

クルミポリフェノール

WALNUT POLYPHENOL

**肝保護・メタボリックシンドローム対応素材
抗酸化素材**

クルミポリフェノール-P10, P30

(粉末, 食品用途)

クルミポリフェノール-WSP10

(水溶性粉末, 食品用途)

クルミポリフェノール-PC10, PC30

(粉末, 化粧品用途)

クルミポリフェノール-WSPC10

(水溶性粉末, 化粧品用途)

クルミポリフェノール-LC

(水溶性液体, 化粧品用途)

クルミ種子油

(油液, 食品・化粧品用途)

オリザ油化株式会社

ver. 1.0 HS

肝保護・メタボリックシンドローム
対応素材，抗酸化素材

クルミポリフェノール

WALNUT POLYPHENOL

1. はじめに

近年，メタボリックシンドロームに対する消費者の関心が高まりつつあります。本症候群は，肥満（特に内臓脂肪蓄積による）に加え，高血糖，高脂血症，高血圧のうち2つ以上の病態が加わった状態を指します。メタボリックシンドロームの予防には，腹腔内に蓄積した脂肪組織を減らし，肥満を解消することが先決です。また肝臓においては，コレステロールや中性脂肪の合成亢進・代謝異常が起きていることから，肝機能を正常に戻す必要があります。

クルミ（*Juglans regia* L.の種子）は，世界中で食されているナッツ類のひとつですが，不飽和脂肪酸であるリノール酸やオレイン酸を多く含むことから，食用油の原料としても用いられています。一方，薬用としては，咳や胃痛の症状改善を目的に伝承的に用いられてきました。近年，クルミの生活習慣病に対する改善効果が数多く発表されています。これらは主に，動脈硬化予防作用や高コレステロール血症改善作用に関するもので，クルミ油の脂肪酸のほかに，ポリフェノール成分の寄与が推測されています。オリザ油化では，ポーラ化成工業との共同研究により，クルミの種皮（薄皮）に含有されるポリフェノール成分の機能性に関する研究を行い，抗酸化活性を有する様々な加水分解型ポリフェノールに，肝保護作用や糖尿病予防作用を見出しました。「クルミポリフェノール」は，肝臓をいたわるメタボリックシンドローム対応素材として，幅広い製品にお使いいただけるものと考えております。



図1．クルミ（*Juglans regia* L.）

2. クルミポリフェノール

クルミポリフェノールは、図 2 に示すように種子の皮の部分にのみ含まれています。その本体は、図 3 に示した加水分解型のポリフェノールで、主なものは表 1 の化合物です。これらは、図 4 に示すように、強い抗酸化活性を示します。

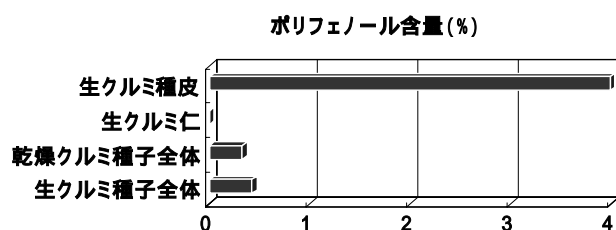


図 2. クルミ種子の部位別ポリフェノール含量 (%)
(Fukuda T. Polyphenols from walnuts: Structures and functions. IFT 2006 Annual Meeting, Orland, Florida, June 24-28, 2006 のスライドより)

表 1. クルミポリフェノールを構成する主なポリフェノール

	(%)
Pedunculagin (1)	16.0
Ellagic acid (5)	15.8
Tellimagrandin I (6)	6.6
Casuarictin (7)	4.1
Tellimagranin II (10)	1.2
Rugosin C (11)	1.8
Casuarinin (12)	1.0

Fukuda T. *et al.*, *BioFactors*, **21**, 251-253 (2004).

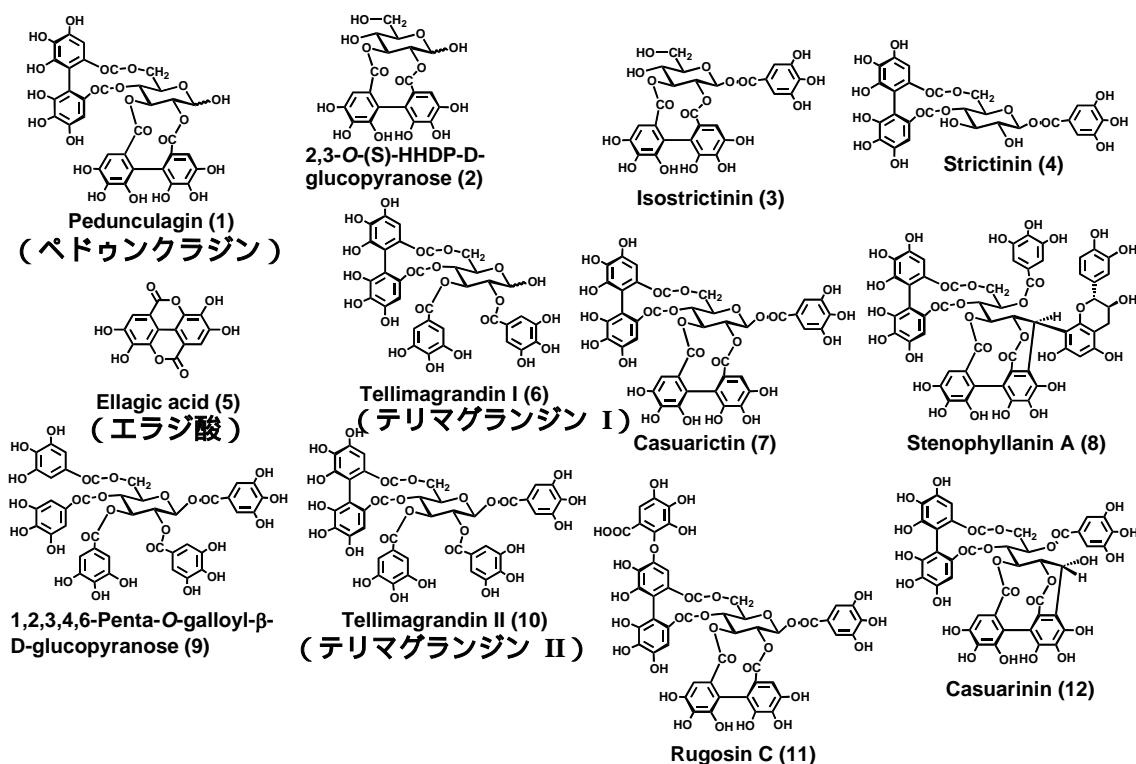


図 3. クルミポリフェノールの化学構造

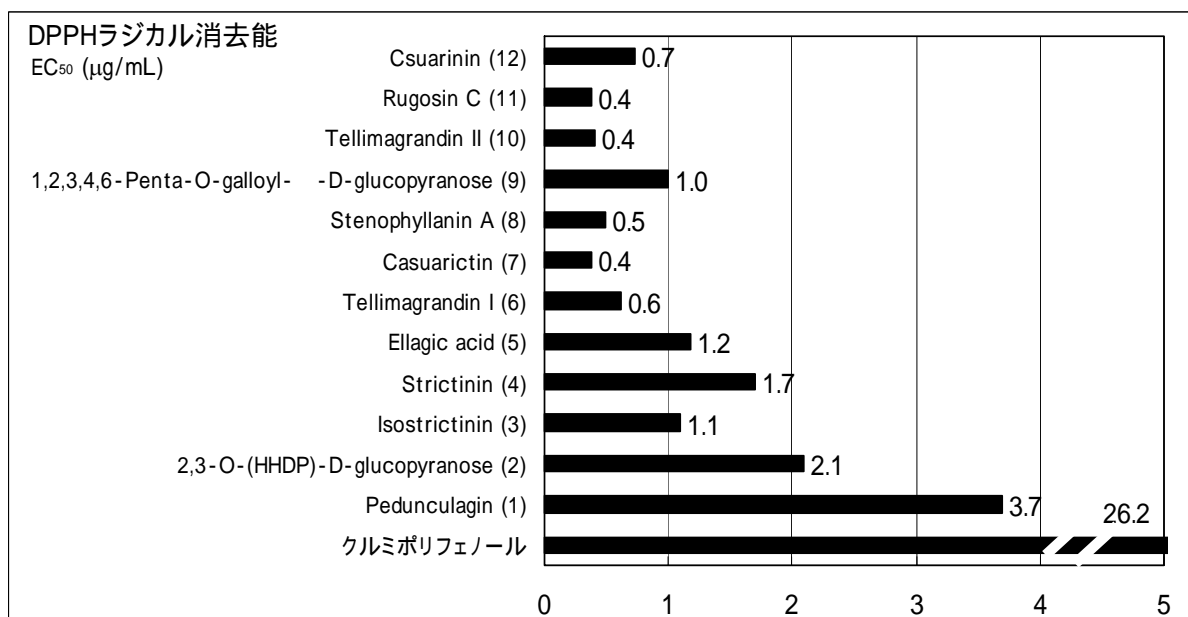
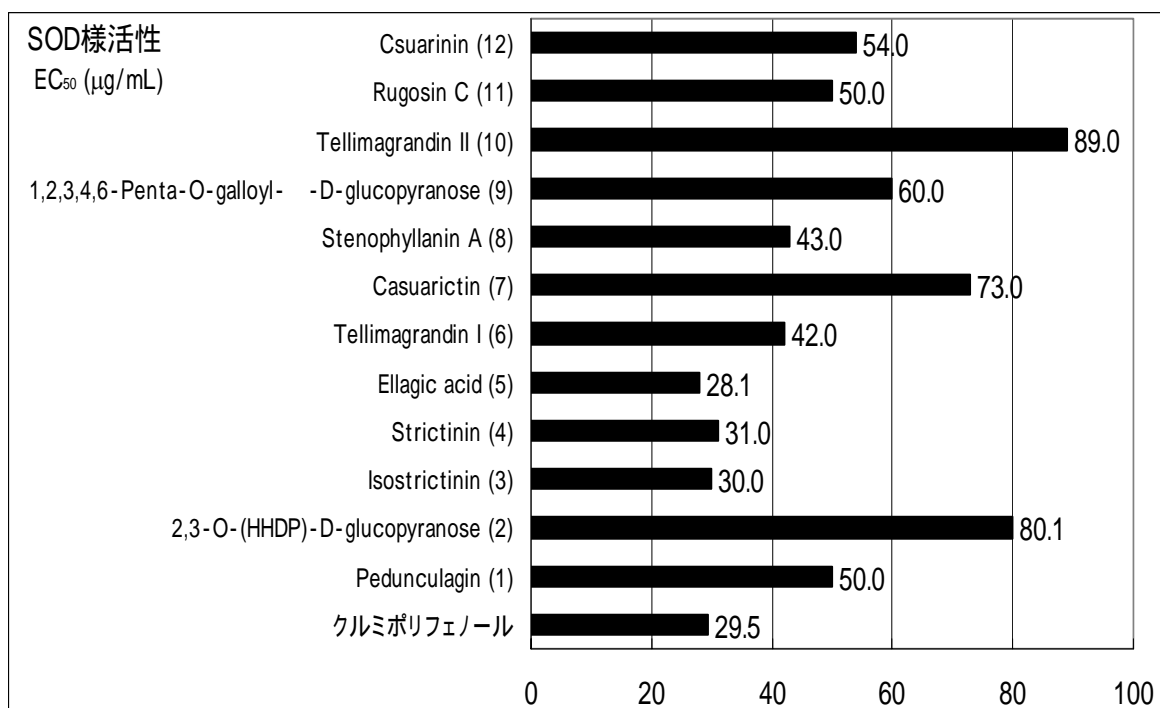


図 4. クルミポリフェノールおよび含有成分の SOD 様活性 (左) および DPPH ラジカル消去能 (右)

Fukuda T., *et al.*, Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry*, **63**, 795-801 (2003).に一部追加
各値は, EC₅₀ (50%作用濃度) で示した。値が低い程活性が強い。

3. クルミポリフェノールの肝保護作用

(1) 動物での評価 (in vivo)

肝臓は、解毒機能や代謝機能を有する臓器ですが、薬品、毒物、ウイルス、アルコールなどの障害因子に、常にさらされています(図5)。本項では、クルミポリフェノールの in vivo での肝保護作用を紹介します。

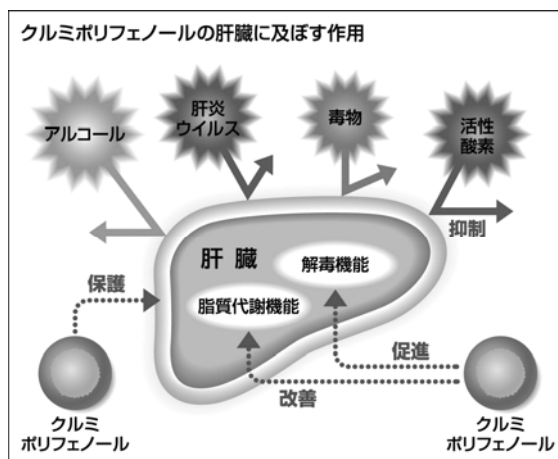


図5. 肝機能と障害物質およびクルミポリフェノールの作用点

1) 四塩化炭素誘発マウス肝障害に対する作用(解毒作用)

クルミポリフェノールの、四塩化炭素から生じるラジカルによる肝障害に対する作用を検討しました。本モデルは、活性酸素や毒物によるヒトの肝炎に相当し、解毒機能の評価が可能なモデルです。実験の結果、肝障害で血中へ逸脱したGOT、GPTの低下が認められ、クルミポリフェノールに肝保護作用があることが判明しました(図6)。この結果から、クルミポリフェノールは、活性酸素や毒物に対する肝保護作用を有することが分かります。また、この作用は、肝保護成分として知られるクルクミンと比較して強い作用でした。

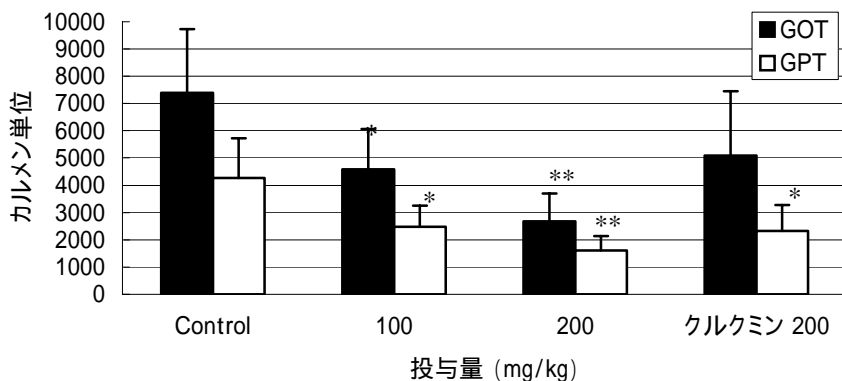


図6. クルミポリフェノールの四塩化炭素誘発肝障害に対する作用 (N=8, 平均値 ± S.E., *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

【方法】

絶食したマウス (ddY, 5 週齢, 雄) にクルミポリフェノールを経口投与し, 1 時間後に 10% 四塩化炭素オリーブ油溶液を背部に皮下投与 (5 mL/kg) した。20 時間後に採血を行い, 血清中の GOT および GPT 濃度を測定した。

2) D-ガラクトサミン誘発マウス肝障害モデル (解毒作用)

続いて, D-ガラクトサミン (D-GalN) による肝障害に対する作用を検討しました。本モデルは, 免疫反応が関与する肝障害で, ヒトのウイルス性肝炎に近い組織像を示すモデルです。 Control 群において D-GalN を投与して 10 時間後に, 肝障害による軽微な GOT, GPT の上昇が認められました (図 7)。これに対し, クルミポリフェノールは, GOT に対しては影響を与えませんでした, GPT の上昇を用量依存的に抑制しました。

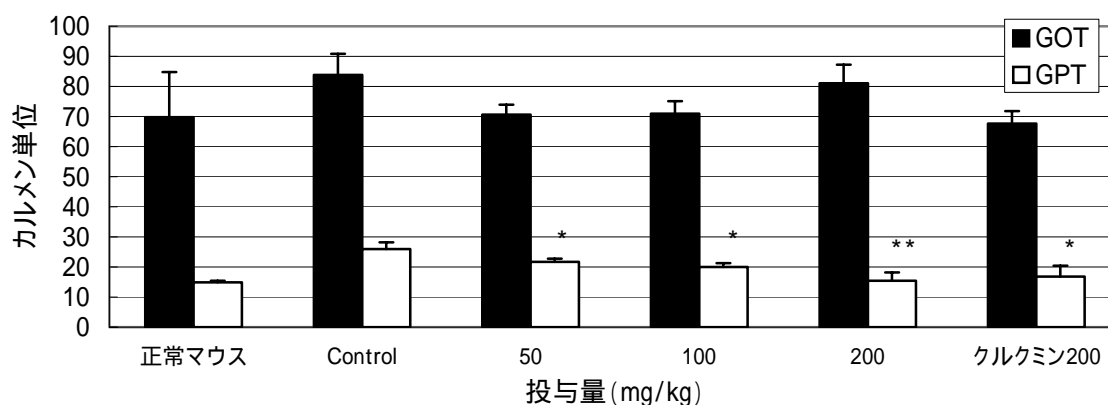


図 7. クルミポリフェノールの D-ガラクトサミン誘発肝障害に対する作用
(N=8, 平均値 ± S.E., *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

【方法】

絶食したマウス (ddY, 5 週齢, 雄) にクルミポリフェノールを経口投与し, 1 時間後に D-GalN (300 mg/kg) を腹腔内投与した。10 時間後に採血を行い, 血清中の GOT および GPT 濃度を測定した。

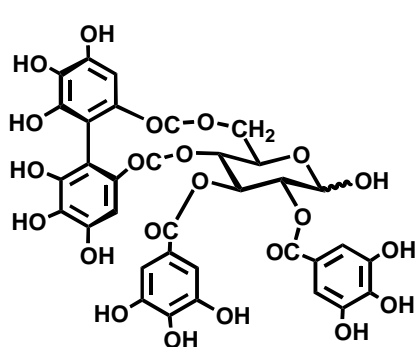
(2) 細胞での評価 (四塩化炭素誘発ラット初代培養肝細胞障害)

クルミポリフェノールを構成する個々の成分について *in vitro* 四塩化炭素肝細胞障害モデルにおける作用を検討しました。実験の結果, tellimagrandin I (6), casuarictin (7), tellimagrandin II (10) および rugosin C (11) に, 比較的強い活性が認められました (表 2)。 Tellimagrandin I (6) は, クルミポリフェノールの中で, 3 番目に多く含まれる成分であることから (表 1), 肝保護作用への寄与が最も高いと考えられます。

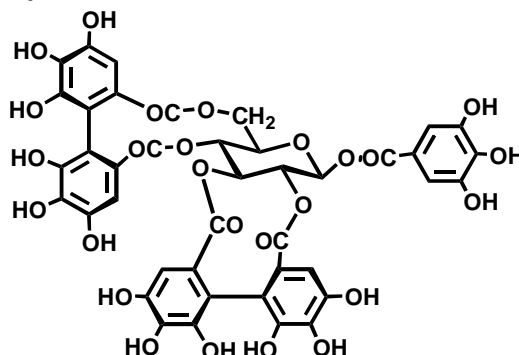
表 2. クルミポリフェノール含有成分の四塩化炭素誘発肝細胞障害に対する作用

	抑制率 (%)		
	10 (μg/mL)	30	100
クルミポリフェノール	7.6 ± 0.2	13.2 ± 0.3	42.1 ± 1.8
Pedunculagin (1)	4.7 ± 0.2	3.4 ± 0.1	15.7 ± 0.7
Ellagic acid (5)	-12.6 ± 0.5	-18.5 ± -1.3	-
Tellimagrandin I (6)	66.7 ± 9.4	53.6 ± 2.8	100.0 ± 6.7
Casuarictin (7)	12.6 ± 0.2	13.9 ± 0.8	48.3 ± 1.9
Tellimagrandin II (10)	35.5 ± 3.2	20.4 ± 1.2	54.8 ± 4.6
Rugosin C (11)	15.8 ± 0.4	36.0 ± 1.4	58.8 ± 0.7
Casuarinin (12)	3.1 ± 0.1	8.9 ± 0.2	12.0 ± 0.6
クルクミン	8.5 ± 0.3	5.9 ± 0.1	-

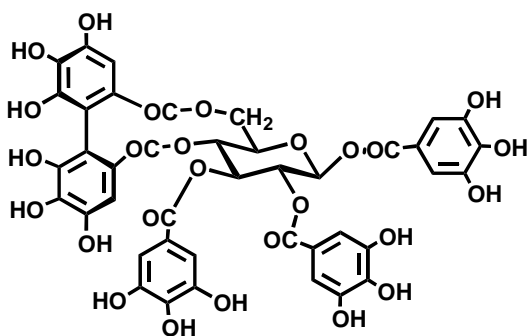
各値は、平均値と S.E. (n=8) で示した。



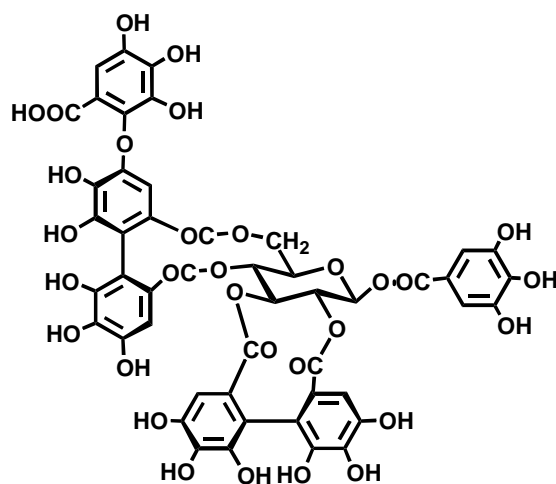
Tellimagrandin I (6)



Casuarictin (7)



Tellimagrandin II (10)



Rugosin C (11)

【方法】

ラットからコラゲナーゼ灌流法により得た肝細胞 (4 × 10⁴ cells/100 μL) を前培養 (4 時間) した後、5 mM 四塩化炭素およびサンプルを含有する培地に交換した。40 時間培養の後、MTTアッセイにより細胞の障害を測定した。

4. クルミのメタボリックシンドローム予防・改善作用

(1) 動脈硬化予防作用

クルミのメタボリックシンドロームに対する作用で、最も有名なものが血中コレステロール改善作用と動脈硬化予防作用です。Ros E.らは、男女高コレステロール血症患者（21名）に1日あたり、8~13個のクルミを4週間摂取させたところ、頸動脈における内皮依存性血管拡張性（EDV）が、有意に改善されたと報告しています（図9）。クルミ油は、不飽和脂肪酸を多く含むナッツであることから（図10）、血中のコレステロールやトリグリセリドをコントロールする効果が期待できます。

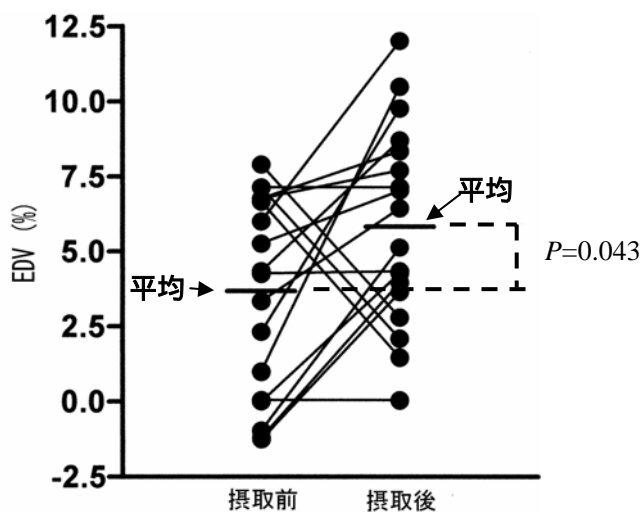


図9. クルミ摂取による動脈硬化予防作用

Ros E. *et al.*, A walnut diet improves endothelial functions in hypercholesterolemic subject. *Circulation*, **109**, 1609-1614 (2004).を和訳

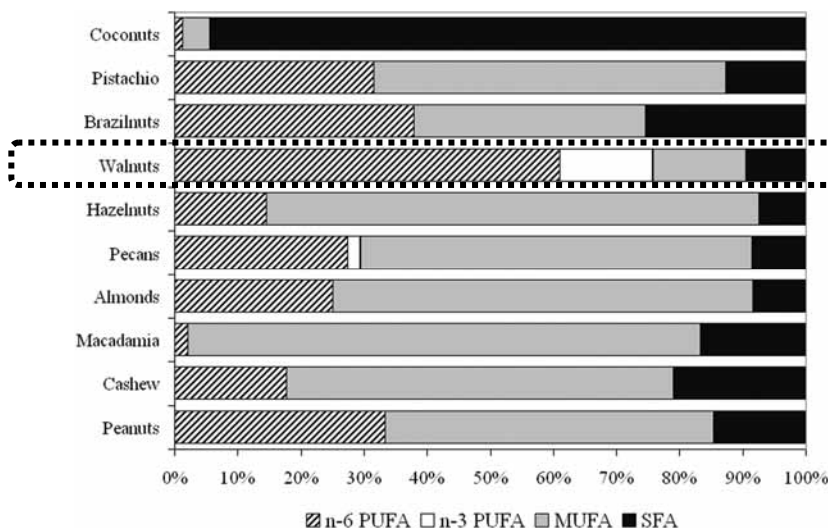


図10. 各種ナッツ類の脂肪酸組成（PUFA: 多価不飽和脂肪酸，MUFA: 一価不飽和脂肪酸，SFA: 飽和脂肪酸）

Mukuddem-Petersen J., *et al.*, A Systematic Review of the Effects of Nuts on Blood Lipid Profiles in Humans. *J. Nutr.* **135**, 2082-2089 (2005).

(2) 高脂血症改善作用

クルミの高コレステロール血症改善作用については、数多くの報告がありますが [(Mukuddem-Petersen J., *et al.*, *J. Nutr.* **135**, 2082-2089 (2005))], なかでも注目すべきは、日本人を対象とした試験です。Iwamoto M.らは日本人健常者男女(40名)に、クルミ含有食(1日当たり43~57gのクルミに相当)を4週間摂取させ、血中のコレステロールを測定しています。試験の結果、男性と比較して女性において、顕著な血中コレステロールの低下がみられたことが報告されています(図11)。

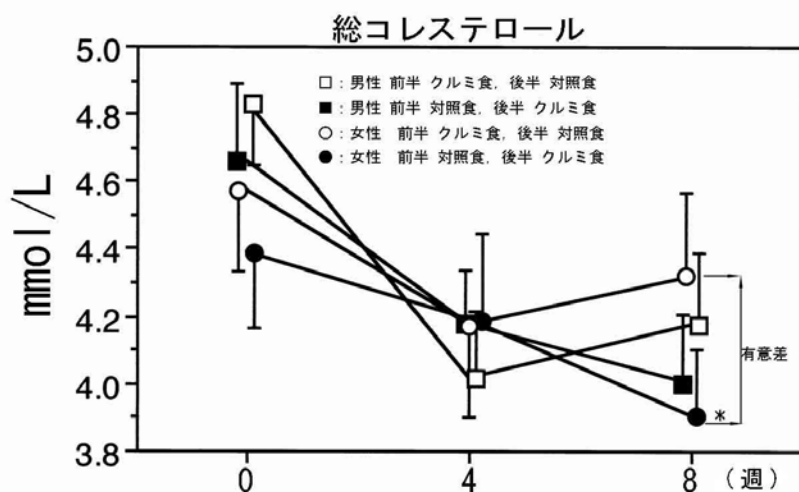
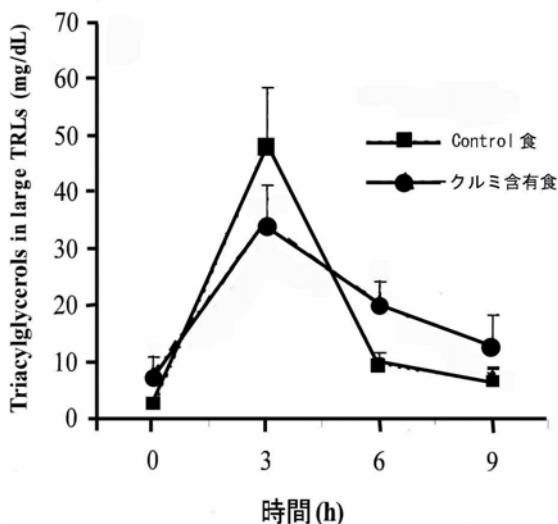


図11. クルミによる血中コレステロール低下作用 (*: $p < 0.05$)

Iwamoto M. *et al.*, Walnuts lower serum cholesterol in Japanese men and women. *J. Nutr.* **130**, 171-176 (2000).を和訳



一方、クルミの中性脂肪に対する作用に関しては、Bellido C. E.らの報告があります。健常者男子(8名)に、脂肪食またはクルミ含有脂肪食を摂取させた後、血中の中性脂肪濃度を測定した結果、大型トリアシルグリセロール高含有リポ蛋白中のトリグリセリド量の上昇が抑制されるという結果が報告されています。

図12. クルミによる食後中性脂肪上昇抑制作用

Bellido C. E. *et al.*, Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor κ B in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**, 1487-1491 (2004).より改変

(3) 糖尿病予防作用

クルミの糖尿病予防作用について、ポーラ化成工業の福田博士は、クルミポリフェノールの成分の糖質分解酵素に対する阻害活性を調べています。

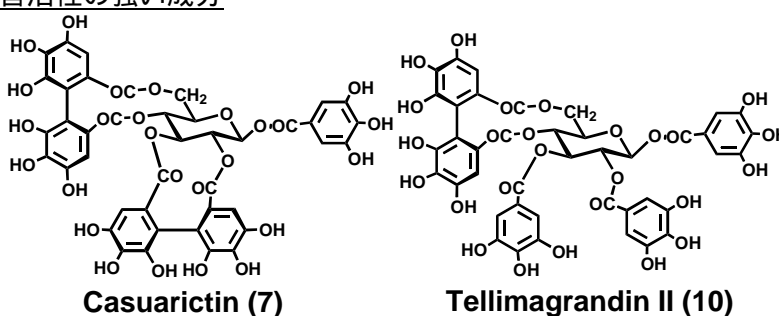
表3に示すように、クルミポリフェノールの成分は、アミラーゼに対する阻害活性が特に強く、なかでも casuarictin (7) と tellimagrandin II (10) の阻害活性が高いことが分かります。また二糖類分解酵素においては、各成分のスクラーゼに対する阻害活性の差はほとんどみられません。マルターゼに対しては tellimagrandins I, II (6, 10) および casuarinin (12) の活性が高いことが分かります。

表3. クルミポリフェノール含有成分の糖質分解酵素阻害活性

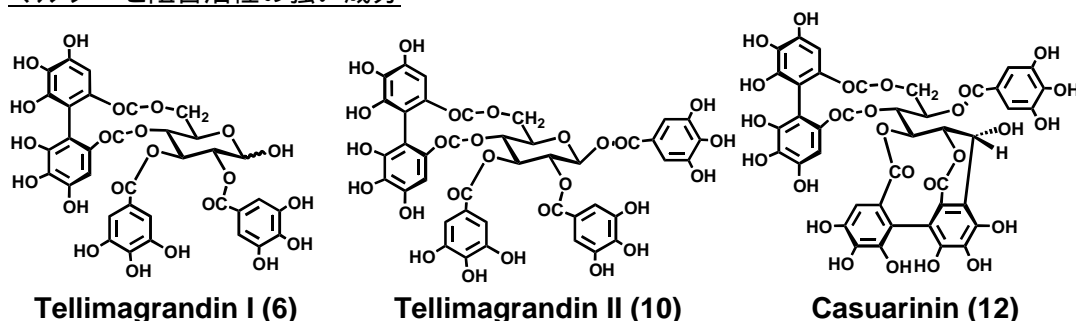
	阻害活性:IC ₅₀ (mg/mL)		
	スクラーゼ	マルターゼ	アミラーゼ
Pedunculadin (1)	0.50	0.70	0.11
2,3-HHDP-Glc. (2)	0.67	0.83	0.13
Isostrictinin (3)	0.41	0.31	0.062
Strictinin (4)	0.26	0.20	0.053
Tellimagrandin I (6)	0.33	0.041	0.013
Casuarictin (7)	0.30	0.18	0.0033
Stenophyllanin A (8)	0.92	0.31	未検討
Tellimagrandin II (10)	0.43	0.025	0.0019
Rugosin C (11)	0.60	0.32	0.017
Casuarinin (12)	0.40	0.046	0.018
クルミエキス	>1	0.40	0.070
クルミエキス合成樹脂非吸着部	>1	>1	>1
クルミエキス合成樹脂吸着部	0.61	0.11	0.011

Fukuda T. Polyphenols from walnuts: Structures and functions. IFT 2006 Annual Meeting, Orland, Florida, June 24-28, 2006. スライドより

アミラーゼ阻害活性の強い成分



マルターゼ阻害活性の強い成分



福田博士らは、クルミポリフェノール濃縮画分 (WPF) の *in vivo* での血糖値上昇抑制作用を、デンプンあるいはショ糖負荷マウスにおいて検討しています。図 13 に示すように、経口投与により緩和な血糖値上昇抑制作用を示すことが分かります。

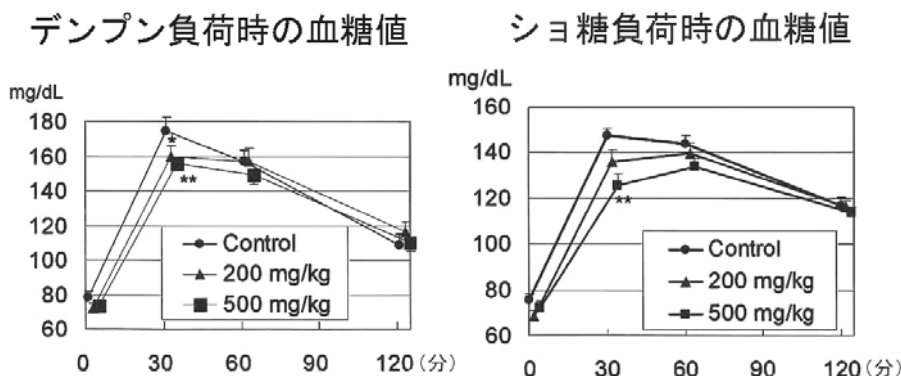


図 13. クルミエキス合成樹脂吸着部 (WPF) の血糖値上昇抑制作用 (平均値 ± S.D., n=23 , * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

絶食したマウス (ddY , 雄 , 10 週齢) から採血を行い , 初期の血糖値を測定した。サンプルを経口投与し , その 20 分後に可溶性デンプン (2 g/kg) または , ショ糖 (2 g/kg) を経口投与した。その後 , 30 , 60 , 120 分後に , 採血を行って血糖値を測定した。

Fukuda T. Polyphenols from walnuts: Structures and functions. IFT 2006 Annual Meeting, Orland, Florida, June 24-28, 2006.スライドより

これらの結果に加え , 同博士らは遺伝性 2 型糖尿病マウス (db/db) において , 血中トリグリセリドや尿中過酸化物を低下させることを見出しています (表 4)

表 4. クルミエキス合成樹脂吸着画分(WPF)の 2 型糖尿病マウスに及ぼす作用

	遺伝系	血糖値 (mg/dL)	コレステロール (mg/dL)	トリグリセリド (mg/dL)	尿中 8-OHdG/creatinine (ng/mg creatinine)
正常マウス	db/+m	25.6 ± 0.8**	63.5 ± 3.2**	69.3 ± 9.3**	84.0 ± 12.4**
Control	db/db	37.4 ± 2.4	103.8 ± 19.1	177.0 ± 59.1	122.5 ± 25.5
WPF	db/db	36.5 ± 2.3	106.7 ± 15.0	121.6 ± 37.0**	94.8 ± 24.9*

N=6-8, 平均値 ± S.D., * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

マウス (C57BL/KsJ-db/db, 9 週齢 , 雄) に , WPF (200 mg/kg) を 4 週間経口投与した。その後 , 8 時間蓄尿した尿中の 8-OHdG を測定するとともに , 絶食下で採血を行い , 血糖値および血中脂質を測定した。

Fukuda T., *et al.*, Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. *BioFactors* **21**, 251-253 (2004).

5. その他の作用

美白作用（メラニン生成抑制作用）

クルミポリフェノールのメラニン生成抑制作用を，メラノーマ細胞を用いて検討しました。常法にしたがって，B16 メラノーマを前培養し，クルミポリフェノール共存下での，メラニン生成量を調べた結果，1～30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において，メラニン生成抑制作用が認められました（図 14）。この作用は，美白成分のアスコルビン酸やアルブチンと比較して，強い作用であることが分かります。

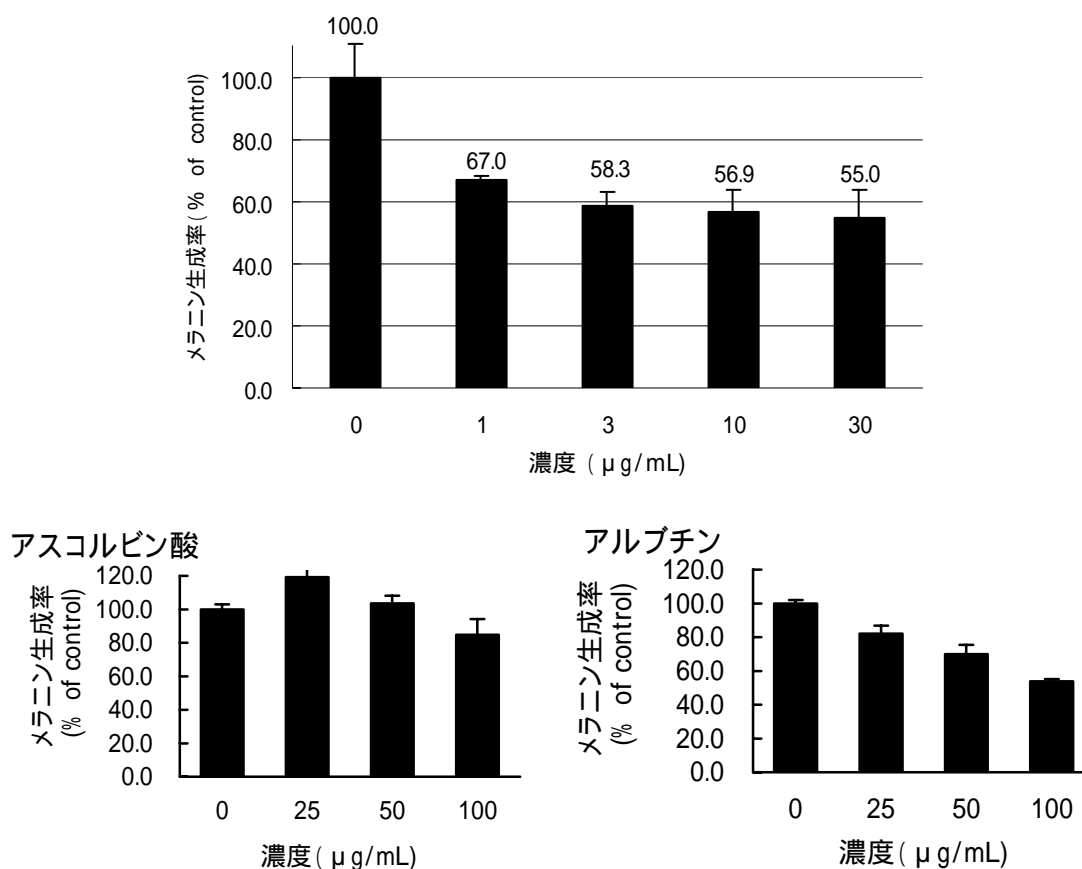


図 14. クルミポリフェノールおよび他美白素材の B16 メラノーマにおけるメラニン生成抑制作用（平均値 \pm S.D., $n=5$ ）

アスコルビン酸およびアルブチンのデータ（平均値 \pm S.E.）: 藍谷教夫, 下田博司 柑橘類エキスの機能性研究について (II) ユズ種子エキスの機能性 ジャパンフードサイエンス 44,58-63 (2005). より

6. クルミポリフェノールの安定性

(1) 熱安定性

クルミポリフェノール（賦形剤未添加品）の熱安定性を検討した結果、100および120の1時間処理で、ポリフェノール含量に差はみられませんでした（図15）。

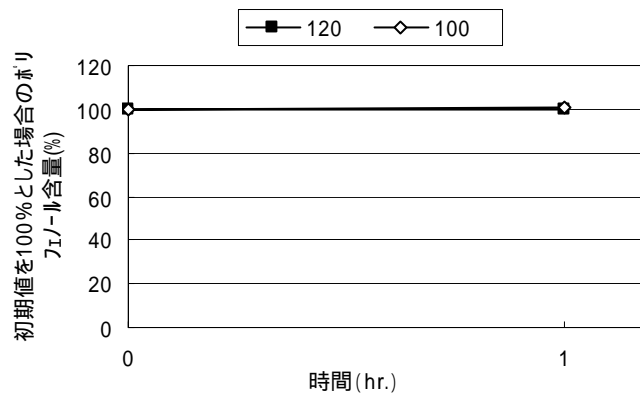


図15．クルミポリフェノールの熱安定性

(2) pH 安定性

各種 pH に調製したクルミポリフェノール（賦形剤未添加品）の0.5%水溶液を作製し、非遮光下、室温で1週間保存後、ポリフェノール含量を測定しました。その結果、酸性から中性領域において安定であることが分かりました（図16）。

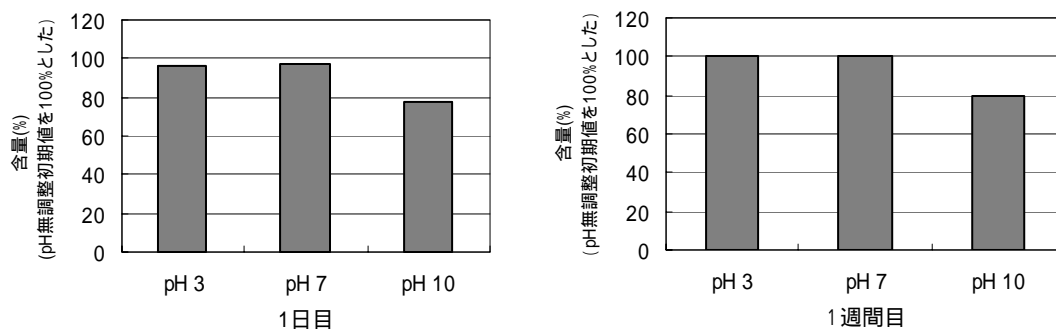


図16．クルミポリフェノールの pH 安定性

7. クルミポリフェノールの栄養成分

分析項目	-P10, -WSP10	-P30, -WSP30	注	分析方法
水分	1.9 g/100g	1.9 g/100g		減圧加熱乾燥法
タンパク質	1.5 g/100g	4.1 g/100g	1	ケルダール法
脂質	14.0 g/100g	37.8 g/100g		酸分解法
灰分	1.7 g/100g	4.5 g/100g		直接灰化法
炭水化物	82.5 g/100g	51.7 g/100g	2	
エネルギー	464 kcal/100g	570 kcal/100g	3	修正アトウォーター
食物繊維	1.2 g/100 未満	3.3 g/100 未満		プロスキー法
ナトリウム	203 mg/100g	549 mg/100g		原子吸光光度法

注1) 窒素・タンパク質換算係数：6.25

注2) 計算式：100 - (水分+タンパク質+脂質+灰分)

注3) エネルギー換算係数：タンパク質 4; 脂質 9; 糖質 4; 食物繊維 2

試験依頼先：エス・アール・エル

試験成績書発行年月日：2006年9月15日

報告書番号：第2006090400032号

7. クルミポリフェノールの安全性

(1) 残留農薬

クルミポリフェノール(賦形剤未添加品)について、食品衛生法および農薬取締法に準じて、447項目の農薬の有無を調べました。その結果、全項目について基準値(検出限界値)以下であることが判明しました。

試験依頼先：株式会社マシス

試験成績書発行年月日：平成18年9月4日

依頼番号：7035

(2) 急性毒性試験(LD₅₀)

医薬品の単回投与毒性試験ガイドラインに従い、動物に負担のかからない許容最大量である2000 mg/kgのクルミポリフェノール(賦形剤未添加品)を、絶食下のddY系雌雄マウス(5週齢)に経口投与し、14日間飼育・観察を行いました。その結果、死亡例や体重推移の異常(対照群との比較)は認められず、試験終了後に行った剖検においても、臓器の肉眼的異常は認められませんでした。したがって、クルミポリフェノールのマウスにおけるLD₅₀値(経口投与)は、雌雄ともに2000 mg/kg以上です。

(3) ヒト摂取試験

社内男性ボランティア4名に、クルミポリフェノール(賦形剤未添加品 50 mg)を1日1回4週間自由摂取させ、摂取前後に以下の項目について血液検査を行いました。その結果、すべての項目について、異常値の発現はみられませんでした。

測定項目：総ビリルビン，総蛋白，アルブミン，AST，ALT，LDH，LAP， γ -GTP，コリンエステラーゼ，アミラーゼ，リパーゼ，L-CAT，LDL-コレステロール，総コレステロール，中性脂肪，リン脂質，遊離脂肪酸，HDL-コレステロール，ナトリウム，カリウム，血清鉄，TIBC，UIBC，尿素窒素，尿酸，血糖，血液一般検査

8. クルミポリフェノールの推奨摂取量

一日あたりクルミポリフェノール-P10または-WSP10として，50～150 mgの使用をおすすめします。

9. 原生薬換算値

1 gのクルミポリフェノールは，200個分のクルミ可食部に相当します。なお，一日あたりの推奨摂取量は，クルミ 10～30個に相当します。

10. クルミポリフェノールの応用例

	利用分野	訴求	剤形
食品	肝保護，メタボリックシンドローム，抗酸化，美容	肝保護およびメタボリックシンドローム，糖尿病，高脂血症，高血圧の予防	飲料（清涼飲料水，ドリンク等），ハードおよびソフトカプセル，タブレット，キャンディー，チューインガム，グミ，クッキー，チョコレート，ウエハース，ゼリー等
化粧品	美白	抗酸化，美白	化粧水，ローション，パック，ボディジェル等