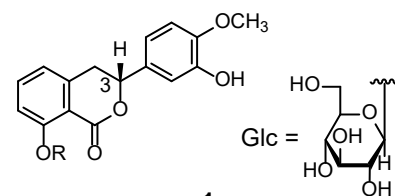


氏名 (生年月日)	つきおか 月岡	じゅんこ 淳子	(1978年11月16日)
学位の種類	博士 (薬学)		
学位記番号	論博薬 第227号		
学位授与の日付	2024年3月16日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	甘味物質フィロズルチンを指標とする甘茶の品質規格化を目指した栽培土壌条件および修治条件に関する検討		
論文審査委員	(主査)	教授	古田 巧
	(副査)	教授	武上 茂彦
	(副査)	教授	南部 寿則

## 論文内容の要旨

### 序章 (はじめに)

近年、糖尿病の有病率の上昇等に伴い、砂糖 (ショ糖) に代わる甘味料の消費量が増加している。その代表例として、カンゾウ抽出物、ステビア抽出物、ラカンカ抽出物があるが、これらの植物由来甘味料は、副作用あるいは栽培地の異常気象による品質、生産量の低下などが懸念されている。著者は、日本原産で江戸時代から食用として利用されてきた生薬甘茶が砂糖の代替甘味料として有望であると考えた。甘茶は、第18改正日本薬局方に収載される生薬で、アマチャ *Hydrangea macrophylla* Seringe var. *thunbergii* Makino (*Saxifragaceae*) (以降、「アマチャ」と表記) の葉及び枝先を通例、揉捻して作られる。甘茶に含有する甘味物質は (*R*)-phyllodulcin (**1**) であり、化合物 **1**



(*R*)-phyllodulcin (**1**): R = H  
 (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**): R = Glc

図1 化合物 **1** および **2** の化学構造

の一部は配糖体 (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) として存在する。化合物 **2** はそのままでは甘味を呈さないが、アマチャ葉を加工調製 (修治) する過程で、**2** から甘味物質 **1** が生成することが知られている。**1** および **2** は、栽培環境や修治によって含有量の変動が予想されるが、甘茶に関してこれらの物質の含有量に関する明確な規格は特になく、甘茶のさらなる活用のためには、品質の規格化が必須である。上述の背景のもと、本研究では、甘茶の品質規格化のため、甘味物質 (*R*)-phyllodulcin (**1**) を指標とし、栽培土壌条件および修治条件について検討した。

## 第一章 栽培土壌の pH 値がアマチャの生長と含有成分に与える影響

評価の指標として化合物 **1** を用いるために、甘茶の甘味度と **1** の含有量の関連について検証した。甘味度は、甘味料の甘さを表す指標の一つで、人による官能評価により判定され、通常、ショ糖の甘さを 1 としたときの相対値で表される。甘茶抽出液（甘茶葉 3g/L）は、2.0% ショ糖水溶液と同程度かそれよりも甘いという官能評価結果と、甘茶抽出液中の **1** の含有量（ $40.6 \pm 0.13$  mg/L）および **1** の甘味度（約 435）から、甘茶の甘味の本質は **1** であると判断し、**1** を指標とすることに決定した。アマチャは、一般に栽培が容易で、多くの植物が生育障害を受ける酸性土壌での栽培にも適応している。しかし、土壌の酸性度とアマチャ葉部の甘味物質の関連についてはほとんど報告がない。そこで、土壌 pH 値と生育・収穫量、**1** 含有量の関連を明らかにした。赤玉土、鹿沼土、腐葉土、牛糞堆肥を配合した培土を基本とし、ピートモスと苦土石灰を施用することで、pH 5.0-7.5 の範囲で 0.5 おきに 5 段階の処理区を設けた。各処理区の土壌をポットに充填し、京都薬科大学薬用植物園で栽培するアマチャから挿し木増殖させた苗木を植え付け、生育（樹高）、収穫量（葉の枚数、葉の乾燥重量）を比較した。その結果、pH 5.0-5.5 の土壌で 2 年間生育した個体では、他条件と比較して葉の乾燥重量が少なかった。さらに、**1**、**2** 含有量を定量分析したところ、pH 5.0-5.5 の土壌で生育したアマチャの葉では、他条件で生育した個体よりも **1**、**2** の含有量が著しく低くなることが分かった。

## 第二章 修治がアマチャ葉部の含有成分に与える影響

8 ~ 9 月頃に収穫された葉は、一度乾燥させた後に再び水を噴霧してむしろをかぶせ、1 日程度放置して 25℃程度に上昇した後、揉捻して乾燥させる。この修治の過程で、アマチャ葉に含まれる酵素による反応（発酵）で化合物 **2** から化合物 **1** が生成する。しかし、発酵温度や時間について明確には定められていない。**2** から **1** への変換が、甘味物質の生産には不可欠であることから、発酵温度・時間と **1**、**2** の含有量変化の関連について検討した。発酵温度（15℃、25℃）と発酵時間（0, 6, 24, 48 時間）を変えた条件で修治した加工葉中の **1**、**2** を定量比較した。発酵時間の経過とともに、**2** が減少し、**1** が増加することが確認され、発酵温度 15℃、25℃のいずれの場合においても、発酵開始から 24 時間で **2** がほぼ分解されたことが示唆された。また、アマチャ花部には青酸配糖体 taxiphyllin (**3**) が含有することが報告されていることから、アマチャ葉部の化合物 **3** の含有について調査し、さらに、修治による **3** の変化を明らかにした。**3** の含有量は、栽培中に経時的に増加することが確認されたが、24 時間発酵後には検出されず、修治によって分解されたことが示唆された。

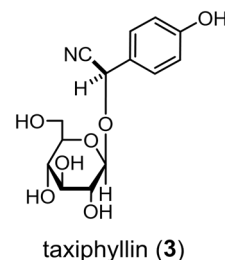


図 2 化合物 **3** の化学構造

## 第三章 アマチャ葉部由来カルスにおけるジヒドロイソクマリン類生成条件の検討

品質評価において化合物 **1** を指標とするとき、標準物質が必要になる。また、現在、甘味料として使用される際には粉末やエキスの形で使用されているが、ステビア葉のステビオシ

ドのように、物質レベルでの **1** の利用も可能だと考えた。しかし、植物から **1** を単離精製するには、大量の原料植物を必要とすることや煩雑な工程が必要なことから、組織培養でカルスを誘導し、カルスを用いた物質生産の可能性を検討した。植物から脱分化したカルスは、培養条件の調節によって二次代謝産物を生成することが知られている。培地に添加する植物ホルモンの種類や濃度によって、各種の二次代謝産物の生成が報告されていることから、植物ホルモンに着目して **1**, **2** の生成条件を検討した。アマチャ葉部からカルスを誘導し、添加する植物ホルモンの種類や濃度を変化させた培地で2か月間培養した後、LC-MS で定量分析を行った。その結果、**2** は乾燥カルスから最大 0.044%の重量収率で得られ、**1** は微量ながらその生産を確認することができた。なお、ジヒドロイソクマリン hydrangenol 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside はアマチャ葉とほぼ同等の収率で得ることができた。

### 総括（結論）

第一章では、栽培土壌の pH 値がアマチャの収穫量および化合物 **1**, **2** 含有量に影響を与えることを見出した。植物由来の生薬は、ほとんどが自然環境下で産出され、品質にばらつきが生じることも多い。薬効成分を指標に、栽培土壌 pH 値の適正範囲を明らかにすることは、生薬生産の根幹をなす栽培適地の選定に有用な知見である。また、第二章では、化合物 **2** が **1** に変換される修治条件（温度、時間）を明らかにした。古くからの加工・利用の経験に基づいて確立されてきた修治を物質レベルで検証することは、修治の効果、国産生薬の高い品質を再確認するだけでなく、最小限の必須条件を明確にすることで修治の省力化さらには機械化につながる。さらに、第三章では、アマチャ葉部由来カルスを用いて、微量ながら **1** の生産を確認した。含有する植物種が限定される物質のカルスを用いた効率的生産は、植物由来の有用物質の活用を推進するものと期待される。以上、本研究で得られた知見は、物質レベルでの甘茶の品質確保のみならず、供給の安定化にも貢献し、急務とされる生薬の国産化に寄与するものである。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

近年、ショ糖に代わる甘味料の使用量が増加しているが、植物由来甘味料に関しては異常気象による品質や生産量低下などが懸念されている。今後もショ糖の代替甘味料の需要拡大が予測される中、申請者は、日本原産の生薬甘茶が代替甘味料として有望であると考えた。甘茶に含有する甘味物質は (*R*)-phyllodulcin (**1**) で、化合物 **1** の一部は配糖体 (3*R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) として存在する。化合物 **2** はそのままでは甘味を呈さないが、修治の過程で **2** から甘味物質 **1** が生成することが知られている。**1** および **2** は、

栽培環境や修治によって含有量の変動が予想されるが、現在、**1**、**2** 含有量に関する明確な規格はない。本研究では、甘茶の活用に向けた品質規格化のため、**1** を指標として栽培土壌条件および修治条件について検討した。

#### 《審査結果の要旨》

##### (1) 栽培土壌の pH 値がアマチャの生長と含有成分に与える影響

品質評価の指標として **1** を用いるために、甘茶の官能評価と甘茶中の **1** 含有量の定量分析を行い、甘味の本質が **1** であることを明確に示した。アマチャが属するアジサイ属植物は、pH 4.0-7.5 の土壌で生育が良好とされるが、土壌 pH 値が生長や含有成分に与える影響についてほとんど報告がないことから、土壌 pH 値と生育・収穫量、**1** 含有量との関連を検討した。pH 5.0-7.5 の範囲で pH 値を調節した 5 種類の土壌を用いて、挿し木増殖させた苗木を栽培し、生育（樹高）、収穫量（葉の枚数、乾燥重量）を比較、さらに葉部の **1**、**2** 含有量を定量分析した。その結果、pH 5.0-5.5 の土壌で 2 年間生育した個体では、他条件に比べて葉の乾燥重量が少なく、**1**、**2** 含有量が著しく低くなることを明らかにした。

##### (2) 修治がアマチャ葉部の含有成分に与える影響

甘茶は、アマチャの葉及び枝先を通例、揉捻して作られる。この修治の過程で、アマチャ葉部に含まれる酵素による反応（発酵）で **2** から **1** が生成するが、発酵温度や時間について明確には定められていないことから、発酵温度・時間と **1**、**2** の含有量変化について検討した。発酵温度（15、25℃）と発酵時間（0、6、24、48 時間）を変えた条件で修治した加工葉中の **1**、**2** を定量比較した結果、発酵温度 15、25℃において、発酵開始から 24 時間で **2** がほぼ分解され、**1** に変換されることが明らかになった。また、アマチャ葉部における青酸配糖体 taxiphyllin (**3**) の含有について調査し、さらに、修治による **3** の変化を検討した結果、葉部に含まれる **3** は 24 時間発酵後には検出されず、修治によって分解されたことを示した。甘茶の生産で不可欠な **2** から **1** へ変換する発酵温度と時間を明らかにするとともに、青酸配糖体 **3** に対する修治の効果を明らかにした。

##### (3) アマチャ葉部由来カルスにおけるジヒドロイソクマリン類生成条件の検討

植物から脱分化したカルスは、培養条件や培地に添加する植物ホルモンの種類や濃度によって、各種の二次代謝産物を生成することが報告されている。アマチャ葉部からカルスを誘導し、インドール-3-酢酸 0.5 mg/L とベンジルアデニン 1.0 mg/L を添加した培地で 2 か月間培養した後、定量分析を行った結果、**2** は乾燥カルスから最大 0.044% の重量収率で得られ、微量ながら **1** の生産を確認した。

#### 《結論》

申請者は、甘味物質 **1** を指標とする甘茶の品質規格化を目指し、アマチャの栽培土壌条件、修治条件の検討を行い、土壌 pH 値が収穫量および **1**、**2** 含有量に影響を与えることを見出した。また、**2** が **1** に変換される修治条件（温度、時間）を明らかにした。さらに、アマチャ葉部由来カルスを用いて **1** の生産を確認した。含有する植物種が限定される物質のカルスを用いた効率的生産は、植物由来の有用物質の活用を推進するものと期待される。

植物由来の生薬は、ほとんどが自然環境下で産出され、品質にばらつきが生じることも多い。薬効成分を指標とした、栽培土壌 pH 値の適正範囲や修治条件の明確化は、物質レベルでの甘茶の品質確保、供給の安定化に貢献するものである。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。