

2023 年度 論文博士学位論文

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

月岡 淳子

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

[1] Junko Tsukioka, Seikou Nakamura. Comparison of growth in *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* grown in different soil pH and quantitative analysis of its sweetness-related constituents. *Chem. Pharm. Bull.* **2023**, 71, 368-373. <https://doi.org/10.1248/cpb.c23-00084>

[第一章, 第二章第二節]

[2] Junko Tsukioka, Yutaro Ohki, Momona Nakao, Seikou Nakamura. Quantitative analysis of taxiphyllin, a cyanogenic glycoside, in the leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*., *J. Nat. Med.* **2023**, 77, 978-985.

[第二章]

[3] Junko Tsukioka, Tomoka Takami, Yuki Ario, Seikou Nakamura. Production of dihydroisocoumarins by callus induction from *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **2023**, 71, 832-837. <https://doi.org/10.1248/cpb.c23-00499>

[第三章]

## 目次

序論.....	1
本論.....	5
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.....	5
第一節 甘茶官能評価と甘茶含有 ( <i>R</i> )-phyllodulcin (1) の定量分析による甘茶甘味度評価..	5
第二節 土壌 pH 値がアマチャの生長に与える影響.....	6
第三節 土壌 pH 値がアマチャ葉部の ( <i>R</i> )-phyllodulcin (1) および ( <i>3R</i> )-phyllodulcin 8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (2) 含量に与える影響.....	10
第一項 ( <i>R</i> )-phyllodulcin (1) および ( <i>3R</i> )-phyllodulcin 8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (2) の 定量分析条件の検討.....	10
第二項 土壌 pH 値がアマチャ葉部に含まれる ( <i>R</i> )-phyllodulcin (1) および ( <i>3R</i> )-phyllodulcin 8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (2) の含量に与える影響.....	12
小括.....	14
第二章 修治がアマチャ葉部の含有成分に与える影響.....	15
第一節 修治による ( <i>3R</i> )-phyllodulcin 8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (2) の変化.....	15
第二節 青酸配糖体 taxiphyllin (5) 含量の定量比較および修治が 5 含量に与える影響 ....	17
第一項 葉の大きさ, 色, 部位別, 収穫時期別 taxiphyllin (5) 含量の定量比較 .....	17
第二項 土壌 pH 値別栽培アマチャ葉部の taxiphyllin (5) 含量の定量比較 .....	22
第三項 修治による taxiphyllin (5) の含量変化 .....	23
小括.....	24
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.....	25
第一節 培地に添加する植物ホルモンがカルス誘導およびカルスの増殖に与える影響 ....	25
第二節 カルスで生成するジヒドロイソクマリン類の定量比較 .....	30
第一項 ジヒドロイソクマリン類の定量分析条件の検討 .....	30
第二項 カルスで生成するジヒドロイソクマリン類の定量比較 .....	33
小括.....	37
結論.....	38
謝辞.....	39
実験の部.....	40
第一章の実験 .....	42
第二章の実験 .....	52
第三章の実験 .....	57
引用文献.....	61

## 序論

近年、糖尿病の有病率の上昇や健康志向の高まりに伴い、砂糖（ショ糖）に代わる甘味料の消費量が増加している。代替天然甘味料の代表例として、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、連用による副作用や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。今後も代替甘味料の需要拡大が予測される中、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。甘茶のさらなる活用には、安定した品質の確保が重要であるが、現在、甘茶の品質評価に用いることができる明確な規格が無いことから、品質の規格化が最優先事項であると考えた。

甘茶は、第18改正日本薬局方<sup>1)</sup>に収載される生薬で、家庭薬の矯味料、口腔清涼剤などに使用されるほか、甘茶の粉末やエキスは甘味料として食品に利用される。日本では、4月8日の灌仏会（花まつり）の際、寺院において、誕生仏に甘茶の煎じ液をかけて祝い、参拝者にふるまわれるなど、飲用としての利用も多い。甘茶は、アマチャ *Hydrangea macrophylla* Seringe var. *thunbergii* Makino（以降、「アマチャ」と表記する）の葉を通例、揉捻したものである<sup>1)</sup>。アマチャに含まれる甘味物質は (*R*)-phyllodulcin (**1**) で、その一部は (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) として植物体に含まれており<sup>2,3)</sup>、アマチャの葉を収穫後に加工調製（修治）する過程で、化合物 **2**（配糖体）から化合物 **1** が生成することが知られている<sup>3-6)</sup>。化合物 **1** は、*in vitro* 脂質過酸化アッセイにより、NADPH 誘導マイクロソーム脂質過酸化およびフェントン型反応に対して抗酸化作用を示すことが明らかにされているほか<sup>7)</sup>、化合物 **1** および hydrangenol (**3**) は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) のスパイクタンパク質とアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) との結合を阻害することが報告されている<sup>8)</sup>。



Fig. 1. 甘茶

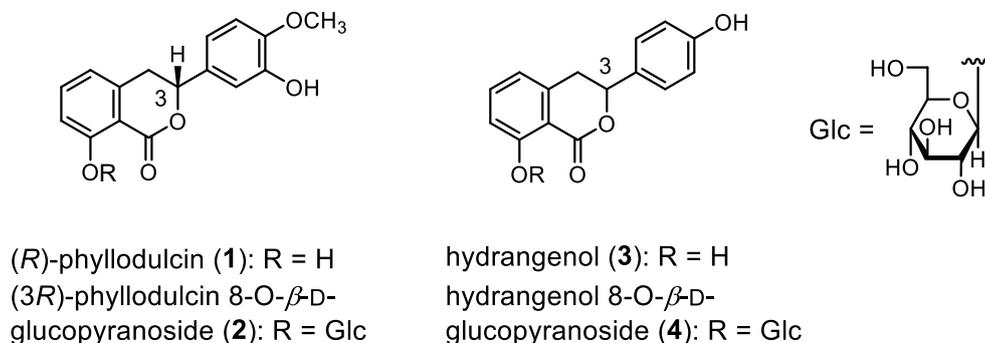


Fig. 2. 化合物 **1** - **4** の化学構造式

甘茶の基原植物であるアマチャは、ユキノシタ科（APG:アジサイ科）アジサイ属植物で、関東や中部地方に分布するほか、甘茶の生産を目的に岩手県、長野県、奈良県、高知県などで栽培される<sup>9)</sup>。高さ70cmほどの落葉性低木で、5月から7月頃に枝先に散形花序をつけ、花序の外縁には、がく片が大きく発達した装飾花が目立つ<sup>10,11)</sup>。他のアジサイ属植物同様、大型の花序が美しい植物で、栽培は比較的容易とされる。



Fig. 3. アマチャ（ユキノシタ科）

アマチャを含むアジサイ属植物は、土壌 pH4.0-7.5 での生育が良好とされる<sup>12)</sup>。一般に、酸性土壌においては土壌に含まれるアルミニウムが遊離し、植物生長に阻害的に働くとされているが<sup>13,14)</sup>、アジサイ属植物は液胞内部にアルミニウムを蓄積することで無毒化する、アルミニウム耐性植物である<sup>15)</sup>。そのため、アジサイ属植物であるアマチャは、酸性土壌の占める割合が大きい日本においても問題なく生育すると考えられる。一方、アジサイ品種の花（がく片）の色は赤、青、紫色など多彩で、これらの色は土壌条件によって変化すると考えられ、土壌 pH と花（がく片）色の関係や、花（がく片）の発色機構について報告されている<sup>16,17)</sup>。土壌 pH 値と花（がく片）色に関する報告は多いが、土壌 pH 値が葉の含有成分に与える影響についての報告はほとんどない。がく片は花を構成する要素の中でも、葉に近い性質を持つとされることから、がく片の色に変化が起きる状況下では、葉の含有成分にも影響を及ぼす可能性があると考えた。

アマチャの葉を甘茶として利用するために、収穫後の葉は修治される。通常、8月から9月ごろに採取した葉を、乾燥させた後（一次乾燥）、水を噴霧して、むしろをかぶせて1日程度放置し、25℃程度に上昇した後、むしろに広げて揉捻して乾燥させる（二次乾燥）。実際は、一次乾燥の程度や、揉捻の工程の有無などに違いがある複数の加工方法が知られている<sup>18)</sup>。この修治の過程で、植物内で一部が配糖体（2）として存在する化合物 1 が、アマチャの葉に含まれる酵素による反応（発酵）で生成する<sup>3)</sup>。発酵温度や発酵時間が化合物 1, 2 に与える影響についての報告はほとんどないが、アマチャの葉に含まれる化合物 2 が化合物 1 に完全に変換される条件が、甘味物質の生産には重要であると考えた。

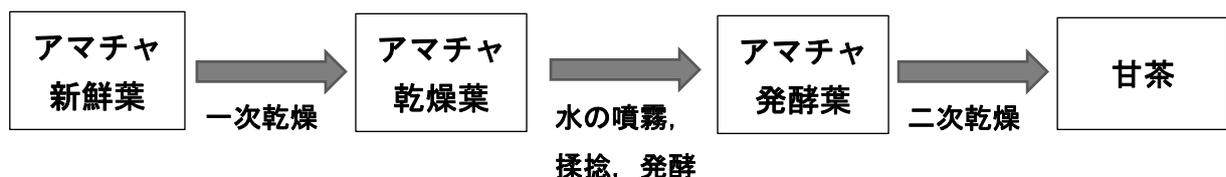
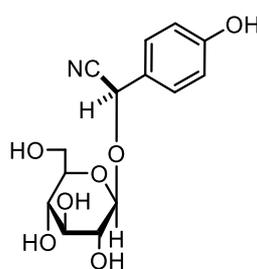


Fig. 4. アマチャの加工調製（修治）

このような背景から、栽培土壌条件（土壌 pH 値）と修治条件（発酵温度，発酵時間）が、甘茶の含有成分を変動させることが予想された。

栽培土壌条件，修治条件が含有成分に与える影響を検討するにあたり，まず，化合物 **1** と甘茶の甘さとの関連について検討した．化合物 **1** は甘茶に含まれる甘味物質で，その甘味度は約 435 とされる<sup>19)</sup>．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って判定され，通常，ショ糖の甘さを 1 としたときの相対値で表される．このことから，化合物 **1** は甘味の強い物質であることがわかるが，甘茶そのものの甘さと化合物 **1** の含量の関連については明確にされていない．そこで，甘茶官能評価と甘茶抽出液中の化合物 **1** の定量分析を行うことで，甘茶の甘味の本質は化合物 **1** であると判断し，評価の指標として用いることにした．

甘茶は，飲用，甘味料として利用されているが，近年，甘茶の飲用による食中毒事例が報告されている．2010 年，神奈川県で花まつり（4 月 8 日）に参加した小学校 1 年生が，甘茶を飲み，悪心や嘔吐の症状が出た．幸い，重篤な症状には至らなかったが，食中毒事故として処理され，原因が調査された．アマチャに含まれる毒性物質の関与が疑われたが，これまでのところ食中毒の原因物質の特定には至っていない<sup>20)</sup>．甘茶を甘味料として利用するとき，粉末やエキスの形で利用されることから，食中毒の原因となる可能性がある物質について明らかにする必要がある．これまで，アジサイ属植物には，青酸配糖体やアルカロイドの含有が知られており，アマチャ花部には青酸配糖体 **taxiphyllin (5)** が含有することが報告されている<sup>21)</sup>．そこで，アマチャ葉部の化合物 **5** の含有について調査した．また，配糖体である化合物 **5** が，修治によって変化する可能性があると考え，未修治葉と修治葉で化合物 **5** の含量を比較検討した．



taxiphyllin (**5**)

Fig. 5. taxiphyllin (**5**) の化学構造式

甘茶の品質評価にあたり，甘味物質である化合物 **1** の含量を指標することは有効な手段と考えるが，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，甘茶が甘味料として利用される際には粉末やエキスの形で使用されているが，ステビアのステビオシドのように，物質レベルでの化合物 **1** の利用の可能性を考えた．しかし，植物から化合物 **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になる．そこで，

天候などの自然環境や病害虫の影響を受けず，省スペースで安定的，効率的生産を可能にする方法として期待されるカルスを用いた物質生産を考えた．植物の組織培養で誘導されたカルス（不定形の細胞塊）は，植物の大量生産や有用物質生産に利用され，培養条件（栄養，光，温度，植物ホルモンなど）の調節により，種々の二次代謝産物を生成することが知られている<sup>22-25</sup>．例えば，ムラサキ（ムラサキ科）由来カルスからは，シコニンの生成に成功し，実用化もされている<sup>22</sup>．そこで，アマチャ葉からのカルス誘導や二次代謝産物の生成に関わる因子として，培地に添加する植物ホルモンの影響を検討した．

# 本論

## 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

### 第一節 甘茶官能評価と甘茶含有 (*R*)-phyllodulcin (**1**) の定量分析による甘茶甘味度評価

一般に製造・販売されている甘茶を用いて官能評価を行い、甘茶の甘味度と、甘茶に含まれる化合物 **1** の含量との関連について検討した。

官能評価とは、人間の感覚（視覚・聴覚・味覚・嗅覚・触覚など）を用いて、対象の物品を検査・評価する方法で、甘味料の甘さの指標として用いられる値が「甘味度」である。通常、ショ糖 (Sucrose) の甘さを 1 としたときの相対値であらわされ、化合物 **1** の甘味度は、約 435 倍とされる<sup>19)</sup>。

甘茶の官能評価は、株式会社ハウス食品分析テクノサービス官能評価有資格者 8 名によって実施された (株式会社ハウス食品分析テクノサービス〈関西事業所〉にて実施)。官能評価では、甘茶抽出液 (甘茶葉 3.0 g/L) と、濃度を変化させたショ糖溶液 (2.0%, 4.0%, 6.0%) を準備し、甘茶抽出液の甘味と同等と感じる濃度のショ糖溶液を選択する方法で実施された。その結果、8 名が甘茶抽出液 (甘茶葉 3.0 g/L) は 2.0% ショ糖溶液と同程度かそれよりも濃いと回答した。

なお、官能評価に用いた甘茶抽出液の濃度 (甘茶葉 3.0 g/L) は、甘茶の飲用に適当とされる濃度を参考に著者が設定した。

次に、官能評価に用いた試料と同一ロットの試料を用いて、官能評価と同様の手順で抽出した甘茶抽出液 (甘茶葉 3.0 g/L 水) 中の化合物 **1** の含量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量分析したところ、 $40.6 \pm 0.13$  mg/L (収率: 1.35%) であった。つまり、化合物 **1** を  $40.6 \pm 0.13$  mg/L 含む甘茶は、20 g/L のショ糖溶液と同等もしくはそれ以上に甘いということになり、化合物 **1** 単独の甘味度 (約 435) を考慮したとき、甘茶の甘味の本質が化合物 **1** であることが示唆された。以上の結果より、甘茶の品質評価において、化合物 **1** を指標とすることにした。

## 第二節 土壌 pH 値がアマチャの生長に与える影響

アマチャの苗木を土壌 pH 値が異なる 5 種類の土壌で栽培し、土壌 pH 値が生育（樹高）および収穫量（葉の枚数、葉の乾燥重量）に与える影響を検討した。

苗木は、京都薬科大学薬用植物園（京都市伏見区日野林）で栽培するアマチャから枝を採取し、挿し木によって増殖させた。試験に用いた 15 本の苗木の高さは 23.5-27.6 cm、葉の枚数は 23 - 34 枚の範囲であった。

試験土壌として用いた土壌は、5 種類 [土壌 1 : pH7.0-7.5, 土壌 2 : pH6.5-7.0, 土壌 3 : pH6.0-6.5, 土壌 4 : pH5.5-6.0, 土壌 5 : pH5.0-5.5] であった。[土壌 2] は、赤玉土、鹿沼土、腐葉土、牛糞堆肥を体積比で 3 : 3 : 2 : 2 の割合で混合したものである。土壌 1 は、[土壌 2] に苦土石灰を混合して調製した。土壌 3, 土壌 4, 土壌 5 は、[土壌 2] に体積比で 30%, 50%, 70%のピートモス (pH4.0) を混合して調製した。試験土壌 (土壌 1-5) を黒色ビニールポットに充填し、苗木を 1 本ずつ植えた。各土壌条件につき、3 個のポット (ポット 1-3) を用意した。2015 年 4 月から 2016 年 10 月まで (18 か月間) 栽培した。途中、2016 年 6 月、2015 年と同じ土壌を用いて黒色ビニールポットに植え替えた。なお、試験土壌の pH 値は、試験期間中、約 2 - 4 週間に 1 回測定し、それぞれ設定した pH 値の範囲内であることを確認した。

樹高は、試験期間中、毎月 1 回程度測定した。収穫量 (葉の枚数、葉の乾燥重量) は、2015 年 10 月と 2016 年 10 月に調査した。

土壌 1 (pH7.0-7.5) で生育した個体は、1 年目は樹高がほぼ変化せず、試験開始から 6 か月後の樹高は、5 条件の中で最も低かった。2 年目 (試験開始から 18 か月後) の樹高に関しては、土壌条件間において有意差はなかった (Fig. 7)。葉の乾燥重量について、土壌 1 (pH7.0-7.5) で生育した個体は、1 年目は著しく少なかったが、2 年目には土壌 2, 3 および 4 と同程度であった。一方、土壌 5 (pH5.0-5.5) で生育した個体の葉の乾燥重量は、2 年目において、他の 4 条件と比較して有意差は確認されなかったものの、5 条件の中で最も高い値を示した土壌 3 (pH6.0-6.5) で生育した個体に比べて 70%程度であった (Fig. 8)。

(a) 試験場所

(上部は、ビニールおよび遮光率約45%の寒冷紗で覆った.)



(b) 試験開始時(2015年5月)



(c) 開始から3か月後



(d) 開始から6か月後



Fig. 6. 栽培試験の様子 [土壌2 (pH6.5-7.0)]

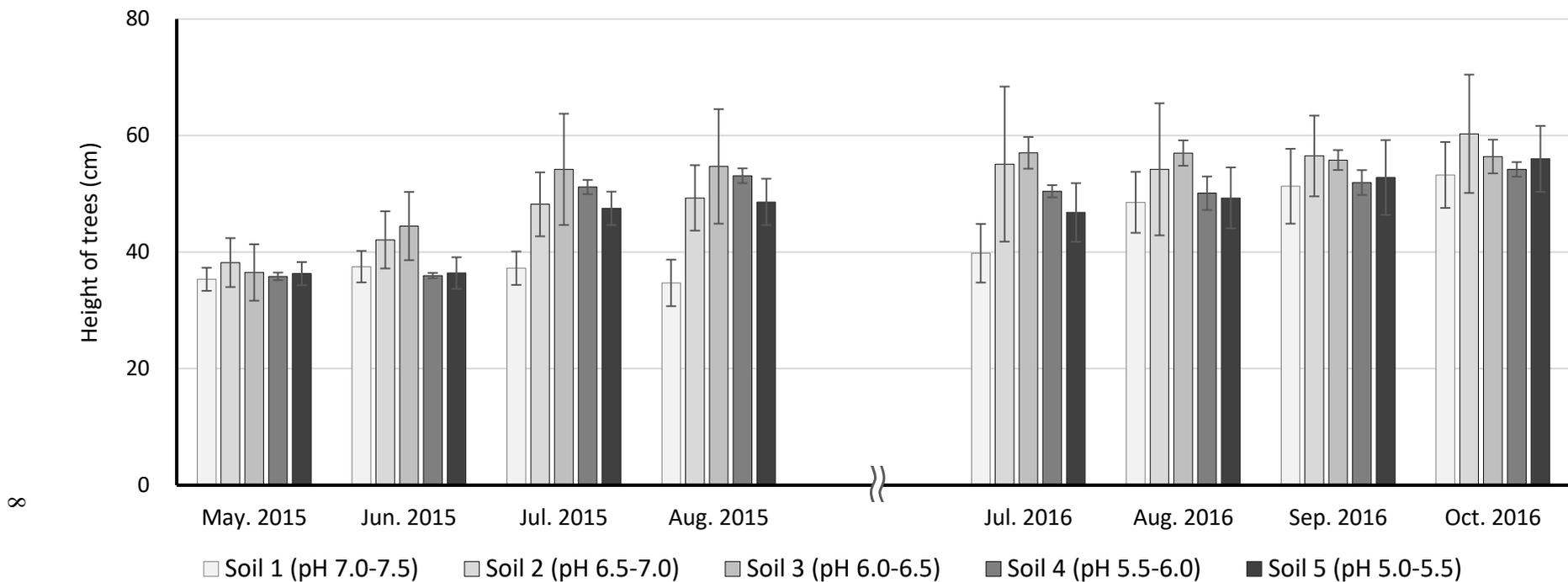


Fig. 7. 栽培土壌の pH 値<sup>a</sup>の違いによる樹高の変化

a 土壌の pH 値 は, 土壌 2 (pH6.5-7.0) に苦土石灰またはピートモスを加えて調製した. 土壌 1 (pH 7.0-7.5) は, 土壌 2 に 1 L あたり約 66.6 g の炭酸苦土石灰を混合して調製した. 土壌 3 (pH6.0-6.5), 土壌 4 (pH5.5-6.0), 土壌 5 (pH5.0-5.5) は, 土壌 2 に体積比で 30%, 50%, 70%のピートモスを混合して調製した. 土壌条件以外の栽培条件は同じであった. 各土壌で 18 か月間生育させ, それぞれの樹高を比較した. 樹高はすべて, 各土壌条件下で生育した 3 本の平均値±標準偏差 (SD) で表した. 図中の縦棒は標準誤差を示す.

[*Chem. Pharm. Bull.* **2023**, *71*, 368 - 373. Fig. 3 より転載]

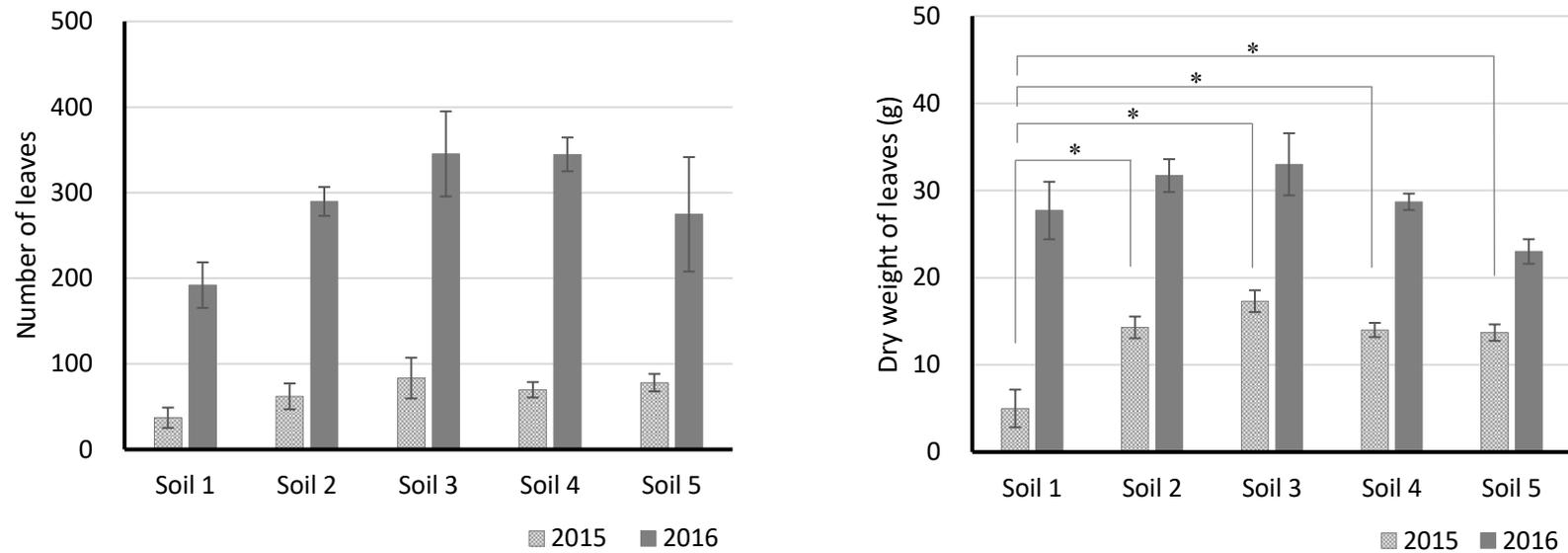


Fig. 8. 栽培1年目（2015年）および2年目（2016年）の収穫量 一葉の枚数（左）と葉の乾燥重量（右）

土壌条件：土壌 1 (pH7.0-7.5)，土壌 2 (pH6.5-7.0)，土壌 3 (pH6.0-6.5)，土壌 4 (pH5.5-6.0)，土壌 5 (pH5.0-5.5)。

葉の枚数：2015年10月，2016年10月にそれぞれ葉を収穫し，枚数を数えた。

葉の乾燥重量：収穫後すぐに，40°Cに設定した乾燥機で24時間乾燥させた後，測定した。

すべての値は，各土壌条件下で生育した3本の平均値±標準偏差（SD）で表した。図中の縦棒は標準誤差を示す。

アスタリスクは，Tukeyの多重検定により，処理区間において5%水準で有意差があることを示す。

[*Chem. Pharm. Bull.* **2023**, *71*, 368 - 373. Fig. 4 より転載]

### 第三節 土壌 pH 値がアマチャ葉部の(*R*)-phyllodulcin (**1**) および (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) の含量に与える影響

#### 第一項 (*R*)-phyllodulcin (**1**) および (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) の定量分析条件の検討

アマチャの葉には、(*R*)-phyllodulcin (**1**) およびその配糖体 (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) が主要な二次代謝産物として含有する<sup>2,3)</sup>。

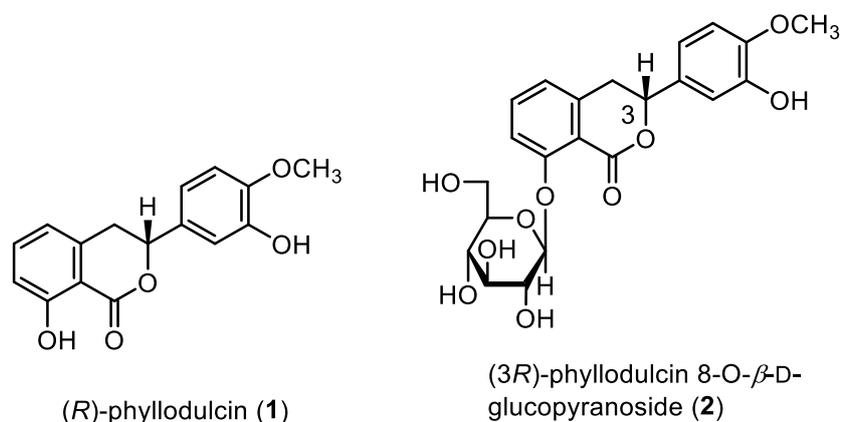


Fig. 9. 化合物 **1**, **2** の化学構造式

化合物 **1**, **2** は、京都薬科大学生薬学分野において、アマチャの葉から単離・精製され保存されているものを用いた。化合物 **1**, **2** の化学構造は、水素核磁気共鳴スペクトル (<sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance, <sup>1</sup>H NMR) および質量分析 (Mass spectrometry, MS) のスペクトルデータを参照データと比較することにより確認し、標準試料とした<sup>3,45,46)</sup>。標準試料 (**1**, **2**) ならびにアマチャ未修治葉および修治葉のメタノール (MeOH) 抽出物について、HPLC クロマトグラムを波長 314 nm の UV 検出で測定したところ、すべてのピークで良好なベースライン分離が確認された (Fig. 10)。ピークは次の保持時間 (*t<sub>R</sub>*) に観察された: **1**, 37.5 min; **2**, 25.8 min<sup>3)</sup>。

各濃度に希釈した標準溶液を用いて作成した検量線はいずれも測定範囲 (0.4 - 500  $\mu$ g/mL) で直線性を示し、決定係数 ( $R^2$ ) は 1.0000 であった。相対標準偏差 (RSD) 値は、日内変動で 1.13 - 1.99%, 日間変動で 2.72 - 3.43% であった (Table 1)。抽出条件については、MeOH を用いた超音波抽出が化合物 **1**, **2** を抽出するのが最も効率的な方法である<sup>3)</sup>。予備的に行った試験で、抽出時間 5 分, 10 分, 15 分で成分の含量に差がなかったことが確認されたため、抽出時間は 10 分とした。MeOH を用いて室温で 10 分間超音波抽出 (2 回) を行い、分析試料を調製した。

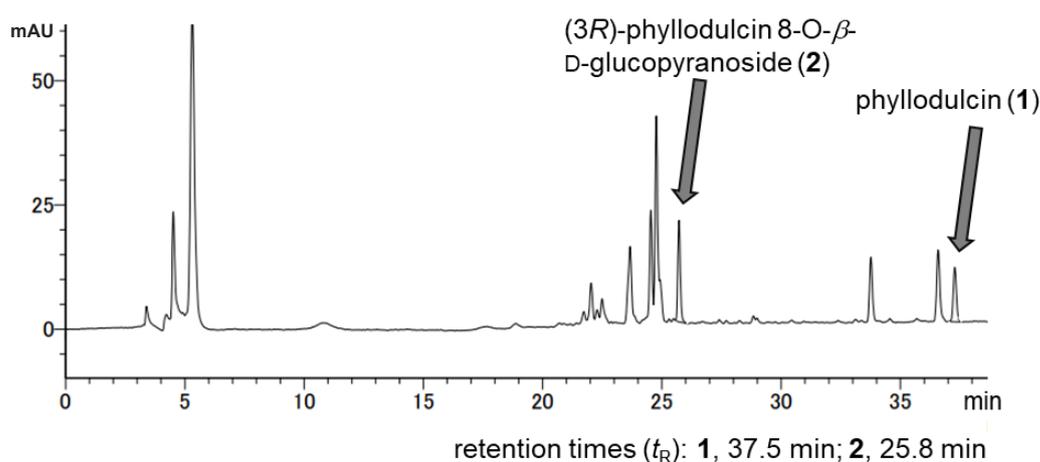


Fig. 10. アマチャ未修治葉から得たエキスの典型的な HPLC クロマトグラム (UV, 314 nm) 未修治葉は土壌 2 (pH6.5-7.0) で生育した個体より得た。

Table 1. 化合物 **1**, **2** の検量線の直線性および精度

Analyte	Regression equation <sup>a</sup>	Coefficient of determination ( $R^2$ )	Precision <sup>b</sup> (RSD, %)	
			Intra-day	Inter-day
<b>1</b>	$y = 9637.2x + 954.3$	1.0000	1.13	3.43
<b>2</b>	$y = 3369.5x + 1394.4$	1.0000	1.99	2.72

a 回帰式において,  $x$  は分析対象溶液の濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $y$  は分析対象物質のピーク面積である。

b 土壌 2 (pH6.5-7.0) で生育させた個体から得た抽出物を用いて, 分析法の精度を検討した. ( $n = 5$ )

次に, アマチャの葉に含まれる化合物 **2** (配糖体) から化合物 **1** (アグリコン) への変換について確認した. アマチャ未修治葉または修治葉の化合物 **1**, **2** の含量を HPLC により定量分析した. その結果, 未修治葉には 0.24 - 0.79% の化合物 **2** (配糖体) が含まれていた (Table 2, Entry 6 - 20) が, 修治葉には, 化合物 **2** は含まれていないか, わずかに含まれる程度であった (Table 2, Entry 1 - 5). したがって, アマチャ未修治葉中の化合物 **2** が修治によって化合物 **1** に変換されたことは明らかである. このことから, 第二項における定量分析では, 未修治中の化合物 **1**, **2** の総含量を定量比較することにした.

## 第二項 土壌 pH 値がアマチャ葉部に含まれる (*R*)-phyllodulcin (**1**) および (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) の含量に与える影響

第一章第二節において土壌 pH 値が異なる 5 種類の土壌で生育させた個体の未修治葉中の化合物 **1**, **2** を, HPLC 分析により定量比較した. その結果, 化合物 **1**, **2** の総モル量 (各条件 3 個体の平均値  $\pm$ SD) は, 土壌 1 (pH7.0-7.5) で生育させた個体の未修治葉では,  $22.42 \pm 2.26 \mu\text{mol/g}$  (Table 2, Entry 6 - 8), 土壌 2 (pH6.5-7.0) では  $22.88 \pm 4.08 \mu\text{mol/g}$  (Table 2, Entry 9 - 11), 土壌 3 (pH6.0-6.5) では  $27.52 \pm 4.03 \mu\text{mol/g}$  (Table 2, Entry 12 - 14), 土壌 4 (pH5.5-6.0) では  $26.25 \pm 3.78 \mu\text{mol/g}$  (Table 2, Entry 15 - 17), 土壌 5 (pH5.0-5.5) では  $16.65 \pm 0.72 \mu\text{mol/g}$  であった (Table 2, Entry 18 - 20). 化合物 **1**, **2** の総モル量は, 土壌 3 (pH6.0-6.5) で最も多く, 土壌 5 (pH5.0-5.5) で最も少なかった.

Table 2. アマチャ修治葉および未修治葉からの抽出物中の化合物 **1**, **2** 含量

Entry	Sample <sup>a</sup>	Soil pH	Pot	Loss on drying (%) <sup>b</sup>	Yield from dry material <sup>c</sup> (%)		Content in dry material <sup>c</sup> (μmol/g)		Total contents in dry material (μmol/g)
					<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	
1	Processed leaves	7.0-7.5 [Soil 1]	1	8.22	0.74 ± 0.03	0.02 ± 0.01	25.72 ± 1.14	0.35 ± 0.18	26.07
2		6.5-7.0 [Soil 2]	1	10.93	0.98 ± 0.02	Not detected	34.12 ± 0.53	Not detected	34.12
3		6.0-6.5 [Soil 3]	1	9.56	0.87 ± 0.04	Not detected	30.41 ± 1.30	Not detected	30.41
4		5.5-6.0 [Soil 4]	1	9.06	1.04 ± 0.01	Not detected	36.40 ± 0.34	Not detected	36.40
5		5.0-5.5 [Soil 5]	1	8.43	0.80 ± 0.02	0.09 ± 0.00	27.85 ± 0.61	2.10 ± 0.10	29.95
6	Unprocessed leaves	7.0-7.5 [Soil 1]	1	8.74	0.51 ± 0.01	0.26 ± 0.00	17.92 ± 0.34	5.78 ± 0.11	23.70
7			2	10.87	0.40 ± 0.01	0.24 ± 0.01	13.91 ± 0.26	5.33 ± 0.30	19.24
8			3	9.78	0.30 ± 0.00	0.63 ± 0.01	10.34 ± 0.08	13.98 ± 10.34	24.32
9		6.5-7.0 [Soil 2]	1	9.43	0.31 ± 0.01	0.79 ± 0.00	10.97 ± 0.24	17.67 ± 0.11	28.64
10			2	10.07	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.01	11.77 ± 0.32	7.95 ± 0.16	19.72
11			3	17.54	0.29 ± 0.01	0.46 ± 0.02	10.12 ± 0.36	10.17 ± 0.38	20.29
12		6.0-6.5 [Soil 3]	1	8.62	0.31 ± 0.02	0.64 ± 0.05	10.69 ± 0.67	14.36 ± 1.07	25.05
13			2	8.68	0.45 ± 0.01	0.78 ± 0.04	15.76 ± 0.51	17.44 ± 0.80	33.20
14			3	8.93	0.42 ± 0.02	0.44 ± 0.04	14.51 ± 0.82	9.79 ± 0.81	24.30
15		5.5-6.0 [Soil 4]	1	9.51	0.62 ± 0.01	0.25 ± 0.01	21.80 ± 0.45	5.59 ± 0.18	27.39
16	2		10.36	0.42 ± 0.01	0.70 ± 0.02	14.66 ± 0.37	15.54 ± 0.36	30.20	
17	3		9.95	0.37 ± 0.00	0.37 ± 0.01	12.79 ± 0.16	8.36 ± 0.30	21.15	
18	5.0-5.5 [Soil 5]	1	10.13	0.18 ± 0.01	0.42 ± 0.01	6.28 ± 0.32	9.42 ± 0.15	15.70	
19		2	10.33	0.22 ± 0.02	0.41 ± 0.01	7.66 ± 0.66	9.16 ± 0.32	16.82	
20		3	9.50	0.24 ± 0.01	0.41 ± 0.03	8.25 ± 0.34	9.19 ± 0.57	17.44	

a 修治葉：2016年10月に収穫・乾燥後、葉に水をかけ、密封可能なビニール袋に入れ、その後25℃に設定した人工気象器に72時間入れた（暗条件）。次に、葉を手で揉捻した後、40℃に設定した乾燥機で24時間乾燥させた。未修治葉：2016年10月に収穫した葉を直ちに40℃に設定した乾燥機で24時間乾燥させた。得られた葉を粉末化し、化合物**1**、**2**の定量分析用試料とした。各粉末試料（300mg）をMeOH（10mL）中、室温で10分間超音波処理した。b 定量分析に使用した試料とは別に、各粉末試料を105℃で5時間乾燥した。c 値は平均値±SD（n=3）

## 小括

甘茶官能評価と甘茶の甘味物質である化合物 **1** の定量分析を組み合わせることで、甘茶の甘味を示す本質は化合物 **1** であると判断し、甘茶の品質評価において化合物 **1** を指標とすることにした。

アマチャの挿し木増殖苗を pH 値の異なる 5 種類の土壌 [土壌 1 : pH7.0-7.5, 土壌 2 : pH6.5-7.0, 土壌 3 : pH6.0-6.5, 土壌 4 : pH5.5-6.0, 土壌 5 : pH5.0-5.5] で栽培し、生長（樹高）および収穫量（葉の枚数、葉の乾燥重量）を比較したところ、樹高は、苗木の若い時期（1 年目）には、土壌 pH 値による差が確認されたが、2 年目にはその差はほぼなくなった。また、土壌 5 (pH5.0-5.5) で生育したアマチャの 2 年目収穫量（葉の乾燥重量）は、他の 4 つの土壌条件で生育した個体の中で最も少なく、最も多かった土壌 3 (pH6.0-6.5) と比較して約 70%であった。

さらに、土壌 5 (pH5.0-5.5) で栽培した個体については、他の 4 種の土壌条件で栽培した個体に比べて、化合物 **1**, **2** 含量が特に少なかった。最も含量の多かった土壌 3 (pH6.0-6.5) と比較すると約 60%であった。以上のことより、栽培土壌の酸性度が強くなることで、アマチャの生育およびアマチャ未修治葉中の化合物 **1**, **2** の含量が低下することが示唆された。

土壌 pH 値が低い状況（酸性条件）においては、土壌中の水素イオンが土壌と結合し、カリウムイオンなどの陽イオンの栄養素が土壌中に留まることができずに溶出することで、植物の栄養分吸収が阻害される<sup>26)</sup>。また、土壌 pH 値が低くなることで、土壌中の硝酸化成作用の低下による窒素吸収抑制、土壌中で遊離したアルミニウムによるリン酸固定とそれに伴うリン酸吸収の悪化などが起こることが知られている<sup>27)</sup>。土壌 5 (pH5.0-5.5) では、植物細胞の浸透圧調節、呼吸や光合成に関与する酵素など多くの酵素活性に関わるカリウムの吸収抑制、茎葉の伸長生長に必要な窒素の吸収抑制、植物体内で核酸やリン脂質の構成成分となるリン酸の吸収悪化など、植物の生命維持、生長に関わる反応に関与する重要な栄養素の取り込みが正常に行われなかったことで、アマチャの生長および化合物 **1**, **2** の生合成に必要な酵素反応の阻害等が起きた可能性があると考えられる<sup>28)</sup>。

## 第二章 修治がアマチャ葉部の含有成分に与える影響

### 第一節 修治による (3*R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) の変化

アマチャの葉に含まれる化合物 **2** (配糖体) は、修治 (アマチャ葉に含まれる酵素による酵素反応で、発酵と呼ぶ) の過程で、化合物 **1** (アグリコン) に変換される<sup>3-6)</sup>。そこで、アマチャの葉を収穫した後、種々の条件 (発酵温度, 発酵時間) で修治したものを試料とし、修治が化合物 **1**, **2** の含量に与える影響を検討した。

アマチャは、通常 8 月下旬から 10 月上旬に収穫されて修治される。修治の過程で、24 時間程度の発酵を行うが、このとき恒温機等は使用されず、容器に入れた状態で、常温 (室温) で静置される。そこで、経験的に確立されてきた修治方法を参考に、収穫時期の気温データから発酵温度の条件設定を行うこととした。現在の甘茶主要産地に近い、岩手県二戸市、長野県信濃町の 2018 年~2020 年の、8 月最終週~10 月第 1 週の日平均気温のデータを参考にした<sup>29)</sup>。3 年間の収穫時期 (8 月最終週~10 月第 1 週) の日平均気温は、13.6 - 25.1 °C (二戸市), 14.5 - 24.1 °C (信濃町) の範囲であった。さらに、予備的に行った修治で、30 °C, 48 時間以上の発酵でカビが発生することが確認された。以上のことから、発酵温度は、15 °C と 25 °C に決定した。

修治の方法は、2022 年 9 月、京都薬科大学薬用植物園で栽培するアマチャから収穫した葉を完全に乾燥させた後、水を噴霧し、密封可能なプラスチック袋に入れた。次に、葉を入れたプラスチック袋を、15 °C または 25 °C に設定した人工気象器内に、0 (この時間を発酵開始時間とした)、6, 24, 48 時間置いた (暗条件)。発酵後、直ちに葉を手で揉捻し、40 °C に設定した乾燥機で 24 時間乾燥させた。得られた修治葉を分析用試料とした。

第一章で決定した分析方法に準じて、修治葉中の化合物 **1**, **2** の含量を HPLC により定量分析した。

発酵温度が 15 °C の場合、発酵開始から 6 時間では化合物 **1**, **2** の含量に変化はなかったが、24 時間後には化合物 **2** から化合物 **1** にほぼ変換され、発酵温度が 25 °C の場合、発酵開始から 6 時間後には、化合物 **2** から化合物 **1** におおよそ変換されたことが示唆された (Fig. 11)。

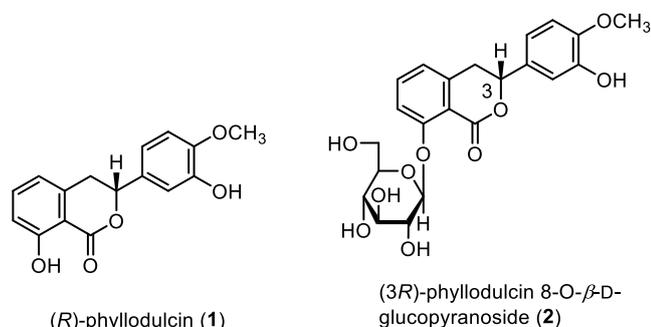


Fig. 9. 化合物 **1**, **2** の化学構造式

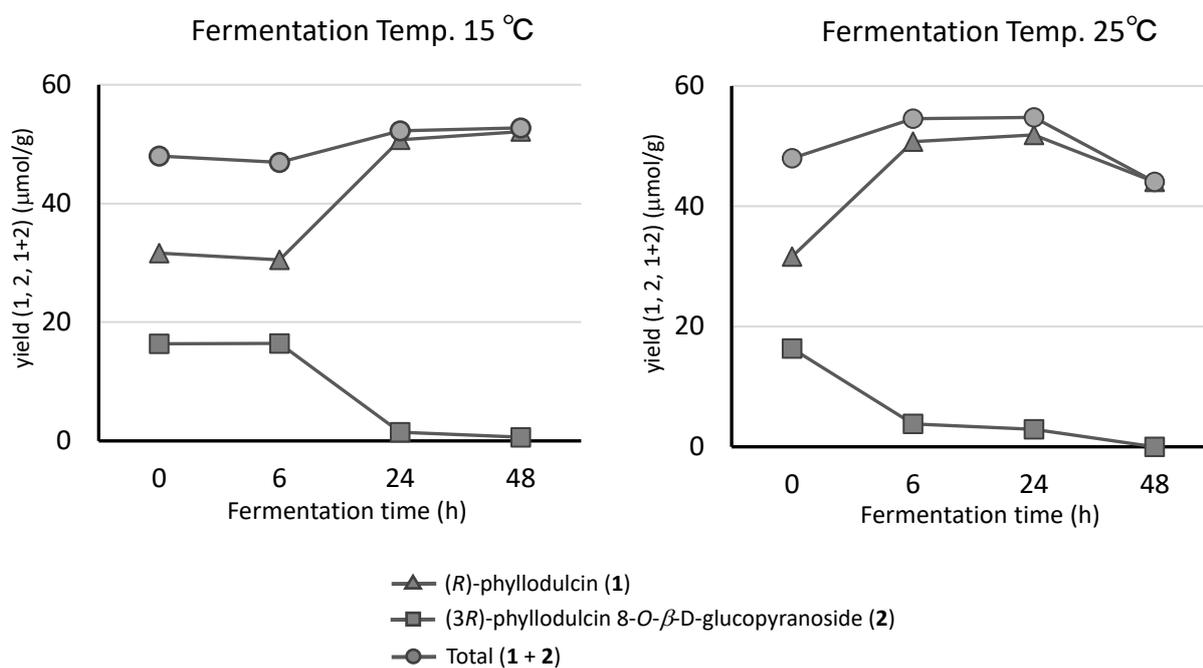
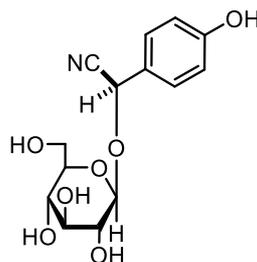


Fig. 11. 修治による化合物 1, 2 の含量変化  
 (左：発酵温度 15 °C, 右：発酵温度 25 °C)

## 第二節 青酸配糖体 taxiphyllin (5) 含量の定量比較および修治が 5 含量に与える影響

### 第一項 葉の大きさ、色、部位別、収穫時期別 taxiphyllin (5) 含量の定量比較

青酸配糖体 5 は、アマチャ花部から単離されたという報告があるが<sup>21)</sup>、アマチャの葉における化合物 5 の有無に関する科学的情報は不十分であった。そこで、アマチャに含まれる化合物 5 の存在を検討した。



taxiphyllin (5)

Fig. 5. taxiphyllin (5) の化学構造式

定量分析用の標品として化合物 5 を使用するために、Møller らによって報告された方法<sup>30)</sup>を用いて合成し (Fig. 12)、アマチャの葉に含まれる化合物 5 の定量分析に用いた。得られた化合物 5 は、スペクトルデータを参照データと比較することで同定した。

化合物 5 の紫外吸収スペクトルでは、197 nm に吸収極大を持つピークが観察された。化合物 5 およびアマチャ未修治葉 MeOH 抽出物の HPLC クロマトグラムは、197 nm の UV 検出により、良好なベースライン分離を示した。HPLC 分析では、5, 8.5 分の保持時間 ( $t_R$ ) にピークが観察された (Fig. 13)。液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) により得られた保持時間、UV スペクトルパターン (190 - 350 nm) および MS スペクトルデータを試料と比較することにより、ピークを同定した。

UV 検出を用いて化合物 5 の HPLC 定量分析を行った。検量線は検討した範囲 (2.33 - 364  $\mu\text{g/mL}$ ) で直線的であり、決定係数 ( $R^2$ ) は 1.0000 であった。相対標準偏差 (RSD) は日内変動で 3.57%、日間変動で 4.06% であった (Table 3)。

予備的に行った試験において、未修治葉および修治葉からの化合物 5 の抽出条件については MeOH による超音波抽出が最も効率的な方法であった。抽出時間 5 分、10 分、15 分では成分含量に差がないことが確認されたため、10 分とした。MeOH による超音波抽出は、室温で 10 分間行い (2 回)、分析試料を調製した。



次に、葉 (leaf A : 葉身の長さが 6cm 以上 8cm 未満) に含まれる化合物 **5** の含量を、HPLC を用いて定量分析した (Fig. 14). その結果、化合物 **5** は  $0.65 \pm 0.01\%$  の収率で得られた (Table 4, Entry 1).

葉における化合物 **5** の含量は、葉の状態によって異なる可能性がある。そこで、大きさ、色、部位の異なるアマチャの葉を用意した。試料は、2022 年 9 月、京都薬科大学薬用植物園において、土壌や生育時期などが同じ条件で栽培された個体から得た。まず、赤色の葉 (Table 4, Entry 2) に含まれる化合物 **5** の含量を、緑色の葉 (Table 4, Entry 1) に含まれる化合物 **5** の含量と比較した。その結果、赤く変色した葉の化合物 **5** の含量は、緑色の葉の化合物 **5** の含量に比べて減少する傾向があった。

次に、葉の大きさ [葉身長 : 2-5 cm (leaf C), 9-11 cm (leaf D)], 部位 [先端部 (leaf E), 中央部 (leaf F), 基部 (leaf G)], 葉柄 (petiole), 主脈 (midvein) の化合物 **5** の含量を評価した。その結果、葉および葉柄のいずれにも化合物 **5** が含まれており、葉の大きさによる含量変化はなく、葉柄を除いて部位別の含量はほぼ同等であった (Table 4)。

最後に、2017 年 5, 6, 7, 8, 9 月に採取した葉について、化合物 **5** の含量を比較した。その結果、化合物 **5** の含量は 5 月から 8 月にかけて増加することがわかった。特に、8 月 7 日に採取した葉に含まれる化合物 **5** の含量は  $12.85 \pm 0.35 \mu\text{mol/g}$  (収率  $0.40 \pm 0.01\%$ ) で、5 月 2 日に採取した葉に含まれる化合物 **5** の含量  $3.39 \pm 0.10 \mu\text{mol/g}$  (収率  $0.11 \pm 0.00\%$ ) に比べて 3 倍以上であった (Table 5)。

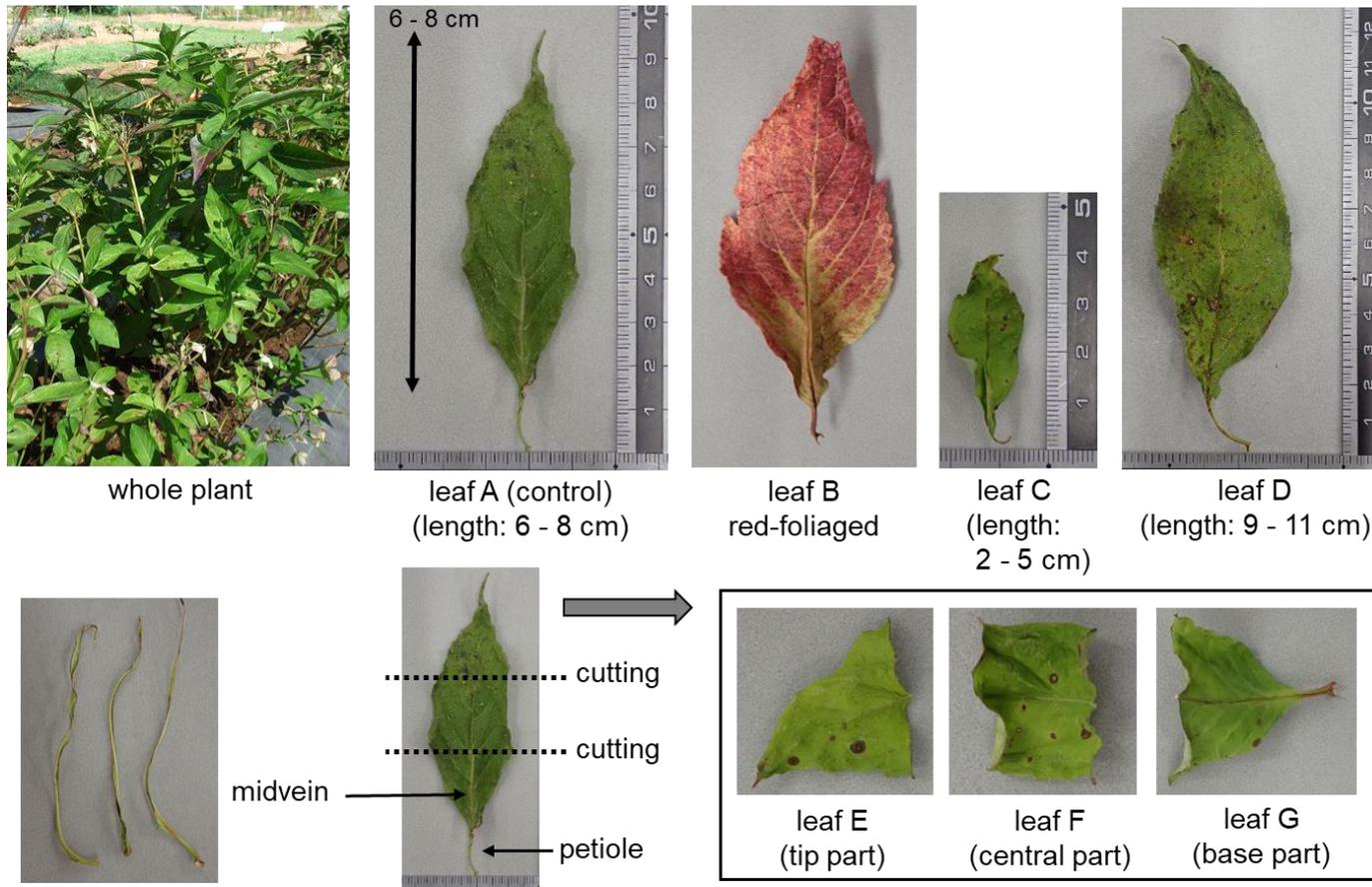


Fig. 14. アマチャ葉の大きさ，部位別試料

[*J. Nat. Med.* **2023**, 77, 978 - 985. Fig. 4 より，Springer Nature の許可を得て転載]

Table 4. 葉の大きさ, 色および部位別の化合物 **5** 含量

Entry	Sample <sup>a</sup>	Loss on drying (%) <sup>b</sup>	Yield (%) of <b>1</b> from dry material <sup>c</sup>	Content ( $\mu\text{mol/g}$ ) of <b>1</b> in dry material <sup>c</sup>
1	leaf A (control)	8.95	$0.65 \pm 0.01$	$21.04 \pm 0.24$
2	leaf B	9.00	$0.46 \pm 0.01$	$14.79 \pm 0.44$
3	leaf C	8.84	$0.62 \pm 0.07$	$20.13 \pm 2.09$
4	leaf D	7.74	$0.57 \pm 0.07$	$18.40 \pm 2.15$
5	leaf E	9.45	$0.59 \pm 0.09$	$18.98 \pm 2.79$
6	leaf F	8.27	$0.45 \pm 0.01$	$14.37 \pm 0.41$
7	leaf G	9.21	$0.53 \pm 0.01$	$17.18 \pm 0.15$
8	petiole	8.96	$0.10 \pm 0.00$	$3.34 \pm 0.016$
9	midvein	8.45	$0.62 \pm 0.03$	$20.05 \pm 1.11$

a 2022 年 9 月に葉を収穫し, 直ちに 40 °C の乾燥機で 24 時間乾燥させた. 各粉末試料 (leaf A, leaf B, petiole は 1.000 g, leaf C - G, midvein は 300 mg) を MeOH (10 mL) 中, 室温で 10 分間超音波抽出した (2 回).

b 定量分析に用いた試料とは別に, 粉末化した各試料を 105 °C で 5 時間乾燥させた.

c 値は平均値  $\pm$ SD (n = 3).

[*J. Nat. Med.* **2023**, 77, 978 - 985. Table 2 より, Springer Nature の許可を得て転載]

Table 5. 収穫時期別の化合物 **5** 含量

Entry	Collection time	Loss on drying (%) <sup>b</sup>	Yield (%) of <b>5</b> from dry material <sup>c</sup>	Content ( $\mu\text{mol/g}$ ) of <b>5</b> in dry material <sup>c</sup>
1	May 2	8.29	$0.11 \pm 0.00$	$3.39 \pm 0.10$
2	June 3	8.72	$0.16 \pm 0.01$	$5.09 \pm 0.18$
3	July 5	8.07	$0.32 \pm 0.00$	$10.13 \pm 0.12$
4	August 7	8.01	$0.40 \pm 0.01$	$12.85 \pm 0.35$
5	September 11	7.71	$0.30 \pm 0.01$	$9.78 \pm 0.35$

a 2017 年に収穫した葉を直ちに 40 °C の乾燥機で 24 時間乾燥させた. 得られた葉を粉末化し, 化合物 **1** の定量分析に用いた. 粉末化した試料 (300 mg) を MeOH (10 mL) 中, 室温で 10 分間超音波抽出した (2 回).

b 定量分析に用いた試料とは別に, 粉末化した各試料を 105 °C で 5 時間乾燥させた.

c 値は平均値  $\pm$ SD (n = 3).

[*J. Nat. Med.* **2023**, 77, 978 - 985. Table 3 より, Springer Nature の許可を得て転載]

## 第二項 土壌 pH 値別栽培アマチャ葉部の taxiphyllin (5) 含量の定量比較

第一章において pH 値の異なる 5 種類の土壌 [土壌 1 : pH7.0-7.5, 土壌 2 : pH6.5-7.0, 土壌 3 : pH6.0-6.5, 土壌 4 : pH5.5-6.0, 土壌 5 : pH5.0-5.5] で生育させたアマチャについて, 葉に含まれる化合物 5 の含量を定量分析した.

その結果, pH5.0-7.5 (土壌 1 - 5) で生育した個体の葉はすべて化合物 5 を含有していた. 化合物 5 の含量は 0.026 - 0.153% であり, 土壌 pH の違いによる化合物 5 の含量の差は認められなかった (Table 6).

Table 6. 土壌 pH 値別栽培個体中の化合物 5 の含量

Sample <sup>a</sup>	Soil pH	Pot	Loss on drying (%) <sup>b</sup>	Yield (%) of 5 from dry material <sup>c</sup>	Content (μmol/g) of 5 in dry material <sup>c</sup>
1	7.0-7.5 [Soil 1]	1	8.74	0.071 ± 0.0001	2.27 ± 0.004
2		2	10.87	0.049 ± 0.0048	1.56 ± 0.156
3		3	9.78	0.114 ± 0.0049	3.65 ± 0.157
4	6.5-7.0 [Soil 2]	1	9.43	0.090 ± 0.0067	2.90 ± 0.215
5		2	10.07	0.058 ± 0.0066	1.88 ± 0.212
6		3	17.54	0.145 ± 0.0074	4.65 ± 0.239
7	6.0-6.5 [Soil 3]	1	8.62	0.072 ± 0.0060	2.30 ± 0.194
8		2	8.68	0.029 ± 0.0031	0.93 ± 0.100
9		3	8.93	0.060 ± 0.0076	1.94 ± 0.243
10	5.5-6.0 [Soil 4]	1	9.51	0.026 ± 0.0012	0.84 ± 0.039
11		2	10.36	0.127 ± 0.0078	4.10 ± 0.252
12		3	9.95	0.045 ± 0.0041	1.45 ± 0.133
13	5.0-5.5 [Soil 5]	1	10.13	0.153 ± 0.0078	4.93 ± 0.251
14		2	10.33	0.061 ± 0.0074	1.95 ± 0.238
15		3	9.50	0.084 ± 0.0056	2.71 ± 0.180

a 2016 年 10 月に収穫した葉を直ちに 40 °C の乾燥機で 24 時間乾燥させた.

粉末試料 (300 mg) を MeOH (10 mL) 中, 室温で 10 分間超音波処理した (2 回). 得られた抽出物を化合物 5 の定量分析に用いた.

b 定量分析に用いた試料とは別に, 粉末化した各試料を 105 °C で 5 時間乾燥させた.

c 値は平均値 ± SD (n = 3).

### 第三項 修治による taxiphyllin (5) の含量変化

第二章第一節で修治した葉を試料とし、含有する化合物 5 を HPLC で定量分析した。

その結果、発酵開始時 (0 時間) の化合物 5 含量は  $1.26 \mu\text{mol/g}$  (収率 : 0.039%) で、発酵温度  $15^\circ\text{C}$ 、 $25^\circ\text{C}$  における 6 時間発酵後には化合物 5 の減少が確認された。さらに、発酵開始から 24 時間後には化合物 5 は検出されなかった (Fig. 15)。

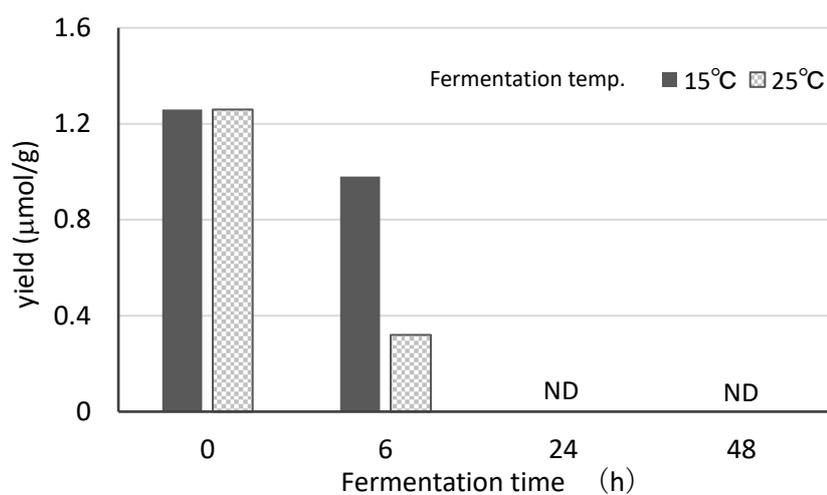


Fig. 15. 修治における発酵温度・発酵時間と化合物 5 含量  
ND : 不検出

## 小括

修治の際の発酵温度が 15 °C の場合、25 °C に比べて化合物 2 から化合物 1 への変換にやや時間が要したが、いずれの温度でも 24 時間で、アマチャ葉に含まれる化合物 2 は化合物 1 へとほぼ変換されたと考えられた。また、25 °C、48 時間発酵では、化合物 1 の量が減少することが確認されたことから、発酵時間は 24 時間が適切であることが示唆された。

青酸配糖体 taxiphyllin (5) は、アマチャの葉の大きさ、部位に関わらず含まれていることが明らかになった。また、化合物 5 の含量は、栽培土壌の pH 値に依存しないことが示唆され、季節の変化に従って増加する傾向が確認された。特に、8 月 7 日に採取された葉の化合物 5 含量は、5 月 2 日に採取された葉の化合物 5 含量の 3 倍以上であった。しかし、化合物 5 は、修治の過程で、24 時間以上の発酵により検出されなくなることから、適切な温度と時間での修治で化合物 5 は分解されたことが示唆された。

ヒトが青酸配糖体を含む食品（植物）を摂取すると、植物に内在する酵素、腸内細菌やその他の組織に存在する  $\beta$ -グルコシダーゼなどの酵素によって触媒された加水分解反応で、シアン化水素が遊離する。体内で発生したシアン化水素は、血中のヘム鉄と結合し、ミトコンドリアの電子伝達鎖末端酸化酵素のシトクロムオキシダーゼを阻害するため、強い急性毒性を有する<sup>31)</sup>。そのため、青酸配糖体を含む食品（植物）を未処理で摂取することは危険であり、青酸配糖体を含むキャッサバやウメ（青梅）などは、水に晒す、発酵、加熱処理、塩蔵などの加工処理を施してから食べられる。

植物体では、青酸配糖体は液胞に蓄積され、それ自体は毒性を持たないが、植物細胞（液胞）が破壊されると、細胞壁に存在する  $\beta$ -グルコシダーゼの作用により分解され、シアン化水素が生成することが知られている<sup>32)</sup>。シアン化水素は、常温で気体（沸点 25.7 °C）であり、乾燥の過程でほぼ揮発すると考えられる<sup>33)</sup>。そのため、アマチャの修治によって、葉に含まれる青酸配糖体 taxiphyllin (5) が分解され、シアン化水素が生成した場合も、修治後の加熱乾燥でほとんどが失われるものと推察される。修治中に、シアン化水素として失われることを考慮すると、甘茶を経口摂取した場合のシアン化水素による急性毒性はかなり軽減できるものと考えられる。

過去の食中毒事例<sup>20)</sup>には、アマチャが含有する青酸配糖体に起因する事故の報告はないが、アマチャが taxiphyllin (5) 以外の青酸配糖体を含む可能性は否定できず、また、青酸配糖体の含量は、栽培条件による変動、季節変動、個体差などがあることから未修治葉中の青酸配糖体含量の定量、修治の過程で遊離するシアン化水素量を測定することにより、修治後の甘茶葉中に残存するシアン化物の量を推定するなど、さらなる安全性の確認が必要と考える。

### 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

#### 第一節 培地に添加する植物ホルモンがカルス誘導およびカルスの増殖に与える影響

カルスは、アマチャの葉から誘導した。アマチャの葉芽と展開直後の葉 (Fig. 16) を滅菌し、カルス誘導用培地に置いた (Fig. 17)。カルス誘導用培地の組成は、4.3 g/L Murashige and Skoog (MS) 培地<sup>34)</sup> に 30 g/L Sucrose, 0.5 mL/L Plant Preservative Mixture<sup>™</sup> (PPM<sup>™</sup>)<sup>35)</sup>, 3 g/L ジェランガムを加え、0.5 mg/L 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) と 0.5 mg/L 6-フルフリルアミノプリン (KIN) を添加したものである<sup>36)</sup>。培地に置床してから約 2 週間後にカルスの発生が確認された。葉芽では約 25%, 展開直後の葉では約 45% からカルスが誘導された。

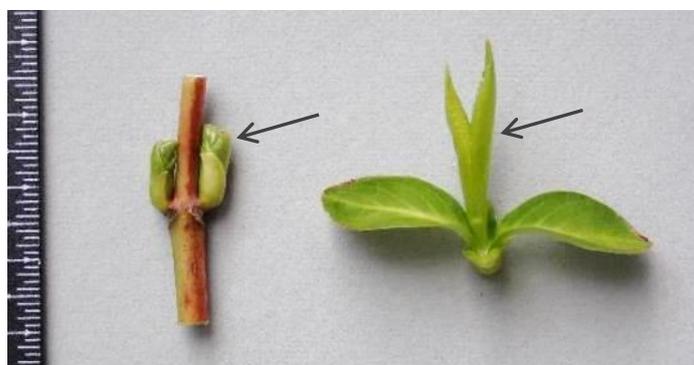


Fig. 16. カルス誘導に用いた部位 (左: 葉芽, 右: 展開直後の葉)

誘導に成功したカルス (Fig. 17, カルス S) を摘出し、誘導用培地に移植して培養した。カルス S' (Fig. 17, カルス S') を 1 つ選び、複数に切断した後、5.0 mg/L 2,4-D と 0.5 mg/L KIN を添加した増殖用培地に移し、8 週間または 29 週間培養した。カルス S' から得られたカルスを、カルス S'' (8 週間) またはカルス S''' (29 週間) と命名した。

次に、カルス S'' (8 週間) をほぼ等しい大きさ (最大直径: 5-15 mm) に切断し、A-H 培地<sup>37)</sup> に移植し、8 週間培養した (Table 7, Fig. 18)。

カルス増殖については、0 週目、4 週目、8 週目にカルスの底面積を求めて比較検討した<sup>38)</sup>。ペトリ皿を上下逆転させ、トレーシングペーパーを当ててカルス底部を描き写した。カルス底部の面積の算出には、米国国立衛生研究所 (NIH) が開発したソフトウェア Image J を用いた (Fig. 19)。

2,4-D (オーキシン) と BA (サイトカイニン) を添加した培地 A-D で培養したカルス A-D と、IAA (オーキシン) と BA を添加した培地 E-H で培養したカルス E-H を比較すると、カルス A-D の方がやや高い増殖率を示し、中でも、基本培地に 2,4-D 2.0 mg/L と BA 1.0 mg/L を添加したカルス D が高い増殖率を示した (Table 7, Fig. 20)。

なお、この植物ホルモンの種類および濃度 (Table 7) では、茎葉および根の再分化は観察されなかった。

Table 7. 培地に添加する植物ホルモンの種類と濃度

Media (Callus) <sup>b</sup>	Phytohormone <sup>a</sup>			Auxin : Cytokinin
	Auxin (mg/L)		Cytokinin (mg/L)	
	2,4-D	IAA	BA	
A	0.20	-	0.20	1 : 1
B	0.50	-	0.10	5 : 1
C	1.00	-	0.10	10 : 1
D	2.00	-	1.00	2 : 1
E	-	0.50	2.00	1 : 4
F	-	0.05	0.10	1 : 2
G	-	0.05	0.20	1 : 4
H	-	0.10	0.20	1 : 2
I	-	0.25	0.50	1 : 2
J	-	0.20	0.40	1 : 2
K	-	0.50	1.00	1 : 2
L	-	0.05	0.25	1 : 5
M	-	0.05	0.40	1 : 8
N	-	0.05	0.50	1 : 10
O	-	0.20	0.20	1 : 1
P	-	1.00	0.20	5 : 1
Q	-	2.00	0.20	10 : 1

a 2,4-D : 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸

IAA : インドール-3-酢酸

BA : ベンジルアデニン

b 培地 A - Q で培養したカルスをそれぞれ「カルス A - Q」とする.

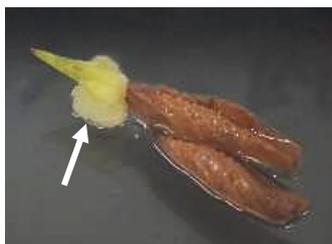
[*Chem. Pharm. Bull.* **2023**, 71, 832 - 837. Table 1 より転載]



### 外植体 (展開直後の葉)

70%エタノールで1分間, 1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で15分間滅菌した後, 水で3回洗浄した. さらに, 5%PPM™水溶液中で4時間攪拌滅菌した後, カルス誘導用培地 (添加した植物ホルモン: 2,4-D 0.5 mg/L, KIN 0.5 mg/L) に置床した.

25 ± 2°C, 暗条件に設定したインキュベーターで培養



### カルス S

カルス S を外植体から切り離し, カルス誘導用培地 (添加した植物ホルモン: 2,4-D 0.5 mg/L, KIN 0.5 mg/L) に移植した.

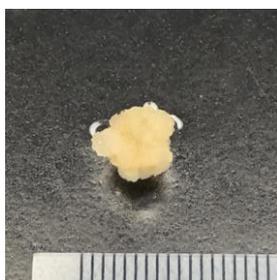
25 ± 2°C, 暗条件に設定したインキュベーターで培養



### カルス S'

カルス S' を複数に切り分け, 増殖用培地 (添加した植物ホルモン: 2,4-D 5.0 mg/L, KIN 0.5 mg/L) に移植した.

25 ± 2°C, 暗条件に設定したインキュベーターで  
8週間または29週間培養

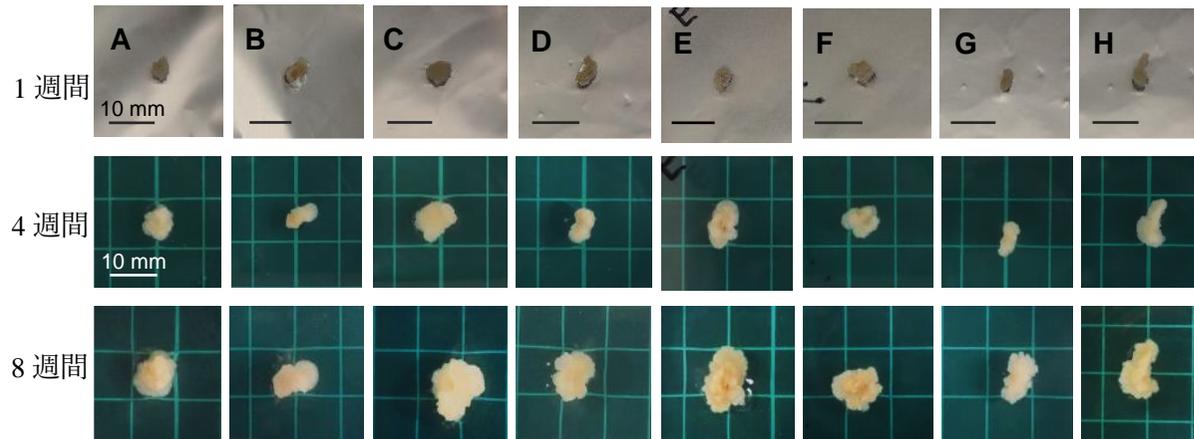


### 継代培養カルス S''

カルス S'' (8週間) はカルス S' を8週間(56日)培養して得た.  
カルス S'' (29週間) はカルス S' を29週間(203日)培養して得た.

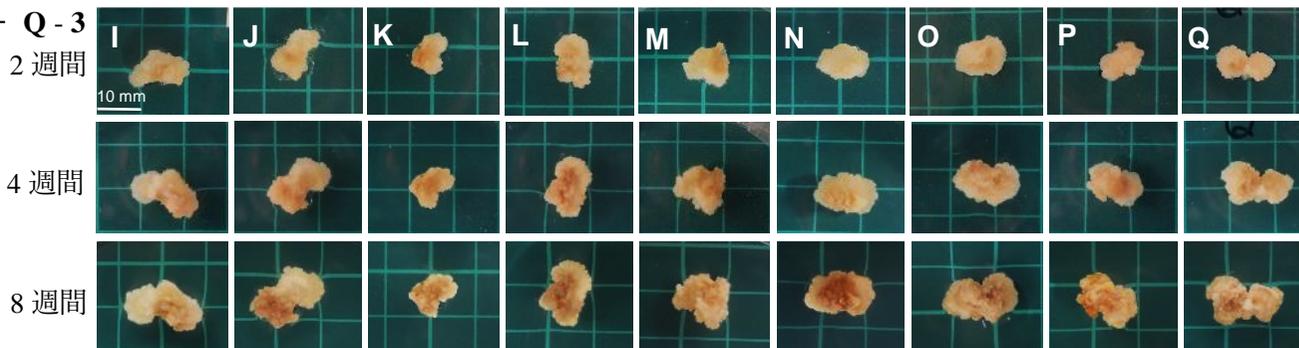
Fig. 17. 葉からのカルス誘導および継代培養

## カルス A - H



カルス S" (8 週間) を 8 個に切り分け、異なる組成の培地 (培地 A - H) に植え付けた。  
 上段の写真は植え付け後 1 週間 (7 日)、中段は 4 週間 (28 日)、下段は 8 週間 (56 日) 経過時のものである。

## カルス I-1 - Q-3



カルス S" (29 週間) を 27 個に切り分け、異なる組成の培地 (培地 I - Q) に 3 個ずつ植え付けた。  
 上段の写真は植え付け後 2 週間 (14 日)、中段は 4 週間 (28 日)、下段は 8 週間 (56 日) 経過時のものである。

Fig. 18. 培地 A - H および培地 I - Q におけるカルスの変化

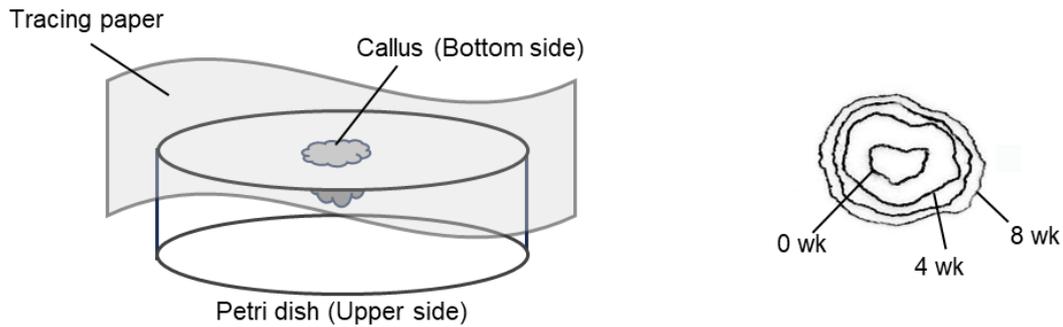


Fig. 19. カルス増殖率の測定（面積の測定方法）<sup>a</sup>

a 0 週目、4 週目、8 週目にカルス底面積を求めた。シャーレを裏返し、カルス底面をトレーシングペーパーに写し取り、米国国立衛生研究所（NIH）が開発した ImageJ ソフトウェアを用いて算出した。

[*Chem. Pharm. Bull.* **2023**, 71, 832 - 837. Fig. 3 より転載]

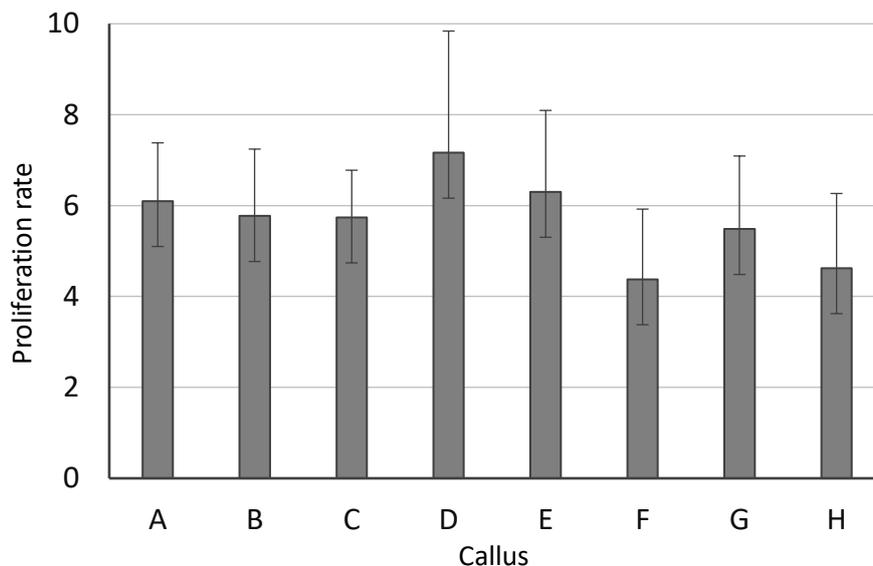


Fig. 20. カルス A - H の増殖率

増殖率（Proliferation rate）＝8 週目の面積／0 週目の面積

すべての増殖率は、各培地で増殖させたカルス 3 個の平均値±標準偏差（SD）で表した。

図中の縦棒は標準誤差を示す。

Tukey の多重検定では、処理区間において 5 % の水準で有意差は認められなかった。

この試験は、1 枚のアマチャ葉から得たカルス（Fig. 17, カルス S''）を 8 片に切断し、培地 A - H で培養することで行った。同一個体の他の 2 枚の葉から得たカルスについても、同様の手順で 3 回繰り返し、各培地条件で 3 個のカルスを得た。

[*Chem. Pharm. Bull.* **2023**, 71, 832 - 837. Fig. 4 より転載]

## 第二節 カルスで生成するジヒドロイソクマリン類の定量比較

### 第一項 ジヒドロイソクマリン類の定量分析条件の検討

アマチャの葉には、ジヒドロイソクマリン (*R*)-phyllodulcin (**1**), (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**), hydrangenol (**3**), hydrangenol 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**4**) が含まれていることが報告されている<sup>2-4)</sup>。

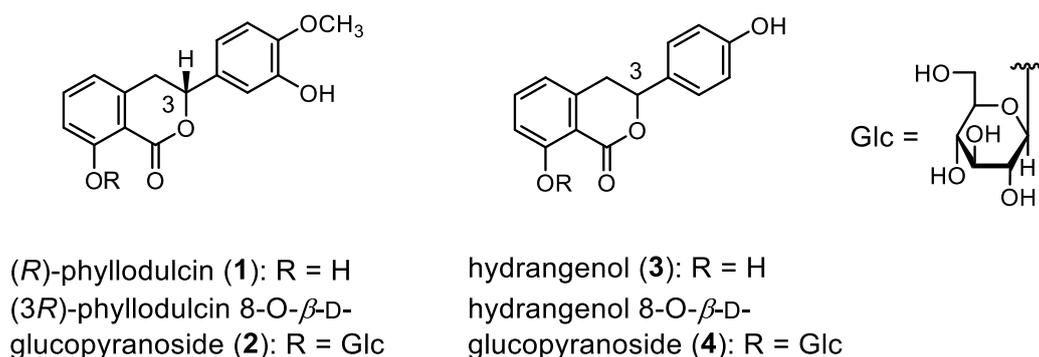
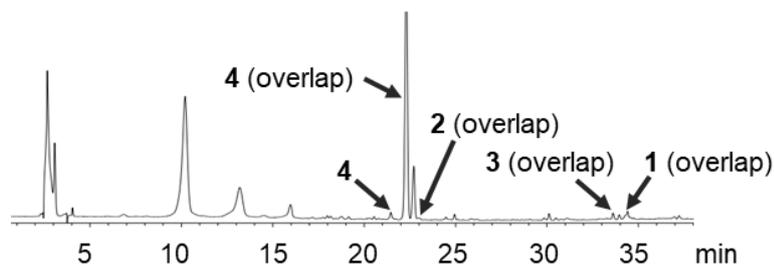


Fig. 2. 化合物 **1** - **4** の化学構造式

標準試料として用いた化合物 **1** - **4** は京都薬科大学生薬学分野が所有するものを使用した。化合物 **1** - **4** については、既報の方法に従って単離し、スペクトルデータを参考データと比較することにより同定した<sup>3)</sup>。波長 314 nm の UV 検出による標準試料の HPLC クロマトグラムでは、以下の保持時間 ( $t_R$ ) にピークが観察された: **1**, 34.1 分, **2**, 23.0 分, **3**, 33.7 分, **4**, 21.5 分と 22.3 分 (**3R** と **3S** の混合物)。しかし、アマチャの葉から得られたカルスの MeOH 抽出物の HPLC クロマトグラムは、未同定化合物のクロマトグラムと重なっていた。そこで、LC-MS 分析でカルス中の **1** - **4** を定量した。エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のネガティブモードによる MS 検出下でのカルス MeOH 抽出物の LC-MS クロマトグラムは、すべてのピークで良好なベースライン分離を示した。各ピークは、準分子イオンピーク ( $[M-H]^-$ ) [**1**:  $m/z$  285; **2**:  $m/z$  447; **3**:  $m/z$  255; **4**:  $m/z$  417]として観察された (Fig. 21)。これらのピークは、保持時間 ( $t_R$ ) を試料と比較することで同定された。検量線は検討した範囲 (**1** については 0.4 - 500  $\mu\text{g/mL}$ ; **2** については 0.4 - 50  $\mu\text{g/mL}$ ; **3** および **4** については 0.4 - 10  $\mu\text{g/mL}$ ) で直線的であり、決定係数 ( $R^2$ ) は 0.9990 - 0.9996 であった (Table 8)。

カルスからのジヒドロイソクマリン類の抽出は、室温 (25 - 30  $^{\circ}\text{C}$ ) で 15 分間、MeOH を用いて超音波抽出を 2 回行い、分析試料を調製した。

(a) HPLC chromatogram (UV 314 nm) of the extract



(b) SIM chromatogram (negative ESI) of the extract

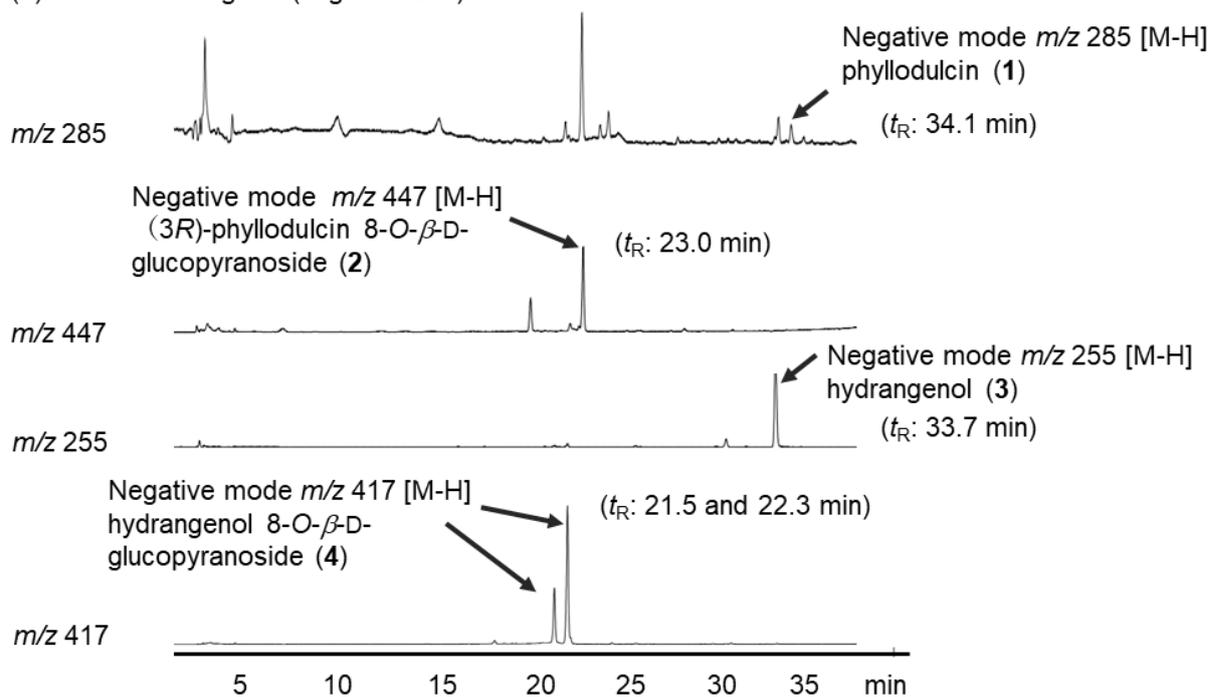


Fig. 21. カルス I-1 から得られたエキスの (a) HPLC クロマトグラム (UV 314 nm) と (b) SIM クロマトグラム (ネガティブ ESI)

YMC-Triart C18 カラム (粒子径 5 μm, 内径 4.6 mm × 250 mm, 株式会社ワイエムシィ, 京都, 日本) を, カラム温度 40 °C で, 以下の条件で操作した: 移動相 A (アセトニトリル) および B (1.0% 酢酸含有 H<sub>2</sub>O); グラジエントプログラム: 0 - 10 分 (A:B 10:90, v/v, ホールド) → 35 分 (A:B 60:40, v/v) → 40 分 (A:B 100:0, v/v). 流速は 1.0 mL/分であった.

Table 8. 化合物 1 - 4 の検量線の直線性

Analyte	Regression equation <sup>a</sup>	Coefficient of determination ( $R^2$ )
( <i>R</i> )-phyllodulcin (1)	$y = 1,272,442x - 155,715$	0.9996
(3 <i>R</i> )-phyllodulcin 8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (2)	$y = 2,740,224x + 472,997$	0.9994
hydrangenol (3)	$y = 13,300,758x + 10,167,590$	0.9997
hydrangenol 8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (4) [1] <sup>b</sup>	$y = 445,806x + 1,192,669$	0.9994
hydrangenol 8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside (4) [2] <sup>b</sup>	$y = 940,281x + 12,789,203$	0.9990

a 回帰式において,  $x$  は分析対象溶液の濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $y$  は分析対象物質のピーク面積である.

b 化合物 4 (3R と 3S の混合物) は 2 つのピークを示した.

これらのピークは [1] 21.5 分と [2] 22.3 分の保持時間 ( $t_R$ ) に観察される.

## 第二項 カルスで生成するジヒドロイソクマリン類の定量比較

予備実験として、第三章第一節で作成したカルス中のジヒドロイソクマリン **1-4** の定性分析を行った結果、植物ホルモン IAA 0.05 mg/L と BA 0.20 mg/L を添加した培地 (G) で培養したカルス G には化合物 **4** が、IAA 0.1 mg/L と BA 0.2 mg/L を添加した培地 (H) で培養したカルス H には化合物 **2, 4** が含まれていた (Table 9)。

また、LC-MS 分析を用いて、各組成の培地 (Table 7) に移植する前のカルス S" (8 週間) およびカルス S" (29 週間) (カルス S" (8 週間)は 10.8 mg, カルス S" (29 週間)は 20.0 mg) に含まれる化合物 **1-4** の含量を調べた。カルス S" (8 週間) とカルス S" (29 週間) には化合物 **1, 2, 4** は含まれず、化合物 **3** の含量は 0.01%以下であった (Fig. 22, 23)。

次に、培地に添加する IAA と BA の比率と濃度を変化させてカルスを培養し、各培地で培養したカルスにおける化合物 **1-4** を高含量で生成する条件を探索した。化合物 **1-4** の含量を調べるために、27 個のカルス (カルス I-1 - Q-3) を調製した。カルス I-1 - Q-3 は、カルス S" (29 週間) をほぼ同じ大きさ (最大径: 5 - 15 mm) に切断し、I-Q 培地に移し、8 週間培養して得た (Fig. 18)。

化合物 **1-4** の含量は、LC-MS 分析を用いて評価した。化合物 **1, 2, 4** については、各培地への植え付け時のカルス S" (29 週間) では確認できなかったが、2 か月間の培養により、生成が確認された。化合物 **4** は、培地に添加する IAA と BA の濃度比が 1:2 のときに高濃度で存在した (Table 9, カルス I, J および K)。特に、IAA 0.5 mg/L と BA 1.0 mg/L を添加した培地で培養したカルス K からは、2.03 - 3.46%の収率で化合物 **4** が生成した。アマチャの葉に含まれる化合物 **4** の含量は 2.15 - 3.58%と報告されていることから<sup>3)</sup>、カルス K の化合物 **4** 含量は植物体 (葉) と同等であった。また、化合物 **1** の配糖体である化合物 **2** について、カルス I, J, K, M および N に含まれており、乾燥カルス (カルス K) から最大 0.044%の収率で得られた。

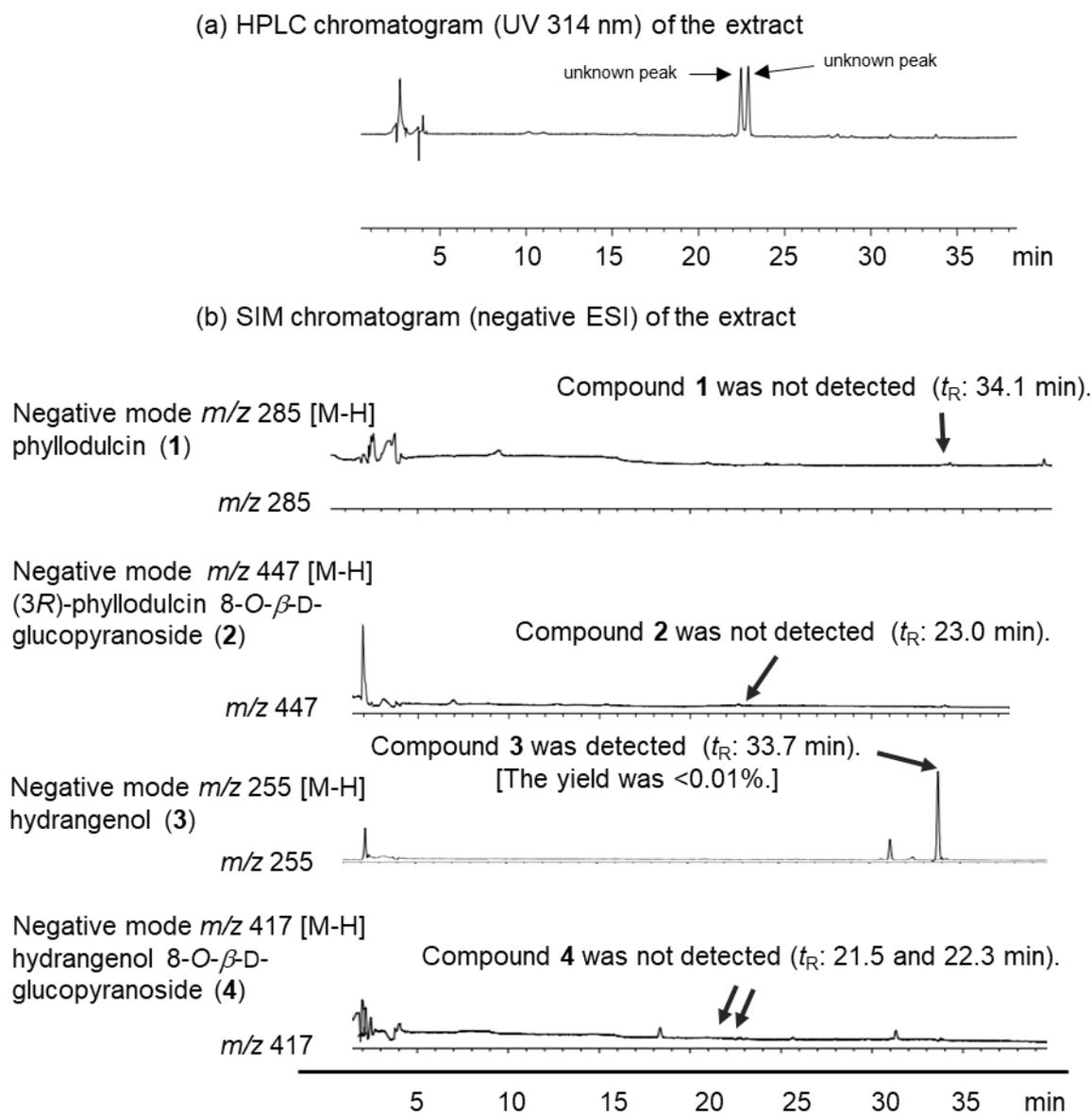
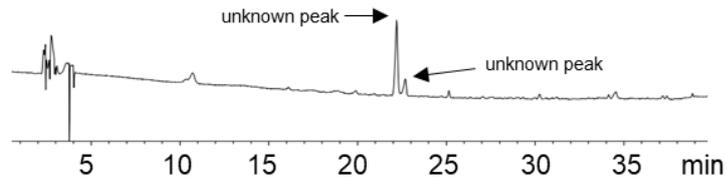


Fig. 22. カルス S" (8 週間) 抽出物の (a) HPLC クロマトグラム (UV 314 nm) と (b) SIM クロマトグラム (ネガティブ ESI)

YMC-Triart C18 カラム (粒子径 5  $\mu\text{m}$ , 内径 4.6 mm  $\times$  250 mm, 株式会社ワイエムシィ, 京都, 日本) を, カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$  で, 以下の条件で操作した: 移動相 A (アセトニトリル) および B (1.0% 酢酸含有  $\text{H}_2\text{O}$ ); グラジエントプログラム: 0-10 分 (A:B 10:90, v/v, ホールド)  $\rightarrow$  35 分 (A:B 60:40, v/v)  $\rightarrow$  40 分 (A:B 100:0, v/v). 流速は 1.0 mL/min であった.

(a) HPLC chromatogram (UV 314 nm) of the extract



(b) SIM chromatogram (negative ESI) of the extract

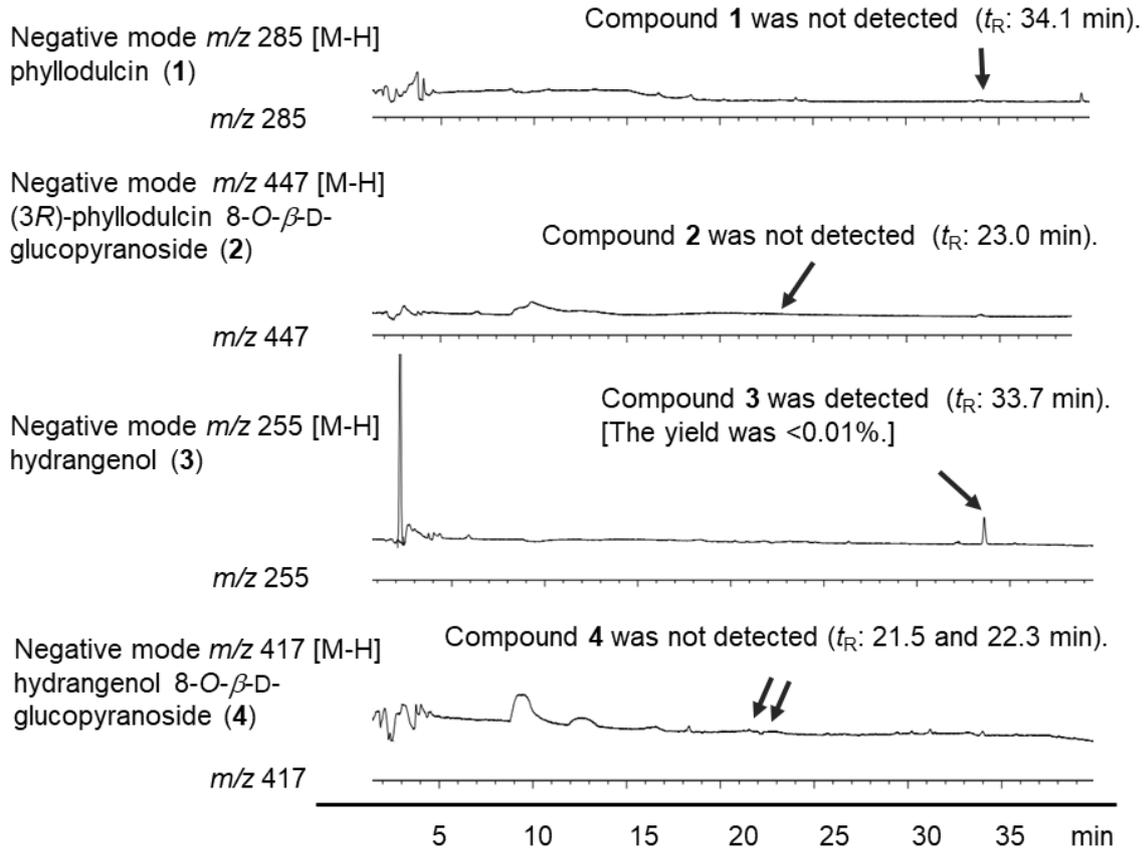


Fig. 23. カルス S<sup>II</sup> (29 週間) 抽出物の (a) HPLC クロマトグラム (UV 314 nm) と (b) SIM クロマトグラム (ネガティブ ESI)

YMC-Triart C18 カラム (粒子径 5  $\mu\text{m}$ , 内径 4.6 mm  $\times$  250 mm, 株式会社ワイエムシイ, 京都, 日本) を, カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$  で, 以下の条件で操作した: 移動相 A (アセトニトリル) および B (1.0% 酢酸含有  $\text{H}_2\text{O}$ ); グラジエントプログラム: 0 - 10 分 (A:B 10:90, v/v, ホールド)  $\rightarrow$  35 分 (A:B 60:40, v/v)  $\rightarrow$  40 分 (A:B 100:0, v/v). 流速は 1.0 mL/min であった.

Table 9. カルス中の化合物 1 - 4 含量

Callus	Yield (%) from dry material in callus <sup>a</sup>			
	1	2	3	4
G-1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.15
H-1	< 0.01	0.012	< 0.01	0.54
I-1	< 0.01	0.014	0.022	0.81
I-2	< 0.01	0.024	< 0.01	1.31
I-3	< 0.01	0.011	< 0.01	1.09
J-1	ND <sup>b</sup>	0.015	< 0.01	1.03
J-2	< 0.01	0.042	0.024	2.44
J-3	< 0.01	0.027	0.017	2.47
K-1	< 0.01	0.044	0.015	3.46
K-2	< 0.01	0.036	0.022	2.03
K-3	< 0.01	0.037	0.076	2.14
L-1	ND <sup>b</sup>	< 0.01	< 0.01	1.17
L-2	ND <sup>b</sup>	0.010	< 0.01	1.29
L-3	ND <sup>b</sup>	< 0.01	< 0.01	0.65
M-1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.82
M-2	< 0.01	0.017	< 0.01	1.08
M-3	< 0.01	0.021	0.032	2.26
N-1	< 0.01	0.014	< 0.01	0.70
N-2	< 0.01	0.018	< 0.01	1.22
N-3	< 0.01	0.032	0.019	2.04
O-1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
O-2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
O-3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
P-1	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.23
P-2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
P-3	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.50
Q-1	ND <sup>b</sup>	< 0.01	< 0.01	0.32
Q-2	ND <sup>b</sup>	< 0.01	< 0.01	0.05
Q-3	ND <sup>b</sup>	< 0.01	< 0.01	< 0.01

<sup>a</sup> カルス S" (8 週間) およびカルス S" (29 週間) は, 化合物 1, 2, 4 を含まず, 化合物 3 の含量は 0.01%未満であった.

<sup>b</sup> ND : 不検出.

## 小括

アマチャカルの増殖においては、培地に添加する植物ホルモンの種類として 2,4-D と BA の組み合わせが有効であった。中でも、基本培地に 2,4-D 2.0 mg/L と BA 1.0 mg/L を添加したカルス D が最も高い増殖率を示した。

カルスにおけるジヒドロイソクマリン類の生成に、IAA と BA のバランスおよび濃度が関与することが示唆された。化合物 1 については、含量が少なく定量に至らなかった。化合物 1 の配糖体である化合物 2 は、各条件の培地に移植する前のカルス S'' においては検出されなかったが、IAA 0.5 mg/L と BA 1.0 mg/L を添加した培地 K で 8 週間培養した場合、乾燥カルス（カルス K）から最大 0.044% の収率で得られた。さらに、カルス K からは、化合物 4 が収率 2.03 - 3.46% で得られた。これはアマチャの葉における化合物 4 含量とほぼ同等であった<sup>3)</sup>。カルス K では、化合物 4 が大量に生成されたが、化合物 1-3 の生成量は非常に少なかった。化合物 1-4 と同じクマリン骨格を持つクマリン類の生合成経路<sup>39)</sup>と同様の反応が起こると仮定すると、化合物 4 を前駆物質とし、酸化、さらに、メトキシ化されることで化合物 2 が生成されると推察できる。化合物 1-4 の生合成経路は未解明であり、化合物 4 を前駆体とした反応を進める要因は不明であるが、化合物 2 を生成したカルス K と、化合物 2 をほとんど生成しなかったカルス L について、トランスクリプトーム解析を行うことで、生合成に関与する酵素の存在を明らかにすることも可能と考える。

化合物 1, 2 は化学合成によって製造することが可能である<sup>40-42)</sup>。4-5 工程の化学反応を必要とするが、季節を問わず、省スペースかつ短時間で、目的物質を単独で製造するには優れた手法である。一方、ムラサキ科ムラサキのカルスを用いたシコニンの生産はすでに実用化されており<sup>43)</sup>、カルスもまた化合物 1 生産において有効な手法であると考えられる。さらに、本研究により、同一の培養条件で培養した 1 個のカルスに化合物 2, 3, 4 を含有するものを得ることができた。目的とする複数のジヒドロイソクマリン類を含有し、かつ、それ以外の成分を含まない、あるいは低減させたカルスを作ることができれば、ジヒドロイソクマリン類の生理活性を期待した機能性食品の開発や医薬品開発に向けて有用性の高い素材となりうると考える。

## 結論

栽培土壌 pH 値が 5.0-5.5 の [土壌 5] で栽培した個体について、pH6.0-6.5 の [土壌 3] と比較したとき、2 年目の収穫量（葉の乾燥重量）は 70%程度であり、さらに (*R*)-phyllodulcin (**1**) と (*3R*)-phyllodulcin 8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**) の合計含量 (**1** + **2**) は 60%程度であった。一般に、栽培が容易で酸性土壌に耐性があるとされるアマチャであるが、土壌 pH 値が 5.5 以下になることで、その収穫量と化合物 **1**, **2** 含量を低下させることが明らかになった。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り、一定品質の確保のみならず、供給の安定化にも貢献する。

アマチャの葉において、化合物 **1** の一部は配糖体 (**2**) の形で含まれることから、甘茶の生産は、栽培・修治の両方が適正に行われることで初めて成立する。今回、化合物 **2** から化合物 **1** が生成する修治条件を検討した結果、15 °C、25 °Cで 24 時間の発酵が適当であることが明らかになった。また、アマチャ葉部に青酸配糖体である taxiphyllin (**5**) が含まれていることが明らかになり、さらに、化合物 **5** は季節の移行に従って増加し、特に、8 月に採取された葉における含量は、5 月に比べて 3 倍以上に増加することが分かったが、化合物 **5** は、15 °C 又は 25 °Cで 24 時間発酵させることで検出されなくなることが確認された。配糖体である化合物 **2** を、甘味物質である化合物 **1** にすべて有効的に変換させるための具体的な条件を明らかにするとともに、化合物 **5** が食中毒を引き起こす可能性を否定する結果が得られた。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、最小限必要な修治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り、甘茶の国内生産促進に寄与するものである。

アマチャ由来カルスを用いて、植物ホルモン IAA (0.5 mg/L) と BA (1.0 mg/L) を添加した培地（培地 K）で培養したカルス K から化合物 **4** が収率 2.03 - 3.46% で得られた。これは、培地に移植して 8 週間（約 2 か月）で、萌芽から 6 か月後に採取したアマチャの葉とほぼ同等量の化合物 **4** が得られたことになる。甘味物質である化合物 **1** に関しては定量に至らなかったが、その配糖体である化合物 **2** については、IAA (0.5 mg/L) と BA (1.0 mg/L) を添加した培地（培地 K）で培養したカルスから最大 0.044% の収率で生成された。酵素反応により、化合物 **2** から化合物 **1** が得られることから、カルスを利用した甘味物質 **1** の生産に向けて有用な知見が得られた。また、目的とする物質を単体で生産するだけでなく、複数の成分を含有するカルスは、機能的食品の開発や医薬品の開発に向けて有用性の高い新たな素材としての可能性を広げる。

医薬品原料としての甘茶は、使用量、国内生産量ともに最近 10 年間で減少しており、2020 年度の国内生産量はゼロで、中国から輸入されている<sup>49)</sup>。一方、食品としては国内でも生産されている<sup>9)</sup>。今後、代替甘味料として、国内だけでなく、海外からの需要が高まる可能性を見据え、苗木の確保、栽培地の選定、栽培・修治の省力化などの対策とともに、甘味物質フィロズルチン (**1**) を指標として甘茶の品質が規格化されることを期待する。

## 謝辞

本研究の完遂にあたり，多大なるご指導，ならびに多くの温かい励ましのお言葉を賜りました．心より御礼申し上げます．

本研究の遂行から論文完成に至るまで，終始，熱心なご指導をいただきました京都薬科大学生薬学分野 中村誠宏准教授に，深甚なる敬意を表します．

本論文を作成するにあたり，ご懇意なるご指導とご高配をいただきました京都薬科大学薬化学分野 古田巧教授に，厚く御礼申し上げます．また，副査としてご助言いただくとともに，本論文の細部にわたりご指導いただきました薬品分析学分野 武上茂彦教授，ならびに薬品製造学分野 南部寿則教授に心から感謝の意を表します．

甘茶官能評価を実施していただきました株式会社ハウス食品分析テクノサービスの皆様，また，カルスを用いた実験において技術指導および多くのご助言をいただきました尾崎和男博士に深謝申し上げます．

本研究の遂行にあたり，植物の栽培，成分分析等において多くの方々にご協力いただきました．有尾友希氏，大城優太郎氏，中尾桃菜氏，高見朋花氏をはじめとする京都薬科大学薬用植物園および生薬学分野の学士，ならびに学生諸氏の皆様，京都薬科大学事務局施設課 深田祐輔氏に深く御礼申し上げます．

長きに渡りご指導ご鞭撻をいただきました京都薬科大学 名誉教授 松田久司先生に深謝致します．

最後に，植物の栽培管理，修治に関しまして多大なるご指導を賜りました後藤勝実先生に謹んで感謝の意を表します．

## 実験の部

栽培試験実施場所（アマチャ栽培地）

名称：京都薬科大学薬用植物園（★）

住所：京都市伏見区日野林 39 番地

緯度 北緯 34 度 56 分 13 秒

経度 東経 135 度 49 分 2 秒

標高 約 60 m

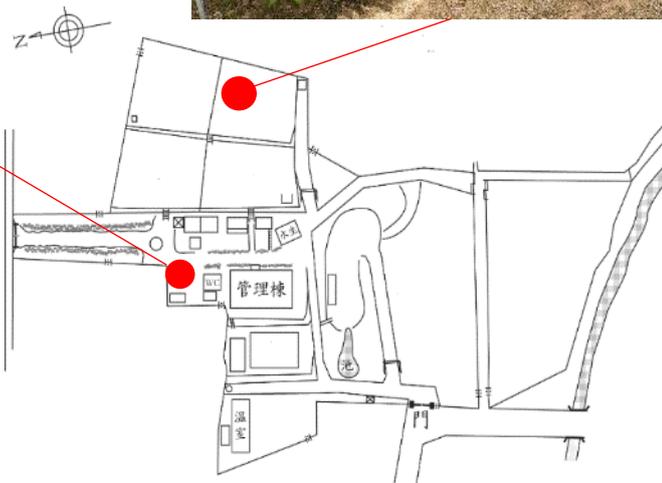


Fig. 24. 試験実施場所（地図中●：主要な試験場所）

植物材料：京都薬科大学薬用植物園で栽培するアマチャについて

アマチャ *Hydrangea macrophylla* Seringe var. *thunbergii* Makino (Saxifragaceae) \*は、ヤマアジサイの一変種とされ、広義の意味では、甘味物質を含むヤマアジサイについても「アマチャ」とされることがあるが、本研究の材料として用いた個体については、大井次三郎著『日本植物誌』<sup>11)</sup>の記載事項と一致することから、アマチャと同定した。

さく葉標本は京都薬科大学薬用植物園標本室に保管する。[標本番号 KPU-20041]

\* 学名および科名は、第18改正日本薬局方に準拠する。

以下、確認した特徴を挙げる<sup>10,11)</sup>。

- ・落葉性低木。枝は叢生する。
- ・葉は対生し、有柄、長さ10 - 15cmで長楕円状ひ針形から卵形、急鋭頭で、鋸齒縁、両面の脈状に粗毛がある。
- ・7月ごろ、枝先に集散花序をつける。
- ・装飾花（中性花）は、4枚のがく片が発達し、がく片は円頭。
- ・両性花は小形で、雄蕊は10本、花柱は3 - 4個。



Fig. 25. アマチャ



Fig. 26. アマチャの花序（左）、葉（右）

## 第一章の実験

### 第一節の実験

#### 官能評価用の材料

生薬甘茶 (Lot no. 000220002) は、2022 年に株式会社栃本天海堂 (大阪) から購入した。官能評価で使用したショ糖 (Sucrose) は、富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。

#### 試薬

抽出用メタノール (MeOH)、HPLC に用いたアセトニトリル (ACN) および酢酸は、富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。

#### 官能評価の方法

官能評価は、株式会社ハウス食品分析テクノサービス (関西事業所) (奈良) にて、同社官能評価有資格者 8 名によって実施された。

沸騰させた蒸留水を、耐熱ガラスポットに計量し (500g)、これにティーバッグに入れた甘茶の茶葉 (1.5 g) を浸けた。耐熱ガラスポットに蓋をして 3 分間放置した。茶葉を取り除き、水を入れた容器に耐熱ガラスポットを浸けることで 30 分間冷却したものを甘茶抽出液とした。甘茶抽出液を、2.0%、4.0%、6.0% のショ糖 (Sucrose) 溶液と比較し、甘さを評価した。

#### 甘茶の官能評価用試料の定量分析

沸騰させた蒸留水を耐熱ガラスポットに計量し (500g)、これにティーバッグに入れた甘茶の茶葉 (1.5 g) を浸けた。耐熱ガラスポットに蓋をして 3 分間放置した後、茶葉を取り除き、水を入れた容器に耐熱ガラスポットを浸けることで 30 分間冷却した。

こうして得た甘茶抽出液をシリンジフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過し、10  $\mu\text{L}$  の試料を高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析に供した。定量分析に用いた試料とは別に、試料を 105  $^{\circ}\text{C}$  で 5 時間乾燥させた。乾燥中の損失を考慮して化合物 **1** の収率を算出した。

#### 標準溶液の調製

化合物 **1**, **2** は京都薬科大学生薬学分野が所有するものを使用した。化合物 **1**, **2** の標準試料の単離および構造決定は、既述の方法で行った<sup>3,45,46</sup>。標準試料 **1**, **2** の 10.00 mg を正確に量り、20 mL のメスフラスコに入れ、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.50 mg/mL) とした。標準原液 (0.50 mg/mL) 2 mL を 10 mL または 20 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.05 mg/mL および 0.10 mg/mL) とした。

各標準原液 2 mL を 10 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.01 mg/mL および 0.02 mg/mL) とした。各標準原液 2 mL を 10 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.002 および 0.004 mg/mL) とした。標準原液 (0.004 mg/mL) 2 mL を 20 mL メスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.0004 mg/mL) とした。この溶液を用いて、検量線を作成するための溶液 (0.4, 2.0, 4.0, 10, 20, 50, 100, 500  $\mu$ g/mL) を調製した。各溶液の 10  $\mu$ L を HPLC システムに注入した。各ピークは以下の保持時間で観察された。( $t_R$ ) : (R)-phyllodulcin (**1**), 37.5 分; (3R)-phyllodulcin 8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**), 25.8 分。これらのピークは、試料の保持時間と比較することによって同定した<sup>3)</sup>。

標準曲線は、0.4 - 500  $\mu$ g/mL の 8 種類の濃度で作成した。直線性の判定には決定係数 ( $R^2$ ) を用いた。pH6.5-7.0 (土壌 2) で生育させたアマチャの未修治葉の抽出物を用いて、分析法の精度と正確性を検証した。日内変動および日間変動は、それぞれ同じ日および異なる 5 日間に対応する反応を 5 回推定することによって決定した。

#### HPLC システムおよび分析条件

HPLC システム (島津製作所, 京都) には、UV 検出器 (SPD-10A), コントロールモジュール (SCL-10A vp), バイナリーポンプ (LC-10AD vp), オートサンプラー (SIL-10AD vp), 恒温カラムコンパートメント, 脱気装置を用いた。検出は 314 nm で行った。これは、化合物 **1** と **2** の UV スペクトルにおいて、クマリン骨格の存在によりこの波長付近に吸収が生じるためである。クロマトグラフィー分離は、YMC-Triart C18 カラム (粒子径 5  $\mu$ m, 内径 4.6 mm  $\times$  250 mm, 株式会社ワイエムシィ, 京都) を用い、カラム温度 40  $^{\circ}$ C で、以下の条件で操作した: 移動相 A (ACN) および B (1.0% 酢酸を含む H<sub>2</sub>O); グラジエントプログラム: 0-10 分 (A:B 10:90, v/v, ホールド)  $\rightarrow$  35 分 (A:B 60:40, v/v)  $\rightarrow$  40 分 (A:B 100:0, v/v)。流速は 1.0 mL/min, 注入量は 10  $\mu$ L であった。

標準物質 1-4 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルデータ

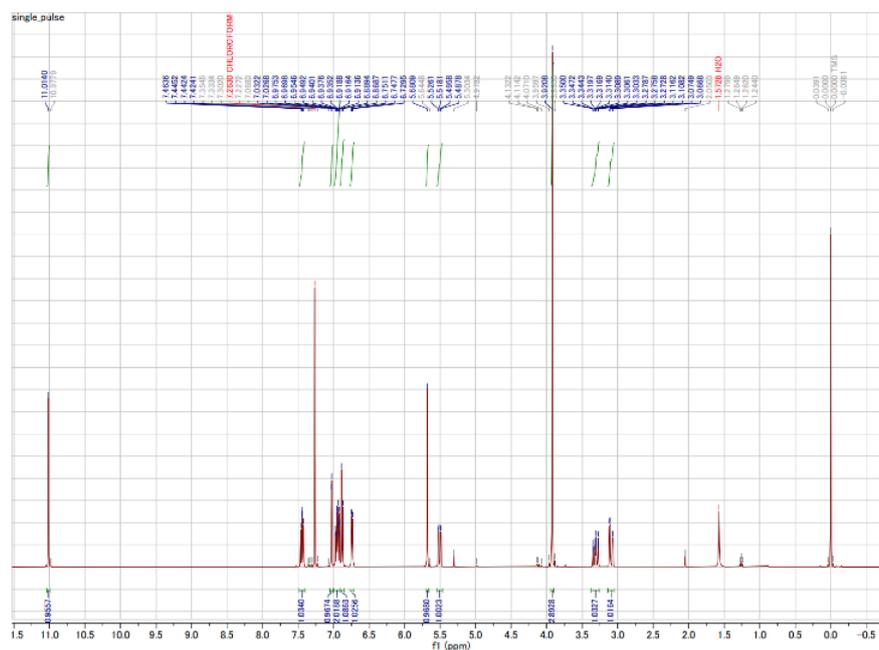


Fig. 27.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of (*R*)-phyllodulcin (**1**) [8-hydroxy-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-one, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]

$^1\text{H NMR}$  [400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  3.09 (1H, dd,  $J = 3.2, 16.6$  Hz, H-4a), 3.31 (1H, dd like,  $J = 12.1, 16.6$  Hz, H-4b), 3.92 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 5.51 (1H, dd,  $J = 3.2, 12.1$  Hz, H-3), 5.68 (1H, s,  $\text{OH}$ ), 6.74 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-5), 6.88 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5'), 6.93 (1H, d like,  $J = 8.4$  Hz, H-7), 6.95 (1H, dd,  $J = 2.2, 8.2$  Hz, H-6'), 7.03 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'), 7.44 (1H, d,  $J = 7.3, 8.4$  Hz, H-6), 11.01 (1H, s,  $\text{OH}$ ).

[Reference: Zehnter, R.; Gerlach, H. *Tetrahed. Asym.* **1995**, 6, 2779-2786.]<sup>45)</sup>



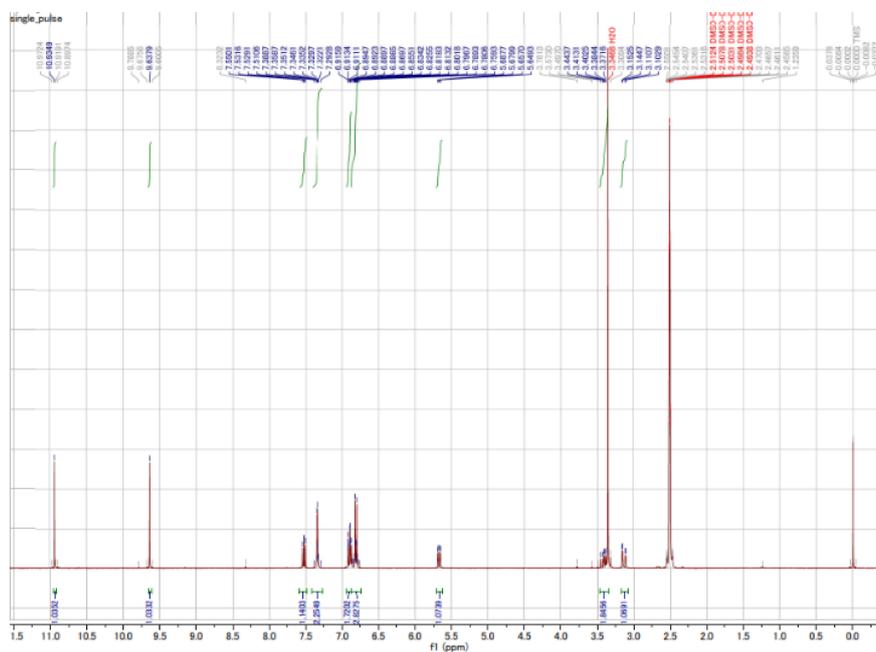


Fig. 29.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of hydrangenol (**3**) [8-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-1-one, 400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ]

$^1\text{H NMR}$  [400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ]  $\delta$  3.13 (1H, dd,  $J = 3.1, 16.7$  Hz, H-4a), 3.41 (1H, dd like,  $J = 12.2, 16.7$  Hz, H-4b), 5.67 (1H, dd,  $J = 3.1, 12.2$  Hz, H-3), 6.81 (2H, d like,  $J = 8.6$  Hz, H-3', 5'), 6.88 (1H, d like,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.90 (1H, d like,  $J = 8.4$  Hz, H-7), 7.34 (2H, d like,  $J = 8.6$  Hz, H-2', 6'), 7.53 (1H, dd like,  $J = 8.4$  Hz, H-7), 9.64 (1H, s, OH), 10.93 (1H, s, OH).

[Reference: Wellmann, J.; Hartmann, B.; Schwarze, E.; Hillebrand, S.; Brueckner, S. I.; Ley, J.; Jerz, G.; Winterhalter, P. *Molecules*. **2022**, *27*, 3424.]<sup>46)</sup>

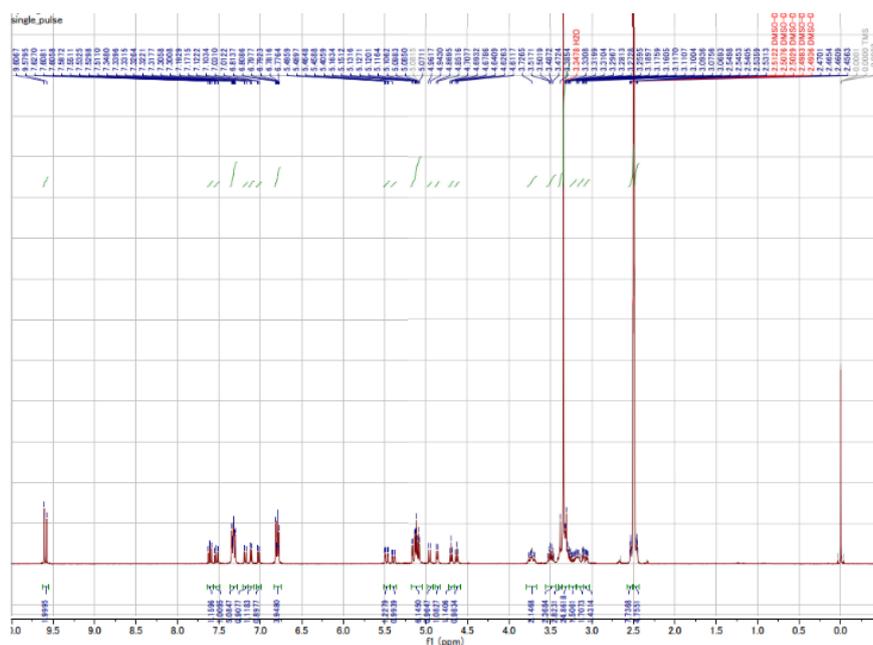


Fig. 30.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of hydrangenol 8- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside (**4**) [ $3R$  and  $3S$  mixture (1:1), 400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ]

$^1\text{H NMR}$  [ $3R$  and  $3S$  mixture (1:1), 400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ]  $\delta$  3.08/3.10 (1H, dd,  $J = 2.7, 16.4$  Hz, H-4a), 3.15-3.40/3.15-3.40 (5H, all m, H-4b, 2'', 3'', 4'', 5''), 3.45-3.55/3.45-3.55 (1H, m, H-6''a), 3.65-3.80/3.65-3.80 (1H, m, H-6''b), 4.63/4.69 (1H, br t,  $J = 5.8$  Hz, OH), 4.86/4.4.95 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-1''), 5.07-5.16/5.07-5.16 (3H, m, OH), 5.39/5.48 (1H, dd,  $J = 2.7, 12.4$  Hz, H-3), 6.79/6.80 (2H, br d,  $J = 8.5$  Hz, H-3', 5'), 7.02/7.11 (1H, br d,  $J = 7.5$  Hz, H-5), 7.18/7.33 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-7), 7.31/7.34 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2', 6'), 7.53/7.61 (1H, dd,  $J = 7.5, 8.5$  Hz, H-6).

[Reference: Wellmann, J.; Hartmann, B.; Schwarze, E.; Hillebrand, S.; Brueckner, S. I.; Ley, J.; Jerz, G.; Winterhalter, P. *Molecules*. **2022**, *27*, 3424.]<sup>46)</sup>

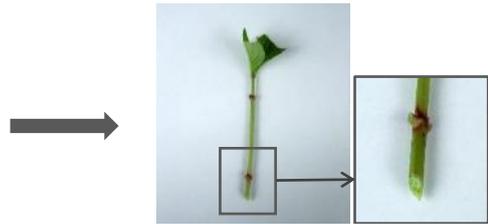
## 第二節の実験

### 植物材料

京都薬科大学薬用植物園見本園で栽培するアマチャ *H. macrophylla* var. *thunbergii* から挿し木で増殖した苗木を使用した。

### 苗木の準備

#### 1. 挿し穂の調製



①枝を採取（2節以上あるものを使用）。

②葉を取り除き，枝の下部は，  
カッターナイフで斜めに切る。

#### 2. 挿し床の準備



赤玉土（小粒）の微塵を除去して使用。

#### 3. 挿し床に挿し穂を挿し，日陰で管理。



#### 4. 培養土に移植

挿し木から約1か月後，発根を確認して，培養土に移植した。

培養土は，赤玉土，鹿沼土，腐葉土，牛糞堆肥を体積比で3：3：2：2の割合で混合した。

Fig. 31. 苗木（挿し木苗）の準備

### 試験土壌の調製, 苗木の定植, 試験場所の条件, 管理方法

試験土壌 [土壌 2] は, 赤玉土, 鹿沼土, 腐葉土, 牛糞堆肥を体積比で 3 : 3 : 2 : 2 の割合で混合したものである. 土壌 1 は, 土壌 2 に 1 L あたり約 66.6 g の苦土石灰を混合して調製した. 土壌 3, 土壌 4, 土壌 5 は, 土壌 2 に体積比で 30%, 50%, 70% のピートモス (pH4.0) を混合して調製した. 試験土壌 (土壌 1 - 5) を黒色ビニールポット (上部直径 24 cm × 高さ 25 cm) に充填し, 各ポットに苗木を 1 本ずつ植えた. 試験は屋外で行い, ビニール屋根と寒冷紗 (遮光率 45%) で覆った. 水は土の表面が乾いたら適宜与えた. 2016 年 6 月, 2015 年と同じ土壌を用いて, 黒色のビニールポット (上部直径 31 cm × 高さ 30.5 cm) に植え替えた. 試験期間中, 試験土壌の pH 値を約 2-4 週間に 1 回測定した (HANNA instruments 土壌 pH 直接測定キット).



赤玉土 (小粒) : 火山灰土  
直径 3 - 6 mm  
製造元 : 刀川平和農園



鹿沼土 (小粒) : 風化火山軽石  
直径 2 - 6 mm  
製造元 : 刀川平和農園



腐葉土 : 広葉樹の落ち葉を腐熟  
させたもの.  
製造元 : 上田林業株式会社



牛糞堆肥 : 牛フンを発酵・乾燥  
させたもの.  
製造元 : 松井牧場



ピートモス : 湿地に水ゴケなどが  
堆積し泥炭化したもの.  
製造元 : (有) 高橋ピートモス工業



炭酸苦土石灰 : ドロマイト (苦灰石) を  
砕いて粉末にしたもの.  
製造元 : 大鉱産業株式会社

Fig. 32 培養土に用いた材料

### アマチャの未修治葉と修治葉の準備

未修治葉：2016年10月，京都薬科大学薬用植物園見本園栽培個体から葉を収穫した後，直ちに40℃に設定した乾燥機（ADVANTEC DRG400AA）で24時間乾燥させた。

修治葉：2016年10月に葉を収穫した後，一次乾燥し，葉に水を噴霧して濡らした．密封可能なプラスチック袋に入れ，25℃に設定した人工気象器（NK System LH-80WLED-DT）内に静置した（暗条件）．次に，葉を手で揉捻し，40℃に設定した乾燥機で24時間乾燥させた（Fig. 33）．得られた葉を修治葉として定量分析に用いた．

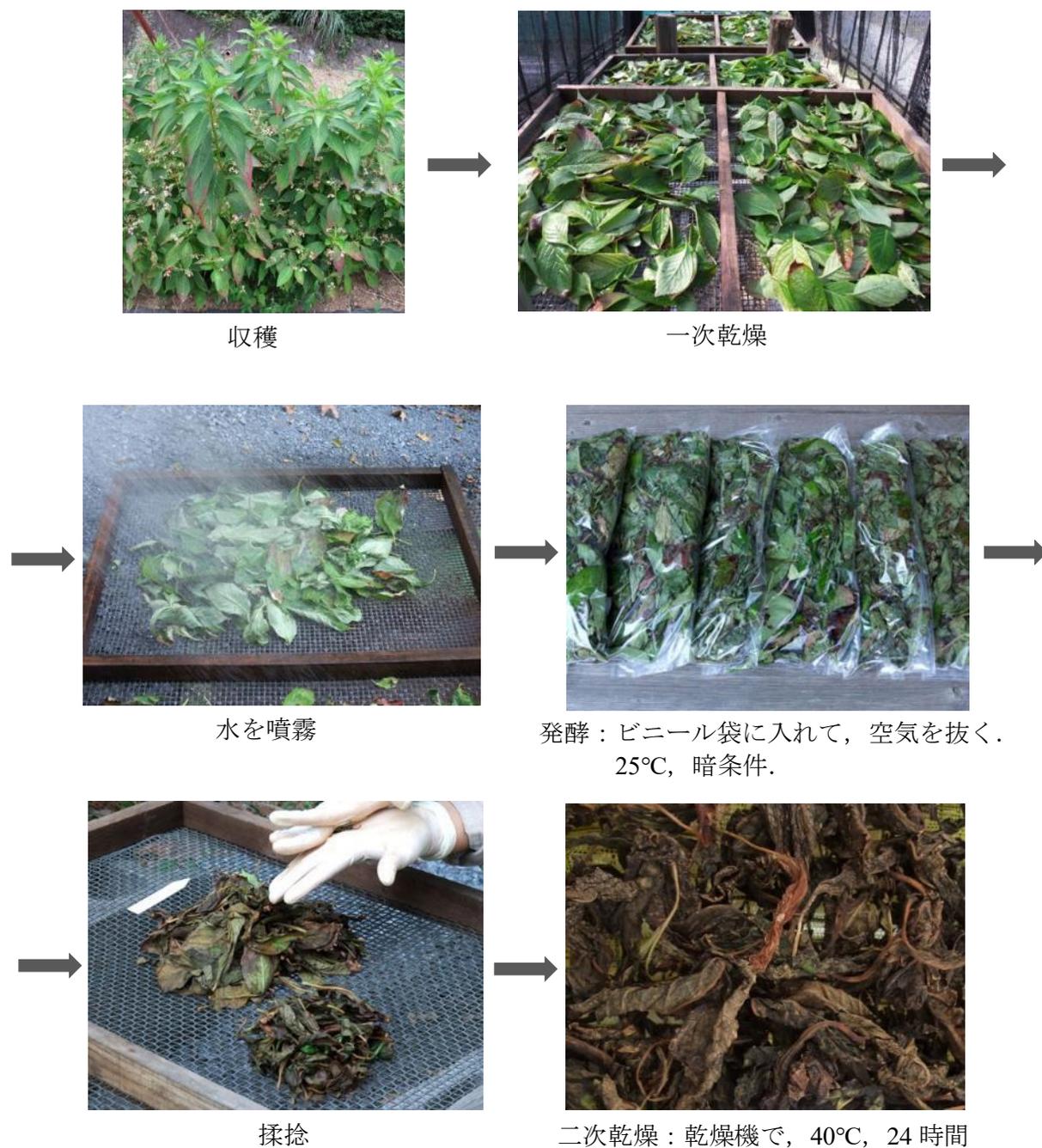


Fig. 33. アマチャの加工調製（修治）

### 土壌 pH (pH5.0-7.5) 別栽培のアマチャ含有化合物 1, 2 の HPLC 定量分析のための試料調製

5 種類の土壌 (土壌 1-5) で栽培した個体から葉を採取し, 40 °C に設定した乾燥機で 24 時間乾燥させた. 葉を粉末にし, 正確に秤量したサンプル (300 mg) を遠沈管に入れ, MeOH (10 mL) を用いて室温で 10 分間超音波処理した. 抽出物を 3000 rpm で 5 分間遠心分離し, 上清を 50 mL のメスフラスコに移した. この抽出を 2 回繰り返した. 合わせた溶液を MeOH で定容した. この溶液をシリンジフィルター (0.45 µm) でろ過し, 10 µL の試料を HPLC 分析に供した. 定量分析に用いた試料とは別に, 各粉末試料を 105 °C で 5 時間乾燥させた. 化合物 1, 2 の収率は, 乾燥中の損失を考慮して計算した. 標品の調製, HPLC システムおよび分析条件は, 第一章第一節の方法に準じた.

## 第二章の実験

水素核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H}$ Nuclear Magnetic Resonance,  $^1\text{H}$ NMR) は, JEOL ECS-400 (400 MHz) (日本電子株式会社, 東京) を用いて測定した.

クロマトグラフィーには以下の材料を使用した: 順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーの吸着剤には, Silica Gel BW-200 (Fuji Silysia Chemical, 150 - 350 mesh) (ナカライテスク株式会社, 京都) を使用した. 薄層クロマトグラフィー (TLC) には, silica Gel 60F<sub>254</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 0.25 mm) (順相) を使用し, 検出は 1% Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> - 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液をスプレーした後, 加熱時の呈色により行った.

### 第一節の実験

#### 植物材料

葉はすべて京都薬科大学薬用植物園見本園で栽培するアマチャから採取した. 未修治葉は, 2022 年 9 月の収穫後, ただちに, 40 °C に設定した乾燥機 (ADVANTEC DRG400AA) で乾燥させた. 修治葉は, 2022 年 9 月の収穫後, 乾燥させたアマチャの葉に水をかけ, 密封可能なプラスチック袋に入れ, 15 °C または 25 °C に設定した人工気象器 (NK System LH-80WLED-DT) で 0 [0 時間を発酵開始時間とした], 6, 24, 48 時間静置した (暗条件). 次に, 葉を手で揉捻し, 40 °C に設定した乾燥機で 24 時間乾燥させた.

#### 試薬

抽出に用いた MeOH, HPLC に用いたアセトニトリル (ACN) および酢酸は, 富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した.

#### 修治条件によるアマチャの化合物 1, 2 の含量比較のための試料調製

各条件で修治した葉を粉末にし, 正確に秤量したサンプル (300 mg) を遠沈管に入れ, MeOH (10 mL) を用いて室温で 10 分間超音波処理した. 抽出物を 3000 rpm で 5 分間遠心分離し, 上清を 50 mL のメスフラスコに移した. この抽出を 2 回繰り返した. 合わせた溶液を MeOH で定容した. この溶液をシリンジフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過し, 10  $\mu\text{L}$  の試料を HPLC 分析に供した. 定量分析に用いた試料とは別に, 各粉末試料を 105 °C で 5 時間乾燥させた. 化合物 1, 2 の収率は, 乾燥中の損失を考慮して計算した.

## 標準溶液の調製

化合物 **1**, **2** は京都薬科大学生薬学分野が所有するものを使用した。化合物 **1**, **2** の標準試料の単離および構造決定は、既述の方法で行った<sup>3,45,46</sup>。標準試料 **1**, **2** の 10.00 mg を正確に量り、20 mL のメスフラスコに入れ、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.50 mg/mL) とした。標準原液 (0.50 mg/mL) 2 mL を 10 mL または 20 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.05 mg/mL および 0.10 mg/mL) とした。各標準原液 2 mL を 10 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.01 mg/mL および 0.02 mg/mL) とした。各標準原液 2 mL を 10 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.002 および 0.004 mg/mL) とした。標準原液 (0.004 mg/mL) 2 mL を 20 mL メスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.0004 mg/mL) とした。この溶液を用いて、検量線を作成するための溶液 (0.4, 2.0, 4.0, 10, 20, 50, 100, 500  $\mu$ g/mL) を調製した。各溶液の 10  $\mu$ L を HPLC システムに注入した。各ピークは以下の保持時間で観察された。(t<sub>R</sub>) : (R)-phyllodulcin (**1**), 37.5 分; (3R)-phyllodulcin 8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**2**), 25.8 分。これらのピークは、試料の保持時間と比較することによって同定した<sup>3</sup>。

標準曲線は、0.4 - 500  $\mu$ g/mL の 8 種類の濃度で作成した。検量線の直線性の判定には決定係数 (R<sup>2</sup>) を用いた。pH6.5-7.0 (土壌 2) で生育させた個体の未修治葉の抽出物を用いて、分析法の精度と正確性を検証した。日内変動および日間変動は、それぞれ同じ日および異なる 5 日間に対応する応答を 5 回推定することによって決定した。

## HPLC システムおよび条件

HPLC システム (島津製作所, 京都) には、UV 検出器 (SPD-10A), コントロールモジュール (SCL-10A vp), バイナリーポンプ (LC-10AD vp), オートサンプラー (SIL-10AD vp), 恒温カラムコンパートメント, 脱気装置を用いた。検出は 314 nm で行った。これは、化合物 **1** と **2** の UV スペクトルにおいて、クマリン骨格の存在によりこの波長付近に吸収が生じるためである。クロマトグラフィー分離は、YMC-Triart C18 カラム (粒子径 5  $\mu$ m, 内径 4.6 mm  $\times$  250 mm, 株式会社ワイエムシィ, 京都) を用い、カラム温度 40  $^{\circ}$ C で、以下の条件で操作した: 移動相 A (ACN) および B (1.0% 酢酸を含む H<sub>2</sub>O); グラジエントプログラム: 0 - 10 分 (A:B 10:90, v/v, ホールド)  $\rightarrow$  35 分 (A:B 60:40, v/v)  $\rightarrow$  40 分 (A:B 100:0, v/v)。流速は 1.0 mL/min, 注入量は 10  $\mu$ L であった。

## 第二節の実験

### 植物材料

葉は、すべて京都薬科大学薬用植物園見本園で栽培しているアマチャから採取した。葉の大きさ、色、部位別比較のための葉は、2022年9月に採取した。採取時期別比較のための葉は、2017年5-9月に採取した。異なる土壌 pH (pH5.0-7.5) 下で栽培された葉は、第一章の通り、2016年10月に収穫した。

収穫した葉は直ちに 40°C に設定した乾燥機でそれぞれ 24 時間乾燥させた。得られた葉を定量分析に用いた。

### 試薬

抽出用 MeOH, HPLC に用いた ACN および酢酸は、富士フィルム和光純薬株式会社(大阪)から購入した。青酸配糖体 taxiphyllin (**5**) の合成に用いた試薬は、富士フィルム和光純薬株式会社(大阪)、ナカライテスク株式会社(京都)から購入した。

### taxiphyllin (**5**) の標準溶液の調製

標準試料である taxiphyllin (**5**) は、既報の方法<sup>30)</sup>を用いて合成した。化合物 **5** は、<sup>1</sup>H NMR および MS データを報告値と比較することにより同定した<sup>30)</sup>。

正確に秤量した 1.82 mg の化合物 **5** を 5 mL のメスフラスコに入れ、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.364 mg/mL) とした。標準原液 (0.728 mg/mL) 2 mL を 5 mL メスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.1456 mg/mL) とした。標準原液 (0.2912 mg/mL) 2 mL を 10 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.0291 mg/mL) とした。標準原液 (0.0582 mg/mL) 2 mL を 10 mL または 25 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.00582 および 0.00233 mg/mL) とした。この溶液を用いて、検量線を作成するための溶液 (2.33, 5.82, 29.1, 145.6, 364 µg/mL) を調製した。キャリブレーションのため、10 µL の溶液を HPLC システムに注入した。次の保持時間 ( $t_R$ ) にピークが観察された: 8.5 分。

標準曲線は 2.33 - 364 µg/mL の濃度で作成した。化合物 **5** の直線性は、ピーク面積に対する濃度のプロットの回帰直線式を求め、決定係数 ( $R^2$ ) を用いて直線性を決定した。アマチャ葉抽出物 (Fig. 14 leaf A: 葉身の長さ 6cm 以上 8cm 未満) を用いて、分析法の精度と正確さを検証した。日内変動および日間変動は、それぞれ同じ日および異なる 5 日間に対応する反応を 5 回推定することによって決定した。

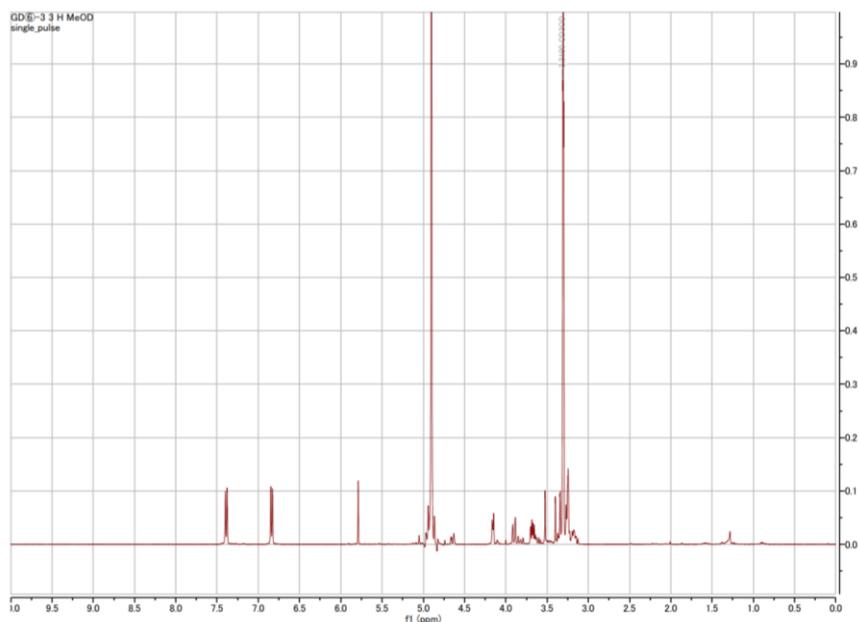


Fig. 34. taxiphyllin (5) の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.40 (2H, d,  $J = 8.6$ , H-2',6'), 6.85 (2H, d,  $J = 8.6$ , H-3',5'), 5.80 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, d like,  $J = 7.6$  Hz, H-1"), 3.91 (1H, dd like,  $J = 1.8, 12.1$  Hz, H-6"a), 3.68 (1H, dd like,  $J = 6.2, 12.1$  Hz, H-6"b), 3.25-3.35 (4H, m, H-2",3",4",5")

#### taxiphyllin (5) の定量分析条件

taxiphyllin (5) の分析は、HPLC システムと LCMS-8040 タンデム四重極型質量分析計（島津製作所，京都）を用いて行った。装置は LabSolutions LCMS Ver.5.6 を用いた。HPLC システムは、システムコントローラー (CBM-20A)，PDA 検出器 (SPD-M20A)，2 台のバイナリーポンプ (LC-20AD)，オートサンプラー (SIL-20AC)，カラムヒーター (CTO-20AC)，および脱気装置 (DGU-20A) を用いた。クロマトグラフィー分離は、Cosmosil C18-PAQ カラム（粒子径  $5\ \mu\text{m}$ ，内径  $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$ ）（ナカライテスク株式会社，京都）を用いて行い，その他の条件は以下の通りであった。

カラム温度： $40\ ^\circ\text{C}$ ；移動相 A (ACN) と B ( $\text{H}_2\text{O}$ )；A : B 10 : 90, v/v；流速： $1.0\ \text{mL}/\text{min}$ ；注入量： $10\ \mu\text{L}$ ；検出波長： $197\ \text{nm}$ 。MS スペクトルの検出は，ポジティブモードエレクトロスプレーイオン化質量分析装置 (ESI-MS) による Q1 スキャンモードで行った。

MS 検出の操作パラメーターは，ネブライザーガスフロー， $3\ \text{L}/\text{min}$ ；乾燥ガスフロー， $15\ \text{L}/\text{min}$ ；脱溶媒ライン温度， $250\ ^\circ\text{C}$ ；ヒートブロック温度， $400\ ^\circ\text{C}$ ；インターフェース電圧： $4.5\ \text{kV}$ 。

葉の大きさ，色および部位，採取時期，土壌 pH 値別栽培個体における化合物 5 含量比較のための試料調製

葉を粉末にして正確に秤量し（葉の大きさ・色・部位別：Fig. 14 の leaf A, leaf B, 葉柄は 1.000 g, leaf C - G および主脈は 300 mg, 時期別採取：2017 年 5 - 9 月は 300 mg, 土壌 pH 値別栽培個体：300mg), MeOH (10 mL) を加えて室温で 10 分間超音波処理した。抽出液を 3000 rpm で 5 分間遠心分離し，上清を 50 mL メスフラスコに移した。抽出を 2 回繰り返した。合わせた溶液を MeOH で定容した。この溶液をシリンジフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過し，10  $\mu\text{L}$  の試料を HPLC 分析に供した。定量分析に用いた試料とは別に，各粉末試料を 105  $^{\circ}\text{C}$  で 5 時間乾燥させた。化合物 5 の収率は，乾燥過程での損失を考慮して計算した。

## 第三章の実験

### 第一節の実験

#### 植物材料および外植体の滅菌

京都薬科大学薬用植物園見本園で栽培されたアマチャから、2022年9月から11月にかけて葉芽と葉を採取した。葉芽と展開直後の葉を、カルス形成を誘導するための外植体として用いた。外植体を70%エタノール (EtOH) に1分間、次いで1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に15分間浸した後、蒸留水で3回洗浄した。その後、5% Plant Preservative Mixture™ (PPM™)<sup>35)</sup> 溶液に浸し、4時間攪拌して滅菌した。

#### 試薬

カルス誘導、増殖、継代に使用した試薬は、富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪)、ナカライテスク株式会社 (京都) およびケニス株式会社 (大阪) から購入した。

#### 培地と培養条件

すべての実験において、ビタミンを含むムランゲ・スクーグ (MS) 培地を使用した<sup>34)</sup>。MS培地には、30 g/L Sucrose, 0.5 mL/L PPM™, および異なる組み合わせの植物ホルモンを添加した。培地の pH は、0.1M 塩酸または 0.1M 水酸化ナトリウム溶液を用いて 5.8 に調整した後、3 g/L のジェランガムを添加し、121 °C で 20 分間オートクレーブ処理した。カルス培養にはプラスチックペトリ皿 (直径 9 cm × 高さ 2 cm) を用いた。

培養はすべて、25 ± 2 °C に設定したインキュベーター (Cool Incubator CN-25C) で、暗条件下で行った。

#### カルス誘導および継代培養

カルス誘導には、ビタミンを含む MS 培地 (30 g/L Sucrose, 0.5 mL/L PPM™, 3 g/L ジェランガム) に、2 種類の植物ホルモン [2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 0.5 mg/L と 6-フルフリルアミノプリン (KIN) 0.5 mg/L] を添加した。滅菌した外植体を培地に植え付け、25 ± 2 °C のインキュベーター内で暗条件下、約 4 週間培養した。カルス形成が確認された後、誘導に成功したカルスを摘出し、カルス誘導用に調整した培地に移し、25 ± 2 °C のインキュベーター内で、暗条件下で培養した。カルスを 1 個 (Fig. 17, カルス S') 選択し、数片に切断して増殖用培地に移し、8 週間培養した (Fig. 17, カルス S'')。増殖用培地には、ビタミンを含む MS 培地 (Sucrose 30g/L, PPM™ 0.5mL/L, ジェランガム 3 g/L を添加) に、2 種類の植物ホルモン (2,4-D 5.0 mg/L, KIN 0.5 mg/L) を添加した<sup>36)</sup>。カルスは、増殖用培地を用いて約 8 週間隔で継代培養した。

### カルス増殖の測定

カルス (Fig. 17, カルス S") を数片に切断し, 条件検討用の培地に移植した (Table 7). 移植日を 0 日とし, 0 日目 (0 wk), 4 週間後 (4 wk), 8 週間後 (8 wk) に, カルスの底面積を測定した. 底面積の測定では, カルスを培養するシャーレの底にトレーシングペーパーを密着させ, カルスの外縁を描き写した. カルスの面積は, 米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health, NIH) が開発した ImageJ ソフトウェアを用いて算出した.

## 第二節の実験

### 試薬

カルス培養に使用した試薬は、富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）、ナカライテスク株式会社（京都）およびケニス株式会社（大阪）から購入した。

抽出用 MeOH, HPLC に用いた ACN および酢酸は、富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）から購入した。

### 化合物 1 - 4 定量分析用カルスの調製

カルス (Fig. 17, カルス S") を数片に切断し、増殖用培地から Table 7 に示すそれぞれの培地 I - Q に移植した。培地 I - Q で培養したカルスについて定量分析を行った。カルスは凍結乾燥機 (Eyela FDU-1200) で凍結乾燥した。凍結乾燥したカルスを破砕し、MeOH (800  $\mu$ L) 中、室温で 15 分間超音波処理した。抽出液を 3000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を 2 mL メスフラスコに移した。抽出は 2 回繰り返す、MeOH で定容した。この溶液をシリンジフィルター (0.45  $\mu$ m) でろ過し、LC-MS 分析に供した。

### 標準溶液の調製

化合物 1 - 4 は京都薬科大学生薬学分野が所有するものを使用した。標準試料の単離と構造決定は、既述の方法で行った<sup>3)</sup>。正確に秤量した各標準試料 1 - 4 10.00 mg を 20 mL のメスフラスコに入れ、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液とした (1 は 0.50 mg/mL)。標準原液 (0.50 mg/mL) 2 mL または 4 mL を 20 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (2 は 0.05 mg/mL, 1 は 0.10 mg/mL) とした。その後、各標準原液 (0.05 mg/mL) 2 mL および 4 mL を 10 mL のメスフラスコに移し、MeOH で容量を調整した。得られた溶液を標準原液 (1 - 4 は 0.01 mg/mL, 1 は 0.02 mg/mL) とした。標準原液 (0.02 mg/mL) 2 mL を 10 mL メスフラスコに移し、MeOH を十分量加えた。得られた溶液を標準原液 (0.004 mg/mL for 1 - 4) とした。標準原液 (0.004 mg/mL) 2 mL を 20 mL のメスフラスコに移し、MeOH で定容した。得られた溶液を標準原液 (0.0004 mg/mL for 1 - 4) とした。この溶液を用いて、検量線を作成するための溶液 (1 については 0.4, 4.0, 10, 20, 100, 500  $\mu$ g/mL; 2 については 0.4, 4.0, 10, 50  $\mu$ g/mL; 3 および 4 については 0.4, 4.0, 10  $\mu$ g/mL) を調製した。検量線作成には、各溶液 (4  $\mu$ L または 20  $\mu$ L) を LC-MS システムに注入した。各ピークは以下の保持時間 ( $t_R$ ) で観察された: 1, 34.1 分; 2, 23.0 分; 3, 33.7 分; 4, 21.5 および 22.3 分 (それぞれ 3R および 3S 混合物)。化合物 1 - 4 の直線性は、ピーク面積対濃度の直線回帰を用いてプロットし、決定係数 ( $R^2$ ) を用いて直線性を求めた。

## HPLC システムと分析条件

化合物 **1-4** は、HPLC システムと ESI インターフェースを備えた LCMS-8040 タンデム四重極型質量分析計（島津製作所，京都）を用いて分析した。装置は LabSolutions LCMS Ver.5.6 を用いて操作した。HPLC システムは、システムコントローラー（CBM-20A）、PDA 検出器（SPD-M20A）、2 台のバイナリーポンプ（LC-20AD）、オートサンプラー（SIL-20AC）、カラムヒーター（CTO-20AC）、および脱気装置（DGU-20A）を用いた。クロマトグラフィー分離は、YMC-Triart C18 カラム（粒子径 5  $\mu\text{m}$ ，内径 4.6 mm  $\times$  250 mm，株式会社ワイエムシィ，京都）を用い，以下の条件で行った。

カラム温度：40  $^{\circ}\text{C}$ ；移動相：A（ACN）および B（1.0%酢酸含有  $\text{H}_2\text{O}$ ）；グラジエントプログラム：0-10 分（A:B 10:90，v/v，ホールド） $\rightarrow$ 35 分（A:B 60:40，v/v） $\rightarrow$ 40 分（A:B 100:0，v/v）。流速は 1.0 mL/min，注入量は 20  $\mu\text{L}$  であった。検出は，ネガティブモード ESI-MS を用い，選択イオンモニタリング（SIM）下で，314 nm（UV）で行った。MS 検出のための操作パラメーターは以下の通り：ネブライザーガスフロー，3 L/min；乾燥ガスフロー，15 L/min；脱溶媒ライン温度，250  $^{\circ}\text{C}$ ；ヒートブロック温度，400  $^{\circ}\text{C}$ ；界面電圧，4.5 kV。

## 引用文献

- 1) The Japanese Pharmacopoeia eighteenth edition (Ministry Notification No. 220 of June 7, 2021). The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 2) Suzuki, H.; Ikeda, T.; Matsumoto, T.; Noguchi, M. *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1815 - 1817.
- 3) Yoshikawa, M.; Chatani, N.; Harada, E.; Nishino, Y.; Yamahara, J.; Murakami, N. *Yakugaku Zasshi* **1994**, *114*, 176 - 181.
- 4) Asahina, Y.; Asano, J. *Yakugaku Zasshi* **1929**, *49*, 117 - 128.
- 5) Yamato, M.; Sato, K.; Hashigaki, K.; Oki, M.; Koyama, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *22*, 475 - 476.
- 6) Yamato, M.; Kitamura, T.; Hashigaki, K.; Kuwano, Y.; Yoshida, N.; Koyama, T. *Yakugaku Zasshi* **1972**, *92*, 367 - 370.
- 7) Yamahara, J.; Miki, A.; Tsukamoto, K.; Murakami, N.; Yoshikawa, M. *Nat. Med.* **1995**, *49*, 84 - 87.
- 8) Yano, A.; Yuki, S.; Kanno, Y.; Shiraishi, A.; Onuma, H.; Uesugi, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2023**, *86*, 1045 - 1055. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbad078>.
- 9) 公益財団法人日本特産農産物協会. [http://www.jsapa.or.jp/Acrop\\_Jpaper/index.html](http://www.jsapa.or.jp/Acrop_Jpaper/index.html)  
(2023年9月15日)
- 10) Satake, Y.; Hara, H.; Watari, S.; Tominari, T. "Wild Flowers of Japan" Heibonsha Ltd., Publishers, Tokyo, Japan, **1989**.
- 11) Ohwi, J. "Flora of Japan" Shibundo, Tokyo, Japan, **1953**.
- 12) Kunitake, T.; Tanigawa, T.; Kuroyanagi, N. *福岡県農業総合試験場研究報告* **2002**, *21*, 30 - 34.
- 13) Maz, Z. C.; Chen, R.; Shen, F. *Plant and Soil* **2014**, *38*, 1 - 12.
- 14) Horst, W. J.; Wang, Y.; Eticha, D. *Annals of Botany* **2010**, *106* (1), 185 - 197.
- 15) Matsumoto, H. *Root Research* **2003**, *12* (4), 149 - 162.
- 16) Kodama, M.; Inoue, H.; Nakayama, M. *Hort. Res. (Japan)*. **2022**, *21* (1), 73 - 81.  
doi: 10.2503/hrj.21.73
- 17) Kodama, M.; Tanabe, Y.; Nakayama, M., *The Horticulture Journal* **2016**, *85* (4), 372 - 379.  
doi: 10.2503/hortj.MI-131
- 18) Izawa, B.; Miyake, H.; Tanaka, K.; Fujimori, M. Korekarano Yakusou-Saibai to Saishu. *Adumi Shobou*, **1963**, 55 - 58.
- 19) Kim, M.; Yoo, S.; Kim, Y.; Hong, J. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 1065 - 1072.
- 20) Kojima, T.; Kai, S.; Kishi, H.; Uemura, H.; Miyazawa, M.; Satake, M. *J. Cookery Sci. Jpn.* **2018**, *51* (2), 133 - 134.
- 21) Liu, J.; Nakamura, S.; Zhuang, Y.; Yoshikawa, M.; Hussein, G. M. E.; Matsuo, K.; Matsuda, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 655 - 661.
- 22) Tabata, M.; Mizukami, H.; Hiraoka, N.; Konoshima, M. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 927 - 932.
- 23) Nawa, Y.; Ohtani, T. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 1732 - 1736.
- 24) Higuchi, S. "In-vitro Culture of Horticultural Plants" Shibata Hario Glass Industries Co., Tokyo, Japan, **1988**.

- 25) Martinez, M. E.; Jorquera, L.; Poirrier, P.; Díaz, K.; Chamy, R. *Agronomy* **2021**, *11*, 1181.
- 26) 農林水産省 [https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen\\_type/h\\_sehi\\_kizyun/pdf/ntuti16.pdf](https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_sehi_kizyun/pdf/ntuti16.pdf)  
(2023年9月20日)
- 27) 農林水産省  
[https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen\\_type/h\\_sehi\\_kizyun/attach/pdf/tottori01-3.pdf](https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_sehi_kizyun/attach/pdf/tottori01-3.pdf)  
(2023年9月20日)
- 28) Enrico, D. C. *The Journal of Biochemistry* **2006**, *282* (3), 1305 - 1308.
- 29) 国土交通省気象庁 <https://www.jma.go.jp/jma/index.html> (2022年9月1日)
- 30) Møller, BL.; Olsen, CE.; Motawia, MS. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1198 - 1202.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01121>
- 31) IPCS UNEP//ILO//WHO, Concise International Chemical Assessment Document No61  
Hydrogen Cyanide and Cyanides : Human Health Aspects **2004**, 20 - 21.  
<http://www.nihs.go.jp/hse/cicad/full/no61/full61.pdf>
- 32) Møller, BL.; Opina, C. *Plant Biol.* **2010**, *13* (3), 338 - 347.
- 33) Yamazaki, S.; Shibusawa, N.; Kuribayashi, T.; Karasawa, H.; Ohinata, H. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2012**, *59* (10), 522 - 527.
- 34) Murashige, T.; Skoog, F. *Physiol Plant* **1962**, *15*, 473 - 497.
- 35) Niedz, R. P.; Bauscher, M. G. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* **2002**, *38*, 468 - 471.
- 36) Ruffoni, B.; Sacco, E.; Savona, M. *Methods in Mol. Biol.* **2013**, *994*, 231 - 244.
- 37) Abdelmageed, A. H. A.; Faridah, Q. Z.; Nor Shuhada K.; Julia A. A. *J. Med. Plants Res.* **2012**, *6*, 3338 - 3344.
- 38) Minami, M.; Yamazaki, T.; Kitabayashi, H.; Ujihara, A. *Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ.* **1992**, *29*, 121 - 128.
- 39) Yoshikawa, M. “生薬学・天然物化学” Kagaku-Dojin Publishing Company, INC., Kyoto, Japan, **2011**, 127 - 128.
- 40) Uchida, K.; Fukuda, T.; Iwao, M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7178 - 7186.
- 41) Guñesa, M.; Speicherb, A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8799 - 8802.
- 42) Mandal, SK.; Roy, SC. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11050 - 11057.
- 43) Tanaka, H. *生物工学会誌* **2006**, *84* (1), 2 - 15.
- 44) Yamamoto, Y.; Isozaki, T.; Kitamaki, Y.; Kurata, K.; Taira, M.; Takeda, O.; Yamaguchi, Y.; Sasaki H. *The Japanese journal of pharmacognosy* **2023**, *77* (1), 24 - 41.
- 45) Zehnter, R.; Gerlach, H.; *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 2779 - 2786.
- 46) Wellmann, J.; Hartmann, B.; Schwarze, E.; Hillebrand, S.; Brueckner, S. I.; Ley, J.; Jerz, G.; Winterhalter, P. *Molecules* **2022**, *27*, 3424.