

## 26. 奈良県内に自生するシロツメクサの有用成分及び有毒成分の含量に関する調査

○谷手 紗也香 (奈良県薬事研究センター)

### 【研究目的】

シロツメクサはイソフラボンであるフォルモノネチンを含有し、骨粗鬆症予防などの健康効果が期待される。一方で、リナマリンなどの青酸配糖体を含有し、シアン中毒を引き起こす危険性がある。そこで本研究では、奈良県内に自生するシロツメクサを対象として、フォルモノネチン及びリナマリンの含量とその部位別分布、また採取地、採取時期による含量の変動について調査した。

### 【研究の必要性】

シロツメクサ (*Trifolium repens*) は日本各地に広く分布し、身近に親しまれている。西洋や中国では薬草として用いられるが、日本では雑草として駆除されることがほとんどである。シロツメクサは幅広い土壌や環境条件で育ち、繁殖力が旺盛であるため、日本全国で大量のシロツメクサが駆除された後、活用されずに廃棄されていると考えられる。

シロツメクサに含まれるイソフラボンの一種であるフォルモノネチンは骨粗鬆症予防作用<sup>1,2)</sup>、抗がん作用<sup>3)</sup>などが報告されており、健康促進に役立つ成分として注目されている。

一方で、シロツメクサにはリナマリンやロタウストラリンといった青酸配糖体が含まれており、シアン中毒を引き起こす危険性がある。そのため、食用とする場合には、青酸配糖体を除去する必要があるが、この手順を踏まずに喫食している事例がインターネット上で散見される。このような誤った情報が拡散されることにより、健康被害が発生する恐れがあるため、シロツメクサに含まれる青酸配糖体についての知見を得る必要があると考えられる。

一般に、植物中の成分含量は外部環境の影響により変動することがある。そこで本研究では、奈良県内各地のシロツメクサを採取し、有用成分であるフォルモノネチンと毒性成分であるリナマリンの含量を測定し、採取地域によって含量に差異が見られるか調査する。また、採取時期や部位により成分含量が異なる可能性もあるため、部位及び採取時期別の成分含量を調査し、使用に適した採取地域・時期及び部位について明らかにする。

### 【研究計画】

2024年9月～11月の期間に、奈良県内の38市町村においてシロツメクサを採取し、リナマリンとフォルモノネチンの含量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって測定し、地域別に比較する。

また、奈良県内の3地点について、2024年9月～2025年8月の間、2ヶ月ごとにシロツメクサを採取し、小葉、葉柄、匍匐茎及び根、花茎、花の5部位のリナマリンとフォルモノネチンの含量をHPLCによって測定し、部位及び採取時期別に成分含量を比較する。

### 【実施内容・結果】

#### 1. 試料

2024年11月～2025年3月に、奈良県内の38市町村において、各市町村から3地点を選び、各地点で3個体のシロツメクサを採取し、水洗、乾燥、粉碎したものを地域別比較の試料とした。

また、橿原市、桜井市、御所市の3地点で、2024年10月、12月、2025年2月、4月、6月の計5回シロツメクサを採取した。採取したシロツメクサを水洗、乾燥した後、小葉、葉柄、匍匐茎及び根（以下、茎とする）、花茎、花の5部位（花及び花茎は4月、6月のみ）の5部位に分け、粉碎したものを、部位及び採取時期別の含量比較用の試料とした。



図1 採取地点

検体の採取地点を図1に示した。なお、採取期間は2024年9月からを予定していたが、9月はシロツメクサが休眠しており、採取が困難だったため、10月より採取を開始した。

#### 2. 標準物質

Toronto Research Chemicals Inc.製リナマリン、東京化成工業株式会社製フォルモノネチンを使用した。

#### 3. 試料溶液の調製

試料約0.5gを精密に量り、アセトニトリル／水混液（3:1）10mLを正確に加え、30分間超音波抽出を行った後、遠心分離し、上澄液をフォルモノネチン試料溶液とした。さらに、この液1mLを正確にとり、アセトニトリル19mLを加えた後、Supelclean™ LC-NH2(500mg)に入れて流出させた。さらに、アセトニトリル／水混液（19:1）10mLで流出させ、先の流出液と合わせて40°Cで減圧乾固し、残留物を水5mLに溶かしてリナマリン試料溶液とした。

#### 4. 標準溶液調製方法

フォルモノネチン約2mgを精密に量り、水／アセトニトリル混液（3:1）に溶かして正確に10mLとし、フォルモノネチン標準溶液とした。また、リナマリン約1mgを精密に量り、水に溶かして正確に100mLとした。この液1mLを正確に量り、水を加えて正確に10mLとし、リナマリン標準溶液とした。

#### 5. フォルモノネチン測定方法

[装置]システムコントローラ:CBM-20A Lite、送液ポンプ:LC-20AT、カラムオーブン:CTO-20AC、フォトダイオードアレイ検出器:SPD-M40

[測定条件]測定波長:270 nm、カラム:Inertsil ODS-4 5 μm 4.6×150 mm、カラム温度:

40 °C、移動相：水／アセトニトリル混液 (7:3)、流量：1.0 mL/min、注入量：10 µL

## 6. リナマリン測定方法

リナマリンは紫外可視領域に吸収を持たず、HPLC による分析は困難であったため、LC-MS を用いて定量を行った。

[装置] システムコントローラ：CBM-40、送液ポンプ：LC-40B XR、カラムオーブン：CTO-40C、質量分析計：LCMS-2050

[測定条件] カラム：Inertsil ODS-3 5 µm 4.6×150 mm、カラム温度：40 °C、移動相：薄めた酢酸 (1→10000) / メタノール混液 (7:3)、流量：0.8 mL/min、注入量：10 µL、イオン化モード：ESI (+)、ネブライザガス流量：3.0 L/min、ドライイニングガス流量：5.0 L/min、ヒーティングガス流量：7.0 L/min、脱溶媒温度：400 °C、DL 温度：250 °C、インターフェイス電圧：3.0 kV、測定モード：SIM、定量イオン：m/z 270.0

## 7. 試料測定結果

市町村ごとのフォルモノネチン及びリナマリンの測定結果を表 1 に示した。また、フォルモノネチンを含有しない検体が五條市の 1 検体、リナマリンを含有しない検体が天川村と黒滝村の 2 検体存在した。

表 1 各市町村のフォルモノネチン及びリナマリン含量

市町村	フォルモノネチン (µg/g)	リナマリン (µg/g)	地域	市町村	フォルモノネチン (µg/g)	リナマリン (µg/g)	地域
明日香	11.249	755.79	大和平野	桜井	116.65	317.60	大和平野
安堵							大和平野
斑鳩							五條・吉野
生駒			地域	n	リナマリン含量	フォルモノネチン含量	五條・吉野
宇陀					平均値 µg/g	平均値 µg/g	五條・吉野
王寺	大和平野	69	538.42		42.96		大和平野
大淀	大和高原	12	877.97		56.70		大和平野
櫃原							大和平野
香芝	五條・吉野	38	596.39		46.52		五條・吉野
葛城	15.311	894.18	大和平野	天理	139.17	278.61	大和平野
上北山	32.836	513.97	五條・吉野	十津川	63.113	463.90	五條・吉野
河合	23.011	451.93	大和平野	奈良	44.929	808.24	大和平野
川上	50.597	595.45	五條・吉野	野迫川	43.106	804.64	五條・吉野
川西	64.957	250.97	大和平野	東吉野	54.111	180.53	五條・吉野
上牧	13.660	221.77	大和平野	平群	33.310	564.52	大和平野
黒滝	95.348	344.03	五條・吉野	御杖	53.691	971.46	大和高原
広陵	29.360	531.90	大和平野	三宅	41.682	407.87	大和平野
五條	16.877	329.88	五條・吉野	山添	52.234	1102.1	大和高原
御所	27.473	484.57	大和平野	大和郡山	44.141	283.58	大和平野
				吉野	43.322	1238.4	五條・吉野

各市町村を大和平野地域、大和高原地域、五條・吉野地域の 3 地域<sup>4)</sup>に区分して（表 1）各地域の成分含量を比較した結果、フォルモノネチン含量、リナマリン含量ともに、大和高原地域で最も高く、大和平野地域で最も低かった（表 2）。

表2 地域別の成分含量

部位及び採取時期別の成分含量の測定結果を図2に示した。リナマリン含量は全期間で葉柄が最も高く、次いで小葉が高かった。また、両部位とも12月に最高値を示した。フォルモノネチン含量は葉柄と茎で高く、葉柄は10月、茎は10月と2月に高値を示した。

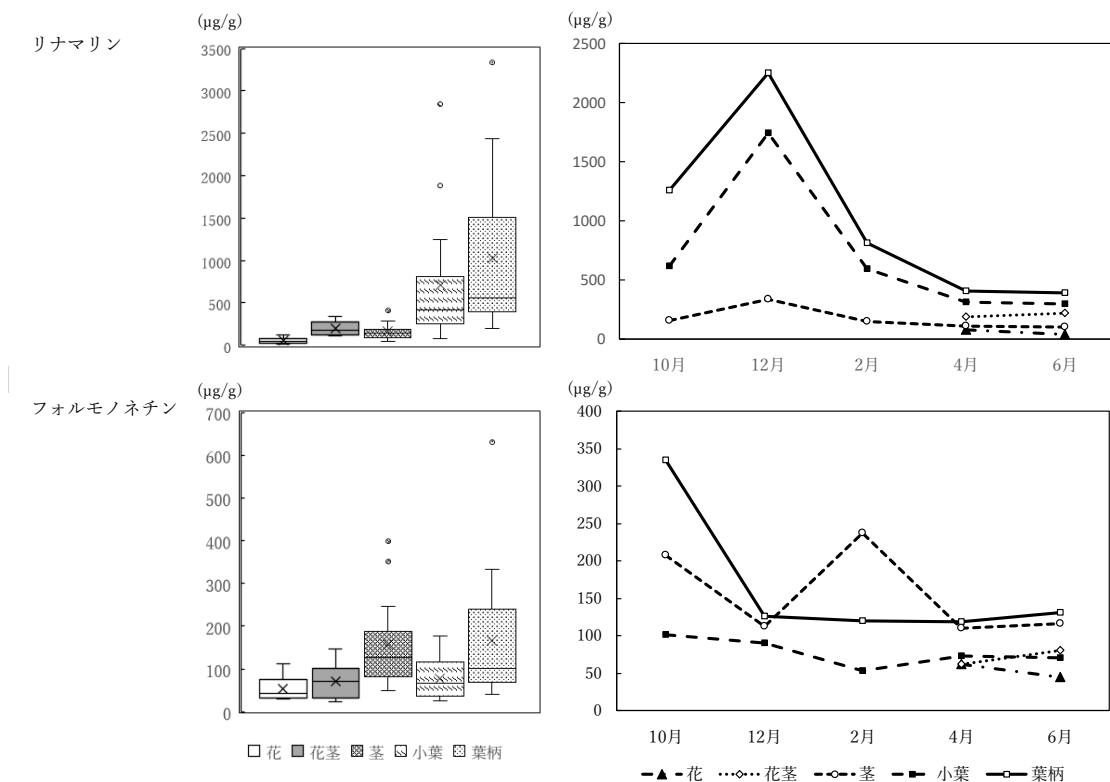


図2 部位及び採取時期別の成分含量

### 【考察と今後の課題】

奈良県内に自生するシロツメクサのフォルモノネチン及びリナマリン含量について調査した結果、都市部である大和平野地域よりも山間部である大和高原地域及び五條・吉野地域の方が、フォルモノネチン含量及びリナマリン含量のどちらも高かった。シアノ化合物はシロツメクサの防御因子であり、昆虫などの草食動物が少ない都市部では、山間部に比べてその量が少ないことが報告されている<sup>5)</sup>。また、イソフラボンもマメ科植物において病原菌や害虫に対する抵抗物質として機能することが知られている<sup>6)</sup>。このことから、本研究において都市部では山間部よりもリナマリン及びフォルモノネチンの含量が低かったと考えられる。この結果から、フォルモノネチンに着目してシロツメクサを利用する場合、山間部の方が有望であると考えられる。一方で、リナマリンの含量も高まる傾向が認められたことから、活用にあたってはリスクを把握し、適切に管理する必要がある。なお、本研究において、リナマリン含量が最も高い検体は都市部に存在したため、山間部だけでなく都市部のシロツメクサにおいても注意が必要である。

また、部位及び採取時期別に含量を比較した結果、茎はフォルモノネチンを多く含有す

る一方でリナマリン含量は低く、活用に適した部位であると考えられる。また、茎のフォルモノネチン含量は10月と2月に高くなるが、リナマリン含量は10月から12月にかけて増加し、12月以降は減少することから、2月頃の収穫が最も適していると考えられる。一方で、茎には土や砂などが入り込み、十分に洗浄することが困難であるため、食用以外での利活用についても検討を進める必要がある。

#### 【参考文献】

- 1) Kaczmarczyk-Sedlak, Ilona et al. "Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis." *Evidence-based complementary and alternative medicine* vol. 2013 (2013): 457052.
- 2) Yu, Xin et al. "Inhibitory effects of Formononetin on CoCrMo particle-induced osteoclast activation and bone loss through downregulating NF-  $\kappa$  B and MAPK signaling." *Cellular signalling* vol. 106 (2023): 110651.
- 3) Park, Sunwoo et al. "The O-methylated isoflavone, formononetin, inhibits human ovarian cancer cell proliferation by sub G0/G1 cell phase arrest through PI3K/AKT and ERK1/2 inactivation." *Journal of cellular biochemistry* vol. 119,9(2018): 7377-7387.
- 4) 奈良県 県土利用政策課「第四次奈良県国土利用計画」p.8 (平成21年3月)
- 5) Santangelo, James S et al. "Global urban environmental change drives adaptation in white clover." *Science* (New York, N.Y.) vol. 375,6586 (2022): 1275-1281.
- 6) 石賀康博ら「イソフラボンを用いたダイズさび病菌防御に関する基盤研究」大豆たん白質研究. Vol. 21 (2018). 24-28

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
① リナマリン標準品	59,565 円
② HPLC用カラム	170,445 円
③ HPLC用アセトニトリル	46,860 円
④ その他試薬（特級アセトニトリル）	29,095 円
合 計	305,965 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円