

9990049

平成 11 年度厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)

緊急に資源確保を要する生薬—麻黄に関する研究

平成 11 年度研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 佐竹元吉

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

緊急に資源確保を要する生薬—麻黄に関する研究

主任研究者 佐竹 元吉 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長

平成11年1月1日より、中国政府は、砂漠化防止を理由に、麻黄の輸出を一切禁止した。麻黄は、漢方製剤の重要な構成生薬で、作用の明確な生薬として需要が大きく、使用量の100%に相当する700トン／年を中国から輸入している。国内での生薬基原植物の栽培は、トウキ、センキュウ、ポタンなど極く少数に限られていて、麻黄については検討されていなかった。そこで、国内での栽培化を緊急に確立するために、これまでに導入した資源を基に、気候、土壌の異なる場所を選び、収穫量の高い、高品質な麻黄栽培の条件を検討した。また、海外の*Ephedra* 属植物を調査研究し、導入可能な資源を国外から収集し、形態解析、遺伝子解析による分類を開始した。また、これらの植物のアルカロイドおよびその他の主要成分の分析法を検討し、成分分析により品質の確保を目的とする系統を選び出した。

分担研究者		下村講一郎	国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場育種室長
佐竹元吉	国立医薬品食品衛生研究所生薬部長	細川啓三	国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場栽培室長
畠山好雄	国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場長	酒井英二	国立医薬品食品衛生研究所和歌山薬用植物栽培試験場主任研究官
柴田敏郎	国立医薬品食品衛生研究所北海道薬用植物栽培試験場長	高野昭人	昭和薬科大学講師
飯田 修	国立医薬品食品衛生研究所伊豆薬用植物栽培試験場長	渡辺高志	北里大学薬学部助手
香月茂樹	国立医薬品食品衛生研究所種子島薬用植物栽培試験場長	水上 元	名古屋市立大学薬学部助教
関田節子	国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長	御影雅幸	金沢大学薬学部教授
		神田博史	広島大学医学部助教

A. 研究目的

麻黄は、発汗、解熱、気管支痙攣の解除、利尿、血圧上昇、抗ウイルス作用を示す生薬で、漢方においては比較的一般に良く知られており厚生省認可210処方中麻黄湯、葛根湯、小青竜湯、麻黄甘草湯など11処方に配合されている要薬である。第13回性日本薬局方では、基本原植物を、マオウ科 (*Ephedraceae*) の *Ephedra sinica* 又はその他同属植物 (*E. intermedia*, *E. equisetina*) と規定している。*E. sinica* は草麻黄、*E. intermedia* は中麻黄、*E. equisetina* は木賊麻黄と呼ばれる。また、*E. sinica* は *E. distachya* と同一種とみなされている。成分は、作用の顕著なエフェドリン、プソイドエフェドリン、フェニルキサゾリン類のアルカロイドの他に数種のフェニルプロパノイド、フラボノイド、加水分解型タンニン、縮合型タンニン等バラエティーに富んでいて、それぞれの活性にも特徴があることから、麻黄が多く処方配合されるものと理解されている。また、主成分であるエフェドリン類のアルカロイドの作用が注目され漢方薬以外にも風邪薬、鎮咳去痰薬等に配合されており使用範囲の広い生薬である。しかし、多くの生薬同様に専ら海外からの輸入に頼っており、しかも野生品であるために今回のように輸出国の事情により供給源を断たれると、数年後には麻黄配合医薬品の使用が不可能な事態に陥る。麻黄の代替生薬は存在せず、輸入が断たれることは漢方薬の存続に関わる

ものとして影響が重大である。したがって、国内における栽培化は緊急に必要である。そこで、品質の良い優良種を栽培するために諸条件を検討した。本研究の成果は、今後、他の輸入生薬の栽培化に重要な示唆を与えるものと期待される。

B. 研究方法

1. 栽培地の違いによるアルカロイド含量に及ぼす影響

春日部試験場由来の筑波薬用植物栽培試験場での保存株 *Ephedra distachya* L. (Ep-13)の株分けした大小の苗を、北海道、筑波、和歌山、種子島の各試験場で試験栽培し、乾燥方法を検討後、毎月15日前後に収穫し、草丈、重量、乾燥歩留、窒素、リン酸、加里、カルシウム、マグネシウムを定量し吸収量を推定した。同時に、生薬部に送付し、アルカロイド含有量をHPLCで分析した。

試料の調製は、材料を60℃で24時間乾燥させた後中末にし、デシケーター(シリカゲル)中で24時間放置した。その約0.5gを精密に量り、2倍に薄めたMeOH 20mLを加え、30分攪拌した後、遠心分離(3,600 rpm、20分間)し、上澄み液を分取した。残留物は2倍に薄めたMeOH 20mLずつを用いて、さらにこの操作を2回行った。全抽出液を合わせ、2倍に薄めたMeOHを加えて正確に100mLとし、試料溶液とした。

測定条件は、以下に示す。

検出器: 日本分光(製), GULLIVER

シリーズ

カラム Inertsil ODS-2 (4.6×250 mm)

移動相：ラウリル硫酸ナトリウム溶液 (1→620) / アセトニトリル / リン酸混液 (620 : 380 : 1)

流速：2.0 mL / min

カラム温度：45℃

検出波長：UV 210 nm

サンプル注入量：10 μL

標準品 定量用塩酸エフェドリン

ネパールで採取した *Ephedra gerardiana* を町田市、諏訪市で3通りの土壌種を選んで栽培し、アルカロイド含有量を測定した。

2. 成分分析による優良系統の選出

乾燥条件を 40℃と 50℃で送風乾燥、天日乾燥、日陰乾燥、凍結乾燥に分けて設定し、アルカロイド含有量に及ぼす影響を検討した後、各栽培地からの試料について毎月の含有量の推移を測定した。

3. ネパール、モンゴル、アンデスの *Ephedra* 属植物調査

ネパール、モンゴル及びペルーアンデスの *Ephedra* 属植物の分布状態、医薬利用、流通状況等について調査し、入手した植物をメタノール抽出し、エキス中におけるアルカロイド含有量を HPLC により測定した。

4. *Ephedra* 属植物の形態、遺伝子解析による地域変異の解明

正確な種の同定がなされている乾燥標本の遺伝子を増幅し、塩

基配列を解読することにより国内にある数系統の *Ephedra* 属植物の DNA による同定法を創出した。植物からの DNA の調製は SDS-Lysis buffer 法で行い、PCR により chlB 遺伝子を増幅した。精製した PCR 産物は、蛍光シーケンサーを使用して、直接シーケンスした。PCR 産物は制限酵素分解を行い、FluorImager (Molecular

Dyanmics) によって検出した。

5. 植物バイオテクノロジーによるマオウのクローン増殖法の検討

筑波薬用植物栽培試験場の圃場にて栽培している *Ephedra distachya* L. (Ep-13) の新出茎の頂芽から第 4 節目までを殺菌後植え付け切片に用いた。条件を設定し、マルチプルシュート形成、発根状態を観察した。

6. 麻黄の栽培指針のための基礎的検討

7月に採取した種子を用い、15～30℃の範囲で発芽試験を、また、低温処置、GA3 処理等による発芽条件について検討した。圃場の苗は、サイズの大小により 1 本、2 本植えとし、活着率を定植後 3 ヶ月目に調査した。定植 (4 月 27 日) 後約 4 ヶ月目 (8 月 16 日) から 1 ヶ月毎に地際から地上部を刈り取った後の株からの植物体の再生状況を調査した。

C. 研究結果

国内栽培の検討

北海道での苗の活着率は、大苗で

62%、小苗で 46%であった。10 月 5 日における生育調査では、草丈、草、莖数、莖の最大直径のいずれも大苗の方が有意に優れた生育を示した。無機成分含有率は、地上部：窒素 2.4%、リン酸 0.54%、加里 1.7%、カルシウム 1.4%、マグネシウム 0.3%、地下部：窒素 1.8%、リン酸 0.4%、加里 1.2%、カルシウム 0.8%、マグネシウム 0.1%であった。乾物重から計算した吸収量は、株当たり地上部で窒素 354mg、リン酸 78mg、加里 244mg、カルシウム 207mg、マグネシウム 45mg、地下部では窒素 59mg、リン酸 14mg、加里 40mg、カルシウム 28mg、マグネシウム 5mg であった。

和歌山での活着率は、大苗で 83.3%、小苗で 75.6%と良い結果が得られた。草丈、苗の乾燥重量いずれも大苗の方が生育が良いことが明確になった。株分け繁殖植物の莖の径及び節間長は、親植物よりも小さい値を示した。株によっては、地下部からも萌芽が確認された。

種子島での活着率は、大苗で 52.9%、小苗で 63.3%で欠株が多く生じた。8 月～11 月の期間ほぼ順調に生体重が増加し、11 月～1 月は停止した。乾燥歩留は 8 月～1 月の期間ほぼ 30%で変化は殆ど認められなかった。

成分含量の測定

乾燥方法によるアルカロイド含有成分量の比較を行ったが、明確な含有量の差は認められなかった。そ

こで、これ以後の毎月の成分含量測定に際しては、60℃送風乾燥に付した。含有率は 2 株の平均値で求めたが、筑波のものは何れも局方の基準の約 2 倍以上の収量であった。北海道のものは 2 ヶ月分の収穫であったが 0.7 % 以上であった。種子島のものは 8 月の 2 株、10 月の 1 株が 0.7 % 以下であったが、それ以外の月の株については基準を充たすものであった。含有量の月別推移は、筑波と種子島のサンプルに類似の傾向が認められた。5 ヶ月間の短い期間であるがこれらの変化は両成分の生合成過程になんらかの周期が認められる結果となった。但し、個体間の差が大きく一方の 2 倍以上の違いを示すものもあった。

ネパール産 *Ephedra gerardiana* の国内における栽培でも、アルカロイド含有量の推移は、個体による違いが大きく、収穫時期による変化も個体により様々な傾向が観察された。3 年以上栽培した 39 個体についてみると、アルカロイドを検出しなかったものが 2 個体、また、含量比として $Eph > pEph$ のものが 5 個体、逆の $Eph < pEph$ のものが 26 個体であった。

アルカロイド含量は 2 年生から 4 年生へと栽培年数の増加に伴い高くなる傾向を示し、総アルカロイド含量は約 0.05% / 年の増加率であった。

栽培土壌の違いによる収量およびアルカロイド含量の変化は、平均

値で比較した場合、総アルカロイド含量と pEph 含量で、川砂栽培群は桐生砂（レキ）栽培群の約2倍の含量であった。

地上部を切断することの収量およびアルカロイド含量への影響は、総アルカロイド含量、pEph 含量が切断回数の増加によって減少する傾向が確認された。

栽培地の違いによる収量およびアルカロイド含量の変化は、長野県白樺湖畔と東京都町田市の2地点で同じ期間栽培した結果、白樺湖畔のアルカロイド含量が Eph, pEph ともに高い値を示した。しかし、個体あたりの草質茎の乾燥総重量を比較すると、町田市の方が白樺湖畔より著しく大きく、株中の総アルカロイド量で比較した場合、町田市の方が高い結果となった

国外の *Ephedra* 属植物調査

ネパール雌株について珠孔管の形状を検討した結果、試料全体は珠孔管の長さ約1mmで真っ直な *E. gerardiana* Stapf と、長さ1~2mmでやや曲折する *E. pachyclada* Boiss の2種が確認された。これまでネパールから報告されている *E. intermedia* は認められず、カトマンズの王立植物標本室でも確認できなかった。また、ネパール東部産のものは *E. gerardiana* var *sikkimensis* とされているが、形態的に基準変種と連続し区別しえなかった。エフェドリン含有率は *E. pachyclada* の方が有意に高かつ

た。日局に照合すると、*E. pachyclada* では1株を除くすべてが条件を満たしたが、*E. gerardiana* では約半数が不適であった。一方、生育地に関しては、より低地で土壌 pH が高い場所に生育する株のエフェドリン含有率が高かった。資源的には豊富であると判断された。ヒツジによる食害が目立ったが、一方で、ヒツジが種子散布に関与しているものと予想された。

モンゴルでは、*Ephedra* 属植物は専らエフェドリン抽出原料として使用されており、生薬としての認識はない。自生の *Ephedra* 属植物は数種類あるが、研究機関での種の同定が進行中である。今回の調査は時期的に自生地を確認することが不可能であったが、標本として保存中の *E. equisetina* と *E. przewalskii* Stapf を入手した。

ペルーでは、*E. americana* がアンデス地域に広く分布し、市場の薬草店に必須の薬用植物である。購入客も多く見受けられた。主にリマ市から東南に400Km離れた地点クスコ市周辺に広大な自生地があり、クスコ市から北に950Km離れたカハマルカ市（海拔3000m）の薬草店でも店頭で販売していた。*E. americana* は、海拔4750m地点からアマゾン川上流地点間近の2300mまでに分布してる。採集は、この間の6カ所で行った。また、カハマルカでは *E. andina* と思われる株を採集できた。これらのアルカロイド含量は、*E. americana*、*E. andina*

ともに、いずれの試料も検出限界以下であった。

形態、遺伝子解析による地域変異の説明

日本各地の薬用植物園から入手した9系統の *Ephedra* 属植物は、10カ所のサイトで塩基配列に置換があり、その配列は3つのタイプに分類できた。決定した chlB 遺伝子の塩基配列をもとにして NJ 法を用いて遺伝子系統樹を作成した。この結果いくつかの系統では植物に付けられている名前と chlB 遺伝子の塩基配列のタイプが一致しなかった。したがって、種名の信頼できる標本が必要であると判断し、1943年に中国の東北地方における *Ephedra* 属植物の自生地を調査した標本（京都大学薬学部生薬学教室所蔵）から DNA を調製し、chlB 遺伝子の塩基配列の解読を行った。現在までのシーケンスの結果、*E. sinica* を基原とすると記載されている標本（M0）の全長と保管場所の異なる標本（M6）の領域 A の塩基配列は Type 1 に完全に一致した。一方、*E. distachya* と同定されている2標本（M10, M13）および *E. equisetina* と配列は、それぞれ Type 2 および Type 3 と完全に一致した。また、1964年にネパールのアンナプルナ山系で採集された標本 M8 の領域 A の塩基配列は Type 1~Type 3 のいずれとも一致せず、別の Type（Type 4）に属するものであった。以上のことから、Type 1

は *E. sinica*、Type 2 は *E. distachya*、Type 3 は *E. equisetina* の配列であると一応同定できた。次に、6系統の植物から領域 A を増幅し、増幅産物を精製後に Bcl I を用いて制限酵素分解を行い、分解産物をアガロースゲル電気泳動を行って確認した。その結果、Type 1 に属する2系統は約 260bp と 80bp の2つの断片が検出できたが、Type 2 と Type 3 では PCR 産物は全く分解されず、この方法によって Type 1（*E. sinica*）の鑑別が可能であった。

そこで、4種の生薬麻黄について同様の実験を行ったところ、*E. sinica* を基原とする標本（M0）では切断断片を生じたが、他の3標本（M10, M12, M13）では大部分が切断されなかった。

クローン増殖法の検討

培養開始約2週間後、節から側芽の伸長が観察され、3週間には、伸長したシュートのガラス化が観察された。8週間培養後、新たに伸長したシュートは、非常に短く、重なりあった形態を示した。

EP-13を用いての各MS培地における平均シュート形成数は、HF MS培地においても約3.1であった。その他の区においても2.1~3.5であった。しかし、WP培地では、MS培地の結果と比較してかなり悪かった。そこで、条件を変えて試みたところ、kinetin 3 mg/L 添加 MS培地では、平均70本と最高であった。一方、増殖、伸長したシュート

が、継代培養可能かどうかを調べた結果、伸長した頂芽より分枝した節の部分を植え付けた方が、新茎が良好に形成した。得られたシュートからの発根は認めれず、現在のところシュート基部に少量のカルスを形成した。

栽培指針作成のための基礎的条件の検討

種子の発芽条件：発芽の至適温度は15℃であった。また、低温処理（10℃、48時間とGA3処理）により種子の発芽が促進された。この結果から種子は弱い休眠状態にあることを見いだした。

活着率：定植後の活着率はサイズの大きい苗で71%、小さい苗では88%であった。

植物体の再生能：8、9、10月に刈り取った株からは地上部の再生が観察されたが、

11、12月に刈り取った株からは地上部の再生が観察されなかった。

乾燥方法：アルカロイド含有量は乾燥方法の違いによる有意な差は見られなかった。

D. 考察

苗の活着率および1年目の生育はいずれも大苗が優れ、栽培生産には大苗が望ましいと考えられた。地上部の生育は、名寄においては9月下旬でほぼ停止すると考えられ、特に小苗ではその傾向が顕著であった。地上部と地下部の乾物重の比率は45:1と地上部の比率が著しく高い

ことが判明した。無機成分吸収量は、窒素>加里>カルシウムの順であり、リン酸の要求度が比較的low、加里、カルシウムの要求度が高い特徴がみられた。

E. distachya L.は雌雄異株であるため国内においての種子採取は困難であり、また、既報によれば挿し木繁殖の活着率は15%と低いため、大量生産には不向きと考えられる。ただし、今回地下部からの萌芽が確認できたため、根伏せ繁殖の可能性が示唆された。根伏せであれば、株分けよりも多くの苗を生産できるものと考えられる。各実験群内でアルカロイド含量に大きな個体差が観察された。従来、*E. gerardiana*では、EphとpEphの含量比はEph<pEphであるといわれていたが、今回の結果では、逆にEph>pEphである個体を約1割、またアルカロイドを全く検出しない個体を2個体認め、個体差の大きいことが示唆された。なお、この結果から、以下の栽培条件の違いによるアルカロイド含量の差異については、平均値などを指標として相対的な評価を行った。アルカロイド含量は栽培年数の増加に伴い高くなる傾向を示した。したがって、さらに栽培年数を延ばして、アルカロイド含量が一定になる栽培年数を把握する必要がある。栽培土壌の性質の違いが、*Ephedra*属植物のアルカロイド含量に強く影響することを示唆した。なお、今回検討した栽培土壌の中では川砂群が最もアルカロイド

含量が高かった。アルカロイド含量を高くするには、収穫間隔を適切に設定すること、動物による食害や強風による風害などによる地上部の物理的切断を受けないような条件下で栽培するのが望ましいと考えられる栽培した2地点を比較すると、株中アルカロイド含量(%)と株中総アルカロイド量で、高低が逆転した。今回比較した2地点は環境的に著しく異なり、どのような環境要因がアルカロイド含量に影響を与えたか結論づけることは難しいが、栽培地を検討する際には、できるだけ多くの地域を選択して検討する必要がある。

ネパールには本研究で確認された2分類群のみが生育していると考えられる。*E.pachyclada*の方がエフェドリン含有率が高い結果が得られたが、これは両種が土壌 pH で住みわけている結果であると考察される。採薬に際しては、低地かつ乾燥した荒廃地に生える株を選択すれば高品質な生薬が得られるものと考察される。資源的にはかなり豊富であり、やせ位置ではヒツジが種子散布に関与しているものと推察されたが、今後薬用資源として保護するにはヒツジによる食害を防ぐことが重要であろう。

モンゴルの *Ephedra* 属植物は、生薬としての使用経験に乏しく、現在すぐに輸入体制に入ることは困難である。しかし、資源量は豊富で、日本との交流を望む声は大きく、さらに調査を続けることが重要であると考えられる。

ペルー国内で流通している代表的生薬である *Ephedra* 属植物は資源量も豊富で、かつてはヨーロッパに輸出していた経験もある。今回は未調査であるが、リマ市周辺の海岸地帯にはエフェドリン含量の高い株があると記録されている。モンゴル同様に現地の協力が得られる状況にあるので、継続的な調査が可能である。

国内の *Ephedra* 属植物は、色々な薬用植物園から導入されたものであり、日本の薬用植物園における *Ephedra* 属植物のラベル名には混乱が生じていることが推察される。このことは、形態学的な *Ephedra* 属植物の分類が難しいことを改めて示すものであるといえる。塩基配列の相同性が非常に高いという事実は、*E. sinica* と *E. distachya* は極めて近縁であるとされていることとよく一致するものと考えられる。一方、Type 1 (*E. sinica*) の 263~268bp の配列 (TGATCA) は制限酵素 Bcl I によって認識され、切断されるのに対して、Type 2 (*E. distachya*)、Type 3 (*E. equisetina*)、Type 4 (ネパール産麻黄) および *E. altissima* では、この位置の配列が TGATTA に置換されているので Bcl I に寄っては切断されない。そこで、このサイトを含む chlB 遺伝子の領域 A を増幅し、その PCR 産物を Bcl I で切断することによって *E. sinica* およびそれを基原とする草麻黄を他の *Ephedra*

属植物あるいは麻黄と簡単に鑑別できることを確かめた。Type 1 と標本 (M0) で未分解の断片が残存したり、標本 (M10) で切断されたと思われる断片がわずかに認められるが、(1) Bcl I の活性が充分でなく、未分解断片が残っている、(2) PCR の過程で誤った断片が導入された産物が混入している、(3) 基原の異なる生薬が一部混入している、(4) 葉緑体の集団に一部ゲノム配列の異なるものが存在しているなどの原因が考えられる。しかし、いずれにしても、大部分の増幅産物は予想どおりの挙動を示すので、PCR-RFLP による *E. sinica* や草麻黄の鑑別は実用上は十分に可能であると判断される。

マオウの増殖は、一般に株分け法により行われているので、地下茎部分を殺菌後、発根を目的に HF および IBA 10 mg/L 添加 MS 培地に植え付けた。しかし、総ての切片でコンタミネーションが発生した。これまで、*Ephedra distachya* 以外の種のカルスの増殖、そのアミノ酸組成等に関して幾つかの報告があるが、まだ、試験管内増殖の成功に関しては、*E. fragilis*、*E. gerardiana* だけである。*E. distachya* の増殖は、一般的な方法として、株分け法が行われているが、挿木法による成功率は、非常に悪く、3%程度と報告されている。それ故、若いシュートからの発根は、増殖系においてもかなり困難な事が推察される。

E. 結論

苗の活着率および1年目の生育からみて、栽培生産には大苗が望ましいと考えられ、また、地上部の生育は、名寄においては9月下旬でほぼ停止すると考えられた。

名寄における苗の活着率は62%、1年目10月における生育は、草丈36.9cm、草高27.6

cm、茎数52.4本、茎の最大直径2.14mm、乾物重は地上部12.7~16.7g、地下部2.3~4.3gであった。無機成分吸収量は、加里とカルシウムの要求度が高い特徴がみられ、地上部と地下部の合計吸収量から換算した1年目の施肥量は、10a当たり窒素1.5kg、リン酸0.4kg、加里1.0kg、カルシウム0.9kg、マグネシウム0.2kgと推定された。

株分け繁殖は可能であるが、得られる苗数が限られるため、大量繁殖を考える場合には、不向きである。地下部からの萌芽が可能のため、株分けより効率良く苗の生産ができる根伏せ繁殖を今後検討する必要がある。

Ephedra gerardiana では、栽培年数、栽培土壌、栽培地などの栽培条件の違いにより、生産物のアルカロイド含量に差異を生じる可能性があることを確認した。今後、さらに栽培試験を継続し、アルカロイド含量が最大となる栽培年数を確認し、収穫間隔の検討をする必要がある。また、アルカロイドの含量%

と株収量（重量）の両指標から総合的に判断した栽培適地の条件を検討する必要がある。今回、栽培条件の違いと同様、アルカロイド含量の個体差の著しいことが確認された。これは、アルカロイド含量の違いを生じる要因として、生育環境とともに遺伝的要因が大きいことを示唆している。系統選抜にあたっては、収穫時期および採取する枝を吟味し、かつ、今回検討したさまざまな栽培条件の影響などを加味して、総合的に系統を選抜していく必要がある。

ネパールには *E.pachyclada* と *E.gerardiana* の 2 種の *Ephedra* 属植物が分布する。漢薬「麻黄」の原植物としてはより低地性で荒廃した土地に生える前者が適しており、資源的にも豊富であることから、日局「マオウ」として導入可能であると考えられる。

モンゴルには日局で採用している *E. sinica* があり、資源量も豊富であるが、直ちに輸出出来る状態ではない。時間をかけて調査交流することが望ましい。

ペルーアマゾンの *Ephedra* 属植物は、種類も資源量にも富んでいる。但し、いずれも日局「マオウ」としての規格には合致しないため、アルカロイド以外の成分や活性についての研究が必要不可欠である。

各地の薬用植物園で植栽されている 9 系統の *Ephedra* 属植物について葉緑体ゲノムに存在する chlB

遺伝子の塩基配列を解読した結果、そのシーケンスから 4 つのタイプが存在することがわかった。基原の同定がなされた麻黄標本の chlB 遺伝子の塩基配列と比較することにより、Type1 は *E. sinica*、Type 2 は *E. distachya*、Type 3 は *E. equisetina* の配列であると同定できた。これまでの形態に基づく *Ephedra* 属植物や麻黄の同定が誤りを生じやすいのに対して、chlB 遺伝子の塩基配列を用いることによって正確な同定ができる可能性があることを示した。

今回の試験の結果、*E. distachya* の培養系におけるシュートの増殖、継代培養は HF-MS 培地を用いるか kinetin 3 mg/L を添加する事により可能な事が判明した。発根に関しては、今後、更に検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高野昭人、渡辺高志：日本生薬学会第 46 回年会（大阪），講演要旨集，p.208 (1999)

御影雅幸・第 31 回ヒマラヤ植物研究会総会、東京大学総合研究博物館（1999 年 12 月 18 日）

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（特別研究事業）

分担研究報告書

麻黄属植物の系統選抜に関する研究

分担研究者 佐竹元吉 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長

研究要旨

本年1月1日より、中国政府は、砂漠化防止を理由に、麻黄の輸出を一切禁止した。麻黄は、作用の明確な生薬として需要が大きく、使用量の100%に相当する700トン/年を中国から輸入している。国内での生薬基原植物の栽培は、トウキ、センキュウ、ポタンなど極く少数に限られていて、麻黄については検討されていなかった。そこで、この事態へ対応するために、国内での栽培化を目的に、国内保存種を気候、土壌の異なる北海道、関東、近畿、種子島各地で試験栽培し、収穫量の高い、高品質な麻黄栽培の条件を探る。日本薬局方ではエフェドリン含量を0.7%以上と規定している。この値を指標に、アルカロイド成分の効率の良い分析法を作成し、各地の収穫物を分析する。

A. 研究目的

麻黄は、発汗、解熱、気管支痙攣の解除、利尿、血圧上昇、抗ウイルス作用を示す生薬で、漢方においては比較的一般に良く知られており厚生省認可210処方中麻黄湯、葛根湯、小青竜湯、麻黄甘草湯など11処方に配合されている要薬である。主成分であるエフェドリン類のアルカロイドの作用が注目され漢方薬以外にも風邪薬、鎮咳去痰薬等に配合されており使用範囲の広い生薬である。今回、中国のマオウ輸出禁止に対応するために、

国内栽培化を図る必要が生じたため、から南までの各地の条件かで、試験栽培を行うこととなった。そこで、マオウの品質評価の指標として成分測定を行うこととし、各地の収穫物のエフェドリン、 pseudoephedrine の定量を行う。

B. 研究方法

1. 材料

使用した材料は筑波薬用植物栽培試験場の保存種保存種 *Ephedra distachya*(Ep-13)で、北海道、筑波、種

子島に配布し定植したもので、北海道は9月と10月に、筑波は8月～12月まで、種子島は、8月～1月までの毎月15日前後に収穫1株が送付された。毎月の測定に先立ち、乾燥条件によるアルカロイド含量への影響を測定した。

2. アルカロイドの定量

(1) 装置と測定条件

高速液体クロマトグラフ、

検出器：日本分光（製）、GULLIVERシリーズ

カラム：Inertsil ODS-2（4.6×250 mm）

移動相：ラウリル硫酸ナトリウム溶液（1→620） / アセトニトリル / リン酸混液（620・380：1）

流速・2.0 mL / min

カラム温度：45℃

検出波長：UV 210 nm

サンプル注入量：10 μL

(2) 標準品

標準品 定量用塩酸エフェドリン

(3) 試料溶液の調製

材料を60℃で24時間乾燥させた後中末にし、デシケーター（シリカゲル）中で24時間放置した。その約0.5gを精密に量り、2倍に薄めたMeOH 20mLを加え、30分攪拌した後、遠心分離（3,600 rpm、20分間）し、上澄み液を分取した。残留

物は2倍に薄めたMeOH 20mLずつを用いて、さらにこの操作を2回行った。全抽出液を合わせ、2倍に薄めたMeOHを加えて正確に100mLとし、試料溶液とした。

(4) 定量

塩酸エフェドリンを標準品として用い、第13改正日本薬局方の方法により定量値を求めた。

C 研究結果

1. 乾燥条件の違いによるアルカロイド含量の変化

定量結果をFig. 1に示す。乾燥条件、40℃と60℃の送風乾燥、日陰、天日、凍結乾燥の条件で乾燥したものをそれぞれ3株で検討したが、差は認められなかった。

2. アルカロイド含量の地域差

定量結果をFig. 2に示す。種子島の8月、10月を除き、いずれも局方の規格値を満たす量を含んでいた。毎月の量の推移が、筑波と種子島で全く同傾向を示した。

D. 考察

1. 乾燥条件の違いによるアルカロイド含量の変化

乾燥方法による量の違いより個体差が大きく、それぞれ高含量であった乾燥方法は異なっていた。（株 No. 1 は天日

乾燥、株 No.2 は 40 ° C 送風乾燥、株 No.3 は 60 ° C 送風乾燥であった) この結果から乾燥方法による明確な含有量の差は認められなかった。

2. アルカロイド含量の地域差

3 場からサンプル 2 株ずつが提供されたが、それぞれの株の特定がなされていないことから株毎の経時変化をみることができず、両株の平均という形で検討を行った。同じ月の株でも大きいもので約 2 倍の差がみられることから今後は同じ株から分けたものを特定して検討する必要がある。

筑波のものは何れも局方の基準の約 2 倍以上の収量であった。北海道のものも 0.7 % 以上であったが、9 月と 10 月の 2 ヶ月分のデータにとどまっている。種子島のものは 8 月の 2 株、10 月の 1 株が 0.7 % 以下であったが、それ以外の株については基準を充たすものであった。

筑波及び種子島のサンプルについてはエフェドリン及びプソイドエフェドリンの含量に差がみられるが 8 月から 12 月までの推移が類似していた。5 ヶ月間の短い期間であるがこれらの変化は両成分の生合成過程になんらかの周期が認められる結果となった。もちろん株分けをして最初の年であることなども一因であると考えられるが、今後も検討を続ける上で非常に興味をもたれる。

今後系統選抜を行う際には、収穫時期および採取する株を十分に検討し、他の種についての同様な検討も必要と考えられる。

F. 研究発表

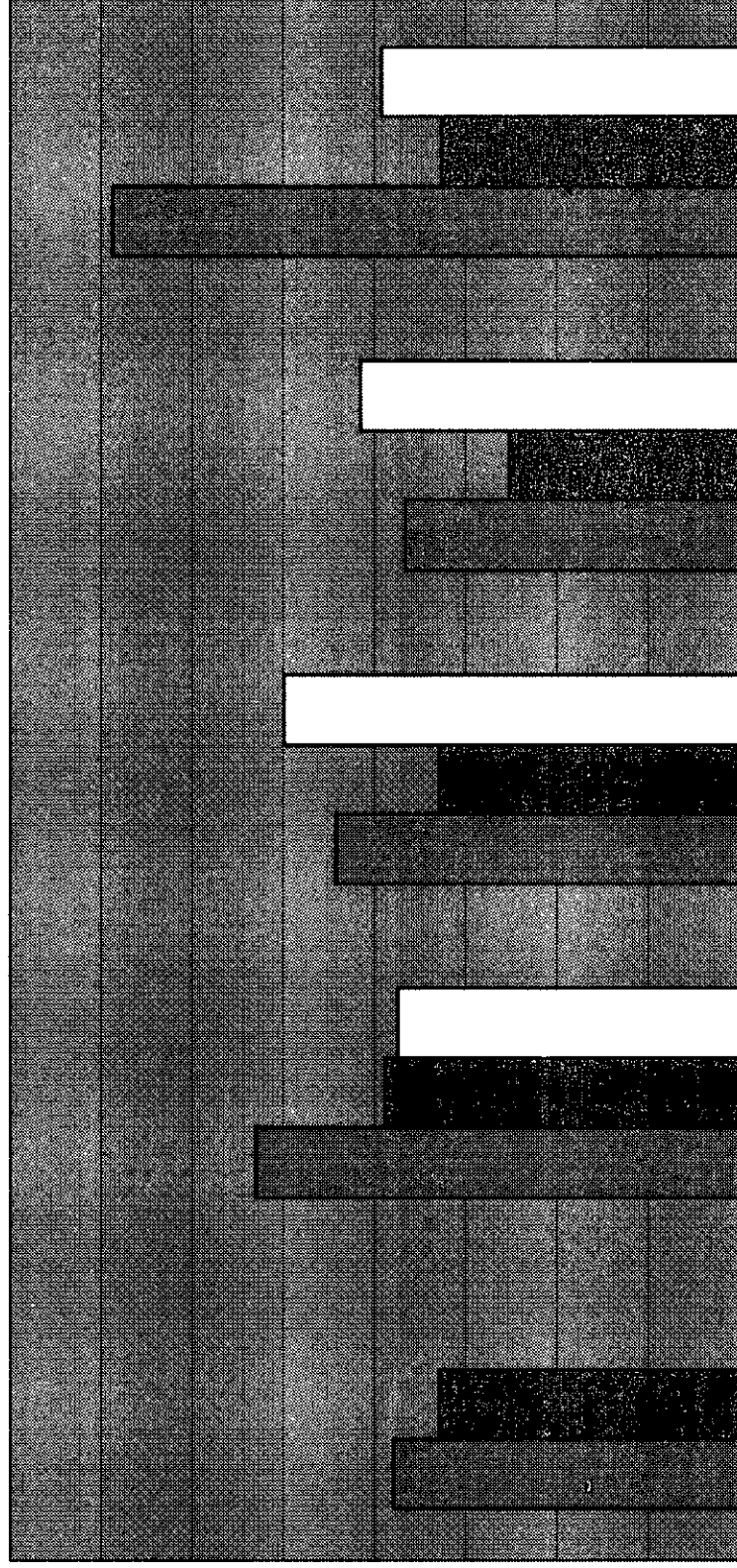
なし

G. 知的所有権の取得状況

なし。

総アルカロイド含量 (%)

1.600
1.400
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000



天日乾燥

凍結乾燥

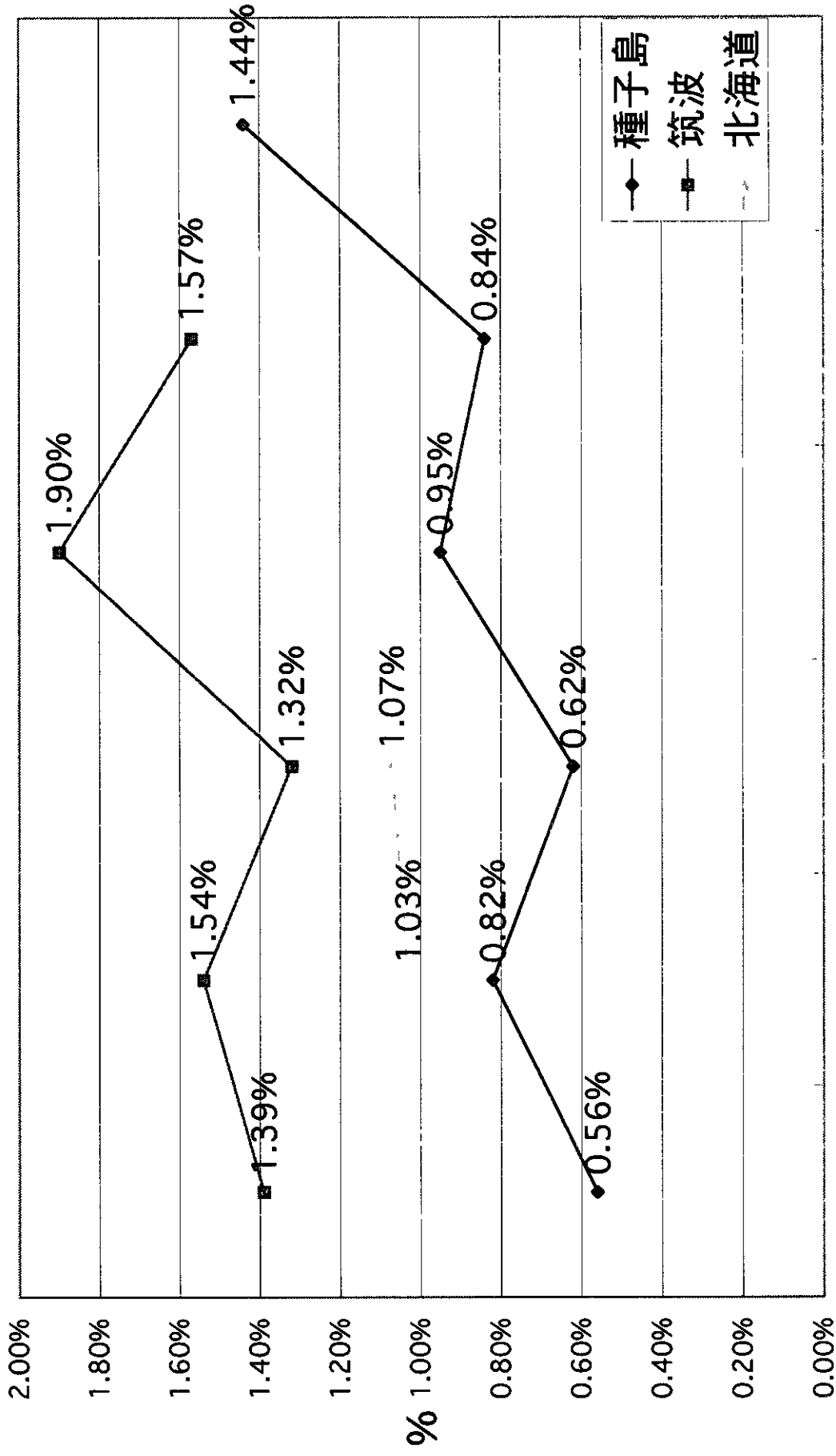
60 °C

40 °C

日陰

■ 株 No.1	0.758	1.060	0.884	0.732	1.374
■ 株 No.2	0.658	0.776	0.658	0.502	0.652
□ 株 No.3		0.748	0.998	0.830	0.784

乾燥方法



1999年8月 1999年9月 1999年10月 1999年11月 1999年12月 2000年1月

厚生科学研究費補助金（特別研究事業）
（分担）研究報告書

緊急に資源確保を要する生薬—麻黄に関する研究

（主任または分担）研究者 畠山 好雄 筑波薬用植物栽培試験場長

研究要旨 中国政府は1999年1月に、「麻黄」の禁輸措置をとった。ために、国内市場は混乱し、緊急に国内生産の必要性が生じた。筑波薬用植物栽培試験場では薬用遺伝子資源保存の一環として、マオウを12種29系統育成しており、その中から局方植物である *E. distachia* を材料にして国産化のための栽培試験に着手し、増殖法・発芽特性・生育特性・肥料反応・耐塩性・収穫時期・成分の経時変化などを検討した。

A 研究目的

中国の禁輸措置により、「麻黄」の国産化を緊急に図らねばならない。生産のためには、種苗の増殖法、生育特性、多収穫技術の一つである肥料反応、品質に関与する成分特性・種の同定などを研究しなければならない。

B 研究方法

栽培に関しては、全国に配置されている5栽培試験場が分担することとし、手法的には、増殖は挿し木・実生・組織培養によった。また、生育特性はファイトロン利用による温度反応、栄養素含量の測定、1月ごとに収穫した材料の乾燥方法・乾物重・成分含量などを検討した。

C 研究結果

活着率は地域および苗の大小により

異なり15—80%の結果であった。種子発芽の適温は15℃、乾燥は60℃温風乾燥が適当、乾燥歩留まりは30%以上などの結果も得られた。アルカロイド含量は9月と11月の2頂曲線を示し、概ね局方の基準値を超えた。

D 考察

マオウの増殖は株分けにより可能であり、活着も良好であるが、増殖率の低いことが欠点である。採取が可能であれば、実生が大量増殖には適しており、その場合には種子予措（低温処理）を行い、平均気温15℃の頃に播く。温風乾燥が可能なのは大量生産上有利である。収量・成分両面から実際栽培を考えると、試験の継続が必要である。

E 結論

増殖は株分け、実生いずれの方法でも可能である。株分けの場合、1年生の生薬でも総アルカロイド含量は局方の基準値0.7%を上回り、温風乾燥によっても含量の低下はなく、国内での栽培・生産とも可能であると思われる。

F 研究発表

栽培指針案として厚生省研究開発振興課に提出

G 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

緊急に資源確保を要する生薬—麻黄に関する研究

分担研究者：柴田 敏郎 国立医薬品食品衛生研究所 北海道薬用植物栽培試験場 場長

研究要旨：北海道におけるマオウの生育データを得るべく、定植1年目の生育ならびに無機成分吸収量について検討した。苗の活着率および1年目の生育からみて、栽培生産には大苗が望ましいと考えられ、また、地上部の生育は、名寄においては9月下旬でほぼ停止すると考えられた。名寄における苗の活着率は62%、1年目10月における生育は、草丈36.9cm、草高27.6cm、茎数52.4本、茎の最大直径2.14mm、乾物重は地上部12.7~16.7g、地下部2.3~4.3gであった。無機成分吸収量は、加里やカルシウムの要求度が高い特徴がみられ、地上部と地下部の合計吸収量から換算した1年目の施肥量は、10a当たり窒素1.5kg、リン酸0.4kg、加里1.0kg、カルシウム0.9kg、マグネシウム0.2kgと推定された。

A 研究目的

平成11年1月1日より、中国政府は砂漠化防止を理由に、漢方製剤の重要な構成生薬である麻黄の輸出を一切禁止した。麻黄は現在国内使用量のすべてを中国に依存しており、これまで国内での栽培研究は検討されておらず、栽培法の確立が急務である。そこで、北海道における生育データを得るべく、定植1年目の生育ならびに無機成分吸収量について検討した。

B 研究方法

筑波試験場で育成した*Ephedra sinica* の株分けした苗、大苗60、小苗60株を、1999年6月2日に、基肥として1a当たり堆肥100kg、苦土石灰10kg、油粕10kg施した名寄市の圃場に定植（70×30cm）した。同年9月7日と10月5日に生育調査を行い、10月14日に生育中庸な大苗3株を掘上げ、50℃で7日間乾燥して乾物重を測定した後、窒素、リン酸、加里、カルシウム、マグネシウムを定量し吸収量を推定した。また、同年9月16日と10月12日に、生育中庸な大苗2株の地上部を刈り取りアルカロイド分析に提供した。

C 研究結果

生育：苗の活着率は、大苗で62%、小苗で46%であった。10月5日における生育調査では、大苗で草丈36.9cm、草高27.6cm、茎数52.4本、茎の最大直径は2.14mmで、小苗では草丈29.0cm、草高23.1cm、茎数12.7本、茎の最大直径は1.60mmで、いずれも大苗の方が有意に優れた生育を示した。9月7日に

における生育調査と比べ、大苗における草丈と茎の最大直径が有意に増加したが、草高や茎数、および小苗におけるいずれの形質も有意な増加は認められなかった。10月14日における乾物重は地上部で12.7~16.7g、地下部で2.3~4.3gであった。

無機成分含有率および吸収量：地上部の含有率は、窒素2.4%、リン酸0.54%、加里1.7%、カルシウム1.4%、マグネシウム0.3%、地下部では窒素1.8%、リン酸0.4%、加里1.2%、カルシウム0.8%、マグネシウム0.1%であった。乾物重から計算した吸収量は、株当たり地上部で窒素354mg、リン酸78mg、加里244mg、カルシウム207mg、マグネシウム45mg、地下部では窒素59mg、リン酸14mg、加里40mg、カルシウム28mg、マグネシウム5mgであった。

D 考察

苗の活着率および1年目の生育はいずれも大苗が優れ、栽培生産には大苗が望ましいと考えられた。地上部の生育は、名寄においては9月下旬でほぼ停止すると考えられ、特に小苗ではその傾向が顕著であった。地上部と地下部の乾物重の比率は4.5・1と地上部の比率が著しく高いことが判明した。

無機成分吸収量は、窒素>加里>カルシウムの順であり、リン酸の要求度が比較的low、加里、カルシウムの要求度が高い特徴がみられた。地上部と地下部の合計吸収量から換算した1年目の施肥量は、10a当たり窒素1.5kg、リン酸0.4kg、加里1.0kg、カルシウム0.9kg、マグネシウム0.2kgと推定された。

E 結論

苗の活着率および1年目の生育からみて、栽培生産には大苗が望ましいと考えられ、また、地上部の生育は、名寄においては9月下旬ではほぼ停止すると考えられた。

名寄における苗の活着率は62%、1年目10月における生育は、草丈36.9cm、草高27.6cm、茎数52.4本、茎の最大直径2.14mm、乾物重は地上部12.7~16.7g、地下部2.3~4.3gであった。

無機成分吸収量は、加里とカルシウムの要求度が高い特徴がみられ、地上部と地下部の合計吸収量から換算した1年目の施肥量は、10a当たり窒素1.5kg、リン酸0.4kg、加里1.0kg、カルシウム0.9kg、マグネシウム0.2kgと推定された。

F 研究発表

なし