

Table 1 アルカロイド含量の定量結果

	実験群	n	Eph(%)	pEph(%)	nEph(%)	mEph(%)	T-Eph(%)	個体 乾燥重量(g)	株中のアルカ ロイド量(mg)
経年変化	2年栽培群	4	nd	0.004±0.009	0.015±0.030	nd	0.020±0.029	0.379±0.029	0.074±0.008
	3年栽培群	5	0.041±0.052	0.035±0.036	nd	0.006±0.010	0.083±0.090	2.016±0.410	1.664±0.368
	4年栽培群	5	0.104±0.096	0.089±0.041	nd	0.009±0.016	0.202±0.152	2.714±0.461	5.474±0.702
地上部切 断による 影響	コントロール群	7	0.067±0.075	0.064±0.051	nd	0.004±0.010	0.135±0.132	3.104±0.530	3.981±3.849
	1回切断群	5	0.032±0.017	0.060±0.057	nd	nd	0.092±0.071	3.068±0.756	2.825±0.535
	2回切断群	5	0.017±0.009	0.041±0.025	nd	nd	0.059±0.032	2.801±0.599	1.653±0.193
栽培土壌 の違い	3回切断群	5	0.020±0.013	0.029±0.013	nd	nd	0.041±0.019	1.646±0.211	0.675±0.039
	コントロール群	7	0.067±0.075	0.064±0.051	nd	0.004±0.010	0.135±0.132	3.104±0.530	3.981±3.849
	川砂群	5	0.048±0.020	0.096±0.040	0.002±0.004	nd	0.146±0.054	3.692±1.277	5.380±0.688
栽培地の 違い	桐生砂(レキ)群	5	0.030±0.028	0.049±0.043	nd	nd	0.080±0.071	3.856±0.553	3.083±0.396
	町田キャンパス群	7	0.067±0.075	0.064±0.051	nd	0.004±0.010	0.135±0.132	3.104±0.530	3.981±3.849
	諏訪キャンパス群	2	0.055±0.072	0.140±0.149	0.003±0.005	nd	0.197±0.224	0.567±0.462	1.117±1.036

注：数値はすべて平均±標準偏差を示す nd は検出されなかったことを示す。

Fig. 1 総アルカロイド含量の月別変化

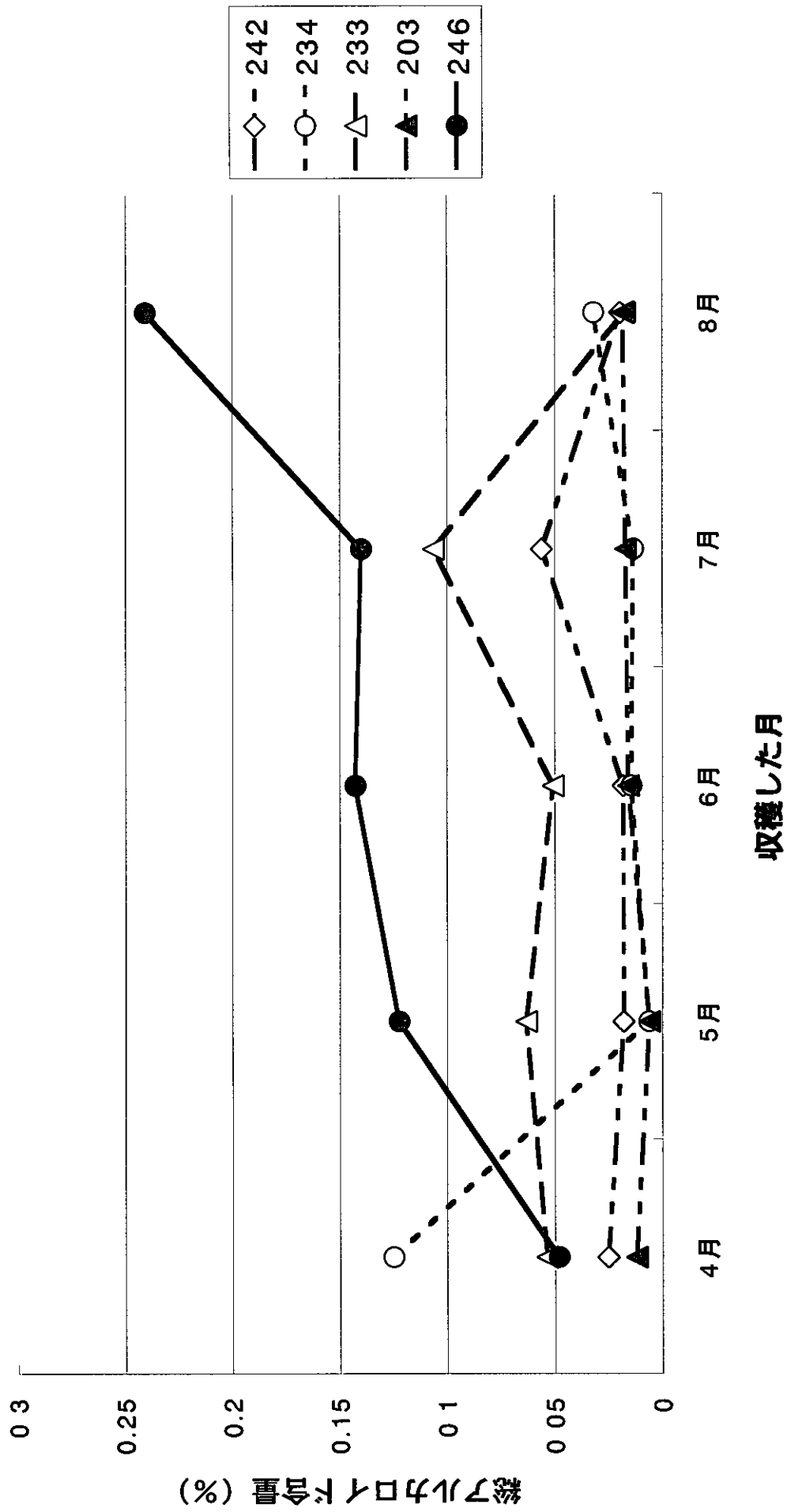


Fig. 2 Yields of Ephedra Alkaloids in each stock of herbal stems of *E. gerardiana*

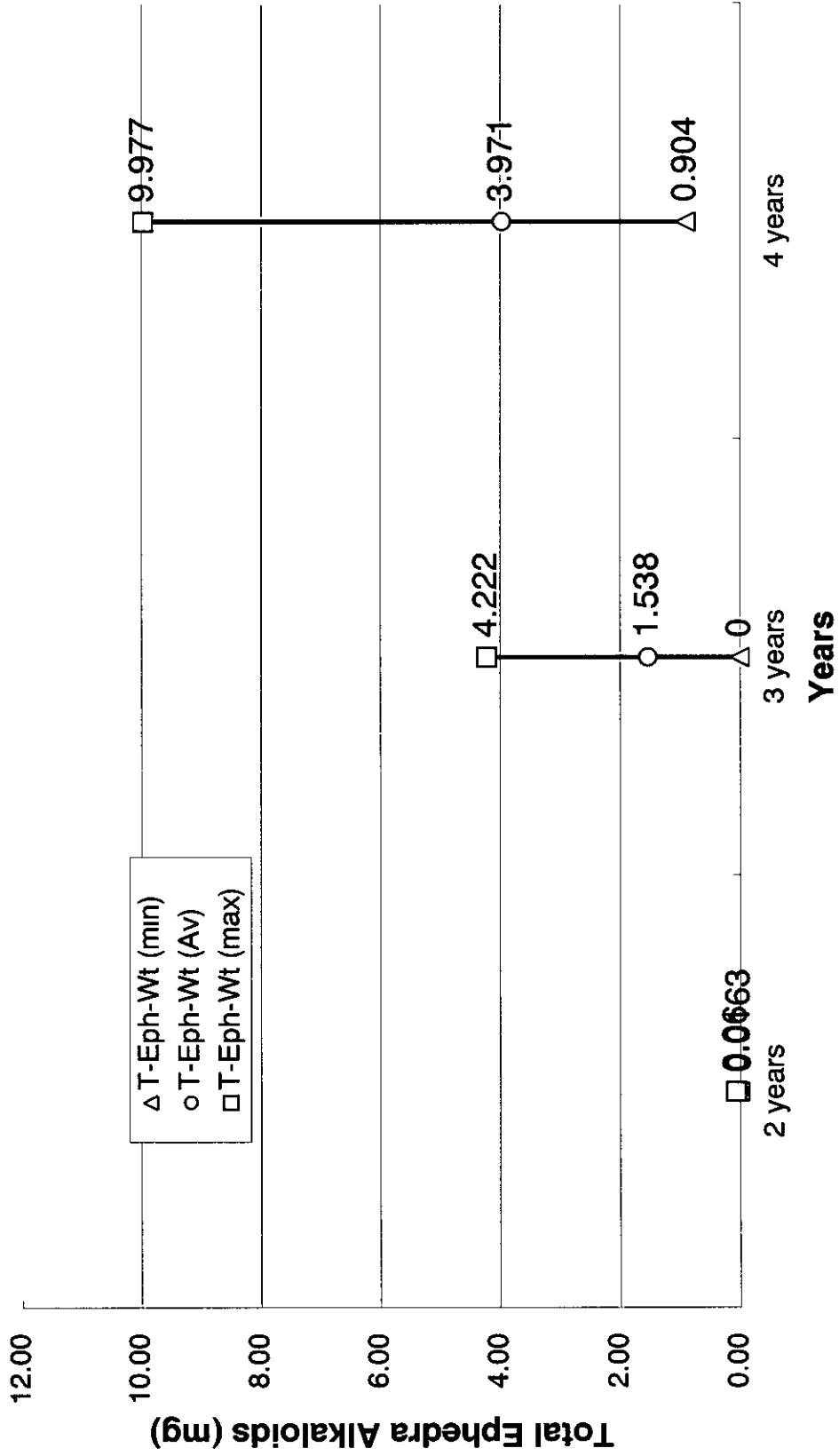


Fig. 3 Total Ephedra Alkaloids contents and dry weights of herbal stems of *E. gerardiana* cultivated in the different soils

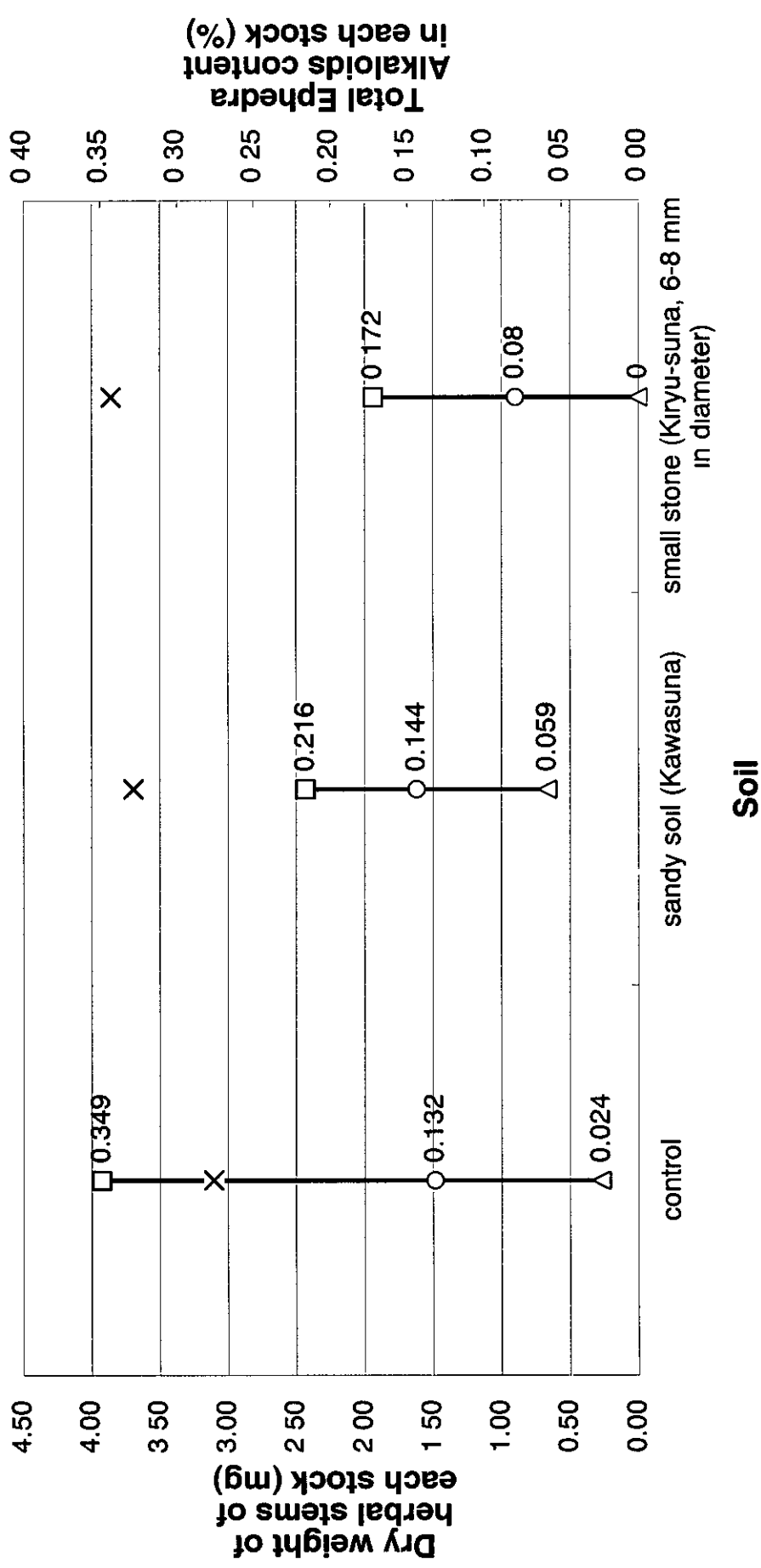
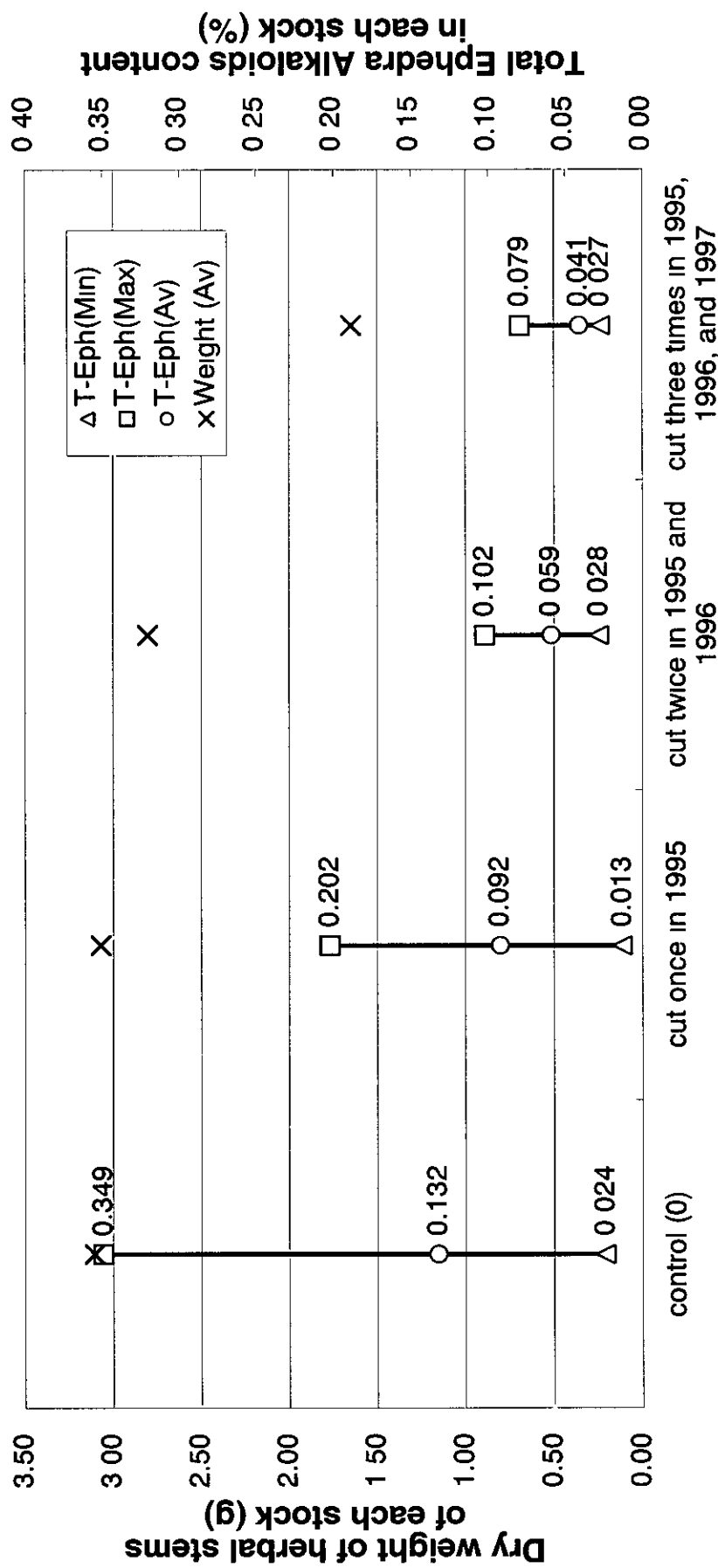


Fig. 4 Influence to the Total Ephedra Alkaloids content and dry weight of herbal stems of *E. gerardiana* by cutting



Number of cutting (at 2cm from the base once a year on July)

Fig. 5 Total Ephedra Alkaloids contents and dry weights of herbal stems of *E. gerardiana* cultivated in the different places

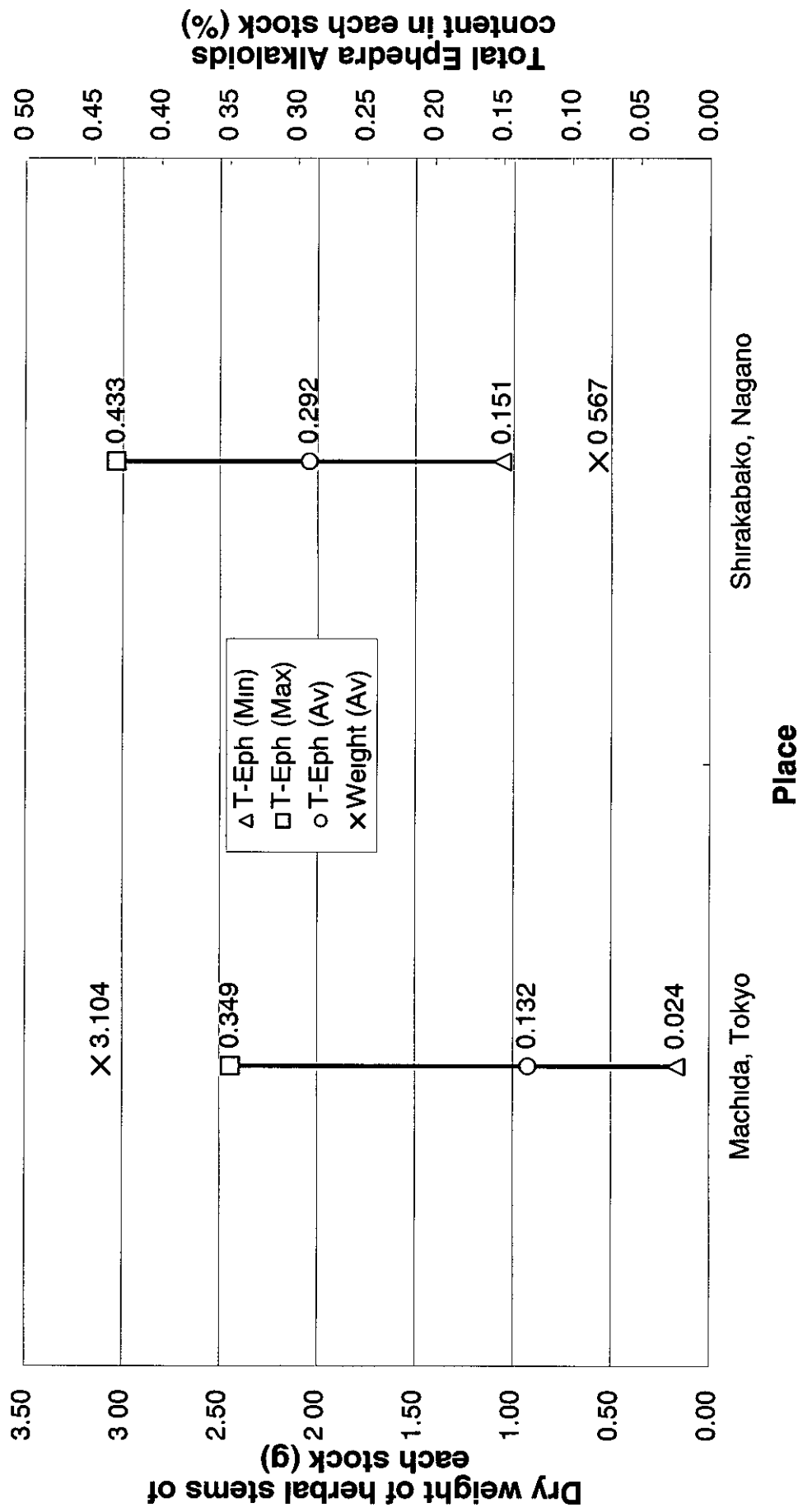
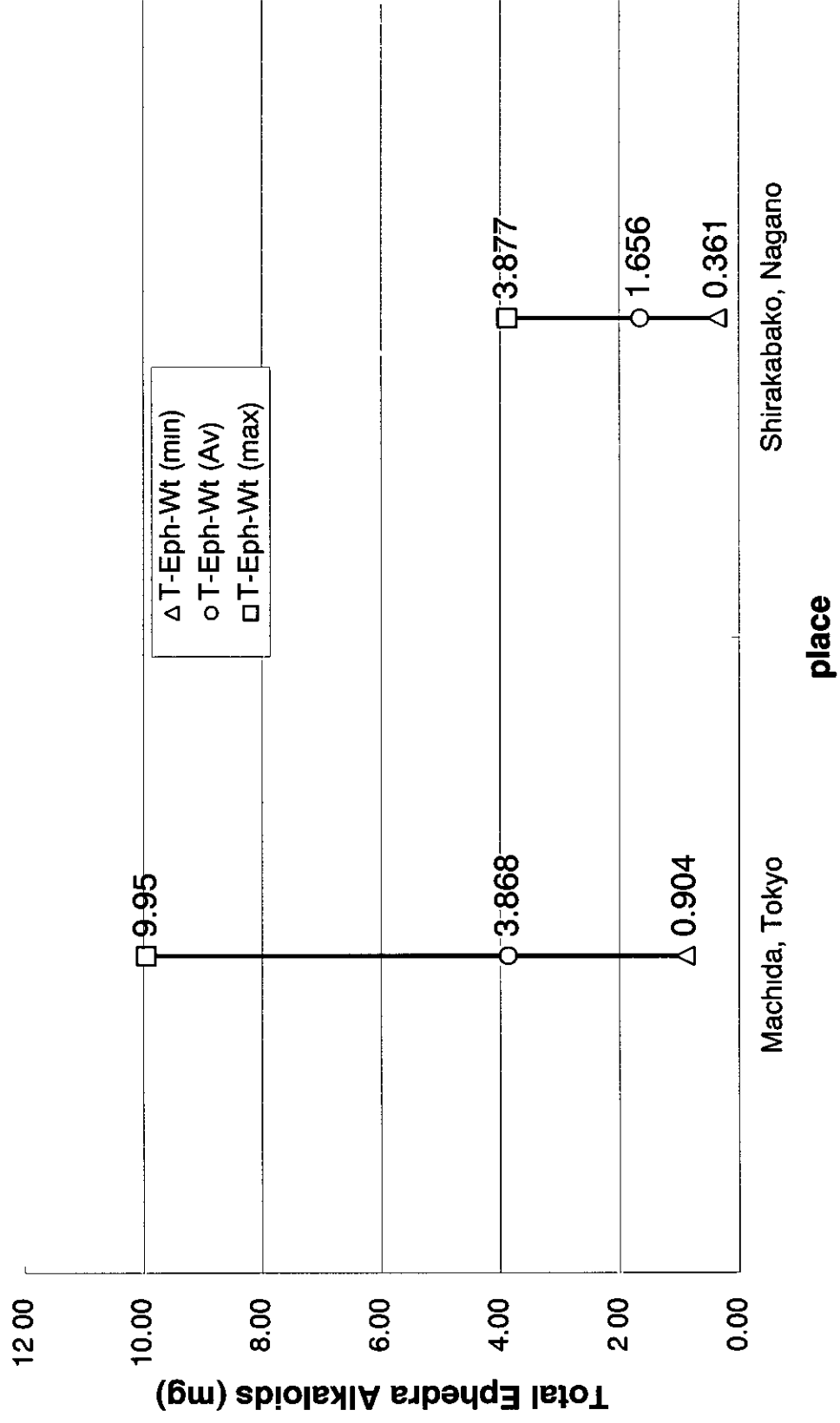


Fig. 6 Yields of Ephedra Alkaloids in each stock of herbal stems of *E. gerardiana*



平成11年度厚生科学特別研究事業報告書
緊急に資源確保を要する生薬 - 麻黄に関する研究

研究項目：ネパール産麻黄
(*Ephedra*) 属植物の栽培に関する研究

a. 分担研究者氏名：^{わたなべ たかし}渡辺 高志
b. 所属機関及び職名：北里大学薬学部附属
薬用植物園、助手
c. 住所 所属機関： 228-8555
神奈川県相模原市北里1-15-1
TEL&Fax: 042-778-9308
E-mail Address. watanabe@clas.kitasato-u.ac.jp

1. 研究内容

2-1. 発芽特性と生長に伴うアルカロイド含量の変化について

【目的】 *Ephedra gerardiana* Wall. ex Stapf を種子繁殖した場合の生産物の特性を知る目的で、西ネパールのジュムラ地方 (Fig. 4) および東ネパールのゴーキョ地方 (Fig. 4) で採取した *E. gerardiana* の種子を材料として、発芽試験を行い、さらに、ジュムラ地方の株については生長に伴うアルカロイド含量の変化および各種栽培条件とアルカロイド含量の関係について検討した。なお、ヒマラヤ地域に分布する *Ephedra* 属植物については、御影ら (金沢大学薬学部教授) が広範囲にわたるフィールド調査を行い、自生地で採取した *E. gerardiana* と *E. pachyclada* Boiss を用いて、組織学的、生態学的および成分化学的検討を行っている。また *E. pachyclada* については、種子からの栽培研究を行っている。

【実験・結果】

1) 発芽試験-1

a 土での発芽試験：1994年7月2日に採取した種子70個を8月6日に播種した (赤玉土：パーライト=9:1)。その結果、

播種10日後から発芽を開始し、9月28日までに59個 (全播種量の84.3%) が発芽した。

b. 吸湿ろ紙上での発芽試験：1) と同じ場所で採取した種子を用いて、100粒を1群とし、温度勾配恒温器中で、明暗12時間ずつ、10、15、20℃および15、20、25℃の条件下で発芽試験を行った (Fig. 1)。その結果、今回の実験条件では、温度が高いほど発芽の開始と終了が速くなるが、最終的な発芽率は約70%で、温度とは無関係であった (Table 1 TEST-I, II; Fig. 2 Germ. Test-I, II)。

2) 栽培条件とアルカロイド含量：

(高野昭、三橋亜矢、渡辺高志、Kuber J Malla, 日本生薬学会講演要旨1999の一部を使用)

原則として1群5個体として群分けし、1) 栽培年数の違い (2年、3年、4年栽培群)、2) 栽培土壌の違い (A群、赤玉土+桐生砂+堆肥、B群；川砂+堆肥、C群；篩により径6~8mm前後の粒のみに調製した桐生砂+堆肥)、3) 栽培地の違い {M群；昭和薬科大学町田キャンパス (東京都町田市) で栽培、S群；昭和薬科大学諏訪キャンパス (長野県白樺湖畔) で栽培} とアルカロイド含量の関係について検討した。その結果、アルカロイド含量は各群内で大きな変異を示し、また、各群の平均値で検討した場合、以下のことが確認された。1) 栽培年数の増加に伴い、地上部の乾燥重量およびアルカロイド含量 (%) が増加した。2) 土壌の違いでは、地上部の乾燥重量はB群とC群がA群に比べて大きく、アルカロイド含量 (%) はA群とB群がC群に比べて多かった。この結果、1株中のアルカロイド量では、B群 (川砂+堆肥) が最大であった。3) S群のアルカロイド含量 (%) はM群に比べて高いが、S群の地上部乾燥重量が著しく少ないため、1株中のア

平成11年度厚生科学特別研究事業報告書

緊急に資源確保を要する生薬 - 麻黄に関する研究

ルカロイド量では、M群（町田キャンパスで栽培）がS群（白樺湖畔で栽培）の約3.6倍量であった。

3) 発芽試験-2（追加試験）

土での発芽試験：西ネパールのジュムラ地方からの種子を播種した実験（1994年8月6日）に引続き、東ネパールのゴーキョ地方で採種（1999年8月7日）した種子を用いて1) 採取後の条件が発芽に及ぼす影響および2) 温度の相違が発芽に及ぼす影響について現在検討中である（Table 2）。その結果については、次回の報告書にまとめる予定である。

2-2. 生育土壌の理化学的性質について

【目的】ネパール産麻黄（*Ephedra*）属植物の草質茎に含有されるアルカロイドの量には種間差があり、また種内においても生育地の経度、高度などの違いにより変異することが明かとなっている（Kondo N, 1997）。生育地の違いとは気温や年間降水量などの気候条件の違いを反映するものと考えられる。同じ生育場所や近隣に生育する株間でも成分含量に大きな差が認められる報告が多くあることから、他の要因として遺伝的要因や生育年数などの影響についても検討する必要がある。ネパール産麻黄（*Ephedra*）属植物中のエフェドリン含量は生育地の環境、特に土壌環境の影響を受けて変異することが明らかになっているので、本研究では、生育地の土壌の理化学的性質と生育地の標高との相関を検討した。

【実験・結果】

1. 採集地、採集日および採集者・

The investigation using of seeds from Machhermo to Gokyo under the Sagarmatha National Park, Solkumbhu Himalaya, Nepal; Aug 7, 1999, Takashi Watanabe

2. 実験日：08 Dec, 2000

3. 実験場所：Kitasato University, Lab of Medicinal Plant Garden

4. 温度条件：Room Temperature (°C)

5. 実験方法：

1) 分析試料

・pH(H₂O)は、未風乾新鮮土ないし風乾細土について測定するが、なるべく未風乾新鮮土を用い、採土後速やかに測定することが望ましい。

・pH(KCl)は、風乾細土について測定する。

2) 分析試薬

・1 N 塩化カリウム液 - 塩化カリウム (KCl)74.5g を水に溶かして1 ℓとする。水酸化カリウム液により、pH 計を用いて pH 7 に調節する。

3) 操作方法

・pH(H₂O)：風乾細土 10 g に超純水 (Milli-Q) 25ml を加え、十分に振り混ぜた後一昼夜放置する。測定前に軽くかき混ぜて懸濁状態とし、pH センサ (ISFET pH 計 KS723) のセンサ部に測定溶液を静かに数滴落す。その後30秒以上経過してpH 計の表示値が安定するのを待って、pH を読み取る。数値は小数点以下1ケタまでとする。測定後の電極は、水でよく洗い、水に浸して保存する。

・pH(KCl)：風乾細土 10 g に1 N 塩化カリウム液 25ml を加え、pH(H₂O)の場合と同じ操作でpH を測定する。

本研究では、西ネパールのジュムラ地方での採種調査（1994年7月2日）に引き続き、1999年8月に訪問した東ネパール・ゴーキョ地方（Fig. 4）での山岳調査をもとに採種したネパール産麻黄（*E gerardiana* Wall ex Stapf）の種子を材料として、生育地の土壌の理化学的性質を調べるために土壌 pH 試験を行った。その結果、Table 3

平成11年度厚生科学特別研究事業報告書

緊急に資源確保を要する生薬 - 麻黄に関する研究

の記載のように生育地番号 NPL990803(1) ~ NPL990807(17) (NPL は国の分類記号、そして 990803 は 1999 年 8 月 3 日に採種したことを意味する。) 順に標高が上昇していくことを示し、土壤水素イオン濃度 pH(H₂O) の測定では、生育地における土壤 pH は 4.80 ~ 6.00 (平均 5.3) で、生育地の土壤 pH は、酸性であることが判明した。さらに、土壤水素イオン濃度 pH(KCl) の測定では、4.30 ~ 5.50 (平均 4.8) で pH(H₂O) より平均値で 0.5 低い数値を示した。また標高との関係は、標高の上昇するとともに pH が上昇する平行な相関が認められた (Fig. 3)。しかしながら、その差は大きなものではなかった。

[考察および結論]

1 温度条件について

Ephedra gerardiana の栽培化を検討する一環として、本植物の特性を知るために発芽試験を行い、10°C ~ 25°C の範囲内では、温度条件が高いほど発芽が早かった。しかし、温度の違いは最終的な発芽率に影響しないことを確認した。また、東ネパール・ゴーキョ地方で採取した *Ephedra gerardiana* の種子を用いて追加試験を現在行っているが、その結果を得るためには観察を継続していく必要があり、次回の報告書にまとめる予定である。2 土壤 pH について

東ネパール・ゴーキョ地方の生育地での土壤 pH を調べた結果、酸性土壤であることが判明したが、これらの結果は御影らの報告 (1997) による明酸性から微アルカリ性土壤に生育する *Ephedra gerardiana* の生育環境と一致する。また前報では土壤 pH が低い場所にアルカロイド含量の低い株が認められており、本研究結果では標高が上昇すると土壤がアルカリ性に傾くことが認められており、即ち生育地の標高が上昇する

につれアルカロイド含量の高い株が生育していることが予想できる。しかしながら、本研究結果のように暖かさの指数 (暖かさの指数とは、月平均気温が 5°C 以上の月の平均温度から 5 を引いた値を換算した数値。) が低い厳しい環境条件よりは、暖かさの指数が高い温暖な地域 (町田キャンパス) の方が生長量とアルカロイド含量との関係でネパール産麻黄 (*E. gerardiana*) の栽培に適していることが認められており、今後さらなる栽培条件の検討が必要である。

なお土壤 pH は降雨量の影響を受けることから、アルカロイド含量はより乾燥した地域での株で含量が高くなると推測される。しかし、実際には乾燥条件だけで全てを論じることは理論的に不可能で、株の年齢や採取試料の部位によってもアルカロイド含量と組成に大きな差違が認められており、これらの条件を満たす十分な実験検討が必要である。

3 土壤の組成 (種類) とアルカロイド含量について

生育地の土壤の組成 (種類) とアルカロイド含量との相関については、B 群 (川砂 + 堆肥) が最大であり川砂が栽培に最も適した土壤であることが認められた。また、アルカロイド含量の高い株の増殖方法の研究する他に、地上部乾燥重量が多い株、即ち生育の著しい株の系統保存育成に勤めることが、栽培化に向けた最も良い方法であることが、本研究は示唆している。

上記の試験結果をもとに、本報告がネパール産麻黄 (*Ephedra*) 属植物に関する栽培指針を作成する際の基礎資料となることを願ってやまない。

● *Ephedra gerardiana* Wall (ネパール産麻黄)の発芽試験

1 採集地および採集日

The seeds were collected at Jumla, Karnali zone, Mid Western region, Nepal,
on Dec, 1994

2 播種量：取りまき種子100粒

3 試験試料および条件など

TEST-I

Date 30 Nov, 1994 ~

Seed Weight

Temperature 15°C, 20°C, 25°C

25°C 2.0367 g / 100 seeds

Lamp Dark / Light = 12 hrs / 12hrs

20°C 2.0811 g / 100 seeds

Each group contains 100 seeds

15°C 2.0481 g / 100 seeds

播種後の経過日	温度°C		
	15°C	20°C	25°C
1	0	0	0
2	0	0	1
3	0	4	18
4	1	21	45
5	5	40	61
6	21	53	65
7	40	60	67
8	52	61	68
9	61	61	69
10	0	0	0
~	0	0	0
upto Final Date	66	63	69

TEST-II

Date 14 Dec, 1994 ~

Seed Weight

Temperature 10°C, 15°C, 20°C

20°C 2.0471 g / 100 seeds

Lamp Dark / Light = 12 hrs / 12hrs

15°C 2.0344 g / 100 seeds

Each group contains 100 seeds

10°C 2.0823 g / 99 seeds

播種後の経過日	10°C	15°C	20°C
	温度°C	温度°C	温度°C
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	4
4	0	1	25
5	0	5	41
6	0	18	58
7	0	32	64
8	3	46	68
9	0	54	0
10	33	0	0
11	42	65	69
12	0	66	69
13	59	0	0
14	63	68	71
15	65	0	0
16	69	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	71	0	0

Table 1 .

Germination Test of *Ephedra gerardiana* Wall.

Seed Materials:

The seeds were collected at Jumla, Karnali zone, Mid Western region, Nepal, on Dec., 1994.

Data:

TEST-I

Date 30 Nov, 1994 ~

Temperature: 15°C, 20°C, 25°C

Lamp Dark / Light = 12 hrs / 12hrs

Each group contains 100 seeds

Seed Weight

25°C : 2.0367 g / 100 seeds

20°C : 2.0811 g / 100 seeds

15°C : 2.0481 g / 100 seeds

TEST-II

Date 14 Dec, 1994 ~

Temperature 10°C, 15°C, 20°C

Lamp: Dark / Light = 12 hrs / 12hrs

Each group contains 100 seeds

Seed Weight

20°C : 2.0471 g / 100 seeds

15°C : 2.0344 g / 100 seeds

10°C : 2.0823 g / 99 seeds

Apparatus:

Plastic vessels (Fig) and Temperature gradient chamber TG-100-AD were used.

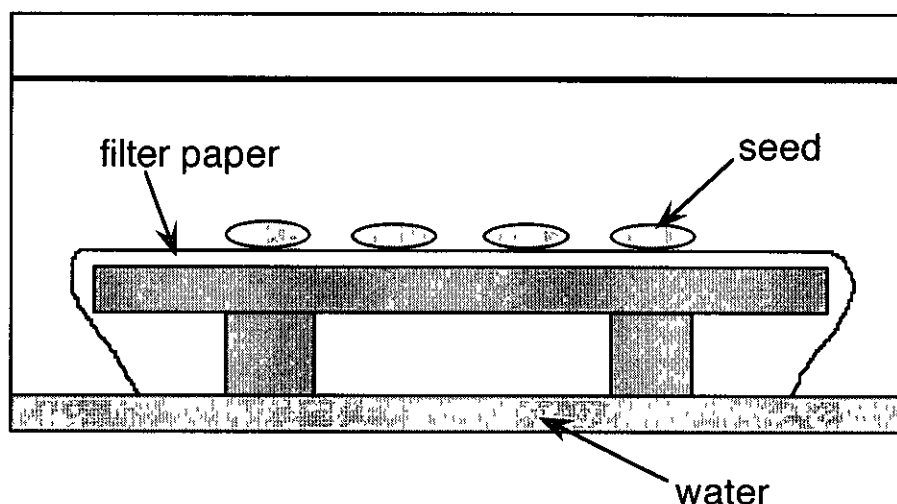
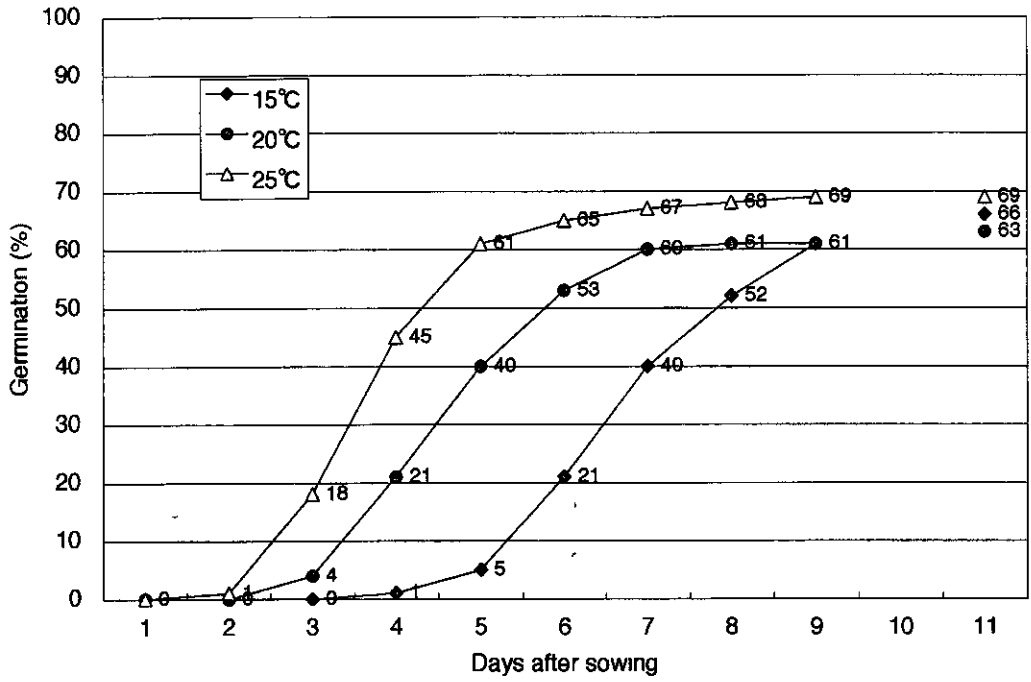


Fig. 1.

Germination Test - I



Germination Test - II

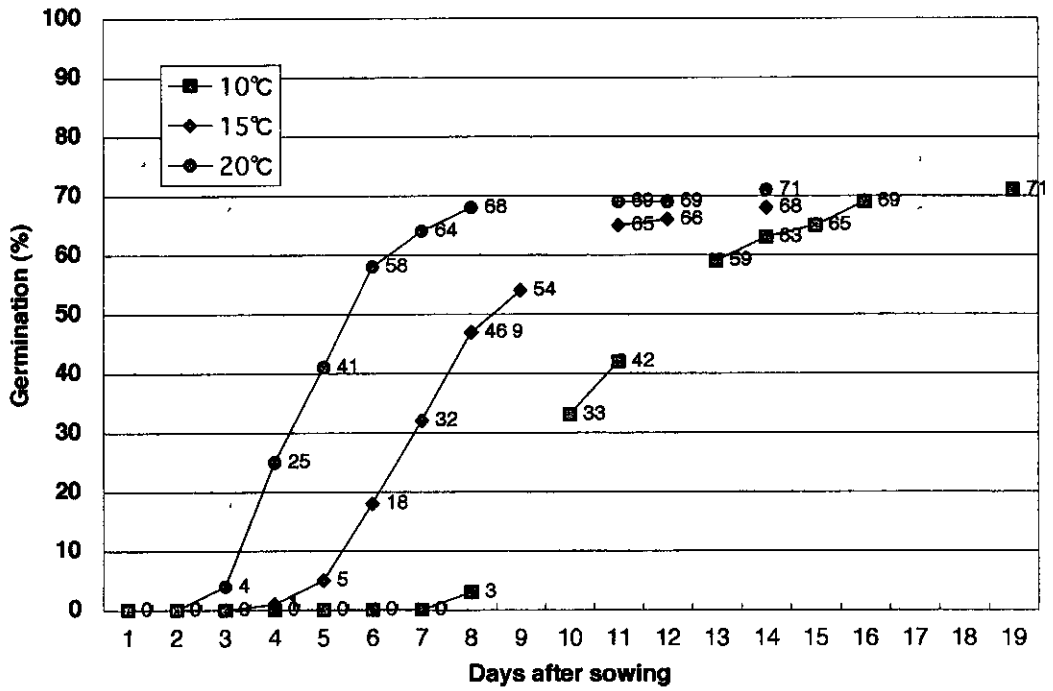


Fig. 2.

● *Ephedra Gerardiana* Wall - ネパール産麻黄-の発芽試験 (追加試験)

1 採集地、採集日および採集者

The investigation using of seeds from Machhermo to Gokyo under the Sagarmatha National Park, Solkumbhu Himalaya, Nepal,

Aug 7, 1999 / Takashi Watanabe

2 播種量：現地採集種子 100粒

3 設定条件：野外自然条件

◎採取後の条件が発芽に及ぼす影響について

ID No	播種日 Pot No	室内乾燥 Room Temperature		室内乾燥 Room Temperature		冷蔵庫乾燥 Refrigerator		冷蔵庫乾燥 Refrigerator		密閉容器保存 Airtight container		
		Germination Numbers	10 30 99	Germination Numbers	12 30 99	Germination Numbers	10 30 99	Germination Numbers	12 30 99	Germination Numbers	10 30 99	Germination Numbers
1	EG-Gokyo	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	EG-Gokyo	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	EG-Gokyo	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	EG-Gokyo	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	EG-Gokyo	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	EG-Gokyo	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

◎温度の相違が発芽に及ぼす影響について

ID No	播種日 Pot No	野外播種 Control		設定温度 5 - 10 °C		設定温度 10 - 15 °C		設定温度 15 - 20 °C		設定温度 20 - 25 °C		設定温度 25 - 30 °C		設定温度 30 - 35 °C	
		Germination Numbers	8 30 99	Germination Numbers	8 30 99	Germination Numbers	8 30 99	Germination Numbers	8 30 99	Germination Numbers	8 30 99	Germination Numbers	8 30 99	Germination Numbers	8 30 99
1	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	EG-Gokyo	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	EG-Gokyo	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	
6	EG-Gokyo	4	0	0	0	0	0	5	0	5	4	0	0	0	
7	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	EG-Gokyo	1	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	0	
9	EG-Gokyo	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	
10	EG-Gokyo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2.

● *Ephedra gerardiana* Wall. (ネパール産麻黄)

生育地域から採取した土壌のpH試験

1 採集地および採集日

The investigation using of seeds from Machhermo to Gokyo under the Sagarmatha National Park, Solkumbhu Himalaya, Nepal, Aug 7 1999

2 実験日

08 Dec, 2000

3 実験場所

北里大学薬学部附属薬用植物園研究室内

4 温度条件

Room Temperature (°C)

5 実験方法

- 1) 分析試料 pH(H₂O)は、未風乾新鮮土ないし風乾細土について測定するが、なるべく未風乾新鮮土について、採土後速やかに測定することが望ましい。
pH(KCl)は、風乾細土について測定する。
- 2) 分析試薬 1N塩化カリウム液 - 塩化カリウム(KCl)74.5gを水に溶かして10とする。水酸化カリウム液によりpH計を用いてpH7に調整する。
- 3) 操作方法 pH(H₂O) 風乾細土10gに超純水(Milli-Q)25mlを加え十分に振り混ぜた後一昼夜放置する。測定前に軽くかき混ぜて懸濁状態としpHセンサ(ISFET pH計KS723)のセンサ部に測定溶液を静かに数滴落す。その後30秒以上経過してpH計の表示値が安定するのを待って、pHを読み取る。数値は小数点以下1ケタまでとする。測定後の電極は水でよく洗い、水に浸して保存する。
pH(KCl) 風乾細土10gに1N塩化カリウム液25mlを加えpH(H₂O)の場合と同じ操作でpHを測定する。

・ pH(H₂O)測定結果

Local No	pH	Sample Weight(g)	Locality	Collector	Altitude(m)
NPL990803(1)	4.8	1.002	Sano Gumela	Binod Basnet	2733
NPL990803(2)	5.0	1.002	Namche Bazar	Takashi Watanabe	3440
NPL990805(3)	5.4	2.004	Namche - Thulo Gailo	Binod Basnet	3440
NPL990805(4)	5.3	2.001	Sanasa	Binod Basnet	3650
NPL990805(5)	4.9	2.000	Lusivasa -Khumjung	Binod Basnet	3780
NPL990805(6)	5.6	2.000	way to Phortse	Binod Basnet	3810
NPL990805(7)	4.9	1.004	Mon La	Takashi Watanabe	3850
NPL990806(8)	5.1	2.002	Lhabarma	Binod Basnet	4330
NPL990806(9)	5.4	2.004	Luza	Binod Basnet	4390
NPL990806(10)	5.3	1.000	Dole	Takashi Watanabe	4040
NPL990806(11)	4.9	0.402	Dole	Binod Basnet	4040
NPL990806(12)	5.5	1.002	Dole	Binod Basnet	4040
NPL990806(13)	5.2	2.005	Dole	Takashi Watanabe	4040
NPL990810(14)	4.9	2.007	Dole	Binod Basnet	4040
NPL990809(15)	5.6	2.003	avove Dole	Takashi Watanabe	4110
NPL990807(16)	5.7	2.006	near Gokyo	Takashi Watanabe	4600
NPL990807(17)	6.0	2.005	Gokyo	Takashi Watanabe	4790

・ pH(KCl)測定結果

Local No	pH	Sample Weight(g)	Locality	Collector	Altitude(m)
NPL990803(1)	4.3	1.002	Sano Gumela	Binod Basnet	2733
NPL990803(2)	4.5	1.002	Namche Bazar	Takashi Watanabe	3440
NPL990805(3)	4.9	2.004	Namche - Thulo Gailo	Binod Basnet	3440
NPL990805(4)	4.8	2.001	Sanasa	Binod Basnet	3650
NPL990805(5)	4.4	2.000	Lusivasa -Khumjung	Binod Basnet	3780
NPL990805(6)	5.1	2.000	way to Phortse	Binod Basnet	3810
NPL990805(7)	4.4	1.004	Mon La	Takashi Watanabe	3850
NPL990806(8)	4.6	2.002	Lhabarma	Binod Basnet	4330
NPL990806(9)	4.9	2.004	Luza	Binod Basnet	4390
NPL990806(10)	4.8	1.000	Dole	Takashi Watanabe	4040
NPL990806(11)	4.4	0.402	Dole	Binod Basnet	4040
NPL990806(12)	5.0	1.002	Dole	Binod Basnet	4040
NPL990806(13)	4.7	2.005	Dole	Takashi Watanabe	4040
NPL990810(14)	4.4	2.007	Dole	Binod Basnet	4040
NPL990809(15)	5.1	2.003	avove Dole	Takashi Watanabe	4110
NPL990807(16)	5.2	2.006	near Gokyo	Takashi Watanabe	4600
NPL990807(17)	5.5	2.005	Gokyo	Takashi Watanabe	4790

Table 3.

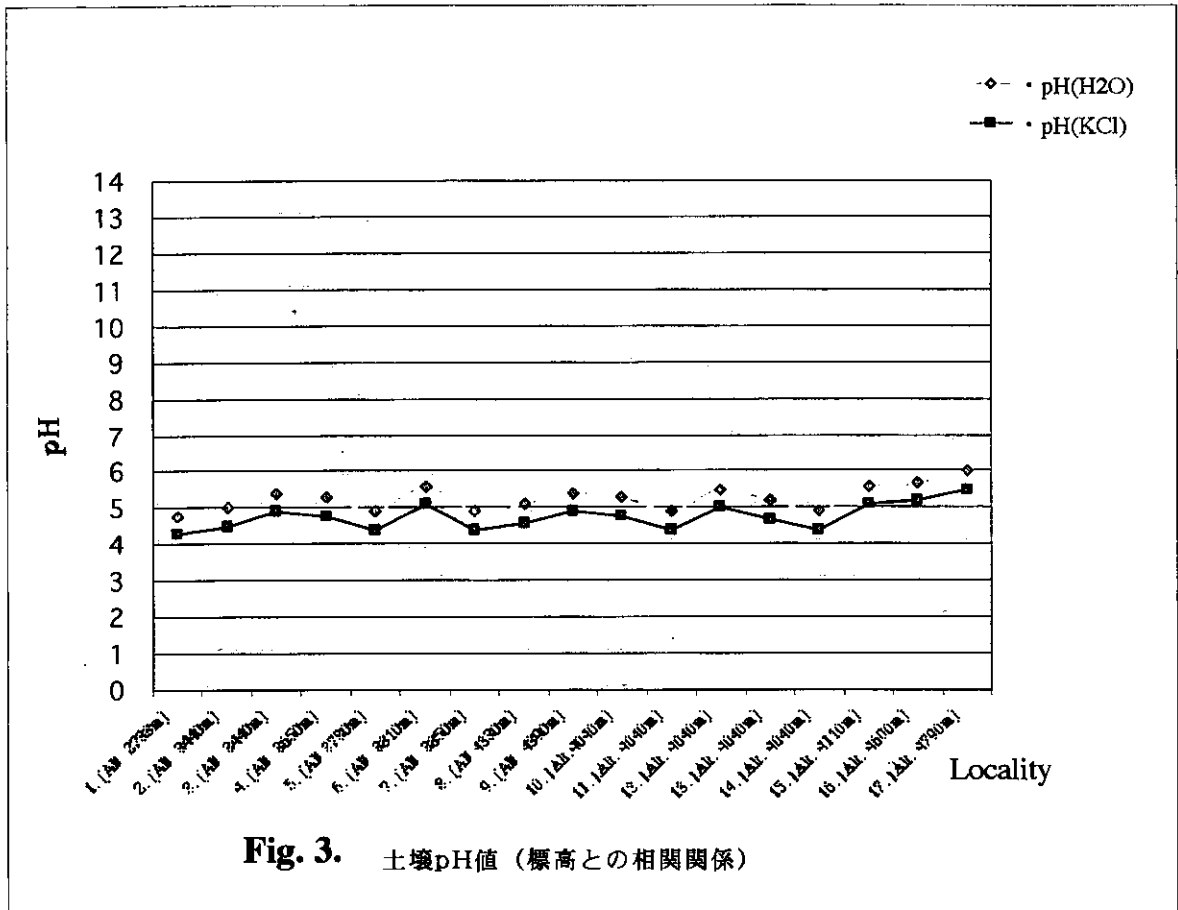


Fig. 3. 土壤pH値 (標高との相関関係)

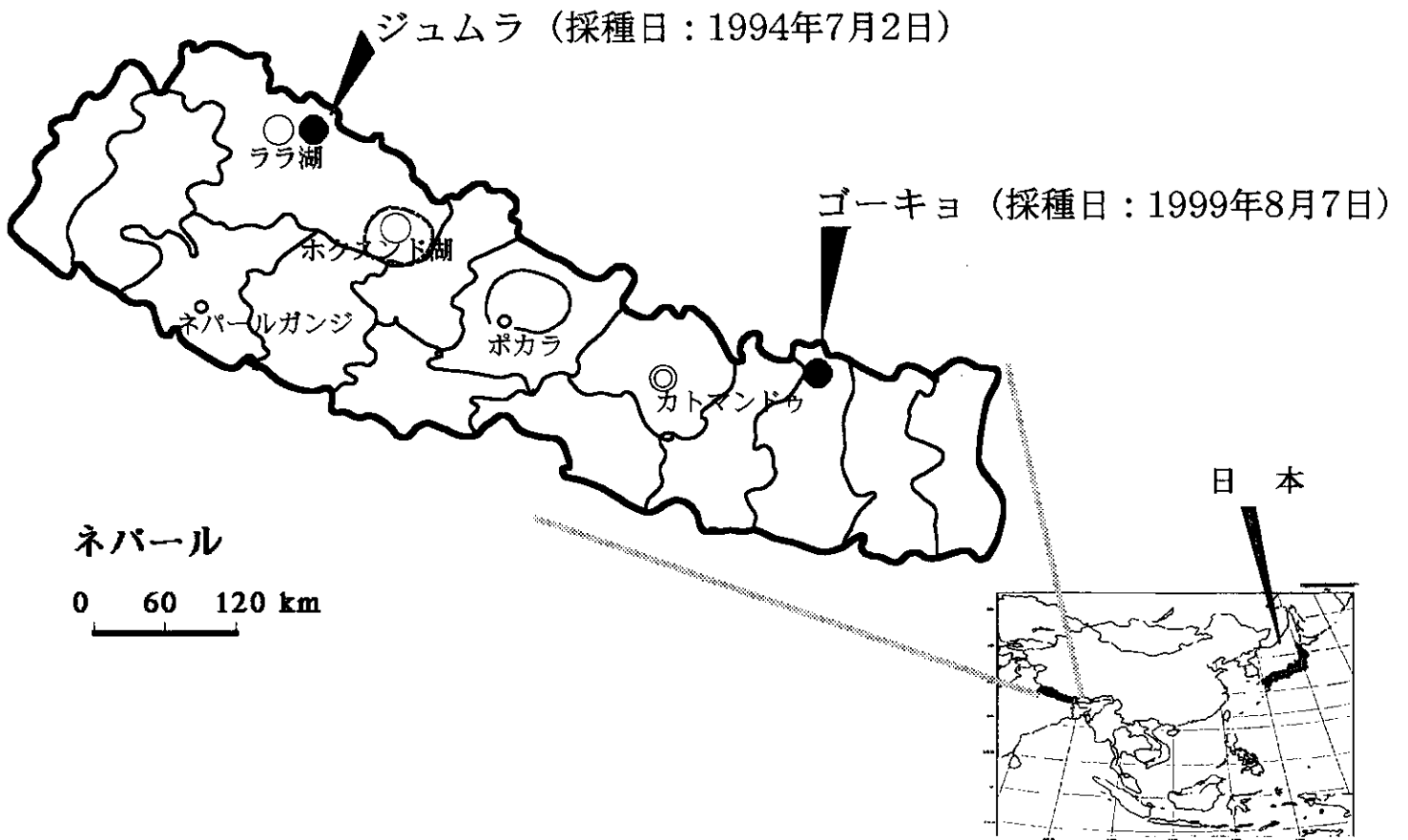


Fig. 4. 調査研究実施地域 (サンプル採種地域)

Approximate geographical range of Medicinal plants used in this survey

分担研究報告書

ネパール産麻黄の導入に関する研究

分担研究者 御影 雅幸 金沢大学薬学部教授

研究要旨

ネパールのヒマラヤ地域に生育するマオウ属植物 (*Ephedra* spp) が日局「麻黄」として導入可能であるか否かを検討する目的で、現地で採集した本属植物の分類学的研究、草質茎のエフェドリン含有率の測定、資源の現状調査を行った。その結果、*E pachyclada* が有望であることが明らかになった。

A 研究目的

ネパールにはマオウ属植物 (*Ephedra*) が4分類群分布するとされている。そのうち *E gerardiana* Stapf は中国にも分布し、漢薬「麻黄」の1原植物とされている。本研究では、他の分類群をも含め、ネパール産マオウ属植物が生薬「麻黄」として日局に適合するか否かを調査するとともに、資源状況を把握することを目的とした。

B 研究方法

これまでに分担研究者らによりネパールで採集されたマオウ属植物について、O Stapf の分類に基づき分類学的検討を行ない、また含有成分について4種のエフェドリン系アルカロイドを定量し、日局の規定 (nor-ephedrine と pseudo-ephedrine の合計が0.7%以上) と比較した。また、西部ネパールのカリガンダキ上流域で本属植物の生態並びに資源状況を調査した。

C 研究結果

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で真っ直ぐな *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 gerardiana* では0.287~1.504%、*E pachyclada* では0.691~2.493%で、

後者の方が有意に高かった。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。

D. 考察

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する。資源的にはかなり豊富であるが、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。

E 結論

ネパールには *E pachyclada* と *E gerardiana* の2種のマオウ属植物が分布する。漢薬「麻黄」の原植物としてはより低地性で荒地に生える前者が適しており、日局「麻黄」として導入可能であると結論する。資源的にも豊富である。

F 研究発表

成果の一部を「第31回ヒマラヤ植物研究会総会」(1999年12月18日：於東京大学総合

厚生科学研究費補助金（特別研究事業）
分担研究報告書

*Ephedra*属植物および生薬麻黄のDNA鑑別に関する研究

（分担）研究者 水上 元 名古屋市立大学薬学部助教授

研究要旨 葉緑体ゲノム上に存在する*chlB*遺伝子の塩基配列を分子マーカーとする*Ephedra*属植物および生薬麻黄の遺伝子鑑別法を検討した。9系統の*Ephedra*属植物の*chlB*遺伝子塩基配列を解読した結果、そのシーケンスは3つのタイプに分類できること、および我が国で植栽されている*Ephedra*属植物に付されている種名は必ずしも信頼できないことが明らかになった。そこで、50年以上前に採集され、正確な種の同定がなされていると考えられる乾燥標本から*chlB*遺伝子を増幅し、その塩基配列を解読することにより、*Ephedra sinica*、*E distachya*、*E equisetina*のシーケンスタイプを同定した。さらに、*E sinica*およびそれを基原とする草麻黄を簡便に同定する方法を提唱した。

これらの検討の結果、*chlB*遺伝子塩基配列に基づくDNA鑑別法は、*Ephedra*属植物および麻黄の優れた鑑別法となりえることが明らかになった。

A. 研究目的

中国政府による漢薬麻黄の輸出禁止措置に伴って、新たな資源の導入が緊急に必要になっている。一般に、生薬の新しい基原植物を導入するにあたっては、植物およびそれから調製された生薬を既存のものと正確に鑑別する方法を確立しておくことが望ましい。*Ephedra*属植物および麻黄の外部形態は非常によく類似しており、また分類形質が生育環境によっても変化することが知られている。したがって、外部形態による鑑別、同定は困難で、内部形態による分類、同定が行われている。しかしながら、内部形態学的な形質も連続的な変異を示すものが多く、麻黄の鑑別には高度な熟練が必要となっている。

生物の遺伝子型をDNAの塩基配列として

直接解析することは、生物の生育環境や発育段階、用いる器官や組織の種類を受けないなどの優れた特色を有している。また、分類形質は客観的なデータとして得られるとともに、その解釈は一般的に一義的であり、また一端プロトコルを確立すれば、その実施には特殊な熟練を要せず、ある程度の自動化も可能であるという利点も存在している。

*ChlB*遺伝子は、葉緑体ゲノム上に存在し、光非依存的protochlorophyllide reductaseのサブユニットの一つをコードしている。この遺伝子は、被子植物には存在せず、またその進化速度は、高等植物の分子マーカーとしてよく用いられる*rbcL*遺伝子よりも数倍大きいことが知られている。このような点に着目して、本研究では*Ephedra*属植物および生

葉麻黄の簡便で正確な鑑別法を確立することを目的として、*chlB*遺伝子の塩基配列を分子マーカーとするDNA鑑別法を検討した。

B. 研究方法

(1) DNAの調製

植物からのDNAの調製はSDS-Lysis bufferを用いる方法で行った。液体窒素中で凍結破砕した地上茎約1gにLysis buffer (400 mM tris-HCl, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0) 3 mLと10% SDS 0.1 mLを加えてよく混和し、さらに5M KOAc 1 mLを加えて60°Cで20分間インキュベートした。20分間氷冷した後、chloroform 4.2 mLを加えて10分間穏やかに攪拌し、遠心後、上清にisopropanol 4.5 mLを加えてDNAを沈殿させた。DNAは少量のTE (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した後、RNaseで処理した。

生薬からのDNAの調製は、本研究室において確立した方法を用いた。粉末にした生薬約100mgに上記のLysis buffer 1 mLと10% SDS 130 µLを加え、乳鉢中でよく混和した。5M KOAc 300 µLを加えて混和した後、60°Cで20分間、さらに氷中で20分間インキュベートした。遠心分離して得た上清にchloroform/isoamyl alcohol (24:1) 1.2 mLを加えてボルテックスした後、遠心分離した。上清に等量のisopropanolを加えてDNAを沈殿させた。DNAを100 µLのTEに溶解後、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) を用いて精製した。

(2) PCRによる*chlB*遺伝子の増幅

DNAデータベース上に登録されている

Ephedra altissima の *chlB* 遺伝子の塩基配列 (GenBank Accession No U21316) に基づいて、 forward primer *chlB1F*=5'-ATGAAATTAGCTTATTGGATG-3' と reverse primer *chlB1R*=5'-ACTGTTGTTTTTGGTGATGC-3' を設計した。PCRは、25 µLあたりプライマー各 10 pmole と dNTP 50 nmole、*Taq* DNA polymerase 0.5 unit、鋳型DNA 10 ngを含むようにPCR混合液を調製し、94°C-30秒、55°C-30秒、72°C-90秒の反応を30サイクル繰り返した。反応産物は、1.5%アガロースゲル電気泳動によって確認した。PCR産物はHigh Pure PCR Product Purification Kit (Roche) を用いて精製した。

(3) PCR産物のシーケンス

精製したPCR産物は、ThermoSequenase Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia) を用いてシーケンス反応を行い、蛍光シーケンサー (Shimadzu DSQ-2000L) を使用して、直接シーケンスした。なお、シーケンスは内部配列プライマーを用いて両鎖について行った。

(4) PCR産物の制限酵素分解

*ChlB*遺伝子の5'側335bpが増幅できるように設計したprimer setを用いてPCRを行うことによって得たPCR産物約 10ng、*Bcl* I 10 unitを含む10 µLの制限酵素バッファー中で50°Cで1時間インキュベートした。反応産物は3%アガロースゲル電気泳動によって分離した後にSYBR Gold (和光純薬) で染色し、FluorImager (Molecular Dynamics) によって検出した。

C. 研究結果と考察

(1) *Ephedra*属植物の*chlB*遺伝子の塩基配列

Table 1に示した日本各地の薬用植物園から入手した9系統の*Ephedra*属植物について、その*chlB*遺伝子の塩基配列を解読した。決定した塩基配列を比較したところ、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 (Type 1、Type 2、Type 3) に分類できることがわかった (Fig 1)。

Type 1とType 2ではシークエンスした全長1504 bpのうち5'側から267番目のサイトでCからTへのtransitionが生じているだけであった。Type 1とType 3では、5'側から78、142、267、486、948、1315、1389、1437番目のサイトで塩基の置換が生じていた。なお、これらの置換はすべて同義的置換であり、塩基配列から推定した*chlB*タンパク質のアミノ酸配列にはType 1~Type 3で全く差はなかった。

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 (Fig. 2)。外群としては、DNAデータベースに登録されているイチョウの*chlB*遺伝子塩基配列を用いた。その結果、Type 1とType 2の配列、Type 3と*E. altissima*の配列がそれぞれ一つのクラスターを形成することが高い確立で支持された。

Table 1から明らかのように、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。これらの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よう。

(2) 生薬麻黄の*chlB*遺伝子の塩基配列

収集した9系統の*Ephedra*属植物について*chlB*遺伝子の塩基配列を解読した結果、その配列は3つのタイプに分類でき、これに基づいたDNA鑑別が可能であることがわかった。しかしながら、各系統に付された種名に混乱があるらしく、配列のタイプと種の間に対応を認めることができなかった。したがって、種名の信頼できる標本が必要である。

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木島正夫は、中国各地から麻黄の標本を収集し、その種の同定を行っている (京都大学薬学部生薬学教室所蔵)。これらの標本類の種名は信頼できるのではないかと考え、Table 2に示した標本類からDNAを調製し、*chlB*遺伝子の塩基配列の解読を行うことにした。

最初に、生薬から調製したDNAをアガロースゲル電気泳動によって分析したところ、市場品 (M0) 由来のDNAでは23kb程度の大きな分子が残存していたが、その他の標本ではDNAの断片化が著しく、約1.5kbの大きさを有する*chlB*遺伝子全体を増幅することは困難であるように思われた。そこで、*chlB*遺伝子を300~500bpの大きさにわけて増幅し、それぞれの断片の塩基配列を貼り合わせることによって、*chlB*遺伝子の塩基配列を復元するというアプローチをとることにした。現在までに、市場品 (M0) では全長の配列決定が終了し、その他では5'側約350bpの配列 (領域A) が解読できている。なお、Fig 1から明らかのように、この領域の塩基配列