

が、定植初年度の一部の月を除き、すべて  
充たす結果を得た。

## 2. 種子島での採種 (別表参照)

年による気象状況の変異・植物の生育具  
合・節食動物の増減等により、採種出来る

### D. 考察

#### 1. マオウの種子島での生育

株分け (ほとんど地下部の走出茎の部分  
のみを利用する根挿しに近い方法) による  
移植栽培では、3年で成株に達する。他地  
域に比べ、生育期間が長く、成分面でも問  
題がない。

#### 2. 種子島での採種

種子島は記述のように、温帯と亜熱帯・  
熱帯、北限と南限の植物が共存し、あるい  
はせめぎ合うという、世界でも極めて希有  
な地域であることが、このことからもうか  
がい知れる。

### E. 結論

#### 1. マオウの種子島での生育

マオウの種子島での栽培は、成分含量の  
面で基準値を充たし、生育量も旺盛なため、  
生理生態的に十分可能であり、他地域より  
有利と思われる。

栽培種は 180 点で露地栽培種 172 点と温  
室栽培種 8 点であった。

## 2. 種子島での採種

種子島の自然は、植物の野生種・栽培種  
いずれもの幅広い種を受け入れられるだけ  
の、すばらしい生育環を包含している場所  
と言える。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

中根孝久、淵野裕之、高橋真理衣、飯田  
修、柴田敏郎、香月茂樹、関田節子、佐竹  
元吉：マオウ科 *Ephedraceae* 植物のエフ  
ェドリン含量Ⅳ—国内栽培試験種及び国外  
野生種—、日本生薬学会、東京、2003

### G. 別添資料

『平成15年(2003年)に採種した植物の  
一覧表』

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究）  
分担研究報告書

ミャンマー産ニンジンに関する化学的研究

分担研究者 神田 博史 広島大学医学部附属薬用植物園

ウコギ科 (*Araliaceae*) *Panax* 属植物はミャンマー、カチン州において発見された植物で、根茎が発達しトチバニンジンに外観が類似した植物である。この *Panax* 属植物の化学的資質について検討した。これまで報告のある *Panax* 属植物は、地下部の発達様式により大別して直根型と竹節型の 2 種類に分けられる。

直根型には、オタネニンジン(朝鮮人参) *Panax ginseng* C. A. Meyer (根は健胃薬、虚弱体質・肉体疲労・病中病後・胃腸虚弱・食欲不振・血色不良・冷え症の場合の滋養強壮<sup>1)</sup>)、サンシチ (田七人参) *Panax notoginseng* F. H. Chen (根は止血、鎮痛、消炎、強壮<sup>2)</sup>) *P. quinquefolium* (アメリカ人参) などがある。

竹節型には、トチバニンジン(竹節人参) *Panax japonicus* C. A. Meyer (根茎は健胃薬<sup>1)</sup>) に代表され、その根茎は節を持つ。日本、中国南部に連続的かつ広範囲に分布し、ヒマラヤニンジンもこのタイプに分類される。国内のトチバニンジンについては、詳細に研究されており、宮崎県、鹿児島県産のトチバニンジンとは異なるサポニン成分であり、サツマ (薩摩) ニンジンとも呼ばれる<sup>3)</sup>。今回は秋田産、宮崎産、湖北産、ブータン産の竹節型ニンジンと比較に用い、ミャンマー産ニンジンがどの系統に属するかを HPLC と逆相 TLC によって検討した。

## 実験の部

### 1) 用いたサンプル(直根型と竹節型を区別するためチクセツニンジンとする)

田七ニンジン	大阪市販生薬 粉末
オタネニンジン(長野産)	栽培品 2年生 根
サツマニンジン(宮崎県)	自生品 根茎
チクセツニンジン(秋田産)	自生品 根茎
チクセツニンジン(湖北産A)	生薬 根茎
チクセツニンジン(湖北産B)	生薬 湖北産Aの中からセリ科様根茎を使用
チクセツニンジン(ブータン産A)	'86.4.24採集 先端以外の根茎を使用
チクセツニンジン(ブータン産B)	'86.4.24採集 根茎先端のこぶを使用
ベトナムニンジン	ベトナムニンジンから単離
ミャンマーニンジン	2002.12ミャンマーカチン州採集(佐竹氏)

### 標品

ginsenoside-Rb1 (G-Rb 1)	購入品 EXTRASYNTHESE社
ginsenoside-Rc (G-Rc)	購入品 EXTRASYNTHESE社
ginsenoside Rb 2 (G-Rb 2)	購入品 EXTRASYNTHESE社
ginsenoside-Rd (G-Rd)	購入品 EXTRASYNTHESE社
chikusetsusaponin-V (C-V)	単離品
chikusetsusaponin-IV (C-IV)	単離品
majonoside-R1 (M-R1)	単離品
majonoside-R2 (M-R2)	単離品

### 2) サンプルの調製

サンプルは 70 % MeOH で 30 分間超音波洗浄器により抽出し、フィルターでろ過したものを HPLC 用の試料とした。チクセツニンジン(湖北産B)は、湖北産のサンプルの中にセリ科の根茎によく似た根茎が混ざっていたのでそれを使用した。また、

チクセツニンジン(ブータン産) Bは根茎先端の瘤上に膨らんだ部分を抽出した。

### 3) HPLC分析条件

流速：1.0 mL/min

検出：202 nm

チャートスピード：2 mm/min.

Range : 0.02

カラム : TSKgel ODS120T 4.6-150mm  
column No T-315

移動相 : Condition A ; CH<sub>3</sub>CN-0.5 %  
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (20 : 80)

Condition B-1 ; 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in 31%CH<sub>3</sub>CN

Condition B-2 ; 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in 27%CH<sub>3</sub>CN

移動相の条件は山口、笠井らにより  
確立された方法<sup>4)</sup>の Condition A と  
Condition B に従った。ただし、  
Condition B では oleanane 系サポニ  
ンの chikusetsusaponin の溶出が速す  
ぎたので今回、既存の Condition B を  
Condition B-1 とし、Condition B の極  
性を下げた Condition B-2 という条件  
を新たに作り oleanane 系サポニンの  
同定を行った。

## 結果と考察

### 1) HPLCの結果 (表 1 を参照)

Condition B-1 ; 20(S)-protopanaxadiol  
系サポニンの溶出条件

表 1 の Condition B-1 の結果から分  
かるように、ミャンマー産に確認さ  
れる 20(S)-protopanaxadiol 系サポニ  
ンは G-Rb1、G-Rc、G-Rd の 3 種だ  
った。これと同じ結果になったのは  
ブータン産 A だけであった。

Condition B-2 ; oleanane系サポニン

### の溶出条件

表 1 の Condition B-2 の結果から分  
かるように、ミャンマー産には  
oleanane 系サポニンの  
chikusetsusaponin-V と -IV の両方が  
確認された。この結果からミャンマ  
ー産は竹節系であるといえる。オタ  
ネニンジンとベトナムニンジンには  
chikusetsusaponin-V のみがあった。

Condition A ; 20(S)-protopanaxatriol  
系サポニンの溶出条件

ミャンマー産には G-Rg1 しかなく、  
G-Re は検出できなかった。ブータン  
産 A,B だけがこれと同じ結果になっ  
た。

### 2) 逆層TLCの結果

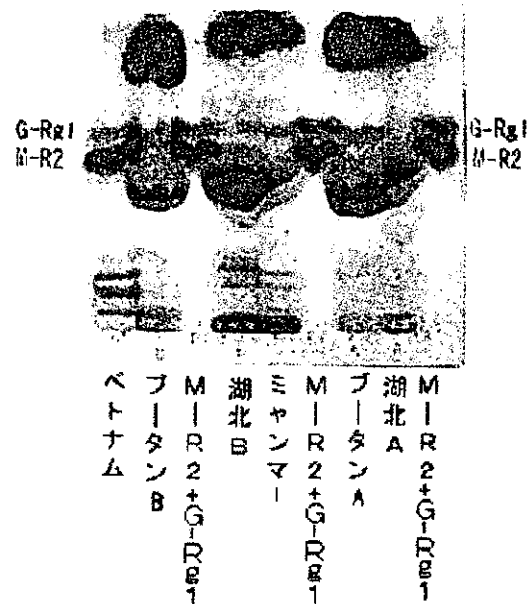


図 1. ミャンマー人參,ベトナム人參,  
湖北竹節人參,ブータン竹節人參の地  
下部MeOHエキスの薄層クロマト

グラム

Plates: HPTLC plates RP-18 F<sub>254</sub> S,  
Solvent: 68%MeOH  
Colour reagent: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
G-Rg1: ginsenoside Rg1  
M-R2: majonoside R2

北Aにはベトナムニンジン特異な成分である M-R2 はなく、G-Rg1 のみが確認された。(図.1参照) しかし、湖北 B には M-R2 と G-Rg1 両方が確認された。

図1のクロマトグラムから分かるようにミャンマー、ブータンA・B、湖

表 1 確認できたサポニン成分 (HPLCと逆相TLCの結果)

	20(S)-protopanaxadiol 系サポニン Condition B- 1 ; 50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 31%CH <sub>3</sub> CN	Oleanane系サポニン Condition B-2; 50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 27%CH <sub>3</sub> CN	20(S)-protopanaxatriol 系サポニン Condition A; CH <sub>3</sub> CN-0.5%H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (20 : 80)
ミャンマーニンジン	G-Rb1, G-Rc, G-Rd	C-V, C-IV	G-Rg1
ブータンA	G-Rb1, G-Rc, G-Rd	C-V, C-IV	G-Rg1
ブータンB	G-Rb1	C-V, C-IV	G-Rg1
湖北A	G-Rb1	C-V, C-IV	G-Rg1, G-Re
湖北B	G-Rb1	C-V, C-IV	G-Rg1, G-Re, M-R2
オタネニンジン	G-Rb1, G-Rc, G-Rb2, G-Rd	C-V	G-Rg1, G-Re
ベトナムニンジン	G-Rb1, G-Rd	C-V	G-Rg1, G-Re, M-R2
サツマニンジン	(G-Rb1, G-Rc) <sup>5)</sup>	C-V, C-IV	G-Rg1, G-Re
秋田産チクセツニンジン		C-V, C-IV	G-Rg1, G-Re
田七	G-Rb1, (G-Rb1, G-Rc) <sup>5)</sup> , G-Rd		G-Rg1, G-Re
<i>P. japonicus</i> var. <i>major</i> (文献より) <sup>5)</sup>	G-Rd	C-V	
<i>P. pseudo-ginseng</i> subsp. <i>Pseudo-ginseng</i> (Himalayan Ginseng) (文献より) <sup>5)</sup>		C-IV	G-Rg1

\*今回未検出であったが、文献5)で報告されているサポニンをカッコ書きで記した。

まとめ

ミャンマー産ニンジンには、chikusetsusaponin-V と -IV の両方が存在したという結果から判断して竹節系ニンジンであると言え、外部形態の特徴とも一致する結果となった。また、チクセツニンジンの中で比較すると 20(S)-protopanaxadiol 系サポニンの G-Rb1, G-Rc, G-Rd の 3 種が存在するというパターンがブータン産 A と同じことと、20(S)-protopanaxatriol 系サポニンでは G-Re が存在せず、G-Rg1 のみが存在するというパターンがブータン産ニンジンとミャンマー産ニンジンに見られることから、ブータン産ニンジンが最もミャンマー産ニンジンに近いと言える。

湖北産 A と比較すると 20(S)-protopanaxadiol 系サポニン G-Rc, G-Rd が湖北産 A にはなく、ミャンマー産ニンジンにはあるという点と 20(S)-protopanaxatriol 系サポニンの G-Re が湖北産 A にはあり、ミャンマー産ニンジンにはないという点で異なる。湖北 B に関してはそれに加え majonoside-R2 があるという点でやはりミャンマー産ニンジンとは異なる。

サツマニンジン、秋田産チクセツニンジンは 20(S)-protopanaxatriol 系サポニンの G-Re が存在したという点でミャンマー産ニンジンと異なる。

ミャンマー産ニンジンとブータン産 A に共通して見られる特徴、20(S)-protopanaxatriol 系サポニンの G-Re が存在せず、G-Rg1 のみが存在するというパターンは、文献<sup>5)</sup>を当たるとその他のニンジンでは Himalayan Ginseng の結果と一致した。

ミャンマー産ニンジンに存在するサポニンの種類は、他のチクセツニンジンに比べて遜色なくサツマニンジン、湖北産チクセツニンジン、秋田産チクセツニンジンよりも多いので、薬用植物としての有用性は高いと推定できる。しかしながら、今回は量的に極少量で定性のみなので、定量を行いサポニンの含有量が決定できればより確かな報告になるだろう。

引用文献：

- 1) 第14改正日本薬局方
- 2) カラーグラフィック薬用植物、  
滝戸 道夫・指田 豊 編、廣川書店
- 3) T.Morita, R.Kasai, H.Kohda, O. Tanaka, J.Zhou, T. Yang, *Chem. Pharm. Bull.*,31, 3205 (1983)
- 4) H. Yamaguchi, R. Kasai, H. Matsuura, O. Tanaka and T. Fuwa, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 3468 (1988)
- 5) Nguyen Minh Duc, "Chemical study on the saponin composition of Vietramese Ginseng, *Panax vietramensis* HA et Grushv."(1994)

遺伝子解析による植物と生薬の種鑑別に関する研究

分担研究者 水上 元 名古屋市立大学大学院薬学研究科

外部形態からは同定が困難なマオウ属植物について遺伝子鑑別法の開発を進め、chlB 遺伝子の 5'-側約 500 塩基の配列を比較することにより、マオウ属植物の種鑑別と生薬「麻黄」の基原同定が可能であることを示した。一方、rbcL 遺伝子による比較では一部に異なる結果が認められたので、生薬についても ChlB 遺伝子の全領域の遺伝子配列を解読し、*E. sinica*, *E. intermedia* に加えて *E. equisetina* の鑑定も可能となった。

A. 研究目的

遺伝子組換え植物の環境中に対する影響を検討する上では、環境中に生育する種々の植物および植物由来産物（食品、生薬など）の種同定・鑑別を正確かつ迅速に行うことが必須である。

我々は、このような観点から、マオウ属植物ならびにそれらを基原とする生薬「麻黄」の遺伝子鑑別法の開発を目的として研究を実施した。

本年度の研究に着手する以前に実施した研究によって、次の成果を得ていた。

(1) 微量（約 10mg）の生薬標本から PCR の鋳型となりえる DNA を迅速に調製する方法を確立した。

(2) 国内各地の薬用植物園に植栽されているマオウ属植物について、葉緑体ゲノム上に存在する chlB 遺伝子（約 1500 塩基）の全塩基配列を決定した。

(3) その結果、chlB 遺伝子の塩基情

報に基づくマオウ属植物の種鑑別は基本的に可能であるが、国内の薬草園に維持されている植物では種名の混乱が見られるために、塩基配列のタイプと種名との間の正確な対応が困難であった。そこで、植物形態学的・生薬解剖学的な同定が行われた生薬標本を用いて、chlB 遺伝子の 5'-側約 500 塩基の配列を比較することにより、マオウ属植物の種鑑別と生薬「麻黄」の基原同定が可能であることを示した。

しかしながら、生薬については chl 遺伝子の一部（5'-側約 500 塩基）しか解読していないため、別の領域を解読すると異なった結果が得られる可能性が存在した。そこで、本研究においては、これまでの成果を踏まえ、

(1) 生薬についても ChlB 遺伝子の全領域の遺伝子配列を解読して、これまでの結果を確認する。(2) その

結果に基づいて、遺伝子塩基配列の違いを間接的に検出する簡便な種鑑別法を確立する。の 2 点を目的として研究を実施した。

## B. 研究方法

### DNA の調製

新鮮な植物地上茎は液体窒素中で凍結破砕したもの約 1g から、乾燥した試料や生薬は粉末約 40mg から、Quiagen の DNeasy Plant Mini キットを用いて DNA を調製した。

### PCR による ch1B 遺伝子の増幅

図 1 に示した ch1B 遺伝子の 4 つの領域を増幅するために、次のプライマーセットを用いた。

#### Region 1

FW-1F=5'-

GTTTTCCCAGTCACGACAATGAAATTAGCTTATTGG

ATG-3'

SP-1R=5'-

ATTTAGGTGACACTATAGAATACCCGATGATATTTA

CAGAAGG-3'

#### Region 2

FW-2F=5'-

GTTTTCCCAGTCACGACATTCAAGCAGCAGATAGGA

C-3'

SP-2R=5'-

ATTTAGGTGACACTATAGAATACTGAAAACCAAACA

GCTTGGG-3'

#### Region 3

FW-3F=5'-

GTTTTCCCAGTCACGACTCGGTGAATCCTTTTGCTT

C-3'

SP-3R=5'-

ATTTAGGTGACACTATAGAATACTCGTACCCCATAA

AAGGACG-3'

#### Region 4

FW-4F=5'-

GTTTTCCCAGTCACGACACTGTTGTTTTTGGTGATG

C-3'

FW-4R=5'-

ATTTAGGTGACACTATAGAATACTTGTAATCTTAAC

TACACCC-3'

それぞれのプライマーの下線部は、プライマーラベル法を用いてシークエンスするために、蛍光標識のシークエンスプライマーのプライミングサイトとして付加したものである。PCR は、25  $\mu$ l 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-30 秒の反応を 30 サイクル繰り返した。反応産物は、2%アガロースゲル電気泳動によって確認した。

#### PCR 産物のシーケンス

PCR 反応液 5 $\mu$ L に ExoSAP-IT (Amersham Bioscience) 2mL を加え、37°C で 15 分間、80°C で 15 分間インキュベートした。この溶液に蛍光標識シーケンスプライマーを加え、ThermoSequenase Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience) 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、塩

基配列を解読した。なお、シーケンスは両鎖について解読した。

#### PCR-RFLP 分析

PCR 反応液 5 $\mu$ l に *Bcl* I 1 $\mu$ l (10 units) または *Xba* I 1 $\mu$ l (10units) および 10X 反応バッファー 1 $\mu$ l を加え、全量を 10 $\mu$ l とした。37°C で 60 分間インキュベートした後、切断の有無を 2%アガロースゲル電気泳動によって確認した。

### C. 研究結果

#### (1) PCR による chlB 遺伝子の増幅

乾燥した植物試料や生薬から調製した DNA では、乾燥過程で DNA の断片化が生じているために一度の PCR で chlB 遺伝子の全領域を増幅することは困難であった。そこで、chlB の領域を一部が重複した約 500bp の 4 つの領域に分けて PCR を行ったところ、生薬由来の DNA からそれぞれの領域に対応した増幅産物を得ることができた (図 1)。

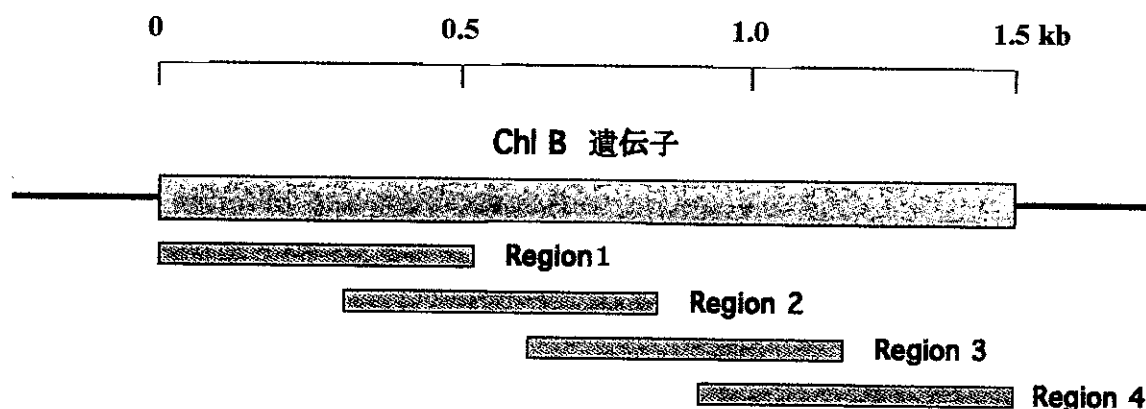


図 1 chlB 遺伝子のシーケンス戦略

## (2) 塩基配列の解読

そこで、茎の断面形、髓の有無、皮層部の維管束の有無と数、表皮のクチクラ層の厚さなどを指標にして、その内部構造から *Ephedra sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina*, *E. przewarskii* と推定できる生薬標本をそれぞれ 13, 15, 5, 4 検体選び、各検体から DNA を調製した。*E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* は日本薬局方において生薬「麻黄」の基原植物として規定され、中

国ではこれらに加えて *E. przewarskii* も麻黄として用いられている。これらの DNA を鋳型にして図 1 に示した chlB 遺伝子の 4 つの領域を別々に増幅してその塩基配列を決定した。さらに、各領域の塩基配列を重ね合わせることにより合計 検体の生薬標本について chlB の全塩基配列を決定した。

その結果、これらの標本の chlB 遺伝子塩基配列は次の 4 つのタイプに分類できた (表 1)。

表 1 生薬麻黄の chlB 遺伝子の配列タイプとシーケンス結果

gene type	position of differences									
	78	142	267	486	948	1047	1119	1315	1389	1437
<b>S</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
<b>I-P</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
<b>E I</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>
<b>E II</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>

*E. sinica* を基原とすると考えられる 13 標本については、すべてが type S の配列を有していた。また、*E. intermedia* を基原とする 15 標本と *E. przewarskii* を基原とする 4 標本はいずれも type IP の配列を示した。これに対して、*E.*

*equisetina* を基原とする 5 標本のうち、旧ソ連や新疆地方など中国周辺由来の標本 4 検体は、type EI を、中国国内産の 1 標本は type EII の配列を示した (表 2、表 3)。

表2 *Ephedra* 属植物の chlB 遺伝子塩基配列のタイプと種名との対応

CHI B 配列タイプ	「麻黄」基原種	生薬名
Type S	<i>Ephedra sinica</i>	草麻黄
Type IP	<i>Ephedra intermedia</i> <i>Ephedra przewalskii</i>	中麻黄
Type EI	<i>Ephedra equisetina</i>	木賊麻黄
Type EII	<i>Ephedra equisetina</i>	木賊麻黄

表3 *E. equisetina* を基原とする標本の chlB 配列タイプ

標本番号	産地	ChIB 配列タイプ
1	新疆	Type EI
38	旧ソ連	Type EI
39	旧ソ連	Type EI
40	陝西	Type EII
41	旧ソ連	Type EI

(5) PCR-RFLP による *E. sinica* の簡便な同定

1) *Ephedra sinica* の鑑別

Type S (*E. sinica*) の 263~268 nt 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、その他の type ではこの位置の配列が

TGATTA に置換されているために、*Bcl* I によっては切断されない。そこで、このサイトを含む Region 1 を増幅し、その増幅産物を *Bcl* I で制限酵素処理を行ってから電気泳動によって切断を確認することにより、簡便に *E. sinica* を鑑別できることが明らかになった。

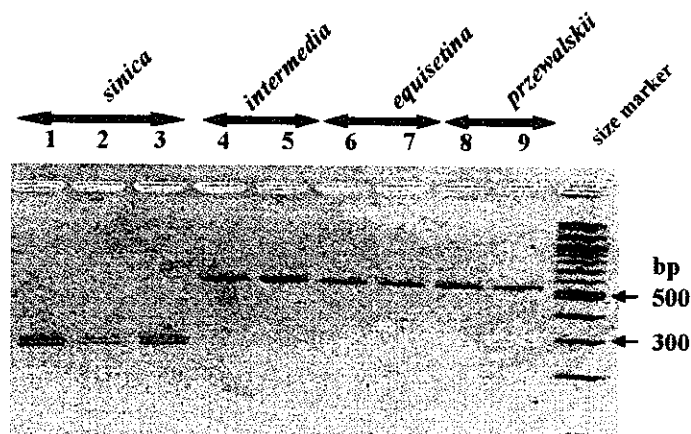


図2 PCR-RFLP による *E. sinica* の鑑別

## 2) *Ephedra equisetina* の鑑別

Type EI と type EII (いずれも *E. equisetina*) の 1214~1219nt の配列 (TCTAGA) は制限酵素 *Xba* I によって認識され、切断されるのに対して、その他の type ではこの位置の配列が TTTAGA に置換されているために、*Xba* I では切断

されない。そこで、このサイトを含む Region 4 を増幅し、その増幅産物を *Xba* I で制限酵素処理を行ってから電気泳動によって切断を確認することにより、簡便に *E. equisetina* を鑑別できることが明らかになった。

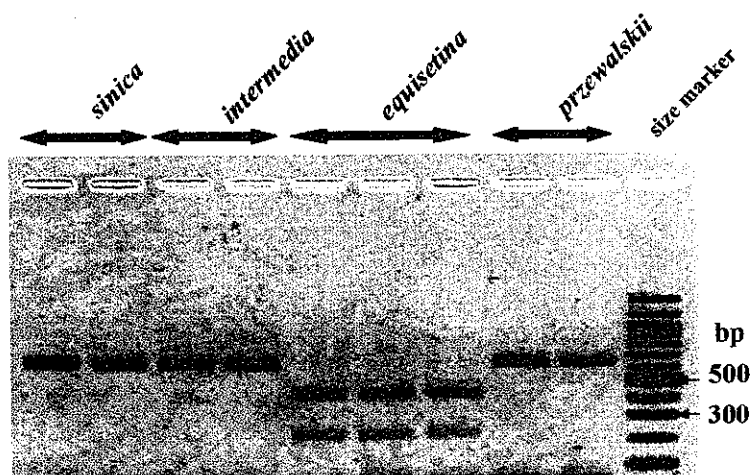


図 3.

## C. 考察および結論

形態学的・生薬学的に同定された麻黄の生薬および押し葉標本を用いて、*chlB* 遺伝子の全塩基配列を決定することにより、マオウの基原種と塩基配列タイプの対応を明らかにした。

*E. sinica* の配列は他の 3 種の配列と明確に異なり、塩基配列のタイプから容易に同定することが可能であった。*E. equisetina* の配列には 2 つの type が存在していた。これらの 2 つの type は基原植物の産地と良く対応しており、*E. equisetina* には地理的分布の異なる少なくとも 2 つの系統が存在していることが推定される。*E. equisetina* の 2 つの配列タイプはいずれも他の 3 種とは明確に異なっており、*E. sinica* と同様に *chlB*

遺伝子の塩基配列から容易に同定可能である。

これに対して、*E. intermedia* と *E. przewalskii* の配列は全く同一であり、これらの 2 種を *chlB* 塩基配列によって相互に区別することは出来ない。この 2 種の形態学的鑑別は比較的容易であるが、遺伝子鑑別のためには他の遺伝子領域について検討することが必要である。

*chlB* 遺伝子塩基配列の情報に基づいて、*E. sinica* と *E. equisetina* を PCR-RFLP 法を用いて簡便に鑑別できることを示した。

本研究によって得られた成果は、麻黄の遺伝子鑑別を実現するための基礎資料を提供するものである。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

中国の薬用植物の導入と栽培法の研究

分担研究者 御影 雅幸 金沢大学薬学部教授

漢方生薬「黄連」と「麻黄」の中国産原植物の我国への導入を目的に種々検討した。「黄連」については効率良い根茎からのクローン増殖方法ならびに少量試料でのアルカロイドの定量方法を検討した。その結果、オウレン根茎からのクローン増殖には根を5mm以下に切った根茎を5~10mmに切断し、春期に植え付けると発芽活着率が良いことが明らかになった。また、色彩計を利用して100mg程度の試料量でベルベリン型アルカロイドの定量が可能であった。「麻黄」については種子の発芽時の耐塩性ならびに栽培に悪影響を及ぼす雑草を検討した。その結果、シナマオウの種子は発芽時には海岸に生えるハマダイコンと同程度の耐塩性があることが明らかになった。また、悪影響を及ぼす雑草として、アカザ科、キク科、イネ科植物などが多く、とくにキク科のハチジョウナとイネ科のカリヤス属植物が除草困難な有害植物であることが明らかになった。

A. 研究目的

報告者はこれまで漢方生薬「黄連」と「麻黄」の中国産の原植物の我国への導入を検討してきた。

中国産「黄連」はキンポウゲ科の *Coptis chinensis* の根茎に由来し、その有効成分であるベルベリンは日本に野生する同属植物の *Coptis japonica* よりも高く、品質的に優れていることが報告されている。これまでわが国では国産の栽培品を用いてきたが、日中国交回復後は安価で品質的に優れた中国産栽培黄連が使用されるようになり、わが国における栽培は廃れた。そこで、研究者は中国産黄連の導入を目指し、これまで根茎によるクローン増殖法を検討してきた。本年度はさ

らに効率良い増殖法を検討するとともに、優良株を選択するために少量の根茎でベルベリン含量を定量する方法を検討した。

一方の「麻黄」は、著名な「葛根湯」や「麻黄湯」に配合される重要漢方生薬である。原植物としてマオウ科の *Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer, *E. equisetina* Bunge の3種が日本薬局方で規定されているが、これらの植物はわが国には自生せず、全量を輸入に頼っている。マオウ属植物は漢方生薬としてのみならず、現代医学における喘息治療薬エフェドリンを含有する植物として知られ、エフェドリンはまた覚せい剤の前駆物質でもあるため、世界中での需要をまかなうために多量に採集

され、中国では最近の 10 数年で資源が激減し、政府の指導で栽培も行われるようになった。また、マオウは乾燥地帯に適応し、固砂作用があるため砂漠化防止に寄与しているとされ、資源保護とともに沙漠の拡大防止のために、中国は 1999 年 1 月から、生薬「麻黄」の輸出禁止政策を打ち出し、わが国では麻黄確保の早急な対策が必要となっている。研究者は 2001 年から中国でマオウ属植物を学際的に調査し、導入研究をも行ってきた。本年度は主として栽培時の問題点を検討し、また発芽時の耐塩性を検討した。

## B. 研究方法

黄連については、石川県金沢市内で新たに 4 月と 10 月に採集した株を用いて、生の根茎の残存する根を長さ 5 mm 以下に切り、一部をベルベリン定量用に乾燥し、残りを 5～10mm に切断し、赤玉土に深さ約 5 mm に植え付け、植え付け時期の違いによる発芽率を調査した。ベルベリン定量方法の改善については、ベルベリンの黄色を利用して色彩計を用いる方法を検討した。

麻黄については、2003 年 7 月下旬～8 月上旬にかけて、内蒙古自治区の主として赤峰～通遼において栽培地と自生地を調査し、標本採集とともに多量の種子を採取した。さらに、9 月上旬に寧夏自治区において栽培地を調査し、畑に生育する雑草を調査した。現地では、北京大学薬学院、中国科学院植物研究所などの協力を得た。帰国後、種子を用いて発芽時における耐塩性を検討し、また麻黄栽培地で採集した雑草の種類を明らかにした。耐塩性についてはハウレンソウ、ハツカダイコン、ハマヨモギ、レンゲソウ、セイヨウタンポポなどと比較した。

## C. 研究結果

### 1. 黄連に関する結果：

(1) 従来は根茎の収穫時期である秋期に根茎を植え付けることを検討してきたが、今回の研究により、秋期よりも春期に植え付けた方が出芽率が優れていることが明らかになった。

(2) 発芽後の生長は、野生株の中でも葉面積が大きな株ほど速いことが明らかになった。

(3) ベルベリンの定量に関しては、色彩計を利用することにより HPLC 法に比してより簡便かつ少量 (100mg) で定量出来ることが明らかになった。また、HPLC 法においてもアルカロイドの抽出をメタノールではなく酢酸水で抽出することにより、有機溶剤を使用することなく環境に負担なく定量できることを明らかにした。

### 2. 麻黄に関する結果：

(1) 発芽時の耐塩性については、ハマヨモギよりも強く、ハマダイコンと同程度であることが明らかになった。

(2) マオウ栽培地で採集した雑草は、植物分類学的に 16 科 49 属 63 分類群に同定された。主要な雑草はアカザ科、キク科、イネ科およびマメ科の 4 科に属する植物であった (写真)。

(3) マオウ栽培に際して問題となる雑草は、引き抜いて絶やすことが困難なキク科のハチジョウナやノガリヤス属植物 (写真) のような根茎を引いて繁殖するイネ科植物であることが明らかになった。一方、ヨモギ属やアカザ科植物は容易に引き抜くことができる。

(4) 栽培地の管理が悪く、除草を怠って雑草が大きくなると、マオウを覆って

日照を妨げ、水分を含む栄養を奪い、風通しを悪くする等して、マオウの生長を妨害することが明らかになった。

#### D. 考察

(1) 黄連の導入については、優良株の選択と効率良いクローン増殖の検討が必要である。中国産黄連の原植物はすでにわが国に導入され、各地の薬用植物園で見本として栽培保存されている。これらの根茎の少量を用いて、ベルベリン含量を今回開発した色彩計を用いる方法で定量し、品質的な優良株を見だし、春期に小さく切った根茎を植え付けることによりクローン増殖が可能である。今後は、増殖させた中国産オウレンを日本固有種のオウレンと同一条件下で生育させ、生長度合いやアルカロイド含量を検討する必要がある。

(2) 中国における麻黄栽培においては、灌水と雑草対策がもっとも重要であることが明らかになった。しかし、多雨なわが国での栽培では灌水には問題がなく、却って雑草対策が中国における栽培以上に問題となることが予想される。本研究である程度の耐塩性があることが明らかになったことから、今後、雑草が少ない海岸砂地での栽培を試みるなど検討する必要がある。

(3) 雑草によってマオウが受ける影響は、日照、水分や養分の競合、風通しなどが考えられる。日照阻害についてはマオウよりも背が高くなる植物が有害であるが、アカザ科植物やキク科ヨモギ属植物など、人的に引き抜きやすい植物は比較的管理が容易である。一方、根茎を引いて繁殖する植物は引き抜いても根茎が残って繁殖するため完全な除草が困難で、解決が望まれる。また、小型のイネ科植

物で、叢生するマオウの株中に生えるものは除草困難であるとともに、収穫した生薬に異物として混入する併害もある。

(4) 雑草駆除には除草剤を用いることが考えられるが、残留農薬などの新たな問題を引き起こすおそれがあり、また対象となる雑草種が多く、現実的ではない。現時点で最も効果的な対策は人手による除草であろう。また、アカザ科植物など個体数が多いものについては、結実するまでに除草し、新たなる種子を散布させないことも重要であろう。今後、マオウ栽培に対する被害を防ぐための効果的な対策を植物の生活型と関係させて研究する必要がある。

(5) 現在一般に栽培されている *E. sinica* と *E. intermedia* の背丈は 60 センチ以下であった。一方、*E. likiangensis* をはじめとする植物種では基部が木質化してより大型に育つ。こうした種を栽培することにより、雑草被害を少なく出来る可能性がある。とくに *E. likiangensis* はエフェドリン含量も高く、栽培種として有望である。なお、同様に木質化する *E. equisetina* は畑地ではうまく生育しないとされる。

#### F. 発表論文

○ Masayuki MIKAGE, Akira TAKAHASHI, Hu-Biao CHEN and Quan-Song LI, Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 1. On the resources of *Ephedra* plants in China  
*Natural Medicines*, 57(5), 202-208 (2003).

○ Masayuki Mikage, Naoko Kondo, Michiyo Yoshimitsu, Ikumi Nakajima and Shao-qing Cai, Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 2. On the Current situation of the Cultivation of

*Ephedra Plants in China, Natural Medicines*, 58, (2004) 投稿中.

#### その他の発表

○日本生薬学会第50年会(2003年9月, 東京)で次の2報を発表。中国産マオウ属植物の研究(4), 核内DNAの解析; 中国産マオウ属植物の研究(5), 1栽培地における草質茎のアルカロイド含量と形態の変異。

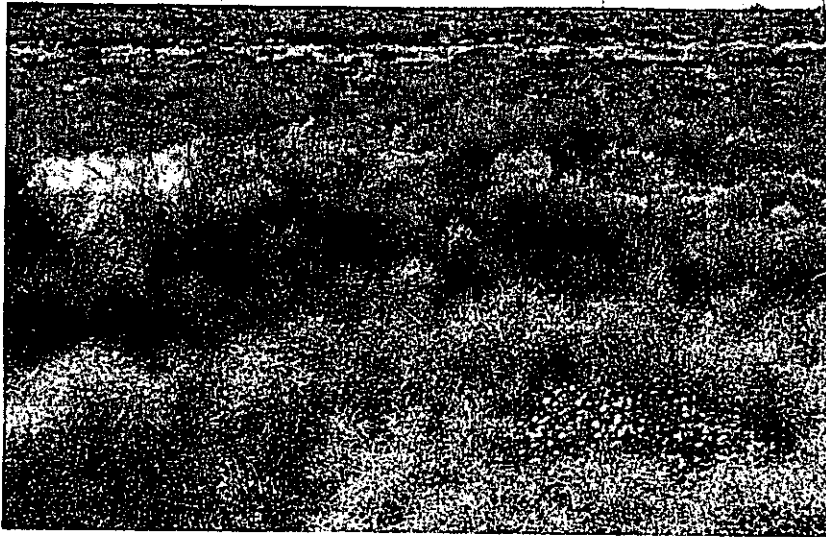
○日本薬学会第124年会(2004年4月, 大阪)で次の6報を発表する。中国産マオウ属植物の研究(6), 栽培状況について; 中国産マオウ属植物の研究(7),

麻黄栽培地の雑草について; 中国産マオウ属植物の研究(8), 種子発芽時の耐塩性; 中国産マオウ属植物の研究(9), 四川省産「麻黄」の原植物; 中国産マオウ属植物の研究(10), 核及び葉緑体 non-coding DNA の解析; 中国産マオウ属植物の研究(11), 漢薬「麻黄」の古来の原植物に関する考証研究。

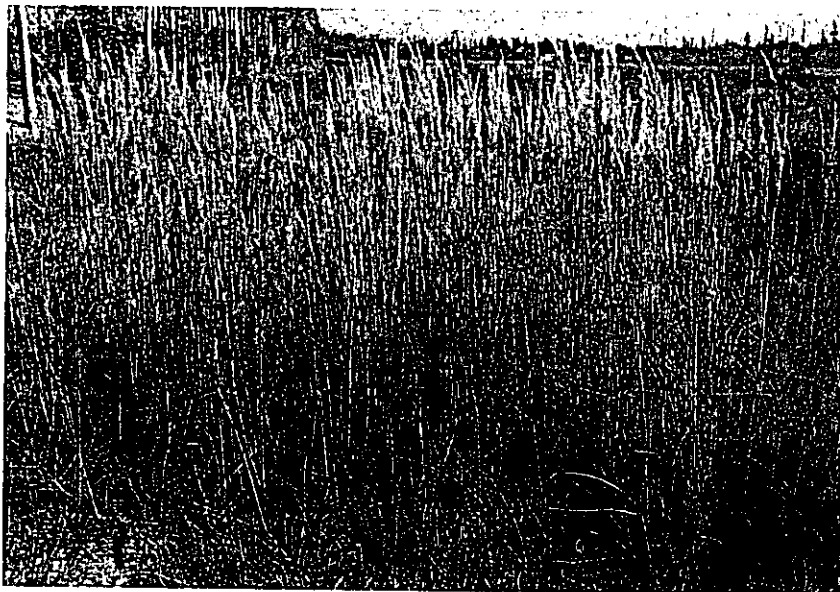
○薬用植物フォーラム 2003(2003年7月18日, つくば市)にて講演(中国の麻黄資源と栽培問題)。

○日本東洋医学会・ランチョンセミナー(2003年5月18日, 福岡市)にて講演(麻黄の資源と栽培問題)。





雑草に覆われる管理の悪いマオウ栽培畑（寧夏自治区）



ノガリヤス属植物に覆われた栽培マオウ（寧夏自治区）

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

薬用生物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に関する総合的研究  
ブラジルの薬用植物の導入と栽培法の研究

分担研究者 高野昭人 昭和薬科大学 講師

ブラジル産薬用植物の導入と試験栽培を実施し、各植物の特性データの収集を行った。これまでに19科23属29種のブラジル産薬用植物を導入し、栽培と観察を継続している。これらの植物の中で、*Carapa guianensis* アンジローバと *Zizyphus joazeiro* ジュアが特に順調な生育を示し、後者は今年開花した。また、*Euterpe oleracea* アサイヤシは基部より新たに2本の幹を生じ、株分けによる栄養繁殖ができる可能性を示した。一方、生育が遅い植物も多くみられ、その主な原因は温室内の地温が低いためと考えられた。なお、昨年導入した *Hevea brasiliensis* パラゴムノキと *Quassia amara* アメリカニガキの2種は枯死した。以上、これまでの栽培試験の結果、各植物が要求する栽培条件や各植物の栽培環境への適応力に違いが明らかになってきた。これらの貴重な植物資源を保存していくには、各植物に適切な栽培条件を解明するとともに、危険分散のために、さまざまな栽培環境を有する数カ所に分譲して遺伝資源の保存にあたる必要がある。

A. 研究目的

薬用生物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に関する総合的研究の一環として、ブラジルの薬用植物の導入と栽培法の研究を行っている。

アマゾン地域には約5,000種の薬用植物が、また、ブラジル全体ではさらに多くの薬用植物が存在するものと推定され

る。しかし、近年の熱帯林の急激な減少など、地球環境の破壊による自然の崩壊に伴い、天然の貴重な優良薬物資源の消失が危惧されている。そこで、緊急な課題として、資源の調査と導入および栽培法の検討を行ってきた。

B. 研究方法

## 1. 植物の導入方法

次の方法により、種子または苗の形で植物を導入した。

- (1) 現地研究者からの種子の提供
- (2) 他の園からの苗の譲受
- (3) 種苗業者からの購入

## 2. 栽培と観察

種子を入手した植物は、直ちに播種し、鉢植えとして観察するとともに、個体数の多い種については、後に一部を温室内に地植えとし、生長を観察した。また、苗を入手した植物は、鉢植えとし、後日、一部を地植えにし、生長を観察した。

## C. 研究結果

### 1. 検討したブラジル産薬用植物と必要とする栽培条件

これまでに 19 科 23 属 29 種の植物を導入し、栽培試験を実施した。それらの名称と導入形態、および必要とする栽培条件を表 1 に示す。

### 2. 検討した主な薬用植物の特性・用途と栽培の経過

#### (1) *Euterpe oleracea* アサイヤシ

ブラジル・アマゾン地方には、ヤシの仲間が多くみられ、貴重な有用経済植物として利用されている。中でも、アサイヤシはアマゾン地域で最も重要なヤシで、食用、染色用、薬用など様々な用途に利用される。食用としては、果実をすりつ

ぶしたジュースに砂糖を入れて食べ、染色用には、この赤紫色のジュースの色素が使われる。薬用としては、種子と根を用い、赤い若い根には、浄血作用があり、肝臓病、黄疸、リウマチなどに用いられ易であるが、株分けによる栄養繁殖（クローン増殖）もできる可能性を示した。

#### (2) *Carapa guianensis* アンジローバ

アンジローバ (*Andiroba*) はアマゾン地方原産のセンダン科植物で、樹皮は苦味が強く、収斂作用を有し、下痢止め、駆虫、解熱薬などとして用いられる。そのダニにつかれると少なくとも 1 週間は痒みから開放されない。このダニ除けとして紹介されたのがアンジローバの種子油で、オイルそのもの、またこのオイル入りの石鹸などの形で利用される。導入した植物中で、最も順調な成長を示し、地植え個体は高さ約 5 m、胸高直径は 51.3 mm 剤あるいは煎剤の形で用いる。また、外用として、チンキを潰瘍や頭髪のローションとして用いる。

順調に生育し、高さは 4 m を超え、胸高直径は 31.3 mm に達した。また、本年夏に初めてナツメとよく似た花をつけたが、結実にはいたらなかった。

#### (4) *Tabebuia* 属植物

この仲間はブラジル国花で、*Tabebuia* 属植物の樹皮の粉末はタヒボの名称で制癌剤としても知られている。*T. impetiginosa* イペー・ホッショの樹皮の煎剤は、糖尿病、胃腸潰瘍、梅毒性潰瘍などに用いら

れる。また、口内炎やのどの腫れにうがい薬として、皮膚病には浴剤として用いる。葉も同様に用いる。さらに、花の煎剤は咳止めに用いられる。

地植えした2種のうち、*T. chrysotricha* イペー・アマレーロは相変わらず成長が遅く、高さはまだ約85cmである。一方、*T. impetiginosa* はやや成長が良く、高さ3m弱、胸高直径24.7mmに達した。

#### (5) *Pilocarpus microphyllus*

ミカン科の *Pilocarpus* 属植物は熱帯アメリカに22種が分布する。*P. jaborandi* ヤボランジや *P. microphyllus* はブラジル特産の植物で、葉に薬効成分ピロカルピンを含有する。同じ属の植物でもピロカルピンを全く含まない種があり、また同一種であっても含有量の個体変異が大きいといわれ、ブラジル・パラ州ベレン市の研究所では、いろいろ個体を収集して栽培し、ピロカルピン含量の高いものを選抜栽培する研究が行われている。

これらの小葉を乾燥したものをヤボランジ葉と呼び薬用とする。唾液の分泌促進作用があり、気管支炎、気管支カタル、喘息、肋膜炎、肺炎、ジフテリア、急性肝臓炎、足のむくみ、尿毒症、糖尿病、などに用い、また外用して頭髮の強壮にも用いる。

導入して栽培した結果、鉢では極めて成長が遅く、枯死する個体もみられた。そこで、昨年4月に1株を温室内に地植えしたところ、成長はいまだに遅いが個

体自体は元気になった。

#### (6) *Cephaelis ipecacuanha* トコン

アカネ科の植物で根を薬用とする。塩酸エメチンの製造原料。アマゾン地域では昔からインディオがアメーバ赤痢の治療に用いていたが、ヨーロッパには赤痢や下痢の特効薬として広まった。現在では去痰薬や催吐剤として使われる。

原産地では昼なお暗い林下に自生する植物で、高温多湿、かつ、遮光条件下での栽培が必要と考えられた。そこで、温室内のやや暗い位置に地植えしてみたが、やはり元気がない。かえって、大きめの平鉢に植えた個体の方が元気である。

#### D. 考察

1. *Carapa guianensis* アンジローバと *Zizyphus joazeiro* ジュアは、温室内（あるいは暖地）であれば、栽培は比較的容易であると考えられる。ジュアは開花が確認され、今後は、屋外での栽培試験を実施し、その適応性をさらに検討する予定である。

2. *Euterpe oleracea* アサイヤシは、株立ちの特性を示し、株分けによる栄養繁殖ができる可能性が示された。今後は、本学の温室の環境条件で開花・結実までに要する期間を確認する予定である。

3. *Pilocarpus microphyllus* は、ベレン市の研究所の屋外で開花・結実しており、成長を促進させるためには、より高温の栽培条件が必要であると考えられた。