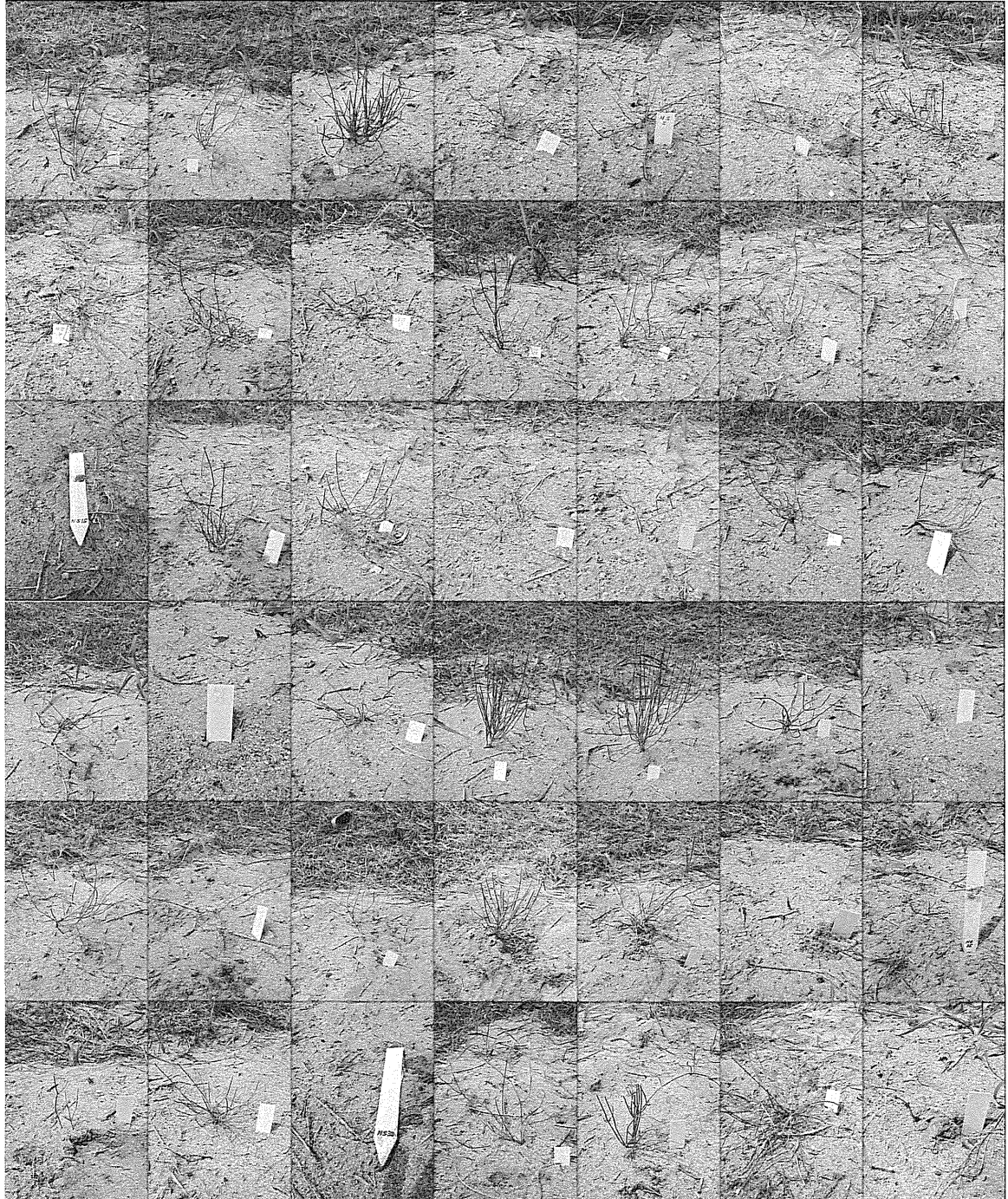


NS001 - NS042



NS001 - NS042

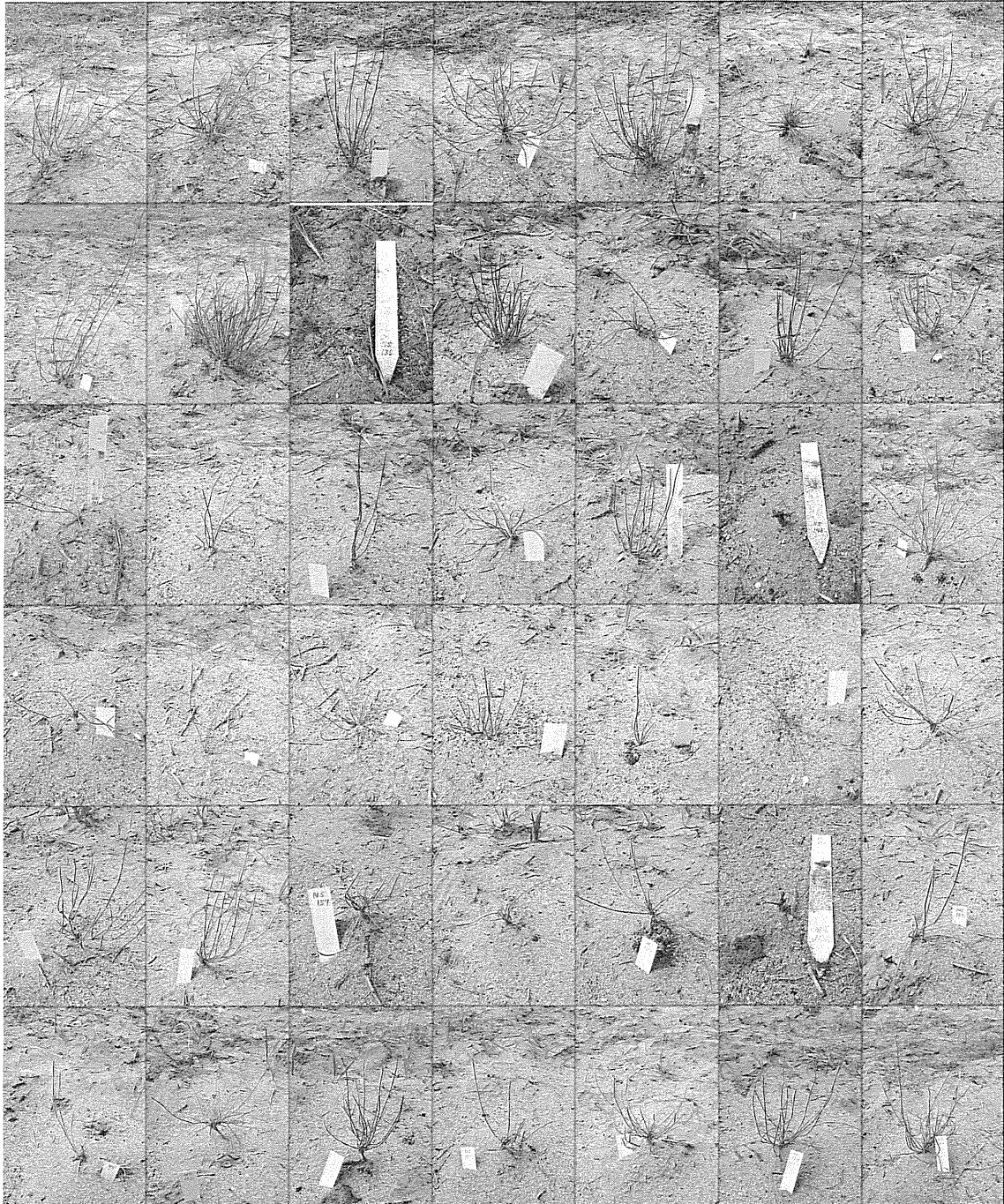
NS043 - NS084



NS043 - NS084

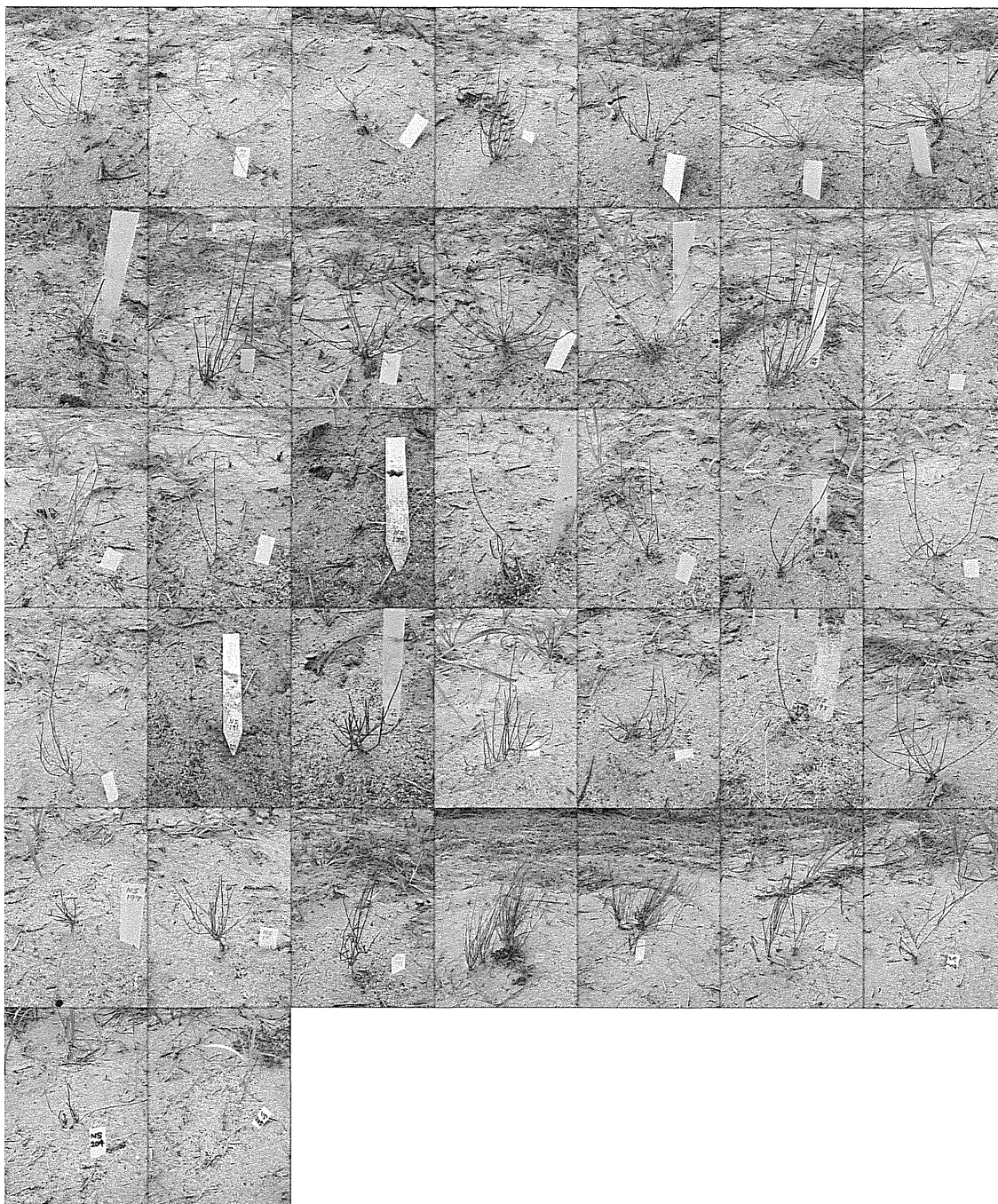
– 79 –

NS127 – NS168



NS127 – NS168

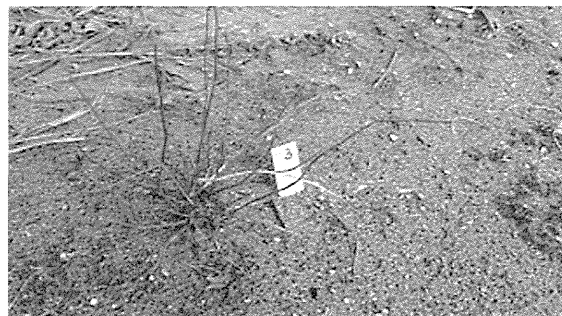
NS169 – NS205



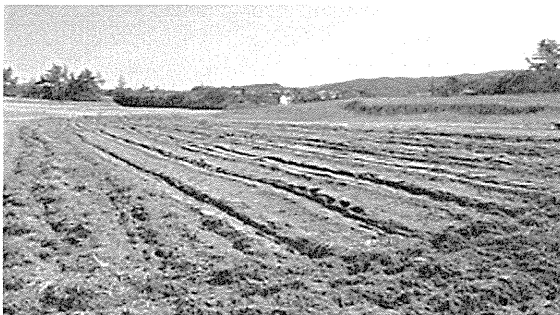
NS168 – NS205

志賀町里本江 栽培圃場 定点観察

2013. 10. 21



2013. 10. 28



2013. 11. 5



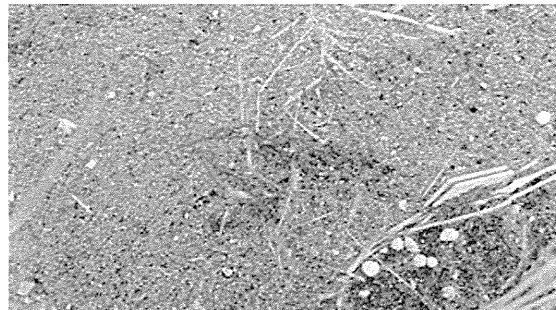
2013. 11. 13



2013. 11. 18



2013. 11. 26



2013. 12. 3



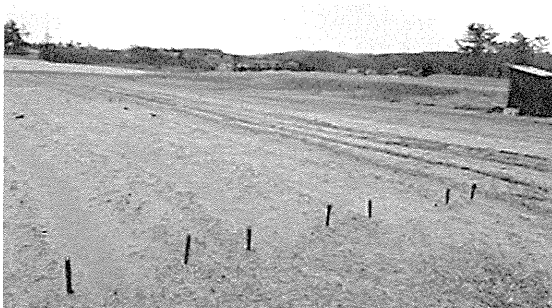
2013. 12. 10



2013. 12. 23



2013. 12. 31



2014. 1. 14



2014. 1. 20



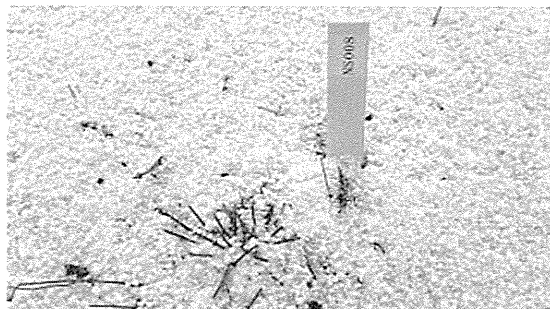
2014. 1. 27



2014. 2. 2



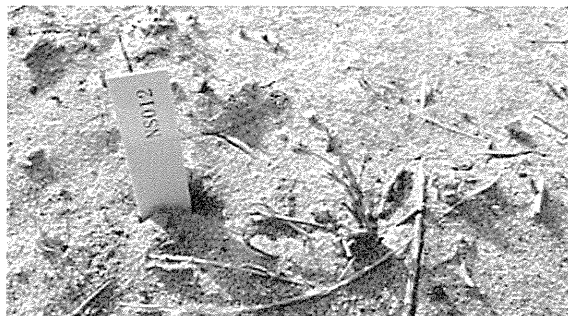
2014. 2. 10



2014. 2. 18



2014. 2. 24



2014. 3. 3



平成25年度厚生労働省科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）

研究課題名：能登半島における国産麻黄生産拠点の構築

分担研究報告書

分担研究課題：麻黄の含有成分に関する化学的・生物学的検討及び栽培地保護対策

研究分担者 関田節子 昭和薬科大学 特任教授

研究要旨 生薬供給を100%中国に依存している「マオウ」は、資源枯渇の危機にあり、国内生産が望まれている。しかし、これまでは教育用あるいは観賞用としての植栽の経験のみであり、大規模栽培の経験はない。そこで、能登半島における国産麻黄生産拠点の構築に取り組んでいる。同時に、人工的な栽培の可能性を探るとともに収穫品の品質の確保に関わる研究及び栽培地の安全管理に関する検討を開始した。

研究協力者 高野昭人 昭和薬科大学薬学部 教授
中根孝久 昭和薬科大学薬学部 准教授
國本 崇 徳島文理大学理工学部 教授
代田 修 徳島文理大学香川薬学部 教授
黒柳正典 静岡県立大学薬学部 客員教授

A. 研究目的

生物資源の枯渇に関する警告が出されてから久しく、ワシントン条約、ラムサール条約に続いて1992年に生物多様性条約が提唱され1993年に発効された。遺伝資源の利用や移動に関しては、Access and Benefit-Sharing 原則に基づくボン・ガイドラインが示され、日本では2016年の制定を目指して国内法の整備が進められている。これまでは商業的な取り扱いに関して討議されていたが、2016年の制定には研究・学術的な利用にも適用される。

この間にも生物資源は加速的に減少している現実を鑑み、伝統薬の継承の危機を予測したWHOは、2013年に富山県で各国のWHO専門家を招集し「WHO conservation of medicinal plants」会議を開催し、ガイドライン作成を採択した。

国内医療の一部をなす漢方医療において、漢方薬原料である生薬は遺伝資源そのもので、現時点で使用する原料生薬の約85%を海外に依存している。特に、葛根湯、麻黄湯の構成生薬である「麻黄」は、年間に569トンを入力しているが、産出国である中国により1999年に輸出規制されている。近年では、中国の経済的発展に伴い、中国国内での需要が高まり価格が高騰し、資源量確保は急務である。

マオウ属 (*Ephedra* sp.) はマオウ科 (Ephedraceae) 唯一の属であり、ユーラシア大陸に約40種、アフリカに11種、アメリカ大陸南部に約30種分布している。第16改正日本薬局方で基原植物として規定しているマオウは、*Ephedra sinica* Stapf、*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Meyer 又は *Ephedra equisetina*

Bunge (*Ephedraceae*) の地上茎であり、乾燥したものに総アルカロイド〔エフェドリン ($C_{10}H_{15}NO$: 165.23) 及びプソイドエフェドリン ($C_{10}H_{15}NO$: 165.23)〕を 0.7% 以上を含むものとされている。そこで、主任研究者の御影は、大規模栽培地として能登半島を選択し、*Ephedra sinica*の試験栽培を開始し、順調な生育を経て10月に収穫を行った。

一方、我々は、栽培地の更なる拡大を想定して、以前に実施したネパール産マオウの栽培実験の結果を参考に、関東地方に於ける栽培条件及び発芽に關与する条件の検討を行うとともに、人工光源を用いた栽培を計画し、光合成を制御することで生合成に与える影響を検討した。

植物の二次代謝にもとづく生産物である生薬は、成長や有用成分量が環境に強く依存するため安定に供給することが一般に難しい。これらを打破する技術として植物工場などによる人工栽培が期待されている。人工栽培のキーは照明である。従来植物工場に使われた蛍光灯は、効率が高い拡散光源であるため大面積照明には好適であるが、植物成長（光合成の明期／暗期）に適したパルス発光ができない欠点を持つ。近年のLED光源の登場に伴い、連続点灯／パルス点灯を含め、植物工場による薬物／小型根菜の生産研究が活発化したが、LEDは本質的に近接型小照射面積という弱点を持つため、近接照射に伴う過剰な投入パワーと大量の熱放射による対象物の焼け／乾燥などの問題がある。光合成／形態形成を支配する光応答、二次代謝を支配する光を含む環境応答を明確にし、成長／二次代謝促進を制御することが本研究の目的である。これらを実現するため、(a) 紫外～近赤外でスペクトル可変、(b) パルス幅と繰り返し周期可変、(c) 高輝度拡散光、という蛍光灯／LEDの長所を兼ね備え、大面積／フレキシブル／近接照射可能という付加価値を持つ新光源：プラズマチューブアレイ (PTA) を活用する。

前述したように、植物は環境因子による影響を受け易く、成長度、形態、体内成分の変動をもたらすことがある。これまで中国北部の野生状態にあったマオウ

は乾燥した砂漠地帯に於いて生育し、その条件下で生合成を営み一定の品質を有していた。これと同じ種を日本の環境で栽培した場合、変動を生じるか否か、生じた際には、日本薬局方生薬「マオウ」として許容される範囲であるか否かを厳密に検討することは医薬品「麻黄」にとって必須である。そこで、日本薬局方「マオウ」を基準に、植物形態的、含有成分の化学的、生合成的検討を計画した。マオウの成分研究において、エフェドリン系アルカロイド及びタンニンはよく知られているが、トリテルペンに関する報告はない。そこで、低極性化合物の有無を含め、エフェドリン類、タンニン類の定性分析を行った。

マオウ属の中で、*Ephedra americana* は、南米アンデス山脈のエクアドルからアルゼンチンにかけての石の多い斜面や砂利の大地に分布している。この種は、砂地や中程度の粘性の土壌や水はけのよい土壌を好み、干ばつにも耐えられるが、日陰では成長できないとされる。成長すると1.8m位になる常緑低木であり、南米の過酷な環境や霜でも痛まず一年中葉をつけ、6月から7月にかけて花を咲かせる。花は雌雄異体で雄花と雌花があるが、一つの株にどちらかの花しかなく、雄花と雌花が育つことで種子ができるが、自家受粉はしない。また、果実を食用とすることがある。果実の直径は8mmで空洞がある。茎は生のものと乾燥したものをお茶として使われ、生でも食べられている。生で食べる場合、若い茎がよく、お茶にするなら古い茎がよいされる。茎は年中収穫でき乾燥させて使うという。また、特筆すべき点として、*E. americana*はエフェドリンを含まれていないとされているが、現地ではその地上部を民間薬として使用している。

本研究では、このエフェドリンを含まれていないとされている *E. americana* を用いて、そのフラボノイド成分の検索を行った。

タンニン成分として、西岡らにより、エピカテキンが、2 量化、3 量化した結合型タンニンの分離報告があるが、加水分解型タンニンの存在もあるとされてい

る。そこで、これらの本体を明らかにする必要があると考え、市場品マオウを中心に、結合型、加水分解型タンニンの分離構造研究を進めるとともに、アジア諸国を起源とする、*E. distachya*, *E. gerardiana*の2種についても、市場品マオウのタンニン成分の比較と、その分析法について検討することとした。

以上のように、本年度は、関東地方に於ける栽培条件の検討、人工光源を用いた栽培、マオウの網羅的含有成分の解析、マオウ含有成分の生合成遺伝子の解析に着手した。

また、検討すべき項目の一つに栽培地の安全管理がある。主要含有成分エフェドリンは覚せい剤原料とされ、近年まで原産地での不正採取が世界の注目をあびている。御影らの現地調査によると中国新疆博楽地区の路傍栽培に対して、「周辺への影響を考慮すると適地ではない」との行政指導がされたとのことである。

日本国内での栽培地が増えると仮定すると、栽培実態の把握は必要不可欠であり、栽培地の管理は厳密になされなければならない。本年度の栽培地は衆目から隔離した場所で行ったが、今後、拡大する際には、具体的な方策を講じる予定である。

(図、表は本文の後ページにまとめて記載した)

B. 研究方法

B-1 マオウ属植物の栽培における施肥の影響

かつてネパール産マオウの栽培実験において、化成肥料施肥群と非施肥群の比較栽培試験を行い、化成肥料が地上部の生長に非常に効果的であることを確認した。しかし、その後の継続観察において、施肥群を施水のみに変更して栽培したところ、すべての個体が枯死するという現象を経験した。なお、非施肥群はその後施水のみですべて生存していた。この枯死の原因を検証する目的で、一定期間化成肥料を施肥後、施水のみで切り替えてその影響を観察した。

材料：昭和薬科大学で保存してきた *Ephedra distachya* と *Ephedra sinica* を材料とした。

株分けによって、*Ephedra distachya* と *E. sinica* から、それぞれ5個体を作出し、ワグネルポットで1個体ずつ栽培した。栽培土壌は山砂とし、ワグネルポットに植え付け、約10日間経過した後、施肥を開始した。施肥はハイポネックスの1000倍液を2週間に1度、各個体に1Lずつ与えた。一定期間、化成肥料（ハイポネックス）を施肥後、半数の個体は施肥を継続し、残りの個体は施水のみで切り替えた。

B-2 *Ephedra sinica* 種子の発芽試験

金沢大学より入手した *Ephedra sinica* の種子229粒、重量は2.66g/229粒を用いて発芽条件（温度）の違いによる発芽率の変化を確認する。

人工気象器：日本医科器械製作所製温度勾配恒温器を使用した。

容器：簡易プラスチック容器の中に図1のようにろ紙を置き、下に水を入れ、ろ紙は常に湿った状態に保つ。そのろ紙の上に種子を並べ、毎日、発芽の有無を観察する。（図1）

温度勾配恒温器内の条件は下記の通りである。

各栽培棚中の温度を5, 10, 15, 20, 25℃に設定した。

人工気象器内は無照明とした。

1群40粒とした。

発芽の判定：発根し、その長さが1mmに達した時を発芽とした。

★発芽した種子の育苗

⇒発芽試験後、ビニールポットで育苗する。

苗は、成分分析用に育てる。

⇒一部を栽培試験用（主に根の成長を観察する）に使用する。

水耕（礫耕）栽培・・・施肥2条件

× 3か所 = 6サンプル

塩ビ・・・5個体×肥料2条件×施

水2条件 = 20サンプル

ワグネルポット 3か所×5個体

= 15サンプル

B-3 人工光源を用いたマオウ栽培の検討

本年度は、次年度の成長実験への準備として、①植物成長用に青色発光／赤色発光のチューブで構成されたプラズマチューブアレイの作製、②比較光源として用いる植物成長用LED、植物成長用蛍光灯で成長を行うためのボックス作製、③暗室内で温度／光環境／培土を変えた状態での発芽の検討を行った。（図2）

B-4 マオウの低極性成分に関する検討

2013年8月、ネパールJomson周辺（2,500m）にて採集した、*Ephedra gerardiana*を、また、昭和薬科大学薬用植物園に生育している*E. distachya*を用いた。*E. gerardiana*は、高低差を考慮し4カ所で採集、そのうち、2株は雄雌を明確にして採集した。

B-5 *Ephedra americana*のフラボノイド成分に関する研究

試料としてペルー産の*Ephedra americana*の地上部9.15 kgを用いた。粉砕器により粉砕し粉末状とした。

粉末にした試料を2つの20Lタンクに分けて入れ、メタノール（MeOH）にて20回冷浸抽出し、エバポレーターで濃縮することでMeOH抽出物470 gを得た。

この抽出物をイオン交換樹脂（DIAION HP-20）1500 mLを用いたオープンカラムクロマトグラフィーに付し、水、5% MeOH、10% MeOH、20% MeOH、40% MeOH、60% MeOH、80% MeOH、100% MeOH、アセトン、ジクロロメタンの順にそれぞれ2 Lずつ流して分画した。

エフェドリン及びアルカロイドの確認は以下の1) および 2) の条件で行った。

1) 日本薬局方マオウに定められた確認試験法に準拠し、イオン交換樹脂分画物に対して以下の簿層クロマトグラフ法により確認を行った。

簿層板：シリカゲル

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸
(100) (7:2:1)

検出：2%ニンヒドリン・エタノール
(95) 溶液噴霧後105℃で5分間加熱

2) 別途、イオン交換樹脂分画物に対して以下の簿層クロマトグラフ法によりアルカロイド含有の確認を行った。

簿層板：オクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）

展開溶媒：30%メタノール、65%メタノール、100%メタノール

検出：ドラーゲンドルフ試液

成分の単離

60%メタノール溶出画分33.49 gをオクタデシルシリル化シリカゲル（ODS）オープンカラムクロマトグラフィー（OCC；5 cm x 50 cm）に付し、30% MeOH（500 mL）、40% MeOH（1 L）、50% MeOH（1 L）、60% MeOH（1 L）、70% MeOH（1 L）、80% MeOH（1 L）、90% MeOH（1 L）、100% MeOH（1 L）で溶出させ、ODS-TLCにおける紫外線照射254 nmと希硫酸噴霧後の加熱呈色しスポットを元にして17個のフラクションに分画した。さらにToyopearl HW-40を用いた低圧液体クロマトグラフィー（LPLC；移動相：MeOH）による分離、最後にODSを用いた分取高速液体クロマトグラフィー（Prep-HPLC；移動相：アセトニトリル/0.1 %ギ酸）による精製により、化合物1（6.7 mg）、2（71.0 mg）、3（18.9 mg）、4（1.1 mg）、5（19.3 mg）、6（3.3 mg）、7（17.3 mg）、8（12.2 mg）をそれぞれ単離した。

単離化合物の構造解析は、以下の機器を用いた。

NMR測定には以下の装置を用いた。

AVANCE 700 (Bruker BioSpin)

Unity INOVA 500 (Varian)

また、NMRのデータ処理ソフトにはMNova (Mestrelab Research) を用いた。

MS測定にはQ-ToF micro

(MICROMASS/Waters) を用い、MassLynx 4.0 (Waters) にて解析を行った。

UV及びCDはJ-820 Spectropolarimeter (JASCO) とORDM-401 (JASCO) を用いて測定した。IRはFT/IR-6300 Fourier Transform Infrared Spectrometer

(JASCO) を用いて測定した。旋光度はP-1030 polarimeter (JASCO) を用いて測定した。

B-6 マオウのタンニン成分に関する研究
市場品マオウを用いて、結合型タンニンの抽出分離の可能性を予試験的に検討することとした。

20 gの市場品のカットされたマオウをすり潰し 70 % acetone水で室温下12時間放置して抽出し、この操作を2回繰り返した。得られた抽出溶液は50℃で減圧下アセトン进行を留去してから、さらに水を加え、不溶物は遠心分離で沈殿させ除き、ろ液を三菱ダイアイオン HP-20 カラムクロマトグラフィーに付した。H₂O、30 % MeOH、50 % MeOH、70 % MeOH、100 % MeOH の順に溶出して、それぞれの溶出フラクションは 50℃で減圧下濃縮した。得られた各溶出フラクションについてはその収量を計測した。また、シリカゲルプレートを用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) を、CHCl₃-MeOH-H₂O = 65 : 35 : 10 混合液の下層を用い展開し、50 % H₂SO₄ 噴霧ご加熱して発色して行った。また、逆相系 (ODS) カラムを用、CH₃CN-H₂O (10 : 90) を溶出溶媒とした高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行い、タンニンの存在と分離の可能性を検討した。

C. 研究結果

C-1 マオウ属植物の栽培における施肥の影響

6月下旬から7月上旬に株分け個体を作成してワグネルポットに植え付けた。

7月13日から施肥を開始し、11月11日に8回目の施肥を行い、1か月後の12月16日より、化成肥料の施肥継続群と、施水群に分け、栽培を継続した。

両種とも3/5個体を施水のみ、残りの2/5個体を施肥継続にして観察を継続し、1月14日と29日に施肥および施水を行った。現時点で、すべての個体が生存し、枯死した個体はゼロである。

C-2 *Ephedra sinica* 種子の発芽試験

発芽試験開始からの発芽の推移を図3に示した。

15~25℃では1週間以内に発芽を開始し、2週間以内ではほぼ発芽が完了し、発芽率は82~85%であった。

10℃になると発芽開始が1週間ほど遅れ、1か月時点で発芽率は63%、5℃で

は、さらに1週間ほど発芽開始が遅れ、1か月経過時点で20%の発芽率であった。

C-3 人工光源を用いたマオウ栽培の検討

①：図2、3に示すような青色：赤色=1：4のパネルを試作した。駆動周波数25 kHzで1500 lx、50 kHzで3000 lxの照度が得られている。白色相当では10000 lx (@50kHz) 程度になり、植物工場に実装されている蛍光灯照明に近い光量になっている。現在葉もの野菜を用いて成長速度増進効果を調べている。

②：育苗器を覆うホワイトアクリルボックスを作製し内部の配光分布を測定した。

③：明所（蛍光灯下）と暗所において *E. sinica* の発芽状況を調べた。培土は、市販培養土 (pH5.8) パーライト (pH5.3) バーマキュライト (pH5.5) を用いた。外気温が支配的で13℃以下では発芽しなかったが、15℃を越した段階で発芽が見られた。土壌内部への光拡散が強いパーライトで発芽速度が高かった。弱い紫外線 (365nm) を含む一般照明の分光していない光で照らされているため波長依存性が不明であるが、発芽の光応答性はあるものと思われる。発芽率はおよそ92%であった。

表2の光環境で蛍光灯、LEDを用いた育苗を開始した。

C-4 マオウの低極性成分に関する検討

E. distachya 及び *E. gerardiana* を *nr* ヘキサンで抽出後、TLCで検討した結果、トリテルペノイド様スポットが確認された。(図4)

C-5 *Ephedra americana* のフラボノイド成分に関する研究

D-5-1 エフェドリン及びアルカロイドの確認

Ephedra americana にはエフェドリンが含まれていないとされている。これを確認するため、イオン交換樹脂分画物 (フラクション：Fr.) についてTLCで検討した。ニンヒドリン試液を用いて呈色させたところ、0% MeOH Fr.、5% MeOH Fr.、10% MeOH Fr. において、R_f 値0.35付

近に赤紫色のスポットを検出したが、いずれもエフェドリン標品 (EP) のスポットと同位置には検出できなかった (図 5)。

また、ドラーゲンドルフ試液を用いて呈色させた場合にはいずれのフラクションにもスポットが見られなかった (図 6)。

C-5-2 単離化合物の構造解析

化合物1は緑褐色の非結晶性物質として得られ、MSスペクトル、 ^1H 及び ^{13}C -NMRより分子式は $\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ と推定した。二次元NMRの詳細な解析によりその平面構造が既知化合物であるエフェドラニンAと一致することが判明した。続いて、エフェドラニンAと化合物1の立体構造を比較した。 $[\alpha]_D$ を比較すると、エフェドラニンAはマイナスの値を示し、化合物1はプラスの値を示した。このことからエフェドラニンAと化合物1の立体配置が逆であると考えられ、エフェドラニンAの結合 ($2\alpha \rightarrow 0 \rightarrow 7, 4\alpha \rightarrow 8$) が ($2\beta \rightarrow 0 \rightarrow 7, 4\beta \rightarrow 8$) となった構造であると推測した (図 7)。

化合物2は、NMR解析による平面構造及びCDスペクトルデータが既知化合物と一致したため、ent-epiafzelechin- ($2\alpha \rightarrow 0 \rightarrow 7, 4\alpha \rightarrow 8$)-quercetinであると同定した (図 7)。

化合物3及び5は、その ^1H 及び ^{13}C -NMRのケミカルシフト値がほぼ一致した。しかし、そのCDスペクトルの波形を比較すると異なるモノであった。このことから、化合物3と化合物5は、平面構造は同じだが立体構造が異なると推測した。詳細なNMR解析の結果、マウアニンD及びmahuannin Eと平面構造が一致することが判明し、CDスペクトルデータを比較した結果、化合物3がmahuannin E、化合物5がmahuannin Dであると同定した (図 7)。

化合物6は、MS及びNMRスペクトルよりその分子式は $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ と推定され、NMR解析よりフラボノイドのケルセチンであると同定した。

化合物7は、そのNMRスペクトルから化合物3のC環部分の水素がヒドロキシ基に置き換わったものと推測した。その平面構造は、mahuannin AとB、PIa、ent-

epiafzelechin- ($2\alpha \rightarrow 0 \rightarrow 7, 4\alpha \rightarrow 8$)-(+)-afzelechin、ent-epiafzelechin- ($2\alpha \rightarrow 0 \rightarrow 7, 4\alpha \rightarrow 8$)-(-)-afzelechin、epiafzelechin- ($2\beta \rightarrow 0 \rightarrow 7, 4\beta \rightarrow 8$)-ent-afzelechinと一致したが、CDスペクトルデータよりmahuannin Bであると同定した (図 7)。

化合物4は褐色の非結晶性物質として得られた。MSスペクトル、 ^1H 及び ^{13}C -NMRより分子式は $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ と推定した。HSQCスペクトルより、2個のメチレンカーボン、14個のメチンカーボン、14個の4級炭素の存在が確認された。 ^1H - ^1H COSYおよびHMBCスペクトルの詳細な解析によりその平面構造が明らかとなり、化合物4はカテキン類が2個結合したプロアントシアニジンであることが判明した。また、文献検索の結果、本化合物は新規化合物であることが判明した。立体配置を決定するため、本化合物のCDスペクトルデータを立体配置が明らかな既知化合物3及び5のCDスペクトルデータと比較した結果、化合物3のデータと同じく $[\theta]_{220}$ がプラスの値を示し、 $[\theta]_{270}$ がマイナスの値を示したので、($2\beta \rightarrow 0 \rightarrow 7, 4\beta \rightarrow 8$)と推測した (図 3)。

化合物8は赤褐色の非結晶性物質として得られ、MS、 ^1H 及び ^{13}C -NMRより分子式は $\text{C}_{45}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$ と推定した。また、DEPTスペクトルより、2個のメチレンカーボン、21個のメチンカーボンの存在が確認された。 ^1H - ^1H COSYおよびHMBCスペクトルの詳細な解析によりその平面構造が明らかとなり、化合物8はカテキン類が3個結合したものであることが分かった。文献検索の結果、本化合物は新規化合物であることが判明した (図 7)。立体配置については現在検討中である。

C-6 マオウのタンニン成分に関する研究

HP-20 カラムクロマトグラフィーの結果、各フラクションの収量は以下のようになった。

H_2O ; 2400 mg, 30 % MeOH; 490 mg, 50 % MeOH; 990 mg, 70 %; 290 mg, 100 % MeOH; 90 mg, 不溶物; 690 mg.

HP-20カラムクロマトグラフィー後の各フラクションの合計収率が 23 % 以上と

いう結果となり、期待以上の高い抽出率が得られた。

各フラクションの TLC では、30 % MeOH および50 % MeOH溶出フラクションに紫外吸収を持ち、50 % H₂SO₄ 噴霧後の加熱で褐色に発色するいくつかのスポットが見られた。

HPLC の分析レベルでの結果では、10 ~12 % CH₃CN の溶媒系で、有機酸等の添加を行わないで 30 % MeOH 溶出フラクションと50 % MeOH 溶出フラクションは似たパターンを示し、5から6つの、シャープな分離可能と考えられるピークが見られた。

D. 考察

D-1 マオウ属植物の栽培における施肥の影響

ネパール産マオウを使用した前回の実験で施肥から非施肥への切り替えにより枯死した原因は、

(1) 施肥により根あるいは毛根細胞が変質し、施肥の中止に伴い、施水のみ環境に対応できなくなった、あるいは、

(2) 施肥環境と施水環境で根あるいは毛根の周囲で、肥料と水という浸透圧の異なる液体に接することによって、その急激な変化に対応できなくなった、

と仮定して、今回の再現実験を行ったが、今回の実験では枯死は観察されなかった。

前回の実験と、今回の実験での違いは、前回は春から夏にかけての実験で、今回は夏から冬にかけての実験であるという時期の違いである。そこで考えられるのは、前回は生長が著しい夏に、栽培条件の変更を行っており、条件変更の影響が強く出たのではないかと推測した。

したがって、再度、今春から検証実験を行う予定である。さらに次回は、施肥群と非施肥群において、根および毛根の生長がどのように異なるのか、あるいは、同じなのかについて、経時的に観察を行い、詳細に検討する予定である。

D-2 *Ephedra sinica* 種子の発芽試験

今回検討した *Ephedra sinica* の種子では、発芽の適温は15~25℃で、発芽率は80%以上であることが確認できた。10℃

では、やや発芽開始が遅れることから、栽培においては最低温度15℃を目途とすべきである。

5℃という条件でも発芽を開始したことから、湿度が発芽開始の大きな要素であると考えられ、かなり過酷な条件であっても発芽する性質をもつことが分かった。

D-3 人工光源を用いたマオウ栽培の検討
プラズマチューブアレイ内での発芽実験で良好な結果を得た。開始した育苗で *E. sinica* の苗がある程度成長した段階で成長実験を行い、PTA、蛍光灯、LEDを用いて栽培の検討を開始する。が簡便な光合成モニタに良く用いられるが、近紫外光励起による、可視~近赤外での広範な蛍光スペクトルの積分強度/スペクトル形状の変化は、植物のストレスとよく対応しているため、これを用いて生育状況を調べる。

D-4 マオウの低極性成分に関する検討
マオウにはトリテルペン生合成遺伝子の存在が認められることも併せ、次世代シーケンサーによるエフェドリン生合成遺伝子の解明のために、*E. sinica*、*E. distachya*、*E. gerardiana*、それぞれの部位(節、節間、側鎖など)毎に分けエフェドリン含量を検討することにより、遺伝子の発現状況が明確になる。

D-5 *Ephedra americana* の成分に関する研究

Ephedra americana にはエフェドリンが含まれていないとされているが、これを確認するため、イオン交換樹脂分画物(フラクション: Fr.) について TLC で検討したところニンヒドリン試液にポジティブなスポットが確認されたもののエフェドリンに一致するスポットは確認されなかった。また、ドラーゲンドルフ試液を用いて検出したところ、アルカロイドと思しきスポットは確認できなかった。このことから、アミノ酸などアミノ基を持つ化合物が含まれるが、エフェドリンなど2級、3級アミンを持つアルカロイドを含まないか、含有量がごくわずかで検出できなかったと考えられた。

それではどのような成分が含まれているのか、イオン交換樹脂 (DIAION HP-20) の60%メタノール溶出画分について成分検索を行ったところ、新規化合物2種を含むA型プロアントシアニジン類7種とフラボノイドのケルセチンが単離された。A型プロアントシアニジン類は、麻黄根

(*Ephedra sinica*などの根を乾燥したもの) などからも単離報告例のある化合物群である。麻黄根からは他にもephedradine Aなどのアルカロイドが単離報告されている。今回、*E. americana*にはアルカロイド成分が検出されていないので、麻黄及び麻黄根とも成分の相違があることが明らかとなった。

A. 参考文献

- 1) Hikino H., Takahashi M., Konno C., *Tetrahedron Lett.*, 23, 673-676 (1982).
- 2) Hikino. H., Shimoyama, N., Yoshimasa. K., Takahashi. M., *Heterocycles*, 19, 1381-1386 (1982).
- 3) Kasahara Y, Hikino H., *Heterocycles*, 20, 1953- 1956 (1983).

D-6 マオウのタンニン成分に関する研究

30 % MeOH 溶出フラクションと50 % MeOH 溶出フラクションは、比較的収率が良好で、タンニン分離に期待が持てる。HPLC において、ODS カラムを用いた酸性物質の分離には、溶出溶媒系に トリフルオロ酢酸 (TFA) などの有機酸を添加する必要があるが、幸い今回の HPLC 分析では、シャープなピークを確認できたことから、タンニン分離が比較的容易に行いえる可能性が期待できる。

E. 結論

自然環境及び人工環境でのマオウ栽培の条件検討を開始し、大規模栽培の可能性に有意義な結果を得ている。生産生薬「マオウ」の品質確保に向けた化学的検討、成分の生合成遺伝子の解明を試み、基本情報を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

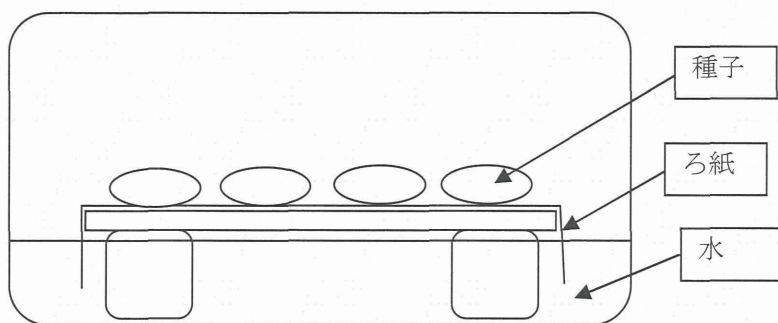
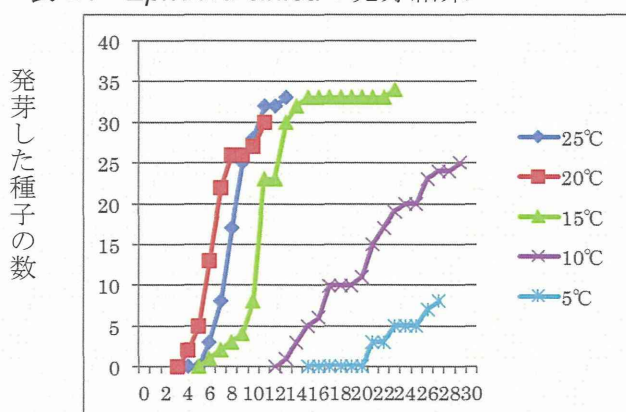
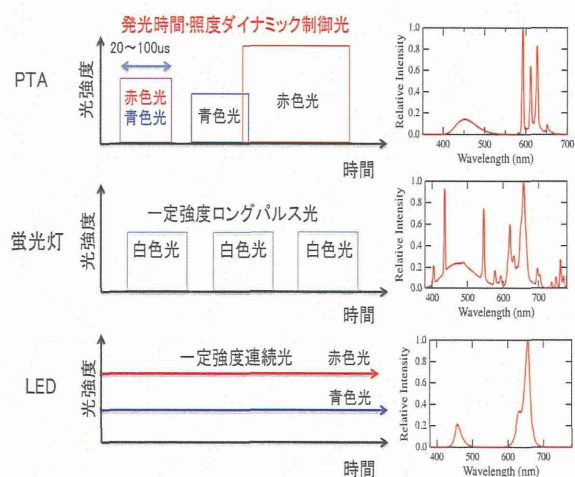


図 1. 温度勾配恒温器

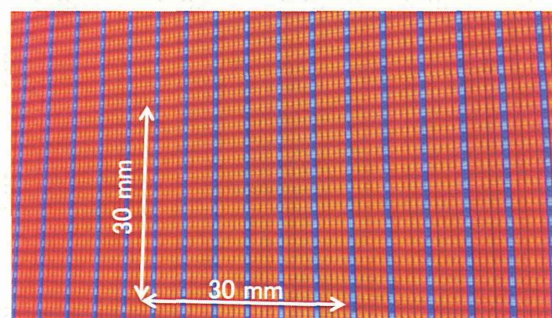
表 1. *Ephedra sinica*の発芽結果



実験開始からの経過日数 (日)



PTA (赤青点灯タイプ: 試作)



フィルムライトなので曲面になっている

図 2. 使用する光源の特性及びスペクトルの比較 (左) と、試作したPTAの点灯の様子 (右)

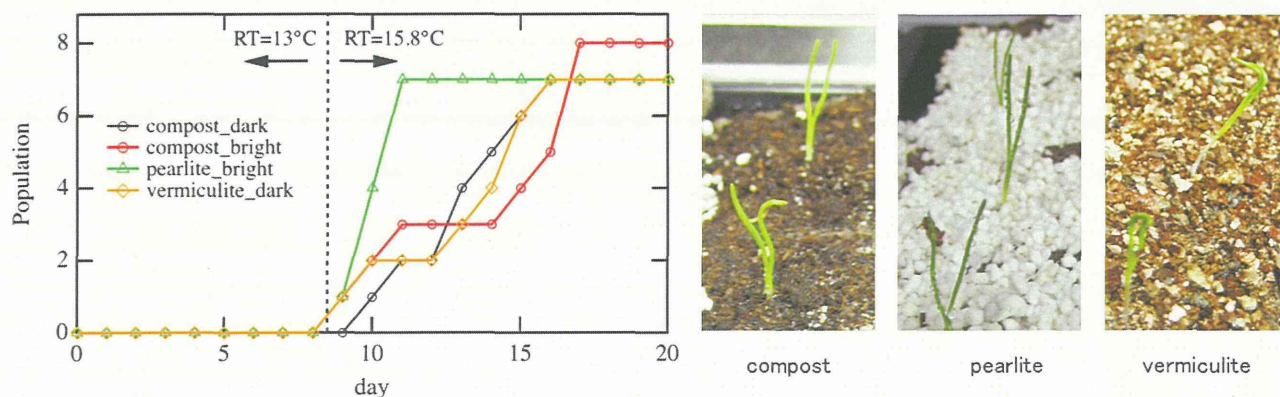
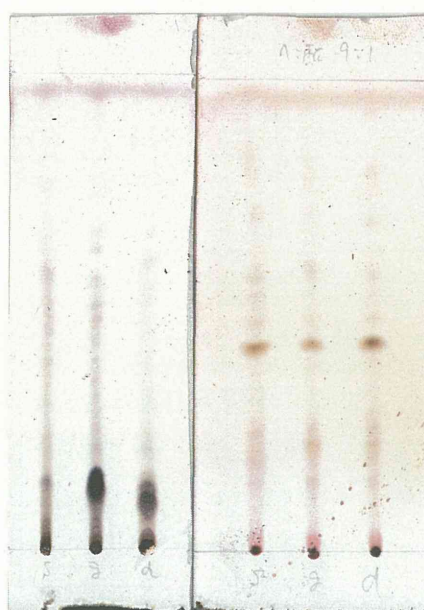


図3. 発芽数の推移と各培土での苗の様子（発芽後4日目）。brightは明所（蛍光灯下）、darkは暗所

表2. 発芽／育苗用の光照射条件

光源	点灯時間 (hrs)	照度 (lx)	照射距離 (cm)
ローパワーLED*	12～24	220	30
蛍光灯（赤強化）**	12～24	1000	30



スポット 左：*E. distachya* 中央：*E. gerardiana* 右：*E. sinica*

左 展開溶媒 メタノール：クロロホルム（1：9）

右 展開溶媒 ヘキサン：酢酸エチル（8：2）

図4. マオウの低極性分画の薄相クロマトグラフィー