

图5. An LC-MS profile of 29-2 rhizome with Amide-80.

a) UV chromatogram at 230 nm; b) extracted mass chromatogram (EIC) at m/z 291.1; c) EIC at m/z 579.2; d) EIC at m/z 867.2; e) EIC at m/z 1155.3; f) EIC at m/z 1443.3; g) EIC at m/z 443.1; h) EIC at m/z 883.2; i) EIC at m/z 1323.2; j) EIC at m/z 1763.3; k) EIC at m/z 731.2; l) EIC at m/z 1171.2; m) EIC at m/z 1611.3. * indicates the same peak as found in a chromatogram of *Crataegus* extract.

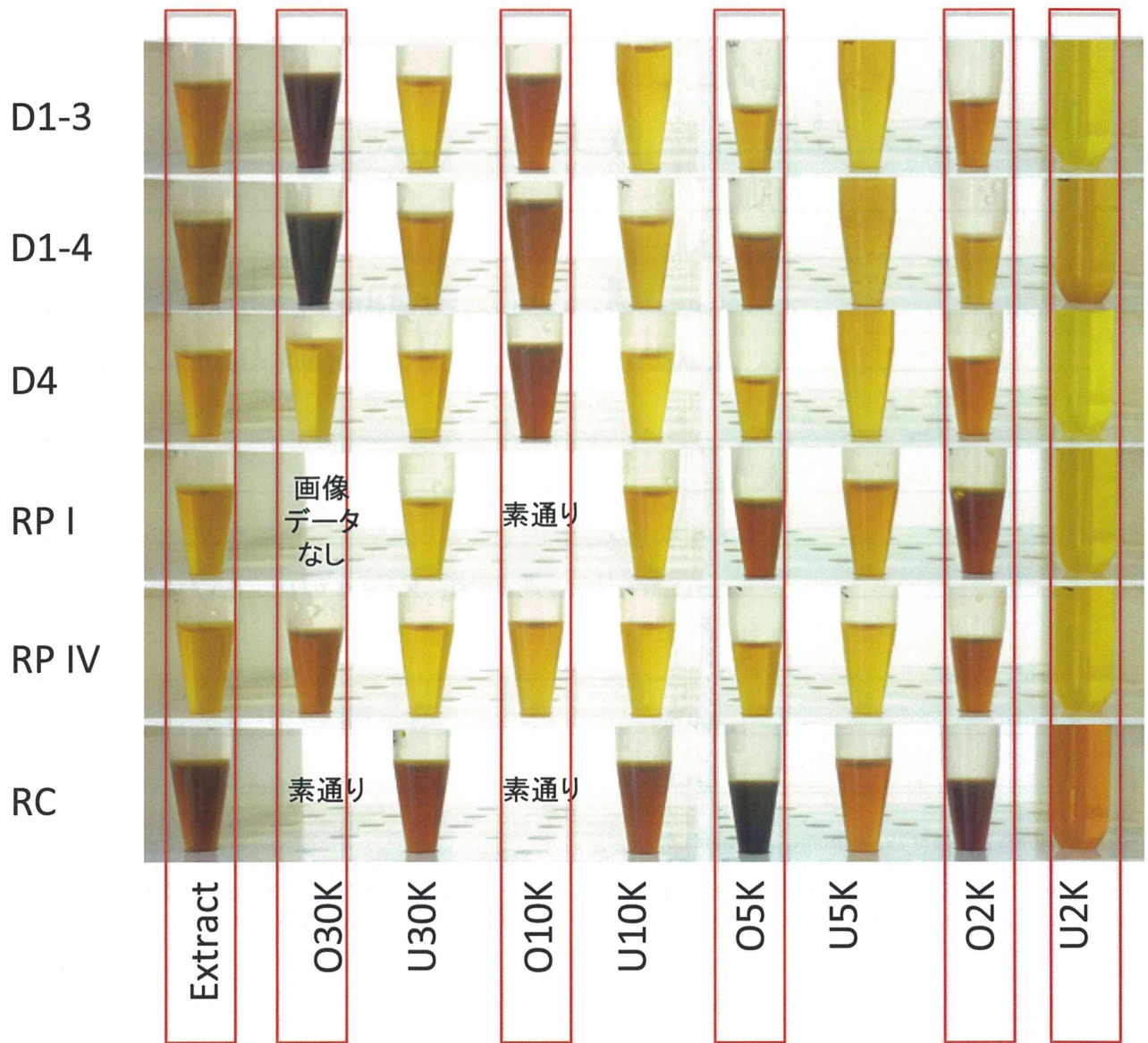


図6. 遠心式限外ろ過による各分画の色

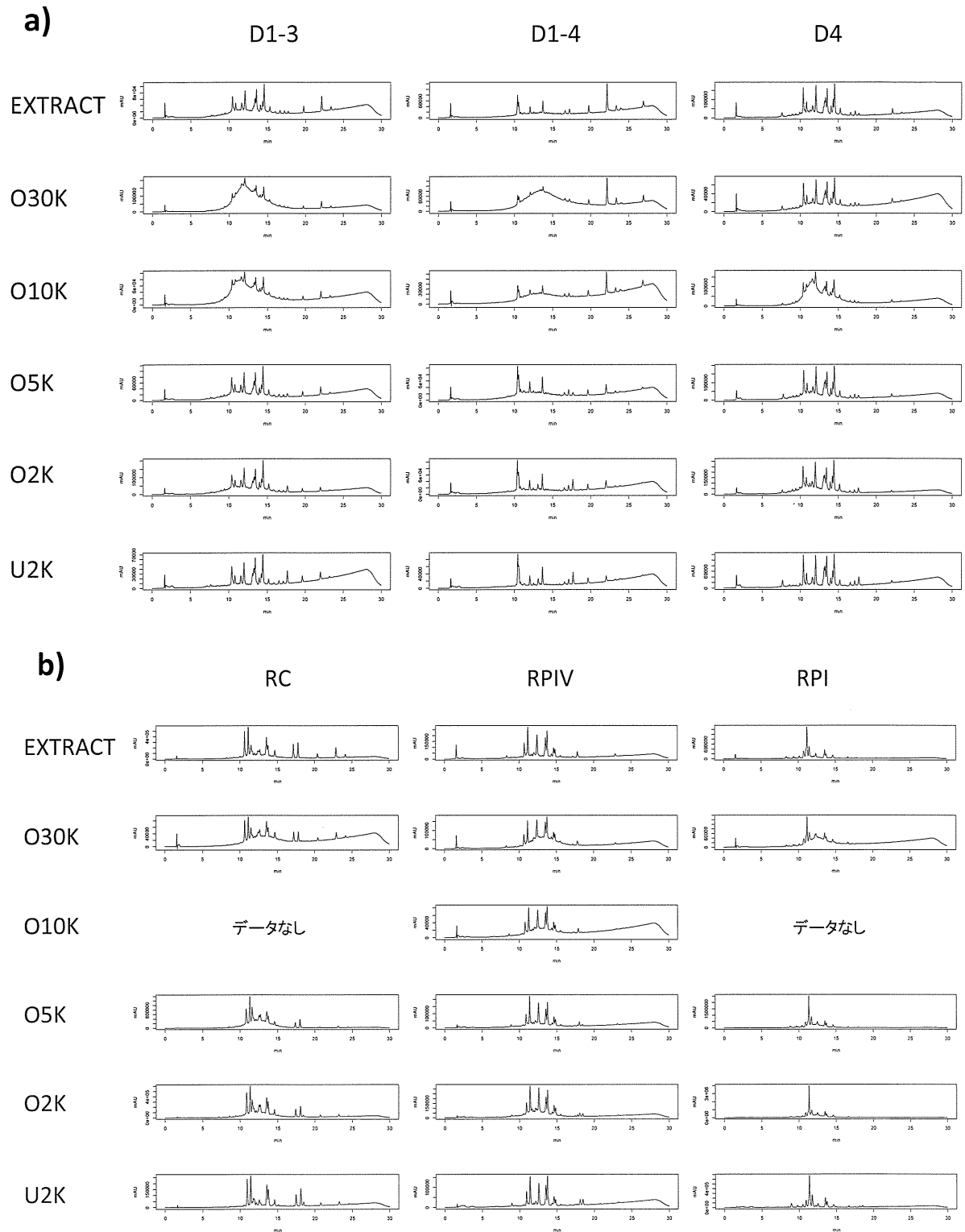


図7. C18カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーによる、遠心限外ろ過分画のPDA検出HPLC分析
 カラム, Capcell Pak C18 MGIII (2.0 i.d. × 150 mm; Shiseido). 溶媒, 0.1%ギ酸水溶液(溶媒A), 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液(溶媒B), 溶媒Aに対して25分間で5-95% 溶媒Bのリニアグラジェント. 流速0.20 mL/min, カラム温度 35°C. 256nm抽出クロマトグラムを表示.

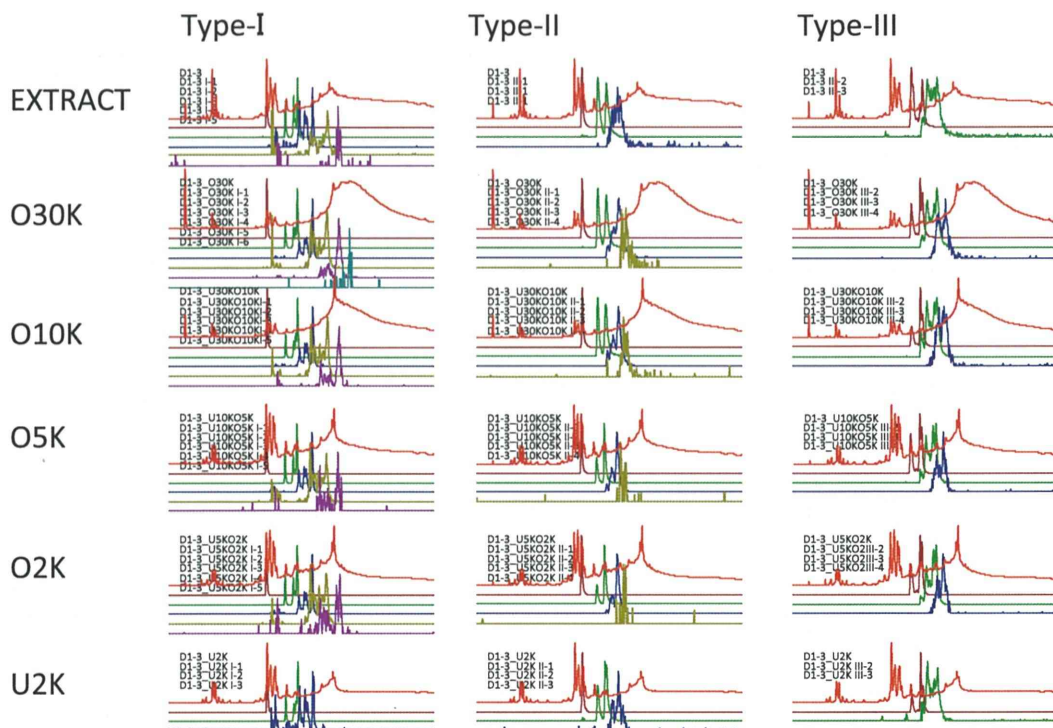


図8. Amideカラムを用いたHILIC高速液体クロマトグラフィーによる、D1-3の遠心限外ろ過分画のLC-MS分析. クロマトグラムは、一番上(赤)から順にPDAマックスプロット(200-600nm)、DP(重合度, n)=1, 2, 3, 4, …の m/z 精密分子量 ± 0.005 の抽出マスククロマトグラム(EIC). 構造の型は図1を参照のこと.

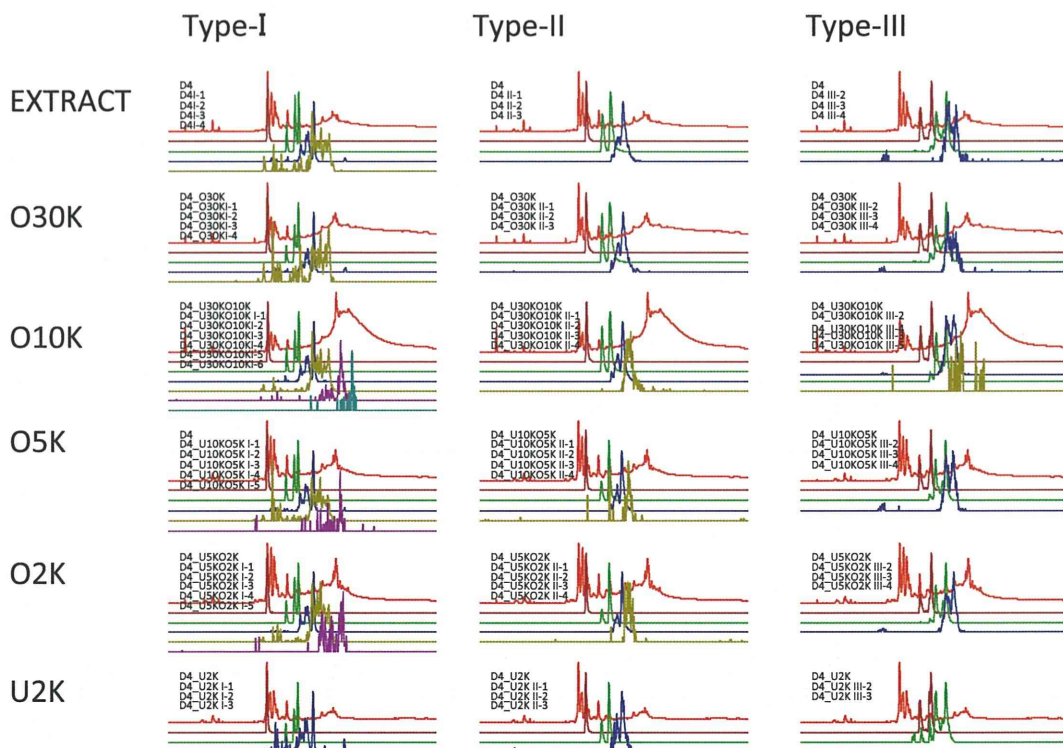


図9. Amideカラムを用いたHILIC高速液体クロマトグラフィーによる、D4の遠心限外ろ過分画のLC-MS分析. クロマトグラムは、一番上(赤)から順にPDAマックスプロット(200-600nm)、DP(重合度, n)=1, 2, 3, 4, …の m/z 精密分子量 ± 0.005 の抽出マスククロマトグラム(EIC). 構造の型は図1を参照のこと.

表1. LC-MSによるダイオウ成分の同定

Table. A summarized list of peaks in the LC/MS chromatograms for 27-07-root.

Time	Compound	UV/Vis max	MS	MS/MS
1.35		277	381.0781	219.026 116.0702
2.01		278	350.1075	171.0284 127.0385 85.0281
5.95	catechin	279	291.0857	207.0649 139.0387 123.0437
6.06	catechin	279	291.0857	207.0649 139.0387 123.0437
6.43	A hexoside of an aglycone	280	395.1326	233.0805 191.07
7.19	Procyanidin B gallate	278	731.1583	411.1068 271.0593 153.0179
7.19	galloyl cinnamoyl glucose?	278	463.1218	301.0702 259.0597
7.93	Resveratrol 4'-O-glucoside	302	391.1375	229.0855
7.93	hydroxycinnamoyl glucose	302	309.096	147.0437
8.38	Cinnamoyl glucose	279	293.1011	131.0487
8.64	(iso)lindleyin	263 407	479.1532	315.07 153.0179
8.64	(anthraquinone derivative?)	263 407		
8.85	epicatechin gallate	277	443.0957	291.0859 139.0386 123.0437
8.85	a galloyl anhydrohexose?	277	315.0701	153.0178
9.17	sennoside B		539.0955	(M - 2 x glc + H) ⁺
9.22	A hexoside of C ₁₆ H ₁₂ O ₁₆ anthraquinone	264 407	463.1217	301.0702
9.72	Resveratrol 4'-O-(6"-galloyl)glucose	291	543.1476	153.0178
9.96	hexoside of reduced (aloe)emodin?	277	435.127	273.0751
10.07	sennoside A	273	539.0952	(M - 2 x glc + H) ⁺
10.2		267 340sh	365.1324	233.0802
10.37		260 404	507.148	259.096
10.37		260 404	467.0804	153.0719
10.66		280	293.1011	131.0487
10.77		280 417	607.1791	
10.77		280 417	445.1115	153.0179 131.0487
10.97		261 406	515.153	177.0543
12.24		261 400	445.1116	153.0179 131.0488
12.24		261 400	409.1483	247.0961 229.0856
12.45		270 419	447.1272	153.0179
12.45		270 419	419.1325	287.0909
13.41		231 344	495.148	247.0959 229.0854
13.79		259 410	495.1482	247.0961
13.79		259 410	535.1431	287.0909
14.07		257 410	497.1119	273.0598 127.0386 109.028
14.34		273 421	519.1116	379.0796 361.0696 337.0721 313.07
14.34		273 421	271.0592	
15.06		271 420	533.1275	393.0959 327.0856 297.0751
15.06		271 420	285.075	
15.7	aloe-emodin	257 429	285.075	
16.24		277	445.1114	153.0179 131.0488
16.89	rhain	258 430	285.0387	
19.83	emodin	287 439	271.0595	
22.53	chrysophanol	257, 278	429 255.0644	
23.46	physcion	266, 286	436 285.0751	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成24年度～26年度総合研究報告書

人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた

実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）

分担研究報告書

分担研究課題：地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

—エゾウコギの養液栽培～圃場栽培と葉の成分探索—

研究分担者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

要旨

1) エゾウコギの養液栽培と圃場栽培への移行

後熟促進処理及び休眠打破処理を行うことにより、発芽までに要する期間を1/3に短縮した。この種子を閉鎖環境下で養液栽培し、発根・発芽から育苗、屋内馴化、屋外馴化までを行い、種子611粒中84個体を植物体まで生育させ、圃場に定植した。発芽率は約13%、育苗に至るまでの成功率は16.4%であり、今後改良の余地があるが、一連の栽培法は確立できた。

2) エゾウコギの葉の成分

葉についてLC/MS分析を行い、カフェオイルキナ酸類8化合物、フラボノイド2化合物を同定した。養液栽培で育苗した植物体の葉の主要成分は、3,5-O-dicaffeoylquinic acid及びmalonyl-3,4-O-dicaffeoylquinic acidであった。養液栽培後屋外で馴化した場合、hyperoside及び5-caffeoylquinic acidが増加した。他にオリゴ糖やサポニン成分も含有していたことから、健康食品として利用は可能であろうと思われる。

研究協力者

村上守一 富山県薬用植物指導センター
元所長
田村隆幸 富山県薬用植物指導センター
主任研究員
川本元裕 北陸機材株式会社 専務
葛 躍偉 富山大学和漢医薬学総合研究所
研究員
磯田 進 昭和大学薬用植物園 講師
菱田敦之 (独) 医薬基盤研究所薬用植物
資源研究センター北海道研究部
研究サブリーダー

A. 研究目的

エゾウコギ *Eleutherococcus senticosus* Maximowicz の根茎及び根は「刺五加」などと称し、滋養強壮薬として東アジアで繁用される。これまでの研究により、刺五加のメタノールエキス及び熱水エキスは、アミロイドβ(25-35)により障害を受けた神経細胞に対して、軸索・樹状突起伸展作用、シナプス再形成作用、神経細胞死抑制作用を示すことを細胞レベルで明らかにした¹⁾。さらに、メタノールエキス中に含まれる eleutheroside B、

eleutheroside E 及び isofraxidin が神経突起萎縮抑制作用を示すことも明らかにした²⁾。このことから、「刺五加」には抗認知症作用が期待できると考えられた。

近年、「刺五加」は健康食品原料として我が国で需要が拡大しているが、本生薬は中国東北地方からの輸入品が使用され、日本（北海道）産のエゾウコギが使われることはほとんどない。一方、中国ではエゾウコギの野生資源が減少し、稀少植物に指定されるようになり、今後輸入が途絶える懸念がある。このように、日本においても栽培の必要性が生じているが、未だ北海道北部を除いた地域での栽培は成功していない。

富山県でエゾウコギを栽培するためには、以下の点を克服しなければならない。

1) エゾウコギの種子は秋の結実時には胚が未熟であり、自然環境下では翌年の春から秋の期間に胚が成熟し、冬の低温によって休眠打破される。すなわち、発芽するには採種から翌々年の春までの期間（約1年半）が必要となる。栽培化するには、胚の成熟を促し（後熟促進）、休眠打破させるための処理を行い、発芽までの期間を短縮する必要がある。

2) 富山県の気候条件は、エゾウコギの発芽から苗の生育に不向きであると考えられる。そこで、栽培条件のコントロールが可能な、閉鎖環境下での養液栽培を検討する必要がある。

3) 生薬「刺五加」はエゾウコギの根茎及び根であるため、養液栽培での生薬生産は難しい。そこで、養液栽培で育てた苗を屋外環境へ馴化させ、圃場で栽培する方法を確立する必要がある。

4) エゾウコギの地下部が生育するまでには数年を要する。そこで、養液栽培で育てた植物体の葉を原料とする健康食品を開発し、栽培意欲を高める必要がある。その基盤として、葉の成分研究を行う必要がある。

以上の4項目を達成するため、栽培研究並

びに成分研究を行った。

B. 研究方法

1. エゾウコギの種子の発芽処理—養液栽培—圃場栽培

1) 材料

平成24年10月15日に医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部より供与された9系統の種子を発芽処理の研究に用いた。その内の5系統を播種し、養液栽培以降の研究に供した（表1）。

2) 方法

2.1) 発芽処理

富山県薬用植物指導センター及び昭和大学薬学部薬用植物園で、既報^{3,4)}を参考に、方法の一部を改変して後熟と休眠打破の処理を行った（平成24年11月9日）（図1）。

後熟促進処理

種子をジベレリン水溶液（100 ppm）に24時間浸漬した後、容器（直径9.5 cm、高さ16 cm、円柱型、プラスチック製、底には径2 mmの20個の穴）に容水量100%の礫（径：2~4 mm）を入れ、深さ約2.5 cmの位置に種子を保存した。保存期間は116日、温度は16℃とした。この期間中、通気操作として、中央部に穴（径：5 mm）を空けたフタを閉め、30 mLのプラスチック製注射筒を用いて、空気を送り込んだ（週1回、5分間、30 mL/分）。

休眠打破処理

後熟促進処理した種子を、カイネチン水溶液（200 ppm）に24時間浸漬した後、後熟促進処理と同様に礫の間に種子を保存した。保存期間は30日、温度は5℃とした。

2.2) 養液栽培

北陸機材（株）（富山市）の敷地内にユニットハウスを設置し、内部に養液栽培のための装置を組んだ。

播種

休眠打破処理が終わった種子にベンレー

トをまぶした後、精製水の入ったトレイ内に置かれているプラグ内の播種床（ウレタン）に1粒ずつ入れ、そのトレイを低温恒温器中（10℃→15℃）に収めた（平成25年4月26日）。

緑化

植物体に本葉が出ていることを確認した後、トレイを低温恒温器から取り出した。別のトレイに水を入れ、大塚SC処方1号を滴下してEC 0.7に調整した（pH 6.4～6.5）。この液肥入り溶液に、発根～緑化を始めた植物体が収まっているプラグを移し替えた。このトレイを栽培床の白色蛍光灯下に移動し、夜間点灯（16時間）、日中消灯を繰り返した。空調は18℃に設定した。液肥入り溶液は3日に一度交換した。その後、本葉が出揃った頃にEC 1.0に調整した。

育苗

本葉が大きくなった植物体から順次、ウレタンごと育苗棚（溶液循環式）に移動した。溶液はEC 1.0（pH6.5）。夏場に最高室温が30℃以上になったため、チラーで水温を17℃に制御した。

屋内馴化

ポット（4号）の底に軽石を入れ、その上に大玉の赤玉土を重ねた。このポットを、水の入った大型トレイに入れ、吸水させた。育苗棚から植物体を取り出し、根からポットに入れ、その回りに赤玉土をかぶせた。ポットからの土の流失を防ぐためポットの下からネットをかぶせ、これをプラグに入れ、馴化棚の循環溶液中に浸した（水温17℃、EC1.0）。

2.3) 屋外馴化～圃場栽培

屋外馴化は富山県薬用植物指導センター（富山市）で行い、圃場栽培は主として富山市粟巣野で実施した。

屋外馴化

馴化棚から植物体をポットごと取り出し、

下方から一部の葉を採取した後、植物体を薬用植物指導センターへ移動させた。ポット（4号）当たりIB化成を1粒/号入れた。その後、太陽光、特に紫外線に馴らすため、寒冷紗（50%遮光）を貼ったビニールハウス内で1週間、続けて直射日光が当たらない屋外に1週間置き、その後太陽光下へ移した（毎日散水）。平成25年12月初旬に積雪対策として、屋外からガラス温室（10℃）に移し、散水しながら植物体を育てた。翌年3月中旬に、紫外線への馴化のためビニールハウスに移動した。さらに、3月下旬に直射日光が当たらない屋外に移動し、自動散水した。4月初旬に屋外（日なた）の寒冷紗（50%遮光）を掛けた場所に移動し、下旬には南面にも寒冷紗を掛けた。その後、5月初旬に直射日光が当たらない屋外に移動、さらに中旬に太陽光下へ移した。屋外では毎日散水した。

圃場への定植

屋外馴化が終わった植物体について、平成26年5月下旬～6月中旬に圃場への定植を行った。圃場の場所及び個体数は次のとおり：富山県富山市粟巣野20株、同市大長谷3株、上市町薬用植物指導センター16株；北海道下川町15株、北海道15株；長野県菅平薬草栽培試験地5株；青森県八甲田4株。

粟巣野の圃場では、直径50cm、深さ50cmの穴を掘り、掘り起こした土と腐葉土2.5Lを混ぜて穴に入れ、バケツ1杯の水を加えた。その中にエゾウコギの苗を植え、土をかぶせた。1ヶ月に一度生育状況を確認し、11月下旬に越冬のための処置として素焼きの7号鉢または8号鉢をかぶせた。圃場の他、北陸機材のユニットハウス内にプランタを置き、腐葉土と赤玉土を入れて、6株を育てた。

2. エゾウコギの挿し穂栽培

1) 材料

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部で栽培されているエゾウコギの当年枝を1株あたり5～7本採取した（平成25年11月中旬）。枝の水揚げを確認した後、切り口を脱脂綿で包み、富山市に郵送さ

れた。挿し穂 85 本を新聞紙に包んだまま冷蔵庫 (5℃) で保管した。

2) 方法

平成 26 年 2 月 26 日に挿し穂を行った。先ず挿し穂用の土を 3 種類用意した：1) 硬質鹿沼土 3:日向土 1(9 穴プラグ×21 プラグ)、2) 硬質鹿沼土 3:富士砂 1 (2 プラグ)、3) ハイドロボール (2 プラグ)。各プラグをトレイに入れ、トレイに水をはった。

エゾウコギの枝を鋭利なカッターで、1 芽を残しながら長さ 10 cm 程度に切り、切り口に切り返しを入れた。その後、ベントレート (1000 倍液) に浸けた。

プラグに土を入れ、芽の位置が縁から 3~5 cm 上に位置するように枝を配置し、土をプラグいっぱいに入れた。9 穴が埋まった段階で、養液栽培棚に移動した。給水方法として、1 時間給水、23 時間閑水を繰り返した。3 月 11 日時点の栽培条件は次のとおり：空調の設定温度：17℃；白色蛍光灯の照射時間：20:00~翌日 8:00 (12 時間照射)、反射材なし、両端の蛍光灯 2 本のみ点灯；給水方法 給水時間：10:00~12:00、排水時間：12:00~翌日 10:00、ただし 4 月 3 日から給水方法を変更し、日中に給水、夕方以降に排水することとした。

7 月 10 日に挿し穂のうち発根が確認できた 12 株を土から抜いて播種からの栽培を行っている水耕の育苗棚に移動した。

10 月 21 日：径 12 cm のポットの底に滅菌した軽石をひき、滅菌した赤玉土の小粒と中粒の混合物 (2:1) をつめ、その中に発根部をよく洗った枝を植えて、ポットの下からネットをかぶせた。それを養液栽培棚にセットした。養液は EC1.0 に調整し、水温 20℃にして環流させた。水位は低めに設定した。白色蛍光灯の照射時間は 11 月 21 日まで 20:00~翌日 8:00 としたが、この日以降 7:00~19:00 に変更した。また、蛍光灯は 12 月 22 日以降、2 本から 3 本に増やした。設定温度は、11 月 21 日~12 月 1 日まで 22℃、12 月 1 日以降 20℃とした。

3. エゾウコギの葉の成分探索

1) 材料

養液栽培で得られた葉：屋外馴化を行う前に植物体の下方から葉 (2~3 枚/株) を採取した (平成 25 年 10 月 17 日)。それを屋内 (25℃) で乾燥した。新鮮重量 48.00g、乾燥重量 7.98g、歩留まり 16.6%。

屋外馴化栽培で得られた葉：屋外馴化を約 2 ヶ月間行って落葉した葉を 12 月 11 日に入手した。葉は屋内で乾燥した。乾燥重量 4.60g。

野生のエゾウコギの葉：中国黒竜江省五大蓮池付近で収集したエゾウコギ (K. Komatsu et al. HJN110, 2014, 7.22) の葉。

北海道で栽培されたエゾウコギの葉：薬用植物資源研究センター北海道研究部から得た当年枝 (平成 25 年 11 月中旬) を冷蔵保存 (5℃) 後、挿し穂用に調製した際 (翌年 2 月 26 日) に不用となった葉を乾燥した。

標準品：rutin (和光純薬工業)、hyperoside (常磐植物化学研究所) を用いた。rutin は 0.06 mg/mL のメタノール溶液、hyperoside は 0.03 mg/mL のメタノール溶液として調製した。

試薬：水は Milli-Q 水、有機溶媒は断りがなければ和光純薬工業製特級溶媒、formic acid は和光純薬工業製特級を用いた。LC/MS 用の有機溶媒は和光純薬工業製 LC/MS グレード、LC/MS 用の水は和光純薬工業製の純水を用いた。

2) 方法

2.1) 試料溶液の調製

乾燥した葉の粉末 50 mg に 50%メタノール 10 mL を加え、室温で 20 分間超音波 (4000 rpm) 抽出し、上澄み液を分取する操作を 2 回行った。上澄み液を合わせ、溶媒を減圧除去して得た乾燥エキスを 50%メタノール 10 mL に溶解し、0.2 μm のフィルターを通した後、LC/MS 用試料とした。

2.2) MS 検出高速液体クロマトグラフィー分析

MS 検出高速液体クロマトグラフは、Agilent 社製 HP1100 HPLC システム (photodiode array 検出器付き) と Blucker 社製 Esquire3000 plus 質量分析計で構成した。分析条件は次のとおり：溶媒 A、water/formic acid (1000 : 1 v/v)；溶媒 B、acetonitrile/formic acid (1000 : 1 v/v)；流速、0.8 ml/min；グラジエント、5-20% B for 20 min、20-22% B for 6 min、22-35% B for 9 min、35-38% B for 10 min、38-80% B for 15min、then keep 80% B for 5 min；カラム、YMC ODS-AQ、250×4.5 mm、5 μm；カラム温度、40℃；イオン化法、ESI (positive-negative 交互測定)；質量観測範囲、m/z 50-1500；検出器、イオントラップ；MS 分析データを取得。

2.3) ピークの同定

Rutin と hyperoside の同定は、HPLC クロマトグラムにおける保持時間と UV スペクトルを標準品と比較して行った。その他の化合物は、保持時間、UV スペクトル及び MS2 または MS3 データを解析し、文献値⁵⁾と比較して同定した。

C. 研究結果

1. エゾウコギの種子の発芽処理—養液栽培—圃場栽培

1) 発芽処理

後熟促進処理後の種子では、胚の成熟に伴い種子が膨張し、内果皮が割れた状態(芽切り)となった。切断面の観察では、胚が成熟したことにより、子葉が形成されていた(図1)。9系統の種子の内、系統 No.2 と No.10 の芽切り種子の割合が高く、約 30%に達した。一方、No.7、8 では 0%または約 2%であった。約 3800 粒の種子に発芽処理を施し、その内平均約 13%が播種可能になった。

2) 養液栽培

栽培経過を図2に示す。平成25年4月26日に薬用植物指導センターで休眠打破処理

が終了した5系統 (No.1、2、3、6、10) の種子を播種した。5月8日に発根が見られたが、発根率には系統間の差異が見られ No.10 が最も発根率が高かった (144 個体中 58 個体が発根)。6月3日に2個体で本葉を確認できたため、6月6日にトレイを低温恒温器から出し、トレイ内の水を液肥入り養液に替えた。これを栽培床の白色蛍光灯下に移動し、観察を続けた。6月19日には20個体で本葉を確認できたが、本葉の色が淡緑色であったため、栽培床の中央の蛍光灯をはずすことにした。6月24日~7月22日、植物体の本葉が大きくなったものから順次、育苗棚に移動した。系統 No.10 では 144 個体中 24 個体が育苗までに至った。各系統の育苗までに至った個体数と育苗開始日については表1参照。

7月4日、新たに薬用植物指導センターで休眠打破処理が終了した系統 No.10 及び昭和大学薬用植物園で同処理が終了した系統 No.1、2、3 を播種し、同様な方法で栽培して、発根—発芽—緑化—本葉形成—育苗までの経過を観察した。昭和大学薬用植物園で処理した種子では育苗まで至る個体が多く、No.1 で 96 個体中 32 個体、No.3 で 48 個体中 25 個体であった。

育苗棚では植物体が順調に生育したが、室内温度を 18℃に設定したにもかかわらず7月に入ると 30℃以上に達したためチラーを設置し、7月16日から水温を 17℃に制御した。これにより植物体は萎れることなく生長し、8月21日には植物体の高さが 30 cm 程度まで達し、上部の棚につかえるものが数個体観察された。

9月18日には育苗棚に植物体が約 100 個体確認できた。それらの内、9月18日に 19 個体、9月25日に 11 個体をポットに植え替え、馴化棚に移動して、育苗棚と同じ組成の養液を循環させた。植え替えの際、地下部を観察すると、根は複数でひげ根状、長さ 15 cm 以上あり、3本ほどの根が太かった。馴化棚では植物体はさらに伸長を続け、10月2日の観察では茎の高さ約 50 cm の植物体が観察された。

以上、播種した種子 611 粒の内、育苗まで

至ったものは 100 個体であり、その割合は 16.4%であった。育苗まで至った植物体については屋外馴化までを順調に行うことができた。

3) 屋外馴化～圃場栽培

10月18日、馴化棚から植物体30個体(A群)を出し、薬用植物指導センターに移動させた。さらに11月6日に58個体(B群)を移動させた。残り11個体は生長不十分であったため、屋外へは移動させなかった。薬用植物指導センターでは10日間50%寒冷紗を貼ったビニールハウス内に植物体のポットを置き、続けて直射日光が当たらない屋外に1週間、その後太陽光下に移動させた。11月24日、A群で少し落葉が始まり、12月4日にはすべて落葉した。B群では植物体には葉がついたままだった(図3)。12月4日にすべての植物体をガラス温室(10℃)に移した。平成26年1月15日、A群では植物体で芽が動き出したものがあった。地下部に直径2～3mm程度の根が数本認められた。B群の植物体でもほぼ落葉した。

3月15日時点で、A群の植物体では葉を旺盛に展開しており、一方B群の植物体では2～3枚の葉が出ている程度であった。アブラムシの発生が見られ、また紫外線への馴化もあったため、3月17日に鉢植えの株をすべてビニールハウスへ移動した。3月21日に直射日光が当たらない屋外、4月7日に寒冷紗を掛けた屋外の日なたに移動し、順化させた。4月14日頃から葉の変色や、葉が葉柄から萎れたような状態が始まり、これが進行して落葉したため、紫外線障害と考え、4月30日に鉢の南面にも寒冷紗を掛けた。この時、株には新しい葉の芽生えが観察できた。5月7日に直射日光が当たらない屋外、5月13日に太陽光下へ移動した。

富山市粟巣野の圃場には、5月29日に20株を定植した。植物体はすべて根付いたが、生育は緩慢であり、7月30日時点で葉が出ていないものが約半数あった。9月7日、葉が落ちている株に大きな芽が付いていた。定植後、何度も葉を落として新しい葉を出し

ているようであった。11月21日にすべての株が生きていることを確認してから素焼きの鉢をかぶせて越冬させた。富山市大長谷でも定植した3株がすべて圃場で育った。一方、ユニットハウス内のプランタで育てた6株では、葉が落ちることはなかったが、生育は遅く、葉の色も悪くなり、1株において葉が枯れた。

2. エゾウコギの挿し穂栽培

平成26年2月26日にプラグ内の土中に挿した枝(穂)は3月11日には8～9割の枝で芽が緑色になり大きくなっていた(図4)。さらに約1割の枝では葉を展開していた。土の組成の違いによる生育の差は見られなかった。水温は定期的に10℃以下になっているが、養液栽培棚の水が抜けセンサーが空気に触れた時に25℃を超える時間帯が発生した。3月24日には植えた挿し穂225本のうち1本以外はすべて葉が展開した。しかし、3月31日に全体の3割程度で、新芽の枯れや小さな新葉の萎れが見られた。葉の縮れ対策として4月3日から日中の冷房時に給水し、夕方以降は排水することにした。ハイドロボールに植えた挿し穂から新芽・新葉の萎れや枯れが見られ、4月22日には葉が健全に育っている挿し穂は2～3割程度に減少し、28日には1割になった。5月13日の観察では13株(鹿沼土3:日向土1が12株、鹿沼土3:富士砂1が1株)が生き残り、6月2日には12株になった。

7月10日にこの12株を土から抜いて、水耕の育苗棚に移した。これにより、同時期に播種から育苗していた植物体と同様、根に藻が付着して生育障害を起こすことになった。そこで、10月21日に育苗棚から挿し穂を抜いて根を十分に洗い、藻を取り除いた後、再度赤玉土に植えて養液栽培を行った。しかし、27年2月現在、約半数の挿し穂が枯れてしまった。

3. エゾウコギの葉の成分探索

イオントラップ型マススペクトロメーターを用いてLC/MS分析を行った。0.1%ギ酸水

溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液の系によるグラジエント分析を行ったところ、比較的良好に分離した(図5)。各ピーク成分の良質なMSスペクトルが得られたことから、HPLCにおける保持時間やUVスペクトル、MS2またはMS3データを解析し、文献値⁵⁾と比較して同定した。各ピークはカフェオイルキナ酸類の8化合物[5-caffeoylquinic acid(3); 1,3-*O*-dicaffeoylquinic acid(6); 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid(10); 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid(11); malonyl-3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid(12); 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid(13); malonyl-4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid(14); dimalonyl-*O*-dicaffeoylquinic acid(15)]、フラボノイドのrutin(8)とhyperoside(9)であった(図6)。保持時間4.0~5.0分に見られるピークの化合物を明らかにするため、50%メタノールエキスをRP-SPEカラムに付し、水で溶出し、その画分から化合物PXを単離した。PXの¹H-NMRデータから、オリゴ糖であることが示唆された。ピーク17はサポニン成分であり、現在検討中である。

次に、養液栽培の植物体から(屋内馴化の時)得られた葉(図5-a)及び屋外馴化栽培を約2ヶ月間行った植物体の葉(図5-b)のHPLCクロマトグラムを、中国で採集した野生のエゾウコギの葉(図5-c)及び北海道で栽培されたエゾウコギの当年枝に付いていた葉(冷蔵保存3ヶ月)(図5-d)と比較した。その結果、aのクロマトグラムはdのクロマトグラムと類似し、11と12が主ピークでフラボノイドのピークは低いのに対し、bのクロマトグラムはcのクロマトグラムと類似し3及び9の増加が見られた。

D. 考察

1. エゾウコギの種子の発芽処理—養液栽培～圃場栽培

薬用植物指導センターで後熟処理及び休眠打破処理を行った種子では、発根率や育苗まで至った個体数に系統間の差違が見られ、No.10が良好でNo.1やNo.3は劣った。一方、

昭和大学薬用植物園で同処理を行った種子では、No.1とNo.3で育苗まで至った個体数が多かった。両機関の方法を比べた場合、後熟処理の期間、休眠打破処理の期間がともに後者の方が長かった。発根率を高め、種苗数を増やすためには、この段階が重要であることが示唆された。また、種子が芽切り状態に至る期間に個体差があり、74日~116日の変動があった。発芽処理を行う種子には完熟した種子を用いることが肝要であろう。

種子の発根・発芽から緑化工程を経て育苗まで至った植物体は、播種した611粒中、100個体で成功率は16.4%であった。成功率を高める養液栽培法を再度、考える必要がある。平成26年度の養液栽培では植物体の根に藻が生えて、茎が伸長しないという現象が起こった。植物体は未だ生きているため屋外での土壌栽培に切り替える予定であるが、養液栽培を再現性良く行えるプロトコルの作成を目指したい。

養液栽培で生育させた植物体の屋内馴化と屋外馴化(越冬処置を含む)はほぼ順調で、84個体を圃場栽培まで引き継ぐことができた。その内23個体は富山市粟巣野及び大長谷の圃場に定植し、ほぼ順調に生育させることができた。一方、ユニットハウスで栽培した植物体では生育が悪かった。屋内で栽培した6株は20℃前後の温度下で、白色蛍光灯を16時間照射しながら、週1回散水して育てたが、生育不良であったことから、太陽光の必要性が示唆された。

夏場に高温になり、日射が厳しい富山県の標高約500~700mの地点で、エゾウコギの圃場栽培が行えるかどうか、今後も生育を観察する予定である。また、北海道で栽培している植物体との生育状況並びに地下部の成分に関する比較も今後行う予定である。

その他、秋に採取した当年枝から挿し穂を調製し、225個体を3種類の土に挿し、養液栽培を実施した。しかし、発根が観察され、最終的に生き残った枝は12個体であった。土として鹿沼土3:日向土1が最も適していることがわかったが、給水—排水の時間割、白色蛍光灯の照射期間、水温・室温などにつ

いて今後も継続して検討する予定である。

2. エゾウコギの葉の成分探索

エゾウコギの葉の成分研究では、フラボノイド、カフェオイルキナ酸類、多糖類及びアミノ酸の含有が報告されており^{6,7)}、根茎の主要成分である eleutheroside B、eleutheroside E 及び isofraxidin の報告はない。今回の結果においても、フラボノイドやカフェオイルキナ酸類は検出できたが、eleutheroside 類は検出されなかった。しかし、カフェオイルキナ酸類には神経保護作用⁸⁾、抗酸化作用⁹⁾など、フラボノイドの rutin や hyperoside には抗酸化作用、抗炎症作用¹⁰⁾などが報告されており、健康食品として十分開発できる可能性がある。今回、養液栽培後、屋外で約 2 ヶ月間馴化栽培した葉で、5-caffeoylquinic acid 及び hyperoside の増加が認められた。フラボノイドは太陽光 (UV) から植物体を守るために生産されることはよく知られているが、caffeoylquinic acid についても同様であることが報告されている¹¹⁾。フラボノイドの hyperoside は、養液栽培により得られた植物体の葉では明らかに少ないが、カフェオイルキナ酸類は様々なものが含まれていた。さらに、未同定ではあるがサポニン成分も検出された。今後、これらの成分を含む葉のエキスの生物活性を調べ、健康食品原料になるか否かを明らかにしていく計画である。なお、hyperoside や 5-caffeoylquinic acid の効果を期待するのであれば屋外栽培で得られる葉の利用も考えた方がよいであろう。

E. 結論

1. エゾウコギの種子の発芽処理—養液栽培～圃場栽培

自然環境下では種子の発芽に約 1 年間半を要するエゾウコギの種子に対し、本研究で用いた後熟促進処理及び休眠打破処理を行うことにより、約半年に短縮できた。この種子を閉鎖環境下で養液栽培して、発根・発芽、緑化、育苗、屋内馴化、屋外馴化（越冬処置を含む）までの工程を行い、種子 611 粒中

84 個体を植物体まで生育させることができた。さらに、5月に富山県などの圃場に定植させることができた。富山市粟巣野及び大長谷で圃場栽培した 23 個体の生長経過はほぼ良好であった。播種から育苗に至るまでの成功率は 16.4%であり、育苗できた植物体の 84%が圃場まで移行できた。種子の発芽率や育苗成功率を上げることが課題として残されたが、一連の栽培方法はほぼ確立できた。次に、挿し穂による養液栽培も試みた。挿し穂に適した土壌を選択できたが、発根率は 6%程度であり、方法は確立できていない。

2. エゾウコギ葉の成分探索

エゾウコギの葉の LC/MS 分析を行い、カフェオイルキナ酸類 8 化合物、フラボノイド 2 化合物を同定した。養液栽培したエゾウコギの葉の主要な成分は、3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid 及び malonyl-3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid であった。養液栽培後、屋外で約 2 ヶ月間馴化、栽培した植物体の葉では、hyperoside 及び 5-caffeoylquinic acid が増加した。その他にオリゴ糖やサポニン成分も含まれていた。これらの成分の存在から、健康食品として利用は十分可能である。

F. 参考文献

- 1) Tohda, C., Ichimura, M., Bai, Y. J., Zhu, S., Tanaka, K., Komatsu, K.: Inhibitory effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts on amyloid b(25-35)-induced neuritic atrophy and synaptic loss, *J. Pharmacol. Sci.*, 107, 329-339 (2008).
- 2) Bai, Y. J., Tohda, C., Zhu, S., Hattori, M., Komatsu, K.: Active components from Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) for protection of amyloid b(25-35)-induced neuritic atrophy in cultured rat cortical neurons, *J. Nat. Med.*, 65(3-4), 417-423 (2011).
- 3) 磯田進, 庄司順三: エゾウコギの栽培研

- 究 (第 I 報) 後熟と休眠打破について, 生薬学雑誌, 43(1), 71-77 (1989).
- 4) 磯田進, 庄司順三: エゾウコギの栽培研究 (第 II 報) 発芽と育苗について, Nat. Med., 48(1), 75-81 (1994).
- 5) Clifford, M. N., Wu, W. G., Kirkpatrick, J., Kuhnert, N.: Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal *Chrysanthemum* by LC-MSⁿ, J. Agric. Food Chem., 55, 929-936 (2007).
- 6) Zhou, H., Xing, J., Liu, S., Song, F., Cai, Z., Pi, Z., Liu, Z., Liu, S.: Screening and determination for potential alpha-glucosidase inhibitors from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by using UF-LC/MS and ESI-MS(n), Phytochemical Analysis, 23(4), 315-323 (2012).
- 7) Zhou, H., Liu, Z., Zheng, Y., Liu, S.: The fingerprints of leaves of *Acanthopanax senticosus* by HPLC-UV and ESI-MS, Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 29(6), 321-326 (2008).
- 8) Kim, J. Y., Lee, H. K., Hwang, B. Y., Kim, S., Yoo, J. K., Seong, Y. H.: Neuroprotection of *Ilex latifolia* and caffeoylquinic acid derivatives against excitotoxic and hypoxic damage of cultured rat cortical neurons, Archives of Pharmacal Research, 35(6), 1115-1122 (2012).
- 9) Akihisa, T., Kawashima, K., Orido, M., Akazawa, H., Matsumoto, M., Yamamoto, A., Ogihara, E., Fukatsu, M., Tokuda, H., Fuji, J.: Antioxidative and melanogenesis-inhibitory activities of caffeoylquinic acids and other compounds from moxa, Chemistry & Biodiversity, 10(3), 313-327 (2013).
- 10) Kim, S. J., Um, J. Y., Lee, J. Y.: Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor- κ B activation in mouse peritoneal macrophages, The American Journal of Chinese Medicine, 39(1), 171-81 (2011).
- 11) Mondolot, L., La Fische P., Buatois, B., Talansier, E., de Kochko, A., Campa, C.: Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development, Annals of Botany, 98(1), 33-40 (2006).
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
- 1) 葛躍偉、村上守一、田村隆幸、川本元裕、磯田進、朱姝、吉松嘉代、小松かつ子: Chemical constituents analysis of the leaf of *Eleutherococcus senticosus* cultivated in different environment. 第 31 回和漢医薬学会学術大会 (2014. 8. 31、千葉)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 種子発芽—緑化—本葉形成—育苗—馴化までの生存個体数の推移

系統 No. -トレイ No.	種子数 (プラグ数)	育苗棚 個体数	育苗 開始日	馴化棚 個体数	屋外馴化 個体数
薬用植物指導センター処理種子(4.26 播種)					
1	48	1	7.8	1	0
2-1	48	5	7.15-7.16	5	4
2-2	48	3	7.8-7.22	3	2
3	35	1	7.8	1	1
6	48	6	7.1-7.16	6	5
10-1	48	1	7.1	1	1
10-2	48	15	6.24-7.2	15	15
10-3	48	8	6.27-7.8	8	8
薬用植物指導センター処理種子(7.4 播種)					
10-4	48	2	7.29-9.7	2	1
昭和大学薬用植物園処理種子(7.4 播種)					
1-1	48	19	7.22-9.7	19	17
1-2	48	13	7.26-9.7	13	11
2	48	1	8.18	1	0
3	48	25	7.22-9.7	24	23
合計	611	100		99	88*

*11個体は11.16時点で生長が不十分なため屋外に移動しなかった。

目的: 胚の成熟及び休眠打破のための処理を行い、発芽までの期間を短縮する。

方法

後熟促進処理

11.9, 2012

①種子を、ジベレリン水溶液(100 ppm)に24時間浸漬

②容器(右図)に容水量100%の礫(径:2~4 mm)を入れ、深さ約2.5 cmに種子を保存

15°C

120日間

通気処理

休眠打破

3.5, 2013

5°C

30日間

①後熟促進処理した種子を、カイネチン水溶液(200 ppm)に24時間浸漬

②後熟促進処理と同様に礫の間に種子を保存

播種

4.26



容器:

直径 9.5 cm、高さ 16 cm の円柱型のプラスチック容器

※底に径 2 mm の20個の穴が開けられている。



後熟促進処理 83日後



種皮を除いた切断面

胚が成熟し、子葉が形成されている

図1 エゾウコギの発芽処理

2013, 4.26



滅菌処理



低温恒温器



5.8 から発根

6.24



7.3



7.30



8.21



植物体を循環式育苗棚に移動 液肥入り溶液を循環; 夜間照明(白色蛍光灯); チラーで水温制御

9.18



9.18



18株を馴化

10.2



馴化棚で栽培

10.17



図2 エゾウコギの養液栽培～屋内馴化

富山県薬用植物指導センター（上市町）

2013, 11.24 A群: 10.18上市移動分 B群: 11.6上市移動分



屋外

ガラス温室

2014, 1.15 A群



3.15 A群



B群



富山市粟巣野での圃場栽培

2014, 5.29 定植(20本)



7.30



富山市粟巣野

2014, 9.7



10.9



北海道

9.18



ユニットハウス内

7.10



9.5



富山市大長谷

7.23



11.10



8.8



10.21



図3 エゾウコギの屋外馴化～圃場栽培



図4 エゾウコギの挿し穂による栽培

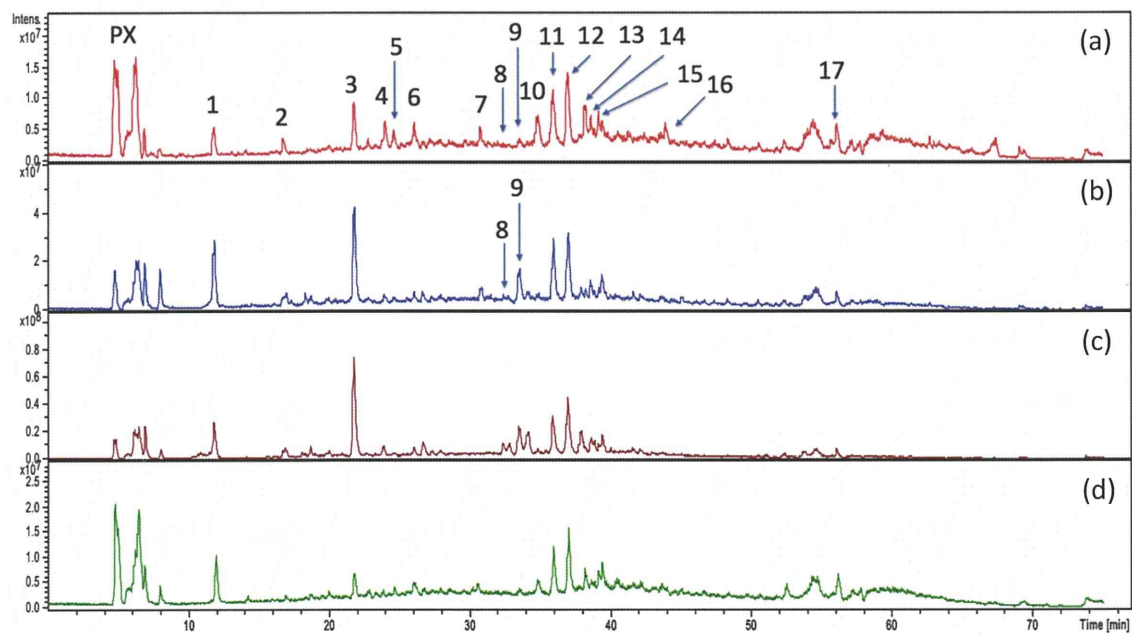
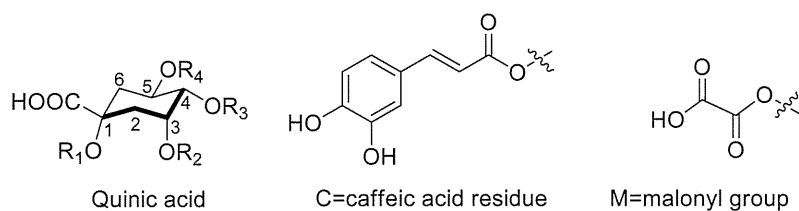


図5 異なる環境で生育したエゾウコギの葉の50%メタノールエキスのHPLCクロマトグラム
(a) 養液栽培の植物体から得られた葉, **(b)** 養液栽培後、屋外馴化を約2ヶ月間行った植物体の葉, **(c)** 中国黒竜江省で採集したエゾウコギの葉, **(d)** 北海道で栽培された植物体から得られた葉.
 化合物1~17: 図5参照、PX: oligosaccharides (測定波長254nm)



Peak	Compound	R1	R2	R3	R4
3	5-Caffeoylquinic acid	H	H	H	C
6	1,3-O-Dicaffeoylquinic acid	C	H	C	H
10	3,4-O-Dicaffeoylquinic acid	H	C	C	H
11	3,5-O-Dicaffeoylquinic acid	H	C	H	C
12	Malonyl-3,4-O-Dicaffeoylquinic acid	H	M-C	C	H
13	4,5-O-Dicaffeoylquinic acid	H	H	C	C
14	Malonyl-4,5-O-Dicaffeoylquinic acid	H	H	C	M-C
15	Dimalonyl-O-Dicaffeoylquinic acid				

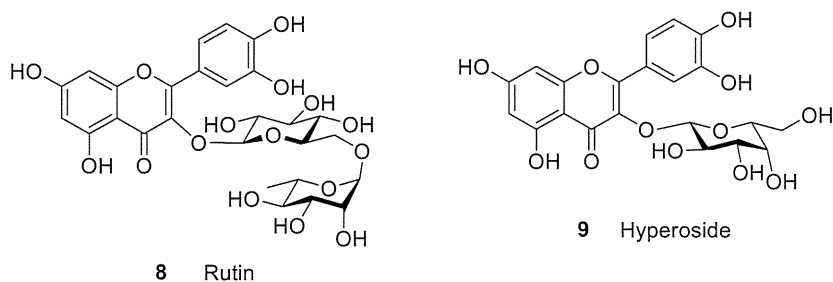


図6 同定された10化合物の構造式

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉松嘉代	薬用植物組織培養物コレクションについて	日経バイオテクオンライン GreenInnovation	219		2012
吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸	植物工場での甘草生産に適したウラルカンゾウの選抜と育成	ブレインテクノニュース	149	1-9	2012
吉松嘉代	甘草の水耕栽培 薬用植物資源の保護と確保	ファルマシア	49	141-146	2013
吉松嘉代	植物工場における薬用植物優良苗の育成と生産	SHITA REPORT No. 30, 日本生物環境工学会, 京都		13-21	2013
Sun, R., Hikosaka, S., Goto, E., Sawada, H., Saito, T., Kubo, T., Ohno, T., Shibata, T., Yoshimatsu, K.	Effect of UV irradiation on growth and concentration of four medicinal ingredients in Chinese Licorice (<i>Glycyrrhiza uralensis</i>)	Acta Horticulturae	956	643-648	2012
Watanabe-Ishizuka, A., Akiyama, H., Kondo, K., Obitsu, S., Kawahara, N., Teshima, R., Goda, Y.	Determination of Cyanogenic Glycoside Linamarin in Cassava Flour using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	Jpn. J. Food Chem. Safety	19	38-43	2012
Watanabe, S., Taguchi, H., Temmei, Y., Hirao, T., Akiyama, H., Sakai, S., Adachi, R., Urisu, A., Teshima, R.	Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction	J. Agric. Food Chem.	60	2108-2115	2012