

Fig. 4-B Example of direct sequencing Electropherogram of *E. equisetina* from China and Mongolia.

Y: C and T S: C and G K: G and T R: A and G M: A and C W: A and T

Subtype B is complex ITS1 peaks from 808th position by overlapping of peaks from two different bases. The 2nd peaks determined to have high homology with AY394073 (*E. equisetina*), the main peaks determined to have high homology with GU968572 (*E. equisetina*).

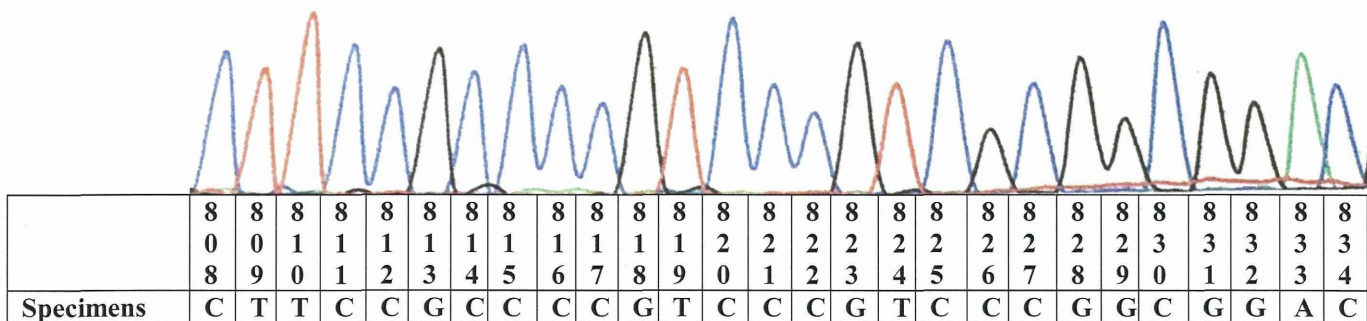


Fig. 5 Example of direct sequencing Electropherogram of *E. major ssp. procera* from Turkey and France.

E. major ssp. procera had single peaks from 808th in ITS1 region.

Species	Total length	Nucleotide positions ^a																						
		63	96-97	116	139	b	180	216	268	278	325	327	395	b	474	489	507	535	563	579	589	597	604	766
<i>E. major</i> ssp. <i>major</i> (GU968557, Algeria)	1098 bp	C	AA	A	T	G	T	T	C	A	A	-	T	AA	T	T	T	A	A	A	T	C	C	A
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens from Turkey)	1121 bp	T	TG	A	G	-	C	C	T	T	G	C	A	--	C	C	C	G	C	T	C	T	G	T
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens from France)	1121 bp	T	TG	R	G	-	C	C	T	T	G	C	A	--	C	C	C	G	C	T	C	T	G	T

	769	771-773	776	792	800-825	b	829	836	840	879	900	919	968	980	983	987-988	999	1079	1105	1111	DDBJ accession No.
<i>E. major</i> ssp. <i>major</i> (GU968557, Algeria)	C	ACA	T	T	-----	C	T	T	C	-	G	T	A	T	G	AT	A	A	T	T	
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens, Turkey)	T	GTG	C	C	#	-	G	C	T	C	A	C	G	C	G	GC	T	C	C	C	LC010497
<i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> (Specimens, France)	T	GTG	C	C	#	-	G	C	T	C	A	C	G	C	R	GC	T	C	C	C	LC010498

Table 2 Nucleotide differences in ITS1 region of *E. major* ssp. *procera* and *E. major* ssp. *major*

#: AAT GGG GCC TTC CGC CCC GTC CCG TC

^a: The number are counted for the 5' - terminal of AY394073

^b: Insertion

Species	Genotype	Total length	Nucleotide positions ^a													DDBJ accession No.
			186-194	744	796	907	1036	1160	1602	1630	1864	2014	2146	2153	2194	
<i>Ephedra equisetina</i> (AB453795, Mongolia)		2307 bp	-----	A	G	C	T	A	A	C	C	G	C	T	A	
<i>E. equisetina</i> (specimens, China)		2307 bp	-----	*	*	*	*	*	G	*	A	*	*	*	*	LC010496
<i>E. major ssp. procera</i> (Specimens, Turkey)	M-1	2307 bp	-----	G	A	T	C	C	*	*	*	*	G	C	G	LC010493
<i>E. major ssp. procera</i> (Specimens, Turkey)	M-2	2316 bp	TTTTCAATG	G	A	T	C	C	*	*	*	C	G	C	G	LC010494
<i>E. major ssp. procera</i> (Specimens, France)	M-2	2316 bp	TTTTCAATG	G	A	T	C	C	*	A	*	C	G	C	G	LC010495

Table 3 Nucleotide differences in *trnK* intron region of *E. equisetina* and *E. major ssp. procera*

-: Deletion *: Same as top column

^a: The number are counted for the 5'- terminal of AB453795

Specimens, China: 71032, 71121, 71123, 71201, 71202, 71203, 71204, 71301, 06c3049, 06c3051, 06c3056, 06c3092, 06c3094, 06c3095, 02136, 02612-1, 02612-2, 02303-1, 02304, 02305, 02356, 02359, 90815104, 90815105, 1007224, 1007226, 1007227

Specimens, Turkey, M-1: U62902, U62903, U62904, U70101, U70102

Specimens, Turkey, M-2: U120330, U120620, U62921, U62922, U62923, U62901, U62905, U62906, U63001, U63002, U63003, U63004, U63005, U63006,

U63007, U63008, U63009, U63010

Specimens, France, M-2: U201209031

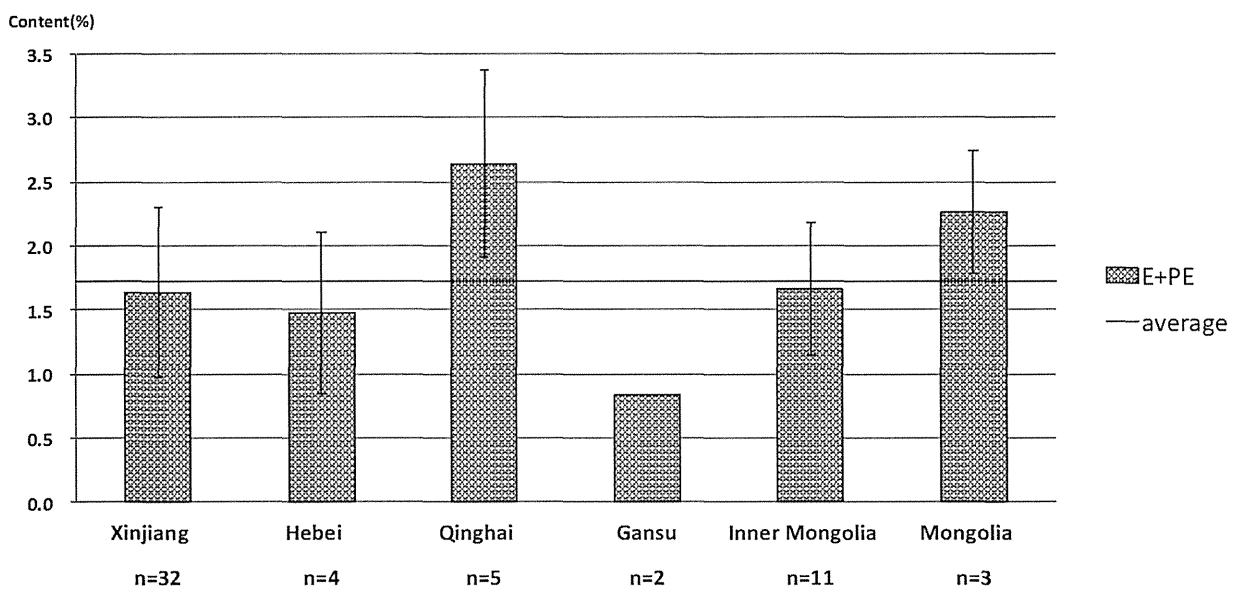


Fig. 6-A Ephedrine and pseudoephedrine contents of *E. equisetina* from China and Mongolia

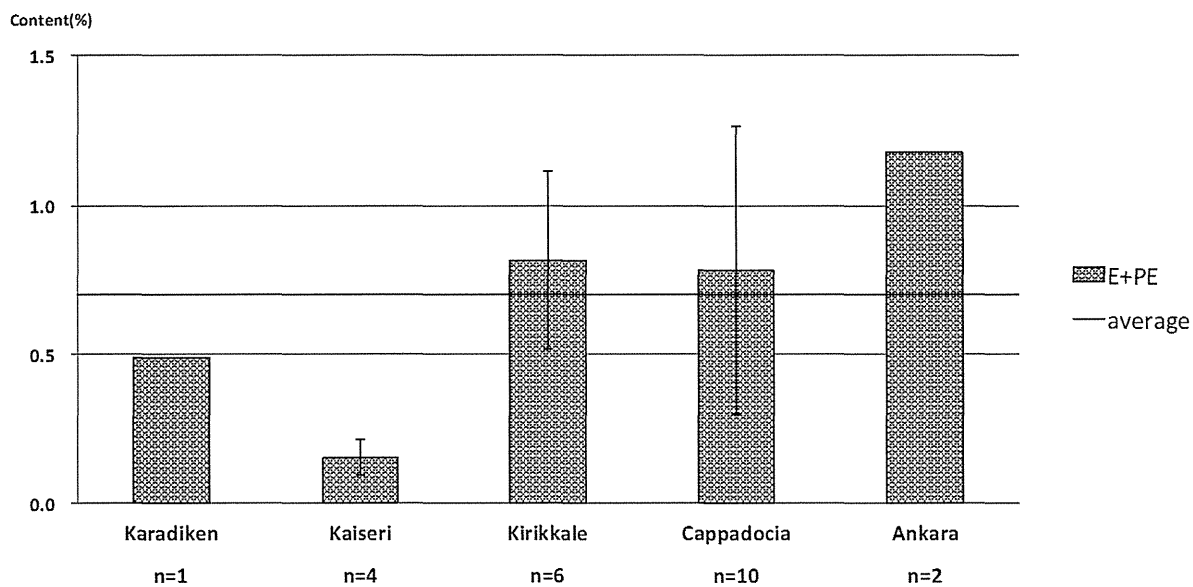


Fig. 6-B Ephedrine and pseudoephedrine contents of *E. major ssp. procera* from Turkey

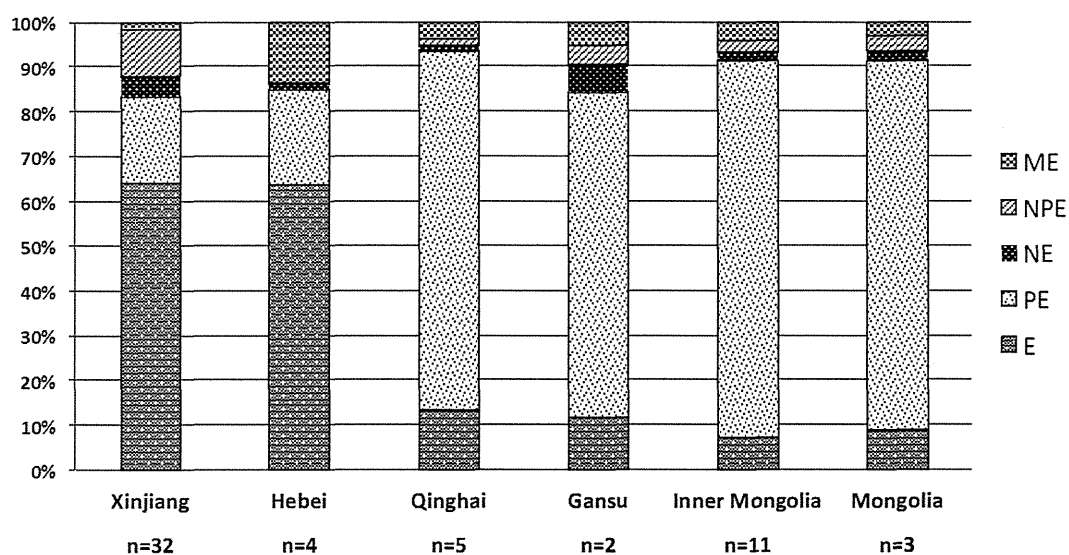


Fig. 7-A Ratio of five constituents of *E. equisetina*; Ephedrine (E), Pseudoephedrine (PE), Norephedrine (NE), Norpseudoephedrine (NPE), Methylephedrine (ME)

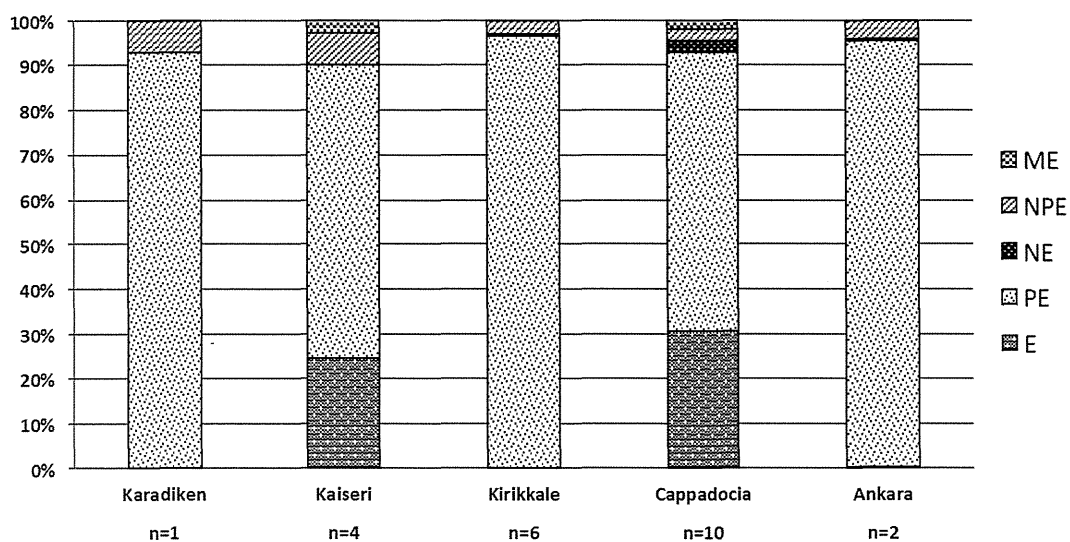


Fig. 7-B Ratio of five constituents of *E. major ssp. procera*; Ephedrine (E), Pseudoephedrine (PE), Norephedrine (NE), Norpseudoephedrine (NPE), Methylephedrine (ME)

薬用植物研究（投稿中）

マオウ属植物の栽培研究（第4報）¹⁾
草質茎の挿し木法の検討（1）

野村行宏¹⁾，佐々木陽平¹⁾，三宅克典¹⁾，御影雅幸²⁾

1) 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科創薬科学専攻分子生薬学研究室

2) 東京農業大学農学部バイオセラピー学科植物共生学研究室

Studies of Cultivation of *Ephedra* Plants (part 4). Multiplication of *Ephedra* plants from herbal stem cuttings

Yukihiro Nomura¹⁾, Yohei Sakaki¹⁾, Katsunori Miyake¹⁾ and Masayuki Mikage²⁾
*

1) Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University
Laboratory of Molecular Pharmacognosy, Graduate School of Medical Sciences,
Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, 920-1192 Japan

2) Laboratory of Plant Conservation, Department of Human and Animal-Plant
Relationships, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture.
1737, Funako, Atsugi, Kanagawa, 243-0034 Japan

要旨：マオウ属植物 *Ephedra sinica* Stapf を始めとする株の草質茎を用いた挿し木法を検討した。従来，草質茎を用いた挿し木は困難であるとされてきたが，人工気象器内に，25℃，25,000～30,000ルクス 24時間照射の条件下で保管することにより容易に発根した。発根率は80%を超え，ビニールハウス内に保管するよりもはるかに効率がよかった。さらに，挿し木の時期については新梢が伸び切る初夏から晩秋まで可能で，挿し穂は長い必要はなく，10cm程度でも可能であることが明らかになった。一方，発根率には種間差が認められ，また同種間でも個体差があることが明らかになった。

Multiplication by herbal stem cuttings of *Ephedra* species including *E. sinica* Stapf and other 2 species were examined. As a result, the cuttings showed rooting in the plant growth chamber, under the conditions of 25℃, lighting 25,000～30,000 lx for 24 hours, though it had been reported that the multiplication by herbal stem of *Ephedra* plants was difficult. The rooting ratio of cuttings in the plant growth chamber, more than 80 %, was much higher than in a simple green house. Moreover, the multiplication could be done from early summer to late

autumn, and 10 cm long of cutting was enough for multiplication. On the other hand, the rooting ability was different with species and even in individuals among the same species.

葛根湯などに配合される漢方生薬「麻黄」は、現在日本では全量を中国からの輸入品に依存している。一方、原産国の中国では野生資源が減少し、1980年代から主として *Ephedra sinica* Stapf の栽培が行なわれているが、資源保護や砂漠化防止などの観点から1999年以降輸出を規制している²⁾。筆者らは麻黄の国産化を目指して、栽培研究を行ってきた。中国では麻黄の種苗生産は一般に野生品の種子を播種して行なわれているが、日本では現時点において多量の種子を得ることが困難である。そこで、挿し木法による増殖を検討し、前報¹⁾では『日本薬局方』³⁾記載種である *E. sinica* の株分け法ならびに木質茎を利用した挿し木法について報告した。両手法ともに新苗の生産が可能であることが明らかになったが、ともに1株から多数の苗を得ることが困難であった。草質茎を利用すると多数の挿し穂が得られるが、*E. altissima* Desf. や *E. distachya* L. を用いた研究では、草質茎の挿し木法は困難であると報告されている⁴⁾。そこで、本研究では *E. sinica* の他、ネパールヒマラヤ産の *E. pachyclada* Boiss., 中国産の *E. saxatilis* Loyle ex Florin などの草質茎を実験材料として、ビニールハウス並びに人工気象器を利用した草質茎の挿し木法を種々検討した結果、発根苗が得られたので報告する。

実験材料

植物材料：金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属薬用植物園（以下、薬用植物園）にて栽培されている *E. sinica* Stapf, *E. saxatilis* Loyle ex Florin (= *E. likiangensis* Florin), *E. pachyclada* Boiss. (ネパール産の本分類群は *E. gerardiana* Stapf と *E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer の交雑種⁵⁾)、の草質茎。用土：バーミキュライト、G20 細粒（ニッタイ株式会社）。川砂（市販品）。市販栽培用土（プランターの土：株式会社秋本天産物）。発根剤：ルートン（石原産業株式会社）。栽培容器：硬質ポリポット（直径9 cm）、イチゴ育苗用ポット。保管場所：人工気象器（日本医化器械製作所 LPH-200RDSMP. 温度 25℃, 湿度 80 %, 全灯 24 時間照射 (25,000～30,000 ルクス)), またはビニールハウス（温度管理なし）。挿し穂の調製：挿し穂は全て当該年春に発芽し生長した緑色枝を使用し、目的に応じて長さおよび重量を調節し、節の直下約 1 mm で横切した。（写真 1）

実験1. *Ephedra sinica* を用いた挿し穂の大きさ及び保管場所と発根率の相関に関する検討

1) 実験材料及び方法

5年生以上の *E. sinica* (G-1株)の草質茎を用い、挿し穂の長さにより①3~10 cm未満、②10~20 cm未満、③20~30 cm未満、④30~40 cmの4グループに分けて検討した。用土としてバーミキュライト：川砂（1：1）を用い、硬質ポリポットに4~5 cmの深さに挿した。実験期間：2009年5月22日に挿し木し、①及び②は同年10月22日（5ヶ月後）、③及び④は翌年3月11日（約10ヶ月後）に発根状態を評価した。保管場所：各グループの約半数ずつを人工気象器内とビニールハウス内に分けて保管した。

2) 結果（表1）

人工気象器内に保管した挿し木の発根率については、グループ①（挿し穂の長さ3~10 cm未満）は33.3%，グループ②（同10~20 cm未満）は50.0%，グループ③（同20~30 cm未満）は81.8%，グループ④（同30~40 cm）は62.5%であった。一方、ビニールハウス内に保管した挿し木の発根率については、グループ①は0%，グループ②は16.7%，グループ③は25.0%，グループ④は22.2%であった。以上、すべてのグループにおいてビニールハウスよりも人工気象器内に保管した方が高い発根率を示した。発根状態を写真2に示す。

実験2. 挿し木時期と発根率に関する検討

1) 実験材料及び方法

5年生以上の *E. sinica* (1-1株, G-1株)の草質茎を用い、異なる4時期に挿し穂（各20本）を準備して挿し、一定期間後に発根を評価した。実験期間（挿し木日~発根評価日）：①（No. 1-1）2010年06月08日~同年10月19日、②（No. G-1）2010年07月14日~同年11月21日、③（No. 1-1）2010年10月20日~2011年3月27日、④（No. G-1）2010年11月21日~2011年3月27日。用土はバーミキュライト：川砂（1：1）を用い、イチゴ育苗用ポットに1本ずつ4~5 cmの深さに挿した。保管場所：人工気象器内。

2) 結果（表2）

発根率については、グループ①は30%，②は70%，③は50%，④は85%であった。実験結果からは、1-1株よりもG-1株の方が発根能力が高い可能性が示唆された。総合的に判断すると、発根率は7月以降に挿し木を行なうのが良好である。

実験 3. 同一種の株の違いによる発根率の相違に関する検討

実験 2 において、*E. sinica* の 1-1 株と G-1 株で発根率が異なった。そこで、両株を用い、再度株による違いを検討した。

1) 実験材料及び方法

E. sinica の 1-1 株と G-1 株を用い、2013 年 11 月 13 日に草質茎から挿し穂を各 24 本ずつ調製した。用土はバーミキュライト：川砂（1:1）を用い、イチゴ育苗用ポットに 1 本ずつ約 5 cm の深さに挿した。保管場所：人工気象器内。2014 年 3 月 19 日（4 ヶ月後）に発根の有無を調査した。

2) 結果

1-1 株は 11 本が発根（発根率 45.9%）し、G-1 株は 22 本が発根（91.7%）し、実験 2 とほぼ同様の結果が得られた。

実験 4. *Ephedra saxatilis* を用いた挿し穂の大きさと発根率の相違に関する検討

1) 方法

実験株：5 年生以上の *E. saxatilis*（5-1 株）から 23 本の長さが異なる挿し穂を調製し、全ての挿し穂の長さ重量を測定した。用土として、バーミキュライト：川砂（1:1）を用い、硬質ポリポットに 4~5 cm の深さに挿し、すべてビニールハウス内に保管した。実験期間：2009 年 6 月 24 日（挿し木）~2010 年 5 月 13 日（約 11 ヶ月後に評価）。

2) 結果（図 1）

発根数は 23 本中 19 本（発根率 82.6%）であった。挿し穂の長さの平均は 25.2 cm、重量平均は 1.7 g であったが、挿し穂の長さ重量と発根率の間に相違は認められなかった。重量については 1.6 g 以上の 11 株は全て発根したが、1 g 以下の 4 本も全て発根しており、明確な相違は認められなかった。また、長さが同様であれば重量が多いものほど茎が太いことを意味しているが、茎の太さと発根率の間にも有意な相違は認められなかった。

実験 5. *Ephedra pachyclada* を用いた挿し穂の大きさと発根率の相違に関する検討

1) 実験材料及び方法

実験株：5 年生以上の *E. pachyclada*（2-1 株）。挿し穂の長さにより、①3~10 cm 未満、②10~20 cm 未満、③20~30 cm の 3 グループに分け、発根率を調査した。用土としてバーミキュライトを用い、硬質ポリポット（直径 9 cm）に 6~12 本ずつ 4~5 cm の深さに挿し、人工気象器内に保管した。実験期間：2009 年 10 月 23

日（挿し木）～2010年7月14日（約9ヶ月後に評価）。

2) 結果（表3）

発根率は、グループ①では43.75%、グループ②では50.0%、グループ③では42.4%であった。*E. pachyclada*においても、挿し穂の長さとの発根率の間に有意な差は認められなかった。

結論および考察

1. マオウ属植物の草質茎の挿し木法について検討した。日本薬局方⁵⁾収載の麻黄の原植物の一種である *Ephedra sinica* を用いて挿し穂の最適な保管場所について検討した結果、すべての実験において人工気象器内の方がビニールハウス内よりも高い発根率を示し、最も高い発根率は5月下旬に挿した1-1株で81.8%、11月下旬に挿したG-1株で85%であった。藤田ら³⁾は、*E. sinica*と同種とする意見⁶⁾もある *E. distachya* L. について草質茎での挿し木は困難であると報告したが、本研究により人工気象器を利用することにより *E. sinica* で80%を超える発根率を得ることができた。人工気象器内で生育させることの利点は、ビニールハウス内に比して気温が25℃で一定であること、光照射時間が長い（最大24時間）こと、風などのストレスがないことなどが考えられる。一方、*E. saxatilis* ではビニールハウス内で管理しても80%を超える発根率を示した。また、*E. pachyclada* では人工気象器内に管理した場合の発根率は50%止まりであった。これらの結果は、発根率に種間差のあることを示唆している。今後は、種間差とともに、人工気象器内の温度や照明の強さなどが発根率に与える影響も検討する必要がある。なお、発根率は悪いがビニールハウス内に保管した *E. sinica* 株も発根した。藤田らの実験で発根しなかったのは切断部位が異なっていたことが原因である可能性がある。切断部位並びに切断方法については別報で述べる。

2. 挿し穂の適切な大きさ（長さ及び重さ）について、*Ephedra saxatilis* Loyle ex Florin (= *E. likiangensis* Florin) の草質茎を用いて検討した結果、最も軽い挿し穂が0.6g（長さ25.2cm）、重い挿し穂が3.1g（22.9cm）で、最も短い挿し穂が17.4cm（重量1.5g）、長い挿し穂が38.8cm（2.3g）であったが、最も短い挿し穂を除いて全て発根した。長さについても2番目、3番目に短い挿し穂では発根しており、挿し穂の大きさと発根率との間には明確な相関が認められなかった。また *E. saxatilis* は保管条件がビニールハウス内にもかかわらず、発根率が82.6%と高い数値を示した。それに対し同様に検討した *E. sinica* では、茎の長さが30cm以上でも重さは0.2～0.3gしかなく、ビニールハウス内に保管した場合、最も高い発根率でも25%しかなかった。また、*E. pachyclada* では長さ10cm以下の挿し穂でもより長い挿し穂と同様に

発根した。本研究結果から、少なくとも長い挿し穂を準備する利点は無く、挿し木作業がしやすい 10~15 cm 程度で十分であると判断される。加えて、例えば長さ 40 cm の枝からは長さ 10 cm の挿し穂が 4 本採れるため、発根率と最終的に得られる苗の数を考えると、挿し穂は短く作る方が有利である。

3. 挿し木を行なう最適時期について、*E. sinica* の草質茎を用いて検討した結果、人工気象器内で管理した場合、発根率は挿し木月が 2009 年 6 月では 25 %、2010 年 7 月では 70 %、2010 年 10 月では 50 %、2010 年 11 月では 85 %であった。本実験に関しては、1 株から十分量の挿し穂が確保できなかったことから、6 月及び 10 月と 7 月及び 11 月は別株を用いて行なった。また、発根の評価は 6 月、7 月挿しは概ね 4 ヶ月後、10 月、11 月挿しは 5 ヶ月後であった。株ごとに評価した場合には両株とも 10 月と 11 月が好成績であったが、挿し木期間が約 1 ヶ月間長かったことが影響している可能性がある。一方、同一種でも株間で発根能力に差異のあることが示唆され、発根しにくい株については発根率を上げる方法を検討する必要がある。5 月下旬に挿し木した結果（実験 3）をも考慮すると、挿し穂を採取するのは時期を問わないものと判断される。5 月は新梢が盛んに伸長する時期であり、本研究結果から、若い枝も挿し穂として利用できることが明らかになったが、若すぎる枝は柔軟で挿しにくい。

4. マオウ属植物の挿し穂は通常、切り口にカルスを形成し、その後に発根することが確認された。カルス形成後発根に至るまでには日数を要する。本研究では発根率を調査するために短期間で栽培を中断したグループもあり、カルス形成のみで発根していない挿し穂もあった。根がしっかりした良質の挿し木苗を確実に得るためには、人工気象器内で保管する場合でも挿し木後 4 ヶ月以上経過してから移植するのが適切であると判断された。5 月に挿し木した場合には 9 月以降に移植することになり、冬に向かってマオウの地上部が枯れる時期であり、却って発根後はビニールハウス内や屋外で管理するなどして、翌年 3 月まで待つて植え替えるのが適切であると判断される。11 月に挿し木した場合には人工気象器内で管理し、翌年 3 月に植え替えが可能である。また、ビニールハウス内や屋外に保管する場合には 10 ヶ月後以降に植え替えるのが適切であると判断された。以上、総合的に判断すると、人工気象器を使用する場合には新梢が十分に伸び切る 9 月以降 11 月頃までに挿し木し、翌年 3 月以降に植え替えるのが適切であると判断される。温度管理設備のないビニールハウスなどでは 6~7 月に挿し木するのが適切であろう。発根した根の長さや移植に関する内容は別報で述べる。

引用文献

- 1) 第3報：野村行宏，佐々木陽平，三宅克典，御影雅幸．マオウ属植物の栽培研究（第3報）シナマオウの株分け及び木質茎の挿し木による種苗生産の検討．薬用植物研究，**35**（2），10-15（2013）
- 2) Masayuki Mikage and Nobuko Kakiuchi. The Recent Situation of the Resources of Chinese Crude Drug Ma-huang, Ephedrae Herba. *J.Trad.Med.*, **22** (Supplement 1), 61-69 (2005)
- 3) 第十六改正日本薬局方，厚生労働省，2012，p.1589。『薬用植物 栽培と品質評価』，Part9，株式会社薬事日報社，東京，2000，pp.67 - 78。
- 4) 藤田早苗之助，栗原孝吾，衛生試験所報告，85，112 - 1149 (1967)。
- 5) Emi Hamanaka, Keisuke Ohkubo, Masayuki Mikage and Nobuko Kakiuchi. Molecular genetic characteristics of Nepalese *Ephedra* plants. *J. Jap. Bot.*, **86**, 303-313 (2011)。
- 6) Yong Yang: The Taxonomy of Chinese *Ephedra*, A Doctor thesis of Chinese Academy of Sciences, 2002. (in Chinese) 。

表1: 挿し穂の長さや保管場所の違いによる発根率の相違 (*Ephedra sinica*)

グループ	① 3~10 cm 未満		② 10~20 cm 未満		③ 20~30 cm 未満		④ 30~40 cm	
	2009年5/22~5ヶ月		2009年5/22~5ヶ月		2009年5/22~10ヶ月		2009年5/22~10ヶ月	
実験期間	人工気象器内		人工気象器内		人工気象器内		人工気象器内	
保管場所*	ハウス	ハウス	ハウス	ハウス	ハウス	ハウス	ハウス	ハウス
長さ (平均) cm	8.4	6.5	16	14.4	25.4	24	34.18	33.5
重さ (平均) g	0.09	0.05	0.19	0.13	0.2	0.17	0.27	0.24
挿し穂の数	6	7	12	12	11	12	8	9
発根数	2	0	6	2	9	3	5	2
発根率 (%)	33	0	50	17	82	25	63	22

*: 人工気象器内の条件; 温度 25℃, 湿度 80 %, 全灯 24 時間照射 (25,000~30,000 ルクス)。ハウスは温度管理設備のないビニールハウス内。

表 2 : 挿し木時期の違いによる発根率の相違 (*Ephedra sinica*)

	第1期* ¹ (1-1株) 2010/6/8~ 2010/10/19	第2期(G-1株) 2010/7/1~ 2010/11/21	第3期(1-1株) 2010/10/20~ 2011/3/27	第4期(G-1株) 2010/11/21~ 2011/3/27
検体数 (本)	24	20	20	20
長さ* ² (cm)	14.3~18.7~25.1	12.3~23.0~35.8	12.1~19.4~28.5	13.0~19.9~27.3
発根数	6	14	10	17
発根率 (%)	25	70	50	85

* 1 : () 内は実験株番号。年月日は挿し木日～発根評価日を示す (西暦年/月/日)

* 2 : 最小値～平均値～最大値

表 3 : 挿し穂の長さと発根率の相違 (*Ephedra pachyclada*)

グループと長さ	① 3~10cm 未満	② 10~20 cm 未満	③ 20~30cm
長さ (cm 平均)	6.4	15.8	23.1
挿し穂の数	32	50	33
発根数 (定植数)	14	25	14
発根率 (%)	43.8	50	42.4

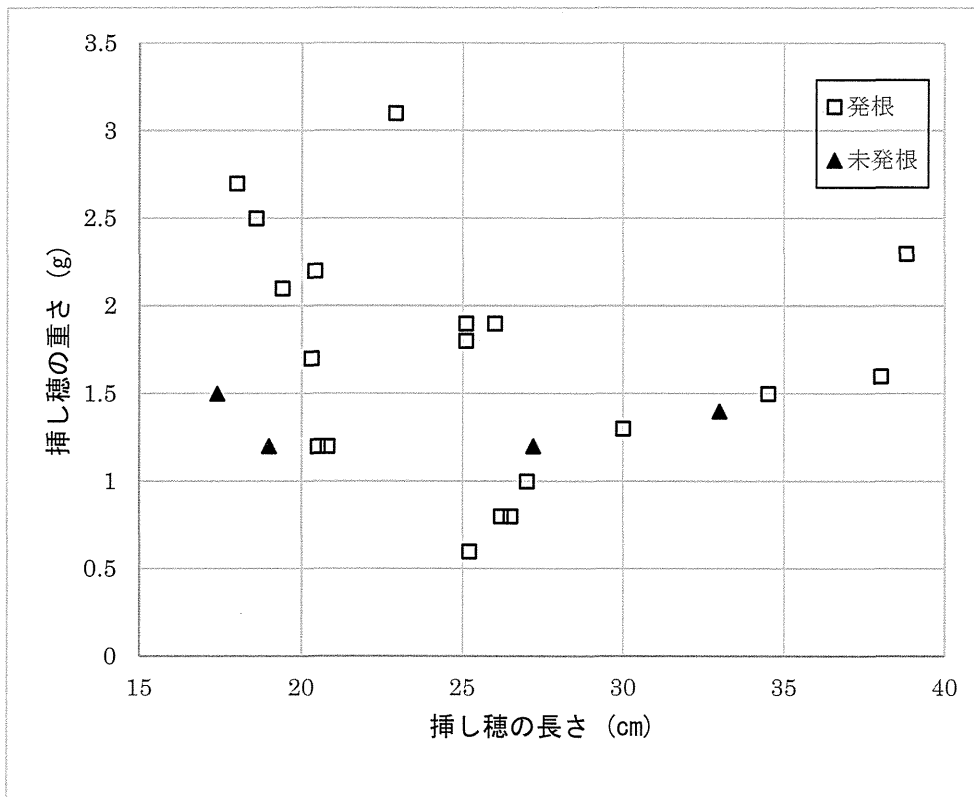


図 1 : 挿し穂の長さ及び重さと発根の相関

(*Ephedra saxatilis*、ビニルハウス内にて保管、6月下旬挿し木、11ヶ月後に評価。)

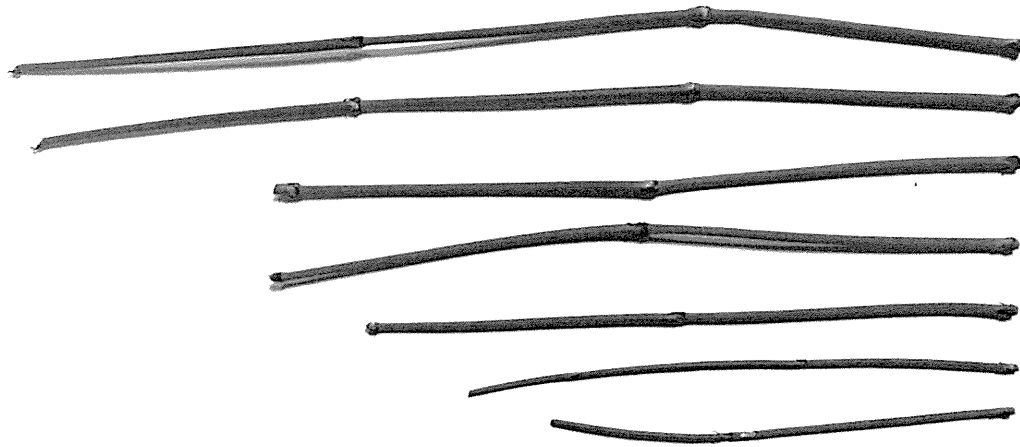


写真1 : 挿し穂 (*Ephedra sinica* Stapf : No.1-1)

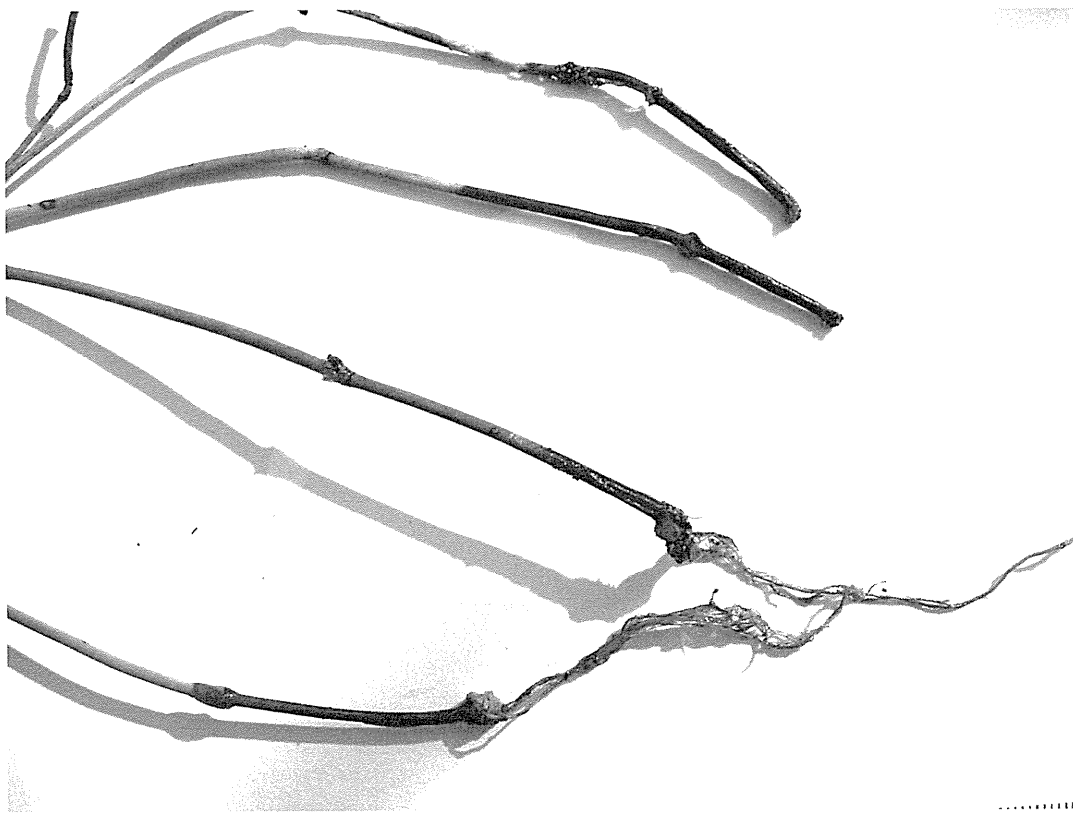


写真2 : *E. sinica* の挿し穂の発根状態

上2本 : 発根しなかった枝, 下2本 : 発根状況。カルス形成後に発根しているのが分る。

マオウ属植物のアルカロイド含量の変異に関する研究

(クラシエ製薬) ○松本昌士, 土田貴志
(金沢大学院・薬) 平山 学, 大富規弘, 大野剛史, 野村行宏, 安藤広和
(基盤研・薬植セ) 飯田 修, 杉村康司, 川原信夫
(東京農大・農) 御影雅幸

Study on the Variation of Alkaloid Content in *Ephedra* Plants

(Kracie Pharma, Ltd.) ○Masashi Matsumoto, Takashi Tsuchida
(Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University) Manabu Hirayama,
Norihiro Ohtomi, Takeshi Ohno, Yukihiro Nomura, Hirokazu Ando
(Research Center for Medicinal Plant Resources /National Institute of Biomedical Innovation) Osamu
Iida, Koji Sugimura, Nobuo Kawahara
(Agriculture, Tokyo University of Agriculture) Masayuki Mikage

We investigated the ephedrine alkaloid ((-)-ephedrine and (+)-pseudoephedrine) composition ratio of a crude Chinese herbal drug described in the Japanese Pharmacopoeia, “Ephedra Herb (Chinese name: Mahuang)”. We surveyed wild plants and obtained 366 samples in Inner Mongolia, Hebei, Gansu and Xinjiang of China. Secondly, we cultivated genetically stable clonal strains through cuttage/division to investigate the influence of growth environments and the alkaloid content. Then we determined the quantity of alkaloid contents by HPLC, to consider the cause of variation of alkaloid content. There were marked changes in the alkaloid composition ratio of wild plants in areas where both male and female clusters coexisted. However, in genetically homogeneous areas with the growth of male or female clusters alone, all of these regression lines’ regression coefficients were positive, but each lean varied; This suggests that the alkaloid composition ratio has a clear tendency in each individual. Based on this, we cultivated individuals for vegetative propagation, and evaluated the alkaloid content ratio. Those propagated by separating the roots showed a specific tendency regardless of the cultivation area (Wakayama, Tanegashima). Those propagated by separating the herbaceous stem showed a specific tendency regardless of the soil or harvest time. In addition, we surveyed the (-)-ephedrine content ratio of 3- to 6-year-old strains. There was a high positive correlation coefficient between the previous and subsequent years. These findings suggest that the ephedrine alkaloid composition ratio of Ephedra Herb depends on genetic factors, but not on environmental factors or the growth period.

1. 緒論

漢方生薬「麻黄」の原植物である *Ephedra sinica* Stapf などのマオウ科 (*Ephedraceae*) マオウ属 (*Ephedra*属) 植物は、日本には自生しておらず、日本国内で消費する麻黄は全てが輸入品である。近年は中国からの輸入に100%依存しているが、中国では自生地での農地への転用、過放牧などによる資源枯渇がかねてより懸念されている。麻黄は葛根湯、小青竜湯、防風通聖散などの主要処方に配合され、漢方エキス生産にとっても、極めて重要な原料生薬であるため、安定して入手する手段の確立が望まれる。また漢方生薬は医薬品であるため、量的確保のみならず、品質が安定したものを安定的に入手する必要がある。天産物である漢方生薬は合成の医薬品と比較して品質のばらつきが大きい。品質のばらつきは、薬効の不確かさの原因となり、使用者への不利益に直結する重要な問題である。そのため、品質のばらつきに及ぼす要因の解明は重要であり、主な要因として、種に依存する先天的な要因（遺伝的要因）、後天的な要因（環境要因）が挙げられる。環境要因に強く影響を受けるとすると、産地の違いなどが、そのまま化学的品質の変動につながる可能性がある。

麻黄中のエフェドリン系アルカロイドは6種が見出されており、第16改正日本薬局方¹⁾では総アルカロイド含量として(-)-ephedrine (以下E) 及び(+)-pseudoephedrine (以下PE) の含量合計を0.7%以上としている。E及びPEについて、局方の含量規格は合計値であり、それぞれの含量についての規定はない。しかし、この2つの化合物についてはそれぞれ異なる薬理作用が報告されており²⁾、組成比（アルカロイドの合計含量に対する各アルカロイド含量の占める割合）に応じて使い分けをすることが本来望ましい。野生のマオウ属植物のアルカロイド組成比については、種間差³⁾、地域性⁴⁾の影響を受けるとする見解の両方がある。しかし、これらは平均的な傾向であり、個体ごとに比較をすると、同じ産地内でもアルカロイド組成比の変動が大きく、EとPEの組成比が逆転しているケースも認められる。野生では、環境要因と遺伝的要因が混在しているため、アルカロイド組成比に影響を及ぼす要因については、現在まで明らかにされていない。

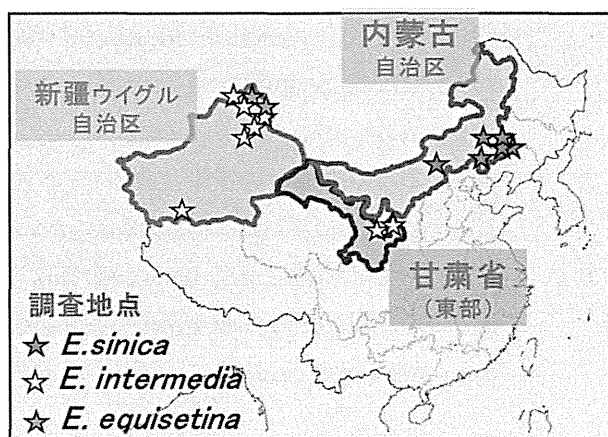
アルカロイド含量及び組成比に影響を及ぼす要因の解明するため、本研究では、野生品及び栽培品のマオウ属植物についてアルカロイド含量の定量及び比較を行なった。

2. 材料

2-1 産地調査品

野生品 (*E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina*)

産地：中国内蒙古自治区（赤峰市，通辽市，錫林郭勒盟，烏蘭察布市，包頭市），甘肅省環県，新疆ウイグル自治区（青河県，阿勒泰市など9市県），河北省承德市で調査し，入手した366サンプル。



栽培品 (*E. sinica*, *E. equisetina*)

産地：中国新疆ウイグル自治区博楽市

サンプル数：*E. sinica* 7サンプル, *E. equisetina* 6サンプル.

内蒙古自治区（包頭及び錫林郭勒盟を除く）、甘肅省での調査品の標本はクラシエ製薬所蔵、新疆ウイグル自治区、河北省承德、内蒙古自治区（包頭及び錫林郭勒盟）の調査品の標本は金沢大学自然科学研究科所蔵.

2-2 日本国内栽培品

① *Ephedra* sp. (Ep-13) (株分け, 露地栽培)

種苗の由来：独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターで保存されている種苗 Ep-13 (*E. distachya* として導入されたもの, もとは1個体).

栽培地：独立行政法人 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 和歌山研究部及び種子島研究部

サンプル数：和歌山栽培品 9 サンプル, 種子島栽培品 26 サンプル.

② *E. sinica* の栽培品 (挿し木, ポット栽培)

種苗の由来：中国（採取時期不明）、金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属薬用植物園（以下、金沢大学薬草園）のロックガーデンで栽培した *E. sinica* (1個体).

栽培地：金沢大学薬草園

栽培方法：2010年7月または10月に挿し木（栽培土壌は川砂：バーミキュライト 1：1）、2010年11月または2011年3月にポットに移植（栽培土壌はプランターの土：バーミキュライト 1：1）。栽培土壌として川砂、山砂、赤玉（硬質）小粒、鹿沼土（小粒）、桐生土、市販土（「プランターの土」、秋本天産物（株））のいずれかを使用.

サンプル数：採取日①2011.11.22 が 12 サンプル, 採取日②2012.9.18 が 11 サンプル.

③ *E. sinica* の栽培品 (実生株, ポット栽培)

種子の由来：中国内蒙古自治区通遼市の自生地において、2003年に入手した複数個の種子.

栽培地：金沢大学薬草園

栽培方法：1/5000a 又 1/2000a のワグネルポットで2004年秋に得た実生苗から2010年まで栽培.

栽培土壌として川砂（土壌下層は化成肥料（普通化成8号（フジカワエッグ, N:P:K=8:8:8）10g/potを混合）又は以下の5種類. ①市販土（「プランターの土」、秋本天産物（株））、②赤玉土、③市販土+赤玉土（28：18, 体積比）、④市販土+土壌アルカリ化剤、⑤赤玉土+土壌アルカリ化剤

*：土壌アルカリ化剤（炭酸苦土石灰 10g/pot, または石灰窒素 10g/pot）、灌水条件：人工海水又はその希釈液（希釈率は 1/2, 1/4, 1/8, 1/16）を週に1回, 地下水を1回ずつ（人工海水の組成：NaCl（特級）86.8g, MgSO₄・7H₂O（一級）20.8g, MgCl₂・6H₂O（特級）15.7g, CaCl₂・

2H₂O (一級) 4.5g 及び KCl (特級) 2.2g を地下水に溶解して 3L としたもの).

採取日：2007 年から 2010 年の 9 月

サンプル数：103 サンプル (栽培中に枯死した個体があり, 2007-2008 年は 100 サンプル, 2009 年は 95 サンプル, 2010 年には 90 サンプル)

3. 方法

3-1 種の鑑別 (外部形態)

種の同定は中国植物志⁵⁾を参考にして行なった. 新疆植物志⁶⁾では *E. glauca* と *E. intermedia* は別種として記載されており, 主に草質茎のざらつきが無く滑らかなものが *E. glauca*, ざらつきがあり粗いものが *E. intermedia* とされている. しかし中国植物志では *E. glauca* は *E. intermedia* の変異の範囲内とされていることから, 本研究では区別せずに *E. intermedia* と表記する.

形態による判断が困難なものについては, 内部形態による鑑別及び DNA 解析により同定を試みた.

2012 年及び 2013 年の新疆の調査で入手したサンプルの一部は *E. przewalskii*, *E. distachya* 及び *E. regeliana* と同定した. この 3 種と同定した個体は, HPLC でアルカロイドのピークがほとんど認められなかった.

Table. 1 書籍に記載された種に特徴的な組織 (外部形態)

種	雌穂果・種子			草質茎		葉	
	形状	珠孔管	種子数	高さ(cm)	色	裂片数	切れ込みの深さ
<i>E. sinica</i>	肉質	真直 ~微湾曲	通常 2	20~40	—	2	下部 1/3 ~2/3 合生
<i>E. intermedia</i>	肉質	長く螺旋状	2~3	20~100	緑色 ~灰緑色	2~3	下部 2/3 合生
<i>E. intermedia</i> var. <i>tibetica</i>	肉質	—	—	100 以上	緑色 ~灰緑色	通常 2	短い
<i>E. equisetina</i>	肉質	短く湾曲	通常 1	100	藍緑色 ~灰緑色	2	大部分合生
<i>E. przewalskii</i>	膜質	—	—	50~240	緑色	通常 3	下部 1/3 ~2/3 合生
<i>E. regeliana</i>	肉質	短く真直ぐ	通常 2	5~15	—	2	下部 1/2 合生
<i>E. monosperma</i>	肉質	長く湾曲か 短く真直ぐ	1	3~8	緑色	2	下部 1/3 ~1/2 合生
<i>E. fedtschenkoae</i>	肉質	真直ぐ	1~2	3~10	緑色	2	1/3 合生

『中国植物志 第 7 巻』を参考にした.

3-2 種の鑑別 (内部形態)

草質茎の節間中央部を取り切り, 常法により切片を作製した. 得られた切片はオードジャベルで漂白処理後, 光学顕微鏡で観察し, 皮層部および髄内に存在する繊維の計数を行なった. また,