

本研究では節間の生長度を揃えるために、各維管束間の二次木部が1～6細胞層からなる節間を1株から3本抽出して観察した。

観察項目は以下の6点（①横切面の長径，短径，②クチクラ瘤の有無，③表皮下繊維群数，④皮層繊維群数，⑤髓内繊維群数，⑥シュウ酸カルシウムの多寡）である。

Table.2 書籍に記載された種に特徴的な組織(内部形態)

種	クチクラ瘤	皮層 繊維群数	髓内 繊維群数	シュウ酸 カルシウム
<i>E. sinica</i>	有	少	少	少
<i>E. intermedia</i>	有	多	多	多
<i>E. equisetina</i>	無	少	しばしば有る	多
<i>E. przewalskii</i>	不規則で小さい	多	多	多

『常用中薬材品種整理和質量研究』<sup>46)</sup>を参考にした。

### 3-3 DNA解析

#### 〈試料溶液調製法〉

植物試料20～50 mgを細く切り，液体窒素で凍結させて粉碎器にかけ，得られた粉末をDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用い，同キットのプロトコールに従い抽出を行なった。

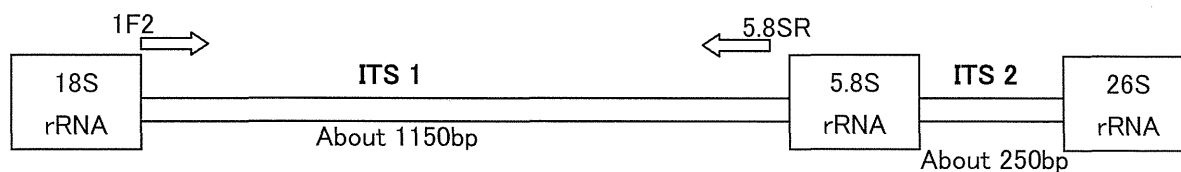
#### 〈PCR〉

ITS1, trn L/F 領域の増幅は PCR 法により行なった。反応溶液は，10×PCR buffer for KOD-Plus(2.5 μL)，dNTP を各0.2 mM(2.5 μL)，MgSO<sub>4</sub> 1.0mM(1.0 μL)，foreword primer 0.4mM(0.5 μL)，reverse primer 0.4mM(0.5 μL)，全DNA を約100-120ng及び 0.5units of KOD-Plus DNAPolymerase (Toyobo)で全量を25μL とした。

使用した primer セット (foreword / reverse) を以下に示す。

ITS1 : Eph-1F2 (ACG TCG CGA GAA GTT CAT TG)

5.8SR (CGG GAT TCT GCAATT CAC AC)



trn L/F : Aco1F (CGA AAR CGG TAG ACG CTA CG)

Aco2R (ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG)

また、反応プログラムは以下の方法で行なった。94℃ 2 分のホットスタートに次いで、熱変性 94℃ 15 秒、アニーリング 55℃ 30 秒、伸長反応 68℃ 45 秒、を 30 サイクル行なった後、68℃ 5 分、終了後 4℃で保持した。PCR 産物 3 μL を 1.5 % のアガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅を確認した。残りの産物を QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製した。

#### 〈PCR反応〉

精製した PCR 産物は Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いて反応させた。反応溶液は、PCR 産物 20 ng, primer 1μL, Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems) 1μL で全量 10μL とした。使用した primer は 3.2 μM の Eph-1F2, Eph-A (GCG GGG ACG TGG ACG GTC TT), Eph-D (CCC TTC CCC GTG TAA CAC GC), Eph-ohk3 (GAA AGG AAA TAG CGC CGG TC), Eph-5.8SR である。使用したプログラムを以下に示す。96℃ 2 分のホットスタートに次いで、96℃ 10 秒、50℃ 5 秒、60℃ 4 分を 25 サイクル行なった後 4℃で保持した。産物を精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。また、多重整列解析は DNASIS version 3.0 software (Hitachi) を用いて行なった。

### 3-4 エフェドリン系アルカロイド 5 種の定量

エフェドリン系アルカロイド 5 種 ((-)-ephedrine (以下 E), (+)-pseudoephedrine (以下 PE), (-)-norephedrine (以下 NE), (-)-methylephedrine (以下 ME), (+)-norpseudoephedrine (以下 NPE)) の含量を、HPLC 法により定量した。

#### 〈試料溶液調製法〉

本品の乾燥粉末約 0.3g/メタノール(1→2) 50mL

#### 〈標準溶液調製法〉

塩酸エフェドリン標準品、塩酸プソイドエフェドリン標準品、塩酸メチルエフェドリン標準品及び塩酸ノルエフェドリン標準品 (いずれも和光純薬工業より購入) 約 0.05g/メタノール(1→2) 20mL → 1mL/メタノール(1→2) 50mL(標準溶液①)

塩酸ノルプソイドエフェドリン標準品 (塩酸ノルエフェドリンからの合成品、クラシエ製薬所蔵) 約 0.01g/メタノール(1→2)20mL → 1mL/メタノール(1→2)10mL(標準溶液②)

#### 〈HPLC 条件〉 (日局 16 の定量法を参考)

カラム : YMC-ODS A-312 (6.0mmI.D×150mm, 粒子径 5 μ m)

移動相 : 17mM SDS 水溶液/アセトニトリル/リン酸混液 (640:360:1)

カラム温度 : 40℃, 注入量 : 10 μ L, 流速 : 1.0mL/min, 測定波長 : 210nm

## 4. 結果及び考察

### 4-1 産地調査品

アルカロイド含量 (E+PE) については, 新疆の *E. equisetina* が全体的に *E. intermedia* 及び *E. sinica* よりも高かった (Fig.1). また *E. equisetina* と *E. sinica* は新疆博楽市の栽培地で同所的に栽培されており, *E. equisetina* の方が *E. sinica* と比較してアルカロイド含量 (E+PE) が高かった (Table.3).

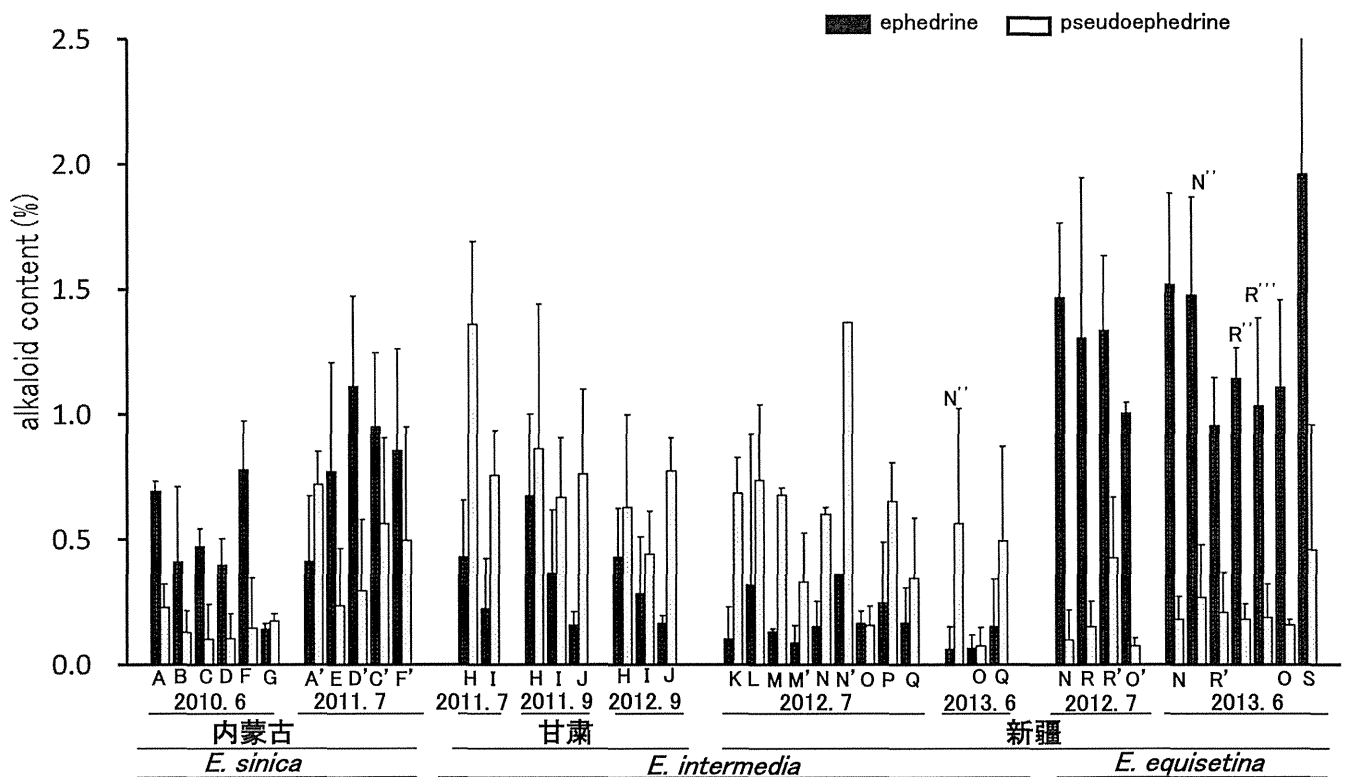
*E. sinica* の中には PE>E の産地 (2010 年の通遼市科爾沁左翼後旗 (G), 2011 年の烏蘭察布市 (A')) が認められたが, それ以外の産地では E>PE であり, 特に地理的な傾向も認められなかった. *E. intermedia* は新疆, 甘肅省共に全ての産地で PE>E で, 一方, 新疆の *E. equisetina* は全ての産地で E>PE であった (Fig.1). これらの産地について, 個体ごとに比較をすると, 同じ産地で採取したものであっても, アルカロイドの組成比が異なることがあった. ここでは新疆博楽市の栽培地の結果のみを示すが, 生育年数, 種, 性差による傾向は認められず, 個体によるばらつきが認められた (Table.3)

Table.3 2013 年新疆博楽市の栽培地で入手したマオウ属植物のアルカロイド含量 (ephedrine 及び pseudoephedrine) 及びその組成の比較

	Voucher No.	sex	contents(%)			
			E	PE	E+PE	E/PE
<i>E. sinica</i>	130625A-3	—	0.83	0.21	1.04	3.95
	130625A-4	♀	0.27	0.19	0.47	1.43
	130625A-5	—	0.84	0.08	0.92	10.78
	130625A-6	—	0.64	0.07	0.71	0.80±0.24
	130625A-7	—	0.50	0.65	1.15	0.76
	130625A-12	—	0.43	0.31	0.74	1.39
	130625A-13	—	0.36	0.23	0.59	1.53
<i>E. equisetina</i>	130625A-1	♀	1.13	0.68	1.81	1.65
	130625A-2	♀	1.94	0.92	2.86	2.12
	130625A-8	—	1.38	0.85	2.23	2.32±0.39*
	130625A-9	—	1.25	0.88	2.13	1.41
	130625A-10	—	1.51	1.21	2.72	1.25
	130625A-11	—	0.89	1.28	2.18	0.70

栽培年数: 実生の8年生. 種苗の由来は不明

\*: student T-test(P<0.05)



(Fig.上の各アルカロイド含量のバーは産地ごとの平均値)

種	産地	記号	入手時期	サンプル数	
<i>E. sinica</i>	内モン古自治区	烏蘭察布	A	2010.6	4
			A'	2011.7	6
		喀喇沁旗	B	2010.6	5
			C	2010.6	5
		巴林右旗	C'	2011.7	11
		赤峰市	D	2010.6	8
			D'	2011.7	8
	通遼市	翁牛特旗	E	2011.7	9
		奈曼旗	F	2010.6	19
		科爾沁左翼後旗	F'	2011.7	9
	合計			87	
<i>E. intermedia</i>	甘肅省環県	調査地①	H	2011.7	5
				2011.9	6
				2012.9	3
		調査地②	I	2011.7	6
				2011.9	12
				2012.9	5
		調査地③	J	2011.9	6
		2012.9	3		
	合計			46	

種	産地	記号	入手時期	サンプル数	
<i>E. intermedia</i>	阜康市	K	2012.7	5	
	木垒哈萨克自治県	L	2012.7	5	
	奇台県		M	2012.7	2
			M'	2012.7	5
	青河県		N	2012.7	2
			N'	2012.7	1
		N''	2013.6	15	
	阿勒泰市		O	2012.7	3
				2013.6	20
		和布克塞爾蒙古自治県	P	2012.7	5
克拉瑪依市	Q	2012.7	3		
		2013.6	9		
	合計			75	
<i>E. equisetina</i>	新疆ウイグル自治区	青河県	N	2012.7	7
				2013.6	7
			N''	2013.6	22
		阿勒泰市	O	2013.6	2
			O'	2012.7	2
			R	2012.7	4
			R'	2012.7	4
		富蘊県		2013.6	18
			R''	2013.6	3
			R'''	2013.6	32
吉木乃県	S	2013.6	5		
	合計			106	

Fig.1 中国のマオウ属植物のアルカロイド含量 (ephedrine 及び pseudoephedrine) の産地間比較 (野生品)

#### 4-2 産地調査品（同一個体または雄株のみの群生地から入手したサンプル）

アルカロイド含量（E+PE）については、個体ごとに数値の変動が認められ、同一個体②（内蒙・錫林郭勒）の1サンプルだけ顕著に低い個体があった（Fig.2A）。E及びPE含量については、以下の回帰式の通りで、産地ごとにE及びPE含量の間に強い正の直線性が認められた（Fig.18B）。同一個体①（内蒙・包頭）[回帰式  $y=2.2874x-0.0703$  (相関係数  $r=0.9544$ )], 同一個体②（内蒙・錫林郭勒）[回帰式  $y=0.0707x-0.0007$  (相関係数  $r=0.9597$ )], 雄株のみの群生地（河北省）[回帰式  $y=0.9931x-0.084$  (相関係数  $r=0.8603$ )]. 同一個体では相関係数 0.95 以上で、また、雄株のみの群生地の個体間でも相関係数が 0.86 と高い数値であった（Fig.2B）。

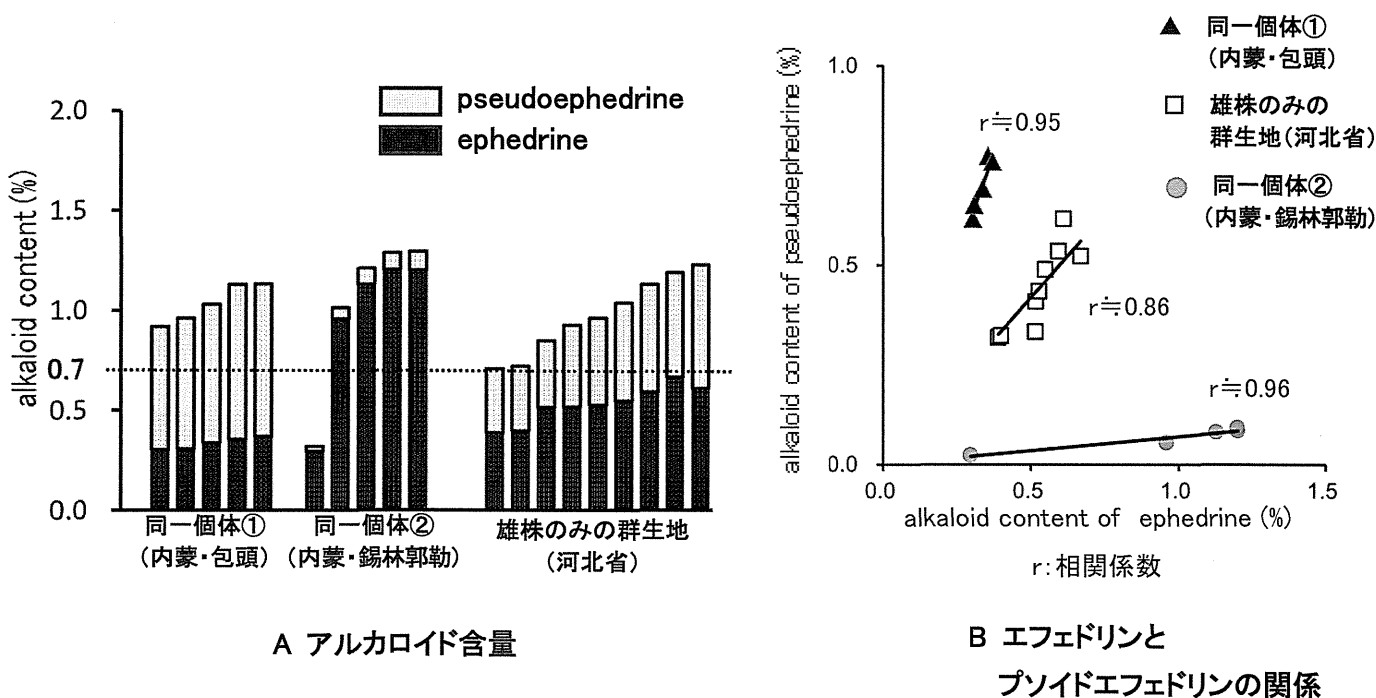


Fig.2 同一個体または雄株のみの群生地から入手した *Ephedra sinica* のアルカロイド含量(ephedrine 及び pseudoephedrine) 及びその組成の比較

#### 4-3 栽培品

アルカロイド含量については個体ごとに数値の変動が認められた。和歌山県産の Ep-13 ではアルカロイド含量（E+PE）0.11～1.16%と 10 倍以上の差が認められた（Fig.3A）。E及びPE含量については、以下の回帰式の通りで、栽培地、栽培条件が異なっても、株分け又は挿し木のような栄養繁殖で増殖した個体間ではアルカロイド組成比のパターンがほぼ同じで、E及びPE含量の間に強い正の直線性が認められた（Fig.3B）。Ep-13（種子島及び和歌山）[回帰式

$y=0.1318x+0.0002$  (相関係数  $r=0.9707$ ), *E. sinica* (金沢大学薬草園, 2011年及び2012年採取)  
 [回帰式  $y=0.9837x-0.0233$  (相関係数  $r=0.9799$ )].

中国で入手した種子から得た実生苗の個々のアルカロイド組成 (E/E+PE) について, 3年生から6年生までの4年間追跡調査を行った. 表示した図は3年生と6年生を比較したものであるが, 土壌及び灌水する水の組成が異なる条件下でありながら, 個々のアルカロイド組成 (E/E+PE) については, 強い正の直線性 (相関係数  $r=0.96$ ) が認められた (Fig.4). その他の年度についても, 以下の回帰式の通りで強い直線性が認められた. 3年生と4年生の間 [回帰式  $y=0.9519x+0.0666$  (相関係数  $r=0.9534$ )], 4年生と5年生の間 [回帰式  $y=0.9284x+0.0687$  ( $r=0.9719$ )], 5年生と6年生の間 [回帰式  $y=0.9565x+0.0373$  ( $r=0.9835$ )], 3年生と6年生の間 [回帰式  $y=0.8786x+0.1421$  ( $r=0.9564$ )]. 相関係数については, 3~4年生の間よりも4~5年生, 5~6年生の間の方がわずかに高かった.

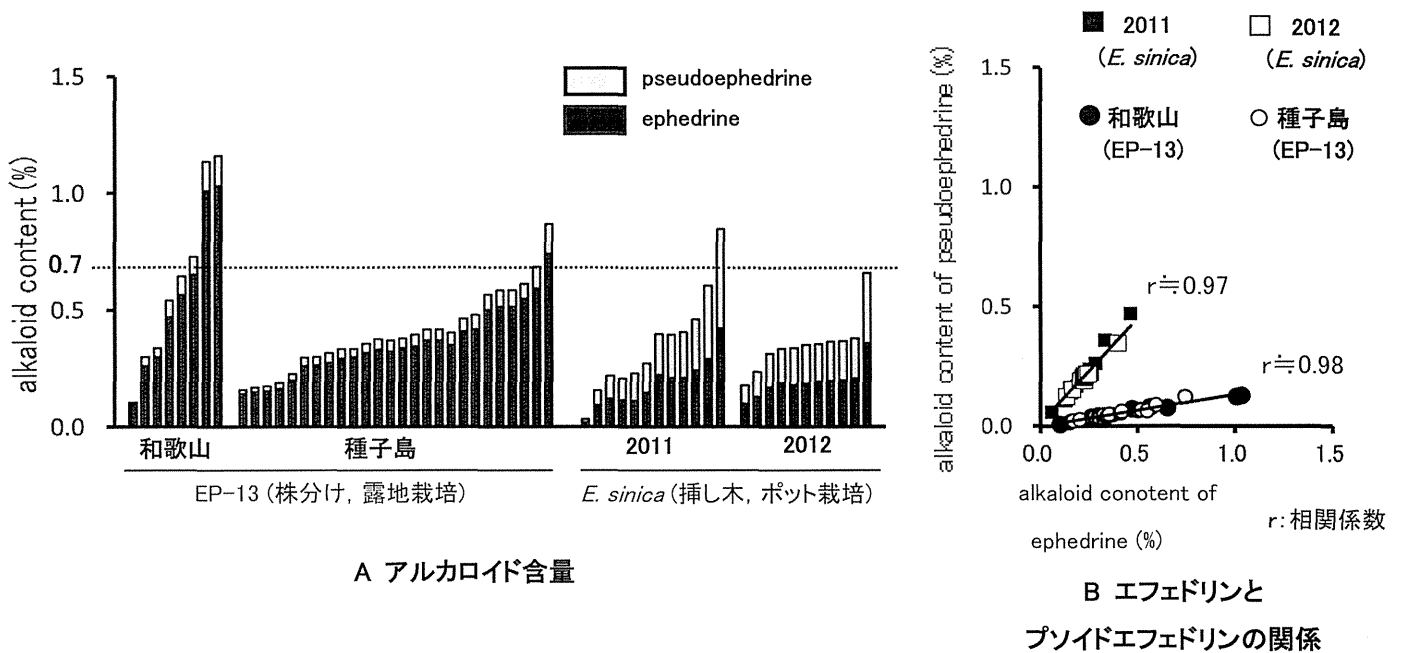


Fig.3 1個体から増殖した栽培品のアルカロイド含量 (ephedrine 及び pseudoephedrine) 及びその組成 (Ep-13 及び *Ephedra sinica*)

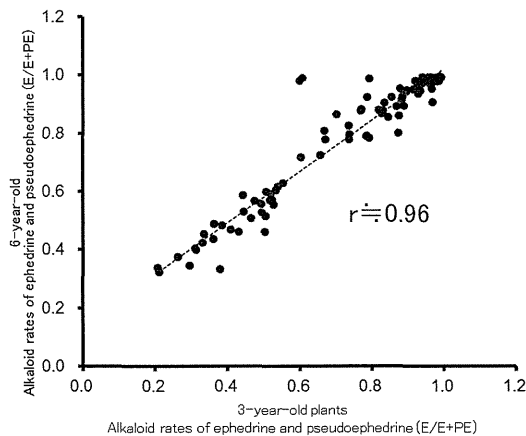
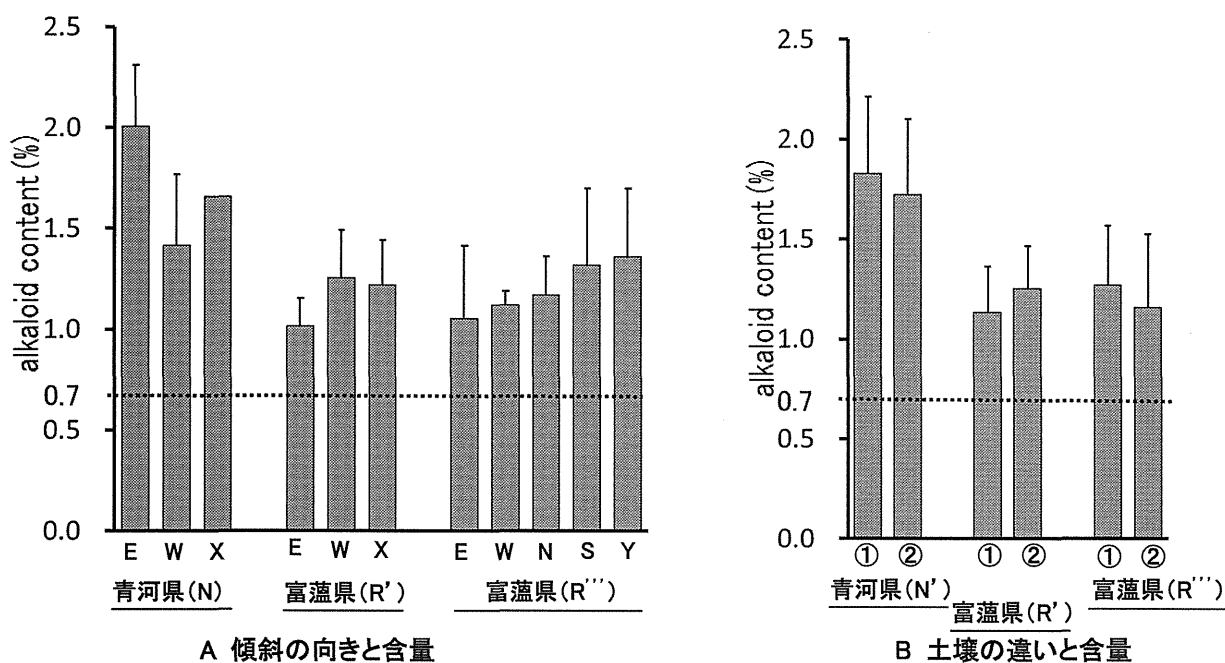


Fig.4 金沢大学薬草園で4年間栽培した *Ephedra sinica* のアルカロイド組成 (ephedrine 及び pseudoephedrine) の経年変化 (3年生と6年生)

#### 4-4 生育環境と含量

新疆の野生の *E. equisetina* を用いて、生育環境の違いとアルカロイド含量 (E+PE) の違いについて比較を行った。傾斜の向き、土壌の違い (岩場及び瓦礫質土壌) について調査をしたが、いずれの産地においても生育環境と含量の間に有意な差は認められなかった (Fig.5).



#### 傾斜の向きの比較

産地	生育環境	記号	サンプル数
青河県	東向き斜面	E	3
	西向き斜面	W	3
	V字溪谷の平地	X	1
富蘆県	東向き斜面	E	6
	西向き斜面	W	9
	V字溪谷の平地	X	3
富蘆県	東向き斜面	E	6
	西向き斜面	W	5
	北向き斜面	N	4
	南向き斜面	S	9
	山頂・尾根	Y	8

#### 土壌の違い

産地	生育環境	記号	サンプル数
青河県	岩場	①	5
	瓦礫質土壌	②	17
富蘆県	岩場	①	13
	瓦礫質土壌	②	5
富蘆県	岩場	①	19
	瓦礫質土壌	②	13

Fig.5 2013年新疆富蘆県及び青河県で入手した *Ephedra equisetina* のアルカロイド含量 (ephedrine 及び pseudoephedrine) と生育環境の関係 (傾斜の向き及び土壌の違い)

#### 4-5 norpseudoephedrine が高含量の産地

今回調査したサンプルは、いずれも ephedrine と pseudoephedrine 以外の 3 種 (norephedrine, norpseudoephedrine, methylephedrine) についても定量を行なったが、大多数の個体は E 及び PE 含量と比較して NE, NPE 及び ME 含量が著しく低かった。しかし甘肅省環県, 新疆和田市, 新疆青河县では, *E. intermedia* の中に NPE 比率が 60%以上の個体が認められた (Fig.6)。NPE 比率が顕著に高い個体はアルカロイド含量 (E+PE) が低い傾向があり, 日局 16 の含量規格 (E+PE  $\geq 0.7\%$ ) を満たすものは無かった。またこのような個体と, 生育環境や内部形態について一定の傾向は認められなかった。

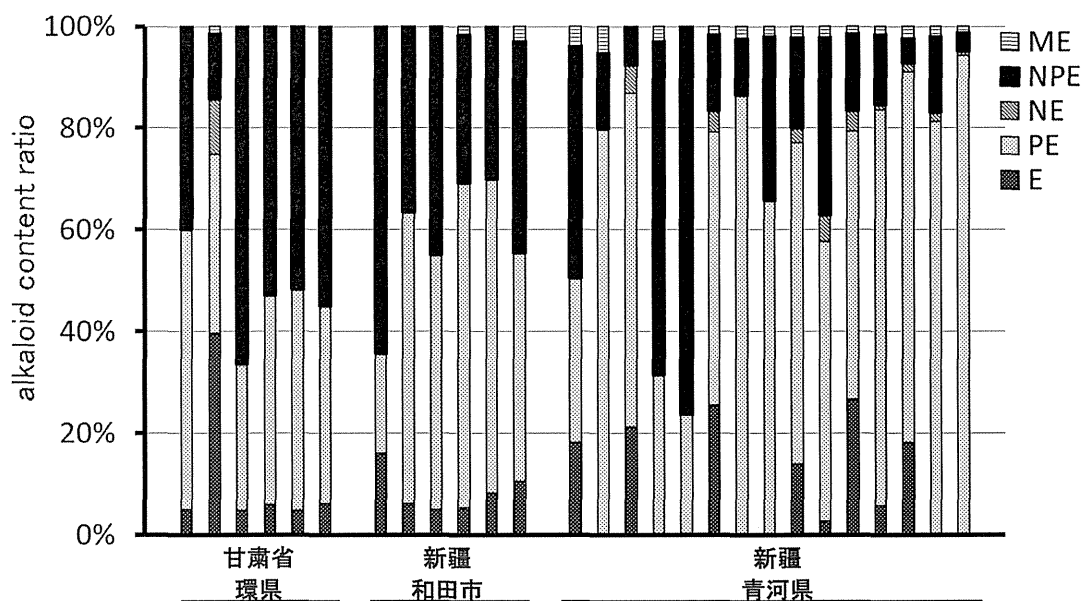


Fig.6 新疆及び甘肅省において, norpseudoephedrine 含量が高い個体を得た自生地 *Ephedra intermedia* のアルカロイド組成比

#### 5. まとめ

アルカロイド組成比 (ephedrine及びpseudoephedrine) について, 同一個体とその個体を株分けや挿し木などの栄養繁殖で増殖させた個体間では, 栽培地, 栽培条件, 生育年数が異なっても E 及び PE 含量の間に強い正の直線性が認められた (Fig.2~Fig.4)。即ちアルカロイド組成比 (E 及び PE) は, 環境や生育年数などの後天的な要因ではなく, 先天的な要因に強く影響を受け



ていることが明らかとなった。つまり遺伝的に同じ個体を安定して入手することができれば、アルカロイド組成比が安定した麻黄を安定して入手することが可能であることが分かった。しかし、アルカロイド含量はクローン株を同じ環境化で栽培をしても、個体ごとの変動が大きかった (Fig.3A) ため、平均的に含量を高める栽培方法を検討する必要がある。本研究においては、野生での生育環境がアルカロイド含量へ及ぼす影響を調査したが、アルカロイド含量が高含量となる環境要因に関する新知見を得ることはできなかった。また産地調査の結果、*E. equisetina* は *E. sinica* 及び *E. intermedia* よりも含量が高い傾向が認められた (Table. 3) ため、本種の活用についても検討の余地があると考えられる。

以上

#### 謝辞

本研究は厚生労働科研 (No. H25-創薬一般-002) により行われた。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省, 『第16改正日本薬局方』, 1589(2011).
- 2) Hiroshi Hikino, Chohachi Konno, Hiroshi Takata and Mitsuru Tamada, Antiinflammatory Principle of *Ephedra* Herbs, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**(10), 2900-2904(1980).
- 3) Yuki Kitani, Shu Zhu, Takayuki Omote, Ken Tanaka, Javzan Batkhuu, Chinbat Sanchir, Hirotohi Fushimi, Masayuki Mikage, Katsuko Komatsu, Molecular Analysis and Chemical Evaluation of *Ephedra* Plants in Mongolia, *Biol. Pharma. Bull.*, **32**(7), 1235-1243(2009).
- 4) Li-Li Wang, Nobuko Kakiuchi, Masayuki Mikage, Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 6: Geographical changes of anatomical features and alkaloids content of *Ephedra sinica*, *J Nat Med*, **64**, 63-69 (2010)
- 5) 中国科学院中国植物誌編集委員会編, 『中国植物誌 第7巻』, 468~489, 科学出版社, 北京 (2000).
- 6) 新疆植物志編委会, 『新疆植物志 第1巻』, 87-108, 新疆科技衛生出版社, 烏魯木齊 (1993).

