

厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業)

能登半島における国産麻黄生産拠点の構築

平成 25 年度 総括・分担研究報告書
(H25-創薬-一般-002)

研究代表者 御影 雅幸
金沢大学医薬保健研究域薬学系

平成 26 (2014) 年 3 月

目次

総括研究報告

- 能登半島における国産麻黄生産拠点の構築 1
研究代表者 御影 雅幸

テーマ別研究報告

1. 中国内蒙古自治区における麻黄栽培の現地調査報告 7
研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教
2. 中国新疆における栽培地調査 18
研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系 助教
3. 同所的に栽培された *Ephedra sinica* Stapf と *E. equisetina* Bunge のアルカロイド含量 21
研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授
4. *Ephedra equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の分類学的位置に関する研究 24
研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
5. マオウ種子の発芽に関する検討 34
研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
6. シナマオウの増殖法の検討 -株分け法- 36
研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教
7. シナマオウの増殖法の検討 木質茎の挿し木 40
研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教
8. シナマオウの増殖法の検討 草質茎の挿し木 47
研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

9 .	マオウ属植物の交配実験		62
	研究代表者	御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授	
	研究分担者	佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授	
	研究分担者	三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教	
10 .	生育地の斜面の向き・位置・土質によるアルカロイド含量の相違		56
	研究代表者	御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授	
	研究分担者	佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授	
11 .	水耕法による麻黄栽培の可能性の検討		60
	研究代表者	御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授	
	研究分担者	佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授	
	研究分担者	三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教	
12 .	光量がアルカロイド含量に及ぼす影響に関する研究		64
	研究代表者	御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授	
	研究分担者	佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授	
	研究分担者	三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教	
13 .	マオウの栽培品種選抜に関する研究	エフェドリン系アルカロイドの 含量比率	69
	研究代表者	御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授	
	研究分担者	佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授	
	研究分担者	三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教	
14 .	国内初のマオウ栽培圃場の構築；志賀町圃場について		75
	研究代表者	御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授	
	研究分担者	佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授	
	研究分担者	三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教	
. 分担研究報告			
	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		87
	研究分担者	関田 節子 昭和薬科大学 特任教授	
. 資料			
1 .	Anatomical, Chemical, and Molecular Genetic Studies of <i>Ephedra distachya</i>		101
2 .	マオウ属植物の栽培研究（第2報） 海水がシナマオウの生長およびアルカロイド含量に及ぼす影響		113
3 .	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		121

能登半島における国産麻黄生産拠点の構築

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

マオウ属植物 (*Ephedra* spp.) は世界中の乾燥地域や高山帯等に自生する植物で、これまでに約 50 種が知られている。そのうちの 3 種 (*E. sinica* stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer, *E. equisetina* Bunge) が現在、漢方生薬「麻黄」の原植物として、日・中の薬局方で規定されている。また、アルカロイドのエフェドリンが日本人研究者の長井長義博士により単離され、西洋医学で喘息治療薬として利用されている。『第 16 改正日本薬局方』では、麻黄にはアルカロイド(エフェドリンとプソイドエフェドリンの総和)として 0.7% 以上含有することを規定している。

マオウ属植物は日本には分布せず、近年は「麻黄」の必要量の全量を中国から輸入している。1999 年 1 月から、中国は資源保護と砂漠化防止を理由に麻黄の輸出を規制し、その供給が危ぶまれている。よって、本課題では日本での麻黄栽培供給を目的として、能登半島において麻黄の国内生産の実用化を目指すことを目的とした。

麻黄の国内生産は初めての試みであり、不明な点が多く、解決すべき課題が多い。そこで本研究では、(1) 栽培種の選択、(2) 種苗生産法に関する研究、(3) 栽培適地の選定、(4) 栽培条件の研究、(5) 栽培拠点の構築、(6) 有効成分その他含有成分の解明、を目的とした。同時に、エフェドリンを 10%以上含む製品は覚せい剤原料となるので、マオウ栽培の栽培地保護対策も検討事項とし、3 年後の事業化を計画し、本年はその初年度である。

(1) 栽培種の選択：麻黄の原植物は日本薬局方で 3 種が規定されており、現時点ではそれらの中から栽培種を決定する必要がある。代表者らがこれまで検討してきた結果、根茎を伸ばして増殖する性質が強い *E. sinica* が栽培適種であると考えてきた。一方、今年度の中国新疆における現地調査で、同一場所に植えられた *E. sinica* と *E. equisetina* では、後者の方が有意にアルカロイド含量が高いことが明らかになり、*E. equisetina* の栽培も検討すべきであることが明らかになった。また、トルコなどに生育する *E. major* Host ssp. *procera* (C.A.Mey.) Bornm を *E. equisetina* のシノニム(同種)であるとする説があり、事実であれば *E. major* ssp. *procera* を日局「麻黄」として使用することが可能であるので、分子生物学的に ITS1 領域を検討した。その結果、*E. equisetina* には 1 塩基の挿入があることが明らかになり、*E. major* ssp. *procera* を別種とするよりは *E. equisetina* の亜種あるいは変種とすることが適切であるとする結果が得られた。

(2) 種苗生産法に関する研究：大規模な栽培化にあたっては、種苗の大量生産法の確立が欠かせない。代表者らはすでに種子生産法に関してはその方法を確立しており、今年度は株分け法や挿し木法について検討した。その結果、地下に伸長した根茎を利用して株分けするのが有利であることを明らかにした。また、挿し木法ではこれまでは木質茎を利用すると容易であるが、草質茎では困難であるとされてきた。本研究で、草質茎でも人工気象器を利用する等して条件を整えば約 80%の発根率が得られることを明らかにした。また品種改良を目的に、株間の交配実験を行なった。その結果、Ep-13 株(♀株、*E. distachya* L. とされるが現時点では詳細不明)と *E. sinica* (♂)との交配、また *E. sinica* 間での交配に成功し、いずれも種子から発芽苗を得ることができた。

(3) 栽培適地の選定：これまでの海外学術調査で、マオウ属植物、特に *E. sinica* は砂地、がれき地、畑地、黄土等、様々な土壌に適應して生育することを明らかにしている。一方、*E. equisetina* は岩場やがれき地を好んで生える特徴がある。今年度は、*E. sinica* を能登地方の海砂地、山砂地、畑地にそれぞれ植え付けし、生育状況を観察中である。また、中国における麻黄栽培地を現地調査し、*E. equisetina* が畑土に栽培されていることを確認し、また麻黄の収穫時期が 9 月中旬から下旬であること、野外で乾燥されていること等の知識を得

た。

(4) 栽培条件の研究：麻黄は日本薬局方では総アルカロイドを 0.7%以上含むことを規定しており，栽培収穫物がこの規定を超える必要がある。大規模栽培化にあたり，アルカロイド含量が上昇する栽培条件を検討する必要がある。本年度は日照条件を検討した結果，日照が強いほどアルカロイド含量が高くなることが明らかになった。また新規に，青森県産業技術センターと共同で水耕栽培法の検討を始めた。

(5) 栽培拠点の構築：能登半島は砂浜や山地など多様な地理を有している一方で，耕作放棄地など栽培研究に利用可能な圃場が各地に点在している。本年度は，石川県羽咋郡志賀町及び石川県金沢市大野町で試験栽培を開始した。

以上の研究事業の協力体制として，今年度は申請者が所属する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の研究者を中心に，水耕栽培を青森県産業技術センター及び株式会社グリーンファーム，栽培研究を株式会社くさのね，合同会社菜友館，および能登町地域活性化推進協議会とした。

(6) 有効成分その他含有成分の解明：マオウ属植物からは鎮咳活性成分のエフェドリンが単離されているが，漢方生薬「麻黄」としての有効成分は未解決である。麻黄栽培においては収穫までに数年を要することから，栽培の方向性を決定するには有効成分の早期発見が不可欠である。本年度は *E. americana* にはアルカロイドを含有しないこと，その他フラボノイド成分，タンニン成分などを分析し，数種の化合物を同定した。

研究分担者 佐々木 陽平

金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授

研究分担者 三宅 克典

金沢大学医薬保健研究域薬学系 助教

研究分担者 関田 節子

昭和薬科大学 特任教授

研究協力者 倪 斯然

金沢大学大学院自然科学研究科 ポスドク

研究協力者 松本 昌士

金沢大学大学院自然科学研究科 院生

研究協力者 安藤 広和

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 院生

研究協力者 ニルファエル ムタリフ

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 院生

研究協力者 金田 あい

金沢大学医薬保健研究域薬学系

研究協力者 高野昭人

昭和薬科大学薬学部 教授

研究協力者 中根 孝久

昭和薬科大学薬学部 准教授

研究協力者 國本 崇

徳島文理大学理工学部 教授

研究協力者 代田 修

徳島文理大学香川薬学部 教授

研究協力者 黒柳 正典

静岡県立大学薬学部 客員教授

研究協力者 中出 喜美子

株式会社くさのね 代表

研究協力者 松村 博行，須藤 雅彦

合同会社菜友館

研究協力者

株式会社グリーンファーム

研究協力者 今井 照規

青森県産業技術センター施設園芸部 部長

研究協力者 飯田修，杉村康司

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

A. 研究目的

漢方生薬「麻黄」は葛根湯等に配合される重要生薬である。日本には原植物のマオウ属植物（マオウ科の *Ephedra* spp.）が自生しないため、現在は必要量（年間約 500 トン）を 100% 中国からの輸入品に依存している。一方、中国におけるマオウ資源の現状には厳しいものがあり、中国政府は 1999 年から輸出規制を行なっている。そこで本研究では、麻黄の国内生産を目指して、能登半島を中心に栽培拠点を構築することを目的とする。

B. 研究方法

（１）栽培種の選択，（２）種苗生産法に関する研究，（３）栽培適地の選定，（４）栽培条件の研究，（５）栽培拠点の構築，（６）有効成分その他含有成分の解明，などに関する調査研究を行なった。

（倫理面への配慮）
該当なし

C. 研究結果

（１）栽培種の選択：*Ephedra sinica* Stapf が中国各地で栽培され、栽培適種であることが明らかになった。一方、本年度に中国の栽培地を見学した新疆では *E. sinica* とともに *E. equisetina* Bunge が植えられている畑があり、アルカロイド含量は後者の方が有意に高かった。

（２）種苗生産法に関する研究：挿し木法を検討した結果、木質茎では容易であるが、草質茎では人工気象器を利用するなどして約 80% の発根率が得られた。また、秋期に挿し木し、春に定植することが効率的であることが明らかになった。株分け法では、地下茎を利用する方法が好成績であった。また、交配実験では、同種間のほか他種間との交配も可能であった。

（３）栽培適地の選定：石川県羽咋郡志賀町及び金沢市大野町の山砂地、砂地、畑地などに *E. sinica* の主として 3 年生苗を植え付けし、現在、継続的に観察中である。

（４）栽培条件の研究：アルカロイド含量を確保するには、日照が多い方が良いことが明らかになった。

（５）栽培拠点の構築：能登半島各地に休耕地（栽培放棄地）やタバコ栽培の跡地などがあり、利用可能な土地は多いが、働き手が少ないことが問題点として浮かび上がった。

（６）有効成分その他含有成分の解明研究：アルカロイド成分のほか、フラボノイド、タンニン成分などを解析中で、単離した化合物の構造を徐々に解明しつつある。

D. 考察

（１）栽培種に関しては *Ephedra sinica* Stapf が適

していると判断され、実際、現在中国では多くの栽培地で本種を栽培している。一方、同時に、アルカロイド含量が高くなる *E. equisetina* を栽培している場所もあり、今後、本種の栽培を検討する必要もあると考える。

（２）種苗生産に関しては、現在中国では全て種子からの発芽苗を利用している。本研究により、乾燥した条件下で種子生産が可能であることが明らかになったので、今後はそうした設備のもとで大量の種子生産が可能になろう。一方、今後、優良品種が選抜できた際には、株分け、挿し木等の方法によるクローン株の生産も重要となろう。今年度の研究により多量に得られる草質茎による挿し木法に目処がついた。

（３）栽培適地については現在様々な土壌や環境で試験栽培中であり、苗を確保した上で、今後さらに異なる環境で試験栽培する必要がある。

（４）栽培条件については、アルカロイド含量を確保するにはできる限り日照が妨げられない場所が適していることが明らかになった。今後は南斜面に植える等の検討も必要であろう。

（５）栽培拠点の構築に関しては、現在の能登半島各地は耕作放棄地が多く、栽培可能な面積は大きいですが、働き手がいけないことが問題となっており、この問題を解決する必要がある。また、麻黄は栽培開始から 5 年を経過しないと商業ベースでの収穫が見込めない（中国）ことから、高齢化した地方で初期投資が困難なことも問題点として解決する必要がある。

（６）麻黄の含有化学成分に関して、近年はエフェドリン以外の成分の有効性が期待されている。今後も多方面からの研究が必要である。

E. 結論

現時点において、麻黄の国産化において解決すべき最大の問題点は、収穫物のアルカロイド含量が日局規定の 0.7% を超えることである。従来、この点に関する研究は代表者らの報告以外にはなく、今後もこの点を重視して、アルカロイド含量が高くなる栽培方法を多角的に探索していく必要がある。また、栽培者にとっては換金作物としての魅力がない場合には栽培を手がけることが困難である。とくに、収穫までに数年を要する麻黄栽培においては、公的な初期投資等も考慮する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 発表論文

1. Masashi Matsumoto・Manabu Hirayama・Norihiro Ohtomi・Takeshi Ohno・Yukihiro Nomura・Osamu Iida・Koji Sugimura・Nobuo

Kawahara · Takashi Tsuchida · Masayuki
Mikage : Influence of genetic factors on the
ephedrine alkaloid composition ratio of
Ephedra plants : *J. Nat. Med.* (投稿中)

- 2 . 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)
- 3 . 大富規弘, 野村行宏, 井出達也, 大野剛史, 毛
利千香, 御影雅幸 : マオウ属植物の栽培研究 (第
2 報) 海水がシナマオウの生長およびアルカロイ
ド含量に及ぼす影響。薬用植物研究, **35** (1),
1-8 (2013)
- 4 . Siran Ni, Masashi Matsumoto, Yui
Shimoyama, Nathalie Allain, Maksut COŞKUN,
Turgut YILMAZ and Masayuki Mikage :
Anatomical, Chemical, and Molecular Genetic
Studies of *Ephedra distachya* : *J. Jpn. Bot.*, **88**
(3), 144-155 (2013)

招待講演

- 1 . 御影雅幸 : 中国におけるマオウ栽培に関する調
査結果と現状。第 14 回加賀・能登の薬草勉強会。
平成 25 年 10 月 26 日 (金沢市)
- 2 . 御影雅幸 : 生物多様性と生薬の品質 (マオウを
例に紹介)。第 63 回日本薬学会近畿支部総会・
大会, 平成 25 年 10 月 12 日 (京田辺市)
- 3 . 御影雅幸 : 葛根湯が作れなくなる マオウを求
めて世界中を駆け巡る。放送大学創立 30 周年
記念講演会。平成 25 年 7 月 13 日 (富山市)

新聞記事の掲載

能登半島における薬草栽培に関する記事が、「北國
新聞」(平成 25 年 6 月 17 日付け朝刊)及び「富山
新聞」(同)に、志賀町でマオウを植え付けしたときの
写真とともに紹介された。

(次ページに掲載)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. **特許取得**
該当なし
2. **実用新案登録**
該当なし
3. **その他**
該当なし



「北國新聞」記事（平成25年6月17日付け朝刊）
 1面トップ記事でマオウの植え付け作業写真とともに紹介された。
 （この時点ではマオウの名前は掲載せず単に薬草とするよう依頼した。）



金沢市大野町（株式会社金剛敷地内）に植え付けた *Ephedra sinica*（手前。奥はニラ）

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
研究報告書

中国内蒙古自治区における麻黄栽培の現地調査報告

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

本研究「能登半島における麻黄栽培の拠点形成」は麻黄の国産化を目的としている。そこで、すでに栽培化している中国における麻黄栽培状況を調査する目的で、内蒙古自治区の杭锦旗錫尼鎮並びに鄂托克前旗の栽培地において収穫時期に現地調査するとともに、管理人から聞き取り調査を行なった。その結果、栽培方法、収穫時期や方法等に関して、今後の国内での栽培に際して有益な情報を多数得ることができた。

研究協力者 倪 斯然 金沢大学大学院自然科学研究科院生

A. 調査研究目的

マオウ属植物の国産化に際して、1980年代から始まったとされる中国における栽培事情を調査することは重要である。これまでに栽培地の訪問調査は行なわれていたが、収穫時期における調査は行なわれていなかったため、今回内蒙古自治区の2箇所で収穫状況等を調査した。

B. 調査方法

平成25年9月下旬に内蒙古自治区の杭锦旗錫尼鎮並びに鄂托克前旗の栽培地において調査した。調査地では、栽培状況、収穫状況等を調査するとともに、管理人に直接会って聞き取り調査を行なった。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 調査研究結果

9月24日：杭锦旗錫尼鎮。管理人Aさん

現在、杭锦旗錫尼鎮で麻黄を栽培しているのはここだけである。

1999年から麻黄の栽培を始めた。

政府の土地である草原を30年借りて畑を作って、現在では美康の栽培基地に指定された。

製薬会社から少し資金を提供してもらい、契約栽培もしているが、買い付け価格は高いとは言えない。

ここで収穫された麻黄は美康を通じて日本へ輸出するらしい。

麻黄の種子は通遼や赤峰地方（珠日河草原らしい）から買って、発芽させ苗を育てた。

発芽後2年で、根の長さが15センチになったものを畑に植えた。

種子から苗を育てる時は、田畑を30~40センチまで深く細かく耕して、地ならしをして、5月に種をまいて、薄く土をかける。あぜを作ったりフィルムをかけたりする必要はない。

種子の品質（発芽率）が非常に重要で、通遼からの種子は良質である。

苗を育てる時、最初に水や肥料をたっぷり与える。その後、苗がちょっと生長したら根を発達させるため水やりを少なくする。

苗を畑に定植する時は、穴を掘って苗を入れて土で埋めればよい。

うね間は約30センチ、株間は約20センチだった。苗の活着率は95%。

1ムー当たり13000株を植え、費用（賃金）は60元。

種子で計算すると1ムー当たり10kg使った。麻黄畑を作った時は苗から植え、植えた3年目から地下茎が横に発展し、そして毎年収穫できるようになる。

除草作業が麻黄栽培で一番難しいところだ。

水やりすれば雑草が出る。

除草剤は農薬残留の恐れがあるため使えないので、年中ずっと人を雇って除草している。人件費は高くてもしょうがない。ある雑草が痛くて取りにくいので、仕方がなく麻黄と一緒に除去

る、あるいは除草剤と一緒に殺すしかない。除草以外の畑管理は肥料を与えることと水やりだ。

水やりは 4 月下旬から 6 月の終わりまで毎日（機械は毎日稼働、それぞれの麻黄に対しては大体週 1 回くらい）地下水を灌水する。7 月から麻黄の生長が止まり始めるので、灌水をやめる。

地面設置型のスプリンクラーは水がずっと同じ場所に当たるので、移動のスプリンクラーのほうが効果がよい。

麻黄の生長時間は 4 月下旬から 7 月までだ。9 月に入ると（1 日から）収穫する。

（農閑期で）人を雇いやすいため他の農物より早く収穫するが、早すぎると茎が軽い（乾燥歩留まりが悪い）。

収穫の人件費は 1kg あたり 1 元、一人は 1 日あたり 1 ムーまで収穫できる。

機械では収穫できない。刈り取り機を工夫して自作しているがなかなかうまく行かない。

毎年収穫しないと茎は木化してしまう。木化すると草刈り鎌で刈り取ることができない。

ここの冬の気温はマイナス 20 度、雪は 20cm くらい積もるが、麻黄はそのまま置いても枯れない。ただし、草質茎は赤くなり、来年の春にまた緑に戻って生長し、別に茎の節からも新しい茎が出る。

麻黄の乾燥について：麻黄の収穫が終わったら、束を作って畑で日乾する。最初は束を横にして置き、少し乾燥したら立てて置く。ずっと横にしておくと、雨に当たったり地面の水分と接触したりするので腐敗する。

完全に乾燥したら袋に入れて製薬会社に売る。

麻黄は乾燥すると、重量はもとの 45% になる、他の損失をも考慮すると、最終製品の重量は生品の 40% くらいである。

うちの栽培面積は全部で 500 ムー。生の麻黄は 1 ムーあたり 500kg 収穫できるので、乾燥品は全部で 200 トン収穫できる。

麻黄の値段は毎年変わる。去年は上がったが、一昨年は下がった。今の値段は 1kg あたり 15 元、運賃は生産者持ち。

麻黄から麻薬を作れるため、中国政府の管理は厳しくなってきた。栽培するのは大丈夫だが、売却先は政府に正式登録された会社しか許されていない。

昔は前旗にもエフェドリン工場があったが、倒産してしまった。現在、蘭州にある製薬会社は麻黄を買ってエフェドリンを作っている。うち

の麻黄は全部天津の会社に売る。

麻黄の栽培では、種子から苗ができるまでに 2 年を要し、さらに苗を植えてから 3 年間収穫できないので、毎年人件費、除草代、肥料代、電気代などがかかり、その間の出費は合算すると 1 年あたり 10 万元だった。

その後 4～5 年間は産量が少なく、苗を植えてから 7～8 年後には安定して生産できるようになる。普通の牧民には（この経費は）負担できない。

麻黄の種子はこの圃場では実らない。理由は、収穫しなかった麻黄にしか種子ができないからである。いわゆる 1 年目の茎には毬果はできず、2 年目の茎にはできる。

種子ができてても売ることはないので不要だ。ちなみに麻黄の毬果は甘く、種子は炒めて食べられる。

ここの年間降水量は 100mm くらい、今年は 130mm だった。

春には黄沙があるが、麻黄には影響しない。

麻黄以外に、甘草もちょっと栽培している。

麻黄の色の株差（緑の濃いものと薄いものがある）は、多分肥料と水の違いによるもの。

9月25日：鄂托克前旗。管理人 B さん

管理人（畑の持ち主）の B さんは河南省の開封の出身で、奥さんのお父さんがここで 1 人で働いていたからこの土地に来た。家族は 3 人、娘さんは 1 歳。

麻黄生産では去年儲けたが、それ以前は毎年損をしていた。麻黄の買い付け価格は、最初（16～17 年前）は 0.5～0.7～0.8 元/500g で、その後も 1～2 元/500g ほどの安さだった。水道代と電気料、労働者の給料その他の各年の初期投資の合計は売上金とほぼ同じだった。その頃は、麻黄畑を諦めてトウモロコシに変わる農家が多かった。うちはそのまま植えつづけて、そして去年初めて金を儲けた。

十何年前にこの畑を買って、麻黄の栽培を始めた。

当時エフェドリンを作っていた工場があって、前旗（政府）が麻黄の栽培を呼びかけたので、親父はこの畑を買った。

去年は工場が麻黄を買い集めなかったもので、うちの麻黄は全部天津の製薬会社を買われた。今年は買い集めるらしい。

麻黄の栽培面積について、こっちは 300 ムーがあって、裏には 200 ムーがあり、合わせ

て 500 ムーがある。ちなみにここは某製薬会社の麻黄生産基地になったが、技術指導や資金面の援助は一切なく、生産基地という名前だけ付けて、麻黄を買ってくれた。

さきほど見た麻黄は苗を植えつけたものであり、苗は自分で種子をまいて育成したものだ。

麻黄の栽培は最初は容易ではなかった。値段が安いので金をならず、誰も関心を持たず、かつてやめようと思ったことがある。去年から値段が上がって、栽培しようと思う人が多くなった。麻黄の苗を植えつけた後の3年間にできた茎は細くて髓が少なく、アルカロイド含量が低かったため、誰も買ってくれず捨てたから金にならなかった。そして毎年十何万元、合わせて50～60万元の資金を投入したので大変だった。その後は投資と売上金ほぼ同じで、去年ようやく儲けた。

ここに土地を買って畑を作ってから、ずっと麻黄しか栽培していない。

麻黄は一旦大きくなれば管理はちょっと楽になるが、その前、特に最初の3年間は難しい。

苗はちゃんと植えなければいけないが、雇った人はきちんと植えてくれない。

毎年肥料を施さなければ生長しない。肥料は窒素系を2種類、1ムーあたり40kg、2種類を半々に使っている。

他の管理は水やり、除草と殺虫だ。水やりは10日に一回くらいしている。ここはあまり雨が降らない、年間降水量は大体十数cmだ。最近雨が降ったが、(水遣り周期からは)ちょっと遅かった。

除草の作業はほぼ20人を雇って毎日やるが、今年は雨が多かったので特に雑草が多くて(背丈が)高い。

人件費は1ムーあたり500～600元、別に食事と住むところを負担する。

1人1日あたり0.2～0.3ムーをやれる(多い人で0.5ムー?)

肥料代と人件費などの費用を合わせて、この投資は1年あたり40万元ぐらいだ(刈り取るだけで16～17万元)。

除草剤を使うと麻黄も枯れるし、ある雑草には除草剤が効かないのであまり使わない。

「草飛死」というすごく小さい虫が夜に出て、たった一晩で麻黄を噛む。噛まれた麻黄は茎に小さい穴がたくさんあき、色が黄色に変わって、枯れてしまう。これは一番恐いことだ。「草飛死」は小さいのでよく見ないとわからず、しかも昼に出なくて夜のみ出るから、前日元気だっ

た麻黄が一晩で枯れる。枯れた麻黄の下に注目すると、大勢の虫がいる。この虫が毎年現れ、他の人によると、卵は冬を越せるらしい。「草飛死」を殺すために殺虫剤(毒死蟬<クコロピリホス?)を使う。他の殺虫剤は農薬残留問題があるので使わない(使ったら買い付ける会社が検査する際に発見され、売れなくなる)。買い付け会社の社員は毎年9月前後にエフェドリン含量を検査しに来て、含量が基準に達したら刈り入れる。

麻黄は刈り取った後は完全に乾燥させて、翌年会社に運ぶ(麻黄が濡れていると運ぶ途中で腐敗する)。

この栽培面積が500ムー、乾燥した麻黄が一年当たり200トン是可以する。これからもっと面積を増やしたい。

今の買い付け会社はエフェドリンを抽出するためではないので、麻黄が黄色く枯れないうちの緑の茎を買う。9月終わりごろからここでは霜が降り、麻黄の茎は赤くなり、乾燥しても普通の黄色にならないが、美康はその紅い麻黄を買わない。それ故、毎年一番早く刈り入れるのは麻黄で、大体9月に入ると始める。遅くなったら、人が雇えなくて間に合わない。エフェドリン含量については9月以後ほぼ同じ、具体的な数字は分からない。

今年、新しい畑をつくりたかったが、去年苗が育たなかった。前の数年間は麻黄の価格が安かったせいで、去年買った種子は古いものだから、発芽率は5%と低かった。他の人も同じだった。新しい種子は今どこでも売っていない。

苗を育てるのは2年かかり、また、苗を植えてから3年間は売れなくて捨てるが、毎年刈らなければならぬ。刈らないと茎が木化するし、根が横に行かない(根茎で増えない)からである。

種をまく時期は4、5月で、苗を植える時期も4、5月だ。

6月を過ぎると水はなるべくやらず、根を発達させる。水が少ないと、麻黄の茎は伸びず、かえって根が伸びる。でもやっぱり水が少ないと麻黄の生長には影響を与える。

今年は雑草が多くて背丈が高かったため、麻黄の生長は悪く、マオウの茎は高く伸びなかった。雑草の対策について：人を雇って取る他、パラコート(百草枯、3元から6元/一瓶)を、春マオウの芽が出る前、雑草の芽が出る時に1回使ったらその後の除草が大分楽になる。パラコートは麻黄も雑草も、緑の植物をすべて枯らす。

もし麻黄を採集する時に、いわゆる草質茎が残っていると、パラコートを使う時雑草と一緒に当たって枯れる。茶色の木質化した茎は大丈夫らしい。麻黄を刈り取る時は、なるべく地面近くから刈ったほうがよい。麻黄の芽が出た後は絶対パラコートを使わない。土をかけるともっとよいが(栄養作用もある)、かける土にも雑草の種子があるし、費用も高すぎる(600元、1ムー?)。

畑は麻黄を刈った後、いわゆる冬にはそのまま置き、水もやらず、正月(旧暦)が終わったら水やりを始める。

ここで冬にはマイナス20から30度になり、地下1メートルに埋めたホースの水が凍って割れたことがある。

気候はあまり関係なく、もっと寒い呼伦贝尔(フルンボイル:内モンゴル東部のロシア・モンゴル国境の市)にも栽培地があるらしい。ここ(鄂托克前旗)で霜が降らない期間は大体120日間だ。

採集時期は経験から判断すると、ちょっと遅くても大丈夫だ。早く採集する麻黄は軽い、遅く採集するものは重くて収量が多くなる。

去年麻黄の値段が上がったのは、赤峰地方に大雪が降って、麻黄を採集することができなくなって、供給不足だったからだ。

エフェドリン含量を増やす栽培方法は特にない。麻黄は6~7月までの1ヶ月間のみエフェドリンを作り、その間には水をたっぷりやり、その後は水やりを減らして根に発達させる。麻黄の茎は高く太いと皮層部が厚く、かえって髄部の割合が少ないのでエフェドリン含量は低い。買い付け会社はエフェドリン含量に応じて価格を決めるので、うちの麻黄は背丈を高くさせない。高くさせない方法は、6月中旬から水をあまりやらないことだ。

買い付け会社によるとうちの麻黄はエフェドリン含量が高い。

この辺りの麻黄は品種が同じ、ほぼ赤峰地方から種子を手に入れた。

栽培品と比べて、自生する麻黄のエフェドリン含量は高い。それは人の手が入っていないからだ。自生品は産量が少なく、エフェドリン含量が高くなる。

前旗の栽培量を合計すると2000トン未満だ。麻黄は乾燥すれば保存しやすいので、もし今年値段が安いと来年まで置いて売ればよい。マオウを栽培している農家は十何軒があって、30~40ムーを栽培する人が多い。うちのよう

な大きな栽培地は少なく、うちが一番大きい。うちの産量は生の麻黄は1年400~500トン、乾燥重量で200トンくらい。1ムー当たりは生のもので1トン、乾燥すると400~450kgくらい。

エフェドリン工場があるが、整備中のため前の数年間は麻黄を買い付けなかった。今年からは麻黄を買い付けるらしい。

麻黄が安かった時に栽培した人は、(売れないために)麻黄の管理をしなかったので、麻黄は水がなくて枯れたし、雑草に負けたし、その結果畑がなくなった場合も少なくない。

麻黄は刈り取った後ずっと畑に置いて乾燥する。最初は束を横にして置いて、上面が乾燥したら反転して下側を乾燥させる。これにはほぼ1週間かかる。その後は立てて置く。そうする理由がある。最初から立てて置くと、麻黄の断面から何か汁が地面に流れて、来年麻黄の生長に悪い影響がある。横に置いて、断面を乾燥させて密閉させたら立てて置く。ずっと横に置いてダメ、束の中が腐敗するから。完全に乾燥すると積み上げてもよいし、そのまま置いてよい。雨や雪が降っても大丈夫だ。

うちは植え替えをしない。9月に苗を植えるのはここでは良くない。すぐ寒くなるから移植後の生育が低い。

機械で麻黄の収穫ができない、深くなったり浅くなったりするから。深く刈ると根茎まで刈ってしまい麻黄が枯れかねない。もし畑がとても平らであれば出来るかもしれない。

十何年前この近くに野生の麻黄がたくさんあったが、今はもうなくなった。野生の麻黄は根まで掘るので、小さくなってなくなった。現在、野生の麻黄、甘草と防風の採集は禁止されている。

近年は麻黄を栽培する家と面積は半分に減っている。土地はトウモロコシ畑やナツメ畑に変わった場合が少なくない。

マオウ畑を柵で囲う理由はヤギやヒツジの侵入防止。綿羊は麻黄を食べないが踏むことによってマオウは倒れる。山羊はマオウが小さい時に根まで掘って食べる。麻黄は一旦倒れたら立ち上がらないので(とくに収穫が)大変だ。

麻黄の栽培は成功すればずっと収入がある。将来はどうなるか知らないが、今、土の下は全部麻黄の根だ。他の人によると、麻黄根と麻黄とは性質が逆で、エフェドリンも含まないため、誰も買わない。

中麻黄(*Ephedra intermedia* Schrenk et

C.A.Meyer) は栽培しない、全部草麻黄 (*Ephedra sinica* Stapf) だ。
最初は銀川から苗を買ったが、値段が高いので、2年目からは自分で種子から苗を育てた。今、苗を売っている所はない。
今年の麻黄の値段は 15~16 元 / 1kg で、去年は 20 元以上 (23 元) であった。乾燥したものだけが売れた。
肥料について：うちではマオウが 1 尺くらいに生長した時に 1 回のみ与える。もし株を大きくさせたかったら 5, 6 月にもう 1 回やればよい。手作業で肥料を与え、1 人 1 日あたり 20~30 ムーの広さを担当できる。
苗を植えた時、うね間は 15 センチ、株間は 10 センチ未満だった。1 ムーあたり 11,000 から 12,000 株だった。
トウモロコシ栽培は電気料と水道料、また農薬と肥料代が高く、今は儲からない。
今、麻黄以外の生薬を栽培する計画はない。土地は 500 ムーしかないの、他の作物を植えると麻黄をやめなければならないから。
今、私が知る限り、銀川の近くの麻黄の栽培はなくなって、全部甘草に変わった。麻黄は金が儲からないから。うちも一度畑を (違う作物に) 変えたいと思ったことがあった。麻黄が安い時代には麻黄畑を 1 ムー 2000 円で売る人もいた。今、畑を買いたい人がたくさんいるが、1 ムー 30000 元でも売る人がいない。
最初麻黄畑の周りに防風林を作った。風が強いから黄砂がたまり、麻黄を埋めてしまう。今は麻黄が大きくなったからもう防風林が要らない。今は、防風林を切ってしまった。
私は他の仕事をしていて給料をもらっていたので、麻黄の栽培で収入がなくても大丈夫だった。今は仕事に行かなくなった。
これから先 4~5 キロ行けばまだ麻黄の栽培地がちょっとある。一軒あたり 30~50 ムー栽培しており、全部合わせて 400 ムーくらい。(南部の) 塩地にも栽培地があるらしい。
裏の畑は雑草が多くて刈り取り作業が困難であった。仕方がないので、一旦収穫を中止した。これから気温が下がると雑草が枯れるので、その時に雑草を取って収穫するつもりだ。
雑草が高く生長すると、マオウは太陽に当たれなくなって枯れる。(雑草の生長を防ぐため) 完全に除草するまでは畑に水やりをしない。
麻黄保管用の倉庫を建てるつもりだが、政府から許可をもらえない。
今年マオウが倒れているのは、除草した時に踏

まれたからだ。ちなみに麻黄が寝ていると収穫の時に手間がかかる。
買い付け会社の人は前年 A さんの案内でここに来て、栽培地の様子を見た。
茎先が曲がっているマオウ株と真っ直ぐ伸びるものと品種は違うと思う。病気ではない。
種子は全部赤峰から買ったからと言っても、品質が完全に同じとは言えない。
畑の中で茎が黄色のものは肥料不足のせいだ。
水やりを使う水は地下 100m 以下から泉水をポンプで汲み上げている。一番大変な雑草は沙蓬 (ヒユ科の *Agriophyllum squarrosum*) で、今はまだ種子が出来ていない。お正月が終わったら取った雑草を他の場所で焼く。

D. 考察

予想されたように、麻黄栽培における最大の困難は除草作業であることが再確認された。一方、肥料は窒素過多気味で行なわれており、地上部の発育やアルカロイド含量を高めるためには日本でも検討する必要がある。また、成熟した畑では 1 平方メートルあたり乾燥重量で 0.5~0.6 キログラム程度の収穫が見込めることが分かった。仮に我が国で年間 500 トンを消費するとして 1000 ヘクタールの面積に相当する。今回調査した 2 カ所は各栽培地とも 300 ヘクタール強の面積で作付けしていた。

E. 結論

麻黄の国産化において最大の問題点はアルカロイド含量が日局規定の 0.7% を超えることである。今回の調査で、中国の栽培者は、麻黄のアルカロイド含量を高くする方法はないと考えているが、アルカロイドは春から夏にかけての生長期に生産されると考えており、この時期の灌水や施肥の管理が重要であるようだ。今後、この点を重視して、アルカロイド含量が高くなる栽培方法を探索していきたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし
3. **その他**
該当なし



広大な麻黄畑（栽培開始後15年）



刈り取り風景



刈り取り作業



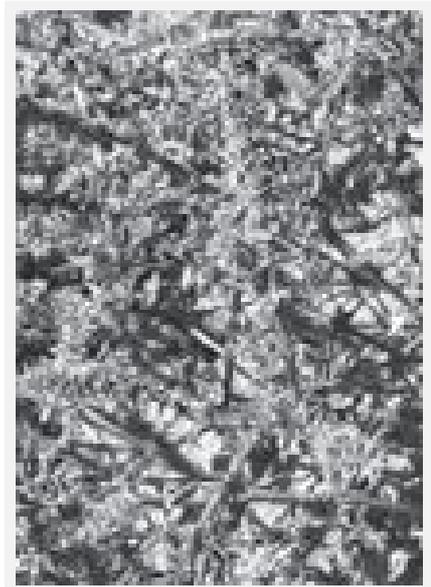
野外での乾燥（最初は横にして乾燥）



野外乾燥（後に立てて乾燥）



雑草が生えたために刈り取られなかった場所



Agriophyllum squarrosum



計量器



刈り取った後



ネナシカズラ(雑草)による被害

散水設備



移動式の撒水設備



地下水くみ上げ設備

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
研究報告書

中国新疆における栽培地調査

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授
研究分担者 佐々木陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系 助教

研究要旨 日本国内で麻黄原植物の栽培化を実施するにあたり、中国の栽培状況および栽培技術を調査した。調査地域は新疆ウイグル自治区である。この地域では *Ephedra sinica* に加え、一般に栽培し難いとされる *Ephedra equisetina* が栽培されていた。しかしこの地域では一度も収穫されることがなく放棄、転換されていた。同時に周辺に自生する *E. equisetina* について生育環境とアルカロイド含量の関係も調査した。

研究協力者 松本 昌士 金沢大学大学院自然科学研究科 院 生

A. 研究目的

漢方生薬「麻黄」は『第16改正日本薬局方』で、マオウは、*Ephedra sinica* Stapf、*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Meyer 又は *Ephedra equisetina* Bunge (*Ephedraceae*) の地上茎であると記載されている。含有成分として、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。

「麻黄」は繁用漢方処方である葛根湯や麻黄湯に配合される重要生薬である。現在日本では約 600 トンを使用しているがその全量を中国からの輸入に依存している。日本向けに麻黄が安く大量に確保することが可能であった過去、大きな問題はなかった。しかし 1999 年、中国は砂漠化を理由に麻黄の輸出規制を実施した。また近年、中国の経済発展に伴う人件費の高騰などの問題もあり、中国産麻黄を輸入し続ける利点が失われつつある。

この状況を改善するためには中国産「麻黄」への依存度を少しずつ低減していく必要がある。すなわち日本産「麻黄」

を生産し、自給率の向上を目指す。しかし現在、日本産「麻黄」の生産実績はなく、またマオウ属植物の栽培も薬系大学附属薬用植物園の見本園にわずか見られるのみである。日本産「麻黄」の生産にはまず、マオウ属植物の国内栽培を拡大しなければならない。

マオウ属植物は金沢大学薬学系附属薬用植物園において、国内最多の種類、個体数を有している。本研究課題「能登半島における国産麻黄生産拠点の構築」は保有する *Ephedra sinica* を含む日本薬局方で規定される 3 種約 300 株を元に大規模栽培化を推進するが、解決すべき問題は大きく次の 2 点である。

大規模栽培に適した種。

アルカロイド 0.7% を達成する条件。

今回の中国新疆調査はこれらの解決を目指して実施した。

B. 調査日および調査日

B-1 マオウ属植物の栽培地調査

平成 25 年(2013 年)6 月 25 日、中華人民共和国新疆ウイグル自治区博楽のマオウ属植物栽培地において調査を行った。

この栽培地は、現地付近の住民に存在及び場所を聞き取り調査し、明らかにした場所である（44.5746N, 81.3003E）。

B-2 マオウ属植物自生地の調査

新疆ウイグル自治区東北部において、様々な環境に生育するマオウ属植物を採集した。具体的に、岩や砂などの土壤環境、および日照時間（西向き、東向き斜面）である。

C. 調査研究結果

C-1 マオウ属植物の栽培地調査

【現状】新疆ウイグル自治区博楽市で探し当てたマオウ属植物栽培地は同年の春にトウモロコシ栽培に転換されていた。生育しているトウモロコシの株元には掘り起こされたマオウ属植物の根が転がっていた。正に栽培跡地であった。しかしながら、トウモロコシ畑の端に面したすぐ横1畝のみにマオウ属植物が残っていた。この理由は、トウモロコシの管理目的の灌水が行き届いたためであった。

【栽培の経緯】この地でマオウ属植物の栽培を開始した理由は、8年ほど前、政府の政策によりマオウ栽培を行うと補助金が出たことによる。一方で、栽培方法に関する指導は何もなかったという。3年間で収穫物を国が回収する予定だった。育苗容器に種子をまき、圃場に植え付けた。その後、肥料や水など特に管理も行わなかった。8年間毎年助成金をもらい、この年助成金対象の最後の年なのでトウモロコシに転作したとのこと。当時は5軒ほど栽培者がいたが、今はだれもいない。マオウ属植物1ムー（中国の面積単位、約666 m²）あたりの補助金は160元であるが、トウモロコシを栽培すると500元の収入がある。

【栽培状況】栽培されていた植物種は *E. sinica* と *E. equisetina* の2種類。種子が送られてきて早春に種まきして7～8月、圃場に定植したとのこと。

C-2 マオウ属植物自生地の調査

新疆ウイグル自治区東北部では主に *E.*

equisetina の自生地調査を実施した。これまで岩場に生育するマオウ属植物はアルカロイド含量が高いと言われていたが、今回の調査では必ずしもそうではないことを明らかにした。

また、日照時間との関連性を調べる目的で斜面の東向き、西向きに生育する個体群を比較したが、明確な傾向は得られなかった。（詳細後述）

D. 考察

これまで栽培が困難とされていた *E. equisetina* が栽培されていた。条件が合えば栽培が可能であることが明らかにされた。また播種から定植までの期間が短いようだったが、十分大きな株に育っていた。活着率は不明だが、ほとんど管理されていなかったことを考えると活着率は高いようであった。

E. 結論

中華人民共和国新疆ウイグル自治区博楽における現地調査を実施し、大規模栽培化に向けた有意義な結果を得ている。

また、新疆ウイグル自治区での自生環境とアルカロイド含量より、今後の栽培管理に対する情報をえた。

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 . マオウ属植物栽培地跡

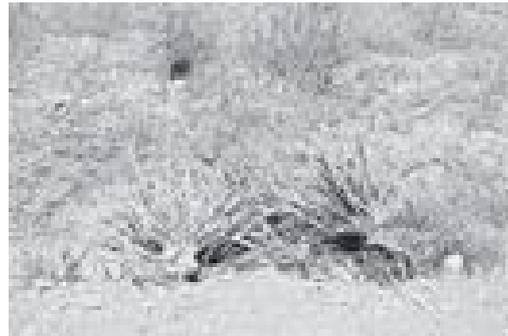


図2 . 掘り起こされたマオウ属植物



図3 . *Ephedra equisetina* 栽培株



図4 . *Ephedra sinica* 栽培株



図5 . *Ephedra equisetina* 雌株



図6 . *Ephedra sinica* 雌株

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
研究報告書

同所的に栽培された *Ephedra sinica* Stapf と *E. equisetina* Bunge のアルカロイド含量

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授

日本でマオウを栽培する際の栽培適種を調査する目的で、中国新疆で同所的に栽培されていたシナマオウ *Ephedra sinica* Stapf とキダチマオウ *E. equisetina* Bunge のアルカロイド含量の調査を行なった。その結果、*E. equisetina* の方が有意にアルカロイド含量が高かった。本種は一般に栽培が困難であるとされるが、栽培麻黄のアルカロイド含量を確保するためには、今後本種の栽培法を検討する必要もあると判断した。

研究協力者 松本 昌士 金沢大学大学院自然科学研究科大学院生

A. 研究目的

代表者らはすでにネパールヒマラヤ産の *Ephedra gerardiana* Stapf 及び *E. pachyclada* Boiss.（実際は *E. gerardiana* と *E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer の交雑種）の含有アルカロイドは生育地の土壌 pH と相関していることを明らかにし、また、中国やモンゴル産の *E. sinica* Stapf (= *E. dahurica* Turcz.) については降雨量の少ない場所に生えるものがアルカロイド含量が高いことを明らかにした。このことは、マオウ属植物のアルカロイド含量は遺伝的要因以上に、生育地の環境に左右されていることを示唆している。本研究事業における中国新疆の調査時に、同所的に栽培されている *E. sinica* と *E. equisetina* Bunge を採集し得たので、それらのアルカロイド含量を調査した。

B. 研究方法

平成 25 年 6 月 25 日に新疆博楽市の麻黄栽培地において現地調査した。調査地では、栽培状況、収穫状況等を調査するとともに、管理人に直接会って聞き取り調査を行ない、分析用サンプルを採取し、帰国後種同定し、日本薬局方に準じて HPLC 法によりアルカロイド含量（エフェドリン + プソイドエフェドリン）を測定した。

（倫理面への配慮）
該当なし

C. 研究結果

栽培は 9 年前に播種した苗を定植し、その後の灌水や施肥は一切されておらず、また採集もされていなかった。*E. sinica* 7 株と *E.*

equisetina 6 株から採取した試料についてアルカロイド含量を測定した。その結果、*E. sinica* では日局の基準である 0.7% を下回る試料が 1 株認められ、後者ではそのような試料はなかった。平均含量は前者で 0.80%、後者で 2.32% であった。以上、同所的に同期間栽培された *E. sinica* と *E. equisetina* では、*E. equisetina* の方がアルカロイド含量が有意に高かった。

D. 考察

同所的に同一期間栽培されている、すなわち同一条件で 8 年間栽培されてきた 2 種のマオウ属植物は、アルカロイド組成比、含有量ともに異なり、*E. equisetina* の方が有意に高いアルカロイド含量を示した。このことは同一環境下では *E. equisetina* の方がアルカロイド産生量が多いことを示唆している。本種の栽培は *E. sinica* に比して困難であるとされているが、一般に栽培麻黄はアルカロイド含量が低いことから、栽培品のアルカロイド含量確保のためには、今後、本種の栽培法を検討する価値があると判断された。

一方、調査した栽培地では定植後、一度も灌水や施肥をしていないと聞いた。麻黄栽培において最大の問題は除草であり、除草を怠ると背丈が高い雑草に覆われてマオウ属植物は容易に枯れる。除草作業なしに 9 年間無事に生育してきたことから、この土地での降雨量はきわめて少ないものと判断される。*E. sinica* のアルカロイド含量が比較的高いのも降雨量が少ないことが影響しているものと考えられた。また同時に、発芽苗を定植した後に（4 月に播種して 9 月頃定植したと聞いた）灌水することは必須作業であると考えられるが、調査地での欠株は目立たなかった。今年度の内蒙

古自治区の栽培地での調査において（別掲）も、地上部の成長期が過ぎれば根を延ばすために灌水を控えるという情報を得ている。本調査を通して、定植後の灌水についても検討する余地があると思われた。

E. 結論

麻黄の国産化において最大の問題点はアルカロイド含量が日局規定の0.7%を超えることである。今回の調査で、同一環境下では *E. sinica* より *E. equisetina* の方がアルカロイド生産量が多いことが明らかになった。一般に栽培される *E. sinica* にはアルカロイド含量が低いことが知られているので、今後は比較的栽培が困難とされる *E. equisetina* の栽培をも検討する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

(%)

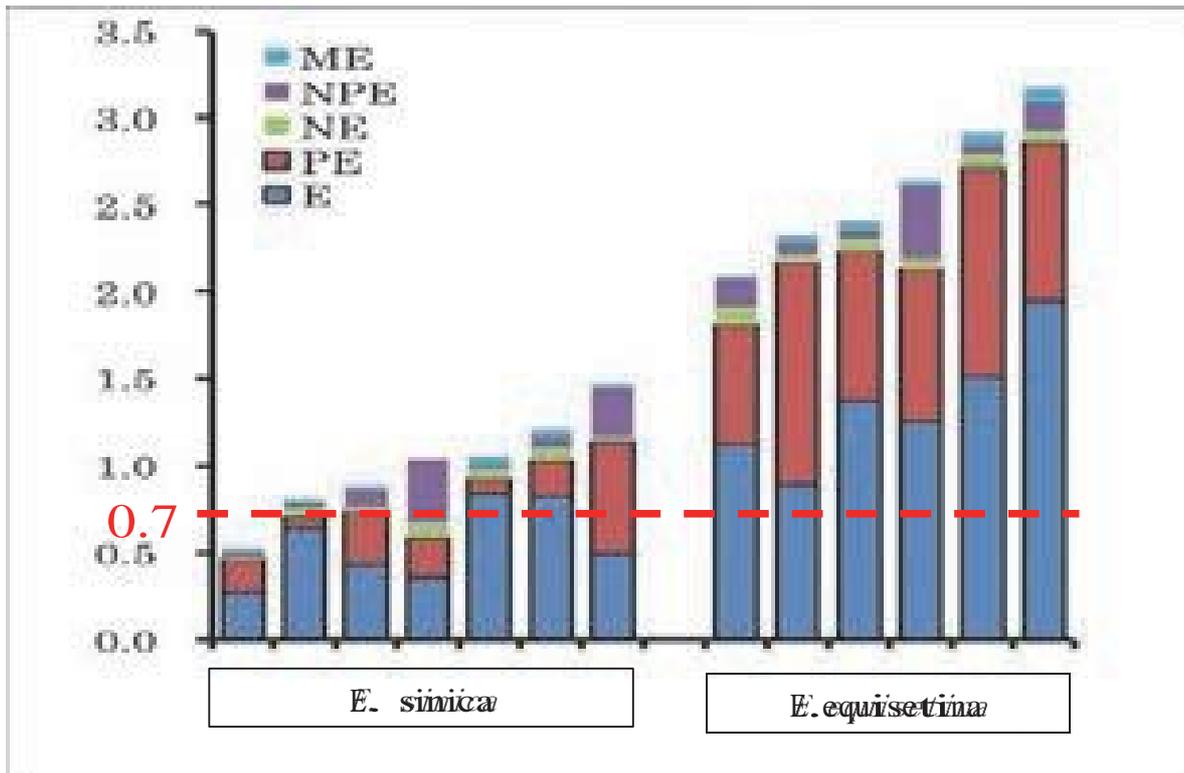


図1 新疆省博楽市で同所的に栽培された *Ephedra sinica* と *E. equisetina* のアルカロイド含量

	E	PE	NE	NPE	ME	all E	サンプル No.	備考
<i>E.sinica</i>	0.27	0.19	0.01	0.02	0.02	0.52	130625A-4	
	0.64	0.07	0.06	0.02	0.03	0.81	130625A-6	
	0.43	0.31	0.03	0.10	0.02	0.89	130625A-12	
	0.36	0.23	0.08	0.37	0.00	1.04	130625A-13	
	0.84	0.08	0.06	0.02	0.05	1.05	130625A-5	
	0.83	0.21	0.08	0.05	0.04	1.21	130625A-3	
	0.50	0.65	0.02	0.28	0.02	1.47	130625A-7	
<i>E.equisetina</i>	1.13	0.68	0.12	0.15	0.02	1.81	130625A-1	
	0.89	1.28	0.03	0.07	0.05	2.18	130625A-11	
	1.38	0.85	0.08	0.04	0.06	2.23	130625A-8	
	1.25	0.88	0.06	0.41	0.03	2.13	130625A-9	
	1.51	1.21	0.07	0.06	0.07	2.72	130625A-10	
	1.94	0.92	0.07	0.15	0.09	2.86	130625A-2	

表1 分析データ (E, エフェドリン・PE, フソイドエフェドリン)

***E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の分類学的位置に関する研究**

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

漢方生薬麻黄の原植物は JP 16 によって *Ephedra. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* の 3 種が規定されている。しかし，日本には *Ephedra* 属植物は自生しておらず，必要量の全量を中国からの輸入に依存している。近年中国はマオウの輸出を規制し今後入手が困難になることが予想される。その為中国以外からの輸入や，JP16 収載種以外の利用を検討する必要がある。そこで *E. equisetina* と同種であるとする説がある *E. major* ssp. *procera* の ITS1 領域及びアルカロイド含量を解析することによって *E. major* ssp. *procera* が生薬として利用可能か検討した。その結果，*E. major* ssp. *procera* と *E. equisetina* の ITS1 領域の塩基配列は 1 塩基の違いであり，別種とするよりは *E. major* ssp. *procera* を *E. equisetina* の亜種あるいは変種とする事が適切であるとする結果が得られた。また，アルカロイド含量も JP16 の規定を満たす事から生薬麻黄として利用可能である事が示唆された。

研究協力者 安藤 広和 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

A. 研究目的

生薬『麻黄』は日本や中国などで伝統的に使用される生薬である。発汗，解熱，鎮咳などの目的で，葛根湯や麻黄湯などの漢方処方に配合されている。JP16 には *Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A. Meyer, *E. equisetina* Bunge の 3 種が収載され，総アルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリン）0.7%以上を含むと規定されている。日本に *Ephedra* 属植物は自生しておらず，中国からの輸入に依存している。近年，資源の保護，砂漠化防止のため，中国は未加工品のマオウの輸出を規制している。国内での試験栽培が行われているが，安定して総アルカロイド 0.7% 以上のマオウを生産する事が最大の問題点である。その為，中国以外の国からの輸入や，JP16 収載種以外の利用を検討する必要がある。また，*Ephedra* 属植物は外部形態的な分類形質が少なく，種類が困難な一群である為，種の位置づけが常に議論されている。特にアルカロイド含量が高いとされている *E. equisetina* と *E. major* Host ssp. *procera* (C.A.Mey.) Bornm. と

の区別は不確かであり混乱している¹⁾。そこで，本研究では，*E. equisetina* の代替種として考えられる *E. major* ssp. *procera* に関して，塩基配列及びアルカロイド含量を明らかにし，生薬麻黄として利用可能か検討した。

B. 研究方法

本研究に使用した試料の詳細を表 1 にまとめた。中国及びモンゴルで採集した *E. equisetina* 58 検体，トルコで採集した *E. major* ssp. *procera* 23 検体を実験材料とした。

1) ITS1 領域の DNA 解析

各試料 50-100 mg を液体窒素下で粉碎し，DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 DNA を抽出した。ITS 領域の増幅は PCR 法により行った。試料溶液は，10 × PCR buffer for KOD-Plus 2.5 μL, dNTP 0.2 mM 2.5 μL, MgSO₄ 1.0 mM 1.0μL, forward primer 0.4 mM 0.5μL, reverse primer 0.4 mM 0.5μL, 全 DNA 100-120 ng, 0.5 units of KOD-Plus DNA polymerase (TOYOBO) 0.5 μL, H₂O で全量 25

μL とした . 使用した primer および PCR プログラムは以下に示した . 3 μL の PCR 産物を 1.5 % のアガロースゲルを用いて電気泳動し , ITS 領域の増幅を確認した後 , QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて PCR 産物を精製した .

forward primer

Eph-1F2 5'- ACG TCG CGA GAA GTT
CAT TG -3'

reverse primer

5.8SR 5'- CGG GAT TCT GCA ATT CAC
AC -3'

PCR program

Hot start 94 2 min

Number cycles 30

denaturation 94 15 sec

annealing 55 30 sec

extension 68 45 sec

final extension 68 5 min

Fin Hold 4

精製した PCR 産物は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて反応を行った . 使用した primer および sequencing プログラムは以下に示した . 反応産物を精製し , ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析を行った . DNA 配列は DNASIS version 3.0 software (Hitachi) を用いて解析した . 混合塩基が認められた場合は , 得られたエレクトロフェログラムを目視によって確認した .

forward primer

Eph-1F2 5'- ACG TCG CGA GAA GTT
CAT TG -3'

Eph-A 5'- GCG GGG ACG TGG ACG
GTC TT -3'

Eph-D 5'- CCC TTC CCC GTG TAA
CAC GC -3'

reverse primer

Eph-ohk3 5'- GAA AGG AAA TAG CGC
CGG TC -3'

5.8SR 5'- CGG GAT TCT GCA ATT CAC
AC -3'

Cycle sequencing program

Hot start 96 2 min

Number cycles 25

96 10 sec

50 5 sec

60 4 min

Fin Hold 4

2) HPLC 法によるアルカロイド分析

HPLC 法によってエフェドリン (E), プソイドエフェドリン (PE), ノルエフェドリン (NE), ノルプソイドエフェドリン (NPE), メチルエフェドリン (ME) の含量を測定した . 試料調製は以下のように行った .

1. 試料の草質茎を粉碎し , 得られた粉末を 105 , 15 時間乾燥させた .
2. 粉末 100 mg を正確に量りとり移動相を 5.0 mL 加えて室温で 20 分間放置した .
3. 25 分間超音波抽出した後 , 3000 rpm, 15 分遠心した .
4. 上澄み液を 0.45 μm フィルターで濾過したものを試料溶液とした .

HPLC 測定機器・条件

Pump ; L-2130 , Autosampler ; L-2200 ,
UV detector ; L-2400 , Integrator ; D-2500
(以上 , Hitachi) . Column ; Handy ODS (4.6
mm I.D × 250 mm) No.14562 (Wako) ,
Column temperature ; 室温 , Flow rate ; 1.0
mL / min , Wavelength ; 210 nm . Mobile
phase ; CH₃CN / H₂O / H₃PO₄ / SDS-Na = 195
mL / 305 mL / 0.8 mL / 2.4 g
(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1) ITS1 領域の DNA 解析

E. equisetina 58 検体, *E. major* ssp. *procera* 23 検体について ITS1 領域の DNA 配列を検討したところ, 全てにおいて解析可能であった. 特に注目すべき配列 (807 番目から 835 番目) を図 1 に示した. *E. major* ssp. *procera* の ITS1 領域の塩基配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されている *E. major* ssp. *procera* の配列 (登録名は *E. major*) (HQ882785) と一致した. また, *E. equisetina* の配列 (GU968572) と一致した. しかし, *E. equisetina* の ITS1 領域の塩基配列は, 807 番目までは, DDBJ に登録されている *E. major* ssp. *procera* 及び *E. equisetina* の配列 (GU968572) と一致したが, 808 番目以降の配列は 2 種の配列を重複に認め, *E. equisetina* の配列 (GU968572) と *E. equisetina* の配列 (GU968572) が 1 塩基ずれた配列となり, 1 塩基挿入に基づく 2 種類の異なる塩基が重なって認められた.

2) HPLC 法によるアルカロイド分析

E. major ssp. *procera* 23 検体のアルカロイド解析結果を図 2, 図 3 に示した. 平均総アルカロイド含量 (エフェドリン及びプソイドエフェドリン) は 0.70% であった. 5 地点中 3 地点で JP16 の規定を超えていた. また, プソイドエフェドリンに対するエフェドリンの組成比は 0.26 でありプソイドエフェドリンを多く含有していた. また, Karadiken, Kirikkale ではエフェドリンが検出されなかった.

E. equisetina 58 検体のアルカロイド解析結果を図 4, 図 5 に示した. 平均総アルカロイド含量 (エフェドリン及びプソイドエフェドリン) は 1.71% であった. 6 地点全てで JP16 規定を超えていた. また, プソイドエフェドリンに対するエフェドリンの組成比は 18.9 であり, エフェドリンを多く含有していた. また, 新疆, 河北省の検体ではエフェドリンが多く, 青海省, 甘肅省, 内モンゴル, モンゴルの検体ではプソイド

エフェドリンが多く含有していた.

D. 考察

1) ITS1 領域の DNA 解析

ITS1 領域の DNA 配列を解析する事によって *E. major* ssp. *procera* は DDBJ に登録されている *E. major* ssp. *procera* の配列 (HQ882785), *E. equisetina* の配列 (GU968572) と一致する事が確認できた. 一方で, 今回解析した *E. equisetina* は DDBJ に登録されている *E. equisetina* の配列 (GU968572) とは 808 番目以降が異なる事が明らかになった. *E. equisetina* の 808 番目以降の配列は, 同じ配列が 1 塩基ずれた重複配列であり, メインピークを基に塩基配列を決定すると, *E. equisetina* の配列 (GU968572) と一致した. *E. equisetina* の配列 (GU968572) と *E. major* ssp. *procera* の配列は一致する為, 1 塩基のみ異なる事となる. 以上の事より両種は近縁関係にあり, 別種とするには相同性が高い. その為 *E. major* ssp. *procera* を *E. equisetina* の亜種あるいは変種とする事が適切である.

2) HPLC 法によるアルカロイド解析

今回解析した *E. major* ssp. *procera* 及び *E. equisetina* のアルカロイド含量は 0.7% 以上であり, 日局規定を満たした事から, 含有成分においては *E. major* ssp. *procera* も生薬麻黄として利用可能であると考えられる. また, アルカロイドの組成は, 同一種においても採集地点によって異なる事が明らかになった. Matsumoto らの報告によると, クローン株を異なる場所で栽培してもエフェドリン, プソイドエフェドリンの組成比は一定であるため, 環境要因には依存しないと報告している. 以上の事を考慮するとアルカロイドの組成は個体によって異なるため種の鑑別には利用できないと考えられる.

E. 結論

ITS1 領域の DNA 解析結果より *E. major*

ssp. *procera* と *E. equisetina* では 1 塩基異なるのみであり，別種とするよりは亜種あるいは変種とする事が適切である．また，含有成分においては，JP16 規定の 0.7%以上であった事から *E. major* ssp. *procera* は生薬麻黄として利用できる事が示唆された．

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

安藤広和，松本昌士，Nathalie Allain，Maksut COŞKUN，Turgut YILMAZ，御影雅幸，*Ephedra equisetina* 並びにその関連種の DNA 及びアルカロイド解析，日本薬学会第 133 年会（横浜）（2013 年 3 月，神奈川）

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

4. 特許取得

該当なし

5. 実用新案登録

該当なし

6. その他

該当なし

I. 参考文献

1) Rydin C., Khodabandeh A. & Endress P. K., The female reproductive unit of *Ephedra* (*Gnetales*): comparative morphology and evolutionary perspectives., *Bot. J. Linn. Soc.* **163**: 387–430 (2010)

表 1 実験材料

	sample ID	採集地	入手年	
<i>E. equisetina</i>	71031~71034	新疆	2012 年	
	71036~71038			青河県
	71121~71124			富蘆県
	71201~71204			富蘆県
	71301, 71302	富蘆県		
	02136	河北省	張家口市 下花園区後峰	2002 年
	02612-1~3		張家口市 下花園後峰	
	02303-1, 02303-2	青海省	循化県 馬耳坡村 草環子	2002 年
	02304, 02305		西寧市大通県 大通郷老爺山	
	02314			
	02356	甘肅省	山丹県 清泉鎮大紅寺	2002 年
	02359		古浪県 十八里堡郷	
	1007221, 1007222	内蒙古	巴彥淖爾市 烏拉特中旗	2010 年
1007224~1007228	巴彥淖爾市 烏拉特後旗			
90815102~90815106	阿拉善左旗 烏力吉蘇木		2009 年	
06C3024, 06C3025	新疆	哈密市 天山區南山口	2006 年	
06C3046		石頭山		
06C3047~06C3049		富蘆県 烏恰溝		
06C3051		阿勒泰市		
06C3056, 06C3057		吉木乃県		
06C3062, 06C3063		S220 88km		
06C3091, 06C3092		新源県		
06C3094, 06C3095		天山天池入口		
06C3138				
20531022, 20531023	モンゴル	Bayanhongor 地区	2005 年	
20531051		Dundgovi 地区		
U120330	トルコ	Karadiken	2012 年	
U120620		Kaiseri		
U62921~U62923		Kirikkale		
U62901~U62906		Cappadocia		
U63001~U63010		Ankara		
U70101,U70102				
<i>E. major ssp. procera</i>				

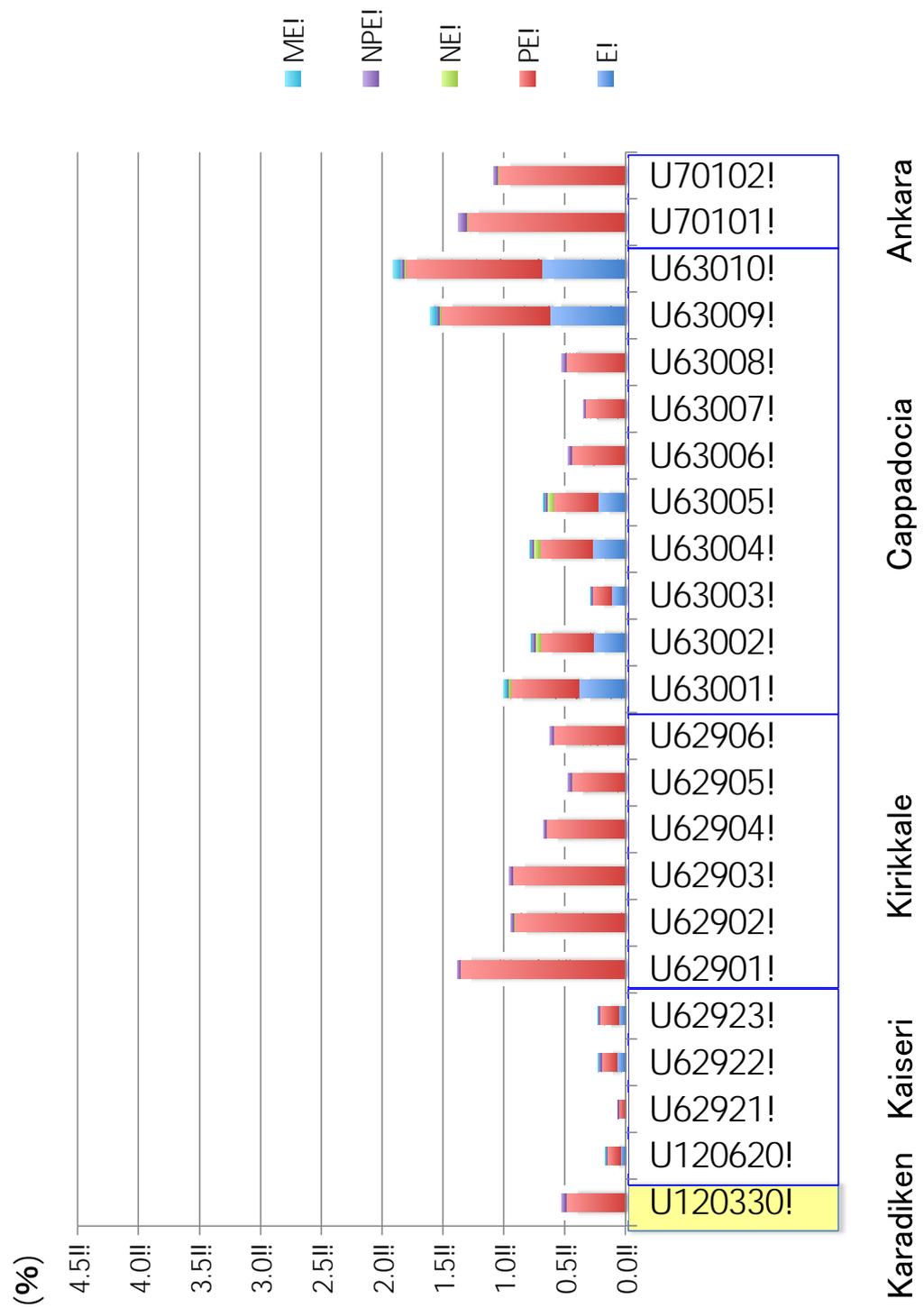


図 2 *E. major ssp. procera* のアルカロイド含量

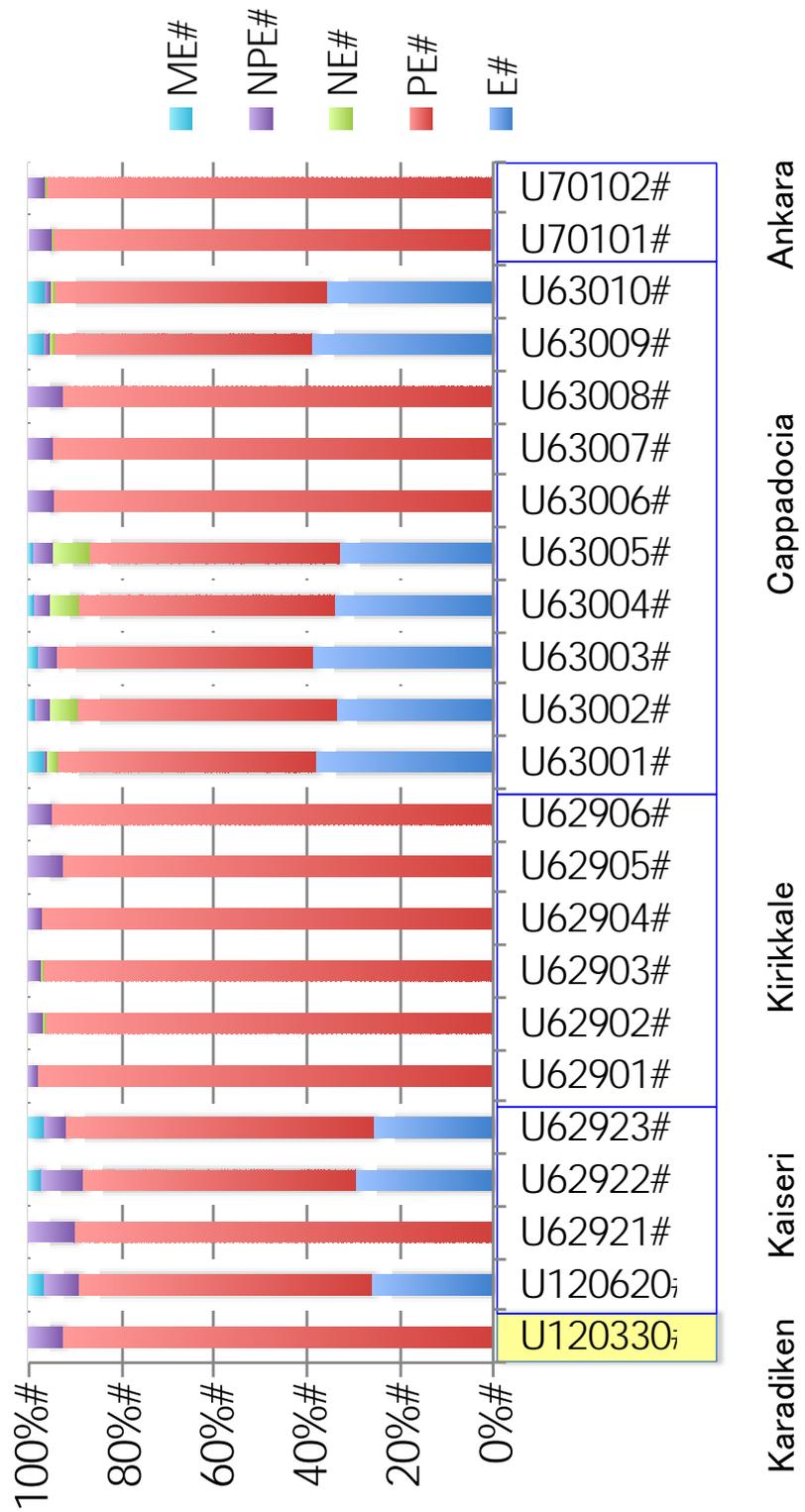


図3 E. major ssp. procera のアルカロイド組成比

図4 *E. equisetum* のアミノ酸含有量

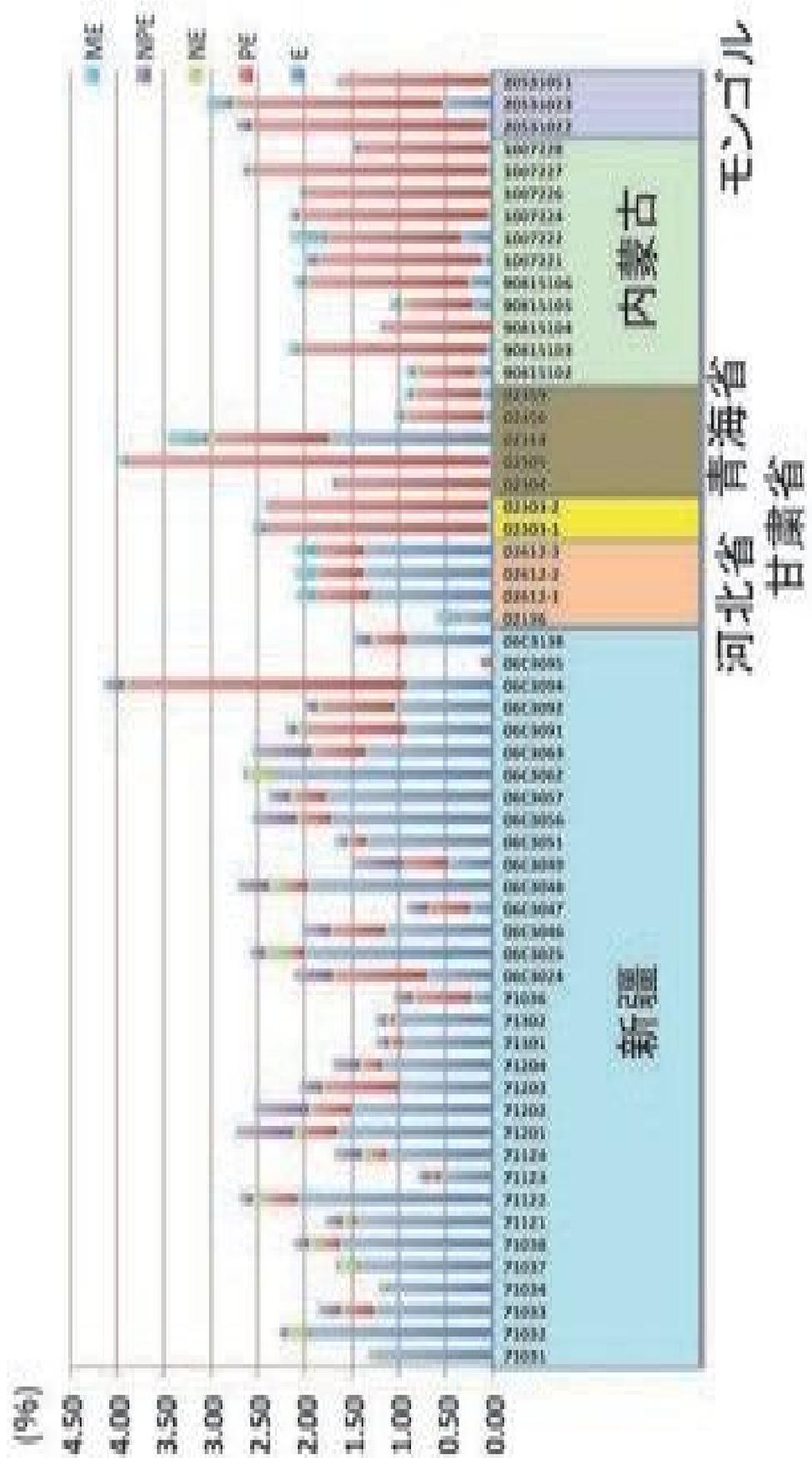
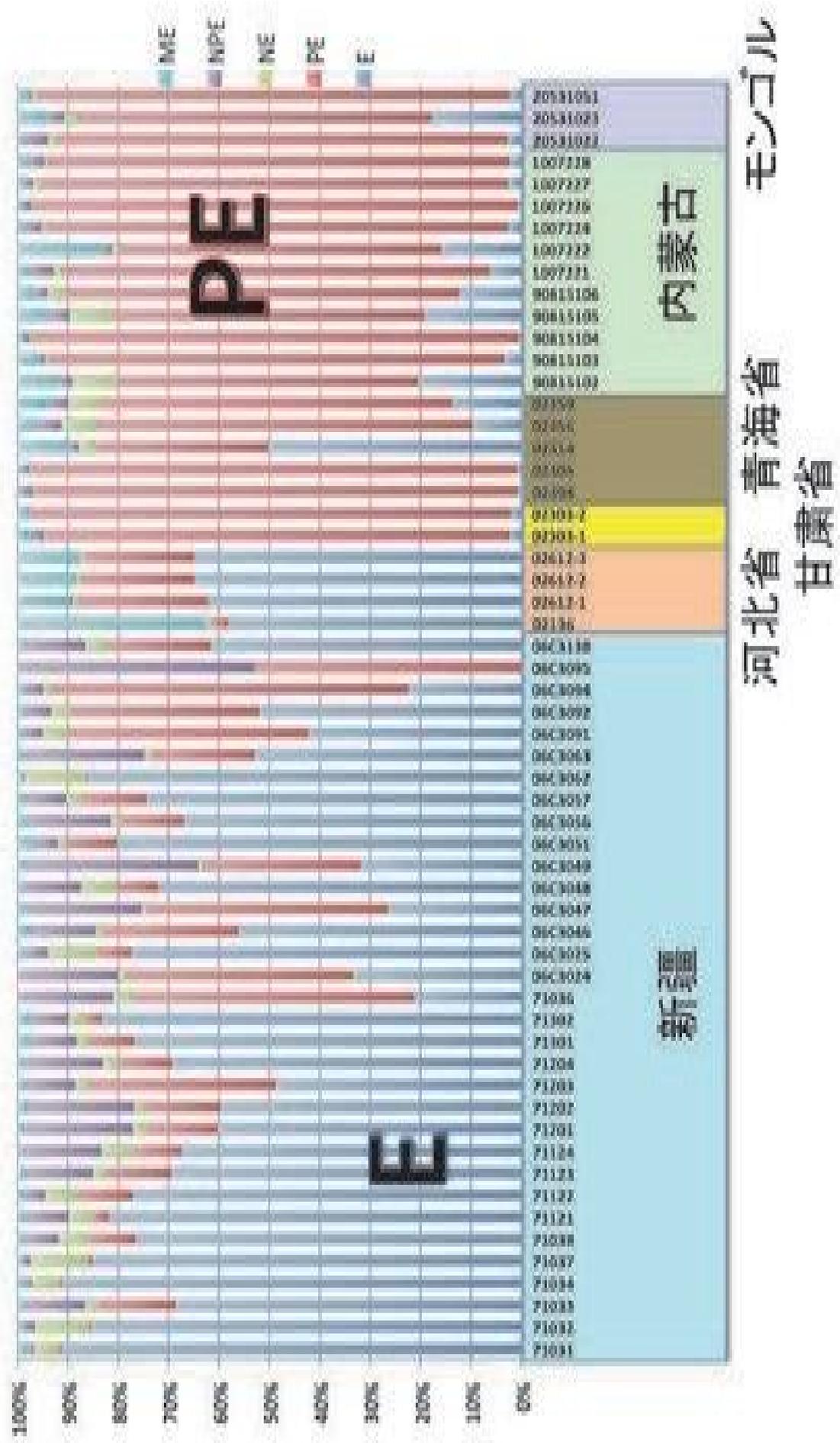


図5 *E. equisetina* のアルカロイド組成比



マオウ種子の発芽に関する検討

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

中国で栽培用に流通するマオウの種子には発芽率に大きな変動があるという情報を得た。マオウの種苗生産に際して、種子による種苗生産は非常に重要である。そこで、入手した野生品ならびに栽培品の株などから得た様々な種子の発芽率を検討した。その結果、株によって発芽率に大きな変動が認められ、栽培者から得た情報を裏付けることができた。

研究協力者 金田 あい 金沢大学医薬保健研究域薬学系

A. 研究目的

マオウの種苗生産に際して、中国では種子が出回り、栽培者はそれを播種して育苗している。一方、栽培者によれば、種子の発芽率に大きな変動があり、良い種子を得ることが重要であるとされる。そこで、入手した様々な種子の発芽率を検討した。

B. 研究方法

金沢大学薬学系附属薬用植物園で24株の *Ephedra sinica* に結実した種子、中国から入手した *E. sinica* 種子、*E. intermedia* 1株からの種子、*E. equisetina* 3株からの種子、トルコから入手した *E. major* 1株からの種子をオアシスベッド、紙ポット、セルトレイ等に播種して発芽率を調査した。

（倫理面への配慮）
該当なし

C. 研究結果

薬用植物園内で株ごとに採取した種子の発芽率は4～96%（平均41%）と大きくばらついた。同じ株から異なる年度に結実した種子の発芽率も一定していなかった。一方、同じ株からの種子を時期を変えて播種した結果は比較的安定していた。なお、定植後を含め、発芽後に枯死する株も見られた。

D. 考察

金沢大学薬学系附属薬用植物園で結実した種子でも株ごとに発芽率が大きく異なったことから、株による性質である可能性があるが、詳細は不明である。一方、同一年に同一株から得られた種子の場合は播種時期に関わらず発芽率が安定していたことから、中国での栽培者からの情報とおり、種子（ロット）による発芽率の違いがあ

るものと判断された。同一株でも異なる年度に採取したものは発芽率が異なったことから、受粉した雄株の影響も考えられる。なお、野生では種子への寄生虫（小型の寄生バチの仲間）の寄生が確認されており、野生からの採集品では虫害を受けている可能性が考えられるが、薬用植物園では確認されていないので、発芽率の低下は別の要因であると考えられる。

E. 結論

実験に供した種々の種子の発芽率に大きな変動が認められ、購入する種子によって発芽率が大きく異なるとする中国の栽培者から得た情報を裏付けることができた。金沢大学薬学系附属薬用植物園で結実した種子も株により大きく変化し、また同一株から異なる年度に採取した種子も発芽率が変動したことから、発芽率を変化させる要因については現時点では不明である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

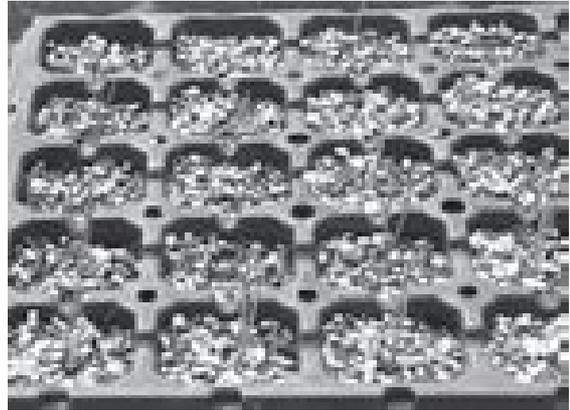
該当なし

3. その他

該当なし



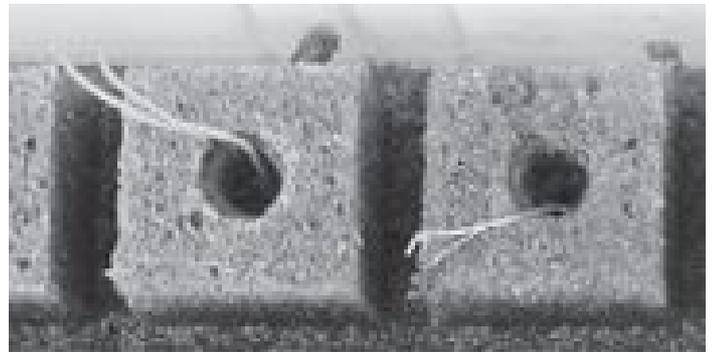
オアシスベッドでの発芽状況



セルトレイでの発芽状況



紙ポットでの発芽状況



発芽後に枯れた株(右)



マオウ種子 (左: *E. sinica* 右: *E. intermedia*)

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
研究報告書

シナマオウの増殖法の検討 ―株分け法―

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

日本薬局方に収載され、また中国で一般に栽培されている漢方生薬「麻黄」の1原植物であるシナマオウ *Ephedra sinica* Stapf を栽培する際の苗を得る目的で、株分け法を検討した。その結果、根茎を引いて生育している株は根茎部を切り分けることで容易に増殖することができた。また、非効率的であるが、まだ根茎を引いていない播種後4年生株からも株分けで1株あたり2～3株の新苗を得ることができた。

研究協力者 倪 斯然 金沢大学大学院自然科学研究科院生

A. 研究目的

漢方生薬「麻黄」の栽培は中国で1980年代から盛んになり、現在では主として *Ephedra sinica* Stapf が栽培され、苗の確保は主として種子繁殖に依っている。一方、現時点では我が国でマオウ種子の生産は行なわれておらず、苗の確保のためには他の手法をも検討する必要がある。また、種子繁殖では遺伝的形質が一定ではない。そこで、クローン株が得られる株分け法を検討した。これまでにマオウ属植物の挿し木法による繁殖については、藤田ら²⁾による『日本薬局方』に収載されていない *E. altissima* Desf. 及び *E. distachya* L. を用いた研究があり、木質茎を挿し穂とした場合の活着率は *E. altissima* で約40%、*E. distachya* で15%であったが、草質茎を挿し穂とした場合には、*E. altissima* では活着率が約10%と低く、*E. distachya* では全く活着しなかったと報告されている。そこで、本研究では金沢大学の薬用植物園が保有する *E. sinica* を用いて、株分け法による増殖を検討した。

B. 研究方法

(1) 根茎で増えた株を利用する方法

富山県薬用植物指導センターから株分けにて譲り受けた *Ephedra sinica* を、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にてワグネルポット(1/2000a)または11号駄温鉢で5年間育てた2株(A株、B株)。地下部に多数の根茎を伸ばし、子株が増殖している株(写真1)。

2013年6月中旬に、適度に根が残るように根茎をA株は10苗に、B株は9苗に切り分け(写

真2)、市販栽培用土(プランターの土:秋本天産物)を用い、ロングポット(深さ20cm)に植え付けた。

(2) 木質茎基部を切り分ける方法

Ephedra sinica: 2株(C株、D株)。2株ともに、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内の株から採取した種子を播種(2004年春)して得られた実生苗を育てた4年生株で、基部は木質化し、径約8mmで、地下に引く根茎は認められなかった。

2008年3月22日に、実験材料を鉢から取り出し、水中でよく土を落とし、鋭利なナイフで、それぞれの子株に適度な根が残るように、C株は3分割(縦割)、D株は4分割し(写真3)、ワグネルポット(1/5000a)に市販栽培用土(プランターの土:秋本天産物)を用いて定植し、日当りの良い屋外に保管した。なお、3月は中国において麻黄の植え替えに適した時期とされている。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

(1) 活着の評価を2013年8月12日に行なった結果、全株が活着していた。

(2) 活着の評価を2008年9月25日に行なった結果、C株は4苗のうち2株(C₂, 4)が生存し、他の2株(C₁, 3)が枯れた。D株は、全3株が生存していた。

D. 考察

1. 地下に根茎を引いて繁殖する株では作製した

全ての子苗が活着し，好成績であった。一方，根茎を引かない株の根元の株分けによる繁殖に関しては，得られた7つの小苗のうち5苗(71.4%)について活着させる事ができた。結果としては十分な成績であるが，発芽後4年以上経過した *E. sinica* でも茎はあまり太くならないため，個体数を多く得る事が出来ないこと，播種してから親株として株分けに供することができるまでに時間がかかりすぎる事，得られる小苗が少ないので失敗した場合のリスクが高すぎる事などの短所がある。なお，*E. sinica* は日局収載の他の2種(*E. intermedia*, *E. equisetina*) に比して根茎を引いて増殖する性質が強いので，本研究の結果からは，十分生長して根茎を引いた株を親株として株分けするのが適していると判断される。一方，同じ *E. sinica* でも株によって根茎を延ばす性質が強いものと弱いものがある可能性があり，今後の検討課題である。なお，Ep-13については，株分け時期は3月中旬～4月中旬頃と10月上旬から11月中旬頃が適期であると紹介されているが，本研究では少なくとも6月中旬までは可能であることが明らかになった。ただし，株分け後の年内の生長を考慮すると，新芽が動き出す前後が適切であると判断される。

E. 結論

株分け法は活着率が高く，クローン株を得る有効な方法であるが，分割する株が限られることが欠点である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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・10)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

引用文献



写真 1 : 根茎を引いて増殖した株



写真 2 : 根茎を引いて増殖した株を切り分けた状態 (一部分)



写真3：2縦割した状態。さらに2縦割して4株とした

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
研究報告書

シナマオウの増殖法の検討 木質茎の挿し木

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

先にシナマオウ *Ephedra sinica* Stapf の株分け法による増殖法を報告したが、一株から得られる株数は多くない。そこで、挿し木法について検討した。その結果、根茎を引いて生育している株は根茎部を切り分けることで容易に増殖することができた。挿し穂基部を水平切りして挿し、人工気象器内で保管することにより、5割の苗が活着した。また、一般に挿し木法においては蒸散を防ぐために地上部を一部をカットするが、マオウにおいてはカットすると成績が良くないことが明らかになった。

研究協力者 野村行宏 金沢大学大学院自然科学研究科院生

A. 研究目的

これまでにマオウ属植物の挿し木法による繁殖については、藤田らによる『日本薬局方』に記載されていない *Ephedra altissima* Desf. 及び *E. distachya* L. を用いた研究があり、木質茎を挿し穂とした場合の活着率は *E. altissima* で約 40%、*E. distachya* で 15%であったが、草質茎を挿し穂とした場合には、*E. altissima* では活着率が約 10%と低く、*E. distachya* では全く活着しなかったと報告されている。そこで、本研究では金沢大学が保有する *E. sinica* を用いて、木質茎の挿し木による増殖法を検討した。

B. 研究方法

園内の雪の下で越冬した *E. sinica* の栽培株を実験材料とした（写真 2）。調製条件：木質茎は数力所の節から多数の草質茎が出た状態で、挿し穂は各節のすぐ上で切断して得た。次いで、木質茎基部の切り口を水平切り（軸に対して垂直）と返し切り（水平切りした部分の約半分に更に斜めに切り込み）の 2 群に分け、それぞれの群を発根剤（ルートン：石原産業株式会社）塗布と塗布無しの、合計 4 群に分け、各群 5 株を準備した（表 1）。草質茎は全て残した。

植え付け用土として鹿沼土を用い、硬質ポリ

ポット（直径 9cm）に 2～3 cm の深さに挿した。

培養環境条件：人工気象器（日本医化器械製作所：LPH-200RDSMP）。温度 25℃，湿度 70%，光照射：15 時間（25,000～30,000 ルクス）
実験期間は、2006 年 11 月 28 日、29 日に挿し木し、2007 年 9 月 26 日（10 ヶ月後）に評価した。

評価は、生存しているものは土壌表面からの地上部の長さ、茎の数、根の長さを測定し、根の量は目視的に観察した。枯死したものについては、切り口のカルス形成の有無、根があれば長さを測定し、根の量を目視的に観察した。（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

切り込みを入れた条件 1、2 では、発根剤の有無にかかわらず、10 検体すべてが枯死したが、発根剤を塗布した群はカルスの形成並びに根の伸長がよかった。水平切りの条件 3、4 については、条件 3（発根剤無し）で 5 検体中 3 検体が活着し、条件 4（発根剤有り）で 5 検体中 2 検体が活着し、発根率や活着率については発根剤の顕著な効果は認められなかった（表 2）（写真 1）。なお、予備実験として草質茎の大半をカットして挿した結

果、全て枯死した（写真3～5）。

D. 考察

1. 木質茎の挿し木による繁殖実験に関しては、水平切り苗、返し切り苗ともに約半数が発根したが、活着率は水平切り苗では50%、返し切り苗では0%であった。活着率から判断すると水平切りが適しているが、返し切り苗でも発根後早期に植え替えるなど適切な管理により活着する可能性がある。また、すべての条件（苗）において、カルス形成が認められたが、その後枯死したものが多く、その原因に不適切な灌水（給水不足）が考えられ、適切な灌水量についても検討する余地がある。また、発根剤の塗布に関しては、発根促進効果は認められなかったが、発根後の根の生長に関しては有効であると判断された。以上、日局収載種の *E. sinica* において挿し穂の基部を水平切りし人工気象器内で管理することにより、藤田らが *E. altissima* で報告した活着率をやや上回る成績が得られた。なお、ここにはデータを示さなかったが、予備的実験として蒸散を押さえるために草質茎を半分以下に切り詰めた株ではすべて枯死したことから、挿し穂には十分な草質茎を残す必要がある。

2. *Ephedra* 属植物は灌木であるが、*E. sinica* については、冬に氷点下をかなり下回る自生地では地上部が根頭部を残して全て枯れるので、挿し穂として利用できるような木質茎が得られない。一方、比較的暖かい地域ではわずかに地上茎が残り、次年度以降に木質化する。金沢では冬期にかなりの積雪があり、その下では *E. sinica* の地上部の大半は枯死せず、一部が木質化する。今回の研究で利用した木質茎はそうしたものである。なお、いずれにせよ大量の木質茎を得ることはできないので、今後は現時点では活着率が悪いとされているが挿し穂が多量に得られる草質茎による挿し木法を検討する必要がある。

E. 結論

シナマオウ *Ephedra sinica* Stapf の木質茎の挿し木において、水平切りの成績が良かった。すべての挿し穂でカルスが形成されたが、発根に至らずに枯死したものが多かった。また、市販の発

根剤の有効性は認められなかった。今後は、ホルモン剤や他の条件を考える等、発根率を上げる研究が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

2. 論文発表

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・10）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

引用文献

藤田早苗之助，栗原孝吾，衛生試験所報告，**85**，112-114（1967）

表1：挿し木の条件

検体No	⊖挿し木 10/06/08		⊖挿し木 10/07/14		⊗挿し木 10/10/20		⌘挿し木 10/11/21	
	長さ(cm)	発根	長さ(cm)	発根	長さ(cm)	発根	長さ(cm)	発根
1	17.9	×	29.7	×	21	×	27.3	○
2	20.8	×	26.9	×	12.5	○	22.5	○
3	15.9	○	20.5	○	16.6	○	19.6	○
4	23.5	○	15	○	22.4	×	17.6	○
5	18	×	19.7	○	28.5	○	25.7	○
6	19.2	○	13	○	13.8	×	18.4	○
7	16.6	○	20.1	○	21.6	○	20.1	×
8	17.9	×	12.3	○	17	×	22.2	○
9	14.8	×	35.8	○	19.3	×	23.5	○
10	20.9	×	28.1	○	23.5	○	19.6	○
11	15.7	×	27.1	○	23.8	×	22.8	○
12	18.1	○	17.5	○	17.8	○	26	○
13	20.2	×	30	○	24.2	×	23.5	○
14	16.1	○	20.5	×	12.1	×	17.3	○
15	20.5	×	20.2	○	17.9	○	24.1	○
16	14.3	×	28.3	×	19.7	○	14.8	×
17	17.5	×	30.7	○	14.2	×	13.8	○
18	22.1	×	30.2	×	23.3	○	13	○
19	25.1	×	17.1	○	22.3	○	13.2	×
20	21.9	×	17.4	×	16.4	×	13.5	○
平均	18.7 ± 2.8		23.0 ± 6.6		19.4 ± 4.3		19.9 ± 4.5	
発根数	6		14		10		17	
発根率	30%		70%		50%		85%	
定植日	2010/10/19		2010/11/21		2011/3/27		2011/3/27	
活着数	5		12		10		16	
活着率	25%		60.00%		50%		80.00%	

(挿し木の時期)

E. sinica の草質茎

⊖ 2010/06/08 ~ 2010/10/19 (4ヶ月間)

⊖ 2010/07/14 ~ 2010/11/21 (4ヶ月間)

⊗ 2010/10/20 ~ 2011/3/27 (5ヶ月間)

⌘ 2010/11/21 ~ 2011/3/27 (4ヶ月間)

活着確認日：2011/6/8

表1：挿し木の結果

条件・試料 番号	生存				枯死		
	地上部長 (cm)	茎数 (本)	根長 (cm)	根の量	カルス形 成	根長 (cm)	根の量
条件1-1	—	—	—	—	無し	—	—
2	—	—	—	—	無し	—	—
3	—	—	—	—	有り	0	—
4	—	—	—	—	有り	8	少
5	—	—	—	—	有り	5	少
条件2-1	—	—	—	—	無し	—	—
2	—	—	—	—	有り	0	—
3	—	—	—	—	有り	3	少
4	—	—	—	—	有り	10	多
5	—	—	—	—	有り	13	多
条件3-1	—	—	—	—	無し	—	—
2	—	—	—	—	有り	3	少
3	7.0	1	9	少	—	—	—
4	6.5	1	16	中	—	—	—
5	13.0, 7.0	2	15	多	—	—	—
条件4-1	—	—	—	—	無し	—	—
2	—	—	—	—	有り	0	—
3	—	—	—	—	有り	0.8	少
4	8.5, 5.5	2	9	多	—	—	—
5	15.7	1	21	多	—	—	—

条件1：返し切り，発根剤（ルートン）塗布なし

条件2：返し切り，発根剤（ルートン）塗布あり

条件3：水平切り，発根剤（ルートン）塗布なし

条件4：水平切り，発根剤（ルートン）塗布あり

：— は枯死したことを意味する。

：0（cm）はカルスの形成が認められたが，根が伸長しなかったものを示す。



写真1：木質茎の挿し木後 10 ヶ月後の状態（条件2）
（左から，条件 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6。草質茎の多くはすでに枯死脱落している）

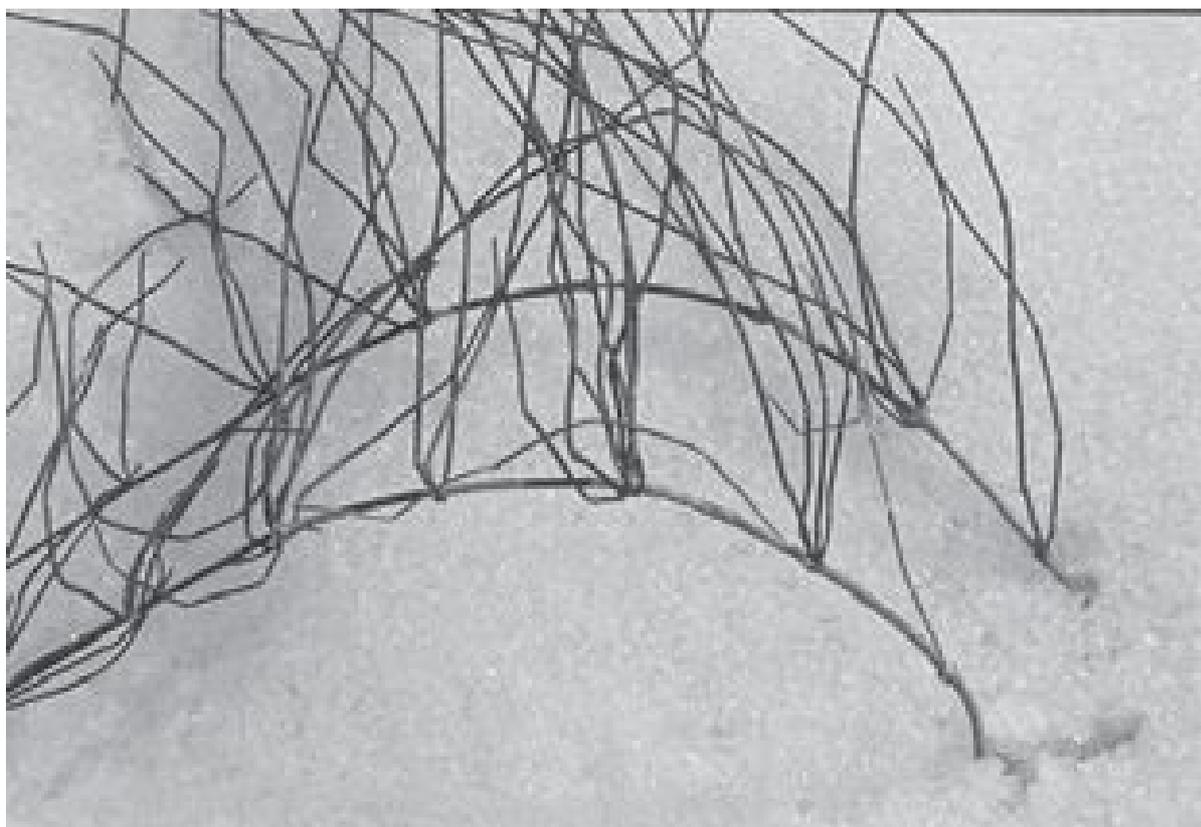


写真2：金沢大学内で，冬期に雪の下で越冬した結果枯死せず二年目に木質化した茎



写真3：蒸散を押さえるために地上部の多くを除去した株（右側）では全て枯死した。



写真4：カルスを形成した挿し穂（下2本）蒸散を押さえるために地上部の多くを除去した株（上2本）は全て枯死した



写真4：発根し，定着させることができた木質茎（下側）上側の2本は緑質茎を短くカットして挿した穂。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
研究報告書

シナマオウの増殖法の検討 草質茎の挿し木

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

先にシナマオウ *Ephedra sinica* Stapf の株分け法による増殖法や木質茎による挿し木法を報告した。これらの方法は成功率は高いが、ともに一株から得られる株数は多くない。そこで、大量に得られる草質茎を用いた挿し木法について検討した。その結果、従来の報告では草質茎では発根率がきわめて低いとされてきたが、人工気象器を利用するなどして、発根率を 80%程度にまで上げることができた。

研究協力者 野村行宏 金沢大学大学院自然科学研究科院生

A. 研究目的

これまでにマオウ属植物の挿し木法による繁殖については、藤田らが草質茎を挿し穂とした場合には、*Ephedra altissima* では活着率が約 10%と低く、*E. distachya* では全く活着しなかったと報告している。そこで、本研究では金沢大学が保有する日本薬局方収載種である *E. sinica* を用いて、木質茎の挿し木による増殖法を検討した。

B. 研究方法

(1) 挿し穂の長さ

E. sinica の草質茎を用い、挿し穂の長さにより 3~10 cm, 11~20 cm, 21~30 cm, 30~40 cm の 4 グループ (~) に分けた。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 3~5 cm の深さに挿した。その後発根を確認した。

挿し穂の調製方法：切断部位は節の下方 1 mm の位置で直切りとした。

(2) 挿し木期間

3~10 cm：2009/5/22~2009/10/22 (5 カ月間)

11~20 cm：2009/5/22~2009/10/22 (5 カ月間)

21~30 cm：2009/5/22~2010/3/11 (10 カ月間)

30~40 cm：2009/5/22~2010/3/11 (10 カ

月間)

(3) 保管場所：人工気象器内および屋外

(4) 挿し木時期適期の調査

E. sinica の草質茎を用いて、2010/06/08, 2010/07/14, 2010/10/20, 2010/11/21 の 4 回に分けて挿し木を行い、その後の生育状態を確認した。用土としてバーミキュライト：川砂 (1:1) を用い、イチゴ育苗用ポットに 3~5 cm の深さに挿した。挿し穂は 2010 年 6 月 8 日、7 月 14 日、10 月 20 日、11 月 21 日に、各 20 本ずつを採取した。

切断部位は節の下方 1 mm の位置を直切りした。事前の処理として挿し木を行う前日に実験材料を採取し剪定を行い、一昼夜室温にて乾燥させた後、挿し木を行った。実験期間 (判定までの期間) は 4~5 ヶ月である。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

挿し穂の長さに関しては、最も高い発根率を示したのは、長さ 21~30 cm で 81.8%であった。

人工気象機内に保管した挿し木の発根率については、グループ (3~10 cm) は 33.3%、グループ (11~20 cm) は 50.0%、グループ (21~30 cm) は 81.8%、グループ (31~40 cm) は 62.5%であった。屋外に保管した挿し木

の発根率については、グループ は 0 %、グループ は 16.7 %、グループ は 25.0 %、グループ は 22.2 %であった。

発根した根の長さの合計は、人工気象器内で 5 ヶ月間保管したグループ は 4.7 cm、グループ は 49.92 cm であった。また 10 ヶ月間保管したグループ は 87.3 cm、グループ は 31.5 cm であった。また人工気象器内に 5 ヶ月間保管した挿し穂にはあまり枯死は見られなかったが、10 ヶ月間に保管しているものには、挿し穂の枯死が多くみられた。

挿し木時期に関する実験では、発根率はグループ (2010/06/08) は 30 %、グループ (2010/07/14) は 70 %、グループ (2010/10/20) は 50 %、グループ (2010/11/21) は 85 %であり、11 月に挿し木した群が最も高い発根率を示した。

D. 考察

挿し穂の長さ、挿し木の時期、保管場所等、すべての要因で大きく発根率が変化することが明らかになった。発根後の定植やその後の生育を考えると、11 月に挿し木し、翌年 3 月に定植するのが適切であると考えられる。

E. 結論

E. sinica の草質茎を用いて挿し木を行う場合、11 月に挿し穂の長さを 21 ~ 30 cm に調整して行かない、人工気象器内に 4 ヶ月間安定した一定条件下で保管し、翌年 3 月に定植するのが最適であると結論した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

3. 論文発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表 1 : *Ephedra sinica* の挿し穂の長さ，保管場所による発根率の相違

グループ	3 ~ 10 cm		11 ~ 20 cm	
	人工気象器内	屋外	人工気象器内	屋外
長さ (平均)	8.4 cm	6.5 cm	16.0 cm	14.4 cm
重さ (平均)	0.09 g	0.05 g	0.19 g	0.13 g
挿し穂の数	6	7	12	12
発根数	2	0	6	2
根の長さ (平均)	2.35 cm	-	8.32 cm	0.8 cm
発根率	33.3 %	-	50.0 %	16.7 %

グループ	21 ~ 30 cm		30 ~ 40 cm	
	人工気象器内	屋外	人工気象器内	屋外
長さ (平均)	25.4 cm	24.0 cm	34.18 cm	33.50 cm
重さ (平均)	0.20 g	0.17 g	0.27 g	0.24 g
挿し穂の数	11	12	8	9
発根数	9	3	5	2
根の長さ (平均)	9.7 cm	0.2 cm	6.3 cm	5.0 cm
発根率	81.8 %	25.0 %	62.5 %	22.2 %

表 2 : 挿し木の時期と発根率

検体No	挿し木日 2010/06/08		挿し木日 2010/07/14		挿し木日 2010/10/20		挿し木日 2010/11/21	
	長さ (cm)	発根	長さ (cm)	発根	長さ (cm)	発根	長さ(cm)	発根
1	17.9	×	21.0	×	29.7	×	27.3	○
2	20.8	×	12.5	○	26.9	×	22.5	○
3	15.9	○	16.6	○	20.5	○	19.6	○
4	23.5	○	22.4	×	15.0	○	17.6	○
5	18.0	×	28.5	○	19.7	○	25.7	○
6	19.2	○	13.8	×	13.0	○	18.4	○
7	16.6	○	21.6	○	20.1	○	20.1	×
8	17.9	×	17.0	×	12.3	○	22.2	○
9	14.8	×	19.3	×	35.8	○	23.5	○
10	20.9	×	23.5	○	28.1	○	19.6	○
11	15.7	×	23.8	×	27.1	○	22.8	○
12	18.1	○	17.8	○	17.5	○	26.0	○
13	20.2	×	24.2	×	30.0	○	23.5	○
14	16.1	○	12.1	×	20.5	×	17.3	○
15	20.5	×	17.9	○	20.2	○	24.1	○
16	14.3	×	19.7	○	28.3	×	14.8	×
17	17.5	×	14.2	×	30.7	○	13.8	○
18	22.1	×	23.3	○	30.2	×	13.0	○
19	25.1	×	22.3	○	17.1	○	13.2	×
20	21.9	×	16.4	×	17.4	×	13.5	○
平均	18.7 ± 2.8		23.0 ± 6.6		19.4 ± 4.3		19.9 ± 4.5	
発根数 (定植数)	6		14		10		17	
発根率	30 %		70 %		50 %		85 %	
定植日	2010/10/19		2010/11/21		2011/3/27		2011/3/27	
活着数	5		12		10		16	
活着率	25 %		60.0 %		50 %		80 %	



図 1：挿し穂の調整



図 2：人工気象機内の状態



図 3：発根した挿し穂



図 4：発根した挿し穂

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
研究報告書

マオウ属植物の交配実験

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

麻黄の栽培研究過程において、優良品種開発のためには交配試験も必要である。これまで原植物であるマオウ属植物の人工交配に関する研究はない。本研究で、人為的に手で受粉する方法と、狭い容器内で受粉させる方法を検討した結果、両方法ともに種子が結実し、それらを播種した結果発芽苗を得ることが出来た。マオウ属においても任意の株同士で交配が可能であることが確認でき、今後の品種改良に利用できることが明らかになった。

研究協力者 飯田 修 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究リーダー
研究協力者 杉村 康司 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究員

A. 研究目的

麻黄の栽培研究過程において、優良品種開発のためには交配試験も重要である。原植物のマオウ属植物は雌雄異株であるが、これまでに人工交配に関する研究はない。そこで、選択した雌株と雄株の交配を試みた。

B. 研究方法

(1) 旧国立衛生試験所の春日部薬用植物栽培試験場に *Ephedra distachya* L. として導入された Ep-13 株(雌株:薬用植物資源研究センター種子島研究部保有株)に金沢大学の薬用植物園が保有するシナマオウ *Ephedra sinica* Stapf(雄株)の花粉を毛筆で人工受粉した。実験は、平成 24 年 6 月 1 日及び平成 25 年 5 月 14 日に種子島研究部において行なった。

(2) 金沢大学の薬用植物園内において、ワグネルポット 4 個が入る大きさのガラス製の箱に、*E. sinica* の雌株と雄株を入れ、開花期の晴天日中に小型扇風機を用いて花粉を飛散させ、受粉を試みた。受粉作業は数日間行なった。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

研究(1)、(2)ともに結実が見られ、播種

したところ発芽苗が得られた。発芽率は概ね 60~80%であった。

D. 考察

小型容器の中で乾燥した晴天日中に扇風機を用いた受粉作業で高成績が得られた。一方、屋外に置いた鉢ではほとんど結実が見られなかった。マオウ属植物は乾燥地帯に適応しており、花粉の飛散は大気が乾燥した状態の方が好都合であると考えられた。

また、得られた種子の発芽率は 60~80%であり、一般的な種子に比較して好成績であった。

種間の交雑も容易に成功したことから、自然界においても交雑種が多く生育していることが考えられる。

E. 結論

マオウ属植物の受粉は容易に行なえることが明らかになった。今後は種々の優良形質をもつ株同士の間で交配を重ねることにより、栽培に適した優良株を得ることができると判断した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし



図1 : Ep-13 (穂花)



図2 : 花粉付け作業



図3 : 交配後に熟した穂果実

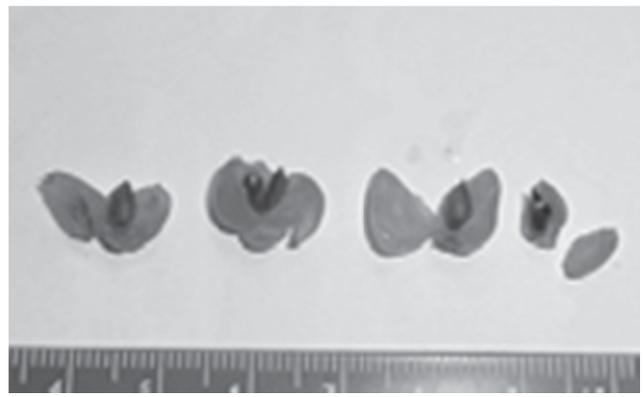


図4 : 穂果の中 (種子は1~2粒)

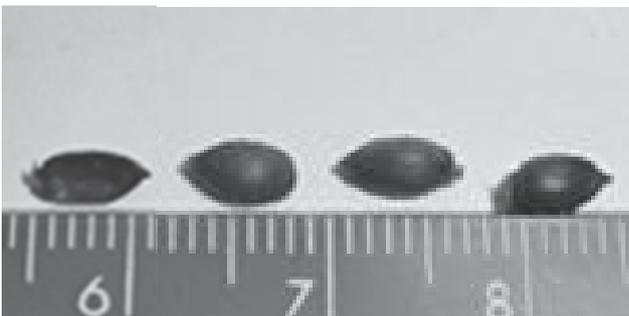


図5 : 種子 (長さ約6mmあり、*E. sinica* や *E. distachya* に比して大型)



図6：発芽した交配種子 図7：ポットに移した苗（右奥の2鉢：生長が早い）



図8：発芽1年後（平成25年7月9日）の株（他種に比して著しく生長が早い）



図9：E. sinica の交配試験



図10：人工的交配により結実した E. sinica

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
研究報告書

生育地の斜面の向き・位置・土質によるアルカロイド含量の相違

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授

マオウの栽培時における適切な日照環境を調査する目的で、中国新疆において、*Ephedra equisetina* Bunge 及び *E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer の野生品を実験材料として、生育地の斜面の向きや高低の位置、また岩上に生えるか土質地に生えるか等の相違とアルカロイド含量の相関を検討した。その結果、検討した生育環境の相違とアルカロイド含量の間に有意な相関は認められず、一方、株による個体差が激しいことが明らかになった。

研究協力者 松本 昌士 金沢大学大学院自然科学研究科大学院生

A. 研究目的

麻黄栽培においては、日本薬局方の基準であるアルカロイド含量 0.7 以上を満足させる必要がある。一方、栽培植物の中には西日を嫌う植物が多い。また、ネパールの *Ephedra pachyclada* Boiss. に関しては長い斜面において、斜面の上部に生育する株ほどアルカロイド含量が高いことが報告されている。そこで、本研究では山間部の斜面で栽培することを想定し、その際の適地に関する情報を得るため、中国新疆の山間部に自生するマオウ属植物の斜面の方向の違いや高低の位置によるアルカロイド含量の相違を調査した。また、調査地は岩石地と土質の場所があったので、それらの相違についても調査した。

B. 研究方法

平成 25 年 6 月下旬に、中国新疆東北部に位置する富蘆県の山間部の東西に傾斜がある深い谷、同青河県の山間部の東西に傾斜が浅い谷、及び青河県の山間部の峠付近の丘陵地において、斜面の方向、高低の位置等を記録しながらマオウ属植物を採集し、また生育地の土質をも記録した。帰国後、HPLC 法で地上部草質茎のアルカロイド含量を測定し、生育地との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

採集したマオウ属植物は外部形態、内部形態及び DNA 配列等により *Ephedra equisetina* Bunge 及び *E. intermedia* Schrenk et C.A. Meyer と同定された。それぞれのアルカロイド含量を測定し、生育地の地形、岩石地土質かなどの環境との相関を検討したが、何れにおいても有意な差は認められなかった。また、これまでの報告では岩上に生える株にアルカロイド含量が高いとされていたが、今回の研究ではそうした傾向は認められなかった。

D. 考察

検討したマオウ属植物 2 種に関しては、アルカロイド含量は生育地の斜面の方向、高低の位置等に影響を受けないことが明らかになった。西日の影響も認められなかったことから、麻黄栽培に際しては、雑草管理や採集時の容易さ等を考慮すると、日当りの良い平坦な場所に植え付けるのが適切と考えられる。

今回の研究では、岩上に生える株にアルカロイドが多いという傾向が認められなかったが、マオウ属植物のアルカロイドは土壌 pH が高い土地に生える株ほどアルカロイド含量が高いことが知られている。今回の調査地はマオウ属以外の植物がほとんど生えない乾燥した土地であり、岩上もそうでないところも pH の変化がほとんどないことが考えられる。

E. 結論

本研究で検討した *Ephedra equisetina* 及び *E. intermedia* に関しては、アルカロイド含量は生育地の日照条件や土質の変化以上に個体差が大きいことが明らかになった。今年度の一連の研究で、クローン株においても株による変動が大きいことが明らかになっている（別掲）ので、今後は肥料条件等を調査し、アルカロイド含量が高くなる栽培方法を探索する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

松本昌士：博士学位論文。平成 25 年度金沢大学自然科学研究科。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

引用文献

M. Mikage , A. Takano , H. Jin , T. Tomimori and T. Namba : Studies on the Nepalese Crude Drug , , On the Variations of the Morphological Appearances and the Alkaloid Contents of the Herbal Stem of *Ephedra gerardiana* Wall. according to the Differences of Habitats . *Shoyakugaku Zasshi* , **41**(3) , 209-214 (1987)

サンプル情報

E: 東向き斜面
N: 北向き斜面
S: 南向き斜面
W: 西向き斜面
Y: 山頂・尾根
: 不明

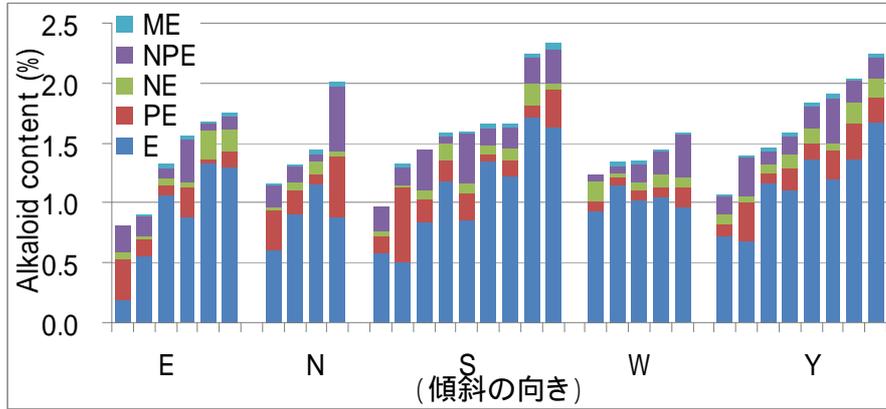


図1 斜面の傾斜の向きとアルカロイド含量 (*Ephedra equisetina*, 調査地:富蘆)

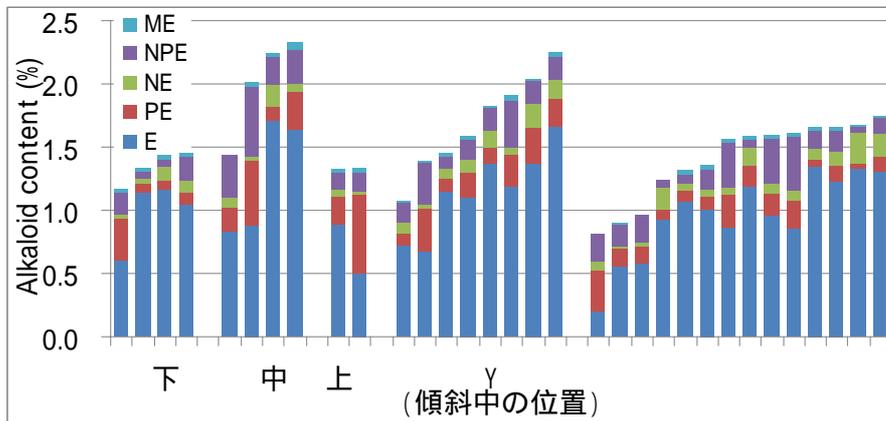
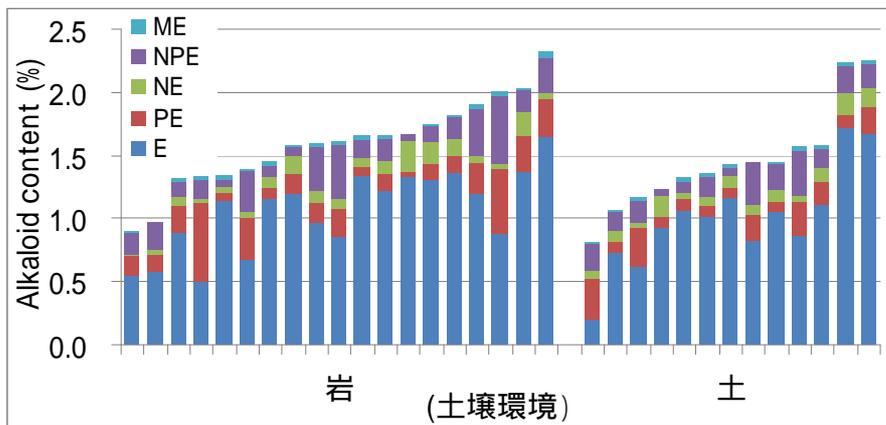


図2 斜面の位置とアルカロイド含量 (*Ephedra equisetina*, 調査地:富蘆)



とアルカロイド含量 (*Ephedra equisetina*, 調査地:富蘆)

図3 土壤環境



図4 南北に走る谷（富蘊県）



図5 峠にある小山を一周して東西南北斜面で採集（青河県）

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
研究報告書

水耕法による麻黄栽培の可能性の検討

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系 助教

マオウ属植物が水耕栽培に適しているか否かを検討する目的で、小規模ながら実験的に栽培している青森県産業技術センターを訪問調査した。その結果、マオウ属植物は水中で根を発達させにくい現状が明らかになった。今後は、ポット等で十分に根を発達させたものを実験に供するなどして検討する必要がある。また、今後は砂を支持体とした水耕法も検討する。

研究協力者 今井照規 青森県産業技術センター施設園芸部 部長

A. 研究目的

水耕法は個々の作物に適した栄養素を養液に溶かして水中に根を張らせてハウス内で育成する方法である。収穫物の生育が早いという利点がある一方で、種々の欠点も知られている。そこで、マオウ属植物が水耕栽培に適しているか否か、また石川県下で利用できる施設があるか否かを調査した。

B. 調査方法

平成 26 年 2 月中旬に地方独立行政法人青森県産業技術センターを訪問調査した。

職員の案内により、水耕法を行なっている大型ハウスを見学調査した。

別に石川県羽咋郡志賀町に設置された水耕栽培設備を見学した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 調査結果

葉菜類等と同じ場所で生育させているマオウ属植物 (*Ephedra equisetina* Bunge) は、他の野菜類に比して根の発達がきわめて悪く、地上部の発達も思わしくなかった。

石川県羽咋郡志賀町の水耕栽培施設は 2 棟あり、1 棟はトマト栽培に使用されているが、1 棟は借り手がなく、今後借りることが可能であるとの情報を得た。なお、本施設は志賀町にある北陸電力の原子力発電所の余熱を利用するように設計されているもので、現在は原子力発電

装置が稼働していないので暖房は石油によっており、燃料費にかなりの経費を要するとのことであった。

D. 考察

マオウ属植物は水耕法には適していない可能性が考えられた。

マオウ属植物は乾燥地に適した形質を有しており、地下深くに根をおろす性質がある。よって、水分環境が悪い土地では急速に根を発達させるものと考えられる。一方、水耕栽培のように水分環境が良い場合には根を発達させる必要がなく、このような結果になったことが考えられる。

今年度の中国内蒙古自治区における麻黄栽培地における聞き取り調査においても、灌水が多すぎると根を張らないという情報を得ており、今後の検討が必要であると思われる。

今年度の経費により、砂を支持体とした水耕栽培設備を導入したので、3 月から実験に取りかかる。

志賀町の水耕栽培設備は立派であるが、原子力発電装置が稼働していない現時点では利用がたいが、暖房なしで単なるハウスとしての利用は可能であり、その場合、LED による栽培研究等にも使用可能である。

E. 結論

マオウ属植物の栽培には水耕法は適していない可能性がある。今後は根を十分に発達させてから養液中に投入するなどの方法の効果を検討する必要がある。また、麻黄に適した養液の検討

も今後の課題であるが、そのためには現在の装置は大規模すぎるので、小型装置を導入する必要がある。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

該当なし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1.特許取得

該当なし

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし



水耕栽培施設（青森県産業技術センター）



マオウの水耕栽培



根張りが悪いマオウ



石川県羽咋郡志賀町にある水耕栽培施設
(麻黄の水耕栽培に目処がついた際にはこの施設を借りて行なう予定)

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
研究報告書

光量がアルカロイド含量に及ぼす影響に関する研究

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

『第 16 改正日本薬局方』では、漢方生薬「麻黄」はアルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリンの総和）を 0.7%以上含有することを規定しており、麻黄栽培にあたっては最終生産物がこの基準を満たす必要がある。本研究では、アルカロイド産生のための栽培適地を検討する目的で、実験的に光量を調節して栽培した。その結果、有為差は得られなかったが、平均値で光量が多い群ほどアルカロイド含量が高かった。よって、栽培地は十分な日照が得られる場所が良いと判断した。

研究協力者 倪 斯然 金沢大学大学院自然科学研究科 PD

A. 研究目的

『日本薬局方』は、漢方生薬「麻黄」はアルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリンの総和）を 0.7%以上含有することを規定している。麻黄の栽培にあたっては、生産物がこの基準を超えることが必須条件であり、麻黄栽培における最大の課題である。

研究者らは平成 23 年 6 月下旬に、中国新疆和田（ホータン）の崑崙山脈の北斜面において調査した結果、峡谷に生える *Ephedra intermedia* Schrenk et C.A.Meyer 株のアルカロイド含量が、他地域産に比してアルカロイド含量が低いことを見いだした。この現象は実験株の生育地が峡谷で日照時間が少ないことに起因しているのではないかと考え、栽培時の日照条件を探る目的で今回の研究を行なった。

B. 研究方法

実験材料：

E. sinica Stapf：株番号（金沢大学内の薬用植物園における麻黄の保管番号）432, 511, 513 の *E. sinica* から採取した種子の発芽苗、それぞれ 12 株。その他の実生苗は 2009 年金大薬用植物園で採取した種子（親株不明）から発芽育成した 14 株。

E. saxatilis Royle (= *E. likiangensis* Florin)：同じ親株から 2009 年 6 月と 2010 年 10 月に挿し木により増やした 16 株。

実験方法：

2013 年 4 月に実験材料を 1/5000 a のワグネルポット鉢に植え替えて 3 群に分け、5 月 10 日に実験を開始した。光条件としては遮光しない群（*E. sinica* のクローン 12 株と実生苗 2 株、*E. saxatilis* のクローン 6 株、計 20 株）、遮光率 22% 群（*E. sinica* のクローン計 12 株、*E. sinica* の実生苗 7 株、*E. saxatilis* のクローン 4 株、計 23 株）と遮光率 51% 群（*E. sinica* のクローン 12 株、*E. sinica* の実生苗 5 株、*E. saxatilis* のクローン 6 株）を設定した。

9 月に今年伸びた草質茎を採集し、HPLC 法によりエフェドリン（E）及びプソイドエフェドリン（PE）含量の定量を行なった。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

PE 含量について遮光しない群、遮光率 22% 群と遮光率 51% 群の平均値はそれぞれ 0.13%、0.14%と 0.10%であった。遮光率 51% 群の PE 含量は少なかったが有意差は認められなかった。一方、E の平均含量は、遮光しない群では 0.53%、遮光率 22% 群では 0.37%、遮光率 51% 群では 0.34%であり、遮光率 51% 群と遮光しない群の間に有意差（ $P < 0.05$ ）が認められた。

麻黄は個体によってアルカロイド含量にばらつきがあるので、*E. saxatilis* のクローン株を用い

て比較を行なった。その結果，E と PE 平均含量は，遮光しない株では 0.65% と 0.10%，遮光率 22% の株では 0.63% と 0.11%，遮光率 51% の株では 0.43% と 0.07% であった。遮光された株の含量が少なかったが有意差は認められなかった。*E. sinica* について，親株 432 から得た種子の発芽株の E と PE 平均含量は，遮光しない株では 0.50% と 0.39%，遮光率 22% の株では 0.34% と 0.27%，遮光率 51% の株では 0.17% と 0.21% であった。遮光率 51% の株の E と PE 平均含量は遮光しない株より有意に ($P < 0.05$) 低いことが確認された。他の *E. sinica* 株と親株不明の実生苗でも同様の傾向が見られたが，統計学的な有意差は認められなかった。

D. 考察

平均値で比較すると，遮光により明らかにアルカロイドが減少した。統計学的に明確な有意差が認められなかった理由として株数の不十分が考えられるが，それ以上に，個体による変異が大きいことが挙げられる。このことは，同一条件で育てたクローン株でさえ大きな変異を示したことからうかがえる。正確を期すにはさらなる検討が必要であろうが，栽培麻黄のアルカロイド含量を高めるためには，栽培地の日照に関しては出来る限り良好であることが望ましいと考える。

E. 結論

麻黄では栽培時の日照条件によってアルカロイド含量が変わり，平均値であるが，光量が多い実験株ほどアルカロイド含量が高くなるのが今回の実験で明らかになった。これによって，今後麻黄の国内生産は十分な日照が得られる栽培地が良いと判断した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし



遮光実験（左：遮光率51%，右：遮光率22%）

No.	種	園内番号	苗作成方法	土壌	定植時間
K01	saxatilis	5-1	挿し木	プランター(1)赤玉(1)	2013/4/9
K02	saxatilis	5-1	挿し木	プランター(1)赤玉(1)	2013/4/9
K03	saxatilis	5-1	挿し木	プランター(1)赤玉(1)	2013/4/9
K04	saxatilis	5-1	挿し木	プランター(1)赤玉(1)	2013/4/9
K05	saxatilis	5-1	挿し木	プランター(1)赤玉(1)	2013/4/9
K06	saxatilis	5-1	挿し木	プランター(1)赤玉(1)	2013/4/9
K07	sinica	511-7	2009年採取種子	プランター	2011/10/26
K08	sinica	511-6	2009年採取種子	プランター	2011/10/26
K09	sinica	511-5	2009年採取種子	プランター	2011/10/26
K10	sinica	511-11	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K11	sinica	432-10	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K12	sinica	432-12	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K13	sinica	432-13	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K14	sinica	432-11	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K15	sinica	513-14	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K16	sinica	513-3	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K17	sinica	513-15	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K18	sinica	513-16	2009年採取種子	プランター	2011/11/21
K19	sinica	513	園内保有株	プランター(1)赤玉(1)	2013/4/24
K20	sinica	513	園内保有株	プランター(1)赤玉(1)	2013/4/24
K21	sinica		園内保有株	プランター	2013/4/16
K22	sinica		園内保有株	プランター	2013/4/16
K23	sinica	421	園内保有株	プランター	2013/4/16

表1 実験株（同一年に挿し木により得たクローン株）

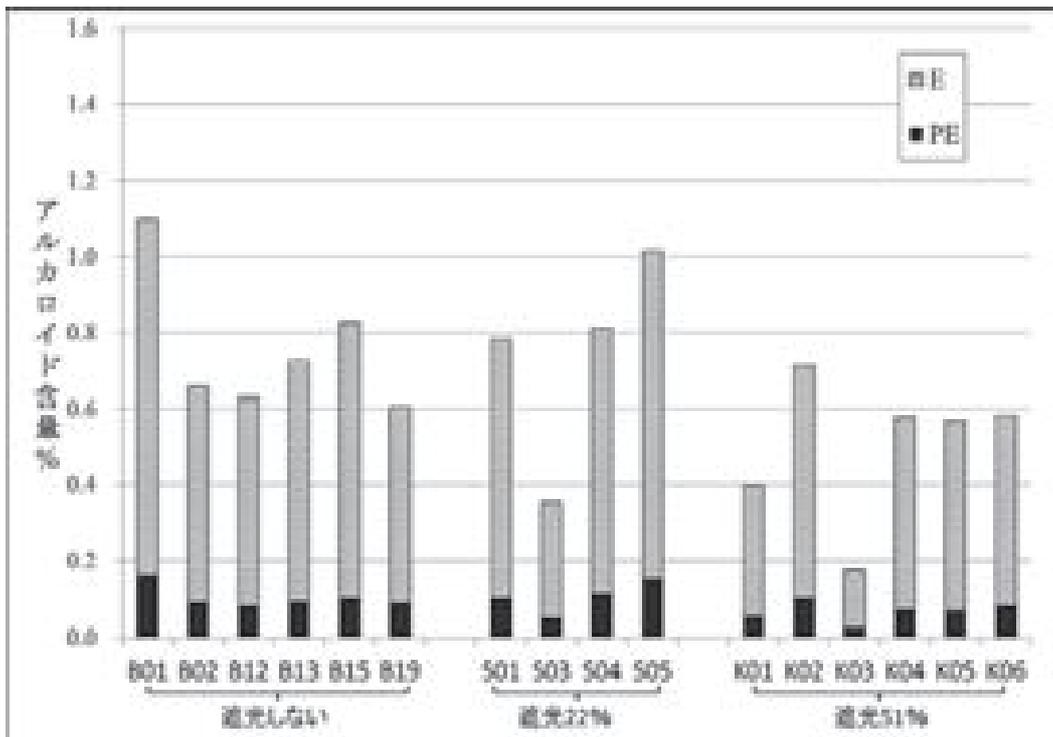


図1 *E. saxatilis* のアルカロイド含量

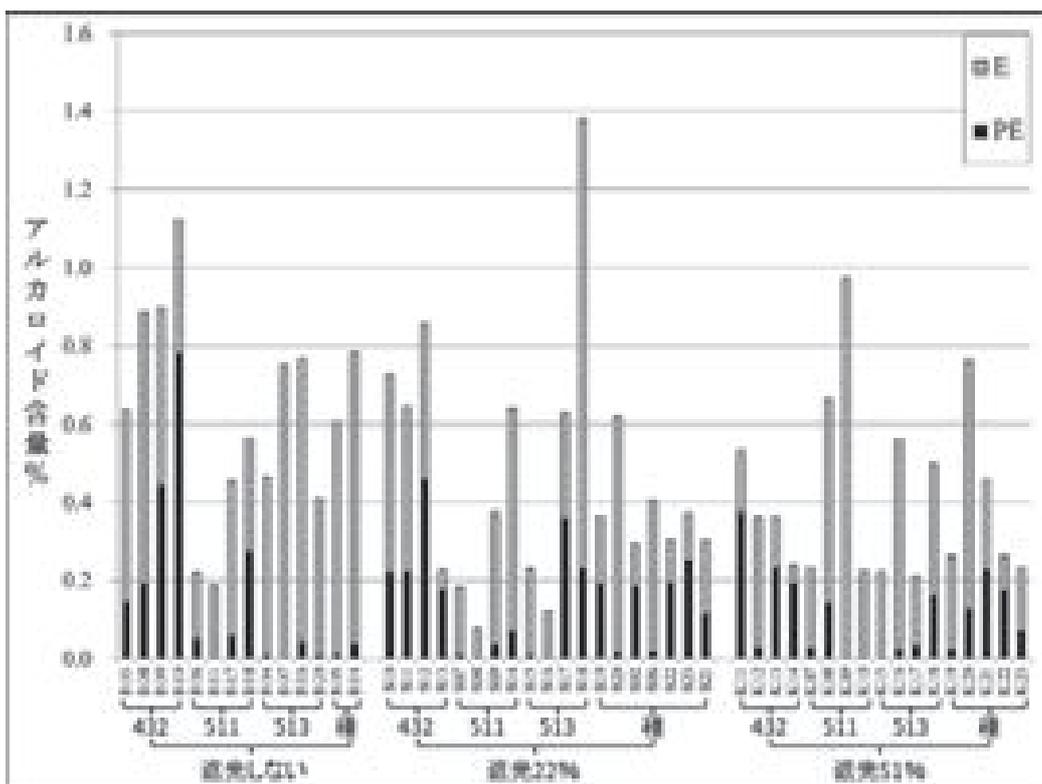


図2 *E. sinica* のアルカロイド含量

種名	挿し木・実生苗 (親株の番号)	コントロール		遮光率 22%		遮光率 51%	
		E (%)	PE (%)	E (%)	PE (%)	E (%)	PE (%)
E.saxatilis	挿し木	0.65	0.10	0.63	0.11	0.07	0.43
E.sinica	実生苗 (432)	0.50	0.39	0.34	0.27	0.17	0.21
E.sinica	実生苗 (511)	0.26	0.09	0.29	0.03	0.48	0.04
E.sinica	実生苗 (513)	0.58	0.01	0.44	0.15	0.15	0.44
E.sinica	実生苗	0.67	0.03	0.24	0.14	0.32	0.05
E.sinica	総計	0.48	0.15	0.32	0.14	0.31	0.11
総		0.51	0.13	0.37	0.14	0.34	0.10

表2 Ephedrine と Pseudo ephedrine の平均含量

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
研究報告書

マオウの栽培品種選抜に関する研究 — エフェドリン系アルカロイドの含有比率 —

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授
研究分担者 佐々木 陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

『日本薬局方』では漢方生薬「麻黄」にアルカロイド含量(エフェドリン及びプソイドエフェドリンの総和)が0.7%以上であることを規定している。両アルカロイドはそれぞれの薬効が異なり、含有比率に応じて使い分けをすることが望ましいと考えられる。含有アルカロイドは今後、マオウの栽培に際して優良品種の選抜を行なうための指標となるため、野生品及び栽培品について、それぞれエフェドリン系アルカロイドの含有比率を調査した。その結果、麻黄のエフェドリン系アルカロイドの含有比率は遺伝的な要因に影響を受けており、品種選抜した株をクローン増殖した栽培品を使用することで、目的とする成分の含有比率の麻黄を生産することが可能であることが示された。一方、総アルカロイド含量は遺伝的要因ではなく、環境等他の要因に影響を受けていることが示唆され、アルカロイド含量を高めるためには今後、栽培方法を検討する必要がある。

研究協力者 松本 昌士 金沢大学大学院自然科学研究科院生

A. 研究目的

『第16改正日本薬局方』において麻黄は、有効成分であるエフェドリン系アルカロイドの(-)-ephedrine(エフェドリン:以下, Eph)及び(+)-pseudoephedrine(プソイドエフェドリン:以下, P-Eph)含量の合計値が0.7%以上と規定されているが、それぞれの含量に関する規定は設けられていない。しかしエフェドリン系アルカロイドは成分によって薬効が異なるとされており、例えばEphの方がP-Ephよりも作用が強いものとして、喘息抑制、血圧上昇が挙げられ、一方でP-Ephの抗炎症作用はEphと比較して強いとする報告がある。そのため発汗解表・宣肺平喘を期待する処方(麻黄湯、麻杏甘石湯など)にはEph組成比の高い麻黄、消炎止痛・減肥を期待する防風通聖散のような処方にはP-Eph組成比の高い麻黄を使用するといった、含有比率に応じた使い分けをすることが本来望ましいと考えられる。麻黄のエフェドリン系アルカロイド組成比は地域性があり、P-Eph組成比が高い市場品は甘粛省・青海省に集中しているとする報告、降水量の少ない所で

は全体的に含量が高く、P-Eph組成比が高い傾向にあることが報告されている。しかしこれらの報告において、同じ産地から得た麻黄でも個体によって含有比率が大きく異なり、EphとP-Ephの含有比率が逆転しているケースも認められる。このことは、同じ産地の麻黄でも安定して目的に応じた使い分けができない可能性があることを意味する。原因としては、生育環境・生育年数・遺伝的要因など複数の要因が関係していると予想されるが、今回は遺伝的要因に着目した。つまり含有比率の違いは個体の多様性によるもので、同一個体はほぼ同じ比率であると推察し、まず野生品について、遺伝的に多様な雌雄両株が共存している群生地と、同一個体による栄養繁殖でしか増殖する手段がない群生地について調査を行なった。後者としては、雄株のみの群生地、或いは*Ephedra*属植物の*E. sinica* Stapfは根茎を地下から横方向に長く伸長させて繁殖する傾向が強く、複数個体の群生地に見える同一個体の群生地があり、この2種類が挙げられる。これらについて、それぞれのEph及びP-Ephの含有比率の調査を行なっ

た。

次に、栽培では安定した含有比率の個体を得ることができるのかどうかを検証するため、遺伝的に同等と考えられる栄養繁殖（株分け、挿し木）で栽培したマオウの Eph 及び P-Eph の含有比率の比較を行なった。またマオウは地上部を使用するため、地下部を残して収穫することにより継続して収穫し続けることが可能で、中国の栽培地でも継続して収穫されている。しかし、継続して収穫を続けた場合、毎年アルカロイド含有比率が安定したものを得られるのかどうかは明らかではない。そこで栽培年数とアルカロイド含有比率の関係について検証をするため、複数の種苗を用いて 3~6 年生株の含有率についても調査を行なった。

B. 研究方法

実験材料

(1) *Ephedra sinica* Stapf (野生品)

採取地点：内蒙古自治区赤峰市 1 (雌雄両株が混在, 2010 年 alt.330m, 2011 年 alt.434m), 標本 No. 100623-3~4 (共に複数個体が混合した検体のため, 各 3 個体を採取して分析した), 110725A1-01~04, B1-02~05. 採取日: 2010.6.23, 2011.7.25, サンプル数: 14.

採取地点：内蒙古自治区赤峰市 2 (雌雄両株が混在, alt.678m), 標本 No. 100623-1 (複数個体が混合したサンプルのため 3 個体を採取して分析した), 110726A1-01~04, B1-01~07, 採取日: 2010.6.23, 2011.7.26, サンプル数: 14 点。

採取地点：河北省承德市 (雄株のみ群生, alt.1345m), 標本 No. 02139, 採取日: 2002.6.10, サンプル数: 9 点。

採取地点：内蒙古自治区包頭市 (根茎を地下で伸長し, 見かけ上別個体のようにして繁殖していた同一個体, alt.1380), 標本 No.100720-10, 採取日: 2010.7.20, サンプル数: 5 点。

採取地点：内蒙古自治区錫林郭勒盟 (根茎を地下で伸長し, 見かけ上別個体のようにして繁殖していた同一個体, alt.1060), 標本 No.7081801, 採取日: 2007.8.1, サンプル数: 5 点。

(2) Ep-13 (栽培品)

Ep-13 は米国から *Ephedra distachya* として我が国に導入されたが、詳細については不明である。一方、Ep-13 は繁殖力が強く、これまで株分けにより同一クローン株として各地で栽培維持されてきたユニークな株である。栽培地: 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 和歌山及び種子島, 栽培方法: 株分け・露地栽培, 採取日: 和歌山 2011.12.15, 種子島 2011.12.13~12.14, サンプル数: 和歌山 9 点, 種子島 26 点。

(3) *E. sinica* (栽培品)

栽培地: 金沢大学附属薬用植物園, 栽培方法: 挿し木法により繁殖したクローン株をワグネルポットで 2 年間栽培 (年 1 回植替え), 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, 採取日: 2011.11.22, 2012.9.18, サンプル数: 12, 11.

栽培地: 金沢大学附属薬用植物園, 栽培方法: 1/5000a 又は 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。市販土 (「プランターの土」, 秋本天産物 (株)), 赤玉土, 市販土 + 赤玉土 (28:18, 体積比), 市販土 + 土壌アルカリ化剤, 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: 人工海水の希釈液を週に 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: 2007.9, 2008.9, 2009.9, 2010.9, サンプル数: 100.

方法

アルカロイドの定量法

定量は以下の方法で行なった。一部の試験は日本薬局方の定量法を参考にした方法で行なっ

た．一部のサンプルについて両方法による E/PE の差を比較し，5%以内であることを確認した．

試料溶液の調製 各試料粉末 100mg に，後述の HPLC 移動相 5.0mL を加え，室温にて 20min 静置後，25min 超音波抽出．その後 3000rpm で 15min 遠心分離し，上澄み液を 0.45 μ m のメンブランフィルター

(Minisart[□]RC25, Sartorius Stedim Biotech 製)にてろ過したものを，試料溶液とした．

HPLC 測定条件 pump : L-2130 , auto sampler : L-2200 , UV detector : L-2400 , integrator : D-2500 (以上，日立製) , column : Handy ODS (4.6mm I.D×250mm) No.14562 和光純薬工業 (株) , column temp. : room temperature , flow rate : 1.0mL/min , detection wavelength : 210nm .

mobile phase : SDS 水溶液 / MeCN / H₃PO₄(305:195:0.8) , SDS 水溶液 : Sodium Lauryl Sulfate(C₁₂H₂₅OSO₃Na , SDS)1.0g を蒸留水に溶かし 127mL とした．

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

(1) 野生品のアルカロイド含有比率

雌雄両株の群生地 (赤峰市) において 2010 年に入手したサンプルは，2 箇所の産地ともに 2011 年と比較して含量が低かった．アルカロイド含量は季節変動があり，2010 年は 2011 年よりも早い 6 月下旬に採取したものであったことが原因と推察される．産地ごとのアルカロイド含有比率は，個体ごとに数値の変動が大きく，一定の傾向は認められなかった (Fig.1) ．一方，雄株のみの群生地で得た個体，根茎を伸ばして見かけ上別個体のようにして繁殖していたものについては，それぞれのアルカロイド含有比率が相関を示した (Fig.2) ．このことから，有性生殖によって繁殖した個体は多様性が大きく，根茎などによる栄養繁殖で増加した個体は，生育年数によらず Eph 及び P-Eph の含有比率がほぼ一定であることが明らかになった．

(2) 栽培品 (株分け・露地栽培，挿し木・鉢

植え) のアルカロイド含有比率

マオウの栽培において遺伝的に同等なクローン株を増殖する方法として，株分け，挿し木の 2 つの方法について，それぞれ別の場所と方法により試験を行なった．

株分け・露地栽培では，和歌山と種子島の 2 箇所の Eph 及び P-Eph 含有比率について，相関係数 $R^2=0.9601$ と高い相関が認められた (Fig.3) ．

挿し木・鉢植えでは，栽培土壌の種類，収穫時期によらず，相関計数 $R^2=0.9423$ と高い相関が認められた (Fig.4) ．

複数の種苗の 3 年生から 6 年生までの含量組成比 (Eph / Eph+P-Eph) については，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，4 年間継続して前年との間に高い相関が認められ，さらに 3 年生と 6 年生を比較しても高い相関が認められた (Fig.5) ．また相関係数は 3~4 年生の間よりも 4~5 年生，5~6 年生株の間の方がわずかに高く，成分含有比率が年々安定していく可能性が示唆された．

D. 考察

雌雄両株が混在した群生地のように，遺伝的な多様性が大きいところでは含有比率が大きく変動することが分かった．雄株のみの群生地や同一個体については含有比率が一定であったが，このような自生地はまれで規模も小さい傾向にあった．これらのことから，成分含有比率が安定した個体を野生品から継続して得ることは困難である．一方株分けや挿し木による栽培品では，異なる栽培地，栽培条件でもアルカロイドの含有比率が一定であった．つまりエフェドリン系アルカロイドの含有比率に応じた使い分けは，クローン株の栽培品を使用することによって達成できるものと考えられる．

一方で問題点として，エフェドリン系アルカロイド含量 (Eph + P-Eph) は，同じ圃場，同じクローン由来株でも，0.1~1.0% と 10 倍以上の数値の隔たりが認められた．このことについては，日照条件，灌水量などが影響していると推定され，安定した含量のものを継続して得るためには栽培方法の検討が欠かせない．また，4 年間の E / E+PE を比較した結果において，E

の含有比率がわずかに増加傾向にあることを報告している。10年単位の長い期間でも安定した数値を維持することが可能かどうかについても調査を行う必要がある。

E. 結論

マオウ属に含有される Eph や P-Eph などのアルカロイドの組成比は、遺伝的要因に影響を受けていることが明らかになった。一方、総アルカロイド含量は遺伝的要因ではなく、別の要因に影響を受けていることが示唆され、麻黄栽培にあたってアルカロイド含量を増大させるためには遺伝的な品種を選抜するのではなく、栽培環境等の要因を検討する必要があることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表論文)

Masashi Matsumoto · Manabu Hirayama · Norihiro Ohtomi · Takeshi Ohno · Yukihiro Nomura · Osamu Iida · Koji Sugimura · Nobuo Kawahara · Takashi Tsuchida · Masayuki Mikage : Influence of genetic factors on the ephedrine alkaloid composition ratio of *Ephedra* plants : *J. Nat. Med.* (投稿中)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

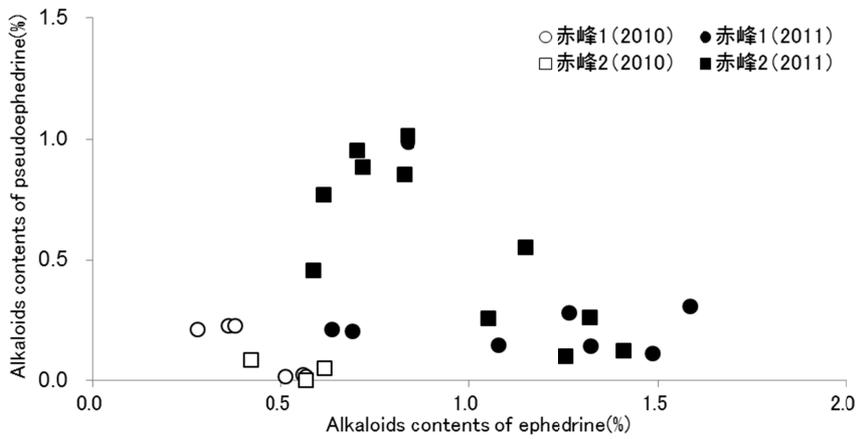


Fig.1 野生株（雌雄両株が混在）のアルカロイド含量比率

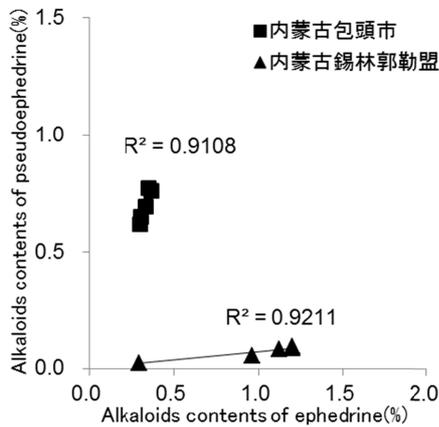
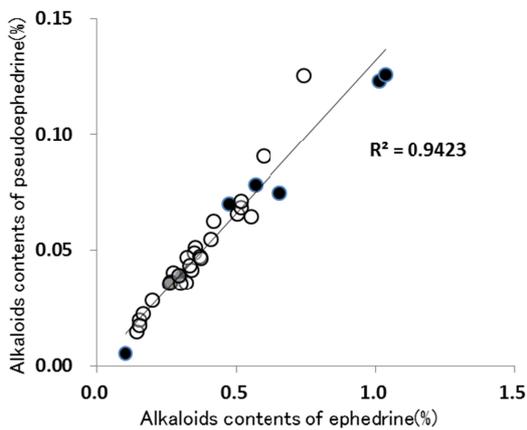
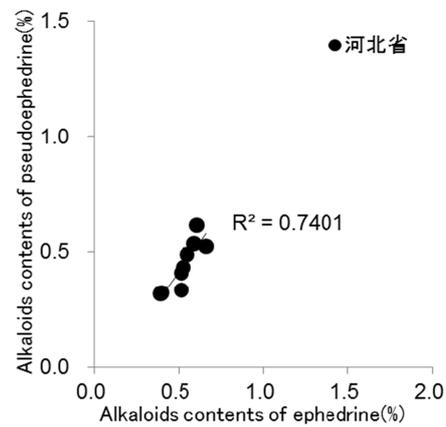
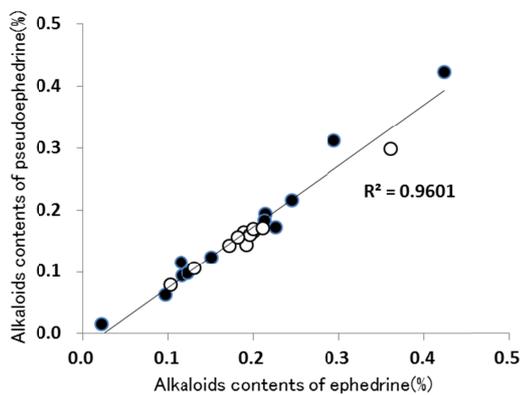


Fig.2 野生株（雄株のみの群生地又は根茎を伸長して見かけ上別個体のようにして繁殖していた個体）のアルカロイド含量比率



○Tanegashima(種子島), ●Wakayama(和歌山)

●2012.9.18 採取



○2011.11.22 採取,

Fig.3 栽培株（株分け・露地栽培）のアルカロイド含量比率

Fig.4 栽培株（挿し木・鉢植え）のアルカロイド含量比率

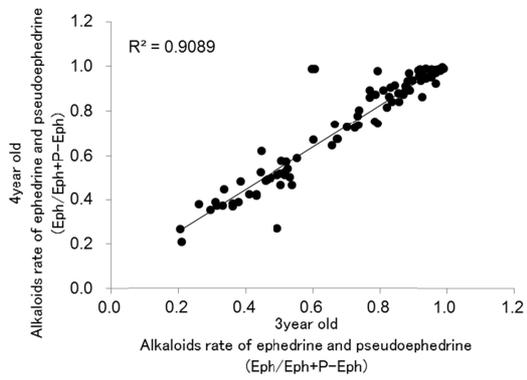


Fig.5-1 栽培株のアルカロイド含量比率
(3年生と4年生)

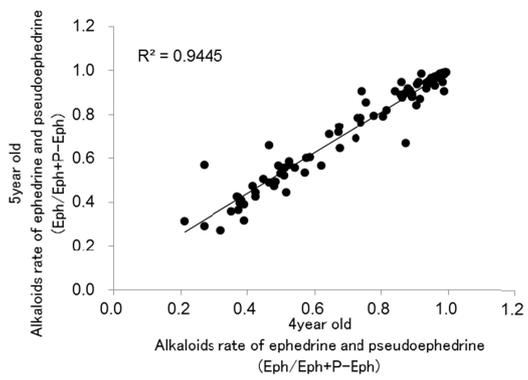


Fig.5-2 栽培株のアルカロイド含量比率
(4年生と5年生)

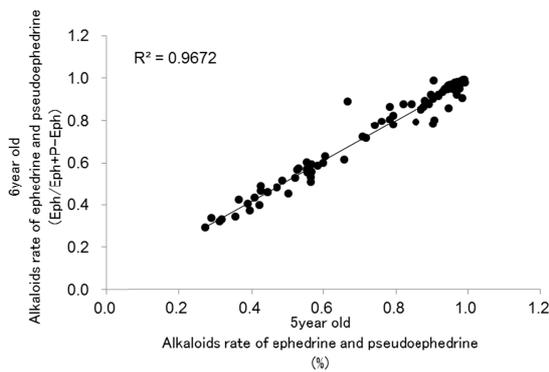


Fig.5-3 栽培株のアルカロイド含量比率
(5年生と6年生)

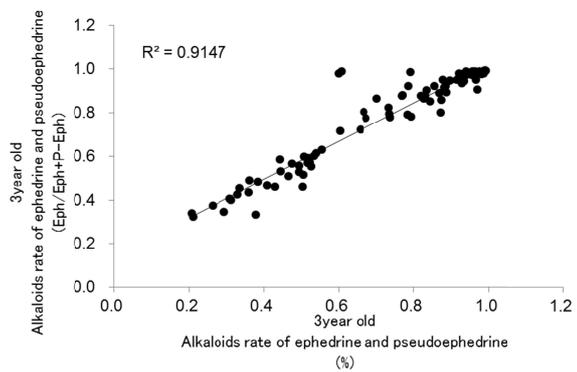


Fig.5-4 栽培株のアルカロイド含量比率
(3年生と6年生)

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
研究報告書

能登半島におけるマオウ栽培圃場の構築；志賀町圃場について

研究代表者 御影 雅幸 金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授
研究分担者 佐々木陽平 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系 助教

研究要旨 日本国内初となるマオウ属植物栽培圃場を構築した。能登半島各地を調査した結果、石川県羽咋郡志賀町里本江の砂地に決定した。初年度は *Ephedra sinica* の栽培株 205 個体を約一反の面積に植え付けた。栽培適地、条件を判断すること、また除草対策を検討することを目的とした。管理は合同会社菜友館に委託し、現在 2 年目、経過観察継続中である。

研究協力者 松村 博行 合同会社菜友館
研究協力者 須藤 雅彦 合同会社菜友館

A. 研究目的

本研究は「能登半島における国産麻黄生産拠点の構築」を目的としている。よって、能登半島でのマオウ属植物の栽培を目的とするが、初年度である本年度は苗の生産に重点を置いた。一方、これまでの研究によりすでに保有していた株を試験的に能登の圃場に移植した。

漢方生薬「麻黄」は『第 16 改正日本薬局方』で、マオウは、*Ephedra sinica* Stapf、*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Meyer 又は *Ephedra equisetina* Bunge (*Ephedraceae*) の地上茎であると記載されている。さらに、含有成分として、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。

マオウ属植物は鉢による栽培では、栽培年数の経過とともに含有アルカロイドが減少するという問題がある。そのため鉢やワグネルポットでは正しい栽培年数経過によるアルカロイド含量の変化を測定することができない。マオウ属植物の栽培においては栽培特性や管理条件を決定する必要が地植えによる圃場栽培の必要性が生じていた。

これまで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ではマオウ属植物の種子発芽苗や挿し木法による

苗生産法を確立しており、この方法で作成された苗を保有している。今年度は保有する主として 3～4 年生の *Ephedra sinica* の 205 株をまず石川県羽咋郡志賀町里本江に定植した。

もう一点、マオウ属植物の栽培に最も重要な除草対策である。マオウ属植物は背丈が高くなる雑草との共存に弱く、随時、除草する必要がある。圃場栽培を行なった際の、実際の状況を確認することも目的とした。

現在、約 1 年目を終え形態的な大きな変化はないものの、その経過観察を報告する。

B. 研究計画

B-1 栽培圃場について

石川県各地の候補から、主要栽培圃場は羽咋郡志賀町里本江に決定した。これは研究協力者である合同会社菜友館の管理する圃場であり、マオウ属植物の管理も菜友館メンバーにより行なわれた。土壌は山砂に近く、pH 8.73 とややアルカリ性に近い土地であった。

B-2 苗の定植について

平成 25 年 4 月 17 日に *E. sinica* に由来する苗、205 株を定植した。全定植株に、管理のために一連の番号を付した。10 月 28 日には全株の生育状況を撮影し、今年度の中国における栽培地での聞き取

り調査結果から、その後地上部を刈り取った。

C. 結果

C-1 定植株の生育状況について

4月17日に定植した205株のうち、1割弱は枯死した。欠株については、10月5日に補充した。枯死の理由は根の未定着と思われる。株毎の個性は多様であり、深く根を張るもの、ほとんど根を張らないものがみられた。

D. 考察

国内初のマオウ属植物栽培圃場がスタートした。2年目を迎えようとしている段階であるが、生長の良否を判断するには時期尚早である。

E. 結論

圃場栽培を引き続き継続し、今後はさらに環境が異なる圃場に作付けし、課題や対策を見いだす。鉢栽培ではなし得ない状況観察ができています。

F. 健康危険情報

なし

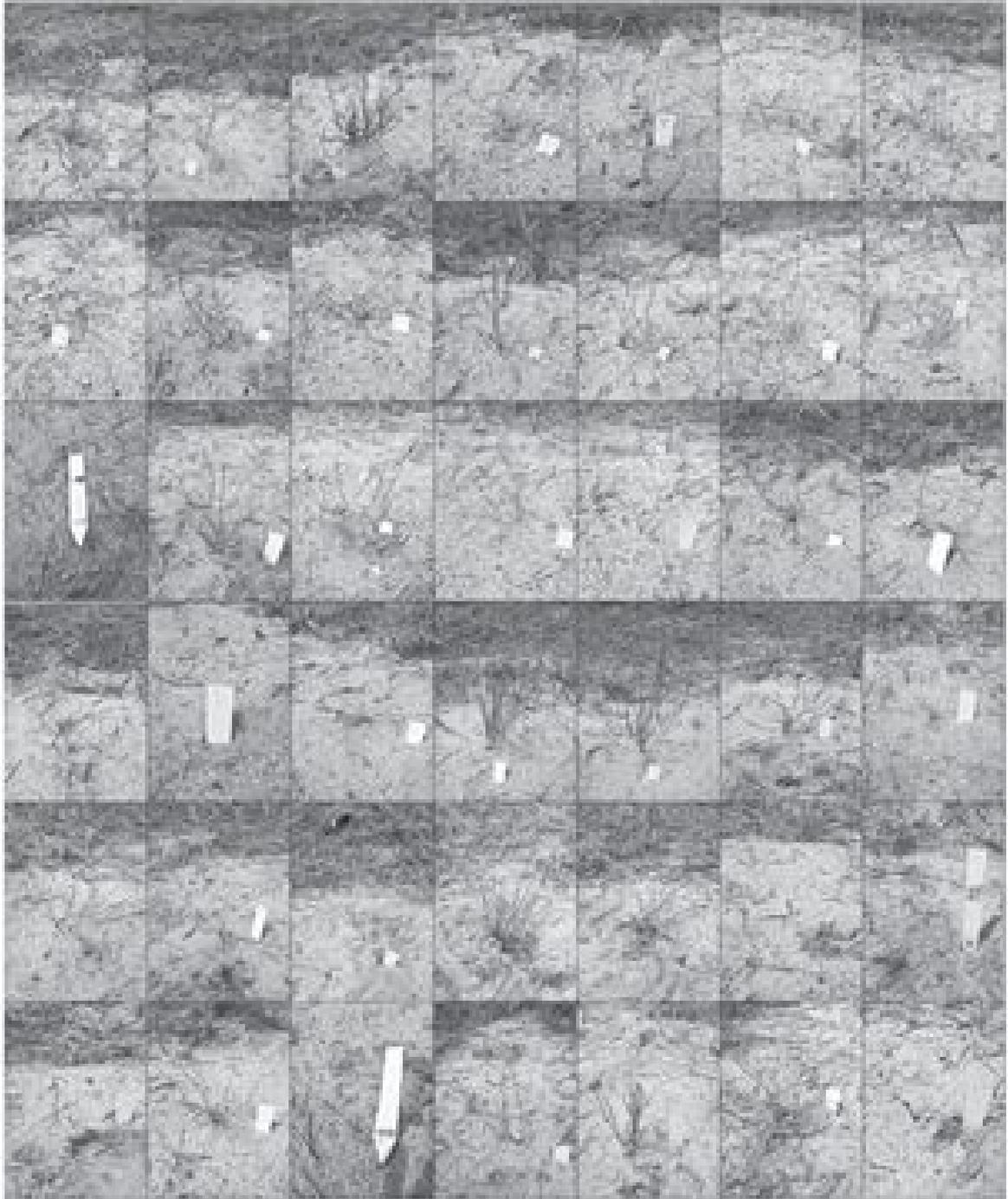
G. 研究発表

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。

NS001 - NS042



NS001 - NS042

NS043 - NS084



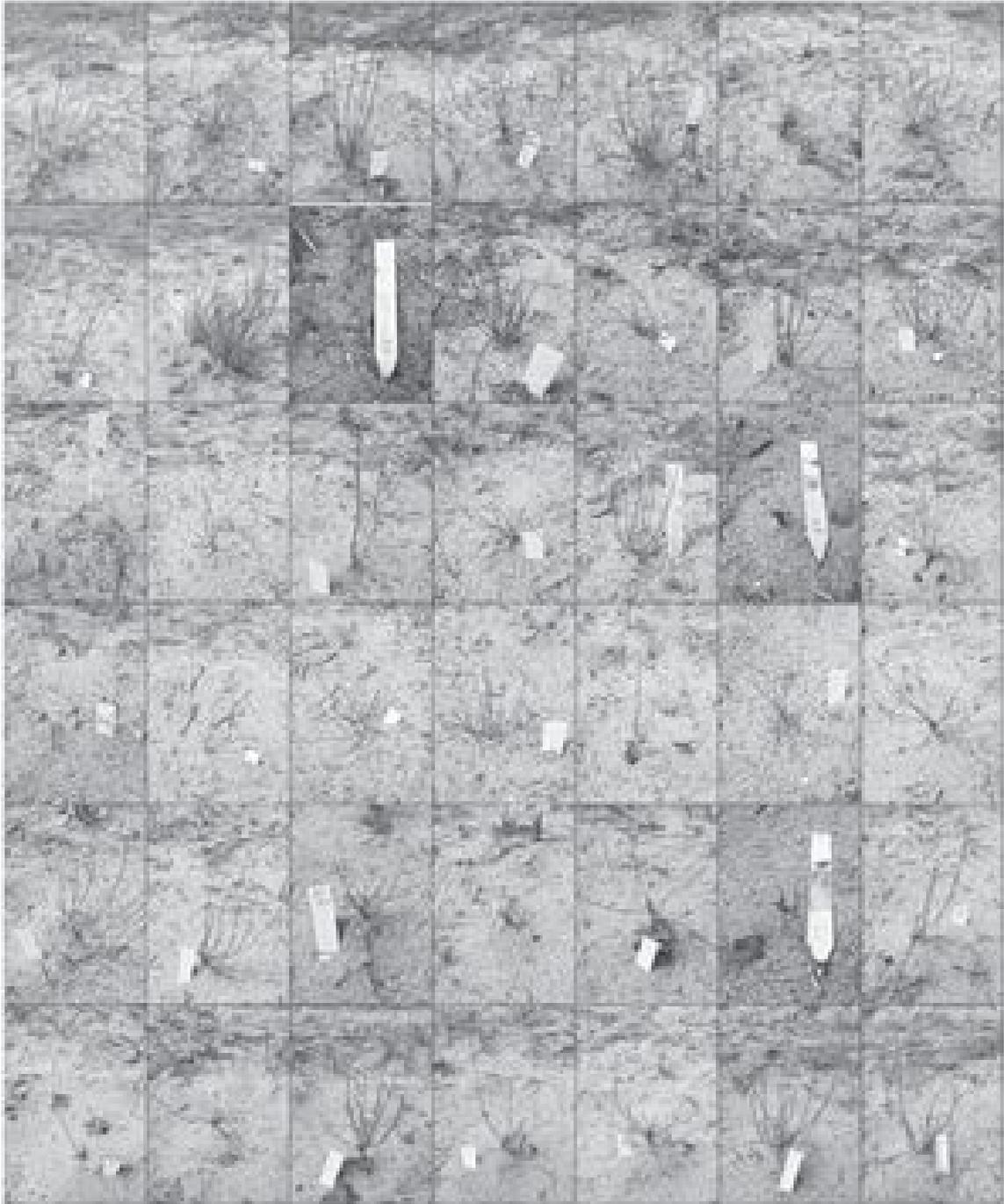
NS043 - NS084

NS085 - NS0126



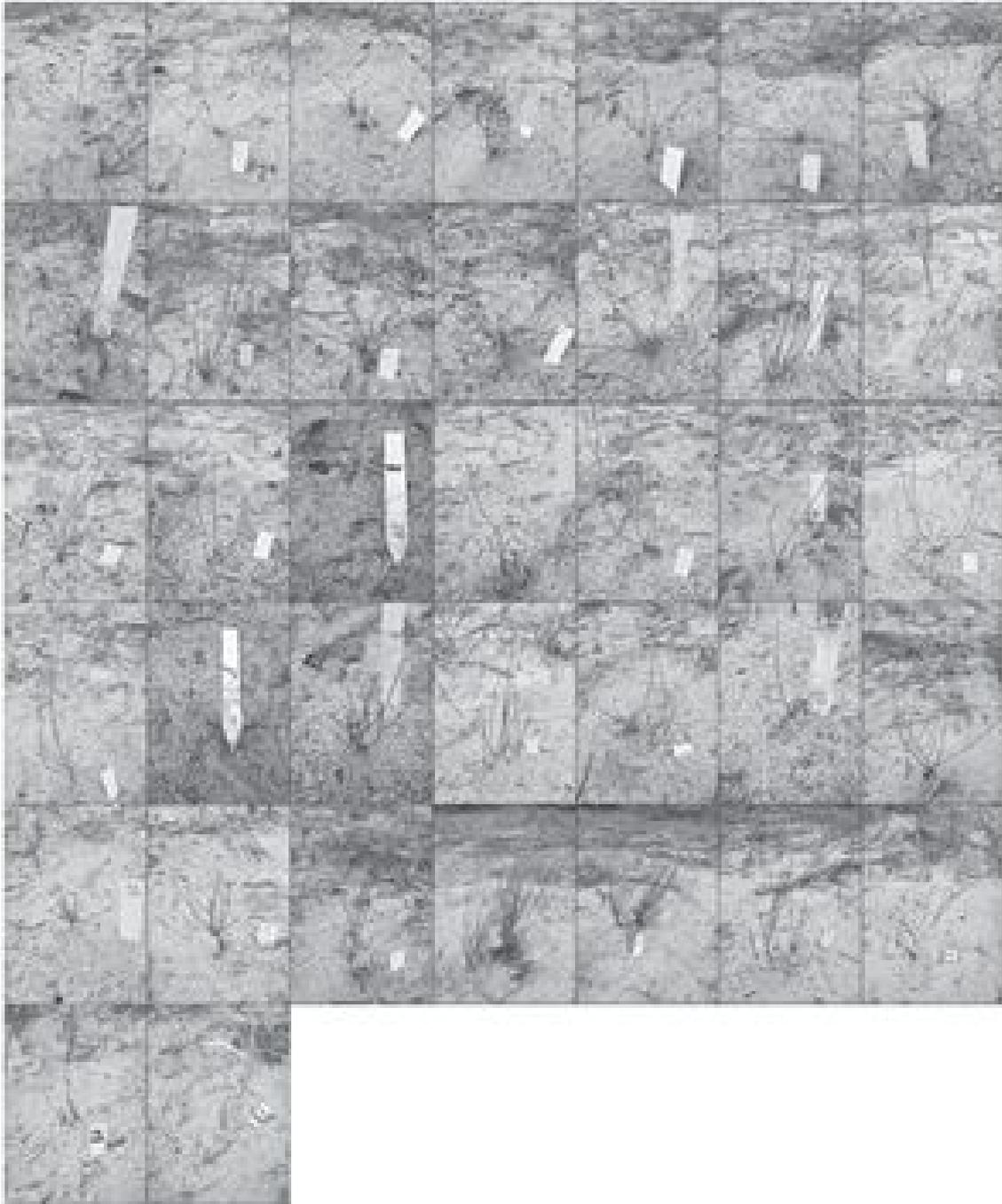
NS085 - NS126

NS127 - NS168



NS127 - NS168

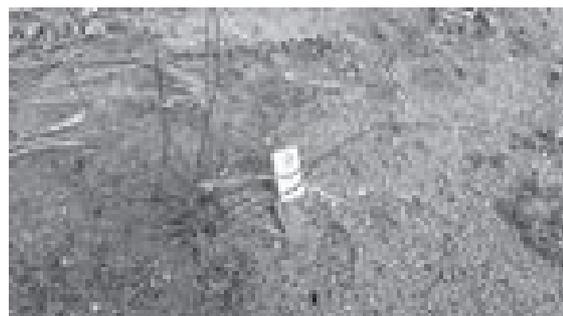
NS169 - NS205



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



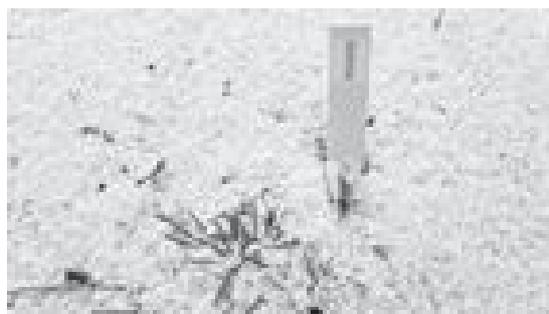
2014. 1. 27



2014. 2. 2



2014. 2. 10



2014. 2. 18



2014. 2. 24



2014. 3. 3



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 トンを輸入しているが、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) 及びブ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、植物工場による葉物/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応じて生育し、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、非施肥群はその後にも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個体を作成し、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、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、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、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。粉碎器により粉碎し粉末状とした。

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 °C 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：オクダ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：ドラージェンドルフ試液

成分の単離

60%メタノール溶出画分 33.49 g をオクダ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、この操作をを2回繰り返した。得られた抽出溶液は50°Cで減圧下アセトンを留去してから、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°C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簿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 噴霧後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か月经過時点で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

：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25kHzで1500 lx、50kHz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。

：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。

：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）パーミキュライト（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*n*-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、ドラージェ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。[]_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 0 7, 4 8)が(2 0 7, 4 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 0 7, 4 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 $C_{15}H_{10}O_7$ 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、Pla、ent-epiafzelechin-(2 0 7, 4 8)-(+)-afzelechin、ent-epiafzelechin-(2 0 7, 4 8)-(-)-afzelechin、epiafzelechin-(2 0 7, 4 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 $C_{30}H_{24}O_{10}$ 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 $[\alpha]_{220}$ がプラスの値を示し、 $[\alpha]_{270}$ がマイナスの値を示したので、(2 0 7, 4 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 $C_{45}H_{34}O_{14}$ 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収率が得られた。

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 % H_2SO_4 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 % CH_3CN 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 を目安とすべきである。

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、

ドラージェ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、含有量の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のあることがあるが、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。

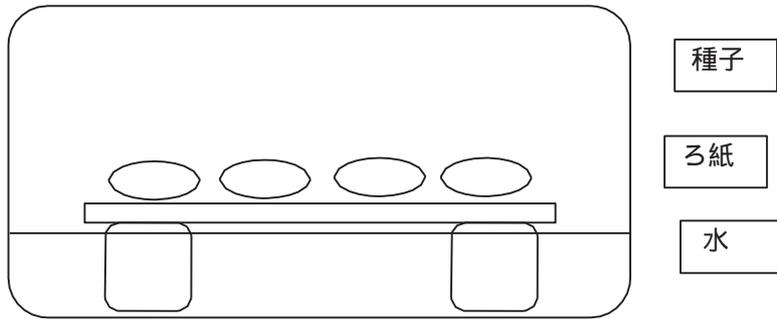
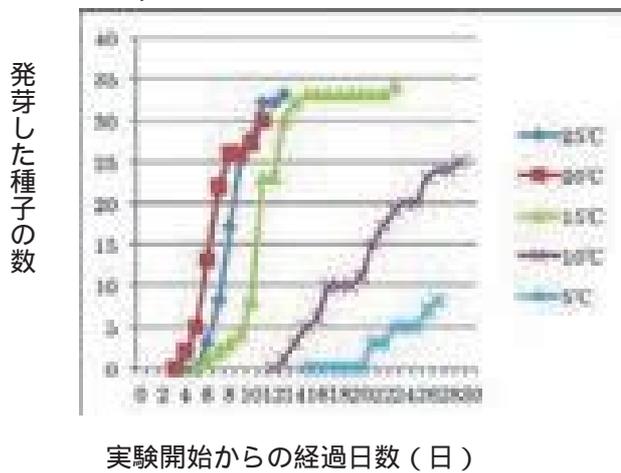


図 1 . 温度勾配恒温器

表 1 . Ephedra sinica の発芽結果



実験開始からの経過日数(日)

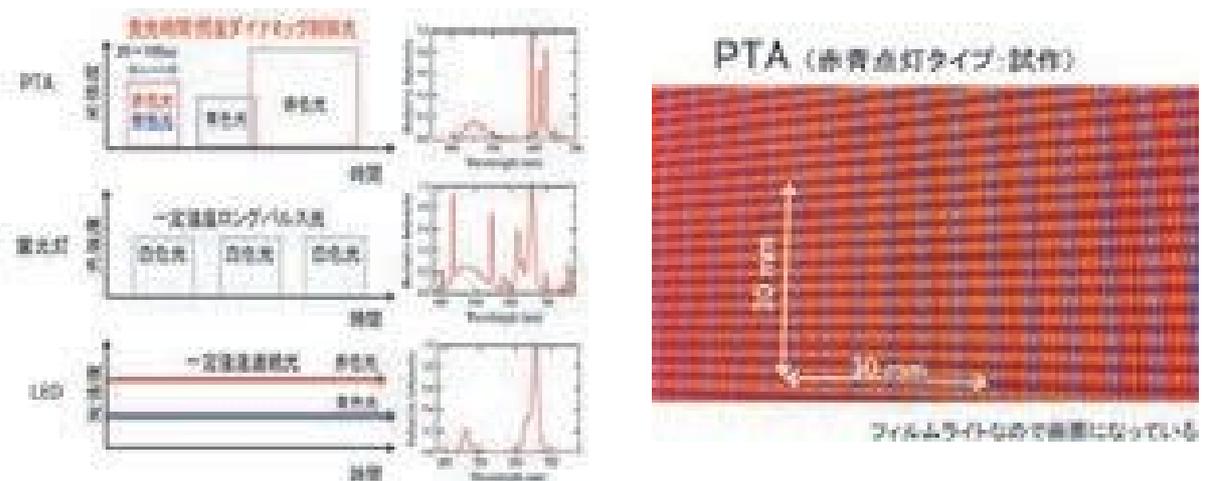


図 2 . 使用する光源の特性及びスペクトルの比較(左)と、試作した PTA の点灯の様子(右)

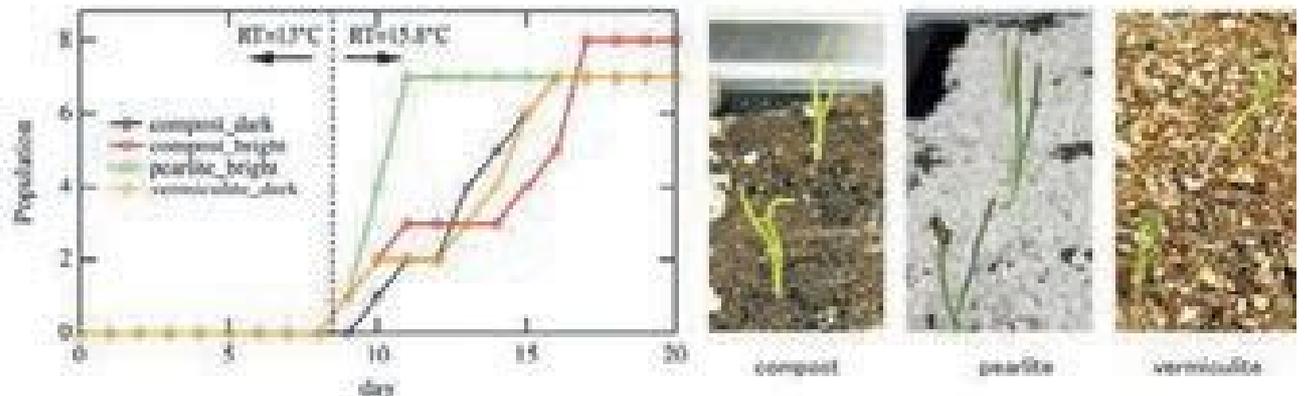
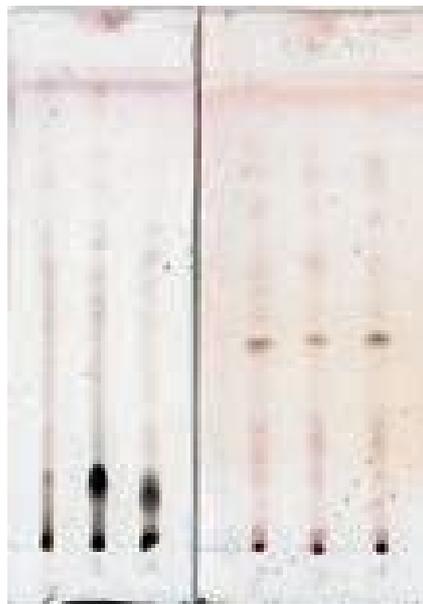


図 3 . 発芽数の推移と各培土での苗の様子（発芽後 4 日目）。bright は明所（蛍光灯下）、dark は暗所

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



図5 . イオン交換樹脂分画物の Si-TLC プロファイル (ニンヒドリン呈色)

EP : エフェドリン標準品

0~100 : 0% MeOH Fr. ~ 100% MeOH Fr.

AC : Acetone Fr.

DC : CH₂Cl₂ Fr.

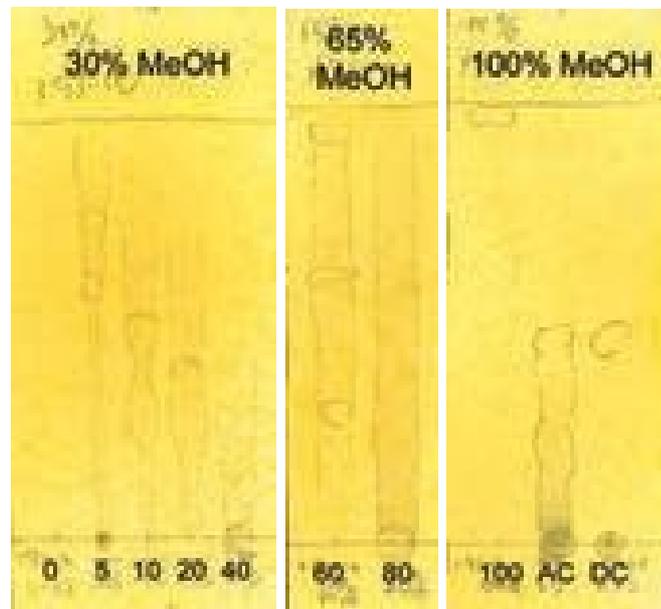


図6 . イオン交換樹脂分画物の ODS-TLC プロファイル (ドラージェンドルフ試液呈色)
 0~100 : 0% MeOH Fr. ~ 100% MeOH Fr.
 AC : Acetone Fr.
 DC : CH₂Cl₂ Fr.

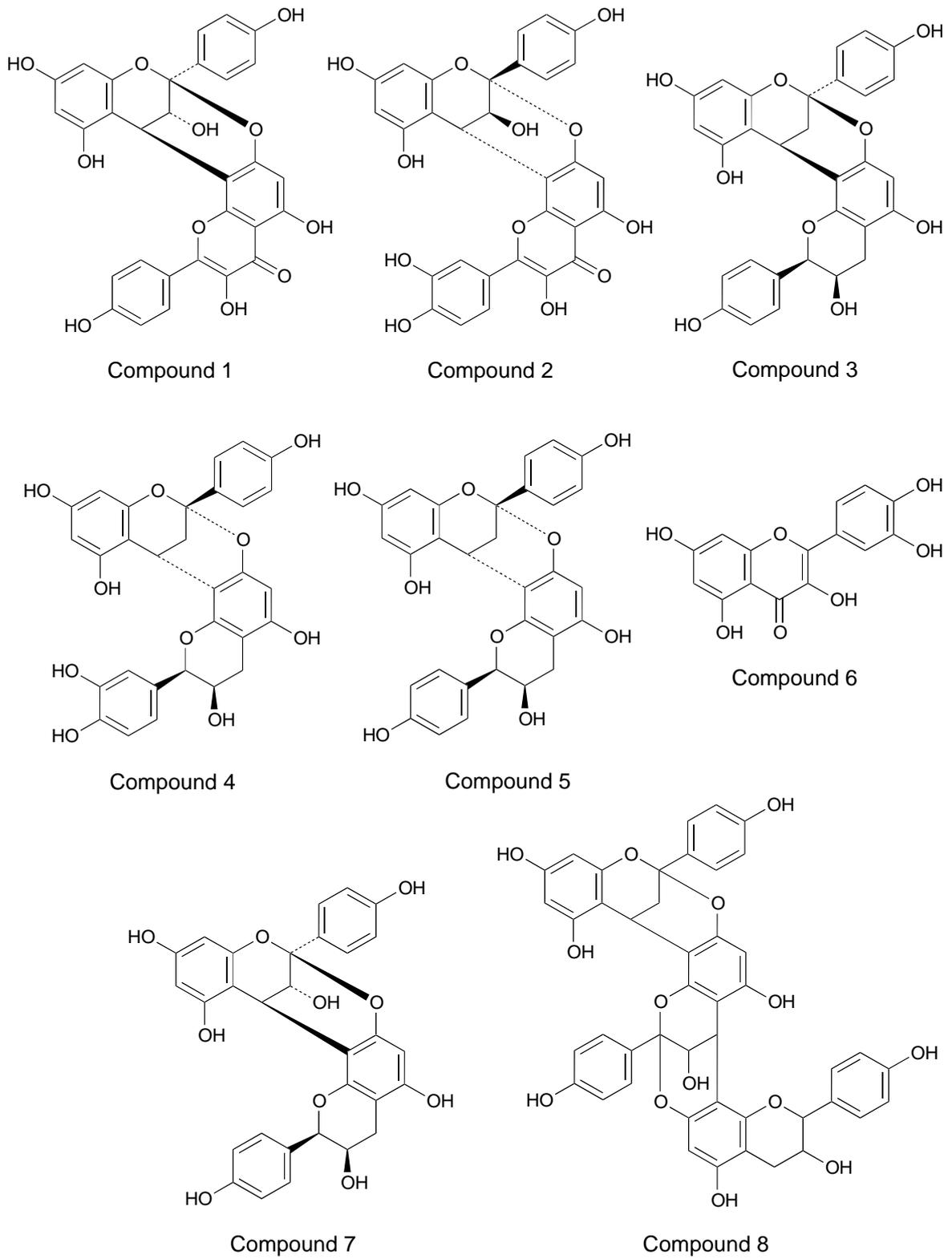


図7．化合物1～8の構造

Anatomical, Chemical, and Molecular Genetic Studies of *Ephedra distachya*

Siran NI^a, Masashi MATSUMOTO^a, Yui SHIMOYAMA^b, Nathalie ALLAIN^c,
Maksut COŞKUN^d, Turgut YILMAZ^d and Masayuki MIKAGE^{a,*}

^aGraduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University,
Kakuma, Kanazawa, 920-1192 JAPAN;

^bSchool of Pharmacy, College of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa
University, Kakuma, Kanazawa, 920-1192 JAPAN;

^cMuséum National d'Histoire Naturelle, Paris, FRANCE;

^dFaculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, TURKEY

*Corresponding author: mikage@ip.kanazawa-u.ac.jp

(Accepted on January 12, 2013)

Ephedrae Herba (ma-huang in Chinese), the herbal stems of *Ephedra sinica* Stapf, which belongs to the Ephedraceae family, is an important crude drug in traditional Chinese medicine. Some researchers think that this species is identical to *E. distachya* L., which mainly grows in Europe. Thus, in this study, we carried out anatomical, chemical, and molecular genetic studies on *E. distachya* plants collected in Switzerland, France, and Turkey to consider whether *E. distachya* could be used to produce Ephedrae Herba. As a result, we found that the morphology of the subepidermal fiber bundles in cross sections of the herbal stems of *E. distachya* and the frequencies of ephedrine alkaloids in *E. distachya* were quite different from those observed in *E. sinica* and that the DNA sequence of the ITS1 region of *E. distachya* contains 11 base changes compared with that of *E. sinica*. Based on these facts, we concluded that *E. distachya* and *E. sinica* should be treated as different taxa and that, according to the prescriptions of the current Japanese and Chinese pharmacopoeias, *E. distachya* is not suitable for producing Ephedrae Herba.

Key words: alkaloid, anatomical study, *Ephedra distachya*, Ephedrae Herba, ITS1.

The genus *Ephedra*, which belongs to the Ephedraceae family, one of the three extant genera of the Gnetales, comprises about 50 species, which are native to arid and semiarid regions of Eurasia, northern Africa, western North America, and South America (Price 1996). Most species of this genus are erect or sprawling shrubs, except for a few species of vine-like climbing shrubs or small trees. Since ancient times, the aerial parts of *Ephedra* plants have been used for treating colds, coughs, bronchitis,

etc. in traditional Japanese medicine (Kampo) and traditional Chinese medicine (TCM) (Tang 2002), under the name ma-huang (Ephedrae Herba). The ephedrine group alkaloids contained in Ephedrae Herba are considered to be active constituents and have been used as bronchodilators or decongestants against asthma or colds in Western medicine.

Ephedra sinica Stapf, one of three plant sources of Ephedrae Herba prescribed in both the Japanese and Chinese Pharmacopoeias, was

denominated in 1927 on the basis of a specimen collected in Hebei Province (Stapf 1927). This species is distributed from central China (Gansu province) and Mongolia, eastward up to the Gulf of Bohai (Hebei province) and the northeast of China (Jilin province) (Cheng 1978, Fu et al. 1999). Due to its relative abundance in nature, *E. sinica* dominates the crude drug market in China (Hong et al. 2011a). However, the export of Ephedrae Herba has been restricted in order to conserve natural ephedra resources and prevent desertification since 1999. Considering the continued use of Ephedrae Herba, substitutes for *E. sinica* should be sought.

Ephedra distachya L. was the first candidate that we considered might be a useful substitute for *E. sinica* because some researchers think that it is identical to *E. sinica*. *Ephedra distachya* was denominated in 1753 by Linnaeus and is widely distributed from Europe to west central Asia (Linnaeus 1753). *Ephedra distachya* subsp. *helvetica* (C. A. Mey.) Asch. & Graebn. was found in the dry Rhône valley in the Swiss Alps and was recorded as a variety of *E. distachya*, based on its slightly longer and twisted micropylar tubes. In morphology-based studies of plant taxonomy, it has been suggested that *E. sinica* and *E. distachya* subsp. *distachya* are conspecific as they both possess fleshy 2-seeded female cones and have rather short micropylar tubes (Kitagawa 1939, Yang 2002), whereas others have indicated that they can be distinguished by the size of the opening at the tips of their micropylar tubes and the shape of the free parts of their leaves (Cheng 1978, Fu et al. 1999). Recent molecular studies have shown that *E. distachya* subsp. *distachya* and *E. sinica* belong to the same clade but different subclades (Ickert-Bond and Wojciechowski 2004, Huang et al. 2005, Rydin and Korall 2009, Kakiuchi et al. 2011). However, because plants of the Genus *Ephedra* are polyphyletic, some species such as *E. przewalskii* Stapf and *E. intermedia* Schrenk & C. A. Mey., whose cone bracts and micropylar tubes are morphologically different from those

of *E. sinica* and *E. distachya*, remained nested together with the latter species after molecular analysis (Ickert-Bond and Wojciechowski 2004, Rydin and Korall 2009, Kakiuchi et al. 2011). Moreover, *E. intermedia* can be easily distinguished by its long and spiral micropylar tube, but different accession samples of the species have been placed in different clades (Kakiuchi et al. 2011). Considering these conflicting results, it is not suitable to separate *E. sinica* from *E. distachya* (subsp. *distachya*) using molecular data alone.

Besides molecular studies, attempts have been made to discriminate between *Ephedra* species using the anatomical characteristics of their stems (Chen 1989, Zhang 1989b, Fushimi 2008) or their ephedrine contents (Liu 1993, Hong 2011b) and have succeeded in identifying some *Ephedra* plants from China. However, no samples of *E. distachya* subsp. *distachya* from Europe have been subjected to studies of these two features. Thus, in the present study, anatomical, phytochemical, and molecular assessments were carried out on samples of *E. distachya* subsp. *distachya* and *E. distachya* subsp. *helvetica* collected from France, Switzerland, and Turkey, and the results were compared with those for *E. sinica*. Our intention is to clarify whether *E. distachya* and *E. sinica* are the same species and investigate the possibility of using *E. distachya* as a substitute for *E. sinica* in Chinese medicine.

Materials

Ephedra distachya subsp. *distachya* plant materials were collected in France in 2011 and in Turkey in 2009 and 2012, and *E. distachya* subsp. *helvetica* plant materials were collected in Switzerland in 2008. Each field study was performed in July or August, the seed-maturing season. All the plant specimens were collected by M. Mikage or M. Mikage & al., and were deposited in the Herbarium of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University (KANP), Japan.

1. *Ephedra distachya* subsp. *distachya*

France. Saint-Jean de Védas (Hérault), open hill slope, 9 km southwest of Montpellier, 43°33'03.3" N, 3°49'24.1" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109171); Etang du Ponant, Le Boucanet, Le Grau-du-Roi (Gard), sandy shore of a lake, 20 km southeast of Montpellier, 43°33'31.4" N, 4°07'17.9" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109172); Etang du Ponant, Le Boucanet, Le Grau-du-Roi (Gard), sandy shore of a lake, 20 km southeast of Montpellier, 43°33'42.4" N, 4°07'04.8" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109173); Le Grand Travers, between Carnon and La Grande-Motte (Hérault), a sandy beach bordering the Mediterranean Sea, northern side of road D59, 13 km southeast of Montpellier, 43°33'20.3" N, 4°01'03.2" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109174); Le Grand Travers, between Carnon and La Grande-Motte (Hérault), sandy beach bordering the Mediterranean Sea, northern side of road D59, 13 km southeast of Montpellier, 43°33'23.2" N, 4°01'16.1" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109175); Les Aresquiers, Vic-la-Gardiole (Hérault), sandy shore, between Mediterranean and Etang de Pierre Blanche, 16 km southwest of Montpellier, 43°28'51.2" N, 3°50'37.5" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109176); north of Etang de Pissevaches, Cabanes de Fleury, Fleury-d'Aude (Aude), west of a naturist resort, 1.2 km inland from the beach, 15 km south of Beziers, 43°12'29.1" N, 3°12'41.3" E, alt. 5 m (18 Sep. 2011, 1109181); Réserve Naturelle du Mas Larrieu, Argelès-sur-Mer (Pyrénées-Orientales), near the beach and south of the Le Tech river, 18 km southeast of Perpignan, 42°35'15.6" N, 3°02'37.9" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109191); between Saint-Cyprien et Canet (Pyrénées-Orientales), sandy coastal land near the southern end of Lake Canet-St-Nazaire, 14 km southeast of Perpignan, 42°38'31.1" N, 3°02'13.7" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109192); between Saint-Cyprien et Canet (Pyrénées-Orientales), near the baraques de pêcheurs, eastern side of Lake Canet-St-Nazaire, 13 km southeast of Perpignan, 42°39'37.7" N, 3°02'07.3" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109193); Torrelles (Pyrénées-Orientales), sandy beach, south of Torrelles Plage, 15 km northeast of Perpignan, 42°45'26.9" N, 3°02'26.5" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109194); Torrelles (Pyrénées-Orientales), sandy beach near the mouth of the River L'Agry, 16 km northeast of Perpignan, 42°46'40.0" N, 3°02'27.7" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109195); Port Barcarès (Pyrénées-Orientales), sandy land along the Mediterranean coast, near Mas de l'illa, 20 km northeast of Perpignan, 42°48'48.6" N, 3°48'26.5" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109196); Les Coussoules, La Franqui (Aude), sandy land near a camping ground, north of Leucate, 30 km north of Perpignan, 42°56'45.0" N, 3°02'09.6" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109197); Les Coussoules, La Franqui (Aude), edge of the tideland near a camping ground, north of Leucate, 30 km north of Perpignan, 42°56'57.2" N, 3°20'09.6" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109198).

Turkey. B5 Kayseri, Yilanli Mountain, Sallibayir,

Kulakli Baglari, alt. 1170 m (07 Jul. 2009, 09070701); Kayseri, 38°42'52" N, 35°26'04" E, alt. 1170 m (29 Jun. 2012, U62911).

2. *Ephedra distachya* subsp. *helvetica*

Switzerland. Sion. The slope around Sion castle, 46°13'40" N, 7°21'41" E, alt. 700 m (08 Aug. 2008, 0808S1; 0808S2; 0808S3); the back of Sion castle, 46°13'40" N, 7°21'41" E, alt. 700 m (08 Aug. 2008, 0808S5-1; 0808S5-2; 0808S6-1; 0808S6-2).

3. *Ephedra sinica*

China. Inner Mongolia. Chagannaer, 60 km south of Sonid Zuoqi, grassland, 43°24'49.2" N, 113°05'04.6" E, alt. 1030 m (16 Aug. 2007, 7081605); 10 km from Bayachagan, Abagaqi, grassland, 43°59'30.4" N, 115°06'57.0" E, alt. 1200 m (17 Aug. 2007, 7081706); along Axi Highway marker 75, Dongwujimqin, grassland, 44°33'34.1" N, 115°53'32.2" E, alt. 1060 m (18 Aug. 2007, 7081803); along road 304 marker 510, 340km south of Tongliao, 43°19'53.7" N, 122°13'33.2" E, alt. 240 m (21 Aug. 2007, 7082102). **Liaoning Province.** Along road 304, Zhangwu County, beside the railway, 42°46'20.8" N, 122°26'10.8" E, alt. 255 m (21 Aug. 2007, 7082104). **Hebei Province.** Seashore, near the mouth of the Nandaihe river, 39°47'57.1" N, 119°26'11.8" E, alt. 2 m (22 Aug. 2007, 070822A01; 070822A02; 070822A03).

Methods

Anatomy

Transverse sections of internodes or herbal stems were examined using an optical microscope without treatment or after clarification with chloral hydrate solution. Three stems with one to six secondary xylem cell layers between their vascular bundles were chosen from each of the specimens to ensure that the experimental stems displayed uniform maturity. The following parameters were examined: the longitudinal and transverse lengths of the herbal stem and cambium ring; the presence of cuticular protuberances; and the numbers of subepidermal, cortical, and pith fibers. Moreover, the ratio of subepidermal fiber bundle length to cortex length was calculated for the 5 longest subepidermal fiber bundles in each stem. We also measured the angle between the two long edges of the subepidermal fiber bundle, as shown in Fig. 1A. This value was considered

to be negative if the lines extrapolated from the two long edges intersected on the epidermal side.

Analysis of alkaloid content

Sample preparation for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

First, 0.1 g powdered samples, which had been dried at 105°C for 15 h, were suspended in 5.0 mL of the mobile phase and then left at room temperature for 20 min, after which sonication extraction was performed for 20 min. After being centrifuged at 3000 r/min for 15 min, the supernatant solution was filtered through a membrane filter (pore size: 0.45 µm) into a HPLC vial, which was then capped.

HPLC conditions

The analysis was performed using a Hitachi Elite LaChrom HPLC system, consisting of an L-2130 pump, an L-2200 auto sampler, and an L-2400 UV detector. An ODS column was used as the analytical column (4.6 mm, 250 mm). The mobile phase consisted of 195 mL CH₃CN, 305 mL H₂O, 0.4 mL H₃PO₄, and 2.4 g sodium dodecyl sulfate. The flow rate was 1.0 mL/min, the sample injection volume was 10 µL, and the detector monitored the eluent at 210 nm.

DNA preparation, PCR amplification and Sequencing

Dried twigs were cut into pieces, frozen in liquid nitrogen, and ground into a powder. Using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), DNA was extracted according to the manufacturer's protocol. The primer sets for Eph-1F (GAC GTC GCG AGA AGT TCA TT) and 5.8S-R (CGG GAT TCT GCA ATT CAC AC) designed by Kakiuchi were used to amplify the ITS1 region. Standard PCR was carried out in a 25 µL reaction mixture containing 2.5 µL of 10× PCR buffer for KOD-Plus, 0.2 mM of each dNTP, 1 mM MgSO₄, 0.4 M of each primer, approximately 100 ng of the DNA sample, and 0.5 units of KOD-Plus DNA polymerase (Toyobo). The cycling parameters used for the

PCR were as follows: 94°C for 2 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 15 s, annealing at 55°C for 30 s, and elongation at 68°C for 45 s; and a final elongation step at 68°C for 5 min. Three microliters of the PCR product were used for agarose gel electrophoresis, and the remaining product was purified using the QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen).

The purified PCR products were sequenced using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Result and Discussion

Microscopic characteristics of the herbal stems

1. *Ephedra distachya* subsp. *distachya*

Generally, the transverse sections were circular or elliptical in shape, and there were many ridges and furrows on their surfaces. Cuticular tubers were observed on the ridges, and stomata with guard cells were located within the furrows. The epidermal cells were arranged compactly and were covered with a thick cuticle. Below the surface, ridges composed of fiber bundles with rectangular shapes (Fig. 1B, C) were in contact with the epidermis. In the samples from France, the longest 5 of these subepidermal fiber bundles were 149.44 ± 22.87 µm in length and accounted for $42 \pm 6\%$ of the cortex, whereas those of the samples from Turkey measured 165.78 ± 26.28 µm in length and accounted for $50 \pm 7\%$ of the cortex (Table 1, Fig. 1B, C). The cortex mainly consisted of parenchyma cells, including radially elongated palisade cells in the outer cortex and circular cells in the inner cortex. Many fibers or small groups of fibers with irregular shapes were scattered throughout the cortex, and the samples from France contained many more of these fibers than the samples from Turkey (Table 1, Fig. 1B, C). The individual collateral vascular bundles were triangular and arranged in a ring, and their phloem bundles were usually capped by fibers. The pith consisted of large parenchyma cells, most of which were circular and were frequently

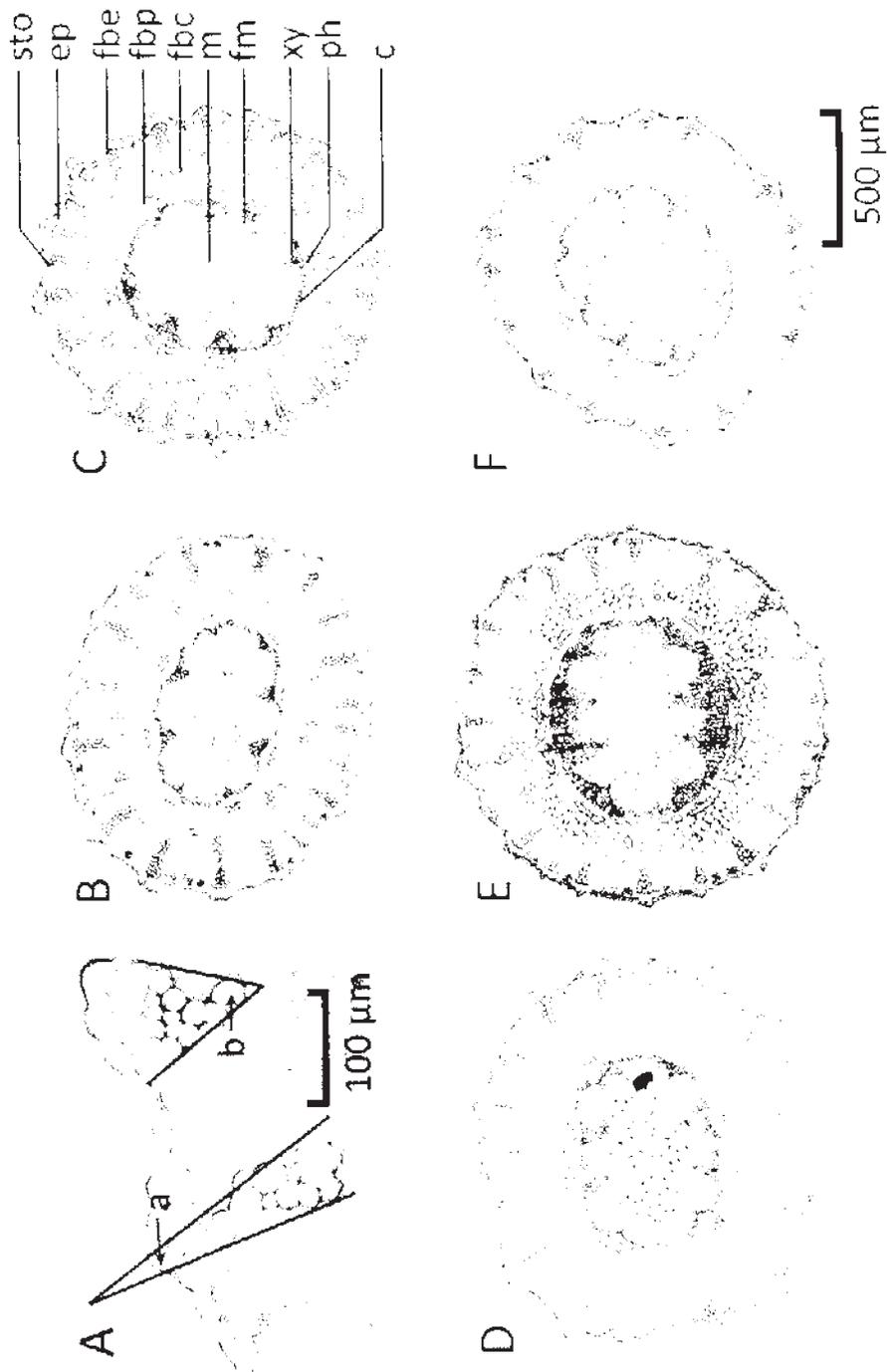


Fig. 1. Transverse section of herbarial stems of *Epilobium distachya* and *E. sinica*. A. Angle of tip of subepidermal bundle fiber. a. Negative value. b. Positive value. B, C. *E. distachya* subsp. *distachya*. B. 1109173 (France). C. 09070701 (Turkey). D, E. *E. distachya* subsp. *heucherica*. D. No fiber existed in the pith (080855-2). E. Fibers existed in the pith (080856-2). F. *E. sinica* (7081706). Abbreviations: c, cambium; ep, epidermis; fbc, fiber bundle in the cortex; fbe, subepidermal fiber bundles; fbp, fiber bundle of the vascular bundle sheath; fm, fiber in pith; m, pith; plt, pithloem; sto, stomat; xy, xylem.

Table 1. Anatomical characteristics of transverse sections of herbal stems of *Ephedra sinica* and *E. distachya*

	<i>E. distachya</i> sp. <i>distachya</i> (France)	<i>E. distachya</i> sp. <i>distachya</i> (Turkey)	<i>E. distachya</i> sp. <i>helvetica</i>	<i>E. sinica</i>
Shape of transverse sections	circular, elliptical	elliptical, triangular	circular, elliptical	elliptical, circular ^{a)} , triangular ^{a)}
Longitudinal length of herbal stem (mm)	1.21–1.95 (1.53 ± 0.16) ^{b)}	1.32–1.73 (1.50 ± 0.16)	1.17–1.67 (1.41 ± 0.15)	1.27–1.74 (1.46 ± 0.14)
Transverse length of herbal stem (mm)	1.08–1.80 (1.44 ± 0.16)	1.14–1.55 (1.34 ± 0.15)	1.17–1.59 (1.33 ± 0.13)	1.14–1.53 (1.27 ± 0.11)
Longitudinal length of cambium ring (mm)	0.47–0.95 (0.68 ± 0.12)	0.58–0.91 (0.75 ± 0.12)	0.47–0.85 (0.67 ± 0.11)	0.68–1.10 (0.82 ± 0.11)
Transverse length of cambium ring (mm)	0.39–0.81 (0.55 ± 0.12)	0.45–0.70 (0.60 ± 0.09)	0.35–0.72 (0.54 ± 0.11)	0.50–0.77 (1.41 ± 0.08)
Existence of cuticular protuberances	present	present	present	present
Number of subepidermal fiber bundles	15–30 (20.23 ± 3.51)	19–31 (23.17 ± 4.79)	15–24 (20.37 ± 2.67)	14–28 (19.96 ± 3.22)
Number of fiber bundles in the cortex	10–92 (41.68 ± 13.79)	12–43 (27.50 ± 14.54)	1–19 (6.53 ± 5.54)	0–48 (9.50 ± 12.00)
Number of parenchyma cell layers in the cortex	4–7	5–7	4–5	5–6
Number of palisade cell layers	2–3	2–3	2–3	2–3
Number of fibers in the pith	8–137 (49.08 ± 30.47)	0	0–25 (8.53 ± 8.56)	0–9 (1.29 ± 2.77)
Mean length of subepidermal fiber bundles (longest 5 stems, μm)	92.06–243.68 (149.44 ± 22.87)	109.36–213.16 (165.78 ± 26.28)	61.52–188.77 (127.92 ± 29.39)	62.03–153.55 (95.90 ± 12.99)
Ratio of subepidermal fiber bundle length to cortex length (longest 5 stems)	0.25–0.65 (0.42 ± 0.06)	0.36–0.68 (0.50 ± 0.07)	0.21–0.63 (0.40 ± 0.07)	0.21–0.46 (0.34 ± 0.04)
Mean angle of the subepidermal fiber bundle tip (longest 5 stems, °)	–17.4–40.7 (11.3 ± 4.3)	5.4–30.3 (16.4 ± 2.4)	–1.4–50.8 (16.1 ± 6.0)	4.8–72.8 (33.0 ± 8.2)

^{a)} *: unusual finding.^{b)} (MEAN ± S.D.).

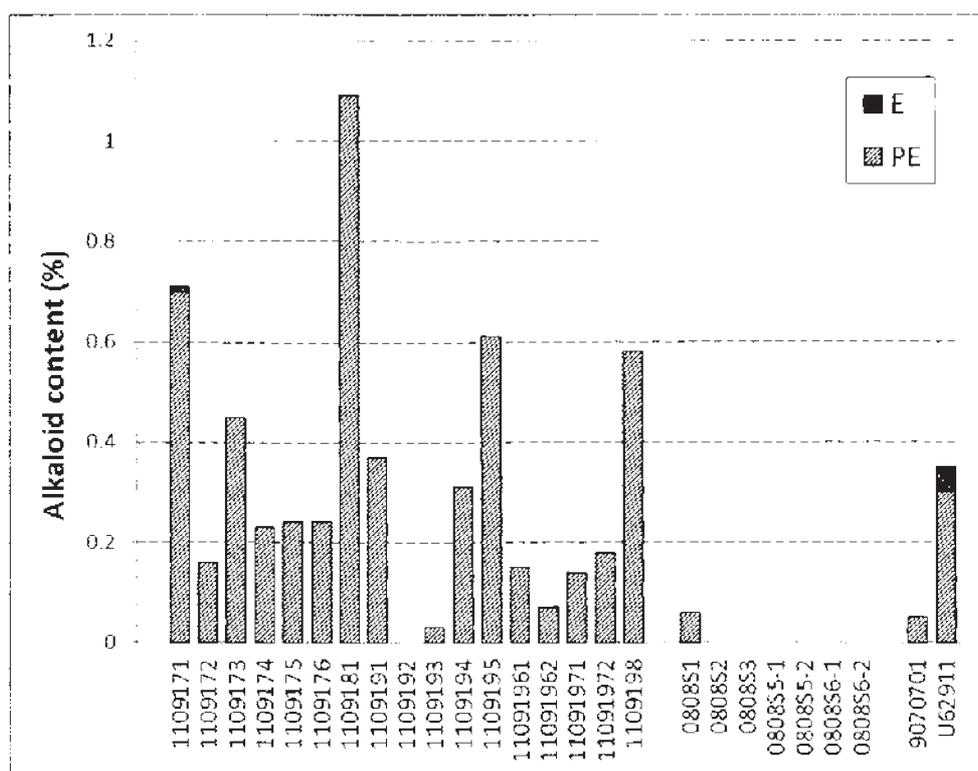


Fig. 2. Ephedrine and pseudoephedrine contents of *Ephedra distachya*. E, Ephedrine, PE, Pseudoephedrine.

filled with brown matter. Large numbers of fibers were observed in the pith of the samples from France, but no fibers were observed in the pith of the samples from Turkey (Table 1).

The anatomical characteristics of transverse sections of this species' herbal stems have been described previously using samples from China, but the results reported by these studies regarding the length and shape of the subepidermal fiber bundles were different from ours (Konoshima 1945b, Xu et al. 1992). Conversely, other studies have reported that *E. distachya* subsp. *distachya* samples collected from Inner Mongolia and Qinghai Province, China, belonged to the same species as *E. sinica* (Fushimi 2008), and another study could not confirm whether samples identified as *E. distachya* from Xinjiang Province, China, belonged to the same species as those from Europe (Fu et al. 1999).

2. *Ephedra distachya* subsp. *helvetica*

The anatomical characteristics of *E. distachya* subsp. *helvetica* were similar to those of *E. distachya* subsp. *distachya* (Fig. 1). However, 3 samples (0808S1, 0808S5-1, 2) contained less than 5 cortex fibers, and 2 of these samples (0808S1, 0808S5-1) contained no fibers in their pith (Fig. 1D). Other samples had more fibers in their cortex and pith (Fig. 1E). Thus, there was a great deal of variation in the findings for *E. distachya* subsp. *helvetica* (Table 1).

3. *Ephedra sinica*

The anatomical characteristics of *E. sinica* have been reported previously (Kimura 1930, Konoshima 1945a, Zhang 1989b, Fushimi 2008), and their results were in agreement with ours. Compared with *E. distachya* and *E. distachya* subsp. *helvetica*, *E. sinica* had shorter subepidermal fiber bundles (Table 1), which were almost trapezoidal in shape (Fig. 1F). Moreover, fewer fibers were observed in the

Table 2. Mutations in the ITS1 region of *Ephedra distachya* and its related species

	Nucleotide sequence of the ITS1 region														
	80	223	403	645	762	774	810	894	899	910	914	915	1023	1131	1134
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (GU 065272)	C	G	—	C	T	G	A	C	T	C	A	G	C	Y	T
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (France) 1109173, 1109176	*	*	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (France) 1109191	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (France) 12 samples	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (Turkey) 2 samples	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. distachya</i> ssp. <i>helvetica</i> (Switzerland) 6 samples	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. sinica</i> (AY 394071)	*	*	A	A	C	T	C	*	C	A	G	T	A	C	C

s: same as the top sequence. —: gap, Y: C or T, S: C or G.

cortex and pith of *E. sinica* than in those of the *E. distachya* samples collected in France (Table 1, Fig. 1F).

Ephedrine alkaloid content (Fig. 2)

1. *Ephedra distachya* subsp. *distachya*

There were no significant differences in the total amount of ephedrine alkaloids (ephedrine and pseudoephedrine) between the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France (mean: $0.36 \pm 0.29\%$) and Turkey (mean: $0.17 \pm 0.17\%$). We also noticed that the ephedrine levels of all of the samples were so low that they could hardly be quantified. Moreover, only 3 of 21 samples met the requirements of the Japanese Pharmacopoeia (more than 0.7%), which suggests that *E. distachya* subsp. *distachya* does not have potential as a source of Ephedrae Herba.

However, two previous studies have reported that *E. distachya* subsp. *distachya* contained more ephedrine than pseudoephedrine (Moriyasu 1984, Kajimura 1994), which was contrary to our results. We noticed that the plant materials they used were cultivated in the Botanical Garden of Gifu College of Pharmacy and the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Osaka University, respectively. However, they did not provide clear information about the provenance of their cultivated plants, so the differing results might have been due to the samples having different origins. It was reported that the alkaloid content of *Ephedra* plants was influenced by the area in which they grew (Zhang 1989a) and soil alkalinity (Kondo 1999), so we consider that the samples being grown in different environments is a reasonable explanation for the differences between their and our alkaloid content results, especially considering that Japan is not the natural habitat of *E. distachya* subsp. *distachya*.

2. *Ephedra distachya* subsp. *helvetica*

Only one of the *Ephedra distachya* subsp. *helvetica* seven samples had their ephedrine alkaloid contents quantified, so we were not able

to reach any conclusion about the ephedrine/pseudoephedrine (E/PE) ratio. In addition, in the sample that was tested only pseudoephedrine was detected. Thus, like *E. distachya* subsp. *distachya*, *Ephedra distachya* subsp. *helvetica* could not be used as a source of Ephedrae Herba.

Nucleotide variations in the ITS1 regions of Ephedra distachya and E. sinica (Table 2)

Among 19 accession samples of *E. distachya* from France, two accession samples (1109173, 1109176) displayed substitutions at position 894, and 1 accession sample (1109191) had a substitution at position 80, whereas the other accession samples displayed identical ITS1 regions as the accession sample reported in a previous study (Kakiuchi et al. 2011). The specimens from Turkey displayed the same sequences as the *E. distachya* subsp. *helvetica* samples from Switzerland, whose ITS1 regions differed from those of the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France due to a substitution at position 223. In contrast to the accession samples of *E. distachya*, whose ITS1 region sequences were reasonably similar, *E. sinica* was found to display about 12 nucleotide differences compared with the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France, including a nucleotide insertion at position 403. Besides these 12 nucleotide differences, *E. sinica* differed from the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from Turkey and *E. distachya* subsp. *helvetica* at position 223, whereas it displayed an identical sequence to the *E. distachya* samples from France.

Comparisons between Ephedra distachya and E. sinica

Microscopic characteristics

We first tried to discriminate between *E. distachya* and *E. sinica* according to the numbers of fibers in the cortex and pith because these features have often been used by researchers to identify the official origins of Ephedrae

Herba including *E. sinica* (Konoshima 1945a, 1945b, Zhang 1989b, Xu et al. 1992, Fushimi 2008). Although some values overlapped, the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France could be separated from *E. sinica* using these parameters ($P < 0.001$), as well as from the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from Turkey ($P < 0.001$) and the *E. distachya* subsp. *helvetica* samples from Switzerland ($P < 0.001$). However, the other samples could not be distinguished from each other according to the morphology of the fibers in their cortex or pith.

On the other hand, we noticed that the subepidermal fibers of the *E. distachya* and *E. sinica* samples displayed different morphologies. Statistical analysis showed that the mean length of the longest 5 subepidermal fiber bundles in *E. distachya* was longer than that in *E. sinica* (*E. distachya* subsp. *distachya*: $P < 0.001$; *E. distachya* subsp. *helvetica*: $P < 0.001$). As subepidermal fiber bundles might be longer in places where the cortex is wider, we also calculated the ratio of the length of subepidermal fiber bundles to the length of the corresponding cortex. The results confirmed that *E. distachya* has longer subepidermal fiber bundles than *E. sinica* (*E. distachya* subsp. *distachya*: $P < 0.001$; *E. distachya* subsp. *helvetica*: $P < 0.001$). We examined the mean angle of the tip of the longest 5 subepidermal fiber bundles as another parameter of subepidermal fiber morphology and found that *E. distachya* displayed smaller angles than *E. sinica* (*E. distachya* subsp. *distachya*: $P < 0.001$; *E. distachya* subsp. *helvetica*: $P < 0.001$), and it was indicated that the subepidermal fiber bundles of these two species are rectangular. Thus, we conclude that *E. distachya* can be morphologically distinguished from *E. sinica* using this feature.

Ephedrine alkaloid content and DNA sequence of ITS1 region

In chemical analysis, we found that the alkaloid content of *E. distachya* was much lower than the values reported for *E. sinica* by

us (Wang 2010) and other researchers (Hong 2011b), although the ranges of the two species overlapped a little. Moreover, *E. distachya* hardly contained any ephedrine. In contrast, we previously found that *E. sinica* normally contains more ephedrine than pseudoephedrine (Wang 2010), while a recent report also found that the F/PE ratio of *E. sinica* was greater than 0.7 (Hong 2011b). Therefore, we concluded that *E. distachya* is phytochemically different from *E. sinica*.

At the same time, both our molecular phylogenetic results and those reported previously (Ickert-Bond and Wojciechowski 2004, Huang et al. 2005, Rydin and Korall 2009, Kakiuchi et al. 2011) showed that *E. distachya* possesses a different ITS1 region from *E. sinica*.

Comparisons between Ephedra distachya subsp. distachya and E. distachya subsp. helvetica
Microscopic characteristics

The *Ephedra distachya* subsp. *distachya* samples from France could be easily distinguished from *E. distachya* subsp. *helvetica* according to the morphology of the fiber bundles in their cortex ($P < 0.001$) and pith ($P < 0.001$). The length ($P < 0.001$) and angle ($P < 0.01$) of the subepidermal fiber bundles of these two species were also found to differ. It was difficult to determine the botanical characteristics of the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from Turkey because only two samples were studied, but generally they did not display any significant difference from *E. distachya* subsp. *helvetica* with regard to the morphology of the fiber bundles in their cortex or pith; however, they did have significantly longer subepidermal fibers than the *E. distachya* subsp. *distachya* ($P < 0.001$) samples from France and *E. distachya* subsp. *helvetica* ($P < 0.001$). Thus, we concluded that these longer subepidermal fiber bundles can be used to differentiate between *E. distachya* subsp. *distachya* and *E. distachya* subsp. *helvetica*. It was unclear why the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France had many

more fiber bundles in their cortex and pith than those from Turkey, although we consider that environmental differences might have played a role as the plants from France grew on a sandy seashore while those from Turkey grew in the clay soil at the foot of a mountain.

Ephedrine alkaloid content and the DNA sequence of the ITS1 region

Chemical analysis showed that *E. distachya* subsp. *helvetica* hardly contained any alkaloids, which was different from *E. distachya* subsp. *distachya*. In addition, a molecular phylogenetic study showed that these two species possessed no more than two nucleotide variations in their ITS1 regions.

Conclusion

We concluded that *Ephedra distachya* and *E. sinica* differ to some extent, based on the differences in the shapes of their subepidermal fiber bundles, their L/PE ratios, and their ITS1 region sequences. Thus, we suggest that these two species represent different taxa although they are morphologically similar.

This study is supported by a Grant-in-Aid from the Japan Society for the Promotion of Science (No. 20255005 to M. Mikage).

References

- Chen H. L., Qiu Z. Y. and Zhao L. Y. 1989. Anatomical Identification of Ma-huang. *J. Chin. Med. Mat.* **12**(3): 24–26 (in Chinese).
- Cheng C. Y. 1978. *Ephedra sinica* Stapf. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* tomus 7: 477–478. Science Press, Beijing (in Chinese).
- Fu L. G., Yu Y. F. and Riedl H. 1999. *Ephedra sinica* Stapf. *Flora of China* 4: 99–100. Science Press, Beijing & St. Louis, Missouri Botanical Garden.
- Fushimi N., Wang L., Ebisui S., Cai S. and Mikage M. 2008. Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 4. Morphological differences between *Ephedra sinica* Stapf and *E. intermedia* Schrenk & C. A. Meyer, and the botanical origin of Ma-huang produced in Qinghai Province. *J. Trad. Med.* **25**(3): 61–66.
- Huang J., Giannasi D. E. and Price R. A. 2005. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (*Ephedraceae*) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* **35**: 48–59.
- Hong H., Chen H. B., Xu F., Zang X. Y., Yang D. H., Wang X., Cai S. Q. and Mikage M. 2011a. Surveys on resources and varieties on Chinese markets of crude drug Mahuang. *China J. Chin. Mat. Med.* **9**: 1129–1132 (in Chinese).
- Hong H., Chen H. B., Yang D. H., Shang M. Y., Wang X., Cai S. Q. and Mikage M. 2011b. Comparison of contents of five ephedrine alkaloids in three official origins of Ephedra Herb in China by high-performance liquid chromatography. *J. Nat. Med.* **65**: 623–628.
- Ickert-Bond S. M. and Wojciechowski M. F. 2004. Phylogenetic Relationships in *Ephedra* (*Gnetales*): Evidence from nuclear and chloroplast DNA sequence Data. *Syst. Bot.* **29**(4): 834–849.
- Kajimura K., Iwamoto Y., Yamasaki K., Sakagami Y., Yokoyama H. and Yoneda K. 1994. Variation of growth and contents of ephedrine type alkaloids in *Ephedra distachya*. *Nat. Med.* **48**(2): 122–125 (in Japanese).
- Kakiuchi N., Mikage M., Ickert-Bond S., Maier Stolte M. and Freitag, H. 2011. A molecular phylogenetic study of the *Ephedra distachya*/*E. sinica* complex in Eurasia. *Willdenowia* **41**: 203–215.
- Kimura K. and Takata J. 1930. A pharmacognostical study on “Ma-wō” or “Ma Huang” and “Ma-wō-kon” or “Ma Huang Hōn”. *Chinese drugs. (Anatomies of Ephedra sinica* Stapf. and *E. foliata* Boiss. *Gnetaceae*). *Yakugaku Zasshi* **50**: 563–572 (in Japanese).
- Kitagawa M. 1939. *Lineamenta Florae Manchuricae*. Report of the Institute of Scientific Research, Manchoukuo vol. 3, append I: 49. Institute of Scientific Research, Manchoukuo.
- Kondo N., Mikage M. and Idaka K. 1999. Medicobotanical studies of Ephedra plants from Himalayan region Part III. The causative factors of variation of alkaloid content in herbal stem. *J. Nat. Med.* **53**(4): 194–200.
- Konoshima M. 1945a. Pharmacognostic studies on the crude drug Mahuang. III. Herbaceous *Ephedra* of northern China, Mongolia, and Manchuria. (2). *Yakugaku Zasshi* **65**: 482–489 (in Japanese).
- Konoshima M. 1945b. Pharmacognostic studies on the crude drug Mahuang. IV. Herbaceous *Ephedra* of northern China, Mongolia, and Manchuria. (2). *Yakugaku Zasshi* **65**: 490–496 (in Japanese).
- Linnaeus C. 1753. *Ephedra distachya* Linnaeus. *Sp. Pl.* **2**: 1040.
- Liu Y. M., Sheu S. J., Chiou S. H., Chang H. C. and Chen Y. P. 1993. A comparative study of commercial samples of Ephedrae Herba. *Planta Med.* **59**: 376–378.
- Moriyasu M., Endo M., Kanazawa R., Hashimoto Y., Kato A. and Mizuno M. 1984. High-performance liquid chromatographic determination of organic substances by metal chelate derivatization III. Analysis of Ephedra bases. *Chem. Pharm. Bull.* **32**(2): 744–747.

- Price R. A. 1996. Systematics of the *Gnetales*: A review of morphological and molecular evidence. *Int. J. Pl. Sci.* **157**: S40–S49.
- Rydin C. and Korall P. 2009. Evolutionary relationships in *Ephedra* (*Gnetales*), with implications for seed plant phylogeny. *Int. J. Pl. Sci.* **170**: 1031–1043.
- Stapf O. 1927. Ma huang of China (*Ephedra sinica* Stapf). *Bull. Misc. Inf. Kew.* **3**: 133–134.
- Tang S. W. [ed. by Shang Z. J., based on the 12 century edition by Cheng A.] 2002. Ma-huang. *Daguan Bencao*: 265–266 (in Chinese).
- Wang L. L., Kakiuchi N. and Mikage M. 2010. Studies of Ephedra plants in Asia. Part 6: Geographical changes of anatomical features and alkaloids content of *Ephedra sinica*. *J. Nat. Med.* **64**(1): 63–69.
- Xu S. F., Lin X. H., Zhong Y. and Liu G. J. 1992. An identification study on tissues of several species of *Ephedra* in Xinjiang. *Acta Acad. Med. Xinjiang* **15**(4): 238–240 (in Chinese).
- Yang Y. 2002. Systematics and Evolution of *Ephedra* L. (*Ephedraceae*) from China: 22–26. Submitted to the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in the subject of Botany. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing (in Chinese).
- Zhang J. S., Li S. H. and Lou Z. C. 1989b. Morphological and histological studies of Chinese *Ephedra* Mahuang 1. Seven species produced in north China. *Acta Pharm. Sin.* **24**(12): 937–948 (in Chinese).
- Zhang J. S., Tian Z. and Lou Z. C. 1989a. Quality evaluation of twelve species of Chinese *Ephedra* (mahuang). *Acta Pharm. Sin.* **24**(11): 865–871 (in Chinese).

倪 斯然^a, 松本晋士^b, 下山裕依^b, N. Allain^c, M. Coşkun^d, T. Yilmaz^d, 御影雅幸^a: *Ephedra distachya* の組織学的, 化学的, 分子遺伝学的研究

マオウ科の *Ephedra sinica* Stapf の草質茎は、中国伝統医学で麻黄の名称で薬用にされる重要生薬である。本種はヨーロッパを中心に自生する *E. distachya* L. と同種であるとする説がある。そこで本研究では、*E. distachya* を麻黄として利用可能か否かを検討するため、スイス、フランス及びトルコで採集した株について、内部形態、含有アルカロイド、並びに DNA 塩基配列を検討した。その結果、本種は *E. sinica* とは、草質茎の横断面では表皮下繊維群の形、化学的にはエフェドリン類

アルカロイドの組成比が大きく異なり、また ITS1 領域の DNA 配列は約 11 塩基が異なっていた。以上の観点から、両種は別の分類群であると判断され、現在の日・中の薬局方に照らし合わせると、*E. distachya* は麻黄として利用できないと結論した。

^a 金沢大学大学院自然科学研究科,

^b 金沢大学医薬保健学域薬学類,

^c フランス・国立自然史博物館,

^d トルコ・アンカラ大学薬学部

マオウ属植物の栽培研究 (第2報) ¹⁾

海水がシナマオウの生長およびアルカロイド含量に及ぼす影響

大富規弘, 野村幸宏, 井出達也, 大野剛史, 毛利千香, 御影雅幸
金沢大学医薬保健研究域薬学系資源生薬学研究室

〒920-1192 石川県金沢市角間町

Studies of Cultivation of Ephedra Plants (part 2).

Effect of sea water on the growth and alkaloid content of *Ephedra sinica* Stapf

Norihiro Ohtomi, Yukihiko Nomura, Tatsuya Ide, Takeshi Ohno, Chika Mouri, and Masayuki Mikage*

Laboratory of Crude Drug and Herbal Medicines, Faculty of pharmaceutical Sciences, Kanazawa
University, Kakuma-machi, Kanazawa, 920-1192 Japan

2013年5月16日受付

Summary

Ephedra plants have salt tolerance to some degree. We reported the salt tolerance of ephedra in germination stage in the previous paper. In this study, we report the salt tolerance of ephedra in growing stage, comparing with some wild plants, and the effect of salt water on alkaloid content of ephedra. The result showed that the salt tolerance of *Ephedra sinica* Stapf was superior than *Amphicarpaea edgeworthii* Benth. and *Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* H.Hara (= *Aletrisia princeps* Pamp.), same as *Inperata cylindrica* Rausch., and less than *Chenopodium album* L. Moreover, the alkaloid content of herbal stem of ephedra intentionally increased by giving the artificial sea waters thinned to 1/16 once a week.

要 旨

マオウ属植物はある程度の耐塩性を有している。前報ではマオウ種子の発芽期における耐塩性を検討した。本研究では生長株の耐塩性を他の野生植物と比較検討するとともに、アルカロイド含量への影響を調査した。その結果、シナマオウの耐塩性はヤブマス、ヨモギに勝り、チガヤと同程度であり、シロザに劣っていた。また、16分の1希釈した人工海水を週1回間灌水することにより、アルカロイド含量が有意に増加することが明らかになった。

緒言

著者らの中国における *Ephedra* 属植物の自生地における現地調査の結果、[自局「麻黄」]の1基原植物である *Ephedra sinica* Stapf (= *E. dahurica* Turcz.) シナマオウは、野生地では土質を選ばず生育し、塩性地や海岸などにも生育する一方、背が高くなる雑草との生存競争に弱いことが明らかになっている¹⁾。中国では麻黄の栽培が行なわれているが、マオウ属植物は多年草で、同一場所で継続栽培されることから、他の一年生の農作物の場合には毎年耕作時に除草可能であるのに対して、除草に手間がかかる欠点がある。そこで、塩性地での栽培は除草の手間が少なくなる可能性があると考え、前報²⁾ではシナマオウの発芽期の耐塩性について検討し、アカミタンボボやレンゲソウなどの一般の植物や海岸の砂地で自生するカワラヨモギよりも高く、日本の海岸砂地に一般的に見られるハマダイコンなどと同等の耐塩性があることを報告した。また、塩性地で生育した *Ephedra* 属植物は、通常よりアルカロイド含量が高いという報告がある³⁾。そこで、本報では、発芽後の生育を他の一般植物と比較するとともに、塩分がアルカロイド含量に及ぼす影響について検討した結果を報告する。

【実験方法】

実験材料：発芽後4年目のシナマオウ及び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、薬草園）内に自生する4種の植物（キク科のコモギ、アカザ科のシロザ、イネ科のチガヤ及びマメ科のヤブマメ）を用いた。これらの4種の植物は、中国における麻黄栽培地において多く見られた有害雑草と同科あるいは同属植物種である⁴⁾。

人工海水の調製：塩化ナトリウム434.0g、

硫酸マグネシウム七水和物103.9g、塩化マグネシウム六水和物78.6g、塩化カルシウム二水和物22.4g及び塩化カリウム11.1gを薬草園の地下水に溶解して15 Lにし、人工海水とした。人工海水1/2、1/4、1/8及び1/16希釈液は上記電解質の量をそれぞれ1/2、1/4、1/8及び1/16にし、薬草園の地下水に溶解して15 Lとして調製した。

栽培容器と土壌：容器として1/2000aのワグネルポット、栽培土壌として川砂を用い、土壌下層に元肥として化成肥料「普通化成8号（フジカワエック、N:P:K = 8:8:8）」25 g/potを混合し、実験植物を1ポットあたり3株定植した。定植直後に置肥としてプロミック遅効きタイプ中粒（ハイポネックスジャパン、N:P:K = 8:8:8）6錠/potを与えた。2007年7月11日に同内容の置肥を追加した。

定植と管理：定植日はシナマオウが実験第一年目（2007年）の4月8日～9日、コモギ及びチガヤが4月24日、シロザが5月2日、ヤブマメが5月21日、シナマオウは54株、他の植物は各18株定植した。実験は雨の当たらないビニールハウス内で行なった。

実験群と灌水方法：上記の方法で定植した実験材料の中から生長度が揃った株を選択し、1群あたりシナマオウ9株、他の植物3株とし、各6群ずつを準備した。毎週月曜日に各群にそれぞれ無希釈の人工海水、1/2、1/4、1/8、1/16希釈の人工海水、及びブランクとして薬草園の地下水を灌水した。土壌中塩分の濃縮を防ぐため、毎週金曜日にすべての群に地下水を灌水した。1回の灌水量は2 L/potとした。上記の灌水を実験一年目は2007年6月4日～2007年11月12日に行なった。

実験二年目(2008年)はシナマオウについてのみ、一年目に枯死しなかった株を3月31日～4月1日にすべて1/5000aのワグネルポットに1株ずつ新たな川砂で再定植し、施肥は元肥を10g/pot、置肥を2錠/potとした。実験材料は定植直後からビニールハウス内にて管理した。一年目に人工海水1/8、1/16希釈液及び地下水を与えた群は引き続き同濃度の希釈人工海水及び地下水を与えて栽培し、人工海水1/2及び1/4希釈液を与えて栽培した群の株には人工海水1/16希釈液を与えた。毎週金曜日に希釈人工海水を灌水し、毎週火曜日に地下水を灌水した。1回の灌水量は400 mL/potとした。上記の灌水を4月11日～11月7日に行なった。

生長の評価：シナマオウについては草質茎の総長(全ての茎の長さの総和)、ヨモギ及びシロザについては草丈及び葉の枚数、ヤブマメについては草丈及び小葉の枚数、チガヤについては葉の総長をそれぞれ生長評価の指標とした。一年目の生長評価は、シナマオウは5月9日～11日、6月1日、7月3日～4日、7月30日～31日、9月11日～12日、11月8日～13日に行なった。ヨモギ、シロザ、ヤブマメ、チガヤについては6月から10月まで、各月の初旬に行なった。シナマオウの二年目の生長評価は4月8日～12日、6月30日～7月4日、9月8日～9月11日に行なった。

アルカロイドの定量：実験二年目の11月13日に、分析に十分量の草質茎を有する36株のシナマオウから3～5本の草質茎を基部から採取し、それらの全量を乾燥粉末化し、アルカロイド[ephedrine(E)及びpseudoephedrine(PE)]を定量した。(装置：日立製)ポンプ：L2130、オートインジェクター：L2200、紫

外部検出器：L2400、クロマトデータ処理及びシステムコントロールソフト：D2500。

(HPLC条件)カラム:ODS(4.6mm×250mm)、カラム温度:室温、流速:1.0mL/min、検出波長:210nm、注入量:10 μ L、移動相: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OSO}_3\text{Na}$ 溶液(1→127)/MeCN/ H_3PO_4 (305:195:0.8)。

二年目は9月11日に同様に36株から草質茎を採取し、測定した。また、前年のデータと比較するため、11月14日に上記36株のうち3株から再び草質茎を採取し測定した。

【結果】

灌水液中塩分濃度が実験植物の生長に及ぼす影響

実験一年目における灌水液の塩分濃度別の平均草質茎長をFig.1に示す。無希釈の人工海水を灌水した群では実験終了までにすべての株が枯死した。人工海水1/2希釈液を灌水した群では2株が枯死し、生存していた株も著しく生長が抑制され、最終生長評価時における平均草質茎長はブランクの半分程度であった。人工海水1/4、1/8及び1/16希釈液を灌水した群ではブランクと比較してわずかに生長が抑制されたものの、ほとんどの株がほぼ正常に生長した。

ヨモギについては、無希釈の人工海水および1/2希釈人工海水の群では全株が年内に枯死した。1/4液希釈液群ではブランクと比較して草丈では約90%、葉の枚数では55%程度であった。1/8希釈以下では顕著な生長不良は認められなかった。

シロザについては、無希釈の人工海水群で3株のうち2株が枯死し、残った1株の草丈も地下水群の70%程度であった。また、1/2希釈液群では枯死株はなかったが、明らかな生長阻害が見られ、1/4希釈以下では顕著な生

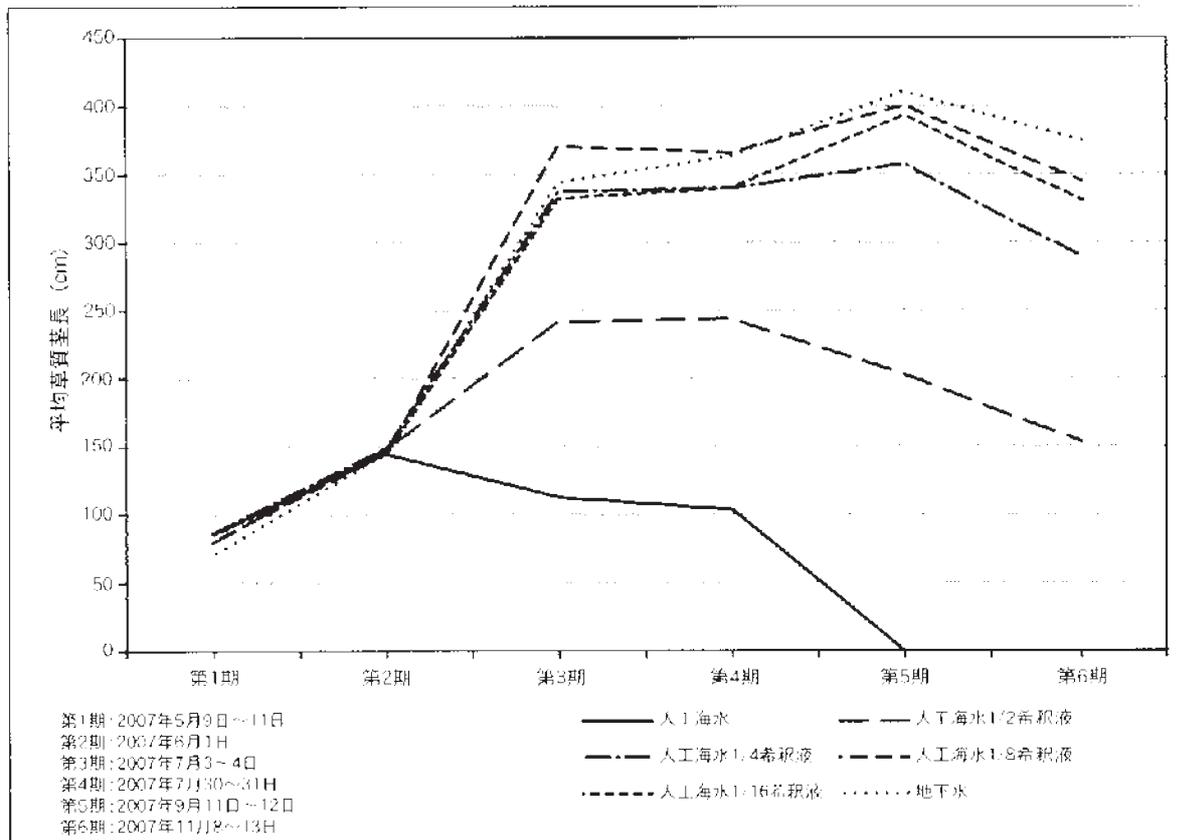


Fig. 1 灌水の塩分濃度とシナマオウの平均草質茎長 (実験一年目)

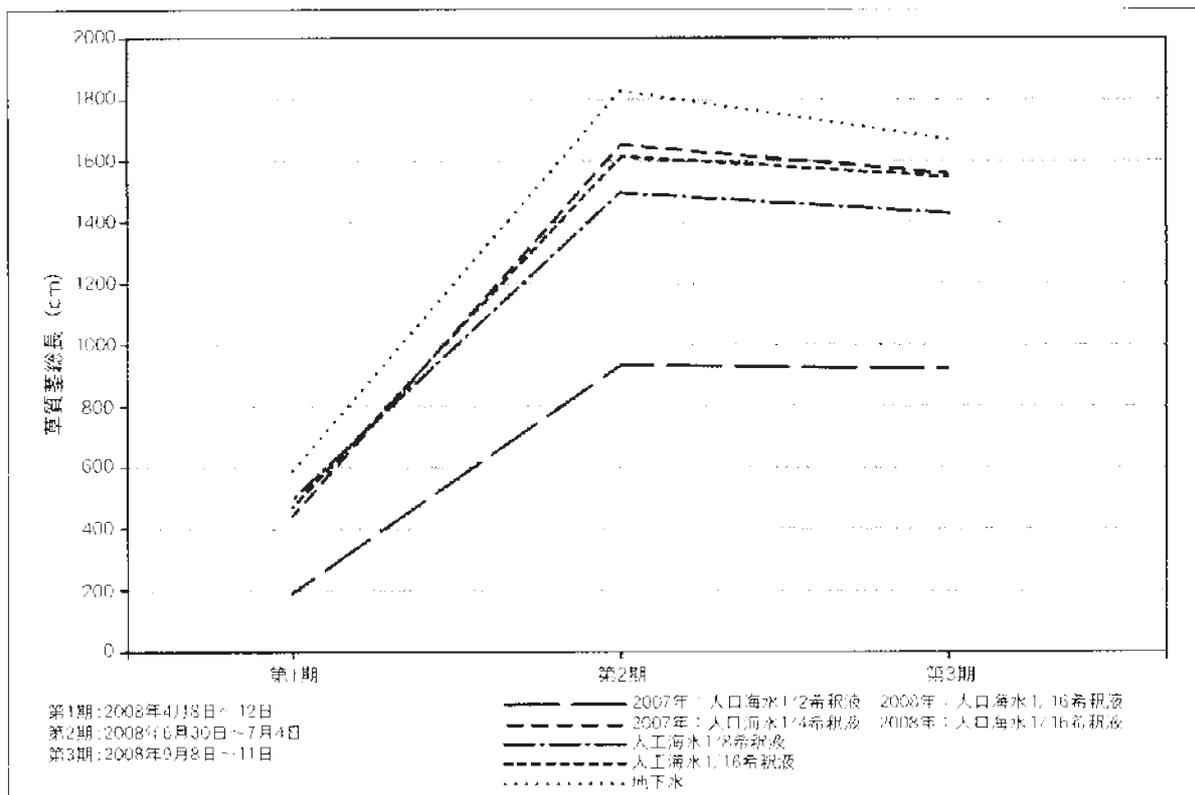


Fig. 2 灌水の塩分濃度とシナマオウの平均草質茎長 (実験二年目)

長不良は認められなかった。

チガヤについては、無希釈の人工海水を灌水した群ではすべての株が枯死した。1/2希釈群では明らかな生長阻害が見られ、葉の総長は地下水群の30%程度であった。1/4希釈群以下では有意な阻害は認められなかった。

ヤブマメについては、1/16希釈以上の人工海水濃度では全て第1期には生存していたが、実験終了までには全株が枯死した。

以上、ヤブマメは最も耐塩性が低く、ヨモギはヤブマメに次いで耐塩性が低く、チガヤは耐塩性が比較的高く、シロザが最も耐塩性が高いことが明らかになった。

実験二年目のシナマオウの灌水液の塩分濃度別の平均草質茎長をFig. 2に示す。一年目に人工海水1/2希釈液を、二年目に人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均草質茎総長はブランクの半分程度であったが、それ以外の群の平均草質茎長はブランクとほぼ同等であった。ブランクの平均草質茎総長は7月に最大となり、その値は約1800cmであった。

塩分濃度がシナマオウのアルカロイド含量に及ぼす影響

異なる塩分濃度の人工海水を灌水した実験一年目のマオウ草質茎の平均アルカロイド含量をFig. 3に示す。人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量は約0.70%であり、ブランクの約1.7倍であった。人工海水1/2、1/4及び1/8希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量はブランクよりも低く、いずれも0.3%前後であった。

実験二年目の9月11日に採取した草質茎のアルカロイド含量をTable 1に示す。人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量は $0.845 \pm 0.35\%$ であり、ブランクの約1.2倍であった。人工海水1/8希釈液を灌水

した群の平均アルカロイド含量はブランクより低く、約0.48%であった。2007年に人工海水1/2及び1/4希釈液を、2008年に人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量はそれぞれ約0.54及び0.58%と、ブランクには劣るものの、人工海水1/8希釈液を灌水した群よりも高かった。

結論および考察

1. シナマオウは人工海水1/4希釈液以下の塩濃度においてほぼ正常に生育できることが明らかになった。また、シナマオウの耐塩性はヤブマメ、ヨモギに勝り、チガヤと同程度であり、シロザに劣っていた。以上、人工海水1/4希釈液を灌水して栽培を行なえば、シナマオウを正常に生長させ、ヤブマメやヨモギの生長を抑え、除草の省力化が期待できると判断できる。しかし、この条件ではチガヤとシロザの生長を抑えることはできなかった。とくにチガヤは地下に根茎を蔓延して繁殖するため、除草作業により根絶させることは困難である。中国の麻黄栽培地においても根茎を引いて増殖するイネ科植物の除草に苦勞しており、有害雑草はできる限り早期に除草する必要がある。なお、人工海水1/4希釈液を灌水した群の土壤中塩分濃度を塩分計(Salt Tester U, EUTECH INSTRUMENTS)を用いて測定した結果、表面において0.80%、深部において0.08%を超えることはなかったことから、この土壤中塩分濃度がシナマオウが正常に生長できる限界の濃度であると判断された(測定法、データ等省略)。

2. 灌水液中の塩分濃度がシナマオウのアルカロイド含量に及ぼす影響に関しては、人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量が最も高く、一年目がブランクの約1.7倍、二年目が約1.2倍であった。これま

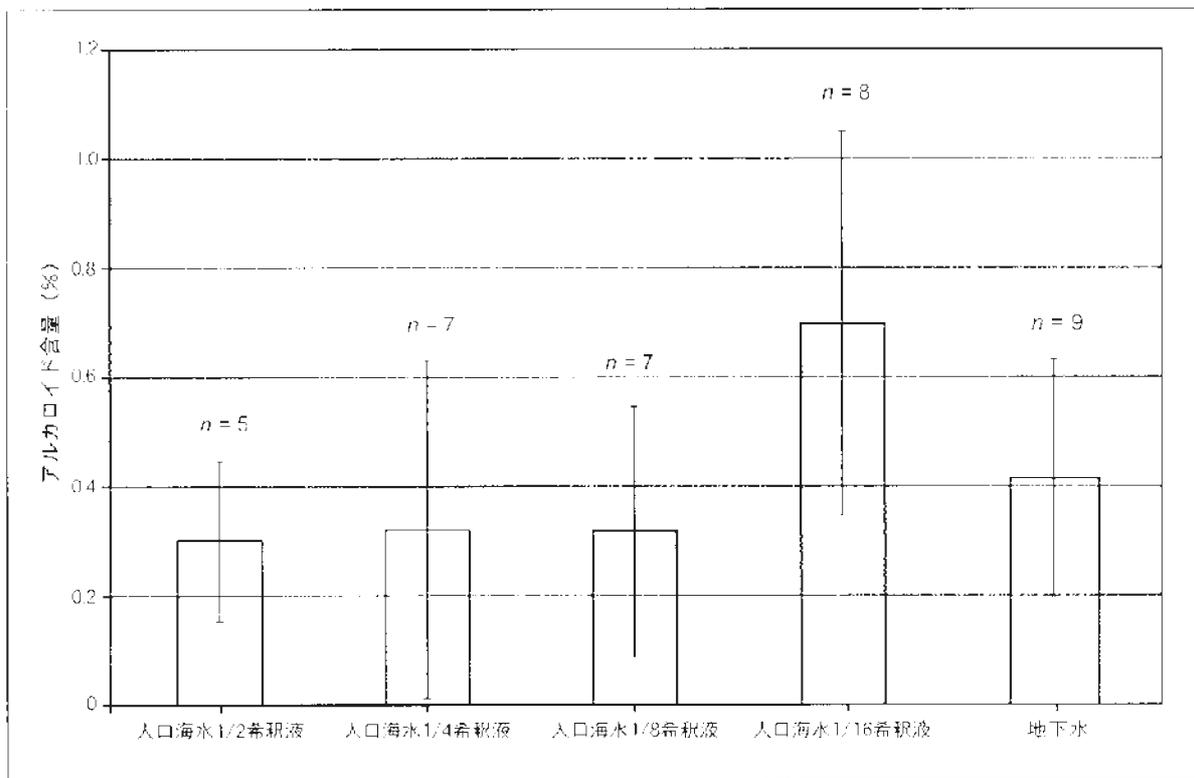


Fig. 3: 灌 waters の塩分濃度とシナマオウ草葉中総アルカロイド含量の相関 (2007年11月13日採取)

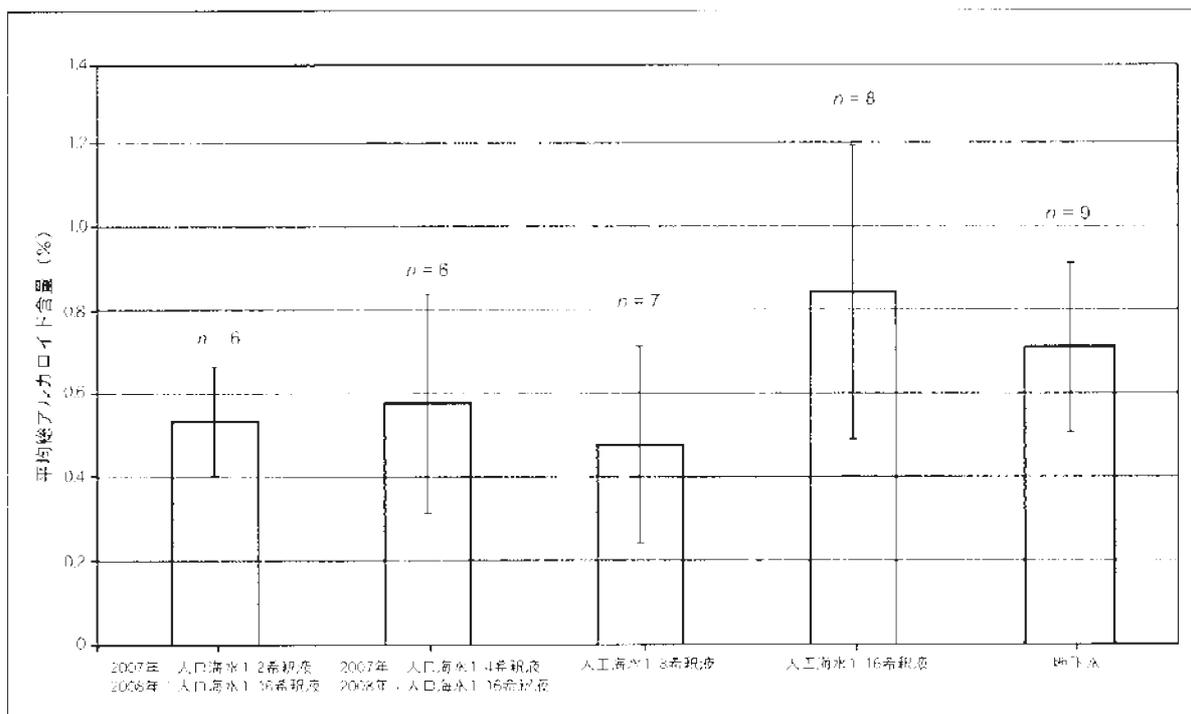


Fig. 4: 灌 waters の塩分濃度とシナマオウ草葉中総アルカロイド含量の相関 (2008年9月11日採取)

Table 1 灌水中塩分濃度とシナマオウ草質茎中のアルカロイド含量の関係 (2008年9月11日採取)

株ID	灌水中塩分濃度	アルカロイド含量 (%)			(平均E+PE) ±SD
		E	PE	E+PE	
No.212		0.092	0.318	0.410	
No.222		0.400	0.296	0.696	
No.223	2007年 人工海水1/2希釈液	0.007	0.691	0.698	0.538±0.13
No.231	2008年 人工海水1/16希釈液	0.029	0.417	0.446	
No.232		0.286	0.171	0.457	
No.233		0.009	0.530	0.539	
No.311		0.191	0.143	0.334	
No.321		0.087	0.228	0.315	
No.322	2007年 人工海水1/4希釈液	0.010	0.797	0.807	0.577±0.27
No.323	2008年 人工海水1/16希釈液	0.236	0.260	0.496	
No.332		0.352	0.369	0.722	
No.333		0.014	0.866	0.880	
No.411		0.031	0.198	0.229	
No.412		0.251	0.137	0.388	
No.413		0.005	0.243	0.248	0.477±0.24
No.421	人工海水1/8希釈液	0.486	0.393	0.879	
No.431		0.223	0.136	0.359	
No.432		0.473	0.175	0.648	
No.433		0.017	0.571	0.588	
No.511		0.004	0.360	0.364	
No.512		0.007	0.812	0.819	0.845±0.35
No.513		0.032	1.067	1.099	
No.521	人工海水1/16高濃液	0.480	0.528	1.008	
No.523		0.109	0.380	0.489	
No.531		0.374	0.439	0.813	
No.532		0.126	0.560	0.686	
No.533		0.386	1.094	1.480	
No.611		0.114	0.796	0.910	0.709±0.20
No.612		0.347	0.200	0.547	
No.613		0.029	0.599	0.627	
No.621		0.383	0.655	1.038	
No.622	地下水	0.056	0.571	0.626	
No.623		0.039	0.386	0.425	
No.631		0.116	0.623	0.739	
No.632		0.280	0.272	0.552	
No.633		0.228	0.698	0.926	

での本園内における *Ephedra* 属植物の栽培では、アルカロイド含量が概ね0.3~0.4%と低かったが、今回の結果から、人工海水1/16液希釈液を灌水することによりアルカロイド含量の高いシナマオウを栽培生産できる可能性が示唆された。なお、人工海水1/16希釈液を灌水した群における土壌中塩分濃度は表面で0.08~0.32%、深部で0.02~0.04%であったことから、この程度の塩分濃度がアルカロイド含量の高いシナマオウを育成させるに最適な土壌中塩分濃度であると考えられる。

3. 実験一年目は、設定した塩分濃度が異なる6群のいずれにおいても平均アルカロイド含量は0.7%に及ばなかったが、二年目には人工海水1/16液希釈液群とブランク群で0.7%を超え、日局に適合した。他の群も一年目より増加したことは、株の生長によるもの

と考えられ、実際、一年目には開花株がなかったが、二年目には開花する株が見られた。また、一年目に人工海水1/2及び1/4希釈液を灌水し、二年目に人工海水1/16希釈液を与えた群の平均アルカロイド含量がブランクより低かったことは、一年目に高濃度の希釈人工海水が与えられたことにより、株の生長が抑制された結果であると考えられる。なお、各群ともにアルカロイド含量の変異幅が大きいのは、株の生長程度(成熟度)が異なるためと考えられるが、これまでの経験から、株の生長度を均一にそろえることは困難である。本研究では一群の数を8株としたが、今後は1群の数をさらに増やすことや、挿し木増殖したクローン株を利用して再検討する予定である。また一方で、同一株では生長するに従いアルカロイド含量が上昇する傾向が見られ

たので、株の年齢とアルカロイド含量との相関についても検討する必要がある。

4. 実験二年目の11月14日に草質茶を採取した3株の平均アルカロイド含量は、前年同期よりは増加していたが、本報で示した同年9月11日よりやや低下していた（ラテータ略）。このことは秋期に採集することが望ましいことを示唆しているが、現地では11月に採集するのが良いとする意見もあり、最適採集時期については更なる検討が必要である。

引用文献

- 1) 前報(*The Japanese Journal of Medicinal Resources*, 34(2), 1-6(2012))を第1報とする。
- 2) Mikage M., Takahashi A., Chen H., Li Q., Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 1. On the Resources of *Ephedra* Plants in China. *Natural Medicines*, 57 (5), 202-208, (2003). Mikage M., Kondo N., Yoshimitsu M., Nakajima I., Cai S., Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 2. On the Current Situation of the Cultivation of *Ephedra* Plants in China. *Natural Medicines*, 58 (6), 312-320, (2004).
- 3) Yang Z., Wang J., Mao D., A Research of *Ephedra* Cultivation in Saline-Alkali Land. *Acta Bot. Boréal.-Occident. Sin.*, 22 (1), 141-145, (2002).
- 4) Mikage M., Motomura H., Yoshimitsu M., Yonekura K., Chen H., Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 3. The Weed Control Problem in *Ephedra* Cultivated Field in China. *Natural Medicines*, 59 (3), 125-128 (2005).

●大宮 規弘 (おおとみ・のりひろ) ●

三重県出身

2009年 金沢大学薬学部卒業

2011年 金沢大学大学院自然科学研究科
(博士前期課程) 修了
薬学修士

●野村 幸宏 (のむら・ゆきひろ) ●

神奈川県出身

1990年 帝京大学薬学部卒業

2012年 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
(博士後期課程) 社会大学生

●井田 達也 (いで・たつや) ●

長野県出身

2004年 金沢大学薬学部卒業
薬学士

●大野 剛史 (おおの・たけし) ●

富山県出身

2008年 金沢大学薬学部卒業
薬学士

●毛利 千香 (もうり・ちか) ●

石川県出身

1996年 金沢大学薬学部卒業

2002年 金沢大学大学院自然科学研究科修了
薬学博士

●御影 雅幸 (みかげ・まさゆき) ●

大阪府出身

1973年 所蔵大学薬学部卒業

1975年 富山大学大学院薬学研究科修了
1984年 薬学博士

マオウ属植物の栽培研究 (第3報) ¹⁾

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

野村行宏, 佐々木陽平, 三宅克典, 御影雅幸*

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科創薬科学専攻資源生薬学研究室

〒920-1192 石川県金沢市角間町

Studies of Cultivation of Ephedra Plants (part 3).

Multiplication from divisions and woody stem cuttings of *Ephedra sinica* Stapf

Yukihiro Nomura, Yohei Sasaki, Katsunori Miyake and Masayuki Mikage*

Laboratory of Herbal Medicine and Natural Resources, Division of Pharmaceutical
Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University.

Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192 Japan

2013年9月 日受付

要 旨

日本薬局方に収載され、また中国で一般に栽培されている漢方生薬「麻黄」の1原植物である *Ephedra sinica* Stapf を栽培する際の苗を得る目的で、株分けおよび木質茎の挿し木法を検討した。その結果、根茎を引いて生育している株は根茎部を切り分けることで容易に増殖することができた。また、非効率的であるが、まだ根茎を引いていない播種後4年生株からも株分けで1株あたり2～3株の新苗を得ることができた。また、挿し木法では、挿し穂基部を水平切りして挿し、人工気象器内で保管することにより、5割の苗が活着した。マオウ属植物の草質茎の挿し木は木質茎より困難であるとされており、草質茎の挿し木法については次報で述べる。

Summary

We investigated the multiplication from divisions and woody stem cuttings of *Ephedra sinica* Stapf, which is prescribed as one of the botanical origins of Ephedrac Herba in the Japanese Pharmacopoeia 16th. The results are as follows: The plantlets obtained by dividing an old stock grown by underground rhizomes took root easily; The plantlets obtained by cutting woody stem longitudinally with roots also took root easily, though it was inefficient; About a half of cuttings obtained from woody stems with enough herbal stems took root in a biotron, and the success rate was higher than that of *E. altissima* Desf. ever reported. The multiplication from cuttings of herbal stems of *Ephedra* plants will be reported in the next paper.

漢方生薬「麻黄」の栽培は中国で1980年代から盛んになり、現在では主として *Ephedra sinica* Stapf が栽培され、苗の確保は主として種子繁殖に依っている。一方、現時点では我が国でマオウ種子の生産は行なわれておらず、苗の確保のためには他の手法をも検討する必要がある。また、種子繁殖では遺伝的形質が一定ではない。そこで、筆者らはクローン株が得られる株分け法ならびに挿し木法などを検討することにした。これまでにマオウ属植物の挿し木法による繁殖については、藤田ら⁹⁾による『日本薬局方』に記載されていない *E. altissima* Desf. 及び *E. distachya* L. を用いた研究があり、木質茎を挿し穂とした場合の活着率は *E. altissima* で約40%、*E. distachya* で15%であったが、草質茎を挿し穂とした場合には、*E. altissima* では活着率が約10%と低く、*E. distachya* では全く活着しなかったと報告されている。また、『第十六改正日本薬局方』¹⁰⁾ 記載種としては、旧国立衛生試験所春日部薬用植物栽培試験場が導入した *E. sinica* 株 (Ep-13) について、株分けや根挿しが有効であると報告されている¹¹⁾ が、Ep-13は我々が保有する *E. sinica* とは繁殖能力が大幅に異なり、筆者ら¹²⁾ はDNAを解析した結果 *E. sinica* ではなく、別種の交雑種である可能性を示した。そこで、本研究では金沢大学が保有する *E. sinica* を用いて、株分けおよび木質茎の挿し木による繁殖法を検討した結果について報告する。

1. 株分けによる繁殖

1) 根茎で増えた株を利用する方法

富山県薬用植物指導センターから株分けにて譲り受けた *Ephedra sinica* を、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にてワグネルポット (1/2000a) または11号

駄温鉢で5年間育てた2株 (A株、B株)、地下部に多数の根茎を延ばし、子株が増殖している株 (写真1)。

2013年6月中旬に、適度に根が残るように根茎をA株は10苗に、B株は9苗に切り分け (写真2)、市販栽培用土 (プランターの土：秋本人産物) を用い、ロングポット (深さ20cm) に植え付けた。

活着の評価を2013年8月12日に行なった結果、全株が活着していた。

2) 木質茎基部を切り分ける方法

Ephedra sinica : 2株 (C株、D株)、2株ともに、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内の株から採取した種子



写真1 根茎を引いて増殖した株



写真2: 根茎を引いて増殖した株を切り分けた状態 (一部分)。

を播種（2004年春）して得られた実生苗を育てた4年生株で、基部は木質化し、径約8mmで、地下に引く根茎は認められなかった。

2008年3月22日に、実験材料を鉢から取り出し、水中でよく土を落とし、鋭利なナイフで、それぞれの子株に適度な根が残るように、C株は4分割（縦割：写真3）、D株は3分割し、ワグネルポット（1/5000a）に市販栽培用上（プランターの土：秋本天産物）を用いて定植し、日当りの良い屋外に保管した。なお、3月は中国において麻黄の植え替えに適した時期とされている。

活着の評価を2008年9月25日に行なった結果、C株は4苗のうち2株（C-2, 4）が生存し、他の2株（C-1, 3）が枯れた。D株は、全3株が生存していた。



写真3：2縦割した状態。さらに2縦割して4株とした。

2. 木質茎の挿し木による繁殖

1) 実験材料

*E. sinica*の園内継続栽培株。

2) 挿し穂の調製方法

調製条件：木質茎は数カ所の節から多数の草質茎が出た状態で、挿し穂は各節のすぐ上で切断して得た。次いで、木質茎基部の切り口を水平切り（軸に対して垂直）と返し切り（水平切りした部分の約半分に更に斜めに切り込み）の2群に分け、それぞれの群を発根剤（ルートン：石原産業株式会社）塗布と塗布無しの、合計4群に分け、各群5株を準備した（表1）。草質茎は全て残した。

3) 植え付けおよび管理方法

用土として鹿沼土を用い、硬質ポリポット（直径9cm）に2～3cmの深さに挿した。

培養環境条件：人工気象器（日本医化器械製作所：LPH-200RDSMP）。温度25℃。湿度70%。光照射：15時間（25,000～30,000ルクス）

4) 実験期間

2006年11月28日、29日に挿し木し、2007年9月26日（10ヶ月後）に評価した。

5) 評価方法

生存しているものは土壌表面からの地上部の長さ、茎の数、根の長さを測定し、根の量は目視的に観察した。枯死したものについては、切り口のカルス形成の有無、根があれば長さを測定し、根の量を目視的に観察した。

結果（表1、写真4）

返し切りした条件1、2では、発根剤の有無にかかわらず、10検体すべてが枯死したが、発根剤を塗布した群はカルスの形成並びに根の伸長がよかった。水平切りの条件3、4については、条件3（発根剤無し）で5検体中3検体が活着し、条件4（発根剤有り）で5検体中2検体が活着し、発根率や活着率については発根剤の顕著な効果は認められなかった。

表1 挿し木条件と結果

条件・ 資料番号	生 存 [※]				枯 死		
	地上部長(cm)	莖数(本)	根長(cm)	根の量	カルス形成	根長(cm)※※	根の量
条件1	1	-	-	-	無し	-	-
	2	-	-	-	無し	-	-
	3	-	-	-	有り	0	-
	4	-	-	-	有り	8	少
	5	-	-	-	有り	5	少
条件2	1	-	-	-	無し	-	-
	2	-	-	-	有り	0	-
	3	-	-	-	有り	3	少
	4	-	-	-	有り	10	多
	5	-	-	-	有り	13	多
条件3	1	-	-	-	無し	-	-
	2	-	-	-	有り	3	少
	3	7.0	1	9	-	-	-
	4	6.5	1	16	-	-	-
	5	13.0, 7.0	2	15	-	-	-
条件4	1	-	-	-	無し	-	-
	2	-	-	-	有り	0	-
	3	-	-	-	有り	0.8	少
	4	8.5, 5.5	2	9	-	-	-
	5	15.7	1	21	-	-	-

条件1：返し切り、発根剤（ル-トン）塗布なし

条件2：返し切り、発根剤（ル-トン）塗布あり

条件3：水平切り、発根剤（ル-トン）塗布なし

条件4：水平切り、発根剤（ル-トン）塗布あり

※：-は枯死したことを意味する。

※※：0 (cm) はカルスの形成が認められたが、根が伸張しなかったものを示す。

結論および考察

1. *Ephedra sinica* 栽培株の株分け実験において、地下に根茎を引いて繁殖した株では作製した全ての子苗が活着し、好成績であった。一方、根茎を引かない株の木質化した根元の株分けによる繁殖に関しては、2株から得られた7つの小苗のうち5苗（71.4%）について活着させることができた。結果としては十分な成績であるが、発芽後4年以上経過した *E. sinica* でも莖はあまり太くならないため、個体数を多く得る事が出来ないこと、播種してから親株として株分けに供することができるまでに時間がかかりすぎることで、得られる小苗が少ない



写真4：挿し木後10ヶ月後の状態（条件2）
（左から、条件2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-1。草質莖の多くはすでに枯死脱落している）

ので失敗した場合のリスクが高すぎることなどの短所がある。なお、*E. sinica* は日局収載の他の2種 (*E. intermedia*, *E. equisetina*)

に比して根茎を引いて増殖する性質が強いため、本研究の結果からは、十分生長して根茎を引いた株を親株として株分けするのが適していると判断される。一方、同じ *E. sinica* でも株によって根茎を延ばす性質が強いものと弱いものがある可能性があり、今後の検討課題である。なお、Ep-13については、株分け時期は3月中旬～4月中旬頃と10月上旬から11月中旬頃が適期であると紹介されているが、本研究では少なくとも6月中旬までは可能であることが明らかになった。ただし、株分け後の年内の生長を考慮すると、新芽が動き出す前が適切であると判断される。

2. *E. sinica* の木質茎の挿し木による繁殖実験に関しては、水平切り苗、返し切り苗ともに約半数が発根したが、活着率は水平切り苗では50%、返し切り苗では0%であった。活着率から判断すると水平切りが適しているが、返し切り苗でも発根後早期に植え替えるなど適切な管理により活着する可能性がある。また、すべての条件（苗）において、カルス形成が認められたが、その後枯死したものが多く、その原因に不適切な灌水（給水不足）が考えられ、適切な灌水量についても検討する余地がある。また、発根剤の塗布に関しては、発根促進効果は認められなかったが、発根後の根の生長に関しては有効であると判断された。以上、日局収載種の *E. sinica* において挿し穂の基部を水平切りし人工気象器内で管理することにより、藤田らが *E. altissima* で報告した活着率をやや上回る成績が得られた。なお、ここにはデータを示さなかったが、予備的実験として蒸散を押さえるために草質茎を半分以下に切り詰めた株ではすべて枯死したことから、挿し穂には十分な草質茎を残

す必要がある。

3. *Ephedra* 属植物は灌木であるが、*E. sinica* については、冬に氷点下をかなり下回る自生地では地上部が根頭部を残して全て枯れるので、挿し穂として利用できるような木質茎が得られない。一方、比較的暖かい地域ではわずかに地上部が残り、次年度以降に木質化する。金沢では冬期にかなりの積雪があり、その下では *E. sinica* の地上部の大半は枯死せず、一部が木質化する。今回の研究で利用した木質茎はそうしたものである。なお、いずれにせよ大量の木質茎を得ることはできないので、活着率が悪いが多量に得られる草質茎の挿し木を検討する必要がある。次報で述べる。

文献

- 1) 第2報：大富規弘，野村行宏，井出達也，大野剛史，毛利千香，御影雅幸，マオウ属植物の栽培研究（第2報），海水がシナマオウの生長およびアルカロイド含量に及ぼす影響，薬用植物研究，35（1），1-8（2013）
- 2) 藤田早苗之助，栗原孝吾，衛生試験所報告，85，112 - 114（1967）
- 3) 第十六改正日本薬局方，厚生労働省，2012，p.1589.
- 4) 薬用植物栽培・品質評価指針作成検討委員会編，『薬用植物 栽培と品質評価』Part9，薬事日報社，東京，2000，pp.67 - 78.
- 5) 御影雅幸，北岡文美代，松本昌士，安藤広和，佐々木陽平，杉村康司，飯田修，旧国立衛生試験所が導入し保存してきたマオウ属植物Ep-13に関する新知見，薬用植物研究，投稿中。

