

| | |
|---------|-----------------------|
| 氏名 | 野村 行宏 |
| 学位の種類 | 博士 (創薬科学) |
| 学位記番号 | 甲第11号 |
| 学位授与の日付 | 平成 27 年 3 月 23 日 |
| 学位授与の要件 | 課程博士 (学位規則第 4 条第 1 項) |
| 学位授与の題目 | マオウ属植物の種苗生産研究 |

| | | |
|--------|----|-----------|
| 論文審査委員 | 主査 | 佐々木 陽平 |
| | 副査 | 御影 雅幸 |
| | 副査 | 後藤(中川) 享子 |
| | 副査 | 山下 克美 |
| | 副査 | 鳥羽 陽 |

学位論文要旨

We investigated the multiplication from divisions and woody stem cuttings of *Ephedra sinica* Stapf, which is prescribed as one of the botanical origins of Ephedrae 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.

麻黄は「神農本草経」の中品に収載される生薬で、発汗、鎮咳、去痰薬として、葛根湯や小青竜湯、麻黄湯など重要な漢方方剤に配合されている。麻黄の原植物として「第十六改正日本薬局方(日局)」にはマオウ科マオウ属植物 *Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A. Meyer. 及び *E. equisetina* Bunge, の3種が規定されている。日本薬局方においては総アルカロイド(ephedrine 及び pseudoephedrine)を0.7%以上含むと規定されている。

マオウ属植物はアジア, ヨーロッパ, 南北アメリカなどの乾燥地帯に約40種類が自生している。その内, 中国には, 日局に規定されている *E. sinica*, *E. intermedia* 及び *E. equisetina*, の3種の他, *E. likiangensis* Florin, *E. gerardiana* Wall.ex Stapf など計14種の自生が確認されている。一方, 日本には自生しておらず, 日本で使用される麻黄の供給は全て, 中国からの輸入に依存している。しかし, 中国において資源確保や砂漠化防止などの問題が深刻化したことを理由に, 1999年1月から, 加工品以外の麻黄の輸出が全面的に禁止された。今後, 麻黄の輸出はより一層制限され, 入手が困難になることが予想される。この問題を解決するため, 日本において麻黄原植物の個体数, そして栽培圃場面積を早急に増加・拡大させる必要がある。

これまでマオウ属植物の繁殖は, 主に種子を用いて行われてきた。しかし, 種子繁殖の場合, 優良品種の株から採れた種子が必ずしも優良株になるとは限らないため, 安定した品質の麻黄を生産する事が出来ない。株分け繁殖については, 同一形質の個体が得られるなどの利点がある。一方, 多数の個体を得ることが出来ない, 株分けを失敗したときに大きな株を失うリスクが高いなどの欠点がある。マオウ属植物の株分け繁殖についての報告はない。マオウ属植物の挿し木繁殖についての報告がある。しかし日局で規定される麻黄原植物についての挿し木繁殖に関する研究報告はない。

これらの問題を解決するためには, 優良な形質を備えた株から多数の個体を確保できる挿し木繁殖を確立させる必要がある。筆者は麻黄原植物の効率的な種苗の生産法を開発することを目的に, 種子及び株分けによる繁殖を再検討するとともに草質茎による挿し木繁殖について検討した。

本研究では, 種子繁殖については効率的な発芽条件, 株分け繁殖については日局規定の *E. sinica* を用い, 作業性や株分け後の生存率について, 挿し木繁殖については, 主に *E. sinica* の草質茎を用い効率的な挿し木条件や活着後の生長などについて検討し, マオウ属植物の繁殖方法を確立させる事を目的として研究を行った。実験には日局規定の3種の中から *E. sinica* を, 他の2種と比較して根茎を伸ばし繁殖していく特徴が強い性質を有するという理由で選んだ。その他, 実験内容によっては *E. likiangensis*, *E. pachyclada* Boiss. (ネパール産

の本分類群は *E. gerardiana* と *E. intermedia* の交雑種) , *E. gerardiana* も使用した.

第一章 種子による繁殖

E. sinica の種子を用い発芽に適した用土について検討した結果, 市販栽培土単独及び市販栽培土にバーミキュライトを混合させることで発芽率がほぼ同様であった. また川砂を用いた場合, 発芽率が低いことから用土の単位容積重量(Kg/L)が発芽と関係していることが推測された.

マオウ属植物の自生地のお多くはアルカリ土壌の砂漠地であるが, むしろ弱酸性土壌の方が高い発芽率を示した.

種子繁殖は, 一度に多数の繁殖が可能である. 一方, 親株と同じ形質が得られないため, 品質の安定した個体を繁殖させることについては, 効率的な方法ではないことが判明した.

第二章 株分けによる繁殖

E. sinica は日局規定の他の2種(*E. intermedia*, *E. equisetina*)に比べて根茎を伸ばし増殖する性質が強いため, 株分け繁殖には適していることが示唆される. しかし *E. sinica* でも株によって根茎を伸ばす性質が強い株と弱い株がある. 地下に根茎を引いて繁殖する株で株分けを行った結果, 作製した全ての苗(100%)が活着した. 一方, 根茎を引かない株の木質茎基部を切断し, 株分けを行った結果, 得られた7つの苗のうち5苗(71.4%)が活着した.

根茎を引いて増殖する株であっても播種後5年が経過した1個体から多数の苗を採取することは出来ない. 同様, 木質茎基部においても発芽後4年以上経過した *E. sinica* でも茎は太くならないため, 多数の個体を得る事が出来ない.

作業性については, 根茎による株分けは手間がかからず容易に行えた. しかし根茎を伸ばし増殖する株がないと行うことが出来ないという問題がある. 一方, 木質茎基部による株分けについては作業性が良くない. 掘り出した株を切断する際, 細い根が絡みあっているため, 根をほぐすのに手間と時間がかかる. 主根が細いため均等に切断することが出来ない.

根茎及び木質茎基部とも, 多数の個体を得ることが出来ない, 作業性が良くないなど問題があり, マオウ属植物の繁殖方法としては適していないことが判明した.

第三章 挿し木による繁殖

第1節 挿し穂の作製方法

1. 挿し穂については, 木質茎及び草質茎のどちらを用いても挿し木による繁殖が可能であることが確認できた. 木質茎を用いて挿し木を行う場合, 1個体から毎年, 木質化した挿し穂を多数採取することが出来ない点から挿し木には適していないことが示唆された. 一方, 草質茎を用いて行う場合, 毎年多数の挿し穂を採取することが出来るため繁殖方法として適していることが明らかにされた.

2. 切断部位については, 切断部位の上の節から発根が確認された. このことより節間より節の方が適していることが明らかにされた.

3. 切断場所については, *E. sinica*, *E. likiangensis* とともに, 茎の上部より下部の方が発根率は好成績であった. このことから切断場所は茎の下部の方が適していることが示唆された.

4. 切断方法については, 水平切りの方が斜め切りと比較して良好な結果であった.

5. 挿し穂の長さについては, 人工気象器内に保管することで, 10 cm の長さの挿し穂でも十分発根が可能

なことが明らかにされた。また *E. sinica* の場合、挿し穂の長さが 10~20 cm の発根率は 78.8% で、20.1~30 cm の発根率は 82.4% であった。*E. pachyclada* の場合、10 cm 以下の発根率は 43.75% で、10.1~20 cm の発根率は 50% で、20.1~30 cm の発根率は 42.42% であった。これらのことから挿し穂の長さで発根については関係性がないことが示唆された。

6.7. 挿し穂処理及び発根剤については、あまり有用性がないことが示唆された。

第2節 挿し木の方法

1. 用土については、バーミキュライト単体及び他の用土とバーミキュライトを混合させることで発根率が上昇することが判明した。

2. 保管場所については、人工気象器内の方が、ビニールハウス内に保管したものと比較して高い発根率が得られた。このことから、人工気象器内に保管し、挿し木を行うことで発根率が上昇することが明らかにされた。しかし *E. likiangensis* の場合、ビニールハウス内においても高い発根率が得られ、*E. sinica* を用いビニールハウス内に保管した場合と比較し、発根率に大きな差が生じ、種間差があることが認められた。

3. 用土と吸水用の水の pH については、同じ用土を用いて挿し木を行う場合、吸水用の水の pH を変えることで発根率に差が生じることが明らかにされた。

4. 深さについては、挿し穂の切断部位の上の節から発根することが確認されていることや *E. sinica* の挿し穂の節間の平均の長さが $3.65 \text{ cm} \pm 0.5$ であることから、挿し木の深さを 5 cm 以上にすることで発根率が上昇することが明らかにされた。

5. 期間については、ビニールハウス内で保管する場合、発根した根の長さから判断し、最低でも 5 ヶ月間以上保管する必要があることが示唆された。一方、人工気象器内に保管する場合、挿し穂の状態などを考慮し、4~5 ヶ月間が適していることが示唆された。しかし、ビニールハウス内、人工気象器内ともに発根後、植え替えを行わずそのまま放置した結果、枯死した株が見られた。このことから発根後は出来るだけ早い段階で植え替えを行う必要があることが明らかにされた。

6. 人工気象器内の照明については、蛍光灯をすべて点灯させた方が発根率は高くなることが明らかにされた。

7. 時期については、ビニールハウス内に保管する場合、カルス形成や挿し穂の状態から判断して、5 月末~7 月中旬頃が適期であることが示唆された。一方、人工気象器内に保管する場合 (*E. sinica* の草質茎を用い 2010 年 6 月 7 日~2013 年 11 月 13 日にかけ計 11 回、挿し木を行った結果)、5 月~7 月の発根率は 46.2% であった。一方、10 月~11 月の発根率は 38.4% であった。計 11 回行った実験を整理し、気象条件と発根率について検討した。気温については、平均気温が $10.1^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 以下の時に挿し木を行った場合の発根率が 50% で、 $20.1 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 以下では 46.0% であった。しかし 10°C 以下になると発根率が 28.3% と低下した。湿度については、平均湿度が 80% 以上の時に挿し木を行った場合の発根率は 55.5% であった。一方、平均湿度が $70.1 \sim 80\%$ 以下では 30.1%、 $60.1 \sim 70\%$ 以下では 36.7% であった。以上のことから、マオウ属植物の挿し木の適期は 5 月末~7 月中旬、気温が $10.1 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 以下、湿度が 80% 以上の時期に挿し木を行うことで、多数のクローン株が得られることが明らかにされた。

8. 挿し木の挿し方(挿し木数)については、1 つのポット(挿し床)に挿し木を行う場合、挿し木の数が少ない方が発根率は上昇することが示唆された。

第3節 親株の生育環境

親株の生育環境による発根率の違いについては、岩場で管理されている株の発根率は91.7%、砂地で管理されている株の発根率は45.9%であった。個体差による相違の可能性も考えられるが、親株の生育環境によって発根率が変わることが明らかにされた。

3年連続で同じ親株を用い、同時期・同条件で挿し木を行った結果、年によって発根率が異なった。2011年11月21日に挿し木を行った結果、発根率は20%、2012年11月14日に挿し木を行った結果、発根率は11.5%、2013年11月13日に挿し木を行った結果、発根率は45.8%であった。原因として毎年、同じ親株から多数の挿し穂を採取すると、親株の栄養状態が悪くなり、それが挿し穂の栄養状態にも影響し、発根率が低下したことが推測される。このことから親株については、最低でも1年間以上休ませるか、または肥料などを与え親株の生育状態を良くする必要性があることが示唆された。

第4節 活着後の生育

1. 活着後の挿し木の生長については、5月～7月に挿し木を行うより10月、11月に挿し木を行ない、人工気象器内に4ヶ月～5ヶ月間保管し、翌年3月に植え替えを行うことで、クローン株が生長することが判明した。

2. 用土については、*E. sinica* の場合、赤玉土が地上茎の生長に有利であった。*E. pachyclada* の場合も *E. sinica* と同様に赤玉土が他の用土と比較して生長が良好であった。このことからマオウ属植物を生長させるためには赤玉土が適していることが明らかにされた。

3. 施肥量別地上茎の合計の長さについては、27個施肥させた群より9個施肥させた群が平均で生長が好成績であった。このことから施肥量について適量があることが明らかにされた。

4. 窒素:リン酸:カリ(以下、NPK)比と *E. sinica* の地上茎の生長について生長が良かった3つの条件について検討した結果、条件14(N:0.51, P:0.51, K:0, 981 mm)、条件2(N:0.51, P:0, K:0, 681 mm)、条件13(N:0.17, P:0.17, K:0, 539 mm)のうち、条件14, 13は共に窒素とリン酸の2種類が配合され、条件14, 2, 13にはすべて窒素が配合されていた。このことから *E. sinica* の生長には窒素とリン酸が関係していることが明らかにされた。一方、枯死した条件について検討した結果、条件2は4株中1株が枯死し、条件15(N:1.53, P:1.53, K:0)は4株すべて枯死し、条件18(N:1.53, P:0, K:1.53)は4株中3株が枯死した。条件2, 15, 18にはすべて窒素が配合されている。これらのことから窒素には適量があり、与えすぎると逆に生育を悪化させることも判明した。

NPK比と *E. gerardiana* の地上茎の生長については、肥料A号(N:P:K=8:6:12)が801.9 cmで地上茎の生長が良好であった。次いでC号(N:P:K=8:25:8)が772.1 cm、B号(N:P:K=5:20:6)が638.9 cm、D号(N:P:K=8:8:8)が545.7 cmであった。各肥料のNPKの配合割合を計算し、生長との相関関係を調べた結果、窒素との相関係数は $R^2=0.4473$ 、リン酸との相関関係は $R^2=0.199$ 、カリとの相関係数は $R^2=0.4803$ であった。配合割合などの相違が影響し生長に差が生じた可能性も考えられるが、地上茎の生長については窒素とカリが関与していることが示唆された。

第5節 アルカロイド含量

1. 用土について、*E. sinica* のアルカロイド含量(E+PE)は、川砂0.024%、山砂0.027%、赤玉土0.041%、鹿沼土0.080%、桐生砂0.05%で、鹿沼土が他の用土と比較して好成績であった。一方、*E. pachyclada* のアルカロイド含量(E+PE 平均)は川砂0.011%、山砂0.008%、赤玉土0.143%、鹿沼土0.032%、桐生砂0.008%で、

赤玉土が他の用土と比較して高い数値を示した。アルカロイド含量を高めるためには *E. sinica* の場合は鹿沼土が適し、*E. pachyclada* の場合は赤玉土が適していることが推測され、種間差があることが示唆された。

2. 施肥量について用土別にアルカロイド含量(平均)が高かった条件について検討した結果、市販栽培土は施肥量が 27 個で 0.458%、川砂は施肥量が 3 個で 0.339%。赤玉土は施肥量 27 個で 0.309%、桐生砂は施肥量 9 個で 0.231%、鹿沼土は施肥量 27 個で 0.196%、山砂は施肥量 3 個で 0.120%であった。これらのことから用土によって施肥量を変える必要があることが示唆された。

施肥量とアルカロイド含量との相関関係については、赤玉土のみに強い相関関係 ($R^2=0.6841$) が見られた。

E. pachyclada の場合、アルカロイド含量を高めるためには、赤玉土を用い、肥料を適量与えることでアルカロイド含量が高くなることが示唆された。

3. *E. gerardiana* を用いた NPK 比とアルカロイド含量について、相関関係を調べた結果、リン酸との間のみ弱い相関関係は ($R^2=0.2899$) がみられた。このことよりマオウ属植物のアルカロイド含量を高めるためにはリン酸が関与していることが示唆された。

審査結果の要旨

漢方生薬「麻黄（マオウ）」はマオウ属植物 *Ephedra sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* の地上茎に由来し、日本ではその供給の 100%を中国に依存している。この現状を少しでも改善するために、金沢大学が中心になり能登半島において麻黄の国内生産の試みが開始されている。しかし原植物の種苗が圧倒的に不足していることが大きな課題となっている。本研究は *E. sinica* を中心にマオウ属植物について種子、株分け、挿し木による種苗生産を検討し、効率的な方法を明らかにすることを目的としている。株分けと木質茎の挿し木について検討した結果、作業効率が悪いことおよび年数を経た親株が必要であることなど有利な方法ではなかった。次いで従来極めて困難であると報告されてきた草質茎の挿し木について検討した結果、高い発根率となる条件を見いだした。すなわち人工気象器を使用し、保管温度と照度条件を調整することで草質茎でも容易に発根することを見いだした。草質茎は多数の挿し穂の確保が可能であるため、本研究の方法を適用することで種苗の大量生産が可能である。

以上、本研究は麻黄の主たる原植物である *E. sinica* について効率的な種苗生産法を開発した。特に草質茎の挿し木の成功は画期的なことであり国産麻黄生産の可能性を大きく引き上げた。これらの特記すべき成果に対し審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。