

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

| | |
|----------|---------------------|
| 研究開発課題名 | 国産麻黄自給率 10%達成に向けた研究 |
| 代表機関名 | 学校法人東京農業大学 |
| 役職 | 教授 |
| 研究開発代表者名 | 御影 雅幸 |
| 全研究開発期間 | 平成 28 年度～令和 2 年度 |

1. 研究開発成果

漢方生薬「麻黄」は麻黄湯の他、葛根湯、小青龍湯、麻黄附子細辛湯などの処方に配合される重要な生薬である。本研究開発課題では、現在 100%を輸入に依存している漢方生薬「麻黄」の国産化を実現するため、原植物であるマオウ属植物の種苗生産を計ることを主たる目的とする。栽培種は *Ephedra sinica* Stapf を中心とし、*E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer 及び *E. equisetina* Bunge を加えた日本薬局方収載のマオウ科マオウ属植物 3 種とし、国内年間使用量約 600 トンのうち 10%相当の約 60 トンの生産を目指し、30 万株の苗を生産することを目的とする。種苗生産は、種子の生産と実生苗の作成、並びに優良株のクローン株を増殖するための株分け及び草質茎の挿し木により行う。

近年、漢方医学が国民医療の一端を担うようになり、漢方薬の使用が増加しているが、国内で使用される生薬の約 90%を輸入に依存している。このような状況のもと、生薬の国内生産を目的とする本研究は、今後も漢方医療を正常におこなっていく上で意義がある。

1) 種苗の生産研究

実生苗: 研究開始当時は優良株のクローンが得られる草質茎の挿し木による苗の生産を目指したが、*E. sinica* では発根率が低いことが明らかになり、2 年目からは実生苗の生産に重点を置き、種子の大量生産を目指した。研究の結果 60%以上の発芽率が得られるようになり、実生苗数は初年度から年次ごとに 4,657 株、29,328 株、約 52,500 株、約 71,700 株(保存種子: 35,000)を得た。最終年度は種子を 212,479 粒生産(当初目標 160,000 粒以上)し、これらを全て播種すると 120,000 株以上の苗が得られる。

挿し木苗: 草質茎を利用した挿し木では節のすぐ下で切断することで優れた発根率が得られたが、発根率は日局不適となる交雑株では高いが、純系の日局収載 3 種では株によって難易度が異なり、概ね 10%前後であり、全く発根しない株も多数あった。生産効率は悪いが優良株のクローン苗が確保できるので、多数本を挿し木した。その結果、5 年間で挿し木苗を 17,676 株生産した。*E. sinica* については最終年度は優良株のみを挿し木対象とし、888 株(年度目標 400 株)を生産した。なお、発根率を高めることができれば多数のクローン株が得られるので現在も研究を継続している。

株分け苗: *E. sinica* は日局収載の他の 2 種に比して地下茎をひいて増殖する性質が強く、

種々検討した結果、子株を採取後すぐに砂地の露地に移植することにより良好な活着率を示した。同様に、温室内に設置した砂栽培ベッドに移植しても良好な活着率を示した。その結果、5年間で株分け苗を22,251株生産し、最終年度は優良株のみを997株を作成した。なお、株分け苗を畑に定植した結果、株分け2年目で多数の毬果を着け、実生苗よりも生長が早く、収穫迄の期間短縮に有利であることが明らかになった。

以上、5年間で実生苗、挿木苗、株分け苗を総合し全198,000余株作成し、種子で保管しているものを含めると当初目標の300,000株を優に超える苗を確保し、所期の目的を達成した。

2) 栽培マオウの優良株の育種

遺伝的に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の和)が高い株、エフェドリンの占める割合が高い株、プソイドエフェドリンが占める割合が高い株などを優良株として選抜した。選別した優良株は平成30年度に志賀町第一圃場に直径40cmの塩ビ管100本を設置して移植し、令和2年にはこれらを株分けした子株を第三圃場の一画に植えつけた(総アルカロイド高含量株824株、プソイドエフェドリン高含有率株143株)。現在迄に親株として、*E. sinica*で総アルカロイド含量が1.5%以上である株、総アルカロイド含量が日局の0.7%を超えかつエフェドリンが100%を占める株、同様にプソイドエフェドリンが70%以上を占める株、またアルカロイドを全く含まない株などを選別し、それぞれ隔離して栽培している。これらの株は、今後の研究開発に極めて貴重かつ有用である。

3) 栽培マオウの化学的評価

圃場で栽培保有する株の総アルカロイド含量を日局17に準じてHPLC法で分析し評価した。本法により圃場栽培の*E. sinica*2,000株以上を分析し、総アルカロイド含量が0.3%以下と判断された株を圃場から除去した。また、アルカロイド以外の有効成分と考えられる成分として総ポリフェノール含量を定量した。化学成分として、化合物(*E*)-cinamic acid、4-Hydroxy-acetophenone及び4-Methoxybenzoic acidが単離された。

4) 栽培技術の開発

総アルカロイド含量を高めるための施肥条件:種々検討した結果、若い株では尿素水溶液を春から初夏にかけて毎週施肥することで有意に高くなった。また、緩効性窒素肥料の施肥と秋期の剪定もやや有効であることが示唆された。一方、灌水量については明確な傾向を認めなかった。現時点では十分に生長した株のアルカロイド含量を高める確実な方法を開発できていない。
栽培に適した地域の探索:石川県金沢市、神奈川県厚木市のほか、北海道網走市や沖縄県宮古島市での栽培試験を行った。その結果、株によって特性が異なるが、*E. sinica*では比較的寒冷地での栽培が適していることが明らかになった。

***E. intermedia*の栽培方法:**中国では栽培が困難とされる*E. intermedia*の栽培方法を1年生株で検討した結果、プランターに不織布を敷き、その上にパミスサンドを培養土として用いた栽培群の生長が最も良く、本種に適した条件であることが示唆された。

塩ビ管での栽培:平成28年度後半から種子生産を目的にビニール温室内に直径30cm長さ

60cm の塩ビ管 92 本を設置し実生苗1株ずつを植付けた結果、露地よりも生長がよく多量の種子を得るとともに地上部も多く収穫することができた。令和 2 年度の収穫量は1塩ビ管あたり平均 444g で、同年数の圃場栽培株の 2 倍以上の収穫量が得られた。塩ビ管栽培は除草に手間がかからず収穫しやすくまた収穫量も多いため、今後、特に優良株の効率的な栽培に有効であると考え。初期投資が必要であるが、除草の手間、収穫量などを考慮すると今後取り入れたい新技術である。

5) 圃場での栽培技術及び生産技術の開発

圃場への植え付け: 圃場への植え付け後の活着率はペーパーポット株が優れていることを明らかにした。またこれまでにビニールマルチ栽培、高畝栽培など様々な手法を検討してきた。その結果、現在では平畝で株間 40cm、畝幅 120cm で栽培することにより、レーキを装着した中型トラクターにより除草の機械化が容易に行えるようになった。

収穫物のアルカロイド含量を高めるための方策: 圃場栽培株に対する施肥条件として、尿素水溶液、固体尿素、NPK オール 14 化成肥料、発酵油粕、海水など種々検討してきたが、確実にアルカロイド含量を高める効果的な施肥方法を見出すには至らず、今後の検討課題となった。

収穫の機械化: 一人用と二人用の茶葉刈り機で地上部を刈り取ったが、刈り残しが多く、今後の検討課題である。刈り取り後の大量の収穫物の乾燥方法については、最終年度には種用ネットに入れてビニール温室などで乾燥したが、黴を防ぎ、より効率的に行うには大型の送風乾燥機などの設備が必要である。日本に適した収穫時期についても今後検討する必要がある。

マルチング: 圃場栽培において、地表を覆って生育する植物で雑草に対するマルチング効果を検討した結果、タイム(イブキジャコウソウ)が有効であることが明らかになった。背丈が低い *E. sinica* では収穫時の障害となるが、木質茎が立ち上がる *E. intermedia* や *E. equisetina* には有効であると考え、現在効果を検証している。所期の結果が得られれば除草の手間を大幅に省くことができる。

以上、栽培技術や乾燥技術に関してある程度の目処がついたが、確実に日局品を生産できる迄には達しておらず、また刈り取り方法や乾燥方法にも改善の余地がある。今後優良株の栽培面積を増やし自給率を上げることで、漢方治療に貢献でき、医療分野の進展に資する業績が達成できる。

6) マオウのアルカロイド合成遺伝子の解明 分子生物学的研究

栽培株の DNA 鑑定: 本研究開始当時、他園から *E. sinica* として導入し継続栽培してきた株の DNA 配列 (trn L/F 領域及び ITS 領域) を検討した結果、かなりの株が交雑種であることが明らかになった。これらの植物は挿し木増殖が容易であり、種苗生産株として優秀であると判断してきたが、原植物として日局に適合しないことが明らかになったことから、研究対象から除外した。その他、多数の保有株の原植物を DNA 鑑定により鑑別し、疑わしい株を排除した。

エフェドリン類合成遺伝子の解明: エフェドリン類合成経路遺伝子の網羅的な発現量解析により、エフェドリン類を合成する地上茎新芽部位で有意に発現変化する 11 遺伝子を同定し、合成の

最終段階で働く4種類の N-methyltransferase 遺伝子が活性化していることを明らかにした。特に、ノルエフェドリンをメチル化してエフェドリンにする EsNMT2-1 の発現量が顕著に活性化しており、HPLC による計測でもエフェドリン含有量が他の 3 種類より非常に多かったことから、EsNMT2-1 がシナマオウにおけるエフェドリン類合成に最も重要な役割を持つ遺伝子であることを解明した。

Ephedra plants are the original plant source of Chinese crude drug *Ephedrae Herba* known as Maou in Japanese. This research plan was made to produce the seedlings of *Ephedra* plants for domestic production. 3 species prescribed in the Japanese pharmacopoeia, especially *E. sinica* were applied for cultivation. The goal was to raise 300,000 seedlings in 5 years, from which about 60 tons of Maou could be produced annually. Seedlings were mainly produced by seed breeding, while stem cutting and stock splitting were also applied to obtain the clone strains of elite stocks.

In Japan, the use of Chinese medicine has been increasing in recent years, however, approximately 90% of herbal medicine used in Japan is imported from abroad. Therefore, this research aiming at domestic production of herbal medicine is of particular importance.

1) Seedling production

Sprouting seedling: Seed production was performed both in open-field and greenhouses. The germination rate of the seeds obtained was 60% or higher. The number of sprouting seedlings produced from the first year to the fourth year was 4,657, 29,328, about 52,500, and about 71,700 (conserved seeds: 35,000), respectively. In the final year, 212,479 seeds were obtained of which all were conserved.

Seedlings by stem cutting: The rooting rate of the cuttings from herbal stem was approximately 10% or lower, while cuttings from some individuals never rooted. As a result, a large number of cuttings were conducted, from which 17,676 seedlings were obtained in five years.

Seedlings by stock splitting: *E. sinica* tends to shoot long rhizomes underground and establish plantlets at their tips. Various methods were attempted, and an increasing survival rate was obtained by transplanting the plantlets right after being divided from the mother plants. By this method we produced 22,251 seedlings in five years.

As mentioned above, only taking into consideration the seeds which were conserved, it was possible to produce more than 300,000 seedlings of *E. sinica* in 5 years.

2) Breeding of the elite strains for *Ephedra* plant cultivation

Elite strains, such as genetically high total alkaloid containing individuals, or individuals showing high percentage of ephedrine or pseudo-ephedrine, were chosen in the cultivation field. These strains are extremely valuable and useful for future research and development.

3) Chemical evaluation of cultivated Maou

The total alkaloid content of the *Ephedra* plants cultivated in the field was chemically evaluated by the HPLC method according to the Japanese Pharmacopoeia 17. More than 2,000 individuals were analyzed by this method, and stocks containing less than 0.3% of total alkaloid were removed from the field.

4) Development of cultivation technique

It was revealed that seedling raised in Paper Pot had higher survival rates after being transplanted into the field. Other techniques such as vinyl film covering or high-ridge cultivation were also investigated. As a result, recently the seedlings were transplanted with 40 cm spacing, and the row distance was set to 120 cm so that the weeds can be removed by a medium-sized tractor with rake.

Also, even though various methods of fertilizer application were tested by using urea and other chemical fertilizers, however, no reliable method was found to increase alkaloid content in the harvested plants.

(Living mulch): Weed suppression effect of various cover crops was examined. As a result, *Thymus quinquecostatus* Celak. of the family Lamiaceae was effective. Although in case of *E. sinica* cultivation *Thymus quinquecostatus* interferes with harvesting, it might be effective on *E. intermedia* and *E. equisetina* which have longer vertical woody stems.

2. 総合評価

優れている

【評価コメント】

中国からの 100%輸入に依存している麻黄の国産化に向け、当初の目標を超える種苗を確保し、地域貢献・活性化にもつなげたことは評価できる。また、日本薬局方の規格を満たす麻黄の育成法を確立するとともに、エフェドリン含量に差異がある優良株の育種やアルカロイド合成遺伝子の解析など、麻黄の新たな臨床応用の可能性を示した。

薬用植物国内栽培拡大に向けた課題である採算性は目処が立ちつつあり、今後は、刈り取り方法や乾燥方法を改善し、生産者が導入できる栽培方法の定型化・簡素化を進めるとともに、生薬メーカー等の企業とも連携し、麻黄栽培事業が本格化されていくことを望む。

以上