# 日本医療研究開発機構　　創薬基盤推進研究事業
# 事後評価報告書

## I 基本情報

補助事業課題名：新メソッドによる薬用ニンジンの品質評価を軸とした伝統的栽培法数値化と効率的生産法の開発

Digital specification of traditional cultivation of ginseng corroborated by quality evaluation using original means and development of efficient production scheme based on the result

実施期間：令和/平成 30 年 12 月 25 日～令和 5 年 3 月 31 日(予定)


補助事業担当者　氏名：伊藤　美千穂

Michiho Ito

補助事業担当者　所属機関・部署・役職：

国立医薬品食品衛生研究所　生薬部　部長

National Institute of Health Sciences, Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, Head


## II 補助事業の概要

本研究開発課題は、国産品の生産量が激減している薬用人参（オタネニンジン *Panax ginseng* C.A.Meyer；高麗人参、朝鮮人参とも一般的に称されている）にスポットを当て、特徴的な成分であるサポニン類の含量・分布の変化および栽培中の土壌とニンジン根の無機成分、さらには菌叢の変化等の科学的データと関連付けることで、栽培法の最適化（数値化）を行うことを目的とした。

・高分解能分離用キャピラリーモノリスカラムの開発とこれらを用いたサポニンの計測法の確立

この数値化の作業の基盤となるニンジンの品質評価に、本プロジェクト内で開発したキャピラリーモノリスカラムを応用した。サポニン類は通常の高速液体クロマトグラフィー分析では分離が非常に困難であるが、開発した高分離能キャピラリーモノリスカラムでは、従来法より短時間で薬用人参が含有する三十数種のサポニン類の分析が可能となった。さらに、極少量のサンプルで計測できるサポニン類一斉分析法を完成した。

このモノリスキャピラリーカラムによるニンジンサポニン詳細分析を軸に、ほかに５つの研究開発項目をたて、アカデミアと企業の研究者が協力して研究を展開した。

・土壌中の無機成分の変化解析

経年的に栽培跡地土壌を採取して朝鮮ニンジン栽培にともなう黒ボク土壌の化学性の変化について調査した。栽培年数と土壌ｐH は有意な負の相関関係が認められ、栽培年数の増加とともに土壌の酸性化が研著であった。ま

た、同様に交換性 Ca も栽培年数と有意な負の相関関係が認められた。一方これに対し、可溶性 Al 濃度は栽培年数と有意な正の相関関係が認められた。また、交換性 Al 濃度は交換性 Ca、Mg と有意な負の相関関係が認められた。これらの結果は朝鮮ニンジンの Ca 吸収によるｐＨの低下が起こり、その結果 Al の溶出量が増加し、さらにｐＨが低下を促進することが黒ボク土壌の朝鮮ニンジン栽培で起こっていると示唆された。

・ニンジン畑土壌中の菌叢解析

大根島の４カ所の畑から、薬用人参の栽培年数（０～６年次）の違いで１７種類に分類できる土壌サンプルの提供を受け、これの菌叢解析を行った。独自のプライマーセットを開発し、検討を行った。さらにアーバスキュラー菌根菌（ＡＭＦ）を含む土壌（４圃場の各最高年次）のＤＮＡについてリボソームＲＮＡ遺伝子のＳＳＵ領域のクローンライブラリーを作製し、クローン数６０個の遺伝子解析情報（検出頻度）からＡＭＦ菌叢を推定した。その結果から大根島人参畑では、Glomus 属および Claroideoglomus 属のＡＭＦが支配的であろうと推定された。

・雲州ニンジンのより効果的・効率的栽培条件の検討

（１）適切な遮光率の検討ならびに石灰質資材施用による生育促進、（２）ニンジンの光合成能力と窒素施肥量の関係の解析、（３）慣行被覆栽培の栽培環境と簡易被覆栽培の環境条件の比較、（４）簡易被覆栽培技術の確立、について検討した。

その結果、以下のことが明らかとなった。（１）遮光率 90%の時に葉緑素濃度（SPAD 値）は高値を示し、石灰質資材の施用は施用量の増加に伴って有意に SPAD 値を上昇させる効果が認められ、ケイ酸カルシウムの場合に最も SPAD 値が高くなった。（２）施肥量の増加に伴って、葉面積は拡大する、SPAD 値は上昇する、光合成速度は有意に上昇する、葉茎および根の乾物重は上昇する、ことがそれぞれ示された。以上の成果はニンジン栽培で最も重要な窒素施肥量と光合成の関係を科学的に証明するものであり、肥培管理マニュアルを作成するための極めて重要な知見となった。また、このことは、古典的栽培法で窒素系施肥はオタネニンジンの生育を阻害するといわれてきたことを科学的に否定する結果であった。（３）伝統的な栗の木と麦わらで構成された独特な遮光栽培施設に代わり、松江方式として遮光シートとパイプハウスを組み合わせた栽培方法を採用し、簡易被覆栽培を確立する上で極めて重要な環境パラメーターを得た。（４）（３）の結果をもとに、新規栽培者である渡部浩氏（八束町遅江）の圃場にて、簡易パイプハウス（1.7m×20m 4 本）を設置し、被覆資材を変えた 4 パターンにおける雲州人参の生育状況や環境温度等を比較した。その結果、簡易被覆栽培の栽培環境の把握ならびに生育環境に関する詳細なデータが得られるとともに、JA および生産者との技術情報の共有化が進んだ。

・ニンジン栽培技術の応用検討

大根島のオタネニンジン畑土壌由来の病害性真菌株を単離、同定し、被験菌株とした。真菌細胞壁を強力に溶解する糖加水分解酵素種が多く含まれる菌株の抽出物を、抗真菌活性を指標とし、各種クロマトグラフィーを用いた分画実験により精製を繰り返し、活性のあるたんぱく質を含む画分を得た。接種実験等も加えながら、分子構造を明らかにする作業を継続中である。

・ニンジンの市場導出に向けた検討

研究班の成果実践の場として、参画企業の複数の関連圃場にてオタネニンジンの試験栽培を行った。そのうち、北海道磯谷郡蘭越町のものは、町農政部および町内農家との連携を得て継続中である。また、栽培品の加工や非

医薬品としての利用促進のための商品開発も進めており、具体的な商品化候補品が定まった。

Our previous research focused is on *Panax ginseng* C.A.Meyer, also known as Asian Ginseng, whose domestic production has declined significantly. The aim of the research was to determine changes in saponin (ginsenoside) content during cultivation and how inorganic, as well as microflora affects it. Thereby, scientifically determine the best cultivation practice for Asian Ginseng.

・Development of high-resolution monolithic capillary liquid chromatography column

To determine scientifically the quality of cultivated Asian Ginseng, we utilized a high-resolution monolithic capillary liquid chromatography column, which was specially developed for this project. Ginsenoside analysis is notoriously difficult using traditional High Performance Liquid Chromatography (HPLC) due to its similarity, but the development of the new column allowed us to analyze more than 30 types of ginsenoside effectively and with shorter time. This column's ability to effectively analyze ginsenoside content became the basis for pursuing five other research topics.

・Analysis of changes to inorganic materials in soil

We researched on how cultivation of Asian Ginseng chemically changes the andosol. This research has revealed the correlation between cultivation length and decline in pH, as longer the cultivation lead to increased acidity of soil (Chart 1). In addition, the amount of exchangeable calcium also decline with increased length of cultivation (Chart 2). Consequently, amount of soluble aluminum increased with increased length of cultivation (Chart 3). This in turn lead to correlation between exchangeable aluminum content and declining exchangeable calcium and magnesium (Chart 4). From these results, we have theorized that Asian Ginseng absorbs calcium as it grows, resulting in pH decline, which leads to increase in soluble aluminum that further decrease the pH level.

・Analysis of soil microflora of Asian Ginseng field

Analysis of microflora from 17 soil samples from four Asian Ginseng fields at Daikonjima, Shimane Prefecture were undertaken. Original primer set were developed and tested for this purpose. In addition, to analyze DNA of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the soil samples, clone library of SSU rRNA was also developed, which was used to predict the dominant microflora. Analysis of the soil samples revealed that the dominant microflora at Daikonjima was *Glomus* species and *Claroideoglomus* species.

・Research into a more efficient and effective cultivation of Unshu (Asian) Ginseng

Following factors were analyzed: (１) Growth difference via difference in shade rate and amount of calcium. (2) Relationship between photosynthesis and amount of nitrogen fertilizer. (3) Difference between traditional shading cultivation and simplified shading technique. (4) Development of a new simplified shading technique.

Based on these analyses, following factors were determined: (1) shading rate of 90% resulted in highest chlorophyll concentrations (SPAD level), and increasing the amount of calcium also increased the SPAD level. Most efficient form of calcium was calcium silicate. (2) Increasing the amount of fertilizer increased the photosynthesis rate, SPAD level, surface area of the leaf, and dry weight of the leaves and roots.

These result scientifically proved the correlation between nitrogen fertilizer and Asian Ginseng photosynthesis capability, and one of the most important information when formulating a new cultivation manual, as traditional cultivation manuals has stipulated that nitrogen fertilizer inhibit growth of ginseng. (3) Alternative to the traditional shading cultivation using chestnut

timber support and hay roof, we have developed a new Matsue-style cultivation technique, using tarp and metal pipes. This new cultivation is simpler to set up while achieving similar results. (4) Based on the results achieved in (3) Four Matsue-style huts with different tarp materials were set up at Mr. Ko Watanabe's field (Osoe, Town of Yatsuka), to determine optimum Matsue-style cultivation. This has allowed detailed information on the new cultivation technique, as well as sharing these information to Japan Agricultural Cooperatives and local ginseng producers.

・Development of new application through ginseng cultivation

By first isolating and determining the pathogenic fungi found within the soil of the ginseng field of Daikonjima, it was used to search for microbes capable of releasing hydrolytic enzymes that will breaking down its cell wall. This was done via fractionation using chromatography, resulting in the finding of several active proteins. Determination of molecular structure, as well as its activity is currently ongoing through inoculation experiments.

・Determining ways to commercialize Asian Ginseng products

To put all the research achievement into practice, corporate partner of the project cultivated Asian Ginseng at various locations. One of which is a partnership with the local government of Rankoshi, Hokkaido. Field trials of Asian Ginseng at Rankoshi via assistance from local government and growers are currently ongoing. In addition to cultivation of ginseng, the company is also in the process of determining best way to process Asian Ginseng for non medical use, as well as development of products using Asian Ginseng.