

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 創薬基盤推進研究事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名 : (日本語) 国産麻黄自給率 10%に向けた研究
(英語) Studies for producing domestic ephedra in the self-sufficiency ratio of 10 %.

研究開発担当者 (日本語) 東京農業大学・教授・御影雅幸
所属 役職 氏名 : (英語) Masayuki MIKAGE. Professor, Tokyo University of Agriculture.

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) マオウ属植物の種苗生産研究
開発課題名 : (英語) Studies on seedlings production and cultivation techniques of ephedra.

研究開発分担者 (日本語) 東京農業大学・教授・宮本太
所属 役職 氏名 : (英語) Futoshi MIYAMOTO. Professor, Tokyo University of Agriculture.

研究開発分担者 (日本語) 東京農業大学・准教授・三井裕樹
所属 役職 氏名 : (英語) Yuki MITSUI. Associate professor, Tokyo University of Agriculture.

研究開発分担者 (日本語) 金沢大学医薬保健学域薬学系・准教授・佐々木陽平
所属 役職 氏名 : (英語) Yohei SASAKI. Associate professor, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University.

研究開発分担者 (日本語) 金沢大学医薬保健学域薬学系・助教・安藤広和
所属 役職 氏名 : (英語) Hirokazu ANDO. Assistant professor, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University.

研究開発分担者 (日本語) 昭和薬科大学薬学部・准教授・中根孝久

所属 役職 氏名： (英 語) Takahisa NAKANE. Associate professor, Showa Pharmaceutical University.

研究開発分担者 (日本語) 東京薬科大学・助教・三宅克典

所属 役職 氏名： (英 語) Katsunori MIYAKE. Assistant professor, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences.

研究開発分担者 (日本語) 医療法人社団ヤベツ会・理事・中出喜美子

所属 役職 氏名： (英 語) Kimiko NAKADE. Director, Medical Corporation YABETSUKAI.

研究開発分担者 (日本語) 一般財団法人東洋医学資源生薬研究財団・専務理事・野村行宏

所属 役職 氏名： (英 語) Yukihiro NOMURA. Managing director, General Foundation Corporation TOYO-IGAKU SIGEN-SHOYAKU KENKYU-ZAIDAN.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(1) 種苗の生産研究

実生苗の生産：国内産種子の生産を目的に *Ephedra sinica* Stapf の主として雌株を大型ポットに1株ずつ計152株植え付けた。新たに植え付けた株から得た種子数は少なかったが、その他の保有株から総数4,829粒の種子を収穫した。今年度産及び過年度産の種子から実生苗4,657個体を生産した。

挿し木苗の生産：*E. sinica*の草質茎の挿し木を行い、6,359株の新苗を生産した。

株分け苗の生産：*E. sinica*定植個体の地下茎から生じた子株を親株と切断し、そのまま2ヶ月以上放置すると小株の根が発達して活着率が上がる方法を開発した。その結果、4,038株の新苗を生産した。

以上、本年度の種苗総生産数は15,054株であった。計画数より少なかった要因として、種子生産用に植え替えた株の毬果の着果が悪かったこと、挿し木による発根率が低かったことが挙げられ、次年度の検討課題とする。

(2) 栽培マオウの優良株の育種

石川県の志賀町圃場株の中から、総アルカロイド中のエフェドリンの割合が100%である株を選抜し、そのクローン株を株分け法により28株作成した。これらの株は今後の種苗登録に利用することができる。また、さらなる優良株の作出を目的に、*E. sinica*の雌株と*E. sinica*でアルカロイド含量が高い雄株、また他の日局種の雄株を交配させ、それらの種子から計19株の発芽苗を得て現在育成中である。

(3) 栽培マオウの化学的評価

能登の圃場で栽培した211株について総アルカロイド含量を測定した結果、平均0.85%であった。その中でJP17の基準(0.7%以上)に適合する株は130株(全体の62%)であった。また、2013年から4年連続してアルカロイド含量の変化を追跡した29株については、2016年収穫株の総アルカロイド含量の平均は0.64%で、4年連続でJP17の規定値を満たさなかった株は29株中12株認められた。後者は遺伝的に含有率が少ない株であると判断し、圃場から撤去し植え替えた。一方で4年連続前年度より高いアルカロイド含量を示し

た優良株も認められ、今後は優良株として増殖を目指す。

(4) 栽培技術の開発

栽培が困難とされる *Ephedra intermedia* の栽培方法の確立を目的として、ワグネルポット、プランター、市販のれき耕栽培装置などを利用して1年生株を材料に比較栽培した結果、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。また、施肥が生長に及ぼす影響を検討し、元肥・追肥と生長の相関や生長が9月に停止することを明らかにした。

(5) 圃場での栽培技術及び生産技術の開発

新たに、マルチ栽培及び高畝栽培を試験的に開始した。マルチング（黒）は除草対策とともに保温効果が期待できる。2017年度にはその効果の評価を行う。

(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）

他園から *E. sinica* として導入し継続栽培してきた株の DNA 配列を検討した結果、いくつかの株が交雑種であることが明らかになった。これらの植物は比較的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、原植物として日本薬局方に適合しないことが明らかになった。

エフェドリンの生合成に関与する酵素・遺伝子を探索する目的で、フローサイトメトリー解析により *Ephedra* 属植物7種のゲノムサイズを推定した結果、4倍体種の *E. sinica* は128億4千万塩基対と大きく、全ゲノム解読は困難であると判断した。

Outline of results (Summary)

(1) Research on sprout production

Seedling production: To produce seeds of ephedra plants domestically in Japan, totally 152 female plants of *E. sinica* were planted individually in large pots for breeding. Totally 4,829 seeds have been obtained from the plants cultivated in both Kanazawa University and Tokyo University of Agriculture, from which 4,657 seedlings have been produced.

Plant propagation by stem cuttings: Vegetative reproduction by herbaceous stem cutting was put into practice, and a total of 6,359 new ephedra plants have been propagated.

Plant propagation by division: A new method which increase the survival rate of new ephedra plants by division was developed: small new individuals formed by stolon underground were cut off from the parent plant and left in the field for 2 months, then the small plant with sufficient amount of roots could be obtained. By using this method 4,038 new ephedra plants have been propagated.

Overall, totally 15,054 seedlings and young plants have been propagated this year. Further studies on how to improve the fruiting rate and rooting rate will be done next year.

(2) Cultivar development and selection

Among more than 1000 individuals cultivated in Shika-machi, Ishikawa prefecture, those containing only ephedrine (the ratio of ephedrine to total alkaloid was 100%) were selected and multiplied by division. A total of 28 clones have been propagated and will be applied for variety registration. Moreover, to produce new cultivars, females of *E. sinica* were crossed with high alkaloid content males of *E. sinica*, or with males of other species stipulated in JP-17.

(3) Chemical evaluation of cultivated Ephedra plants

The total alkaloids (as the total of ephedrine and pseudoephedrine) of 211 individuals cultivated in Shika-machi were analyzed. The result showed that the average total alkaloid content was 0.85%, which met the standard set in JP-17.

(4) Development of cultivation technology

The members of Showa Pharmaceutical University studied the effective cultivation method for *E. intermedia* which has been considered as a difficult plant to cultivate. As a result, the seedlings grew best in the pumice sand filled planter put non-woven fabric on the bottom. It was also revealed that *E. intermedia* stopped growing in September.

(5) Development of technologies used in field cultivation

Mulching with plastic film and high ridge plant system were newly started in ephedra field. It can be expected that application of black plastic film as mulch will inhibit weeds and warm the soil. The effects of these measures will be evaluated in 2017.

(6) Molecular biological study

Some ephedra plants introduced from other botanical gardens as *E. sinica* were identified to be hybrids by analyzing their DNA sequences of ITS region. Though these hybrids are superior in young plant production by cutting, they do not meet to JP-17. This result suggests that it is important to check the exact species before planting in the field. Moreover, to discover the candidate genes and enzymes potentially involved in ephedrine biosynthesis, the genome sizes of *E. sinica* and the other six species were estimated by flowcytometry. The result showed that *E. sinica* was a tetraploid species and the estimated genome size was approximately 12.8 billion.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3 件、国際誌 0 件）

1. 安藤広和・草場大作・御影雅幸・佐々木陽平. マオウ属植物の栽培研究（第9報）マオウ属植物 Ep-13 草質茎のアルカロイド含量の局在性について. 薬用植物研究. 2016, 38 (2), 10-16.
2. 安藤広和・北村雅史・佐々木陽平・北岡文美代・御影雅幸. マオウ属植物の栽培研究（第8報）旧国立衛生試験所が導入し保存されてきたマオウ属植物 Ep-13 の遺伝的背景について. 薬用植物研究. 2016, 38 (2), 1-9.
3. 安藤広和, 倪斯然, 佐々木陽平, 御影雅幸. マオウ属植物の栽培研究（第7報）圃場栽培株の総アルカロイド含量の経年変化と日局麻黄の生産. 薬用植物研究. 2016, 38 (1), 20-27.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. *Ephedra* 属植物 Ep-13 系統株の性質に関する研究. ポスター. 草場大作, 安藤広和, 佐々木陽平, 御影雅幸, 2016/9/24, 国内.
2. 漢方生薬「麻黄」の国産化研究. ポスター. 安藤広和, 倪斯然, 佐々木陽平, 安井廣迪, 御影雅幸, 第33回和漢医薬学会学術大会, 2016/8/27, 国内. (優秀発表賞受賞)
3. マオウの草質茎挿し木による種苗生産研究. 口頭. 工藤喜福, 倪斯然, 御影雅幸, 第17回加賀・能登の薬草シンポジウム, 2016/8/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 漢方生薬の国産化, 漢方産業化推進研究会平成28年度第5回セミナー, 御影雅幸, 東京, 2017/3/8, 国内.
2. 漢方生薬の国産化に向けて, 御影雅幸, 日本東洋医学会東京支部会講演会, 2017/3/5, 国内.
3. スーパー農学の知恵: 高品質な生薬栽培への挑戦, 御影雅幸, 森野藤助賽郭没後250年記念講演会「地域文化力と6次産業化の融合」, 東大寺ミュージアム, 奈良市, 2017/1/18, 国内.
4. 日本から漢方薬がなくなる!? ~農学における漢方生薬の栽培と生産~, 東京農業大学「食と農」の博物館 ワークショップ, 御影雅幸, 東京, 2016/11/5, 国内.
5. 漢方生薬の異物同名品と麻黄の国産化研究、おけらの会, 御影雅幸, 秩父市, 2016/5/15, 国内.
6. 麻黄の国産化研究, 御影雅幸, 256回大阪生薬協会技術部会, 2016/4/25, 国内.

(4) 特許出願

該当なし