

Study on the Variation of Alkaloid Content in Ephedra Plants

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/40291

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



マオウ属植物のアルカロイド含量の変異に関する研究

Study on the Variation of Alkaloid Content in *Ephedra* Plants

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻

生理活性物質化学講座

松本 昌士

Abstract

In *Ephedra* plants, six ephedrine type alkaloids were found. However the content of alkaloids except (-)-ephedrine and (+)-pseudoephedrine are told rather low, and their contents are not described in the 16th Revision of the Japanese Pharmacopeia. In addition, the alkaloid composition ratio of wild *Ephedra* plants varied widely. This cause is remain to be clarified whether environment factors or genetic factors.

We surveyed wild plants and obtained 355 samples (in part, cultivated plants) in Inner Mongolia, Gansu and Xinjiang of China. Secondly, we cultivated genetically stable clonal strains through cuttage/division to investigate the influence of growth environments and the alkaloid content. Then we determined the quantity of alkaloid contents by HPLC, to consider the cause of variation of alkaloid content.

There were marked changes in the alkaloid composition ratio of wild plants in areas where both male and female clusters coexisted. However, those propagated by separating the roots showed a specific tendency regardless of the cultivation area (Wakayama, Tanegashima). Those propagated by separating the herbaceous stem showed a specific tendency regardless of the soil or harvest time. And wild plants that (+)-norpseudoephedrine composition ratio were higher were found. Those plants grew naturally in different areas which habitats were diverse.

These findings suggest that the ephedrine alkaloid composition ratio of *Ephedra* plants depend on genetic factors, but not on environmental factors or the growth period.

【序論】

漢方生薬「麻黄」の原植物である *Ephedra sinica* Stapf などのマオウ科 (*Ephedraceae*) マオウ属 (*Ephedra*属) 植物は、日本には自生していない。そのため日本国内で消費する麻黄は全てが輸入品であり、近年は中国からの輸入に100%依存しているが、中国では野生地の農地への転用、過放牧などによる原植物の資源枯渇がかねてより懸念されている。麻黄は葛根湯、小青竜湯、防風通聖散などの主要処方に配合され、漢方エキス生産にとっても、極めて重要な原料生薬であるため、安定して入手する手段の確保が必要である。また漢方生薬は医薬品であるため、量的確保のみならず、品質が安定したものを安定的に入手する必要がある。天産物である漢方生薬は合成の医薬品と比較して品質のばらつきが大きい。品質のばらつきは薬効の不確実さの原因となり、使用者への不利益に直結する重要な問題となるため、品質のばらつきに及ぼす要因の解明は重要である。ばらつきの主な要因として、種や個体に依存する先天的な要因（遺伝的要因）、後天的な要因（環境要因）が挙げられる。主な薬効成分が、遺伝的要因ではなく、環境要因に強く影響を受けるとすると、産地などの違いが、そのまま化学的品質の変動につながる可能性がある。本研究では、エフェドリン系アルカロイドに着目し、中国市場品、野生品、栽培品のマオウ属植物についての研究を行なった。

麻黄中のエフェドリン系アルカロイドは6種が見出されているが、E及びPE以外の(-)-norephedrine (以下NE), (-)-methylephedrine (以下ME), (+)-norpseudoephedrine (以下NPE), (+)-methylpseudoephedrine (以下MPE)

は第16改正日本薬局方には含量の規定が無い。またE及びPEについて、日局16の含量規格は合計値（E+PE \geq 0.7%）であり、それぞれの含量についての規定はない。しかし、この2つの化合物についてはそれぞれ異なる薬理作用が報告されており、組成比（アルカロイドの合計含量に対する各アルカロイド含量の占める割合）に応じて使い分けをすることが望ましい。野生品のアルカロイド組成比に影響する要因としては、種間差（遺伝的要因）、地域性（遺伝的要因）の両方が報告されている。しかし、これらの報告は平均値での傾向であり、個体ごとに比較をすると、同じ産地内でもアルカロイド組成比の変動は大きく、EとPEの組成比が逆転しているケースも認められる。野生では、環境要因と遺伝的要因が混在しているため、アルカロイド組成比に影響を及ぼしている要因については、現在まで明らかにされていない。本研究では、同一個体と考えられる野生品から得た標本、クローン株の栽培品のアルカロイド含量について評価し、アルカロイド組成比に影響を及ぼしている要因の解明を行なった。

【材料と方法】

実験材料は、以下の通りである。

- 1). 野生品（本学自然科学研究所蔵標本）（*E. sinica*）：採取地点：河北省承德市（ほぼ全ての草質茎で雄花があり、雌花は確認できなかった自生地，alt.1345m），標本 No. 02139，採取日：2002.6.10，サンプル数：9。
採取地点：内蒙古自治区包頭市（雌雄不明，根茎まで掘り上げた個体，alt.1380），標本 No.100720-10，採取日：2010.7.20，サンプル数：5。採取地点：内蒙古自治区錫林郭勒盟（雌雄不明，根茎まで掘り上げた個体，alt.1060），標本 No.7081801，採取日：2007.8.1，サンプル数：5。
- 2). 日本国内栽培品
 - ① 詳細不明種（株分け，露地栽培）。種苗の由来：*Ephedra distachya*として導入されたが，詳細については不明である種苗 Ep-13（もとは1個体）。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，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，種子島 26。
 - ② *E. sinica*の栽培品（挿し木，ポット栽培）。種苗の由来：中国（採取時期不明），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，本学薬草園）のロックガーデンで栽培した *E. sinica*（1個体）。栽培地：本学薬草園。栽培方法：挿し木により繁殖したもの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：①2011.11.22，②2012.9.18。サンプル数：①12，②11。
 - ③ *E. sinica*の栽培品（複数の実生株，ポット栽培，平山の学位論文より）。種子の由来：中国内蒙古自治区通遼市の自生地において，2003年に入手した複数個の種子。栽培地：本学薬草園。栽培方法：1/5000a 又 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。①市販土（「プランターの土」，秋本天産物（株）），②赤玉土，③市販土+赤玉土（28:18，体積比），④市販土+土壌アルカリ化剤，⑤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：人工海水又はその希釈液を週に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 年～2010 年の 9 月。サンプル数：103 サンプル (栽培中に枯死した個体があり，2008 年は 99 サンプル，2009 年は 95 サンプル，2010 年には 89 サンプル)

エフェドリン系アルカロイド 5 種 (E, PE, NE, NPE 及び ME) の含量は，HPLC 法により定量した。HPLC 条件：カラム：YMC-ODS A-312 (6.0mmI.D×150mm，粒子径 5 μ m)，移動相：SDS 水溶液(ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)5.0g を蒸留水 640mL に溶解)／アセトニトリル／リン酸混液 (640:360:1)，カラム温度：40 $^{\circ}$ C，注入量：10 μ L，流速：1.0mL/min，測定波長：210nm。

【結果】

1. 野生品 (本学自然科学研究所蔵標本)

E 及び PE 含量については，産地ごとに E 及び PE 含量の間に強い正の直線性が認められた (Fig.1B)。根茎でつながった同一個体の草質茎同士では相関係数 0.95 以上で，また，雄株のみの群生地の間は，相関係数が約 0.86 で，同一個体と比較するとやや低かった (Fig.18B)。

2. 日本国内栽培品

アルカロイド含量 (E+PE) については，個体ごとの数値の変動が顕著に大きく，和歌山県産の Ep-13 ではアルカロイド含量 (E+PE) 0.11～1.16% と 10 倍以上，本学薬草園の *E. sinica* (挿し木・鉢植え，2011.11.22 採取) では 0.04～0.85% と約 20 倍の差が認められた (Fig.2A)。E 及び PE 含量については，栽培地，栽培条件が異なっても，株分け又は挿し木のような栄養繁殖で増殖した個体間ではアルカロイド組成比のパターンがほぼ同じで，E 及び PE 含量の間に強い正の直線性が認められた (Fig.2B)。

中国で入手した種子から得た実生苗の個々のアルカロイド組成 (E/E+PE) について，3 年生から 6 年生までの 4 年間追跡調査を行っており，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，個々のアルカロイド組成 (E/E+PE) は，強い正の直線性 (相関係数 $r > 0.95$) が認められた (Fig.3)。相関係数については，3～4 年生の間よりも 4～5 年生，5～6 年生の間の方がわずかに高かった。

【考察】

単一個体の野生品 (過去に採取した本学所蔵標本)，単一個体をクローンで増殖した栽培品の E 及び PE についてアルカロイド組成比の比較を行った結果，栽培地，栽培条件，生育年数が異なっても E 及び PE 含量の間に強い正の直線性が認められた (Fig.1～3)。即ちアルカロイド組成比は，環境や生育年数などの後天的な要因ではなく遺伝的要因に強く影響を受けていることが明らかとなり，遺伝的に同じ個体を安定して入手することができれば，アルカロイド組成比が安定した麻黄を安定して入手することが可能であることが分かった。しかし，野生では単一の個体を由来とするマオウを継続して入手することは困難である。河北省の雄株のみの自生地は広面積であったが，極めて稀有な例である。根茎でつながった同一個体については，地上から判断をすることは困難である。このため，目的とするアルカロイド組成比の種苗を安定して入手するためには，株分け，挿し木，組織培養などの無性繁殖による栽培化をすることが最も適した手段であると考えられる。

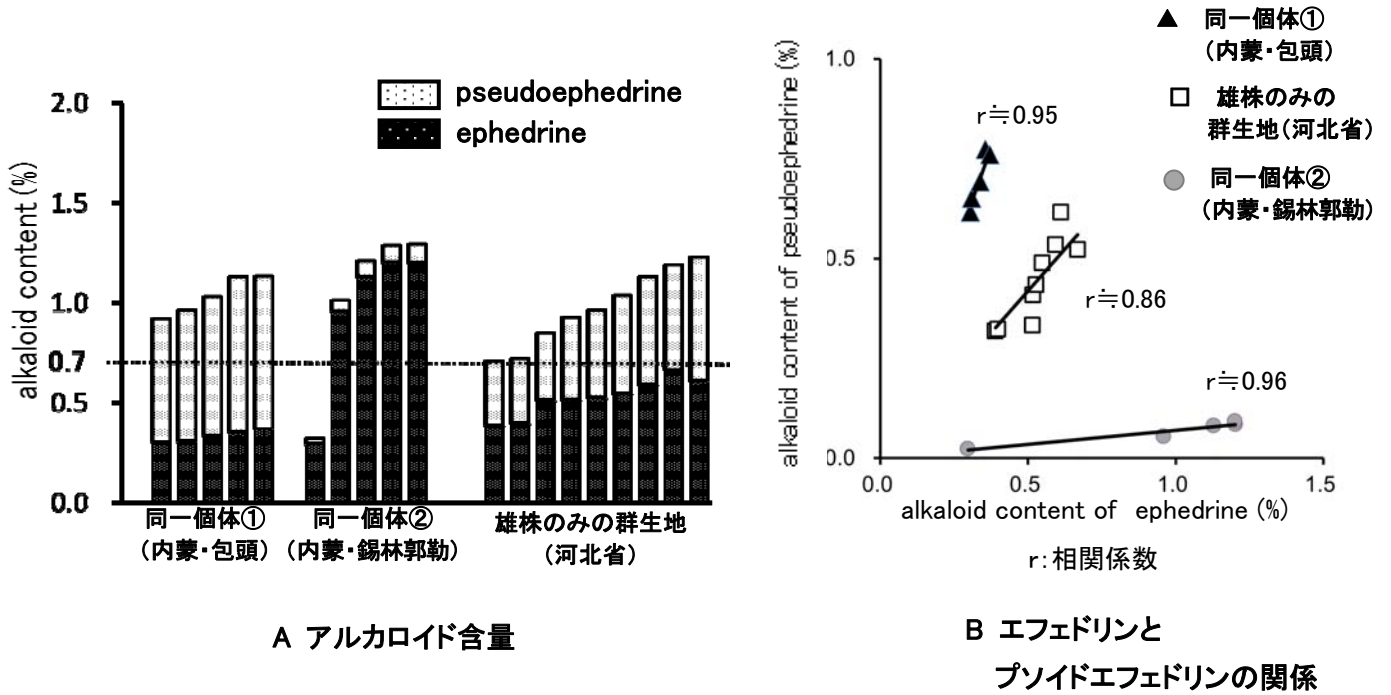


Fig.1 同一個体または雄株のみの群生地から入手した *Ephedra sinica* のアルカロイド含量 (ephedrine 及び pseudoephedrine) 及びその組成の比較

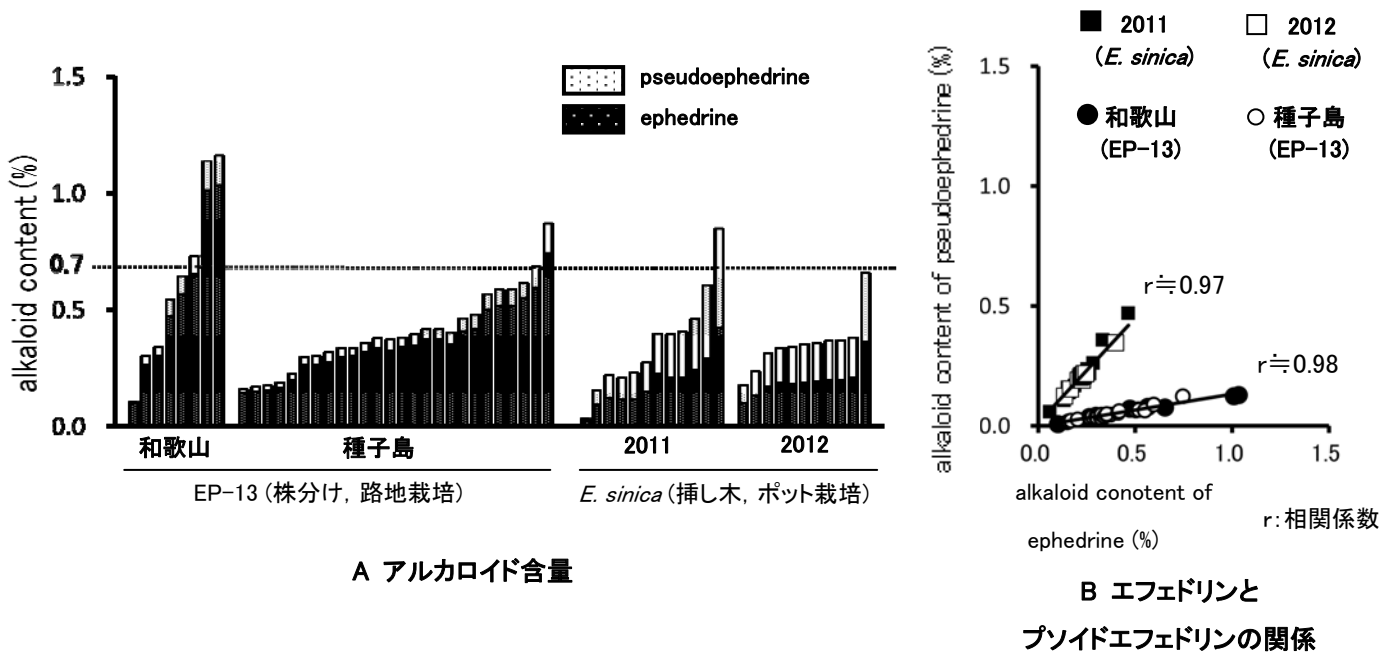
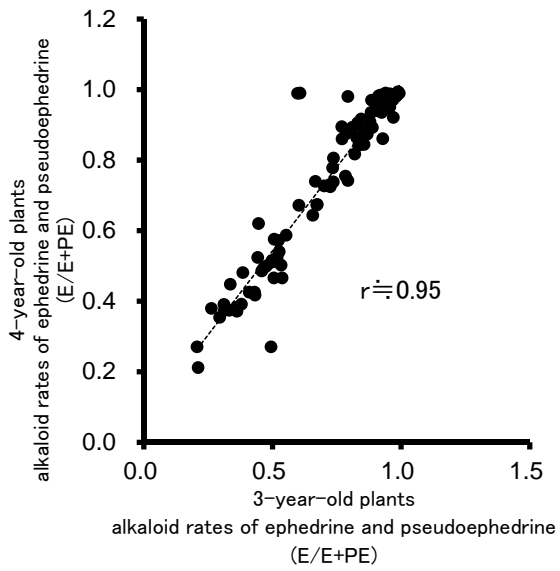
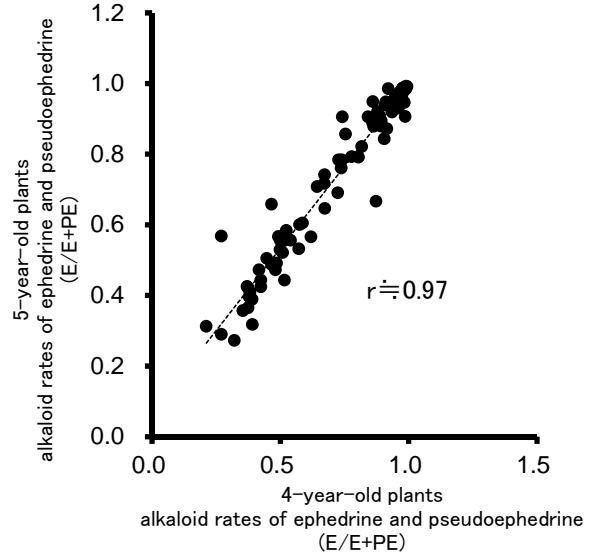


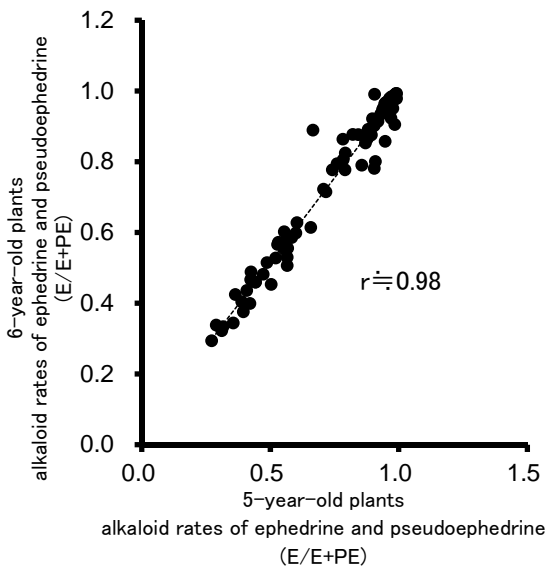
Fig.2 1 個体から増殖した栽培品のアルカロイド含量 (ephedrine 及び pseudoephedrine) 及びその組成 (Ep-13 及び *Ephedra sinica*)



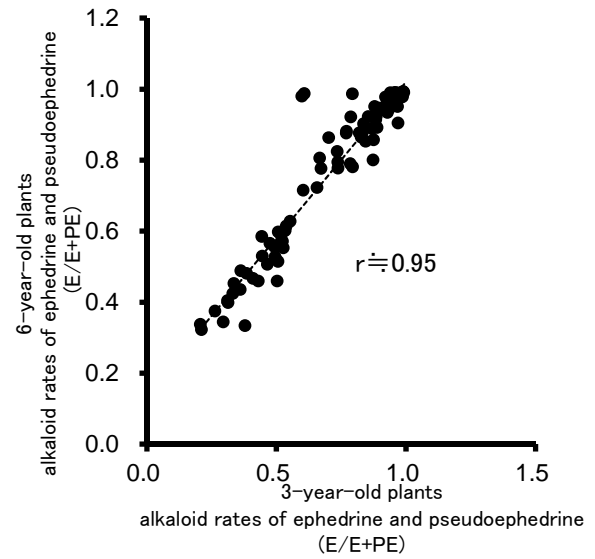
A (3年生と4年生)



B (4年生と5年生)



C (5年生と6年生)



D (3年生と6年生)

Fig.3 金沢大学薬草園で4年間栽培した *Ephedra sinica* のアルカロイド組成(ephedrine 及び pseudoephedrine)の経年変化

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

マオウ属植物のアルカロイド含量の変異に関する研究

2. 論文提出者 (1) 所 属 生命科学 専攻 生理活性物質科学 講座
(2) 氏 名 松本 昌士

3. 審査結果の要旨（600～650字）

マオウ科の *Ephedra sinica* Stapf を始めとする同属植物の地上茎が、漢方生薬「麻黄」として種々の漢方処方に配合されている。日本薬局方は麻黄について、含有アルカロイドの(-)-ephedrine (Eph) と (+)-pseudoephedrine (P-Eph) の総和が0.7%以上であることを規定しているが、個々の含量については規定がない。両アルカロイドはそれぞれ薬効が異なり組成に応じた使い分けが望ましいと考えられるが、現時点ではそうした生薬が得られていない。そこで、本研究では各アルカロイドの組成比が安定した生薬が得られるか否かを検討する目的で、野生及び栽培品マオウのアルカロイドを調査した。その結果、種子繁殖株では比率の変動が大きい、雄株のみの群落で得た野生品や、株分けや挿し木によって得られたクローン株の栽培品では Eph と P-Eph の組成比がほぼ一定であった。またこれら組成比の経年変化を追跡した結果、前年度との間に強い相関を認めた。以上のことから、各アルカロイドの組成比は環境要因等ではなく遺伝的な要因に支配されており、選別した株を栄養繁殖して栽培することにより目的とするアルカロイド組成の麻黄が得られることを明らかにし、葛根湯や麻黄湯など発汗解表・宣肺平喘を期待する処方には Eph 組成比の高い麻黄を、防風通聖散のような消炎止痛・減肥を期待する処方には P-Eph 組成比の高い麻黄を使用することを提案した。

本研究結果は、*Ephedra* 属植物の各アルカロイド組成比が個体の遺伝的要因に依ることを明らかにした画期的なもので、漢方薬のより細やかな運用を進める上で価値が高く、博士（薬学）の価値があると判断した。

4. 審査結果 (1) 判定 (いずれかに○印) 合格 ・ 不合格
(2) 授与学位 博士 (薬学)