

漢方生薬当帰の生産工程の効率化と品質に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-11-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 工藤 喜福, KUDO Yoshitomi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00068064

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



学 位 論 文

漢方生薬当帰の生産工程の効率化と品質に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科創薬科学専攻（博士後期課程）
分子生薬学研究室
学籍番号 1929012006
学生氏名 工藤 喜福
主任指導教員名 佐々木 陽平
論文提出 令和 4 年 2 月

目次

序論	1
本論	
第1章 トウキ苗生産へのペーパーポットの応用	
第1節 ペーパーポットを用いて育苗したトウキ苗の生育評価方法の開発	5
第1項 緒言	
第2項 材料と方法	
第3項 結果	
第4項 考察	
第2節 ペーパーポットを用いた冬期屋内育苗方法の開発	12
第1項 緒言	
第2項 材料と方法	
第3項 結果	
第4項 考察	
第5項 小括	
第3節 ペーパーポット苗の生育度合いの差が定植後の生育に及ぼす影響	27
第1項 緒言	
第2項 材料と方法	
第3項 結果	
第4項 考察	
第4節 ペーパーポット苗から調製した当帰の品質評価	32
第1項 緒言	
第2項 材料と方法	
第3項 結果	
第4項 考察	
第2章 (Z)-ligstilide 含量の個体間差異と局在性	40
第1節 緒言	
第2節 材料と方法	
第3節 結果	
第4節 考察	
総括	50
実験の部	51
謝辞	55
引用文献	56

略語一覧

本論文では以下のとおり略語を使用する.

本論文全体

JP18 : 第 18 改正日本薬局方

PP : ペーパーポット

PP 苗 : ペーパーポットを使用して生産したトウキ苗

第 1 章

TS : 伝統的（慣行的）な手法を用いて生産したトウキの苗

PT : PP 苗を用いて生産した当帰

TT : TS を用いて生産した当帰

ZL : (Z)-ligustilide

第 2 章

トウキの根を分類し、各部位に以下なように略称をつけた.

RH : 根頭部

RM : 主根

RL : 側根

RHU : 根頭上部

RHL : 根頭下部

RHUO : 根頭上部のうち表皮から 5 mm の部分

RHUI : 根頭上部から表皮から 5 mm を除いたもの

RHLO : 根頭下部のうち表皮から 5 mm の部分

RHLI : 根頭下部から表皮から 5 mm を除いたもの

RM1 : 直径 25.0mm 以上の主根

RM2 : 直径 15.1–25.0mm の主根

RM3 : 直径 8.1–15.0mm の主根

RM4 : 直径 8.1mm 未満の主根

RL1 : 直径 8.0 mm 以上の側根

RL2 : 直径 5.1–8.0 mm の側根

RL3 : 直径 3.1–5.0 mm の側根

RL4 : 直径 1.1–3.0 mm の側根

RL5 : 直径 1.1mm 未満の側根

PC : 主根と側根の合計から RL5 を減じたもの (RM + RL - RL5)

序論

第18改正日本薬局方（以下JP18）において当帰はトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa又はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino (*Umbelliferae*)の根を、通例、湯通したものであると規定されている[1]。当帰の性状は太くて短い主根から多数の根を分枝してほぼ紡錘形を呈し、特異なにおいがあり、味は僅かに甘く、後にやや辛い[1] (Fig. 1) とされている。また、薄層クロマトグラフィーによるZLとscopoletinの確認試験が規定されているほか、希エタノールエキス含量はJP18で35.0% 以上含むと規定され[1]、医薬品として利用するためには種々の規定を満たす必要がある。当帰は補血強壮、婦人病の治療薬として繁用され[2]、四物湯や当帰芍薬散、当帰建中湯などの漢方処方に配合される。日本で使用される当帰には大和当帰と北海当帰の2種類がある。大和当帰はトウキ *Angelica acutiloba* (Siebold et Zucc.) Kitag. の根から大和地方（平安時代頃から称されている行政区分・地名であり、現在の奈良県に相当する地域）の伝統的な栽培調製技術を用いて生産される当帰であり、収穫後、泥のついた状態で稻架（ハサ）などに掛け2-3ヶ月間天日乾燥、自然乾燥（はさ掛け）させた後 (Fig. 2)、湯もみと称される温浸を伴う揉み洗い加工が行われる。湯もみは浸けこみと揉み洗いの2工程があり土砂の除去、整形、防虫や保存効果を高めるために行なわれる[3] (Fig. 2)。一方、北海当帰はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* (Siebold et Zucc.) Kitag. var. *sugiyamae* Hikino を原植物とするが、大和当帰に比べて品質が劣るとされる[4,5]。また、中国でも当帰という名の生薬が使用されているがその原植物は *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels であり、JP18の規定を満たさない。大和当帰という名称は江戸時代後期の「古方薬品考（1841年）」に初出する[6]。一方、日本国内における当帰の産地は1600年代後半の文献からも確認され、すでに江戸時代には日本の国内で当帰の栽培が行われていたと考えられる[3]。2005年の国内生産量は約197トンで自給率は約44%と高く、その維持が重要視されていた[3]。しかし、現在は中国で日本由来のトウキの種子を用いて大和当帰に類する技術で調製した当帰が輸入されるようになった [3,7]。その後、2016年には日本国内で使用される当帰の約8割を中国からの輸入に依存するという結果に至っている[8]。この様に原料の生薬を中国などの海外に依存する流通体系は他の漢方生薬も同様である。一方で、近年漢方製剤の需要は増加しており、生薬の持続的な供給や品質面の不安から、国産生薬の生産を促進する動きが各地で見られる[7]。しかしながら、近年は当帰の生産者数は減少している。原因としては生産者の高齢化と新規参入者の減少、中国産との価格競争が挙げられる。当帰の生産方法は江戸時代より続く伝統的な手法を踏襲しており、画期的な効率化は図られていない。これらの課題を解決するためには生産コストの削減、すなわち生産工程の効率化が必須である。トウキの栽培暦は一般的に前年秋期に得た種子を翌春まで保管した後に播種して、露地の苗床にて1年間育苗を行う。翌春に苗を掘り上げ、選別後、圃場に定植し、その年の秋に収穫するというものである[3]。このようにトウキは種子繁殖により種苗の生産が行われるため、採種技術向上に関する研究が行われてきた[9]。また、採種から収穫まではおよそ27ヶ月を要し、そのうち圃場での育苗には12ヶ月を要することは更に大きな課題である。このような従来の栽培方法では育苗により圃場が一部占有されるということや、苗の掘り上げや選別に手間がかかること、さらに圃場で育苗を行なうため気候や虫害の影響を受けやすく安定して苗を生産することが困難である。また、この育苗期間は一般的な農作物と比較して、長いことから収益の確保も課題となっている。以上のことから、効率的かつ安定的な苗の生産方法の確立が求められている。これまでにもセル成型苗を用いた

栽培の効率化[10], 保温ベッド育苗による短期育苗法 [11], 種子の選別による苗の初期生育の向上 [12-14]など, トウキ種苗生産の効率化, 安定化を志向した種々の検討が行われてきた. 特にセルトレイや保温ベッドを用いて冬期に育苗を行うことで育苗期間を大幅に短縮可能であるが, 実用には未だ課題が残る. セルトレイ苗は苗の掘り上げは必要なく, 省力化が期待できるうえに機械を用いた定植にも対応する. 更に播種後も苗を移動することができるため, 管理が容易である. 一方で, セルトレイは充填できる培養土の量が少ないうえ, セルの容量が小さく苗の根が絡み合うため苗の生育が抑制され易い. 更にセル成型苗の生産物量は慣行的な手法に比して低い傾向にある[10]. また, 保温ベッドでは十分な量の培養土で育苗を行うため, 生育抑制の懸念はない一方, 慣行的な栽培方法と同様に苗を掘り上げる必要があるうえ, トウキの育苗用に保温ベッドを構築する必要がある. 更に, 播種後は苗の移動を行うことができないため, 管理に手間を要することがある. そこで, 我々は上記の課題を解決し, 更なる当帰の生産効率化を目指し, ペーパーポット (以下, PP) を用いた育苗方法の検討を行った. PPは特殊加工した紙製の折たたみ式育苗鉢で, 通気性, 浸水性に優れ, 良く揃った健苗ができるとされ, 蔬菜類, 木本類, 水稲などの育苗に広く使われ, 機械を用いた定植にも対応する [15]. PPはセルトレイのように苗の掘り上げの手間を要さないだけでなく, より多くの培養土を充填することができるため苗の生育促進が期待される. 更に, 新たに保温ベッドのような設備を構築する必要ないうえ, 播種後も苗の移動が可能であり, セルトレイと保温ベッドの両方の課題を克服することが可能である. このようにPPを用いることでこれまでよりも効率的にかつ安定的に屋内での育苗が可能になる. 本手法は環境要因や虫害の影響を受けにくくなるだけでなく, 掘り上げの労力を削減可能なうえ, 冬期の育苗が可能となり栽培期間の短縮が可能である (Fig. 3) .

本研究では, 秋に得た種子を PP に播種し屋内で育苗した後, 翌年の 4 月に定植することで圃場栽培期間の短縮, 安定的な苗の生産, 作業の効率化を図り圃場栽培 1 年で日局に適合する漢方生薬「当帰」を生産することを目的とした.

ここで, トウキ生産に PP 導入する際の課題を次のとおり挙げ, 各項別に記載する。

- ・ PP で生産したトウキ苗の生育評価方法の開発 (第 1 章 第 1 節)
- ・ PP を用いた屋内育苗条件の検討 (第 1 章 第 2 節)
- ・ PP 苗の生育度合いの差が定植後の生育に及ぼす影響の調査 (第 1 章 第 3 節)
- ・ PP 苗を用いて生産した当帰の品質評価 (第 1 章 第 3 節)
- ・ 当帰含有成分の局在性と成分含量の個体間差異の調査による品質評価指標の創出 (第 2 章)



Fig. 1 当帰の原植物および生薬「当帰」. 左: 金沢大学で栽培されるトウキ *Angelica acutiloca* (Siebold et Zucc.) Kitag. 右: 生薬「当帰」金沢大学・薬用植物園で生産



Fig. 2 金沢大学・薬用植物園で実施しているトウキの加工法.

左上 稲架にかけた状態での天日自然乾燥（はさ掛け）.

右上 温湯への掛け込み工程（湯もみ）.

左下 揉み洗い工程（湯もみ）.



Fig. 3 左：本研究に用いた PP（規格 FS515, 高さ 15 cm × 口径 5 cm, 130 本 / 冊）.
培養土を充填し, トウキの種子を 1 穴あたり 1 粒播種した.
右：冬期に PP を温室で管理する様子.

本論

第1章 トウキ苗生産へのペーパーポットの応用

第1節 ペーパーポットを用いて育苗したトウキ苗の生育評価方法の開発

第1項 緒言

慣行的なトウキの栽培においては、一般には根頭部の径が 5–8 mm 程度の苗を定植する[3]。根頭部の径が 9–10 mm 以上の苗を定植した場合は抽苔しやすくなることが知られており[3]、苗を選抜することで抽苔を防いでいる。抽苔した株は根の肥大が止まり、根が木質化し、経験的に薬用としての価値がなくなるとされていたことから[17, 18]、我々は抽苔したトウキの根を加工して製した当帰の品質評価を行った。その結果、抽苔により根頭部の木質化や空洞化、側根の脱落が起こり、抽苔していないトウキの根から調製した当帰と比べ、根の重量、希エタノールエキス含量、(Z)-ligustilide (以下、ZL) 含量が低くなることを報告している[19]。

このようにトウキの栽培において、苗の選抜は当帰の品質に大きな影響を与える重要な工程である。しかしながら、PP 苗は従来の育苗方法と異なり、苗の掘り上げが必要ない。これは苗の根に損傷を与える事なく移植が可能である一方、従来の選抜方法適応できないことを意味する。つまり、PP 苗の根は培養土と紙筒に包まれているため、紙筒を破らない状態で根頭部径を測定することができず、根頭部径を基準にする苗の選別を行うことができない。PP を外すことは根の乾燥や損傷を引き起こすだけでなく、苗は機械定植に対応しなくなる。そのため、PP を外さずに苗の選別を行う手法を開発する必要がある。そこで、本研究では、トウキ PP 苗のうち唯一 PP から出ている器官である葉部に着目した。トウキの葉は 2 回 3 裂複葉[20]と記載されているが、苗の初期段階、つまり未熟な発芽初期の状態においては複葉ではなく単葉が観察され、生育とともに 1 回 3 裂複葉や 2 回 3 裂複葉と葉の形態が変化する (Fig. 4)。そのため、小葉の変化はトウキの植物全体の生育と密接に関連し、苗の評価指標として有用であると考えられる。本章では PP を用いたトウキ苗の短期生産方法を確立するために、PP 苗に適した苗の選別方法の開発を行った。

第2項 材料と方法

2017 年 10 月 19 日、11 月 23 日、2018 年 9 月 12 日、10 月 12 日、11 月 19 日、12 月 20 日にトウキの種子を PP (規格 FS515、高さ 15 cm × 口径 5 cm、130 本/冊、日本甜菜製糖株式会社、以下、PP) に 1 穴あたり 1 粒播種した。覆土後、さらに糞殻で培養土の表面を覆った。2017 年に播種した苗は 2018 年 3 月 15 日まで金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属 薬用植物園のビニルハウス (加温なし。以下、ビニルハウス) で管理し、3 月 16 日に全て屋外に移動した。同年 4 月 7 日に成長段階の異なる様々な PP 苗を得た (Fig. 4)。PP と培養土を除去した後に、最大葉柄長、最大頂小葉長、最大両側小葉長、最大根長、根頭部径を測定した (Fig. 5A, B)。なお、この時点で 1 個体から展開している葉は 1 枚から 6 枚である。2018 年に播種した PP 苗は 2019 年 4 月 5 日まで金沢大学環日本海域研究センター附属植物園実験温室 (5°C を下回らないように加温。以下、温室。Fig. 6 に温室内と屋外の最低気温、最高気温、平均気温を示す) で管理した。その後、PP 苗を全て屋外に出し、前年度と同様に PP と培養土を除去し、同一の指標を調査した。なお、最大葉柄長、最大頂小葉長、最大両側小葉長はいずれも 1 個体から生える葉のうち最大のものについて測定した。なお、本研究では全ての種子を播種までシリカゲルと共にチャック付きラミネート袋 (MA-14,

株式会社生産日本社)に入れて約5°Cで保管した。本論文において特に断りがない限り、培養土は全てサカタのスーパーMix A (N:P:K=150-260 mg/L:70-160 mg/L:190-320 mg/L, 株式会社サカタのタネ)を使用した。



Fig. 4A 様々な生育段階の PP 苗, B. トウキの小葉.

育苗過程において、単葉が複葉へと変わる。

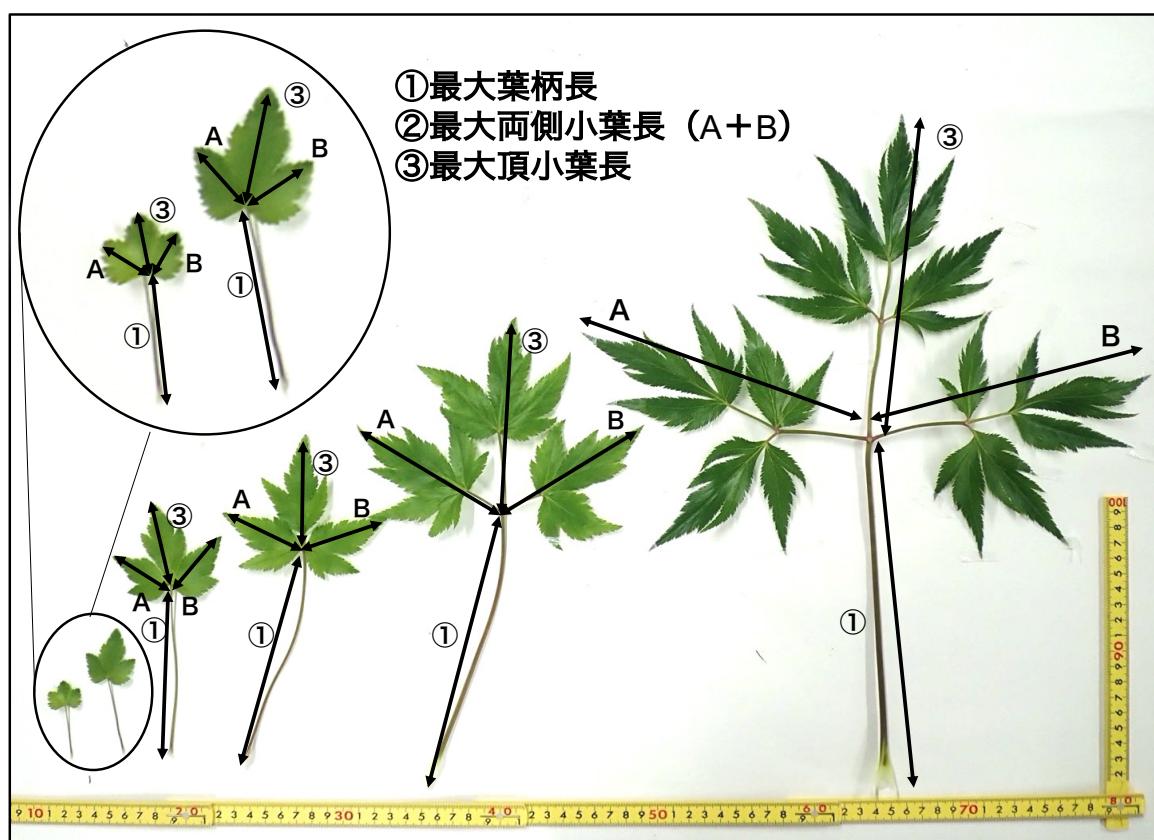


Fig. 5A 地上部の測定箇所. 各苗から生える最も大きい複葉について測定した。最大両側小葉長は左右の側小葉長 (A, B) を合計した値である。



Fig. 5B 地下部の測定箇所.

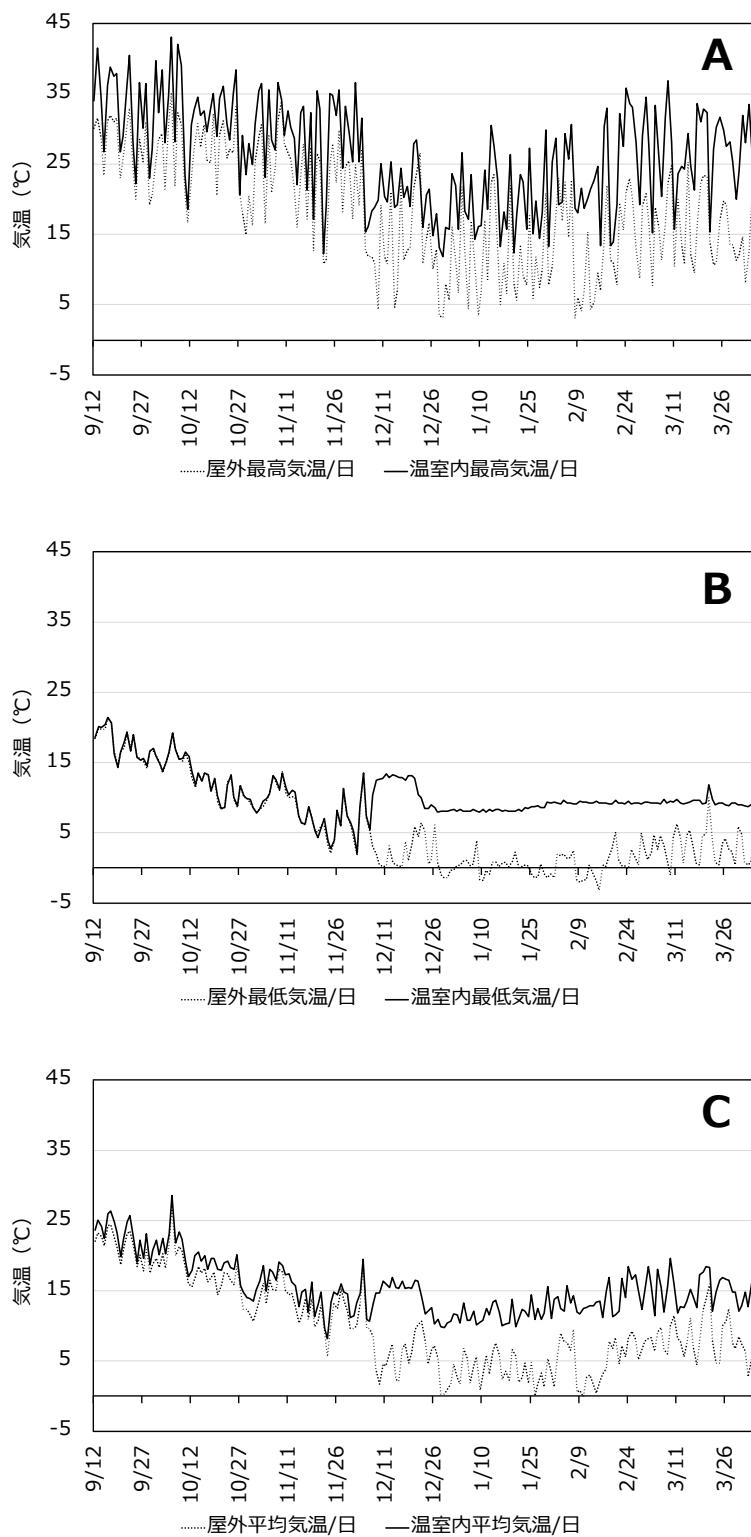


Fig. 6 金沢大学環日本海域研究センター附属植物園実験温室の気温と屋外気温の推移. A : 1日あたりの最高気温, B : 1日あたりの最低気温, C : 1日あたりの平均気温. 測定期間 : 2018年9月12日から2019年4月4日. 12月5日から加温開始. 気温が5°Cを下回らないように加温.

第3項 結果

異なる時期に播種し、様々な成長度合いの苗を得た (Fig. 4). それらの苗について、最大葉柄長、最大頂小葉長、最大両側小葉長、最大根長、根頭部径を測定し関係を調査した結果を Fig. 7A-F, Table1 に示す。最大根長は両側小葉長と強い正の相関が認められた ($r = 0.62$)。根頭部径は最大両側小葉長、最大頂小葉長において非常に強い正の相関が認められた ($r \geq 0.98$)。

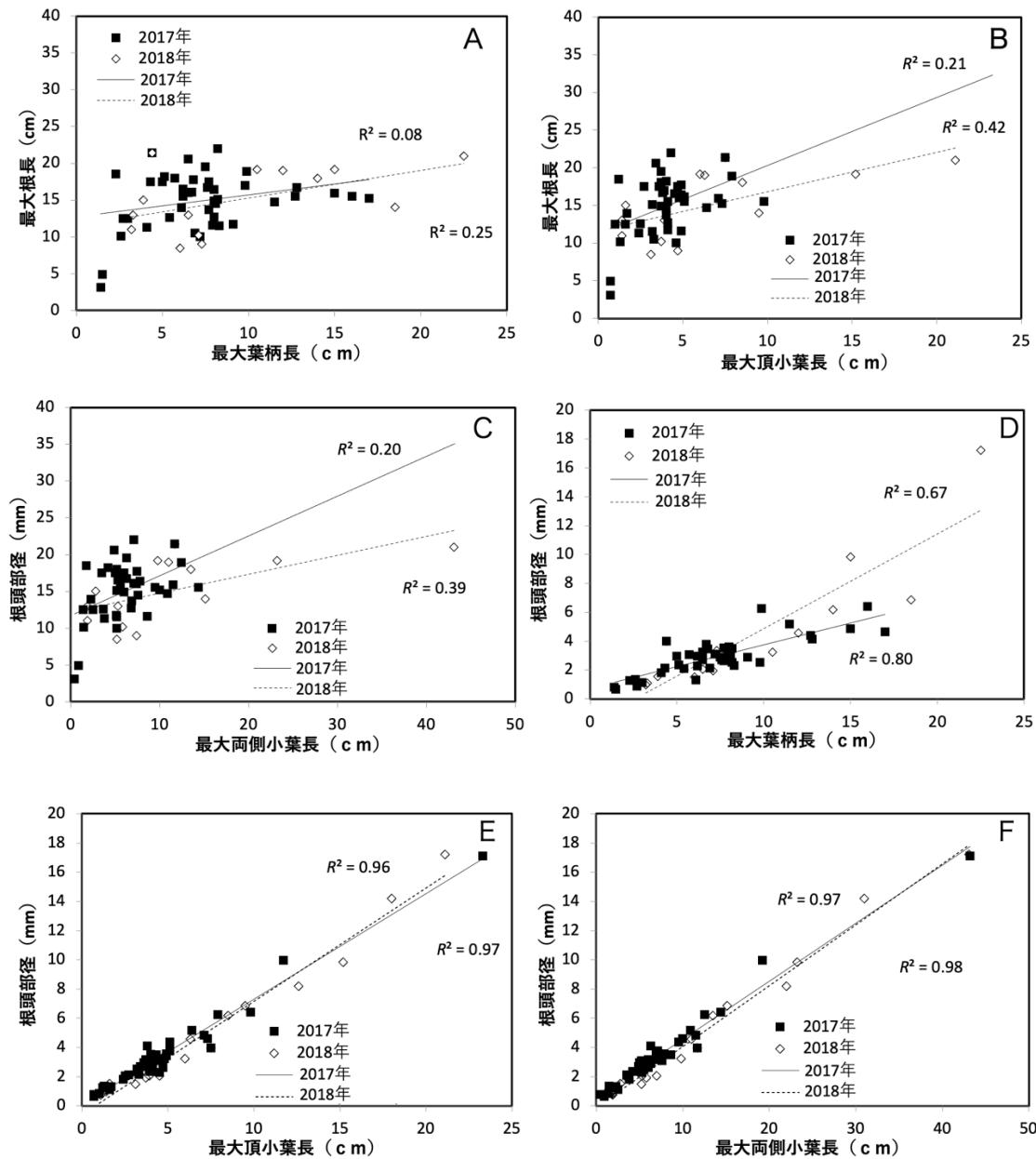


Fig. 7 A-F PP 苗の地上部と地下部の関係. A : 最大葉柄長と最大根長, B : 最大頂小葉長と最大根長, C : 最大両側小葉長と最大根長, D : 最大葉柄長と根頭部径, E : 最大頂小葉長と根頭部径, F : 最大側小葉長と根頭部径.

第4項 考察

PP を育苗に用いることで屋内での育苗が可能になり、環境要因や害虫の影響を受けにくくなるだけでなく、冬期に育苗することで栽培期間の短縮や、掘り上げの労力を削減可能である。定植後のトウキの生育能力は苗の大きさと密接な関係にあり、苗の根頭部径が太くなるに従って定植後の生育は旺盛になり[21]、慣行的な栽培方法では、根頭部径を基に苗の選抜が行われている。すなわち、1 年間露地で育苗した苗を一度掘り上げて、根頭部径が 5–8 mm の苗が定植される[3]。しかし、PP から生産した苗は根部が培養土と PP に包まれているために、根頭部径を測定することができない。紙を外すことで根頭部の大きさを測定可能である一方、同時に根の乾燥や損傷を引き起こすだけでなく、苗は機械定植に対応しなくなり、PP を育苗に使用するメリットを失う。そこで、PP 苗の地上部から地下部の成長度合いを予測可能な手法を検討した。本研究では地上部の測定項目として最大葉柄長、最大頂小葉長、最大両側小葉長を測定し、地下部は最大根長と根頭部径を測定することで各値の関係を調査した。2 年間にわたる測定から得られた最大頂小葉長 (x) と最大両側小葉長 (x) について、根頭部径 (y) の関係を算出したところ、最大頂小葉長は $y = 0.7423x - 0.1178$, $R^2 = 0.96$ 、最大両側小葉長は $y = 0.4011x + 0.4099$, $R^2 = 0.97$ の関係があった。この公式を用いることで根頭部径を正確に予測できる。また、根頭部径に対する最大頂小葉長と最大両側小葉長の決定係数 (R^2) を比較したところ、2017 年、2018 年、2 年合算とともに、頂小葉長に比して両側小葉長で僅かに高い値が認められた。これは、頂小葉を測定する場合は計測値が小葉一枚の値となってしまうが、両側小葉を測定する場合は側小葉 2 枚の値を合算するため、小葉と根頭部径の相関関係の誤差が収束した可能性がある。通常、トウキ実生苗の葉は頂小葉長が 4–5 cm 以下の生育初期段階においては単葉であり、頂小葉、両側小葉ともに測定にかかる手間は同程度である。しかし、生育が進み単葉が 2 回、3 回と複葉に変化していくにつれて、両側小葉の測定は手間を要するようになる。一方で、最大頂小葉は最大両側小葉に比して測定にかかる手間はおよそ半分である。最大頂小葉長は最大両側小葉長に比して決定係数が僅かに低いものの十分高い値を示しており、実用面を考慮すると最大頂小葉を評価指標として採用するべきである。これまでの育苗方法では苗の選別時に、苗を掘り上げる必要があり、選別後は根を乾かさないような管理が必要になる。そのため、定植まで日数が空く場合は、再度土に埋め戻すこともある。このようにトウキの栽培において苗の生産、管理はかなりの労力を要する。さらに、慣行的な種苗生産方法により生産、選別した苗は一度掘り上げているため、長期に及ぶ輸送には不適であることに加え、定植までの間苗の保管には注意が必要である。一方、PP 苗は掘り上げが不要であるうえ、根に損傷を与えることなく苗を移動することが可能である。更に、小葉の長さから根頭部径が予測可能であることから、苗の生育評価を容易に行え、天候に左右されることなく、また根を傷つけることなく任意の大きさの苗を長期間保存でき、輸送にも耐えうる。以上、PP 苗の頂小葉長と両側小葉長は根頭部径と強い正の相関があり、それぞれの長さを測定することで正確に根頭部径を推測することが可能となった。

Table 1 PP 苗の地上部（最大葉柄長，最大頂小葉長，最大両側小葉長）と地下部（最大根長，根頭部径）の関係。

		最大葉柄長		最大頂小葉長		最大両側小葉長	
		<i>r</i>	R^2	<i>r</i>	R^2	<i>r</i>	R^2
2017年	最大根長	0.28	0.08	0.46**	0.21	0.45**	0.20
	根頭部径	0.82**	0.67	0.98**	0.96	0.98**	0.97
2018年	最大根長	0.50	0.25	0.65*	0.42	0.62*	0.39
	根頭部径	0.89**	0.80	0.99**	0.97	0.99**	0.98
2年合算	最大根長	0.35**	0.12	0.48**	0.23	0.45**	0.20
	根頭部径	0.83**	0.69	0.98**	0.96	0.99**	0.98

r はピアソンの相関係数， R^2 は決定係数を示す。*: $p < 0.05$ ， **: $p < 0.01$

第2節 ペーパーポットを用いた冬期屋内育苗方法の開発

第1項 緒言

本章では第1章 第1項目で開発した苗の生育評価方法を用いて、PPを用いた冬期屋内育苗の開発を試みた。従来の露地育苗では育苗期間に休眠期間を含むため育苗期間が長くなっている。そこで本研究では冬期に苗を屋内で管理することで苗の休眠を防ぎ、短期間での育苗を目指す。本手法は従来の育苗期間およそ12ヶ月を大幅に短縮することを目指す。PPを用いた冬期屋内育苗の開発にあたりいくつかの問題がある。以下にその問題と解決のために本項で行った検討を記す。

問題1：最適な育苗期間が不明であること。

通常の栽培暦においてトウキの種子の採取時期は秋である。通常は秋に得た種子を翌春まで保管してから播種する[3]。そのため、秋に得た種子を直ぐに播種することで栽培暦の大幅な短縮が期待される。一方、秋に播種し翌年4月の定植を目指す場合、苗を屋内（ビニルハウスや温室等）で管理する必要がある。しかし、トウキの冬期育苗に関する報告は殆どないうえ、PPをトウキの栽培に導入した例はなく、本手法でどのような品質の苗を生産できるかは不明である。トウキの栽培において育苗は大変重要な工程であり、苗の根頭部径が太くなるに従って定植後の生育は旺盛になる[21]。一方で、極端に太いトウキ苗を定植した場合は、株が抽苔して薬用価値を失う[3, 19]。そのため、新たな栽培手法を開発するにあたり育苗期間、育苗時期と苗の生育の関連を把握する必要がある。

問題1に対する検討：播種時期が苗の生育に及ぼす影響の調査

問題2：トウキの種子の発芽は不揃いである。

トウキの育苗において発芽を揃えることは大変困難である。本実験で用いるPPは紙製の筒が連結した構造をしており、生産の効率化を図るために限らず全てのPPの穴に苗が存在した状態で育苗することが望ましい。加えて、トウキの種子の供給源は限られていることから、効率的な種子の利用が求められる。そのため、各ポットへの最適な播種数の検討が必要である。

問題2に対する検討：1穴あたりの播種数の検討

問題3：短期間で充実した苗を生産する必要がある。

従来は12ヶ月かけて育苗を行っている。一方、本育苗方法ではその育苗期間をおよそ半分の6-7ヶ月に短縮することを試みる。そのため、苗が十分に成長しない可能性があり、施肥による栽培促進を検討する必要がある。

問題3に対する検討：施肥が苗の生育に及ぼす影響の調査

問題4：定植時のPP1本あたりの苗数は1本であるべきである。

問題2で述べたようにトウキの種子の発芽は不揃いであるため1穴あたり複数粒の種子を播種することでPPの利用効率の向上を目指す必要がある。しかし、その場合は複数の苗が存在するポットができてしまう。トウキは側根が多く圃場の土砂や培養土などを根と根の間に抱き込みやすいことが知られている。更に複数本の苗を密植した場合は根が絡み合い、夾雑物の除去がより困難になる。また、ポットに複数本の苗が存在する状態で育苗を行った場合は苗の生育抑制が起こる可能性

がある。そのため、1穴あたり複数粒の播種を行うと仮定した場合は、同時に間引きの手法を検討する必要がある。

問題4に対する検討：間引き時期の検討

播種はトウキの採種時期である9月から開始し12月まで4回行った。播種数の検討については、PPを効率的に使用すべくPP1本あたりの播種数を検討した。施肥に関しては、短期間で苗を十分に成長させることを目的に最も苗を成長させる施肥条件の探索を行った。間引き時期の検討では、PP1穴に複数粒の種を播種した場合に、間引き時期の差異が苗の生育に及ぼす影響を調査した。

第2項 材料と方法

播種時期の検討

2017年10月19日と11月23日にトウキの種子をPPにPP1穴あたりに1粒播種した。2018年3月15日までビニルハウスで管理した。その後、PP苗を全て屋外に移動し、4月7日に発芽率を測定した後、第1節と同様にPPと培養土を除去し、最大葉柄長、最大頂小葉長、最大両側小葉長、最大根長、最大根頭部径を測定した。また、2018年9月12日、10月12日、11月19日、12月20日に種子をPPにPP1穴あたり1粒播種し、覆土後に糞殻で培養土の表面を覆った。2018年に播種した苗は2019年4月5日まで温室で管理した。その後、4月6日に苗を全て屋外に出して最大頂小葉長を測定した。

PP1穴あたりの播種数の検討

2017年10月19日と11月23日に播種を行った。各時期でPP1穴あたりに播く種子の数をそれぞれ1粒、2粒、3粒、4粒とする4条件と、3粒かつ外周のみ4粒とする1条件(Fig. 8)の計5条件で播種を行った。その後、苗を2018年3月15日まで温室で管理した後、苗を全て屋外に出し、4月7日に発芽率、苗生産数、PP利用率を評価した。ここで苗生産数とはPP1穴当たり苗が1本生えているものを1本苗とし、1-4本苗の4種類に分類した数である。PP利用率とはPP1冊(130穴)に対し生育株が存在する穴の割合を表す。

施肥が苗の生育に及ぼす影響

2018年9月21日にトウキの種子を元肥と培養土を充填したPPに1穴あたり1粒播種した。元肥としてマグアンプK(N:P:K:Mg = 6%:40%:6%:15%, 株式会社ハイポネックスジャパン)を培養土1Lに対して3.25gを底から3cm程度の深さに混合または、発酵油かす中粒(N:P:K = 3%:7%:4%, 日清ガーデンメイト株式会社)を培養土1L当たり約5gとなるように底から3cmの高さに混合した。また、追肥として1,000倍希釀した花工場(N:P:K:Mg:Mn:B = 8%:10%:5%:0.01%:0.004%:0.016%, 住友化学園芸株式会社)を1週間に1度PP1冊当たり4L施肥した。液肥は9割以上の苗の本葉が展開した10月24日から行った。以上の施肥方法を組み合わせて、以下の6区画を設定した。

対照区：元肥、追肥ともに行わない

液肥区：液肥による追肥のみ行う液肥区

油かす区：元肥として油かすを施肥する

マグアンプK区：元肥としてマグアンプKのみを施肥する

油かす/液肥区：元肥として油かすを施肥し、更に液肥による追肥を両方行う

マグアンプK/液肥区：マグアンプKを元肥として施肥し、更に液肥による追肥を行う

覆土後、糞殻で培養土の表面を覆い、2019年4月5日まで温室で管理した。その後、4月6日に苗を全て屋外に出して最大頂小葉長を測定した。

間引き時期の検討

2018年10月12日にトウキの種子をPP1穴あたり3粒播種した。その後、異なる時期（2018年12月15日、2019年1月18日、2月19日、3月19日）に、PP1穴当たりの苗の数が1本になるように最も頂小葉長が大きい個体のみを残すように間引きを行った。なお、間引きはハサミで不要株の根頭部を切断することにより行い、間引き直前に頂小葉長を測定した。その後、2019年4月5日まで温室で管理し、4月6日に苗を全て屋外に出して最大頂小葉長と最大葉長（最大葉柄長+最大頂小葉長）を測定した。

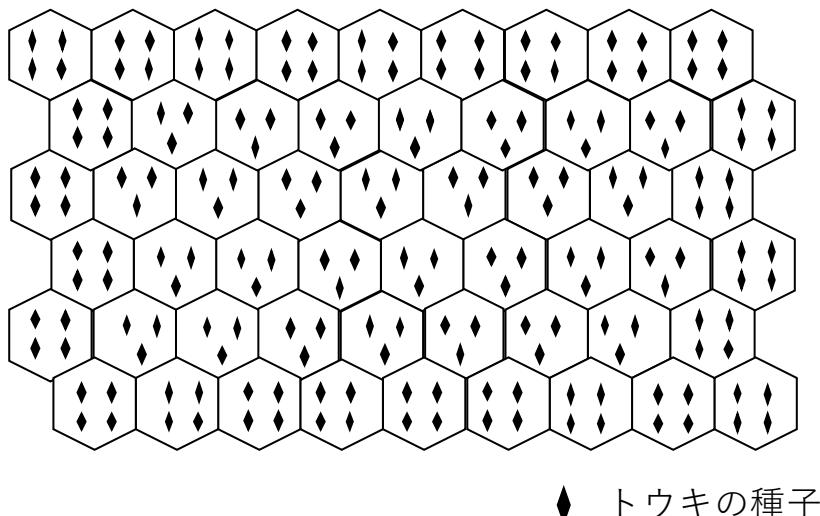


Fig. 8 基本を3粒播種として外周のみ4粒とする播種方法の模式図。

第3項 結果

播種時期の検討

2017年10月19日と11月23日に播種を行ったところ、翌年4月7日時点での発芽率は10月播種の場合は56.9%，11月播種の場合は36.9%と有意差が認められた (Chi-squared test, $p < 0.01\%$)。また、10月に生産した苗の最大葉柄長は8.3 cm, 最大頂小葉長は5.4 cm, 最大両側小葉長は8.8 cm, 最大根長は14.4 cm, 根頭部径は4.0 mmであった (Fig. 9)。一方、11月に生産した苗の最大葉柄長は5.9 cm, 最大頂小葉長は3.4 cm 最大両側小葉長は4.6 cm, 最大根長は15.9 cm, 根頭部径は2.4 mm であり、最大葉柄長、最大頂小葉長、最大側小葉長、根頭部径において10月に生産した苗の値が有意に大きくなつた (Student's *t*-test)。なお、根長では有意差は認められなかつた。2018年9月12日、10月12日、11月19日、12月20日の4回異なる時期に播種し、生産したPP苗の様子をFig. 10に示す。4月3日時点での発芽率は9月区では平均55.4%，10月区では平均53.6%，11月区では平均40.0%，12月区では平均25.8%であり、播種時期が遅くなるにつれて発芽率が低下した。更に、4月3日時点での各時期の発芽の有無に有意差が認められた (Chi-squared test, $p < 0.01\%$)。また、発芽に要した日数は9月区と10月区では15日であったのに対して、11月区は30日、12月区は35日要し、播種時期が遅くなると発芽に要する日数が増加した (Fig. 11)。各播種時期における最大頂小葉長は9月区7.2 cm, 10月区4.0 cm, 11月区3.7 cm, 12月区2.6 cm であり、9月区は10月区、11月区、12月区に比して有意に値が大きくなつた (Fig. 12)。

PP1穴あたりの播種数の検討

2017年10月19日、11月23日に異なる条件でトウキの種子を播種したところ、2018年4月7日時点での各条件の発芽率は以下の通りであった。

- ・10月19日播種の場合

1粒播種区：56.9%，2粒播種区：51.2%，3粒播種区：63.6%，
3粒播種かつ外周のみ4粒播種区：55.4%，4粒播種区：61.9%。

- ・11月23日播種の場合

1粒播種区：36.9%，2粒播種区：40.4%，3粒播種区：39.5%，
3粒播種かつ外周のみ4粒播種区：39.9%，4粒播種区：37.5%。

以上の結果より、播種数と発芽の有無に有意差は認められなかつた (Chi-squared test, $p > 0.05\%$)。

各条件のPP利用率は以下の通りである (Fig. 13A)。

- ・10月19日播種の場合

1粒播種区：56.9%，2粒播種区：75.4%，3粒播種区：94.6%，
3粒播種かつ外周のみ4粒播種区：90.0%，4粒播種区：99.2%。

- ・11月23日播種の場合

1粒播種区：36.9%，2粒播種区：62.3%，3粒播種区：70.0%，
3粒播種かつ外周のみ4粒播種区：80.0%，4粒播種区：82.3%。

以上の結果より、播種数と生育株の有無に有意差が認められた (Chi-squared test, $p < 0.01\%$)。

また、各条件において PP1 冊当たりが生産した PP 苗の数は以下の通りであった (Fig. 13B).

・10月19日播種の場合

1粒播種区：1本苗が74本，

2粒播種区：1本苗が63本，2本苗が35本，

3粒播種区：1本苗が30本，2本苗が61本，3本苗が32本，

3粒播種かつ外周のみ4粒播種区：1本苗が39本，2本苗が40本，3本苗が35本，4本苗が3本，

14粒播種区：1本苗が20本，2本苗が46本，3本苗が42本，4本苗が21本.

・11月23日播種の場合

1本苗：48本

2粒播種区：1本苗が57本，2本苗が24本，

3粒播種区：1本苗が40本，2本苗が39本，3本苗が12本，

3粒播種かつ外周のみ4粒播種区：1本苗が51本，2本苗が40本，3本苗が12本，

4粒播種区では1本苗が45本，2本苗が39本，3本苗が20本，4本苗が3本.

以上の結果より、播種数と生産される各苗の数に有意差が認められた (Chi-squared test, $p < 0.01\%$).

施肥が苗の生育に及ぼす影響

各施肥条件の平均最大頂小葉長は対照区 4.9 cm, 液肥区 6.2 cm, 油かす区 5.7 cm, マグアンプ K 区 5.9 cm, 油かす / 液肥区 8.3 cm, マグアンプ K / 液肥区 9.6 cm であり、対照区に対して液肥区、油かす / 液肥区、マグアンプ K / 液肥区の3区において有意に最大頂小葉長が増加した (Dunnett's *t*-test, Fig. 14).

間引き時期の検討

間引き時点での平均最大頂小葉長は12月区で3.0 cm, 1月区で4.3 cm, 2月区で4.7 cm, 3月区で8.0 cm であった (Table 2). 間引き作業に要した時間は12月区で10分39秒, 1月区で12分23秒, 2月区で13分53秒, 3月区で20分36秒を要した. 間引いた苗数は12月区で48本, 1月区で58本, 2月区で74本, 3月区60本であった. 間引かれた苗の総生重量は12月区で13.6 g, 1月区で14.0 g, 2月区で22.4 g, 3月区33.9 g であった. 間引かれた苗1本あたりの重量は12月区で0.29 g, 1月区で0.24 g, 2月区で0.30 g, 3月区0.55 g であった. 以上の項目について播種から間引きまでの日数との相関係数を調査したところ、平均最大頂小葉長、間引き作業に要した時間、間引かれた苗の総生重量間に有意な正の相関が認められた ($p > 0.05$). 2019年4月6日に各間引き条件の最大葉長を測定したところ、12月区で12.4 cm, 1月区で12.1 cm, 2月区で14.8 cm, 3月区で15.7 cm であり、Tukey's multiple comparison test を行ったところ、12月区と2月区、12月区と3月区、1月区と2月区、1月区と3月区において有意差が認められ、間引き時期が遅くなるほど葉は長くなった (Fig. 15). また、最大頂小葉長は12月区で4.42 cm, 1月区で4.75 cm, 2月区で5.07 cm, 3月区で5.11 cm であり、12月区と2月区、12月区と3月区において有意差が認められ、複葉長と同様に間引きの時期が遅くなるほど大きくなった. 間引かれた地上部を Fig. 16 に示す.

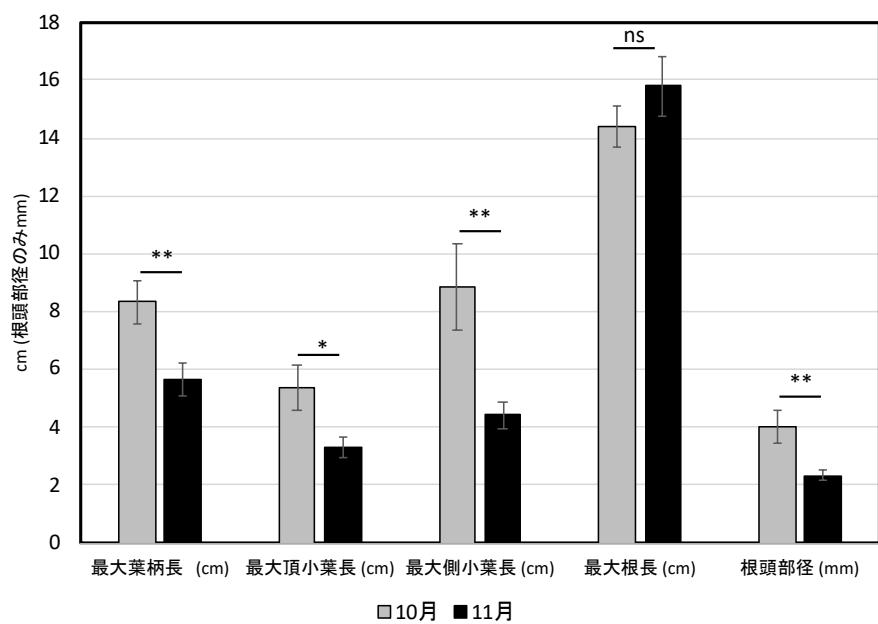


Fig. 9 播種時期の差異が PP 苗の生育に及ぼす影響. 播種日 2017 年 10 月 19 日または 2017 年 11 月 23 日, 測定日 : 2018 年 4 月 7 日, Student's *t*-test, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, ns : not significant, $n = 16-27$, Mean \pm SE



Fig. 10 異なる時期に播種し育苗した PP 苗. 撮影日: 2019 年 4 月 2 日.
左から 2018 年 9 月 12 日播種, 10 月 12 日播種, 11 月 19 日播種, 12 月 20 日播種.

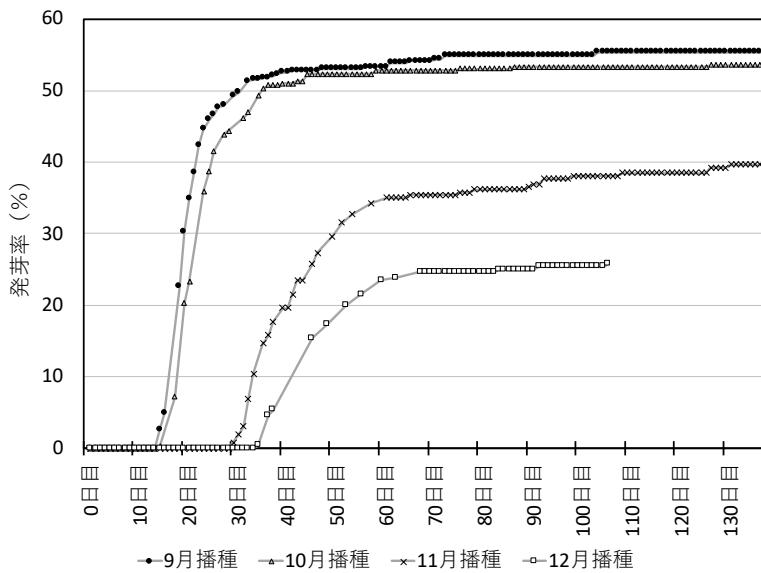


Fig. 11 異なる播種時期における発芽率.

9月播種: 2019年9月12日, 播種数 n = 390,

10月播種: 2019年10月12日, 播種数 n = 390,

11月播種: 2019年11月19日, 播種数 n = 260,

12月播種: 2019年12月20日, 播種数 n = 260.

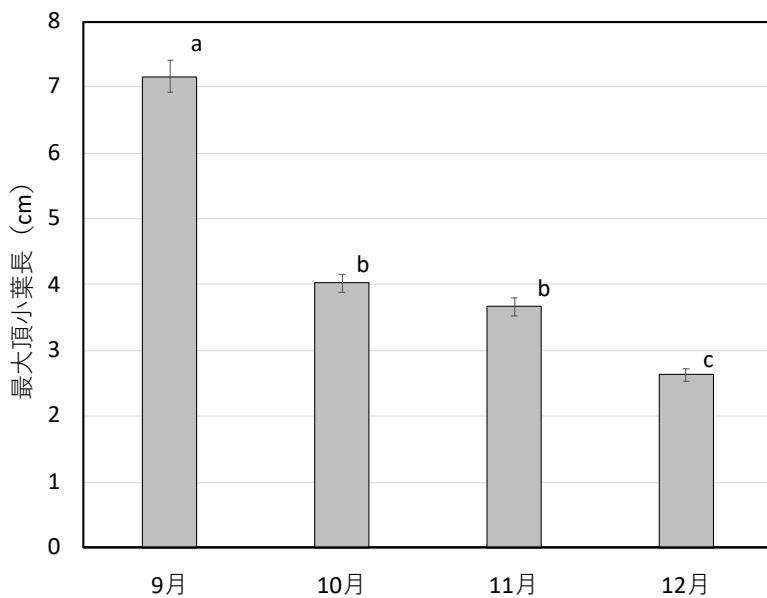


Fig. 12 播種時期が PP 苗の最大頂小葉長に及ぼす影響.

9月播種: 2018年9月12日播種, 10月播種: 2018年10月12日播種, 11月播種: 2018年11月19日播種, 12月播種: 2018年12月20日播種, Tukey's multiple comparison test, 異なるアルファベット間に 5%水準で有意差あり. n = 65 – 179, Mean \pm SE

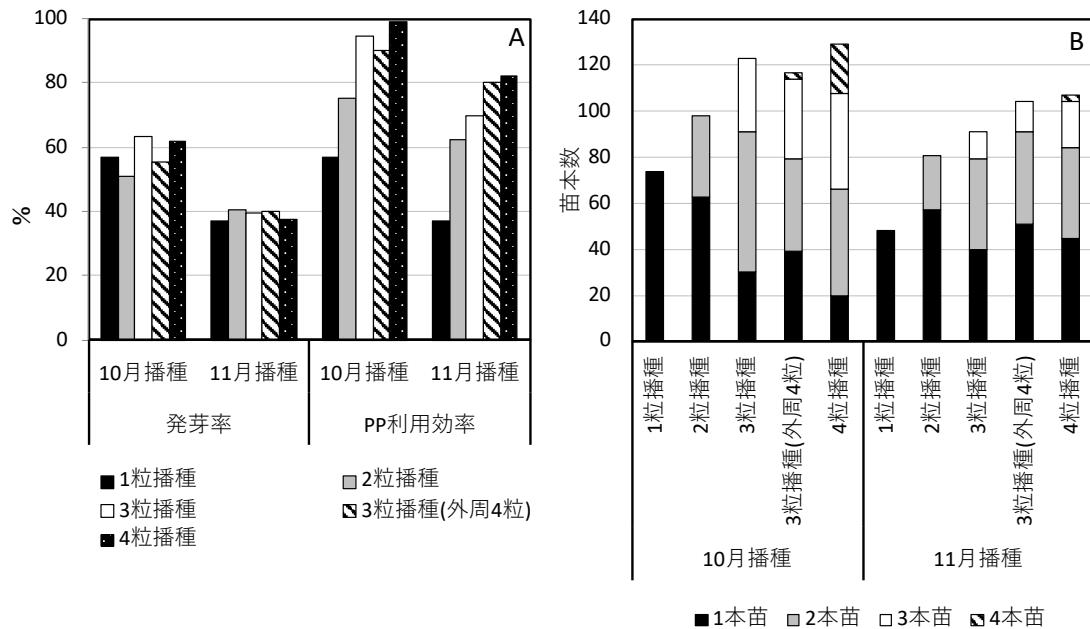


Fig. 13A 異なる播種方法で生産した苗の発芽率と PP 利用率, B: 生産した苗数. 10月播種: 2017年10月19日, 11月播種: 2017年11月23日. $n = 130$.

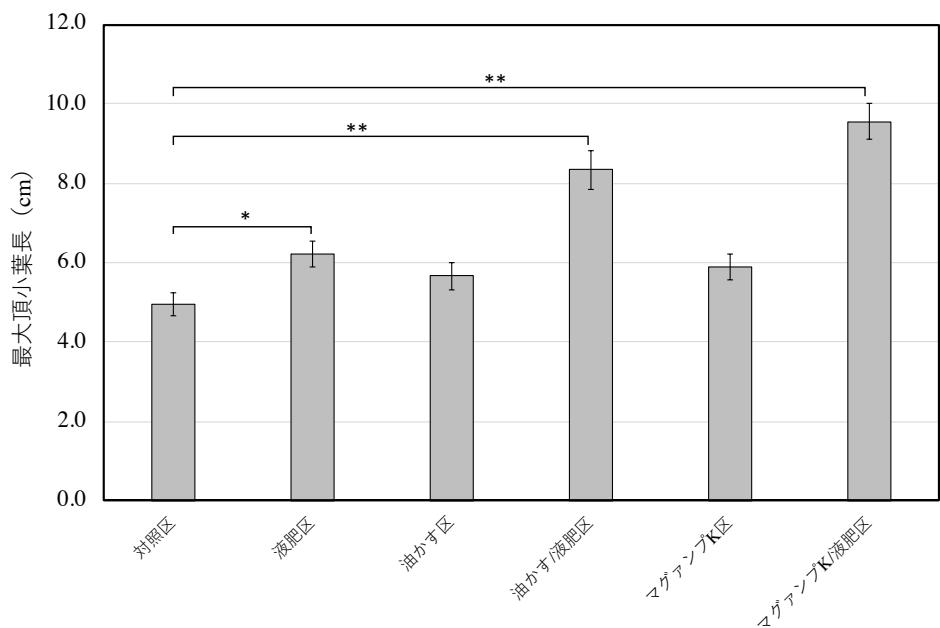


Fig. 14 異なる施肥条件で育苗した PP 苗の最大頂小葉長の差異.

Dunnett's *t*-test, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, $n = 46-69$, Mean \pm SE

Table 2 間引き作業に関する諸データ

間引き日	間引き時の 最大頂小葉長		要した時間 時間	間引かれた苗の 総生重量		間引かれた苗 1本あたりの生重量		間引いた苗数	
	cm	r		g	r	g	r	本	r
2018年12月15日	3.0 ^a		10分39秒	13.6		0.29		48	
2019年1月18日	4.3 ^b	0.92*	12分23秒	14.0		0.24		58	
2019年2月19日	4.7 ^b		13分53秒	22.4	0.91*	0.30	0.75 ^{n.s.}	74	0.66 ^{n.s.}
2019年3月19日	8.0 ^c		20分36秒	33.9		0.55		60	

2018年10月12日に1穴3粒播種し、1穴の苗数が1本になるよう異なる時期に4回（2018年12月15日、2019年1月18日、2月19日、3月19日）間引きを行った。間引き時の最大頂小葉長にはTukeyの多重比較を行った。異なるアルファベット間に有意差あり ($p < 0.05$)。n=5-7。r:各測定項目と播種から間引きまでの日数との相関係数を示す、* : $p < 0.05$, ns: not significant

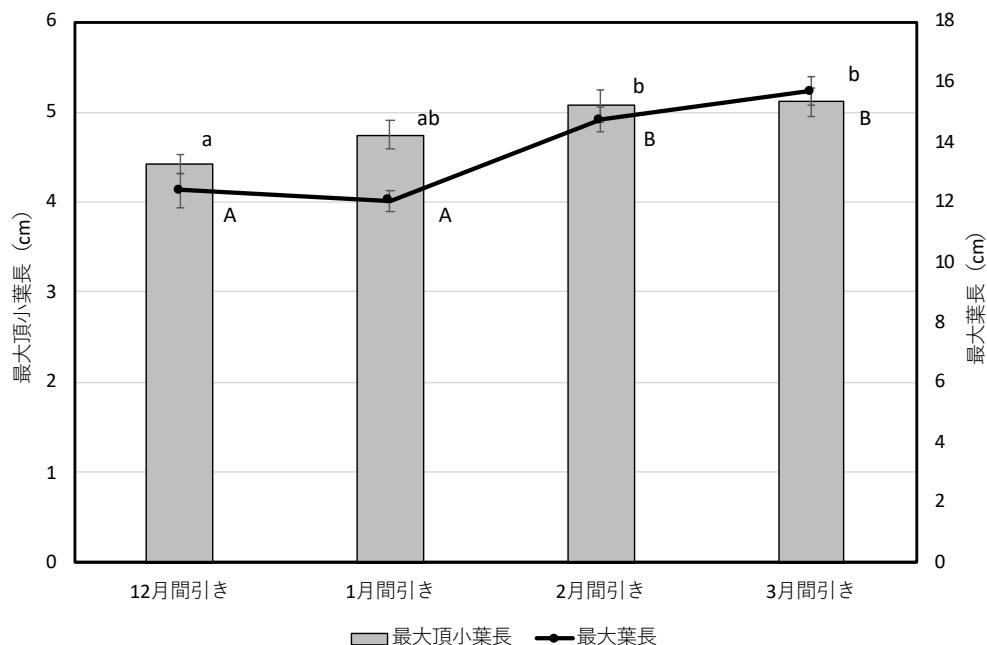


Fig. 15 異なる間引き条件別の苗の生育差異。最大葉長=最大葉柄長+最大頂小葉長。最大頂小葉長についてはアルファベットの小文字で検定結果を示し、最大葉長についてはアルファベット大文字で検定結果を示した (Tukey's multiple comparison test)。異なるアルファベット間に5%水準で有意差あり。最大頂小葉長: n = 103-220, 最大葉長: n = 20, Mean \pm SE



Fig. 16 2018年10月12日に播種し、2019年1月18日に間引かれた苗の地上部。

第4項 考察

播種時期の検討

最適な播種条件を検討したところ、播種時期が遅れるに従い発芽に要する日数の増加、発芽率、最大葉柄長、最大頂小葉長、最大両側小葉長、最大根頭部径が低下した。種子は限られた温度範囲でのみ発芽し、一般に低温域では発芽所要日数は長くなる[22]。9月播種と10月播種とともに、播種後約2週間程度で発芽し、以降は発芽に要する日数が増加した。そこで、各播種時期について播種後14日間の平均気温(AT)、平均最低気温(ALT)、平均最高気温(AHT)をそれぞれ求めた。その結果を下記に記す。

9月播種ではAT 23.5°C, ALT 18.4°C, AHT 33.5°Cであり、10月播種ではAT 18.9°C, ALT 11.8°C, AHT 32.4°Cであった。11月播種は発芽に30日要し、12月播種では35日要したことから両時期において発芽までのAT, ALT, AHTをそれぞれ求めた。その結果を次に示す。

11月播種ではAT 14.0°C, ALT 8.9°C, AHT 24.8°Cであり、12月播種ではAT 11.7°C, ALT 8.5°C, AHT 19.8°Cであった。

11月、12月は9月、10月に比べてAT, ALT, AHT全てにおいて顕著に低下していた。以上のことから、ATが18.9°C–23.5°C, ALTが11.8°C–18.4°C, AHTが32.4°C–33.5°Cの環境は比較的発芽に適しており、約2週間で発芽すると考えられる。一方、ATが11.7°C–14.0°C, ALTが8.5°C–8.9°C, AHTが19.8°C–24.8°Cの環境下はトウキの種子にとって気温が低く、発芽に約30日要することが明らかとなった。トウキ種子の発芽と温度に関しては、15°C, 17.5°C, 20°C, 22.5°C, 25°Cの異なる一定温度条件での発芽率を比較したところ、20°Cが最も高い発芽率を示し、次いで17.5°C, 22.5°Cが高く、15°Cではそれ以下であったという報告がある[13]。この先行研究からも、本研究の結果を支持できる。また、9月播種と10月播種の発芽率は同程度であったにもかかわらず、9月播種区に比して10月播種区では最大頂小葉長は半値以下であった。これまでにトウキの冬期育苗において加温は苗の生育を促進することが報告されており[11]、低温が苗の生育を抑制する可能性が示唆されている。その為、10月播種での生育差異は生育期間が約1ヶ月短いことに加え、温度の低下により生育が緩慢になったと考えられる。また、2017年の無加温管理と2018年の加温管理の各10月、11月播種条件の平均最大頂小葉長を比較すると2017年は5.4cm, 3.4cm, 2018年は4.0cm, 3.7cmであり、ともに有意差は認められず、2018年に行った程度の加温条件は苗の生育に大きな影響を及ぼさないと考えられる。以上の結果より、PPを利用し屋内で育苗を行う際は、9月が最適な播種時期であると考えられる。また、本手法では最大で頂小葉長が17cmに達する苗が生産した。頂小葉長が17cm程度の場合、根頭部径は約13mmに達しており、一般に定植が推奨されている太さよりも太く、容易に抽苔する可能性がある。しかし、一般的なトウキの栽培においても極端に太い苗は芽くりと呼ばれる成長抑制処理を行うことで5–8mm程度の苗を定植するよりも収穫量が多くなることが報告されており[16]、PP苗においても選別太さに応じた成長抑制方法の必要性が示唆された。以上、播種時期は9月が適期であり、時期が遅くなるほど発芽に要する時間が増え、苗の生育が抑制されることが明らかとなった。

PP1穴あたりの播種数の検討

PP1穴あたりの播種数を変えて、育苗したところ、播種数は4月時点での最終的な発芽率に影響を及ぼさないことが明らかとなった。タバコでは、極端に播種密度が高いと発芽率が低下すると報告

されているが[23], 本条件においてトウキは, PP1 穴あたり 4 粒播き程度であれば発芽抑制が起こらず種子を効率的に使用できる. これまでに植物やその種子が他の植物の生長や発芽を抑制するアレロパシーが多く報告されている[24-26]. その要因の 1 つとして植物に含まれる精油成分などの研究が行われており[26, 27], クマリン類もアレロケミカルとして研究されてきた[28]. これらの研究からアレロケミカルは濃度, 土壌, 植物種に依存して作用することが明らかとなっている. トウキと同じセリ科では *Heracleum sosnowskyi* Manden. にアレロパシーが報告され[29, 30], そのアレロケミカルは葉や根から滲出するアンゲリシン等のフラノクマリンと種子に含まれるオクタナールであるとされる. トウキの根や葉, 種子もアレロパシー作用を持つ可能性があるが, 本条件では発芽抑制は起こらず, その理由として播種密度が低くアレロケミカルが低濃度であることや, トウキには作用しない可能性がある.

PP 1 穴あたりの播種数にかかわらず, 播種時期が遅くなると PP 利用率が低下した. これは播種時期が遅くなったことによる発芽率の低下が原因であると考えられる. また, 10 月播種において播種数が 1 粒から 3 粒へと増加するに従い, PP 利用率は 56.9% から 94.6% へと増加した. PP の構造上, 外側のポットは乾燥しやすく苗の生育が抑制されやすいため, 本研究では外周のみ 4 粒播き条件を検討したが, PP 利用率は増加しなかった. また, 3 粒播きと 4 粒播きを比較したところ, 利用率は 94.6% から 99.2% へと上昇したが, 上昇率は小さく, 3 粒播き程度で十分 PP を効率的に利用できると考えられる. PP 1 穴あたり複数粒の播種を行った際は, PP1 穴あたりの苗数が異なる PP 苗が生産され, 10 月 3 粒播き条件では 1 本苗が 34 本, 2 本苗が 55 本, 3 本苗が 28 本生産された. 今後は, PP1 穴あたりの苗数が定植後の生育に及ぼす影響を調査する必要がある.

施肥が苗の生育に及ぼす影響

施肥条件を検討したところ、対照区に対して液肥区、油かす / 液肥区、マグアンプ K / 液肥区の3区で有意に成長が促進され、施肥管理による苗の生育促進が可能であることが明らかとなった。続いて、液肥の施肥回数を20回、培養土を40Lとし、さらに培養土に元から含まれる肥料も合算したうえで、各区画のPP1冊あたりのN, P, Kの量を計算、比較した。その結果、N : P : Kは、それぞれ対照区で4g : 6.4g : 12.8g、液肥区で16.8g : 14.4g : 16.8g、油かす区で16.4g : 20.4g : 20.8g、油かす / 液肥区で22.8g : 28.4g : 24.8g、マグアンプ K区で18.2g : 58.4g : 20.6g、マグアンプ K / 液肥区で24.6g : 66.4g : 24.6gであった。単施肥条件である液肥区、油かす区、マグアンプ K区の3区画において液肥区でのみ有意差が認められたことから、3区画のN, P, Kの量を比較したところ、油かす区、マグアンプ K区の各量は液肥区と同等以上であった。そのため、油かす区、マグアンプ K区で頂小葉長の有意な増加が認められなかった原因是N, P, Kの量ではなく液肥に含まれるN, P, K以外の無機要素または施肥方法であると考えられる。N, P, K以外の元素に関してはPP1冊あたり液肥区ではMgが0.008g、Mnが0.003g、Bが0.013g含まれ、これらが要因として考えられるが、油かす区、マグアンプ K区に地上部に目立った変色などは認められなかった。施肥方法に関しては、本実験では苗の肥料やけを懸念して油かすとマグアンプ KはPPの底から3cm程度の位置に混合したため、根が肥料に届くまでに時間を要し、油かす区、マグアンプ K区では育苗初期段階で肥料を吸収できなかった可能性がある。そのため、緩行性の肥料を施肥する場合はPP全体に混合、PPの中間程度の高さに混合するなど施肥方法を検討する必要がある。一方、液肥と油かすまたはマグアンプ Kの組み合わせでは顕著に最大頂小葉長が大きくなつており、これは即効性である液肥により、生育が促進され、比較的早くPPの底に施肥した緩効性肥料に根が届いたためであると考えられる。また、液肥と組み合わせる元肥の比較として油かす / 液肥区とマグアンプ K / 液肥区を比較したところ、マグアンプ K / 液肥区の最大頂小葉長が大きくなる傾向が認められた。これまでの研究でNおよびPはトウキの生育に強く影響を及ぼすと報告され[31]、油かす / 液肥区に比してマグアンプ K / 液肥区ではNが1.8g、Pが38.0g多く含まれていたために、生育が促進されたと考えられる。一方、マグアンプ K / 液肥区ではPがNの2.7倍多く含まれるというPが極端に多い配合比率になっていたために更にNの量を増やすことでより生育を促進できる可能性がある。

間引き時期の検討

間引き時期を検討したところ、12月や1月に間引きする場合に比して2月や3月に間引きを行うことで、4月時点での苗の複葉長と頂小葉長が増加した。これは播種後2,3ヶ月経過時点の比較的早期に間引きを行う場合、苗自体が十分に成長しておらず、残すべき苗が間引き作業の影響を受け、生育が阻害された可能性がある。加えて、生育初期では小葉の展開が不十分で苗の生育の判断が困難であるということも、12月、1月間引き条件で苗が小さくなった原因の1つであると考えられる。また、3月に間引きを行う場合、2月に行う場合と比べて作業に要する時間は約2倍に増加する。これは3月では苗が大きく成長しており、トウキの葉が作業の障害になっているためである。以上の結果より、PP用いた温室育苗における最適な間引き時期は2月であると考えられる。

第5項 小括

9月に播種を行い、上記の施肥条件で育苗したところ、平均で最大頂小葉長が9.6cmの苗を得た。最大頂小葉長が9.6cmの苗の根頭部径は7.0mm程度と予測され、一般に定植が推奨されている苗と同程度の根頭部径の苗である。更に生産された苗のうち根頭部径が5-8mm程度の定植に適した苗の割合は53%であり、他の施肥条件と比べ最も高くなかった。なお、無施肥条件では17%にとどまった。以上のことからも、施肥は必須であると考えられる。一方、同条件で育苗を行ったにも関わらず、苗の生育に個体差が生じ、根頭部径が1.5mm程度の苗から15.3mm程度の苗まで様々な生育段階の苗が存在した。極端に細い苗に関しては間引きを行うことで除くことが可能である。一方、トウキは苗の根頭部径が大きいほど生育が旺盛になると報告されていることから[16]、特に太いPP苗に関しては芽くり[3]のような成長抑制処理を施してから定植することで、収穫量の増加が期待される。種子の品質により発芽率が異なるものの、今回の傾向は広く応用可能であり、PPを用いた屋内苗を行うことで約6ヶ月という短期間で充実した苗を安定的に生産可能であると考えられる。

第3節 ペーパーポット苗の生育度合いの差が定植後の生育に及ぼす影響

第1項 緒言

本章では、第2章で生産したPP苗について定植に適した苗の検討を行う。第2章で開発したPPを用いた屋内育苗方法によりトウキの苗を安定的かつ短期間で生産できるようになった。一方で、同一条件で生産したにも関わらず苗は多様性に富み、根頭部の径が1.0 mm程度の細い苗から16 mm程度の太い苗が確認された (Fig. 17)。先に述べたように伝統的なトウキの栽培方法において苗の根頭部径はトウキの抽苔と密接に関わり、生産量に大きな影響を及ぼす。一方、本手法で生産したPP苗は通常の苗と形状が異なるうえ、育苗の環境、期間が大きく異なる。そのため、これまでの伝統的な苗の生育と異なる傾向を示す可能性があるが、詳細は不明である。そこで本章ではPP苗の生育状態の違いが定植後の生育と収穫量に及ぼす影響を調査し、定植に最適な苗の条件を明らかにすることを目標とした。

第2項 材料と方法

2018年9月21日にスーパー ミックスAを充填したPPにトウキの種子を播種した。なお、スーパー ミックス、PPとともに第1章、第2章で使用したものと同じものである。2018年9月21日にトウキの種子を元肥と培養土を充填したPPに1穴あたり1粒播種した。元肥としてマグアンプK (N : P : K : Mg = 6% : 40% : 6% : 15%, 株式会社ハイポネックス ジャパン) を培養土1 Lに対して3.25 gを底から3 cm程度の深さに混合した。また、追肥として1,000倍希釀した花工場 (N : P : K : Mg : Mn : B = 8% : 10% : 5% : 0.01% : 0.004% : 0.016%, 住友化学園芸株式会社) を約1週間に1度PP1冊当たり4 L施肥した。液肥は9割以上の苗の本葉が展開した10月24日から行った。覆土後、糞殻で培養土の表面を覆い、2019年4月5日まで温室で管理し、4月6日に苗を全て屋外に移動した。その後、19本のPP苗それぞれの根頭部径 (Y mm) と頂小葉長 (X cm) を計測し線型近似曲線を得た ($Y = 0.777X - 0.610$, $R^2 = 0.97$)。また、残りのPP苗を頂小葉長の長さに応じて7段階に分類した (P1, 2.0 cm–2.9 cm; P2, 3.0 cm–3.9 cm; P3, 4.0 cm–5.9 cm; P4, 6.0 cm–7.4 cm; P5, 7.5 cm–9.9 cm; P6, 10.0 cm–12.7 cm; P7, 12.8 cm–17.3 cm)。これらの苗の根頭部径を線形近似曲線を用いて計算したところ、P1, 0.9 mm–1.6 mm; P2, 1.7 mm–2.4 mm; P3, 2.5 mm–4.0 mm; P4, 4.1 mm–5.1 mm; P5, 5.2 mm–7.1 mm; P6, 7.2 mm–9.3 mm; P7, 9.4 mm–12.8 mm. であった。その後、各PP苗 (P1, 50 個体; P2, 50 個体; P3, 100 個体; P4, 100 個体; P5, 100 個体; P6, 78 個体; P7, 29 個体) と伝統的な方法で育苗した苗(以降、TSまたは慣行苗。根頭部径, 7.0 mm–8.0 mm; 51 個体)を2019年4月12日に株間40 cm, 条間40 cm, 穴間150 cmの二条千鳥植で定植した。なお、TSは福田浩三博士(福田商店、奈良県)から提供された。慣行苗の生産方法は以下の通りである。2018年4月に圃場に播種し、2019年まで無施肥条件で露地管理した。定植後、苗の生存数、抽苔数を6月から11月の間に19回 (2019年6月11日, 6月7日, 7月8日, 7月15日, 7月23日, 8月9日, 8月27日, 9月2日, 9月6日, 9月9日, 9月17日, 9月30日, 10月3日, 10月9日, 10月11日, 10月25日, 10月30日, 11月1日, 11月5日) 測定した。更に生存数から抽苔数を減じて生産数を算出した。また、各値から生存率と抽苔率、生産率を算出した。2019年11月に収穫を行い、葉鞘を10 cm残して地上部を切除した。その後、水洗いにより土砂を取り除き、生重量を測定した。測定後、2020年1月27日まではさ掛け[3]を行った。一次乾燥が終了した根を湯もみ (60°C–70°C,

1時間). その後, 2日間再びはさ掛け乾燥を行った. はさ掛け後, 恒温乾燥機 (EOP-450B, ETTAS) 内で 60°C 12時間の加熱乾燥を行った. その後, 室温で 48時間放置し, 再び 60°C 12時間の乾燥を行った. 全ての乾燥工程が終了した後に, 葉鞘を除去し, 乾燥重量を測定した.

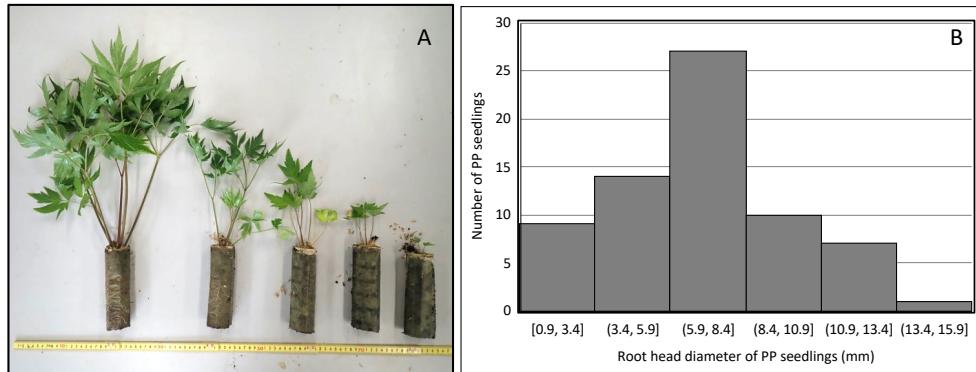


Fig. 17A 異なる生育段階の PP 苗. B PP 1 冊 (130 穴) で生産した苗数と根頭部径の分布. 2 播種日: 2018 年 9 月 21 日, 1 穴あたりの播種数は 1 粒, 根頭部径は 2019 年 4 月 5 日に測定した頂小葉長をもとに算出した. 施肥条件: マグアンプ K (N : P : K : Mg = 6% : 40% : 6% : 15%) を元肥として各穴に培養土 1L あたり 3.25 g 混合した. 更に液肥 (N : P : K : Mg : Mn : B = 8% : 10% : 5% : 0.01% : 0.004% : 0.016%) を追肥した.

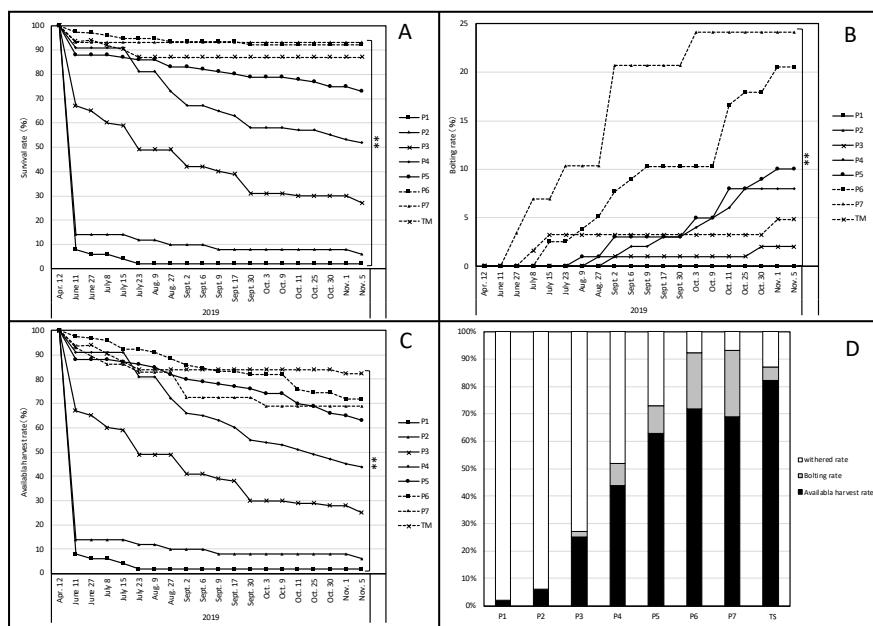


Fig. 18 A 生存率の変化. B 抽苔率の変化. C 生産率の変化. D 2019 年 11 月 11 日 (収穫直前時点での) 各苗の枯死率, 抽苔率, 生産率. 生産数は定植した苗の数から抽苔数と枯死数を減じて求めた. P1-P7: 成長段階に応じて分類した PP 苗. TS: 伝統的な手法を用いて生産した苗. 各 PP 苗の根頭部径は P1, 0.9 mm–1.6 mm; P2, 1.7 mm–2.4 mm; P3, 2.5 mm–4.0 mm; P4, 4.1 mm–5.1 mm; P5, 5.2 mm–7.1 mm; P6, 7.2 mm–9.3 mm; P7, 9.4 mm–12.8 mm; TS, 7.0 mm–8.0 mm. また各苗の定植数は P1, 50 個体; P2, 50 個体; P3, 100 個体; P4, 100 個体; P5, 100 個体; P6, 78 個体; P7, 29 個体; TS, 62 個体. 11 月 5 日時点の PP 苗の生存率, 抽苔率, 生産率において Chi-squared test を行った. **: $p < 0.01$.

第3項 結果

Fig. 18A-D は 4 月 12 日から 11 月 5 日までの生存率, 抽苔率, 生産率の推移を示す。6 月 11 日での生存率は P1 が 8.0%, P2 が 14.0%, P3 が 67.0%, P4 が 91.0%, P5 が 88.0%, P6 が 97.4%, P7 が 93.1%, TS が 93.5% であり, P1, P2 では生存率が顕著に低く, 定植後約 2 ヶ月で 86% 以上の株が枯死していた (Fig. 18A)。一方で, P4-P7, と TS では枯死した株の割合は 12% 以下であった。その後, 生存率は全条件で経時的に低下した。特に P3 と P4 では生存率の低下が著しく, 9 月 30 日時点での生存率は P3 で 31.0%, P4 で 58.0% であった。収穫直前の 11 月 5 日時点での生存率は, P1 が 2.0%, P2 が 6.0%, P3 が 27.0%, P4 が 52.0%, P5 が 73.0%, P6 が 92.3%, P7 が 93.1%, TS が 87.1% と頂小葉が長くなるに従い生存率は上昇し, 特に P6, P7 においては 90% 以上の高い値を示した。1 月 5 日時点での生存率と定植時の苗の太さに 1% 水準で有意差が認められ, 苗の太さが生存率に影響を及ぼすことが明らかとなった (Chi-squared test)。抽苔に関しては, 6 月 27 日に P7 で最初の抽苔が観察されて以降, TS は 7 月 8 日, P6 は 7 月 15 日, P5 は 8 月 9 日, P4 は 8 月 27 日, P3 は 9 月 2 日にそれぞれ条件内における最初の抽苔が観察され, 頂小葉が長い条件ほど早く抽苔が起こった (Fig. 18B)。その後, P1, P2 を除く全条件で経時的に抽苔率が上昇し, 11 月 5 日時点での抽苔率は P1 が 0.0%, P2 が 0.0%, P3 が 2.0%, P4 が 8.0%, P5 が 10.0%, P6 が 20.5%, P7 が 24.1%, TS が 4.8% であり, 頂小葉が長い条件ほど抽苔率は高くなった。また, P6 と TS は同程度の根頭部径であるにも関わらず, TS に比して P6 では著しく高い抽苔率を示した。また, 根頭部径が TS より細いにも関わらず, P4, P5 でも TS に比して高い抽苔率が認められた。11 月 5 日時点での抽苔率と定植時の苗の太さに, 1% 水準で有意差が認められ, 苗の太さが抽苔率に影響を及ぼすことが明らかとなった (Chi-squared test)。生産率に関しては, 6 月 11 日時点は P1 が 8.0%, P2 が 14.0%, P3 が 67.0%, P4 が 91.0%, P5 が 88.0%, P6 が 97.4%, P7 が 93.1%, TS が 93.5% であり, 生存率と同様の値であったが, その後経時的に生存率の減少, 抽苔率の増加が起こり収穫直前の 11 月 5 日時点での生産率は, P1 が 2.0%, P2 が 6.0%, P3 が 25.0%, P4 が 44.0%, P5 が 63.0%, P6 が 71.8%, P7 が 69.0%, TS が 82.3% となった。生存率に関しては TS に比して P6, P7 で高い値を示していたが, PL6, PL7 は抽苔率も高く, 生産率では TS が最も高い生産率を示した (Fig. 18C, D)。収穫後, 水洗いにより土砂を取り除き, 地上部を切除した PP 栽培トウキと慣行栽培トウキを Fig. 19 に示す。1aあたりの生重量は P1 が 1.6 kg, P2 が 2.9 kg, P3 が 21.9 kg, P4 が 58.9 kg, P5 が 64.0 kg, P6 が 87.4 kg, P7 が 117.6 kg, TS が 93.3 kg であった (Fig. 20A)。また, 11aあたりの製品重量は P1 が 0.1 kg, P2 が 0.3 kg, P3 が 2.6 kg, P4 が 8.1 kg, P5 が 10.9 kg, P6 が 13.9 kg, P7 が 18.9 kg, TS が 13.4 kg であった (Fig. 20B)。1 株あたりの生重量は P1 が 235.0 g, P2 が 144.7 g, P3 が 265.9 g, P4 が 405.9 g, P5 が 302.9 g, P6 が 362.3 g, P7 が 516.8 g, TS が 343.7 g であった (Fig. 20A)。1 株あたりの生重量について Tukey's multiple comparison test を行ったところ, P2 と P7 間, P3 と P7 間, P5 と P7 間, P6 と P7 間, P7 と TS 間に 5% 水準で有意差が認められた。なお, P1 は生存株が 1 株のみであったため, 統計処理は行わなかった。1 株あたりの製品重量は P1 が 21.6 g, P2 が 23.8 g, P3 が 33.3 g, P4 が 54.9 g, P5 が 51.4 g, P6 が 58.5 g, P7 が 83.0 g, TS が 52.5 g であった (Fig. 20B)。1 株あたりの製品重量について Tukey's multiple comparison test を行ったところ, P3 と P6 または P7 間, P4 と P7 間, P5 と P7, P7 と TS の間に 5% 水準で有意差が認められた。なお, P1 は収穫株が 1 株のみであったため, 統計処理は行わなかった。



Fig. 19. A:PP 苗から成長したトウキの根. B : TS から成長したトウキの根.

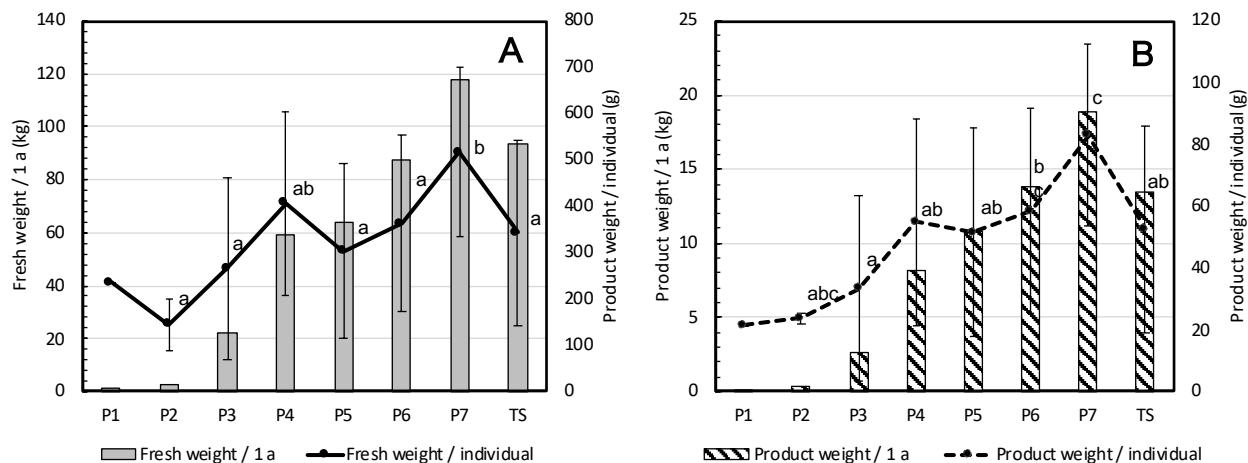


Fig. 20 各苗の生重量 (A) と乾燥重量 (B) . P1—P7: PP 苗. TS: 伝統的な手法により生産した苗. 各 PP 苗の根頭部径は P1, 0.9 mm–1.6 mm; P2, 1.7 mm–2.4 mm; P3, 2.5 mm–4.0 mm; P4, 4.1 mm–5.1 mm; P5, 5.2 mm–7.1 mm; P6, 7.2 mm–9.3 mm; P7, 9.4 mm–12.8 mm; TS, 7.0 mm–8.0 mm. また各苗の定植数は P1, 50 個体; P2, 50 個体; P3, 100 個体; P4, 100 個体; P5, 100 個体; P6, 78 個体; P7, 29 個体; TS, 62 個体. また各苗の収穫数は P1, 1 個体; P2, 3 個体; P3, 25 個体; P4, 44 個体; P5, 64 個体; P6, 57 個体; P7, 20 個体; TS, 51 個体. Mean \pm SD. 異なるアルファベット間に 5% レベルで有意差あり (Tukey's multiple comparison test, $p < 0.05$) . P1 では収穫個体が 1 であったため, 統計解析からは除外した. 各条件の 1a あたりの乾燥または生重量 (kg) = (各条件ごとの収穫量 (kg)) \times (330 / 各条件の定植数) .

第4項 考察

トウキの栽培において育苗は収穫量のみならず、抽苔の有無にも関与することから生薬としての品質を左右する重要な工程である[16, 19, 32]。第2章で開発したPPを用いた屋内育苗方法を用いることで短期かつ安定的に苗を生産することが可能になる。一方、本手法で育苗したPP苗は生育状態に大きな個体間差異が認められ、PP苗においても慣行苗と同様に苗の選別を行う必要が示唆された。しかし、定植に最適なPP苗の条件は不明であったために、本研究ではPP苗を成長段階ごとに定植し、定植後の生育と収穫量、製品重量を比較した。具体的には根頭部径が0.9 mm–12.8 mmの生育状態の異なるPP苗と慣行的な栽培方法で定植が推奨されている7.0 mm–8.0 mm程度の慣行苗を定植し、定植後の生育と収穫量を比較することで生産量を指標に定植に最適なPP苗の条件を調査した。その結果、PP苗は根頭部径が太くなるほど、定植後の生存率や抽苔率が高くなり収穫量も増加することが明らかとなった。この傾向は慣行的な育苗方法で生産した苗と同様の傾向である[3]。一方、P1とP2のおおよそ90%のPP苗は生育評価の初日（6月11日）までに枯死した。これはP1やP2の苗が未熟であり定植から2ヶ月以内に根がPPから圃場の土壤に根を出すことができず、乾燥の影響を強く受けた可能性がある。それゆえ、根頭部径が2.4 mm以下の苗は定植に不向きであることが判明した。しかしながら、PP苗とTSを比較したところ、P6とTSは同程度の根頭部径であるにも関わらず、P6は著しく高い抽苔率を示した。また、根頭部径がTSより細いP4、P5でもTSに比して高い抽苔率を示した。以上のことから、PP苗は慣行苗に比して抽苔しやすい傾向があり、慣行苗と同様の苗の選別基準、栽培管理方法ではより多くの株が抽苔してしまうと考えられる。特にP6とTSは1株あたりの製品重量、1aあたりの製品重量ともに同程度の結果を示したものの、抽苔率に関してはP6が20.5%、TSが4.8%と大きく異なり、P6では比較的多くの個体が抽苔し薬用価値を失ったため、収穫段階で処分した。本結果よりPP苗は抽苔しやすいと考えられる。これまでにトウキの苗は植え付ける際に側根などを切除してから植え付けることで抽苔を防ぐことができると報告されている[32]。つまり、本研究で多くのPP苗が抽苔したのは、PP苗が育苗段階において掘り上げ工程を経ないために根が損傷を受けなかつたことが理由であると考えられる。加えて、育苗期間の異なる育苗温度や日長条件が抽苔率に影響を及ぼした可能性もあるが現時点では詳細は不明である。また実際の生産現場では、慣行的な栽培方法では特に太い苗を植え付ける際、苗の根頭部にある成長点を取り除く、芽くりとよばれる成長抑制処理を行うことで苗の抽苔を防ぎ、収穫量の低下を防いでいる[3, 16, 21]。PP苗においても抽苔を防ぐことができれば収穫量の増加が期待できるものの、PP苗は慣行苗と苗の形状が大きく異なるため慣行的な成長抑制方法とは異なる、独自の成長抑制処理が必要である。以上、根頭部径が7.2 mm–12.8 mm以上のPP苗を植え付けることで従来の栽培方法と同等以上の収穫量を得ることができると明らかになった。一方で、PP苗は慣行苗に比して抽苔易いことが明らかになった。

第4節 ペーパーポット苗から調製した当帰の品質評価

第1項 緒言

当帰は古来、甘く辛く、香りが良いものや[33]、側根を馬の尾のような形状に調製した、いわゆる馬尾当帰が良品とされてきた[6]。現在では香りや味、形状といった伝統的な品質評価方法に加え、化学的な手法により品質が評価されている。当帰のJP18における含量規定は、灰分7%以下、酸不溶性灰分1%以下、希エタノールエキス含量35.0%以上と規定されている[1]。PPから生産された当帰がこれらの項目を満たさない限り、新たな栽培方法を開発したということはできない。

PP苗は根が培養土と紙に包まれた状態で定植される。PPに使用されている紙は土中で分解する素材である[15]。しかし、トウキのように定植後の栽培期間が6ヶ月程度しかない場合は一部の紙が分解せずに根とともに収穫されることがある。そのため、PP苗から栽培、調製した当帰（以下、PT）は慣行苗を用いて栽培、調製した当帰（以下、TT）に比してPPや土砂など、根部における夾雜物が増加すると予想される。当帰は加えて、慣行苗は12ヶ月程度の育苗期間を経ているのに対し、PP苗の育苗期間は約6ヶ月と半分程度であるため、PTの含有成分量がTTと同等であるか調査する必要があると考えられる。また、当帰に含まれる主要な精油成分の一つであるZLは当帰の香りに関連すると報告[34]があるだけでなくJP18からはTLCによる確認試験が追加され[1]、近年その重要性が増している。ZLは抗アセチルコリン作用[35]や血管拡張作用[36]などが報告されており、品質評価指標として頻用される[19, 31, 37-40]。これまでに我々は、ZLが当帰の細い根に局在しており、主根や側根が多い個体ほどZL含量が多い傾向を示すことを明らかにしている[41]。PTとTTは異なる栽培方法により生産されるため根部の形状が異なる可能性があり、ZLに関しても比較を行う必要があると考えられる。以上のように、PTとTTは種々の品質評価項目において差異が存在する可能性があるものの、両者の品質を比較した報告はなく、PTの品質は不明である。本章ではPP苗から調製した当帰の品質を明らかにすべく、希エタノールエキス含量、灰分、酸不溶性灰分、ZL、形状の項目からPTとTTの品質を評価、比較した。

第2項 材料と方法

希エタノールエキス含量, 灰分, 酸不溶性灰分試験

2015年12月15日にトウキの種子をPPに播種し, ビニルハウスで育苗した後, 2016年4月19日に定植し, 11月17日に収穫した。2017年3月6日まではさ掛けを行った後, 湯もみ(60°C–70°C, 1時間)を行い, 再度4月8日まではさ掛けを行い, 地上部および葉鞘を切除した後2017年産PTを得た。2017年10月19日にトウキの種子を培養土を充填したPPに播種し, ビニルハウスで育苗した後, 2018年4月13に定植し, 11月8日に収穫した。2019年3月5日まではさ掛けを行った後, 湯もみ(60°C–70°C, 1時間)を行い, 再度4月11日まではさ掛けを行い, 地上部および葉鞘を切除して2019年産PTを得た。なお, 両年とも対照区として慣行苗を定植し, PP苗と同様の条件で栽培, 調製して2017年産TT, 2019年産TTを得た。生産した2017年産PT, TT, 2019年産PT, TTについて無作為に各3個体ずつ抽出し, JP18に則り, 希エタノールエキス含量, 灰分, 酸不溶性灰分を測定するとともに, PTとTTの品質を比較した。また, 2019年産PT, TTについて湯もみに要する時間を測定した。

形状の比較

製品重量を測定した当帰について, PTとTTそれぞれから無作為に13個体ずつサンプルを抽出し, 根頭部, 主根, 側根の3部位に分類した。その後, 各部位を約1.0cm角に刻み, デシケーター内で60時間乾燥させた。乾燥後, 各部位の重量を測定し, 全体の重量に占める部位別の重量比率を算出し, 形状評価後, 粉碎し, 試料を得た。

ZLの定量

試料各0.03gを精密に量り, MeOH 1.5mLを加えて30分超音波抽出を行った。抽出後の溶液を15,000 rpmで5分間遠心し, 上清をメンブランフィルター(FILTSTAR 0.45 μm 日本ジェネティクス(株))に通して試料溶液とする。その後, HPLC法によりZLの測定を行った。

また, 各部位のZL含量と乾燥重量から1個体あたりのZL含量(=総ZL含量)を算出した。なお, 本実験では60°C/12時間乾燥2回とデシケーター内での60時間乾燥後に乾燥減量を測定したところ, 13個体の全部位で減量が0.45%以下であることを確認したため, 乾燥減量による補正は行わなかった。

第3項 結果

希エタノールエキス含量, 灰分, 酸不溶性灰分試験

JP18 に則って 2017, 2019 年産 PT, TT に対して JP18 に準じた試験を行った結果を Table 3 に示す。希エタノールエキス含量は 2017 年産 PT で 43.7%, 2017 年産 TT で 48.7% であり有意差は認められなかった (Student's *t*-test)。2019 年産 PT で平均値 45.4%, 2017 年産 TT で平均値 45.6% であり、有意差は認められなかった (Student's *t*-test)。以上、全条件で規定値 35.0% を満たした。灰分は 2017 年産 PT で平均値 5.82%, 2017 年産 TT で平均値 6.01% であり有意差は認められなかった (Student's *t*-test)。2019 年産 PT で平均値 6.62%, 2017 年産 TT で平均値 6.34% であり有意差は認められなかった (Student's *t*-test)。以上、全条件で規定値の 7.0% 以下を満たした。酸不溶性灰分は 2017 年産 PT で平均値 0.10%, 2017 年産 TT で平均値 0.16% であり有意差は認められなかった (Student's *t*-test)。2019 年産 PT で平均値 0.48%, 2017 年産 TT で平均値 0.36% であり、有意差は認められなかった (Student's *t*-test)。以上、酸不溶性灰分は全条件で規定値の 1.0% 以下を満たした。

湯もみの揉み洗い工程に要する時間は PT が一個体当たり平均 106 秒 ($n = 6$), TT が一個体当たり平均 58 秒 ($n = 5$) であり、有意差が認められた (Student's *t*-test, $p > 0.01$)。

形状の比較, ZL の定量

生産した PT, TT の様子を Fig. 21 に、それぞれを部位ごとに分類した様子を Fig. 22 に示す。各サンプルを 3 部位に分類し重量を測定した後、根部全体の重量に占める各部位の割合を算出し、PT と TT 間で比較した結果を Fig. 23 に示す。PT の根頭部、主根、側根それぞれの平均割合は 28.6%, 18.1%, 53.3% であり、TT の根頭部、主根、側根それぞれの平均割合は 34.8%, 32.8%, 32.4% であった。TT に比して PP は根頭部、主根の割合が小さく、側根の割合が大きかった。部位の平均割合について Student's *t*-test を行ったところ、PT と TT 間において根頭部、主根、側根の割合に有意差が認められた。その後、各部位に関して ZL の定量を行ったところ、PT の根頭部、主根、側根それぞれの平均含量は 0.08%, 0.09%, 0.06% であり、TT の根頭部、主根、側根それぞれの平均含量は 0.11%, 0.11%, 0.13% であり、PT, TT ともに部位別の含量に有意差は認められなかった (Fig. 24)。一方、総 ZL は PT で平均 0.07%, TT で平均 0.12% であり PT に比して TT で有意に含量が高かった (Fig. 25)。

Table 3 異なる方法で生産した当帰の日本薬局方の試験結果

Year		Dilute ethanol-soluble extract (%)	Total ash (%)	Acid-insoluble ash (%)
2017	PT	43.7 (± 3.9)	5.82 (± 0.46)	0.10 (± 0.01)
	TT	48.7 (± 1.2)	6.01 (± 0.48)	0.16 (± 0.02)
2019	PT	45.4 (± 2.7)	6.62 (± 0.22)	0.48 (± 0.14)
	TT	45.6 (± 2.3)	6.34 (± 0.43)	0.36 (± 0.05)

PT : PP 苗から生産した当帰。TT : 伝統的な手法で生産した当帰。 $n = 3$, mean \pm SD。各項目は第十八改正日本薬局方に基づいており、それぞれの規定値は以下の通りである。希エタノールエキス含量 : 35.0% 以上、灰分 : 7% 以下、酸不溶性灰分 : 1.0% 以下。



Fig. 21 PT : PP 苗から生産した当帰. TT : 伝統的な手法で生産した当帰.

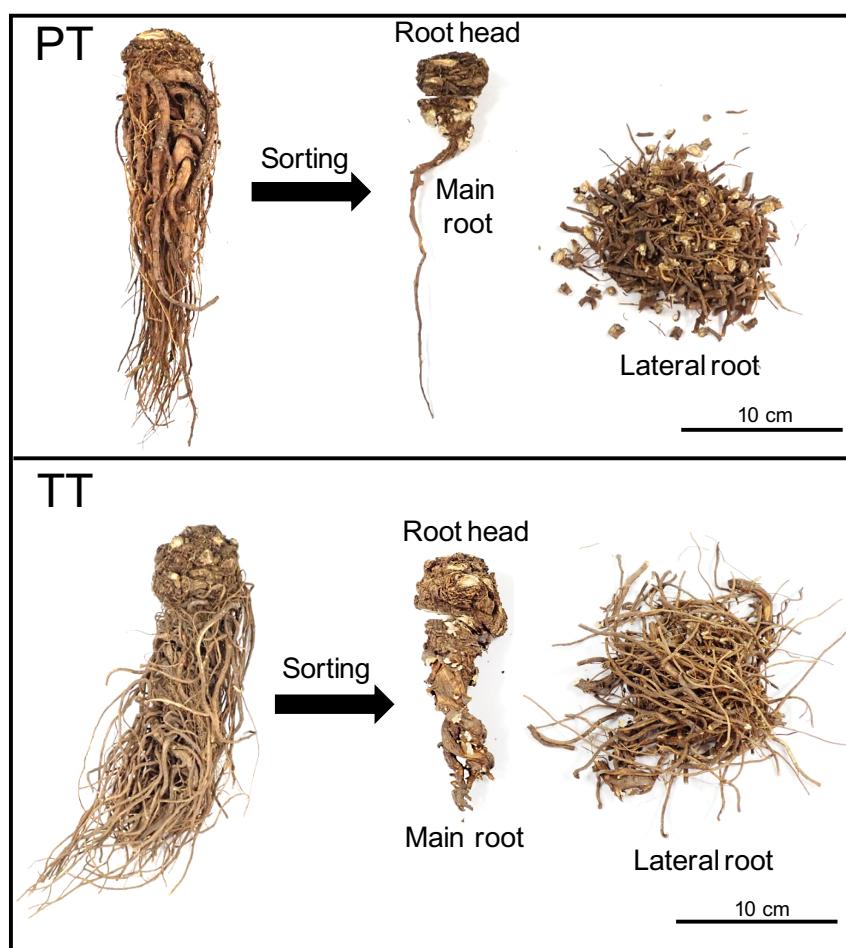


Fig. 22 各当帰は根頭, 主根, 側根の三部位に分割された. PT : PP 苗から生産した当帰. TT : 伝統的な手法で生産した当帰.

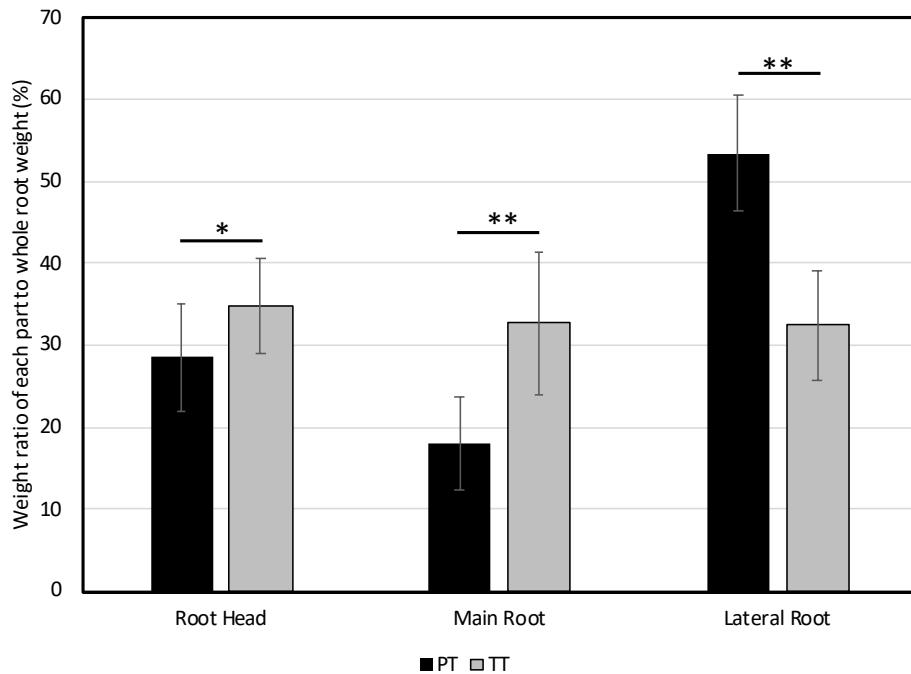


Fig. 23 PT と TT の部位別重量比.

PT : PP 苗から生産した当帰. TT : 伝統的な手法で生産した当帰. $n = 13$, Mean \pm SD, Student's *t*-test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

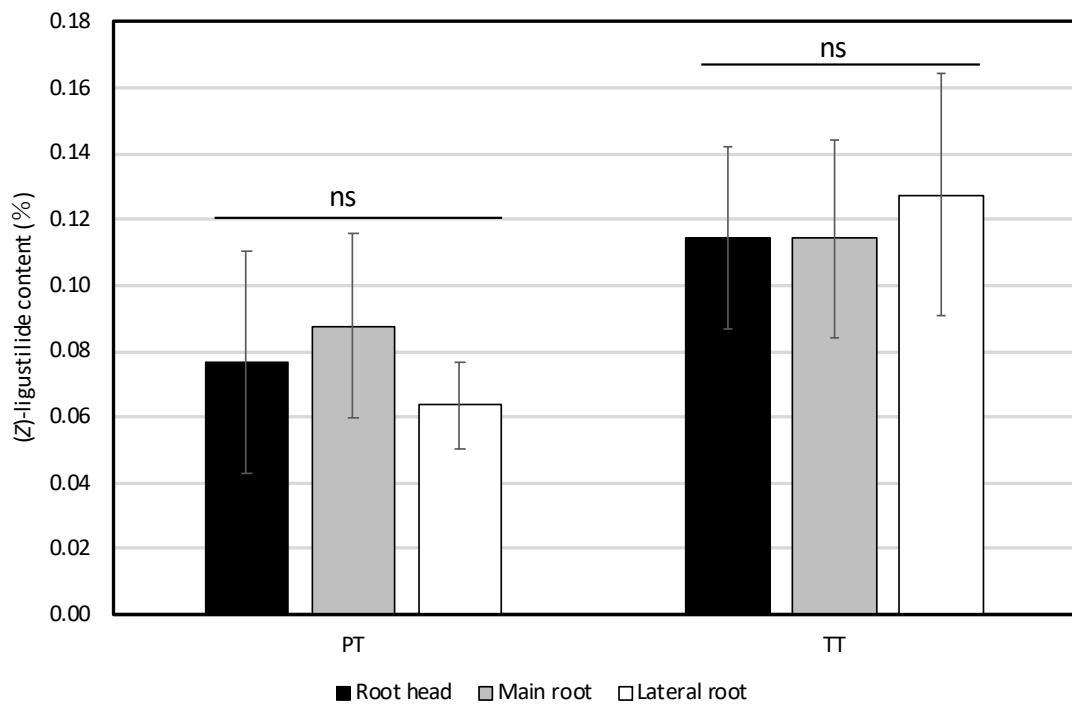


Fig. 24 PT と TT それぞれにおける部位別の ZL 含量. PT : PP 苗から生産した当帰. TT : 伝統的な手法で生産した当帰. $n = 13$, Mean \pm SD, Tukey's multiple comparison test, ns: not significant

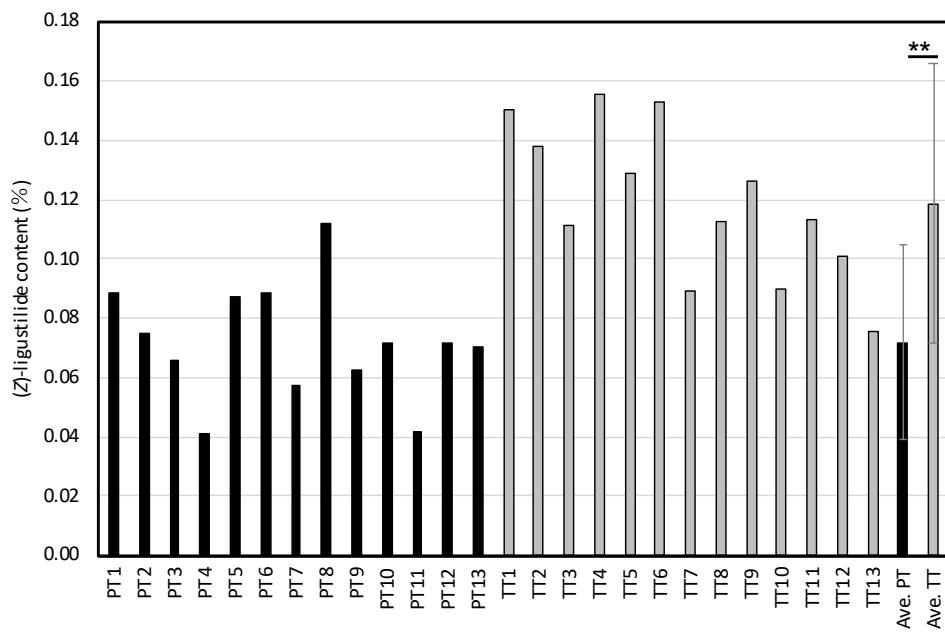


Fig. 25 PT と TT の Z L 含量の比較. PT : PP 苗から生産した当帰. TT : 伝統的な手法で生産した当帰. $n = 13$, Mean \pm SD, Student's t -test, **: $p < 0.01$

第4項 考察

希エタノールエキス含量, 灰分, 酸不溶性灰分試験

2017年, 2019年に生産したPT, TTについてJP18に則り, 希エタノールエキス含量, 灰分, 酸不溶性灰分の3項目について試験を行ったところ, 全項目でJP18の規定値を満たし, 各項目のPTとTTの値は同程度であった. これまでの研究で根頭部の径が8mmから24mm程度のトウキの苗を植え付けて乾燥重量と希エタノールエキス含量を比較したところ, 植え付ける苗が太くなるほど重量が大きくなったものの, 希エタノールエキス含量の差異は小さいと報告されている[21]. 本研究でも, PTとTTの希エタノールエキスが同程度の含量を示したことから, 苗の状態が希エタノールエキス含量に与える影響は小さいと考えられる.

また, 湯もみの揉み洗い工程に要する時間はPTが一個体当たり平均106秒, TTが一個体当たり平均58秒でおよそ2倍に増加し, PP苗を用いて栽培したトウキはより多くの土砂を噛み込んでいたと推測される. PTで土砂の噛み込みが多くなった理由はPTで側根が多いからであったと考えられる. 本研究では湯もみを行っているため十分に土砂等を取り除くことができたものの, 湯もみを行わなければ灰分, 酸不溶性灰分の規定上限を超える可能性がある. 一方で, PP苗を用いた場合, 湯もみに要する時間が長くなるのは大きな課題である. しかし, 本研究で用いたれたPPの規格はFS515という大きいものであり, 今後, より小さな規格のPPを使用することで根の夾雑物を減らすことが可能になり, 湯もみに要する時間も短縮することが期待される. 以上, 短期育苗方法により生産したPP苗からJP18の規定を満たす当帰を生産可能であることが明らかになった.

形状の比較, ZLの定量

PTとTTの形状を比較したところ, PTはTTに比して全体の重量に占める, 根頭や主根の割合が小さく, 側根の割合が多いことが明らかとなった. これは慣行苗が掘り上げ工程により, 細い根が切断, 脱落しているのに比して, PP苗は掘り上げ工程を経ず, 細い根を痛めることなく定植可能であるからだと考えられる. また, 切根処理を行うことで主根の太さが増加することが報告されており, 本研究の結果を支持している[32]. これまでに我々は, 湯もみを行っていない当帰に関して, ZLは側根など特に細い根に多く含まれ, 全体の重量に占める根頭部の割合が小さく, 主根や側根の割合が多い個体ではZL含量が高くなることを報告している[41]. しかしながら, 本研究ではTTに比して側根が多いPTのZL含量が低くなり, これまでの結果と異なる傾向を示した. 更に, 根頭部, 主根, 側根の部位別ZL含量を比較したところ, 部位間のZL含量に有意な差は認められず, 特にPTにおいては側根の含量が最も低くなつた. 以上の結果より, トウキに含有されるZLは湯もみにより局在性を失うことが明らかとなり, ZLの均一化も湯もみの目的の一つである可能性がある. *A. sinensis*を原植物とする中国の当帰では, 一般的に湯もみは行われず, 根頭部から主根上部を「帰頭」, 側根を「帰尾」として使い分ける[42]. 一方で, 一般的に日本の当帰は部位ごとに使い分けられることはなく, これは湯もみによる成分の均一化が要因の一つである可能性がある.

また, PTにおいては側根の含量が最も低くなつており, TTとは異なるZLの局在傾向を示した. これまでにZLは湯もみにより低下することが報告されている[43]. 本研究におけるPT, TT間の含量差は, 側根が多いというPTの形状特性に起因し, 側根が多くなつたために面積が増加し, 熱や湯など湯もみの影響をより強く受けたと考えられる. 加えて, PTでは揉み洗い工程に要する時

間が TT の約 2 倍に増加しており、湯もみの影響を強く受けたと考えられる。以上、PT と TT は例え同条件で調製したとしても ZL 含量に差異が生まれる。

当帰の生産方法は江戸時代に確立された[3]。それ以前は、*A. sinensis* から調製した唐当帰が中国から輸入され、薬として使用されていたと考えられる[4]。しかし、日本の漢方医は唐当帰を採用することなく、当帰を採用した。唐当帰に含まれる ZL は 0.94–1.42%[39]であり、当帰に比して顕著に多い。また、五感による伝統的な品質評価方法により、高品質とされるトウキと低品質とされる当帰を比較した際、高品質な当帰の ZL 含量は低いという報告もある[44]。そのため、必ずしも ZL を多く含む当帰が日本人に適しているとは言い難い。そのため、本研究で生産した ZL 含量の低い当帰は新たな市場価値を有する可能性がある。

以上、PT は TT に比して多くの側根を有するが、湯もみにより ZL 含量は均一化され、特に細い根は強い影響を受けたと予想され、含量の低下が容易に起こったと考えられる。仮に、PT の ZL 含量を高める必要がある場合は湯もみ工程における湯への浸漬時間を変更するなど湯もみ条件を変更する必要がある。本研究では、我々は短期育苗方法により生産した PP 苗の条件が定植後の生育に及ぼす影響を検討するとともに、PP 苗から生産した当帰の品質を調査した。その結果、以下のことことが明らかとなった。

PT と TT の品質は希エタノールエキス、灰分、酸不溶性灰分に関しては差が認められなかった。一方で、PT はより多くの側根を有していたにも関わらず ZL 含量は TT に比して低い値を示した。加えて、ZL 含量の低い当帰が市場で求められる場合、本生産方法は大変有用である。湯もみに要する時間は改善の余地があるものの、JP18 の規定を満たす当帰の生産期間を約 6 ヶ月短縮することに成功した。

第2章 (Z)-ligustilide の個体間差異と局在性

第1節 緒言

当帰の品質は古くから味,匂い,形で評価されており,甘くて辛くて香ばしい当帰は高品質と言われている[33]. また,側根が馬の尾のように束ねられた当帰も良質とされ,「馬尾当帰[6]」と呼ばれており,文献の図から側根が多いことが見受けられる. また,当帰の主要な精油成分であるZLは主根や細根よりも側根が多いことが報告されている[46, 47]. また,JP18では当帰は「本品は太くて短い主根から多数の根を分枝してほぼ紡錘形を呈し,長さ10~25cm,外面は暗褐色~赤褐色で,縦じわ及び横長に隆起した多数の細根の跡がある.」との記載がある.以上,当帰の品質において側根は重要な要因である[1]. 現在では味,匂い,形での評価に加えて化学的な品質評価が行われている. JP18ではエキス含量として希エタノールエキス含量を35%以上含むと規定されている[1]. ZLは当帰の香りに関連している[34]のみならず,抗コリン作用[35]や血管拡張作用[36]を有し,品質評価指標として頻用される[19, 31, 37-40].

我々はこれまでに金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属 薬用植物園で当帰の生産研究を行ってきた. しかしながら, ZLの含量は個体間差異が大きく,加工条件を検討する実験等においての条件間の差を評価することが困難である.そのため,当帰の品質を評価する実験を行うためにはZLの個体間差異とその要因を明らかにする必要がある.また,中国では当帰の根頭部を「帰頭」,側根を「帰尾」として使い分ける[42].つまり,当帰は部位によって薬効が異なる可能性がある.したがって,本研究では,根を主根,側根,根頭に区別し,主要成分としてのZLの含有量を比較し,含量の個体間差異との関連を調査した.具体的には,同一の栽培・加工条件で生産した当帰をこれまでの研究よりも詳細に13の部分に分類し,各部分の重量を測定して形状を評価した.さらに,異なる根の部分でZLを定量し,ZLの局在と個体間の含有量の違いを調査した.最後に,各根部の重量または重量比とZL含有量との相関を調査した.

第2節 材料と方法

材料とサンプル調製

2016年4月19日に金沢大学・薬用植物園にトウキの種子を圃場に播種し約1年の露地育苗を行った後に2017年4月15日に移植した.その後,2017年11月14日に収穫を行い12月23日まで屋外で乾燥をおこなった.乾燥工程後,地上部を除去し,水で根部を洗浄した.13個体の当帰(KT1-13, Fig. 26)はそれぞれ13部位(RHUO, RHUI, RHLO, RHLI, RM1, RM2, RM3, RM4, RL1, RL2, RL3, RL4, RL5)に分けられた(Fig. 27, 28).まず,根を3つの部分(根頭,主根,側根)に分割した.根頭は根茎と根の上部であり,地上部との境界から最初の側根が発生する部分までである.主根は根頭から真下に伸びた根であり,側根はその他の根である.根頭は葉の跡を含む上部とそれを含まない下部に分けた.さらに,上部は表皮から5mmの外側(RHUO)と内側(RHUI)の2つに分けた.下部も上部と同じように外側(RHLO)と内側(RHLI)の2つに分けた.各部位は恒温乾燥機(ETTAS, EOP-450B)を使用して60°Cで12時間乾燥した後に,室温で約12時間放置し,再度恒温乾燥機を使用して60°Cで12時間乾燥した.その後,主根をRM1:直径25.0mm以上, RM2:直径15.1-25.0mm, RM3:直径8.1-15.0mm, RM4:直径8.1mm未満の4段階に分類した.また,側根は根の径に基づき5つのグレードに分類

した (RL1 : 直径 8.1 mm 以上, RL2 : 直径 5.1–8.0 mm, RL3 : 直径 3.1–5.0 mm, RL4 : 直径 1.1–3.0 mm, RL5 : 直径 1.1 mm 未満)。各サンプルの重量を測定した後, サンプルを粉碎し, その後の実験に使用した。根頭 (RH) の重量と ZL 含量は, RHUO, RHUI, RHLO, および RHLI の重量と含量から計算した。主根 (RM) の重量と ZL 含量は, RM1, RM2, RM3, および RM4 の重量と含量から計算した。側根 (RL) の重量と ZL 含量は, RL1, RL2, RL3, RL4, および RL5 の重量と含量から計算した。比較には, 市販の当帰 (柄本天下堂株式会社, ロット番号 : 008014005) を使用した。

ZL の定量

試料各 0.03 g を精密に量り, MeOH 1.5 mL を加えて 30 分超音波抽出を行った。抽出後の溶液を 15,000 rpm で 5 分間遠心し, 上清をメンブランフィルター (FILTSTAR 0.45 μ m 日本ジェネティクス (株)) に通して試料溶液とする。その後, HPLC 法により ZL の測定を行った。なお, 総 ZL 含量 (個体ごとの ZL 含量) は各部位の ZL 含量と重量から計算した。

全体重量, 各部位の重量または全体重量に占める各部位の重量比と総 ZL 含量の相関関係

根頭 (RH), 主根 (RM), 側根 (RL), および根 (RM + RL) について, 重量または重量比と総 ZL との間のピアソンの相関係数を調査した。一般的に, 当帰ははさがけや湯もみ (熱水処理) [3]などの加工を経るため, 細い根 (直径 1.1 mm 未満) のほとんどが脱落する。そのため, 加工工程を経た当帰を仮定し, 直径 1.1 mm 未満の側根 (RL) を根から取り除いた場合 (以下, $PC = RM + RL - RL5$) の相関も調べた。



Fig. 26 本実験に用いたトウキの根 (KT1–KT13)。

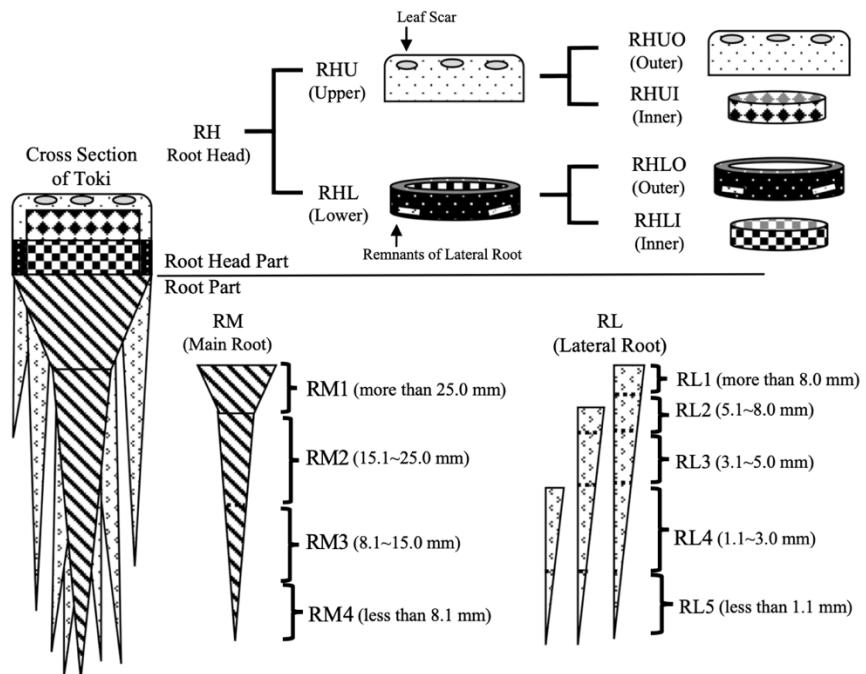


Fig. 27 根の分割模式図.

各個体を 13 部位に分けた (RHUO, RHUI, RHLO, RHLI, RM1, RM2, RM3, RM4, RL1, RL2, RL3, RL4, RL5).

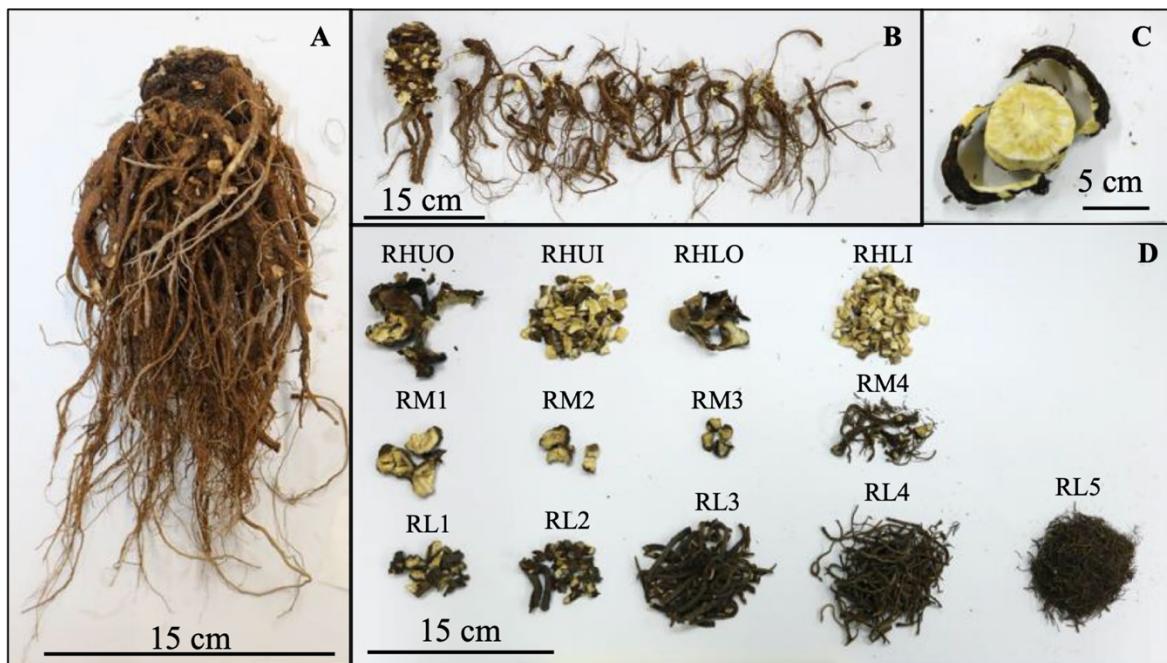


Fig. 28 A 自然乾燥後のトウキ根 (KT10). B 主根から側根を切り離した. C 根頭において外側から 5 mm を境に分割した. D 乾燥後の各部位の様子.

第3節 結果

根の重量または各部位の重量比の評価

各サンプルの全根および異なる根の部位の乾燥重量を Table 4 に示す。13 個体の全根乾燥重量は 68.2–132.3 g (平均 96.0g) であった。根頭 (RH) の重量は 22.2–58.0 g (平均 32.8g)、主根 (RM) の重量は 10.4–33.0 g (平均 18.2g)、側根 (RL) の重量は 28.6–69.7 g (平均 45.0g) であった。全根乾燥重量に対する各部分の重量比は、根頭 (RH) で 29.0–43.8% (平均 33.8%)、主根 (RM) で 10.6–25.4% (平均 19.0%)、側根 (RL) の場合は 31.3–56.6% (平均 47.2%) であった。これらの結果は、個体間で各根部の重量比に大きな違いがあることを示している。

乾燥重量と総 ZL 含量の個体間差異

13 個体の重量と総 ZL 含量の結果を乾燥重量の昇順で配置した (Fig. 29)。総 ZL 含有量は、KT11 で 0.08% と最も低く、KT3 で 0.22% と最も高かった (平均 $0.14 \pm 0.01\%$)。含量の個体差は最大で約 2.7 倍であった。また、市販の当帰の含有量は 0.07% であった。

異なる部位中の ZL 含量

まず、根頭 (RH)、主根 (RM)、側根 (RL) の ZL 含量を比較した (Fig. 30)。側根 (RL) の ZL 含量は 0.12–0.27% (平均 0.19%) で最も高く、続いて主根 (RM) の 0.07–0.24% (平均 0.13%) であり、根頭 (RH) は 0.03–0.14% (平均 0.09%) であった。すべての部位間に有意差が認められた ($p < 0.01$)。次に、主根 (RM) の ZL 含量を根の直径ごとに比較した。ZL 含量は、直径 25 mm を超える RM1 で 0.04–0.16% (平均 0.09%) で、直径 15.1–25.0 mm の RM2 で 0.07–0.24% (平均 0.11%)、直径 8.1–15.0 mm の RM3 で 0.07–0.24% (平均 0.13%)、直径 8.1mm 未満の RM4 では 0.09–0.26% (平均 0.16%) であった。根が細くなるにつれて含有量が増える傾向が認められた (Fig. 31)。次に、側根 (RL) の ZL 含量は、直径 8 mm を超える RL1 で 0.06–0.25% (平均 0.13%) で、直径 5.1–8.0 mm の RL2 で 0.07–0.26% (平均 0.14%) で、直径 3.1–5.0 mm の RL3 で 0.10–0.25% (平均 0.18%)、直径 1.1–3.0 mm の RL4 で 0.15–0.41% (平均 0.24%)、直径 1.1 mm 未満の RL5 では 0.13–0.36% (平均 0.23%) であった。主根 (RM) と同様に、根が細くなるにつれて含有量が増加した (Fig. 31)。最後に、ZL 含量を根頭 (RH) の異なる部分で比較した (Fig. 32)。上根頭 (RHU, 0.08%) と下根頭 (RHL, 0.1%) の間で ZL 含量に有意差は認められなかった。一方、上根頭と下根頭の両方の ZL 含量は、内側よりも外側で有意に高かった (RHUI : 0.06% vs RHUO : 0.11%, $p < 0.01$, RHLI : 0.06% vs RHLO : 0.16%, $p < 0.01$)。

重量または各部位の重量比と総 ZL 含量の相関関係

根の形状と総 ZL との相関を調べた (Fig. 33)。総 ZL と各部分の重量との相関係数は次のとおりであった：根頭 (RH; $r = -0.40$, $p = 0.09$)、主根 (RM; $r = 0.17$, $p = 0.30$)、側根 (RL; $r = -0.26$, $p = 0.20$)、根 (RM + RL; $r = -0.13$, $p = 0.33$)、および加工条件 (RM + RL – RL5; $r = -0.07$, $p = 0.41$)。総 ZL と RH の重量との間に比較的高い負の相関が観察された ($p > 0.05$)。ま

た, 各部分の重量比と総 ZL の相関関係は次のとおりであった: 根頭 (RH; $r = -0.42$, $p = 0.80$), 主根 (RM; $r = 0.34$, $p = 0.13$), 側根 (RL; $r = 0.07$, $p = 0.41$), 根 (RM + RL; $r = 0.42$, $p = 0.08$), および加工条件 (RM + RL - RL5; $r = 0.51$, $p = 0.04$)。根頭の重量比と総 ZL の間に比較的強い負の相関が観察された ($p > 0.05$)。また, 加工条件の重量比と総 ZL との間に有意な相関が認められた ($p < 0.05$)。一方, 根全体の重量と総 ZL との間に相関関係は認められなかつた ($r = -0.29$, $p = 0.17$)。

Table 4 各サンプルの全体重量と部位別重量

Sample	RHUI	RHUO	RHLI	RHLO	Total RH	RM1	RM2	RM3	
1	6.6	8.2	4.0	3.4	22.2	—	5.8	1.8	
2	11.6	10.2	5.5	3.0	30.3	3.9	2.0	1.8	
3	9.5	5.5	5.4	3.2	23.5	—	5.2	2.2	
4	7.1	6.7	5.7	4.3	23.8	—	6.7	1.2	
5	5.7	6.0	9.4	5.4	26.5	5.3	1.9	0.9	
6	7.9	11.9	6.4	3.2	29.3	11.5	1.4	2.7	
7	7.9	9.6	6.5	2.7	26.7	7.0	3.9	4.0	
8	11.9	9.3	5.4	2.7	29.3	9.2	5.7	1.9	
9	13.9	7.9	11.1	2.8	35.6	7.1	3.9	1.7	
10	10.2	6.4	9.4	4.9	30.9	15.3	1.5	1.4	
11	19.9	10.6	12.8	3.0	46.4	9.7	3.2	1.3	
12	12.7	5.9	20.3	5.7	44.5	4.1	—	2.4	
13	17.5	12.9	18.7	8.9	58.0	—	7.1	4.7	
Ave.	11.0	8.5	9.3	4.1	32.8	8.1	4.0	2.2	
S.D.	4.1	2.3	5.0	1.7	10.2	3.5	2.0	1.0	
Sample	RM4	Total RM	RL1	RL2	RL3	RL4	RL5	Total RL	Whole root
1	9.8	17.4	2.2	3.4	8.0	9.9	5.1	28.6	68.2
2	6.9	14.7	—	1.9	6.8	15.9	4.5	29.1	74.1
3	3.1	10.4	4.6	5.2	13.9	15.2	5.4	44.3	78.2
4	2.8	10.7	—	1.5	21.8	14.4	6.6	44.3	78.8
5	6.0	14.0	4.4	8.2	10.0	12.3	7.0	41.9	82.5
6	4.4	20.0	1.6	6.9	12.8	12.7	6.2	40.1	89.5
7	5.0	19.8	3.1	12.2	15.3	9.3	6.9	46.8	93.3
8	7.0	23.9	10.8	6.3	12.0	12.9	5.6	47.6	100.8
9	3.8	16.5	6.9	7.5	18.2	11.1	8.0	51.7	103.8
10	7.8	26.0	3.7	11.2	24.0	9.7	2.9	51.6	108.5
11	2.3	16.5	9.8	5.5	14.6	12.8	5.5	48.2	111.0
12	7.1	13.6	4.0	20.3	23.5	14.2	7.6	69.7	127.8
13	21.2	33.0	2.3	16.0	7.6	8.0	7.5	41.4	132.3
Ave.	6.7	18.2	4.9	8.2	14.5	12.2	6.1	45.0	96.0
S.D.	4.7	6.1	2.9	5.3	5.7	2.3	1.4	9.9	19.4

RH : 根頭, RM : 主根, RL : 側根, RHUI : 根頭上部の内側, RHUO : 根頭上部の外側, RHLI : 根頭下部の内側, RHLO : 根頭下部の外側, Total RH = RHUI + RHUO + RHLI + RHLO, RM1 : 直径が 25.0 mm 以上の主根, RM2 : 直径 15.1–25.0 mm の主根, RM3 : 直径 : 8.1–15.0 mm の主根, RM4 : 直径 8.1 mm 未満の主根, Total RM = RM1 + RM2 + RM3 + RM4, RL1 : 直径 8.0 mm 以上の側根, RL2 : 直径 5.1–8.0 mm の側根, RL3 : 直径 3.1–5.0 mm の側根, RL4 : 直径 1.1–3.0 mm の側根, RL5 : 直径 1.1 mm 未満の側根, Total RL = RL1 + RL2 + RL3 + RL4 + RL5, whole root = Total RH + Total RM + Total RL, “—” は該当するサンプルが存在しないことを示す。

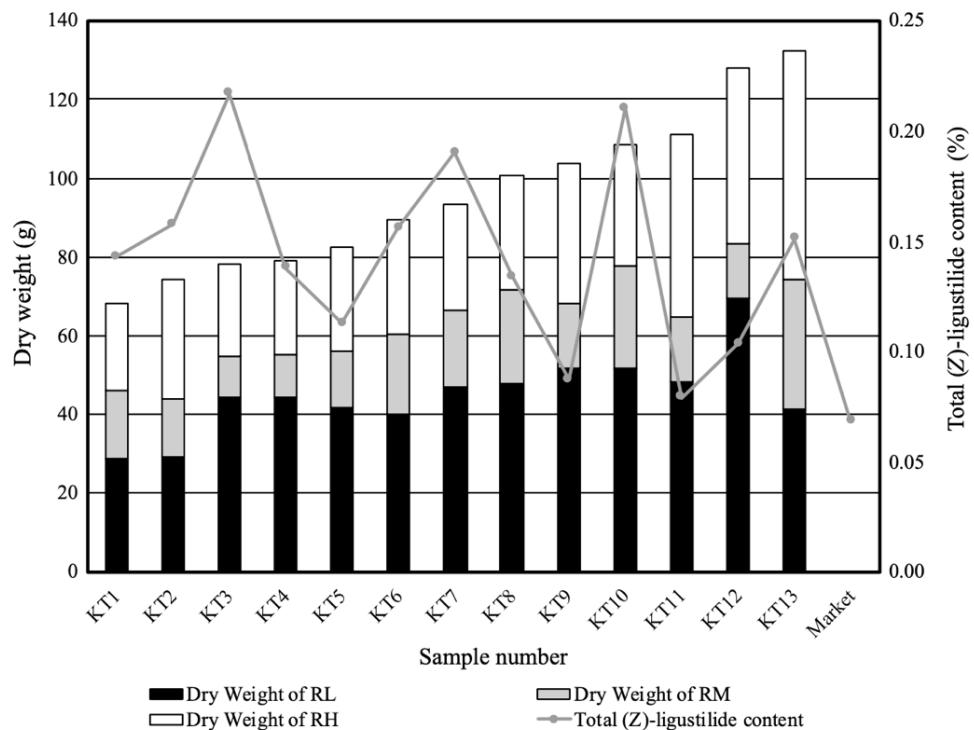


Fig. 29 個体間の総 ZL 含量と重量の個体間差異. 総 ZL 含量 (Total (Z)-ligustilide content) は部位別の ZL 含量と重量を用いて算出した.

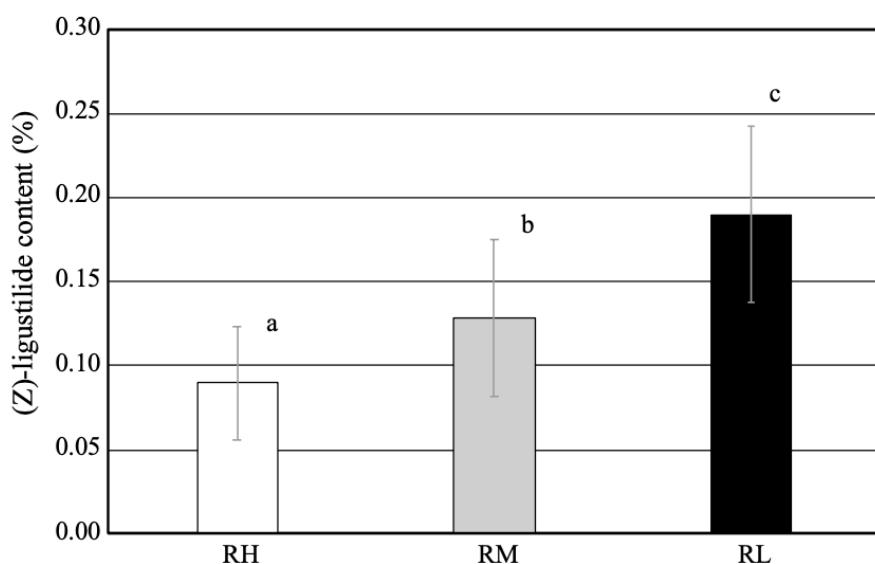


Fig. 30 トウキの根に含まれる ZL の部位別含量. 異なるアルファベット間に有意差あり. (ボンフレーロー補正を行った Student's *t*-test, $p < 0.01$). Mean \pm S.D., $n = 13$, RH : 根頭部, RM : 主根, RL : 側根

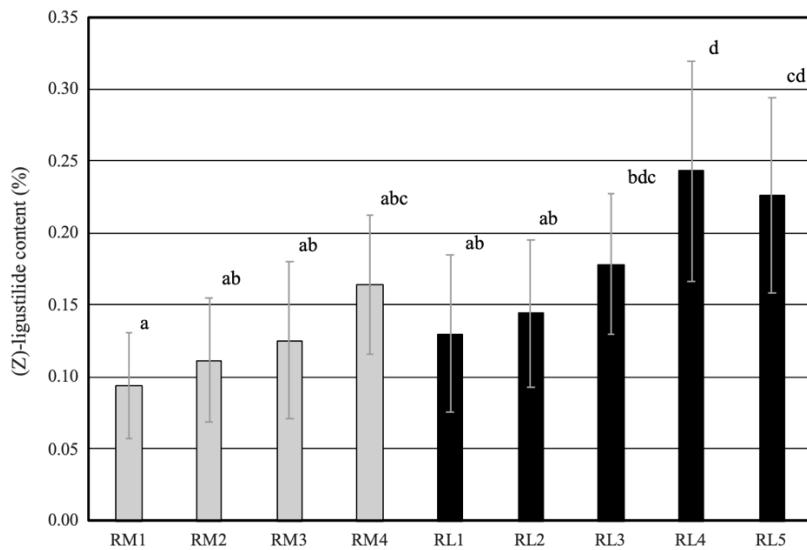


Fig. 31 異なる直径の主根と側根に含まれる ZL 含量の比較. 異なるアルファベット間に有意差あり. Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$). Mean \pm S.D. ($n = 913$). RM1 : 直径が 25.0 mm 以上の主根, RM2 : 直径 15.1–25.0 mm の主根, RM3 : 直径 : 8.1–15.0 mm の主根, RM4 : 直径 8.1 mm 未満の主根, Total RM = RM1 + RM2 + RM3 + RM4, RL1 : 直径 8.0 mm 以上の側根, RL2 : 直径 5.1–8.0 mm の側根, RL3 : 直径 3.1–5.0 mm の側根, RL4 : 直径 1.1–3.0 mm の側根, RL5 : 直径 1.1 mm 未満の側根

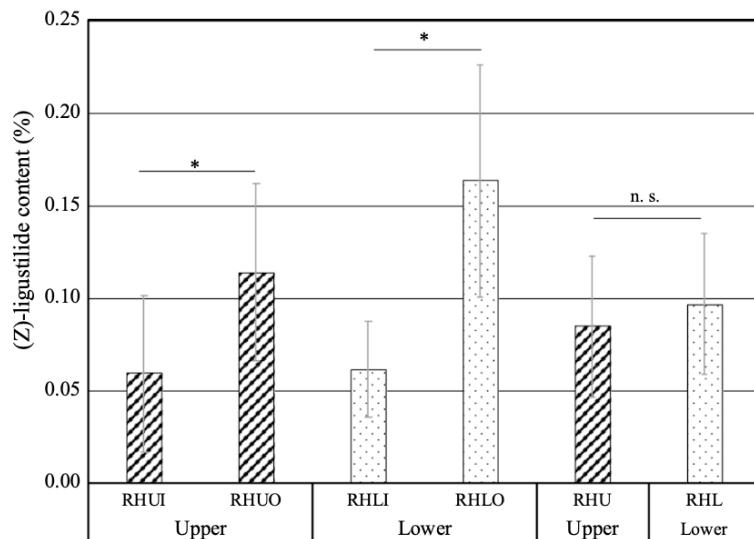


Fig. 32 根頭部の部位別 ZL 含量. * $p < 0.01$, n.s. : not significant. Student's *t*-test. RHUI : 根頭上部の内側, RHUO : 根頭上部の外側, RHLI : 根頭下部の内側, RHLO : 根頭下部の外側, RHU : 根頭上部, RHL : 根頭下部. RHUI と RHUO, RHLI と RHLO, RHU と RHL を比較した. Mean \pm S.D. ($n = 13$)

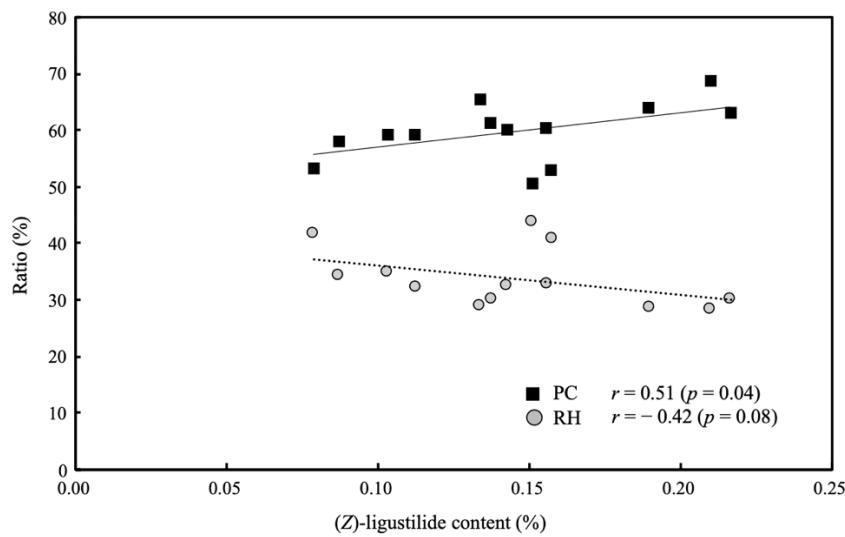


Fig. 33 各部位の重量比と総 ZL 含量の相関関係.

RH : 根頭, PC : 加工条件 (RM + RL - RL5), RM : 主根, RL : 側根, RL5 : 直径が 1.1 mm 未満の側根. r : ピアソンの相関係数.

第4節 考察

根全体の乾燥重量と根の形状、総 ZL 含量の個体間差異

全根重と、13 個体の各部分の重量比との間に明確な相関関係は認められなかった。さらに、総 ZL は 0.08–0.22% であり、個体間で最大約 2.8 倍の差が認められた。本実験には、同じ栽培・加工条件で生産した当帰を用いたが、根全体の乾燥重量、各根部の重量、各根部の重量比、ZL 含量に大きな違いが見られた。他の薬用植物では、形態的特徴や化学成分の含有量や組成に個体差があり、その個体差は遺伝的に制御されており、遺伝的に等しい個体の差異は小さい[45]。一般的に、トウキは種子育種によって増殖するため、その形態的特徴や化学成分は個体間で容易に異なる傾向がある。この研究で観察された個体間の差異は、遺伝的要因に起因すると考えられる。以上、品質評価においては各根部の根重量比や ZL 含量の個体差の影響は大きく、品質評価や実験に大きな影響を及ぼす。そのため、特に実験においては形状に留意してサンプリングを行う必要がある。

トウキの根における ZL の局在

部位別の ZL 含量は、直径 1.1–3.0 mm (RL4) の側根で最も高く（平均 0.24%），根頭の上部内側 (RHUI) で最も低く（平均 0.06%）その含量差は約 4.0 倍であった。つまり、ZL の局在化は、品質評価に大きな影響を与える可能性がある。また、根頭には内側よりも外側に多くの ZL が含まれていることが明らかになった。生薬として根を使用するいくつかの薬用植物では、品質評価のための重要な化学成分が根の表面近くの組織に局在している[46–48]。同様に、トウキでは、ZL は根の表面近くの組織に局在していると考えられる。中国の薬用植物 *Ligusticum chuanxiong* に含まれる ZL で強い殺虫活性が観察され[49]、他の植物の精油でも抗真菌活性が報告されている[50–52]。したがって、トウキの ZL 含量は、根の表面近くに局在することにより、昆虫や真菌に対する防御機構として機能する可能性がある。さらに、主根と側根の両方で根が細くなるにつれて、ZL 含量が増加することが明らかになった。これは、根が細くなるにつれて表皮付近の組織の重量が増加したためと考えられる。これまでに、ミシマサイコに含まれるサイコサポニンは細い根毛に多く、根が太くなるに従い含量が減少することが報告されている。このサイコサポニン含量の違いは、根組織の割合に起因することも報告されている[53]。同様に、当帰では、根が細くなるにつれて、師部や皮層などの比較的外側の組織の割合が増加し、ZL 含量が増加したと推定される。一部の個体では、ZL 含量は、直径 1.1 mm 未満の最も細い側根 (RL5) よりも直径 1.1–3.0 mm の側根 (RL4) の方が高かった。これは、試料処理時の洗浄・乾燥の影響により、直径 1 mm 以下の側根で ZL が流出・分解した可能性がある。また組織が完全に発達しておらず、分泌と蓄積が不十分であった可能性もある。市販の当帰の ZL 含量は 0.07% であり、13 個体の含有量と比較して顕著に低い値を示した。その理由は、ZL 含量の高い細い根が加工処理中に脱落した可能性や、切断・サンプル処理により根の表面積が増加したため、ZL 含量が揮発したと推測される。

重量または重量比と総 ZL 含量の相関関係

総重量、根の各部位の重量、または重量比と総 ZL 含量との相関関係を調べたところ、総重量と総 ZL 含量の間に相関関係は認められなかった。したがって、総重量から総 ZL 含量を予測することは困難である。部位別重量と総 ZL 含量との相関については、根頭 (RH) で比較的強い負の相関 ($r = -0.40, p = 0.09$) が観察され、根頭が小さいほど、高い含量を含む傾向が認められた。重量比と総 ZL 含量との相関関係に関して、最も強い負の相関 ($r = -0.42, p = 0.80$) が根頭 (RH) で、比較的強い正の相関 ($r = 0.42, p = 0.08$) が根部 (RM + RL) で確認された。総 ZL 含量は、根の割合が増加するにつれて増加する傾向がある。さらに、総 ZL 含量と直径 1.1 mm 未満の側根が除去された処理条件 (RM + RL - RL5) との間に最も強く有意な正の相関が観察された ($r = 0.51, p = 0.04$)。つまり、総 ZL 含量は、根部 (RM + RL - RL5) の比率が高い個体で高い含量を示した。この相関関係は、側根に ZL が局在しているという結果を支持する。つまり、個体間の含有量の違いは、根の形状と ZL の局在に起因すると考えられる。トウキの根は、はさ掛けや湯もみなど、さまざまな加工工程を経て当帰となる[3]。その過程で、直径 1 mm 未満の非常に細い根は脱落し、市場の製品には含まれない。さらに、直径 1 mm 未満の根は、太い根よりも表面積が大きく、サンプルの準備中にさまざまな影響を受けた可能性がある。したがって、当帰の品質評価では、直径 1 mm 未満の根は評価から除外する必要がある。以上のように、当帰の形状と ZL 含量は関連していることが明らかとなった。つまり、実験において条件ごとの ZL 含量を比較したい場合、試料となる当帰の形状を均一にすることで、個人差の影響を低減することが期待される。従来、当帰の品質評価では味、匂い、形が重要視されてきたが、本研究では根の部分比率 (RM + RL - RL5) が品質評価に影響を与える可能性があることが明らかにした。根頭が小さく、根の部分が多い当帰は、「馬尾当帰」の形をしていると考えられ、形状を指標とした古来の品質評価の有用性を証明した。これまでに、ボタン、オタネニンジン、コガネバナ、ミシマサイコについて根部の成分の局在性が明らかになっており[46–48, 53]、本研究によりトウキにも同様の局在性が存在することが明らかとなった。

以上、当帰の主成分である ZL は根全体の重さが同じであっても含有量に大きな違いがあることが明らかとなった。さらに、ZL は根部に局在する傾向が認められ、根の比率 (RM + RL - RL5) が高い個体ほど高い ZL 含量を有することが明らかとなった。本研究では、これまで個体差や局所化により困難であった温度や時間など、トウキの加工条件の検討実験に貢献することが期待される。

総括

本研究では、当帰の原植物であるトウキ *Angelica acutiloba* の栽培の効率化を図り、以下のことを明らかにした。

1. トウキの栽培における育苗期間の短縮、苗生産の安定性向上を目的に 130 穴 PP を用いた屋内での育苗方法の検討と PP を用いた栽培方法に適した苗の選別方法の開発を行った。まず、PP 苗の選別方法の開発を試みたところ、苗の根頭部径と最も大きい複葉の頂小葉 ($r = 0.98$ 以上)、両側小葉 ($r = 0.98$ 以上) の間に強い正の相関が認められ、頂小葉または両側小葉の長さを計測することで根頭部径を正確に予測できることを明らかにした。

2. PP を用いて屋内での播種時期、播種方法、施肥が苗の生育に及ぼす影響、間引き時期を検討したところ、播種時期は 9 月が最適であり播種が早いほど苗は大きく成長した。播種方法は PP1 穴あたり 3 粒播きを行うことで、PP を効率よく使用することが可能であった。施肥は PP1 穴 (培養土 0.3 L) あたりマグアンプ K (N : P : K : Mg = 6% : 40% : 6% : 15%) 3.25 g または発酵油かす (N : P : K = 3% : 7% : 4%) 5.0 g を元肥として混合し、更に液肥 (N : P : K : Mg : Mn : B = 8% : 10% : 5% : 0.01% : 0.004% : 0.016%) による追肥を行うことで最も苗の生育が旺盛となった。間引きは、PP1 穴あたり 3 粒播種した場合、2 月—3 月に行うことで苗が最も大きく成長した。以上のことにより屋内で育苗することで、虫害や気候の影響を受けにくくなり、苗生産の安定性が向上するだけでなく、冬期を育苗期間に充てることが可能になり、従来の育苗期間 (4 月—翌年 3 月) から 9 月—翌年 3 月に約半年育苗期間を短縮することが可能になる。

3. PP 苗を用いて、定植後の成長に対する苗の根頭部の直径の影響を調査した。その結果、直径が 10.0 cm 以上の苗の生存率は 90% 以上であったが、20% 以上の苗が抽苔し、同程度の根頭部径を有する慣行苗に比して PP 苗は抽苔し易い傾向が認められた。しかし、直径が 10.0 cm 以上の苗を定植した際の収穫量は慣行苗を定植した際と比べ同等かそれ以上であり、PP 苗は収穫量の観点からは十分に実用的であることが明らかとなった。

4. PT と TT の品質を比較した。その結果、PT は希釀エタノール含量、灰分含量、酸不溶性灰分含量は JP18 の規定を満たした。また、PT は TT に比して根の総重量に対する側根の割合が高いことが明らかとなった。ZL 含量は PT で 0.07%，TT で 0.12% であり、PT は TT に比べて含量が低いことが明らかとなった。以上、PP 苗から JP18 の規定を満たす当帰を生産できることが明らかとなり、PP を用いた育苗方法と併せて当帰の生産期間を 6 ヶ月短縮した。

5. 当帰に含まれる ZL の個体間含量差異と局在性に加え、形状と成分含量の関連を調査するため、13 個体 (乾燥重量 : 68.2 g—132.3 g) を 13 部位に分割し、各部位の ZL を定量した。その結果、個体別の ZL は 0.08% から 0.22% であり、個体間の最大含量差は約 2.8 倍であった。また、ZL は側根で最も高く (0.19%)、次に主根が高く (0.13%)、根頭で最も低い値を示した (0.09%)。さらに、根が細くなるにつれて含量が増加する傾向が認められた。加えて 13 部位間では、根頭部上の内側 (0.06%) と直径 1.1—3.0 mm の側根 (0.24%) では約 4.1 倍もの含量差が認められ、ZL の局在性は根の表面や細い根に局在していた。形状と成分含量に関しては、全根乾燥重量における根部の重量比が高い個体は、ZL 含有量が高い傾向が認められた。

実験の部

第1章

第2節 ペーパーポットを用いた冬期屋内育苗方法の開発

(1) ペーパーポットの規格について

本論文ではペーパーポットの中でも培養土量が最大の FS515 (高さ 15 cm × 口径 5 cm, 130 本／冊) を使用した。本規格は培養土量が最大であることが利点だが、他の規格と比べ紙の強度が高いことと水稻育苗箱に対応であるという欠点がある。水稻育苗箱に対応した規格は口径が 1.9 – 5.0 cm, 高さが 3.0 – 13.0 cm のものがある (代表的なものは 13 種類)。今後は、ペーパーポットの規格間比較も検討する必要がある。また、紙鉢が連結した構造のチェーンポットと呼ばれる規格も存在し、トウキの栽培に応用することで更なる効率化が期待される。

(2) 育苗期間中の虫害について

温室内での育苗期間中に苗の根が切れて枯死する株が観察された (Fig. 34)。根を掘り上げて切断部位を観察したところ、透明な芋虫様の虫がトウキの根を食していた (Fig. 35, 36)。キノコバエ類の幼虫と考えられるが詳細は不明である。温室内の多湿環境と有機質の培養土が発生原因と考えられる。今後はこのような虫害の発生を考慮した管理を行う必要がある。



Fig. 34 温室内での栽培管理期間中に食害により根が切断された苗。



Fig. 35 苗 1 本あたりに複数の幼虫が発生する。



Fig. 36 食害により、根が空洞化して切れる。

第4節 ペーパーポット苗から調製した当帰の品質評価

(1) 希エタノールエキス定量法

a) 希エタノールの調製

JP 18において、希エタノールは「エタノール（95）1容量に水1容量を加えたもの」とされているが、本研究で使用した EtOH は 99.5% であったため、EtOH : 蒸留水 = 239 : 261 の割合で混合した。

b) 希エタノールエキス定量法

JP 18 の一般試験法に準じて行った。すなわち、粉末試料約 2.3 g を精密に量り、希エタノール 70 mL とともにフラスコに入れ、攪拌した。その後、1 時間に一度攪拌し、5 時間浸出した後、さらに 17 時間放置し、ろ紙でろ過した。フラスコ及び残留物を、ろ液が 100 mL になるまで希エタノールで洗い、ろ液 50 mL を蒸発皿に移して投入式恒温装置（ヤマト科学、Themo-Mate, BF200, ）を使用して沸騰水浴上で蒸発乾固した。105°C で 4 時間乾燥し、その後デシケーターで 30 分放冷後、その質量を精密に秤量した。残留物の重量に 2 を乗じたものを希エタノールエキスの量とし、乾燥減量を用いて乾燥物に換算した粉末試料量に対しての希エタノールエキス含量（%）を算出した。

$$\text{希エタノールエキス (\%)} =$$

$$[(\text{乾燥後の全体質量} - \text{蒸発皿の質量}) \times 2] \times 100 / \text{粉末試料量}$$

c) 乾燥減量

JP 18 の一般試験法に準じて行った。すなわち、粉末をあらかじめ質量をはかったるつぼにいれ、2 g を精密にはかりとり、105°C で 5 時間乾燥し、シリカゲルの入ったデシケーターで 30 分放冷後、秤量した。その減量を乾燥減量(%)とした。

$$\text{乾燥減量(%)} = (\text{粉末の質量} - \text{乾燥後の粉末の質量}) \times 100 / \text{粉末の質量}$$

(2) 灰分、酸不溶性灰分試験法

a) 灰分

JP 18 の一般試験法に準じて行った。すなわちあらかじめ磁製のるつぼを実験室用電気炉(林電工株式会社、NEW-1型)を使用して 500°C で 1 時間強熱し、デシケーター中で放冷した後、その質量を精密に量る。分析用試料 2 g を採取し、先のるつぼに入れ、その質量を精密に量る。るつぼの蓋をずらし、初めは弱く加熱し、徐々に温度を上げて 500°C で 4 時間以上強熱して、炭化物が残らなくなるまで灰化し、デシケーター中で放冷した後、その質量を精密に量る。

b) 酸不溶性灰分

灰分に希塩酸 25 ml を注意して加え、5 分間穏やかに煮沸し、不溶物を定量分析用ろ紙を用いてろ取りし、熱湯でよく洗い、残留物をろ紙とともに乾燥した後、灰分の項と同様に操作した質量既知の磁製のるつぼ中で 3 時間強熱し、デシケーター中で放冷した後、その質量を精密に量る。

(3) (Z)-ligustilide の定量

試料各 0.03 g を精密に量り、MeOH 1.5 mL を加えて 30 分超音波抽出を行った。抽出後の溶液を 15000 rpm で 5 分間遠心し、上清をメンブランフィルター (FILTSTAR 0.45 μm 日本ジェネティクス(株)) に通して試料溶液とする。その後、HPLC 法により ZL の測定を行った。また、各部位の ZL 含量と乾燥重量から 1 個体あたりの ZL 含量(=総 ZL 含量)を算出した。なお、本実験では 60°C / 12 時間乾燥 2 回とデシケーター内での 60 時間乾燥後に乾燥減量を測定したところ、13 個体の全部位で減量が 0.45% 以下であることを確認したため、乾燥減量による補正は行わなかった。

HPLC 条件：機器：日立 L-2200 型高速液体クロマトグラフ、Column: COSMOSIL Packed Column 5C18-MS-II (φ4.6 × 250 mm) Mobile phase: methanol / 1% acetic acid (7:3), Column temperature: 40°C, Flow rate: 1.0 mL / min, UV detection: 320 nm, Injection volume: 10 μL, 標準物質：(Z)-ligustilide Standard Solution (0.1mg / mL Methanol Solution)；富士フィルム 和光純薬株式会社、APE3699). 検量線 $y = 24321496.46715x - 26628.43306, R^2 = 0.9998$

第 2 節 (Z)-ligstilide 含量の個体間差異と局在性

試料各 0.03 g を精密に量り、MeOH 1.5 mL を加えて 30 分超音波抽出を行った。抽出後の溶液を 15000 rpm で 5 分間遠心し、上清をメンブランフィルター (FILTSTAR 0.45 μm 日本ジェネティクス(株)) に通して試料溶液とする。その後、HPLC 法により ZL の測定を行った。なお、総 ZL 含量(個体ごとの ZL 含量)は各部位の ZL 含量と重量から計算した。

HPLC 条件：第 1 章 第 4 節と同様である。ただし、標準物質は(Z)-ligustilide Standard Solution (0.1mg / mL MeOH Solution)；富士フィルム 和光純薬株式会社、TWH1363) を用いて、検量線 Y

$= 24,900,886.651 X - 9,247.998, R^2 = 0.99999$ を作成した.

統計解析

本研究では統計解析に IBM SPSS Statistics Version 25 (IBM, USA) を用いた.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健研究域薬学系 佐々木陽平教授に深く感謝いたします。

研究の面白さを教えて下さった東京農業大学農学部 御影雅幸教授、倪斯然助教に深く感謝いたします。

日頃より助言くださいました金沢大学医薬保健学研究域薬学系 安藤広和助教に深く感謝いたします。

また、当帰の栽培・加工についてご指導を賜りました福田商店福田浩三博士に深く感謝いたします。

最後に、金沢大学分子生薬学研究室の皆様にあわせて深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 厚生労働省, 第十八改正日本薬局方, 2007-2008, 2021
- 2) 田中重雄, 鹿野美弘, 田端守, 木島正夫, 「当帰」(*Angelica acutiloba* KITAGAWA)エキスのマウスにおける Writhing および毛細血管透過性におよぼす影響 : 鎮痛および抗炎症作用, *薬学雑誌*, **91**(10), 1098-1104, 1971
- 3) 福田浩三, 村田和也, 松田秀秋, 鰥忠人, 当帰の栽培生産の歴史と現状, *薬史学雑誌*, **44**(1), 10-17, 2009
- 4) ヒキノヒロシ, 当帰考-2-, *薬学研究*, **29**(11), 43-62, 1957
- 5) ヒキノヒロシ, ニッポン産當歸類生薬の基源植物について : 當歸研究 1, *植物分類, 地理*, **17**(3), 76-84, 1958
- 6) 内藤蕉園, 古方薬品考, 文泉堂, 京都, 1841, 影印, 燐原, 東京, 163-165, 1974
- 7) 山岡傳一郎, 伊藤隆, 浅間宏志, 佐橋佳郎, 三谷和男, 姜東孝, 安井廣迪, 渡辺均, 生薬国内生産の現状と問題, *日本東洋医学雑誌*, **68**(3), 270-280, 2017
- 8) 山本豊, 笠原良二, 平雅代, 武田修己, 樋口剛央, 山口能宏, 白鳥誠, 佐々木博, 日本における原料生薬の使用量に関する調査報告(2), *生薬学雑誌*, **75**(2), 89-105, 2021
- 9) 新藤聰, 松原紀嘉, 渡辺均, 池上文雄, トウキ (*Angelica acutiloba* Kitagawa) の種苗生産に及ぼす花序除去の影響, *生薬学雑誌*, **67**(2), 59-64, 2013
- 10) 渡辺均, 新藤聰, 池上文雄, “第 1 章 薬用植物の新たな苗生産技術”, *生薬・薬用植物研究の最新動向*, 高松智監修, シーエムシー出版, 東京, p. 3-12, 2017
- 11) 米田健一, 東井慈子, 浅尾浩史, ヤマトトウキにおける冬期保温ベッド育苗による短期育苗法の検討, *奈良県農業研究開発センター研究報告*, **47**, 1-9, 2016
- 12) 新藤聰, 小田順子, 松原紀嘉, 渡辺均, 薬用植物トウキの最適な種子選別方法, *農業および園芸*, **86**(10), 1000-1004, 2011
- 13) 野島博, 田代享, Ninh Thi Phip, トウキの発芽および初期生育に及ぼす温度と比重選の影響, *日本作物学会関東支部会報*, **19**, 56-57, 2004
- 14) 野島博, Ninh Thi Phip, 田代享, トウキの発芽および初期生育に及ぼす種子重の影響, *日本作物学会関東支部会報*, **20**, 62-63, 2005
- 15) 日本甜菜製糖株式会社, ペーパーポット, <http://www.paperpot.jp/paperpot.html>, (参照 2022 年 1 月 1 日)
- 16) 磯田進, 庄司順三, トウキ *Angelica acutiloba* KITAGAWA の栽培に関する研究 (第 1 報) 芽くりの改良法について, *生薬学雑誌*, **42**(4), 272-277, 1988
- 17) 久保道徳, 福田眞三, 勝城忠久, 薬草入門, 保育社, 大阪, p. 56, 1980
- 18) 佐竹元吉, 飯田修, 川原信夫, 新しい薬用植物栽培法 採取・生薬調製 第 2 版, 廣川書店, 東京, p. 226-230, 2002
- 19) 吉江唯菜, 工藤喜福, 安藤広和, 佐々木陽平, トウキ抽苔株の根から調製される生薬当帰の品質評価, *薬用植物研究*, **41**(1), 1-8, 2019
- 20) 邑田仁, 米倉浩司, 新分類牧野日本植物図鑑, 牧野富太郎原著, 北隆館, 東京, p. 1253, 2017
- 21) 磯田進, 庄司順三, トウキ *Angelica acutiloba* KITAGAWA の栽培に関する研究 (第 2 報) 芽

- くり苗の大きさが生育に及ぼす影響, 生薬学雑誌, **42**(4), 278-283, 1988
- 22) 鈴木善弘, 種子生物学, 東北大学出版会, 宮城, p. 197, 2003
- 23) 渡辺信義, 栽培タバコ種子の発芽におよぼす播種密度の影響と種間相互作用, 育種学雑誌, **34**(1), 62-68, 1984
- 24) 塩家仙子, 津布楽洋一, 田中宥司, 山田小須弥, 穴井豊昭, 長谷川宏司, 植物種子分泌液に検出されたアレロパシー活性における有機物・無機物の貢献度, 雜草研究, **40**(1), 14-19, 1995
- 25) Inouye S R, Density-dependent germination response by seeds of desert annuals, *Oecologica*, **46**, 235-238, 1980
- 26) 駒井功一郎, 植木邦和, ハマスゲに含まれる生長抑制物質について, 雜草研究, **25**(1), 42-47, 1980
- 27) 関根伸浩, 澄谷栄, 谷田貝光克, 針葉樹葉油の水溶性とその種子発芽抑制活性および抗シロアリ活性, 木材学会誌, **58**(1), 44-53, 2012
- 28) 高橋佳孝, 大谷一郎, 魚住順, 萩野耕司, 五十嵐良造, クマリンのアレロパシー発現に及ぼす土壤条件の影響, 日本草地学会誌, **40**(2), 223-226, 1994
- 29) Mishyna M, Laman N, Prokhorov V and Fujii Y, Angelicin as the principal allelochemical in *Heracleum sosnowskyi* fruit. *Nat Prod Commun*, **10**(5), 767-770, 2015
- 30) Mishyna M, Laman N, Prokhorov V, Maninang S J and Fujii Y, Identification of octanal as plant growth inhibitory volatile compound released from *Heracleum sosnowskyi* fruit. *Nat Prod Commun*, **10**(5), 771-774, 2015
- 31) 賴宏亮, 林文音, 元田義春, 玉井富士雄, 田辺猛, トウキ(当帰)の生産ならびに品質向上に関する研究(第1報) 施肥成分の相違がトウキの生育ならびに収量, エキス抽出率, Ligustilide, Butyldene phthalide 含量に及ぼす影響, 生薬学雑誌, **46**(4), 321-327, 1992
- 32) 賴宏亮, 林文音, 玉井富士雄, 元田義春, 田辺猛, トウキ(当帰)の生産並びに品質向上に関する研究-4-切根処理がトウキの抽苔防止並びに生育, 生理, 収量及び品質に及ぼす影響, 生薬学雑誌, **47**(4), 367-376, 1993
- 33) 一色直太郎, 和漢薬の良否鑑別法及調製法, 吐鳳堂書店, 東京, p. 81-82, 1916
- 34) Zheng SH, Ren WG and Huang LF, Geoherbalism evaluation of Radix *Angelica sinensis* based on electronic nose. *J Pharm Biomed Anal*, **105**(25), 101-106, 2015
- 35) Mitsuhashi H, Nagai U, Muramatsu T and Tashiro H, Studies on the constituents of Umbelliferae plants. II. Isolation of the active principles of *Ligusticum* root. *Chem Pharm Bull* **8**(3), 243-245, 1960
- 36) Cao YX, Zhang W, He JY, He CL and Xu CB, Ligustilide induces vasodilatation via inhibiting voltage-dependent calcium channel and receptor-mediated Ca²⁺ influx and release. *Vascu Pharmacol*, **45**(3), 171-176, 2006
- 37) 関崎春雄, 縣功, 木村康一, 大深当帰栽培過程における ligustilide 含量の変化について. 生薬学雑誌, **38**(4), 361-362, 1984
- 38) Jeong SY, Kim MH, Lee KH, Kim KY, Huang DS, Kim JH and Seong RS, Quantitative analysis of marker compounds in *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, and *Angelica acutiloba* by HPLC/DAD, *Chem Pharm Bull*, **63**(7), 504-511, 2015

- 39) Lu GH, Chan K, Chan CL, Leung K, Jiang ZH and Zhao ZZ, Quantification of ligustilides in the roots of *Angelica sinensis* and related umbelliferous medicinal plants by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1046**(1-2), 101-107, 2004
- 40) Zhou SS, Xu J, Tsang CK, Yip KM, Yeung WP, Zhao ZZ, Zhu S, Fushimi H, Chang HY and Chen HB, Comprehensive quality evaluation and comparison of *Angelica sinensis* radix and *Angelica acutiloba* radix by integrated metabolomics and glycomics, *J Food Drug Anal*, **26**(3), 1122-1137, 2018
- 41) Kudo Y, Ando H and Sasaki Y, Quality evaluation of *Angelicae acutilobae* radix: Individual differences and localization of (Z)-ligustilide in *Angelica acutiloba* root. *J Nat Med*, **75**(1), 1-10, 2021
- 42) Zhao ZZ, Chen HB (2012) Illustrated Chinese Materia Medica, Japanese. NTS Inc., Tokyo, p. 101-102
- 43) Fukuda K, Murata K, Itoh K, Taniguchi M, Shibano M, Baba K, Shiratori M, Tani T and Matsuda H, Fibrinolytic activity of ligustilide and pharmaceutical comparison of *Angelica acutiloba* roots before and after processing in hot water. *J Trad Med* **26**(5+6), 210-218, 2009
- 44) Katoh A and Ninomiya Y, Relationship between content of pharmacological components and grade of Japanese *Angelica* radices. *J Ethnopharmacol*, **130**(1), 35-42, 2010
- 45) 尾崎和男, 芝野真喜雄, 草野源次郎, 渡辺均, 甘草の国内生産を目指して(2) : ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) の優良個体の選抜について. 生薬学雑誌, **64**(2), 76-82, 2010
- 46) 糸忠人, 勝城忠久, 久保道徳, 有地滋, 北川勲, 牡丹皮の研究 (第4報) 「奈良県産」ボタン根中のpaeonolの存在部位について, 生薬学雑誌, **34**(4), 292-298, 1980
- 47) Tani T, Kubo M, Katsuki T, Higashino M, Hayashi T and Arichi S, Histochemistry II. Ginsenosides in ginseng (*Panax ginseng*, root). *J Nat Prod*, **44**(4), 401-407, 1981
- 48) Tani T, Katsuki T, Kubo M and Arichi S, Histochemistry. VII. Flavones in *Scutellariae* radix. *Chem Pharm Bull*, **33**(11), 4894-4900, 1985
- 49) Chu SS, Jiang GH, Liu ZL, Insecticidal components from the essential oil of Chinese medicinal herb, *Ligusticum chuanxiong* Hort. *E-J Chem*, **8**(1), 300-304, 2011
- 50) Onawunmi GO, Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. *Int J Crude Drug Res*, **27**(2), 121-126, 2008
- 51) Mehmoud ALE, Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Lett Appl Microbiol*, **19**(2), 110-113, 1994
- 52) Inouya S, Watanabe M, Nishiyama Y, Takeo K, Akao M and Yamaguchi H, Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses* **41**, 403-410, 1998
- 53) Tani T, Katsuki T, Kudo M and Arichi S, Histochemistry : IX. Distribution of saikosaponins in *Bupleurum falcatum* root. *J Chromatogr A*, **360**, 407-416, 1986