

令和 6 年 6 月 1 7 日現在

機関番号：3 2 6 5 8

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：2 0 K 1 5 5 1 0

研究課題名（和文）生薬「威霊仙」の国産化を目指したサキシマボタンツルの栽培条件と品質評価法の開発

研究課題名（英文）Development of cultivation and quality evaluation methods for Clematis chinensis Osbeck aimed at domestic production of the Kampo medicine Ireisen

研究代表者

倪 斯然（Ni, Siran）

東京農業大学・農学部・助教

研究者番号：9 0 8 2 6 8 3 5

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では漢方生薬「威霊仙」の国内生産を目指し、宮古島産サキシマボタンツルの種苗生産法、生息地外栽培法、品質評価などの研究に取り組み、一連の技術を確立することを目的とした。研究の成果として、関東地方で本種の栽培が成功し、発芽能力のある種子が結実することを確認し、生息地外での栽培生産が継続的に行えることを明らかにした。また、栽培品は日本国内に流通している「威霊仙」と同様にoleanolic acidとヘデラゲニンを含有し、他の化学的特徴においても差が認められなかったため、「威霊仙」の生産原料として利用できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生薬「威霊仙」（イレイセン）は年間使用量約11トンの全量を中国からの輸入品に依存しており、安定供給のためには国内生産が必要である。「威霊仙」の原植物であるサキシマボタンツルが沖縄地方にのみ分布するが、薬用資源として利用されていない。本研究は未利用資源であるサキシマボタンツルの栽培生産技術を確立したことで、生物資源の有効活用を推進することができ、「威霊仙」の国産化に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop the domestic production of the Kampo medicine Clematidis Radix et Rhizoma (also be called as “ireisen” in Japanese) by using Clematis chinensis Osbeck that growing naturally in Miyakojima, Okinawa. Seedling production method and ex-situ cultivation method were developed, and the cultivated products was evaluated by HPLC and TLC methods. As a result of this study, this species was successfully cultivated in the Kanagawa prefecture. Seeds capable of germination were found to be produced on individuals cultivated in the Kanagawa prefecture and Toyama prefecture, therefore continuous ex-situ cultivation could be applied. Additionally, the cultivated products contained oleanolic acid and hederagenin and there were almost no differences observed in other chemical characteristics between cultivated products and commercial sample. Therefore, it was concluded that these cultivated plants can be used as raw materials of “ireisen”.

研究分野：生薬学、薬用植物学

キーワード：威霊仙 サキシマボタンツル 発芽特性 薬用植物栽培

1. 研究開始当初の背景

近年医療現場で漢方製剤のニーズが高まり、生産金額は年々増加している。その原料となる生薬の年間使用量も上昇しているが、生薬の生産国については、中国産が約8割を占めており、日本産は全体の1割程度で推移している。また、中国産生薬は、中国国内需要の増加、人件費の上昇、天然資源の減少などの理由で、輸入価格が2006年から2014年までの8年間で約2.4倍まで上昇し、今後さらなる値上がりが見込まれている。日本における漢方治療を持続可能にするためには国内生産を拡大させ、原料生薬の安定供給を図る必要がある。一方、日本に分布しているが国内で利用されていない薬用植物が種々存在し、生薬「威霊仙」の原植物であるサキシマボタンヅルもその一つである。「威霊仙」は祛風湿薬として「疎経活血湯」や「二朮湯」に配合される生薬で、神経痛、関節痛、リウマチ、腰脚痛などの治療に用いられる。現行の日本薬局方と中国薬典では、「威霊仙」の基原はキンポウゲ科の *Clematis chinensis* Osbeck、*C. mandshurica* Ruprecht、*C. hexapetala* Pallas の根および根茎と規定されている。3種のうち *C. chinensis*（サキシマボタンヅル）は日本（沖縄の先島諸島）に分布しているが、現在日本で使用されている「威霊仙」の全量約11トン中国から輸入しており、本種は薬用資源として利用されていない。そこで申請者は「威霊仙」の国内生産を目的に、宮古島に自生するサキシマボタンヅルを利用することを着想した。

申請者は事前に宮古島でサキシマボタンヅルの調査を行い、本種は内陸部や海岸付近に普遍的に分布するが、生薬として利用するには資源的に不足であり、また珊瑚礁由来の島尻マージに生育するため根を掘り取ることは困難であることが判明した。資源量を確保するため自生地での栽培生産ができたとしても、物流コストなどがかり採算が合わない可能性が高いと考えられる。この問題を解決するため、申請者は宮古島市で採種したサンプルを関東地方で試験的に栽培したところ、生息地外での栽培が可能であることが判明した。栽培品は「威霊仙」としての適性があれば、関東地方での栽培により国内生産が可能になると考えられる。

しかし、先島諸島に分布するサキシマボタンヅルが生薬生産目的に栽培された事例がなく、栽培年間スケジュールや施肥管理などの栽培技術が確立されていない。過去に種子の発芽特性に関する研究報告があるが、処理時間も含めて発芽までに6ヶ月を要するなど、種子繁殖による種苗生産について検討する余地が多々ある。また、「威霊仙」の品質評価において、日本薬局方では特定成分の確認試験や定量試験に関する規定がない。中国薬典ではオレアノール酸とヘデラゲニン含量をそれぞれ0.30%以上含有することが規定されているがサキシマボタンヅルの栽培品はこの2成分を含有するか否かは不明である。以上の課題を解決することが、国産「威霊仙」の栽培化に重要である。

2. 研究の目的

本研究では宮古島に自生するサキシマボタンヅルを用いる「威霊仙」の国産化に向けて、本種の栽培生産技術を開発することを目的とした。目的を達成するためまず、関東地方で栽培した株から種苗生産のための種子・挿し穂を採集することができるのか否か、またこれらの種子・挿し穂を用いて実際に種苗の大量生産が可能であるのか否かを検討した。次にサキシマボタンヅルの栽培条件を探索し、自生地ではない関東地方で栽培することが、本種にどのような影響を与えるかについて検討した。最後は栽培品の品質を評価するため、オレアノール酸及びヘデラゲニンの含量を定量することとともに、TLC法を用いて収穫物の化学的特徴を明らかにした。

3. 研究の方法

本研究では、サキシマボタンヅルの生息地である沖縄県宮古島市および生息地外である神奈川県厚木市と伊勢原市で同時展開した。「実験1」種子繁殖による種苗生産に関する研究、「実験2」挿し木法による種苗生産に関する研究、「実験3」品質評価に関する研究、「実験4」栽培条件に関する研究を行った。

「実験1」サキシマボタンヅルの種子発芽特性の解明

発芽実験は人工気象器内で行った。生息域外栽培株の種子の発芽能力調査は、ビニルポットに鹿沼土（細粒）を入れ、各種子を1鉢に40粒ずつ播種した。播種後覆土を行わず、表面が乾燥しないように灌水した。また、発芽温度、冠毛の有無、ジベレリン処理、種子の保存期間による影響を検討するため、シャーレに脱脂綿とろ紙2枚を敷き、その上に種子を40粒置き、ろ紙が乾燥しないように適宜給水した。

「実験2」挿し木法によるサキシマボタンヅルの種苗生産法の検討

2020年12月に宮古島でサキシマボタンヅル自生株から地上茎を採取し、厚木市で挿し木実験を行った。地上茎を2節ごとに節の下約1cmで切断し、下の節の葉は切り落とし、赤玉土細粒を充填したプランターに挿し付けた。その後温室内で管理し、灌水を適宜行った。

「実験3」サキシマボタンヅルの根の品質評価

伊勢原市で栽培されたサキシマボタンヅルを用い、中国薬典に記載されている方法でオレアノール酸とヘデラゲニンの含量を測定した。また、「威霊仙」の市場品、伊勢原市の収穫品、宮古

島市の自生品の化学的特徴を中国薬典の TLC 法を用いて比較した。

「実験 4」サキシマボタンヅルの栽培条件の探索

伊勢原市におけるサキシマボタンヅルの生育状況と収穫時期を検討するため、2020 年 5 月に伊勢原市内に設置した圃場に実生苗を定植し、2021 年 3 月、6 月、9 月、12 月に 20 株ずつ収穫し、根の長さや乾燥重量を測定した。宮古島市と厚木市で栽培した株を比較するため、実生苗各 20 株をルートラップ 6 号に植え替え、その状態で圃場に植え付けた。用土は現地の畑土を用い、1 年後と 2 年後にそれぞれ 10 個体を収穫し、地上部と地下部の長さ及び乾燥重量を測定し比較した。肥料反応の確認試験では、1/5000a ワグネルポッドを用い、窒素、リン酸、カリウム、追肥量、栽培用土をそれぞれ 4 水準設け、直交配列表を用いて実験を行った。

4. 研究成果

「実験 1」サキシマボタンヅルの種子発芽特性の解明

センニンソウ属植物の発芽の適温は 20~25 とされ、また角ら (1994) の研究ではサキシマボタンヅルは 15 と 25 の条件下では発芽せず、20 でのみ発芽した結果となった。しかし、本研究では 180 日目の発芽率は 15 で $71.3 \pm 11.6\%$ 、20 で $48.8 \pm 20.3\%$ で、前者の方が有意に高かった (t 検定、 $p < 0.05$) が、25 では発芽しなかった (図 1: 左)。15 の平均発芽日数 (67.5 ± 2.0 日) は 20 条件に比べて短かったが、有意差はなかった。角らの研究と異なる結果になったのは、実験に供試した種子の採取地もしくは保存条件などに起因すると考えられる。また、種毛の有無は発芽率・平均発芽日数に影響がなかった。

生息地と異なる環境に移植した株に由来する種子の発芽能力を確認するため、神奈川県厚木市の栽培株 5 株と富山県富山市呉羽町の栽培株 1 株から種子を採取し、発芽実験を行った。180 日目の発芽率は厚木産種子では $41.7 \pm 13.0\%$ (厚木 1) ~ $90.3 \pm 3.6\%$ (厚木 5) に収まり、富山産種子では $59.0 \pm 14.2\%$ であった (図 1: 右)。また、発芽率が最も低かった種子 (厚木 1) の平均発芽日数は 93.4 ± 5.4 日で、他の個体から採集した種子に比べて有意に短かった (Tukey's HSD Test、 $p < 0.05$)。厚木市と富山市に移植栽培した宮古島市の自生株から発芽能力のある種子が得られ、発芽率と平均発芽日数は宮古島産種子とほとんど差がなかったことから、亜熱帯域の宮古島産のサキシマボタンヅルが温帯域においてもライフサイクルを完結することができ、生息域外において威霊仙の継続的な栽培生産が可能であることが確認できた。

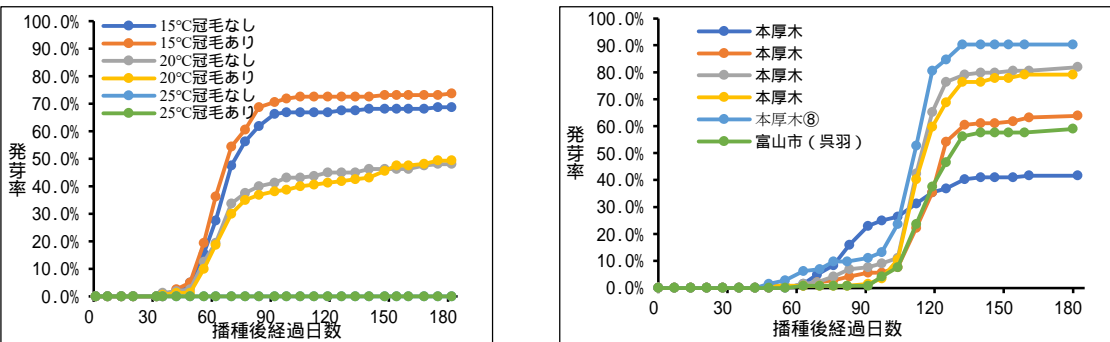


図 1 左：冠毛と温度がサキシマボタンヅルの発芽に与える影響、右：生息域外栽培株の種子の発芽状況

これまでの実験で、サキシマボタンヅルは発芽まで 60 日以上を要し、発芽を促進させる処理方法としてジベレリン処理の検討を行った。その結果、平均発芽日数は 500ppm 水溶液処理区が 60.2 ± 0.7 日 (表 1) で、無処理区 (0ppm 水溶液処理区、 72.9 ± 7.5 日) に比べて有意に短かった (Tukey's HSD Test、 $p < 0.05$)。他の実験区においてもジベレリンの処理濃度を上げることで平均発芽日数は減少傾向にあったが、有意差は認められなかった。一方、120 日発芽率は 500ppm 水溶液処理区が $77.5 \pm 8.9\%$ で、他の処理区に比べて有意に低かった (Tukey's HSD Test、 $p < 0.05$)。従って、ジベレリン処理は発芽日数を早めるのに有効であると考えられ、最も効果がある処理濃度は 500 ppm であった。

表 1 ジベレリン処理種子の発芽率・平均発芽日数

溶媒	濃度	120 日目発芽率 (%)	平均発芽日数 (日)
水	0ppm	$91.3 \pm 11.3\%$	72.9 ± 7.5
水	100ppm	$89.4 \pm 4.3\%$	65.3 ± 4.1
水	500ppm	$77.5 \pm 8.9\%$	60.2 ± 0.7
アセトン	0ppm	$96.9 \pm 3.8\%$	69.6 ± 3.6
アセトン	100ppm	$95 \pm 0\%$	72.3 ± 7.1
アセトン	500ppm	$93.1 \pm 4.3\%$	62.0 ± 2.9

厚木産種子の保存期間を検討した結果、保管期間4ヶ月までに種子の発根・発芽率は上昇傾向が見られ、2022年2月に行った発芽実験では、発根・発芽率共に、50%を上回った。一方、保管期間5ヶ月以降の発根・発芽率は減少傾向に転じ、2022年9月の発芽率は20%以下に低下したことが分かった(図2左)。発根・発芽日数について、2021年11月の発根・発芽日数が最も長い日数を要していた。2022年2月までは多少のばらつきが見られたが、2022年3月以降は発根・発芽日数共に徐々に減少傾向に転じていた(図2右)。以上のことから冷蔵庫で保存する場合、5ヶ月間の保存は発根率が高く、発芽に要する日数も短いため、最も好ましい条件であると考えられる。

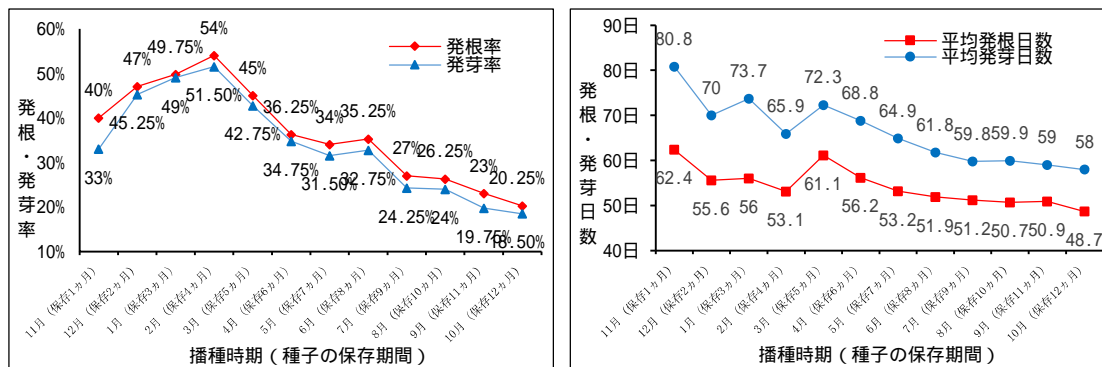


図2左：発根率と発芽率の変化、右：平均発根・発芽日数の変化

「実験2」挿し木法によるサキシマボタンツルの種苗生産法の検討

申請者は以前宮古島産サキシマボタンツルを用いて挿し木実験を複数回行った結果、厚木市での最大発根率は70.8%(4月に挿し穂を採取した)に達した。一方、2020年12月に実施した実験では、宮古島の冬期でも挿し木法による繁殖が可能であることが判明したが、発芽率が1割以下であったため、大規模栽培に向けての種苗生産には挿し木法よりも種子繁殖の方が適していると判断した。

「実験3」サキシマボタンツルの根の品質評価

神奈川県伊勢原市の圃場で栽培されたサキシマボタンツルと「威霊仙」の市場品を分析した結果、両者ともオレアノール酸とヘデラゲニンを含有していることを確認できた。オレアノール酸含量において栽培品では $0.662 \pm 0.112\%$ で、市場品($0.803 \pm 0.160\%$)に比べて低かったが、ヘデラゲニン含量において栽培品では $1.020 \pm 0.110\%$ で、市場品($0.254 \pm 0.0826\%$)を大幅に上回った(図3左)。また、市場品と栽培品において溶出パターンに大きな差が認められなかった(図3右)。以上の結果から、サキシマボタンツルの栽培品地下部と現在市場の威霊仙は化学成分的にほぼ同様であることが確認できた。なお、3月、6月、9月、12月の収穫物に含まれるオレアノール酸とヘデラゲニンの含量を測定した結果(図3左)、ヘデラゲニン含量は9月が $1.11 \pm 0.02\%$ で最も高かったが、収穫時期による差は殆ど認められなかった。一方、オレアノール酸の含量は、6月が $0.491 \pm 0.08\%$ で他の区より有意に低かったため、含有成分が季節により変動することが示唆された。さらに中国薬典に記載されているTLC法を用いて市場品と伊勢原圃場の栽培品の化学的特徴を比較した結果、HPLC法と同様に両者の差が認められなかった。

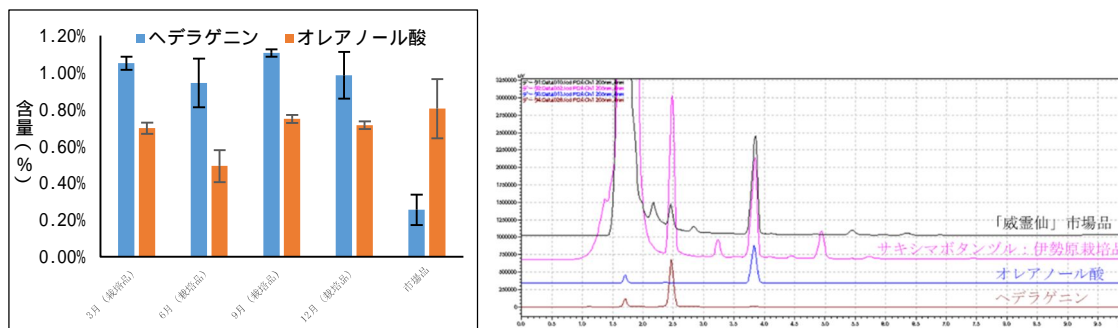


図3左：市場品と栽培品(収穫時期)のヘデラゲニンとオレアノール酸含量、
右：市場品と栽培品のクロマトグラム(中国薬典のHPLC法により分析)

「実験4」サキシマボタンツルの栽培条件の探索

薬用部位である根の収穫時期について、伊勢原市の圃場で2年生株を用い、3月、6月、9月、12月の4期に検討したところ、根の長さや収量は、3月が最も低く、6月がそれぞれ $72.6 \pm 20.0\text{cm}$ 、 $21.1 \pm 14.2\text{g}$ で最も大きい数値を示し、9月が $62.1 \pm 15.9\text{cm}$ 、 $14.9 \pm 8.4\text{g}$ で一旦減少

したが、12月が $68.1 \pm 14.9\text{cm}$ 、 $18.9 \pm 9.6\text{g}$ で再び増加した（図4）。関東ではサキシマボタンヅルは7月中旬頃から開花するため、開花前および果実の成熟後に根を伸ばすことが示唆された。なお、6月に根の収量が最も高い結果を得た一方、オレアノール酸の含量は最も低かったため、最適な収穫時期は12月であると判断した。

宮古島と厚木の圃場栽培株を比較した結果、宮古島個体、厚木個体ともに地上部、地下部で1年生株より2年生株の方が高いという結果が出た。宮古島試験区では1年生株で地上部が0.18g、地下部が0.74g、2年生株で地上部が5.93g、地下部が9.84gと大きな差が確認された。また、厚木個体では1年生株の地上部が28.57g、地下部が16.06g、2年生株が78.92g、地下部が25.88gと地上部では大きな差が確認できたが、地下部に関しては約1.6倍と比較的小さな差であった（図5）。宮古島市では5月にサキシマボタンヅルが開花し、7月に種子が成熟した後に地上部が黒変して枯れる（以下「夏枯れ」という）が、厚木市では7月中旬頃から開花が観察され、結実後夏枯れが起こらなかった。自生地である宮古島よりも厚木での生育が良かった理由は、3月から12月まで圃場栽培した場合、夏枯れしない厚木市栽培株では生育期間が長かったためと考えられる。

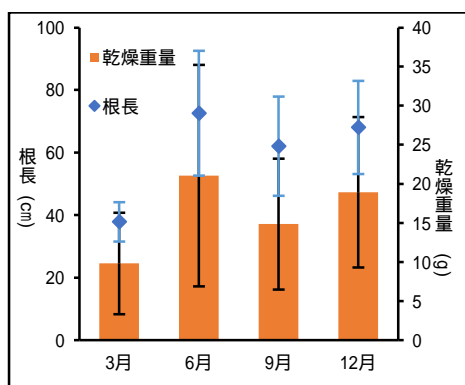


図4 収穫時期別：根の長さ（cm）と収乾燥重量（g）（n=20）

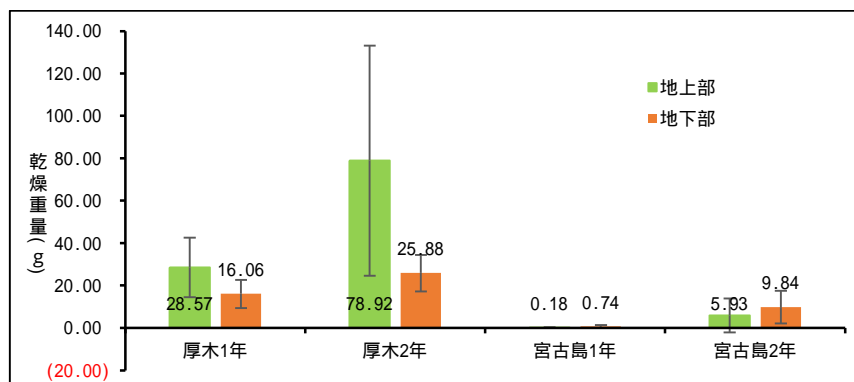


図5 栽培場所と栽培年数による地上部と地下部の乾燥重量の変化

5要素4水準の直交配列表を用い、ワグネルポットによる栽培実験で窒素、リン酸、カリウム、追肥量、栽培用土がサキシマボタンヅルの生育に及ぼす影響を検討した結果、総茎長、SPAD値、地上部と地下部の乾燥重量において全試験区間に有意差が認められなかったため、野生種である本種の肥料反応性が弱いことが考えられる。なお、最も生育が良かった試験区では肥料三要素の施肥量が多く、塩化カリウム施肥量が10kg(10a/kg)である一方で、生育不良が観察された試験区の施肥量は全体的に低く、塩化カリウム施肥はいずれも無施肥となっている。従って、カリウムの不足が本種の生育不良が起こった要因の一つであると考えられる。以上、本研究課題では宮古島に自生するサキシマボタンヅルを用い、生息地外である関東地方での栽培に成功した。栽培品の化学的特徴は現在日本国内市場に流通している「威霊仙」とほぼ同様であるため、「威霊仙」の生産原料としての利用が可能であると考えられる。また、本種の種苗生産や収穫時期、施肥量などの検討を行った結果、栽培条件次第に生息地外である関東地方における収穫量が自生地である宮古島より高くなることを明らかにした。

<引用文献>

角 真二、武田 修己、樋口 正視、サキシマボタンヅル(*Clematis chinensis* Osbeck)の発芽と休眠打破について、生薬学雑誌、48(4)、1994、264-268

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 倪斯然，金正成，中里周，成岡来美，笠井凉介，菊野日出彦，御影雅幸
2．発表標題 サキシマボタンツルの神奈川県下における栽培について
3．学会等名 薬用植物栽培研究会第5回研究総会
4．発表年 2023年

1．発表者名 倪斯然，佐藤亜海，菊野日出彦，御影雅幸
2．発表標題 沖縄県宮古島市由来サキシマボタンツルの種子発芽特性
3．学会等名 薬用植物栽培研究会第5回研究総会
4．発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------