

薬用植物シナマオウ（*Ephedra sinica* Stapf）における
エフェドリンアルカロイド含有量に関する育種学的研究

2021 年 1 月

樋山 肇

薬用植物シナマオウ（*Ephedra sinica* Stapf）における
エフェドリンアルカロイド含有量に関する育種学的研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物圏資源科学専攻
博士（農学）学位論文

樋山 肇

目次	i
略語	iii
語句の説明	iv
第1章 緒論	1
第2章 日本におけるシナマオウ育種に向けた保有遺伝資源の育種材料としての適性評価	
緒言	13
材料および方法	14
結果	17
考察	19
第3章 日本におけるシナマオウ総アルカロイド含有量の選抜育種の検証	
緒言	29
第1節 ジェネットおよびクローンの総アルカロイド含有量と収量の経年評価	
材料および方法	32
結果	35
考察	37
第2節 栽培地における評価と総アルカロイド含有量に対する選抜効果の検証	
材料および方法	40
結果	43
考察	44
第3節 総アルカロイド含有量に対する遺伝効果と環境効果の評価	
材料および方法	48
結果	50
考察	52
第4章 総合考察	85

摘要	90
謝辭	92
引用文獻	93

略語

日局 17 : 第 17 改正日本薬局方

Eph : (-)-Ephedrine

PEph : (+)-Pseudoephedrine

TA : 総アルカロイド

G: genotype

E: environment

Y: year

L: location

G×E 交互作用 : Genotype × Environment interaction

G×Y 交互作用 : Genotype × Year interaction

G×L 交互作用 : Genotype × Location interaction

L×Y 交互作用 : Location interaction × Year interaction

G×L×Y 交互作用 : Genotype × Location interaction × Year interaction

語句の説明

麻黄：*E. sinica*, *E. intermedia* 又は *E. equisetina* の地上茎を乾燥させた生薬

シナマオウ：*Ephedra sinica* Stapf

エフェドリンアルカロイド：下記 6 種の総称

(-)-Ephedrine, (-)-Norephedrine, (-)-N-Methylephedrine, (+)-Pseudoephedrine,
(+)-Norpseudoephedrine, (+)-N-Methylpseudoephedrine

総アルカロイド：第 17 改正日本薬局方で定義されているエフェドリンとプソイドエフェドリンの総和

ジェネット：一つの種子由来の株

収量：マオウの木質茎を除く，ジェネットまたはクローンあたりの地上茎乾燥重量

第1章 緒論

日本、中国および韓国では、古来より生薬が伝統薬として用いられている。生薬とは、植物、動物、あるいは鉱物などの天然物を乾燥などの簡易に加工して作った薬であり（竹谷・鳥居塚 2012）、天然物を精製せずに用いる薬のことである（斉藤 2017）。医薬品は厚生労働大臣が定めた医薬品の規格基準書である第 17 改正日本薬局方（以下、日局 17）（厚生労働省 2016）によって規格が定められており、生薬や漢方製剤などの単一成分によらない天然医薬品は、「医薬品各条 生薬等」として 324 品目が定められている（斉藤 2017）。天然物由来である生薬は、同一種であっても含有成分の組成及び含有量に多様性がある（袴塚 2020）。そのため、一般に、日本薬局方における生薬の成分含有量の規格は、化学医薬品にみられる狭い規格幅ではなく、下限値が設定されている（袴塚 2020）。日本における漢方医学は中国を起源としているが、中国の伝統医学である「中医学」や、起源を同じくする韓国の伝統医学である「韓医学」とは異なった医学体系を形成している（株式会社ツムラ 2018）。中国の漢の時代に完成した伝統医学が 6 世紀頃から日本に導入され、江戸時代に日本で独自に発達した医学を漢方と呼ぶようになった。その漢方で使う薬が漢方薬である（竹谷・鳥居塚 2012）。漢方薬は、漢方医学理論に従って調合された複数の生薬を熱水で煮出して生薬カスをろ過して除き、湯液としたものを基本的な剤形としている（牧野 2015）。生薬を煎じたあとの湯液に含まれる水分を乾燥させた抽出物を製剤化したものが医療用漢方製剤として販売されている。一部の医療用漢方製剤処方では、製法や成分含有量が規定されており、製法には配合される生薬の分量が規定されている（厚生労働省 2016）。医療用漢方製剤の医薬品としての有効性及び安全性を確保するため、一定範囲内に有効成分の含有量を収める必要がある。しかしながら、原料である生薬の成分含有量の変動幅が大きいため、日局 17 では、医療用漢方製剤の定量指標成分の含有量規格の幅を広く規定し、上限値が下限値の 3 ～4 倍となっている（袴塚 2020）。

2017 年度のデータでは、医療用医薬品市場は 10.5 兆円であるのに対して、医療用漢方製剤市場は 1,509 億円とわずかではある（株式会社ツムラ 2018）。しかしながら、漢方薬使用実態調査では、医療用漢方製剤を処方している医師は、調査した医師の 90%以上である（日経メディカル編集部 2003）。さらに、漢方製剤等は科学技術による基礎および臨床での科学的根拠の解明が進むに従い、がん支持療法や高齢者医療等、新たな領域においても重要な役

割を担うようになってきた（日本漢方生薬製剤協会 2018）。これらのことは、現在、医療用漢方製剤が我が国の医療にとって必要不可欠になっていることを示している。また、定期的な薬価改定により医療用漢方製剤の薬価は低下し続けているにも関わらず、医療用漢方製剤の需要は年々増加しており、医療用漢方製剤の生産額は年々増加している（日本漢方生薬製剤協会 2019）。今後も医療用漢方製剤を安定供給していくことが必要とされており、医療用漢方製剤の原料となる生薬を安定供給することが不可欠である。

日本漢方生薬製剤協会の生薬使用量調査（山本ら 2019）によると、日本で使用されている生薬は 293 品目あり、2008 年の生薬使用量は 20,763t であったが、2016 年の生薬使用量は 26,784t と増加している。日本における生薬の生産量は 2,467t（2008 年）から 2,860t（2016 年）、日本における生薬の生産品目数は 86 品目（2008 年）から 89 品目（2016 年）とそれぞれ増加している（山本ら 2019）。しかしながら、生薬の生産国の割合は、日本が 11.9%（2008 年）から 10.7%（2016 年）、中国が 79.3%（2008 年）から 77.0%（2016 年）、その他の国が 8.8%（2008 年）から 12.3%（2016 年）と推移している（山本ら 2019）。日本における生薬の自給率は低く、生薬の供給の大部分を中国に依存しているのが現状である。また、中国の伝統医薬である中医薬も生薬を原料として使用しており、近年、中医薬の使用量増加による中国国内の生薬需要の高まりや中国における生薬栽培従事者の減少および人件費の高騰の影響によって中国産の生薬価格が高騰している（川原 2013, 牧野 2015）。中国産の生薬価格は 2006 年から 2014 年の 8 年間で平均して 2.4 倍に上昇しており、使用量の多い生薬では、甘草が 2.4 倍、芍薬が 2.7 倍、茯苓が 2.4 倍に値上がりし、最も価格が上昇したのは、人参の 5.8 倍であった（日本漢方生薬製剤協会 2015）。今後も製品となる医療用漢方製剤の薬価下落と原料となる生薬価格の高騰が続けば、利益が減りコストが増え続けることになり、将来的に医療用漢方製剤の安定供給ができなくなることが懸念される。さらに、中国では、自生している薬用植物が乱獲により減少しており、資源保護および環境保全のため、一部の薬用植物では採取規制や輸出規制が行われている（長友 2013）。そのため、生薬の供給に対するリスクを分散するため、日本国内における栽培の需要が高まっている（川原 2013）。近年、日本における薬用植物の栽培は、中山間地域の活性化や遊休農地の解消に向けた対策として注目されており（長友 2013）、長野県（堀 2013）、富山県（大江 2013）、奈良県（奈良県農林部農業水産振興課 2013）、兵庫県（福嶋 2013）などで薬用植物の栽培が取り組まれている。中山間地域以外では、北海道での大規模栽培に向けた取り組みも行われている。

(中島 2013, 鈴木 2013). 加えて, 高品質な生薬の国内栽培に向け, 薬用植物の成分育種が芍薬(柴田 2013)や甘草(林 2013)などで行われている. また, 国内での麻黄(以下, 生薬を示す場合は麻黄と表記)の生産を目指して 2013 年よりシナマオウの栽培が開始されている(安藤ら 2016).

麻黄の日本における使用量は 561.4~707.8t (2008 年~2016 年)であり, 麻黄は現在日本で使用されている生薬 293 品目中, 使用量 15 位(2016 年)と使用量の多い生薬である(山本ら 2019). しかしながら, その全量を中国からの輸入に依存している. さらに, 中国では資源保護と砂漠化防止を理由に 1998 年に「エフェドリン類製品の輸出管理問題に関する通知」(対外経済貿易管理局発第 573 号)が出され, 1999 年 1 月から麻黄の輸出を禁止しており, 粉末や切裁などの加工品にしなければ中国政府からの輸出許可を得ることができない(御影 2013, 神谷 2012). また, 2000 年には資源保護のため, 「甘草と麻黄の乱掘制止に関連する問題に関する通達」が公布され, 中国での麻黄の野生採取が禁止された(海外環境協力センター 2001). そのため, 麻黄は供給リスクが高く, 今後の安定供給に向けて, 日本における麻黄の生産が求められている.

麻黄は, エフェドリンアルカロイドを含み, 葛根湯や小青龍湯, 麻黄湯, 防風通聖散や麻黄附子細辛湯などの処方に用いられる重要な生薬であり, 風邪, 頭痛, 気管支喘息および鼻炎の治療に用いられている. これらの薬理作用はエフェドリンアルカロイドに由来すると考えられている(原田 1980). 麻黄には, (-)-Ephedrine (以下, Eph), (+)-Pseudoephedrin (以下, PEph), (-)-Norephedrine, (+)-Norpseudoephedrine, (-)-Methylephedrine, (+)-Methylpseudoephedrine の 6 種類のエフェドリンアルカロイドが含まれている (Leung and Foster 1996). このうち, Eph と PEph でエフェドリンアルカロイドのおよそ 90% を占めている (Liu *et al.* 1993). また, 日局 17 (厚生労働省 2016) には, 「麻黄は *Ephedra sinica* Stapf, *Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Meyer 又は *Ephedra equisetina* Bunge (Ephedraceae) の地上茎を乾燥させたものであり, 総アルカロイド[エフェドリン ($C_{10}H_{15}NO$: 165.23) 及びプソイドエフェドリン ($C_{10}H_{15}NO$: 165.23)] 0.7% Dry weight 以上 (7.0 mg/g Dry weight: DW) を含む」と規定されている. したがって, 日局 17 に規定されている総アルカロイド (以下, TA) 含有量の規格値を超えることは医薬品である麻黄を生産する上で必要不可欠である. また, 例えば, 麻黄が配合されている代表的な漢方製剤処方である葛根湯では, 麻黄 4g あたり TA 含有量 12.0~36.0mg と規定されている(厚生労働省 2016). さらに, 生薬の抽出時

におけるエキスへの TA 含有量の移行率を考慮する必要がある、Eph および PEph 含有量の移行率はそれぞれ $66.6 \pm 0.6\%$, $64.6 \pm 0.5\%$ との報告がある (Hayashi *et al.* 2010). したがって、生薬からエキスへの移行率を考慮すると、葛根湯で求められている麻黄の TA 含有量は $5.0 \sim 15.0 \text{ mg/g DW}$ である. 生薬は数百から数千の多成分で構成されており、漢方製剤であれば、さらに多くの成分から構成されることになる (袴塚 2020). 伝統的医薬品である医療用漢方製剤は、数百年の歴史の中で長年の使用経験により安全性と有効性が担保されており (袴塚 2020), 漢方製剤に用いる生薬の含有成分の組成や含有量を変えないことが望ましい. そのため、日局 17 における医療用漢方製剤処方の規格値の範囲内で、これまでに使用されてきたものと同程度の TA 含有量を有する麻黄が必要である.

基原植物である上記 3 種, *E. sinica* (シナマオウ), *E. intermedia*, *E. equisetina* が属するマオウ属植物は、古くより伝統薬として用いられており、およそ 50 種が世界中の乾燥地や原野に分布している (Price 1996). 麻黄の基原植物 3 種の中でも特にシナマオウが古来より良質であるとされている (吉澤ら 2005). また、日本薬局方に麻黄が初めて収載された 1951 年より、シナマオウのみが現在まで麻黄の基原植物として記載されており (神谷 2012), 現在流通している麻黄は主にシナマオウである (株式会社ウチダ和漢薬 2020). さらに、上記 3 種は、種によって TA 含有量や Eph と PEph の比率が異なっている (Hong *et al.* 2011), そのため、麻黄の国内生産には、シナマオウを対象とすることが妥当である. シナマオウは中国東北部からモンゴルに分布し、原野や乾燥地に生育する裸子植物の多年生草状小低木で高さ 30~70cm, 茎は細長く叢生し分枝しており (図 1-1), 葉は細かい鱗片状で節に対生している (図 1-2) (岡田 2002, 上海科学技術出版社 1985). シナマオウは雌雄異株 (図 1-1) であり、地下茎 (以下、ストロン) による栄養繁殖も行う (図 1-3). 図 1-3 の黒い点線は根を、白い点線はストロンを示しており、ストロンは土中を匍匐し、根および地上茎を出す. また、シナマオウは厳寒や干ばつに耐え、砂質土壌、砂土、壤土いずれの土壌でも生育することができるが、低地や排水の悪い粘土は栽培に適さない (上海科学技術出版社 1985).

中国では 1980 年代よりシナマオウの栽培が開始されている (御影 2013). しかしながら、栽培方法は様々であり、確立されておらず、各農家が独自に開発しているのが現状であり、シナマオウの栽培は、種子や購入した実生苗を用いて行われている (倪ら 2015 b). 前年に地上茎を収穫すると翌年には結実しないため、前年収穫されなかった圃場や野生の株から採種し、種子を入手している (倪ら 2015 b). 種子から栽培する場合、入手した種子を苗床

で2年間育苗し、実生3年生の苗を圃場に定植し、定植後3年目となる実生5年生（図1-4）の夏から秋にかけて最初の収穫が行われ、それ以降毎年収穫されている（Mikage and Kakiuchi 2005, 倪ら 2015 b）. 中国における麻黄の主な生産地は内蒙古自治区西北部の鄂托前旗であり、中国の全生産量のおよそ90%である4,500~5,000tが生産されていると報告されている（佐橋 2019）.

中国ではすでにシナマオウが40年近く栽培されているが課題も多い. 栽培上の課題として、収穫や除草を人手で行い、人件費によるコストが高いこと、十分な灌水や施肥を行わないとシナマオウが枯死すること、エフェドリンアルカロイド含有量が低いことである. 特に、エフェドリンアルカロイド含有量が低いことは、生薬の品質低下にもつながる重要な問題である. 麻黄の野生採取品が流通していた1990年代の市場調査によると、麻黄のTA含有量は13.3~13.9 mg/g DWであり（Liu *et al.* 1993, 田中ら 1995）、上記の日局17に記載されている葛根湯で規定されているTA含有量の範囲にも収まっている. しかしながら、中国で栽培された麻黄のTA含有量は野生採取品と比べて低いとの報告がある（御影 2013）. また、シナマオウのTA含有量は3.2~23.4 mg/g DWと変異幅が大きいことも報告されているが（Hong *et al.* 2011）、TA含有量を高め、安定させるための品種改良は行われていない（御影 2013）.

中国におけるシナマオウの自生地や栽培地である内蒙古自治区は北緯37度26分から北緯53度23分、東経97度20分から東経126度5分に位置している. また、大部分が標高1000m以上であり、総面積の76.4%が草原で、一部に流動砂丘が見られる世界有数の乾燥地である（南家ら 2018）. シナマオウの栽培地であるオルドス市は温帯大陸性乾燥気候帯に属し、年平均気温は6.0~6.3℃、年平均気温日較差は14.6℃と寒暖差が大きく、最高気温は36.4℃、最低気温は-31.4℃になり、年間降水量340~420mmで、7~9月に雨が集中して降る（李博 1990, 神近ら 1986）. マオウ属植物の自生地における調査では、土壌pHが高く、降水量が少ないほどTA含有量が高くなると報告されている（御影 2012, Kondo *et al.* 1999, Wang *et al.* 2010）. ワグネルポットを用いて土壌pHおよび灌水量がシナマオウのTA含有量に及ぼす影響の調査が行われたが、TA含有量と土壌pHや灌水量との間に相関はなく、再現性は得られていない（御影ら 2019 a）. また、自生地によってシナマオウのTA含有量は変動すること（Wang *et al.* 2010）、マオウ属植物においてTA含有量は季節変動すること（笠原ら 1986）や生長によって変動すること（梶村ら 1994）も報告されている.

一方、日本にはマオウ属植物は自生していない (Caveney *et al.* 2001). 2018 年の日本の年間平均降水量は 1,764mm (国土交通省 水管理・国土保全局 水資源部 2019) と自生地よりも多く、日本列島は南北に長いため、北は亜寒帯から南は亜熱帯まで様々な気候区分に属しており、日本は中国の自生地や栽培地とは異なる環境である。日本における麻黄の供給リスク対策として、2013 年より石川県で麻黄を国内生産するため、実生株を用いて栽培が開始されている (安藤ら 2016). 2020 年には 3.3 ha で約 2,000 株から乾燥重量 400 kg のマオウが収穫されたが、このうち、日局 17 の規格値である TA 含有量 7.0 mg/g DW を超えたのは全量の 25%である約 100 kg のみであった (北國新聞 2020). このことから、麻黄の国内生産には、シナマオウの TA 含有量を高める育種が重要課題である。また、日本におけるシナマオウの栽培を確立するため、施肥条件 (安藤ら 2016, 2020) や採種 (御影 2013, 俣ら 2020), 挿し木法 (野村ら 2013, 2015, 俣ら 2015 a, 2017, 2018 a), ストロンによる増殖法 (野村ら 2013, 御影ら 2019 b) などの検討が行われているが、エフェドリンアルカロイド含有量の育種に不可欠な基本情報である遺伝率や遺伝子型と環境の交互作用 (G×E 交互作用) に関する知見は得られていない。

医薬品である麻黄の国内生産を目指すには、日局 17 の規格値 (TA 含有量 7.0 mg/g DW) を安定して超えることが必要不可欠である。さらに、漢方製剤で求められている麻黄の品質を担保するためには、過去に流通していた野生品と同程度の TA 含有量であるおよそ 13.0 mg/g DW を有する麻黄の生産を目指す必要がある。したがって、日本におけるシナマオウの栽培を確立するためには、TA 含有量への遺伝要因や環境要因の影響を評価し、育種で TA 含有量を高めることや育種したシナマオウを栽培できることを示す必要がある。

シナマオウは雌雄異株であり、播種してから開花するまでには数年を要し、さらに株によって開花する株としない株があり、開花が不安定である。このようなシナマオウの特性を考慮すると、交雑育種を行うことは難しい。一方で、シナマオウは、ストロン (野村ら 2013, 御影ら 2019 b) や挿し木 (野村ら 2013, 2015, 俣ら 2015 a, 2017, 2018 a) による栄養繁殖の研究が進んでおり、選抜した株を栄養繁殖させていくことは可能である。

本研究では、日本における麻黄の安定生産に向け、これまでに市場流通していた麻黄の TA 含有量と同程度である TA 含有量 13.0mg/g DW を育種目標として、シナマオウ TA 含有量の向上および安定化には選抜育種が有効であることを検証することとした。シナマオウにおける選抜育種は、形質評価に基づいてジェネットを選抜し、選抜ジェネットを栄養繁殖

して系統化することである（図 1-5）．この選抜育種の有効性を検証するため、日本における保有する遺伝資源の育種材料としての適性や TA 含有量の経年変動、選抜効果、TA 含有量への遺伝要因および環境要因の影響について評価した．

第 2 章では、保有する遺伝資源の TA 含有量および収量性の変異、TA 含有量と収量の関係性、遺伝的多様性について調査し、日本の環境におけるシナマオウの育種材料としての適性を明らかにした．

第 3 章では、TA の含有量と収量性に対する年生や栽培地の影響を調査し、それらの安定性およびクローンでの再現性を評価した．3 地域を選び、その中から異なる 7 栽培地を選定し、栽培地としての評価および TA 含有量の選抜効果を評価した．3 地域は、中国の栽培地である内蒙古自治区と同緯度である北海道、中国の栽培地とは大きく異なり、平均気温が高く、最高気温と最低気温の差が小さく、年間降水量も多い沖縄、両地域の中間に位置し、年間の最高気温と最低気温の差が大きい関東甲信東海である．これらの結果を元に、3 試験地を選び、TA 含有量の遺伝効果および環境効果について評価した．第 1 節では、茨城での TA 含有量と収量の経年変動を調査し、年生間の安定性およびクローンの再現性を評価した．第 2 節では、日本の栽培地におけるシナマオウ TA 含有量および収量の評価および TA の高含有量に対する選抜効果を評価するため、まず、北海道（恵庭・豊浦・大樹）、茨城、山梨、静岡、沖縄の計 7 か所の試験地にて栽培試験を行った．続いて、各試験地にて TA 含有量を指標に選抜したジェネットを茨城の試験地へ移植し、各環境下で選抜したジェネットの TA の高含有量に対する選抜の効果を検証した．第 3 節では、TA 含有量の遺伝要因（G）および環境要因（E）の影響を評価するため、TA の広義の遺伝率および G×E 交互作用を推定した．第 1 節および第 2 節の結果に基づいて、茨城で選抜し、育成したクローン系統を茨城、山梨、静岡の 3 地点にて、3 年間栽培し、2 年間 TA 含有量の評価を行った．これらの結果から遺伝要因と環境要因が TA 含有量に及ぼす影響を明らかにし、TA 含有量が高く安定した麻黄を生産するためには、栄養繁殖個体による選抜育種が有効であることを示した．

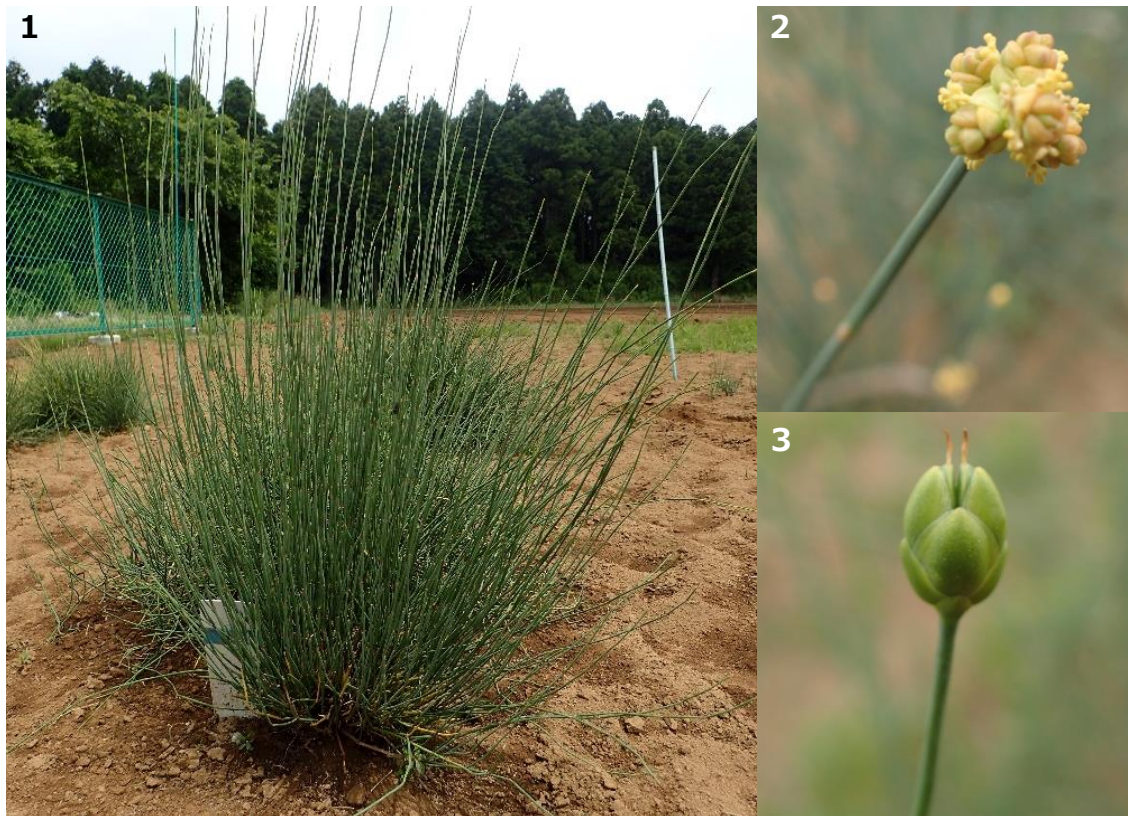


図 1-1. シナマオウの植物体，雄花および雌花

1：実生 6 年生シナマオウ（撮影：2017 年 6 月），2：雄花（撮影：2017 年 6 月），3：雌花（撮影：2017 年 6 月）．雄花序は 3～5 複穂状で広卵形．雌花序は卵形．

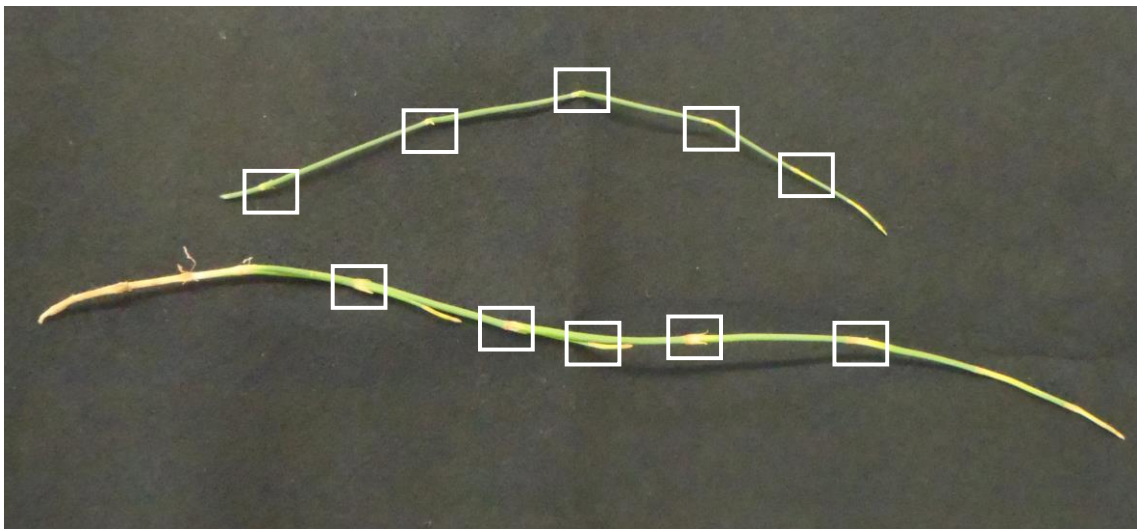


図 1-2. シナマオウの地上茎

白枠は葉を示す．葉は膜質の鋭三角形で鱗片状であり，節に対生している（撮影：2016 年 5 月）．



図 1-3. シナマオウの4年生株の全形写真

白点線：ストロン，黒点線：根（撮影：2017年6月）.

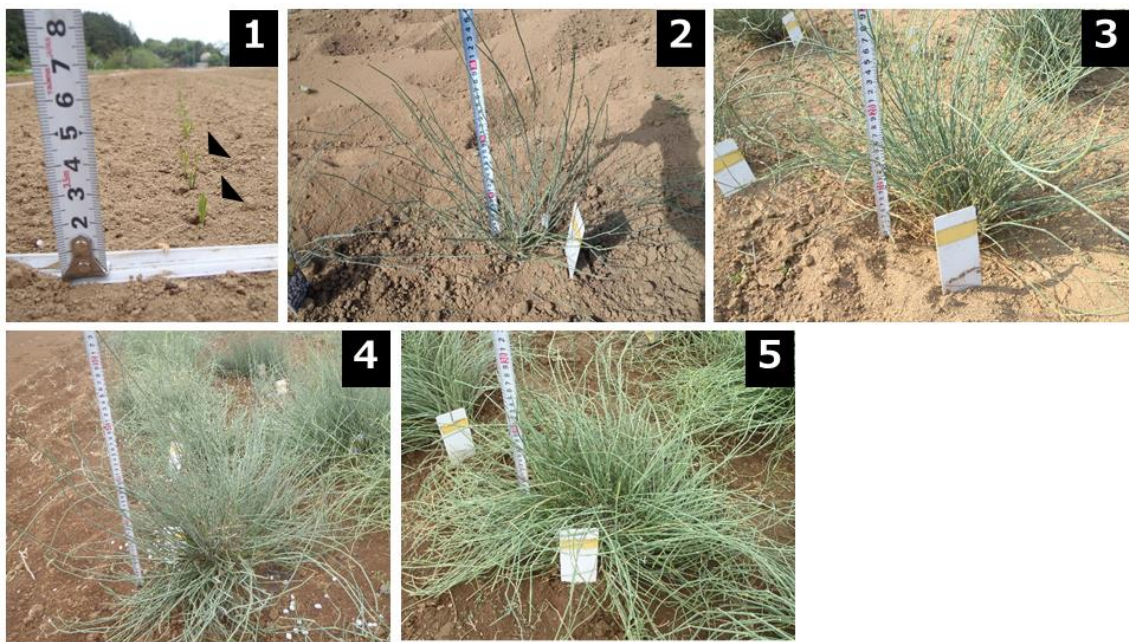


図 1-4. 出芽時から実生 5 年生までのシナマオウ

1 : 出芽直後 (撮影 : 2011 年 6 月), 2 : 実生 2 年生 (撮影 : 2012 年 8 月), 3 : 実生 3 年生 (撮影 : 2013 年 7 月), 4 : 実生 4 年生 (撮影 : 2014 年 8 月). 5 : 実生 5 年生 (撮影 : 2015 年 8 月). 1 の黒矢印は出芽したシナマオウを示す.

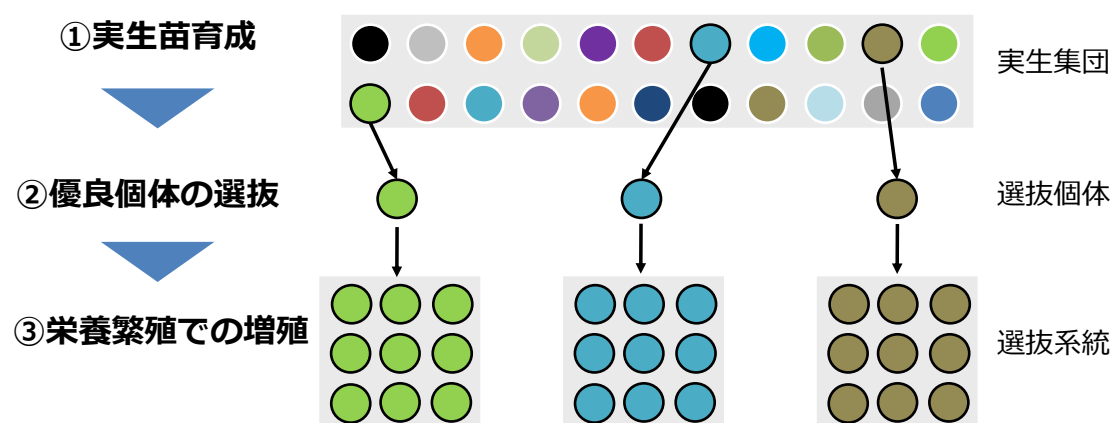


図 1-5. シナマオウの選抜育種計画

①種子からのジェネット育成, ②表現型からのジェネット選抜, ③ジェネットからの栄養繁殖による増殖を示す. ○はジェネットを示し, 色は異なる遺伝子型を示す.

第2章

日本におけるシナマオウ育種に向けた保有遺伝資源の育種材料としての適性評価

緒言

麻黄は、現在、その全量を中国からの輸入に依存している（山本ら 2019）。一方、中国ではマオウ属植物の乱獲が引き起こす砂漠化の防止およびマオウ属植物の資源保護のため、1999 年より麻黄の輸出が規制され（御影 2013, JETRO 2019）、野生採取も禁止されている（海外環境協力センター 2001）。このような状況下で麻黄を持続的かつ安定的に供給するためには、日本におけるシナマオウの生産体制確立が喫緊の課題である。

麻黄において重要な薬理を担う 6 種類のエフェドリンアルカロイドは、その 90%以上が (-)-Ephedrine（以下, Eph）と (+)-Pseudoephedrine（以下, PEph）であり（Liu *et al.* 1993）、第 17 改正日本薬局方（以下, 日局 17）では, Eph と PEph の含有量の和を総アルカロイド (TA) 含有量としている（厚生労働省 2016）。国内生産に向けて、麻黄の TA 含有量をコントロールすることは医療用漢方製剤の品質管理上、最重要課題である。

自生地の調査結果によると、シナマオウにおける TA 含有量は、3.2~23.4 mg/g DW（Hong *et al.* 2011）や 2.0~15.0 mg/g DW（Wang *et al.* 2010）と変動が大きく、自生地によって異なることが報告されている。医療用漢方製剤はまだ解明されていない部分が多く、多成分を有する複数の生薬が配合されている。医療用漢方製剤の品質を安定させるためには、これまでに用いられてきたものと同等の品質を有する生薬を使用することが重要である。したがって、麻黄についても、高品質の麻黄を安定生産するためには、これまでの麻黄の市場流通品の調査結果（Liu *et al.* 1993, 田中ら 1995）に準ずる TA 含有量 13.0 mg/g DW を目指して安定させることが重要である。

国内生産の先行研究として、2013 年より石川県にて限られた遺伝資源の中から実生苗を育成して栽培が開始され（安藤ら 2016）、国産の麻黄が生産されたものの、その生産物の 75%が日局 17 の規格値を超えなかった（北國新聞 2020）。したがって、これまでに使用されてきた TA 高含有量の麻黄を日本で安定生産するためには、シナマオウの TA 含有量を高く安定させることが重要である。

シナマオウのエフェドリンアルカロイド含有量は遺伝要因に左右されているとの報告も

あり（御影 2012），シナマオウの TA 含有量を高く安定させるには育種を行うことが効果的であると考えられるが，これまでにシナマオウの品種改良について報告はされていない（御影 2013）．さらに，麻黄の安定供給には生薬部位である地上茎の乾燥重量（以下，収量）も高めていくことが重要であり，収量についても育種を行っていく必要がある．シナマオウの収量については，自生地や中国栽培地に関する情報はほとんどなく，日本での栽培試験における知見も他のマオウ属植物種の情報がわずかにあるのみである（佐竹ら 2002）．

本章では，TA 含有量が 13.0 mg/g DW となるシナマオウの日本での栽培および育種に向け，種子から材料を育成し，茨城にて育成したジェネットの TA 含有量および収量の変異について調査し，育種材料としての評価を行った．加えて，EST-SSR マーカー（Jiao *et al.* 2019）を用いて遺伝子型を調査し，材料の遺伝的多様性を評価した．

材料および方法

1. ジェネットの TA 含有量および収量の評価

1-1. 供試材料

株式会社ツムラが保有する自然交配により得られたシナマオウ（*Ephedra sinica* Stapf）の種子を供試し，株式会社ツムラの研究圃場（北緯 35 度 99 分，東経 140 度 19 分，茨城県稲敷郡阿見町，標高 26m，黒ボク土）において，2014 年 5 月 2 日から 2016 年 4 月 27 日までのおよそ 2 年間育苗して実生苗を育成した．育成した実生 3 年生 1,003 株（ジェネット）を供試材料として用いた．

1-2. 栽培

基肥として，完熟堆肥 2,000kg / 10a，IB 化成 S1 号（N:P₂O₅:K₂O=10:10:10）20kg / 10a を 2016 年 4 月 26 日に与えた圃場に，1003 ジェネットを 2016 年 4 月 27 日に畝間 100cm，株

間 30cm で定植した。

中国では畝間 30cm, 株間 20cm で定植されているが (倪ら 2015 b), 畝間の中耕管理は行われないため, 畝間や株間はなくなり, 圃場全面にシナマオウが生育している (図 2-1)。そのため, ジェネットの識別や除草管理が困難である。そこで, 機械による畝間の除草管理および個体識別を明確にするため, 畝間 100cm, 株間 30cm でジェネットを定植し (図 2-2), 畝間の中耕管理を行った。

前年に刈取りしなかった地上茎は木質化し (木質茎), 木質茎は異物となるので, 木質茎が混入しないようにするため, 2016 年 11 月に地上茎を株元から 5cm の部位で刈り取り, 地上茎を除去した。収穫前の植物体の様子を図 2-2 に示す。2017 年 10 月 17 日, 18 日, 24 日に, 実生 4 年生ジェネットの地上部を株元から 5cm の部位で収穫した。マオウ属植物では, 地上茎の伸長が停止してからエフェドリンアルカロイドの含有量が安定することが報告されている (梶村ら 1994) ため, これに準じて本研究では, シナマオウの地上茎の伸長が停止してから収穫した。

1-3. 加工調製と収量測定

採取した地上茎は乾燥機 (TB-60-F: 大紀産業, 日本) を用いて, 35℃で 72 時間, その後, 50℃で 4 時間乾燥した。乾燥した地上茎の質量を収量とした。収量測定後, 乾燥した地上茎を剪定鋏で 5mm の大きさに切裁した。

1-4. アルカロイド分析

上記の乾燥物をロッドミル (TI-100, CMT 株式会社, 日本) で 2 分間粉碎し, 粉末 0.245g ~0.254g に, $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=1:1$ を 20 mL 加え, 振とう機 (SR-1, タイテック株式会社, 日本) で 200 回/分の条件下, 30 分振とうした。振とう後, 3000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上澄液を回収した。上澄液回収後の残渣に $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=1:1$ を 20 mL 加え, 上記と同じ条件で振とう, 遠心後, 上澄液を回収した。2 回の上澄液を合わせ, $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=1:1$ で, 50 mL にメスアップした。定容後, 栓をして, メスフラスコを 20 回上下に攪拌し, サンプルを 0.45 μm フィルター (PTFE 13HP) を用いて, ろ過し, ろ液 1.0 mL をバイアルビンに分注し

た.

日局 17 に準じて HPLC (LC-10AD system : 株式会社島津製作所, 日本, カラム : Inertsil ODS-3, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm, ジーエルサイエンス株式会社, 日本) で, Eph 含有量及び PEph 含有量を測定し, TA 含有量を算出した. 使用した Eph と PEph の標準品は株式会社ツムラより提供された. 移動層は, H₂O : CH₃CN : H₃PO₄ = 650 : 350 : 1 にラウリル硫酸ナトリウム 5g/L を溶かしたものを使用した. カラム温度 40°C, 流量 1.1 mL, 分析時間 50 分, 測定波長 210 nm の条件下で HPLC を用いて分析した.

1-5. 統計解析

TA 含有量と収量の相関関係を評価するため, ピアソンの積率相関分析を行った. 相関分析は統計解析ソフトウェア R (version 3.5.0) を用いて行った.

2. ジェネットの遺伝的多様性の評価

2-1. 供試材料

株式会社ツムラの研究圃場 (北緯 35 度 99 分, 東経 140 度 19 分, 茨城県稲敷郡阿見町, 標高 26m, 黒ボク土) において, 本章 1-1. と同じ種子を用いて, 2011 年 6 月 22 日から 2012 年 5 月 11 日までのおよそ 1 年間育苗して実生苗を育成した. 育成した実生 2 年生ジェネットの中から無作為に 46 ジェネットを選び, 供試材料とした.

2-2. 栽培

基肥として, 完熟堆肥 2,000kg / 10a, IB 化成 S1 号 (N:P₂O₅:K₂O=10:10:10) 20kg / 10a を与えた株式会社ツムラの研究圃場 (北緯 35 度 99 分, 東経 140 度 19 分, 茨城県稲敷郡阿見町, 標高 26m, 黒ボク土) に, 2012 年 5 月 11 日に畝間 100cm, 株間 30cm で上記 46 ジェネットを定植した. 2013~2019 年の 3 月と 6 月に, それぞれ追肥として IB 化成 S1 号

(N:P₂O₅:K₂O=10:10:10) 20kg / 10a を与えた.

第 3 章第 1 節にて, 実生 2~8 年生のジェネットにおける TA 含有量および収量を評価するため, 上記 46 ジェネットを供試材料として用いた (第 3 章第 1 節参照).

2-3. EST-SSR マーカーによる遺伝子型評価

Jiao *et al.* (2019) の方法に準じて蛍光フラグメント解析を実施した. 2019 年 8 月 7 日に実生 9 年生の 46 ジェネットからそれぞれ地上茎を採取し, DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Germany) を用いて DNA を抽出した. 抽出した DNA 46 検体について, 8 種類のユニバーサル蛍光標識プライマー (表 2-1) を使用して PCR を行い, 蛍光フラグメントアナライザー ABI3730xl (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて電気泳動を行った. DNA 型は GeneMarker プログラム (SoftGenetics, USA) を用いて判定した. GeneMarker プログラムによる DNA 型の判定では, Jiao *et al.* (2019) が用いた各マーカーの Allele size にプライマーに付加したユニバーサル配列約 28 塩基を加えた増幅サイズの範囲で, 蛍光強度が 100 以上を目安としてピークの判定を行った. DNA 型を元に 46 ジェネットの遺伝子型を評価した.

結果

1. ジェネットの TA 含有量および収量の評価

1003 ジェネットの TA 含有量の変異幅は 0.8~20.1 mg/g DW と大きく, 集団中の TA 含有量は多様であった (図 2-3). また, 日局 17 の規格値である TA 含有量 7.0 mg/g DW 以上のジェネット数は 620 で全体の 61.8%であり, 目標値である TA 含有量 13.0 mg/g DW 以上のジェネット数は 84 で全体の 8.4%であった (図 2-3). 1003 ジェネットの TA 含有量の平均値は 8.2 ± 3.6 mg/g DW と日局 17 の規格値を超えるものの標準偏差が大きかった.

1003 ジェネットの収量の平均値は 18.9 ± 13.5 g であった. ジェネットの収量の変異幅は

1.8～96.4g であった (図 2-4). 最も多い分布域は 9.0～12.0g であり, ジェネット数は 169 であった (図 2-4). この 9.0～12.0g の分布域を境に, 収量が高くなるにつれてジェネットの割合は減少した (図 2-4).

ジェネットの TA 含有量と収量との間の相関係数は-0.06 と低く, 有意な相関関係は認められなかった. TA 含有量が目標値である 13.0 mg/g DW 以上のジェネットでは, 収量が 4.4～53.1g と変異幅が大きく, その中には, TA 含有量および収量ともに高いジェネットである, TA 含有量 13.3mg/g DW, 収量 47.5g のジェネット, TA 含有量 14.6mg/g DW, 収量 45.0g のジェネット, TA 含有量 16.7mg/g DW, 収量 53.1g のジェネット, TA 含有量 20.1mg/g DW, 収量 45.2g のジェネットが認められた (図 2-5).

2. ジェネットの遺伝的多様性の評価

8 種類の EST-SSR マーカー遺伝子座 (表 2-1) は 46 ジェネットに対して, E-20 の対立遺伝子数は 3 (163bp, 173bp, 176bp), E-33 の対立遺伝子数は 8 (249bp, 251bp, 253bp, 254bp, 255bp, 258bp, 259bp, 262bp), E-35 の対立遺伝子数は 2 (187bp, 196bp), E-49 の対立遺伝子数は 6 (183bp, 186bp, 189bp, 192bp, 226bp, 229bp), E-59 の対立遺伝子数は 5 (213bp, 215bp, 218bp, 221bp, 227bp), E-62 の対立遺伝子数は 6 (225bp, 230bp, 231bp, 234bp, 238bp, 239bp), E-71 の対立遺伝子数は 11 (253bp, 256bp, 260bp, 261bp, 262bp, 263bp, 264bp, 265bp, 266bp, 271bp, 277bp), E-83 の対立遺伝子数は 2 (261bp, 264bp) であった (表 2-2).

各 EST-SSR マーカーの遺伝子型は, E-20 が 3 種類 (A 型～C 型), E-33 が 8 種類 (A～H 型), E-35 が 2 種類 (A～B 型), E-49 が 6 種類 (A～F 型), E-59 が 10 種類 (A～J 型), E-62 が 7 種類 (A～G 型), E-71 が 16 種類 (A～P 型), E-83 が 2 種類 (A～B 型) であった. 遺伝子型に基づいて 46 ジェネットを分類した (表 2-3). その結果, #8 と#9, #11 と#50, #38 と#40 の 3 組がそれぞれ同じタイプに分類されたが, 他のジェネットはすべて異なっていた (表 2-3).

考察

実生 4 年生における 1,003 ジェネットの TA 含有量の平均値は日局 17 の規格値 (7.0 mg/g DW) を超えたものの、標準偏差が大きく、目標値である 13.0 mg/g DW よりも下回っており、選抜をせずに栽培した場合、麻黄の TA 含有量が日局 17 の規格値も下回る恐れがある。シナマオウの TA 含有量は種内変動が 3.2~23.4 mg/g DW と大きいと報告されているが (Hong *et al.* 2011), 本章での結果も 0.8~20.1 mg/g DW と変異幅が大きく、報告と一致しており、シナマオウの TA 含有量は変異幅が大きいことが考えられる (図 2-3)。また、目標値である TA 含有量 13.0 mg/g DW 以上のジェネットは集団中に 8.4% (84 ジェネット) 存在したことから、これらのジェネットは、今後のシナマオウの育種母材となりうる。

これまでの研究より、マオウのエフェドリンアルカロイド含有量は遺伝要因に左右されていることが報告されており (御影 2012), 大きい変異幅の中から目標値である 13.0 mg/g DW 以上の TA 含有量が高いジェネットを選抜することにより、TA 含有量を高めることができる可能性がある。さらに、シナマオウは雌雄異株で開花が不安定であるため、現状では、目的のジェネット同士を交配し、種子を得ることは難しいが、ストロンや挿し木を用いた栄養繁殖により増殖することは可能である。したがって、TA 含有量が高いジェネットを選抜し、その選抜したジェネットを栄養繁殖し、クローン系統を育成することが、シナマオウ TA 含有量を高める育種戦略として考えられる。

ジェネットの収量の分布域は 1.8~96.4g であり、ジェネットの収量の変異幅が大きいことを明らかにした (図 2-4)。先行して石川県にて国内初の麻黄が生産され、2000 株で 400kg であった (北國新聞 2020)。ジェネットあたりの平均収量は推定 200g であり、この値は本章の結果よりも高い。しかしながら、年生が定かではないため、本章の結果と比較することは難しい。また、中国では TA 含有量が低いため、麻黄は実生 5 年生以降のシナマオウから作られているが (倪ら 2015 b), 年生ごとの収量評価は行われていない。詳細な収量を把握するためには、本章の結果に加えて、年生による収量の変動を評価する必要がある。

シナマオウの TA 含有量と収量には有意な相関関係が認められなかったものの、目標値である TA 含有量 13.0 mg/g DW 以上の 84 ジェネットは収量の変異幅が大きく、4.4~53.1g であった (図 2-5)。供試した 1003 ジェネットには、TA 含有量と収量性がともに高いジェネットがあり、今後の育種材料として有望であることが明らかとなった。

本章で使用した 46 ジェネットを EST-SSR マーカーの遺伝子型により分類した結果、同一遺伝子型を示したジェネットは 3 組しか認められず、遺伝的に多様であり（表 2-3）、保有する遺伝資源は、遺伝的多様性を保持した集団であるといえる。また、核 18S rRNA 遺伝子や葉緑体 *trnk* 遺伝子領域を用いた自生地 of シナマオウの多様性評価が行われている（Kitani *et al.* 2009）。その結果では、シナマオウの遺伝的多様性が高く保持されていることが確認されており（Kitani *et al.* 2009）、本研究の結果と一致する。さらに、シナマオウは雌雄異株であり（岡田 2002）、 $2n=4x=28$ の異質四倍体（Wu *et al.* 2009）、ゲノムサイズが 17.26~17.73pg (1c/value) と巨大であることが報告されており（Ickert-Bonda *et al.* 2020）、シナマオウは遺伝的多様性が高く保存された植物であることが考えられる。

本章では、保有する遺伝資源の育種材料としての適性について評価することができた。本章にて供試した遺伝資源の中には目標値である TA 含有量 13.0 mg/g DW 以上のジェネットが存在し、TA 含有量および収量の変異がともに大きく、遺伝的多様性を保持した集団であることから、育種素材として適していることがわかった。

シナマオウの生薬部位である地上茎は毎年収穫されており、経年での評価が必要であるものの、TA 含有量に関する経年での評価は少なく（Matsumoto *et al.* 2015）、収量に関しては報告されていない。また、日本での麻黄の生産に向けて、シナマオウの TA 含有量および収量性の経年での安定性、環境要因や遺伝要因の影響を把握することも必要である。



図 2-1. 中国内蒙古自治区杭锦旗におけるシナマオウの栽培地（撮影：2014 年 9 月）

実生 3 年生のときに株間 20 cm，畝間 30～50 cm で定植された実生 18 年生のシナマオウ。



図 2-2. 実生 4 年生シナマオウのジェネット (撮影 : 2017 年 8 月)

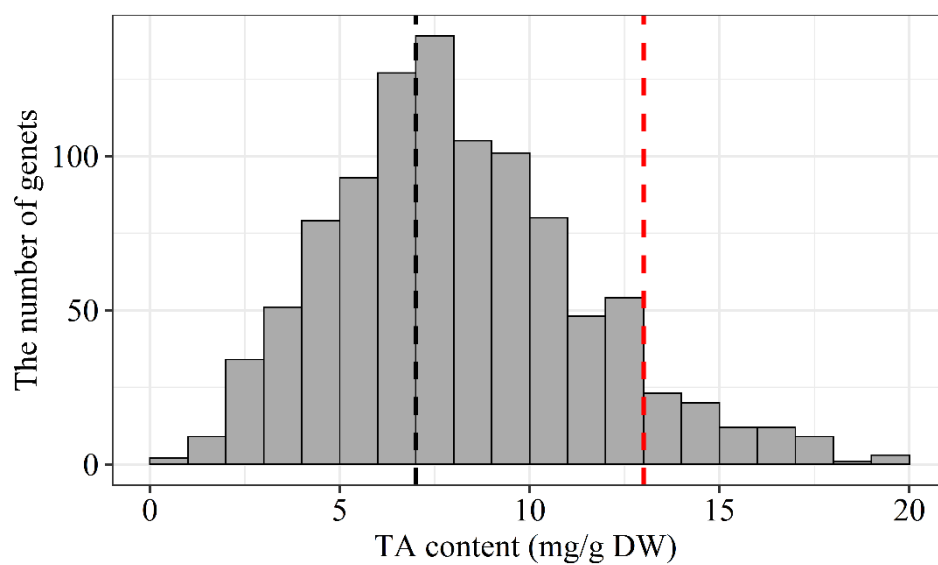


図 2-3. 実生 4 年生シナマオウ 1003 ジェネットにおける TA 含有量の分布

ヒストグラムの幅は 1.0 mg/g DW. 黒点線 : TA 含有量 7.0 mg/g DW (日局 17 の規格値), 赤点線 : TA 含有量 13.0 mg/g DW (育種目標値).

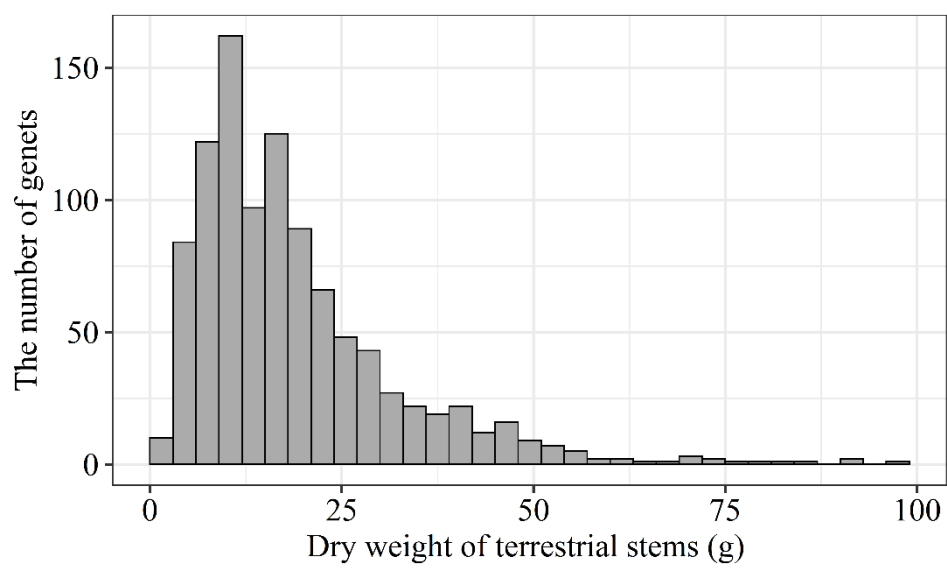


図 2-4. 実生 4 年生シナマオウ 1003 ジェネットにおける収量の分布
ヒストグラムの幅は 3.0g.

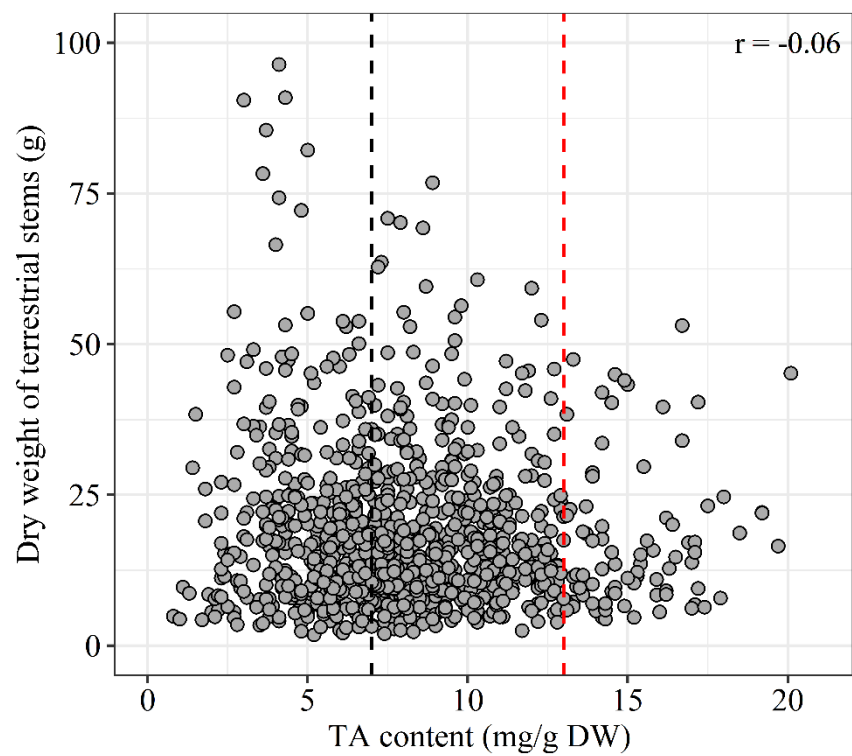


図 2-5. 実生 4 年生シナマオウ 1003 ジェネットの TA 含有量と収量の相関

黒点線 : TA 含有量 7.0 mg/g DW (日局 17 の規格値), 赤点線 : TA 含有量 13.0 mg/g DW (育種目標値), r : ピアソンの積率相関係数.

表 2-1. EST-SSR マーカーのプライマーセット

Locus	Primer sequences (5'–3')
E-20	f_U: GCTACGGACTGACCTCGGACGATTAGGTGGAAAGCAAGCG r_pig: GTTTCCTTATCCAACCCGATCATGTACC
E-33	f_U: GCTACGGACTGACCTCGGACTTGATGATGTCTGTAGCGGC r_pig: GTTTCCTTAGTGGCAGAAGTGTTGGCTT
E-35	f_U: GCTACGGACTGACCTCGGACGGTGTTTCAGATGCGATTCA r_pig: GTTTCCTTATCGTTGATCCTCTTGCGAT
E-49	f_U: GCTACGGACTGACCTCGGACCCCTTGAGGCGCTTTATTTCAG r_pig: GTTTCCTTCGCAAGATCGAAATACCCAT
E-59	f_U: GCTACGGACTGACCTCGGACGGATCCAAGATCTGGAAGGAG r_pig: GTTTCCTTAAGCCCATGTCATCATCCAT
E-62	f_U: GCTACGGACTGACCTCGGACTGAATAGAAGCTGGCTGGGT r_pig: GTTTCCTTTTGGCTGGTTCTGTCTGATG
E-71	f_U: GCTACGGACTGACCTCGGACAAAGCGTGCAAGACGAGTTT r_pig: GTTTCCTTTCCTCTTCCTCTCCACCTCA
E-83	f_U: GCTACGGACTGACCTCGGACGTCATGTCATGCTCACCGAC r_pig: GTTTCCTTGCGACTTCTCATTGCTCTCC

f_U : 蛍光色素を付与するためのユニバーサル配列 (GCTACGGACTGACCTCGGAC) 付き
Fw プライマー, r_pig : ピグテイル配列 (GTTTCCTT) 付きの Rv プライマー.

表 2-2. 8 種類の EST-SSR マーカースの特性

Locus	The number of allele	Allele size range (bp)
E-20	3	163-176
E-33	8	249-262
E-35	2	187-196
E-49	6	183-229
E-59	5	213-227
E-62	6	225-239
E-71	11	253-277
E-83	2	261-264

表 2-3. EST-SSR マーカーの遺伝子型を用いた 46 ジェネットの分類結果

Genets	E20	E33	E35	E49	E59	E62	E71	E83	
#1	A	E	B	E	J	G	J	B	
#2	C	E	B	C	J	G	E	B	
#3	C	E	B	C	B	G	E	B	
#4	C	G	B	C	F	D	E	A	
#5	C	E	B	A	D	G	I	B	
#6	B	E	B	E	B	G	E	B	
#8	C	E	B	E	F	G	O	B	α
#9	C	E	B	E	F	G	O	B	α
#10	C	B	B	B	B	G	L	B	
#11	C	E	B	E	B	G	E	B	β
#12	C	E	A	E	F	G	D	B	
#13	C	C	A	C	F	G	E	B	
#14	C	A	B	E	E	G	O	B	
#15	C	H	B	E	F	B	O	B	
#16	C	C	B	E	B	G	B	B	
#17	C	D	B	E	B	G	E	B	
#18	C	E	A	E	J	F	F	B	
#19	C	E	B	E	J	G	E	B	
#20	C	E	B	A	F	G	O	B	
#21	C	E	B	E	B	G	O	B	
#22	C	C	B	E	F	A	N	B	
#23	C	C	B	E	F	G	M	B	
#24	C	C	B	E	F	G	H	B	
#25	C	E	B	E	I	F	G	B	
#26	C	C	B	E	B	G	O	A	
#27	C	E	B	E	G	F	O	B	
#28	C	E	B	E	F	G	A	B	
#29	C	E	B	E	F	G	E	B	
#30	C	E	B	E	D	G	O	B	
#31	B	C	B	A	C	G	E	B	
#32	C	C	B	E	F	E	O	B	
#33	C	E	B	F	F	E	O	B	
#34	C	E	B	D	F	E	O	B	
#35	C	E	B	E	H	C	E	B	
#36	C	F	B	C	B	G	O	B	
#37	C	E	B	A	B	G	P	B	
#38	C	E	B	E	F	E	O	B	γ
#40	C	E	B	E	F	E	O	B	γ
#41	C	C	B	E	B	E	E	B	
#42	C	E	B	E	C	G	A	B	
#43	C	E	B	E	G	G	E	B	
#44	C	E	B	E	J	G	C	B	
#45	C	E	B	E	A	G	K	B	
#46	C	E	B	E	C	G	O	B	
#47	C	NA	B	E	F	E	O	B	
#50	C	E	B	E	B	G	E	B	β

NA:欠損値, アルファベット:各 EST-SSR の遺伝子型, α , β , γ :各々同じ種類を示す.

第3章

日本におけるシナマオウ総アルカロイド含有量の選抜育種の検証

緒言

これまでに行われているシナマオウの TA 含有量に関する研究では、自生地における含有量の変異幅が大きいこと (Wang *et al.* 2010), 遺伝要因による影響を受けること (御影 2012) が報告されている。中国で栽培された麻黄はこれまでに市場流通していた野生採取の麻黄よりも TA 含有量が低いことが課題となっており (御影 2013), 生薬の品質への影響が懸念される。漢方製剤を構成する生薬の品質が変わることは、漢方製剤の有効性や薬効への影響が考えられ、大きな問題である。したがって、これまでに市場流通していた野生採取品と同程度に高い TA 含有量を有する麻黄が求められており、育種によって TA 含有量を高めることが重要な課題である。

一方で、自生地では TA 含有量が環境要因の影響を受けて変動しており (Wang *et al.* 2010, 御影 2012), マオウ属植物では、土壌 pH が高く、降水量が少ない方が TA 含有量は高くなると報告されている (Kondo *et al.* 1999, Wang *et al.* 2010)。シナマオウの自生地や栽培地がある内蒙古自治区は、温帯大陸性乾燥気候帯に属し、日本の気候とは大きく異なる。日本でもシナマオウの栽培研究が行われているものの (大富ら 2013, Matsumoto *et al.* 2015, 安藤ら 2016, 2020, 御影ら 2019 a, 2019 b), 育種を行う上で重要となる遺伝率や G×E 交互作用に関する報告はされておらず、日本の栽培地における TA 含有量への環境要因や遺伝要因の影響について詳細は明らかになっていない。したがって、日本で栽培や育種を行うためには、日本の栽培環境に対し、TA 含有量がどのような応答を示すのか、また、TA 含有量に対して遺伝要因がどのくらい影響するのか調査する必要がある。

中国の栽培地では、シナマオウは種子を用いて栽培されており、実生 5 年生の夏から秋にかけて収穫された地上茎が初めて生薬として使用され、以後、毎年収穫が行われている (Mikage and Kakiuchi 2005)。日本におけるシナマオウの生産も毎年収穫することが想定されるため、麻黄の安定生産やシナマオウの育種にとって、TA 含有量および収量の経年変動を把握し、経年での安定性を評価することは重要である。

また、生産や育種を行っていくためには種苗の増殖方法を検討する必要がある。シナマオウ

ウの繁殖方法として、種子繁殖（御影 2013, 倪ら 2020）、栄養繁殖として挿し木法（野村ら 2013, 2015, 倪ら 2015 a, 2017, 2018 a）およびストロンによる増殖（野村ら 2013, 御影ら 2019 b）がある。シナマオウは雌雄異株であり（岡田 2002）、株によって開花が不安定であることから、特定のジェネットの組み合わせを交配して種子を得ることは難しく、組織培養法もまだ確立されていない（吉松 2018）。一方で、挿し木法（野村ら 2013, 野村ら 2015, 倪ら 2015 a, 倪ら 2017, 倪ら 2018 a）やストロンによる増殖（図 3-1）（野村ら 2013, 御影ら 2019 b）を用いた栄養繁殖が可能であり、増殖に時間を要するもののクローンを得ることはできる。挿し木法については、発根率に個体差があり、全く発根しない株もあることが報告されており（倪ら 2018 a）、選抜したジェネットが増殖できない恐れがある。一方、ストロンは個体によりストロンの数が異なるものの、ストロンによる増殖は親株から地上茎の付いたストロンを採取し、これを定植することで行える。現状では、ストロンを用いた増殖法は安定してクローン系統を増やすことができる重要な繁殖法である。しかしながら、これまでにストロンを用いた栄養繁殖による TA 含有量の再現性の評価が行われていない。

そこで本章では、第 1 節にて、ジェネットおよびストロンを用いて栄養繁殖したクローン系統の TA 含有量と収量について経年での安定性を評価するため、まず第 2 章で育成した 46 ジェネットについて、7 年間 TA 含有量と収量を評価した。次に 46 ジェネットのうち、TA が高含有量の 3 ジェネットをストロンよりクローン増殖し、そのクローン系統を 5 年間栽培し、クローン系統の TA 含有量と収量を評価し、クローン系統における再現性について検証した。

第 2 節では、日本の環境におけるシナマオウの栽培地の評価および TA の高含有量に対する選抜効果を検証した。試験地は、日本の異なる 3 地域を選定した。選定した 3 地域は、高緯度に位置し、中国の栽培地と同緯度に位置する北海道、低緯度に位置する沖縄、北海道と沖縄の中間に位置する関東甲信東海である。試験地として、北海道から恵庭、豊浦、大樹の 3 試験地、関東甲信東海から茨城、山梨、静岡の 3 試験地、沖縄からうるま（以下、沖縄）の 1 試験地、計 7 試験地を選定した。茨城で育成した 333 ジェネットをそれら 7 試験地へ無作為に約 50 ジェネットずつ選んで配布し、各栽培地の TA 含有量および収量を評価した。続いて、各試験地にて TA 含有量が上位 10%のジェネットおよびその対照区として上位 30～70%のジェネットからそれぞれ 4 ジェネットずつ無作為に選抜し、その後、茨城へ移植し、同一環境下にて、各地で選抜したジェネットの TA の高含有量に対する選抜の効果を検証し

た.

第3節では、TAの遺伝要因と環境要因の影響を評価するため、第1節および第2節の結果に基づいて、第1節で評価したジェネットよりストロンを用いて4つのクローン系統を作出し、関東甲信東海の3試験地（茨城，山梨，静岡）にそれぞれ定植し、定植2年目および定植3年目のTA含有量を評価し、G×E交互作用および広義の遺伝率を推定した。

第1節 ジェネットおよびクローンの総アルカロイド含有量と収量の経年評価

材料および方法

1-1. 茨城における46ジェネットのTA含有量および収量の経年評価

1-1-1. 供試材料

第2章の材料および方法2-1.にて育成した46ジェネットを供試材料とした。

1-1-2. 栽培

第2章2-1.の材料で用いた46ジェネットを第2章2-2.の方法で栽培した（第2章2-2.参照）。

毎年、シナマオウの地上茎の伸長が停止したことを確認し、下記の日に地上茎を株元から5cmの部位で刈り取り、収穫した。当年以外の地上茎が混入しないようにするため、前年から残存している地上茎は除去した。実生2～8年生のTA含有量および収量を評価するため、2012年10月11日（実生2年生）、2013年8月21日（実生3年生）、2014年9月19日（実生4年生）、2015年10月27日（実生5年生）、2016年10月11日（実生6年生）、2017年9月12日（実生7年生）、2018年7月14日（実生8年生）にそれぞれ収穫した。

1-1-3. 加工調製と収量評価

第2章の材料および方法1-3.に従い、シナマオウの加工調製および収量評価を行った。

1-1-4. アルカロイド分析

第2章の材料および方法1-4.に従い、エフェドリンアルカロイドを定量した。

1-1-5. 分類

各ジェネットの 7 年分の TA 含有量の平均値（実生 2～8 年生）を元に、TA 含有量の平均値が上位 15%のジェネットを TA 高含有量型（High）、平均値が下位 15%のジェネットを TA 低含有量型（Low）、TA 高含有量型および TA 低含有量型に属さないジェネットを TA 中含有量型（Middle）と定義して分類した。

1-1-6. 統計解析

TA 含有量と収量との相関性を評価するため、ピアソンの積率相関分析を行った。TA 含有量および収量の経年変動を評価するため、分散分析および Tukey-Kramer 法を用いた。また、TA 含有量と収量の安定性を評価するため、各 7 年分のデータについてスピアマンの順位相関分析を行った。これらの統計解析は統計解析ソフトウェア R (version 3.5.0)を用いて行った。

1-2. 茨城における選抜ジェネットクローンの TA 含有量および収量の経年評価

1-2-1. 供試材料

選抜によるシナマオウの TA の高含有量化とクローンによる TA 含有量の再現性を評価するため、本節 1-1.にて評価した 46 ジェネットの中から 3 ジェネット（#2, #19, #26）を選抜し、2014 年 6 月 19 日に各ジェネットからストロンを採取して供試材料とした。選抜の判断基準は、2014 年 6 月 19 日時点で、栄養繁殖するのに必要なストロンを 8 本以上有し、実生 3 年生の TA 含有量が上位 3 のジェネットである。

1-2-2. ストロンを用いた栄養繁殖法

2014 年 6 月 19 日にストロンを採取するジェネット付近の土壌を掘り、ジェネットにつな

がっているストロンを切除して採取し、ストロン株（クローン）として、同日に定植した（図 3-1）。

1-2-3. 栽培

基肥として、2014 年 6 月 18 日に株式会社ツムラの研究圃場（北緯 35 度 99 分，東経 140 度 19 分，茨城県稲敷郡阿見町，標高 26m，黒ボク土）へ完熟堆肥 2,000kg/10a，IB 化成 S1 号（N:P₂O₅:K₂O=10:10:10）20kg / 10a を与えた。TA 高含有量型の 3 ジェネット（#2，#19，#26）より採取したストロン株は各由来ジェネットごとに，畝間 100cm，株間 30cm で上記圃場へ定植した。定植株数はそれぞれ 9，14，8 株（#2，#19，#26）であるが，定植してから活着するまでの 2 カ月間で枯死した株および栽培の途中で枯死した株を除き，5，5，4 株（#2，#19，#26）についてのみ評価した。2014 年 11 月 19 日（定植 1 年生），2015 年 8 月 4 日（定植 2 年生），2016 年 8 月 3 日（定植 3 年生），2017 年 9 月 12 日（定植 4 年生）2018 年 7 月 14 日（定植 5 年生）にそれぞれ収穫した。

1-2-4. 加工調製と収量評価

第 2 章の材料および方法 1-3.に従い，シナマオウの加工調製および収量評価を行った。

1-2-5. アルカロイド分析

第 2 章の材料および方法 1-4.に従い，エフェドリンアルカロイドを定量した。

1-2-6. 統計解析

TA 含有量および収量性の経年変動の評価は本節 1-1-6.に従い，解析した。

結果

1-1. 茨城における 46 ジェネットの TA 含有量および収量の経年評価

46 ジェネットを用いて、実生 2 年生から 8 年生までの 7 年間ににおける TA 含有量および収量について調査した（表 3-1, 2, 図 3-2, 3, 4）. 各年生におけるジェネットあたりの TA 含有量の平均値および標準偏差は、実生 2 年生が 6.4 ± 2.8 mg/g DW（2012 年）、3 年生が 7.6 ± 2.9 mg/g DW（2013 年）、4 年生が 7.3 ± 3.0 mg/g DW（2014 年）、5 年生が 6.9 ± 3.4 mg/g DW（2015 年）、6 年生が 7.6 ± 3.4 mg/g DW（2016 年）、7 年生が 7.6 ± 3.3 mg/g DW（2017 年）、8 年生が 7.7 ± 3.3 mg/g DW（2018 年）であった（表 3-1）. 標準偏差が大きく、実生 2 年生（2012 年）と実生 5 年生（2015 年）以外は日局 17 の規格値である 7.0 mg/g DW を超えた（表 3-1）. また、46 ジェネットの TA 含有量の平均値は、年生間に有意な差は認められなかった（図 3-2）. ジェネット間を比較すると、TA 含有量の差は大きく、各年生における TA 含有量が最大となるジェネットと最小となるジェネット間における TA 含有量の差は 12.4（実生 2 年生）、13.2（実生 3 年生）、12.6（実生 4 年生）、14.7（実生 5 年生）、15.6（実生 6 年生）、14.3（実生 7 年生）、14.3（実生 8 年生）であった（表 3-1）. 一方で、各ジェネットにおける TA 含有量は、7 年間の経年変動が小さく、各ジェネットにおける 7 年間の TA 含有量の最大値と最小値の差は 1.2～11.5 であった（図 3-3, 表 3-1）. 各ジェネットにおける 7 年間の TA 含有量の平均値を指標として、46 ジェネットを分類し、分類したジェネットから育成したクローンを第 3 章第 1-2 節および 3 節の供試材料として用いた. 続いて、ジェネットにおける TA 含有量の年生間の安定性を評価するため、TA 含有量の年生間での順位相関を解析した. 実生 2 年生の TA 含有量は実生 3～8 年生の TA 含有量に対して順位相関係数が低かったものの（ $\rho = 0.43 \sim 0.57$ ）、実生 3～7 年生の TA 含有量は実生 4～8 年生の TA 含有量に対して順位相関係数が高かった（ $\rho = 0.85 \sim 0.94$ ）（表 3-3）. また、46 ジェネットのうち 7 年間、目標値である TA 含有量 13.0 mg/g DW を超えたジェネットは 1 ジェネットのみであった（表 3-1）.

各年生におけるジェネットの収量の平均値および標準偏差は、実生 2 年生が 2.8 ± 1.8 g（2012 年）、3 年生が 43.1 ± 31.1 g（2013 年）、4 年生が 86.5 ± 55.5 g（2014 年）、5 年生が 102.0 ± 51.2 g（2015 年）、6 年生が 58.4 ± 32.2 g（2016 年）、7 年生が 77.5 ± 28.5 g（2017 年）、

8 年生が 89.4 ± 36.6 g (2018 年) であった (表 3-2)。標準偏差が大きく、実生 2 年生から 4 年生まで収量の平均値は有意に増加し、6 年生で減少したものの、7 年生の収量の平均値は 4 年生の収量の平均値と同程度になり、8 年生の平均収量も 7 年生の平均収量と同程度となった (図 3-2)。実生 2 年生を除く、実生 3～8 年生におけるジェネットの収量はジェネット間の差が大きく、各年生で収量が最大値となるジェネットと収量が最小値となるジェネットの収量の差は、それぞれ 7.8 (実生 2 年生), 139.1 (実生 3 年生), 244.0 (実生 4 年生), 226.4 (実生 5 年生), 152.1 (実生 6 年生), 117.2 (実生 7 年生), 165.6 (実生 8 年生) であった (表 3-2)。また、各ジェネットにおける収量の 7 年間の経年変動も大きく、46 ジェネットにおける 7 生間の収量の最大値と最小値の差は、44.0～257.0 であった (図 3-4, 表 3-2)。続いて、ジェネットの収量の年生間の安定性を評価するため、ジェネットの収量の年生間における順位相関を解析した。順位相関は実生 3 年生と 4 年生との順位相関 ($\rho = 0.49$) を除くと実生 2 年生と 3 年生 ($\rho = 0.74$)、実生 4 年生と 5 年生 ($\rho = 0.73$) 実生 5 年生と 6 年生 ($\rho = 0.73$)、実生 6 年生と 7 年生 ($\rho = 0.75$)、実生 7 年生と 8 年生 ($\rho = 0.80$) と次年生の収量との順位相関は高いものの、実生 2 年生と 4～8 年生、実生 3 年生と 6～8 年生、実生 4 年生と 6～8 年生の順位相関は低かった ($\rho = 0.28 \sim 0.54$) (表 3-4)。実生 5～7 年生の収量は実生 6～8 年生の収量との順位相関が高かった ($\rho = 0.66 \sim 0.80$) (表 3-4)。

実生 2～8 年生におけるジェネットの TA 含有量と収量との相関関係はそれぞれ $r = 0.04$ (実生 2 年生, ns), -0.18 (実生 3 年生, ns), -0.28 (実生 4 年生, ns), -0.31 (実生 5 年生, $p < 0.05$), -0.23 (実生 6 年生, ns), -0.08 (実生 7 年生, ns), -0.22 (実生 8 年生, ns) であり、低かった (図 3-5)。一方で、#38 のジェネットのように収量と TA 含有量がともに高いジェネットも認められた (表 3-1, 図 3-5)。

1-2. 茨城における選抜ジェネットクローンの TA 含有量および収量の経年評価

TA 高含有量型 3 ジェネット (#2, #19, #26) のクローンを用いて、茨城における TA 含有量および収量を 5 年間評価した (表 3-5)。各系統におけるストロン株の活着率は、系統#2 が 55.6%、系統#19 が 50.0%、系統#26 が 87.5% であった。

系統#2 および系統#26 の TA 含有量の平均値は、定植 1 年生では有意に低かったものの ($p < 0.05$)、定植 2 年生以降は有意な差は認められなかった (表 3-5, 図 3-6)。系統#19 の

TA 含有量の平均値は定植 1 年生では有意に低く、定植 1～2 年生、定植 4～5 年生で有意に増加した ($p < 0.05$) (表 3-5, 図 3-6). また、各系統の TA 含有量の平均値は、定植 2 年生で各由来ジェネットの TA 含有量と同程度になった (ジェネット#2 : 10.3 ± 0.5 mg/g DW, ジェネット#19 : 14.9 ± 1.7 mg/g DW, ジェネット#26 : 12.2 ± 3.0 mg/g DW) (表 3-1, 表 3-5).

クローン系統の平均収量は、各由来ジェネットともに定植 4 年生まで有意に上昇し、定植 4 年生と定植 5 年生との間には有意な差が認められなかった (図 3-7). 各系統のクローン間の変動幅が大きく、由来ジェネットよりも平均収量が低い傾向であった (表 3-2, 表 3-6).

考察

茨城における 46 ジェネットの TA 含有量の平均値は、実生 2 年生から 8 年生まで安定しており (図 3-2, 表 3-1), TA 含有量の経年変動は小さく、TA 含有量の平均値は実生 2 年生で安定することがわかった. 一方で、46 ジェネットの TA 含有量の平均値は低く (表 3-1), 日局 17 の規格値 (7.0 mg/g DW) を超えた年生が多かったものの、一部の年生で日局 17 の規格値を超えなかった (図 3-2, 表 3-1). また、第 1 章で述べた TA 含有量の目標値は 13.0 mg/g DW であるが、今回の 46 ジェネットの平均値は目標値と比べて低く、TA 含有量 13.0 mg/g DW 以上の麻黄を日本で生産するためには、育種による TA の高含有量化および安定化が必要であることが示唆された.

ジェネットの TA 含有量については、ジェネット間の差は大きいものの、ジェネットの経年変動が小さいことから (図 3-3), ジェネット選抜による TA の高含有量化や安定化が期待できる. 本節での 46 ジェネットの TA 含有量の変異幅が大きいことは、第 2 章における 1003 ジェネットの結果や Wang *et al.* (2010) の報告と一致する. また、46 ジェネットの TA 含有量の順位相関解析の結果より (表 3-3), 実生 3 年生以降におけるジェネット間の順位変動が小さいことを示唆しており、実生 3 年生以降の TA 含有量でジェネットを評価し、選抜することができる.

さらに、選抜したジェネットより育成したクローン系統の TA 含有量は、定植 2 年生で由来ジェネットの TA 含有量と同程度になっており (表 3-1, 表 3-5), クローンによる再現性

が得られたことを示唆している。したがって、TA 含有量が高いジェネットを選抜し、ストロンによる栄養繁殖を行うことで TA を高含有量かつ安定化させることができる。

本節では、各系統のクローンの活着率は 50.0～87.5%であったが、その後、栽培の途中で枯死する株があった。この原因として、クローン数を得るため、地上茎が小さいストロン株も用いたことが考えられる。安定してクローン数を増やすには、親株となるジェネットを大きくし、採取するストロン株を増やすことを検討する必要がある。また、採取時期によって活着率が 28.8～77.5%と異なることが報告されており（御影 2019b）、ストロン株の採取時期を考慮する必要もある。

本節は、同一環境下でのジェネットの選抜とクローン再現性の検証であり、異なる選抜地におけるジェネットの選抜に対して効果があるのか、異なる環境下においてクローンが環境の影響を受けるのかを検証する必要がある。

46 ジェネットの平均収量は実生 2 年生から 4 年生まで有意に増加しており、実生 5 年生における平均収量と実生 4 年生における平均収量との間には有意な差が認められなかった（図 3-2, 表 3-2）。これは、実生 4 年生で平均収量が安定することを示唆しており、実生 4 年生でジェネットあたりの平均収量を評価できると考えられる。本研究では、実生 6 年生（2016 年）の平均収量が一時的に減少したが、この詳細な要因は明らかにできなかったが、2016 年の環境の影響を受けて、一時的に収量が低下したものと推測される。

ジェネットの収量はジェネット間差が大きく、経年変動も大きいものの（表 3-2）、年生間の順位相関解析の結果より、実生 5 年生以降におけるジェネット間の順位変動は小さく、安定していることを示しており（表 3-4）、ジェネットの選抜による高収量化が期待できる。

選抜したジェネットより育成したクローン系統の平均収量は、各系統ともに定植 4 年生まで有意に上昇し、定植 4 年生と定植 5 年生との間には差が認められず（図 3-7, 表 3-6）、ジェネットの収量の経年変動も同じ傾向を示していた。しかしながら、各系統のクローン間の変動幅が大きく、由来ジェネットよりも平均収量が低い傾向であり（表 3-2, 表 3-6）、系統内の収量のばらつきが大きかった。この要因として、採取時のストロン株の大きさが均一ではなかったことが考えられ、その影響で由来ジェネットより低い傾向を示した可能性がある。

実生2年生から8年生までの7年間、ジェネットにおけるTA含有量と収量との相関関係を評価したが、相関係数はすべて低く、実生5年生以外はすべて有意な相関はなかった（図3-5）。また、#38は収量およびTA含有量が安定している実生5年生のTA含有量が11.8mg/g DW、収量が172.6gとTA含有量と収量がともに高いジェネットであり（表3-1，表3-2），このようにTA含有量が高く収量も高いジェネットが存在することから，TA含有量が高く収量も高いジェネットが選抜できる可能性を示唆している。

第2節 栽培地における評価と総アルカロイド含有量に対する選抜効果の検証

材料および方法

2-1. 供試材料

第2章の材料および方法 1-1. で用いた *Ephedra sinica* Stapf (シナマオウ) の種子を供試した。株式会社ツムラの研究圃場(北緯 35 度 99 分, 東経 140 度 19 分, 茨城県稲敷郡阿見町, 標高 26m, 黒ボク土)にて, 基肥として完熟堆肥 2,000kg / 10a, IB 化成 S1 号 (N:P₂O₅:K₂O=10:10:10) 20kg / 10a を 2012 年 6 月 13 日に与え, 2012 年 6 月 14 日に上記種子を播種し, およそ 1 年間育苗して実生苗を育成した。育成した実生苗から無作為に 333 ジェネットを選び, 供試材料とした。

2-2. 各試験地での栽培

2-2-1. 試験地

中国の栽培地(内蒙古自治区)とは異なる気候である日本において, シナマオウの栽培地における評価および TA の高含有量に対する選抜の効果を検証した。

日本の気候の異なる 3 地域(北海道, 関東甲信東海, 沖縄)を選定し, その 3 地域から計 7 試験地を選定した。3 地域は, 中国栽培地と同緯度に位置する北海道, 日本の南に位置し, 平均気温が高く, 年間降水量も多く, 気温差が小さい沖縄, 北海道と沖縄の中間に位置し, 日本の平均的な年間降水量および平均気温を示し, 気温差が大きい関東甲信東海である。各地域内の試験地は標高や降水量および土壌の種類が異なる地点を選んだ。

試験地は, 北海道 恵庭(北緯 42 度 92 分, 東経 141 度 56 分, 標高 35m, 黒ボク土, 気象観測地点: 恵庭島松), 豊浦(北緯 42 度 65 分, 東経 140 度 66 分, 標高 210m, 黒ボク土, 気象観測地点: 大岸), 大樹(北緯 42 度 53 分, 東経 143 度 27 分, 標高 105m, 褐色森林土, 気象観測地点: 大樹), 茨城(北緯 35 度 99 分, 東経 140 度 19 分, 標高 26m, 黒ボク土, 気象観測地点: 龍ヶ崎), 山梨(北緯 35 度 78 分, 東経 138 度 32 分, 標高 674m, 黒ボク土,

気象観測地点：大泉），静岡（北緯 34 度 64 分，東経 138 度 11 分，標高 16m，低地土，気象観測地点：御前崎），沖縄（北緯 26 度 31 分，東経 127 度 95 分，標高 5m，低地土，気象観測地点：宮城島）である。

収穫の前年の地上茎を刈り取った 2013 年 10 月から 1 年間の気象庁の各気象観測地点データ（気象庁 2019）を元に年間降水量，年間最高気温，年間最低気温，年間平均気温を表 3-7 にまとめた。

2-2-2. 栽培方法

1 つの種子集団から 50 ジェネットずつを無作為抽出することで、標本のばらつきを代表していると仮定し、上記の育成した 333 ジェネットを無作為に約 50 ジェネットずつ選んだ。2013 年 3 月 21 日（沖縄，畝間 50cm），4 月 22 日（山梨，畝間 80cm），4 月 24 日（静岡，畝間 100cm），4 月 26 日（茨城，畝間 100cm），5 月 22 日（北海道 大樹，畝間 77cm）5 月 27 日（北海道 恵庭，畝間 77cm）5 月 27 日（北海道 豊浦，畝間 77cm）に株間 30cm でそれぞれ約 50 ジェネットを定植した。

当年以外の地上茎が混入しないようにするため、2013 年 10 月に地上茎を株元から 5cm の部位で刈り取り，前年から残存している地上茎を除去した。本節では，第 3 章第 1 節の結果に基づき，TA 含有量が安定する実生 3 年生で評価した。シナマオウの地上茎の先端部を目視で確認し，地上茎の伸長停止を確認後，下記の日収穫した。各地の TA 含有量および収量を評価するため，2014 年 7 月 18 日（静岡），7 月 23 日（沖縄），7 月 28 日（山梨），8 月 4 日（茨城），10 月 22 日（北海道 大樹），10 月 23 日（北海道 恵庭，豊浦）にそれぞれ収穫した。

2-3. 加工調製と収量評価

第 2 章の材料および方法 1-3.に従い，シナマオウの加工調製および収量評価を行った。

2-4. アルカロイド分析

第2章の材料および方法 1-4.に従い、エフェドリンアルカロイドを定量した。

2-5. 選抜

第2節ではTAの高含有量に対する選抜の効果を評価するため、実生3年生のTA含有量のデータを用いて、2015年10月30日に北海道（大樹）、茨城、山梨、静岡の4試験地由来のジェネットを選抜した。

TA高含有量選抜（各試験地におけるTA含有量が上位10%以内のジェネットから無作為に4ジェネットを選抜）および対照区となるTA中含量選抜（各試験地におけるTA含有量が上位30%から70%以内のジェネットから無作為に4ジェネットを選抜）の2種類の選抜を実施し、供試した。枯死したジェネットが多かったため、北海道（恵庭、豊浦）と沖縄の試験地は対象から除いた。

2-6. 移植後の栽培方法

TAの高含有量に対する選抜の効果を評価するため、2015年10月30日に上記の選抜ジェネットを北海道（大樹）、山梨、静岡から茨城へ移植した。各由来地ごとに畝間100cm、株間30cmでジェネットを移植した。茨城で選抜したジェネットは、移植の有無による影響を評価する対照区とし、移植しなかった。また、当年以外の地上茎が混入しないようにするため、2015年11月および2016年11月に地上茎を株元から5cmの部位で刈り取り、前年から残存している地上茎を除去した。2017年9月12日に各選抜ジェネットの地上茎を株元から5cmの部位で収穫し、第2章の材料および方法 1-3.および 1-4.に従い、サンプルの加工調製およびアルカロイド分析を行った。

2-7. 統計解析

7試験地間におけるTA含有量および収量の変動を評価するため、分散分析およびTukey-

Kramer 法による多重比較を用いた。また、選抜ジェネットの移植前後における TA の高含有量に対する選抜の効果を評価するため、分散分析、Student's t-test および Dunnet's test を用いた。さらに、選抜ジェネットの移植前後における TA 含有量の安定性を評価するため、スピアマンの順位相関解析を用いて順位相関係数を算出した。これらの統計解析は統計解析ソフトウェア R (version 3.5.0)を用いて行った。

結果

TA 含有量は各試験地でばらつきが大きく (図 3-8)、試験地間で有意な差を示し、3 地域のうち関東甲信東海の 3 試験地 (茨城、山梨、静岡) が他の試験地と比べて高かった ($p < 0.05$) (表 3-8)。TA 含有量のジェネットあたりの平均値は、茨城 ($7.7 \pm 2.6 \text{ mg/g DW}$)、山梨 ($8.6 \pm 3.2 \text{ mg/g DW}$)、静岡 ($9.0 \pm 4.0 \text{ mg/g DW}$) のみ日局 17 の規格値 (7.0 mg/g DW) を超えた (表 3-8)。一方、北海道の豊浦 ($4.4 \pm 2.3 \text{ mg/g DW}$)、大樹 ($5.0 \pm 3.0 \text{ mg/g DW}$) と沖縄 ($4.5 \pm 2.4 \text{ mg/g DW}$) は他の試験地と比べて有意に低く ($p < 0.05$) (図 3-8)、北海道と沖縄の TA 含有量の平均値は日局 17 の規格値 (7.0 mg/g DW) を超えなかった (表 3-8)。

収量も各試験地でばらつきが大きく、試験地間で有意な差を示し ($p < 0.05$) (図 3-8)、TA 含有量と同様にジェネットあたりの平均収量についても、3 地域のうち関東甲信東海の 3 試験地 (茨城、山梨、静岡) が他の試験地と比べて有意に高かった (表 3-8)。さらに、静岡の平均収量 ($30.9 \pm 12.0 \text{ g}$) は他の試験地と比べて有意に高かった (表 3-8)。続いて、茨城 ($15.2 \pm 8.0 \text{ g}$)、山梨 ($13.3 \pm 8.1 \text{ g}$) の平均収量が高かった (表 3-8, 図 3-8)。北海道、沖縄は、恵庭と豊浦との間で平均収量に有意な差を示したものの、北海道および沖縄の各試験地における平均収量は、関東甲信東海の各試験地における平均収量と比べて低かった (図 3-8)。

TA 高含有量選抜ジェネットの各試験地における TA 含有量 (2014 年) は、 $8.6 \sim 20.7 \text{ mg/g DW}$ 、茨城への移植後の TA 含有量 (2017 年) は、 $11.7 \sim 21.4 \text{ mg/g DW}$ であり、すべて日局 17 の規格値 (7.0 mg/g DW) を超えた (表 3-9)。TA 高含有量選抜ジェネットとして選抜した 16 ジェネットのうち、8 ジェネットが試験地および移植地の両方で育種目標値である 13.0

mg/g DW を超えた（表 3-9）．選抜ジェネットにおける移植前の TA 含有量と比べて移植後の TA 含有量は変動したものの（図 3-9），TA 含有量の順位相関は，どの由来地の選抜ジェネットも有意に高く（ $p < 0.05$ ），順位相関係数は，北海道（大樹）が由来地の選抜ジェネットでは $\rho = 1.00$ ，茨城が由来地の選抜ジェネットでは $\rho = 0.76$ ，山梨が由来地の選抜ジェネットでは $\rho = 0.81$ ，静岡が由来地の選抜ジェネットでは $\rho = 0.79$ であった（図 3-9）．移植による順位変動は小さかった．

各由来地における TA 高含有量選抜ジェネットの TA 含有量の平均値は，各対照区の TA 含有量（TA 中含量選抜ジェネットの TA 含有量）の平均値と比べて有意に高かった（ $p < 0.05$ ）（図 3-10）．加えて，茨城への移植後においても同様に，TA 高含有量選抜ジェネットの TA 含有量の平均値は，各対照区の TA 含有量（TA 中含量選抜ジェネットの TA 含有量）の平均値と比べて有意に高かった（ $p < 0.05$ ）（図 3-11）．また，移植後における TA 高含有量選抜ジェネットの TA 含有量は，2013 年より茨城で栽培し続けた未選抜の 44 ジェネットの TA 含有量の平均値と比べて有意に高かった（ $p < 0.05$ ）（図 3-12）．さらに，TA 高含有量選抜ジェネットにおける移植後の TA 含有量は，ジェネットの由来地間で 5%水準の有意な差は認められなかった．

考察

7 試験地におけるジェネットあたりの平均 TA 含有量は，試験地の環境によって変動しており，関東甲信東海の 3 試験地（茨城，山梨，静岡）のみが日局 17 の規格値（7.0 mg/g DW）を超え，他の地域の試験地よりも有意に高かった（表 3-8，図 3-8）．関東甲信東海地域では日局 17 の規格値を超える栽培地があり，栽培が可能であることを明らかにできた．

Kondo *et al.* (1999) は，「自生地ではアルカリ性土壌の方がエフェドリンアルカロイド含有量が高くなる」とマオウ属植物について報告している．一方，本節では，アルカリ性土壌である沖縄（pH8.1）の TA 含有量の平均値は，他の試験地と比べて低く，TA 含有量の平均値が高かった試験地の土壌 pH は 6.5（茨城），6.9（山梨），5.8（静岡）であり，日本では土壌 pH が TA 含有量に及ぼす影響を見出すことはできなかった（表 3-7，表 3-8）．また，Wang *et*

al. (2010)によると、「自生地では降水量の少ない場所ほど、エフェドリンアルカロイド含有量が高い」とのことであるが、本節では、TA 含有量の平均値が高かった茨城、山梨、静岡の年間降水量は 1520, 1051, 1969mm であり（表 3-7）、自生地の年間降水量 340~420mm（李博 1990, 神近ら 1986）と比べて、2.5~5.8 倍も多い。御影ら（2019 a）はワグネルポットで土壌 pH および灌水量が TA 含有量に及ぼす影響を調査しており、土壌 pH や灌水量は TA 含有量との相関性はないものの、灌水量については、多い方が TA 含有量が高くなったと報告しており、本節での結果と一致している。しかしながら、沖縄の年間降水量は 2448mm と最も多かったものの（表 3-7）、TA 含有量が低かったことから、降水量が多ければ多いほど、TA 含有量が高くなるわけではないことを示している。乾燥地よりも年間降水量が多い日本の環境でも TA 含有量が日局 17 の規格値（7.0 mg/g DW）を超えるシナマオウを栽培できる場所があることがわかった。

収量についても、ジェネットあたりの平均値は、試験地の環境によって変動しており、TA 含有量と同様に、関東甲信東海の 3 試験地が他の試験地よりも収量の平均値が高かった（図 3-8, $p < 0.05$ ）。また、3 試験地の中でも静岡が最も有意に高く、続いて、茨城と山梨であった（表 3-8, $p < 0.05$ ）。

中国の栽培地と同じ緯度に位置する北海道は、ジェネットあたりの平均収量が低く（表 3-8）、枯死したジェネットも多く、生育が悪かった。シナマオウは厳寒には耐えるが、過湿を嫌う性質があるとの報告があり（上海科学技術出版社 1985, 御影ら 2019 a）、北海道は積雪量が多く、積雪による過湿にシナマオウが数カ月間も曝されたことが生育不良の要因として考えられる。

シナマオウは、寒冷地では、毎年、地上部草質茎の大半が枯れ落ち、春に根頭部あるいはわずかに残った木質茎から新梢が生じる（御影 2013）。温暖地では、冬期に地上部が枯死することはなく、春に少数の充実した枝の節から新梢が生じ、その後、多くの前年枝が枯死し、地上部が更新される（御影 2013）。沖縄では、最低気温が 11.1℃までしか下がらず（表 3-7）、上記の報告されている現象とは異なり、新梢が生じて 10cm ほど伸長し、その後、すぐに枯れる現象を繰り返すことが確認され、他の試験地では確認されない生育をしていたと考えられる。加えて、収量も低いことから、沖縄はシナマオウの栽培には適さないと考えられる。

シナマオウは年間降水量 340～420mm の乾燥地で生育しており(李博 1990, 神近ら 1986), 干ばつに耐えると言われている(上海科学技術出版社 1985). しかしながら, 中国の栽培地では生育期に灌水を行っており(倪ら 2015 b, 2018 b), 灌水をしないと枯死することもある(倪ら 2018 b). 本節の結果からも, シナマオウの生存や生育には一定量の灌水や雨が必要であると考えられる. 一方で, 静岡の年間降水量は 1969mm と茨城および山梨と比べてそれぞれ 449mm, 918mm も多く, 自生地 の 6 倍近い年間降水量である(表 3-7). 茨城と山梨の土壌は黒ボク土であるのに対し, 静岡は砂壤土である(表 3-7). このことから, 自生地と比べて 6 倍近い年間降水量であっても, 水はけが良い砂壤土であったため過湿にならず, シナマオウにとって適した水分環境になった可能性がある. また, 平均気温も自生地はおおよそ 6℃であるものの, 生育が良好であった関東甲信東海地域は 11.0～16.2℃と高く, シナマオウの生育に適した気温の範囲幅は大きい可能性がある. 以上より, 土壌の種類や気温もシナマオウの生育やアルカロイド含有量に影響を及ぼす重要な要因として考えられる.

前節では実生 4 年生で収量は安定するとの結果を得ているが, 今回の結果は実生 3 年生の結果である. しかしながら, 他の試験地と比べて, ジェネットあたりの平均収量が有意に高く, 枯死したジェネットもほとんどなかったことを考慮すると, 3 つの地域の中では, 関東甲信東海地域が日本ではシナマオウの生育にとって良い場所であることが示唆される. また, 関東甲信東海地域の 3 試験地(茨城, 山梨, 静岡)では, TA 含有量も高かった(表 3-8). これまでに, 生育の差が TA 含有量に影響を与えていること(Matsumoto *et al.* 2015), 生育不良が発生しやすい環境下では TA 含有量が低くなる可能性があること(松本 2014)が報告されており, 生育が良い場所では, ジェネットの TA 含有量が高くなる可能性がある. 本研究における試験地の環境の影響による TA 含有量の変動は, 各試験地の生育の差により生じたものであると考察される.

以上より, ジェネットあたりの TA 含有量の平均値が日局 17 を超え, 平均収量が高く, 生育が良好である関東甲信東海地域の茨城, 山梨, 静岡は他の 2 地域の試験地よりも栽培地として適していると考えられる.

TA 含有量が試験地の影響を受けたことから, 選抜にあたっては, TA 含有量に対する選抜効果を検証する必要がある. そこで, 本節では, 異なる環境下における TA の高含有量に対する選抜効果を検証した. どの試験地においても, 対照区である TA 中含量選抜ジェネッ

トの TA 含有量と比べ、TA 高含有量選抜ジェネットの TA 含有量は有意に高かったことから（図 3-10）、試験地における TA の高含有量に対する選抜は有効であるといえる。また移植後も同様の結果が得られたことから（図 3-11）、異なる環境下での TA の高含有量に対するジェネットの選抜は有効であるといえる。

試験地と移植地の TA 含有量を評価すると、試験地と移植地で TA 含有量変動するものの（表 3-9）、それらの順位相関が有意に高いことから（ $\rho = 0.76 \sim 1.00$, $p < 0.05$, 図 3-9）、移植や試験地にかかわらず、ジェネットの TA 含有量が安定していることを示している。また、今回の選抜によって、試験地と移植地の両方で、安定して TA 含有量が 13.0 mg/g DW 以上を示すジェネットが 8 ジェネット得られた。TA 高含有量選抜ジェネットと未選抜の対照区（44 ジェネット）を比較すると、選抜ジェネットの由来地を問わず、TA 含有量に有意な差が認められた（図 3-12）。さらに、移植地にて TA 高含有量選抜ジェネット間における有意な差は認められなかった。

以上より、シナマオウは TA の高含有量に対する選抜の効果があり、ジェネットの枯死数が多い生育不良となる場所では検証できなかったものの、日本の複数の場所にて TA が高含有量を有するシナマオウの選抜が可能であるといえる。

第3節 総アルカロイド含有量に対する遺伝効果と環境効果の評価

材料および方法

3-1. 供試材料

第3章第1節の材料および方法 1-1-5.にて分類した、46 ジェネットの TA 高含有量型ジェネット、TA 中含有量型ジェネット、TA 低含有量型ジェネットを用い、ストロンによる栄養繁殖法（図 3-1）により、下記の4 ジェネットからクローン系統を育成した（表 3-10）。

ジェネットの選抜基準は、ストロン数が 15 本以上有し、各型のジェネットから TA 含有量が上位の 2 ジェネットとした。

TA 高含有量型ジェネットからは、#2 と#26 を選抜した。TA 中含有量型ジェネットでは、ストロン数が 15 本以上のジェネットは#35 のみであったため、#35 のみを選抜した。TA 低含有量型ジェネットでは、ストロン数が 15 本以上のジェネットがなかったため、最もストロン数が多かった#41 のみを選抜した。全ストロン株は、2017 年 6 月 7 日に採取した。

3-2. 栽培方法

TA 含有量に対する G×E および広義の遺伝率を推定するため、第2節の結果より日本において、日局 17 の規格値（7.0 mg/g DW）を超えて生育が良いと判断され、シナマオウの栽培地となりうる関東甲信東海の 3 試験地（茨城、山梨、静岡）にて、上記 4 クローン系統（#2, #26, #35, #41）をそれぞれ畝間 100cm, 株間 30cm で系統ごとに定植した。各試験地の定植株数については、表 3-10 にまとめた。定植日は 2017 年 6 月 7 日（茨城）、6 月 9 日（静岡）、6 月 23 日（山梨）である。また、各圃場に定植前日までに完熟堆肥 2,000kg / 10a, IB 化成 S1 号（N:P₂O₅:K₂O=10:10:10）20kg / 10a を与えた。

第1節の結果より、定植の影響により TA 含有量が低くなることを考慮し、定植 1 年生は評価せず、定植 2 年生および定植 3 年生の TA 含有量を評価した。定植 2 年生は 2018 年 7 月 3 日（静岡）、7 月 11 日（茨城）、7 月 18 日（山梨）、定植 3 年生は 2019 年 7 月 10 日（静岡）、7 月 19 日（茨城）、8 月 2 日（山梨）にそれぞれ収穫した。各年の収穫数については、

表 3-11 にまとめた．当年以外の地上茎が混入しないようにするため，2017 年 11 月に地上茎を株元から 5cm の部位で刈り取り，前年から残存している地上茎を除去した．

3-3. 加工調製および収量評価

第 2 章の材料および方法 1-3.に従い，シナマオウの加工調製および収量評価を行った．

3-4. アルカロイド定量

第 2 章の材料および方法 1-4.に従い，エフェドリンアルカロイドを定量した．

3-5. 統計解析

G×E を推定するため，3 元配置の分散分析を行った．G×E の要因は，遺伝子型 (G)，場所 (L)，年 (Y) であり，それら要因の効果および交互作用の効果を推定した．また，広義の遺伝率を算出するため，3 元配置の分散分析で得られた平均平方より分散値を算出し，鵜飼 (2002) に基づいて広義の遺伝率を算出した．計算式は以下の通りである．

$$h^2 = \sigma_g^2 / [\sigma_g^2 + (\sigma_{gl}^2/l) + (\sigma_{gy}^2/y) + (\sigma_{gby}^2/ly) + (\sigma_e^2/rly)]$$

l, y, および r はそれぞれ，Lの水準数，Yの水準数および反復数を示す． σ_g^2 , σ_{gl}^2 , σ_{gy}^2 , σ_{gby}^2 , および σ_e^2 はG, G×L, G×Y, G×L×Y, および誤差の分散値を示す．これらの分散値は上記の平均平方を用いて算出した (Milligan *et al.* 1990, 鵜飼 2002)．本研究では，反復数が栽培地によって異なっているため，補正された反復数(r)を算出した．補正された反復数は吉田 (1998) の方法で以下の通り算出した．

$$r = (\sum_{i=1}^a r_i - \sum_{i=1}^a r_i^2 / \sum_{i=1}^a r_i) / (a - 1)$$

a および r_i は水準数および各水準での反復数を示す．

結果

茨城における各系統の活着率は、系統#2 が 57.1%, 系統#26 が 77.8%, 系統#35 が 100.0%, 系統#41 が 100.0%, 平均値および標準偏差は $83.7 \pm 17.8\%$ であった。山梨における各系統の活着率は、系統#2 が 50.0%, 系統#26 が 23.1%, 系統#35 が 100.0%, 系統#41 が 50.0%, 平均値および標準偏差は $55.8 \pm 27.8\%$ であった。静岡における各系統の活着率は、系統#2 が 33.3%, 系統#26 が 44.4%, 系統#35 が 40.0%, 系統#41 が 66.7%, 平均値および標準偏差は $46.1 \pm 12.5\%$ であった。

定植 2 年生 (2018 年) では、系統#2 における TA 含有量の平均値と標準偏差は 9.7 ± 0.8 mg/g DW (茨城, n=8), 10.1 mg/g DW (山梨, n=1), 8.6 ± 0.8 mg/g DW (静岡, n=5), 系統#26 における TA 含有量の平均値および標準偏差は 14.2 ± 1.4 mg/g DW (茨城, n=7), 15.7 ± 3.0 mg/g DW (山梨, n=4), 12.2 ± 3.8 mg/g DW (静岡, n=3), 系統#35 における TA 含有量の平均値および標準偏差は 5.5 ± 1.2 mg/g DW (茨城, n=6), 1.8 ± 0.8 mg/g DW (山梨, n=2), 5.0 ± 0.8 mg/g DW (静岡, n=5), 系統#41 における TA 含有量の平均値および標準偏差は 2.9 ± 0.6 mg/g DW (茨城, n=3), 4.9 ± 1.2 mg/g DW (山梨, n=2), 2.9 mg/g DW (静岡, n=1) であった (表 3-12)。各クローン系統の採取年 (2017 年) における由来ジェネットの TA 含有量は #2 が 10.4 mg/g DW, #26 が 14.2 mg/g DW, #35 が 4.5 mg/g DW, #41 が 2.2 mg/g DW であり (表 3-1), 山梨の系統#35 および#41 以外は由来ジェネットと同程度の TA 含有量であった。山梨の系統#35 は系統#41 よりも TA 含有量は低かった。各試験地間における TA 含有量の平均値の相関係数は、茨城と山梨が $r = 0.91$ (ns), 茨城と静岡が $r = 1.00$ ($p < 0.01$), 静岡と山梨が $r = 0.91$ (ns) であった (図 3-13)。

定植 3 年生 (2019 年) では、系統#2 における TA 含有量の平均値および標準偏差は 11.8 ± 1.0 mg/g DW (茨城, n=8), 5.3 ± 0.4 mg/g DW (山梨, n=2), 10.4 ± 0.3 mg/g DW (静岡, n=3), 系統#26 における TA 含有量の平均値および標準偏差は 15.5 ± 0.7 mg/g DW (茨城, n=7), 11.7 ± 2.5 mg/g DW (山梨, n=4), 16.1 ± 3.6 mg/g DW (静岡, n=3), 系統#35 における TA 含有量の平均値および標準偏差は 5.0 ± 0.5 mg/g DW (茨城, n=6), 3.4 ± 1.5 mg/g DW (山梨, n=2), 5.3 ± 0.9 mg/g DW (静岡, n=4), 系統#41 における TA 含有量の平均値および標準偏差は 3.0 ± 0.7 mg/g DW (茨城, n=3), 3.0 ± 1.2 mg/g DW (山梨, n=2), 3.5 mg/g DW (静岡, n=1) であった (表 3-12)。山梨の系統#2 以外は由来ジェネットと同程度の TA 含有量であった。各試験地間にお

ける TA 含有量の平均値の相関係数は、茨城と山梨が $r=0.90$ (ns), 茨城と静岡が $r=0.99$ ($p < 0.05$), 静岡と山梨が $r=0.96$ ($p < 0.05$) であった (図 3-14) .

さらに、茨城と静岡における系統#2 および#26 の定植 3 年生は、定植 2 年生と比べて TA 含有量が上昇していた (表 3-12). 一方、山梨では、系統#2, #26 および#41 の定植 3 年生は、定植 2 年生と比べて TA 含有量が減少していた (表 3-12). しかしながら、系統#26 は他の系統と比べて、定植 2 年生 (2018 年) および定植 3 年生 (2019 年) で TA 含有量の平均値は安定して高かった (図 3-15). 茨城と静岡の間における TA 含有量の平均値の相関係数は 2 年間で有意でかつ高く、山梨と他の試験地間における TA 含有量の平均値の相関係数は高かったものの、一部しか有意ではなかった (図 3-13, 14). 続いて、各試験地における定植 2 年生 (2018 年) と定植 3 年生 (2019 年) の TA 含有量の平均値の相関係数は、茨城が $r=0.99$ ($p < 0.05$), 静岡が $r=1.00$ ($p < 0.01$), 山梨が $r=0.92$ (ns) であった (図 3-15).

三元配置の分散分析の結果、遺伝子型 (G) ($p < 0.01$), 場所 (L) ($p < 0.01$), L \times Y 交互作用 ($p < 0.01$), G \times L \times Y 交互作用 ($p < 0.05$) の効果が有意であった (表 3-13). 一方で、年 (Y), G \times L 交互作用, G \times Y 交互作用は有意でなかった (表 3-13). また、(G) の分散値 (σ_g^2), (L) の分散値 (σ_l^2), Y の分散値 (σ_y^2), G \times L の分散値 (σ_{gl}^2), G \times Y の分散値 (σ_{gy}^2), L \times Y の分散値 (σ_{ly}^2), G \times L \times Y の分散値 (σ_{gly}^2) および誤差の分散値 (σ_e^2) はそれぞれ 24.33, 0.00, 0.00, 0.00, 0.00, 1.20, 1.24, 3.00 であった (表 3-14). 補正された反復数 (r) は 3.78 であった. (G), (L), L \times Y 交互作用および G \times L \times Y 交互作用は TA 含有量に対して有意であったが ($p < 0.05$), 分散値の中では G の分散値 (σ_g^2) が最も高かった. また、広義の遺伝率 (h^2) は 0.99 と高い値であった (表 3-14).

続いて、TA 含有量と収量の関連性について評価した. 定植 2 年生 (2018 年) における各試験地の TA 含有量と収量の相関係数は、茨城が $r=0.09$ (ns), 山梨が $r=0.08$ (ns), 静岡が $r=0.31$ (ns) と低く、相関もなかった (図 3-16). 定植 3 年生 (2019 年) も、茨城が $r=-0.22$ (ns), 山梨が $r=0.19$ (ns), 静岡が $r=-0.43$ (ns) と低く、相関はなかった. 定植 2 年生よりも定植 3 年生の方が収量の変動幅が大きくなり、定植 3 年生では、どの試験地においても、系統内の変異幅が大きかった. また、試験地や年生によって相関係数は変動したものの、すべて 5%水準で有意な相関は認められなかった.

考察

クローンの生存率の平均値と標準偏差は、試験地によって異なっており、茨城が $83.7 \pm 17.8\%$ と最も高く、山梨は $55.8 \pm 27.8\%$ 、静岡は $46.1 \pm 12.5\%$ であった。御影ら (2019 b) は、ストロンの移植時期を評価しており、7 月下旬～8 月、11 月後半～12 月、3 月に行うと活着率が約 70～80% と高くなると報告している。本研究では 6 月に定植したものの、ストロン株の採取日に定植した茨城は生存率が最も高く、採取日より 2 日後、16 日後と定植日が遅れた山梨および静岡では低かった。本研究では、ストロン株の採取日から定植日までの日数が長かったことや、採取地から試験地へ輸送したことが活着に影響したと考えられる。

三元配置の分散分析の結果、遺伝子型の効果 (G) が TA 含有量に有意な効果を示し ($p < 0.01$) (表 3-13)、(G) に対する分散値 (σ_g^2) が最も高かった (24.33) (表 3-14) また、広義の遺伝率は $h^2 = 0.99$ と高いことがわかった (表 3-14)。これらの結果はシナマオウの TA 含有量が遺伝要因に強く支配されていることを示している。一般に、育種形質では、狭義の遺伝率の推定が重要であるが、シナマオウの種子繁殖による増殖方法は制約があるため、狭義の遺伝率を推定することができなかった。しかしながら、クローン増殖を用いて育種するためには、遺伝的変異の大きさを推定することが重要であり、選抜されたジェネットが優性分散成分と相加分散成分の両方を持っていたとしても、より高い TA 含有量を持つシナマオウのジェネットを選抜することで、効果的な育種を達成することができる。これまでに育種目標形質の広義の遺伝率は、牧草のローズグラスでは 0.66～0.90 (Komatsu *et al.* 2004)、サトウキビでは 0.19～0.74 (Milligan *et al.* 1990) と推定され、個体選抜することで効果的な育種が可能であることが示されている。本節で推定された高い広義の遺伝率 (0.99) は、TA が高含有量を有するジェネットを対象とした選抜育種が可能であることを示唆している。

第 1 節では、クローンにおける収量は、定植 4 年生より安定することを明らかにしたが、本節では、TA 含有量を評価することが目的であり、定植 2 年生および定植 3 年生の収量のみ測定した。これらの収量から算出した広義の遺伝率に有用性はないと考えられることから、本研究では収量の広義の遺伝率を推定しなかった。また、TA 含有量と収量との間には、各場所、各年ともに相関関係は認められなかった (図 3-16)。

これまでのいくつかの研究では、TA 含有量は環境要因の影響を受けると報告されており (Wang *et al.* 2010, Kondo *et al.* 1999)、第 2 節では試験地間によって TA 含有量の平均値に

有意な差が認められ（図 3-8, $p < 0.05$ ），本節でも TA 含有量には場所（L）の効果も有意に認められた（表 3-13, $p < 0.01$ ）．しかしながら，各系統の TA 含有量は試験地によってばらつきがあったものの（表 3-12, 図 3-13, 14），（G）の分散値（ σ_g^2 ）（24.33）は（L）の分散値（ σ_l^2 ），（0.00）よりも大きいため（表 3-14），（G）の効果は（L）の効果よりも大きいと考えられる．さらに，本節では，異なる試験地間でも TA 含有量の平均値の相関係数が高く（図 3-13, 14），TA 高含有量型ジェネット由来である系統#2 および#26 の TA 含有量は，2018 年および 2019 年のいずれの試験地においても，高く安定していた（図 3-15）．第 2 節で試験地間によって平均 TA 含有量に有意な差が認められた要因として，実生由来のジェネットを用いて比較していたことや各地域のジェネットの生育差が影響したと考えられる．本節では，生育が良好であった関東甲信東海地域のみで評価しており，さらに，クローン系統を育成して評価し，生育による影響や種子によるばらつきを除いた．その結果，（G）の効果の評価することができ，（L）の効果が小さくなったと考えられる．これらの結果から，クローン系統を栽培条件の異なる 3 試験地で栽培した場合，TA 含有量は（L）よりも（G）の影響を大きく受けていたといえる．したがって，シナマオウの TA 含有量は関東甲信東海地域の異なる環境下の試験地でも安定していると考えられる．

TA 含有量に対する年（Y）の効果は有意には認められなかった（表 3-13）．2019 年については，2018 年 10 月の山梨における台風による集中豪雨で生育に影響を及ぼし，山梨で栽培した 3 つのクローン系統（#2, #26, #41）は，2018 年と比較して TA 含有量が減少したと推定される（表 3-12）．一方で，台風の影響があったにもかかわらず，各試験地との 2018 年と 2019 年における TA 含有量の平均値の相関係数は高かった（図 3-15）．特に系統#26 では，他のクローン系統と比較して，2 年間（2018 年，2019 年）の TA 含有量の平均値が安定して高かった（表 3-12）．これらの結果から，TA 高含有量型ジェネットにおけるクローンの TA 含有量は，環境の影響を受けにくく，経年で安定していることが示唆された．

TA 含有量には， $L \times Y$ 交互作用と $G \times L \times Y$ 交互作用の有意な効果が認められた（ $p < 0.05$ ）（表 3-14）が， $L \times Y$ の分散値（1.20）および $G \times L \times Y$ の分散値（1.24）は，（G）の分散値（24.33）よりも小さかった（表 3-15）．さらに，TA 低含有量型ジェネットおよび TA 中含量型ジェネットに由来するクローン系統の TA 含有量は，場所や経年で変動していたものの（表 3-13），TA 高含有量型ジェネットに由来するクローン系統の TA 含有量は，TA 中含量型ジェネットおよび TA 低含有量型ジェネットに由来するクローン系統の TA 含有量と

比べて、場所や年に関係なく高い値を示した（表 3-12）。これらの結果は、TA 高含有量型ジェネット由来のクローン系統に対する $L \times Y$ 交互作用と $G \times L \times Y$ 交互作用の影響が小さいことを示唆している。以上より、日本におけるシナマオウのクローンを用いた TA 含有量に対する選抜育種は有効であると考えられる。

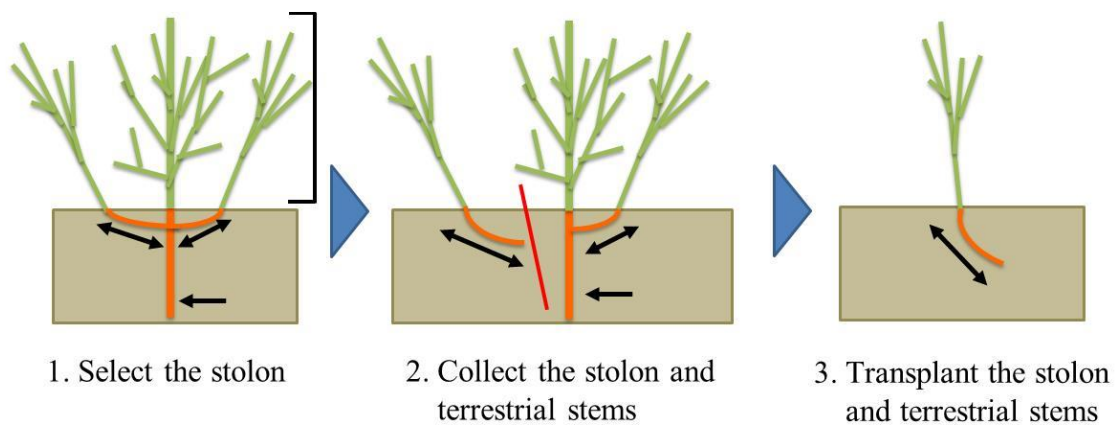


図 3-1. ストロンを用いたシナマオウの栄養繁殖法

黒矢印はストロンを示す． 1. 採取するストロン株を選択， 2. 地上茎のついたストロン株の採取， 3. 2 で採取したストロン株の移植．

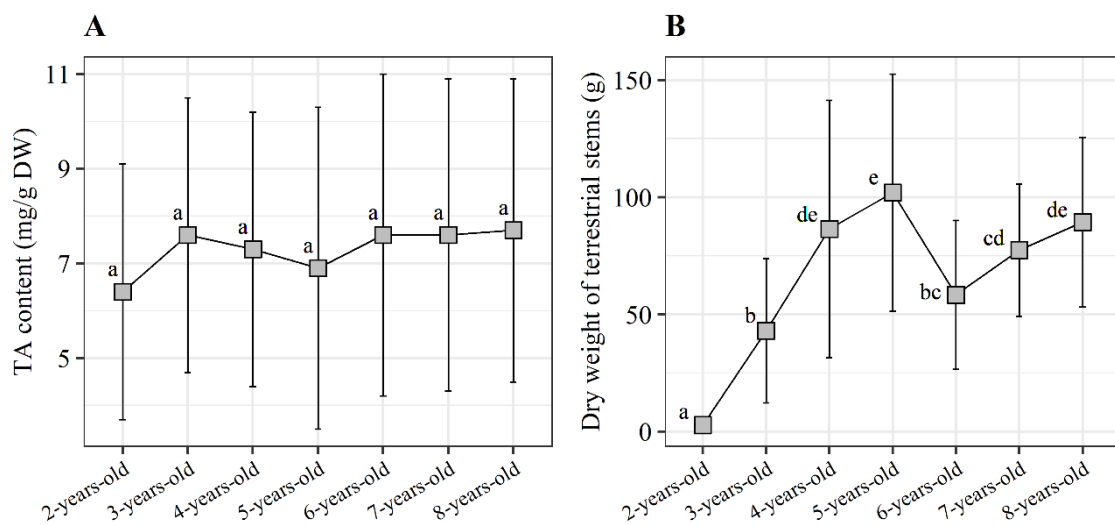


図 3-2. 46 ジェネットの TA 含有量および収量の経年変動

A: 実生 2～8 年生のジェネットあたりの平均 TA 含有量. B: 実生 2～8 年生のジェネットあたりの平均収量. Year-old : 年生. □ : TA 含有量 (A), 収量 (B) をそれぞれ示す. バーは標準偏差を示す. Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行った. 異なる文字間において 5%水準の有意差を示す. 平均 TA 含有量は分散分析の結果より, 年生間における有意な差は認められなかった. 平均収量は分散分析の結果より, 0.01%水準で年生間における有意な差が認められた.

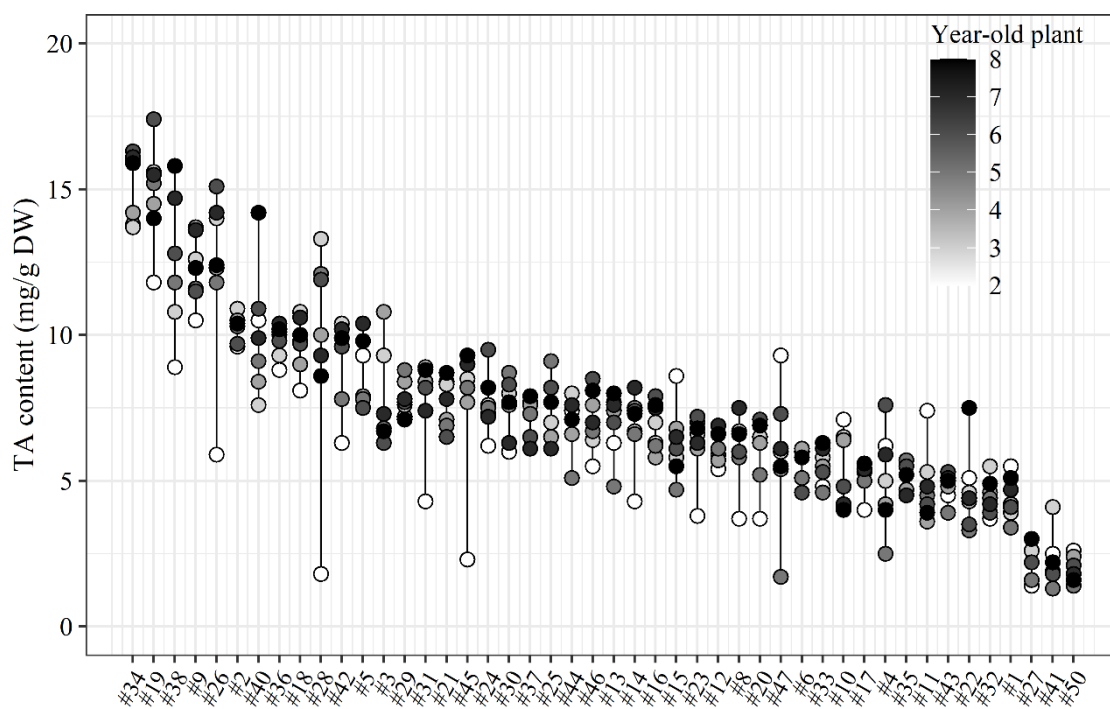


図 3-3. 各ジェネットにおける TA 含有量の経年変動

ジェネットを 7 年分の平均 TA 含有量（実生 2～8 年生）が高い順に並べた．グラデーションは各ジェネットの年生を示す．色が濃くなるほど年生が高くなることを示す．

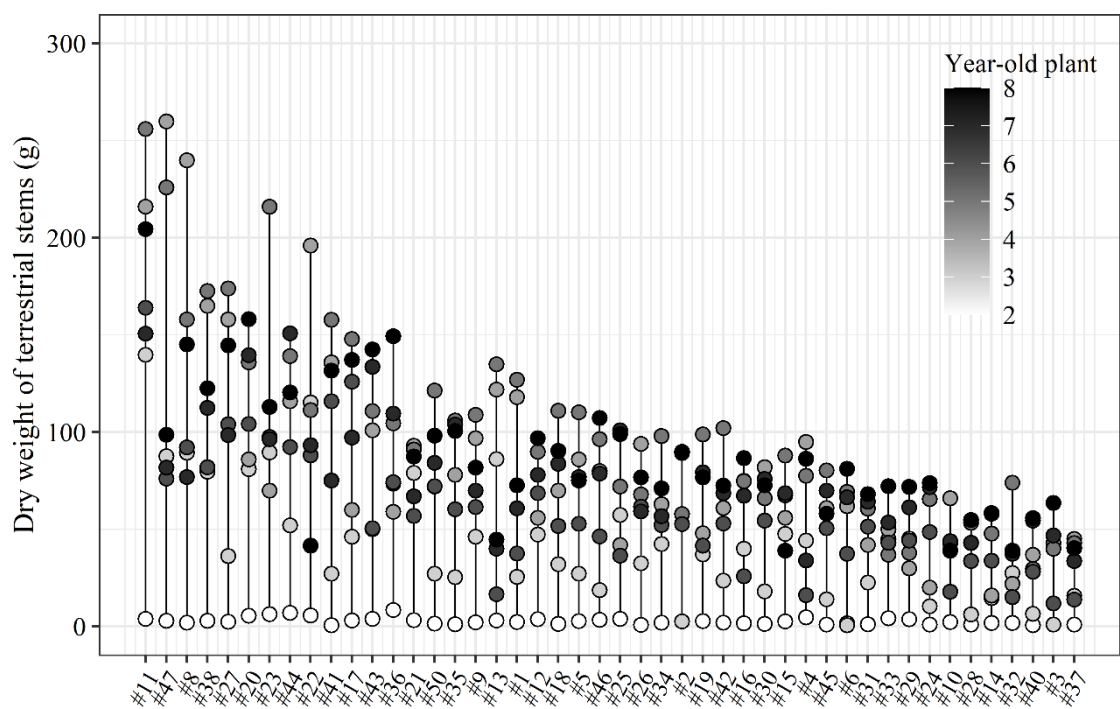


図 3-4. 各ジェネットにおける収量の経年変動

ジェネットを 7 年分の平均収量（実生 2～8 年生）が高い順に並べた．グラデーションは各ジェネットの年生を示す．色が濃くなるほど年生が高くなることを示す．○は各ジェネットにおける各年生の収量を示す．

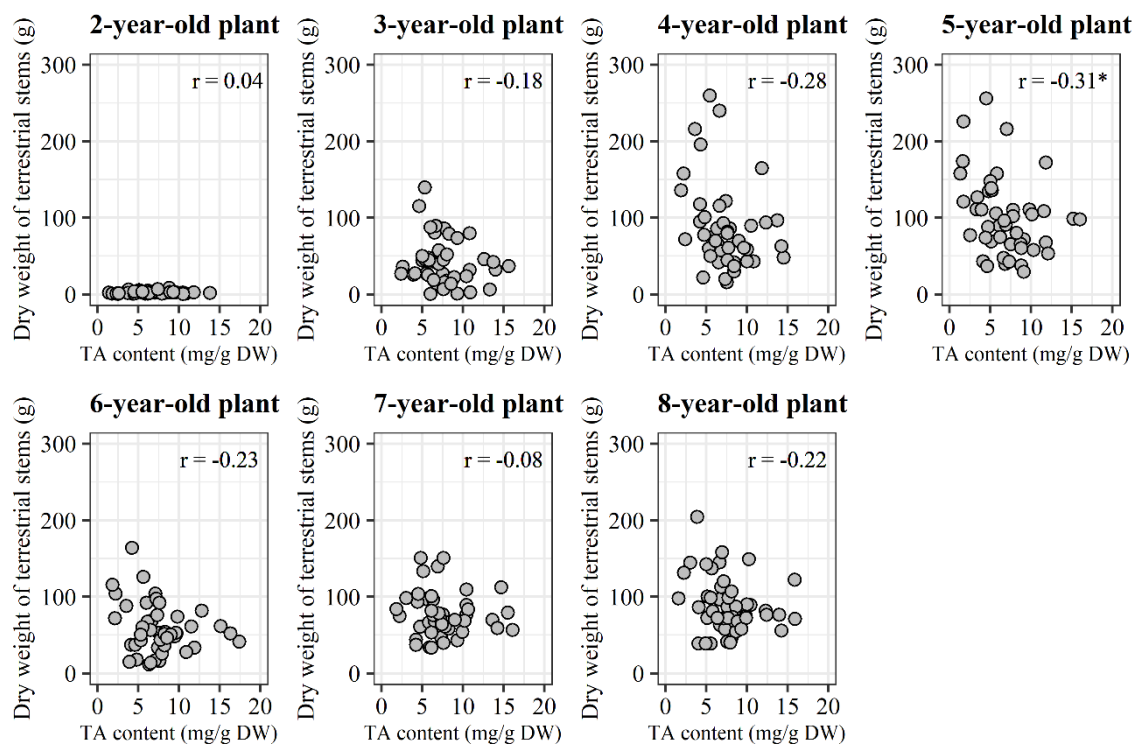


図 3-5. 実生 2 年生から実生 8 年生における 46 ジェネットの TA 含有量と収量の相関

2-year-old plant : 実生 2 年生, 3-year-old plant : 実生 3 年生, 4-year-old plant : 実生 4 年生, 5-year-old plant : 実生 5 年生, 6-year-old plant : 実生 6 年生, 7-year-old plant : 実生 7 年生, 8-year-old plant : 実生 8 年生. r は TA 含有量と収量の相関係数を示す. *は $p < 0.05$ を示す.

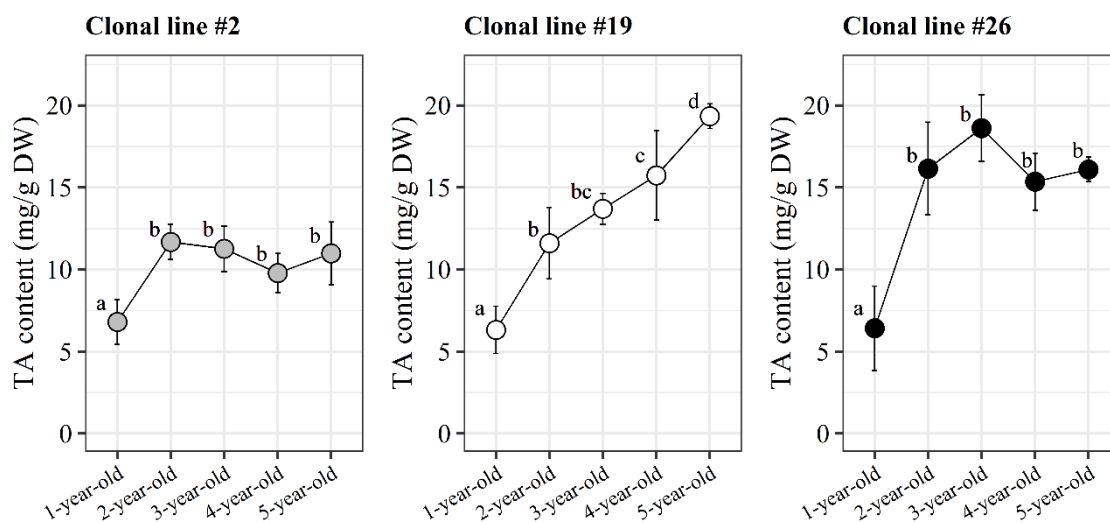


図 3-6. TA 高含有量型ジェネットクローンの平均 TA 含有量の経年変動

Clonal line #2: ジェネット#2 由来のクローン (n=5), Clonal line #19: ジェネット#19 由来のクローン (n=5), Clonal line #26: ジェネット#26 由来のクローン (n=4) を示す. ○: 各ジェネットクローンの TA 含有量の平均値を示す. バーは標準偏差を示す. クローンを育成するため, TA 高含有量選抜ジェネットの中からストロンを 8 本以上有する 3 ジェネットを選んだ. Year-old はジェネットより採取したストロン株を移植した年生を示す. Tukey-Kramer 法による多重比較を行った. 異なる文字間で有意な差を示す ($p < 0.05$).

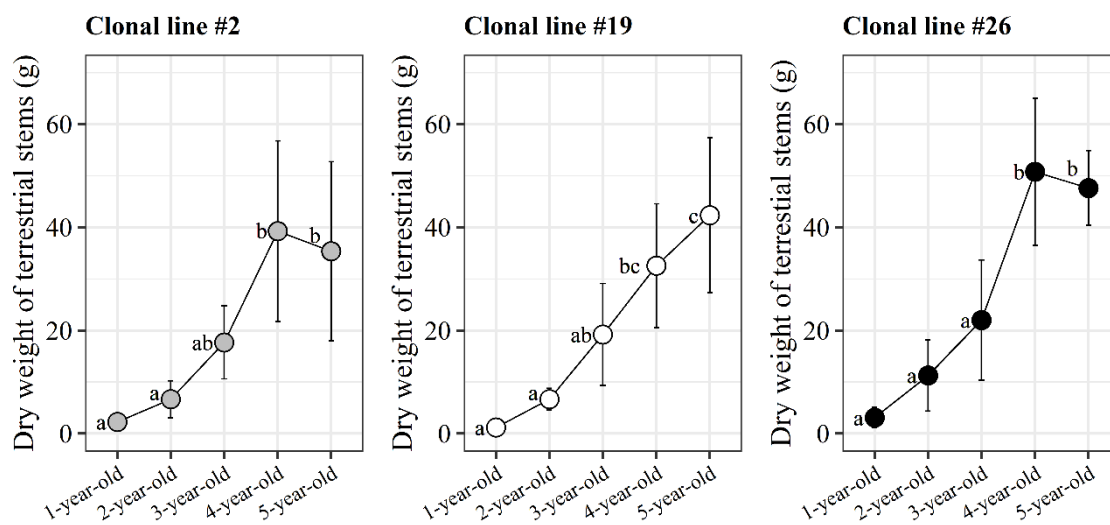


図 3-7. TA 高含有量選抜ジェネットクローンの平均収量の経年変動

Clonal line #2: ジェネット#2 由来のクローン (n=5), Clonal line #19: ジェネット#19 由来のクローン (n=5), Clonal line #26: ジェネット#26 由来のクローン (n=4) を示す. ○: 各ジェネットクローンにおける収量の平均値を示す. バーは標準偏差を示す. Year-old はジェネットより採取したストロン株を移植した年生を示す. Tukey-Kramer 法による多重比較を行った. 異なる文字間で有意な差を示す ($p < 0.05$).

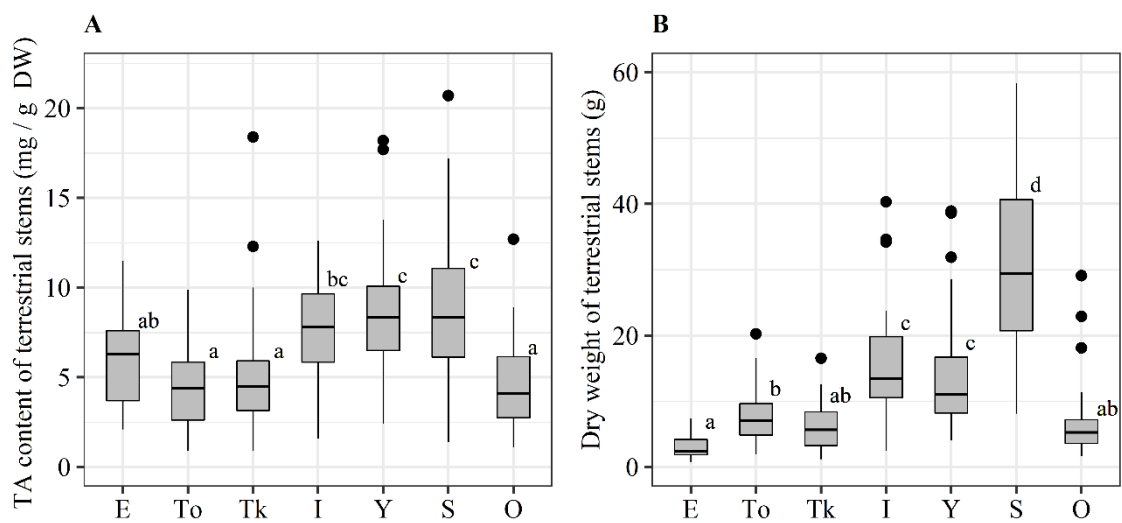


図 3-8. 各試験地における実生 3 年生の TA 含有量および収量

A : 各試験地における実生 3 年生の TA 含有量, B : 各試験地における実生 3 年生の収量.
 E, To, Tk, I, Y, S, O はそれぞれ北海道 恵庭 (n=37), 豊浦 (n=46), 大樹 (n=56), 茨城 (n=44),
 山梨 (n=50), 静岡 (n=50), 沖縄 (n=50) を示す. Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行
 った. 異なる文字間で有意な差を示す ($p < 0.05$).

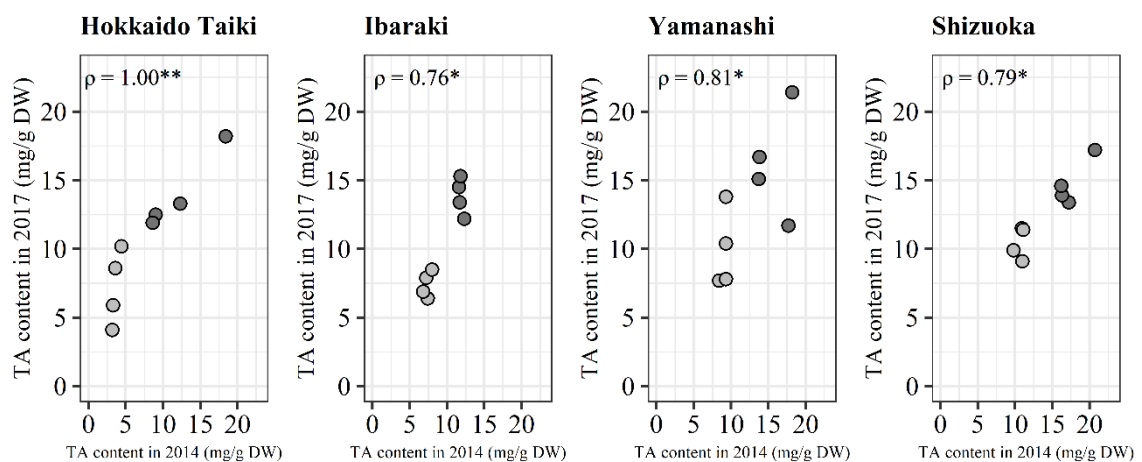


図 3-9. 選抜ジェネットの移植前（2014 年）と移植後（2017 年）における TA 含有量の相関
 2014 は移植前の各試験地での TA 含有量, 2017 は移植後の TA 含有量を示す. Hokkaido Taiki, Ibaraki, Yamanashi, Shizuoka はそれぞれジェネットの選抜由来地を示す. ○は各ジェネットの TA 含有量を示し, 黒色は TA 高含有量選抜ジェネット（各試験地における TA 含有量が上位 10%以内のジェネット）, 灰色は TA 中含量選抜ジェネット（TA 含有量が上位 30%から 70%以内のジェネット）を示す. ρ はスピアマンの順位相関係数を示す. *, **は $p < 0.05$, $p < 0.01$ をそれぞれ示す. Ibaraki は移植なしの対照区として用いた.

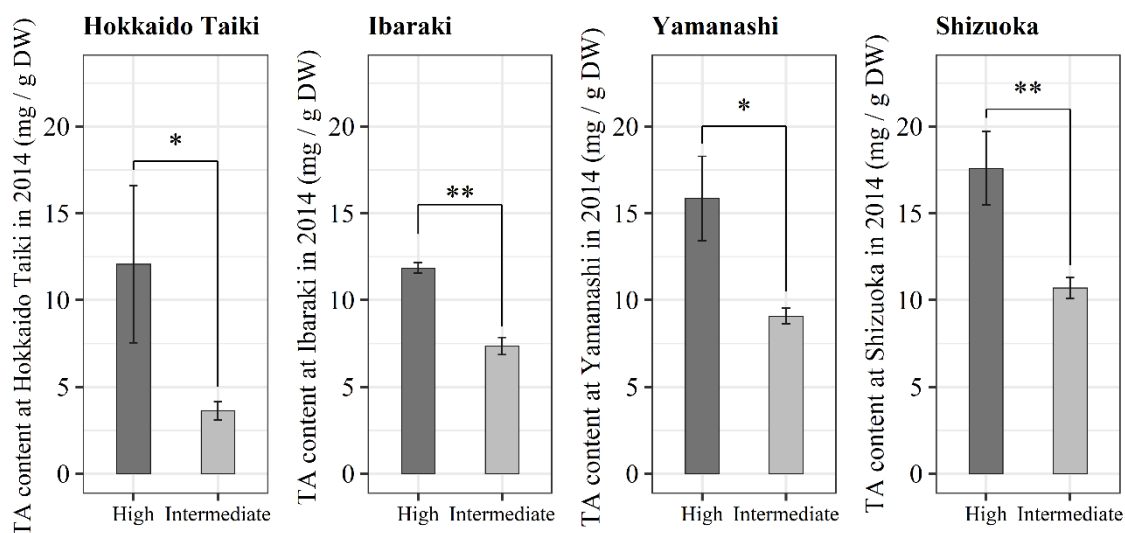


図 3-10. 各試験地における TA 高含有量選抜ジェネットと TA 中含有量選抜ジェネットの平均 TA 含有量 (2014 年)

Hokkaido Taiki, Ibaraki, Yamanashi, Shizuoka は各試験地を示す。バーは標準偏差を示す。High, Intermediate はそれぞれ TA 高含有量選抜ジェネット (各試験地における TA 含有量が上位 10%以内のジェネットの中から無作為に選んだ 4 ジェネット), TA 中含有量選抜ジェネット (TA 含有量が上位 30%から 70%以内のジェネットの中から無作為に選んだ 4 ジェネット) の TA 含有量の平均値を示す。高含有量選抜ジェネットの TA 含有量と中含有量選抜ジェネットの TA 含有量を比較するため、Student's t tests を用いて評価した。*, **はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ を示す。

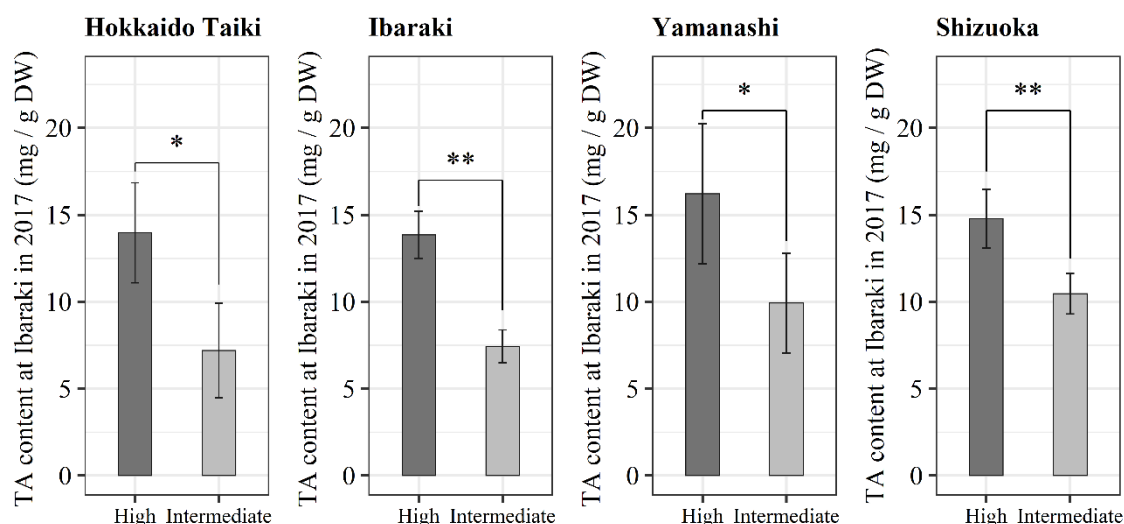


図 3-11. 移植地（茨城）における TA 高含有量選抜ジェネットと TA 中含有量選抜ジェネットの平均 TA 含有量（2017 年）

Hokkaido Taiki, Ibaraki, Yamanashi, Shizuoka は各由来地を示す。バーは標準偏差を示す。High, Intermediate はそれぞれ TA 高含有量選抜ジェネット（各試験地における TA 含有量が上位 10%以内のジェネットから無作為に選んだ 4 ジェネット）、TA 中含有量選抜ジェネット（TA 含有量が上位 30%から 70%以内のジェネットから無作為に選んだ 4 ジェネット）の TA 含有量の平均値を示す。高含有量選抜ジェネットの TA 含有量と中含有量選抜ジェネットの TA 含有量を比較するため、Student's t tests を用いて評価した。*, **はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ を示す。

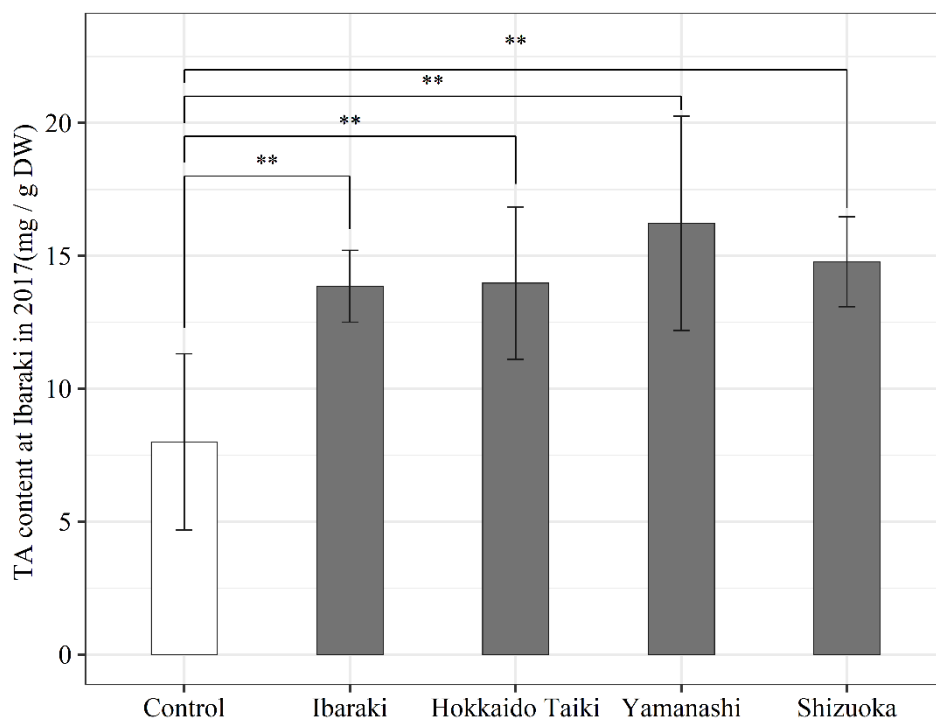


図 3-12. 移植地（茨城）における TA 高含有量選抜ジェネットと対照区のジェネットの平均 TA 含有量（2017 年）

Hokkaido Taiki (n=4) , Ibaraki (n=4) , Yamanashi (n=4) , Shizuoka (n=4) は各選抜由来地を示す。バーは標準偏差を示す。Control (n=44) は茨城で移植せずに 2013 年より栽培し続けた対照区のジェネットの平均 TA 含有量を示す。TA 高含有量選抜ジェネットは各試験地における TA 含有量が上位 10%以内のジェネットから無作為に選んだ 4 ジェネット。対照区と各試験地由来の TA 高含有量選抜区との多重比較するため、Dunnet's test を用いた。 **は $p < 0.01$ を示す。

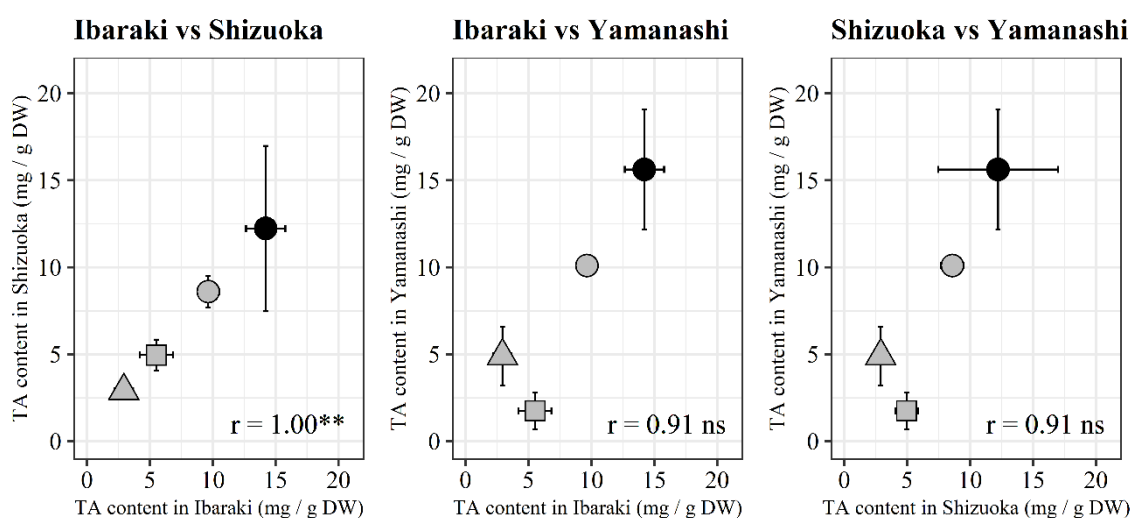


図 3-13. 試験地間における定植 2 年生 (2018 年) クローン系統 TA 含有量の平均値の相関
 Ibaraki vs Shizuoka : 茨城と静岡における TA 含有量の相関, Ibaraki vs Yamanashi : 茨城と山梨における TA 含有量の相関, Shizuoka vs Yamanashi : 静岡と山梨における TA 含有量の相関. ○ : 高含有量型ジェネット由来 (黒色 : #26, 灰色 : #2), □ : 中含有量型ジェネット由来 (#35), △ : 低含有量型ジェネット由来 (#41) の TA 含有量. r : ピアソンの相関係数. ns, **はそれぞれ有意差なし, $p < 0.01$ で有意差があることを示す. バーは標準偏差を示す.

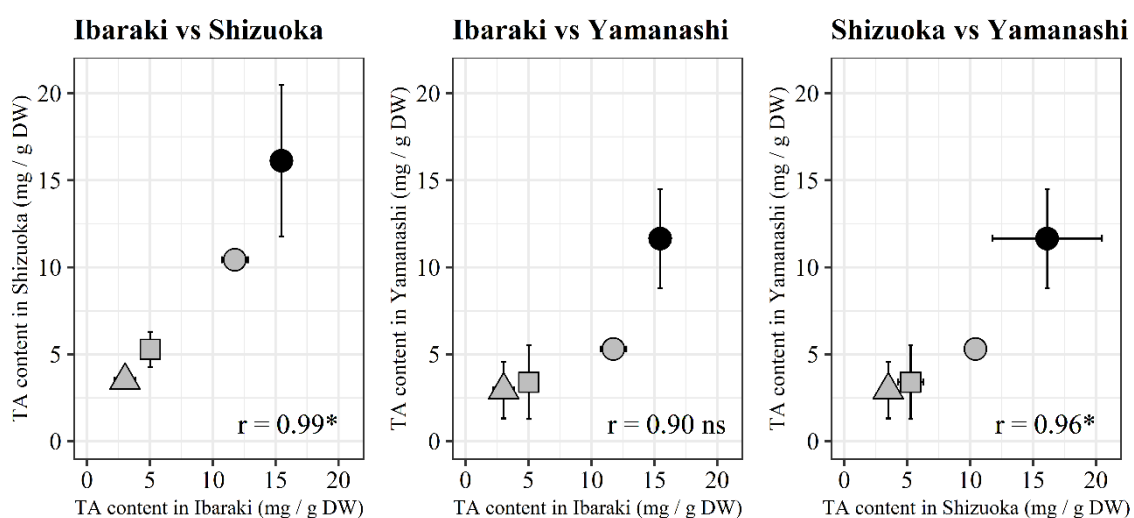


図 3-14. 試験地間における定植 3 年生 (2019 年) クローン系統 TA 含有量の平均値の相関
 Ibaraki vs Shizuoka : 茨城と静岡における TA 含有量の相関, Ibaraki vs Yamanashi : 茨城と山梨における TA 含有量の相関, Shizuoka vs Yamanashi : 静岡と山梨における TA 含有量の相関. ○ : 高含有量型ジェネット由来 (黒色 : #26, 灰色 : #2), □ : 中含有量型ジェネット由来 (#35), △ : 低含有量型ジェネット由来 (#41) の TA 含有量. r : ピアソンの相関係数. ns, * はそれぞれ有意差なし, $p < 0.05$ で有意差があることを示す. バーは標準偏差を示す.

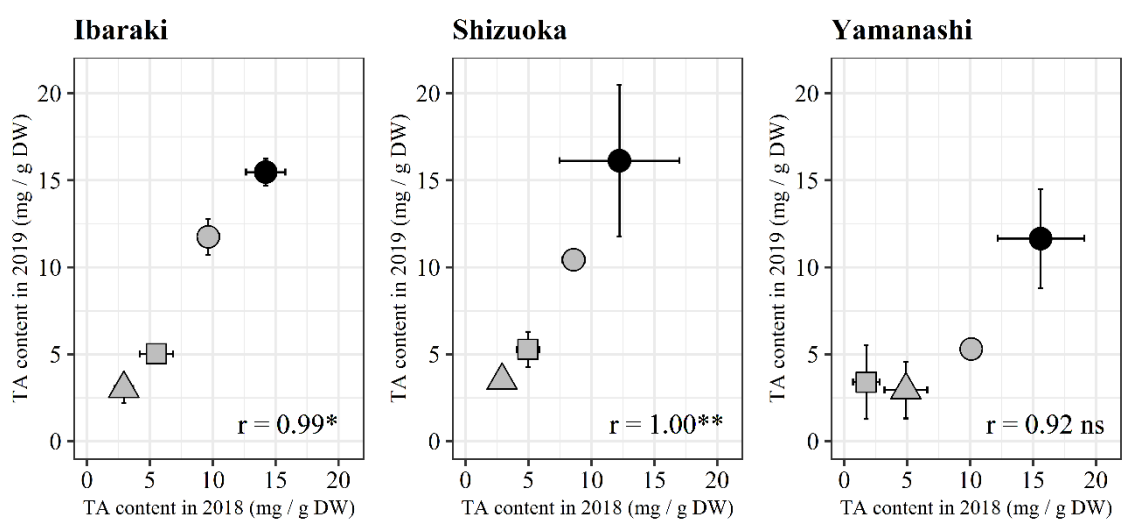


図 3-15. 各試験地の定植 2 年生（2018 年）と 3 年生（2019 年）クローン系統における TA 含有量の平均値の相関

2018：定植 2 年生，2019：定植 3 年生．○：高含有量型ジェネット由来（黒色：#26，灰色：#2），□：中含有量型ジェネット由来（#35），△：低含有量型ジェネット由来（#41）の TA 含有量． r ：ピアソンの相関係数．ns，*，**はそれぞれ有意差なし， $p < 0.05$ ， $p < 0.01$ で有意差があることを示す．バーは標準偏差を示す．

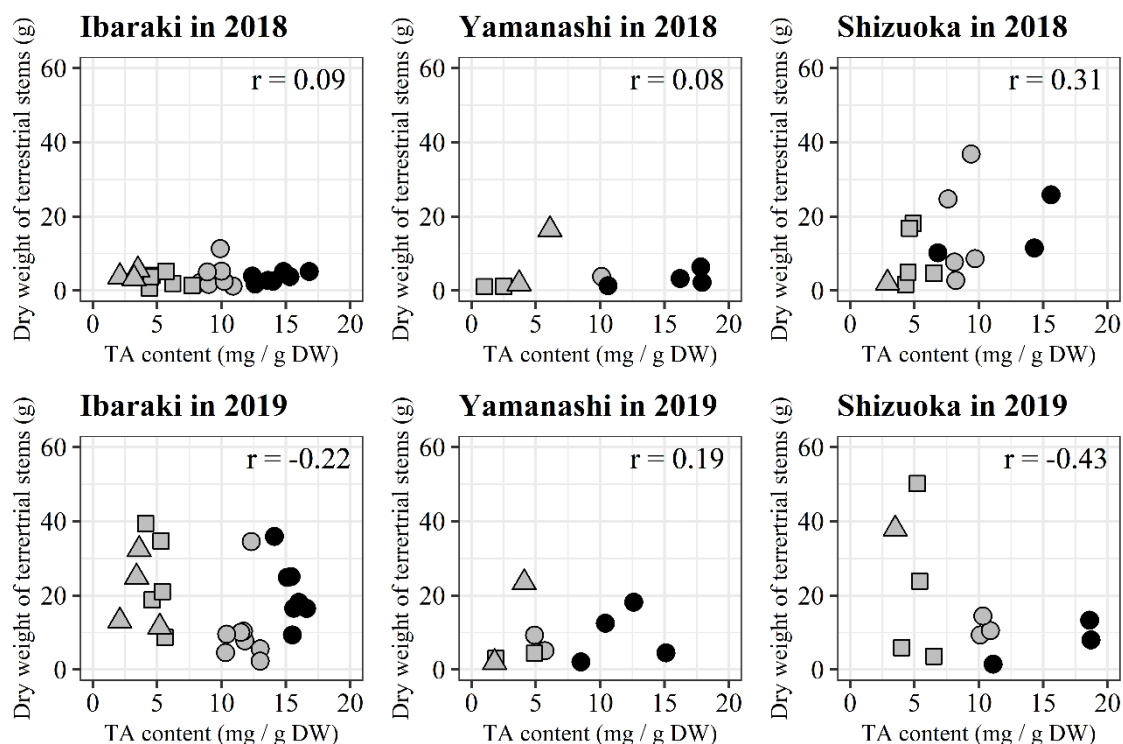


図 3-16. 各試験地の定植 2 年生と 3 年生クローン系統における TA 含有量と収量の相関

Ibaraki in 2018 : 茨城, 定植 2 年生, Yamanashi in 2018 : 山梨, 定植 2 年生, Shizuoka in 2018 : 静岡, 定植 2 年生, Ibaraki in 2019 : 茨城, 定植 3 年生, Yamanashi in 2019 : 山梨, 定植 3 年生, Shizuoka in 2019 : 静岡, 定植 3 年生. ○は高含有量型ジェネット由来 (黒色 : #26, 灰色 : #2), □は中含有量型ジェネット由来 (#35), △は低含有量型ジェネット由来 (#41) の平均 TA 含有量と平均収量を示す. r はピアソンの相関係数を示す. 5%水準の有意な相関関係は認められなかった.

表 3-1. 46 ジェネットにおける TA 含有量の経年評価

Genet	TA content (mg/g DW)								TA content Type
	2-year-old	3-year-old	4-year-old	5-year-old	6-year-old	7-year-old	8-year-old	Mean	
#1	5.5	3.9	4.2	3.4	4.1	4.7	5.1	4.4±0.7	Low
#2	9.6	10.9	10.5	10.3	9.7	10.4	10.4	10.3±0.5	High
#3	10.8	9.3	10.8	6.8	6.3	7.3	6.7	8.3±2.0	Middle
#4	6.2	5.0	4.2	2.5	7.6	5.9	4.0	5.1±1.7	Middle
#5	9.3	7.5	7.9	7.8	7.5	10.4	9.8	8.6±1.2	Middle
#6	6.0	6.0	6.1	5.1	4.6	5.8	5.8	5.6±0.6	Middle
#8	3.7	6.7	6.6	5.8	6.0	7.5	6.6	6.1±1.2	Middle
#9	10.5	12.6	13.7	11.6	11.5	13.6	12.3	12.3±1.2	High
#10	7.1	6.5	6.4	4.1	4.8	4.2	4.0	5.3±1.3	Middle
#11	7.4	5.3	3.6	4.5	4.2	4.8	3.9	4.8±1.3	Middle
#12	5.4	5.9	5.7	6.1	6.6	6.9	6.6	6.2±0.6	Middle
#13	6.3	7.7	7.4	4.8	7.0	7.6	8.1	7.0±1.1	Middle
#14	4.3	6.7	7.5	6.6	7.4	8.2	7.3	6.9±1.3	Middle
#15	8.6	5.8	6.8	4.7	6.1	6.5	5.5	6.3±1.2	Middle
#16	6.3	7.0	5.8	6.2	7.9	7.5	7.6	6.9±0.8	Middle
#17	4.0	5.3	5.3	5.0	5.6	5.4	5.6	5.2±0.6	Middle
#18	8.1	10.8	9.0	9.8	9.7	10.6	10.0	9.7±0.9	Middle
#19	11.8	15.6	14.5	15.2	17.4	15.5	14.0	14.9±1.7	High
#20	3.7	6.5	6.3	5.2	7.1	6.9	6.9	6.1±1.2	Middle
#21	8.4	8.3	7.1	6.9	6.5	7.8	8.7	7.7±0.9	Middle
#22	5.1	4.6	4.3	3.3	3.5	4.4	7.5	4.7±1.4	Low
#23	3.8	6.6	6.1	7.0	7.2	6.3	6.8	6.3±1.2	Middle
#24	6.2	7.6	7.3	7.5	9.5	7.2	8.2	7.6±1.0	Middle
#25	6.1	7.0	6.5	9.1	8.2	6.1	7.7	7.2±1.1	Middle
#26	5.9	14.0	12.3	11.8	15.1	14.2	12.4	12.2±3.0	High
#27	1.4	2.6	2.2	1.6	2.2	3.0	3.0	2.3±0.6	Low
#28	1.8	13.3	10.0	12.1	11.9	9.3	8.6	9.6±3.8	Middle
#29	7.2	7.6	8.4	8.8	7.7	7.8	7.1	7.8±0.6	Middle
#30	6.0	8.0	7.6	8.7	8.3	6.3	7.7	7.5±1.0	Middle
#31	4.3	8.9	8.4	8.8	8.2	7.4	8.8	7.8±1.6	Middle
#32	3.7	5.5	4.6	4.4	3.9	4.2	4.9	4.5±0.6	Low
#33	4.8	5.8	5.5	4.6	5.3	6.1	6.3	5.5±0.6	Middle
#34	13.8	13.7	14.2	16.0	16.3	16.1	15.9	15.1±1.2	High
#35	4.5	5.7	4.7	5.7	5.5	4.5	5.2	5.1±0.5	Middle
#36	8.8	9.3	10.0	10.1	9.8	10.4	10.2	9.8±0.6	Middle
#37	7.9	7.7	7.6	7.3	6.5	6.1	7.9	7.3±0.7	Middle
#38	8.9	10.8	11.8	11.8	12.8	14.7	15.8	12.4±2.3	High
#40	10.5	7.6	8.4	9.1	10.9	9.9	14.2	10.1±2.2	Middle
#41	2.5	4.1	1.9	1.3	1.8	2.2	2.2	2.3±0.9	Low
#42	6.3	10.4	9.6	7.8	9.6	10.2	9.9	9.1±1.5	Middle
#43	4.5	5.0	4.8	3.9	5.3	5.1	5.0	4.8±0.5	Middle
#44	7.4	8.0	6.6	5.1	7.6	7.6	7.1	7.1±1.0	Middle
#45	2.3	8.5	7.7	8.2	9.0	9.0	9.3	7.7±2.5	Middle
#46	5.5	6.4	7.6	6.7	8.5	7.0	8.1	7.1±1.0	Middle
#47	9.3	6.0	5.4	1.7	7.3	6.1	5.5	5.9±2.3	Middle
#50	2.6	2.4	2.4	1.4	2.1	1.8	1.6	2.0±0.5	Low
Mean	6.4±2.8 ^a	7.6±2.9 ^a	7.3±3.0 ^a	6.9±3.4 ^a	7.6±3.4 ^a	7.6±3.3 ^a	7.7±3.3 ^a		

Year-old : ジェネットの年生. TA content Type : ジェネットの TA 含有量型. 各ジェネットの 7 年分 (実生 2~8 年生) の平均 TA 含有量で分類した. TA 含有量が上位 15% を High, 下位 15% を Low, それら以外を Middle と定義した. Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行った. 異なる文字間で有意な差を示す ($p < 0.05$).

表 3-2. 46 ジェネットにおける収量の経年評価

Genet	Dry weight of terrestrial stems (g)							
	2-year-old	3-year-old	4-year-old	5-year-old	6-year-old	7-year-old	8-year-old	
#1	2.3	25.7	118.0	127.0	37.6	60.9	72.7	
#2	2.7	2.6	90.0	58.0	52.7	89.6	89.2	
#3	1.0	1.1	43.0	40.0	11.9	46.9	63.6	
#4	4.8	44.2	95.0	77.6	16.2	34.1	86.4	
#5	2.8	27.2	86.0	110.3	52.9	76.9	75.2	
#6	1.6	0.7	62.0	69.3	37.4	66.6	81.2	
#8	2.1	89.4	240.0	158.0	92.2	77.0	145.2	
#9	2.1	46.2	97.0	109.0	61.5	70.0	81.8	
#10	2.4	42.8	66.0	43.0	17.9	43.9	39.1	
#11	3.9	139.8	216.0	256.0	164.0	150.8	204.6	
#12	3.8	47.4	56.0	90.0	68.6	78.0	97.0	
#13	3.1	86.3	122.0	135.0	16.6	40.0	44.8	
#14	1.9	14.6	16.0	47.9	33.8	58.4	58.2	
#15	2.7	47.7	56.0	88.0	67.5	68.6	39.0	
#16	1.7	40.1	75.0	74.9	25.9	67.3	86.8	
#17	3.2	46.1	60.0	148.0	126.0	97.2	137.2	
#18	1.3	32.1	70.0	111.0	51.7	83.8	90.4	
#19	2.9	37.1	48.0	98.8	41.7	79.4	76.8	
#20	5.5	80.9	86.0	136.0	104.2	139.6	158.2	
#21	3.4	79.1	93.0	91.0	56.9	67.1	87.5	
#22	5.7	115.2	196.0	111.4	88.2	93.4	41.7	
#23	6.5	89.6	70.0	216.1	97.6	96.4	113.0	
#24	1.0	10.5	20.0	65.6	48.7	71.8	73.9	
#25	4.0	57.5	42.0	72.0	36.5	101.0	99.0	
#26	0.9	32.6	94.0	68.0	61.7	59.3	76.8	
#27	2.5	36.3	158.0	174.0	104.1	98.5	144.6	
#28	1.0	6.3	43.0	53.4	33.7	43.1	54.9	
#29	3.7	45.3	30.0	38.0	44.2	61.4	71.9	
#30	1.4	18.1	82.0	66.0	54.5	76.0	72.7	
#31	1.2	22.6	42.0	60.7	51.4	64.2	68.1	
#32	1.8	27.6	22.0	74.0	15.2	37.5	39.0	
#33	4.4	45.0	50.0	37.0	43.2	53.6	72.3	
#34	2.1	42.5	63.0	98.0	52.3	56.8	71.1	
#35	1.2	25.5	78.0	106.0	60.4	103.9	100.7	
#36	8.5	73.6	59.0	104.5	74.3	109.6	149.5	
#37	1.0	15.8	45.0	42.9	13.9	33.7	40.4	
#38	2.9	79.7	165.0	172.6	82.0	112.6	122.6	
#40	0.8	6.6	37.0	29.6	28.1	54.5	55.9	
#41	0.7	27.3	136.0	157.9	116.0	75.1	131.7	
#42	2.1	23.7	61.0	102.2	53.1	68.7	72.6	
#43	4.0	50.2	101.0	110.9	50.6	133.7	142.5	
#44	7.0	52.1	116.0	139.1	92.4	150.9	120.5	
#45	1.0	14.0	61.0	80.3	50.6	70.0	58.1	
#46	3.5	18.8	80.0	96.4	46.4	78.7	107.3	
#47	3.0	87.6	260.0	226.0	76.1	81.8	98.8	
#50	1.5	27.3	72.0	121.4	72.2	84.2	98.2	
Mean	2.8±1.8 ^a	43.1±31.1 ^b	86.5±55.5 ^{de}	102.0±51.2 ^e	58.4±32.2 ^{bc}	77.5±28.5 ^{cd}	89.4±36.6 ^{de}	

Year-old : ジェネットの年生. Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行った. 異なる文字間で有意な差を示す ($p < 0.05$).

表 3-3. TA 含有量の各年生間におけるスピアマンの順位相関係数

	TA content						
	2-year-old	3-year-old	4-year-old	5-year-old	6-year-old	7-year-old	8-year-old
2-year-old	-	0.52 ^{**}	0.57 ^{**}	0.43 ^{**}	0.47 ^{**}	0.54 ^{**}	0.50 ^{**}
3-year-old	-	-	0.94 ^{**}	0.90 ^{**}	0.86 ^{**}	0.89 ^{**}	0.88 ^{**}
4-year-old	-	-	-	0.91 ^{**}	0.85 ^{**}	0.90 ^{**}	0.88 ^{**}
5-year-old	-	-	-	-	0.89 ^{**}	0.86 ^{**}	0.90 ^{**}
6-year-old	-	-	-	-	-	0.88 ^{**}	0.88 ^{**}
7-year-old	-	-	-	-	-	-	0.90 ^{**}
8-year-old	-	-	-	-	-	-	-

Year-old は年生を示す. *, **は $p < 0.05$, $p < 0.01$ をそれぞれ示す.

表 3-4. 収量の各年生間におけるスピアマンの順位相関係数

	Dry weight of terrestrial stems						
	2-year-old	3-year-old	4-year-old	5-year-old	6-year-old	7-year-old	8-year-old
2-year-old	-	0.74 ^{**}	0.28	0.38 ^{**}	0.31 [*]	0.46 ^{**}	0.40 ^{**}
3-year-old	-	-	0.49 ^{**}	0.61 ^{**}	0.52 ^{**}	0.44 ^{**}	0.42 ^{**}
4-year-old	-	-	-	0.73 ^{**}	0.54 ^{**}	0.41 ^{**}	0.50 ^{**}
5-year-old	-	-	-	-	0.73 ^{**}	0.66 ^{**}	0.66 ^{**}
6-year-old	-	-	-	-	-	0.75 ^{**}	0.67 ^{**}
7-year-old	-	-	-	-	-	-	0.80 ^{**}
8-year-old	-	-	-	-	-	-	-

Year-old は年生を示す. *, **は $p < 0.05$, $p < 0.01$ をそれぞれ示す.

表 3-5. 各クローン系統の TA 含有量の経年評価

Clonal lines	TA content (mg/g DW)					
	Clones	1-year-old	2-year-old	3-year-old	4-year-old	5-year-old
#2	1	8.5	12.3	12.0	11.1	12.0
	2	7.6	12.2	12.1	9.5	11.9
	3	5.6	11.5	11.1	9.7	11.4
	4	5.2	12.5	12.2	10.6	12.0
	5	7.1	9.9	8.9	8.0	7.6
	mean	6.8±1.4 ^a	11.7±1.1 ^b	11.3±1.4 ^b	9.8±1.2 ^b	11.0±1.9 ^b
#19	1	7.5	13.8	13.4	11.7	18.7
	2	4.6	13.9	13.7	14.6	19.8
	3	4.9	10.7	13.6	18.4	18.5
	4	7.2	8.9	12.6	16.0	19.4
	5	7.4	10.7	15.2	18.0	20.3
	mean	6.3±1.4 ^a	11.6±2.2 ^b	13.7±0.9 ^{bc}	15.7±2.7 ^c	19.3±0.8 ^d
#26	1	3.3	14	15.8	13.7	16.1
	2	8.1	15.3	18.5	14.3	15.9
	3	8.9	20.3	20.4	17.6	17.1
	4	5.4	15	19.8	15.8	15.3
	mean	6.4±2.6 ^a	16.2±2.8 ^b	18.6±2.0 ^b	15.4±1.7 ^b	16.1±0.8 ^b

1-year-old～5-year-old は定植 1～5 年生を示す。2014 年から 2018 年にかけて定植 1 年生から定植 5 年生の評価を行った。Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行った。異なる文字間で有意な差を示す ($p < 0.05$)。

表 3-6. 各クローン系統の収量の経年評価

Clonal lines	Dry weight of terrestrial stems (g)					
	Clones	1-year-old	2-year-old	3-year-old	4-year-old	5-year-old
#2	1	4.2	11.6	29.2	67.6	61.9
	2	1.6	5	14.9	36.8	35.6
	3	2.4	9.3	19.5	37.2	19.9
	4	1.7	3.8	11.9	35.4	39.6
	5	1.4	3.6	12.9	19.3	19.8
	mean	2.3±1.2 ^a	6.7±3.6 ^a	17.7±7.1 ^{ab}	39.3±17.5 ^b	35.4±17.4 ^b
#19	1	0.9	8.2	19.7	35.1	58.7
	2	0.7	6.6	33.1	51.8	58.8
	3	1.3	9.1	23.7	30.3	33.0
	4	1.8	5.7	9.8	24.2	29.0
	5	1.2	3.7	9.8	21.4	32.2
	mean	1.2±0.4 ^a	6.7±2.1 ^a	19.2±9.9 ^{ab}	32.6±12.0 ^{bc}	42.3±15.1 ^c
#26	1	1.7	7.9	13.0	47.2	49.2
	2	4.6	19.5	34.2	71.8	56.1
	3	1.1	3.7	11.1	40.7	38.5
	4	5.0	13.9	29.7	43.4	46.7
	mean	3.1±2.0 ^a	11.3±6.9 ^a	22.0±11.7 ^a	50.8±14.3 ^b	47.6±7.3 ^b

Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行った。異なる文字間で有意な差を示す ($p < 0.05$)。

±は標準偏差を示す。

表 3-7. 各試験地の環境データ

Factor	Hokkaido			Ibaraki	Yamanashi	Shizuoka	Okinawa
	Eniwa	Toyoura	Taiki				
Average temperature (°C)	7.1	7.4	5.9	14.3	11.0	16.2	22.3
Highest temperature (°C)	31.1	30.2	32.8	35.9	33.4	30.3	32.9
Lowest temperature (°C)	-23.7	-17.6	-23.8	-7.4	-11.3	-1.9	11.1
Precipitation (mm)	1098	1109	1162	1520	1051	1969	2448
Soil type	Andosol	Andosol	Brown Forest soil	Andosol	Andosol	Lowland soil	Lowland soil
Soil texture	Loam	Loam	Loam	Loam	Loam	Sandy loam	Sandy loam
Soil pH	5.6	5.5	5.6	6.5	6.9	5.8	8.1
North latitude	42°92'	42°65'	42°53'	35°99'	35°78'	34° 64'	26°31'
East longitude	141°56'	140°66'	143°27'	140°19'	138°32'	138°11'	127°95'

気温および降水量は気象庁（2019）のデータを引用した．実生 3 年生時の地上茎を評価するため，前年の茎が刈り取られた 2013 年 10 月から収穫時の 2014 年 10 月までのデータを元に，平均気温，最高気温，最低気温および年間降水量を算出した．

表 3-8. 各試験地における平均 TA 含有量および平均収量 (2014 年)

Cultivation location	The number of genets	TA content	Dry weight of stems	Resion
		Mean (mg/g DW)	Mean (g/genet)	
Hokkaido Eniwa	37	6.2 ± 2.7^{ab}	3.0 ± 1.6^a	Hokkaido
Hokkaido Toyoura	46	4.4 ± 2.3^a	7.7 ± 3.7^b	
Hokkaido Taiki	56	5.0 ± 3.0^a	6.0 ± 3.2^{ab}	
Ibaraki	44	7.7 ± 2.6^{bc}	15.2 ± 8.0^c	Kanto-koshin-Tokai
Yamanashi	50	8.6 ± 3.2^c	13.3 ± 8.1^c	
Shizuoka	50	9.0 ± 4.0^c	30.9 ± 12.0^d	
Okinawa	50	4.5 ± 2.4^a	6.5 ± 5.0^{ab}	Okinawa

Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行った。異なる文字間で有意な差を示す ($p < 0.05$)。

±は標準偏差を示す。

表 3-9. 選抜ジェネットの移植前（2014 年）および移植後（2017 年）における TA 含有量

Selected genets	TA content (mg/g DW)		Selection types	Selection locations	Transplant date
	2014	2017			
HHT-042	18.4	18.2	High	Hokkaido Taiki	October 30 2015
HHT-057	12.3	13.3			
HHT-055	9.0	12.5			
HHT-052	8.6	11.9			
HHT-059	4.4	10.2	Intermediate		
HHT-064	3.6	8.6			
HHT-076	3.3	5.9			
HHT-060	3.2	4.1			
IA-091	11.6	14.5	High	Ibaraki	No transplant
IA-101	12.3	12.2			
IA-106	11.7	13.4			
IA-108	11.8	15.3			
IA-086	7.2	7.9	Intermediate		
IA-102	8.0	8.5			
IA-113	7.4	6.4			
IA-123	6.8	6.9			
YH-103	13.7	15.1	High	Yamanashi	
YH-128	17.7	11.7			
YH-133	13.8	16.7			
YH-146	18.2	21.4			
YH-123	9.3	10.4	Intermediate		October 30 2015
YH-124	8.4	7.7			
YH-131	9.3	7.8			
YH-150	9.3	13.8			
SO-108	17.2	13.4	High	Shizuoka	
SO-116	20.7	17.2			
SO-121	16.3	13.9			
SO-125	16.2	14.6			
SO-128	9.8	9.9	Intermediate		
SO-134	10.9	11.5			
SO-138	11.1	11.4			
SO-150	11.0	9.1			

High は TA 高含有量選抜ジェネット（各試験地の TA 含有量上位 10%の中から選抜した 4 ジェネット）、Intermediate は TA 中含量選抜ジェネット（各試験地の TA 含有量上位 30～70%の中から選抜した 4 ジェネット）を示す。2014 は各試験地（実生 3 年生）、2017 は移植後（実生 6 年生）を示す。

表 3-10. G×E 交互作用および広義の遺伝率(h^2)の推定に用いた供試材料

Clonal Lines	The number of clones (2017)		
	Ibaraki	Yamanashi	Shizuoka
#2	14	6	10
#26	9	9	13
#35	6	5	5
#41	3	3	2

表 3-11. 供試材料の各系統における生存数および収穫数

Clonal Lines	Locations	Transplant	Survivor		Harvest	
		1-year-old (2017)	2-year-old (2018)	3-year-old (2019)	2-year-old (2018)	3-year-old (2019)
#2	Ibaraki	14	8	8	8	8
#26		9	7	7	7	7
#35		6	6	6	6	6
#41		3	3	3	3	3
#2	Yamanashi	6	2	2	1	2
#26		9	4	4	4	4
#35		5	2	2	2	2
#41		3	2	2	2	2
#2	Shizuoka	10	5	3	5	3
#26		13	3	3	3	3
#35		5	5	4	5	4
#41		2	1	1	1	1

Year-old は定植年生を示す． Transplant は移植数， Survivor は生存数， Harvest は収穫数を示す．

表 3-12. 試験地ごとの各選抜系統における平均 TA 含有量

Clonal Lines	Ibaraki		Yamanashi		Shizuoka	
	2018 (mg/g DW)	2019 (mg/g DW)	2018 (mg/g DW)	2019 (mg/g DW)	2018 (mg/g DW)	2019 (mg/g DW)
#2	9.7±0.8	11.8±1.0	10.1	5.3±0.4	8.6±0.8	10.4±0.3
#26	14.2±1.4	15.5±0.7	15.7±3.0	11.7±2.5	12.2±3.8	16.1±3.6
#35	5.5±1.2	5.0±0.5	1.8±0.8	3.4±1.5	5.0±0.8	5.3±0.9
#41	2.9±0.6	3.0±0.7	4.9±1.2	3.0±1.2	2.9	3.5

2018 は定植 2 年生の平均 TA 含有量，2019 は定植 3 年生の平均 TA 含有量を示す．各系統の反復数は表 3-11 参照．±は標準偏差を示す．

表 3-13. TA 含有量に対する三元配置の分散分析表

Factors	Df	Mean Sq	F value	P (>F)
Genotype (G)	3	551.7	181.04	<2.0E-16 **
Location (L)	2	17.9	5.87	4.4E-03 **
Year (Y)	1	4.0	1.32	0.25
Genotype×Location (G×L)	6	6.2	2.03	0.07
Genotype×Year (G×Y)	3	1.4	0.46	0.71
Location×Year (L×Y)	2	25.9	8.50	5.0E-04 **
Genotype×Location×Year (G×L×Y)	6	7.7	2.53	2.9E-02 *
Residuals	68	3.0		

*, **は $p < 0.05$, $p < 0.01$ をそれぞれ示す.

表 3-14. TA 含有量に対する各主効果および交互作用の分散値と広義の遺伝率

Source of variance	Component of variance	Effective replication (r)	Broad sense heritability (h^2)
σ_g^2	24.33		
σ_l^2	0.00		
σ_y^2	0.00		
σ_{gl}^2	0.00		
σ_{gy}^2	0.00	3.78	0.99
σ_{ly}^2	1.20		
σ_{gly}^2	1.24		
σ_e^2	3.00		

σ_g^2 : Genotype (G) の分散値, σ_l^2 : Location (L) の分散値, σ_y^2 : Year (Y) の分散値, σ_{gl}^2 : G \times L 交互作用の分散値, σ_{gy}^2 : G \times Y 交互作用の分散値, σ_{ly}^2 : L \times Y 交互作用の分散値, σ_{gly}^2 : G \times L \times Y 交互作用の分散値, σ_e^2 : 誤差の分散値を示す.

第4章 総合考察

麻黄は、エフェドリンアルカロイドを含み葛根湯や小青龍湯、麻黄湯、防風通聖散、麻黄附子細辛湯などの処方に用いられる重要な生薬であるが、その全量を中国からの輸入に依存している。しかしながら、中国では麻黄の輸出（御影 2013, 神谷 2012）や野生採取が規制されている（海外環境協力センター 2001）。そのため、麻黄は供給リスクが高く、今後の安定供給に向けて、日本における生産が求められている。国内での安定生産に向けて、石川県にて 2020 年に国内初の麻黄が生産されたが、収穫量 400kg のうち 300kg は TA 含有量が日局 17 の規格値を下回った（北國新聞 2020）。さらに、麻黄の国内での安定生産には、これまで流通し、使用実績のある野生採取品と同等である 13.0 mg/g DW の TA 含有量が必要であり、TA 含有量の高含有量化および安定化が重要課題である。

本研究では、日本国内での麻黄の安定生産に向け、これまで明らかとなっていなかった日本に保存されている遺伝資源の育種材料としての適性や TA 含有量への遺伝要因や環境要因の影響を評価し、TA 含有量が育種目標である 13.0 mg/g DW 以上を有するシナマオウの選抜育種の有効性を検証した。

本研究では、保有する遺伝資源は遺伝的多様性を保持し、適した育種素材であることを明らかにした。TA 含有量、収量ともに変異幅が大きく、多様であり、TA 含有量が 13.0 mg/g DW を超える育種母材として適した 93 ジェネットを得ることができた。

シナマオウは雌雄異株の低木に属する裸子植物であり（岡田 2002）、異質四倍体（Wu *et al.* 2009）でゲノムサイズが 17.26~17.73pg (1c/value) と巨大である（Ickert-Bonda *et al.* 2020）。また、自生地やその集団によって、TA 含有量の変異幅が大きく（Wang *et al.* 2010, Hong *et al.* 2011）、自生地のシナマオウは遺伝的多様性が保存されている（Kitani *et al.* 2009）ことが明らかにされている。本研究で供試した遺伝資源においても、遺伝的多様性が保存されていたことから、シナマオウは遺伝的多様性を保持したまま自生あるいは栽培されている可能性が高い。一方で、今後、選抜育種が進むことにより、保有遺伝資源の遺伝的多様性が低下することが懸念される。日本におけるシナマオウの遺伝資源は限られており、今後、新規で遺伝資源を導入することは難しい。シナマオウのように、他殖性で栄養繁殖し、複倍数性を有し、ゲノムサイズが大きい作物として、サツマイモがある。サツマイモでは、遺伝的に遠縁となるようないくつかの集団内で目的遺伝子を集積して親系統を育成し、最終的に親系

統間で交配を行ってヘテロシスで収量を高めるという育種戦略が用いられてきた（田中 2018）。サツマイモでは、新たな遺伝資源の利用は少なく、既存の育成品種や有望系統間での交配が多い（田中 2018）。シナマオウは遺伝的多様性が大きいことから、新規遺伝資源を導入しなくても、交配により遺伝的多様性を増加させることが可能であると考えられる。しかしながら、シナマオウは株によって時期は異なるものの、雄株が先に開花し、その後、雌株が開花するため、交配が難しい。また、開花までに播種から複数年を要するため、雌雄の判別に時間を要する。現在、シナマオウでは、安定した交配および採種技術が確立していないものの、採種については、技術確立に向けて研究が進められており、日本の野外でも採種が可能となってきた（御影 2013, 倪ら 2020）。また、交配についても、花粉を採取し、維持する技術が確立されつつあり（倪ら 2020）、今後、交配による採種技術の確立が望まれる。

本研究では、ジェネットの TA 含有量は実生 2 年生、収量は実生 4 年生で安定し、ジェネットの選抜には TA 含有量では実生 3 年生以降、収量では実生 5 年生以降が適していることを明らかにした。また、ジェネットより増殖したクローン系統は、ジェネット間の変動に比べてクローン間の変動は小さく、クローンは定植 2 年生以降で TA 含有量が安定し、栽培開始から 2 年で由来ジェネットと同程度の含有量になることを示しており、クローンでも選抜の再現性があることを明らかにした。Stamp (2003) は 植物のアルカロイド含有量とバイオマスとの相関は植物種によって異なると報告している。トリカブト (*Acconitum Japonicum*) ではアコニチンアルカロイド含有量と根茎の重さとの間に負の相関があること（石崎ら 2018）、インドジャボク (*Rauwolfia serpentina*) ではレセルピン含有量と根の長さとの間に正の相関があること（Usmani *et al.* 2014）が報告されている。本研究では、シナマオウの TA 含有量と収量との間に相関は認められなかったものの、TA が高含有量でかつ収量も高いジェネットがあることを確認した。そこで、ジェネットの育成段階から選抜育種を始める場合、まず、TA 含有量について選抜を行い、その後、TA 含有量で選抜されたジェネットの中から収量について選抜を行う方が別々に選抜するよりも育種年数を短縮でき、かつ効率的に育種できる。今後、TA 含有量が高くかつ多収量のシナマオウを系統として選抜できることを見出した。

一方で、クローンの収量は定植 4 年生で安定したものの、由来ジェネットよりも低く、クローン内のばらつきが大きく、クローンによる再現性は確認できなかった。この要因として、採取したストロン株の大きさが異なっていたことが考えられる。国内で安定生産するため

には、収量は重要な要素であり、さらなる検討が必要である。

本研究では気候の異なる3地域（北海道、関東甲信東海、沖縄）でシナマオウを栽培し、関東甲信東海の3試験地（茨城、山梨、静岡）ではシナマオウの栽培ができることを明らかにした。シナマオウは乾燥地よりも年間降水量が多い日本においても、生育が良い場所があることがわかった。また、エフェドリンアルカロイド含有量の多寡は、遺伝要因以上に生育環境の影響を強く受けていること（Kondo *et al.* 1999）、生育の差がTA含有量に影響していること（Matsumoto *et al.* 2015）、生育不良が発生しやすい場所ではTA含有量が低くなる可能性があること（松本 2014）が報告されており、生育が良い場所ではTA含有量が高くなることが考えられる。施肥条件によりシナマオウのTA含有量が上昇することも報告されている（安藤ら 2016, 2020, 俣ら 2015 a）。本研究では栽培法まで検討できなかったが、育種以外にも施肥などによりTA含有量や収量を上昇させる条件を検討することが、今後の安定生産に向けた課題である。

どのような場所で選抜できるのか理解することは、育種を行う上で重要である。しかしながら、環境要因に対してTA含有量に影響を受けて変動するとの報告例（Kondo *et al.* 1999, Wang *et al.* 2010, 御影 2012）やTA含有量に影響を及ぼす環境要因の解明についての研究は行われてきたものの（御影ら 2019 a）、TA含有量の育種に向けた高含有量に対する選抜効果の検証は行われてこなかった。本研究の結果から、シナマオウはTAの高含有量に対する選抜の効果があり、ジェネットが枯死するような生育の悪い場所では選抜ができないものの、日本の複数の場所にて選抜が可能であることを明らかにした。

日本でのシナマオウの栽培および育種に向けて、これまでにマオウ属植物では報告されていないTA含有量に対する遺伝要因と環境要因の影響を明らかにした。また、生育が良好であった関東甲信東海地域にてTA含有量の広義の遺伝率および交互作用について調査し、その安定性を確認した。TA含有量では（G）、（L）、 $L \times Y$ および $G \times L \times Y$ 交互作用が有意に認められた（ $p < 0.05$ ）。第3章第2節では、7試験地のジェネットあたりのTA含有量の平均値が試験地の環境によって変動しており、TA含有量の選抜効果の検証時にも移植前後で選抜ジェネットのTA含有量が変動していた。これらの結果は、（L）の効果がTA含有量に対して有意であったことを支持しているが、クローン間では生育の差がTA含有量に影響することが報告されている（Matsumoto *et al.* 2015）。また、生育が試験地によって異なっていたことから、生育の影響によって変動したことが示唆される。一方で、本研究では複数試

験地で TA の高含有量に対する選抜効果があったこと、広義の遺伝率が高く、(G) の分散値が最も高い値であったことから、遺伝要因の影響が大きく、環境の効果は小さいといえる。また、 $L \times Y$ および $G \times L \times Y$ 交互作用も有意に認められたものの ($p < 0.05$)、各分散値は (G) の効果よりも小さく、高含有量型ジェネットでは TA 含有量が高く安定していた。以上より、TA 高含有量型のクローン系統は、場所および年次によらず、高く安定することを明らかにした。他植物種におけるアルカロイド含有量についても、インドジャボク (*Rauwolfia serpentina*) のレセルピン (Usmani *et al.* 2014) やケシ (*Papaver somniferum*) のモルヒネ (Hemant *et al.* 2006) などでは広義の遺伝率が高いことが報告されており、アルカロイド含有量の遺伝率は高い傾向にある。また、シナマオウのようにアルカロイド含有量の規格値が日局 17 によって定められている生薬は多く (厚生労働省 2016)、本研究で示した選抜育種が他の植物種のアルカロイド含有量を高めることに有効である可能性を示している。

TA 含有量 13.0 mg/g DW 以上の麻黄を日本で生産していくためには、育成した系統を大量に増殖して栽培していく必要がある。本研究において、クローンによる再現性が得られたことから、今後、母本となるジェネットの初期選抜に加えて、挿し木などの複数のクローン増殖技術を駆使して増殖していくことが重要である。また、まだ確立していない組織培養法についても、大量増殖のみならず遺伝資源の維持の必要不可欠であり、今後、確立に向けた検討を行う必要がある。

麻黄の薬効として発汗、解熱、鎮咳、抗炎症、鎮痛などが知られており、これらの薬効はエフェドリンアルカロイドのみで説明できるとされている (原田 1980)。しかしながら、近年の麻黄の薬効に関する研究では、薬効の一部である鎮痛作用、抗インフルエンザ作用、抗ガン作用はエフェドリンアルカロイドに依存しないとの報告がある (Hyuga *et al.* 2013)。また、麻黄の非アルカロイド成分の構成が産地によって異なっていること (Oshima *et al.* 2019)、上記の薬効に寄与する非アルカロイド画分としてフラボノイドである herbacetin の配糖体が見いだされたこと (Amakura *et al.* 2013)、縮合タンニンが活性画分として示唆されたこと (天倉 2019) が報告されている。現在、日局 17 で規定されている成分は TA のみであるが、医薬品としての麻黄の品質を向上させるためには、上記のエフェドリンアルカロイド以外の二次代謝産物についても、シナマオウの成分育種を行うことが今後の課題となってくる。本研究では、高含有量の TA を保有するジェネットが多数見いだされており、この中からさらにスクリーニングし、他の二次代謝産物に対する選抜を行うことも可能である。また本研究

で示してきた TA 含有量に対する育種戦略は他の二次代謝産物にも適用できる可能性があり、今後のシナマオウにおけるアルカロイド以外の成分育種への応用の道筋も示せた。

現在、日本における生薬自給率は 10%程度と低く（山本ら 2019）、生薬が普及できない原因の一つとして、成分含有量が低いことがあげられる。また、中国でも植物性生薬のうち、大規模栽培が行われている品目はその 46%のみであり（小松 2019）、野生品に依存している品目も多い。これらの大規模栽培されている生薬の基原植物についても、栽培されているものの育種されておらず、遺伝的多様性が高く保持されている可能性が高いことが想定される。今後、生薬の持続的な安定供給に向けて、国産生薬を増やしていくためにも、複数の生薬で成分含有量を高めていく育種が求められている。本研究で示したシナマオウのエフェドリンアルカロイド含有量に関する選抜育種の基礎的知見を活用し、高品質な生薬の安定生産にむけた成分育種への応用につなげることができると考えられる。

本研究では、シナマオウの選抜育種は有効であり、TA 高含有量の系統に適した場所で栽培することで、日本でも高品質な麻黄の生産ができる可能性があることを示した。

摘要

麻黄は *Ephedra sinica* (以下, シナマオウ) の乾燥させた地上茎である。麻黄はエフェドリンアルカロイドを含み, 葛根湯や小青龍湯, 麻黄湯等の重要な医療用漢方製剤に用いられている。医薬品の品質基準が定められている第 17 改正日本薬局方 (以下, 日局 17) には, 麻黄は総アルカロイド ((-)-Ephedrine と (+)-Pseudoephedrine の総和: 以下, TA) 含有量 7.0mg/g DW を満たすものと定められている。麻黄はその全量を中国からの輸入に依存しているものの, 中国では資源保護のため, 輸出や野生採取が規制されており, 供給リスクが高い。また, 栽培された麻黄の TA 含有量は野生採取品 (およそ 13.0mg/g DW) よりも低いことが課題となっており, 麻黄が配合されている医療用漢方製剤の安定供給には, 野生採取品と同等の TA 含有量を有する麻黄が必要である。したがって, 品質を満たした麻黄を安定供給するためには, 日本での生産や育種が求められている。石川県で麻黄が生産されたが (北國新聞 2020), その TA 含有量が低く, 国内での安定生産をするためには大きな課題である。

本研究では日本国内での麻黄の安定生産に向け, TA 含有量 13.0mg/g DW を育種目標とし, シナマオウ TA 含有量の育種には選抜育種が有効であることを検証するため, 日本における保有遺伝資源の育種材料としての適性や TA 含有量の経年変動, 選抜効果, TA 含有量への遺伝要因および環境要因の影響について評価した。

保有遺伝資源の育種材料としての適性を評価するため, 種子から 1003 ジェネットを育成し, TA 含有量および収量を茨城で評価した。その結果, TA 含有量と収量の変異幅は大きく, 育種目標値を超えるジェネット数は 84 であった。また, 別途, 46 ジェネットを育成し, EST-SSR マーカーを用いて遺伝子型を調査した結果, 遺伝的多様性を保持した集団であることが示され, 保有遺伝資源は育種材料として適していることを明らかにした。

中国では, シナマオウは 10 年以上栽培され, 地上部のみが毎年収穫されている。そこで, 46 ジェネットとその 3 クローン系統における TA 含有量および収量の経年変動を茨城で調査した。ジェネットおよびクローンにおける TA 含有量の平均値は 2 年生で安定し, 収量の平均値は 4 年生で安定することが明らかとなった。また, TA 含有量はジェネット間差が大きいものの経年変動は小さく, 各クローン系統は由来ジェネットと同程度の値を示し, クローンによる再現性を得ることができた。実生 2 年生から 8 年生までのジェネットにおける TA 含有量の順位相関は, 実生 3 年生以降有意に高かったことから, 実生 3 年生以降のジェ

ネットから選抜することによって TA 含有量を高め、安定させることができる。さらに、収量と TA 含有量との間には有意な相関関係は認められず、TA 含有量と収量ともに高いジェネットがあったことから、TA 含有量と収量の同時選抜が可能であることを示した。また、7 年間、育種目標値を超えるジェネットを 1 ジェネット得ることができた。

シナマオウは中国北部からモンゴルにかけての乾燥地に自生しており、日本には自生していない。そこで、自生地とは環境の異なる日本におけるシナマオウの栽培地を評価するため、環境の異なる 3 地域（北海道、関東甲信東海、沖縄）を選定し、その中の 7 か所の試験地（北海道 3 か所、茨城、山梨、静岡、沖縄）にて、およそ 50 のジェネットをそれぞれ栽培し、TA 含有量と収量を評価した。その結果、TA 含有量および収量の平均値は、試験地の環境によって変動するものの、関東甲信東海（茨城、山梨、静岡）は TA 含有量の平均値が日局 17 の規格値を超え、収量の平均値も高く、生育も良好であった。よって、日本の環境でもシナマオウの栽培が可能であり、関東甲信東海は他の 2 地域よりも栽培地として適していると考察した。TA 含有量は試験地の環境の影響を受けることから、選抜を行うためには、異なる選抜地での TA の高含有量に対する選抜の効果を検証する必要がある。そこで、4 か所の試験地（北海道、茨城、山梨、静岡）よりジェネットを選抜し、1 試験地（茨城）へ移植し、選抜の効果を検証し、どの試験地でも高含有量に対して選抜効果があることを明らかにした。また、育種目標値を超えるジェネットを 8 ジェネット得ることができた。よって、TA 含有量の高いシナマオウを複数の栽培地で選抜が可能であることを示した。

育種や栽培の基礎的知見となるシナマオウの TA 含有量に対する環境効果や遺伝性を検証するため、生育が良好であった関東甲信東海の 3 試験地（茨城、山梨、静岡）で 4 クローン系統を用いて広義の遺伝率と $G \times E$ 交互作用を評価した。その結果、 G （遺伝子型）、 L （場所）、 $L \times Y$ （年）交互作用、 $G \times L \times Y$ 交互作用が有意であったものの、 G の分散値が最も高くかつ広義の遺伝率も 0.99 と高い値を示した。また、TA が高含有量の系統は各場所・各年ともに安定して高かったことから、日本におけるシナマオウのクローンを用いた TA 高含有量に対する選抜育種は有効であるといえる。

本研究において、シナマオウ TA 含有量の育種には、選抜育種が有効であり、TA 高含有量の系統を栽培に適した場所で栽培することにより、日本でも目標値である TA 含有量 13.0mg/g DW を超える麻黄が生産できる可能性があると結論した。

謝辞

本論文をとりまとめるにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系教授 大澤良博士に心より感謝申し上げます。学位論文審査において、貴重なご指導とご助言をいただきました同教授 林久喜博士、同准教授 吉岡洋輔博士、ならびに先端農業技術科学専攻連携大学院教授 乙部千雅子博士に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行する機会を与えていただきました株式会社ツムラ 元生薬研究所長 武田修己氏、前生薬研究所長 橋本和則博士、元栽培研究部長 近藤健児博士、ならびに生薬一部長 小柳裕和氏に感謝申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、実験の実施および論文執筆に関して数多くのご指導とご助言ならびに激励を頂きました株式会社ツムラ 牧野文昌博士、津坂宜宏博士に感謝申し上げます。実験の実施に関して、成分定量でご助力いただきました株式会社ツムラ 小沢彩氏、遺伝子型解析でご助力いただきました公益財団法人かずさ DNA 研究所 磯部祥子博士、同 DNA 解析センターの皆様、ならびに茨城県農業総合センター生物工学研究所 陳蕤坤博士、栽培管理や加工調製で熱心なご助力いただきました株式会社ツムラ 酒井幹雄氏、植竹晶子氏、黒沢輝枝氏、株式会社夕張ツムラ 佐々木聡子氏、株式会社薬善 赤堀秀幸氏、特定非営利活動法人 えがおつなげて 曾根原久司氏に感謝申し上げます。

本研究を実施するための環境を整備し、支援していただきました株式会社ツムラ 菊地原博士、熊澤広明氏、松葉知浩氏、神保智一氏、佐野朋子博士に感謝申し上げます。

最後に、今日に至るまでの学生生活に対して、暖かく見守り支援してくれた家族には深い感謝の意を示して謝辞と致します。

引用文献

- Amakura Y, Yoshimura M, Yamakami S, Yoshida T, Wakana D, Hyuga M, Hyuga S, Hanawa T, Goda Y (2013) Characterization of Phenolic Constituents from Ephedra Herb Extract. *Molecules* 18: 5326-5334
- 天倉吉章 (2019) エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFE) の活性画分の解析と評価. 日本生薬学会第 66 回年会 講演要旨集 78-79
- 安藤広和, 倪斯然, 佐々木陽平, 御影雅幸 (2016) 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. *薬用植物栽培研究* 38: 20-27
- 安藤広和, 伊藤ほのか, 落合真梨絵, 金田あい, 工藤喜福, 佐々木陽平, 倪斯然, 野村行宏, 御影雅幸 (2020) マオウ属植物の栽培研究 (第 16 報) 一施肥及び地上茎の刈込みが栽培株のアルカロイド含量に与える影響一. *薬用植物栽培研究* 42: 30-39
- Caveney S, Charlet DA, Freitag H, Maier-Stolte M, Starratt AN (2001) New observations on the secondary chemistry of world *Ephedra* (Ephedraceae). *American Journal of Botany* 88: 1199-1208
- 福嶋昭 (2013) 兵庫県における薬草栽培の歴史と技術指導. *特産種苗* 16: 133-135
- 袴塚高志 (2020) 日本薬局方における生薬の標準化. *YAKUGAKU ZASSHI* 140: 783-788
- 原田正敏 (1980) 麻黄の薬理. *現代東洋医学* 1: 34-39
- Hayashi K, Shimura K, Makino T, Mizukami H (2010) Comparison of the contents of kampo decoctions containing ephedra herb when prepared simply or by re-boiling according to the traditional theory. *Journal of Natural Medicines* 64: 70-74
- 林茂樹 (2013) カンゾウの新品種育成について. *特産種苗* 16: 28-30
- Hemant K, Shukla YS, Singh SP (2006) Genetic variability and interrelationship among opium and its alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Euphytica* 150: 207-214
- 北國新聞 (2020) 2020 年 1 月 4 日. <https://www.hokkoku.co.jp/subpage/H20200104105.htm>
(2020 年 11 月 24 日)
- Hong H, Chen HB, Yang DH, Shang MY, Wang X, Cai SQ, Mikage M (2011) Comparison of contents of five ephedrine alkaloids in three official origins of Ephedra Herb in China by high-performance

- liquid chromatography. *Journal of Natural Medicines* 65: 623-628
- 堀澄人 (2013) 長野県における薬用作物の生産体制整備について. 特産種苗 16: 122-124
- Hyuga S, Hyuga M, Yoshimura M, Amakura Y, Goda Y, Hanawa T (2013) Herbacetin, a constituent of ephedrae herba, suppresses the HGF-induced motility of human breast cancer MDA-MB-231 cells by inhibiting c-met and akt phosphorylation. *Planta Medica* 79: 1525-1530
- Ickert-Bond SM, Sousa A, Min Y, Loera I, Metzgar J, Pellicer J, Hidalgo O, Leitch IJ (2020) Polyploidy in gymnosperms – Insights into the genomic and evolutionary consequences of polyploidy in *Ephedra*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 147: 106786
- 石崎昌洋, 川口敷美, 高橋行継, 和田義春 (2018) トリカブトの塊根の大きさとアコニチン系アルカロイド成分含有率との関係および塊根内での成分の分布について. 日本作物学会紀事 871: 76-82
- Jiao SQ, Sun YQ, Zhang DX, Gao Q, Jin Y, Liu H, Ma Y, Yang Y, Porth I, Mao JF (2019) Development of novel EST-SSR markers for *Ephedra sinica* (Ephedraceae) by transcriptome database mining. *Applications in Plant Sciences* 7: e01212
- JETRO(2019)https://www.jetro.go.jp/ext_images/jfile/country/cn/trade_02/pdfs/cn2F010_exp_item.pdf (2019 年 11 月 10 日)
- 株式会社ツムラ (2018) Integrated Report 総合報告書 2018.
<https://www.tsumura.co.jp/corporate/togoreport/pdf/2018.pdf> (2020 年 10 月 23 日)
- 株式会社ウチダ和漢薬 (2020) 生薬の玉手箱 麻黄 (2)
<https://www.uchidawakanyaku.co.jp/kampo/tamatebako/shoyaku.html?page=343>
(2021 年 1 月 25 日)
- 海外環境協力センター (2001) 環境省 平成 12 年度環境省委託調査 日中環境協力情報資料集 –中国の環境保全の状況と日中環境協力事例– <2000 年度版>
<http://www.env.go.jp/earth/coop/jcec/2000/jcec-2000-1.pdf> (2020 年 11 月 26 日)
- 梶村計志, 岩本嗣, 山崎勝弘, 坂上吉一, 横山浩, 米田該典 (1994) *Ephedra distachya* の成長とエフェドリン系アルカロイド含量の変動. *生薬学雑誌* 48: 122-125
- 神近牧男, 山本太平 (1986) 中国毛鳥素砂漠における自然環境について一, 三の気象・土壌特性一. 鳥取大学砂丘研究所報告 25: 27-35
- 神谷洋 (2012) 麻黄の選品と流通. 第 28 回生薬に関する懇談会『麻黄』講演要旨集: 2-8

- 笠原義正, 早坂英記, 大場慶司, ヒキノヒロシ (1986) マオウにおけるエフェドリン系アルカロイドの季節的变化. 生薬学雑誌 40: 390-392
- 川原信夫 (2013) 今後の日本における薬用植物の国内栽培化に関する展望. 特産種苗 16: 1-2
- 気象庁 (2019) <https://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/index.php> (2019 年 11 月 20 日)
- Kitani Y, Zhu S, Omote T, Tanaka K, Batkhuu J, Sanchir C, Fushimi H, Mikage M, Komatsu K (2009) Molecular analysis and chemical evaluation of Ephedra plants in Mongolia. Biological and Pharmaceutical Bulletin 32: 1235-43
- 国土交通省 水管理・国土保全局 水資源部 (2019) 令和元年版 日本の水資源の現況について. <https://www.mlit.go.jp/common/001316355.pdf> (2020 年 11 月 25 日)
- 小松かつ子 (2019) 伝統薬の永続的利用を目指して. 日本生薬学会第 66 回年会 講演要旨集: 2-3
- Komatsu T, Yamada M, Hakuzan R (2004) Genetic variation of agronomic traits in diploid Rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth) populations. Grassland Science 50: 24-30
- Kondo N, Mikage M, Idaka K (1999) Medico-botanical studies of Ephedra plants from the Himalayan region, Part III Causative factors of variation of alkaloid content in herbal stems. Natural Medicines 53: 194-200
- 厚生労働省 (2016) 第十七改正日本薬局方 pp2602
- Leung, A.Y. and S. Foster (1996) Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York. pp649
- 李博主編, (1990) 内蒙古鄂爾多斯高原自然資源与環境研究. 科学出版社, 北京 pp227
- Liu YM, Sheu SJ, Chiou SH, Chang HC, Chen YP (1993) A comparative study on commercial samples of Ephedrae Herba. Planta Medica 59: 376-378
- 牧野利明 (2015) いまさら聞けない生薬・漢方薬. 医薬経済社 東京, pp199
- 松本昌士 (2014) マオウ属植物のアルカロイド含量の変異に関する研究. 博士論文 金沢大学 石川, pp69
- Matsumoto M, Hirayama M, Ohtomi N, Ohno T, Nomura Y, Iida O, Sugimura K, Kawahara N, Tsuchida T, Mikage M (2015) Influence of genetic factors on the ephedrine alkaloid composition ratio of *Ephedra* plants. Journal of Natural Medicines 69: 63-67

- Mikage M, Kakiuchi N (2005) The recent situation of the resources of Chinese crude drug Ma-huang, *Ephedrae Herba*. *Journal of Traditional Medicines* 22(Suppl.1): 61-69
- 御影雅幸 (2012) 麻黄の国内生産に向けて. 第 28 回生薬に関する懇談会『麻黄』講演要旨集 : 9-12
- 御影雅幸 (2013) 麻黄 (マオウ) の国内栽培を目指して. 特産種苗 16: 53-57
- 御影雅幸, 落合真梨絵, 細川理佐, 倪斯然 (2019 a) マオウ属植物の栽培研究 (第 13 報) 生育及びアルカロイド含量に及ぼす栽培土壌環境の検討. 薬用植物研究 41: 14-22
- 御影雅幸, 井上穂香, 野村行宏, 倪斯然 (2019 b) マオウ属植物の栽培研究 (第 14 報) *Ephedra sinica* Stapf 株分け法に関する検討 (2) 薬用植物研究 41: 28-35
- Milligan SB, Gravois KA, Bischoff KP, Martin FA (1990) Crop effects on broad-sense heritabilities and genetic variances of Sugarcane yield components. *Crop Science* 30: 344-349
- 長友秀昌 (2013) 薬用作物を巡る最近の状況. 特産種苗 16: 3-5
- 中島和彦 (2013) 北海道における薬用作物の生産振興. 特産種苗 16: 109-111
- 南家進吾, 山本晴彦, 山崎俊成, 高山成, 王秀峰 (2018) 中国内蒙古自治区における降水量の長期変動解析. 自然災害研究協議会 中国地区部会 研究論文集 第 4 号 51-54
- 奈良県農林部農業水産振興課 (2013) 奈良県における「漢方のメッカ推進プロジェクト」の取組について. 特産種苗 16: 136-139
- 日本漢方生薬製剤協会 (2015) 中国産原料生薬の価格調査 第 3 回 (2015 年実施). <https://www.nikkankyo.org/serv/serv3.htm>. (2020 年 11 月 25 日)
- 日本漢方生薬製剤協会 (2018) 漢方の将来ビジョン 2040 ～国民の医療と健康を担う～. <https://www.nikkankyo.org/action/pdf/vision2040.pdf> (2019 年 11 月 20 日)
- 日本漢方生薬製剤協会 総務委員会編 (2019) 漢方製剤等の生産動向 平成 30 年「薬事工業生産動態統計年報」から. <https://www.nikkankyo.org/serv/movement/h30/all.pdf>. (2019 年 11 月 20 日)
- 日経メディカル編集部 (2003) 漢方薬使用実態調査, 日経メディカル 東京 10 (別冊) 33-38
- 倪斯然, 佐々木陽平, 野村行宏, 月元洋輔, 金田あい, 安藤広和, 三宅克典, 御影雅幸 (2015 a) マオウ属植物の栽培研究 (第 5 報) 草質茎の挿し木法の検討 (2) 薬用植物研究 37 (2) : 1-7

- 倪斯然, 佐々木陽平, 三宅克典, 蔡少青, 御影雅幸 (2015b) マオウ属植物の栽培研究 (第 6 報) 中国内蒙古自治区のマオウ栽培地における現地調査報告. 薬用植物研究 37 (2) : 9-17
- 倪斯然, 工藤喜福, 御影雅幸 (2017) マオウ属植物の栽培研究 (第 10 報) 草質茎の挿し木法の検討 (3) 挿し穂の前処理が発根に及ぼす影響. 薬用植物研究 39: 13-21
- 倪斯然, 工藤喜福, 安藤広和, 佐々木陽平, 御影雅幸 (2018a) マオウ属植物の栽培研究 (第 11 報) 草質茎の挿し木法の検討 (4) 挿し木の適期に関する研究. 薬用植物研究 40: 22-28
- 倪斯然, 安藤広和, 金田あい, 工藤喜福, 蔡少青, 御影雅幸 (2018b) マオウ属植物の栽培研究 (第 12 報) 中国内蒙古自治区のマオウ栽培地における現地調査報告 (2). 薬用植物研究 40: 29-37
- 倪斯然, 井上穂香, 加藤由華, 金田あい, 野村行宏, 安藤広和, 佐々木陽平, 御影雅幸 (2020) マオウ属植物の栽培研究 (第 15 報) *Ephedra sinica* Stapf 種子の発芽に関する新知見. 薬用植物研究 42: 22-29
- 野村行宏, 佐々木陽平, 三宅克典, 御影雅幸 (2013) マオウ属植物の栽培研究 (第 3 報) シナマオウの株分け及び木質茎の挿し木による種苗生産の検討. 薬用植物研究 35: 10-15
- 野村行宏, 佐々木陽平, 三宅克典, 御影雅幸 (2015) マオウ属植物の栽培研究 (第 4 報) 草質茎の挿し木法の検討 (1). 薬用植物研究 37 (1) : 1-7
- 岡田稔 (2002) 新訂原色牧野和漢薬草大圖鑑 北隆館 東京 pp892
- 大江勇 (2013) 富山県の薬用植物栽培に関する取り組み. 特産種苗 16: 129-132
- 大富規弘, 野村幸宏, 井出達也, 大野剛史, 毛利千香, 御影雅幸 (2013) マオウ属植物の栽培研究 (第 2 報) 海水がシナマオウの生長およびアルカロイド含量に及ぼす影響. 薬用植物栽培研究 35: 1-8
- Oshima N, Yamashita T, Uchiyama N, Hyuga S, Hyuga M, Yang J, Hakamatsuka T, Hanawa T, Goda Y (2019) Non-alkaloidal composition of Ephedra Herb is influenced by differences in habitats. Journal of natural medicines 73: 303-311
- Price RA (1996) Systematics of the Gnetales: a review of morphological and molecular evidence. International Journal of Plant Sciences 157 (suppl. 6): 40-49
- 佐橋佳郎 (2019) 生薬のひとつとき ～中国の新しい産地情報～. 日本生薬学会第 66 回年会

講演要旨集 20-21

- 斉藤和季 (2017) 植物はなぜ薬をつくるのか. 文藝春秋 東京 pp240
- 佐竹元吉, 飯田修, 川原信夫 (2002) 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 pp339
- 上海科学技術出版社 (1985) 中薬大辞典 第四卷. 小学館 東京 pp707
- 柴田敏郎 (2013) シャクヤクの薬用品種育成について. 特産種苗 16: 24-27
- Stamp N. (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. Quarterly Review of Biology 78: 23-55
- 鈴木清史 (2013) トウキ原種苗の安定生産に向けた取り組み. 特産種苗 16: 112-116
- 竹谷孝一, 鳥居塚和生 (2012) パートナー生薬学 改訂第2版. 南江堂 東京 pp438
- 田中勝 (2018) サツマイモ遺伝資源の保存と利用. 農業および園芸 93: 967-972
- 田中俊弘, 大場幸次, 川原一仁, 酒井 英二 (1995) 市場品麻黄各種の成分組成の比較エフェドリン系アルカロイドについて. Natural medicines 49: 418-424
- 鵜飼保雄 (2002) 量的形質の遺伝解析. 医学出版 東京 pp392
- Usmani G, Chawhaan PH, Mishra Y, Mandal AK (2014) Variability, heritability and character association analysis of chemoagronomic traits in *Rauwolfia serpentine*. Euphytica 200: 259-268
- Wang LL, Kakiuchi N, Mikage M (2010) Studies of *Ephedra* plants in Asia. Part 6: Geographical changes of anatomical features and alkaloids content of *Ephedra sinica*. Journal of Natural Medicines 64: 63-69
- Wu J, Li S, Jiang H, Gao Y, Niu J (2009) Staining and slide-preparing technique of mitotic chromosomes and application in karyotype determination of *Ephedra*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 34: 2725-2729
- 山本豊, 黄秀文, 佐々木博, 武田修己, 樋口剛央, 向田有希, 森祐悟, 山口能宏, 白鳥誠 (2019) 日本における原料生薬の使用量に関する調査報告. 生薬学雑誌 73: 16-35
- 吉田実 (1998) 畜産を中心とする実験計画法 第8版. 養賢堂 東京 pp473
- 吉松嘉代 (2018) 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書 研究開発課題名: 安心・安全・高品質な漢方薬原料生薬の持続的利用を指向した薬用植物バイオナリーサリーの構築とブランド生薬の開発に関する研究.
<https://www.amed.go.jp/content/000032450.pdf> (2019年11月13日)

吉澤千絵子，北出万紀子，御影雅幸（2005）麻黄に関する史的考察（1）古来の正品ならびに
和産麻黄の原植物について．薬史学雑誌 40: 107-116