

キハダ22年生クローンのアлкаロイド含有率と成長

Alkaloid content and growth of 22 years old clone in *Phellodendron amurense*

谷口亨*1・河村文郎*2・高田直樹*1・磯田圭哉*3・松下通也*3・佐藤新一*4・濱本光*3・佐藤省治*4
 Toru TANIGUCHI*1, Fumio KAWAMURA*2, Naoki TAKATA, Keiya ISODA, Michinari MATSUSHITA, Shinichi SATO,
 Hikaru HAMAMOTO and Syoji SATO

*1 森林総合研究所森林バイオ研究センター

FFPRI, Forest Bio-research Center, Ishi 3809-1, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301

*2 森林総合研究所

FFPRI, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687

*3 森林総合研究所木林育種センター

FFPRI, Forest Tree Breeding Center, Ishi 3809-1, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301

*4 森林総合研究所木林育種センター九州育種場

FFPRI, Forest Tree Breeding Center, Kyusyu Regional Breeding Office, Koshi, Kumamoto, 861-1102

要旨: キハダはミカン科キハダ属の落葉高木であり、内樹皮はベルベリンやパルマチンを含み、生薬原料に供されている。宮崎県産の22年生接ぎ木クローンの内樹皮のアлкаロイド(ベルベリンとパルマチン)含有率を調査し、胸高直径や内樹皮厚との関係を解析した。ベルベリンの含有率は95個体の実測値で平均4.0%(2.2~7.5%)、クローン(48遺伝子型)の推定値の平均値は3.9%(2.9~5.7%)であった。一方、パルマチンの含有率は、ベルベリンよりも少なく、個体の実測値は平均0.5%(0~1.6%)、クローン推定値は平均0.4%(0~1.3%)であった。ベルベリン含有率には、胸高直径や内樹皮厚と正の相関関係が見られ、成長特性に優れた個体を選抜すれば、ベルベリン含有率が高くなることが示唆された。一方、パルマチン含有率は胸高直径や内樹皮厚との相関関係は見られなかった。

キーワード: ベルベリン・パルマチン・胸高直径・内樹皮厚

Abstract: *Phellodendron amurense* is a medicinal woody plant, belonging to the family Rutaceae. Inner bark of this species contains berberine and palmatine, and it is used for traditional Japanese medicine. We investigated berberine and palmatine contents in inner bark of 22-year-old *P. amurense*, originated from Miyazaki prefecture and propagated by grafting. The content of berberine was 4.0% in average of 95 tested individuals (2.2-7.5%), and 3.9% in average of 48 genotypes (2.9-5.7%). Palmatine content was lower than berberine, and it was 0.5% in average of the individuals (0-1.6%), and 0.4% in average of the genotypes (0-1.3%). There are positive correlations between berberine contents and diameter at breast height, and between berberine contents and inner bark thickness. Therefore, these relations suggest that selection of individuals with good growth traits leads to selection of berberine-rich individuals. Palmatine content was not correlated with diameter at breast height and inner bark thickness.

Keywords: berberine, palmatine, diameter at breast height, inner bark thickness

はじめに

キハダ(*Phellodendron amurense*)はミカン科キハダ属の落葉高木で、アジア北東部と日本の北海道~九州に分布する。本種の内樹皮を乾燥させたものはオウバクと称される生薬である。オウバクはアルカロイドの一種であるベルベリンを含み、胃腸の炎症を抑えるなどの効果を期待する漢方製剤や生薬製剤に配合され、また、外用消炎薬として用いられる。また、キハダは養蜂の蜜源や染料の材料にも用いられ、材は家具等の用材に使用される。

オウバクの生薬としての国内の平成20年度から24年度にかけての年間の使用量は、200~230トン程度で推移しているが、国産率は20~24年度にかけて3.4%から1.6%に減少している。各年度ともに国産以外は全量を中国から輸入している(6, 7, 8)。国内の天然のキハダの資源量は減少していると考えられ、オウバクの自給率を上げるためにはキハダの国内栽培が有効であり、そのためには優良個体の選抜が効果的と考えられる。

宮崎県内より収集され、接ぎ木したキハダのクローン

が林木育種センター九州育種場（熊本県合志市）に集植されている（4、5、9）。宮崎県で選抜された際には、選抜個体の成長形質とベルベリン含有率が調べられ（4）また、接ぎ木クローン幼齡木についても調査されている（5、9）。本研究では、環境条件が比較的均となる一箇所に集植され、伐採適期にまで生育したキハダのクローンについてベルベリン含有率を調べるとともにベルベリン含有率と成長特性との関係を解析したので報告する。

材料と方法

1. 供試材料

キハダ接穂は宮崎県内の10市町村で収集し、1992年2月に2年生の宮崎県産実生苗に接ぎ木された（5）。接ぎ木翌年の1993年に林木育種センター九州育種場（熊本県合志市）に40クローン、各5個体、合計200本が列間隔3m、行間隔2mで列状に植栽された。2015年9月には生存個体数は95個体であった。2015年9月に全供試木の遺伝子型を決定するために葉を採取してDNAを抽出し、7座（P3、P4、P8、P9、P11、P13、P24）のSSRマーカー（11）を用いてDNAジェノタイピングした。また、供試木は接ぎ木によりクローン化されているため、接ぎ木台木が伸長している個体がある可能性がある。そこで、根の樹皮もDNAジェノタイピングに供し、台木の伸長個体か否かの判定を行った。

2. 形質の測定

接ぎ木後、22年目となる2014年7月に樹高、枝下高、胸高直径を測定するとともに胸高部の東西2方向から直径25mmのポンチで樹皮を採取した。採取後、速やかに内樹皮と外樹皮に分離し、乾燥前に各々の厚さを測定した。その後、室内で自然乾燥した東西2方向の内樹皮を破砕容器に入れ、液体窒素で凍結して破砕機（Retsch

社製、Mixer Mill MN300）で破砕（30rpm、30秒間）した。破砕したサンプルをアルカロイド（ベルベリン、パルマチン）含有率分析用と含水率測定用に分け、含有率測定用サンプルは分析に供するまで凍結保存した。含水率は105で一晩以上乾燥させてから算出した。アルカロイドの定量は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（日本分光、PU2080）を用いて行い、内樹皮絶乾重量当たりの含有率を算出した。

測定した樹高やアルカロイド含有率などの形質データは、保存園内の微小環境の効果を調整するための統計手法である空間自己相関（1、10）により補正し、各クローンの形質の推定値を算出した。

結果と考察

供試木95本は48遺伝子型に分けられた。そのうち、69個体は22遺伝子型（遺伝子型あたりの個体数は2～6個体）に、11個体は11遺伝子型（すなわち、遺伝子型あたりの個体数は1個体）であった。残りの15個体は接ぎ木の台木が伸長した個体であった。

表-1に各形質の概要を個体の実測値とクローンの推定値の別に示す。胸高直径の個体の実測値は変異幅が大きく、最大で40.5cmとなっており、林縁や養分条件など環境の良い場合、キハダは旺盛な生育を示すことが示唆される。逆に個体の実測値の最小値は4.6cmと小さく、また、22年生時の残存個体数が97本と植栽時の半分程度になっている。これらのことより、間伐など適切な保育施業により良好な光環境を維持することが重要と考えられた。ベルベリンの含有率は個体の実測値、クローンの推定値ともに厚生労働省が日本薬局方に定める生薬原料基準の1.2%を上回っていた。ベルベリンと類似の薬理作用があるとされるパルマチンの含有率はベルベ

表 1. 22年生キハダの各形質の概要

Table 1. Summary of traits in 22-year-old *P. amurense*

形質		平均値	最大値	最小値	標準偏差	変動係数(%)
個体の 実測値 (n=95)	樹高(m)	11.8	21.3	2.5	4.0	33.4
	胸高直径(cm)	16.8	40.5	4.6	6.4	38.2
	枝下高(m)	4.1	9.6	0.6	2.3	55.1
	内樹皮厚(mm)	4.6	9.9	1.9	1.2	26.4
	外樹皮厚(mm)	1.6	4.2	0.3	0.8	50.8
	ベルベリン(%)	4.0	7.5	2.2	1.0	25.8
クローンの 推定値 (n=48)	パルマチン(%)	0.5	1.6	0.0	0.3	66.6
	樹高(m)	10.9	17.0	6.0	2.5	23.1
	胸高直径(cm)	15.4	19.8	11.6	1.7	11.1
	枝下高(m)	3.6	4.2	3.1	0.2	6.6
	内樹皮厚(mm)	4.4	5.5	3.3	0.5	10.3
	外樹皮厚(mm)	1.5	2.3	0.8	0.4	25.6
ベルベリン(%)	3.9	5.7	2.9	0.6	14.3	
パルマチン(%)	0.4	1.3	0.0	0.3	69.6	

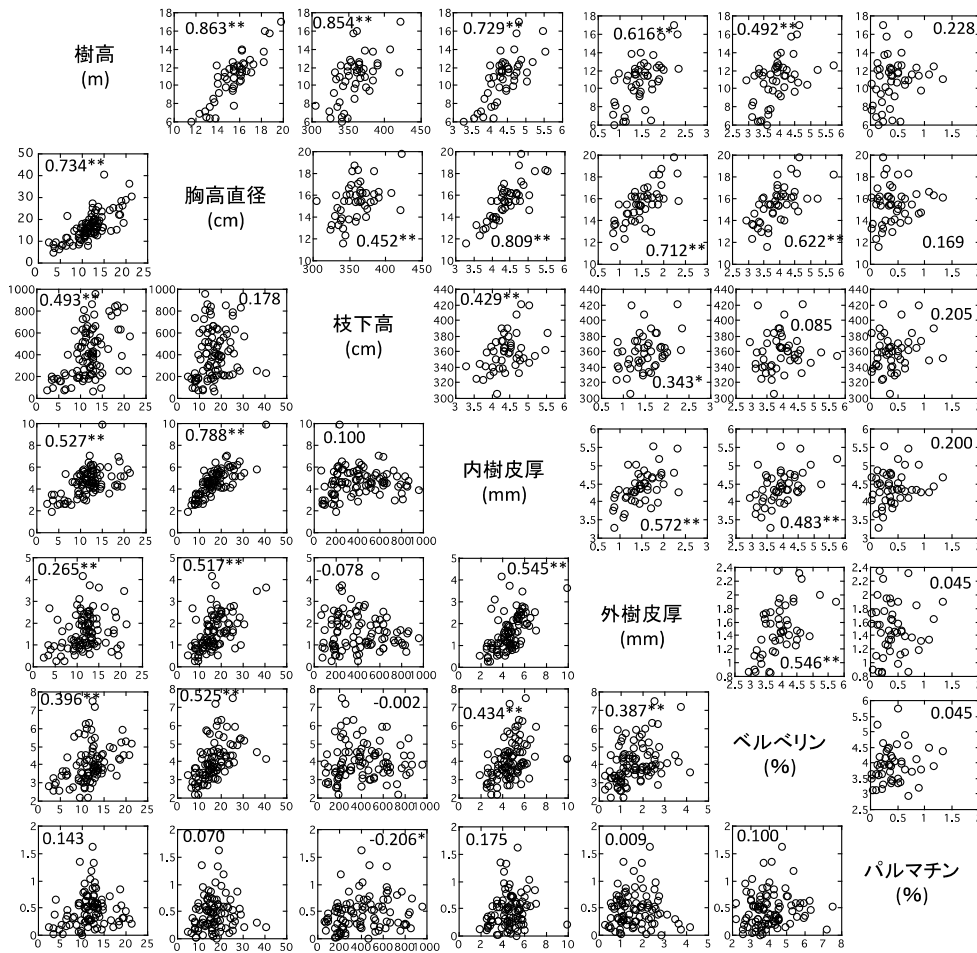


図-1. キハダの各形質間の関係

Fig. 2 Relation among traits in 22-year-old *P. amurense*. Figures at left lower and right upper show the relation of individual trees (n=95) and of clones (n=48), respectively. Numbers in figures show correlation coefficient (*: significant at 5 % level, **: significant at 1 % level).

リンよりも少なく、変動係数が大きい。

図-1 に各形質間の相関関係を個体の実測値とクローンの推定値の別に示す。内樹皮厚は胸高直径との相関が高く、胸高直径の大きいキハダはオウバク（内樹皮）の収量が多くなることが示唆される。ベルベリン含有率も胸高直径との相関が高く、胸高直径の大きいキハダはベルベリン含有率が高くなる傾向が見られる。このことは成長を指標として選抜すればベルベリン含有率が高くなることを示唆する。一方、パルマチンは他の形質との関連がないことが明らかになった。

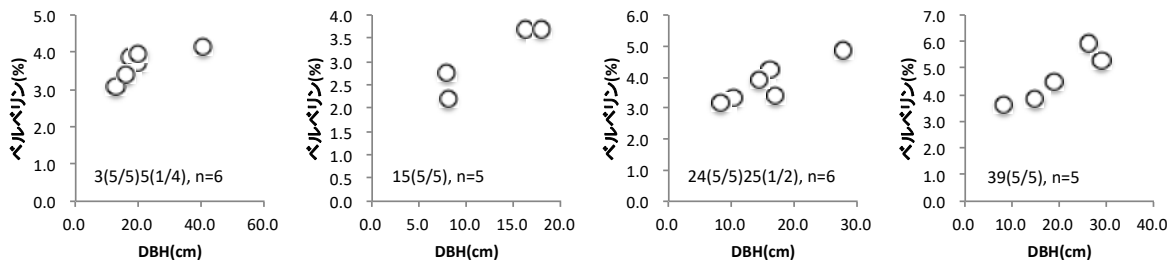
クローン内の個別別のベルベリン含有率と胸高直径及び内樹皮厚の関係を図-2 に示す。いずれのクローンにおいても胸高直径が大きくなるに従い、また、内樹皮厚が厚くなるに従い、ベルベリン含有率が高くなることが示唆された。このことは、伐採時期や植栽密度管理などに

より、直径成長を制御すればベルベリン含有率が制御でき、多様なベルベリン含有率のオウバクを求めるユーザーの要望に対応できる可能性が示唆される。

おわりに

本研究は宮崎県産の概ね収穫時期のキハダの調査事例であり、ベルベリン含有率は胸高直径と正の相関があることが示唆された。樹齢は不明であり、かつ、調査木の樹齢にはバラツキがあると思われるが、北海道産（3）や鳥取県産（2）の調査においてもベルベリンと胸高直径には同様の傾向が見られる。また、本研究結果と選抜時の自生地での調査結果（4）は概ね似ており、胸高直径 20 cm ではベルベリン含有率が 3~6%程度である。一方、北海道産（3）のベルベリン含有率は本研究の宮崎県産や鳥取県産（2）よりも低い傾向がうかがえ、産地、

ベルベリンと胸高直径



ベルベリンと内樹皮厚

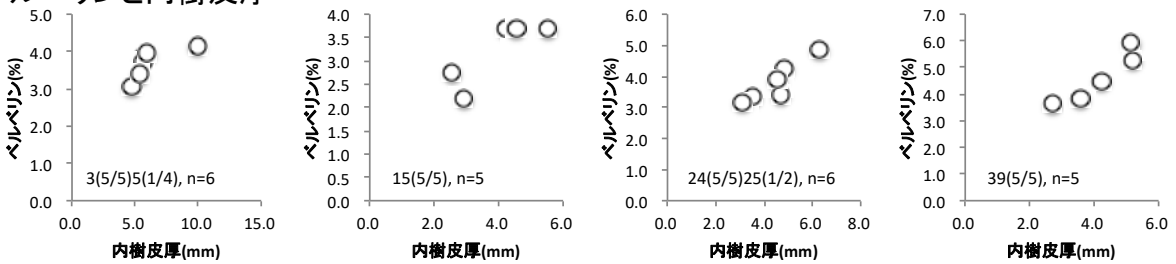


図-2. 22年生キハダにおけるクローン内の個体におけるベルベリン含有率と胸高直径及び内樹皮厚の関係

Fig. 2 Relation between berberine contents, DBH, and inner bark thickness in 22-year-old *P. amurense* clones. Genotype and individual number were shown in figures.

もしくは環境によりベルベリン含有率は変動する可能性がある。

謝辞

本研究は、平成 26～28 年度の農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業(発展融合ステージ)「薬用系機能性樹木の生産効率化手法の開発」の成果の一部である。

引用文献

(1) DUTKOWSKI, G. W., COSTA E SILVA, J., GILMOUR, A. R., WELLENDORF, H. and AGUIAR, A. (2006) Spatial analysis enhances modelling of a wide variety of traits in forest genetic trials. *Canadian Journal of Forest Research* 36: 1851-1870

(2) 橋詰隼人・黄栄鳳・山本福壽・河本忍・西原秀昭 (1992) キハダの育種に関する基礎的研究(II) -樹皮の厚さとベルベリン含有率の変異-. *日林関西支論* 1: 247-250

(3) 梶勝次・佐藤孝夫・山岸喬・中野道晴 (1989) キハダ内皮のベルベリン含量の個体及び産地間差異. *北海道林業試験場研究報告* 27: 84-91

(4) 中島豊・若松茂樹 (1994) キハダ系統間のベルベリン含有率について. *日林九支研論集* 47: 269-270

(5) 中島豊・若松茂樹 (1995) キハダ系統間のベルベリン含有率について(II) -幼齡木の分析-. *日林九支研論集* 48: 215-216

(6) 日本漢方生薬製剤協会 (2011) 原料生薬使用量等調査報告書 -平成 20 年度の使用量-. 日本漢方生薬製剤協会, 東京: 22pp

(7) 日本漢方生薬製剤協会 (2013) 原料生薬使用量等調査報告書 (2) -平成 21 年度および 22 年度の使用量-. 日本漢方生薬製剤協会, 東京: 24pp

(8) 日本漢方生薬製剤協会 (2015) 原料生薬使用量等調査報告書 (3) -平成 23 年度および 24 年度の使用量-. 日本漢方生薬製剤協会, 東京: 41pp

(9) 田村明・山野邊太郎 (1999) キハダ幼齡期における諸特性. *日林学術講* 110: 274-275

(10) WHITE, T. L., ADAMS, W. T. and NEALE, D.B. (2007) *Forest genetics*, CAB International, Oxfordshire, UK: 682pp

(11) YU, J. H., CHEN, C. M., HAN, S. J., GUO, X. R., YUAN, S. S., WANG, C. J. and ZU, Y. G. (2013) Development and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Phellodendron amurense* (Rutaceae). *Applications in plant sciences* 1: 1200321