

化粧品原料として竹節人參の組織培養による 物質生産ならびに大量増殖に関する研究

広島大学医学部

神田博史

Panax japonicus C. A. Meyer is a perennial herb of the Araliaceae family, indigenous to Japan and China. *Panax Japonici Rhizoma* (Chikusetsu-ninjin, in Japanese), the dried rhizome of this plant, has been utilized for hundreds of years in Japan as a drug for gastroenteric disorder, antiulcer, expectorants, and antipyretics. Several oleanane saponins, chikusetsusaponin- I_b, -IV, -IV_a, and -V, along with dammarane saponins, chikusetsusaponin- I_a and -III were isolated from the rhizome of this plant. The composition of saponins in the rhizome of Satsumaninjin, which limited distribution in South Kyushu, was remarkably different from that of other *P. japonicus* specimens collected from other places in Japan.

Callus induced from various organs of an *in vitro* plantlet gave embryogenesis on the Murashige-Skoog's (MS) medium containing 1 ppm 2, 4-D at higher yield and in shorter incubation time than that of intact plant. When the mature embryo were cultured on the 1/2 MS medium supplemented with GA and BAP (each 1 ppm), shoot formation was induced. Subsequently the shoots were transferred to the 1/2 MS medium supplemented with 1 ppm GA and 10 ppm BAP to form multiple shoot complexes. When the shoots were subcultured in the medium containing 2 or 4 ppm IBA, rooting occurred from plantlets.

From tissue callus of *P. japonicus* grown in South Kyushu, two dammarane saponins, ginsenosides Rg₁ and Re, and an oleanane saponin (desglucosyl chikusetsusaponin-IV) together with chikusetsusaponin-IV were isolated. From the callus of Hiroshima origin, three new oleanane saponins along with chikusetsusaponin-IV and -IV_a were isolated.

第1節 トチバニンジンの不定胚分化による増殖について

これまで育毛促進効果を有する生薬として当薬(センブリ)何首烏(ツルドクダミ)竹参(トチバニンジン)番椒(トウガラシ)等が報告され、現在、養毛剤として市販されている。また、最近生薬「甘草」の油溶性エキス(フラボノイド分画)に抗チロシナーゼ作用、紫外線吸収作用、過酸化脂質抑制作用、抗菌作用があることが確認され、化粧品原料としてスキンケアに広範囲な利用が期

待されている。

今回、その中から竹節人參を選び、大量増殖に関する検討、並びに、化学的品質に関する評価を行った。

トチバニンジン (*Panax japonicus* C. A. MEYER, ウコギ科 Araliaceae) は、日本特産の多年生草本で、北海道、本州、四国、九州の山地の樹陰に自生する。根茎は結節があって地中を長く横走、やや肥厚し白色、各節の上面に茎を付着していた跡がある。根茎が竹の節に似ることから竹節人參と呼ばれるが、その根茎を通例湯通しした

Studies on the Constituents and Mass-propagation in Cultures of *Panax japonicus* for Cosmetic Materials.

Hiroshi Kohda

ものを生薬「竹節人參」とする。*Panax*属植物で根茎が発達したものは他にも多数あり、中国西南部にも同名の植物がある他、節間が細く長く延びた数珠状の根茎を持つ珠子参(*P. japonicus* C. A. MEYER var. *major* (BURK.) C. Y. WU et K. M. FENG), 小葉が竹節人參に較べて細長い狭葉竹節参(*P. japonicus* C. A. MEYER var. *angustifolius* (BURK.) CHENG et CHU)などが知られている。一方薬用人參として有名なオタネニンジン(直根型で、同じ型のものにはアメリカ人參(広東人參, 洋参, *P. quinquefolium* L.), 三七人參(田七, 金不换, *P. notoginseng* (BURK.) F. H. CHENG)など約5種が知られている。

竹節人參は、福井、長野、山形、群馬、香川、鹿児島などの各県が産地であり、ほとんど野生株の採取に頼っているが、近年試作が行われている。10~11月頃、野生の根茎を掘り、細根を除いて水洗、湯通して乾燥する。竹節人參は、配合剤(健胃剤、去痰剤など)の原料とするが、漢方の方剤(処方)に人參と使い分けて用いることがある。その含有成分については主としてサポニン類について詳細な研究がなされてきた¹⁻⁴⁾。これらの研究から、自生地によるサポニン類の質的、量的変異が認められ⁵⁻⁹⁾、産地による品質の不均一性が大きいことが明らかとなった。また、近年の乱獲により野生株が減少し、資源の枯渇も懸念されるが、本植物の栽培法ははまだ確立されていない。このような現状から、本研究は、組織培養によるトチバニンジン(トチバニンジン)の優良品種の育成とその増殖による資源確保を目的とした。

そこで、各器官の組織を用いた培養法を検討し、その増殖法を確立した。各器官としては、花芽、茎、葉、および根茎を用いて培養した。

第1項 各器官からのカルスおよび不定胚形成

カルス誘導と再分化、あるいは不定胚分化等は、培養条件のうち、とくに添加ホルモンの種類と濃度に影響され、また、実験に用いる器官によっても差異があることが報告されている。このためト

チバニンジン(トチバニンジン)の各器官の組織を用いて、カルス化と不定胚分化に関して検討し、下記の結果を得た。

1. トチバニンジン花芽からのカルスおよび不定胚形成

1.1 カルスの誘導

基本培地は、Murashige & Skoog(MS)培地¹⁰⁾とし、植物ホルモンとして、2, 4-dichlorophenoxyacetic acid(2, 4-D)を1ppm添加し、滅菌した花芽を植え付けた。そして、まず光の影響を検討するため、全日長下および暗黒下で培養した。15週間培養した結果、全日長下における培養では、カルス化することなく、緑色を呈した花序の個々の花芽が生長し、一部には、開花するものも認められ、増殖の目的には不適當であった。このため、以下のカルス誘導はすべて暗黒下で行った。

花芽切片を2, 4-D 1ppmまたは α -naphthaleneacetic acid(NAA)1ppm添加MS培地で15週間培養した結果、2, 4-DおよびNAA添加区とも100%のカルス化が認められた。形成カルスの生重量を比較すると、2, 4-D添加区がNAA添加区に比べ約3倍であった。

1.2 不定胚形成

2, 4-Dによる誘導カルスは、散形花序全体がカルス塊となり、最初淡黄白色の柔らかいカルスであったが、しだいに淡褐色の部分が増えようになり、15週間後には球状胚から心臓型胚に至る各ステージの不定胚が形成された。不定胚形成率は80%と良好であった。

1.3 胚の生育と二次不定胚

これら不定胚を形成したカルスは同一条件下6週間毎に継代することにより、各世代ほぼ同等のカルス増殖と同時に全カルス切片より不定胚形成が認められた。しかし、これらの不定胚は球状胚から心臓型胚まで、胚の生育状態が不均一であるため、胚の生育促進と二次不定胚の形成を目的として、球状胚のみを選び、その切片をNAAと6-benzylaminopurine(BAP)添加培地で、全日長下10週間培養した。結果はFig. 1に示す通り、

花芽由来の不定胚はNAA 2ppmとBAP 5ppmおよび10ppm添加区において、二次不定胚の形成率が100%と良好であった。このうちNAA 2ppm, BAP 10ppm添加区はその重量増加率から、二次不定胚の成熟促進が認められ、大部分の胚が心臓型胚を形成した。NAA 2ppmとBAP 2.5, 5および10ppm添加区では約半数の切片から平均1~2本のshoot形成が認められた。この傾向はNAA 1ppm添加区においてもみられ、約30%の切片から平均1本のshoot形成が認められた。

なお、NAA 3ppm添加区では、二次不定胚の形成、胚の成熟促進ともに不良で、再びカルス化する切片も認められた。

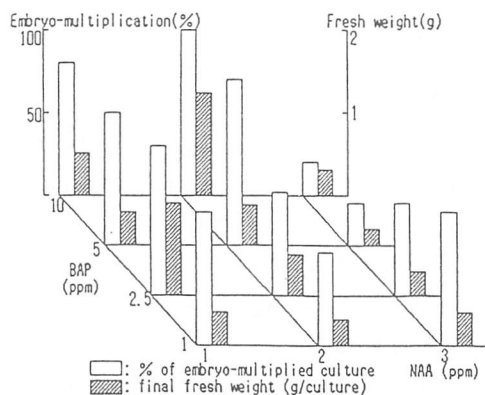


Fig. 1 Embryo Multiplication from Flower Bud Culture condition: in MS medium, at 25 ± 1 °C, under continuous light, in 10 weeks.

2. 根茎からのカルスおよび不定胚形成

2.1 カルスの誘導

根茎切片を花芽切片と同様に、2, 4-D 1ppm, NAA 1ppm添加MS培地で、暗黒下15週間培養した結果、2, 4-D 1ppm添加区で55%, NAA 1ppm添加区で64%の切片がカルス化した。しかし、両添加区ともカルスの増殖が不良で、継代を重ねるに従って増殖が阻害され、枯死するカルスが多く、不定胚分化には至らなかった。このため、2, 4-Dとkinetinの組み合わせによる添加濃度を検討した。

根茎切片を2, 4-Dおよびkinetinの0, 0.02, 0.2, 2ppm添加培地で、暗黒下6週間培養を行った結果、カルス形成が認められたのは、2, 4-D 0.02ppmとkinetin 0.02, 0.2ppmの添加区、2, 4-D 0.2ppm添加区の全区および2, 4-D 2ppmとkinetin 0, 0.02, 0.2ppm添加区である。しかし、2, 4-D 0.2ppmとkinetin 0, 0.02, 0.2, 2ppmの組合せの添加区以外ではカルスの増殖率も低下し、枯死するに至った。2, 4-D 0.2ppm添加区のうち、kinetin 2ppmとの組合せ添加区が最も良好で、6週間培養後のカルス生重量は0.7gであった。

2.2 不定胚形成

2, 4-D 0.2ppm, kinetin 2ppm添加区による誘導カルスは6週間毎に約1年間継代を繰り返したところ、40%のカルス切片からX不定胚形成が認められた。不定胚形成状態は花芽由来カルスからの不定胚形成と同様であった。なお、一年半後には2, 4-D 0.2ppm添加全区において、継代培養カルスより不定胚分化が認められた。

2.3 胚の生育と二次不定胚

次に2, 4-D 0.2ppm, kinetin 2ppm添加区において得られた不定胚を、0, 0.2, 2.0, 20ppmの濃度のNAAおよびBAP添加培地で全日長下、6週間培養したところ、いずれの組合せにおいても二次不定胚の形成率は100%であった。NAA 20ppm添加区を除いたほぼ全区で、約10倍の増加率が認められ、二次不定胚の形成と成熟促進が確認された。

なお、NAA-kinetin, indole 3-acetic acid (IAA)-kinetinの添加実験を行った結果、NAA-BAPの添加区に比べ、二次不定胚の形成率には差がないものの、その増加率はいずれも劣り、さらに、異常組織を形成するものが多く認められた。

3. 茎および葉のカルス形成

葉切片および茎切片を2, 4-D 1ppmおよびNAA 1ppm添加培地で、暗黒下15週間培養した

結果、葉切片のカルス化率は2, 4-D, NAA添加区とも100%であった。生重量は他の器官に比べ、最高値を示した。一方、茎切片のカルス化率は低く、15週間の培養期間中に、カルス化することなく枯死する切片が多かった。これら葉および茎由来のカルスを継代したが、いずれも不定胚分化には至らなかった。

4. まとめ

以上、トチバニンジンの花芽、茎、葉および根茎の各部位を用いた組織培養を検討した結果、すべての部位がカルス化した。このうち、葉を用いた場合、カルス化率とカルスの重量増加に関しては、最高の結果が得られたが、増殖につながる不定胚誘導には至らなかった。花芽由来のカルスは15週間の培養中に不定胚を形成した。また、根茎の場合には約1年間の継代培養後、不定胚誘導に成功した。次に、花芽由来および根茎由来の不定胚を用いて発芽の検討を行った。

第2項 胚の発芽について

1. 不定胚の発芽条件の検討

花芽由来の不定胚の場合、さきの二次不定胚の形成培地において、shoot形成が認められたが、大部分の胚および根茎由来の胚は、同一培地で培養を続けると発芽することなく、再びカルス化したり、異常組織を形成したりした。そこで不定胚の発芽条件について検討した。

予試験的に、花芽および根茎由来の両不定胚を gibberellin A₃ (GA) および BAP 各1ppm を添加した MS 培地で継代培養すると、大部分の胚は正常に発芽することなく、再びカルス化したり、異常な組織形成をすることが明らかとなったので、無機塩濃度を1/2および1/4としたMS培地にGA, BAPを添加し、発芽状況を検討した。この結果、GA 1ppm および GA, BAP 各1ppm を添加した両1/2MS培地で、それぞれ80%および85%の胚が発芽した。

2. まとめ

以上より、成熟胚の発芽はGA, BAP 各1ppm 添加1/2MS培地が適していることが明らかとなった。本添加区においてはshootのみ形成するものや、shootと発根が同時に起こるものなどが認められた。また、6週間後には根茎の形成が認められるものもあった。

第3項 発根について

1. 発根条件の検討

胚の発芽に際し、shoot形成と同時に発根するものも一部認められたが、shoot形成のみにとどまるものが大部分であった。そこでshootの発根について検討した。

IAA 添加区では発根する個体は認められなかった。Indole-3-butyrlic acid (IBA) 添加区では1および2ppm 添加区とも発根が認められるものの、8個体中6個体のshootはshoot基部からカルス化が起こり、15週間後にはshoot全体がカルス化するに至った。NAA 1ppm 添加区では、すべてのshootが発根し、平均発根数6.8本と良好な結果が得られた。0.5ppm 添加区においても10個体中6個体のshootから根の形成が認められた。

2. まとめ

以上より、shoot形成した個体の発根にはNAA 1ppm 添加区が適していることが明らかとなった。これらの幼植物はバーミキュライトへ移植し栽培中である。

不定胚によるトチバニンジンの増殖法の模式図をChart 1に示す。

第2節 トチバニンジンのクローン増殖

Panax japonicus の花芽および根茎由来カルスから誘導した不定胚による増殖法については前に述べた。しかし、2年間の継代中に、カルスの不定胚形成能および不定胚の再分化能は次第に低下し、ついには失われて、不定胚からのshootも

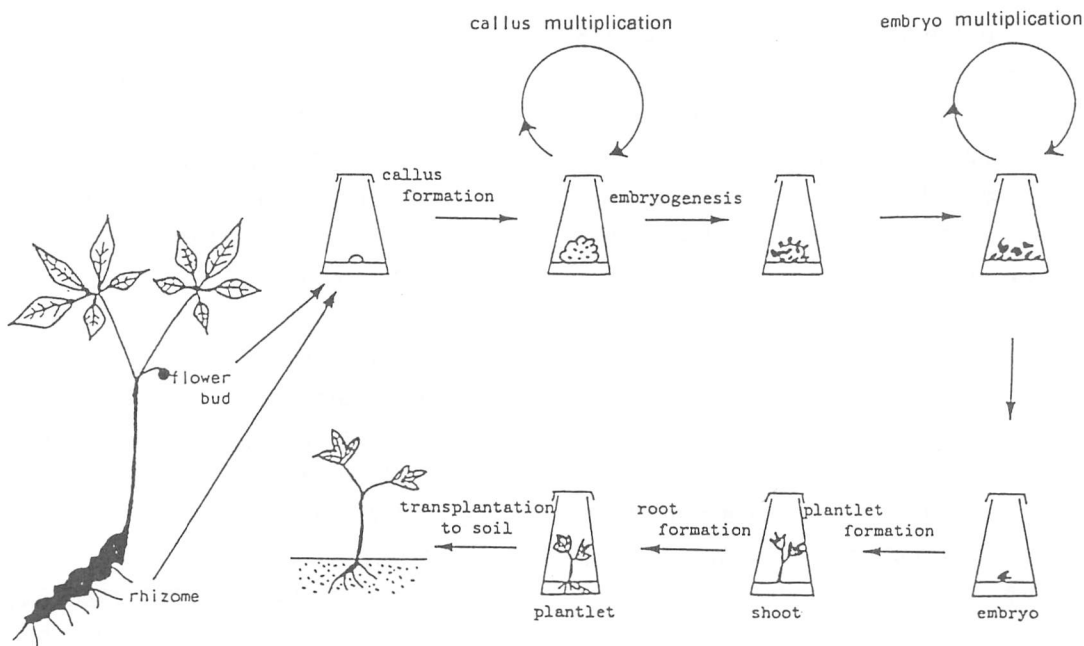


Chart 1 *In vitro* Multiplication of *Panax japonicus*

異常な形態を示すものが観察された。よって、不定胚形成能を保持したカルスおよび再分化能を保持した不定胚を得るため、*in vitro*の様々な器官を培養し、そのカルス誘導と不定胚形成について検討した。また、別に*in vitro*のshootを用いて multiple shoot の形成によるクローン増殖を試みた。

第1項 *in vitro* 植物器官からのカルスおよび不定胚形成

まず、不定胚形成能の回復を目的として *in vitro* の花芽、葉、茎、根茎様組織、細根切片を、1ppm 2, 4-D を添加した MS 培地に植え付け、25°C、暗黒下で培養した。4.5ヶ月後には全種類の切片からカルス誘導できた。*in vitro* の花芽から誘導したカルスからは約2ヶ月後に不定胚が形成された。カルス表面に未熟な、あるいは成熟した不定胚が観察された。*in vitro* の葉と茎から誘導したカルスも4.5ヶ月培養した後に不定胚を形成した。第1節に述べたように親植物の葉や茎切片から誘導したカルスからは不定胚は形成されな

かったが、*in vitro* の葉や茎切片から誘導したカルスは不定胚を形成することが明らかとなった。さらに、今回得られた不定胚形成の比率を、第1節のものと比べてみると、*in vitro* の切片の方が不定胚形成の量が多く、期間も短いようである。これらの結果は、ミシマサイコで得られた結果とよく一致していた。1ppm GA と 1ppm BAP を加えた 1/2MS 培地上での成熟胚の発芽率は前の結果と同様であった。

第2項 *in vitro* 植物器官からの multiple shoot 形成

次に、クローン植物を得ることを目的として、不定胚から再分化させた正常な shoot から multiple shoot を形成させるための検討を行った。BAP-GA を含む MS 培地および BAP-GA, BAP-IAA そして BAP-NAA を含む 1/2MS 培地に *in vitro* の shoot を植え付けた。その結果、multiple shoot 形成に最もふさわしい条件は、1/2MS 培地に 1ppm GA と 10ppm BAP を添加した培地で 1株当たり shoot 11本が形成された。1/2

MS培地に5ppm GAと1あるいは5ppm BAPを添加した培地では、1株当たりshoot6本が形成された。MS培地に加えた様々な量のGA-BAPのほとんどがmultiple shoot形成に効果的であることを示している。しかし、shootの数は、対応する1/2MS培地で得られるものより少なかった。従って、以後multiple shoot形成には1ppm GAと10ppm BAPを含む1/2MS培地を用いることとした。

第3項 発根条件の検討

次に、得られたshootを発根させるため様々な濃度のIAA, IBA, NAAを添加したMS培地に移植した。その結果、2あるいは4ppm IBAを加えた培地が発根に適しており、良好な幼植物形成がなされた。よって、この条件を発根のステージに用いることとした。

第3節 トチバニンジンのカルスのサポニンについて

*Panax*属植物を主成分であるサポニン組成の面からみると、トチバニンジンに代表される根茎型の*Panax*は、オレアノール酸サポニンを主サポニンとして含み、ダマラン系サポニンはそれぞれに特徴的に含まれている。一方、オタネニンジンに代表される直根型の*Panax*はダマラン系サポニンを主サポニンとして含み、オレアノール酸サポニンは微量しか含まないか、全く含まないという共通性がある。

竹節人參の成分については主としてサポニン類について詳細な研究がなされてきた。竹節人參(九州南部を除く)の根茎のサポニンについては、庄司ら¹⁻³⁾によって研究が行われ、オレアノール酸サポニンとして、Chikusetsusaponin-IV, -V, -I_b, -IV_aが、ダマラン系サポニンとして、Chikusetsusaponin-III, -I, -I_aが報告されている。また、地上部のサポニンについては、矢原ら⁴⁻⁸⁾によって研究が進められ、九州南

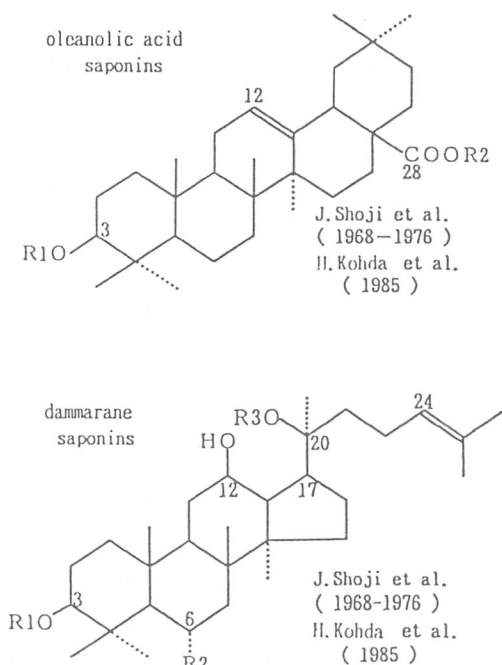
部を除く日本に広く野生する竹節人參葉のサポニンは、生育地に特徴的で太平洋側と日本海側は全く異なっていることが明らかとなった。太平洋側では20(S)-protopanaxatriol系サポニンのみであるが、日本海側は20(S)-protopanaxadiol系サポニンのみで、しかも12-keto体であり、さらに鳥取型と新潟型に分かれる。一方、竹節人參の中で九州南部に野生するいわゆる薩摩人參と呼ばれるものは、日本の普通の竹節人參と比較して外部形態には差がないが、神田らは薩摩人參の根茎のサポニンについて検討し両者の間に明らかな差が認められたことを報告した¹¹⁾。薩摩人參のサポニン組成は、従来報告されている竹節人參より薬用人參に近いものであった。これらの2つのタイプの竹節人參を材料として組織培養を行い、制御された環境下、つまり同一培養条件下において、カルス中に生産される成分に差が現れるか否か検討した。

第1項 広島産竹節人參と鹿児島産竹節人參の成分の違い

神田等¹¹⁾は、竹節人參の中で南九州に野生するいわゆる薩摩人參と呼ばれるものは、日本の普通の竹節人參と比較すると、地上部および地下部の外部形態には差がなかったが、根茎のサポニン分画には明らかに差が認められたことを報告している(Chart 2)。

そこで、広島産のトチバニンジン(従来報告のあった竹節人參に相当するもの)と、鹿児島産のトチバニンジン(神田等の報告する薩摩人參に相当するもの)から誘導したカルスについてサポニン成分の検討を行った。それぞれのカルスについてメタノール抽出を行い、その粗サポニン分画についてFig. 2に示すようにTLCで定性分析を行った。

その結果、成分パターンの異なるトチバニンジンから誘導したカルスのサポニン分画は、ある程度、原植物の成分を反映していた。



○ "Chikusetzu-Ninjin"
● "Satsuma-Ninjin"

	R1	R2
○ chikusetsusaponin IVa	: -GlcUA	-Glc
○● chikusetsusaponin IV	: -GlcUA ⁴ -Ara(f)	-Glc
○● chikusetsusaponin V (=ginsenoside Ro)	: -GlcUA ² -Glc	-Glc
○ chikusetsusaponin Ib	: -GlcUA ⁴ -Ara(f)	-H

	R1	R2	R3
○ chikusetsusaponin III	: -Glc ² -Glc	-H	-H
○ chikusetsusaponin Ia	: -Glc ⁶ -Xyl	-H	-H
● ginsenoside Rb ₁	: -Glc ² -Glc	-H	-Glc ⁶ -Glc
● ginsenoside Rc	: -Glc ² -Glc	-H	-Glc ⁶ -Ara(f)
● ginsenoside Re	: -H	-O-Glc ² -Rha	-Glc
● ginsenoside Rg ₁	: -H	-O-Glc	-Glc
● gypenoside XVII	: -Glc	-H	-Glc ⁶ -Glc
● notoginsenoside R1	: -H	-O-Glc ² -Xyl	-Glc
● notoginsenoside R2	: -H	-O-Glc ² -Xyl	-H
● notoginsenoside R4	: -Glc ² -Glc	-H	-Glc ⁶ -Glc ⁶ -Xyl

Chart 2 Saponins from Rhizomes of *Panax japonicus*

	V	IVa	Re	III	Rg ₁
std. x	○	○	○	○	○
HC x	○	○	○	○	○
HR x	○	○	○	○	○
KR x	○	○	○	○	○
KC x	○	○	○	○	○

Plates: silica gel HF₂₅₄. Solvent: CHCl₃-MeOH-H₂O (30:17:4)

Colour reagent: H₂SO₄

std.: standard saponins

III, IV, IVa, V: chikusetsusaponins- III, IV, IVa, V

Re, Rg₁: ginsenosides Re and Rg₁

Samples: crude saponin fractions of *Panax japonicus*

HC: callus induced from the plant of Hiroshima origin

HR: rhizome of the plant of Hiroshima origin

KR: rhizome of the plant of Kagoshima origin

KC: callus induced from the plant of Kagoshima origin

Fig. 2 Thin-layer chromatogram of saponins from rhizomes and calli of *Panax japonicus* of different origin

第2項 カルスの増殖と成分の抽出

1. カルスの増殖条件

広島県産トチバニンジンのカルス(以下, 広島

産由来カルスと略す)は, 根茎から誘導したものをを用いた。2, 4-D 10⁻⁶M-kinetin 10⁻⁵M添加MS培地上, 25±2°C, 暗黒下で誘導したカルスを, 同条件で6週間毎に継代を繰り返し, 2年間培養して安定したものについてメタノール抽出を行い, TLCで定性分析を行ったところ, 数種のサポニンの存在を認めた。

そこで, カルスのみを大量に得るため, さらに他の植物ホルモンとしてIAA, IBAについても検討を行った。MS基本培地に, IAA:kinetin=0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M:0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M, あるいはIBA:kinetin=0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M:0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴Mを添加し, 2, 4-D:kinetin=10⁻⁶:10⁻⁵M添加MS培地で培養したカルスを植え付け, 暗黒下, 25±2°Cで培養した。6週間培養した結果, IBA 10⁻⁴Mの系でカルス増殖が旺盛であった。そのうちカルス生長とメタノールエキスのTLCパターンから判断して IBA:kinetin=10⁻⁴:10⁻⁶M添加MS培地をカルス

増殖用最適培地とした。上記培地に移植したカルスは6週間毎に継代し、同時に残ったカルスを収穫した。植物ホルモンの違いによるカルスの成分パターンの差は認められなかった。

鹿児島県産トチバニンジンのカルス(以下、鹿児島産由来カルスと略す)については、2, 4-D 5×10^{-6} M 添加MS培地上、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、暗黒下で誘導したカルスを、同条件で6週間毎に継代を繰り返し、広島産と同様に収穫した。

2. 広島産由来カルス成分の抽出

収穫した広島産由来カルスは凍結乾燥後(Dry wt. 93 g)、熱メタノールで抽出、メタノールエキス27 gを得、各種クロマトグラフを繰り返した。メタノールエキスのうち26 gを多孔性樹脂DIAION HP-20にて分画し、粗サポニン分画を2.47 g得た。そのうち2.4 gをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、フラクション1-50に分画した。フラクション3, 4からは、メタノールからの結晶化により、結晶(それぞれ、8mg, 20 mg)が析出し、それらは標品との比較により、 β -sitosterol- β -D-glucosideと同定した。また、フラクション26からは、逆相のクロマトグラフによる分離精製を繰り返しCompound 3(9mg)を、フラクション29からはCompound 1, 4(各7 mg)を得た。フラクション34からは、逆相のクロマトグラフにより、Compound 2(10mg)を、フラクション40からCompound 5(17mg)を、フラクション41からCompound 6(7mg)を得た。

3. 鹿児島産由来カルス成分の抽出

鹿児島産由来カルスについても凍結乾燥後(dry wt. 105 g)、熱メタノールで抽出、メタノールエキス41 gを得、各種クロマトグラフを繰り返した。メタノールエキスをDIAION HP-20にて分画し、粗サポニン分画3.7 gを得た。それをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、フラクション1-23に分画した。フラクション5からは、Compound 7(10mg)を、フラクション11からはCom-

pound 8(8mg), 10(4mg)を、またフラクション17からはCompound 9(21mg)を単離した。

第3項 既知化合物の同定

1. 広島産由来

Compound 1, 2は、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、旋光度を測定した結果、標品との比較により以下のように同定した。

1, 2のゲニン部の $^{13}\text{C-NMR}$ シグナルを、既に報告されているサポニンのデータと比較したところ、いずれもoleanolic acidをゲニンとすることがわかった。

$^{13}\text{C-NMR}$ においてCompound 1の糖部のシグナルのうち、 δ 105.8ppmと δ 95.2ppmの2つのアノメリックカーボンのシグナルが観測されたことによって、2つの単糖の存在が示唆された。また、A環およびC-28位のカルボキシル基のグリコシレーションシフトから、それらは3-グリコサイドおよびエステルグリコサイドであることが明らかとなった。2つの単糖類は $^{13}\text{C-NMR}$ の糖部のシグナルパターンから、 β -glucoseと β -glucuronic acidであることが明らかとなった。

上記のことより、1の構造は、 β -D-glucopyranosyl oleanolate-(3)- β -D-glucuronopyranoside か β -D-glucuronopyranosyloleanolate-(3)- β -D-glucopyranoside のどちらかと考えられた。前者は親植物であるトチバニンジンの成分として既に報告されているchikusetsusaponin IV_a(C-IV_a)であるが、1の $^{13}\text{C-NMR}$ データをC-IV_aのものと比較すると、よい一致を示した。 β -glucuronic acidの6位の炭素のケミカルシフトに若干の差が見られるが、これは塩を形成しているためと思われる。青山ら¹²⁾は、竹節人參の粗サポニンはマグネシウム塩を形成していることを報告している。C-IV_aを塩のまま測定を行ったところ1と同様な変化が認められた。よって、1はC-IV_aと同定した。

同様に、Compound 2について検討したところ、 $^{13}\text{C-NMR}$ データより3つの単糖類の存在が

示され、それらは β -glucose, 4-substituted β -glucuronic acid, α -arabinofuranose と推定された。予想されるいくつかの oleanolic acid glycoside のうち、chikusetsusaponin IV (C-IV) の ^{13}C -NMR スペクトルとよい一致を示し、2 は C-IV と同定した。

また、Compound 3 については竹節人参の既知化合物とは一致しなかったが、同じウコギ科の *Cussonia spicata* から得られている 3-(4- α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucosyloleanolic acid¹³⁾ (=desglucosylchikusetsusaponin IV, prosapogenin of chikusetsusaponin IV) について報告された ^{13}C -NMR データと比較したところ、同一物質と思われた。その報告には ^{13}C -NMR の糖部のデータしか記載されていなかったため、ゲニン部は他のオレアナン系 chikusetsusaponin のデータと合わせて比較したところよく一致した。また引用文献¹³⁾ の報告の糖部シグナルの一部の帰属に明らかな間違いが認められた (glucuronic acid の 3 位と 4 位の炭素の帰属を、それぞれ arabinose の 3 位, 2 位と入れ替えた)。

なお、広島産由来のカルスから単離した化合物のうち、4~6 は糖部構造が新しいものであり、 ^{13}C -NMR データよりゲニンはいずれも oleanolic acid であることが明らかとなった。その構造は Chart 3. に示したように推定し、それに従って ^{13}C -NMR の糖部の assignment については、収量が低かったため詳細については検討していない。

2. 鹿児島産由来

Compound 7, 8, 9 は、 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 旋光度を測定した結果、標品との比較により以下のように同定した。

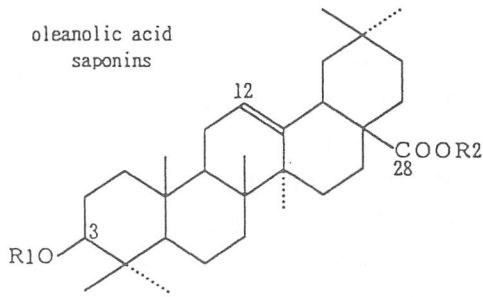
7, 8, 9 のゲニン部の ^{13}C -NMR シグナルを、既に報告されているサポニンのデータと比較したところ、7, 8 のゲニンはいずれも 20(S)-protopanaxatriol であり、9 のゲニン部は oleanolic acid であることが明らかとなった。

^{13}C -NMR データの標品との比較により、既知サポニンのうち原植物から報告されているものとして、Compound 7 を ginsenoside Rg₁, 8 を ginsenoside Re, 9 を chikusetsusaponin IV (=2) と同定した。

さらに Compound 10 は、広島産由来のカルスから得られた 3 と同一物質である 3-(4- α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucuronosyloleanolic acid であった。なお、本化合物の報告は原植物 (薩摩人参) にはまだない。

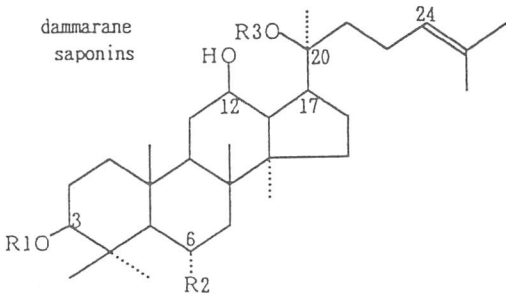
第 4 項 まとめ

従来報告されている竹節人参と薩摩人参は成分的に大きな差異がある。つまり、前者が主にオレアナン系サポニンを含むのに対して、後者ではダマラン系サポニンが主であることである。今回、広島産トチバニンジン (従来竹節人参) 由来のカルスからは chikusetsusaponin -IV, -IV_a の他、オレアナン系サポニンのみを単離した。一方、鹿児島産 (薩摩人参) 由来のカルスからは chikusetsusaponin -IV の他、ダマラン系の 20(S)-protopanaxatriol をゲニンとする ginsenoside-Rg₁, -Re を単離した。このようにカルスの生産するサポニンはそれぞれの原植物の成分を反映したものであった。同じ培養条件下において広島産と鹿児島産のカルス成分が異なり、それぞれ原植物を反映する成分パターンを示したことから、従来竹節人参と薩摩人参のサポニン類の差異は本質的な差異によるものであり、環境的なものではないことが裏付けられた。従来、それらは同一種として扱われてきたが植物分類学的にも検討を要する。その他の点では、日本の普通の竹節人参に特徴的な 20(S)-protopanaxadiol 系の chikusetsusaponin III の他、いずれのカルスでも diol 系の化合物は確認されておらず、カルスにおいてこの系統のサポニンが確認されないということは興味深い。また、原植物の主化合物である chikusetsusaponin V は今のところ単離されていない。カルスから単離したサポニンの構造を



- Callus induced from "Chikusetsu-Ninjin"
- Callus induced from "Satsuma-Ninjin"

	R1	R2
○ 1	: -GlcUA	-Glc:chikusetsusaponinIVa
○● 2, 9	: -GlcUA ⁴ -Ara(f)	-Glc:chikusetsusaponinIV
○● 3, 10	: -GlcUA ⁴ -Ara(f)	-H :desglucosyl-chikusetsusaponinIV
○ 4	: -GlcUA ² -Glc	-H
	↙ Ara(f)	
○ 5	: -GlcUA ² -Glc	-Glc
	↙ Ara(f)	
○ 6	: -GlcUA ⁴ -Glc	-Glc



	R1	R2	R3
● 7	: -H	-0-Glc ² -Rha	-Glc :ginsenosideRg ₁
● 8	: -H	-0-Glc	-Glc :ginsenosideRe

Chart 3 Saponins from Callus Induced from *Panax japonicus*

Chart 3に示した。

総論

現在、市場品の生薬「竹節人参」は国内産および中国からの輸入品を取り扱っている。これらの材料には上記のごとく化学的に本質的な差があることが明らかとなった。化粧品材料として竹節人参を使用するにあっても輸入品と国内産、さらには国内産でも薩摩系とその他の地域のものでは効果に差があることが予想される。天産品である以上、多少のバラツキは致し方ないとしても均一な生薬の安定供給、使用が望まれる。

均一材料の大量生産を期待して、植物組織培養を手段としてカルス生産、種苗生産を行った。カルス誘導に成功し、原植物の本質的な差がそのまま反映された二次代謝産物生産が認められた。しかしながら、20(S)-protopanaxadiol系の化合

物の生産が認められないため、カルス成分では本物質による効果は期待されない。

一方、不定胚増殖法は人工種子材料にもなる遺伝的に安定した増殖法であり、誘導に成功したことは今後、均一な種苗の大量生産の道を開くことになり、均一な生薬の安定供給につながるものと思われる。

今後、薩摩産、広島産(その他の地域の系)トチバニンジン、さらには各々の培養植物、カルス成分について生理作用を検討する予定である。

引用文献

- 1) 近藤紀子, 庄司順三, 薬学雑誌, 88, 325(1968).
- 2) 近藤紀子, 庄司順三, 南雲昇, 小松信彦, 薬学雑誌, 89, 846(1969); N. Kondo, Y. Marumoto and J. Shoji, Chem. Pharm. Bull., 19, 1103 (1971).
- 3) N. Kondo, K. Aoki, H. Ogawa, R. Kasai and

- J. Shoji, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1558(1970).
- 4) T. -D. Lin, N. Kondo and J. Shoji, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 253(1976).
- 5) S. Yahara, O. Tanaka and T. Komori, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 2204(1976).
- 6) S. Yahara, K. Kaji(Née Matsuura) and O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 88(1979).
- 7) S. Yahara, K. Matsuura, R. Kasai and O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 3212(1976).
- 8) S. Yahara, R. Kasai and O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2941(1977).
- 9) S. Yahara, O. Tanaka and I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 3010(1978).
- 10) T. Murachige and F. Skoog, *Physiol. Plant*, 15, 473(1962).
- 11) T. Morita, O. Tanaka and H. Kohda, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3852(1985).
- 12) 青山新次郎, 薬学雑誌, 49, 678(1929); *idem*, *ibid.*, 50, 1076, 1163(1930).
- 13) J. Gunzinger, J. D. Msonthi and K. Hostettman, *Phytochemistry*, 25, 2501(1986).