

薬用人参のギンセノシド詳細分析と
遺伝的多様性に関する研究

2 0 2 3

伊藤 ほのか

目次

諸言	1
第一章：薬用人参研究の変遷と近年の動向	3
第一節 薬用人参研究の全体像と近年の動向	3
1. 薬用人参研究の全体像	
2. 成分研究	
3. 栽培研究	
4. 組織培養	
5. 分子生物学的研究	
6. 薬理学的研究	
7. 臨床研究	
第二節 薬用人参のギンセノシド含量に関する研究の詳細	12
1. ギンセノシド含量に関する研究の概要	
2. ギンセノシド類の局在に関して	
3. 生育年数に伴うギンセノシド含量の変動に関して	
4. 生育環境の影響に関して	
第三節 オタネニンジンの分子生物学研究の詳細	14
1. オタネニンジンの分子生物学研究の概要	
2. 遺伝的多様性や遺伝子情報とギンセノシド含量などとの関係について	
第四節 考察	16
第二章：日本産薬用人参のギンセノシド類の局在と経年変化	18
第一節 ギンセノシド類の詳細分析条件の検討	18
1. 既存のギンセノシド類の分析条件の調査	
2. モノリスキャピラリーカラムを用いたギンセノシド類の分析	
第二節 薬用人参のギンセノシド類の局在と含量の経年変化	25
1. 生育年数とギンセノシド含量の関係	
2. 根の部位によるギンセノシド含量の違い	
第三節 考察	28
第三章：栽培されるオタネニンジンの遺伝的多様性とギンセノシド含量等について	30
第一節 SSR マーカーを用いたオタネニンジンの遺伝的多様性の評価	31
1. 日本国内の主要な産地のオタネニンジンの遺伝的多様性について	
2. 日本国内の主要な産地と韓国および中国のオタネニンジンの遺伝的多様性の比較	

第二節 オタネニンジンの遺伝的多様性と成分含量や根の太さとの関係	35
第三節 考察	37
総括及び結語	41
実験の部	43
発表論文目録	50
謝辞	51
引用文献	52

諸言

我が国では漢方薬や民間薬など生薬を使用した医薬品が伝統的に用いられてきた。特に、漢方薬は 1976 年に多数の医療用漢方製剤が薬価収載されたことを契機に急速に普及し、現代では一般医療の現場で広く利用されている。加えて、セルフメディケーションの場面でも民間薬や生薬製剤が用いられているほか、サプリメントなどのいわゆる健康食品の原料として薬用植物が多用されている。このような背景のもとで近年、生薬の使用量は増加傾向にあるものの、その原材料の大部分を海外からの輸入に依存しており、特に全体の使用量の 80%程度を中国産が占める状態が続いている[1]。しかし、気候変動や環境破壊による生薬資源の枯渇が懸念されているほか、中国が麻黄や甘草などの輸出規制を行っているように、生薬の供給が国際情勢の影響を受ける場合もあり、高まる需要の中で生薬資源を安定的に確保することが課題となっている。

ウコギ科オタネニンジン(*Panax ginseng* C.A. Meyer)の乾燥した根は薬用人参や朝鮮人参、高麗人参などと称し、古くから東アジア諸国で珍重されてきた。中国最古の本草書である神農本草経の上品に収載され、その効能は「五臓を補い精神を安んじ魂魄を定め驚悸を止め邪気を除き目を明らかにし心を開き智を益す。久しく復すれば身を軽くし年を延ばす」とされている。日本では薬用人参は 8 世紀ごろに生薬として中国から伝来した記録があり[2]、現代では人参養栄湯や大建中湯などの様々な漢方処方に配合されているほか、サプリメントなどのいわゆる健康食品や薬膳料理などに広く使用されている。一般的に根をそのまま乾燥したものを人参、蒸してから乾燥したものを紅参と区別し、特徴的な成分としてトリテルペン配糖体のギンセノシド類を含有する。日本薬局方には生薬「ニンジン」として第 6 局から収載されており、現行の第 18 局では定量指標成分として ginsenoside Rb1 および Rg1 が規定されている[3]。

オタネニンジンは韓国、中国、極東ロシアに自生し、かつては野生のものが生薬に使用されることもあったが、乱獲により個体数が激減し、一部地域のものはワシントン条約(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約))の付属書IIに記載されて取引が制限されている。そのため、現在では韓国や中国などを中心に栽培が行われている。圃場での栽培には 4-6 年を要するほか、野生品を模倣して山林で 10 年ほどの年月をかけて栽培する場合もある。日本にはオタネニンジンが自生しないが、江戸時代に行われた享保の改革の一環として、朝鮮から種苗を導入し栽培化に成功して以来、現在まで栽培が続けられている。主な

栽培地は長野県、島根県、福島県であり、特に明治から昭和にかけて盛んに生産され、その多くが海外へ輸出されていた[4,5]。現在も製品の一部は海外へ輸出されているが、栽培の難しさや栽培期間の長さがマイナス要因となり、生産は減少の一途をたどっている。日本特産農産物協会の報告書[6]によると、1982年にはオタネニンジンの栽培農家数は2580戸、土根生産量は613tであったのに対し、2021年には栽培農家数106戸、土根生産量13tまで減少している(図1)。

現在、我が国では高齢化が急速に進んでおり、高齢者の予防医療や健康寿命の延伸が課題となっている。内閣府の「健康・医療戦略」[7]では機能性表示食品等による高齢者のヘルスケアが重要視されている。また、国民の健康と医療を担う漢方の将来ビジョン研究会による提言[8]では、高齢者のフレイル対策の重要性が述べられており、効果が期待される漢方処方として薬用人参を配合した処方が複数挙げられている。こうした背景のもと、薬用人参の使用量は増加傾向にあり(図2)、2020年における国内使用量はおよそ740tで、これは原料生薬の使用量中で10位に位置することから需要の高さがうかがえるが、使用量の約99%が中国からの輸入品である[1]。高齢化の進行とともに、薬用人参の安定供給の重要性は今後さらに高まるものと考えられる。そのため、危険分散や国産化推進の観点から、基原植物であるオタネニンジンの栽培の振興を目標に、その問題点の克服が求められている。本研究では、薬用人参研究の歴史的変遷と近年の動向を調査し、調査結果に基づく栽培振興の基盤整備のための検証の一部として、日本で栽培されているオタネニンジンのギンセノシド類の詳細分析と遺伝的多様性について実験を行い、両者の関係についても考察を行った。

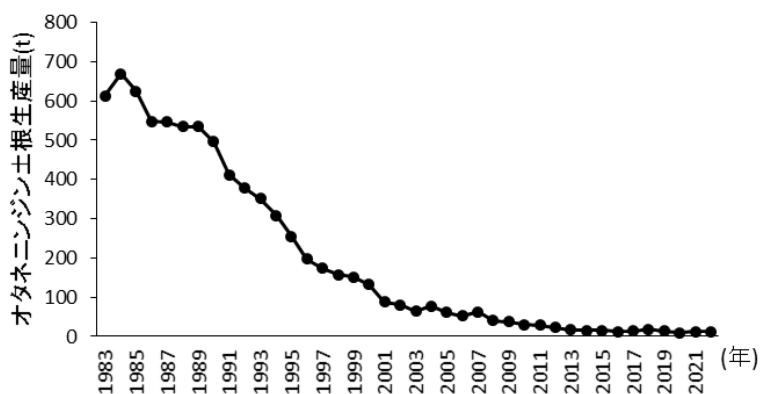


図1 日本でのオタネニンジンの土根生産量の推移。
日本特産農産物協会の報告書[6]をもとに作成

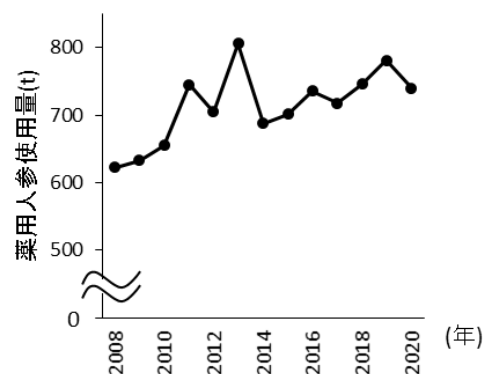


図2 日本での薬用人参使用量の推移。日本漢方生薬製剤協会の報告書[1]をもとに作成

第一章 薬用人参研究の変遷と近年の動向

第一章では、薬用人参研究の現状について整理し、問題解決のためのヒントや新たな展開への糸口を見出すことを目的として、これまで多くの研究者によって行われてきた薬用人参に関する研究についての調査を行った。データベースから収集した文献をもとに近年の研究の動向をまとめ、詳細な調査が必要と思われた、ギンセノシド含量についての研究と分子生物学的研究の2項目について、研究の歴史的変遷を調査した。

第一節 薬用人参研究の全体像と近年の動向

1. 薬用人参研究の全体像について

薬用人参に関する研究について、PubMed, Web of Science, Scifinder[®], Google Scholar を用いて検索した結果、1208 件の文献が得られた。それぞれの文献を要旨の内容やキーワードに基づいて研究分野別に分類すると(分類基準は45 ページを参照),重複するものを含めて、臨床研究 28 件,組織培養 71 件,分子生物学的研究 131 件,薬理学的研究 549 件,栽培研究 58 件,成分研究 262 件,総説論文 123 件,その他植物学的研究 49 件であった(図 3)。これらの文献は中国や韓国の研究グループによるものが多く、日本の研究グループによる報告は全体の 1 割未満の 106 件であった。日本の研究グループによる報告を研究分野別に分類すると、分子生物学研究 2 件,薬理学的研究 70 件,栽培研究 6 件,成分研究 35 件,総説 4 件であった。

比較対象として、薬用人参同様に古くから日本で基原植物が栽培されている生薬のひとつである、大和当帰の研究状況について調査した。その結果、得られた文献は 238 件であり、このうち半数以上の 147 件は日本の研究グループによる報告であった。日本の研究グループによる報告を研究分野別に分類すると、組織培養 1 件,分子生物学的研究 9 件,薬理学的研究 46 件,栽培研究 25 件,成分研究 70 件,総説論文 4 件であった。

両者の比較から、日本では薬用人参の成分や、基原植物であるオタネニンジン[®]の栽培、分子生物学に関する研究が少ないことがわかった。

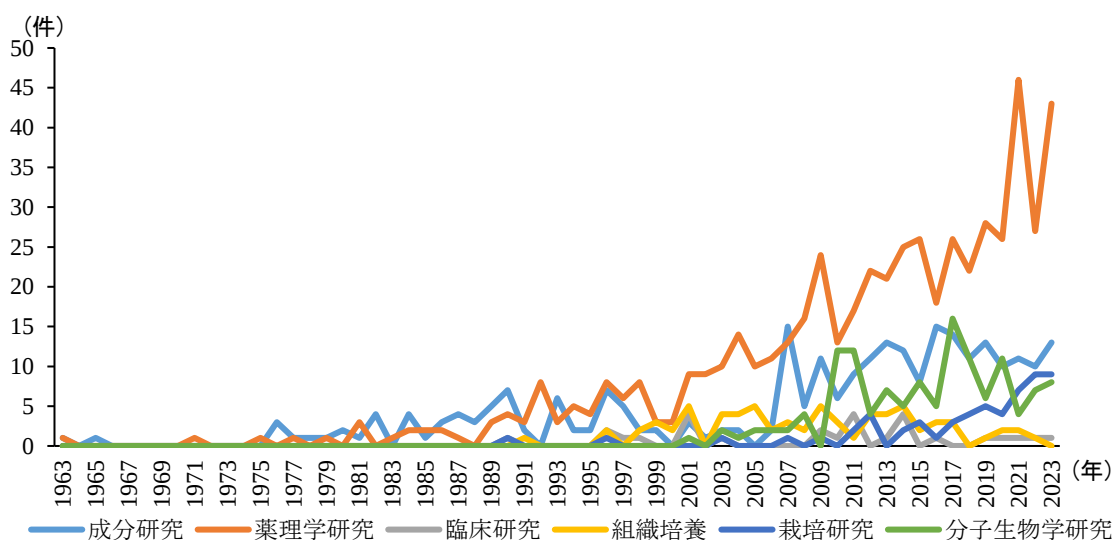


図3 薬用人参研究の各分野の論文件数. 論文件数の年次推移を, 各研究分野ごとに示した

2. 成分研究

薬用人参の含有成分として, ギンセノシド類や多糖類, ポリアセチレン化合物, フェノール性化合物など種々の化合物が報告されており, これらの化合物に関する研究の中でも, 特徴的な成分であり様々な薬理作用を示すギンセノシド類を対象とした研究が最も多い[9-28]. ギンセノシド類は基本骨格に基づいてプロトパナキサジオール系, プロトパナキサトリオール系, オレアナン系などに分類され, 側鎖の構造が異なる多数の類縁体が存在する[9-12]. 日本薬局方の定量指標成分として規定されている ginsenoside Rb1 および Rg1 はそれぞれ 1970 年代に単離され, 構造が報告された[13,14]. そして, 2019 年までに, オタネニンジンの根や葉, 花, 果実などの部位から合わせて約 170 種類のギンセノシド類が単離同定されている[9]. 最も早くに構造決定されたものは 1971 年の ginsenoside Rg1 であり[14], 最も近年に構造決定されたものは 2022 年に報告された 20(S)-Ginsenoside Re10 および 20(R)-Ginsenoside Re11 である[10]. また, 根に含まれるギンセノシド類では, 側鎖として 1-5 個の糖が結合しており, 糖が 4 個のものが最も多い[9]. 近年では化合物の構造決定に関する研究は多くなく, MS などを使用した二次代謝産物の網羅的解析や品質評価に関する研究が多く行われている[11, 12, 15-21]. LC-MS を用いた品質評価研究では, ギンセノシド類の含量や成分パターンと, オタネニンジンの栽培地や生育年数との関連に関する調査などが多い. 栽培地の違いに関する研究では, ギンセノシドのプロファイルに関して, モンスーン気候や大陸性気候などの気候の違いによる差や中国・韓国・日本など生産国の違いによる差な

どが調査されており，多変量解析により栽培地の識別が可能であることや，生産国によって成分組成が異なり，中国産では ginsenoside Ro，韓国産では Ra1, Ra2, Ra3, Rk1，日本産では Rb1, Rb2, Rc が多い [11, 12, 15]. 生育年数に関する調査では，LC-MS に加えてイメージング MS を用いた解析も行われており，栽培年数ごとに根に含まれるギンセノシド類のプロファイルが異なり，Rg1 や Rb1 など複数の化合物が生育年数の鑑別に有効である可能性がある[16-18, 22]. ギンセノシド類以外の成分に関する研究の一例として，オタネニンジンの地上部に含まれる揮発性有機化合物の分析が行われている．葉および茎から検出されたセスキテルペンの 1 種である 1-cyclohexene-1-carboxaldehyde, 2, 6, 6-trimethyl- (図 4) はオタネニンジンの生育年数を鑑別するためのバイオマーカーとなり得る化合物であり，これを用いた生育年数の予測は，商品価値が高い粗放栽培のオタネニンジンの品質評価へ有用である可能性がある[23]. また，オタネニンジンの地下部に含まれる多糖類はギンセノシド類以外の活性化合物として知られており，メチル化反応や加水分解，MS 測定，NMR 測定などによる構造の解析や薬理活性について調査されている[21, 24-28]. 根に含まれる酸性多糖としてラムノガラクトツロナン I に分類されるものが複数あり，動物実験で疲労回復作用や免疫刺激作用を示す [24-26].

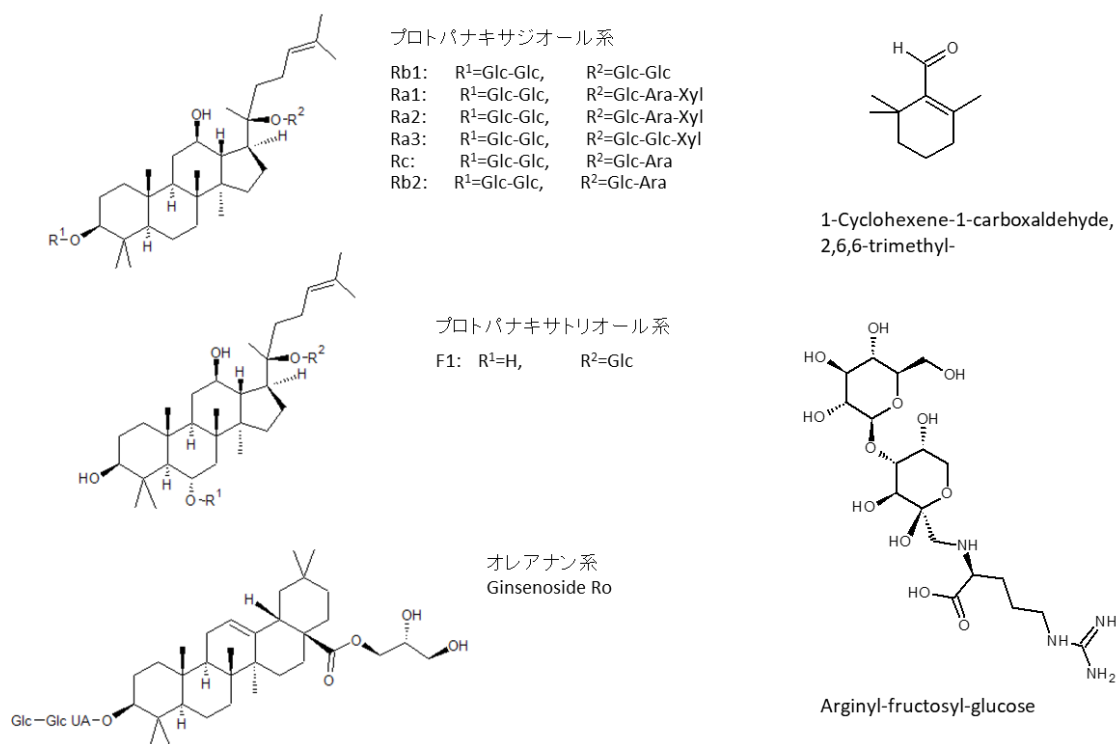


図 4 オタネニンジンに含まれる化合物の構造式

3. 栽培研究

オタネニンジン栽培研究は土壌分析や微生物の調査、栽培条件と根重量やギンセノシド含量等との関連の調査、植物工場での栽培方法の検討など多岐にわたる。土壌の元素や微生物の多様性、施肥条件、栽培年数などと、植物の形態学的特徴、根重量、成分含量などは互いに相関関係を示す[20, 29-35]。日本のオタネニンジン産地の一つである島根県では、農地の黒ボク土に多量に含まれるアルミニウムが根の成長を阻害することによって、他の栽培地と比較して根が小さくなる[29]。また、韓国では粗放栽培によって生育したオタネニンジン栽培の根の長さなどの成長特性が、土壌の pH や陽イオン交換量 (CEC)、全窒素、有機物等と相関を示すほか、根の長さとギンセノシド含量が正の相関を示す [30-32]。栽培期間中の施肥条件については、肥料の種類によってオタネニンジン栽培の生育やギンセノシド含量に与える影響が異なるほか、N:P:K=3:1:3 の比率で最も生育が良く、成分含量も多くなり、さらに根圏の真菌で病原性を示すものの割合が減少し、生育に有用な真菌の割合が増加する[33, 34]。オタネニンジン栽培の土壌に分布する微生物や植物内生菌に関する研究が複数行われている[36-45]。特にこれら微生物とオタネニンジン栽培の病害との関連が数多く調査されており、植物内生菌の *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma citrinoviride*, *Burkholderia stabilis* や土壌細菌の *Brevundimonas terrae* 等が病原微生物に対して阻害活性を示す二次代謝産物を産生するほか、オタネニンジン栽培の防御反応を誘導し防除効果を示すことや、生育の促進、ギンセノシドの生合成促進の作用を示す [37-40, 44]。また、原因菌が特定されていない病害である Red skin root は、根圏の *Proteobacteria* や *Ascomycota* 等の数種類の微生物と関連を示すことに加え、これら土壌の微生物のネットワークには土壌のリンやカリウム、カタラーゼ、インペルターゼ等が影響する[36]。オタネニンジン栽培は圃場や山林以外でも行われている。植物工場は環境の変化や病害の影響を受けにくい等の利点があるため、これを利用した栽培が試みられている。人為的な環境下で実生苗を生産する場合は、光量や培養液の伝導率、栽植密度等が根重量やギンセノシド含量などに影響を及ぼすため、最適な栽培条件の検討や、生産したオタネニンジン栽培の品質評価などが行われている[46-51]。

4. 組織培養

オタネニンジンには利用価値が高いものの生産に長期間を要すほか、気候の制約を受ける[11,31]。そのため、効率的かつ栽培に適さない地域でも生産が可能な組織培養が行われてきた。一般的に組織培養はコストの面で植物の栽培生産には不適とされることが多いが、オタネニンジン単価が高い薬用植物であるため、組織培養によって生産した不定根や培養細胞などが製品やエキスの原料として利用される場合があり、培養条件や培養物の含有成分等についての研究が行われている。ギンセノシド類などの含有成分やバイオマスを指標とした場合、カルスや毛状根と比較して不定根が培養に適している[52]。不定根の培養はフラスコを用いた振とう培養法や固形培地での培養に加えて、バイオリクターを用いる方法がある[53,54]。大量培養を行う場合は、フラスコを用いた振とう培養に比べてバイオリクターで成長率が高く、2倍以上の差がある[55]。培養根の有効性や安全性についての *in vitro* の実験で、培養根から調製したエキスは抗トロンビン作用や駆虫作用、メラニン生成阻害作用などを示し、細胞毒性を示さないことが確認されている[55,56]。ジャスモン酸メチルなどの植物の防御反応を誘発する物質の投与はギンセノシド含量を増加させ、この際、ポリアミン類の *putrescine* や一酸化窒素、過酸化水素などがシグナル分子として働く[53]。培養根を長期間培養すると、DNA のメチル化などの影響により収量やギンセノシド含量の低下を招く可能性がある[57]。これに対し、少量のガンマ線を照射した場合、培養根に突然変異を誘発して収量やギンセノシド含量の増加をもたらすため、長期間の培養による品質の低下に対する有用な対処法となりうる[54]。遺伝子操作によってオタネニンジン培養根の含有成分を操作する試みもなされている。アントシアニンの生合成に関連するタンパク質である *PAP1* を過剰発現したオタネニンジンの培養根では、対照群と比較して一部のギンセノシド類の含量を低下させるものの、もともと根にほとんど含まれないアントシアニン類を生合成する[58]。

このように種々の研究が行われている培養根の使用状況について、google 検索により情報収集したところ(調査方法は 45 ページ参照)、2023 年時点で、原材料として培養根末を使用したいわゆる健康食品が国内製造品で少なくとも 7 件販売されており、日本国内で流通していることが確認された。

5. 分子生物学的研究

オタネニンジン分子生物学的な研究として、遺伝子発現に関する調査や、遺伝的多様性の調査、染色体マッピングなどが行われており、近年では特にギンセノシド類の生合成に関連する酵素の発現や植物体のストレス応答などに関連する遺伝子発現系に関する研究が盛んに行われている[59-70]。トリテルペン配糖体であるギンセノシド類のアグリコンはメバロン酸経路によって生合成され、経路上のスクワレン合成酵素や β -アミリン酸化酵素、ダンマレンジオール合成酵素等のクローニング研究が行われている [71-77]。ギンセノシド類の生合成と転写因子の関連についても調査が行われており、植物に特有の転写因子である GRAS タンパクや、APETALA2/ethylene-responsive factor などの発現量が生育年数や植物体の部位によって変化することでギンセノシド含量に影響する [59,60]。ストレス応答に関する遺伝子発現については、ストレス応答で重要な役割を担うことが知られている NF-Y や HD-Zip, PgbZIP, C2H2-ZFP などの転写因子と種々のストレスとの関連が調査されており、オタネニンジンで転写因子の発現量が塩分ストレス、pH ストレス、干ばつストレスなどを受けて上昇する [61-64]。オタネニンジンの遺伝的多様性に関しては、韓国や中国で栽培されているものやロシアで自生しているもの等に関して、マイクロサテライトマーカー等を使用した系統解析が行われている[78-82]。

6. 薬理学的研究

薬用人参の薬理学的研究は抽出エキスのほかにギンセノシド類や多糖類，ポリアセチレン化合物，メラノイジン，ペプチド類，フェノール性化合物など様々な含有成分を対象として行われており，化合物単体の薬理活性は特にギンセノシド類や多糖類に関する報告が多い．これまでに報告されているギンセノシド類の薬理作用を表 1 にまとめた．日本薬局方の定量指標成分である Ginsenoside Rb1 および Rg1 について複数の研究が行われている．Rb1 はマウスの単回経口投与および 3 週間の経口投与で抗うつ作用を示し，モノアミン類やアミノ酸などの受容体，BDNF-TrkB-CREB シグナル伝達系が活性に関与する[83, 84]．また，炎症性腸疾患モデルマウスに 7 日間腹腔内投与した場合，Nrf2/PI3K/NLRP3 シグナル伝達経路を調節することにより炎症応答を阻害することに加え，SOD の活性上昇させることで，治療効果を示す[85]．このほかに，Rb1 は長期の腹腔内投与での肥満症の改善や糖尿病による肺損傷の改善，長期の経口投与で老化を遅延させる [86-88]．Ginsenoside Rg1 では，短期経口投与および長期の腹腔内投与で，SIRT1 の活性化や AhR 核内移行の調節による肝障害の改善作用を示す [89, 90]．また，8 週間の経口投与では，糖尿病モデルマウスの CD36 の過剰発現の減少と TRPC/NFAT2 シグナル経路の阻害によって腎障害症状を改善する[91]．このほかに，14 日間の経口投与によって NMDA 受容体の NR2B の活性を調節し，アルコールに起因する認知障害を改善する [92]．他のギンセノシド類に関しても免疫調節作用，抗腫瘍活性，心血管系への作用など様々な薬理作用の調査やメカニズムの解明が行われている [93-99]．例えば，Ginsenoside F1 は肥満・糖尿病モデルマウスで血糖降下作用や中性脂肪を減少させ，そのメカニズムはアドレナリン $\beta 3$ 受容体に結合することにより熱産生タンパク (UCP1) の発現を増加させることである[93]．薬用人参に含まれる多糖類の薬理作用に関しては，マウスへの長期経口投与で JAK2/STAT1/NLRP3 シグナル経路を阻害して炎症性腸疾患の炎症反応を軽減することや，短期経口投与で腸内細菌叢の調節と AMPK 経路を活性化して脂質代謝を改善するほか，線虫で TOR シグナル経路を活性化し寿命延長作用を示す [100-102]．その他，オタネニンジン（紅参）を加工する際のメイラード反応で生じる Arginyl-fructosyl-glucose (図 4) は，マウスに長期経口投与することで脳の老化を抑制し，そのメカニズムは抗酸化作用によりミトコンドリアの機能不全を抑制するものであることが示唆されている[103]．

表 1 これまでに報告されているギンセノシド類の主な薬理作用

化合物名	薬理作用
Rb1	α アミラーゼ阻害活性[104], 抗炎症作用[85], 臓器保護作用[86], 神経保護作用[105-107], 抗うつ作用[83,84,108], メラニン生成阻害作用[109], 抗老化作用[88], エストロゲン受容体活性化作用[110], 抗肥満作用[87]
Rb2	免疫賦活作用[98]
Rc	心筋保護作用[96], 抗炎症作用[131]
Rd	プロテアソーム阻害作用[132]
Re	神経保護作用[115], 抗炎症作用[119,120], 抗糖尿病作用[121], 造血機能改善作用[122], アジュバント作用[117]
Rf	タウ凝集阻害作用[133], 抗肥満作用[134], 抗炎症作用[127]
Rg1	抗老化作用[111], 神経保護作用[105], 認知機能改善作用[92,112], 臓器保護作用[89-91,113], 抗うつ作用[114], 抗アレルギー作用[115], 抗モルヒネ依存作用[116], アジュバント作用[117]
Rg2	抗老化作用[97], 心筋保護作用[135], 皮膚保護作用[136]
Rg3	臓器保護作用[123,124], 抗炎症作用[125-127], 神経保護作用[106,128], 認知機能改善作用[129], 抗腫瘍活性[130]
Rg4	抗炎症作用[99]
Rg5	抗腫瘍活性[137,138], 美白作用[139], 抗肥満作用[140], インスリン抵抗性改善作用[141]
Rh1	抗腫瘍活性[143], 臓器保護作用[144], 認知機能改善作用[145], 抗肥満作用[146], 抗アレルギー作用[147]
Rh2	抗腫瘍活性[148,149], 心筋保護作用[150], 皮膚保護作用[151], 抗炎症作用[127]
Rk1	美白作用[139], 抗肥満作用[140], インスリン抵抗性改善作用[141], 抗腫瘍活性[137,142]
Rk3	造血機能改善作用[122], 神経保護作用[94], 認知機能改善作用[94]
Ro	抗炎症活性[152-154], 抗腫瘍活性[155], 抗 AGA 作用[156]
CK	抗腫瘍活性[95,163], 骨髄抑制改善作用[164]
F1	血糖降下作用[93], 中性脂肪減少作用[93]
F2	抗肥満作用[165]
20R-Rg3	臓器保護作用[157,158]
20S-Rg3	神経保護作用[159],
20R-Rh2	心筋保護作用[160], 抗ウイルス作用[161]
20S-Rh2	アルドース還元酵素阻害作用[162]

カッコ内は参考文献の番号を示す

7. 臨床研究

薬用人参に関する臨床研究として、循環器系、糖代謝、ストレス、免疫反応、皮膚症状などの様々な症状に対する効果が調査されている[166-174]。ランダム化比較試験のメタアナリシスでは、糖代謝の改善や呼吸器疾患に関連する免疫反応の緩和に薬用人参が有用であり、重篤な有害事象もみられない[166, 167]。COVID-19 の後遺症としても知られる慢性疲労症候群の患者に対して薬用人参のエキスを 1 か月程度経口投与した場合に、VAS や NRS などのスコアを有意に改善する [171, 172]。紅参エキスの 2 週間の経口投与はプラセボと比較して、健常人のストレスによる認知機能の低下を有意に軽減させ、その効果は白参エキスよりも優れている [168]。循環器系に対する作用では、薬用人参エキスの単回経口投与で血圧の有意な低下や、血管内皮機能の改善がみられ、薬効成分は多糖類ではなくギンセノシド類である可能性がある[173, 174]。皮膚症状に対する薬用人参の効果についての研究では、紅参エキスの長期経口投与によるしわの改善や、ポリアセチレン化合物を主成分とする画分を 4 週間外用することにより尋常性ざ瘡の改善効果を示す[159, 170]。

第二節 薬用人参のギンセノシド含量に関する研究の詳細

1. ギンセノシド含量に関する研究の概要

日本では薬用人参の成分研究やオタネニンジン栽培研究がそれほど多く行われていなかったため、特に品質を左右するギンセノシド含量に関する研究について、さらに詳細を調査した。オタネニンジン栽培年数とギンセノシド含量との関係、植物の部位ごとのギンセノシド類の含量や組成、栽培地とギンセノシド含量の関係などは 1970 年後半から韓国や中国等の多数の研究グループによって研究されてきた。また、薬用人参を加熱などによって加工することによるギンセノシド類の含量や組成の変化についても調査が行われてきた。分析手法やデータ解析手法の発展を伴いつつ、近年でもこれらの研究が行われていた。

2. ギンセノシド類の局在に関して

オタネニンジンに含まれるギンセノシド類の単位重量当たりの含量は植物の部位によって異なる。過去の研究で、葉や細根でギンセノシド含量が高くそれぞれおよそ 30–70 mg/g (葉), 12–85 mg/g (細根), 次いで根茎がおよそ 10–38 mg/g, そして薬用部位として最もよく用いられる主根では含量が低く、およそ 25–36 mg/g 程度である [175-179]。また、部位によって成分組成が異なり、主根では ginsenoside Rg1 の割合が高く、葉では ginsenoside Re の割合が高い[175-178]。また、ギンセノシド類は主根でさらに局在を示し、表皮～皮層で最も含量が高く、中心部ほど含量が低い[175,176,180]。しかし、オレアナン系の ginsenoside Ro は他のギンセノシド類とは異なり髄で高含量を示す[175, 16]ほか、Zhang ら[176]によると、主根の中心部の主成分は Rg1, Re, Rb1 である。

3. 生育年数に伴うギンセノシド含量の変動に関して

薬用人参のギンセノシド含量は生育年数の影響を受けるとされ、複数の研究者がこれについて報告を行っている。しかし、年数の増加と共に含量が増加報告や 4 年目前後で減少を示す報告[175]、および年数とともに減少する報告があるなど、結果に共通性がない。成分が生育課程で減少することに関しては、根重量の急激な増大[175]や、ギンセノシド類が局在を示す表皮～皮層の割合が減少することが原因であると考察されている[183]。以下の表 2 に、これまでに報告されている、地下部における総ギンセノシド含量の経年変化をまとめた。

表 2 総ギンセノシド含量の経年変化

	部位	1year	2year	3year	4year	5year	6year
Samukawa et al.[175]	全根	7.899 mg/g	14.952 mg/g	16.864 mg/g	8.386 mg/g	14.153 mg/g	16.229 mg/g
Zhang et al. [176]	主根	16.27 mg/g	19.79 mg/g	20.77 mg/g	23.48 mg/g	24.17 mg/g	24.68 mg/g
Li et al. [181]	全根	25.77 mg/g	35.98 mg/g	39.86 mg/g	41.96 mg/g	46.00 mg/g	39.02 mg/g
Lee et al. [182]	主根	0.93%	0.93%	0.94%	0.79%	0.77%	-
Han et al. [183]	主根	-	-	-	29.65 mg/g	28.76 mg/g	26.34 mg/g

4. 生育環境の影響に関して

オタネニンジン根の太さやギンセノシド含量などは生育環境による影響を受け、気候や土壌の特徴が関連を示す。Jia らによると、ギンセノシド含量と栽培地の気温は強い相関を示し、湿度や標高、日照時間は弱い相関を示す [184]。また、Kim らは、複数の栽培地で栽培したオタネニンジン根の形態的特徴や栽培地の土壌について分析し、根重量等と pH および Ca, Mg, K などのミネラルが相関を示すことを報告している[185]ほか、Yu らは全リン(無機リンと有機リンの総含量)は Re と負の相関を示すことを報告している[186]。土壌の組成については、オタネニンジン根の栽培年数とともに変化することが報告されているほか栽培地によっても異なり[29-31]、気温等の気象条件については栽培地によって大きく異なることから、オタネニンジン根の含有成分及び形態的特徴は栽培地によって異なると判断できる。

第三節 オタネニンジン分子生物学研究の詳細

1. オタネニンジン分子生物学研究の概要

他の研究分野と比較して報告が少なかった分子生物学的研究について、現状を整理するためにさらに詳細を調査した。

オタネニンジン分子生物学的研究の歴史は比較的浅く、1990年代後半から発展してきた。2000年代初頭までは主にギンセノシド類の生合成に関連する酵素のクローニングや、系統解析などが行われており、系統解析ではウコギ科トチバニンジン属の種間の系統関係や、オタネニンジン種内での遺伝的多様性について調査されていた。2010年代に入るとこれらに加えてトランスクリプトーム解析を応用した研究も盛んに行われるようになった。

2. 遺伝的多様性や遺伝子情報とギンセノシド含量などとの関係について

オタネニンジン種内での遺伝的多様性の解析として RAPD 法や AFLP 法, ISSR を用いた方法[187-189] (図 5), 葉緑体全ゲノムの配列を用いる方法[190]などが報告されているが、最も頻繁に行われているのはマイクロサテライトマーカーを使用した方法である[188, 191-193,78-80,82]。この方法で、ロシアや韓国、中国のオタネニンジン種内での遺伝的多様性が調査されてきた (表 3)。ロシアに自生するオタネニジンは地域ごとに異なる遺伝的多様性を示す[82]が、韓国や中国で栽培されるオタネニンジン種内での遺伝的多様性は栽培地とは関連を示さない[193,80]。韓国や中国ではオタネニンジン登録品種が多数存在し、品種の鑑別に有用なマイクロサテライトマーカーが複数開発されていた[191,192]。ギンセノシド類の生合成等に係る酵素の遺伝子の変異に関してはこれまでほとんど報告がないものの、オタネニンジン種内での遺伝的多様性は主根のギンセノシド含量等にも影響する[194]。中国で栽培されているオタネニンジン種内での、ginsenoside Rd の含量や HPLC のクロマトグラムのパターンは ISSR マーカーによる遺伝的多様性と関連する [186]。

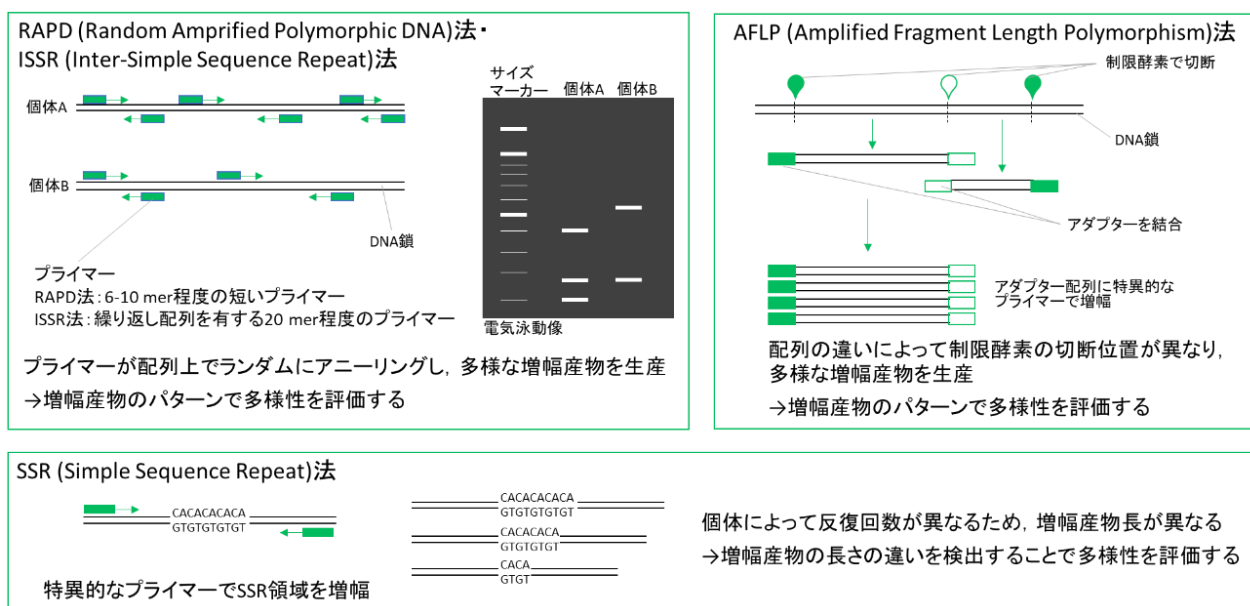


図 5 遺伝的多様性の解析手法について

表 3 マイクロサテライトマーカーを使用した遺伝的多様性の解析のまとめ

	集団	使用したマーカーの数	対立遺伝子数の平均値	ヘテロ接合度の平均値
Kim et al. (2012) [191]	韓国の栽培品, n=70	6	3	0.019
Reunova et al. (2014) [82]	ロシア野生品, n=139	8	2.49	0.453
Um et al. (2016) [192]	韓国の栽培品種 6 種, n=115	8	4.13	0.32
An et al. (2017) [193]	中国の栽培品, n=73	8	7	0.324
Jang et al. (2019) [79]	韓国栽培品(n=118), 韓国野生品(n=23), ロシア野生品(n=3), 日本栽培品(n=3), n=147	5	3.8	0.115
Lee et al. (2020) [78]	韓国栽培品 n=451	33	6.85	0.88
Lee et al. (2020) [80]	韓国栽培品 n=1109	17	3.29	0.95

対立遺伝子：

ゲノム上の特定の位置における DNA 配列が 2 種類以上ある場合, そのうちの 1 つを対立遺伝子と呼ぶ. (p.33 図 14 参照)

ヘテロ接合度：

集団内のヘテロ接合の個体の割合のことを指す. (p.33 図 14 参照)

第四節 考察

薬用人参の研究は薬理作用に関するものが最も多く、次いで成分研究が多かった。一方で栽培研究や分子生物学的研究は多くなかった。このことから、薬用人参は作用や有効成分について特に関心が向けられていると判断できる。文献のほとんどは韓国や中国の研究グループによるものであり、日本の研究グループによる報告は一割に満たなかった。比較対象として大和当帰では、文献の半数以上が日本の研究グループによるものであり、文献の数も、日本の研究グループによる薬用人参についての文献数を上回っていることに加え、栽培や成分に関する研究が多く行われていた。これは、薬用人参は日本で長い栽培の歴史があるにもかかわらず、栽培等に関して十分な検討が行われていないということを示していると考えられた。このことについて、薬用人参は市場価格が高いため非常に収益性が高く、生産者が栽培に関する独自のノウハウを開示することを望まず、その結果栽培に関する研究がほとんど行われなかったのではないかと思われた。

これまでに薬用人参の特徴的な成分であるギンセノシド類のみならず、ラムノガラクトロナンのような多糖類の複雑な構造が明らかになっており、それら化合物の薬理作用や作用メカニズムの解明も進んでいる。成分研究では、分析手法の発達に伴い、根に含まれる多数のギンセノシド類を一斉分析して異なる産地間や生育年数間での差を可視化することが可能になっている。これまでに十分な調査がなされていない生産地の個体や、根以外の部位、ギンセノシド類以外の成分などに関してさらに調査を行うことで品質評価に有用な知見が得られると考えられる。一方で薬理学的研究では、ギンセノシド類をはじめとした種々の化合物の薬理作用とそのメカニズムが明らかにされてきたが、複数の化合物の相互作用等についてはほとんど報告がなく、これらについても調査することが必要であると考えられる。

栽培研究や分子生物学的研究の文献は多くないものの、栽培土壌や施肥とオタネニンジン¹⁾の成長やギンセノシド含量などとの関連、そして遺伝子発現等についても解明が進んでいる。栽培研究では、オタネニンジン¹⁾の生育やギンセノシド含量に対する、土壌や施肥の条件および遺伝子発現などの影響が示されている。分子生物学的研究では、ストレス応答に係る遺伝子発現の調査や遺伝的多様性の調査が行われていた。これらの結果を施肥条件の改善や遺伝子情報を用いた個体の選抜などのような形でオタネニンジン¹⁾の栽培に応用することは、栽培方法を改良することやより優れた薬用人参を生産することに有用であると考えられる。

薬用人参やオタネニンジン¹⁾の培養根は粉末や抽出物として、タブレットやカプセル、飲

料などのいわゆる健康食品、そして化粧品などに広く用いられている。また、果実や花などが原料として使用される場合もある。これらの製品は医薬品と比較して手軽に利用でき、消費者の健康の維持や QOL の向上に有用であるが、機能性表示食品としての届け出があるものなど、安全性や期待される効果の科学的根拠が十分に示されているものは多くない。また、機能性表示食品や医薬品の有効性の根拠としてヒト試験の結果が必要であるが、薬用人参を用いた臨床研究では、大規模試験は少なく、パイロット試験の結果に留まるものや健常人を対象した試験などが複数あった。今後さらなるデータの蓄積が重要であると考えられる。

薬用人参のギンセノシド含量に関する研究について詳細な調査を行った結果、ギンセノシド含量と栽培年数の関係については複数の異なる傾向が報告されていたが、これは栽培条件や収穫時期の違い、そして実験方法の違いなどが影響したと考えられる。第一節でまとめた通り、オタネニンジン栽培地の気候や土壌、施肥等がギンセノシド類の組成や含量に影響を及ぼすことに加え、植物の防御反応に関連する物質がギンセノシド含量に影響する可能性が示されていたことから、病原菌や害虫の有無なども含めた栽培環境の違いによって異なる結果が示されたと推測される。また、ギンセノシドが内部構造に基づく局在を示すことから、成分の含量が根の太さによる影響を受けることも関係していると考えられる。これまでに Lee ら[182] はギンセノシド類が主根の周皮に局在していることを指摘し、各組織ごとの総ギンセノシド含量の経年変化を調査しているものの、個別の化合物については報告しておらず、一年目の根については調査を行っていない。このほかに実験方法の影響として、例数が少なく統計的な検討を行っていない報告や個体別分析ではなく複数の個体を混合して分析している報告等、個体間のばらつきが考慮されていない文献が多かったほか、成分分析の対象とした部位が全根の場合や主根のみの場合があったこと、測定対象化合物や分析条件が文献ごとに違ったことなどが異なる結果を生じた要因であったのではないかと推察された。

日本で生産された薬用人参の根のギンセノシド含量の変動についてより詳細な評価を行うために、成分の局在や栽培地の違い、個体間のばらつき等、種々の要因を考慮した調査が必要であると考えられる。

オタネニンジン分子生物学的研究のうち遺伝的多様性等について詳細に調査を行った結果、日本で栽培されるものに関してはほとんど報告がないことが判明した。これは先述の通り、生産者の協力を得ることが難しかったことが一因であると思われる。一方で、韓国や

中国、ロシア等のオタネニンジンに関しては複数の報告があったため[78-80, 82, 191-193], これらの報告で用いられている手法を日本のオタネニンジンに適用することで、日本のオタネニンジン種の遺伝的多様性に関する情報を得るのみならず、他国のオタネニンジンと比較して考察することが可能であると考えられる。

以上より、薬用人参は日本で生産されている他の生薬と比較しても基原植物の栽培や成分含量等に関する研究が少なく、栽培振興のための基盤整備の一部として、ギンセノシド含量についての詳細な調査を行うことや、遺伝的多様性について調査を行うことが必要であると考えられた。

第二章：日本産薬用人参のギンセノシド類の局在と経年変化

薬用人参は栽培年数に応じてギンセノシド含量が高くなると言われており、一般に栽培年数が長いほど市場価格が高い。一方で第一章での文献調査では、複数の先行研究で薬用人参の栽培年数とギンセノシド含量の関係が報告されていたが、栽培年数とともに含量が増加する報告や減少する報告があるなど結果に共通性がなく[175,176,181-183]、考察で述べたように、成分の局在や根の太さ、個体間のばらつき等、種々の要因を考慮した詳細な調査が必要であると考えられた。このため、第二章では栽培期間中のギンセノシド含量の変動を明らかにすることを目的として、日本産薬用人参の主根のギンセノシド類の局在と含量を調査した。

第一節 ギンセノシド類の詳細分析条件の検討

1. 既存のギンセノシド類の分析条件の調査

現在、ギンセノシド類の分析には HPLC が汎用されているため、これまでに報告されているギンセノシド類の分析条件を調査した。ギンセノシド類は構造の類似性が高い多数の類縁体が存在し分離が困難であるため、分離改善を目的として、カラムの充填剤や移動相の検討およびカラム温度や流量のグラジエント条件の検討が行われていた[195,196]。また、より高感度な分析を行うために、UV 検出器ではなく ELSD や MS 検出器を使用している例や、UPLC-MS を使用した例もみられた[176,197, 198]。以上の分析条件の詳細を表 4 にまとめた。これらの分析方法によって多数のギンセノシド類を一斉分析することが可能となっていた。しかし、ギンセノシド類の局在と経年変化を個体別に調査するにあたって、1 年根などの生育年数の短い根は根重量が少なく、既存の分析条件では分析が困難であることが懸念され、微量の試料を用いてギンセノシド類を高感度に分析可能な条件が必要であると考えられた。

表 4 HPLC によるギンセノシド類の分離条件

分析装置	抽出条件	測定条件	分析化合物	参考文献
HPLC-UV	粉末 10 g から調製したエキスを 1 mg/mL に再溶解	カラム: Nucleosil 10NH ₂ (3.9 mm × 30 cm), 移動相: Acetonitrile: water = 82:18, 検出波長 202 nm, 流量: 1 min→10 min; 1 mL/min, 10 min→15 min; 1 mL→2 mL/min, 15 min→30 min; 2 mL/min	Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1	Nishimoto et al. (1986) [196]
HPLC-UV	粉末 3 g から調製したエキスを 30 mL の含水アセトリルに溶解	カラム: Superspher RP-18 (4.0 mm × 250mm), 移動相: (A)acetonitrile: water: 0.1% H ₃ PO ₄ = 21: 72: 8, (B)acetonitrile, 流量: 0.8 mL/min グラジエント条件: 0→19 min: 100% (A), 19→20 min: 100→90% (A), 20→73 min: 90% (A), 73→103 min: 90→70% (A), 103→120 min: 70% (A), カラム温度: 0→30 min: 35°C, 30→60 min: 55°C, 60→120 min: 35°C, 検出波長 202 nm	Ro, Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rs1, R1, 20(S)-Rg2, 20(R)-Rg2, 20(S)-Rg3, 20(R)-Rg3, 20(S)-Rh1, 20(R)-Rh1	Samukawa et al. (1995) [195]
HPLC-ELSD	粉末 1 g から調製したエキスを 20 mL の水に溶解し, 前処理カラムで精製	カラム: Discovery C18 (4.6 mm × 250 mm), カラム温度: 40°C, 移動相: acetonitrile: water: 5% acetic acid= 10: 85: 5 (A), acetonitrile: water= 80: 20 (B), グラジエント条件: 0 min (0% B), 0–10min (30%B), 10–25 min (50% B), 25–40 min (100% B), 40–50 min (100% B), 50–53 min (0% B), and 53–60 min (0% B). 流量: 1.5 mL/min, インジェクション: 10 µL	Rg1, Re, Rf, Rb1 Rc, Rb2, Rd, F4, Rg6, Rk3, Rh4, 20(S)-, 20(R)-Rg3, 20(S)-, 20(R)-Rs3, Rk1, Rg5, Rs4, Rs5	Sun et al. (2009) [197]
HPLC-MS	粉末 0.5 g から調製したエキスを 5 mL の MeOH に溶解したのち適宜希釈	カラム: Zorbax Extrend-C18 (250 × 4.6 mm) カラム温度: 40°C, 移動相: acetic acid: water= 0.1: 100 (A), acetic acid: water: acetonitrile= 0.1: 20: 80 (B), 流量 0.5 mL/min, グラジエント条件: 0-10 min: 30%-40%B, 10-15 min: 40% B, 15-25 min: 40-46% B, 25-65 min: 46-65% B, 65-75 min: 65-75% B,	Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2	Wang et al. (2006) [198]
UPLC-MS	粉末 1 g から調製したエキスを, 4 mL の MeOH に溶解	カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 µm), カラム温度: 25°C, 移動相: water(A), acetonitrile(B), グラジエント条件: 0–4.0 min, 19% B; 4.0–7.0 min, 19%–30% B; 7.0–15.0 min, 30%–32% B; 15.0–16.0 min, 32%–80% B. インジェクション: 2 µL	Rg1, Re, Ro, Rf, Rb1, Rc, Rb2, Rd, Rg2, F5, F3, Rb3, M-Re	Zhang et al. (2014) [176]

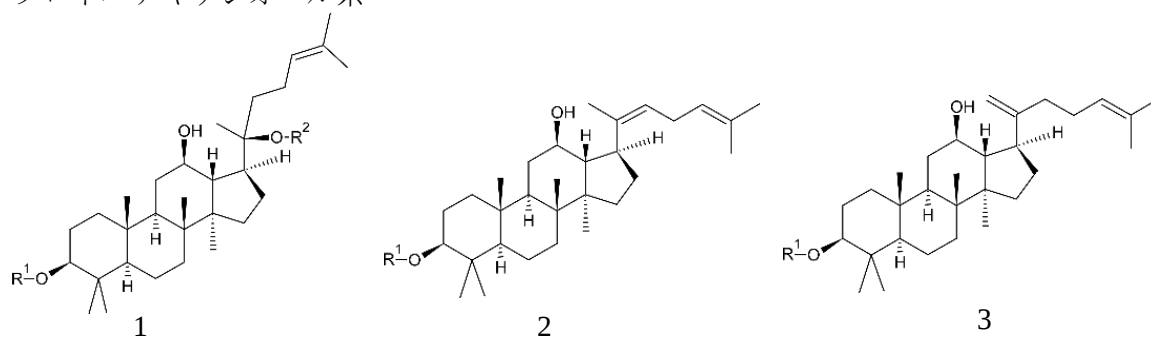
表 4 続き

分析装置	抽出条件	測定条件	分析化合物	参考文献
UPLC-MS	200 mg の粉末を, 2 mL の 70% MeOH で抽出したものを試料とした	カラム : ACQUITY BEH C18 column (2.1 mm × 100 mm; 1.7 μm), カラム温度 : 40°C, 移動相 : water and 0.1% formic acid (A) acetonitrile and 0.1% formic acid (B), グラジエント条件 : 0–0.5 min, B 15%; 0.5–1 min, B 15–20%; 1–6 min, B 20%; 6–13 min, B 20–30%; 13–23 min, B 30–35%; 23–24 min, B 35–38%; 24–27 min, B 38–60%; 27–31 min, B 60–90%; 31–32 min, B 90–15%; and 32–35 min, B 15%, 流量 : 0.45 mL/min, インジェクション : 2 μL	gRf, nR1, Rg1, Re, fKa, Rh6, Rh23, vR4, pF11, Rf, nR2, nR4, F5, Rh1, nR2-R, Rg2, F3, Rg2-R, Rh1-R, Ra2, Ra3, Rb1, XLIX, M-Rb1, Rc, Ra1, Ro, F1, M-Rc, Rb2, Rb3, M-Rb2, GyA, Rd, M-Rd, GyXVII, nFe, CO, Rg4, Rk3, F4, Rh4, GyLF2, GyLI, nFt1, PPT, Rg3, Rg3-R, MC, CY, CK, Rk1, Rg5, Rh2, Rk2, Rh3, PPD	Lee et al. (2017) [199]

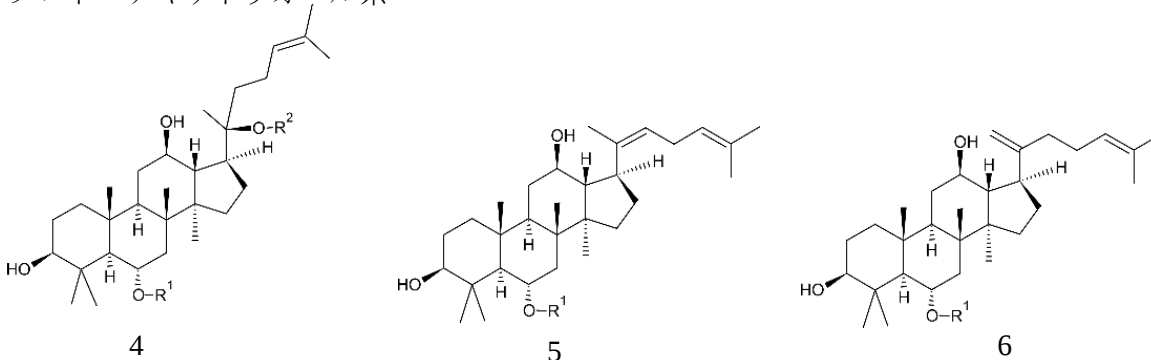
2. モノリスキャピラリーカラムを用いたギンセノシド類の分析

少量の薬用人参サンプルを使用してギンセノシド類を分析するために、HPLC や UPLC と比較して流量が小さく、微量のサンプルでも高感度に検出可能であり、かつ分離の向上も期待できるナノフローLC を用いて分析を行った。カラムには分離能や耐圧性に優れるモノリスキャピラリーカラムを用いた。その結果、27 種類のギンセノシド類（図 6、表 5）の標品を同時分析できることを確認した。また、これらの検量線を作成した結果、表 6 に示す通りであった。さらに、5 mg の薬用人参粉末を 1 mL の 70%メタノールで抽出し、10% MeOH で 5 倍希釈した試料溶液を 1 μ L インジェクションすることで、ギンセノシド類の検出及び簡易定量が可能であった。以下にギンセノシド標品および市場品人参粉末から調製したサンプルのクロマトグラムを示した（図 7）。

プロトパナキサジオール系



プロトパナキサトリオール系



オレアナン系

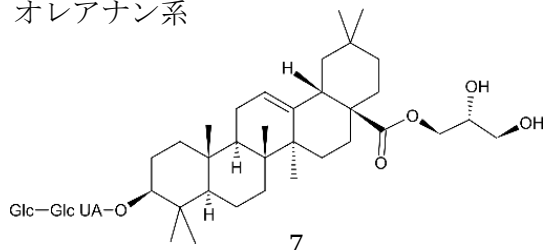


図 6 ギンセノシド類の基本骨格の構造

表 5 使用した標品

化合物名		基本骨格*	側鎖	
プロトパナキサジオール系				
1	Ginsenoside Ra1	1	R ¹ = Glc-Glc	R ² = Glc-Ara-Xyl
2	Ginsenoside Rb1	1	R ¹ = Glc-Glc	R ² = Glc-Glc
3	Ginsenoside Rb2	1	R ¹ = Glc-Glc	R ² = Glc-Ara
4	Ginsenoside Rb3	1	R ¹ = Glc-Glc	R ² = Glc-Xyl
5	Ginsenoside Rc	1	R ¹ = Glc-Glc	R ² = Glc-Ara
6	Ginsenoside Rd	1	R ¹ = Glc-Glc	R ² = Glc
7	Ginsenoside Rg3 (20S)	1	R ¹ = Glc-Glc	R ² = H
8	Ginsenoside F2	1	R ¹ = Glc	R ² = Glc
9	Ginsenoside CK	1	R ¹ = H	R ² = Glc
10	Ginsenoside Rh2 (20S)	1	R ¹ = Glc	R ² = H
11	Malonyl-ginsenoside Rb1	1	R ¹ = Glc-Glc-MA	R ² = Glc-Glc
12	Ginsenoside Rg5	2	R ¹ = Glc-Glc	
13	Ginsenoside Rk1	3	R ¹ = Glc-Glc	
プロトパナキサトリオール系				
14	Ginsenoside Re	4	R ¹ = Glc-Rha	R ² = Glc
15	Notoginsenoside R1	4	R ¹ = Glc-Xyl	R ² = Glc
16	Ginsenoside Rf	4	R ¹ = Glc-Glc	R ² = H
17	Ginsenoside Rg1	4	R ¹ = Glc	R ² = Glc
18	Ginsenoside Rg2 (20S)	4	R ¹ = Glc-Rha	R ² = H
19	Ginsenoside F3	4	R ¹ = H	R ² = Glc-Ara
20	Ginsenoside F5	4	R ¹ = H	R ² = Glc-Ara
21	Ginsenoside Rh1(20R)	4	R ¹ = Glc	R ² = H
22	Ginsenoside F1	4	R ¹ = H	R ² = Glc
23	Ginsenoside F4	5	R ¹ = Glc-Rha	
24	Ginsenoside Rh4	5	R ¹ = Glc	
25	Ginsenoside Rg6	6	R ¹ = Glc-Rha	
26	Ginsenoside Rk3	6	R ¹ = Glc	
オレアナン系				
27	Ginsenoside Ro	7		

*: 基本骨格は図 6 の番号を示す. Glc: glucose, Ara: arabinose, Xyl: xylose, Rha: rhamnose, MA: Malonyl

表 6 ギンセノシド類の検量線

	化合物名	検量線式	r^2
1	Ginsenoside Ra1	$y = 50350444 x$	0.9996
2	Ginsenoside Rb1	$y = 30087316 x$	0.9991
3	Ginsenoside Rb2	$y = 29618290 x$	0.9986
4	Ginsenoside Rb3	$y = 31359553 x$	0.9996
5	Ginsenoside Rc	$y = 26022089 x$	0.9997
6	Ginsenoside Rd	$y = 33275395 x$	0.9972
7	Ginsenoside Rg3 (20S)	$y = 4798678 x$	0.9893
8	Ginsenoside F2	$y = 27888024 x$	0.9994
9	Ginsenoside CK	$y = 23781410 x$	0.9791
10	Ginsenoside Rh2 (20S)	$y = 57718718 x$	0.9985
11	Malonyl-ginsenoside Rb1	$y = 22109522 x$	0.9905
12	Ginsenoside Rg5	$y = 61413190 x$	0.9804
13	Ginsenoside Rk1	$y = 37440641 x$	0.9893
14	Ginsenoside Re	$y = 24090780 x$	0.9978
15	Notoginsenoside R1	$y = 34638150 x$	0.9992
16	Ginsenoside Rf	$y = 69202595 x$	0.9998
17	Ginsenoside Rg1	$y = 57266187 x$	0.9929
18	Ginsenoside Rg2 (20S)	$y = 44167503 x$	0.9996
19	Ginsenoside F3	$y = 86933694 x$	0.9996
20	Ginsenoside F5	$y = 42936353 x$	0.9990
21	Ginsenoside Rh1(20R)	$y = 57144530 x$	0.9975
22	Ginsenoside F1	$y = 104853083 x$	0.9999
23	Ginsenoside F4	$y = 46507829 x$	0.9997
24	Ginsenoside Rh4	$y = 25916137 x$	0.8125
25	Ginsenoside Rg6	$y = 78684865 x$	0.9988
26	Ginsenoside Rk3	$y = 55946237 x$	0.9991
27	Ginsenoside Ro	$y = 33231632 x$	0.9998

y: ピーク面積, x: 試料溶液中のギンセノシド濃度(mg/mL), r^2 : 決定係数

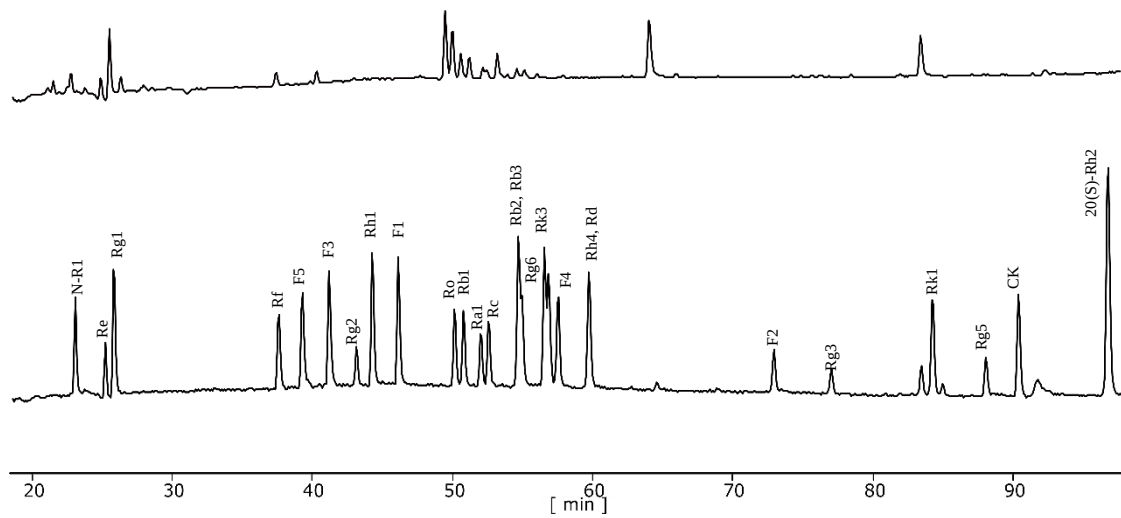


図7 薬用人参 (上) およびギンセノシド標品 (下) のクロマトグラム

第二節 薬用人参のギンセノシド類の局在と含量の経年変化

1. 生育年数とギンセノシド含量の関係

第一節で検討した測定条件を用いて、長野県産の薬用人参(1-6 年栽培品)の主根のギンセノシド含量の測定を行うとともに、主根の太さを計測した。使用した試料の一例を図 8 に示す。主根の太さと乾燥物の単位重量あたりギンセノシド含量 (mg/g) の経年変化は図 9 に示す通りであった。生育年数の増加とともに根は太くなり、6 年根の太さの平均値は 1 年根の 0.3 cm と比較して 10 倍近い 2.8 cm となった。一方で、単位重量あたりギンセノシド含量 (mg/g) は統計学的に差があるとはいえないが、1 年目で最も高く、2 年目で最も低かった。3 年目以降ではほとんど含量が変化しなかった。また、1 年目と 2-6 年目では成分組成が異なり、1 年目では他の年数と比較して ginsenoside Re, Rc, の割合が高く, ginsenoside Rg1, Ro の割合が低かった。

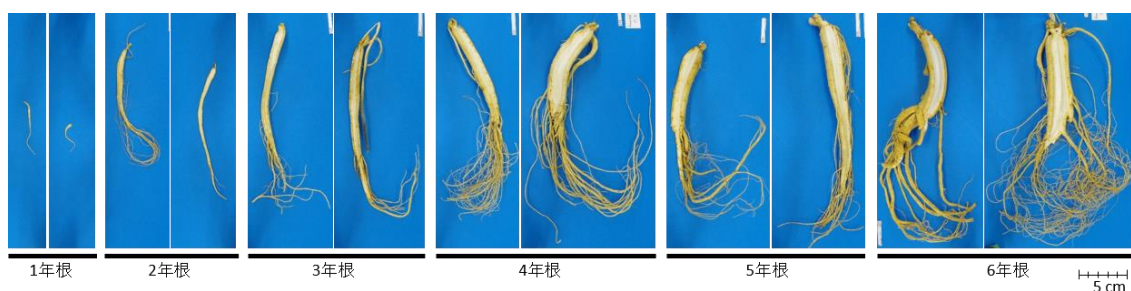


図 8 各栽培年数の薬用人参。地下部を半割して乾燥したものを同一条件下で撮影

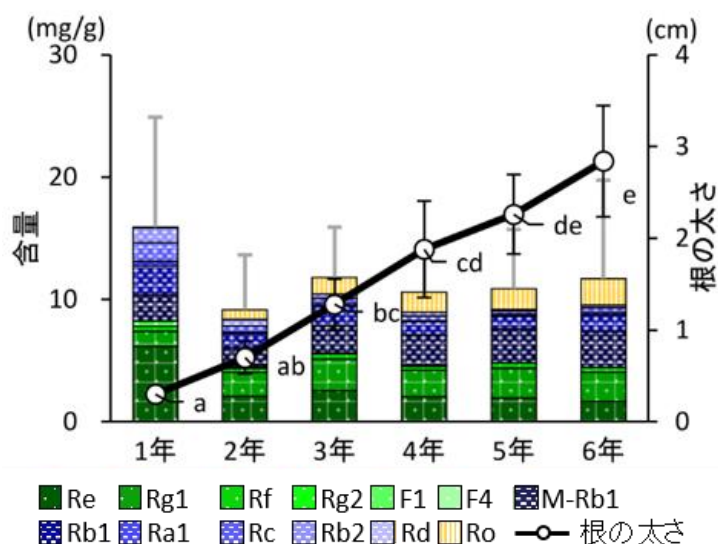


図 9 薬用人参の太さとギンセノシド含量の経年変化。Data = mean $\pm$ S.D., a-e: 異なるアルファベット間で有意差あり ($p < 0.05$; Tukey's HSD Test)

2. 根の部位によるギンセノシド含量の違い

薬用人参の根では周皮にギンセノシド類が局在すると報告されているため、これについて確認を行った。長野県産の薬用人参（6年栽培品）の主根の一部を切り出して周皮と内部に分割し、それぞれ乾燥物の単位重量あたりギンセノシド含量(mg/g)を第一節で決定した分析条件にて測定した。結果を図10に示す。先行研究[16,175,176]と同様に周皮で高含量だったが、周皮と内部でギンセノシド類の組成が異なり、周皮では Ginsenoside Re の割合が高く、内部では Ginsenoside Rg1, Ro, および Malonyl-ginsenoside Rb1 の割合が高かった。

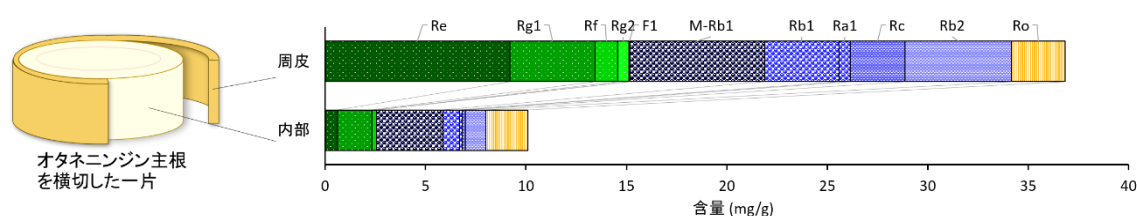


図10 薬用人参の周皮と内部のギンセノシド含量の比較。データは6年栽培品5個体の分析結果の平均値で示している

周皮と内部の乾燥物の単位重量あたりギンセノシド含量(mg/g)の経年変化(n=5)を図 11 に示した。全ての生育年数で周皮のギンセノシド含量(mg/g)が内部の 5 倍前後であった。

周皮、内部それぞれのギンセノシド含量(mg/g)の経年変化については、1 年目から 2 年目にかけて両方ともに減少傾向を示した。3 年目以降では、内部のギンセノシド含量 (mg/g) は一定の傾向を示さず 5 年目で最も含量が高くなったが、周皮のギンセノシド含量 (mg/g) は経年的に減少する傾向を示した。個別の化合物については、Ginsenoside Ro は、周皮、内部ともに 2 年目までと比較し 3 年目以降で高含量となった。また、周皮では Ginsenoside Rd が 1 年目に最も高含量で、2 年目以降は含量が低下した。

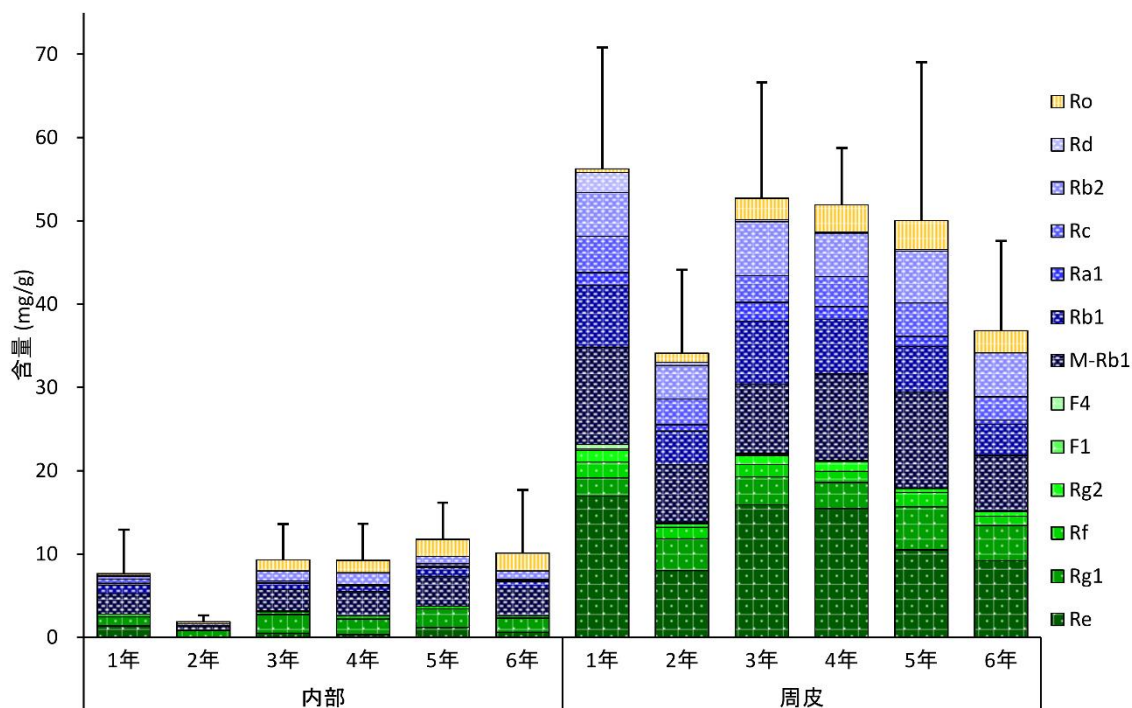


図 11 薬用人参の周皮と内部のギンセノシド含量の経年変化。Data = mean $\pm$ S.D., 栽培年数間で有意差なし($p < 0.05$; Tukey's HSD Test)

第三節 考察

ギンセノシド類は糖鎖の構造が異なる多数の類縁体が存在し、分離が困難であるため、種々の分析条件が検討されてきた。LC での複雑なグラジエント条件や、MS 検出器等を使用することによって分析条件が改善されてきたが、ごく少量の試料を用いた分析は困難であった。しかし、モノリスキャピラリーカラムを使用することで、試料中の少量のギンセノシド類を感度よく検出でき、分離も良好であった。ギンセノシド類の検量線も直線性が高く、少量の薬用人参試料に含まれるギンセノシド類を定量可能であることが示された。

長野県産薬用人参の単位重量当たりギンセノシド含量(mg/g)の経年変化を調査した結果、2 年目で含量が低い傾向にあるという結果を得たが、長野県ではオタネニンジンは一様に 2 年目まで苗床で育苗したのちに圃場への定植を行っている。2 年目では他の年数と比較して栽植密度が高く、肥料や日光などの影響が異なることなどが影響したと考えられるが、さらなる調査が必要だと思われる。3 年目以降ではギンセノシド含量(mg/g)がほとんど変化しなかったことから、ギンセノシド含量を指標とした場合、栽培年数に依らず同等の品質の薬用人参が得られると考えられる。栽培年数 1 年の薬用人参はギンセノシド含量(mg/g)が最も高かったものの、他の生育年数の薬用人参とはギンセノシド類の組成が異なるため、同等の品質とはいえ注意が必要であると考えられる。

オタネニンジンのトランスクリプトーム解析を行った先行研究によると、ギンセノシド類の生合成に関与する糖転移酵素の多くは根の内部と比較して周皮で発現量が多い[200]。栽培年数 6 年の薬用人参では内部と比較して周皮でギンセノシド含量(mg/g)が高かったことは生合成酵素の発現量の差に関連していると考えられる。含量の差に加えて、周皮と内部でギンセノシド類の組成が異なり、プロトパナキサトリオール系では、Ginsenoside Rg1 と Re の割合の多少が逆転していた。また、プロトパナキサジオール系については、外部と比較して内部で Malonyl-ginsenoside Rb1 の割合が非常に高かった。これらのことから糖転移酵素やマロニル化酵素などの生合成酵素の発現量だけでなく、発現酵素の構成などが周皮や内部で異なる可能性が考えられる。

全ての生育年数で薬用人参の周皮は内部と比較してギンセノシド類の含量 (mg/g)が高いという結果を得たが、組成については経年的に変化していた。特に、周皮では Ginsenoside Rd の含量が 1 年目で最も高く、2 年目以降では減少していたが、ギンセノシドの推定生合成経路[201]に基づき考えると、Ginsenoside Rd に糖が付加することで他のプロトパナキサジ

オール系の化合物に変換された可能性が考えられる。

韓国産の薬用人参 4-6 年根の周皮のギンセノシド含量 (mg/g) の経年変化を調査した先行研究[180]では、周皮のギンセノシド含量 (mg/g) は経年的に増加する結果が示されており、本研究ではこの先行研究とは異なる結果となった。一般に植物の二次代謝産物の役割として、抗菌や防虫作用など生体防御への寄与が知られており、ギンセノシド類が周皮に局在していたこともこれに関係すると推測される。そのため、本研究と先行研究の結果が異なった原因として、第一章の考察で述べた種々の要因のうち、特に病原菌や害虫などの影響が大きく異なっていたのではないかと考えられる。このほかに、先行研究では個体別分析を行っていないうえに、測定に汎用 HPLC を用いていたため分離が不十分でクロマトグラムのピークが夾雑し、分析結果に影響を及ぼした可能性なども否定できない。

栽培期間とギンセノシド含量変化については、今後、もう少し検体数を増やして検討する必要があるが、オタネニンジン栽培に関してしばしば聞かれる、若年根はサポニンが少ないので利用価値が低いといった評価は、科学的には必ずしも正しくないことが、本研究の成果から示されたと考えている。肥培管理や栽培暦の違いで成分含量がどの程度変化するのかについては、今後の検討が必要と考えられる。図 12 に示すように、若年根は重量が少なく、1 本の根から得られるギンセノシドの量は 6 年根と比較して少ない点は注意が必要である。しかし、短い栽培年数で収穫することを前提とすれば 6 年目までの成長を考慮する必要がないため、栽植密度を上げることで収量を増やせる可能性があり、今後検討を行うことで、短期間で効率的に薬用人参の生産を行うことが出来る可能性が考えられる。歴史的に培われた、オタネニンジンの農産物としての評価について、充実した 6 年根が高評価であることは今後も変わらないと思われるが、ギンセノシドなどの成分に注目した利用を考える際には、より短期間で収穫できる若年根を原材料とする計画もたてることができそうであり、有用植物の新しい形の利用方法を考えるきっかけになるのではないかと考察された。

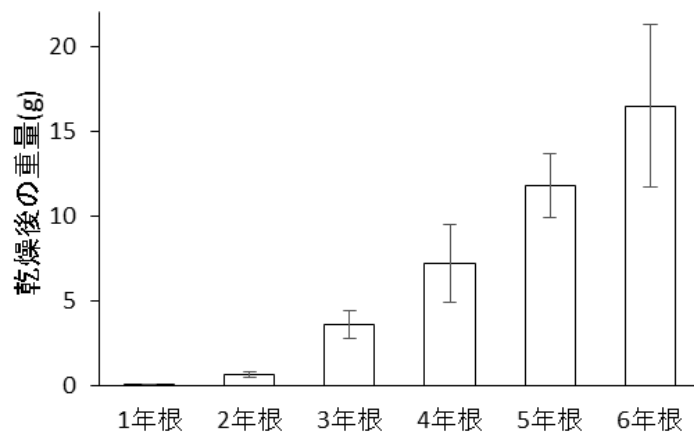


図 12 根の重量の経年変化. 半割した根の乾燥後の重量を測定した. Data = mean ± SEM

第三章 オタネニンジン（オタネニンジン）の遺伝的多様性とギンセノシド含量等について

韓国や中国ではオタネニンジン（オタネニンジン）の新品種開発が盛んに行われており、ギンセノシド含量が高いものなど、様々な品種が登録されている[202]。また、遺伝的多様性の調査等も行われており、遺伝的多様性と主根のギンセノシド含量が関連を示したという報告もあることから[186]、ギンセノシド含量は遺伝的制御を受けると考えられる。

遺伝的多様性を調査する方法の1つに Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーを使用する方法があり、オタネニンジン（オタネニンジン）では最も頻繁に用いられている。SSR は塩基配列上で少数の塩基の繰り返し配列を含む領域であり、繰り返し回数が増えることにより個体間で多型を生じやすい。また、SSR マーカー領域の配列は父親および母親に由来する1対の相同染色体の両方に存在する。これら1対の配列を対立遺伝子と呼び、2つの対立遺伝子の組み合わせが遺伝子型である。遺伝子型には同一の対立遺伝子を有するホモ接合体の場合と互いの対立遺伝子が異なるヘテロ接合体の場合がある。複数のマーカー領域の遺伝子型の組み合わせから父親や母親との親子関係が推測できるほか、集団内での個体同士の近縁関係の推測や個体識別などが可能である(図13)。第三章では日本のオタネニンジン（オタネニンジン）の遺伝的多様性を明らかにすることを目的として、SSR マーカーを使用した遺伝的多様性の解析を行った。

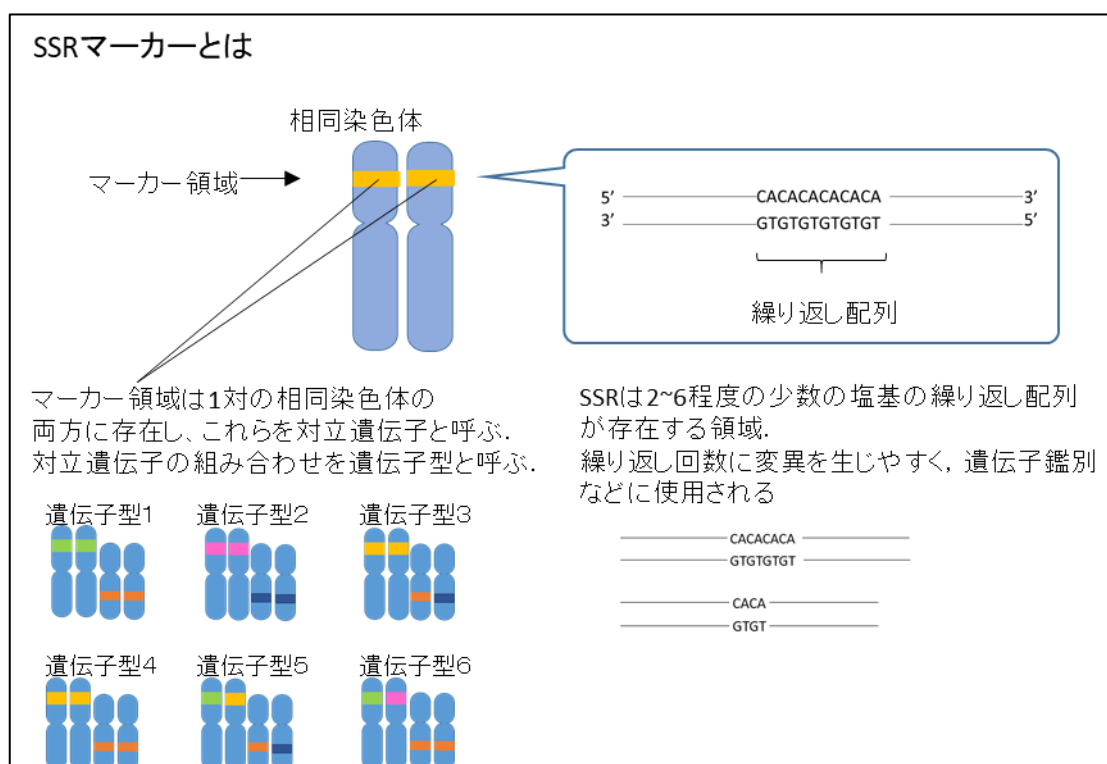


図13 SSR マーカーについて

表 7 各マーカーの対立遺伝子数(*Na*), ヘテロ接合度観測値(*Ho*), ヘテロ接合度期待値(*He*)

	PgSSR07	PgSSR37	PgSSR40	PgSSR51	PgSSR08	PgSSR09	PgSSR17	PgSSR53
<i>Na</i>	7	4	5	4	1	7	2	3
<i>Ho</i>	0.066	0.055	0.055	0.011	0.000	0.978	0.978	0.890
<i>He</i>	0.759	0.652	0.593	0.506	0.000	0.626	0.500	0.600

表 8 各マーカーの遺伝子型頻度

	PgSSR07		PgSSR37		PgSSR40		PgSSR51		PgSSR08		PgSSR09		PgSSR17		PgSSR53	
対立遺伝子数	7		4		5		4		1		7		2		3	
遺伝子型数	11		7		7		5		1		7		2		4	
遺伝子型頻度	遺伝子型	頻度	遺伝子型	頻度	遺伝子型	頻度	遺伝子型	頻度	遺伝子型	頻度	遺伝子型	頻度	遺伝子型	頻度	遺伝子型	頻度
	254/254	0.05	108/108	0.31	137/137	0.01	115/115	0.64	185/185	1	198/198	0.02	116/128	0.98	168/168	0.01
	254/262	0.02	108/120	0.02	155/155	0.47	118/118	0.29			198/204	0.65	128/128	0.02	168/175	0.42
	260/260	0.11	108/133	0.02	155/159	0.03	118/121	0.01			198/206	0.09			175/175	0.10
	260/262	0.01	120/120	0.21	155/171	0.01	121/121	0.04			198/207	0.14			175/181	0.45
	262/262	0.25	120/133	0.01	159/159	0.37	98/98	0.02			198/208	0.01			168/175/181	0.02
	262/265	0.01	126/126	0.01	163/171	0.01					198/211	0.07				
	262/268	0.01	133/133	0.42	171/171	0.09					198/212	0.02				
	262/274	0.01														
	265/265	0.33														
	271/271	0.02														
	274/274	0.16														

対立遺伝子が 3 個検出される個体がある場合、正確な遺伝的距離の計算が困難となるため、遺伝的距離の算出は PgSSR53 を除いた 7 種のマーカーを用いて行った。その結果、UPGMA 法により得られた系統樹は図 15 に示す通りとなった。

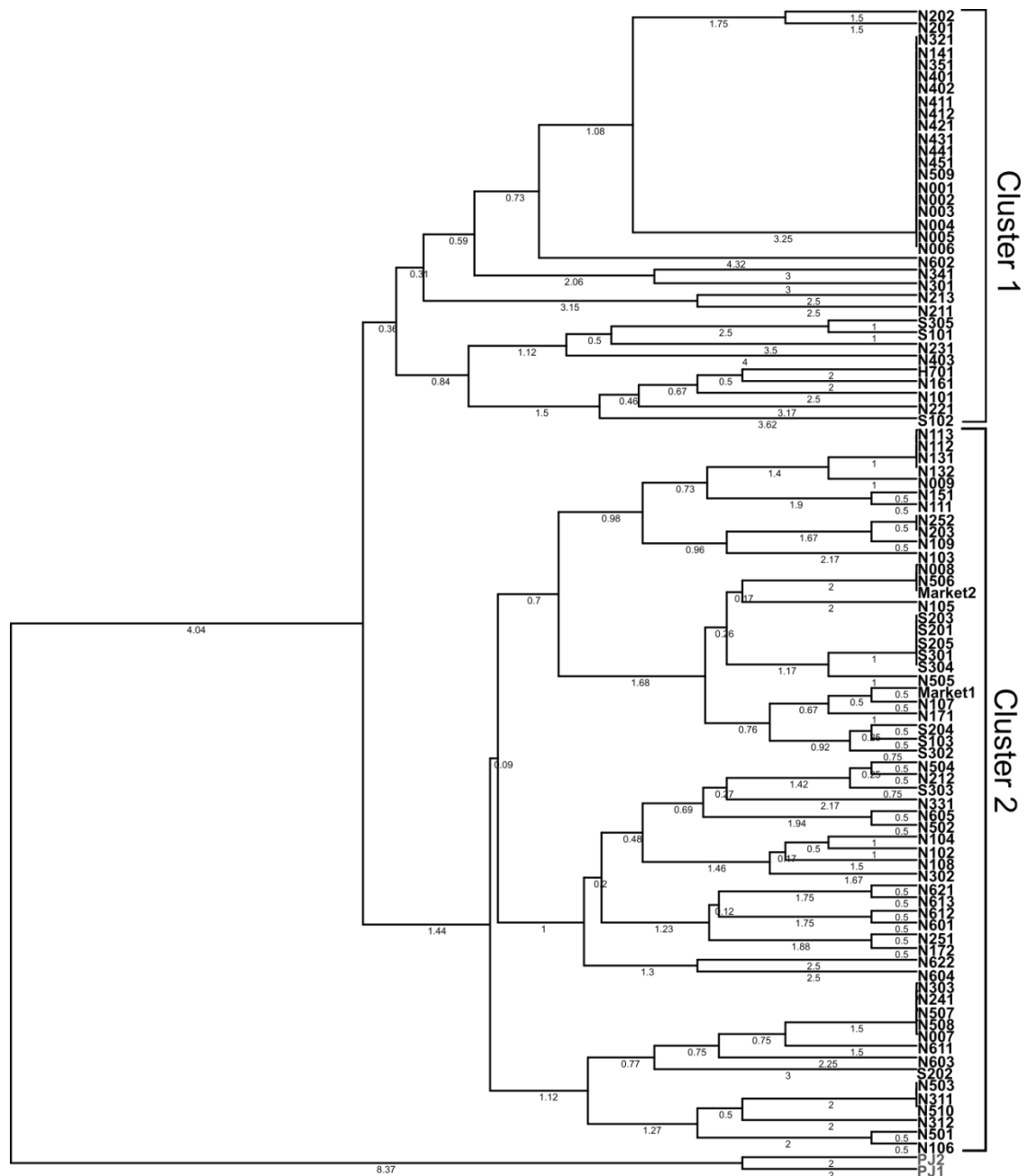


図 15 SSR マーカーの遺伝子型に基づく系統樹(UPGMA 法)

個体 ID のアルファベットはそれぞれの産地を示す。N：長野県産，S：島根県産，Market：市場品，H：北海道，PJ：トチバニンジン

日本の複数の栽培地のオタネニンジンおよび韓国産・中国産市場品人参は、長野県産 30 個体、島根県産 3 個体、北海道産 1 個体の計 34 個体からなるクラスター1 と、長野県産 47 個体、島根県産 10 個体、市場品 2 個体の計 59 個体からなるクラスター2 の 2 群に大きく分類された。クラスター1 のうち、長野県産 18 個体が同一の遺伝子型を示した。韓国産および中国産の市場品同士の遺伝的距離は近かった。また、オタネニンジンとは明確に区別された。

2. 日本国内の主要な産地と韓国および中国のオタネニンジン遺伝的多様性の比較

遺伝的多様性の指標である N_a , H_o について、同じ SSR マーカーを用いて、韓国の主要なオタネニンジン栽培品種を含む 6 つの品種を解析した先行研究[192]、および中国の人参の主要な産地である吉林省の 6 つの栽培地で栽培されたオタネニンジン解析した先行研究[193]の結果と比較したところ、表 9 に示す通りとなった。それぞれの集団の N_a , H_o の平均値は、 N_a は日本の複数の栽培地の集団および韓国の 6 品種で 4.13、中国吉林省の集団では 7.00 であった。 H_o は日本の複数の栽培地の集団が 0.38 であったのに対し、韓国の 6 品種および中国吉林省の集団ではともに 0.32 であった。

表 9 日本産オタネニンジンと、同一 SSR マーカーを使用した先行研究の韓国産オタネニンジンおよび中国産薬オタネニンジンとの遺伝的多様性の比較

	Japan (n=91)		Six cultivars grown in Korea (n=115)[192]		Cultivated in 6 regions of Jilin province, China (n=73)[193]	
	N_a	H_o	N_a	H_o	N_a	H_o
PgSSR07	7	0.07	3	0.26	7	0.27
PgSSR08	1	0.00	5	0.59	8	0.22
PgSSR09	7	0.98	3	0.59	7	0.89
PgSSR17	2	0.98	3	0.08	4	0.00
PgSSR37	4	0.06	5	0.36	3	0.26
PgSSR40	5	0.06	3	0.28	10	0.23
PgSSR51	4	0.01	8	0.34	7	0.25
PgSSR53	3	0.89	3	0.07	8	0.47
Mean	4.13	0.38	4.13	0.32	7.00	0.32

第二節 オタネニンジン(オタネニンジン)の遺伝的多様性と成分含量や根の太さとの関係

調査したオタネニンジン(オタネニンジン)の遺伝子型と、ギンセノシド含量などが関連を示す可能性を考え、遺伝子型に基づくクラスター間で、ギンセノシド含量や根の太さを比較した。この際、栽培環境による影響を避けるために、長野県産のオタネニンジン(オタネニンジン)のみを使用して検討を行った。4-6 年栽培品の乾燥後の主根の直径を計測し、遺伝子解析の結果に基づくクラスター間で比較したところ、クラスター1 に属する個体はクラスター2 に属する個体と比較して直径が太い傾向を示した(表 10)。

表 10 長野県産 *P. ginseng* の主根の直径平均値(cm)

	cluster1	cluster2
4 年	1.66 (n=5)	1.04 (n=5)
5 年	2.43 (n=3)	1.87 (n=3)
6 年	2.90 (n=2)	2.32 (n=6)
4 年+5 年+6 年	2.14 (n=10)	1.76 (n=14)

値は平均値として記載している

ギンセノシド類の測定は第2章と同様の方法で行った。各クラスターごとの結果を図16に示す。オレアナン系サポニンの **Ginsenoside Ro** はクラスター1に属する個体で含量が有意に高く、クラスター2に属する個体の約1.6倍であった。一方で、プロトパナキサジオール系サポニンおよびプロトパナキサトリオール系サポニンはクラスター2に属する個体で多い傾向にあり、特に **Ginsenoside Re** はクラスター2で含量が有意に高く、クラスター1に属する個体の約1.8倍であった。しかし、**Ginsenoside Rg1** は他のプロトパナキサトリオール系サポニンと異なりクラスター1で含量が高い傾向を示した。個体間での差が大きかったものの、8種のギンセノシド類の合計値はクラスター間でほとんど差がみられなかった。

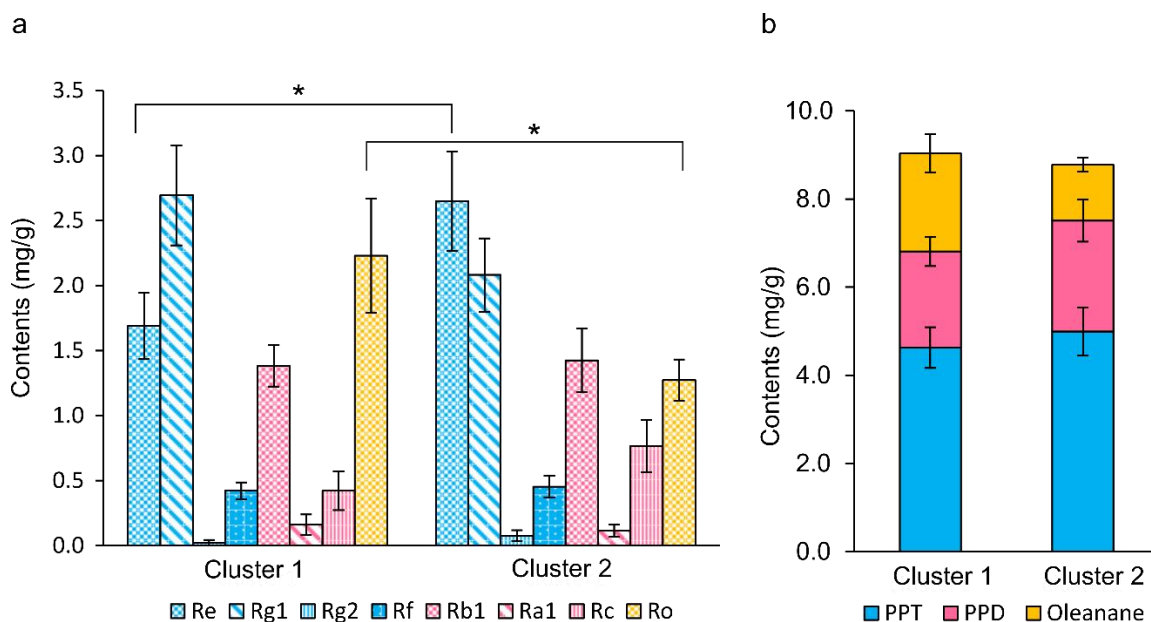


図16 各クラスターでのギンセノシド含量(mg/g)の比較. a: 各化合物を棒グラフで示した. b: ギンセノシド類の総量を、各化合物を基本骨格別に分類した積み上げ棒グラフで示した.

Data=Mean±SEM, *: $p < 0.05$ (Student's T test). PPT: protopanaxatriol-type, PPD: protopanaxadiol-type

第三節 考察

オタネニンジンには細胞内に 2 種の異なる染色体セットを有する異質四倍体植物であり [203,204], その生殖様式は、自家不和合性でないため自家受粉によって種子形成が可能であることに加え、受粉を伴わずに親株と同一の遺伝子型をもつ種子を形成する無融合種子形成も行う(図 17)[188]. また、ジェノタイピング結果から算出される *He* は集団内で無作為に交配が起こると仮定した場合にヘテロ接合体の個体が出現する頻度であり、実際にヘテロ接合体が観測された頻度である *Ho* が *He* より小さい場合は、同じ遺伝子型同士での交配が進んでおり、*He* より大きい場合は異なる遺伝子型同士での交配が進んでいると判断できる. 使用した 8 種の SSR マーカーで、PgSSR08 は単型を示し、PgSSR07, 37, 40, 51 は対立遺伝子数が多いものの *Ho* が *He* と比較して著しく小さく、ほとんどの個体がホモ接合体であった. これは自家受粉や同一の遺伝子型の個体同士での交配あるいは無融合種子形成による結果であると考えられる. また、PgSSR09, 17, 53 の 3 種では *Ho* が 0.9 前後でほとんどの個体がヘテロとなり、*He* を上回った. このような現象は、意図的な交配などにより起こり得るが、この場合雑種第二代ではメンデルの法則に従ってヘテロ接合体とホモ接合体に遺伝子型が分離する. しかし、生育年数が異なる個体が存在するにもかかわらず、表 5 に示すようにほとんどすべての個体が同一の遺伝子型を保持している場合があり、遺伝子型の分離が起っていないことから、*Ho* が高値を示した原因が個体間の交配である可能性は低く、その他の要因による結果であると考えられる. 無融合種子形成による個体増殖で種子は親株と同一の遺伝子型を受け継ぐため、複数の世代にわたってヘテロ接合体を維持することが可能であり、PgSSR09, 17, 53 の *Ho* が高かった原因として合理的である. このことから、日本で栽培されるオタネニンジンには主に無融合種子形成で繁殖している可能性が考えられる. また、PgSSR53 では対立遺伝子が 3 つ検出される個体があったが、オタネニンジンには異質四倍体植物であるため、2 つのサブゲノム上に PgSSR53 の遺伝子座がそれぞれ存在する可能性が考えられる. この場合、1 個体につき最大 4 つの異なる対立遺伝子が検出される可能性がある. PgSSR53 を除いた 7 つのマーカーの遺伝子型に基づいた系統樹では、栽培地ごとのクラスターは形成されず、異なる栽培地の個体同士が近縁関係にある場合もみられるなど、遺伝子型に地域性はみられなかった. 異なる栽培地の個体も共通の祖先に由来するためであると考えられる. 系統樹のクラスター1では同一の遺伝子型を示す個体が多く存在したが、これは無融合種子形成によるクローン個体であると考えられる.

対立遺伝子はどのように遺伝するか

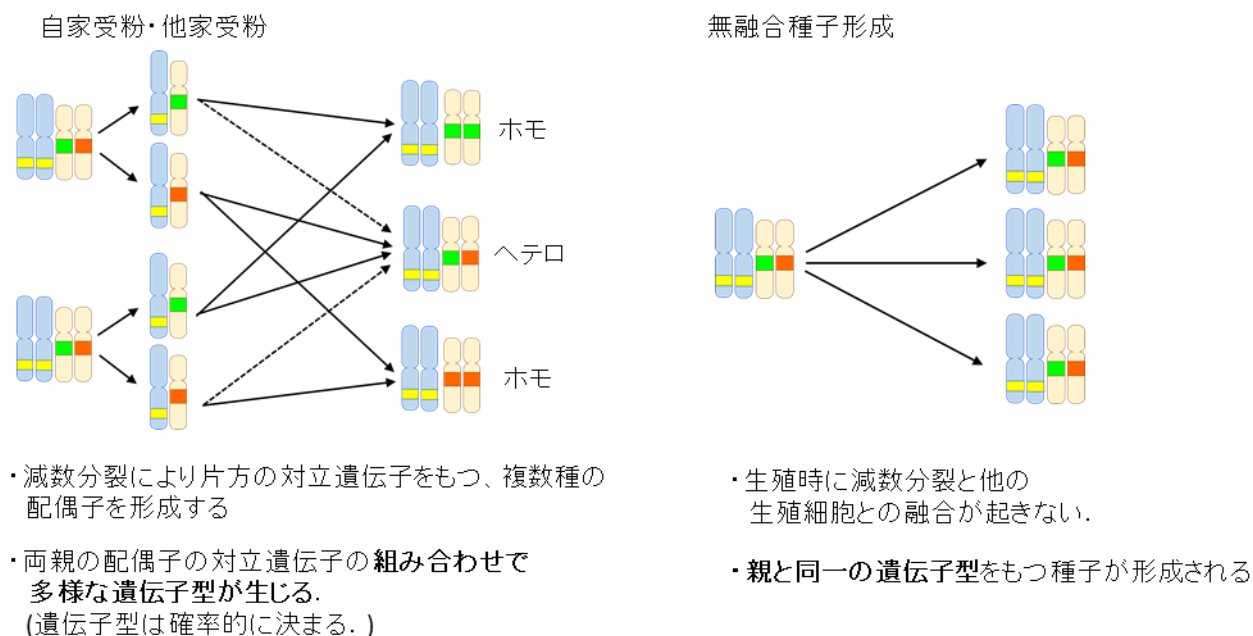


図 17 対立遺伝子の遺伝様式について

SSR マーカーは遺伝的多様性の評価だけでなく品種鑑別や個体識別にも有用であり、日本のオタネニンジンに特徴的なマーカーを探索することで、市場に流通する薬用人参の由来を鑑別できる可能性が考えられる。しかし、オタネニンジンの栽培の基盤整備のためには、新たな SSR マーカーの探索よりも日本のオタネニンジンの遺伝的多様性を韓国や中国のものと比較してそれらの差異を明らかにすることが重要であると考えたため、既報[192]の SSR マーカーを使用した。実際に SSR マーカーによる解析結果を、同じマーカーを使用した先行研究[192,193]の結果と比較したところ、 N_a の平均値は韓国の 6 品種では日本の複数の栽培地の集団と同値であったが、中国吉林省の集団では日本の複数の栽培地の集団より大きい値を示し、多様性に富んでいた。 H_o については、平均値は 3 つの集団でほとんど差がなかったが、日本の複数の栽培地の集団では 0.1 未満のマーカーと 0.9 前後のマーカーに 2 極化していたのに対し、韓国の 6 品種および中国吉林省の集団では日本の複数の栽培地の集団と比較して値のばらつきが少なく、数値の 2 極化もみられなかった。 $PgSSR07, 08, 37, 40, 51$ の 5 種のマーカーの H_o が韓国の 6 品種および中国吉林省の集団と比較して日本の複数の栽培地の集団で小さい値であったことに加え、 $PgSSR09, 17, 53$ の 3 種のマーカーの H_o は日本の複数の栽培地の集団で 0.9 前後と高値を示したものの、ほとんどの個体が同一の遺

伝子型であったことから、韓国の 6 品種および中国吉林省の集団は日本の複数の栽培地の集団と比較してより多様な遺伝子型を有していると考えられる。これらのことから、もともとオタネニンジンには日本に自生せず、日本で栽培されている個体は中国や韓国の種子に由来するはずであるにもかかわらず、これらの国の集団とは遺伝子型の構成が異なることに加え、多様性に乏しいと判断できる。日本では、18 世紀に少数の種子を輸入して以降、海外からの新たな種子導入が少なく、自家採種による栽培が継続してきた。また、各マーカーの解析結果から、日本で栽培されている個体は無融合種子形成で繁殖してきたことが予測されたが、Zhuravlev ら[188]の報告によると、無融合種子形成による結実率には個体差が存在する。そのため、外部からの種苗の供給がない状況で、偶然性が大きい受粉により種子を生産する個体は淘汰され、より効率的な種子生産が可能である無融合種子形成を行う個体の割合が増加したと考えられる。新たな遺伝子が導入されず、無融合種子形成により遺伝子型が多様化していないことで、種子を輸入した当時の遺伝子型が現在でも維持されている可能性が考えられる。一方で、韓国や中国においてはオタネニンジンの育種が盛んに行われている。これらの国では根重量やギンセノシド含量の高さ、耐病性などが重要視され、交雑育種などにより優れた品種が多数作出されてきた[202]。このように、各国の栽培の背景から、韓国および中国では育種や新たな遺伝子ソースの導入等が行われて栽培される系統が変化してきたが、日本は変化が少なく、韓国および中国のオタネニンジンには日本の集団よりも遺伝的多様性に富んでいると考えられる。加えて、韓国や中国では育種の過程で根重量などの重要な性質が劣っている系統の遺伝子型が排除された可能性もあり、この場合、育種がほとんど行われていない日本と比較して、集団の遺伝子構成が部分的に異なる可能性が考えられる。

系統樹におけるクラスタリング結果と主根の太さは関連を示した。ギンセノシド含量も同様に関連を示したが、これは主根の太さの差に起因するものであると考えられる。Han ら[180]は薬用人参の主根の直径は生育年数とともに増大し、根が太くなるにつれて中心部の髓の割合が増加し、主根の直径がプロトパナキサトリオール系やプロトパナキサジオール系サポニンの含量と負の相関を示すことを報告している。Ginsenoside Ro と主根の直径の相関に関してはほとんど報告が無いが、Liu ら[205]は薬用人参の生育年数が増加するにつれて Ginsenoside Ro の含量が他のギンセノシド類と比較して大幅に増加することを報告しており、寒川ら[175]は、ギンセノシド類は主根では主に表皮に局在するが、Ginsenoside Ro は表皮ではなく木部や髓など根の中心部に局在することを報告している。また、第 2 章の結果でも根の

内部では周皮と比較して **Ginsenoside Ro** の割合が高いことを確認している。これらのことから、主根が太くなる傾向にあるクラスター1 ではクラスター2 と比較して主根の髄の割合が高くなり、結果として **Ginsenoside Ro** の含量が高くなったと考えられる。一方、他のギンセノシド類は表皮に局在するため、主根が細い傾向にあるクラスター2 で多い傾向を示したが、**Ginsenoside Rg1** は異なる傾向を示した。薬用人参の主根の直径と成分含量の相関に関する Han ら[182]の報告でも、**Ginsenoside Rg1** は根の太さとの相関を示しておらず、**Ginsenoside Rg1** は表皮以外の組織にも多く分布していることが予測される。

オタネニンジン（オタネニンジン）のギンセノシド含量と遺伝的多様性の関係の調査手段として、生合成酵素等の遺伝子をターゲットとした解析も考えられる。しかし、現在までにクローニングされているギンセノシド生合成酵素遺伝子は全体の一部であり、第一章第三節で述べたようにオタネニンジン（オタネニンジン）のギンセノシド類の生合成に関わる酵素遺伝子の変異に関してはほとんど知見が無い。現在報告されている酵素遺伝子をターゲットとした場合、多種多様なギンセノシド類の一部との関連だけしか検討することができない。そのため、本研究では酵素遺伝子をターゲットとせず、オタネニンジン（オタネニンジン）の遺伝的多様性の評価に多用されている **SSR** マーカーを使用した。今後、それぞれの **SSR** マーカーとギンセノシド含量の関連の詳細な解析を行うことや、個々のギンセノシドの薬理作用をふまえたうえで、生合成遺伝子等をターゲットとして含量と遺伝子の関係を明らかにすることで、特定のギンセノシドの含量が高い品種の開発など、遺伝子情報をオタネニンジン（オタネニンジン）の栽培に有効利用できる可能性が考えられる。

以上、日本の複数の栽培地で栽培されるオタネニンジン（オタネニンジン）の遺伝的多様性と成分含量や根の太さについて調査したところ、遺伝的に多様であるものの、無融合種子形成により同一の遺伝子型が数世代にわたって維持されている可能性があることや、原産地である中国や韓国の集団とは遺伝子型の構成が異なることが明らかとなった。サンプルの入手が困難であったことから、日本国内の主要な産地の一つである福島県のオタネニンジン（オタネニンジン）は分析を行っていないが、福島県のオタネニンジン（オタネニンジン）は、島根県で生産された種を移入したことから栽培が始まったという歴史的経緯があるため、遺伝的には島根県（島根県）のものと大きな差はないと考えられ、福島県産（福島県産）のサンプルを解析しても実験結果が大きく変わる可能性は低いと考えられる。また、遺伝子解析に使用した **SSR** マーカーは主根の太さや含有成分との関連を示した。今後さらにギンセノシド含量と遺伝的多様性についての詳細な調査を行うことにより、使用目的に応じた品質の薬用人参（薬用人参）を生産する上で遺伝子情報を有効利用できると考えられる。

総括及び結語

第一章では、薬用人参についての研究状況を調査し、大和当帰の研究状況と比較することで、日本ではオタネニンジン栽培が長い歴史を持つものの、栽培やギンセノシド含量、遺伝的多様性等に関する研究が少ないことを明らかにした。また、ギンセノシド含量や伝的多様性についてさらに詳細な調査を行った。これらの結果から、オタネニンジン栽培の振興のための基盤整備の一部として、日本で栽培されているオタネニンジンのギンセノシド含量の変動についての詳細な調査や遺伝的多様性について調査することが必要であると考えられた。

第二章では、モノリスキャピラリーカラムを使用することで、従来分析が困難であった少量の薬用人参試料のギンセノシド含量を測定できることを確認した。そして、これまで検討が不十分であった日本産薬用人参のギンセノシド含量の変動について、周皮や内部などの部位ごとに調査することで、栽培年数によって主根のギンセノシド類の局在や含量は大きく変化しないが、ギンセノシド類の組成は部位によって異なることに加え、経年的に変化することを示した。これらの結果から、生育年数の短い薬用人参は利用価値が低いという従来の通念は科学的に必ずしも正しくなく、ギンセノシド含量に着目した場合は栽培年数の短い根も利用できる可能性があると考えられた。

第三章では、既報の SSR マーカー[192]を使用して、これまで不明であった日本のオタネニンジンの遺伝的多様性を調査し、日本で栽培されているオタネニンジンと韓国や中国で栽培されているものと比較して遺伝的多様性が低いことに加え、種苗を導入した当時の個体の遺伝子型が現在でも維持されている可能性があることを明らかにした。さらに、遺伝子型による群分けと主根の太さやギンセノシド含量が関係することを示した。これらの結果から、優れた性質を持つ個体の選抜に遺伝子情報を活用できる可能性があると考えられた。

オタネニンジン栽培の振興のためには、施肥や灌水をはじめとする栽培条件の検討や管理作業の効率化、優れた性質を持つ品種の開発などに関する種々の検討が必要であると考えられる。本研究ではそれらの検討の一部として、少量の試料で分析可能なモノリスキャピラリーカラムを使用したギンセノシド類の分析を行い、日本産薬用人参のギンセノシド含量の変動の詳細について明らかにした。また、これまで不明であった日本のオタネニンジンの遺伝的多様性の一端を明らかにしたことに加え、遺伝子情報とギンセノシド含量等が関

係することを示した.

本研究の成果は、現状では収穫に 6 年ほどの長期間を要するオタネニンジン栽培で、栽培期間の短い薬用人参の利用の検討や遺伝子マーカーを用いた育種への活用が考えられ、高齢化が進行する中でますます需要が拡大することが予想される生薬資源の、安定的な確保を念頭に置いた栽培振興の基盤整備に役立つ知見であると考えられる.

実験の部

第一章

【薬用人参研究の文献検索】

データベースは PubMed, Web of Science, Scifinder[®] を用い, *Panax ginseng* C.A. Meyer, ginsenosides, genetic diversity, biosynthesis, cultivation, pharmacology 等のキーワードで構成した検索式で検索し, 1941 件の検索結果を得た. これらの結果に Google Scholar のフリーワード検索で得た文献 189 件を加えて, 重複や関連の低い文献を除いた.

得られた文献を, 要旨の内容やキーワードに基づいて 6 つの研究分野(成分, 栽培, 組織培養, 分子生物学, 薬理, 臨床)に分類した. 以下に分類の基準を示す.

成分研究: オタネニンジンやその乾燥した根の含有成分の機器分析や単離精製に関する研究

栽培研究: オタネニンジンの栽培年数や施肥, 土壌, 日照条件等の栽培環境に関する検討を行った研究

組織培養研究: オタネニンジンの培養細胞, 不定根, 毛状根の培養条件等に関する研究

分子生物学研究: オタネニンジンを対象とした生合成酵素のクローニング, 遺伝子発現の調査, 遺伝的多様性の調査, ゲノム解析など分子生物学的手法を用いた研究

薬理学研究: 薬用人参やその含有成分の薬理作用に関する *in vitro* または *in vivo* の研究

臨床研究: 薬用人参やその含有成分の薬理作用に関する研究でヒトを対象としたもの

【ヤマトトウキの研究の文献検索】

データベースは PubMed, Web of Science, Scifinder[®] を用い, *Angelica acutiloba* 等のキーワードで構成した検索式で検索し, 得られた検索結果から重複や関連の低い文献を除いた.

得られた文献について, 薬用人参研究と同様に分類を行った.

【薬用人参培養根を用いた健康食品についての情報収集】

google 検索を用いて, ”薬用人参 培養根”や, 薬用人参培養根の通称である”山参培養根”を

キーワードとして検索を行った。検索結果から、原料としてオタネニンジン培養根を使用している、いわゆる健康食品の製品数を確認した。

第二章

【モノリスキャピラリーカラムを用いたギンセノシド類の詳細分析】

HPLC 測定は、カラム：モノリスシリカキャピラリーカラム(ULTRON-X, 0.1 mm I.D. × 700 mm; 信和化工株式会社), ポンプ：ナノ流量送液ユニット (CKD 株式会社製), 検出器：capillary flow cell UV detector (MU701, cell volume; 6 nL, GL science, Tokyo, Japan), データ処理ソフト：CDS Lite 5.0 (LAsoft)を用いて行った。

【試薬】

ギンセノシド類の標品として以下のものを用いた。

Ginsenoside Re, Rg1, Rb1, Rc (FUJIFILM Wako Chemicals)

Ginsenoside Rg2, Rf, Ro (ChromaDex)

Ginsenoside Ra1, Malonyl-ginsenoside Rb1 (Nagara Science)

【植物材料】

長野県東御市の複数の圃場で 1-6 年栽培した薬用人参を、各栽培年数につき 5 個体ずつ、計 30 個体収集した。収穫は 2021 年 9 月に行った。地下部を半割して自然乾燥し、実験に供した。

【主根の太さとギンセノシド含量の測定】

乾燥後の主根の最も太い部位の径を測定し、これを主根の太さとした。

成分分析では、各個体の主根の最も太い部位を 1 cm 程度の厚さで横切した一片、またはこれを周皮と内部に分割したものをデシケーターで一晩乾燥したのちに粉碎し、粉末 5 mg を量り取り、70% メタノール 1 mL を正確に加えて室温で 30 min 抽出した。抽出液を Ultrafree CL GV (Millipore) を用いて 3000 rpm で 3 分間遠心後、ろ液 0.2 mL を正確に量り取り、10% メタノールで 1 mL にメスアップしたものを HPLC 用サンプルとした。標品として Ginsenoside Re, Rg1, Rg2, Rb1, Ra1, Rc, Rb2, Rd, Rf, Ro, F1, F4, Malonyl ginsenoside Rb1 の 13

化合物を用い、主根に含まれる各化合物の簡易定量を行った。

HPLC 測定は上記【モノリスキャピラリーカラムを用いたギンセノシド類の詳細分析】と同様の装置で行った。測定条件は以下の通りである。

流量：500 nL/min

カラム温度：50°C

検出波長：203 nm

インジェクション量：1 μ L

移動相：(A) 0.1% TFA in 20% MeOH, (B) 0.1% TFA in MeOH/ACN= 6/4

グラジエント条件：30% B (0 min) - 40% B (23 min) - 46% B (29 min) - 70% B (83 min)

【統計解析】

得られた実験データは、R 4.2.2 [206]を用いて、Tukey の HSD 検定を行い、 $p < 0.05$ で統計的に有意とした。

第三章

【植物材料】

日本で栽培されたオタネニンジン 91 個体(長野県産 77 個体, 島根県産 13 個体, 北海道産 1 個体; 表 11)を収集した。一部の試料は第二章で使用した個体と同一のものである。また、市場品として韓国産人参, 中国産人参各 1 検体を入手した。系統解析の外群として、北海道で採集したトチバニンジン(*P. japonicus* (T.Nees) C.A. Meyer) 2 個体を用いた。

【DNA 抽出】

DNA 抽出は Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、附属のプロトコルに従い行った。すなわち、乾燥した主根または茎を約 20 mg とって粉砕し、AP1 buffer 400 μ L および RNaseA 4 μ L を加えてボルテックスした。65°Cのヒートブロックで 15 分インキュベートしたのち 130 μ L の AP3 buffer を加えボルテックスし、氷上で 5 分間放置した。20000 $\times g$ で 5 分遠心後、上清を QiA Sherdder へ添加し、20000 $\times g$ で 2 分遠心した。ろ液を回収し、1.5 倍量の AW1 buffer を加えピペッティングしたのち、スピンカラムに添加して 13000 rpm で 1 分間遠

心した. AW2 buffer 500 μL を加えて遠心する操作を 2 回行い, メンブレンに溶液が残っていないことを確認したのち, AE buffer 60 μL を加えて 65°C で 5 分間インキュベートし, 13000 rpm で 1 分間遠心する操作を 2 回行った.

抽出後の DNA は NanoDrop One (Thermo Scientific) により濃度の測定を行った.

【PCR 増幅】

SSR マーカーは Um らが報告した 8 種のマーカーを用いた[192]. 各マーカー領域のプライマーおよび反復配列, 増幅産物長を表 12 に示す. 各マーカー領域につき片方のプライマーの 5'末端を FAM または HEX で修飾したものをを用いて PCR による増幅を行った. サーマルサイクラーは geneatras (astec)を用いた. PCR 反応液の組成と反応条件は以下の通りである.

〈PCR 反応液〉		〈PCR 反応条件〉		
10×PCR Buffer for KOD -plus- ver.2	2.0 μL	predenature	95°C 2 min	
2 mM dNTPs	2.0 μL	denature	95°C 10 sec	
25 mM MgSO_4	1.2 μL	annealing	60°C 30 sec	35 cycles
10 μM primers	0.6 μL	extension	68°C 20 sec	
KOD -plus- (TOYOBO)	0.4 U	final extension	68°C 4 min	
DNA	~50 ng			
<u>Water</u>	<u>x μL</u>			
Total volume	20 μL			

表 11 使用した *P. ginseng* の産地および生育年数

ID	産地	生育年数	ID	産地	生育年数	ID	産地	生育年数
N001	Nagano	2	N213	Nagano	2	N510	Nagano	-
N002	Nagano	2	N221	Nagano	3	N601	Nagano	2
N003	Nagano	3	N231	Nagano	4	N602	Nagano	2
N004	Nagano	4	N241	Nagano	5	N603	Nagano	2
N005	Nagano	4	N251	Nagano	6	N604	Nagano	2
N006	Nagano	4	N252	Nagano	6	N605	Nagano	2
N007	Nagano	5	N301	Nagano	1	N611	Nagano	4
N008	Nagano	5	N302	Nagano	1	N612	Nagano	4
N009	Nagano	5	N303	Nagano	1	N613	Nagano	4
N101	Nagano	1	N311	Nagano	2	N621	Nagano	6
N102	Nagano	1	N312	Nagano	2	N622	Nagano	6
N103	Nagano	1	N321	Nagano	3	S101	Shimane	-
N104	Nagano	1	N331	Nagano	4	S102	Shimane	-
N105	Nagano	1	N341	Nagano	5	S103	Shimane	-
N106	Nagano	1	N351	Nagano	6	S201	Shimane	-
N107	Nagano	1	N401	Nagano	1	S202	Shimane	-
N108	Nagano	1	N402	Nagano	1	S203	Shimane	-
N109	Nagano	1	N403	Nagano	1	S204	Shimane	-
N111	Nagano	1	N411	Nagano	2	S205	Shimane	-
N112	Nagano	1	N412	Nagano	2	S301	Shimane	-
N113	Nagano	1	N421	Nagano	3	S302	Shimane	-
N131	Nagano	2	N431	Nagano	4	S303	Shimane	-
N132	Nagano	2	N441	Nagano	5	S304	Shimane	-
N141	Nagano	3	N451	Nagano	6	S305	Shimane	-
N151	Nagano	4	N501	Nagano	-	H701	Hokkaido	-
N161	Nagano	5	N502	Nagano	-	Market 1	Korea	-
N171	Nagano	6	N503	Nagano	-	Market 2	China	-
N172	Nagano	6	N504	Nagano	-			
N201	Nagano	1	N505	Nagano	-			
N202	Nagano	1	N506	Nagano	-	<i>P. japonicus</i>		
ID	産地	生育年数	ID	産地	生育年数	ID	産地	生育年数
N203	Nagano	1	N507	Nagano	-	PJ1	Hokkaido	-
N211	Nagano	2	N508	Nagano	-	PJ2	Hokkaido	-
N212	Nagano	2	N509	Nagano	-			

P. ginseng の ID のアルファベットは産地の頭文字を示し、数字の上一桁は生産者ごとに異なる数字を割り当てた。

表 12 使用した SSR マーカーの反復配列およびプライマー配列[192], 増幅長

マーカー名	反復配列	プライマー配列 (5' → 3')	増幅長 (bp)
PgSSR07	(GAA) _n	FAM- ATGGAAGTGGTTTGTGTTGG AGGAGACCATGAAGGATTCG	254-274
PgSSR08	(GAAA) _n	CCTGCTGGAGATTGAAGTCAT FAM- GTTGGAATGCTTCAGCAGAT	174-204
PgSSR09	(AG) _n	FAM- TGGATGATTTCGACATTTCTG CCGTTCAACTAACCCCAAAC	182-212
PgSSR17	(GGAACC) _n	HEX- ATCAGAACCGGAACCTGGAAC CTGAATTACCGAACCGAACC	116-128
PgSSR37	(ATG) _n (CTGATG) _n	FAM- AATCAGAAACAAAGAAAGCTAAAAC CTCTCTCATCTCTCTCTCTTCC	99-133
PgSSR40	(ATAG) _n	HEX- GTAGTAGTAGTAAACTTTGCTAACG ATTTACAACCTCTCTTCTTCTCTAC	137-171
PgSSR51	(AAG) _n	HEX- GGAGGTGATTGATGTAGTGGAATCC GGCTCTCCTATACTCACTATTTCCC	98-121
PgSSR53	(CTCCTTT) _n	CTACACGCTTTTTCATAGCTTACA HEX- TGTCTGCATAAAAGAGTTCGAGGC	168-181

【フラグメント解析】

PCR で得られた増幅産物を滅菌水で適宜希釈した。希釈後の PCR 産物と Hi-Di Formamide (life technologies), GS500 Rox Size Standard (life technologies)を混合し全量 15 μ L としたものを
用いて, genetic analyzer 3500 (life technologies) によりフラグメント解析を行った。

【データ解析】

フラグメント解析により得られたデータは, Gene Mapper 4.0 (life technologies)を用いて遺伝子型判定を行ったのち, 遺伝子型頻度を算出した。SSR の繰り返し回数の違いにより PCR 産物の増幅長が異なることから, 各対立遺伝子は増幅断片長で表記した。解析ソフト GenAlEx 6.5 [207, 208]を用いて対立遺伝子数(N_a), ヘテロ接合度観測値(H_o), ヘテロ接合度

期待値(H_e), 遺伝的距離を算出した. R 4.2.2 [206]を使用し, 遺伝的距離に基づく系統樹の作成を UPMGA 法により行った.

【根の太さとギンセノシド含量の測定】

乾燥後の主根の最も太い部位の径を測定し, これを主根の太さとした.

成分分析では, 各個体の主根の最も太い部位を 1 cm 程度の厚さで横切した一片を用い, 第二章と同様に試料の調製を行ったのち, モノリスキャピラリーカラムを用いるギンセノシド含量の測定を行った.

【統計解析】

得られた実験データは, R 4.2.2[206]を用いて, Tukey の HSD 検定を行い, $p < 0.05$ で統計的に有意とした.

発表論文目録

1. Honoka Ito and Michiho Ito (2023), Recent trends in ginseng research, *J Nat Med*, in press.
2. Honoka Ito and Michiho Ito (2023), Analysis of Ginsenosides in Different Parts of *Panax ginseng* by Age. *Japan J Pharmacog.* 78(1)
3. Honoka Ito and Michiho Ito (2023), Genetic diversity of *Panax ginseng* cultivated in Japan and its relation with some plant characteristics. *J Nat Med.* 78(1); 91-99. <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01747-1>

その他

- Honoka Ito and Michiho Ito (2022), Comparison of phenolic compounds contained in *Aquilaria* leaves of different species. *J Nat Med* 76(3) 693-702. <https://doi.org/10.1007/s11418-022-01608-3>.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始懇切なご指導とご鞭撻を賜りました，国立医薬品食品衛生研究所生薬部部長 伊藤美千穂 先生（元・京都大学大学院薬学研究科 准教授）に謹んで感謝の意を表します．

実験に際し，モノリスキャピラリーカラムの分析に関して有益なご助言をくださいました信和化工株式会社 小林宏資 氏（現・アクアス株式会社），分析機器の使用についてご指導いただき、様々なご助言をくださいました国立医薬品食品衛生研究所生薬部の皆様に感謝申し上げます．

金沢大学在籍時に生薬や薬用植物の研究の契機を与えてくださいました，金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類 佐々木陽平 准教授（現・教授），安藤広和 助教に厚く御礼申し上げます．

共に研究生活を送り，終始温かく励ましてくださいました京都大学大学院薬学研究科 薬品資源学分野の卒業生・当時の在学生の皆様に心から感謝いたします．

参考文献

1. 山本豊, 磯崎隆史, 北牧侑樹, 倉田清, 平雅代, 武田修己, 山口能宏, 佐々木博 (2023) 日本における原料生薬の使用量に関する調査報告(3) 生薬学雑誌 77(1); 24-41.
2. 木村雄四郎 (1968) 江戸時代に於ける人参栽培事情, 薬史学雑誌 3(2); 8-13.
3. 厚生労働省. 第十八改正日本薬局方. pp2018-2020.
4. D Tong (2015) On Japanese Ginseng-Exports to Qing China during the Middle of the Meiji-Period. *Yakushigaku Zasshi* 50(2); 109-118. https://doi.org/10.34531/jjhp.50.2_109
5. 川瀬清 (1956) 統計より見た薬用人参の生産. 生薬学雑誌 10(1); 17-19.
6. 公益財団法人日本特産農産物協会 (2023) 地域特産作物(工芸作物、薬用作物及び和紙原料等)に関する資料(令和3年産). p55.
7. 内閣府. 健康・医療戦略. 令和2年3月27日閣議決定, 令和3年4月9日一部変更.
8. 国民の健康と医療を担う漢方の将来ビジョン研究会. 提言書. 2017年(平成29年)3月, 2021年(令和3年)2月追加更新.
9. X Piao, H Zhang, J P Kang, D U Yang, Y Li, S Pang, Y Jin, D C Yang and Y Wang (2020) Advances in Saponin Diversity of *Panax ginseng*. *Molecules* 25, 3452. <https://doi.org/10.3390/molecules25153452>
10. Xueni Niu, Yinuo Shi, Linxuan Teng, Chongning Lv & Jincai Lu (2022) Two new dammarane-type saponins from radix and rhizomes of *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2022.2150848
11. Y Sun, X Liu, X Fu, W Xu, Q Guo, and Y Zhang (2023) Discrepancy Study of the Chemical Constituents of *Panax ginseng* from Different Growth Environments with UPLC-MS-Based Metabolomics Strategy. *Molecules* 28, 2928. <https://doi.org/10.3390/molecules28072928>
12. Y Sun, X Fu, Y Qu, L Chen, X Liu, Z He, J Xu, J Yang, W Ma, J Li, Q Guo, and Y Zhang (2023) Characterization of Ginsenosides from the Root of *Panax ginseng* by Integrating Untargeted Metabolites Using UPLC-Triple TOF-MS. *Molecules* 28, 2068. <https://doi.org/10.3390/molecules28052068>
13. S Sanada, N Kondo, J Shoji, O Tanaka, S Shibata (1974) Studies on the Saponins of Ginseng. I. Structures of Ginsenoside-Ro, -Rb1, -Rb2, -Rc and -Rd, *Chem Pharm Bull* 22(2) 421-428. <https://doi.org/10.1248/cpb.22.421>
14. Y. Nagai, O. Tanaka, S. Shibata (1971) Chemical studies on the oriental plant drugs—XXIV : Structure of ginsenoside-Rg1, a neutral saponin of ginseng root. *Tetrahedron* 27(5) 881-892. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92488-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92488-3)
15. D Yoon, W-C Shin, S-M Oh, B-R Choi, D Y Lee (2022) Integration of multiplatform metabolomics and multivariate analysis for geographical origin discrimination of *Panax ginseng*. *Food Res. Int.* 159 111610. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111610>

16. H Bai, S Wang, J Liu, D Gao, Y Jiang, H Liu, Z Cal (2016) Localization of ginsenosides in *Panax ginseng* with different age by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry imaging. J Chrom. B 1026: 263-271. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.09.024>
17. JW Lee, S-H Ji, Y-S Lee, D J Choi, B-R Choi, G-S Kim, N-I Baek and D Y Lee (2017) Mass Spectrometry Based Profiling and Imaging of Various Ginsenosides from *Panax ginseng* Roots at Different Ages. Int. J. Mol. Sci. 18, 1114. <https://doi.org/10.3390/ijms18061114>
18. Y Xiu, X Li, X Sun, D Xiao, R Miao, H Zhao, S Liu (2019) Simultaneous determination and difference evaluation of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* roots cultivated in different areas and ages by high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer in the multiple reaction monitoring mode combined with multivariate statistical analysis. J Ginseng Res 43: 508-516. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.12.001>
19. H Li, H Jiang, L Xu, Y Deng, J Xu, and Y Zhao (2022) Effects of Different Extraction Methods in Pharmacopoeia on the Content and Structure Transformation of Ginsenosides. Molecules 27, 4347. <https://doi.org/10.3390/molecules27144347>
20. S Walia, P Kumar, D Kumar, R Kumar (2023) A preliminary study on suitability of growing ginseng (*Panax ginseng* Meyer) in the Western Himalayan region. Plant, Soil and Environment · February. <https://doi.org/10.17221/288/2022-PSE>
21. N Guo, Y Yang, X Yang, Y Guan, J Yang, J Quan , H Yan, W Hou, G Zhang (2021) Growth age of mountain cultivated ginseng affects its chemical composition. Industrial Crops & Products 167: 113531. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113531>
22. G Chen, H Zhang, J Jiang, S Chen, H Zhang, G Zhang, C Zheng, H Xu (2023) Metabolomics approach to growth-age discrimination in mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. J Sep Sci 2300445. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300445>
23. H-E. Zhang, G. Li, JFeng Hou, Y.Y. Han, P. Ye, CB. Chen, XH. Xu, and EP. Wang (2023) Volatile Components' Variation Analysis on Ginseng Stems and Leaves at Different Growth Ages by HS-SPME-GC-MS. J. Chem. 4550047. <https://doi.org/10.1155/2023/4550047>
24. Y Yu, J Nie, B Zhao, J Tan, C Lv, J Lu (2023) Structure characterization and anti-fatigue activity of an acidic polysaccharide from *Panax ginseng* C. A. Meyer. J Ethnopharmacol. 301 115831. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115831>
25. S J Lee, G In, S-T Han, M-H Lee, J-W Lee, K-S Shin (2020) Structural characteristics of a red ginseng acidic polysaccharide rhamnogalacturonan I with immunostimulating activity from red ginseng. J ginseng Res 44(4) 570-579, <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.05.002>
26. S J Lee, G In, J-W Lee, K-S Shin (2021) Elucidation of the microstructure of an immunostimulatory polysaccharide purified from Korean red ginseng using sequential hydrolysis Int J Biol Macromol 186: 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.202>

27. B Zhao, X Wang, H Liu, C Lv, J Lu (2020) Structural characterization and antioxidant activity of oligosaccharides from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Int J Biol Macromol* 150: 737-745, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.016>
28. H M Kim, Y Song, G H Hyun, N P Long, J H Park, Y S.Y. Hsieh and S W Kwon (2020) Characterization and Antioxidant Activity Determination of Neutral and Acidic Polysaccharides from *Panax Ginseng* C. A. Meyer. *Molecules* 25, 791. <https://doi.org/10.3390/molecules25040791>
29. S Matsumoto, H Doi and J Kasuga (2022) Changes over the Years in Soil Chemical Properties Associated with the Cultivation of Ginseng (*Panax ginseng* Meyer) on Andosol Soil. *Agriculture* 12, 1223. <https://doi.org/10.3390/agriculture12081223>
30. YB Yun, JH Huh, Y Um (2022) Correlations among Soil Properties, Growth Characteristics, and Ginsenoside Contents in Wild-Simulated Ginseng with Different Ages. *forests* 2065. <https://doi.org/10.3390/f13122065>
31. K Kim, J-H Huh, Y Um, K S Jeon and H-J Kim (2020) The Comparative of Growth Characteristics and Ginsenoside Contents in Wild-simulated Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) on Different Years by Soil Properties of Cultivation Regions. *Korean J. Plant Res.* 33(6):651-658. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2020.33.6.651>
32. Y-B Yun, K Kim, J-H Huh and Y Um (2023) Relationships between Rhizosphere Environments and Growth of 10-Year-Old Wild-Simulated Ginseng. *Agronomy* 13, 1313. <https://doi.org/10.3390/agronomy13051313>
33. J Sun, H Luo, Q Yu, B Kou, Y Jiang, L Weng and C Xiao (2022) Optimal NPK Fertilizer Combination Increases *Panax ginseng* Yield and Quality and Affects Diversity and Structure of Rhizosphere Fungal Communities. *Front. Microbiol.* 13, 919434. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.919434>
34. J Eo, H-S Mo, and K-C Park (2018) Abiotic Factors Influencing Growth and Ginsenoside Content of *Panax ginseng* Roots. *Horit Sci Technol* 36(5) 681-690, <https://doi.org/10.12972/kjhst.20180068>
35. C Liu, R Xia, M Tang, X Liu, R Bian, L Yang, J Zheng, K Cheng, X Zhang, M Drosos, L Li, S Shan, S Joseph and Genxing Pan (2022) More microbial manipulation and plant defense than soil fertility for biochar in food production: A field experiment of replanted ginseng with different biochars. *Front. Microbiol.* 13:1065313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1065313>
36. L Dong, X Bian, Y Zhao, H Yang, Y Xu, Y Han and L Zhang (2022) Rhizosphere analysis of field-grown *Panax ginseng* with different degrees of red skin provides the basis for preventing red skin syndrome *BMC Microbiology* 22:12. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02430-9>
37. Y-H Park, Y Kim, R C Mishra & H Bae (2017) Fungal endophytes inhabiting mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng* Meyer): Diversity and biocontrol activity against ginseng pathogens. *Sci rep* 7: 16221. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16181-z>

38. Y-H Park, R C Mishra, S Yoon, H Kim, C Park, S-T Seo, H Bae (2019) Endophytic *Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens. *J Ginseng Res* 43: 408-420 <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.03.002>
39. MD. E K Chowdhury, H Bae (2018) Bacterial endophytes isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng* Meyer) have biocontrol potential against ginseng pathogens. *Biological Control* 126: 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.006>
40. Z Sun, L Yang, L Zhang, M Han (2018) An investigation of *Panax ginseng* Meyer growth promotion and the biocontrol potential of antagonistic bacteria against ginseng black spot. *J Ginseng Res* 42: 304-311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgr.2017.03.012>
41. Q Jin, Y Zhang, Y Ma, H Sun, Y Guan, Z Liu, Q Ye, Y Zhang, C Shao, P Mu, Q Wang (2022) The composition and function of the soil microbial community and its driving factors before and after cultivation of *Panax ginseng* in farmland of different ages. *Ecological Indicators* 145: 109748. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109748>
42. A-Z Tong, W Liu, Q Liu, G-Q Xia and J-Y Zhu (2021) Diversity and composition of the *Panax ginseng* rhizosphere microbiome in various cultivation modes and ages. *BMC Microbiology* 21:18. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02081-2>
43. K Kim, H J Kim, D H Jeong, J H Huh, K S Jeon and Y Um (2021) Correlation between Soil Bacterial Community Structure and Soil Properties in Cultivation Sites of 13-Year-Old Wild-Simulated Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Appl. Sci.*, 11, 937. <https://doi.org/10.3390/app11030937>
44. S Zhang, J Han, N Liu, J Sun, H Chen, J Xia, H Ju, S Liu (2023) *Botrytis cinerea* hypovirulent strain $\triangle BcSpd1$ induced *Panax ginseng* defense. *J Ginseng Res.* <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2023.08.005>
45. Tong A, Liu Lijuan, Liu Lihua, Liu W & Qin J (2023) Comparative analysis of microbial community structure in different times of *Panax ginseng* Rhizosphere microbiome and soil properties under larch forest. *BMC Genomic Data* volume 24, 51. <https://doi.org/10.1186/s12863-023-01154-1>
46. T Kawakatsu, N Fukuda (2023) Dense planting and environmental control (temperature, light intensity, and concentration of nutrient solution) can increase the yield of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) seedlings in indoor cultivation with artificial light. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 64:571–582. <https://doi.org/10.1007/s13580-022-00506-7>
47. J Choi, J Kim, H I Yoon, J E Son (2022) Effect of far-red and UV-B light on the growth and ginsenoside content of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) sprouts aeroponically grown in plant factories. *Hortic Environ Biotechnol* 63:77–87. <https://doi.org/10.1007/s13580-021-00380-9>
48. J Y Lee, H Yang, T K Lee, C H Lee, J W Seo, J-E Kim, S Y Kim, J H Y Park, K W Lee (2020) A

- short-term, hydroponic-culture of ginseng results in a significant increase in the anti-oxidative activity and bioactive components. *Food Sci Biotechnol* 29(7):1007–1012 <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00735-5>
49. J-S Song, S Jung, S Jee, J W Yoon, Y S Byeon, S Park & S B Kim (2021) Growth and bioactive phytochemicals of *Panax ginseng* sprouts grown in an aeroponic system using plasma-treated water as the nitrogen source. *Scientific Reports* 11:2924 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82487-8>
 50. J Yang, J Song, J Shilpha and B R Jeong (2023) Top and Side Lighting Induce Morphophysiological Improvements in Korean Ginseng Sprouts (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Grown from One-Year-Old Roots. *Plants*, 12(15), 2849; <https://doi.org/10.3390/plants12152849>
 51. J Song, J Yang and B R Jeong (2023) Growth and Photosynthetic Responses to Increased LED Light Intensity in Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Sprouts. *Agronomy*, 13(9), 2375; <https://doi.org/10.3390/agronomy13092375>
 52. T. Huang, W Y Gao, J. Wang, Y. Cao, Y. X. Zhao, L. Q. Huang, C. X. Liu (2010) Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Acta Physiol Plant* (2010) 32:765–772 <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0461-6>
 53. X-H Wu, M-Z Fan, X-F Li, X-C Piao, R Gao, M-L Lian (2021) Involvement of Putrescine, Nitric Oxide, and Hydrogen Peroxide in Methyl Jasmonate-Induced Ginsenoside Synthesis in Adventitious Root Cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Plant Growth Regul.* 40:1440–1449 <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10199-w>
 54. K-C Le, T-T Ho, K-Y Paek, S-Y Park (2019) Low dose gamma radiation increases the biomass and ginsenoside content of callus and adventitious root cultures of wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer). *Industrial Crops & Products* 130: 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.056>
 55. S Ahmed, A M Shohael, K Y Paek (2021) Evaluation of growth and some unexplored bioactivities of bioreactor grown adventitious root culture of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69. 2046–2060. <https://doi.org/10.1002/bab.2266>
 56. Z E Jiménez-Pérez¹, Y-J Kim, V Castro-Aceituno, R Mathiyalagan, J Markus, S Ahn, S Y Simu, D-C Yang (2017) Novel application of cultured roots of mountain ginseng (*Panax ginseng* Meyer) and ginsenoside re as safe antimelanogenic cosmeceutical components. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 14(5): 209-218. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i5.24>
 57. G N. Chelomina, K V. Rozhkov, O L. Burundukova, T Y. Gorpenchenko, Y A. Khrolenko and Y N. Zhuravlev (2020) Age-Dependent and Tissue-Specific Alterations in the rDNA Clusters of the *Panax ginseng* C. A. Meyer Cultivated Cell Lines. *Biomolecules*, 10, 1410. <https://doi.org/10.3390/biom10101410>
 58. S Jin and T K Hyun (2020) Ectopic Expression of Production of Anthocyanin Pigment 1 (PAP1) Improves the Antioxidant and Anti-Melanogenic Properties of Ginseng (*Panax ginseng* C.A.

- Meyer) Hairy Roots. *Antioxidants* 9, 922. <https://doi.org/10.3390/antiox9100922>
59. C Liu, K Wang, Z Yun, W Liu, M Zhao, Y Wang, J Hu, T Liu, N Wang, Y Wang and M Zhang (2023) Functional Study of PgGRAS68-01Gene Involved in the Regulation of Ginsenoside Biosynthesis in *Panax ginseng*. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 3347. <https://doi.org/10.3390/ijms24043347>
 60. X Fang, M Wang, X Zhou, H Wang, H Wang and H Xiao (2022) Effects of growth years on ginsenoside biosynthesis of wild ginseng and cultivated ginseng. *BMC Genomics* 23:325 <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08570-0>
 61. M Liu, Z Pan, J Yu, L Zhu, M Zhao, Y Wang, P Chen, C Liu, J Hu, T Liu, K Wang, Y Wang and M Zhang (2022) Transcriptome-wide characterization, evolutionary analysis, and expression pattern analysis of the NF-Y transcription factor gene family and salt stress response in *Panax ginseng*. *BMC Plant Biology* 22:320 <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03687-6>
 62. L Li, B Lv, K Zang, Y Jiang, C Wang, Y Wang, K Wang, M Zhao, P Chen, J Lei, Y Wang and M Zhang (2023) Genome-wide identification and systematic analysis of the *HD-Zip* gene family and its roles in response to pH in *Panax ginseng* Meyer. *BMC Plant Biology* 23:30 <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04038-9>
 63. Y Jiang, L Liu, Z Pan, M Zhao, L Zhu, Y Han, L Li, Y Wang, K Wang, S Liu, Y Wang¹ & M Zhang (2022) Genome-wide analysis of the C2H2 zinc finger protein gene family and its response to salt stress in ginseng, *Panax ginseng* Meyer. *Scientific Reports* 12:10165 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14357-w>
 64. H Li, J Chen, Q Zhao, Y Han, L Li, C Sun, K Wang, Y Wang, M Zhao, P Chen, J Lei, Y Wang and M Zhang (2021) Basic leucine zipper (*bZIP*) transcription factor genes and their responses to drought stress in ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer. *BMC Genomics* 22:316. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07624-z>
 65. X Meng, T Zhang, C Chen, Q Li and J Liu (2022) Regulatory network of ginsenoside biosynthesis under Ro stress in the hairy roots of *Panax ginseng* revealed by RNA sequencing. *Front Bioeng Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1006386>
 66. M Zhao, Y Lin, Y Wang, X Li, Y Han, K Wang, C Sun, Y Wang & M Zhang (2019) Transcriptome analysis identifies strong candidate genes for ginsenoside biosynthesis and reveals its underlying molecular mechanism in *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Scientific REPORTS* 9:615. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36349-5>
 67. B W Yang, Y T Hahm (2018) Transcriptome analysis using de novo RNA-seq to compare ginseng roots cultivated in different environments. *Plant Growth Regul* 84:149–157. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0328-6>
 68. P Mohanan, T-J Yang and Y H Song (2023) Effect of far-red light on the production and diversity of ginsenosides in leaves of *Panax ginseng* Meyer. *Applied Biological Chemistry* 66:16 <https://doi.org/10.1186/s13765-023-00776-4>

69. H Lei, H Zhang, Z Zhang, H Sun, M Li, C Shao, H Liang, H Wu, Y Zhang (2022) Physiological and transcriptomic analyses of roots from *Panax ginseng* C. A. Meyer under drought stress. *Industrial Crops & Products* 191: 115858. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115858>
70. N E Waminal, T-J Yang, J-G In, H H Kim (2020) Five-color fluorescence in situ hybridization system for karyotyping of *Panax ginseng*. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 61:869–877 <https://doi.org/10.1007/s13580-020-00267-1>
71. J Y Han, Y S Kwon, D C Yang, Y R Jung and Y E Choi (2006) Expression and RNA Interference-Induced Silencing of the Dammarenediol Synthase Gene in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* 47(12): 1653–1662. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcl032>
72. J-Y Han, H-J Kim, Y-S Kwon and Y-E Choi (2011) The Cyt P450 Enzyme CYP716A47 Catalyzes the Formation of Protopanaxadiol from Dammarenediol-II During Ginsenoside Biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* 52(12): 2062–2073. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr150>
73. T-D Kim, J-Y Han, G H Huh and Y-E Choi (2011) Expression and Functional Characterization of Three Squalene Synthase Genes Associated with Saponin Biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* 52(1): 125–137. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq179>
74. J-Y Han, H-S Hwang, S-W Choi, H-J Kim and Y-E Choi (2012) Cytochrome P450 CYP716A53v2 Catalyzes the Formation of Protopanaxatriol from Protopanaxadiol During Ginsenoside Biosynthesis in *Panax Ginseng*. *Plant Cell Physiol.* 53(9): 1535–1545. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs106>
75. J-Y Han, M-J Kim, Y-W Ban, H-S Hwang and Y-E Choi (2013) The Involvement of β -Amyrin 28-Oxidase (CYP716A52v2) in Oleanane-Type Ginsenoside Biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* 54(12): 2034–2046. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct141>
76. Kim NH, Jayakodi M, Lee SC, Choi BS, Jang W, Lee J, Kim HH, Waminal NE, Lakshmanan M, van Nguyen B, Lee YS, Park HS, Koo HJ, Park JY, Perumal S, Joh HJ, Lee H, Kim J, Kim IS, Kim K, Koduru L, Kang KB, Sung SH, Yu Y, Park DS, Choi D, Seo E, Kim S, Kim YC, Hyun DY, Park YI, Kim C, Lee TH, Kim HU, Soh MS, Lee Y, In JG, Kim HS, Kim YM, Yang DC, Wing RA, Lee DY, Paterson AH, Yang TJ. (2018) Genome and evolution of the shade-requiring medicinal herb *Panax ginseng*. *Plant Biotechnol J.* 2018 Nov;16(11):1904-1917. <https://doi.org/10.1111/pbi.12926>
77. T Zhang, M Han, L Yang, Z Han, L Cheng, Z Sun and L Yang (2019) The Effects of Environmental Factors on Ginsenoside Biosynthetic Enzyme Gene Expression and Saponin Abundance. *Molecules* 24, 14. <https://doi.org/10.3390/molecules24010014>
78. KJ Lee, R Sebastin, SH Kim, E Yoo, S Lee, GT Cho, M Kang DY Hyun (2020) Genetic Composition of Korean Ginseng Germplasm by Collection Area and Resource Type. *agronomy* 10.1643. doi:10.3390/agronomy10111643
79. W Jang, Y Jang, N-H Kim, N E Waminal, Y C Kim, J W Lee, T-J Yang (2020) Genetic diversity among cultivated and wild *Panax ginseng* populations revealed by high-resolution microsatellite

- markers. *J Ginseng Res* 44 637-643. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.05.008>
80. K J Lee, J-R Lee, R Sebastin, G-T Cho and D Y Hyun (2020) Molecular Genetic Diversity and Population Structure of Ginseng Germplasm in RDA-Genebank: Implications for Breeding and Conservation. *Agronomy* 10, 68. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010068>
 81. Y Li, R Li, N Zhang, J Zhang, W Hou, Z Qu, P Zheng (2023) Genetic diversity and population structure of Chinese mountain cultivated *Panax ginseng* accessions using SSR and KASP markers. *Genet Resour Crop Evol.* <https://doi.org/10.1007/s10722-023-01705-6>
 82. G D Reunova, O G Koren, T I Muzarok, Y N Zhuravlev (2014) Microsatellite Analysis of *Panax ginseng* Natural Populations in Russia. *Chinese Medicine* 5; 231-243. <http://dx.doi.org/10.4236/cm.2014.54028>
 83. G-L Wang, Y-P Wang, J-Y Zheng, L-X Zhang (2018) Monoaminergic and aminoacidergic receptors are involved in the antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1 in mouse hippocampus (CA3) and prefrontal cortex. *Brain Research* 1699: 44–53 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.05.035>
 84. G Wang, C Lei, Y Tian, Y Wang, L Zhang and R Zhang (2019) Rb1, the Primary Active Ingredient in *Panax ginseng* C.A. Meyer, Exerts Antidepressant-Like Effects via the BDNF–Trkb–CREB Pathway. *Frontiers in Pharmacology* 10: 1034. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01034>
 85. S Li, R Yuan, Q Fan, C Zhang, S Han, J Li, Z Xu, K Sun, Q Xu, C Yao, S Yang, H Gao (2023) Ginsenoside Rb1 exerts therapeutic effects on ulcerative colitis through regulating the Nrf2/PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. *J. Funct. Foods.* 102 105475 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105475>
 86. H Su, C-J Tian, Y Wang, J Shi, X Chen, Z Zhen, Y Bai, L Deng, C Feng, Z Ma & J Liu (2022) Ginsenoside Rb1 reduces oxidative/carbonyl stress damage and ameliorates inflammation in the lung of streptozotocin-induced diabetic rats. *PHARMACEUTICAL BIOLOGY* 60(81), 2229–2236. <https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2140168>
 87. S Lim, J Park and J-Y Um (2019) Ginsenoside Rb1 Induces Beta 3 Adrenergic Receptor–Dependent Lipolysis and Thermogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and *db/db* Mice. *Frontiers in Pharmacology* 10: 1154. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01154>
 88. S Yub, H Xiaa, Y Guoc, X Qianb, X Zoua, H Yanga, M Yina, H Liua (2020) Ginsenoside Rb1 retards aging process by regulating cell cycle, apoptotic pathway and metabolism of aging mice. *J Ethnopharmacol* 255: 112746. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112746>
 89. Q Gao, G Li, Y Zu, Y Xu, C Wang, D Xiang, W He, T Shang, X Cheng, D Liu, C Zhang (2023) Ginsenoside Rg1 alleviates ANIT-induced cholestatic liver injury by inhibiting hepatic inflammation and oxidative stress via SIRT1 activation. *J Ethnopharmacol* 319: 117089. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117089>
 90. H Li, Y Gao, L Song, T Chen, G Zhang, Z Ye, Y Gao, W Huo (2022) Ginsenoside Rg1 protects

- mice against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced liver injury by inhibiting CYP1A1 through the aryl hydrocarbon receptor. *J Ethnopharmacol* 294: 115394. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115394>
91. Y Han, Y Su, M Han, Y Liu, Q Shi, X Li, P Wang, W Li, W Li (2022) Ginsenoside Rg1 attenuates glomerular fibrosis by inhibiting CD36/ TRPC6/NFAT2 signaling in type 2 diabetes mellitus mice. *J Ethnopharmacol* 302, 115923. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115923>
 92. L Huang, Z Peng, C Lu, Y Chen, J Lv, M Qin, D Liao, X Liu and Z Shi (2020) Ginsenoside Rg1 alleviates repeated alcohol exposure-induced psychomotor and cognitive deficits. *Chin Med* 15:44 <https://doi.org/10.1186/s13020-020-00325-x>
 93. Y Meng, W Li, C Hu, S Chen, H Li, F Bai, L Zheng, Y Yuan, Y Fan, Y Zhou (2023) Ginsenoside F1 administration promotes UCP1-dependent fat browning and ameliorates obesity-associated insulin resistance. *Food Sci. and Human Wellness* 12: 2061-2072 <http://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.03.025>
 94. L She, L Xiong, L Li, J Zhang, J Sun, H Wu, J Ren, W Wang, X Zhao, G Liang (2023) Ginsenoside Rk3 ameliorates A β -induced neurotoxicity in APP/PS1 model mice via AMPK signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 158, 114192. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114192>
 95. M Liu, Y Zhang, A Zhang, Y Deng, X Gao, J Wang, Y Wang, S Wang, J Liu, S Chen, W Yao, X Liu (2023) Compound K is a potential clinical anticancer agent in prostate cancer by arresting cell cycle. *Phytomedicine* 109, 154584. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154584>
 96. L Shi, W Fu, H Xu, S Li, X Yang, W Yang, D Sui & Q Wang (2022) Ginsenoside Rc attenuates myocardial ischaemic injury through antioxidative and antiinflammatory effects. *Pharm Biol* 60(1): 1038-1046, <https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2072518>
 97. J-j Zhang, K-c Chen, Y Zhou, H Wei, M-h Qi, Z Wang, Y-n Zheng, R-x Chen, S Liu, W Li (2022) Evaluating the effects of mitochondrial autophagy flux on ginsenoside Rg2 for delaying D-galactose induced brain aging in mice. *Phytomedicine* 104, 154341. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154341>
 98. S Zheng, H Zheng, R Zhang, X Piao, J Hu, Y Zhu and Y Wang (2022) Immunomodulatory Effect of Ginsenoside Rb2 Against Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mice. *Front Pharmacol* 13, 927087. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.927087>
 99. G O Kim, N Kim, G Y Song and J-S Bae (2022) Inhibitory Activities of Rare Ginsenoside Rg4 on Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 10836. <https://doi.org/10.3390/ijms231810836>
 100. Y Li, P Yu, W Fu, J Wang, Y Ma, Y Wu, H Cui, W Zhao, F Zhang, X Yu, D Sui, H Xu (2022) Polysaccharides from *Panax ginseng* C. A. Meyer alleviated DSS-induced IBD by inhibiting JAK2/STAT1/NLPR3 inflammasome signalling pathway in mice. *J Func. Food* 91: 105013. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105013>

101. T Ren, F Liu, D Wang, B Li, P Jiang, J Li, H Li, C Chen, W Wu, L Jiao (2023) Rhamnogalacturonan-I enriched pectin from steamed ginseng ameliorates lipid metabolism in type 2 diabetic rats via gut microbiota and AMPK pathway. *J Ethnopharmacol* 301: 115862. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115862>
102. J Wang, Y Zhou, Y Yu, Y Wang, D Xue, Y Zhou, X Li (2023) A ginseng-derived rhamnogalacturonan I (RG-I) pectin promotes longevity via TOR signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Carbohydr. Polym.* 312 120818. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120818>
103. J-j Zhang, K-c Chen, J-y Yin, Y-n Zheng, R-x Chen, W Liu, S Tang, J Zhang, M Zhang, Z Wang, S Liu, W Li (2023) AFG, an important maillard reaction product in red ginseng, alleviates D-galactose-induced brain aging in mice via correcting mitochondrial dysfunction induced by ROS accumulation. *Eur. J. Pharmacol.* 952 175824. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175824>
104. H Wang, Y Cheng, X Zhang, Y Wang, H Zha (2022) Comparative analysis of physicochemical properties, ginsenosides content and α -amylase inhibitory effects in white ginseng and red ginseng. *Food Sci. Hum. Well.* 12(1): 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.014>
105. B Liao, H Newmark, R Zhouv (2002) Neuroprotective Effects of Ginseng Total Saponin and Ginsenosides Rb1 and Rg1 on Spinal Cord Neurons in Vitro. *Exp. Neurol.* 173(2): 224-234. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7841>
106. Y C. Kim, S R. Kim, G J. Markelonis, T H. Oh (1998) Ginsenosides Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *Neurosci. Res.* 53(4): 426-432. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980815\)53:4<426::AID-JNR4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980815)53:4<426::AID-JNR4>3.0.CO;2-8)
107. J. Zhu 1, Y. Jiang 1, L. Wu, T. Lu, G. Xu, X. Liu (2012) Suppression of local inflammation contributes to the neuroprotective effect of ginsenoside Rb1 in rats with cerebral ischemia. *Neurosci.* 202(27): 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.070>
108. GL Wang, ZM He, HY Zhu, YG Gao, Y Zhao, H Yang, LX Zhang (2017) Involvement of serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems in the antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1, a major active ingredient of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Ethnopharmacol.* 204: 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.009>
109. Wang, L., Lu, AP., Yu, ZL. et al. The Melanogenesis-Inhibitory Effect and the Percutaneous Formulation of Ginsenoside Rb1. *AAPS PharmSciTech* 15, 1252–1262 (2014). <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0138-3>
110. JY Cho, W Park, SK Lee, W Ahn, YJoo Lee (2003) Ginsenoside-Rb1 from *Panax ginseng* C.A. Meyer Activates Estrogen Receptor- α and - β , Independent of Ligand Binding. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(7): 3510–3515, <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031823>
111. S Wang, J Qiao, C Jiang, D Pan, S Yu, J Chen, S Liu, P Zhang, D Zhao, M Liu (2023) Ginsenoside Rg1 Delays Chronological Aging in a Yeast Model via CDC19- and SDH2-Mediated Cellular Metabolism. *antioxidants* 12(2): 296. <https://doi.org/10.3390/antiox12020296>

112. J Zhou, J Zhang, L Cao, Y Liu, L Liu, Cl Liu, X Li (2023) Ginsenoside Rg1 modulates vesicular dopamine storage and release during exocytosis revealed with single-vesicle electrochemistry. Chem Comm 59: 3087-3090. DOI <https://doi.org/10.1039/D2CC06950D>
113. C Mo, S Xie, T Zeng, Y Lai, S Huang, C Zhou, W Yan, S Huang, L Gao, Z Lv (2021) Ginsenoside-Rg1 acts as an IDO1 inhibitor, protects against liver fibrosis via alleviating IDO1-mediated the inhibition of DCs maturation. Phytomedicine 84:153524. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153524>
114. HQ Wang, SW Yang, Y Gao, YJ Liu, X Li, QD Ai, MY Lin, YT Yang, Q Zeng, Y Zhang, ZZ Wang, NH Chen (2021) Novel antidepressant mechanism of ginsenoside Rg1: Regulating biosynthesis and degradation of connexin43. J Ethnopharmacol 278: 114212. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114212>
115. Lim C, Lim S, Lee B, Cho S. Ginsenoside Rg1 Exhibits Anti-asthmatic Activity in an Aspergillus Protease-Induced Asthma Model in Mice. Natural Product Communications. 2018;13(4). doi:10.1177/1934578X1801300409
116. Z Chen, Y Lin, Q Zhou, S Xiao, C Li, R Lin, J Li, Y Chen, C Luo, Z Mo (2022) Ginsenoside Rg1 mitigates morphine dependence via regulation of gut microbiota, tryptophan metabolism, and serotonergic system function. Biomed. Pharmacoth. 150: 112935. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112935>
117. F Su, L Yuan, L Zhang, S Hu (2012) Ginsenosides Rg1 and Re act as adjuvant via TLR4 signaling pathway. Vaccine 30(27): 4106-4112. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.052>
118. Madhi, I., Kim, J., Shin, J., & Kim, Y. (2021). Ginsenoside Re exhibits neuroprotective effects by inhibiting neuroinflammation via CAMK/MAPK/NF-κB signaling in microglia. Molecular Medicine Reports, 24, 698. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12337>
119. IA Lee, S R. Hyam, SE Jang, M Joo Han, DH Kim (2012) Ginsenoside Re Ameliorates Inflammation by Inhibiting the Binding of Lipopolysaccharide to TLR4 on Macrophages. J. Agric. Food Chem. 60, 38, 9595–9602. <https://doi.org/10.1021/jf301372g>
120. S Paul, H S Shin, S C Kang (2012) Inhibition of inflammations and macrophage activation by ginsenoside-Re isolated from Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Food Chem. Toxicol. 50(5): 1354-1361. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.035>
121. W C.S. Cho, WS Chung, S K.W. Lee, A W.N. Leung, C H.K. Cheng, K K.M. Yue (2006) Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. Europ. J. Pharmacol 550: 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.08.056>
122. J Han, J Xia, L Zhang, E Cai, Y Zhao, X Fei, X Jia, H Yang, S Liu (2019) Studies of the effects and mechanisms of ginsenoside Re and Rk3 on myelosuppression induced by cyclophosphamide. J ginseng Res 43(4): 618-624. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.07.009>

123. Tian, W., Daohui, W., Pinyuan, Z., Jie, H., & Bing, H. (2021). Ginsenoside Rg3 Alleviates Rotenone-induced Lung Injury in Mice by Its Anti-oxidative Properties. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 9(6), 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.22270/ajprd.v9i6.1039>
124. Z Cheng, L Li (2016) Ginsenoside Rg3 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through inactivating the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* 34: 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.02.011>
125. N Han, SG Ko, PD Moon, HJ Park (2021) Ginsenoside Rg3 attenuates skin disorders via down-regulation of MDM2/HIF1 α signaling pathway. *J ginseng Res.* 45(5): 610-616. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2021.06.008>
126. Park Y-J, Cho M, Choi G, Na H, Chung Y. A Critical Regulation of Th17 Cell Responses and Autoimmune Neuro-Inflammation by Ginsenoside Rg3. *Biomolecules.* 2020; 10(1):122. <https://doi.org/10.3390/biom10010122>
127. EA Bae, MJ Han, YW Shin, DH Kim (2006) Inhibitory Effects of Korean Red Ginseng and Its Genuine Constituents Ginsenosides Rg3, Rf, and Rh2 in Mouse Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction and Contact Dermatitis Models. *Bio.Pharm. Bull.* 29(9): 1862-1867. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1862>
128. Y Han, T Wang, C Li, Z Wang, Y Zhao, J He, L Fu, B Han (2021) Ginsenoside Rg3 exerts a neuroprotective effect in rotenone-induced Parkinson's disease mice via its anti-oxidative properties. *Europ. J. Pharmacol* 909: 174413. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174413>
129. Y Zang, X Yang, S Wang, S Song (2019) Ginsenoside Rg3 Prevents Cognitive Impairment by Improving Mitochondrial Dysfunction in the Rat Model of Alzheimer's Disease. *J. Agric. Food Chem.* 67, 36, 10048–10058. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03793>
130. YJ Choi, HJ Lee, DW Kang, IH Han, BK Choi, WH Cho (2013) Ginsenoside Rg3 induces apoptosis in the U87MG human glioblastoma cell line through the MEK signaling pathway and reactive oxygen species. *Oncol. Rep.* 30(3): 1362-1370. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2555>
131. T Yu, MH Rhee, J Lee, SH Kim, Y Yang, HG Kim, Y Kim, C Kim, YS Kwak, JH Kim, JY Cho (2016) Ginsenoside Rc from Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Attenuates Inflammatory Symptoms of Gastritis, Hepatitis and Arthritis. *The American Journal of Chinese Medicine* Vol. 44, No. 03, pp. 595-615. <https://doi.org/10.1142/S0192415X16500336>
132. TL Chang, HYDing, YW Kao (2008) Role of Ginsenoside Rd in Inhibiting 26S Proteasome Activity. *J. Agric. Food Chem.* 56, 24, 12011–12015. <https://doi.org/10.1021/jf801427e>
133. S Zhang, H Wang, J Wang, W Jin, X Yan, X Chen, D Wang, D Zhao, Y Wang, D Cong, L Sun (2022) Ginsenoside Rf inhibits human tau proteotoxicity and causes specific LncRNA, miRNA and mRNA expression changes in *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Europ. J. Pharmacol.* 922: 174887. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174887>

134. F M Siraj, S Natarajan, M A Huq, YJ Kim, DC Yang (2015) Structural investigation of ginsenoside Rf with PPAR γ major transcriptional factor of adipogenesis and its impact on adipocyte. *J. Ginseng Res.* 39(2): 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2014.10.002>
135. Quanwei Wang, Wenwen Fu, Xiaofeng Yu, Huali Xu, Dayun Sui & Yeling Wang (2021) Ginsenoside Rg2 alleviates myocardial fibrosis by regulating TGF- β 1/Smad signalling pathway, *Pharmaceutical Biology*, 59:1, 104-111, DOI: 10.1080/13880209.2020.1867197
136. HJ Kang, YH Huang, HW Lim, D Shin, K Jang, Y Lee, K Kim, CJ Lim (2016) Stereospecificity of ginsenoside Rg2 epimers in the protective response against UV-B radiation-induced oxidative stress in human epidermal keratinocyte. *J Photochem. Photobiol.* 165: 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.03>
137. SJ Kim, AK Kim (2015) Anti-breast cancer activity of Fine Black ginseng (*Panax ginseng* Meyer) and ginsenoside Rg5. *J. Ginseng Res.* 39(2): 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2014.09.003>
138. H Kim, P Choi, T Kim, Y Kim, BG Song, YT Park, SJ Choi, CH Yoon, WC Lim, H Ko, J Ham (2021) Ginsenosides Rk1 and Rg5 inhibit transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and suppress migration, invasion, anoikis resistance, and development of stem-like features in lung cancer. *J. Ginseng Res.* 45(1): 134-148. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2020.02.005>
139. Y Jin, JH Kim, HD Hong, J Kwon, EJ Lee, M Jang, SY Lee, AR Han, TG Nam, SK Hong, TL Huh, NJ Kang, TG Lim (2018) Ginsenosides Rg5 and Rk1, the skin-whitening agents in black ginseng. *J. Funct. Foods* 45: 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.036>
140. Yesmin Simu S, Ahn S, Castro-Aceituno V, Yang DC. Ginsenoside Rg5: Rk1 Exerts an Anti-obesity Effect on 3T3-L1 Cell Line by the Downregulation of PPAR γ and CEBP α . *Iran J Biotechnol.* 2017 Dec 29;15(4):252-259. doi: 10.15171/ijb.1517. PMID: 29845077; PMCID: PMC5903912.
141. Ponnuraj SP, Siraj F, Kang S, Noh HY, Min JW, Kim YJ, Yang DC. Amelioration of insulin resistance by Rk1 + Rg5 complex under endoplasmic reticulum stress conditions. *Pharmacognosy Res.* 2014 Oct;6(4):292-6. doi: 10.4103/0974-8490.138257. PMID: 25276065; PMCID: PMC4166816.
142. YJ Kim, HC Kwon, H Ko, JH Park, HY Kim, JH Yoo, HO Yang (2008) Anti-tumor Activity of the Ginsenoside Rk1 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Inhibition of Telomerase Activity and Induction of Apoptosis. *Bio. Pharm. Bull.* 31(5) 826-830. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.826>
143. Nahar J, Boopathi V, Murugesan M, Rupa EJ, Yang DC, Kang SC, Mathiyalagan R. Investigating the Anticancer Activity of G-Rh1 Using In Silico and In Vitro Studies (A549 Lung Cancer Cells). *Molecules.* 2022; 27(23):8311. <https://doi.org/10.3390/molecules27238311>
144. WeY Su, Y Li, X Chen, X Li, H Wei, Z Liu, Q Shen, C Chen, YP Wang, W Li (2021) Ginsenoside

- Rh1 Improves Type 2 Diabetic Nephropathy through AMPK/PI3K/Akt-Mediated Inflammation and Apoptosis Signaling Pathway. *American J. Chinese Med.* 49(5): 1215-1233. <https://doi.org/10.1142/S0192415X21500580>
145. C Lu, Z Shi, L Dong, J Lv, P Xu, Y Li, L Qu, X Liu (2017) Exploring the Effect of Ginsenoside Rh1 in a Sleep Deprivation-Induced Mouse Memory Impairment Model. *Phytotherapy Res.* 31(5): 763-770. <https://doi.org/10.1002/ptr.5797>
 146. W Gu, KA Kim, DH Kim (2013) Ginsenoside Rh1 Ameliorates High Fat Diet-Induced Obesity in Mice by Inhibiting Adipocyte Differentiation. *Bio. Pharm. Bull.* 36(1): 102-107. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00558>
 147. EK Park, MK Choo, MJ Han, DH Kim (2004) Ginsenoside Rh1 Possesses Antiallergic and Anti-Inflammatory Activities. *Int Arch Allergy Immunol* 133 (2): 113–120. <https://doi.org/10.1159/000076383>
 148. H Nakata, Y Kikuchi, T Tode, J Hirata, T Kita, K Ishii, K Kudoh, I Nagata, N Shinomiya (1998) Inhibitory Effects of Ginsenoside Rh2 on Tumor Growth in Nude Mice Bearing Human Ovarian Cancer Cells. *Jap. J. Cancer Res.* 89(7): 733-740. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1998.tb03278.x>
 149. Tode, T., Kikuchi, Y., Kita, T. et al. Inhibitory effects by oral administration of ginsenoside Rh2 on the growth of human ovarian cancer cells in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 120, 24–26 (1993). <https://doi.org/10.1007/BF01200720>
 150. Lo S-H, Hsu C-T, Niu H-S, Niu C-S, Cheng J-T, Chen Z-C. Ginsenoside Rh2 Improves Cardiac Fibrosis via PPAR δ –STAT3 Signaling in Type 1-Like Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017; 18(7):1364. <https://doi.org/10.3390/ijms18071364>
 151. Oh, SJ., Lee, S., Choi, WY. et al. Skin anti-photoaging properties of ginsenoside Rh2 epimers in UV-B-irradiated human keratinocyte cells. *J Biosci* 39, 673–682 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12038-014-9460-x>
 152. HL Xu, GH Chen, YT Wu, LP Xie, ZB Tan, B Liu, HJ Fan, HM Chen, GQ Huang, M Liu, YC Zhou (2022) Ginsenoside Ro, an oleanolic saponin of *Panax ginseng*, exerts anti-inflammatory effect by direct inhibiting toll like receptor 4 signaling pathway. *J Ginseng Res* 46(1): 156-166. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2021.05.011>
 153. H Matsuda, K Samukawa, M Kubo (1990) Anti-Inflammatory Activity of Ginsenoside Ro. *Planta Med* 56(1): 19-23. [10.1055/s-2006-960875](https://doi.org/10.1055/s-2006-960875)
 154. X-H ZHANG, XX XU, T XU (2015) Ginsenoside Ro suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes by inhibiting NF- κ B. *Chin. J. Nat. Med.* 13(4): 283-289. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30015-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30015-7)
 155. Zheng S-w, Xiao S-y, Wang J, Hou W, Wang Y-p. Inhibitory Effects of Ginsenoside Ro on the Growth of B16F10 Melanoma via Its Metabolites. *Molecules.* 2019; 24(16):2985.

- <https://doi.org/10.3390/molecules24162985>
156. K Murata, F Takeshita, K Samukawa, T Tani, H Matsuda (2011) Effects of Ginseng Rhizome and Ginsenoside Ro on Testosterone 5 α -Reductase and Hair Re-growth in Testosterone-treated Mice. *Phytotherapy Res* 26(1): 48-53. <https://doi.org/10.1002/ptr.3511>
 157. Y Li, J Hou, Z Liu, X Gong, J Hu, Y Wang, W Liu, X Lin, Z Wang, W Li (2021) Alleviative effects of 20(R)-Rg3 on HFD/STZ-induced diabetic nephropathy via MAPK/NF- κ B signaling pathways in C57BL/6 mice. *J Ethnopharmacol.* 267: 113500. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113500>
 158. W Li, JQ Wang, YD Zhou, JG Hou, Y Liu, YP Wang, XJ Gong, XH Lin, S Jiang, Z Wang (2020) Rare Ginsenoside 20(R)-Rg3 Inhibits D-Galactose-Induced Liver and Kidney Injury by Regulating Oxidative Stress-Induced Apoptosis. *The American Journal of Chinese Medicine* 48(5): 1141-1157. <https://doi.org/10.1142/S0192415X20500561>
 159. J Tian, S Zhang, G Li, Z Liu, B Xu (2009) 20(S)-ginsenoside Rg3, a neuroprotective agent, inhibits mitochondrial permeability transition pores in rat brain. *Phytotherapy Res.*23(4):486-491. <https://doi.org/10.1002/ptr.2653>
 160. Kim, A.R., Kim, S.W., Lee, B.W. et al. Screening ginseng saponins in progenitor cells identifies 20(R)-ginsenoside Rh2 as an enhancer of skeletal and cardiac muscle regeneration. *Sci Rep* 10, 4967 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61491-4>
 161. S Kang, K Im, G Kim, H Min (2017) Antiviral activity of 20(R)-ginsenoside Rh2 against murine gammaherpesvirus. *J Ginseng Res.* 41(4): 496-502. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2016.08.010>
 162. S Fatmawati, T Ersam, H Yu, C Zhang, F Jin, K Shimizu (2014) 20(S)-Ginsenoside Rh2 as aldose reductase inhibitor from *Panax ginseng*. *Bioorganic Medicinal Chem. Letters* 24(18): 4407-4409. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.08.009>
 163. Cho, S.H., Chung, K.S., Choi, J.H. et al. Compound K, a metabolite of ginseng saponin, induces apoptosis via caspase-8-dependent pathway in HL-60 human leukemia cells. *BMC Cancer* 9, 449 (2009). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-449>
 164. J Han, Y Wang, E Cai, L Zhang, Y Zhao, N Sun, X Zheng, S Wang (2019) Study of the Effects and Mechanisms of Ginsenoside Compound K on Myelosuppression. *J. Agric. Food Chem.* 67, 5: 1402–1408. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06073>
 165. Fayeza Md. Siraj, Natarajan SathishKumar, Yeon Ju Kim, Se Young Kim & Deok Chun Yang (2015) Ginsenoside F2 possesses anti-obesity activity via binding with PPAR γ and inhibiting adipocyte differentiation in the 3T3-L1 cell line, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30:1, 9-14, DOI: 10.3109/14756366.2013.871006
 166. J L Shergis, A L Zhang, W Zhou, C C Xue (2013) *Panax ginseng* in randomized controlled trials: a systematic review. *Phytother Res.* 27(7):949-65. <https://doi.org/10.1002/ptr.4832>.
 167. E Shishtar, J L. Sievenpiper, V Djedovic, A I. Cozma, V Ha, V H. Jayalath, D J. A. Jenkins, S B

- Meija, R J. de Souza, E Jovanovski, V Vuksan (2014) The Effect of Ginseng (The Genus *Panax*) on Glycemic Control: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. PLOS ONE 9 (9): e107391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107391>
168. P-A Mariage, A Hovhannisyan and A G. Panossian (2020) Efficacy of *Panax ginseng* Meyer Herbal Preparation HRG80 in Preventing and Mitigating Stress-Induced Failure of Cognitive Functions in Healthy Subjects: A Pilot, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Trial. Pharmaceuticals 13, 57. <https://doi.org/10.3390/ph13040057>
169. S-Y Park, Y-K Shin, H-T Kim, Y M Kim, D-G Lee, E Hwang, B-G Cho, C S Yin, K-Y Kim, T H Yi (2016) A single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the efficacy and safety of “enzyme-treated red ginseng powder complex (BG11001)” for antiwrinkle and proelasticity in individuals with healthy skin. J Ginseng Res 40: 260e268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgr.2015.08.006>
170. J H Hou, H Shin, K H Jang, C K Park, B Koo, H S, S H Yuk, K Y Lee (2019) Anti - acne properties of hydrophobic fraction of red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and its active components. Phytotherapy Res. 33:584–590. <https://doi.org/10.1002/ptr.6243>
171. J Teitelbaum and S Goudie (2022) An Open-Label, Pilot Trial of HRG80™ Red Ginseng in Chronic Fatigue Syndrome, Fibromyalgia, and Post-Viral Fatigue. Pharmaceuticals 15, 43. <https://doi.org/10.3390/ph15010043>
172. H-G Kim, J-H Cho, S-R Yoo, J-S Lee, J-M Han, N-H Lee, Y-C Ahn, C-G Son (2013) Antifatigue Effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. PLOS ONE 8(4): e61271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061271>
173. E Jovanovski, E A. Bateman, J Bhardwaj, C Fairgrieve, I Mucalo, A L. Jenkins, V Vuksan (2014) Effect of Rg3-enriched Korean red ginseng (*Panax ginseng*) on arterial stiffness and blood pressure in healthy individuals: a randomized controlled trial. J American Soci of Hypertension 8(8) 537–541. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jash.2014.04.004>
174. E Jovanovski, V Peeva, J L. Sievenpiper, A L. Jenkins, L Desouza, D Rahelic, M-K Sung & V Vuksan (2014) Modulation of Endothelial Function by Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and its Components in Healthy Individuals: A Randomized Controlled Trial. Cardiovascular Therapeutics 32: 163–169. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12077>
175. K. Samukawa, H. Yamashita, H. Matsuda, M. Kubo (1995) Simultaneous analysis of ginsenosides of various ginseng radix by HPLC. YAKUGAKU ZASSHI, 115 (3); 241-249. https://doi.org/10.1248/yakushi1947.115.3_241
176. YC. Zhang, G Li, C. Jiang, B. Yang, HJ. Yang, HY. Xu, LQ. Huang (2014) Tissue-Specific Distribution of Ginsenosides in Different Aged Ginseng and Antioxidant Activity of Ginseng Leaf. Molecules 19;17381-17399. <https://doi.org/10.3390/molecules191117381>
177. OJ Kang, JS Kim (2016) Comparison of Ginsenoside Contents in Different Parts of Korean

- Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Prev. Nutr. Food Sci.21(4):389-392. <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.4.389>
178. W Shi, Y Wang, J Li, H Zhang, L Ding (2007) Investigation of ginsenosides in different parts and ages of *Panax ginseng*. Food Chem. 102: 664-668. doi:10.1016/j.foodchem.2006.05.053
 179. X Li, SJ Kang, JS Han, JS Kim, JE Choi (2009) Effects of Root Diameter Within Different Root Parts on Ginsenoside Composition of Yunpoong Cultivar in *Panax ginseng* C. A. Meyer. Korean J. Medicinal Crop Sci. 17(6) : 452 – 457
 180. JS Han, HS Tak, GS Lee, JS Kim, RJ Woo, JE Choi (2013) Comparison of ginsenoside content and ratio of root tissue according to root age and diameter in *Panax ginseng* C.A. Meyer. Korean J. Medicinal Crop Sci. 21 (5); 342-347. <http://dx.doi.org/10.7783/KJMCS.2013.21.5.342>
 181. X Li, YZ Yan, X Jin, YK Kim, MR Uddin, YB Kim, H Bae, YC Kim, SW Lee, SU Park (2012) Ginsenoside Content in The Leaves and Roots of *Panax ginseng* at Different Ages. Life Science Journal 9(4): 679-683.
 182. MH Lee, H Park, CH Lee (1987) Effect of growth conditions on saponin content and ginsenoside pattern of *Panax ginseng*. Proceedings of the Ginseng society Conference 1987.06a: 89-107
 183. JS Han, HS Tak, GS Lee, JS Kim, JE Choi (2013) Comparison of Ginsenoside Content According to Age and Diameter in *Panax ginseng* C. A. Meyer Cultivated by Direct Seeding. Korean J. Medicinal Crop Sci. 21(3) : 184 – 190. <http://dx.doi.org/10.7783/KJMCS.2013.21.3.184>
 184. Jia GL, Huang LF, Suo FM, Song JY, Xie CX, Sun J(2012). Correlation between ginsenoside contents in *Panax ginseng* roots and ecological factors, and ecological division of ginseng plantation in China. Chinese Journal of Plant Ecology 36(4): 302-312. doi: 10.3724/SP.J.1258.2012.00302
 185. K Kim, Y Um, DH Jeong, HJ Kim, MJ Kim, KS Jeon(2019). The Correlation between Growth Characteristics and Location Environment of Wild-simulated Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). Korean J. Plant Res. 32(5):463-470. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2019.32.5.463>
 186. Han Yu, Jiaxin Zhao, Jian You, Jiangnan Li, Hongyu Ma, Xia Chen (2019) Factors influencing cultivated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) bioactive compounds. PLOS ONE Oct. 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223763>
 187. Y.P. Lim, C.S. Shin, S.J. Lee, Y.N. Youn, J.S. Jo (1993) Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis method for classification and breeding of the Korean ginseng. Proceedings of the Ginseng society Conference 1993.09a: 138-142
 188. Y.N. Zhuravlev, O.G. Koren, G.D. Reunova, T.I. Muzarok, T.Y. Gorpenchenko, I.L. Kats, Y.A. Khrolenko (2008) *Panax ginseng* natural populations: their past, current state and perspectives. Acta. Pharmacol. Sin 29(9): 1127-1136. <http://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00866.x>
 189. JW Lee, YC Kim, IH Hyun, AY Seo, JH Lee, OK Kim, DY Hyun, SW Cha, KH Bang, JH Cho (2011) Development of an ISSR-Derived SCAR Marker in Korean Ginseng Cultivars (*Panax*

- ginseng* C. A. Meyer). *J. Ginseng Res.* Vol. 35, No. 1, 52-59. DOI:10.5142/jgr.2011.35.1.052
190. K Kim, SC Lee, J Lee, HO Lee, HJ Joh, NH Kim, HS Park, TJ Yang (2015) Comprehensive Survey of Genetic Diversity in Chloroplast Genomes and 45S nrDNAs within *Panax ginseng* Species. *PLOS ONE* 10(6): e0117159. doi:10.1371/journal.pone.0117159
 191. NH Kim, HI Choi, IO Ahn, TJ Yang (2012) EST-SSR Marker Sets for Practical Authentication of All Nine Registered Ginseng Cultivars in Korea. *J Ginseng Res.* 36(3): 298-307. <http://dx.doi.org/10.5142/jgr.2012.36.3.298>
 192. Y Um, ML Jin, OT Kim, YC Kim, SC Kim, SW Cha, KW Chung, S Kim, CM Chung, Y Lee (2016) Identification of Korean ginseng (*Panax ginseng*) cultivars using simple sequence repeat markers. *Plant Breed Biotech* 4(1): 71-78. <http://dx.doi.org/10.9787/PBB.2016.4.1.71>
 193. H An, JH Park, CE Hong, S Raveendar, Y Lee, IH Jo, JW Chung (2017) Genetic diversity and population structure of Chinese ginseng accessions using SSR markers. *J Plant Biotechnol* 44: 312-319. <https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.3.312>
 194. JU Kim, YC Kim, DH Kim, JW Lee, KH Bang, DY Hyun, MH Jang, BJ Seong, GH Park, YJ Yoon, IH Jo (2021) New Korean Ginseng Cultivar ‘Cheonmyeong’ with High Yield and Rusty Root Tolerance. *Hortic Sci Technol* 28: 132-140. <https://doi.org/10.7235/HORT.20210012>
 195. K. Samukawa, H. Yamashita, H. Matsuda, M. Kubo (1995) Simultaneous analysis of saponins in Ginseng Radix by high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 43(1); 137-141. <https://doi.org/10.1248/cpb.43.137>
 196. N. Nishimoto, S. Masaki, S. Hayashi, T. Takemoto, T. Hayashi, N. Tsuji (1986) Analysis of Dammrane-Type saponins (I) high performance liquid chromatographic method for determination of ginsenosides in *Panax ginseng*. *Shoyakugaku Zasshi* 40(3); 345-351.
 197. BS. Sun, LJ. Gu, ZM. Fang, CY. Wang, ZWang, MR. Lee, Z Li, JJ. Li, CK. Sung (2009) Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC–ELSD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50; 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.025>
 198. Y. Wang, JY. Pan, XY. Xiao, RC. Lin, YY. Cheng (2006) Simultaneous Determination of Ginsenosides in *Panax ginseng* with Different Growth Ages Using High-performance Liquid Chromatography–mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* 17; 424–430. <https://doi.org/10.1002/pca.944>
 199. JW. Lee, BR. Choi, YC. Kim, DJ. Choi, YS. Lee, GS Kim, NI Baek, SY Kim, DYg Lee (2017) Comprehensive Profiling and Quantification of Ginsenosides in the Root, Stem, Leaf, and Berry of *Panax ginseng* by UPLC-QTOF/MS. *Molecules* 22;2147. <https://doi.org/10.3390/molecules22122147>
 200. Zhang J-J, Su H, Zhang L, Liao B-S, Xiao S-M, Dong L-L, Hu Z-G, Wang P, Li X-W, Huang Z-H, et al. Comprehensive Characterization for Ginsenosides Biosynthesis in Ginseng Root by Integration Analysis of Chemical and Transcriptome. *Molecules.* 2017; 22(6):889.

<https://doi.org/10.3390/molecules22060889>

201. J Wang, WY Gao, J Zhang, BM Zuo, LM Zhang, LQ Huang (2012) Advances in study of ginsenoside biosynthesis pathway in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Acta Physiol Plant* 34; 397-403. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0844-3>
202. H Zang, S Abid, JC Ahn, R Mathiyalagan, YJ Kim, DC Yang, Y Wang (2020) Characteristics of *Panax ginseng* Cultivars in Korea and China. *Molecules* 25: 2635. <https://doi.org/10.3390/molecules25112635>
203. H. Shim, N. E. Waminal, H. H. Kim, TJ Yang (2021) Dynamic evolution of *Panax* species. *Genes & Genomics* 43:209–215. <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01047-6>
204. FX Shi, MR Li, YL Li, P Jiang, C Zhang, YZ Pan, B Liu, HX Xiao, LF Li (2015) The impacts of polyploidy, geographic and ecological isolations on the diversification of *Panax* (Araliaceae). *BMC Plant Biology* 15: 297. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0669-0>
205. Z Liu, CZ Wang, XY Zhu, JY Wan, J Zhang, W Li, CC Ruan, CS Yuan (2017) Dynamic Changes in Neutral and Acidic Ginsenosides with Different Cultivation Ages and Harvest Seasons: Identification of Chemical Characteristics for *Panax ginseng* Quality Control. *Molecules* 22: 734. <https://doi.org/10.3390/molecules22050734>
206. R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
207. Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
208. Peakall, R. and Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>