

200/0440

平成13年度厚生科学研究費補助金
(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

薬用生物資源の種子保存法確立における 研究基盤整備に関する総合的研究

平成13年度総括・分担研究報告書

平成14年3月

主任研究者 関田節子

目 次

I. 総括研究報告	
薬用生物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に 関する総合的研究	
関田 節子	—————1
II. 分担研究報告	
1. GAP に関する研究	
佐竹 元吉	—————13
2. 種子貯蔵庫の活用に関する研究	
瀧野 裕之	—————25
3. 種子の収集と寒冷地植物の栽培保存に関する研究	
柴田 敏郎	—————31
4. 種子の収集と亜熱帯植物の栽培保存に関する研究	
香月 茂樹	—————40
5. 種子の収集と熱帯植物の栽培保存に関する研究	
飯田 修	—————55
6. 種子の収集と温帯植物の栽培保存に関する研究	
酒井 英二	—————76
7. 遺伝子解析と導入遺伝子による品種改良に関する研究	
正山 征洋	—————80
8. 遺伝子解析による品質特性に関する研究	
水上 元	—————83
9. 自然環境における栽培保存法の研究	
神田 博史	—————89
10. カルス培養等による保存方法の研究	
下村 講一郎	—————93

協力報告

11. 栽培によるマオウの成分変動と超低温保存に関する研究 中根 孝久	—————96
12. 中国の薬用植物の導入と栽培法の研究 御影 雅幸	—————103
13. ネパール, 東南アジアの薬用植物の導入と栽培法の研究 渡辺 高志	—————105
14. ブラジルの薬用植物の導入と栽培法の研究 高野 昭人	—————136
15. バイオ技術による保存法の研究 平岡 昇	—————143
16. ヨーロッパの薬用植物の導入と栽培法の研究 後藤 勝美	—————145
研究成果の刊行に関する一覧表	—————148

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

薬用生物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に関する総合的研究

主任研究者 関田節子 国立医薬品食品衛生研究所
筑波薬用植物栽培試験場長

薬用生物資源の保存法の確立を目的に、種子の長期保存条件と保存による影響、栄養繁殖体の保存法としてマオウの繁殖栽培と栽培期間中の成分変動、組織培養法を用いた冷蔵ならびに超低温保存法の構築と保存による影響、遺伝子解析による薬用植物の特性・同定法の確立、薬草園の保存植物ならびに周辺の野生薬用植物の調査、GAP 確立における検討を行った。

後藤勝美（京都薬科大学薬草園助手）

分担研究者

佐竹元吉（日本薬剤師研修センター）
刈野裕之（国立衛研・筑波薬用植物栽培試験場）
柴田敏郎（国立衛研・北海道薬用植物栽培試験場）、
香月茂樹（国立衛研・種子島薬用植物栽培試験場）、
飯田 修（国立衛研・伊豆薬用植物栽培試験場）、
酒井英二（岐阜薬科大学）、
正山征洋（九州大学薬学部）、
水上 元（名古屋市立大学薬学部）
神田博史（広島大学医学部附属植物園）
下村講一郎（東洋大学生命科学部）
協力研究者
高橋真理衣（国立衛研・筑波薬用植物栽培試験場研究支援員）
中根孝久（国立衛研・筑波薬用植物栽培試験場研究員）
御影雅幸（金沢大学薬学部）
渡辺 高志（北里大学薬学部 助手）
高野昭人（昭和薬科大学 講師）
平岡 昇（新潟薬科大学教授）

1) 研究目的

薬用植物資源は、生薬としてそのもの自体が医療に重要な位置を占めているが、同時に新薬のシーズとして医薬品開発に大きく貢献している。現在、市場にある医薬品の 1/4～1/3 が天然資源に由来するもので、これらの資源に含有される成分の多様性と個々の化合物の構造の新奇性は新薬開発に欠かせないものである。近年、合成薬中心の医療体制をとってきた米国が植物を中心とした天然薬物の有用性を再評価し、1994 年に Dietary Supplement を法制化してからは自国の薬用植物だけではなく中国の生薬にも強い関心を持つようになり、東南アジアや南米産薬用植物はもとより、最近では日本産薬用植物から新薬開発の目的で極めて熱心に研究を進めている。一方、我が国は生薬の 90%以上を中国、東南アジ

ア、中近東、南米の国々から輸入している。しかし、一昨年、昨年と続けて、中国が砂漠化防止の名目で麻黄、甘草の輸出を禁止したように、天然資源の保護のために輸出を禁止した場合には自国で対応する必要があり、種子の収集、保存が重要であることは明白である。導入した種子や栄養体は、種毎に保存方法の適否によって発芽能力や成分の生合成能を失うため、より優れた条件を開発することが重要である。更に、これらの条件を検証するためには化学的遺伝子学的手段により有効性と安全性を常に確認することが必須である。数年前よりヨーロッパ諸国は薬用植物栽培の安全規格（Good Agriculture Practice: GAP）を提唱し、WHO が中国、日本に呼びかけてその作成を進めている。我が国では 10 年前から当時の厚生省が国立衛生試験所生薬部、薬用植物栽培試験場 5 場、地方自治体の薬草園と共に「薬用植物の品質評価・栽培指針」を作成してきた。そこで、これを基礎に GAP のに本案を作成するための研究を行う。これらの下に管理された有用資源は、生薬、生薬製剤（漢方製剤）として、また、新薬開発の資源として医療に大きく貢献することが期待される。同時に、これらの研究を通じて知的財産を保護するための新たな基盤が築けるものと期待される。

2) 研究方法

1. 種子の長期保存法

種子を長期に渡り保存するための条件を確立することを目的として、ウツボグサ、オミナエシ、キンミズヒキ、カラスウリ、オトコエシについて温度（-80℃、-20℃、-1℃、10℃、20℃）と容器（スチロール製缶、スチロール製瓶、ビニール袋、紙袋）で保存し、採集直後および 5～10 年間保存後の種子の発芽試験を国際種子検査規定に準拠した方法で発芽試験を行なった。

発芽試験法

発芽床は 8.5 (W) × 15.8 (L) × 3.2 (H) cm の角形スチロール製バットに蒸留水または催芽処理溶液で湿らせたろ紙 2 枚を敷いた。

発芽チャンバーの条件は温度 15℃、12 時間の明暗サイクルとした。試験期間中、発芽床のろ紙に蒸留水または催芽処理溶液を適宜加えた。下記の催芽処理法により処理した種子 30 粒を 1 区として発芽床に播種し、経時的に発根と発芽を観察した。

催芽処理法

催芽処理 1：播種前に湿った清浄な砂（30～50 mesh）に種子を埋設し、密閉容器中、10℃で 2 週間放置する。

催芽処理 2：播種前に種子を蒸留水で十分に洗浄する。

催芽処理 3：播種前に発芽床を 0.05% ジベレリン酸溶液で湿らせた。

催芽処理 4：播種前に発芽床を 0.2% 硝酸カリウム溶液で湿らせた。なお、コントロールとして無処理の種子を播種した。

2. 栄養繁殖性植物の長期保存方法

栄養繁殖性を長期間保存する条件を確立するために、植え付け方法、光、温度、植え替え必要時期等の検討を開始した。昨年度に引き続き、筑波薬用植物栽培試験場の保存株を元に北海道、種子島に配布し栽培実験を行っているマオウ種苗の生育度と成分を測定した。種子については保存方法・発芽条件を、苗については光条件、温度条件、生態等を検討する。また、サラシナショウマ、トウキ、日本産オウレン、エンゴサク、中国のオウレン、ヨーロッパのラクツカリユウムソウ、キバナバラモンジン、サントリソウ、ピロードモウズイカ、カミツレ、マリアアザミ、パラマツなど24種のブラジル薬用植物、ネパール薬用植物について栽培法を検討した。

3. 組織培養法を用いた保存法に関する研究

培養シュートの温度を 5、10、15°C の3段階、各温度について明所と暗所の合計6処理区で冷蔵保存が進行中であるハマボウフウおよびチョウセンアサガオ属植物について、冷蔵株から再現した植物の戸外での栽培を引き続き行い、形態を調査し、根茎に含まれる有効アルカロイド成分のヒヨスチアミンとスコボラミンをGC法によって分析した。ムラサキの培養シュート、ジャコウの不定胚の超低温保存の条件を検討し、保存前後の成分変動を、シコニンについてはHPLCで、ジャコウ成分についてはGC-MSで分析

した。

4. 栽培試験場、薬草園の保存植物ならびに周辺の野生薬用植物の調査

2001年9月～11月にかけて茨城県、栃木県の野生薬用植物の種子、苗を採取し、学名の同定後、試験条件にそって保存をおこなった。

知里真志保の分類アイヌ語辞典植物篇に記載されている薬用及び食用植物のリストを作成し、植物の導入・植栽を行なった。2001年8月25日・26日に中川郡美深町松山湿原における野生薬用植物の分布調査を実施した。

2001年初夏～晩秋に伊豆半島、特に南端地域に自生する野生植物の種子採取を行った。また、2001年10～11月、伊豆半島南端南伊豆町走雲峡（同町加納～石廊崎線）全長約6kmのうち、海側約2kmの道路沿い及びその周辺に分布する植物の調査を行った。

2001年9～10月に種子島の野生薬用植物の分布調査と種子採取を実施した。

5. 遺伝子解析による薬用植物の特性に関する研究

名古屋市立大学薬学部所蔵の標本、北海道医療大学薬学部吉田尚三氏から送付されたネパール産マオウ (*E. paniculata* とラベルされているもの) および国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場所有のモンゴル産マオウ標本（種名は付されていない）を用いて遺伝子解析を行った。

各サンプルの約40mgを粉末にし、QuiagenのDNeasy Plant Miniキットを用いてDNAを調製した。

これまでの研究結果に基づいて、ch1B遺伝子の5'側約350bpを増幅するために3種類のプライマーを設計した。25 μL

あたりプライマー各 10 pmole と dNTP 50 nmole、Taq DNA polymerase 0.5 unit、鋳型 DNA 10 ng を含むように PCR 混合液を調製し、94°C-30 秒、55°C-30 秒、72°C-30 秒の反応を 30 サイクル繰り返し、72°C-30 秒の反応を 30 サイクル繰り返した。反応産物は、2%アガロースゲル電気泳動によって確認した。

PCR 後、蛍光シーケンサーにより塩基配列を解読した。なお、シーケンスは通常は一方の鎖について実施し、必要に応じて他方の鎖もシーケンスした。

PCR 反応液 5 μ L に *Bcl*I 1 μ L(10 units) および 10X 反応バッファー 1 μ L を加え、37°C で 60 分間インキュベートした後、切断の有無を 2%アガロースゲル電気泳動によって確認した。

一方、漢方処方に最も頻繁に配合されるニンジン（人参）、サイコ（柴胡）、カンゾウ（甘草）、ダイオウ（大黄）、シヤクヤク（芍薬）等の活性成分であるトリテルペン系配糖体やアントラキノン配糖体に対する超高感度の定量系を確立するために、成分の中から指標化合物を選んで、このキャリアタンパクをマウスに免疫し、ミエローマ細胞と融合し、モノクローナル抗体（Mab）産生ハイブリドーマをスクリーニング、クローニングする。選抜マイブリドーマを培養して抗センノシド A-MAb を得る。このものを用いて ELISA を構築した。

6. GAP 作成の検討

GAP 作成のために、薬用植物栽培と品質評価指針の各項目を横断的に検討し、

それらの内容を要約し、安全性の面から総合的にまとめ上げ、GAP 素案を作成する。

C. 研究結果

種子の保存法を検討した結果、ウツボグサの新鮮種子は 87%、保存期間 8 年 5 ヶ月では、10°C 真空で 89%、-1°C 真空で 91%、-20°C 真空で 92% であった。

オミナエシの新鮮種子は 48%、保存期間 7 年 3 ヶ月では、10°C 真空で 37%、-1°C 真空で 46%、-20°C 真空で 33% であった。

キンミズヒキの新鮮種子は 95%、保存期間 6 年 9 ヶ月では、10°C 真空で 92%、-1°C 真空で 95%、-20°C 真空で 91% であった。

カラスウリの新鮮種子は 80%、保存期間 9 年 9 ヶ月では、10°C 真空で 2.2%、-1°C 真空で 11%、-20°C 真空で 4.5% であった。

オトコエシの新鮮種子は、74% 保存期間 4 年 9 ヶ月では、10°C 真空で 31%、-1°C 真空で 32%、-20°C 真空で 30% であった。

サラシナショウマの新鮮種子の発根試験では、無処理 50% なのに対して、催芽処理 1 で 33%、催芽処理 2 で 17%、催芽処理 3 で 3%、催芽処理 4 で 13% であった。

2. 栄養繁殖性植物の長期保存方法

北海道でのマオウの生育については、3 年間の生育期間中、雪の下で越冬した株は地上部がすべて枯れ、春にシュートが新たに萌芽することが繰り返し観察された。草丈は、新たに伸長したシュートの生育が 7 月の時点では前年秋に比べ劣っ

たが秋には回復し、年数を経るに従って増加した。茎の径も草丈とほぼ同様に推移した。茎数は個体による変異が大きく、経年による顕著な増加傾向は認められなかった。また、地上部の乾物重は、8月から10月にかけて緩やかに増加し、以後生育が停止する傾向が認められた。一方、定植時の株の大きさの影響は、2年目までは顕著に認められ、大苗が優れた生育を示したが、3年目ではほぼ消失することが明らかとなった。3年目株における1株当たり乾物重は20~50gであった。地上部の無機成分含有率は、窒素は3年間を通じ変化が少なく、2.4%前後で推移した。カリウムは、季節、経年による変動が少ない傾向であった。一方、リン酸は9月にピークに達し、以後急速に低下する傾向が認められ、また、年数を経るにつれて増加する傾向も認められた。加里は8月に高く、以後急速に低下する傾向が認められ、また、経年の増加は認められなかった。

伊豆においては、マオウの根挿し苗の調製法の比較をしたところ、横走根茎5cm、2cm及び無しの苗の活着率は、それぞれ65、43、56%であった。定植苗は全て活着した。地上部乾燥重量は大苗では9月植えが最も大きく、11月植えが最も小さく、晩秋植えでは生育がやや劣った。小苗では9月植えが最も大きく、以下定植時期が遅くなるにつれて小さかった。なお、1株当たりの地上部最高乾燥重量は209.33gであった。大苗、小苗の比較では、大苗での収穫重量が大きかった。全ての株で、木質部は2gにみたく、除外せずとも局方の基準値内であった。

マオウの3年生株については、北海道、筑波、種子島いずれの地区でも秋期に成

分量が低くなる傾向が認められ、個体差はみられるが、種子島の一部を除いて局方の基準値である0.7%を充たす結果を得た。なお、伊豆については成分は現在分析中である。

3. 組織培養法を用いた保存法に関する研究

不定胚、培養シュートを材料に条件を確立した組織培養系及び超低温保存後の組織培養物の薬用成分を未保存対照群と比較したところ、ハシリドコロは、すべての項目について対照群との間に有意な差は認められなかった。ムラサキの超低温保存では、0℃でのPVS2処理時間を20~90分に設定し、その後、LNで直ちに凍結し、一定期間LNに保存後、解凍、洗浄を行い1ヶ月後の再生率を調べた。その結果、最適処理時間は60分で再生率は約60%であった。また、光の影響は、再培養を明所と暗所とで比較した結果、1ヶ月後の再生率はどちらも約56%であるが、2ヶ月後の再生率は明所が約39%、暗所が約44%と暗所の方が若干良好であった。HPLC分析の結果、超低温保存後のシュートおよび無処理のものにおいても、同一の保持時間を示す5本のピークが検出され、シコニン誘導体組成に変化は認められなかった。赤色色素をシコニンに変換しTLC分析した結果、シコニン標品と同一位置にスポットが得られた。ビャクダンの再生率は、0.1Mショ糖を添加した区では、ガラス化液処理時間に関

ならず、不定胚の再生が認められたが、グリセリンを添加した区では、全く再生が認められないものがあった。再生後の不定胚の生育が良好だった前培養培地—ガラス化液処理時間（分）は、0.1M ショ糖+1M グリセリン—20 分であった。超低温保存した不定胚からは、正常な植物体が分化し、GC-MS 分析の結果、超低温保存後の不定胚エキスは保存前のものと同一 GC パターンを示し、MS 分析結果も同一パターンのピークが検出された。

4. 栽培試験場、薬草園の保存植物ならびに周辺の野生薬用植物の調査

分類アイヌ語辞典植物篇に記載のある約 400 種類の植物の内、キハダ、トリカブト類、ギョウジャニンニク等代表的な有用植物 100 種類の生きた植物株を導入した。中川郡美深町松山湿原における野生植物の分布調査を実施した結果、シダ類ではオシダ、コタニワタリ等 10 科 21 属 41 種、種子植物ではエゾトリカブト、イケマ、ゲンノショウコ等 70 科 176 属 243 種、合計で 80 科 197 属 284 種を確認し、リストとして記載した。

伊豆半島南部を中心に 63 科、170 種を採種した。走雲峡の植物については、シダ植物 16 科、31 種、裸子植物 5 科、5 種、被子植物・単子葉 7 科、27 種、同・双子葉 65 科 204 種を確認した。

種子島は、生物分布の区分線である渡瀬線に接する場所に位置し、亜熱帯に近い暖温帯という環境に属し、露地において温帯性（本土的）植物と熱帯・亜熱帯性植物が生育している状況が見られ、高等植物 141 科 795 種（内栽培種 311 種）について調査できた。これらのうち、アケビ・ヤクタネゴヨウのように、自生種

で個体が地理的に孤立し、自家不和合その他の原因のため結実不良の植物があった。ハマナス・マンゴー・リョウキョウ等は、栽培種において、よく開花するものの、結実しないものや結実歩合が低いものが見られた。また、ヒロハヤブニッケイ・カシワ×コナラと推定されるような種間雑種と思われる個体があった。

5. 遺伝子解析による薬用植物の特性に関する研究

これまでの研究から、*Ephedra* 属植物の *chlB* シークエンスタイプは、5'側約 350bp を解読すれば特定できることが明らかであった。また、この領域内の polymorphic site には制限酵素 *Bcl* I の認識サイトが含まれており、type 1 では *Bcl* I によって 270bp と 80bp の 2 つの断片に切断されるのに対して、他の type ではこのような切断を受けないことも示されていた。

そこで、まずこの 5'側 350bp の領域を PCR で増幅してその塩基配列を解析した。さく葉標本と生薬標本について DNA の調製を行ったところいずれの検体からも DNA の調製は可能であった。これにより PCR を行ったところ、75% の検体で増幅産物の生成を確認できた。増幅産物を得られなかったサンプルは、さく葉標本で 40%、生薬標本では 12% であり、さく葉標本のほうが PCR 増幅に適した鋳型 DNA の調製が難しいようであった。これらについては、2nd PCR の実施、鋳型 DNA の精製、他の DNA 調製法の検討などを行う必要がある。今後、DNA 鑑別法

が実用化されると多数の検体を短時間で解析する必要が生じるものと予想される。そこで、より簡便なプロトコールを作成した。

茎の断面形、髓の有無、皮層部の維管束の有無と数、表皮のクチクラ層の厚さなどを指標にして、その内部構造から *E. intermedia*、*E. equisetina*、*E. sinica* と推定できる標本を選んだ。これらについて、その 5'側 350bp の塩基配列を解析した。その結果、内部形態学的に *E. sinica* と鑑定された標本のシーケンスはすべて type 1 を、同じく *E. equisetina* と鑑定された標本は、すべて type 3 のシーケンスを示した。一方、内部形態学的に *E. intermedia* と鑑別された標本は、*chlB* の配列はすべて type 2 であった。type 3 については、*E. distachya* ではなく、*E. intermedia* の配列であるとする結果が得られた。*E. distachya* の取り扱いについてはこれまで、色々な議論があり、中国では *E. sinica* に含めて考えられている。日本薬局方でも、麻黄の基原植物としては *E. sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* の 3 種のみを取り上げている。また、昨年度に報告した筑波薬用植物栽培試験場で *E. intermedia* として植栽されている植物も type 2 のシーケンスを示した。今後、*E. distachya* という種の取り扱いについては、*E. sinica* および *E. intermedia* との関係をも含めて検討する必要があるが、一応、現時点では type 2 の配列を示す標本は *E. intermedia* と

考えてよいものと思われる。

以上の結果から、*chlB* 塩基配列の type 1 は *E. sinica*、type 2 は *E. intermedia*、type 3 は *E. equisetina* の配列と一応同定できた。しかしながら、これらの結論は *chlB* 遺伝子の 5'側 350bp の配列に基づいたものであり、今後 *chlB* 遺伝子の全長について配列を決定することが必要である。

作成した抗ペオニフロリン、抗グリチルリチン、抗サイコサポニン a、抗センノシド AMAb を用いてそれぞれの競合的 ELISA を構築した。これらの化合物に対して極めて特異的かつ感度が高く、ng オーダーでの検出定量が可能となった。また、イースタンプロットティングによる 2 重染色により、プロトパナクサジオールをアグリコンとするジンセノシド類は赤系統に染色される。一方プロトパナクサジオールをアグリコンとするサポニン類は青系統に染色される。従って発色によりアグリコンの構造が判り、Rf 値から糖の数が予測される。また、ダンマラン系統のサポニンであるかどうかの判定も容易になされる。

6. GAP 作成の検討

薬用植物の栽培方法とその生薬の品質評価に関する指針案 (GOOD AGRICULTURAL PRACTICE FOR MEDICINAL PLANTS IN JAPAN , Draft) について、総論とオウレン、トウキ、ミシマサイコ、ウコンの各論について安全性を主体にまとめあげた。

D. 考察

昨年度に引き続き、薬用生物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に関する総合的研究を行い、それぞれの保存方法の条件設定とその有効性について発芽率、発根率、再生率、成分の変動を検討した。サラシナショウマの発根には日数がかかり、さらに、日数のバラつきが大きい。また、子葉の展開には発根後さらに時間を要することが分かった。本種子は上部胚軸休眠の可能性があり、子葉の展開を促進する条件についての検討が必要であると考えられる。5~10年間の保存後でも、発芽率がほぼ維持されるもの（キンミズヒキ、ウツボグサ）と、発芽率が著しく減少するもの（カラスウリ、オトコエシ）があることがわかった。また、保存温度によって発芽率に差がでる（オミナエシ、カラスウリ）場合も観察されたことから、各々の種子に対して最適な保存温度、保存期間を検討することが必要であると判断した。したがって、今後も各々の種子に対して最適な保存温度、保存期間を検討することが必要である。これらのデータの積み重ねにより、現存する種子植物資源の多くを種子として長期間保存し、必要時にはすみやかに個体を再現できることが期待される

マオウの生育について、積雪の多い地域においては、本来常緑植物である本種は地上部がすべて枯れ、春にシュートが新たに萌芽することが繰り返されることが観察され、生育に不利であることが判

明した。草丈は、新たに伸長したシュートの生育が7月の時点では前年秋に比べ劣ったが秋には回復し、年数を経るに従って増加した。気温の点では中国のマオウの自生地と似たような環境にあるので今後は積雪対策が必要となる。暖かい地域では、根挿し苗では横走根茎を長く付けた方が活着率が高くなるが、横走根茎を付けずとも、十分活着はする。その際、茎は太く、長い方が有利である。圃場への定植は、9月~11月、2~4月のいずれの時期でも可能である。従来、温暖な地域ではマオウの生育は困難と考えられていたが、現在の状況では成分的にも不利な点は認められていず、増殖可能と判断される。

種子による保存が適当でない薬用植物の保存法として、無菌培養苗を試験管内で1~2年間移植しないで維持する方法を確立するための検討をしている。また、不定胚の超低温保存についても検討を行い、これまで実用的な超低温保存法は報告されていない熱帯性薬木においてもガラス化法による超低温保存が可能であることが判明した。さらに、これらの成分を分析した結果、保存前後で変化がないことを確認したが、再生率の向上が今後の課題と考えられた。

野生植物については、地理的に孤立していたり自家不和合その他の原因のため結実不良の植物（アケビ、ヤクタネゴヨウ）については異系統のものを早急に隣植するなどの方策を講じる必要がある。

亜熱帯、熱帯地方の植物も必ずしも日照不足になるわけではなく、高木が多く、樹林下は日中でも薄暗い自生地のアマゾ

ン熱帯林の環境下に自生する植物では、適応可能な環境の選定により増殖可能であり、次世代の確保が可能な種が以外に多く存在することが確認できた。

熱帯アジア原産とされるもので、新大陸に帰化した薬用植物は日本国内にも分布するものがある。この種子をブラジル・アマゾンで入手し温室内で栽培してみたところ、確実に成長し、開花結実し、種子を収穫することができた。しかし、開花結実した株の中で3株を二年前から屋外の圃場で試験栽培しているが、今のところ、葉の成長は著しく、植物体としては大きくなるものの、開花結実はせず、秋を迎え、地上部は枯死することを繰り返している。同じ植物であっても、長い年月を経て世界中に伝播されているために、生育地の気象条件に適応した性質を後天的に獲得したと考えられる。これらの現象は、分布域の広い薬用植物について多様な性質を持った遺伝資源を確保するためには、世界各地のさまざまな分布域からのサンプルの採取と保存が必要であることを示唆している。

前年度に指摘したように遺伝子の解明法を用いた品質確保の方法の検討では、まず対象となる材料の種を正しく鑑別、同定することが不可欠な前提である。このためには、外部・内部形態が種鑑別の指標として主として用いられてきているが、これらの指標は生物の発育段階や生育環境によって変化するため、種鑑別が困難をとまなう植物も多数存在している。

生物の遺伝子型を DNA の塩基配列として直接解析することは、生物の生育環境や発育段階、用いる器官や組織の種類を受けないなどの優れた特色を有している。また、分類形質は客観的なデータとして得られるとともに、その解釈は一般的に一義的であり、さらに一度プロトコールを確立すれば、その実施には特殊な熟練を要せず、ある程度の自動化も可能であるという利点も存在している。そこで、*Ephedra* 属植物を研究対象として、*chlB* 遺伝子の塩基配列に基づく種鑑別の可能性について検討している。今回の DNA 調製法では、約 25% の標本で PCR 増幅産物を得ることができなかった。これらの標本について、DNA の精製法を検討するとともに、どのような標本からでも確実にかつ簡便に PCR-grade の DNA が調製できる方法を確立することが必要である。また、今回検討したのは *chlB* 遺伝子の 5'側 350bp の領域のみである。残された領域の塩基配列の解読が必要である。

含有成分のモノクローナル抗体 (MAb) の作製により、新しい超高感度の定量系が確立された。

6. GAP 作成の検討

薬用植物の栽培技術と種苗の品質に関して、約 14 年がかりで、53 品目が完成した。これらをまとめて、医薬品として安全で有効なものを安定して供給するための基準を作成した。この基準は「薬用植物の栽培及び調製加工に関する基準」(GOOD

AGRICULTURAL PRACTICE FOR MEDICINAL PLANTS IN JAPAN, 略称 GAP) として、まとめ上げた。医薬品として使われる生薬原料が品質面で確保できれば、有効性に関する研究が可能になったと思われる。このようなものが、ヨーロッパと中国だけではなく、広く世界で共通に利用できれば、安心して生薬が流通できるものと思われる。今年度は品質の安全性を中真に検討した。今後は品質の有効性を取り上げて検討を進める。

E. 結論

生薬の基原植物のうち、サラシナショウマ、ウツボグサ、等について発芽試験と発根試験を行い、サラシナショウマの発根試験にはかなり日数がかかること、さらに日数のバラつきが大きいことが観察された。また、サラシナショウマの圃場での栽培では寒冷紗 (50% 遮光) の使用により、健全な生育が可能なることを確認した。

保存後の発芽試験において種によっては発芽率がほぼ維持されるものと、著しく減少するものがあった。また、保存温度によって発芽率に差がでる場合も観察された。

今後の課題として、圃場での各種条件にして栽培したサラシナショウマを、各種指標成分をもとに成分の分析を行う予定である。また、さらに栽培条件の検討を行い、生薬ショウマの国内生産が可能なる条件を探る。

マオウの国内栽培では、積雪により地上部が枯死するが、翌春にシュートから生育した株の大きさは年数ごとに増加した。温暖な地域では活着率、生育度とも良好であった。成分のエフェドリン量はいずれの地域のものも薬局方の規格値を満たしていた。

培養シュートは冷蔵保存あるいは超低温保存により、保存前後で成分含量等の特性に影響を与えず、有効な保存法と考えられたが、再生率は植物種により大きな差が認められた。

結実期に種子の採取を行った。野生植物の生育環境は減少している。保存林等一見緑地が保存されているような所であっても放置により、下草の環境は荒れている場合が多い。

Ephedra 属植物のさく葉および生薬標本由来の DNA を鋳型として *chlB* 遺伝子を増幅して、その塩基配列を決定する簡便なプロトコルを確立し、内部形態学的な情報と遺伝子塩基配列情報をあわせて検討することにより、*E. sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* を *chlB* 遺伝子の塩基配列に基づいて鑑別できる可能性があることを示した。

本研究で開発したイースタンブロッティング法と ELISA により簡便で確実な鑑定が可能となった。特に 2 種のモノクローナル抗体を用いた 2 重染色により、アグリコン及び糖鎖の推測が可能となり、配糖体の構造を容易に類推することが可能となった。芍薬、人参、柴胡、大黄等配合漢方製剤中の活性を持つマーカ-

化合物をアッセイすることにより原料の品質管理が可能なことを示した。また、極く濃度の低いサンプルに付いてはアフィニティーカラムで濃縮後 ELISA で定量が可能なことを明らかにした。また、甘草の場合グリチルリチンが医薬品であるので、その血中濃度の測定を行い、迅速・簡便に測定可能なことを明らかにした。

世界の取り組みを拝啓に GAP の作成を目指して総論と生薬の一部の各論を作成した。

F. 研究発表

1) 論文発表

1) 佐竹元吉, 川原信夫, 飯田修ら; 薬用植物栽培指針・生薬品質評価, part9 薬事日報社(2001)

2) 柴田敏郎, 吉田清人, 鈴木邦輝, 本間尚治郎: 「第2回薬用植物に関するワークショップー北方先住民族の有用植物とその利用法についてー」記録集, 北国研究集録, 5, 1-44 (2001) .

3) 柴田敏郎, 成毛 哲也, 鈴木邦輝, 三浦 忠一, 本間 尚治郎: 「第3回薬用植物に関するワークショップー北方先住民族の有用植物とその利用法について、その2ー」記録集, 北国研究集録, 6, (印刷中) .

4) W.Put al un, H.Tanaka, Y.Shoyama, TLC immunostaining of steroidal alkaloid glycosides,

Encyclo.Chromat og., 849-851(2001)

5) H.Tanaka, Y.Shoyama, Forskolin purification usingan immunoaffinity column combined with an anti-forskolin monoclonal antibody, Encyclo. Chromatog., 352-354(2001)

6) S.J.Shan, H.Tanaka, J.Hayashi, Y.Shoyama, Western blotting of glycyrrhetic acid glucuronides using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody, L.Liq.Chrom.Rel.Technol., 24(10), 1491-1499(2001)

7) N.Fukuda, H.Tanaka, Y.Shoyama, Double staining of ginsenosides by western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies, Biol.Pharm.Bull., 24(10), 1157-1160(2001)

8) H.Tanaka, L.J.Xan, S.Morimoto, Y.Shoyama, R.Isobe, K.Nojima, Direct determination of naturally occurring biologically active compound- serum albumin conjugate by MALDI- Mass, Spectroscopy, 15, 1-18(2001)

- 9) O. Morinaga, S. Nakajima, H. Tanaka, Y. Shoyama, Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA, *Analyst*, 126, 1372-1376(2001)
- 10) S.J. Shan, H. Tanaka, Y. Shoyama, Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and a new eastern blotting for glucuronides of glycyrrhetic acid, *Anal. Chem.*, 73 (24), 5784-5790(2001)
- 11) W. Putalun, H. Tanaka, Y. Shoyama, Distribution of solasodine glycosides in *Solanum khasianum* fruiting stage determined by ELISA and western blotting, *Natural Med.*, 55(5), 243-246(2001)

2. 学会発表

- 1) 中根孝久, 関田節子, 佐竹元吉, 細川敬三, 畠山好雄, 柴田敏郎, 飯田 修, 香月茂樹: マオウ科 *Ephedraceae* 植物のエフェドリン含量 II, -国内栽培試験種及び国外野生種-, 日本生薬学会, 金沢, 9月(2001)

G. 知的所有権の取得状況

なし

薬用植物の栽培及び調製加工に関する基準に関する研究
Study on GOOD AGRICULTURAL PRACTICE FOR MEDICINAL PLANTS
IN JAPAN (Draft)

所 属 財団法人 日本薬剤師研修センター

研究者 佐竹元吉

平成13年4月1日～平成14年3月31日

薬用植物の生産のための栽培方法が個々の栽培者に全面的に依存してきたが、栽培が大型化し、栽培品種の数の増加から、安全性及び有効性を保障するために、栽培方法の基準が重要になってきた。厚生省は薬用植物栽培と品質評価指針を個々の薬用植物について約50種類を各論として規定しているが、総論的にはまとめ上げられていなかった。この総論が GAP である。GAP の内容と薬用植物栽培と品質評価指針の関連をまとめ上げた。

1. 研究目的

薬用植物の利用が世界各国で拡大してきているが、これらの薬用植物は野生のものを採集することが多い。一部のものは、古くから栽培されていたが、この20年間に大型の栽培が行なわれたものが多い。しかし、薬用植物の栽培は小規模であったため栽培方法や調製加工の方法が個々に任されてきた。1986年より厚生労働省は薬用植物栽培と品質評価指針の作成を打ち出し、2001年まで、毎年予算化し、研究班を組織した。また、農林水産省は薬用植物の営農への貢献のために、地域振興補助金制度を作り、薬用植物の栽培振興を図った。両省の活動は常に連絡できるように、厚生省の会合には農林水産省畑作振興課の職員がオブザーバー参加を認められた。薬用植物の栽培を安全性の面から総合的に規定する方法（GAP）を策定することを目的とした。

2. 研究方法

GAP 作成のために、薬用植物栽培と品質評価指針の各項目を横断的に検討し、それらの内容を要約し、安全性の面から総合的にまとめ上げ、GAP 素案を作成する。

3. 研究成果

薬用植物の栽培方法とその生薬の品質評価に関する指針案（GOOD AGRICULTURAL PRACTICE FOR MEDICINAL PLANTS IN JAPAN, Draft）をまとめあげた。その内容は以下の通りである。

総論（General Remarks）

生薬の生産はかつては野生植物に頼っていたが、次第に栽培化されるようになってきている。我が国では江戸時代に薬用の栽培が盛んになり、その栽培技術の大部分は失われてしまったが、一部のものは伝承されている。最近、薬用植物の栽培の篤農家及び栽培・品質評価の研

究者との努力で、多くの薬用植物に関して、新しい技術で栽培化に成功し、更にその生産物の品質評価方法も確立されてきている。これらの成果は過去10年に渡りまとめられ「薬用植物栽培指針と品質評価指針」として出版されてきている。

世界の医薬品関連分野では品質の保証が広く要望されている。医薬品の生産に GMP (GOOD MANUFACTURAL PRACTICE : 生産管理のための優良基準)、臨床知見には GCP (GOOD CLINICAL PRACTICE : 臨床知見作成のための優良基準)、医薬品の輸入に関しては GIP (GOOD IMPORT PRACTICE : 輸入に関する優良基準) があり、薬用植物の栽培に関してもその基準作成が話題になってきている。

ヨーロッパ生薬連合会 (EUROPEAN HERBAL INFUSIONS ASSOCIATION) は Code of Good Agricultural Practice (CGAP) の原案を作り、検討が行われている。中国の生薬行政担当者からも GAP に基づく栽培が話題として出されている。

このような世界の動きを受けるものとし、国内には既に完成されている「薬用植物栽培指針と品質評価指針」がある。この指針を GAP として活用することは、世界各国に先んじて、個々の植物に関する記載方法を含む薬用植物栽培基準 (GOOD AGRICULTURAL PRACTICE FOR MEDICINAL PLANTS IN JAPAN, 略称: GAP-MP) を作成する絶好な機会であると思われる。

この GAP-MP は、生薬生産者には、栽培方法、種苗の特性、栽培暦、品質評価法の基準となり、生薬利用者には日本の生薬製剤及び漢方製剤の原料生産が如何に良く管理され、生産され、品質評価されているか等を理解する基準

となるものである。

薬用植物の優良種苗の確保およびこれらの薬用植物の栽培技術指導を目的として、1988年より「薬用植物実態調査、栽培品質評価指針作成等の事業」が開始された。これらの活用が GAP 作成に役に立つと思われる。

薬用植物栽培・品質評価指針は薬用植物の優良種苗の確保およびこれらの薬用植物の栽培技術指導を目的として、1988年より「薬用植物実態調査、栽培品質評価指針作成等の事業」が開始された。原案作成は国内で栽培可能な薬用植物約80種について、国立医薬品食品衛生研究所生薬部および同所各薬用植物栽培試験場を中心として大学薬学部(薬科大学)、薬業界の各専門家および地方自治体の薬用植物担当者が委員となり、一層の品質向上と優良種苗の安定供給を図るための栽培技術の指導に役立つよう、薬用植物ごとに作成しています。

内容はそれぞれの薬用植物について1.植物名、2.利用部位、3.植物の性状、4.生薬の特徴および産地、5.栽培種の特長、6.栽培法、7.生薬の品質評価、8.特性分類表、9.栽培暦、10.資料の順に記載されている。さらに薬用植物の各栽培時期および生薬の調製法に関する写真なども掲載し、薬用植物栽培に初めて取り組む人々にもわかりやすい内容となるよう心掛けた。

日本の漢方・生薬製剤は漢方エキス製剤の出現により飛躍的に発展しており、今後もさらに薬用植物の需要は高まるとと思われる。しかし、一方では輸入量の増大から流通価格が変動し、国内の薬用植物生産農家の減少にも結びついているのが現状であり、優良種苗の確保、野生薬用植物の保護などとともに新しい問題を生みだしている。

このような背景から、将来の薬用植物栽培を予測し、的確な対応をするためには薬用植物の統計、調査を確実にを行い、生産、消費、輸入量の動向を正確に把握することが必須であるとともに、今回紹介した「薬用植物栽培・品質評価指針」等のガイドライン作成により薬用植物栽培に取り組みやすい環境を築くことが重要であると考えられる。

この GAP が世界各国の薬用植物栽培指針作成等の参考となれば幸いである。

0 はじめに (PREFACE)

0.1. この指針 (GAP-MP) は生薬・生薬製剤・漢方製剤に関連ある原料生薬の生産に関する生産と栽培と調製加工及び生産物の品質評価に関する指針である。この指針は既に厚生省厚生科学研究事業の一環として行われてきた「薬用植物栽培及び品質評価指針」を中心にまとめあげたもので、その他、薬局方や薬局方外生薬規格等を参考にして集大成されたものである。この検討は薬用植物栽培及び品質評価指針検討班員が行う。

0.2. ここで目標とする生薬関連生産物とは

- a) 高品質の製品
- b) 衛生的に管理され、微生物汚染が最小限度に制限されていること
- c) 衛生的に管理され、残留農薬やその他の不要な物質が無いか最小限度に制限されていること

0.3. この目標の微生物汚染や残留農薬、その他の夾雑の混入に関しては、薬局方にその基本的考え方が記載されているので、それに従うこととする。実際の生産者はこのことを理解して、栽培や調製加工を行うこと

0.4. このガイドラインに基づいて生産されたことを国民に知らせること

0.5. この指針内容は広く公表し、多くの方の理解を得ること及び世界各国へも公表すること

1. 序

1.1. 漢方製剤及び生薬製剤に用いる原料生薬は栽培農家での生産及び調製加工過程で微生物や残留農薬の汚染が極力無いようにして生産されること

1.2. 良い製品を作るためには、汚染の恐れがある場合には良く洗いか、必要に応じて皮を剥くか又は色やにおいが変わらないように低温で乾燥すること

1.3. 原料生薬の生産に関するもので、微生物の付着の程度に関してはこの基準で行う。

2. 栽培

2.1. 薬用植物は危険性のある土壌では栽培してはならない。危険性のある土壌とは重金属、農薬やその他の産業廃棄物をさす。

2.2. 土壌は排水が良く、そして灌漑（もし必要ならば）が整っていること。このことによって、植物の根の生長や黴の発生を防ぐ。

2.3. 灌漑に用いる水は人や家畜に汚染されていないものであること。

2.4. 有機堆肥は十分に発酵されたものを植え付ける前か、最初の収穫の直後に施肥すること。

2.5. 牛は栽培地域に入れないこと

2.6. 汚染された水は収穫するときに使わないこと

2.7. 植物は最小限度の雑草が繁れる広さに

植えること。雑草が育つことは良いことで、雑草が枯れるのは病害か虫害である。

- 2.8. 農薬や除草剤は経験ある人が使うもので、専門家であれば上手に使える。散布は専門家が収穫前に間隔をおいて行うか、使用された農薬の残存期間を考慮して行う。

3 収穫

- 3.1 収穫物は濡れている場所や湿度の高い場所に置かないこと。出来るだけ乾燥して、湿度のひくとこれで保管すること。
- 3.2 収穫物は清潔にして、衛生的に取り扱うこと。
- 3.3 機械で収穫するときはそれに使う機械類は清潔に管理すること。
- 3.4 収穫用の機械のカッター刃は、土砂を混入させないように、調節すること。
- 3.5 収穫物をとる時のかご等は他の植物が入っていないことを確認すること。また、これらの収穫物を保存する場所は清潔で、乾燥し、ねずみや虫の被害がないように管理する。
- 3.6 収穫物が腐ったり、微生物で汚染されたり、獣虫の被害を受けた時は投棄すること。
- 3.7 収穫された材料は、乾いた袋、バスケット、トレーラーまたはポッパアーで保存すべきである。土間や庭先の土の上で保存してはならない。
- 3.8 収穫物は機械などで高圧圧縮し、植物組織を壊すようなことをしてはならない:
-プラスチック製の袋は、収穫の時には使うと蒸れるので使わない。

- 収穫物の袋詰は溢れないようにすること。

- 収穫物を積み重ねないこと。

- 3.9. 収穫物は乾燥するための輸送は出来るだけ短時間で行なうこと。
- 3.10. 収穫物は、害虫、鶏、および家畜の被害を受けないように管理すること。

4. 乾燥

- 4.1 収穫物は乾燥するために出来るだけ早く梱包から取り出し、乾燥すること。直射日光を避けて乾燥するものがあるので、注意すること。乾燥する時、雨に遭わないようにする。
- 4.2 乾燥場は換気の良い場所で、家畜のいない場所であること。
- 4.3 収穫物を乾燥する建物は鳥、虫、鶏、および家畜がこないようにすること。
- 4.4 乾燥棚は清潔に管理し、定期的に清潔に保たれているかどうかを検査すること
- 4.5 収穫物は棚の上で行い、換気を良くするために、薄く広げて乾燥すること。
- 4.6 乾燥は土間や直射日光のもとではなるべくしないこと。
- 4.7 乾燥物はカビが生えていないか、腐っていないか、土や石などの異物がないかを調べ、篩い分けすること。きれいかどうかを定期的に調べること。
- 4.8 廃棄するもの入れ物は解かり易い記号をつけて、出来るだけ早く空にすること。
- 4.9. 乾燥物は害虫、鶏、および家畜の被害を受けないように管理すること。
- 4.10 乾燥物は、害虫の被害を受けないように、出来るだけ早く、梱包すること。

5. 包装

- 5.1 異物を取り除いた乾燥物は、出来るだけ

- 速く、清潔な袋や箱に詰めること。
- 5.2. 乾燥物を詰める袋や箱は害虫のいない清潔な乾燥した場所に保管すること。
- 5.3 再利用できる袋や箱は眼に使った材料が残っていないかどうかを確認してから用いること。
- 5.4 梱包された乾燥物は、壁や土間から離れたところで、乾燥した場所に保存すること。また、害虫、鶏、および家畜の被害を受けないように管理すること。
- 5.5 梱包に用いた素材は要請があれば開示すること。
6. 貯蔵と配送
- 6.1 乾燥した収穫物は温度差の小さい、乾燥した部屋で、通気性のある包装で保存すること。
- 6.2 シャッターやドア-の開閉は害虫、鶏、および家畜の被害を受けないように管理すること。
- 6.3 包装した乾燥物が保存されるための参考事項：
 - しっかりした床のある建物、
 - 移動できる荷台 on pallets、
 - 壁から離れた場所、
 - 他の収穫物と隔離できる場所。
- 6.4 輸送のために、出入り口を区別することや一時的な輸送貯蔵施設は汚染リスクを最小限にすることが大切である。移送車両は搬入口のあるものが良く、搬入の記録が取ことも必要である。
- 6.5 輸送や貯蔵のデータは流通段階で要求があれば直ぐ出せるようにすること。
- 6.6 害虫の駆除は必要な時のみ行うこと。燻蒸は研修を受けた人が担当すること。燻蒸剤は許可されたもののみ使うこと。
- 6.7 殺虫や燻蒸剤に用いる農薬は隔離して保存なすること。
- 7 機材
- 7.1 収穫や加工に使う装置や機器は汚染しないように出来るだけ清潔に保つこと。清潔にして、乾燥すること。水の使用が避けられない場所や装置は、出来るだけ、速く乾燥すること。
- 7.2 すべての装置は、出来るだけ無菌的に取り扱いたい。定期的に点検して、清潔に維持されたい。
- 7.3. 木の使用は出来るだけ避けること。
- 7.4. 木製の道具(例えば、へらや運搬車)を使ったときは、化学薬品で殺菌してはならない。もし使うと、汚れの原因となる恐れがある。
8. 取り扱う人
- 8.1 口に入るものを取り扱う人は次のことを守ること：
 - 高度に衛生管理をした人が取り扱う。
 - 更衣室を備え、トイレも備え、手を洗う場所が必要である。
- 8.2 取り扱う人が、もし風邪や病菌をもちいるときは生薬を取り扱うべきではない。特に下痢を伴う病気は注意して欲しい。
- 8.3 取り扱う人が、皮膚の感染症の場合は回復するまで、生薬類から遠ざけて、取り扱いを避けるべきである。
9. 記録
- 9.1 燻蒸剤、殺虫剤、および除草剤の記録はロット番号順位に記載すること。ロット番号のあるものは保管することが大切である。
- 9.2 生薬の燻蒸剤にシュウ化メチルやフス