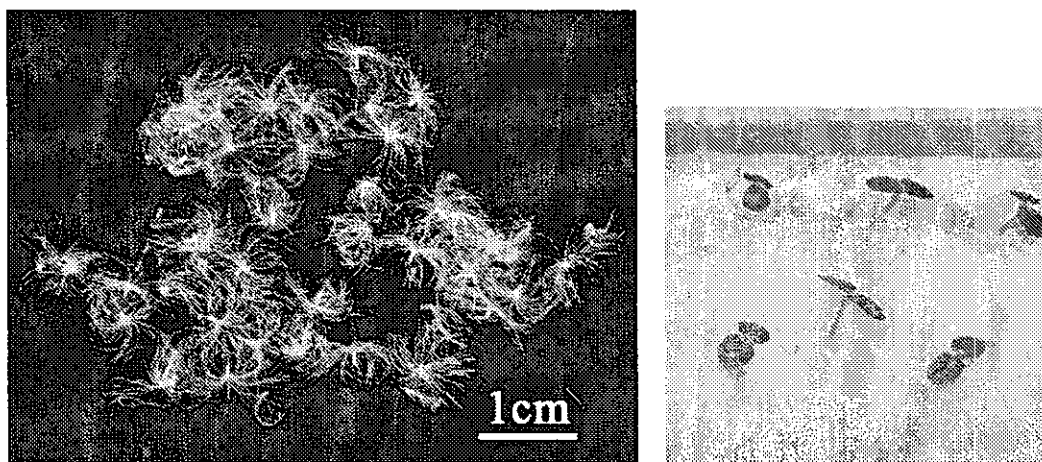


G. 知的所有権の取得状況

なし

## アレクリンについて

南米の東南部に分布する雌雄異株の垂高木。学名は *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) で、Alecrim-do-campo と呼ばれている。ブラジル産の緑色をしたプロポリスの原料植物として近年注目を浴びている。



種子（左）と発芽（右）の様子

種子には毛があり、風による散布される形状をしている。種子のみの100粒重は、約12mgと非常に小さい。25°Cが発芽適温と考えられ、数日で発芽し約一週間で子葉まで展開する。暖地では、順調に生育し栽培1年目で開花する。耐寒性もあり越冬する。雌雄異株。



-モノクローナル抗体を用いた漢方薬・生薬の有効成分に関わる研究-

分担研究者 正山征洋 九州大学大学院薬学研究院 教授

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）、シャクヤク（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モノクローナル抗体(MAb)を作製し、超高感度の定量系を確立した。また、ウエスタン、ノーザン、サザンに次ぐ4番目の染色法として MAb を用いる新しい検出法を開発し、イースタンプロットティングと命名した。さらに、濃縮やハプテン分子をワンステップで単離するためのアフィニティカラムの開発を行った。

#### 研究目的

上述の4種の薬用植物の主要活性成分に対する MAb を作製し、それらを用いた超微量定量法の確立と、低分子化合物に対しては旧来類を見ない全く新しい検出法であるイースタンプロットティング法の開発と、さらにアフィニティカラムの開発を主目的とした。

#### 研究方法

1. MAb の作製と超高感度アッセイ系の構築  
センノシド A-キャリアータンパクをマウスに免疫し、ミエローマ細胞と融合し、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 を構築する。同様にサイコサポニン a、ペオニフロリンに対する MAb を作製し、競合的 ELISA を開発する。

2. イースタンプロットティングによる2重染色法の開発

ニンジンエキスを TLC にて展開し、プロテイング液を添加後、熱により PVDF 膜へ転写する。膜を過ヨウ素酸酸化後、BSA 等のタンパクと処理して膜上で結合体を作成。

MAb とインキュベートし、2次抗体、基質を添加して発色する。また、抗ジンセノシド-Rb1 モノクローナル抗体と抗ジンセノシド-Rg1 モノクローナル抗体両者を用いた2重染色を開発し、ジンセノシド類の簡便な検出法を確立する。

#### 3. アフィニティカラムの作製

モノクローナル抗体の糖部を過ヨウ素酸酸化後、ヒドラジン基を結合したアガロースゲルと反応して抗体を結合する。本アフィニティゲルをプラスチックカラムに充填する。

#### 研究結果と考察

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 A-MAb 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、イースタンブロッティングによる2重染色の成功は人参サポニンの構造を容易に推定可能とした。即ち、この染色により、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。

抗ジンセノシド **Fb1** を用いたアフィニティーカラムによりジンセノシド **Fb1** をワンステップで単離することが可能なことを報告したが、さらに洗浄溶媒で溶出したフラクションを繰り返しカラムにかけると、ジンセノシド **Fb1** とジンセノシド **Fc** が分離することを見出した。本法はまた測定限度以下の濃度の場合、濃縮後に競合的 ELISA によって定量出来るメリットを持つ有用な手法である。

#### 結論

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ることを示した。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 で定量が可能なる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。(論文作成中)

#### 発表論文

- 1 W.Putalun, H.Tanaka, Y.Shoyama, TLC immunostaining of steroidal alkaloid glycosides, *Encyclo.Chromatog.*, 849-851(2001)
- 2 H.Tanaka, Y.Shoyama, Forskolin purification using an immunoaffinity column combined with an anti-forskolin monoclonal antibody, *Encyclo. Chromatog.*, 352-354(2001)
- 3 S.J.Shan, H.Tanaka, J.Hayashi, Y.Shoyama, Western blotting of glycyrrhetic acid glucuronides using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody, *L.Liq.Chrom.Fel.Technol.*, 24(10), 1491-1499(2001)
- 4 N.Fukuda, H.Tanaka, Y.Shoyama, Double staining of ginsenosides by western blotting using anti-ginsenoside **Fb1** and **Fg1** monoclonal antibodies, *Biol.Pharm.Bull.*, 24(10), 1157-1160(2001)
- 5 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)

- 6 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)
- 7 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)
- 8 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)

## 研究課題 遺伝子解析による品質特性に関する研究

分担研究者 水上 元 名古屋市立大学薬学部助教授

### 研究目的

資源確保が問題となっている *Ephedra* 属植物を研究対象として、薬用植物遺伝子資源の導入と保存の前提となる種同定の手段としての DNA 鑑別法の有用性の評価を研究の目的として研究を実施している。これまでに、(1) 日本各地の薬草園で導入・維持されている *Ephedra* 属植物 29 系統の *chlB* 遺伝子配列を解読し、その配列は 12 のタイプが存在すること、(2) それ故に、*chlB* 遺伝子塩基配列に基づく種鑑別の可能性が存在すること、(3) しかしながら、それぞれの植物に付されたラベル名と塩基配列タイプは一致せず、各地の薬草園で栽培されている *Ephedra* 属植物のラベル名に混乱が存在していると推定されることを明らかにしてきた。

今年度は、(1) 多数のサンプルについて迅速に *chlB* type の同定を可能にする簡便なプロトコールを確立すること、(2) 形態学的に種同定ができたサンプルの *chlB* シークエンスを解読することにより、*chlB* type と種名との対応を明らかにすること、(3) これらを利用して、導入されたいくつかのマオウ標本の種名を推定すること、の 3 点を目的として研究を実施した。

### 研究方法

#### 実験材料

マオウの標本は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) のものを用いた。

#### DNA の調製

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。

#### PCR による *chlB* 遺伝子の増幅

これまでの研究結果に基づいて、*chlB* 遺伝子の 5'側約 350bp を増幅するために、FW-1F=5'-GTTTTCCCAGTCACGACAATGAAATTAGCTTA TTGGATG-3' と SP-3R=5'-ATTTAGGTGACA-CTATAGAATACTTGTTTTTGGTGATGC-3' を設計した。それぞれのプライマーの下線部は、プライマーラベル法を用いてシークエンスするために、蛍光標識のシークエンスプライマーのプライミングサイトとして付加したものである。PCR は、25  $\mu$ L 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 産物のシークエンス

PCR 反応液 5 $\mu$ L に ExoSAP-IT(Amersham

Bioscience)2 $\mu$ L を加え、37 $^{\circ}$ Cで 15 分間、80 $^{\circ}$ Cで 15 分間インキュベートした。この溶液に蛍光標識 シークエンスプライマーを加え、ThermoSequenase Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Bioscience)を用いてシークエンス反応を行い、蛍光シークエンサー (ShimadzuDSQ-2000L) を使用して、塩基配列を解読した。なお、シークエ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クエンスした。

### PCR-RFLP 分析

PCR 反応液 5 $\mu$ L に *Bcl* I 1 $\mu$ L(10 units)および 10X 反応バッファー1 $\mu$ L を加え、全量を 10 $\mu$ L とした。37 $^{\circ}$ 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。

### 結果と考察

一般にさく葉標本や生薬などの乾燥体から調整した DNA は、乾燥や保存の過程での切断によって、断片化していることが多い。したがって、*chIB* 遺伝子の全長 1.5kb を一度の PCR で増幅することは困難であることが予想された。また、これまでの研究から、*Ephedra* 属植物の *chIB* 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 350bp 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 (表 1)。

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することとした。

#### (1) DNA の調製と PCR 増幅

さく葉標本および生薬標本について Quiagen 社のキットを用いて DNA の調製を行った。いずれの検体からも DNA の調製は可能であり、40mg のサンプルからの DNA 収量は約 2~20 $\mu$ g であった。調製した DNA の 10ng を鋳型として 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。

#### (2) 簡便なプロトコールの確立

これまでは、25 $\mu$ L のスケールで PCR を行って増幅産物を確認したのち、100 $\mu$ L スケールでの PCR 反応液から増幅産物を精製し、これを鋳型としてシークエンスの解析を行っていた。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検討した。

まず、25 $\mu$ L の PCR 反応液のうち 5 $\mu$ L を用いて増幅の有無を確認した。PCR 産物の精製が確認されたものについては、別の 10 $\mu$ L をとり、ExoSAP-IT(exonuclease と alkaline phosphatase の混合液) 4 $\mu$ L を加えて 37 $^{\circ}$ Cで 15 分間インキュベートすることにより、PCR 反応液中のプライマーと dNTP を分解した。80 $^{\circ}$ Cで 15 分間インキュベートすることにより exonuclease と alkaline phosphatase を分解させた後、その半量にシークエンス用蛍光プライマーを加えてシークエンス反応を行った。必要な場合には、残りの半量を用いて逆鎖についてもシークエンスした。

PCR-RFLP を行う場合には、PCR 反応液 5 $\mu$ L に *Bcl* I 1 $\mu$ L と 10 倍濃度の反応バッファー1 $\mu$ L を加え、全量を 10 $\mu$ L とし、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させることにより、制限酵素分解が可能であった。

これらのことから、25 $\mu$ L スケールの PCR を 1 回行うことにより、増幅産物の精製やバッファー交換などを行うことなく、増幅産物の確認、*Bcl* I による RFLP 分析、両鎖の直接シーケンスが迅速に行えるようになった。

### (3) 塩基配列の解読

茎の断面形、髄の有無、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。

これまでに日本各地の薬草園に植栽されているマオウと生薬麻黄の *chlB* 塩基配列を解読することにより、type 1 は *E. sinica*、type 2 は *E. distachya*、type 3 は *E. equisetina* の配列であると推定していた。今回の結果は、*E. sinica* と *E. equisetina* についてはこれまでの結果と一致するものであったが、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。

### (4) ネパール産およびモンゴル産マオウの種の推定

北海道医療大学薬学部で植栽されていたマオウ (*E. pachyclada* とラベル名が付されている) の全長 *chlB* 配列を解読したところ、その配列は type 4 の配列と完全に一致した。Type 4 は、*E. gerardiana* のネパール東部に分布する植物とされた標本の配列であり、これら 2 種の間には今後の検討が必要である。

さらに、筑波薬用植物栽培試験場によって導入されたモンゴル産マオウの標本のうち #4, 7, 8, 9 の 4 検体について *chlB* 遺伝子の 5'側 350bp の配列を解読したところ、4 検体とも *E. sinica* の type 1 と一致した。

### (5) PCR-RFLP による塩基配列の推定

Type 1 (*E. sinica*) の 263~268bp の配列 (TGATCA) は制限酵素 *Bcl* I によって認識され、切断されるのに対して、それ以外の type では、



この位置の配列が TGATTA に置換されているので *Bcl* I に寄っては切断されない。そこで、このサイトを含む *chlB* 遺伝子の 5' 側 350bp 領域 A を増幅し、その PCR 産物を *Bcl* I で切断することによって *E. sinica* およびそれを基原とする草麻黄を他の *Ephedra* 属植物あるいは麻黄と簡単に鑑別できる。

この方法をモンゴル産の 4 標本 (#4、#7~9) に適用したところ、すべて *Bcl* I による切断が確認された (図 1)。

#### 結論と今後の課題

本年度の研究によって、まず (1) *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ール (図 2 のフローチャートに示した) を確立し、(2) 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。

この方法の確立に向けての今後の課題は次のとおりである。

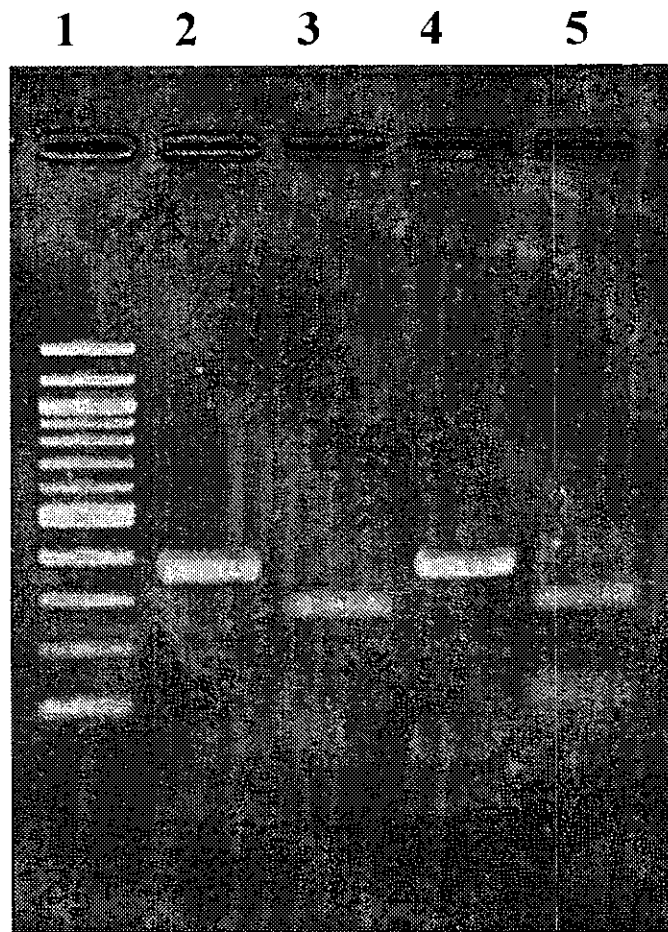
(1) 今回の DNA 調製法では、約 25% の標本で PCR 増幅産物を得ることができなかった。これらの標本について、DNA の精製法を検討するとともに、どのような標本からでも確実かつ簡便に PCR-grade の DNA が調製できる方法を確立することが必要である。

(2) 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。

表1 *Ephedra* 属植物のchlB 塩基配列タイプ

ChlB type	Sequence position					Species identification
	1	1	2	2		
	7	0	4	5	6	
	8	5	2	5	7	
Type 1	C	A	A	T	C	<i>E. sinica</i>
Type 2	C	A	A	T	T	<i>E. intermedia</i>
Type 3	G	A	C	T	T	<i>E. equisetina</i>
Type 4	G	G	C	C	T	<i>E. gerardiana/pachyclada?</i>
Type 5	G	A	C	C	T	<i>E. gerardiana?</i>

Type 1の2 6 7ntのCは、*Bcl I*の切断サイトを構成している。



- 1: 100-bp サイズマーカー
- 2: *E. sinica* (*Bcl*I 処理前)    3: *E. sinica* (*Bcl*I 処理後)
- 4: モンゴル産マオウ (*Bcl*I 処理前)
- 5: モンゴル産マオウ (*Bcl*I 処理後)

図1 PCR-RFLP 分析による *E. sinica*(*chlB* type 1)の同定

薬用植物の重要性を語る際には是非とも考えておかななくてはならないことは薬用植物資源の実態調査である。まず、自生地を確認し、自生量、生育状態、植物特性を調査した後、保存、育種、選抜をすすめる必要がある。薬用植物の自生調査、自然保存活動、資源保存園の整備ならびに自然環境におけるエンゴサクの栽培保存法に関して広島県佐伯郡吉和村での取り組みを報告する。

(1) 広島県吉和村における薬用植物の自生調査、自然保存活動、資源保存園の整備

平成 8 年 (1996) 以来、国立医薬品食品衛生研究所の生薬部をはじめ北海道から種子島までの薬用植物園関係の研究者 10 数人がボランティアで広島の地に集まり、一般市民を対象とした大学での薬用植物園を解放したシンポジウムと観察会、県内の吉和村で「吉和村の資源調査および観察会」を開催している。大学での行事には毎年 300 人余りの参加者がある。講演としては世界の民俗医学あれこれ、薬草と毒草、薬と食とのつながりなどであり、毎年講演内容を小冊子にまとめ発行している。吉和村冠山近傍での自然観察会には毎年 100 人余りの参加者を募集し、度ごとに観察植物リストならびに押し葉標本を作成して吉和村に寄贈している。薬用植物資源を守ることと、医薬品開発材料としての利用は矛盾するようであるが、自然と調和した資源の利用を行う時代である。

吉和村は西中国山地の豊かな森の中に位置し、清らかな川、太田川の源流域であり山野

草や薬用植物も多く自生している。近年、生物資源の保護および保存の重要性が世界のあらゆる地域、機関で強調されている。一方で、野生生物に関しては無秩序な採取や自然環境の悪化により急速に失われ、絶滅の危機に瀕しているものも増えている。国民の健康志向の膨らみの中で薬用植物の需要は高まっているが植物資源同様、薬草の自生地は明らかに減少し続けている。

吉和村では豊かな保水力をもち、緑のダムとも呼ばれる冠山の自然林、十方山のブナ林を含め太田川流域の森や清冽な水を守るために村内一斉清掃など村民あげて活動をしている。にもかかわらずゲンノショウコ、ドクダミ、センブリ、ホオノキ、キハダなど多くの薬用植物を目にする機会が減ってきている。

過去 6 年間、冠山近隣の自然観察会 (薬用植物自生調査) を行った結果、約 500 種の植物がリストアップされた。そのうち薬用とされる植物は 70 種ほどであった。世界の植物のうち約 10 分の 1 が薬用とされると聞いているので多少多めである。この活動中植物学的に

特筆すべきことは、広島県で始めてウスバサイシン（漢薬「細辛」）と近縁種である南方種のクロフネサイシンの自生を発見したことである。中四国地方で初めての発見となり、植物関係者へ学術的材料提供となった。

さらに、これまでの薬用植物の自生調査、自然保存活動の成果の一環として広島県下で確認された薬用植物個々に関して、生存地点ならびに状態が簡単に確認できるよう自生地を地図上にプロットすると同時に、生涯学習資料として「よしわの植物ガイドブック」を発刊した。

## （２）エンゴサク *Corydalis turtschaninovii* Besser forma *yanhusuo* (延胡索)の栽培研究 (I)

生薬「延胡索」エンゴサクは *C. turtschaninovii* Besser forma *yanhusuo* Y. H. Chou et C. C. Hsu (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 又はその同属植物の塊茎とされている。「延胡索」は唐の陳藏器の本草拾遺（739）に「玄胡索」という名で初めて収録され、後に延胡索と改められ、開宝本草から歴代の本草書に収載されている。その薬能は「血を破る」（開宝本草）、「血を活し、気を利し、痛を止め小便を利す」（本草綱目）などと記載されている。わが国には漢種が享保年間（1717～1735）に初めて伝えられたといわれ、現在でも漢方（後世派）の要薬である<sup>1)</sup>。

この植物はケシ科の多年生草本で、高さは10～20cm、地上部は普通6月中には枯れる（図1. 参照）。中国では河北、山東、浙江省などに自生しており、主として浙江省で栽培されている<sup>2)</sup>。

国内には、北方性で北海道、東北にかけて多く自生しているエゾエンゴサク *C. ambigua* Cham. et Schlecht、東北より内帯を京都まで分布するミチノクエンゴサク *C. capillipes* Franch. の他本州、九州にかけて広くヤマエンゴサク *C. lineariloba* Sieb. et Zucc., ジロボウエンゴサク *C. decumbens* (Thunb.) Pers. などが自生するが流通性はない<sup>3)</sup>。

生薬「延胡索」の輸入量は1996年度においては45トンであったが、近年70トン近くになっている<sup>4)</sup>。にも拘らず、日本ではこの仲間の栽培に関する報告は見当たらない。そこで、富山医科薬科大学薬学部附属薬用植物園に系統保存しているエンゴサク *C. turtschaninovii* Besser forma *yanhusuo* を材料として栽培研究を試みた。

### （試験方法）

試験に用いた材料の塊茎径を4段階とし、(I) 2.83～4.70 mm 未満区 24 球で 1.47g の1反復、(II) 4.70～6.30mm 未満区 60 球で 7.97g の2反復、(III) 6.30～10.0mm 未満区 156 球で 56.21g の2反復、(IV) 10.0～15.0mm 未満区 108 球で 76.41g の2反復、合計 348 球、142.06g を供試した（表4 参照）。なお、幅は10.0～15.0mm 区と限定した。試験区の大きさは畝幅 90cm、畝の長さ 400cm、畝の高さ 15cm とした。定植方法は条間 10cm、球間は 5cm とし区間は混ざるのを避けるため 20cm とした。

肥料は元肥として試験区当たり腐葉土 100 リットル、TTG 緩効性肥料 (N: 8, P: 9, K: 9, Mg: 1) 500g、粒状消石灰 500g を全層に施し

た。定植は1999年9月27日で掘り上げは2000年6月1日とし、調査は2000年6月7日とした。除草は適宜行ない、薬剤散布は行わなかった。

#### (結果と考察)

表1と表2で明らかなように、塊茎の大きさが2.83-4.76mm未満区では塊茎数が0.79倍と減少したが、その原因は試験に用いた材料の中には塊茎径が3mm以下で重さが0.1g程度の小球を含み、それが枯死したためである。しかし、塊茎重では3.04倍と増殖、塊茎径の平均値では8.22mmとなり、生薬に可能な塊茎径10mm以上<sup>2)</sup>のものは2球であった。

4.76-6.30mm未満区では塊茎数の増殖率は2.60倍であったが、塊茎重の増殖率は11.81倍で非常に好結果となった。

大きさにおいても塊茎径の平均値で10.42mmとなり、生薬になり得る10mm以上のものは67球、43.0%にも達した。6.30-10.0mm未満区では塊茎数は1.39倍、塊茎重では2.97倍と増殖、塊茎径の平均値は11.28mmとなり、10mm以上で市場性があると思われるものは60.4%を占めた。10.0-15.0mm未満区では塊茎数が1.88倍、塊茎重では1.82倍となったものの、塊茎径の平均値は10.55mmとなり、10mm以上の割合は93球、45.9%と6.30-10.0mm未満区に比べやや低い値となった(表2.参照)。

#### まとめ

種苗の大きさと塊茎数増殖率の間に相関は

見られなかったものの、1球当たり塊茎径との間には相関が見られた。さらに、6.30-10.0mm未満区に比べ種苗が大きい10.0-15.0mm未満区では分球数はやや多いものの、塊茎増殖率は低く、1塊茎当たりの重さおよび10.0mm以上の割合も低くなった。

今回の栽培研究により、種苗には塊茎の大きさが4.76-6.30mm未満あるいはそれより少し大きいものを用いることにより、毎年10mm以上の生薬になる塊茎を50%前後得ることが可能である。栽培密度は条間10cmで球間は5cmかやや広い方が適当である。塊茎の選別は市販の篩で容易にできる。などが明らかになった。

今後は、調整法や成分についても研究をする計画である。

#### 参考文献

- 1) 日本公定書協会編、第13改正日本薬局方解説書、廣川書店、1996、pp. D119-121
- 2) 小学館編、“中薬大辞典第1巻”上海科学技术出版社、東京、1985、pp. 88-92
- 3) 大井次三郎著・北川政夫改訂、“新日本植物誌・顕花篇改訂版”，至文堂、1992、pp.749-754
- 4) 杭州薬物試験場など編著、“薬用植物栽培”，上海人民公社、1977、pp. 115-124
- 5) 薬用植物(生薬)需給の現状と将来展望、(財)日本特殊農産物協会、pp. 216-248, 317

表1. エンゴサク栽培試験；植え付け種苗毎の塊茎数、塊茎重と直径の増殖率

	植付け 塊茎数	収穫 塊茎数	増殖率 (倍)	収穫		1塊茎当り		植付け		収穫		増殖率	
				総直径	直径	直径	塊茎重	塊茎重	塊茎重	(倍)	塊茎重	塊茎重	
2.83-4.76	24	19	0.79	106.9	8.22	1.47	4.47	3.04	0.24				
4.76-6.30	60	156	2.6	1354.5	10.42	7.97	94.21	11.81	0.60				
6.30-10.0	156	217	1.39	2128.7	11.28	56.21	167.15	2.97	0.77				
10.0-15.0	108	203	1.88	1843	10.55	76.41	139.17	1.82	0.69				

4段階別の収穫時塊茎数と塊茎重，増殖倍率

## 各地産絶滅危惧種ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)の超低温保存法に関する研究

東洋大学 生命科学部 下村 講一郎

### <研究目的>

ムラサキ(ムラサキ科、*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)は日本・韓国や中国の山林に生息する多年生草本で、6~7月に白い花を咲かせる。その根の表面は、赤紫色を呈しており、古来より軟膏や染料として用いられてきた。しかし、自然環境の変化、また本植物の栽培が難しいため、本邦産ムラサキの個体数は激減し、現在では絶滅危惧種に指定されている。これまでムラサキの栽培・増殖は、種子を用いて行われてきたが、種子は乾燥に弱く保存期間が長くなるにつれ発芽率が低下するため、種子からの増殖はかなり難しい場合がある。最近の研究では、培養シュートによる植物個体の増殖も可能となった。本研究では、ムラサキの培養シュートを長期的に安定に保存するためのVitrification法を用いた超低温保存法の確立を目的としている。さらに各地産のムラサキの形態的・遺伝的特性を比較し、生育地の異なるムラサキの最適な超低温保存条件の構築を目的としている。

### <材料および方法>

国立医薬品食品衛生研究所 筑波薬用植物栽培試験場において栽培されているムラサキより無菌培養シュートを確立し材料に用いた。また、各地産ムラサキ(岩手県安比高原、岩手県松尾町、青森県十和田市、宮城県仙台市、

韓国)のシュート培養系を確立し、液体窒素保存後の再生率を検討した。無菌培養シュートをMurashige and Skoog (MS)培地で1ヶ月間、暗所、24℃、シャーレ内で培養し、シュートの頂芽と側芽(約3mm長)についてVitrification法による超低温保存を行った。0.3M sucrose含有MS培地で前培養、0℃にてLoading solution (2M glycerol, 0.4M sucrose含有MS培地)で処理後、0℃でPVS2 (30% w/v glycerol, 15% w/v ethylene glycol, 15% w/v DMSO, 0.4M sucrose含有MS培地)処理し、液体窒素(LN)に保存した。1~7日間保存した後、40℃(水浴)にて1分間解凍し、Washing solution (1M sucrose含有MS培地)で洗浄し、MS培地で再培養を行った。超低温保存が再生率に対する影響を調べるため、解凍したシュートをシャーレで再培養し、1ヶ月後の再生率を調査した。生存していたシュートは試験管に移植し、さらに1ヶ月間培養した。再生シュートのシコニン生産能を調べるため、暗所で1ヶ月間培養した超低温保存後のシュートから赤色色素を抽出し、HPLCにより分析を行った。また、超低温保存後のシュートからの赤色色素を、アルカリ・酸の処理によりシコニン誘導体をシコニンに変換し、クロロホルムを用いて抽出し、TLC分析およびシコニン含量の測定を行った。

<結果及び考察>



培養ムラサキシュートを超低温保存するための最適な手順を検討していく上で、各処理段階における再生率を調べた。前培養後 Washing solution で洗浄し、再培養したシュートの再生率は 100%であった。前培養以降の各処理を 0℃で行なった結果、Loading solution 処理後では、再培養したシュートの再生率は、約 90%、PVS2 処理 20 分間では約 80%、PVS2 処理 30 分間では約 80%であった。しかし、LN で一定期間保存後、解凍、洗浄、再培養したシュートの再生率は、PVS2 処理 20 分間では約 20%、PVS2 処理 30 分間では約 30%であった。このことより、PVS2 処理時間が再生率に影響することが判明したので、PVS2 処理時間を検討した。

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。

保存するシュートの部位を PVS2 60 分間にて検討を行った結果、頂芽と側芽の再生率は、それぞれ頂芽約 60%および側芽約 30%で、頂芽を用いた方が再生率は良好であった。

Loading solution の処理時間を 10~40 分と設定し、再生率の影響を検討した結果、最適処理時間は 20 分で再生率は約 70%であった。

前培養の処理時間を 0~3 日前と設定し、再生率の影響を検討した結果、最適処理時間は 2 日間で再生率は約 70%であった。

解凍後の洗浄が再生率に及ぼす影響を検討するため、シュートの洗浄方法として Washing 法・Serial dilution 法・Serial dilution 法を行う時に 1M sucrose を使う方

法を行い、再生率を比較した。Washing 法では約 56%、Serial dilution 法では約 20%、Serial dilution 法を行う時に 1M sucrose を使う方法では約 59%の再生率が得られ、従来用いていた Washing 法がより簡便で適していることが判明した。

解凍後の光条件による再生率の影響を調べるため、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。

超低温保存処理後、2 ヶ月間培養したシュートを観察した結果、無処理のものと形態的に大きな違いは認められなかった。

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。

各地産ムラサキにおける再生率の影響を検討した結果、再生率に違いが認められた。1 ヶ月後の再生率は、安比高原産は約 78%、松尾町産は約 50%、十和田市産と韓国産は約 39%であった。しかし、2 ヶ月後のシュートが生育した時点での生存率は、安比高原産は約 56%、松尾町産は約 17%、十和田市産は約 22%、韓国産は約 33%であった。なお仙台産は培養シュートの増殖が十分でなく、今回は検討していない。

#### <結論>

暗所、24℃、MS 固形培地（シャーレ）に水平に 1 ヶ月間培養したムラサキシュートの頂芽を用いて、前培養 2 日間、Loading

solution、0°C、20 分間、PVS2、0°C、60 分間処理し、LN に一定期間保存後、速やかに解凍、Washing solution で洗浄することにより、最も高い再生率約 72%が得られた。これによりムラサキ培養シュートの超低温保存が可能となった。また、形態及びシコニン生産能は凍結保存後も保持されていることが確認された。これまでの種々の植物を用いた研究結果より、LN 保存前の処理段階での再生率への影響が大きいことが判明している。また、今回、各地産ムラサキを培養し、頂芽を用いて超低温保存を行った結果、安比高原産は再生率が高いが、松尾町産は再生後のシュートの生存率が良好でないという結果が得られた。このことは、産地により再生率が異なり、最適処理時間の検討が必要であることが示唆された。

#### <今後の実験計画>

今後は、各地産ムラサキの再生率の向上に関して、更に検討していく予定である。また、再生植物を順化後、圃場栽培を行い、生育あるいは種子形成についても検討していく予定である。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

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

協力研究者 中根孝久 国立医薬品食品衛生研究所  
筑波薬用植物栽培試験場研究生

植物遺伝子資源の保存の方法は、種子保存、栄養体保存、バイオ技術の適用等がある。バイオ技術による極長期の保存の方法の一つとして、超低温保存法確立するためにビャクダン不定胚を材料に、ガラス化法を適用するための種々の条件を検討した。また、GC-MS 分析による保存後の植物の評価を行った。中国からの輸入が極めて困難になったマオウについては、栄養体の保存と増殖を、北海道、筑波、種子島の各薬用植物栽培試験場で検討を続け、生育度、成分の経時変化を検討している。

#### A. 研究目的

植物遺伝子資源の保存の方法は、種子保存、栄養体保存があるが、バイオ技術による極長期の保存の方法の一つとして、超低温保存法がある。本方法を薬用植物の保存法として確立するためにビャクダン不定胚を材料に、ガラス化法を適用するための種々の条件を検討した。また、GC-MS 分析による保存後の植物の評価を行った。

また、生薬マオウは葛根湯などの漢方処方に配合される重要生薬であるが、日本はそのほとんどを中国からの輸入に依存してきた。しかしながら 1999 年 1 月より中国政府が砂漠化防止を理由に全面的な輸出禁止措置を講じたため、我が国においてはその資源確保のための緊急な検討を余儀なくされている。そのため中国以外からの輸入あるいは国内での栽培が検討されている。第 14 改定日本薬局方には、総アルカロイドを 0.7%以上含むと記載されているが、国内での栽培の可能性を検討するため、各

試験場にて栽培した 3 年目の *E. distacya* の総アルカロイド含量について定量を行い、前年度からの経時変化を追跡している。

## B. 研究方法

### 1. ガラス化法によるビャクダンの超低温保存法の確立

植物無添加培地で増殖・分化するビャクダン (*Santalum album*) 不定胚培養を材料に、ガラス化法による超低温保存条件の検討を行った。

植物ホルモン無添加改変 WP 培地 (10mg/L グルタミン含有)、25°C、暗所で培養を行っているビャクダン不定胚を 0.1-0.2M ショ糖および 0.5-1M グリセリンを含む WP 固形培地、25°C、暗所で 16 時間前培養した。切片 6-7 個を 2ml 容のクライオチューブに入れ、2ml のローディング液 (0.4M ショ糖と 2M グリセリンを含む WP 液体培地) を入れ、室温 (25°C) で 20 分間処理した後、ガラス化液 (PVS2、WP 培地で調製) に置換し室温で 20~30 分間処理した。クライオチューブから約 1ml のガラス化液を取り除いた後 (1ml/チューブ)、液体窒素中 (-196°C) に 8 日間保存した。液体窒素中から取り出したチューブを 40°C の水浴中に 1 分間浸して解凍し、速やかにガラス化液を取り除いた後、1M ショ糖を含む WP 培

地 2ml を加えて 20 分間洗浄後、ショ糖を含まない WP 液体培地で徐々に希釈しながら洗浄した (最終: 0.125M ショ糖を含む WP 液体培地、20 分間)。再培養は 3% ショ糖を含む改変 WP 固形培地 (10mg/L グルタミン含有)、25°C、暗所で行った。超低温保存後再生した不定胚に含まれる精油成分を、エーテルで抽出後、GC-MS 分析を行った。

精油成分の抽出: 新鮮試料 (約 0.3g) を碎断して 50ml 共栓付き三角フラスコに入れ、ジエチルエーテル (5 ml) を加え、蓋をして室温 (24°C) で 24 時間冷浸した。抽出液を約 1/2 に濃縮後、GC-MS 分析に供した。

#### GC 条件

カラム: OV1701 (GL Science) キャピラリーカラム 25m (0.25mm i.d.), カラム温度: 60°C (10 分) → 2°C/分 → 130°C → 5°C/分 → 230°C (30 分), カラム流量: He 1.5ml/分 (75Kpa),

気化室温度: 230°C, インターフェース温度: 250°C, キャリアーガス流量: He 26ml/分, 検出: FD

#### MS 条件

検出: EI, 質量範囲: M/Z 40-350

### 2. マオウ (*Ephedra distacya*) の栽培地及び時節変化にともなうエフェ