

20020425

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療研究事業

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14年度総括・分担研究報告書

主任研究者 関田節子

平成15(2003)年3月

## 目 次

I. 総合研究報告	
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	1
関田 節子	
II. 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	8
関田 節子	
III. 分担研究報告	
1. 薬用植物栽培指針作成に関する研究	19
佐竹 元吉	
2. 種子の収集と寒冷地植物の栽培保存に関する研究	23
柴田 敏郎	
3. 種子の収集と亜熱帯植物の栽培保存に関する研究-種子島における希少植物-	32
香月 茂樹	
4. 種子の収集と熱帯植物の栽培保存に関する研究	53
飯田 修	
5. 栽培薬用植物の品質評価に関する研究-牛膝-	62
淵野 裕之	
6. 種子の収集と温帯植物の栽培保存に関する研究	65
酒井英二	
7. 遺伝子解析による品質特性に関する研究	72
水上 元	
8. 薬用植物の高感度アッセイ法による保存植物の品質評価に関する研究	77
正山 征洋	
9. 自然環境における薬用植物栽培保存法の研究	80
神田 博史	
10. シュート培養による薬用植物の長期保存法に関する研究	87
下村 講一郎	
研究支援報告	
11. 薬用植物資源の種子保存法確立に関する化学的研究	97
高橋真理衣	

協力報告	
12. 中国の薬用植物の導入と栽培法の研究	103
御影雅幸	
13. ブラジルの薬用植物の導入と栽培法の研究	107
高野昭人	
14. バイオ技術による保存法の研究	113
平岡 昇	
15. ヨーロッパの薬用植物種の導入と栽培法の研究	117
後藤勝実	
16. ネパール産薬用植物種の導入と栽培に関する研究	125
渡辺高志	
17. マオウの栽培と成分及びマオウ属植物の有効利用に関する研究	135
中根孝久	
18. シュート培養による薬用植物の長期保存法に関する研究	141
吉松嘉代	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	146

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総合研究報告書

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

研究要旨 本研究は国内外の薬用植物の収集と得られた種子、栄養繁殖体、組織培養体の種子保存法の開発、遺伝子解析による種の解明、医薬品に適した品種の開発と栽培法の研究を行うことにより薬用生物遺伝資源の保存・保護の推進を目指している。特に近年は植物の生育環境が激変し、長い歴史を経て重要な医薬品とされていた種々の野生薬用植物の利用が困難となっていて、現実には、麻黄、甘草の採取が厳しい制限を受けている。従来、我が国は殆どの生薬を輸入に依存していたため、対策として国内栽培の研究を開始し、3年間の研究を通じて国内栽培の可能性を明確にした。更に、遺伝子解析と形態解析の組み合わせによる麻黄の種の同定法、自生地調査、栽培法の開発に大きな成果が得られた。また、国内自生の植物についても組織培養体の長期保存が可能になり、保存後の薬用成分の代謝能の保持率も向上した。種子の長期保存条件は発芽率に大きな影響を及ぼすので種別の対応が必要であるが、国内種 128 種の基礎的データの集積が得られた。

分担研究者：

佐竹元吉 日本薬剤師センター（お茶女大）

柴田敏郎 国立医薬品食品衛生研究所

北海道薬用植物栽培試験場

香月茂樹 国立医薬品食品衛生研究所

種子島薬用植物栽培試験場

飯田 修 国立医薬品食品衛生研究所

筑波薬用植物栽培試験場

荻野裕之 国立医薬品食品衛生研究所

筑波薬用植物栽培試験場

酒井英二 岐阜薬科大学

水上 元 名古屋市立大学薬学部

正山征洋 九州大学大学院薬学研究科

神田博史 広島大学医学部総合薬学科

下村講一郎 東洋大学生命科学部

支援研究員：

高橋真理衣 国立医薬品食品衛生研究所

筑波薬用植物栽培試験

協力研究員：

御影雅幸 金沢大学薬学部

高野昭人 昭和薬科大学

平岡 昇 新潟薬科大学

後藤勝実 京都薬科大学

渡辺高志 北里大学薬学部

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

吉松嘉代 国立医薬品食品衛生研究所

筑波薬用植物栽培試験場

## A. 研究目的

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の最終年度として、寒冷地植物、温帯植物、亜熱帯植物、熱帯植物を国内外から導入し、それらの種子、栄養体、細胞、組織による保存方法を検討した。薬用植物は生薬として、その有効成分は合成医薬品のリード化合物として重要な役割をはたしており 20 世紀においては多くの優秀な医薬品が輩出され医療の場に大きく貢献している。ゲノム創薬全盛の昨今においても、これらの資源に含有される個々の化合物の構造の新奇性と成分の多様性は生体に顕著な薬理活性を示し今後も創薬における一翼を担うものと予想される。特に、熱帯地域の植物資源の大部分は薬効、成分の化学的研究が未着手の状態にあり、創薬のシーズを求めた先進国が乱獲することで環境を破壊し、資源保有国との新たな問題を提起している。このような状況から世界規模で薬用植物資源の保存保護の機運が高まっており、我が国は望ましい保存法と利用法をリードすべく注目されている。このような背景から、貴重な薬用植物の種子・植物体の保存法を確立し、発芽能や有効成分の生合成能の維持を確保することを目的に研究を行った。更に、化学的、遺伝子学的手段により有効性と安全性の検証方法を検討した。特に、砂漠化防止により採取の禁止された麻黄については国内栽培法の確立に向けての検討を継続して行った。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。

## B. 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、温度（-80℃、-20℃、-1℃、10℃、20℃）と通気性（スチロール製缶、スチロール製瓶、ビニール袋、紙袋）に対する適性条件を検討し、発芽試験で評価を行った。発芽試験は、国際種子検査規定に準拠し、種毎に休眠打破処理法を検討した。

(2) 栄養繁殖性植物の長期保存方法：国内栽培を確立するために、植え付け方法、光、温度、植え替え必要時期等栄養繁殖性を長期間保存する条件の検討を行った。マオウは、筑波薬用植物栽培試験場の保存株を北海道、伊豆（平成 12 年度まで）、和歌山、種子島の各場に配布し挿し木法により増殖を行い、生育状態とアルカロイド含量を測定した。また、ネパール産マオウ属、国内原産のサラシナショウマ、ヒナタイノコズチ、ブラジル産薬用植物、ヨーロッパ産薬用植物について検討した。

(3) 組織培養法を用いた保存法に関する研究：培養シュートを温度と光度を組み合わせた 6 処理区で冷蔵保存した後、冷蔵株から再現した植物を戸外で栽培し形態調査と根茎に含まれる有効成分を分析した。また、培養シュートの超低温保存の条件を検討し、保存前後の成分変動を分析した。

(4) 国内外の薬用植物の調査と保存植栽の検討：国内の野生及び栽培薬用植物の種子、苗を採取し、学名を同定した後、試験

条件にそって保存した。国内及びネパール、中国、ブラジルの薬用植物を調査し、分布状況を纏めた。

(5) 遺伝子解析によるマオウの特性に関する研究：ネパール、モンゴル、国内のマオウについて遺伝子解析を行い、内部形態による分類法を組み合わせ同定法の開発を行った。

(6) フィールドでの成分含量解析に可能な高感度モノクローナル抗体によるアッセイ系の作成を行った。

(7) Good Agriculture and Collection Practice の作成：EU が提案し WHO が世界規格の作成を行っている GACP について、要望に従い日本案を作成した。

### C. 研究結果及び考察

128種の薬用植物について検討した結果、全ての温度条件でほぼ完全に発芽率が維持されるタイプ（ウイキョウ等）いずれの温度下においても発芽率の低下するタイプ（オオグルマ等）、温度依存性が見られ10℃でのみ維持出来るタイプ（ナガバノワレモコウ等）、10℃及び-1℃で維持されるタイプ（ジュズダマ等）、-10℃及び-20℃で維持されるタイプ（クソニンジン等）の5タイプが認められた。容器の種類による影響も観察された。

中国のマオウの輸入が困難になったことから国内栽培を確立するために、北海道、筑波、伊豆、和歌山、種子島における生育状態とアルカロイド含量を測定した。北海道では、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。後述の凍死とは矛盾するが、筑波で長い間植栽されてきた

ことを考慮すると日本の環境に馴化したことによるものかと考えられる。その他の地域では経年ごとに順調に生育した。4年生株は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、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。また、原産地である内蒙古から敦煌までの地域で局方収載のマオウ基原植物を調査した。*E.intermedia* と *E.sinica* を比較すると前者は殆ど走枝根をもたないが後者は地下に長い走枝根により増殖することが分かった。尚、*E.equisetina* は全く走枝根をもたない。更に、マオウ属植物は地上部を刈られると全株が枯死することが明らかになった。従って、*E.intermedia* はもとより *E.sinica* においても群落内で地上部全てが採集されたり畑地などに開墾されると全滅し、麻黄資源減少の最も大きな要因がこの畑地の開墾によるものであることが本調査を通じて明らかになった。マオウ属植物の種子は休眠せず果肉の有無に係わらず発芽率は極めて高い。夏期に発芽したものはその年の内に数節の草質茎を伸ばさせ野外で越冬できた。冬期に発芽したものは茎が伸びず双葉のまま越冬するので凍死予防の温度管理が必要である。挿し木法では、木質化した茎ではやや容易であるが、草質茎では困難である。時期的には春先の成績が良いが、秋以降でも人工気象器内では良好な結果が得られた。*E.sinica* は冬期でも暖地では比較的太い茎がわずかに残り翌年に木質化することが明らかになった。

局方生薬の基原植物であるヒナタイノコズチ、サラシナショウマの含有成分を分離し、これらを指標として成分定量し、栽培状況を観測しながら有用性を評価している。

ハシリドコロは稔性が極めて悪く、栽培を継続すると自然消滅することが多い。このような植物は *in vitro* での保存が望まれる種の一つである。シュートの段階で2年間冷蔵した株と一度も冷蔵することなく25℃で継代培養した対照株から復元した植物を戸外で栽培して3年目と4年目に品質を評価した結果、形態のみならず染色体数にも変異は観察されず、また、ヒヨスチアミン、スコポラミンの含量も対照に比べて同じか高く、2次代謝産物の蓄積の面でも悪影響は観察されなかった。ハマボウフウについても同様な結果が得られている。南方系植物であるチョウサンアサガオは5及び10℃の保存では阻害され15℃が適温であったが培地の乾燥が厳しいので対策が必要である。

組織培養で発根の困難であったマオウについて、ネパール産 *E. gerardiana* のシュートから BAP と NAA による濃度組み合わせ添加 MS 培地で大量増殖した苗を、寒天培地での発根を経由することなく、無菌条件下ではあるが川砂で直接発根誘導することに成功した。

東北地方5ヶ所、長野、韓国から入手したムラサキ種子からシュートを形成し超低温保存の条件検討を行った。産地、clone によって違いはあるが、PVS2 処理60分前後で超低温保存後の再生率は、約50%以上であった。この方法により、ムラサキの超低温保存が可能となった。しかし、再生後の向上には clone ごとに詳細な検討が必要であると予測された。長野県産培養ムラサキシュートでは液体窒素内1年間保存後でも再生率は約40%を維持していた。また、ヤマトトウキの非形質転換シュート (NS)

及び形質転換シュート (TS) を各種条件で超低温保存を行った。NS では、ショ糖とグリセリン各5%を含む培地で前培養後脱水前処理無しで20分間のガラス化液処理(25℃)を行ったときに最も高い再生率(46%)が得られた。一方、TS においては、ショ糖とグリセリンの各7.5%を含む培地で前培養後脱水前処理無しで25分間のガラス化液処理(25℃)を行ったときに最も高い再生率(18%)が得られた。いずれの再生シュートも健全な植物体に生育し、含有成分の保持も確認できた。

毎年、国内の種子を約1,300ヶ所から収集した。国内外と種子交換を行い、毎年約5,500点を導入しほぼ同数を送付している。ネパール産薬用植物を調査し、マメ科15種、キク科9種、トウダイグサ科9種、キツネノマゴ科8種、シソ科7種、ヒルガオ科6種、タデ科6種、モクセイ科5種、ウルシ科4種、イネ科4種、ツツラフジ科4種、ショウガ科4種を採取し、さく葉標本として保存している。

*Hevea brasiliensis*、*Cephaelis ipecacuanha*、*Paullinia cupana*、*Quassia amara* など18科22属27種のブラジル産薬用植物を保有栽培し観察を継続したところ薬用植物園の温室の環境に適応したものと不適応のものに明確に分かれつつあり、植物によって要求する栽培環境が極めて多様であることが再確認されてきた。種によっては適応性が豊かで東京近辺の野外でも栽培可能なものもある。

マオウの資源植物である *Ephedra* 属植物を対象として、種鑑別の手段としてのDNA鑑別法の有用性評価を目的として研究を実施した。マーカーとしては葉緑体ゲノム上

に存在し、光非依存的 protochlorophyllide reductase の B サブユニットをコードする chlB 遺伝子を用いた。乾燥した植物試料や生薬から調製した DNA では、乾燥過程で DNA の断片化が生じているために一度の PCR で chlB 遺伝子の全領域を増幅することは困難であったので chlB の領域を一部が重複した約 500 bp の 4 つの領域に分けて PCR を行ったところ生薬由来の DNA からもそれぞれの領域に対応した増幅産物を得ることができた。塩基配列の解読の結果、国内の薬用植物園に植栽されているマオウは 5 タイプに分類された。更に、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、内部構造から *E. sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* と推定できる標本を選び、その chlB 遺伝子の塩基配列を解読した。その結果、内部構造学的に *E. sinica* と鑑定された標本の chlB 塩基配列はすべて Type 1、同じく *E. intermedia* と鑑定された標本はすべて Type 2、さらに *E. equisetina* と鑑定された標本は Type 3 の配列を示した。Type 1 (*E. sinica*) の 263~268 nt 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、Type 2~5 ではこの位置の配列が TGATTA に置換されているために、*Bcl* I によっては切断されない。そこで、このサイトを含む Region 1 を増幅し、その増幅産物を *Bcl* I で制限酵素処理を行ってから電気泳動によって切断を確認することにより、簡便に *E. sinica* を鑑別できることが明らかになった。

薬理活性成分、サイコの saikosaponin a、シャクヤクの paeoniflorin に対するモノクローナル抗体 (Mab) を作製し、それらを用

いた高感度アッセイ系を構築した。また、大黃の sennoside A 及び B に対する Mab を用いて両者を一度に検出可能なキットの開発に成功した。

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纏め英文版とした。本年 7 月に世界に発信されパブリックコメント収集後公布される予定である。

#### D. 結論

薬用植物種子の長期保存法の研究歴は浅く、特に有用成分生合成能の維持については殆ど研究されていなかった。本研究の結果は極く一部のものではあるが対象範囲が広い他種への予測が可能であり学術的な影響が大きいと考えられる。植物種の絶滅は生態系への影響が大きい。これらを保存・保護することは学術的にも有意義であり、国際世界にも大きく貢献するものである。生物多様性条約の締結により海外からの資源種の導入は困難になっているが、これまでの海外との共同研究ならびに種子交換の実績を基礎として交流が保たれており、種子、植物体共に予期していた以上の成果が得られた。保存方法についても種子保存、バイオ技術による保存等で有用な結果が得られていて当初の目的はほぼ達成されている。

漢方薬の原料であるマオウの輸入が困難になり国内栽培の確立を目標に研究を開始した。基本となる種の同定については鑑定の困難であったが、形態解析に加えて遺伝子解析法が有用であった。薬用植物の基原植物名は医薬利用の点から最重要事項であ



り、正確な学名を付すことができたことは大きな成果であった。現地の野生生育環境が明らかになり国内栽培の可能性が示された。マオウの国内栽培法の確立は海外に依存していた資源を国内で確保できることを示唆するもので今後他の種にも同様の方策の可能性を含んでおり医薬品供給として意義深いものである。採取により砂漠化が憂慮されている生産地にとっても歓迎されると考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表	9 件
原著論文による発表	8 件
それ以外（レビュー等）の発表	0 件

そのうち主なもの

##### 論文発表

- 1) 三木栄二、金井弘夫、近藤健児、岡田稔、関田節子、佐竹元吉：標本に基づく薬用植物の生育状況変遷の推定、植物研究雑誌 75 : 347-359 (2000)

##### 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、第 48 年会 (2001)
- 2) 水上 元、中島亜希子、釣賀綾子、平岡 昇、神田博史、武内美和、石塚康弘、本多義昭、高野昭人、細川敬三、佐竹元吉：ChIB 遺伝子を分子マーカーとする *Ephdra* 属植物および生薬麻黄の DNA 鑑別、日本生薬学会第 47 回 (2000 年) 年会、2000.9

- 3) 香月茂樹、鏑木敏一、野崎トモ子、飯田 修、高上馬希重、栗原孝吾、山田和也、黒柳正典：「薬用植物のジーンバンク化に向けて」日本国内で保存されている *Curcuma* 属植物の特性評価（形質とゲノム情報）について、日本薬学会第 121 年会、2001.3

- 4) 中根孝久、菱田敦之、柴田敏郎、飯田 修、香月茂樹、関田節子、佐竹元吉、マオウ科 *Ephedraceae* 植物のエフェドリン含量 III、-国内栽培試験種及び国外野生種-、日本生薬学会第 49 年会、(2002)

##### 2) 海外

口頭発表	1 件
原著論文による発表	11 件
それ以外（レビュー等）の発表	0 件

そのうち主なもの

##### 論文発表

- 1) H.Tanaka, Y.Shoyama, Forskolin purification using an immunoaffinity column combined with an anti-forskolin monoclonal antibody, *Encyclo. Chromatog.* 352-354 (2001)
- 2) Waraporn Putalun, Osamu Morinaga, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Development of one step immuno-chromatographic strip test for the detection of sennosides, *Phytochem. Analysis*, in press.
- 3) MIKAGE Masayuki and TAKAHASHI Akira, "A field research on *Ephedra* plants in Inner-Mongolia, China", *Newsletter of Himalayan Botany*, No.31, 1-7 (2003) .

##### 学会発表

- 1) Motoyoshi Satake, Importance of Herbal Medicines, Nepal-Japan Joint Symposium on

Conservation and Utilization of Himalayan  
Medicinal Resources, Nepal, June (2000)

F. 知的所有権の出願・取得状況

1. ペオニフロリンに関する特許

「抗体及びその製造方法並びに抗体を用いた抗原の定量方法」:

出願番号 特願 2002291666

2. イチョウ葉のアレルギー作用物質、ギンゴリン酸に関する特許

「モノクローナル抗体及びその製造方法並びにモノクローナル抗体を用いた抗原の定量方法」:

出願番号 特願 2002-29166

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

研究要旨 薬用生物資源の保存法の確立を目的に、国内外から種子、種苗を導入し、その長期保存法について検討した。保存体は、種子、栄養体の他に培養シュートを作成し、冷蔵保存後、超低温保存後の植物体再生率向上を目的とした条件検討と保存による二次代謝産物生成への影響を検討した。輸入が困難となったマオウについて北海道、筑波、伊豆、種子島で栽培を試み経時的に生育度とエフェドリン系アルカロイドを定量することにより国内栽培の可能性を明らかにした。また、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を行った。

分担研究者

佐竹元吉（日本薬剤師研修センター）

柴田敏郎（国立医薬品食品衛生研究所  
北海道薬用植物栽培試験場）

飯田 修（国立医薬品食品衛生研究所  
伊豆薬用植物栽培試験場）

澁野裕之（国立医薬品食品衛生研究所  
筑波薬用植物栽培試験場）

香月茂樹（国立医薬品食品衛生研究所  
種子島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）

支援研究員

高橋真理衣（国立医薬品食品衛生研究所  
筑波薬用植物栽培試験場）

協力研究者

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）

後藤勝実（京都薬科大学薬草園助手）

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）

吉松嘉代（国立医薬品食品衛生研究所  
筑波薬用植物栽培試験場）

A. 研究目的

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の最終年度として、寒冷地植物、温帯植物、亜熱帯植物、熱帯植物を国内外から導入し、それらの種子、栄養体、細胞、組織による保存方法を検討した。薬用植物は生薬として、その有効成分は合成医薬品のリード化合物として重要な役割をはたしており 20 世紀においては多くの優秀な医薬品が輩出され医療の場に大きく貢献してい

る。ゲノム創薬全盛の昨今においても、これらの資源に含有される個々の化合物の構造の新奇性と成分の多様性は生体に顕著な薬理活性を示し今後も創薬における一翼を担うものと予想される。特に、熱帯地域の植物資源の大部分は薬効、成分の化学的研究が未着手の状態にあり、創薬のシーズを求めた先進国が乱獲することで環境を破壊し、資源保有国との新たな問題を提起している。このような状況から世界規模で薬用植物資源の保存保護の機運が高まっており、我が国は望ましい保存法と利用法をリードすべく注目されている。このような背景から、貴重な薬用植物の種子・植物体の保存法を確立し、発芽能や有効成分の生合成能の維持を確保することを目的に研究を行った。更に、化学的、遺伝子学的手段により有効性と安全性の検証方法を検討した。特に、砂漠化防止により採取の禁止された麻黄については国内栽培法の確立に向けての検討を継続して行った。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。

## B. 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、導入種子 335 種、野生種 125 種、圃場栽培種の内からサイコ、シャクヤク、オオバナオケラ、ムラサキバレンギク等について温度（-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）で保存した。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。

催芽処理 5：播種前に濃硫酸に湿らせた。

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

### (1) サラシナショウマの栽培

野生のサラシナショウマの林床下での生育状況を参考に圃場での栽培を試みた。実生苗の移植の前段階として、ある程度生育したサラシナショウマ苗を圃場に移植し、至適環境の検討を行った。

供試苗：1998 年に足尾山麓より採取後、3 年間遮光下鉢植えで育成した幼苗を、圃場内で 1 年間育成した。

栽培条件 1：コントロール（無処理）

栽培条件 2：地表面に黒白マルチシートを施した

栽培条件 3：寒冷紗（50%遮光）で全体を覆った

1 区 20 株で試験を行った。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条件検討を行った。

(2) マオウの栽培について：筑波試験場で栽培中の *Ephedra* sp. (EP-13 系統) より株分けした苗、

大苗 60 株、小苗 60 株を 1999 年 6 月 2 日に北海道試験場の圃場に定植 (70×30 cm) し、4 年目の生育を調査した。2002 年 7 月 1 日、8 月 23 日、10 月 8 日に草丈、茎数、最大茎径を、9 月 20 日、10 月 18 日に地上部乾物重を測定し、4 年間の生育経過をまとめた。乾物重を測定した試料は、アルカロイド及び無機成分の定量に供した。また、*Ephedra sinica* のモンゴル産栽培 2 年目株を入手し、成分の定量に供した。無機成分含量 (N、K<sub>2</sub>O、CaO、MgO) を、N はケルダール法、他の 3 成分は SPAD 法により測定した。また、モンゴル産マオウ、ネパール産マオウについても検討した。

定量分析の検体の採取時期：筑波各年 8 月～12 月 (5 ヶ月間)；北海道、1999 年及び 2001、2 年 8 月～11 月 (2 ヶ月間か 4 ヶ月間)；種子島、1999 年 (7 ヶ月間) 及び 2001 年 1 月～2002 年 12 月 (24 ヶ月間)

栽培麻黄の至適温度の検討：麻黄栽培時の至適温度を検討するためにファイトトロンで、同一株から株分けしたものを 3 株ずつをそれぞれ 15 °C、20 °C、25 °C 及び 30 °C で一定期間成育し、総アルカロイド量の差を検討した。

生薬マオウの調整方法の検討：調整方法による総アルカロイド量の差をみる為に 天日、陰干し、凍結乾燥、40 °C 及び 60 °C 乾燥の方法で同一株から取り分けたものをそれぞれ検討した。

(3) 国内原産のヒナタイノコズチ、カンラン、ヨーロッパの薬用植物アマ、ルリジサ、トウキンセンカ、ジギタリス等、ブラジル薬用植物ガラナ、アメリカニガキ、アサイヤシ等の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

ハマボウフウ (*Glehnia littoralis*) およびチョウセンアサガオ属植物 (*Datura metel* var. *rubra* および *D. metel* var. *fastuosa*) については、培養シュ

ートを 5、10、15 °C の 3 段階、各温度について明所と暗所の合計 6 処理区で保存して一部は再培養して植物体を再生して形質検定を行った。ハシリドコロ (*Scopolia japonica*) 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、再現性を確かめるために 2 回目の評価を実施した。評価は、形態を調査し、有効アルカロイド成分のヒヨスチアミンとスコポラミンを GC 法によって分析した。有意差検定は、Student の t-test によった。染色体観察は試験管内で発根した植物の根端細胞を使ってフォイルゲン押しつぶし法により行った。ムラサキについては、4 県 6 市町村産の種子を入手し、種子を 75 % EtOH に浸漬し洗浄後、2 % 次亜塩素酸ナトリウム (0.1 % v/v Tween 20 添加) で殺菌後、寒天培地 (0.5 % sucrose、0.5 % agar) に植え付け、無菌培養系を確立した。その後、形態的特徴を比較した。また、Murashige and Skoog (MS) 固形培地 (3 % sucrose、0.2 % Gelrite、9 cm φ シャーレ) にシュートを水平に置床し、暗所、25 °C にて培養を行った。シュートに形成された赤色色素の抽出エキスを 2.5 % 水酸化カリウムに溶解し 620 nm にて吸光度を測定し新鮮重量当たりのシコニン誘導体含量の定量分析を行った。また、作出した培養シュートの超低温保存条件を検討した。各シュートの頂芽を 3 mm に切り出し、前培養、loading solution (2 M glycerol、0.4 M sucrose 含有 MS 培地) 処理を行い、PVS2 (30 % w/v glycerol、15 % w/v ethylene glycol、15 % w/v DMSO、0.4 M sucrose 含有 MS 培地) は 60 分間処理し、液体窒素中で 3 日間保存後、急速解凍、洗浄 (1M sucrose 含有 MS 培地)、再培養を行った。4 週間後に新葉を展開したものを再生したと判断し、再生率を算出した。ヤマトトウキ (*Angelica acutiloba*) は、約 3 mm 長のシュートを調製し、ムラサキと同様にガラス化法による超低温保存を行い、解凍は、40 °C の温浴中で 1 分間行い、1 M ショ糖を含む培

地で 20 分間洗浄後、再培養を行った。超低温保存後再生したシュートの評価のため、アセトン抽出物の TLC 分析および GC-MS 分析を行った。

#### 4. 品質評価に係わる成分定量法の研究

(1) 筑波薬用植物栽培試験場で栽培を行ったヒナタイノコズチの根を乾燥後粉碎し、メタノールで抽出を行った。その後濾過を行い、濾液を濃縮後得られた残渣をボンドエリユートカラム (C-18) にかき、溶出部を濃縮後 HPLC にて分離精製を行った。移動層はアセトニトリル-水混合溶媒、カラムには Inertsil ODS-3 を用いた。グラジエント溶出を行い、フォトダイオードアレイにて検出し、エクジステロイド類に特徴的な吸収を持つ化合物 4 種類を分取した。

また、ベトナム産 *A. aspera* L. の乾燥した根をメタノールで抽出し、その後各種クロマトグラフィーを行い分離精製し、4 種類のトリテルペン、および ecdysone を単離し各種スペクトルデータから構造を決定した。

さらにヒナタイノコズチとマルバイノコズチのメタノールエキスの HPLC 分析を行い、ベトナム産 *A. aspera* との比較を行った。

(2) サラシナショウマの単離成分の内、cimifugin、cimifugin glucoside、cimigenol、cimigenol xyloside の 4 種を標品として分析法の検討を行った。試料：市販の中国産升麻 3 種 (1~3)、中国産升麻 (*C. foetida*) (4)、野生品サラシナショウマ (5、6) (筑波山、足尾山)、移植一年目のサラシナショウマ (7)、イヌショウマ (8、9) (比較のため)

試料の調製：乾燥品を粉碎して得られた粉末 0.5 g にメタノール 5 ml を加え、30 分間震盪した後遠心分離を行い、上澄み液を試料溶液として用いる。

HPLC 条件：カラム Mightysil RP-18 4.6 φ x 250 mm、移動層 0~45 min. 15% CH<sub>3</sub>CN~

100% CH<sub>3</sub>CN、45~60 min. 100% CH<sub>3</sub>CN、流量 0.8 ml / min.、測定波長 203 nm、カラム温度 40 °C、注入量 20μL

以上の条件下で4つの標品 cimifugin glucoside、cimifugin、cimigenol xyloside、cimigenol の保持時間はそれぞれ 11.3、14.2、31.0、39.2 min. であった。これらのうち共役系の少ない骨格をもつ cimigenol 類の検出感度は低かった。

TLC 条件：シリカゲル薄層板、クロロホルム/メタノール (4 : 1)、試料溶液 10 μL、検出 UV 254 nm および希硫酸噴霧後加熱

LC/MS/MS 条件：カラム TSK-Gel ODS、移動層 0-7 min. CH<sub>3</sub>CN 90% / 0.1% ギ酸 10%、7-10 min. CH<sub>3</sub>CN 10% / 0.1% ギ酸 90%、流量 300 μl/min.、イオン化法 electron spray、検出 トリプル四重極 MS/MS

#### 5. 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

国立衛研・伊豆薬用植物栽培試験場の廃止に伴い、温室内で保存されていた熱帯・亜熱帯性薬用植物の導入時のオリジナル植物やオリジナルに近い植物を種子島試験場に移動した。筑波試験場には、閉鎖に先立ち取り木、挿し木あるいは株分けした植物を主として移動した。植物種が明確なものは 61 科、210 種あり、そのリストを作成した。

2002 年春から晩秋にかけて、国立衛研・北海道、筑波、和歌山及び種子島の各試験場でそれぞれ独自に種子を採取した。野生種は各試験場の近隣地区に自生しているものを採種し、一方、街路樹や庭木など明らかに人工的に移入されたものは栽培種とした。各試験場で採取された種子は、調製後筑波試験場に集められ、種子リストを作成した。なお、リストの発送及びリストを元に請求された種子の発送は、筑波試験場で一元化し行っている。

## 6. 遺伝子解析による薬用植物の特性に関する研究

### (1) マオウの同定法に関する研究

DNA の調製：新鮮なマオウ及び生薬マオウの約 40 mg 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：DNA データベース上に登録されている *Ephedra altissima* の chlB 遺伝子塩基配列 (Accession No. U21316) に基づいて、chlB のほぼ全長が増幅できるようなプライマーを設計した。このプライマーセットを用いて、いくつかの薬草園で栽培している *Ephedra* 属植物から調製した DNA を鋳型として PCR を行ったところ、いずれの試料からも約 1.5 kb と予想されるサイズを有する断片の増幅を認めた。乾燥した植物試料や生薬から調製した DNA では、乾燥過程で DNA の断片化が生じているために一度の PCR で chlB 遺伝子の全領域を増幅することは困難であった。そこで、chlB の領域を一部が重複した約 500 bp の 4 つの領域に分けて PCR を行ったところ、生薬由来の DNA からそれぞれの領域に対応した増幅産物を得ることができた。

PCR 産物のシーケンス：PCR 増幅産物を含む反応液中には未反応のプライマーや dNTP が残存しているために、そのままではシーケンス反応を行うことができない。通常はカラム等を用いて精製を行うが、時間を要することになる。そこで、PCR 反応液に exonuclease と alkaline phosphatase の混合液を加えて 37 °C で 15 分間反応させることにより、PCR プライマーと dNTP を分解してから、シーケンス反応を行った。

### (2) モノクローナル抗体の作製と高感度アッセイ系の構築

柴胡の saikosaponin a、芍薬の paeoniflorin それぞれの糖鎖部分を NaIO<sub>4</sub> で開環し、BSA 等のキャリアタンパクを結合しマウスへ免疫する。脾臓細胞の単離、ミエローマ細胞との融合、セレ

クション、クローニングを経て Mab 産生細胞を単離・増殖し、大量培養により Mab を得る。Mab を用いて定法どおり競合法による ELISA を確立する。

### (3) ennoside A 及び B に対する Mab を用いた同時分析キットの開発

膜ヘトラップ用の sennoside A-HAS コンジュゲートと sennoside B-HAS コンジュゲートをそれぞれ適当な間隔を置き吸着させる。抗マウス IgG Mab をトップへ吸着させ、余分の Mab をトラップする。センナの粗抽出エキスと金粒子でラベルした抗 sennoside A 及び B Mab をステック下部へ添加し、バッファー液にステック下部を浸して浸透圧によりバッファー液を上昇させる。

## 7. GAP 追加基準作成に関する研究

昨年度は GAP 素案を作成し日本案として WHO や FHH 会議の場で討議を行った。その基礎となった「薬用植物栽培と指針」を一部継続するものとして新たに対象植物種を増やし、栽培に有用な情報を与える気象環境、土壌環境の調査と間境域にある植物の特性評価として化学的な検討を行った。

## C. 研究結果・考察

### 1. 種子の長期保存法

サラシナショウマの発根率が最も高いのはコントロール群で、次に催芽処理 1 (播種前に濡れた砂で湿らせる処理) が高かった。0.05 % ジベレリン酸は発根を阻害する可能性がある。また、最も発根率の高かったコントロールにおける平均発根日数は 108 日であり、播種後 66 日目から 216 日目まで新たな発根が観察された。発芽については 251 日後にコントロール群で 1 個体に子葉が観察されたのみであった。ただし、別に催芽処理 1 を施した種子につき、赤玉土の苗床に播種後、室外遮光下に放置したものは、320 日後より子葉が観察され、350 日後には本葉が観察された。したがって、サラシナ

シヨウマの子葉の展開には発根の後、冬を経験することが必要であることが推測された。

## 2. 栄養繁殖性植物の長期保存方法

### (1) 花穂形成時の状態

栽培条件 1：夏期に枯死した株が多数あった、葉が小さい

栽培条件 2：栽培条件 1 より少ないが、枯死した株があった、葉が小さい

栽培条件 3：健全に生育し、花穂が形成された

(2) 圃場での栽培の結果、栽培条件 3 において、サラシナシヨウマは健全に生育することが可能であることを確認した。したがって、栽培条件 3 により実生苗の栽培検討を行うこととした。

1) マオウの生育について：4 年目株の生育は、10 月の調査では草丈は 65~70 cm、莖数 116~154 本、最大莖径 3.2~3.6 mm、地上部乾物重は 87 g に達した。9 月、10 月の地上部の無機成分含有率は、これまでの 3 年間と比較して変化が少なく、窒素 2.3~2.6 %、カルシウム 1.8~2.0 %、加里 2.3~2.7 %、マグネシウム 0.5 % であった。モンゴル産栽培株の無機成分含有率は、窒素 2.7 %、カルシウム 3.1 %、加里 1.7 %、マグネシウム 0.6 % であった。また、モンゴル産栽培株の無機成分含有率は、カルシウムが著しく高く、マグネシウムも比較的高かったが、加里は顕著に低い特徴が認められ、この傾向は昨年と同様であり、生育地の土壌条件によるものと推定した。

北海道での栽培は収穫時期が短いという欠点があるが成分含量的には局方の基準を満たすものであった。筑波における 4 年間では何れも 1 % を越えており、ここ 2 年間においては 1.5 % 以上の高含量であった。種子島では 3 場でもっとも月毎の変動が大きく、定植してから 0.7 % を満たしていない月が 3 回あるが、4 年目には通年で基準を満たしている。

従って、日本全国でマオウの栽培化は可能であると思われるが、種子島など熱帯地域では定植後、数年の期間をおくことで一年を通じて収穫できる可能性が示唆された。

乾燥方法による明確な差は認められなかった。

*E. Americana* (ペルー)、*E. Americana var. andina* (ペルー)、*E. viridis* (アメリカ合衆国)、*E. nevadensis* (アメリカ合衆国)、*E. przewalskii* (モンゴル) からはエフェドリン及びプソイドエフェドリンは検出されなかった。しかし、モンゴルにおいて栽培された *E. sinica*、ネパールの *E. gerardiana* の総アルカロイド含量は高含量な試料が多く、何れも日本薬局方の基準を十分に満たすものであった。このことから、モンゴルでの栽培 *E. sinica* は植物の基原も局方収載品目に該当することから生産量と輸入経路が確保されれば日本で利用できる可能性が示唆された。また、ネパールの *E. gerardiana* も総アルカロイド含量の点からは今後、中国産マオウにかわる新しい資源として検討される可能性が示唆された。

## 3. 組織培養法を用いた保存法に関する研究

ハマボウフウ (新潟株) の培養シュートの一部を 14 ヶ月後に通常条件下で再培養した結果正常に生育することを確認した。ハシリドコロは、一昨年度からプランターで栽培し、今年度第 2 回目の生育記録とアルカロイド分析を実施した。冷蔵しない培養シュートから同様に復元した植物群を対象として用いた。昨年度に比べて薬用部である根茎が非常に大きくなっていった。調査した項目のうち、植物の高さおよび根茎中のスコポラミン含量が対照群に対して優位に大きかった。その他の形質については、対照群との間に有意な差は認められなかった。また、染色体数は対照株、冷蔵株ともに  $2n=88$  であり、日本各地で採集されたハシリドコロの染色体数と一致しており、変異は認められなかった。ハシリドコ



口は稔性が極めて悪く、栽培を継続すると自然消滅することが多い。今回、昨年度に続いて 2 回目の形質評価を実施した。シュートの段階で 2 年間冷蔵した株と一度も冷蔵することなく 25 °C で継代培養した対照株から復元した植物を戸外で栽培して、3 年目と 4 年目の 2 年度にわたって品質を評価した結果、形態のみならず染色体数にも変異は観察されなかった。また、薬用成分として重要なヒヨスチアミン、スコポラミンの含量も対照に比べて同じか高く、2 次代謝産物の蓄積の面でも悪影響は観察されなかった。チョウセンアサガオの 2 変種は光照射の有無に拘わらず 5 °C で保存すると 6 ヶ月後にはすべて生存しなかった。10 °C および 15 °C では変種 *rubra* のすべてのシュートが生存した。変種 *fastuosa* では、15 °C 保存のシュートは全て、10 °C 保存シュートは 8 割が生存した。25 °C で再培養すると冷蔵株ではシュートの増殖率が低下する傾向が見られた。シュートの発根に関しては対照株と冷蔵株の間で差は認められなかった。プランター栽培した植物では、冷蔵株で地上部が有意に高いものがあつた他は対照株と比べて各種の形質に差はなかった。14 ヶ月目になると 10 °C 冷蔵株はほとんどが死滅し、15 °C 冷蔵株のみが生存した。

したがって植物の種によって低温耐性が異なることを考慮して薬用植物の試験管内保存を行う必要がある。しかし、15 °C では培地の乾燥が激しいことが生存を妨げる要因となるので、低温に耐える工夫と乾燥を押さえる工夫を並行して改善する必要があると示唆された。

#### 4. 成分定量法の研究

(1) ヒナタイノコヅチの HPLC チャートでは PDA 分析では 4 つのエクジステロイド類と思われるピークが現れた。その 4 種について単離を行った。NMR スペクトルを検討した結果、2 種の化合物は *ecdysone*、20-hydroxyecdysone と同定

した。3 番目と 4 番目は *inokosterone* の 25 位エピマーと決定したが、その配置についてはまだ決定していない。また、ヒナタイノコヅチとマルバインコヅチの PDA チャートを比較した結果、ほぼ同一のチャートであり両者の成分上での違いはほとんど見られないことがわかった。

ベトナム産牛膝 *A. aspera* の成分に関しては、6 月と 8 月に採集した根から 4 種類のトリテルペンを単離した。

(2) サラシナショウマの TLC 法 中国産升麻 (3 ~6) については (6) の *C. foetida* より *cimifugin*、*cimifugin glucoside* (*cimigenol xyloside* に相当する位置にスポットが観察されるが、ODS による検討により標品とは異なる物質であることがわかった。) が認められ、*syouma 2* (4) は *cimigenol xyloside* と *cimifugin*、*syouma 3* (5) は *cimigenol xyloside* のみが認められ、*syouma 1* (3) については 4 つの標品すべてが認められなかった。

茨城県産サラシナショウマ (*C. simplex*) (7, 8) およびその移植したもの (9, 10) についてはすべて *cimifugin* が認められ、足尾山産のものからは *cimifugin glucoside* も観察された。イヌショウマ (*C. japonica*) については *cimigenol xyloside* のみが認められた。

HPLC 法 *cimifugin* ; TLC 法で検出されなかった *syouma 1* およびイヌショウマからはほとんど認められなかったが、*syouma 3* からは少量、検出された。*cimifugin glucoside* ; TLC 法では *C. foetida* と足尾山産 *C. simplex* についてのみスポットが観察されたが、*syouma 2* およびサラシナショウマから極少量ずつピークが観察された。*Cimigenol xyloside* および *cimigenol* については TLC 法にてスポットが観察されたものでも相当するピークは認められなかった。

LC/MS/MS 法 *syouma 1* について 4 つの標品の定量を行ったところ、*cimifugin* 16.4 ng/ml、

cimifugin glucoside 246 ng/ml, cimigenol 295 ng/ml, cimigenol xyloside 10.5 µg/ml であった。

## 5. 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

旧伊豆試験場では *Cinnamomum* 属と *Curcuma* 属について研究が行なわれ、その材料が多く集められた。同一種であっても系統により差異がみられる特徴があり、その 1 例として、*Cinnamomum cassia* では挿し木時の発根の難易が系統により異なることが確認されている。*Curcuma* 属に関しては種子島試験場との共同研究のために収集された系統があり、その一部を移動した。*Curcuma* 属は系統の種名が未定のもが多く、リスト掲載は種の明確なものにとどめた。なお、*Curcuma* 属の保存は、種子島試験場が主体となっており行っている。

## 6. 遺伝解析による薬用植物の特性に関する研究

### (1) マオウの同定法に関する研究

日本各地の薬用植物園で収集、保存されている *Ephedra* 属植物について、その chlB 遺伝子の塩基配列を解読して比較したところ、個所のサイトで塩基置換があり、その配列は 5 つのタイプ (Type 1 ~5) に分類できることがわかった。しかしながら、各植物園で同じ名前は付けられているのに chlB 遺伝子の塩基配列のタイプが異なっていたり、異なったラベル名が付されているのに塩基配列が同じタイプであるものが多く、日本の薬草園に栽培されている *Ephedra* 属植物の標本名には混乱が存在していることが明らかになった。そこで、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. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* と推定できる標本を選び、その chlB 遺伝子の塩基配列を解読した。その結果、内部構造学的に *E. sinica* と鑑定

された標本の chlB 塩基配列はすべて Type 1、同じく *E. intermedia* と鑑定された標本はすべて Type 2、さらに *E. equisetina* と鑑定された標本は Type 3 の配列を示した。

さらに、生薬標本を用いて検討した結果、市場品「草麻黄」(*E. sinica* を基原とする麻黄) および津村順天堂標本「草麻黄」の配列はいずれも Type 1 であった。また、第二次大戦中に木島正夫によって中国東北部で採取され、*E. equisetina* と鑑別された標本の配列は Type 3 を示した。

また、1960 年にネパールで採取された標本は、Type 4 を示した。

### (2) モノクローナル抗体の作製と高感度アッセイ系の構築

柴胡の saikosaponin a に特異的な Mab が得られ、他の saikosaponin は殆ど認識しないことが明らかとなった。本 Mab を用いて競合的 ELISA を確立した。本法によると 26 ng/ml から 1.5 µg/ml の範囲で正確な分析が可能ながことが判明した。また、旧来の HPLC 法による分析結果と良好な相関が得られ、信頼がおける分析法であることを証明した。

### (3) Senoside A 及び B に対する Mab を用いた同時分析キットの開発

一方幅広いクロスリアクションを持つ Mab によりトータル saikosaponin の分析法も同様に確立した。本法を用いて柴胡配合漢方薬中の saikosaponin a やトータル saikosaponin 含量を分析した。これらの分析値は HPLC で測定した値と良い相関が得られたことから、信頼がおける分析法であることを確認した。芍薬の paeoniflorin に対する Mab は paeoniflorin および arbutiflorin 両者を認識することが明らかとなった。そこで本 Mab を用いて paeoniflorin および arbutiflorin を同時分析する方法を開発した。本法により芍薬配合漢方薬や芍薬の paeoniflorin および arbutiflorin

分析した。本法により芍薬の品質評価が可能なことを明らかとした。

Sennoside A 及び B 分析用キットの作製に成功した。本キットは競合的 ELISA を応用しているので、sennoside A 及び B の量が多いとスポットの発色は薄くなり、逆に量が少ないと発色は濃くなる。本キットの検出限界は両化合物共に 125 ng/ml であった。本法を使ってタイ産 *Cassia* 属植物の資源探索を行った結果当然センナの含量が最も高かった。

## 7. GAP 追加基準作成の検討

我が国における薬用植物の栽培育成に関する文献を調査し、生育環境に関するデータを抽出し、データとする。また、文献が不足している植物に関しては、生産地および全国各地の薬用植物園の視察や生産者への聞き込み調査、ならびに過去および現在における生産地での生育状況のデータ収集を行い、データを作製した。項目としては薬事日報社「薬用植物栽培と品質評価」の区分に従い、以下のものをあげた。

### 1. 気候区分

#### 1) 気温に関するデータ

寒さの区分として、1月の平均気温が

- I. -6℃未満
- II. -6℃～-2℃未満
- III. -2℃～2℃未満
- IV. 2℃～6℃未満
- V. 6℃～10℃未満
- VI. 10℃以上

として表した。

暖かさの区分として、暖かさの指数（各月の平均気温の値よりそれぞれ 5℃ を引き、この値が負となるときは 0 としたときの総和）を採用した。

#### 2) 日照条件

- I. 50 時間未満

II. 50～100 時間未満

III. 100～150 時間未満

IV. 150～200 時間未満

V. 200 時間以上

2. 土壌区分 土壌分類として、以下の区分を採用した。すなわち、

- I. ポドソル性褐色土壌（針葉樹林帯の土）
- II. 酸性褐色森林土（落葉樹林帯の土）
- III. 黄褐色森林土（照葉樹林帯の土）
- IV. 赤黄色土（湿潤亜熱帯の土）

これらの項目に関してそれぞれの薬用植物の適応する区分を当てはめ、データとし表にまとめた。また、区分の設定は野生植物の生育適地の分布する範囲の中心部とした。

## E. 結論

サラシナショウマの発根は日数がかかり、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低温などの条件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さらに必要である。

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条件を探る。

寒冷地におけるマオウの生育を 4 年間調査した結果、4 年目の生育の増加は著しく、1 株当たり地上部乾物重から換算した 10a 当たり収量は約 414 kg と推定された。また、4 年目株の無機成分含有率と乾物重から計算した 10a 当たり施肥量は、窒素 9.6～10.7 kg、加里 9.7～13.6 kg、カルシウム 7.6～8.3 kg、マグネシウム 2.0 kg と推定された。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。

ハマボウフウは系統の違いに拘わらず冷蔵保存ができる見通しとなった。

冷蔵保存したハシリドコロ培養シュートから復元した植物を対照株とともにプランターで栽培し、2回目の収穫をして各種の形態学的な性質および根茎に含まれるアルカロイドを分析した結果、対照群との間に大きな差が認められなかったため、培養シュートの冷蔵保存が薬用植物の生殖質の保存法として使用できる可能性が高くなった。特に薬用植物の生命ともいえる有効成分の蓄積に関してもシュートの試験管内冷蔵保存は悪影響を及ぼさないことが明らかになったことは重要な知見である。

熱帯性の植物の冷蔵保存に関しては、冷蔵温度や保存中の培地の乾燥防止などいくつかの課題があることが示唆された。

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。

ベトナム産 *Achyranthes aspera* の成分検索および、当栽培試験場にて栽培試験を行っている日本産ヒナタイノコズチ *A. fauriei* Leveille et Vaniot およびマルバイノコズチ *A. fauriei* Leveille et Vaniot forma rotundifolia Ohwi との比較を行った結果、*A. aspera* に含有される ecdysteroid 類は ecdysterone であった。ヒナタイノコズチおよびマルバイノコズチに含有される ecdysteroid 類は数種類含有されているが両者の間に大きな違いは見られなかった。ヒナタイノコズチに含有される数種類の ecdysteroid 類は既に報告があるが、最も含量の多いのは ecdysone であった。*A. aspera* は成分的には *A. fauriei* と重複しており、トウゴシツ *A. bidentata* 等と同様、生薬牛膝として利用できる可能性がある。*A. aspera* か

ら単離された化合物 4 および 5 は、既に *A. fauriei* より単離報告のある achyranthoside A および F と考えられる。サラシナショウマの品質評価のための成分分析には TLC 法が簡便であるが、定量や多成分分析には HPLC 法より劣る。しかし、UV などで検出しにくい成分については TLC 法における硫酸発色が成分の検出に有効であることが示された。LC/MS/MS 法は非常に検出感度がよく、簡便で、検量線の直線性もよく、ダイナミックレンジも広いなど、定量分析に優れている。

*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。

芍薬と柴胡の薬理活性成分に対する Mab を用いて、簡便・高感度分析を可能とした。このことにより漢方薬や生薬の品質評価を簡便かつ高感度で、また有機溶媒を使用しない環境に優しい方法で行うことが可能となった。大黃の寫下活性成分である sennoside A 及び B の分析キットを完成させた。本キットは分析限界が 125 ng/ml であり、フィールドでの研究には好都合な手法と自負している。現在、国内での薬用植物の栽培は品目が限られているが、外国からの輸入が急に困難になることも十分に考えられ、国内栽培の早急な対応に迫られることを考慮しなければならない。栽培において最も重要な条件である栽培適地および土壌条件の検討は今後さらに続けていく必要がある。なお、土壌条件については、栽培の場合には適宜土壌の改良が可能であるため、参考とすべきである。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表