

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。(論文9)

芍薬の paeoniflorin に対する MAb は paeoniflorin および arbiflorin 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 arbiflorin 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 arbiflorin 含量を分析した。本法により芍薬の品質評価が可能なることを明らかとした。(論文6)

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 125ng/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。(論文5)

#### D. 結論

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。

大黄の瀉下活性成分である 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 125ng/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。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

#### 1. 発表論文

1. Waraporn Putalun, Noriko Fukuda, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Immunoaffinity column for isolation of bioactive compounds using monoclonal antibodies, *J.Liquid Chromatog.Related Technol.*, 25, 2387-2398, 2002 (Review)
2. Waraporn Putalun, Hiroyuki Tanaka, Toshiya Muranaka, Yukihiro Shoyama, Determination of aculeatisides based on immunoassay using a polyclonal antibodies against aculeatiside A, *Analyst*, 127, 1328-1332, 2002
3. Kiyoshi Noda, Kuniaki Tanaka, Akira Yamada, Jyunkio Ogata, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Simple assay for antitumour immunoactive glycoprotein derived from *Chlorella vulgaris* strain CK22 using ELISA, *Phytother.Res.*, 16, 581-585, 2002
4. K.Vengatajalabathy Gobi, Makoto Sasaki, Yukihiro Shoyama, Norio Miura, Highly sensitive detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and association constants of the interaction between PAHs and antibodies using surface plasmon resonance immunosensor, *Sensor Actuators B*, 89, 137-143, 2002.
5. Waraporn Putalun, Osamu Morinaga, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Development of one step immunochromatographic strip test for the detection of sennosides, *Phytochem.Analysis*, in press.
6. Zhaohua Lu, Osamu Morinaga, Hiroyuki

Tanaka, Yukihiro Shoyama, A quantitative ELISA using monoclonal antibody for survey of paeoniflorin and albiflorin in crude drugs and traditional Chinese herbal medicines, Biol.Pharm.Bull., in press.

7. Osamu Morinaga, Hiroyuki Tanaka, Sorasak Lhieochaiphant, Waraporn Putalun, Yukihiro Shoyama, Analytical system of pharmacologically active natural products, sennoside A and B by concurrent ELISA, a newly established eastern blotting and immunohistochemical staining using anti-sennoside A and B monoclonal antibodies, Anal.Chem., submitted.
8. Ppong Loungkratana, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Production of monoclonal antibody against ginkgolic acid in *Ginkgo biloba* Linn., Life Science, submitted.
9. Shu-hang Zhu, Shin-ichi Shimokawa, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Development of assay system of major biologically active saikosaponin a using anti-saikosaponin a monoclonal antibodies, Analyst, submitted.

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2002-291667

#### G. 特許出願

##### 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2002-291666

##### 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

自然環境における薬用植物栽培保存法の研究

分担研究者 神田博史 広島大学医学部総合薬学科

平成8年（1996）以来、全国の薬用植物関連研究者 10 数名が広島県佐伯郡吉和村において薬用植物の自生調査、自然保存活動、資源保存園の整備に取り組んでおり、吉和村冠山近傍での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。医薬品開発材料としての利用を図るためには薬用植物資源を守ることが必須であり、自然と調和した資源の利用を行う時代である。

吉和の自然

広島県の植生調査は古くは 1910 年ころに始まり、牧野富太郎、田代善太郎先生など数多くの報告がある。

中国地方は東中国と西中国に分かれ、中国山地によって北の日本海側の山陰地方と瀬戸内海側の瀬戸内地域に分けられる。県北の山間部にブナ林が点々と残り、落葉広葉樹林帯には日本海側と太平洋側の植物が主に見られ、さらにシコクスミレなどの四国要素の植物もある。また、ブナ林には亜高山性の植物も時々見られる。県北中央部の庄原市近くには蛇紋岩性の特異な植物相をなしている地域もある他湿原群も見られる。このほか、県西部には襲速紀(そはやき)要素といわれる九州、四国、紀伊の中央部に見られる植物群が存在し、岡山県境には阿哲(あてつ)要素といわれる朝鮮半島や中国大陸に起原をもつものが多く見られる。島嶼部の社そうにはシイノキ林が目立つほか、南

方要素の北限に近い物もある。このため広島県の植生は非常に豊かである。

吉和村は西中国山地の山塊の中に位置し、広島、島根、山口三県の県境にあり、瀬戸内文化圏にありながら山陰文化の影響も強く受けている。村域は 145 ㎢あり、北と西は 1000m 以上 1300m 台の山が囲み、南西には 900m から 1000m 台の山が並ぶ。この山々から流れ出る緒水を集めて、吉和川が南西から北東に向かって中央を流れる。居住区は川の両域標高 500m から 800m の間に広がっている。西の 800m 前後の地域は高原性を帯びており冠高原と通称し、中央は吉和盆地と通称する。北の 500m の低地帯は昭和 13 年に建設された立岩ダムによって水没した。当村の中心域は緯度的には広島市の飯室や白木町辺りになるが地形的にも気候的の類似性は少ない。むしろ等温線を辿ると県北部の高野町や比和町に結ばれる。降雨量は芸北町八幡と共に県下

最高の 2400mm 前後である。年平均気温は沿岸部に較べて 5℃前後低いが特徴的なのは最低気温であり、沿岸部と 20℃前後低い日もある。根雪になって、山では 4月5月になっても消えない年もある。

吉和村の地質は吉和川以東は花崗岩で被われ、以西はその類と共に、北半は水成岩系の粘板岩、南半は緑色岩で新しい第四紀のものが多い。冠山周辺には先史時代の石器が埋蔵していることが分かっているし、ほぼ二万年前には冠山が二度以上爆発している。

吉和村は植物学にいう森林群落では約 900m 以上の高地部は冷温帯に属し、低地部や南半は中間温帯域とされている。冷温帯のブナ群落はその代表で日本の南西限ともいわれたが今はブナーミズナラの二次群落林となり、これも最近の伐採で次第に丸裸にされつつある。本州の冷温帯林は日本海側と太平洋側でその植生が大きく異なることが知られているが、冠山山地では一般に両者の特徴を合わせもった植生となっている。

冠山北部の八郎川域にある天然杉はハチロウ杉と呼ばれ、杉の自然植生としては注目される。ハチロウ杉は中井博士が京都大学芦生演習林内に野生するスギに基づき命名されたもので下枝が下垂して根を生じ、それが新株として成長して行く性質をもっている。中間温帯林は潜在植生的にはイヌブナ林や、モミーツガ林となるが、吉和村ではアカマツコナラ或いはクヌギーコナラ等の二次林となっている所が多い。一方、河川の周辺には独特の植生が認められ、細見谷、中津谷の溪谷にはサワグルミやトチノキが繁

り、冠高原や下吉和川域にはハンノキ林や中間湿原および低層湿原のような湿地帯がある。このような要因により、吉和村は独特の風土と文化を形成してきた。

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の数である。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(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。襲速紀(そはやき)要素の植物であり中四国地方で初めての発見となり、植物関係者への学術的材料提供となった。

さらに、これまで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した。

#### 吉和で見かける薬草

漢方薬；主に漢方処方に配合される薬草。  
民間薬；主に生活の知恵の言い伝えとして使われる薬草。

アオキ 葉 民間薬

葉は弱火で炙って火傷、はれもの、おできに塗る。

丸剤の光沢を増すために添加。

アカネ 根；茜草根(せんそうこん) 民間薬

腎臓病、月経不順に用いる。根は黄赤色で、榮華の色である茜色、黄色染料として有名。

アカメガシワ 樹皮,葉 民間薬  
苦く胃酸過多、胃潰瘍の治療。下痢に用いる。葉は腫れ物に外用。葉及び種子は赤色染料。

アケビ 茎；木通(もくつう) 漢薬用  
漢方では腎障害、慢性湿疹に処方。ツルは陶芸細工。果実は食用ミツバアケビは実が付き易い。

アマドコロ 根茎；萎ズイ(いずい) 漢薬用  
漢方や民間薬として精力減退に服用。トコロに似て甘い。打撲に剃ったものを外用。

イカリソウ 地上部；淫羊 (いんようかく) 漢、民間薬

精力減退に服用。「仙靈脾酒」の名で薬用酒。いずれのイカリソウも薬用であるが中国産はホザキイカリソウ。吉和村のイカリソウはコイカリソウとされる。

イタドリ 根；虎杖根(こじょうこん) 民間薬

民間では緩下、腎障害に服用。傷みをとる草からイタドリ。無機塩が多いので灰汁抜きをして食用。

イチイ 葉；一位薬 民間薬  
民間では腎障害に服用。カキドオシ、タラと併用すると良い。最近樹皮から抗癌物質発見、国産イチイでは微量。

イノコヅチ 根；牛膝(ごしつ) 漢薬用  
漢方では婦人病、腎障害に処方。ヒカゲイノコヅチ、ヤナギイノコヅチともに薬用

イワタバコ 葉；岩チシャ。民間薬  
民間では胃腸病に飲む。若葉を茹でてお浸しや和え物に良いとある書もあるが採集は考えもの。

ウコギ 根皮；五加皮(ごかひ) 漢、民間薬

漢方では更年期障害、精力減退に処方。救荒植物として生け垣にもされる。コシアブラと共に新芽は山菜。

ウツボグサ 花穂；夏枯草(かごそう) 漢,民間薬

花が咲き終わった頃の花穂を漢方では腎障害、尿路疾患、腫れ物に処方。白花種も薬用。

ウド 根；独活(どっかつ) 漢薬用  
漢方では頭痛、発熱、五十肩、リュウマチに処方。中国の独活はシシウドの類。

若芽、茎は春の山菜の王。

ウラジログシ 葉 民間薬  
葉は民間で、尿路結石や胆石に用いる。この他のカシ類の葉も代用になる。

ヤマエンゴサク 塊茎；延胡索(えんごさく) 漢薬用

漢方では胸やけ、鎮痛を目的とした神経性胃炎に処方。有毒性があるので要注意。

セリバオウレン 根茎；黄連(おうれん) 漢薬用

漢方では神経症、食欲不振、熱証に処方。二日酔いにも良いが高価なため尻込み。黄色で横長の根茎は苦い。。

オオツツラフジ 茎、根茎；防已(ぼうい)。 漢薬用

漢方では排尿困難、神経痛、関節炎に処方。アオツツラフジは同目的には使わない。

オオバコ 地上部；車前草(しゃぜんそう) 種子 漢、民間薬

漢方では主に種子(車前子)を排尿困難に処方。民間では咳、痰、のどの腫れに服用。

オケラ 根茎；白朮(びやくじゅつ) 漢、民間薬

漢方では食欲不振、胃腸障害、吐き気止めに処方。屠蘇散にも配合。若芽は山菜。オトギリソウ 地上部；小連翹(しょうれんぎょう) 漢、民間薬

民間では切傷に外用。神経痛には服用するが皮膚過敏症、他薬を飲んでいる人は要注意。

オニノヤガラ 根茎；天麻(てんま)。 漢、民間薬

漢方では神経衰弱、頭痛に処方。ジャガイモに似ているため時に偽物として出ることがある。

オミナエシ 根；敗醬根(はいしょうこん) 漢、民間薬

民間では排尿困難、腫れ物、おできに服用。市場品は多種多様。漢名の意味する特異な臭い。

カキ 蒂；柿蒂(してい)、葉、渋 漢、民間薬

漢方ではしゃっくりに処方。民間では葉をお茶にして血圧が気になる人が飲む。渋は腹痛、切傷など多用。

カキドオシ 地上部；連銭草(れんせんそう) 民間薬

民間では排尿困難、糖尿病、腎臓結石や子供の爛に服用するため爛取り草。イチイ、タラ根皮と併用すると良い。

ガマ 花粉；蒲黄(ほおう) 漢、民間薬  
漢方及び民間で出血、炎症、切傷、火傷に煎液を塗布するか粉末直接散布。因幡の白兎で実証済み。

カワラナデシコ 種子；く麦子(くばくし) 漢、民間薬

漢方、民間で排尿困難、浮腫に服用。多用には注意とある。カラナデシコも薬用。秋の七草。

キキョウ 根；桔梗根(ききょうこん) 漢、民間薬

漢方では去痰、扁桃炎や化膿性の腫れに処方。民間では強壯に食用。若芽は山菜として美味。秋の七草。

キササゲ 果実；梓実(しじつ) 民間薬  
民間では浮腫み、膀胱炎、排尿困難に服用。利尿にはトウモロコシの毛と結石にはウラジロガシと併用すると良い。

キハダ 樹皮；黄柏(おうぱく) 漢、民間薬

漢方では胃炎、のぼせなどの熱証に処方。民間では打撲に粉末に食酢を加え外用。二日酔いには粉末。

キンミズヒキ 全草；竜牙草(りゅうがそう) 民間薬

民間では下痢、腹痛、かゆみ、ただれに服用。口内炎にはうがい。

ミズヒキはタデ科で非薬用。

クコ 葉；枸杞葉(くこよう)、果実、根皮 漢、民間薬

葉は滋養強壯に服用。果実は枸杞子(くこし)、疲労回復や血圧降下に服用。根皮は地骨皮(ちこっぴ)、消炎に服用。食用。

クサギ 葉 民間薬

民間で下痢、胃もたれに服用。痔や腫れ物には煎液を患部外用。クサギ菜と称し、灰汁抜きして食用。。

クズ 根茎；葛根(かっこん) 漢、民間薬

漢方では肩凝り、発熱悪寒に処方。葛餅、葛湯など重宝。葛花は二日酔い止めによし。春に若芽が美味。

クララ 根；苦参(くじん) 漢、民間薬  
漢方では胃潰瘍に処方。皮膚病、たむし、  
ただれには外用。蟲の殺虫剤として散布。  
有毒性なので服用には注意。

クロモジ 根皮、茎、葉 民間薬  
根皮は胃腸炎や脚気に服用。捻挫には茎  
葉を外用。抜け毛やふけ取りにはアルコ  
ールエキスをつける。茎は爪楊枝。香料  
剤。

クロフネサイシン 根茎 漢薬用  
同類のウスバサイシンの根茎は細辛(さい  
しん)。漢方では気管支炎、鼻炎に処方。  
四国、九州に見られる本植物の発見は注  
目。

クワ 根皮；桑白皮(そうはくひ) 漢、  
民間薬  
漢方では炎症、咳に処方。民間では葉や  
果実を精力減退、咳に服用。食える葉か  
らクワ、実は美味。

ゲンノショウコ 地上部；現の証拠 民間  
薬  
民間で下痢止めに服用。浸剤(軽くお湯だ  
し)にすると便秘改善によい。腫れ物、し  
もやけには浴用剤。

サラシナショウマ 根茎；升麻(しょうま)  
漢、民間薬  
漢方では炎症、痔、皮膚炎に処方。ユキ  
ノシタ科のショウマ類は代用にならない。  
サルトリイバラ 地下部；山帰来(さんき  
らい) 漢、民間薬  
漢方では炎症、慢性皮膚炎に服用、外用、  
浴用剤。広島では柏餅の葉。中国では土  
茯苓(どぶくりょう)とも言う

サンショウ 果皮；山椒(さんしょう)  
漢、民間薬  
漢方では胃腸障害、駆虫、冷え症に処方。

葉、果実は食欲増進に香辛料。イヌザン  
ショウは非代用。

スイカツラ 蕾み；金銀花(きんぎんか)  
漢、民間薬

漢方では化膿性湿疹に処方。民間では排  
尿困難、咽の痛みに服用。腰痛に浴用。  
茎葉は忍冬(にんどう)と称し同様に薬用。

スギナ 茎；問荆(もんけい) 民間薬  
民間では排尿困難に服用。ウルシかぶれ  
には外用。ツクシは代用にはならない。  
無機塩が多いので結石に注意。

センブリ 全草；当薬(とうやく) 民間  
薬  
民間では胃腸障害、二日酔いに服用。防  
虫剤として外用。最近、養毛剤として注  
目。当(まさ)に薬で当薬。

セイヨウタンポポ 根；蒲公英(ほこうえ  
い) 民間薬  
民間では胃腸障害、乳腺炎、便秘に服用。  
他のタンポポ類も同様。タンポポコーヒ  
ーも出回っている。

ダイコンソウ 全草；水楊梅(すいようば  
い) 民間薬

民間では排尿困難、浮腫み、腫れ物の炎  
症、下痢に服用。皮膚病には外用。

タムシバ 蕾；辛夷(しんい) 漢薬用  
コブシの蕾と同様に日本産の辛夷(しん  
い)。漢方では蓄膿症、鼻炎、それに伴う  
頭痛に処方。

タラノキ 根皮；タラ根皮 民間薬  
民間では糖尿病気味、高血圧気味、胃腸  
障害に服用。樹皮も薬用となるが効果は  
減弱。ウドメ、ウドモドキで山菜。

ツリガネニンジン 根；沙参(しゃじん)  
漢薬用  
漢方では精力減退や咳、痰に処方。ツル

ニンジンと同様にオタネニンジンの代用。  
トトキの名で山菜。

ツルニンジン 根は党参(とうじん) 漢  
薬用

漢方では精力減退に処方。種子に翼があ  
りジイソブの別名。翼のないバアソブも  
同様。オタネニンジンの代用。

ドクダミ 地上部；十葉、重葉(じゅうや  
く) 民間薬

民間では排尿困難、胃腸障害、皮膚炎に  
服用。皮膚炎には生の葉を揉んで外用。  
腫れ物、湿疹には浴用剤。

トチノキ 葉、樹皮 民間薬

民間では主に葉、樹皮を皮膚炎、蕁麻疹  
に使用。しもやけ、水虫には葉、種子の  
煎液を塗布。種子を晒してトチ餅。

トチバニンジン 根茎；竹節人参(ちくせ  
つにんじん) 漢,民間薬

漢方では胃腸障害、咳、痰に処方。民間  
では養毛剤としてアルコールエキスを塗  
布。

ナルコユリ 根茎；黄精(おうせい) 漢、  
民間薬

漢方、民間で精力減退に服用。黄柏粉と  
混ぜたものを捻挫、挫傷に塗る。オオナ  
ルコユリも同様に使う。

ナンテン 果実；南天実(なんてんじつ)  
民間薬

民間では咳に服用。有毒性があるため特  
に妊婦は要注意。難を転じる意で難転。

ニガキ 木部；苦木(にがき) 漢、民  
間薬

民間で胃腸障害に服用。とにかく苦い。  
農作物、家畜の殺虫、殺蠅に使用。

ニワトコ 枝；接骨木(せつこつぼく)  
民間薬

民間で浮腫み、炎症、打ち身に服用。打  
ち身や捻挫には外用。多量の服用には注  
意。

ヌルデ 虫こぶ；五倍子(ごばいし) 漢、  
民間薬

ヌルデノミミフシアブラムシの造った虫  
こぶ。下痢止めに使用。止血には粉末を  
塗る。皮なめしやインク製造に使用。

ネムノキ 樹皮；合歡皮(ごうかんひ) 漢、  
民間薬

漢方では不眠、鎮静に用いる。民間では  
関節炎、腰痛、打ち身に服用ないしは外  
用。

ノイバラ 果実；菅実(えいじつ) 民  
間薬

民間では便秘に服用。多用に要注意。テ  
リハノイバラも同様。花は香水の原料。

ヒカゲノカツラ 胞子；石松子(せきしよ  
うし) 民間薬

民間では湿疹に塗布。製剤用で丸剤の丸  
衣。トウゲシバ、スギカズラ、マンネン  
スギの胞子も同様に使用。

ヒキオコシ 地上部；延命草(えんめいそ  
う) 民間薬

民間では胃腸炎、下痢に服用。目の覚め  
るほど苦くて立ち所に回復。近縁のヤマ  
ハッカは非代用。

ホオノキ 樹皮；厚朴(こうぼく) 漢、  
民間薬

漢方では不安神経症、神経性胃炎に処方。  
中国産厚朴は別種。細工物、朴葉みそ、  
朴葉下駄。

マタタビ 虫こぶ；木天蓼(もくてんり  
ょう) 民間薬

マタタビアブラムシの虫こぶ。民間では  
精力減退に服用。ネコにマタタビ、猫も



精力旺盛。キュウイはシナマタタビ。

マツブサ 茎 民間薬

浴用剤として保温、鎮静。名は幹がマツに似る、切り口がマツのにおいがするため。

メギ 茎,根(目木,小檗(しょうばく))

民間薬

民間では胃炎に服用。目の充血や結膜炎に洗眼液。黄柏と同じ黄色成分。染料。

メグスリノキ 樹皮、木部 民間薬

民間では樹皮を煎じて洗眼液とする他、肝障害に用いる。肝臓障害は目に出るといふ漢方理論。

ヤマシャクヤク 根；山芍薬 漢薬代用

嘗てはシャクヤク(芍薬)の代用として使ったこともある。中国輸入品の赤芍の一種。採集はひかえたい。

ヤマノイモ 根茎；山薬(さんやく) 漢、

民間薬

漢方では精力減退、栄養補給に処方。ムカゴも美味の自然薯。食用として多用。有毒性のトコロは互生。

ユキノシタ 葉；虎耳草(こじそう)

民間薬

民間では子供の引きつけに服用。腫れ物、虫刺されには外用。テンプラにすると美味。

ユズリハ 葉、樹皮 民間薬

駆虫、リュウマチに使用。日本海側のエゾユズリハも同様。有毒性のため要注意。

ヨモギ 葉；艾葉(がいよう) 漢、

民間薬

民間、漢方で出血性疾患、痔、皮膚炎に服用、民間では胃炎、貧血に服用、あせも、腰痛に浴用。モグサ原料。

リンドウ 地下部；龍胆(りゅうたん) 漢、

民間薬

漢方では消化器疾患や尿路疾患に処方。確かめてはいないが龍の胆のごとく非常に苦いため民間では胃炎に服用。

ワサビ 根茎；山葵 民間薬

民間で食欲増進。防腐効果は食品業界で有用。日本を代表する香辛料。チューブ入りの山葵はワサビダイコン。

ワレモコウ 根茎；地榆(ちゆ) 漢、民間薬

民間で下痢に服用、出血に外用。モンゴル地区では花部を腹痛に服用。

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

分担研究者 下村講一郎 東洋大学生命科学部

A. 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、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困難であるため、本邦産ムラサキの個体数は激減し、現在では絶滅危惧種ⅠB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。本実験では、このような絶滅危惧種であるムラサキを保存することを目的とし、日本各地に自生しているムラサキの種子を採種し、培養系を確立し、培養系における各地産ムラサキの形態および生育を比較した。さらに、これらの生育地の異なるムラサキの最適なvitrification法を用いた超低温保存法の構築を行うことを目的とした。

B. 材料および方法

東北地方（岩手県松尾村、岩手県安代町、青森県十和田市、宮城県仙台市）産の種子を入手し、種子を75 % EtOHに10秒間浸漬し、滅菌水で1回洗浄後、2 %次亜塩素酸ナトリウム（0.1 % v/v Tween 20添加）で10分間殺菌後、滅菌水で3回

洗浄し、素寒天培地（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をクロロホルムで抽出し、クロロホルムを留去後、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。

長野県茅野市および韓国産は、培養シュートとして維持している。これまでの研究で、長野県産培養ムラサキシュートについて、超低温保存条件で良好な再生率を得たので、その条件を用いて韓国産、東北地方産においても検討した(Fig. 1)。暗所、25°C、MS固形培地にて1ヶ月間培養した各シュートの頂芽を用いて実験を行った。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（1 M 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。

C. 結果および考察

### ①東北地方産ムラサキの比較

東北地方産の種子および培養系の形態的特徴を比較した。入手したムラサキの種子の外部形態は、岩手県松尾村産、岩手県安代町産は、あめ色を呈しているものが多いが、青森県十和田市産はあめ色と白色が半分ずつ、宮城県仙台市産は、全て白色を呈していた。今回入手したムラサキの種子は産地によって種皮の色調が異なることが判明した (Fig. 2)。

種子を滅菌処理し、発芽した無菌植物体は培養約2週間後の形態は、松尾村、十和田市、仙台市産は子葉が楕円形であったが、安代町産のみ子葉にくびれが観察された (Fig. 3)。岩手県松尾村産と岩手県安代町産は、地理的には近いが、形態的には違いがあることが判明した。

種子を滅菌処理し、約4週間後、発芽率を調べた。全体的に発芽率は約30%と低い、松尾村産は特に約5%と低い結果であった (Fig. 4)。採取した種子の発芽率が低かったことより、保存した種子からの栽培はかなり難しいことが判明した。

各地産ムラサキシュートを暗所、25℃、MS固形培地にて、5週間培養し生育について比較した (Fig. 5)。仙台市産を除いては、シュートの生育は良好で大きな違いは認められなかったが、仙台市産では発根数は多いが、シュートの分枝が他の産地より少なく、生育は不良であった。

各地産培養ムラサキシュートのシコニン生産能を調べるため、莖表面に蓄積した赤色色素を抽出し、新鮮重量当たりのシコニン誘導体含量を調べた。松尾村産clone No. 5あるいは松尾村産clone No. 8が約0.13%と高いシコニン誘導体含量であり、十和田市産clone No. 18が約0.02%と低いシコニン誘導体含量であった (Fig. 6)。このように、産地、cloneによって違いがあることが明らかとなった。

### ②各地産ムラサキの超低温保存

これまでの研究で、長野県産培養ムラサキシュートについて最適な超低温保存条件を確立したので、この条件を用いて韓国産、東北地方産においても検討した。材料としたのは、暗所、25℃、MS固形培地にて1ヶ月間培養したシュートの頂芽を用いて実験を行った。頂芽を3mmに切り出し、前培養、loading solution、PVS2 (60分間) 処理し、液体窒素中で3日間保存した。その後、急速解凍、洗浄、再培養を行った。長野県産において最適であったこの手法で、各地産ムラサキについて検討した。

長野県産において最適であったPVS2処理時間60分間で各地産について検討した結果、韓国産と十和田市産clone No. 8では、約60%と高い再生率が得られたが、仙台市産clone No. 4では再生率は約8%と低い値であった (Fig. 7)。このように超低温保存条件が同じであるにもかかわらず、産地だけでなく、cloneの違いによっても再生率の違いがあることが判明した。

産地あるいはcloneによりシュートの再生率に差があることが判明したので、生育の良好な松尾村産clone No. 7を用いて超低温保存における最適な手順を構築するために、各処理段階の再生率に対する影響を検討した。前培養処理のみを行い、洗浄、再培養したとき再生率は100%、同様にloading solution、PVS2処理20分、30分間で検討したとき、再生率は90%以上と良好であった。しかし、液体窒素保存後、再生率が急激に低下した (Fig. 8)。これは、液体窒素保存前までの各処理は、細胞に対して阻害的な影響はないことを示唆している。しかし、液体窒素に入れることで再生率が大幅に低下しており、この原因は脱水が十分ではなかったためと考えられる。

そこで、シュートの脱水処理時間について検討した。PVS2処理時間を30~105分間で、検討し

た結果、脱水処理時間を長くすると、シュートの再生率は60分間処理まで上昇し、脱水は再生率に大きく影響していることが判明した(Fig. 9)。しかし、60分間処理以上では再生率に大差はなく、105分でまた少し再生率は上がったが、簡便な方法としてvitrification法を行っていることから、105分間もの処理は簡便ではないと考えられるため、以後は60分間前後で検討した。

生育の良いclone (安代町産clone No. 14、十和田市産clone No. 8、韓国産) についてPVS2処理60分間前後で残りの産地について検討した。安代町産clone No. 14では、PVS2処理60分間以上で約50%以上の再生率、十和田市産clone No. 8では、PVS2処理60分間以上で約60%以上の再生率であった(Figs. 10, 11)。韓国産では、PVS2処理60分間以上で約70%以上の再生率が得られた(Fig. 12)。この結果から、各地産いずれもPVS2 60分間以上で約50%以上の再生率が得られたことから、PVS2 60分間の処理は有効な方法であると考えられた。

ところで、超低温保存においては長期間の保存が可能かということも、検討する必要がある。そこで、1年間液体窒素中で保存した長野県産ムラサキシュートを再培養し、再生率を確認した。その結果、1年後の再生率は約40%と若干低下はしているが、長期保存が可能であることが示唆された。

#### D. 結論

東北地方産ムラサキの特徴は、

- ① 種子は産地によって種皮の色調が異なっていた。
- ② 発芽率は全体的に低い、松尾村産は特に低い値であった。
- ③ 安代町産のみに、子葉にくびれが観察された。
- ④ 培養系においては、仙台市産のみ生育が不良

であった。

⑤ シコニン誘導体含量は、産地、cloneによって違いがあった。

そこで、このように各地産で多様性を示す東北地方産および韓国産ムラサキを長期間保存することは非常に重要と考えられる。

培養ムラサキシュートの超低温保存について検討し、

① 産地、cloneによって違いはあるが、PVS2処理60分間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、各地産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。

② 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。

以上のことより、vitrification法によるムラサキの超低温保存が可能になったことは意義深く、絶滅危惧植物ムラサキの有用な形質を保存する道が開かれたと考える。

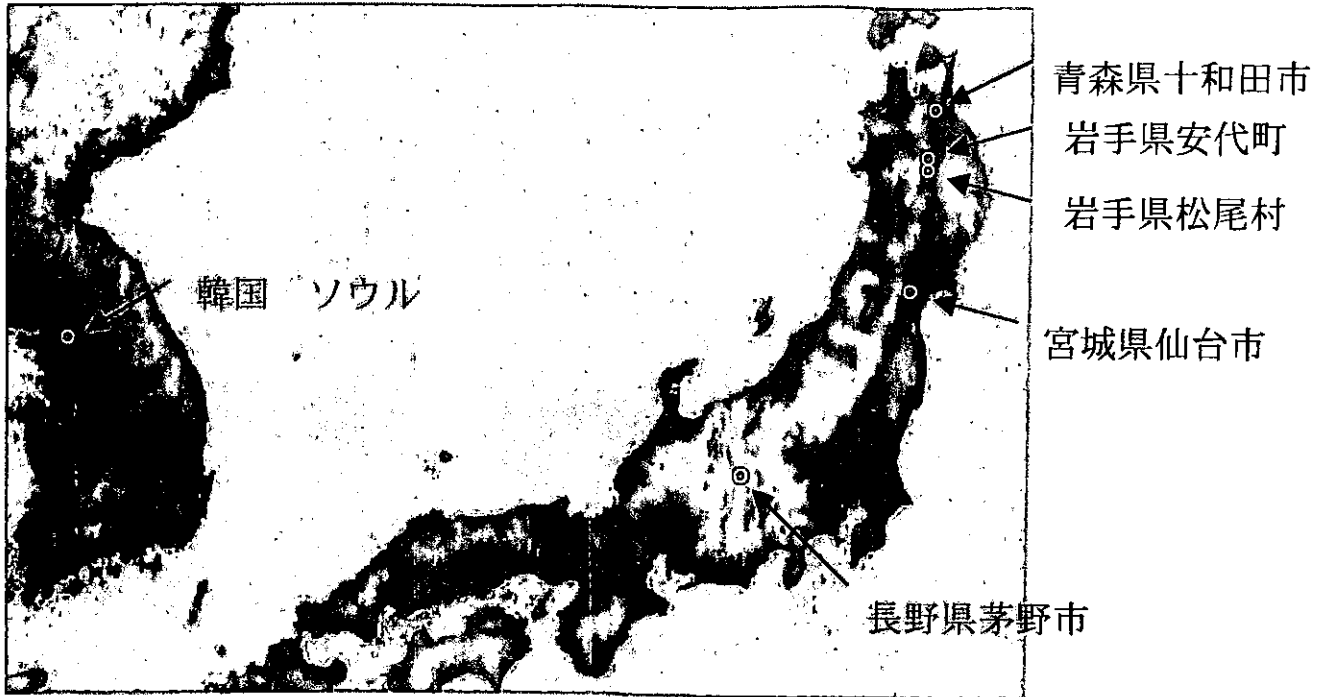


Fig. 1 実験に使用した各地産ムラサキ

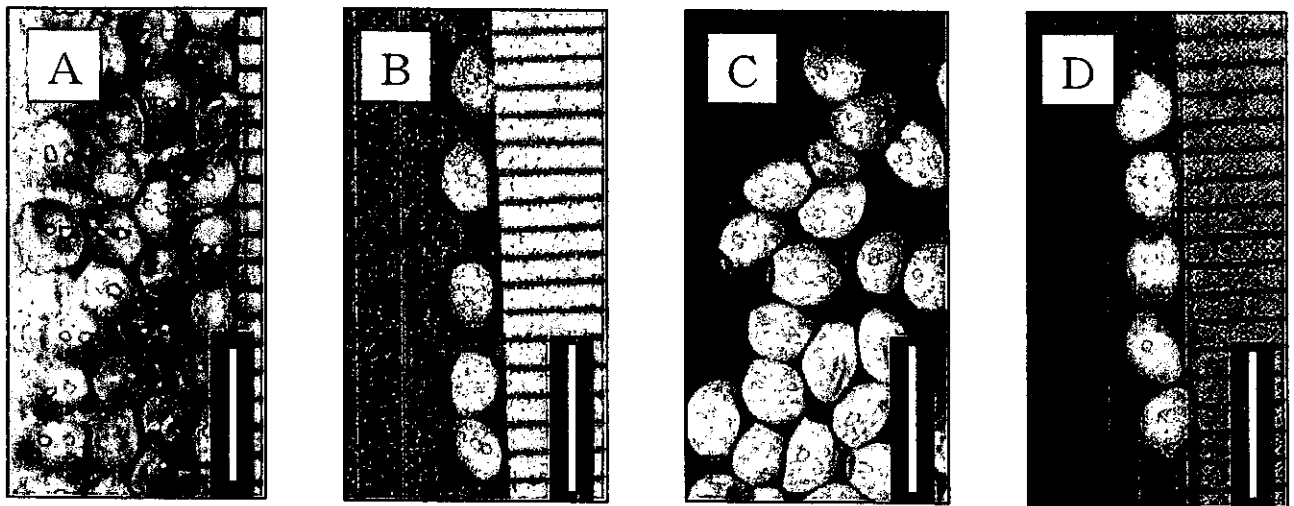
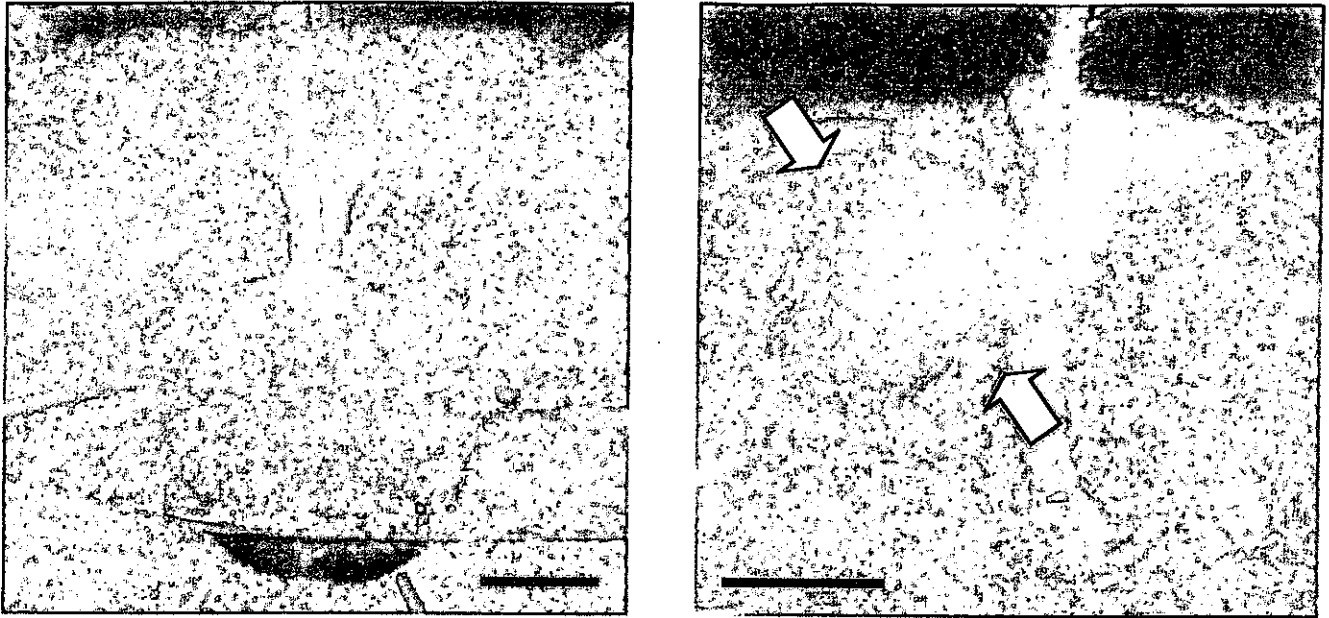


Fig. 2 実験に用いた各地産ムラサキの種子

- A. 岩手県松尾村産    B. 岩手県安代町産  
 C. 青森県十和田市産    D. 宮城県仙台市産



宮城県仙台市産 (Bar: 3 mm) 岩手県安代町産

Fig. 3 発芽植物体の子葉の形態差異

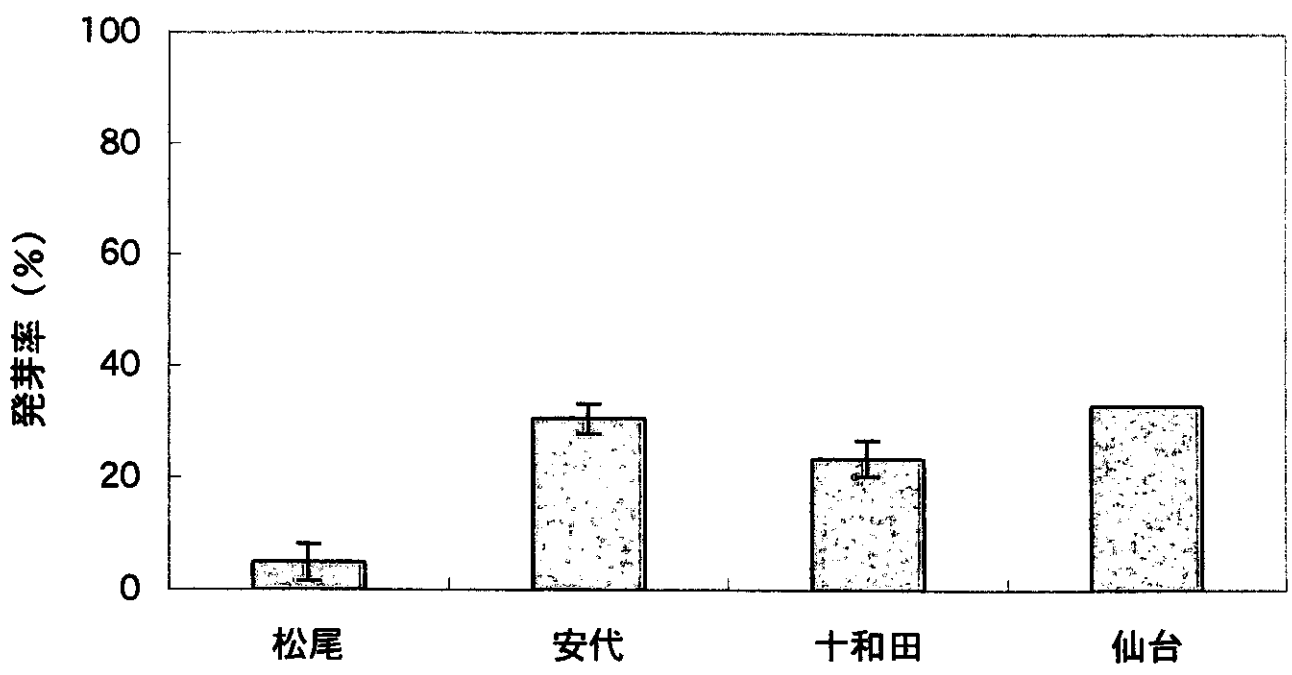


Fig. 4 東北地方産ムラサキの発芽率

滅菌処理後、素寒天培地にて発芽したシュートをMS固形培地に移植し、14時間照明下、25℃にて2週間培養した。

Bar: 標準誤差

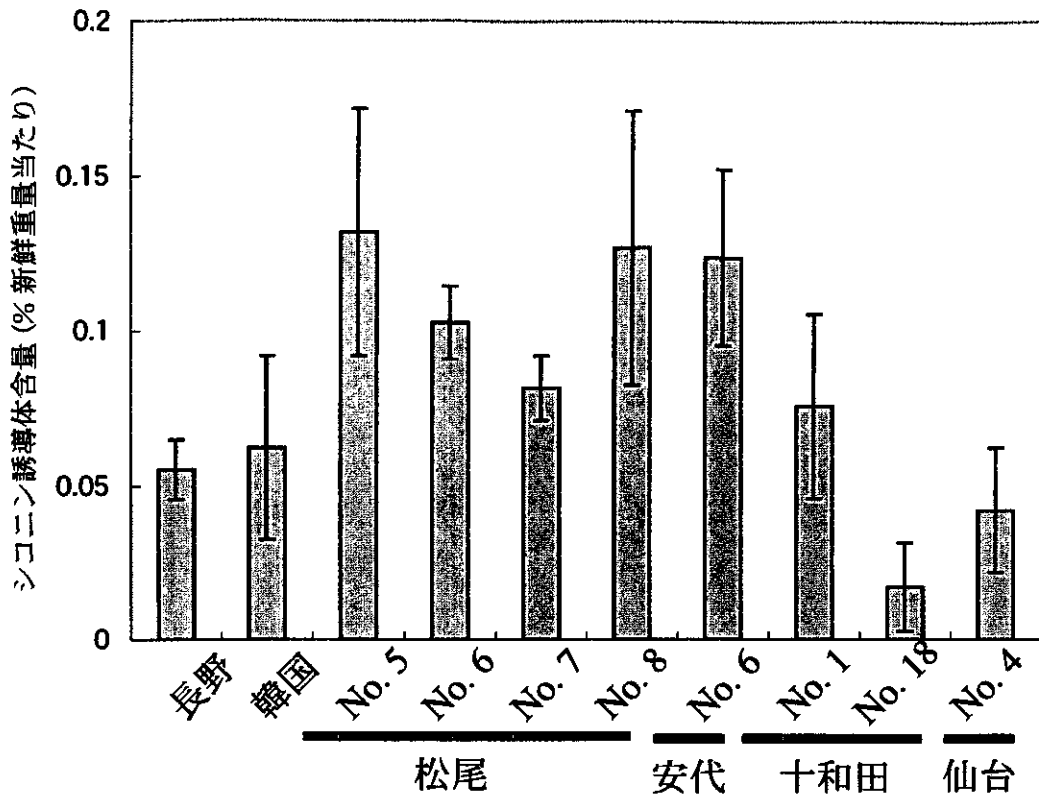


Fig. 6 各地産ムラサキのシコニン誘導体含量の比較

シュートをMS固形培地で暗所、25℃にて5週間培養を行った。各地産の末尾の数字はclone No.を示す。

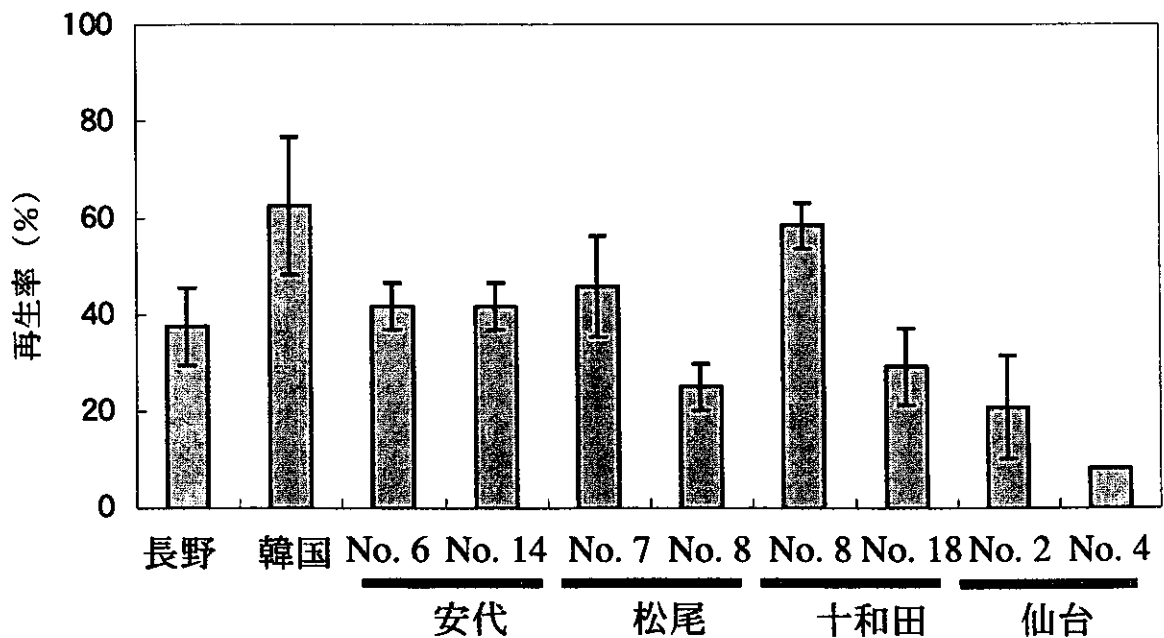


Fig. 7 各地産ムラサキをPVS2 60分間処理したときの再生率

各地産ムラサキを材料に、長野県産ムラサキシュートはPVS2処理時間が最適であった60分間にて検討した。

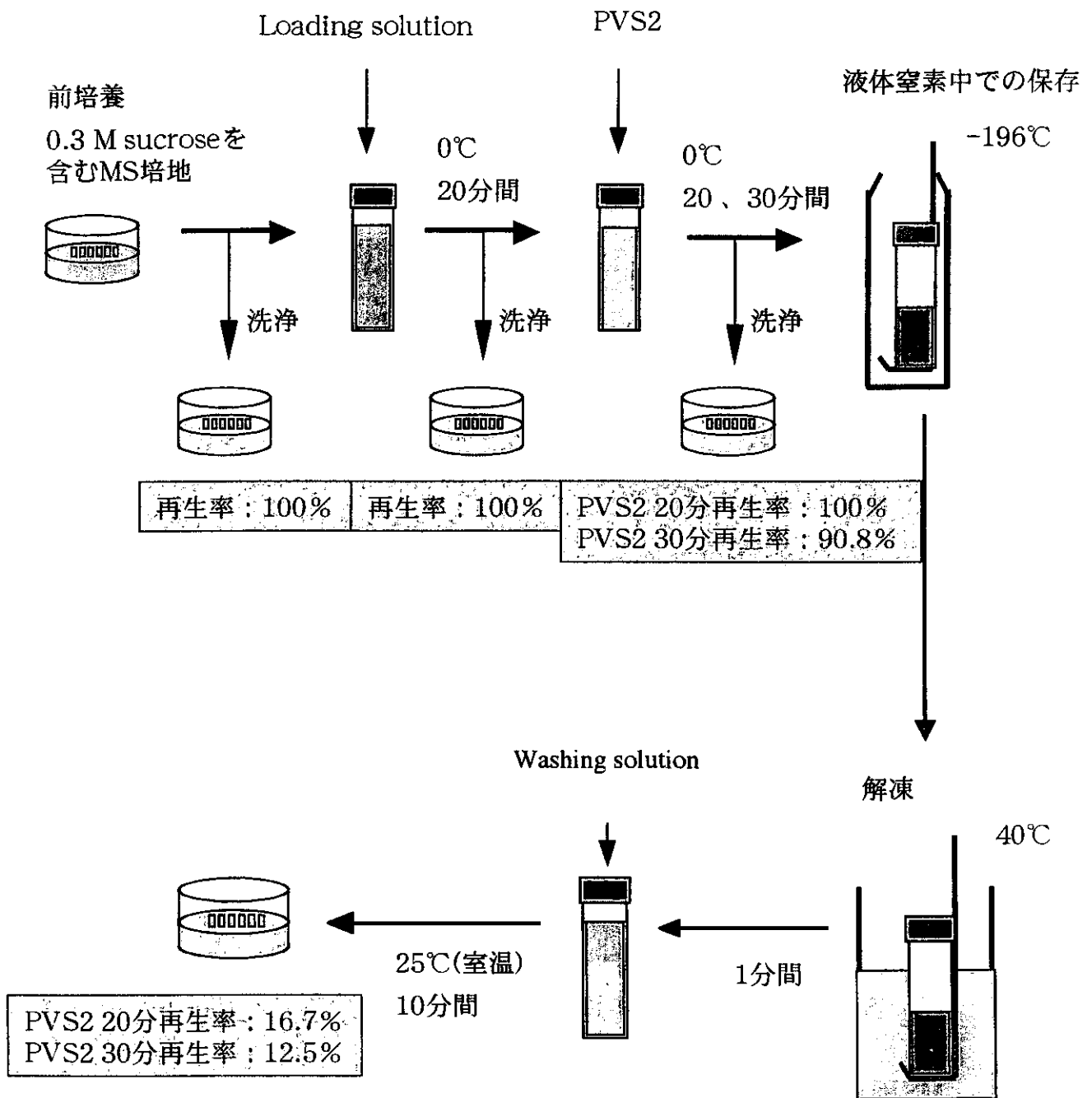


Fig. 8 松尾村産clone No. 7培養ムラサキシュートを用いての各処理段階におけるシュートの再生率



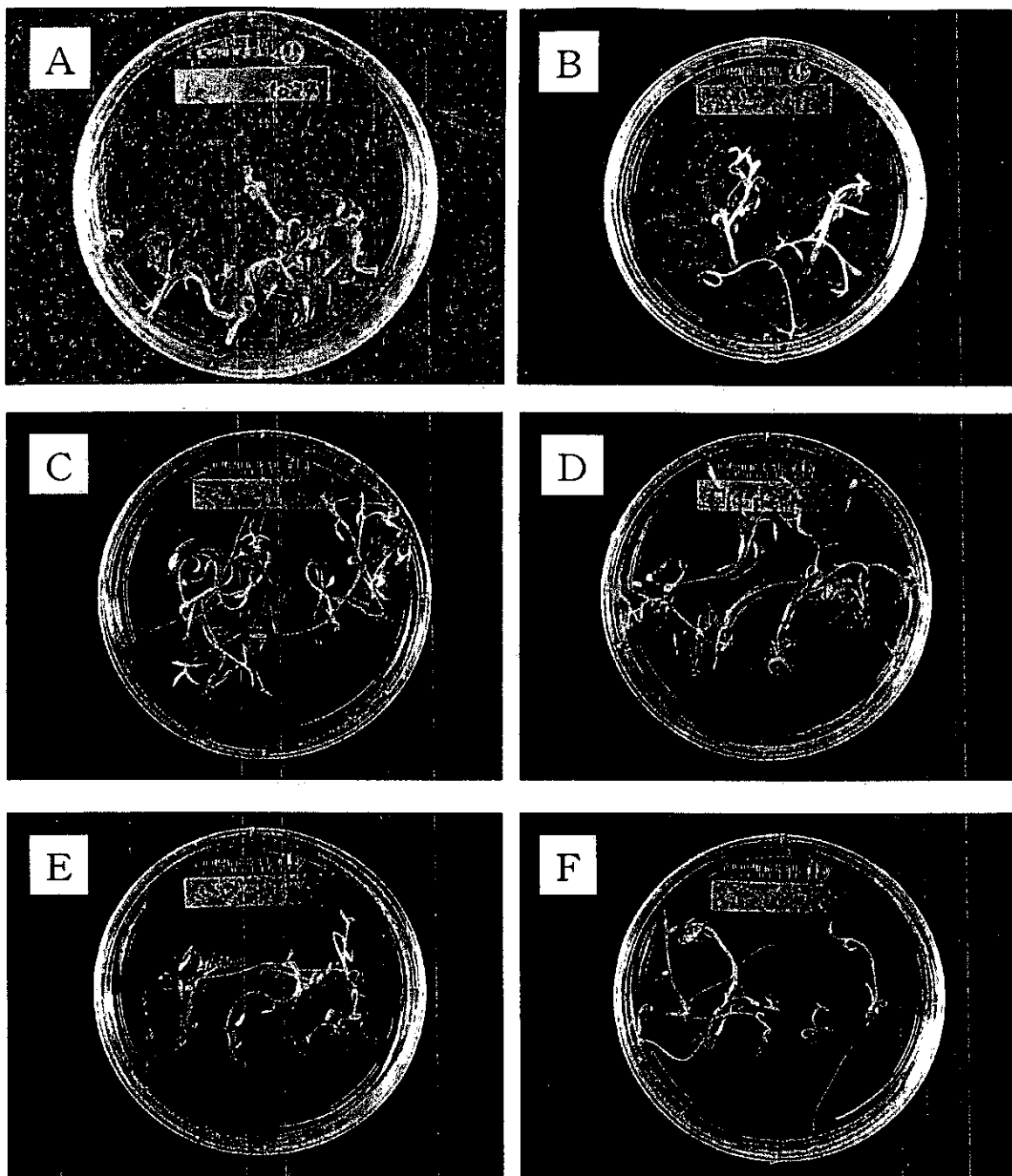


Fig. 5 実験に用いた各地産ムラサキの培養シュート

MS固形培地、暗所、25℃で約4週間培養した。

- A. 長野県茅野市産
- B. 韓国ソウル産
- C. 岩手県松尾村産 clone No. 7
- D. 岩手県安代町産 clone No. 14
- E. 青森県十和田市産 clone No. 8
- F. 宮城県仙台市産 clone No. 4

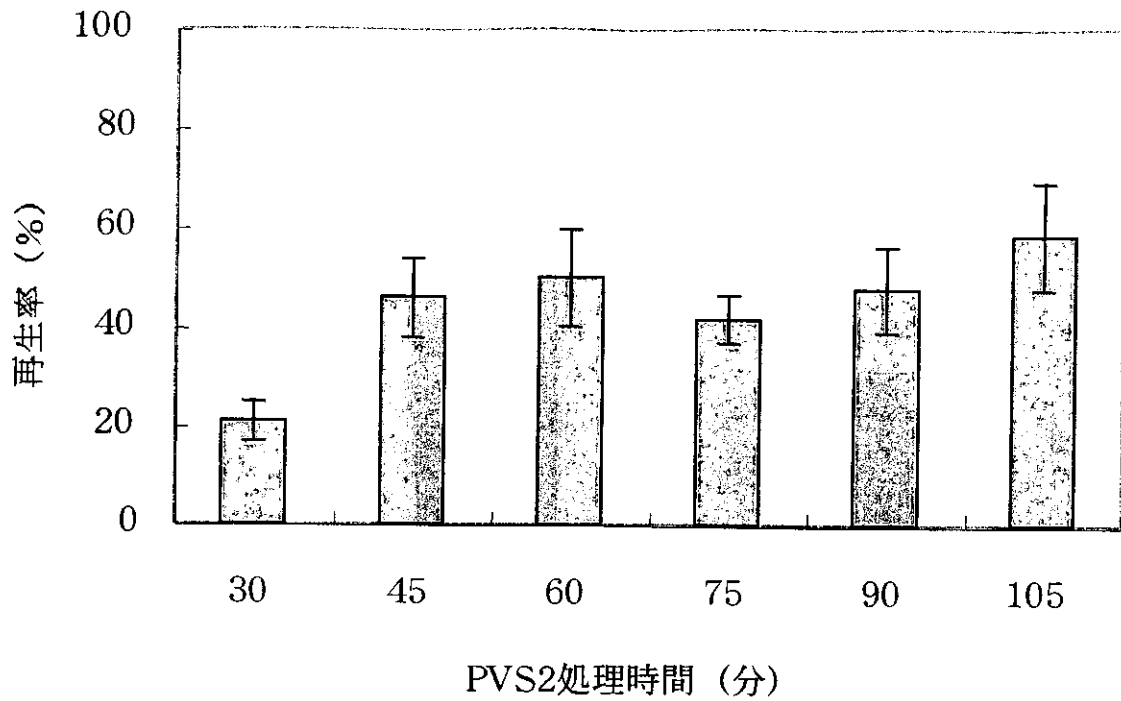


Fig. 9 松尾村産ムラサキclone No. 7におけるPVS2 処理時間がシュートの再生率に及ぼす影響

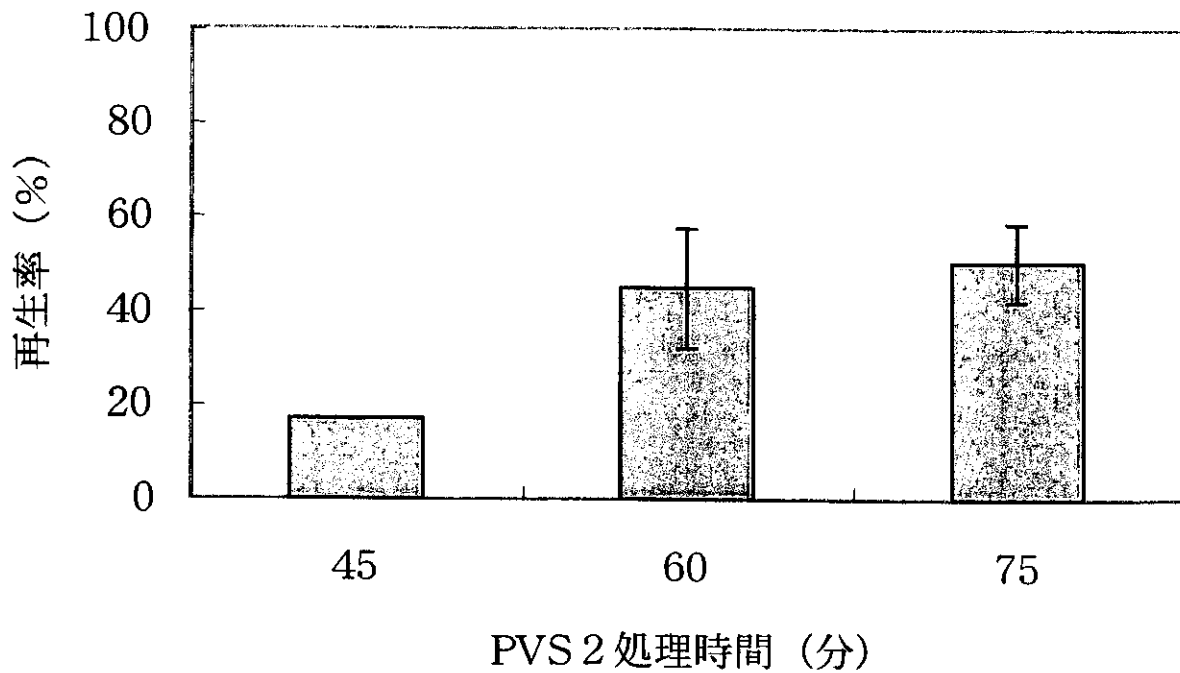


Fig. 10 安代町産ムラサキclone No. 14におけるPVS2 処理時間がシュートの再生率に及ぼす影響

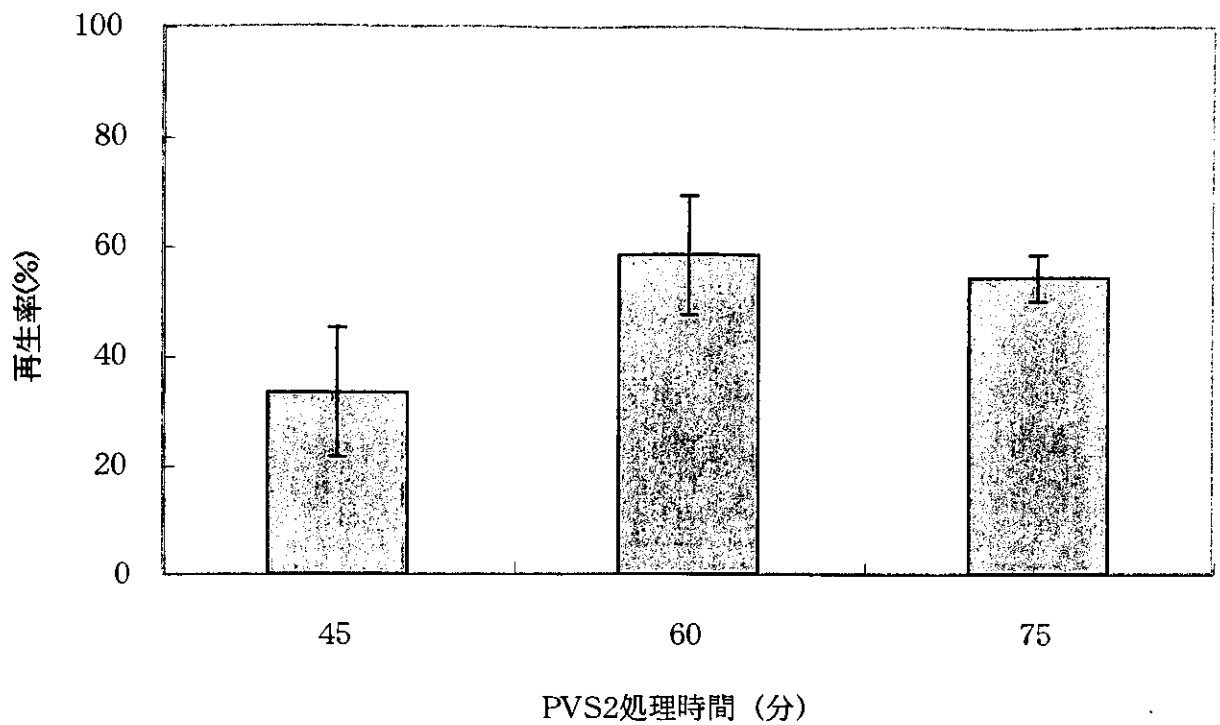


Fig. 11 十和田産ムラサキclone No. 8におけるPVS2 処理時間がシュートの再生率に及ぼす影響

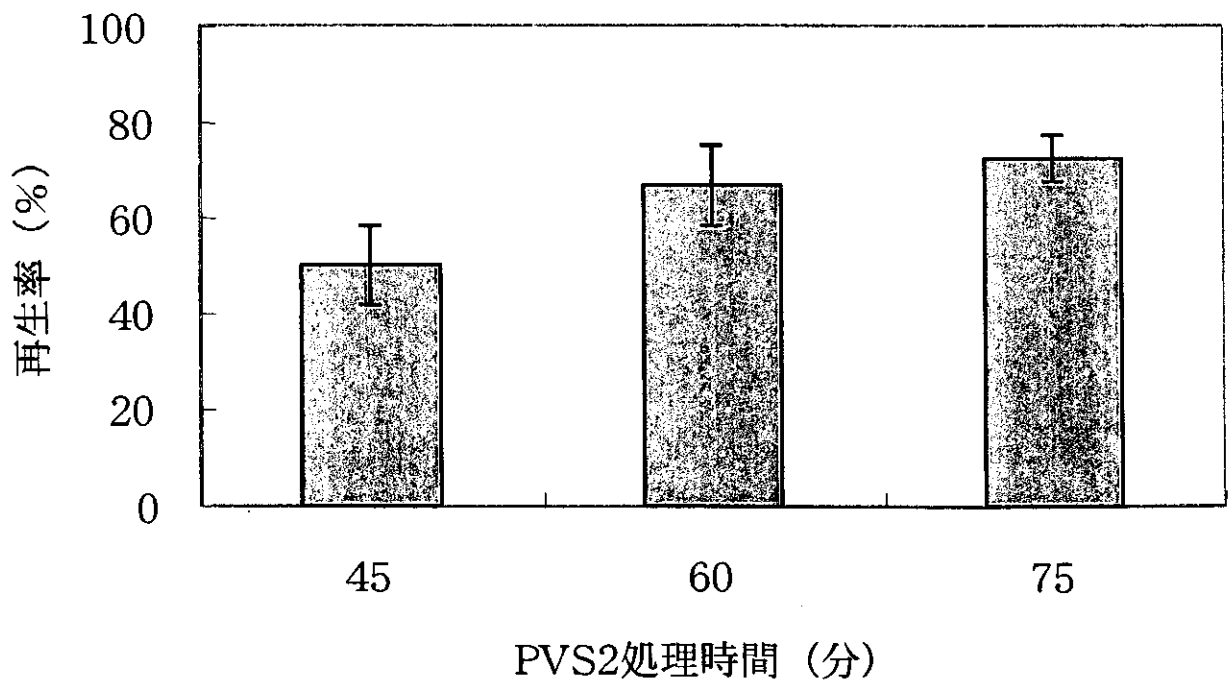


Fig. 12 韓国産ムラサキにおけるPVS2処理時間がシュートの再生率に及ぼす影響

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

薬用植物資源の種子保存法確立に関する化学的研究

支援研究者 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

ショウマの基原植物は4種で、サラシナショウマ (*Cimicifuga simplex*)、北升麻 (*C. dahurica*)、関升麻 (*C. heracleifolia*)、西升麻 (*C. foetida*) であるが、この中で日本に自生するのはサラシナショウマのみであり、他はすべて中国産である。そのうち、現在国内で流通しているショウマは、主に北升麻と関升麻で、サラシナショウマはほとんど認められない。その理由として、自生地が減少していること、また、種子の発芽率が悪い、成長が遅いなどから栽培による生産が難しいことがあげられる。しかしながら、生薬を輸入に頼ることは、生産地における天災や、人的汚染、政治的問題など、危機管理の面からも対処が必要であること、生薬升麻の有効成分の解明ならびに用途への応用を念頭においた各基原植物の成分特異性の研究のための植物資源の確保が必要であることから、国内栽培における優良品種の育成と栽培法の確立が望まれる。

そこで、育種および栽培法の検討の一環としてサラシナショウマ種子の催芽処理について検討し、また、野生品並びに栽培品のサラシナショウマの成分比較を行うための分析法の検討を行った。

1. 各催芽処理法による発芽試験の実施

[協力研究者：山田みどり 国立衛研・筑波]

供試種子：

- ・ 1999年11月に足尾山（茨城県）にて採取し、冷蔵保存していたサラシナショウマの種子（催芽処理1のみ）
- ・ 1999年12月に筑波薬用植物栽培試験場で採取し、冷蔵保存していたサラシナショウマの種子（催芽処理2、3、4およびコントロール）

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。

次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（播種日：2001年5月11日）、経時的に発根と発芽を観察した。

催芽処理法

催芽処理 1：播種前に濡れた砂で湿らせる処理を施す

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。