

200711012A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

薬用植物資源の安定確保と有効活用のための  
基盤的技術の研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

(H19-資源-指定-001)

主任研究者 木内 文之

平成20(2008)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

薬用植物資源の安定確保と有効活用のための基盤的技術の研究 -----	1
木内文之	

### II. 分担・協力研究報告

1. 薬用植物種子の発芽条件および長期保存に関する研究 -----	13
飯田 修, 杉村康司, 菱田敦之	
2. 薬用植物種子の発芽試験法に関する研究 -----	21
木内文之, 菱田敦之, 熊谷健夫	
3. 薬用植物培養物の長期保存法に関する研究 -----	29
吉松嘉代	
4. 大規模機械化栽培による薬用植物の低コスト栽培法の確立 -----	43
柴田敏郎	
5. 薬用植物への新規遺伝子導入法の開発 -----	49
河野徳昭, 千田浩隆	
6. 遺伝子組換え薬用植物の形質変異の評価法に関する研究 -----	55
木内文之, 河野徳昭, 千田浩隆	
7. 薬用植物資源に関する中国情勢の調査 -----	63
鳥居塚和生	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	75
---------------------------	----

薬用植物資源の安定確保と有効活用のための基盤的技術の研究

主任研究者 木内文之 (独)医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター センター長

薬用植物資源を将来に亘って安定して確保するための基盤の整備を目的として、生薬等として重要な薬用植物の種子並びに培養物の長期保存条件を検討するとともに、薬用植物栽培の低コスト化を目指し、既存の農業機械を活用した薬用植物の栽培技術の検討を行った。また、薬用植物の生理活性物質生産能を最大限に利用する基盤として、薬用植物に適用できる迅速な遺伝子導入法として、種子に対する直接遺伝子導入法を検討した。

薬用植物種子の発芽条件に関しては、発芽試験に昼夜変温条件（温度較差10℃）を用いると高い発芽率を示す種子5種並びに恒温条件の方が発芽率の高い種子2種を明らかにし、ハトムギ（2系統）、ベニバナ、トウキ、エビスグサ、イノコズチ属（2種）、チョウジソウについて、発芽試験に適切な条件を見出した。また、オウレン等の超低温保存条件を検討するとともに、ウラルカンゾウについて、培養物からの苗の増殖並びに水耕栽培条件を検討し、8ヶ月で、2年間鉢栽培した場合の約1.7倍の収量が得られる条件を見出した。

薬用植物の機械化栽培では、野菜用に開発され、現在農家に普及している農業用機械の薬用植物栽培への応用を検討し、機械を一部改良することにより、アスパラ収穫物用に開発された選別機が、トウキの苗の選別に、野菜苗の定植作業用に開発された半自動定植機が、トウキ、センキュウ、ダイオウ等の定植に、更に、ゴボウ用に開発された根切断機が、ナイモウオウギの残茎部の切り取り作業に応用可能であることを示した。

薬用植物へ遺伝子導入法に関しては、ケシを材料にして種子への直接遺伝子導入法を、マーカー遺伝子（GFP）の一過的発現を指標として検討し、導入用ベクター並びに催芽時間等の条件を変えることにより、形質転換効率を最大8.5%にまで改善することができた。

また、薬用植物資源の利用に関する海外、特に中国の情勢を把握しておくことは、薬用植物資源の安定確保の観点から非常に重要と考えられることから、中国で開催された「中薬国際科技合作大会」において、中国並びに周辺諸国の情勢についての調査を行った。

分担研究者

飯田 修

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究

センター 室長

河野 徳昭

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究

センター 研究員

柴田 敏郎

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 北海道研究リーダー  
鳥居塚 和生  
昭和大学薬学部 教授  
吉松 嘉代

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 室長  
協力研究者  
熊谷 健夫

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 主任研究員  
杉村 康司

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究員  
千田 浩隆

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター リサーチレジデント  
菱田 敦之

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 主任研究員

## A. 研究目的

現在日本で使用される生薬の国内自給率は10%以下にまで低下しており、国内の在来薬用植物栽培種も急速に失われつつある。一方、日本が生薬供給を依存している中国では、急激な経済の発展に伴い農村部の衰退傾向が見え、更に野生薬用植物資源の枯渇、農業汚染等の問題、更には、生薬のような資源を外交的に利用しようとする動きもあり、これまでのように生薬の供給の大部分を中国に依存する状況は修正を余儀無くされている。このような状況において海外からの生薬の供給不安に対処し、創薬資源としての薬用植物を安定的に確保するためには、まず薬用植物の種・系統を種子等の形で長期保存する体制を整え、必要に応じてこれらの資源が利用でき、国内での栽培が可能となるような技術基盤を整備することが重要である。本研究で

は、代表的な薬用植物について発芽能力の検定法を確立し、種子保存条件を検討するとともに、培養物を超低温で長期保存する技術の開発を目指し、研究を行なった。また、高い栽培コストが日本国内での薬用植物栽培の衰退の原因の一つであることから、低コスト栽培の実現を目指し、既存の農業機械を活用した薬用植物の大規模機械化栽培のための技術基盤を整備するための研究を行なった。

このような研究により、薬用植物資源の長期保存が可能になるとともに、絶滅の危機にさらされている貴重な薬用植物資源の保護及び将来にわたっての安定した利用が可能となる。また、本研究により得られた機械化栽培技術を企業へ移転し、農家との契約栽培により普及や活用を図ることにより、低コスト・大規模機械化栽培の実用化が可能になり、国内での薬用植物栽培の振興に貢献するとともに、生産履歴の明確な生薬の安定確保に貢献することが期待される。

薬用植物の有用物質生産能の医薬品開発への活用には、遺伝子組換え技術が有効と考えられるが、遺伝子導入細胞等から植物体を再生する段階が必要な従来の方法は、薬用植物への適用が困難な場合が多い。そこで、この再生段階を必要としない種子への遺伝子導入を検討し、薬用植物への高効率かつ迅速な遺伝子導入法の研究を行なった。このような技術の確立により、薬用植物の高効率かつ迅速な遺伝子組換えラインの作成並びに成分評価が可能となり、薬用植物におけるアクティベーションタグラインなどの構築により、有効成分の生合成機構の遺伝子レベルでの解明や遺伝子組換えによる新たな薬用植物資源の開発に大きく貢献することが期待

される。

最初に述べたように、現在日本は、生薬の供給の多くを中国に依存しているが、中国は国が中心となって中医学の積極的な活用と海外への普及を図っており、それに伴って中国国内での生薬の消費が急増し、生薬の需給のバランスに影響が及びつつある。このような情勢から、諸外国特に中国の薬用植物資源の利用に関する情勢を把握しておくことが、資源の安定確保の上でも重要であることから、中国情勢の調査を行った。

## B. 研究方法

【薬用植物種子並びに培養物の保存法の研究】

### (1) 薬用植物種子の発芽条件および長期保存

昨年度種子島研究部で採取した種子54点について、恒温(15, 20, 25, 30, 35℃)並びに変温(昼-夜温: 35-25℃, 30-20℃, 25-15℃, 12時間切り替え)に於ける発芽率を検討した。また、5℃で貯蔵した平成13年(2001年)産種子51点、および同14年(2002年)産種子41点の発芽率を同様に検討した。

トウキの種子は、2-3年で発芽率が急速に落ちることが知られているが、昨年度水及び洗剤で洗浄処理して貯蔵したトウキ種子の貯蔵1年後の発芽率を調査した。(飯田, 杉村, 菱田)

### (2) 薬用植物種子の発芽試験法

ハトムギ(2系統), ベニバナ, トウキ, ホッカイトウキ, エビスグサ, ヒナタイノコズチ, トウイノコズチ, チョウジソウ, セリバオウレンについて、種子発芽試験の条件を検討した。また、国際種子検査規定の中から、薬用植物種子に関する規定を抜粋し、整理し

た。(菱田, 熊谷, 木内)

### (3) 薬用植物培養物の長期保存法

オウレン属植物, オニゲシ, ニチニチソウ等のカルスを用い、超低温保存のためのPV2処理時間の影響を検討した。また、新たな実験材料として導入したニチニチソウのアルカロイド含量調査を行うとともに、不定胚培養を誘導した。更に、ウラルカンゾウを用い、ストロン様組織の誘導による苗の増殖と、水耕栽培による溶液培養での生長並びにグリチルリチン含量を検討した。(吉松)

【薬用植物栽培の機械化に関する研究】

### (1) アスパラ選別機を用いたトウキ類苗の選別作業の機械化

アスパラ選別機(AS-Iin, オギワラ精機)を用い、トウキとホッカイトウキの苗を選別し、各ランクに仕分けられた苗の根頭径を測定して、苗の重量との相関を調べるとともに、機械選別作業に必要な時間を測定した。(柴田)

### (2) 野菜移植機を使った苗の機械定植

トウキとホッカイトウキの苗およびセンキュウ(種イモ), ダイオウ(ペーパーポット苗), ボウフウ(ペーパーポット苗), ゲンチアナ(ペーパーポット苗)について、半自動野菜移植機(ベジータキッドKP-1K, クボタ製)を用いて、定植作業を行い、作業効率並びに活着率を調査した。(柴田)

### (3) 連続ごぼう自動根切機を使った根頭部の切断作業

連続ごぼう自動根切機(GCB-195A型, 岡山農栄社製)を用い、3年生ナイモウオウギの切断状況及び作業時間を測定し、従来から行われている剪定バサミや押し切りを用いた

場合の作業時間と比較した。(柴田)

### 【薬用植物への遺伝子導入法並びに成分分析法】

#### (1) 薬用植物への外来遺伝子の導入法の検討

遺伝子の導入効率の向上およびGFP遺伝子の安定的な発現を目的に、pUC18ベクターを基本骨格としてEL2-Wエンハンサー配列を有するpUC-EL2-W-sGFPベクターを新たに構築し、このベクターとGFP (Green Fluorescence Protein) 遺伝子を組み込んだpWI-sGFPベクターを用いて、ケシ種子への遺伝子の直接導入を検討した。操作は、(独)農業生物資源研究所が開発した種子への遺伝子導入法のプロトコールを基本とし、発芽した植物体に効率よく蛍光の発現が見られる条件を検討した。(河野, 千田)

#### (2) 遺伝子組換えによる成分変化の評価

シロイヌナズナにダイオウから得たベンザルアセトン合成酵素 (BAS) 遺伝子を導入した組換え植物を用い、導入した遺伝子の塩基配列と植物体での発現を確認するとともに、ショ糖負荷によって誘起されるアントシアニン生合成を野生株と比較した。(木内, 河野, 千田)

### 【薬用植物資源の活用に関する中国情勢の調査】

「中医薬国際科学技術協力計画綱要 (2006-2020)」の路線上で開催されたと思われる『中医薬国際科技合作大会: International Traditional Chinese Medicine Conference for Cooperation in Science and Technology』に参加し、中国並びに関係国の

情勢を調査した

### C. 研究結果

#### 【種子並びに培養物の保存法の研究】

#### (1) 薬用植物種子の発芽条件および長期保存

##### 1) 発芽における昼夜変温条件の検討:

変温条件により発芽率が向上したものは、キダチトウガラシ (54→100%), タカクマムラサキ (26→94%), コロシントウリ (30→84%), ゴマクサ (36→80%), エビスグサモドキ (44→72%) であった。一方、インドジャボクおよびクロタラリアの発芽は恒温条件で高かった。

##### 2) 貯蔵種子の発芽率の経年変化

5°Cで保存した種子の発芽率 (発根率) が70%以上のものは、平成14年産種子 (貯蔵期間5年) ではカワラケツメイ98%, エビスグサ92%, キダチトウガラシ (ネパール系) 86%, エビスグサモドキ86%, キビ70% (表2), 平成13年産種子 (同6年) ではヘチマ100%, エビスグサ100%, アサガオ (白実) 88%, ローゼル80%, トウアズキ78%, シロバナヨウシュチョウセンアサガオ72%, アサガオ (黒実) 70%であった。

##### 3) 洗浄処理したトウキ種子の貯蔵1年後の発芽率

洗浄処理したトウキ種子の5°C冷蔵貯蔵1年後の発芽率は、a) 水8h: 発根82.7%→出葉37.3%, b) 洗剤8h: 84.0→38.0%, c) 水24h: 90.0→65.3%, d) 洗剤24h: 92.0→86.7%, e) 無処理: 94.0→86.0%であり、洗剤24時間処理と無処理がともに高い発根率と出葉率を示し、洗剤24時間処理では、無処理に比べ発芽が促進された。その他のいず

れの処理でも発根は良好であったが、水および洗剤の8時間処理では根が褐変枯死するものが多く、出葉率は他に比べて大きく低下した。

貯蔵温度-1℃および-20℃と発芽率の関係については、5℃同様、洗剤24時間処理と無処理の発根および出葉率が高く、水8時間処理と洗剤8時間処理で低かった。また、貯蔵温度が低下するほど、発根および出葉率が低下する傾向が見られた。

## (2) 薬用植物種子の発芽試験法

今回テストした薬用植物種子の発芽適温並びに発芽に必要な期間は、以下の通りであった。

・ハトムギ(つくば)は、温度25-35℃の範囲で発芽率が高く、至適温度は30℃付近と推定した。この温度域では、発芽は、置床後10日目から始まり30日でほぼ終了した。

・ハトムギ‘北のはと’は、温度20-30℃の範囲で最終発芽率が高く、この温度域では、発芽は、置床後、5-11日目から始まり26-30日で終了した。

・ベニバナ(つくば)は、15-25℃の範囲で発芽率が高く、至適温度は20℃付近と推定された。この温度域では、発芽は、置床後4-6日目から始まり22-28日で終了した。

・トウキ(富山県薬事指導所系)は、温度15-25℃の範囲で最終発芽率が高かった。この温度域では、発芽は、置床後14-21日目に始まり42日目で終了した。

・ホッカイトウキ(北大系)は、温度15-25℃の範囲で最終発芽率が2.0-4.7%であった。

・エビスグサの至適温度は30-35℃付近と推定した。この温度域では、発芽は置床後、4

〜6日目から始まり68日目で終了した。

・ヒナタイノコズチとトウイノコズチは、温度20-25℃の範囲で最終発芽率が高かった。この温度域では、発芽が置床後6日目に始まり16日目にほぼ終了した。

・チョウジソウは、未処理の種子では発芽が認められず、種子の表皮の一部を切傷すると発芽した。切傷した種子を用いた試験では、25-30℃もしくはそれ以上の温度域に至適温度があると推定され、発芽は、置床後7日目から始まり61日で終了した。

## (3) 薬用植物培養物の長期保存法

### 1) 薬用植物カルスの超低温保存

継代維持中のオウレン属植物、オニゲシ、ケシーオニゲシ種間雑種、ニチニチソウカルスを材料にガラス化法による超低温保存条件のうち、特にPVS2処理時間を検討した。

セリバオウレン非形質転換カルスは、PVS2処理30分で28.6%が再生したが、形質転換カルスでは、同条件で再生が認められたものはCjGUSII627-7-2のみであった。中国産オウレン属植物カルスでは、セリバオウレンより再生率は低いものの、PVS2処理30分で再生が認められた。オニゲシではPVS2処理20分で9.1%が再生し、ケシーオニゲシ種間雑種は7系統中4系統で再生が認められた。ニチニチソウカルスはPVS2処理時間を変えて実験を行ったが、いずれの条件でも再生は認められなかった。

### 2) 新規導入ニチニチソウの育成とインドールアルカロイド含量

新規導入ニチニチソウのシュート培養を確立し、8種のインドールアルカロイドの含量を分析した結果、シュート培養からは

Catharanthine, Vindoline, Vinblastineの3種のアルカロイドが検出され、主アルカロイドはVindolineであり、茎よりも葉の方が高含量であった。

子葉、葉、胚軸、幼根、根を材料に、形態形成実験を行った結果、今回試験した条件でカルスは形成するものの、不定芽及び不定胚の分化には至らなかった。そこで、未熟果実をHF培地に植え付け24℃暗所で培養した結果、1つの系統で果実の表面に不定胚が生成し、同培地で継代可能であることが判明した。

### 3) ウラルカンゾウ苗の大量増殖と養液栽培法の確立

培養植物体として継代維持中の2種のウラルカンゾウ (GuH及びGu) のうち、より優れた形質を持つものを選抜するため、それぞれの植物体を土壌へ移植し閉鎖温室内で栽培し、生育及びグリチルリチン含量を調査した。

2年生株では、葉の形質 (最大葉長, 最大葉幅, 最大頂小葉長, 最大頂小葉幅, 最大側小葉長, 最大側小葉幅) は, Guの方が大きく, 主根長, 主根幅は, GuHが, 主根収量, 細根収量はGuの方が大きかった。主根のグリチルリチン含量は, GuH, Guとも約2.1%であり, 根の収量はGuの方が多いため, 根のグリチルリチン収量はGuの方が高く, GuHの1.4倍であった。

Guを材料に, WPG固形培地で継代培養を行っているシュートをクローン化後, 節切片を調製し, スترون様組織誘導培地に植付け, 2ヶ月間培養し, 生育良好なサブクローンを選択して継代を繰り返すことにより, 培養8週間で増殖率6.0倍のストロン様培養物を得た。このストロン様組織の茎 (2節) を植物体育成培地で12週間培養した結果, 植物体形

成率は76%であった。

上記培養苗を材料に, 2種の水耕栽培を試みたところ, 活着率は, ともに66.7%であったが, 植物の生育はハイドロカルチャーの方が旺盛であった。ハイドロカルチャー8ヶ月後のGu2では, 主根の肥大が観察され, その収量は2年間鉢栽培したGuの約1.7倍であり, グリチルリチン含量は約1.8%と2年生主根と同程度であった。このように, 今回確立したウラルカンゾウハイドロカルチャーは, わずか8ヶ月間の栽培で, 2年間鉢栽培した植物の約1.6倍のグリチルリチン収量が得られる有効な栽培方法であることが判明した。

### 【薬用植物栽培の機械化に関する研究】

#### (1) アスパラ選別機を用いたトウキ類苗の選別作業の機械化

選別された苗のサイズと実測した根頭径の間にはヤマトトウキ $r^2=0.887$  ( $n=152$ ), ホッカイトウキで $r^2=0.872$  ( $n=110$ )と高い相関性が認められた。そして, ランク3, ランク4及びランク5に仕分けされた苗の根頭径は, ヤマトトウキではそれぞれ $9.0 \pm 0.91$  mm,  $6.3 \pm 0.90$  mm,  $4.5 \pm 0.79$  mm, ホッカイトウキではそれぞれ $7.9 \pm 0.83$  mm,  $5.6 \pm 0.85$  mm,  $4.4 \pm 0.48$  mmで, これまで手作業で仕分けを行った「中(根頭径7~9 mm)」, 「小(同5~7 mm)」, 「極小(同3~5 mm)」の苗にそれぞれ良く対応し, 手作業での仕分けと同程度の選別精度が得られた。作業効率は, コンベア1回転25秒の設定において,  $10 \text{ m}^2$ の苗床から得られる約3,300本の苗の仕分けに1時間5分~1時間11分(1本当たり10.3~11.0秒/人)を要した。

#### (2) 野菜移植機を使った苗の機械定植



トウキの場合、移植成功率は $64 \pm 10\%$ で、何らかの手直し作業が必要なケースが $36 \pm 10\%$ の割合で発生したが、作業時間は手植え作業に較べて大幅に短縮されることがわかった。定植した苗の活着率はヤマトウキの中苗及び小苗 $93.5 \pm 3.4\%$ 、ホッカイトウキの中苗及び小苗 $88.9 \pm 0.4\%$  (手植え $84.6 \pm 0.7$ )と良好な結果が得られた。また、ダイオウの場合は、作業時間1時間21分/10 a、活着率は $97.0 \pm 2.0\%$  (手植え100%)、ボウフウの場合作業時間2時間46分/10 a、活着率は100%、ゲンチアナの場合の活着率は93.6%、と良好な結果であった。一方、センキュウ (種イモ) の場合、作業時間は手植えと変わらなかった。

### (3) 連続ごぼう自動根切機を使った根頭部の切断作業

試験的に実施した結果、手切り (401本の調査)  $6.3 \sim 6.86$ 秒/本に対し機械切り (9回反復, 合計933本の調査)  $5.0 \sim 5.9$ 秒/本と効率良く切断できること、切断成功率は89%であることが判明した。

## 【薬用植物遺伝子組換え体作出技術の確立と成分評価】

### (1) 薬用植物への外来遺伝子の導入法の検討

pWI-sGFPベクターを用いた場合、GFPの一過的発現が確認されなかったため、GFP遺伝子が安定的に発現するように最適化されたpUC-EL2W-sGFPベクターを用いて、種々条件検討した。まず催芽時間を3時間に固定し、GFPの一過的発現を観察した結果、3日目に2粒の種子が蛍光を発したが、10日目では、蛍光を発する種子が無くなった。そこで、催芽時間を18時間にし、ベクター濃度を倍に変更

した結果、遺伝子導入操作後3日目で、26粒の種子が蛍光を発し (形質転換効率11.5%)、10日目においても2株で蛍光が観察された。次に、各催芽時間 (3-18時間) における、遺伝子導入後10日目の形質転換効率を検討した結果、それぞれ5.8% (3時間)、8.5% (6時間)、3.5% (12時間)、4.0% (14時間) および0.5% (18時間) となり、催芽時間6時間が最も良い条件であることが明らかになった。また、GFPの蛍光部位は、ほとんどの株で発芽組織の一部であったのに対し、催芽時間3、6時間のものは、発芽部位全体が蛍光を発するものが得られた。

### (2) 遺伝子組換えによる成分変化の評価

#### 1) BAS遺伝子のPCRによる検出と配列の確認

野生株およびBAS導入株の両者より抽出したtotal RNAから合成したcDNAおよびgenomic DNAを鋳型に、BAS特異的なプライマーでBAS遺伝子の検出を行ったところ、BAS導入株のみにBAS遺伝子の全長に相当する約1.2 kbpのバンドが現れ、その増幅産物のサイズから、BAS導入株におけるBAS遺伝子の存在 (genomic DNA) および転写 (cDNA) が確認された。増副産物の塩基配列決定後、データベースに登録済みの*R. palmatum*由来BAS遺伝子と比較した結果、シロイヌナズナに導入され、発現しているBASに変異および欠落は起きていないことが判明した。

#### 2) シロイヌナズナの栽培および形質変化

0.5%ショ糖含有MS培地で育成した場合、野生株およびBAS遺伝子導入株に目立った変化は見られず、6%ショ糖含有MS培地に移植した両株は、葉の裏面からアントシアニンと思われる紫色の色素が蓄積し始め、徐々に葉の表面までアントシアニンの蓄積が起こる。個体

により若干のアントシアニン蓄積の差が見られたが、野生株とBAS導入株の間でアントシアニンの蓄積量に差は見られなかった。この原因としてBAS遺伝子の発現がシロイヌナズナ内在のCHS遺伝子の発現をより促進している可能性が考えられたので、BASおよびCHS遺伝子の発現プロファイルを解析したが、BAS遺伝子の発現によりCHS遺伝子の転写量の増加は確認できなかった。

#### 【薬用植物資源の活用に関する中国情勢の調査】

『中医薬国際科技合作大会: International Traditional Chinese Medicine Conference for Cooperation in Science and Technology』の概要と各国の対応は、以下の通りであった。

##### (1) 会議の概要

- 1) 約40ヶ国及びWHO, WIPOが参加した。中国側は、副首相のスピーチを始め、各関係省庁の高官が出席した。ただし、当初ロシア、ドイツからの政府高官の出席が予定されていたが、欠席であった。
- 2) 中国政府関係者の発表は、次の点に関するメッセージが共通していた。
  - ① 伝統医薬の品質管理技術の向上が、国際的な進出にとって必要。
  - ② 西欧で受け入れられるためにも、現代科学技術による効果の解明等の近代化が必要であり、近代化には、国際的な協力が必要。
  - ③ 生物多様性の保護、伝統中医学の知的財産の保護の重要性の認識。
- 3) 大会の最後に、伝統中医薬の医療やヘルスケアにおける役割と近代化のための国際的な技術協力を推進したいとする趣旨の「北京

宣言」が中国側から出された。

4) 「国際協力専門家委員会の準備委員会」を発足することとし、72人のメンバーが中国側から発表された。中国人が32名であり、その他米国、英国、ドイツ等からのメンバーが中国側により選任された。

5) 今後、準備委員会を開催し、専門家からなる正式な専門家委員会を発足する予定ということであった。(時期は未定)

##### (2) 会議における各国の対応、発表内容等

###### 1) プレナリー等の発表

① 中医薬の国際的な普及のための協力に外国参加者は必ずしも賛同しておらず、アラブ首長国連邦、マレーシア等は中医学以外の伝統医学の発表を行っている。(TCMをあえて、Traditional & Complementary Medicineと発言している)

② フランス、英国・豪州は、中国との医学協力の枠組みの中で中医学・中医薬を対象とした共同研究を行っており、中国寄りの発表であった。

###### 2) パネルディスカッション

北京宣言案、パネルメンバーの案が、規制、品質、臨床評価の3つのパネルでそれぞれ事前に発表されたが、欧米参加者から中医学批判や、事前に宣言案やメンバーの選出についての案も示されず、拙速であること、メンバーの選出も不透明との会議運営に対する不満が続出したが、すべて黙殺された。

#### D. 考察

種子の発芽を誘起あるいは促進するため、昼夜変温下で試験を行ったところ、恒温条件に比べ1.6〜3.6倍の高い発芽率を示す植物が確認された。タカクマムラサキおよびゴマ

クサは環境省のレッドデータブックで絶滅危惧1Aおよび1Bにそれぞれ指定されており、本結果は種子の生存確認判定のみならず稀少植物の保護と増殖においても極めて有用な成果である。今回、昼夜の温度較差を10℃に設定したが、較差の程度についても今後さらに検討する必要がある。

5℃で5～6年間貯蔵した種子64種92点の発芽試験では、発芽率が70%以上のものが10種確認された。その一方で、多くの種が5年以内に発芽力を失っている。今後各植物について発芽条件とともに貯蔵条件と種子寿命について確認する必要がある。また、トウイノコズチについては、ポリ瓶に入れ-1℃で6年間保管した種子を実験材料としたが、至適温度域で95%以上の高い発芽力を保っており、この保存条件が適しているものと思われた。

洗浄処理したトウキ種子の低温貯蔵1年後の発芽率は、洗剤24時間処理および無処理が同程度に高い値を示し、洗浄処理の有用性は認められなかった。今後、貯蔵2年、3年後の発芽率を確認する必要がある。

発芽試験に際し、エビスグサでは発芽までに長期間を要したが、エビスグサの種子は、硬実種子であり、種子に水分が吸収されるまでに時間を要するために、発芽までに日数を要したことが推察される。今後、切傷したエビスグサの種子を用いて試験を行う必要があるものと思われる。

継代維持中の薬用植物カルスを材料に、PVS2処理時間を検討したが、今回用いた材料の中で、比較的良好な再生が認められたのは、セリバオウレン非形質転換カルスのみであった。同じセリバオウレン由来であっても、

形質転換体では非形質転換体ほどの再生率が得られず、個々に詳細な条件検討が必要と思われる。

新規にニチニチソウ種子を導入し、形態とインドールアルカロイドを調べた結果、培養シュートの葉と栽培した再生植物体の葉では、高アルカロイド含量を示す植物体の系統が異なっていた。また、形質転換体の育成に有効な不定胚が誘導できたのは、再生植物体が矮性を示した1系統のみであった。それぞれに優れた形質を持つクローンは、今後、継代維持・保存・超低温保存を行う上で特に重要と思われる。

今回実験に用いたウラルカンゾウ2系統は、いずれも同じ系統に由来するものであるが、再生植物体の形質が異なっていた。これは、一方は種子で更新され、他方は栄養繁殖で維持されてきたためと思われる。培養苗のハイドロカルチャーでは、8ヶ月間の栽培でグリチルリチン含量1.8%の根が得られた。今後、局方値2.5%に達するまでの栽培期間の確認が必要と思われる。

アスパラ選別機を用いたトウキ類苗の選別作業では、選別された苗のサイズと実測した根頭径の間に高い相関性が認められ、手作業での仕分けと同程度の選別精度が得られ、実用的な応用可能であることが判明した。しかし、苗の葉の展開の程度、土砂の付着程度が選別精度に強く影響するため、条件の統一が必要である。

野菜移植機を使った苗の機械定植については、機械操作に慣れていないこともあって作業性の測定が十分正確に実施できなかった点があるが、従来の手植え作業と比べて、

いずれもほぼ同様の活着率が得られ、また、作業の疲労度が低下するため作業者からは良い感想が得られ、今後の実用化への目処をつけることができた。

連続ごぼう自動根切機を使った根頭部の切断作業については、従来の手切り作業に比べて作業効率も良好で十分応用可能であることがわかった。

種子への直接遺伝子導入法は簡便ではあるが、これを開発した生物資源研の報告によると、形質転換効率は比較的低い（サイズで1.0%程度）ため、今回のケシ種子における遺伝子導入効率（最大8.5%、催芽6時間）は、高い形質転換効率であると考えられる。今後、一過的遺伝子発現のみならず恒常的に遺伝子が発現する実験条件並びに植物体まで育成する条件の検討が必要がある。

前年度の検討で野生株と成分的に差がなかった、シロイヌナズナにダイオウから得たBAS遺伝子を導入した組換え植物について、高ショ糖ストレス存在下でアントシアニンの生合成が促進されることを指標にして、遺伝子導入の影響を評価しようと試みたが、高ショ糖（6%）存在下においても野生株とBAS導入株の形質に有意な差は見られなかった。BAS遺伝子の発現を確認するとともに、その塩基配列を確認したところ、BAS導入シロイヌナズナでは、BAS遺伝子が正常に発現していることが明らかになった。さらに、BASと同じ基質を生合成に用いるCHS遺伝子の発現プロファイルを解析したが、BAS遺伝子の導入による転写量の変化は確認できなかったことから、本シロイヌナズナ形質転換体で発現しているBASは、アントシアニン生合成系

には影響を及ぼしていないものと考えられた。

今回調査のために参加した「中医薬国際科技合作大会」は、中国政府の中医学・中医薬の振興のためのプロパガンダともとれる会議であった。また中医薬そのもの、あるいは成分や製品を新規なコンセプトの医薬品として認めさせたいという印象もあった。中医学・中医薬については、これまで、知日派の学者達が、日本とのさまざまな協力関係の中で学術的に良い関係を保ってきた歴史がある。しかし今回の会議では、そのような知日派を意図的に排除している印象があり、欧州や米国指向の国際協力を目指している空気を感じた。しかし、欧米の出席者からの宣言等に対する批判も受け入れられず、中国以外の参加者には不満が残っている様子であった。また、WHO（伝統医療課長 Zhang氏 中国人）も今回の会議には決して賛同的ではなく、大会宣言の内容（WHOの活動と重複）、進め方等について疑問を投げかけており、北京宣言については、中医学・中医薬に関する中国政府の宣言であり、表だって反対はしないが、積極的に協力する義務はないとの姿勢が良いのではないかと思われた。

中国政府は中医学・中医薬の海外における認知度を高めることに力を入れており、アメリカではすでに42州が中医の合法化と医療保険の適用を認め、FDA（アメリカ食品薬品管理局）は2007年に中医薬学を独立した科学体系として認定するなど海外への働きかけが功を奏してきている。また中医薬の英訳化は独自に勧めており、5700語に達し、更に10,000語を目指し、他言語への翻訳も進め

ているという。日本の漢方についても、積極的に海外への情報発信を行うべき時期に来ているものと思われる。

## E. 結論

種子保存に関しては、発芽試験に昼夜変温条件（温度較差10℃）で高い発芽率を示す種子5種並びに恒温条件の方が発芽率の高い種子2種を明らかにした。また、5℃で5～6年間貯蔵した種子95点の発芽率を調べ、11系統が70%以上の発芽率（発根率）を示すことを明らかにした。更に、ハトムギ（2系統）、ベニバナ、トウキ、エビスグサ、イノコズチ属（2種）、チョウジソウについて、発芽試験に適切な条件を見出した。更に、昨年度水およびアルカリ性洗剤液で洗浄処理し、5℃で1年間貯蔵したトウキ種子について発芽率を調査し、洗剤24時間処理と無処理が同程度の高い発根および出葉率を示すこと、しかし、その他の処理では発根までは良好であるが、その後根が褐変枯死するものが多く、出葉率が大きく低下することを見出した。

薬用植物培養物の長期保存に関しては、継代維持中のオウレン属、オニゲシ、ケシ・オニゲシ種間雑種及びニチニチソウカルスを材料にガラス化法による超低温保存条件のうち、ガラス化液（PVS2）処理時間を検討したが、比較的良好な再生植物体が得られたのは、セリバオウレン非形質転換カルスのみであり、その他のカルスについてはさらに詳細な条件検討が必要であることが判明した。保存のための優良クローン選抜に関しては、ニチニチソウでは、高アルカロイド系統（3系統）と高不定胚形成能系統（1系統）を見出

した。また、ウラルカンゾウでは、グリチルリチン含量及び収量ともに優れた系統をクローン化し、ストロン様組織を介した増殖で、生育及び増殖能の高いクローンを得た。このクローン由来の培養苗を材料に水耕栽培条件を検討した結果、ハイドロボールを培養土とするハイドロカルチャーにより、わずか8ヶ月間の栽培で、鉢栽培2年間の主根の1.6倍グリチルリチン収量が得られることが判明した。

薬用植物栽培の機械化に於いては、アスパラ収穫物の選別用に開発され、現在一般に普及している選別機が、トウキ類苗の選別に能力的に応用可能であることを明らかにした。また、野菜苗の定植作業用に開発され、現在一般に普及している半自動定植機が、トウキ、センキュウ、ゲンチアナ、ダイオウ及びボウフウの、苗、種イモ、ペーパーポット苗の定植に応用可能であり、従来の手植え作業と比べて、いずれもほぼ同様の活着率が得られ、作業の疲労度も低下することを明らかにし、実用化への目処をつけることができた。更に、ゴボウ用に開発された根切断機が、根を利用する薬用植物における収穫後の残茎の切取り作業に応用可能であり、従来の手切り作業に比べて作業効率も良好であることを明らかにした。

薬用植物への新規遺伝子導入法の開発のため、ケシ種子への遺伝子導入法を検討し、遺伝子導入用ベクター、DNA濃度、催芽時間等の諸条件の検討により、GFPの一過的発現を指標とした形質転換効率を最大8.5%まで上げることに成功した。本法の利点は、遺伝

子導入が短期間に完了する点にあり、今回のケシの場合は催芽6時間、減圧浸透処理3時間の実質9時間で導入操作は完了し、その後3日ないし10日後の発芽の段階で遺伝子導入の成否を評価可能であった。ケシに対し本法が適用可能であることが示されたことから、各植物に応じた遺伝子導入条件の最適化により、従来法では遺伝子導入が困難であった薬用植物への新規遺伝子導入法としての発展が期待される。

ダイオウ由来のBASを導入したシロイヌナズナについて、この酵素と同じ基質を用いるアントシアニン生合成経路との関連性を調べたが、正しい塩基配列を持ったBAS遺伝子が発現しているにも拘らず、アントシアニン生合成に影響を与えず、CHSの発現にも影響を及ぼしていないことが明らかとなった。このことから、本シロイヌナズナ形質転換体で発現しているBASは、アントシアニン生合成系の酵素群とは、コンパートメントを異にし、シロイヌナズナの形質には影響を及ぼしていないものと考えられた。

諸外国の薬用植物資源の利用に関する情勢を調査し把握しておくことが、資源確保の上でも重要なことと考えられるため、「中薬国際科技合作大会」における、中国および周辺諸国の情勢について調査を行った。中国は国策の一つとして中医学、中医薬の海外に

おける認知度を高める活動をしてきており、また今後もし続けられると思われる。このような地道な努力は数年～十数年を経た後に、成果を挙げていくと推測され、中医学が国際的な標準になる可能性も否定できない。漢方医学は、中国系医学を起源としているが、わが国独自に発展してきた医学でもあり、それに基づいた漢方エキス製剤や市販後調査、EBM集積など、伝統医学の科学的評価や品質管理などを現代科学的に高いレベルで検討を重ねてきている。このような点を、日本から世界により発信すべき時期に来ているといえるし、発信することで資源確保において、より高い発言権が得られるものと思われる。

#### F. 健康危機管理情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

###### 1) 「薬用植物への新規遺伝子導入の開発」

千田浩隆, 河野徳昭, 吉松嘉代, 木内文之 :  
日本薬学会第128年会 (横浜) 2008年3月26日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

### 分担研究報告書

#### 薬用植物種子の発芽条件および長期保存法に関する研究

分担研究者 飯田 修 (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部リーダー  
協力研究者 杉村康司 (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部研究員  
協力研究員 菱田敦之 (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部主任研究員

要旨 薬用植物種子の発芽条件および長期保存法を確立するため、以下の研究を行った。(1) 種子の発芽における昼夜変温条件(温度較差 10℃)を検討した結果、キダチトウガラシ(ポナペ系)、タカクマムラサキ、コロシントウリ、ゴマクサ、エビスグサモドキが高い発芽率を示した。

(2) 5℃で5~6年間貯蔵した種子の発芽率を確認した結果、カワラケツメイ、エビスグサ、キダチトウガラシ(ネパール系)、エビスグサモドキ、キビ、ヘチマ、アサガオ(白実、黒実)、ローゼル、トウアズキおよびシロバナヨウシュチョウセンアサガオが70%以上の発芽率(発根率)を示した。(3) 水およびアルカリ性洗剤液で洗浄処理したトウキ種子について、5℃で貯蔵した1年後の発芽率を調査した結果、洗剤24時間処理と無処理が同程度の高い発根および出葉率を示した。一方、その他の処理では発根までは良好であったが、その後根が褐変枯死するものが多く、出葉率が大きく低下した。(4) 乾燥に弱い種子の貯蔵法について検討した。供試種子は発芽が困難なものが多く、引き続き調査確認中である。

#### A. 研究目的

地球的規模の環境の変化により、動植物をはじめとする生物資源は急速に減少し、その保護・保存が求められている。そこで薬用植物種子の発芽条件および長期保存法を確立するため、(1) 種子の発芽における昼夜変温条件を検討した。すなわち、平成18年産の新鮮な種子を用い、従来の昼夜恒温条件に加え、昼夜の温度較差を10℃設けた。(2) 5℃で貯蔵した種子の発芽率の経年変化を検定するため、今年度は平成12, 13, 14年産種子の発芽

率を確認した。(3) 水およびアルカリ性洗剤液で洗浄処理したトウキ種子について、5℃で貯蔵した1年後の発芽率を調査した。(4) 乾燥により発芽が急激に低下すると思われる種子について、乾燥防止を目的としてラミジップアルミ袋を用いて貯蔵効果を検討した。

#### B. 研究方法

(1) 発芽における昼夜変温条件の検討  
材料：種子島研究部で採取した平成18年産種子54点。除湿室内の室温下で保存したもの。

恒温条件：15℃，20℃，25℃，30℃，35℃  
変温条件（昼-夜温）：35-25℃，30-20℃，  
25-15℃（12時間切り替え）

供試粒数：種子の大小により最高50粒，  
スチロール製角形シャーレ（152×72×25  
mm）使用．各温度での反復なし．

発芽チャンバー：温度勾配型チャンバー  
MTI-201（EYELA：恒温），MTI-204（同：  
変温）

照明条件：明暗各12時間

種子処理：果肉の除去以外，種子消毒，  
種皮の切傷等の処理は行わなかった．

発芽期間：置床から原則1ヶ月で終了．発  
芽の可能性の有るものは継続した．

発芽調査：発根および出葉（子葉の展開  
時点など）の2段階で行った．

## （2）貯蔵種子の発芽率の経年変化

材料：種子島研究部にて，ポリ袋中に入れ，  
5℃で貯蔵した平成12年（2000年）産  
種子44点，同13年（2001年）産種子51点，  
および同14年（2002年）産種子41点．

発芽温度は植物種により適宜恒温および  
変温条件で行い，その他は（1）に準じた．

## （3）洗浄処理したトウキ種子の貯蔵1年 後の発芽率の確認

材料：トウキ（*Angelica acutiloba*）平成  
18年（2006年）産種子 100粒重 0.235  
～0.245 g

洗浄液および洗浄方法：上記種子と蒸留  
水又はアルカリ性洗剤（シカクリーン  
LX-3 関東化学）1%濃度液を用い，種  
子をa) 蒸留水中8時間振とう，b) 1%洗  
剤液中8時間振とう，c) 蒸留水中8時間振

とう後，新しい蒸留水中で更に16時間振  
とう（水24時間），d) 1%洗剤液中8時間  
振とう後，新しい1%洗剤液中で更に16  
時間振とう（洗剤24時間）の各処理およ  
びe) 無処理区を設けた．処理後，除湿し  
た室内の室温下で乾燥した種子約1.5 g，  
脱酸素剤およびシリカゲル各1個をラミ  
ジップアルミチャック袋（0.089×85×  
120 mm AL-D 生産日本社）に入れ，脱  
気後密封し貯蔵した．

貯蔵温度：5℃，-1℃，-20℃で貯蔵した．  
5℃貯蔵は種子島研究部で，-1℃と-20℃  
貯蔵は筑波研究部で行い，それぞれの種  
子の発芽試験は各研究部で行った．

種子封入日は平成18年12月26日，低温  
貯蔵開始日は平成19年1月4日，貯蔵1年後  
の発芽試験開始日は，種子島と筑波研究  
部ともに平成20年1月15日であった．

発芽試験：スチロール製角形シャーレ1  
個に50粒置床．3反復．

発芽温度：20℃（恒温）

発芽チャンバー：種子島研究部では  
MTI-201（EYELA）を，筑波研究部では  
TD-28CCFL-3LD（日本医化器械製作所）  
を用いた．両機器は照明が異なり，前者  
は直管蛍光灯40W，4本，後者はCCFL（冷  
陰極蛍光ランプ）6w，5本仕様であった  
が，照明時間は同一とした．

その他の条件は，（1）に準じた．

## （4）乾燥に弱い種子の貯蔵法の検討

材料：平成19年（2007年）に種子島研究  
部で採取した以下の種子を供試した．ピ  
ロウ（果実，種子），ハマビワ，タカク  
マムラサキ，ヤマモガシ，カンラン，ヤ



マモモ、ニガキ、クスノハガシワ、アカメガシワ、ヤマコンニャク、クスノキ、マルバニッケイ、ムベ。

方法：採種後、種子を直ちに（原則として）、チャック付きポリ袋およびラミジップアルミチャック袋（AL-D：生産日本社）に入れ、5℃および室内の室温下にて貯蔵した。アルミチャック袋には、脱気して種子を封入した。種子の発芽確認は、取り蒔き、貯蔵1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月で行い、今後1年および2年後にも発芽試験を行う予定である。播種床は野外では鉢、室内では角形シャーレを用いた。

### C. 研究結果

(1) 発芽における昼夜変温条件の検討：供試植物、発芽温度条件および発芽結果を表1に示した。

54点中41点が発芽した。変温条件により発芽率が向上したものは、キダチトウガラシ（ポナペ系：54→100%）、タカクマムラサキ（26→94%）、コロシントウリ（30→84%）、ゴマクサ（36→80%）、エビスグサモドキ（44→72%）であった。一方、インドジャボクおよびクロタラリアの発芽は恒温で高かった。

#### (2) 貯蔵種子の発芽率の経年変化

5℃で保存した種子の発芽率（発根率）が70%以上のものは、平成14年産種子（貯蔵期間5年）ではカワラケツメイ98%、エビスグサ92%、キダチトウガラシ（ネパール系）86%、エビスグサモドキ86%、キビ70%（表2）、平成13年産種子（同6年）ではヘチマ100%、エビスグサ100%、

アサガオ（白実）88%、ローゼル80%、トウアズキ78%、シロバナヨウシュチョウセンアサガオ72%、アサガオ（黒実）70%であった（表3）。平成12年産種子については、現在発芽試験を実施中である。

#### (3) 洗浄処理したトウキ種子の貯蔵1年後の発芽率の確認

洗浄処理したトウキ種子の5℃貯蔵1年後の発芽率の推移を図1に示した。最終的な発芽率は、a) 水8h：発根82.7%→出葉37.3%、b) 洗剤8h：84.0→38.0%、c) 水24h：90.0→65.3%、d) 洗剤24h：92.0→86.7%、e) 無処理：94.0→86.0%であった。洗剤24時間処理と無処理がともに高い発根率と出葉率を示し、洗剤24時間処理では、無処理に比べ発芽が促進した。その他のいずれの処理も発根は良好であったが、水および洗剤の8時間では根が褐変枯死するものが多く、出葉率は他に比べて大きく低下した。

種子の貯蔵温度と発芽率の関係については、-1℃および-20℃においても5℃同様、洗剤24時間処理と無処理の発根および出葉率が高く、水8時間と洗剤8時間処理で低かった。また、貯蔵温度が低いほど、発根および出葉率が低下する傾向が見られた（表4）。

#### (4) 乾燥に弱い種子の貯蔵法の検討

現在までに貯蔵6ヶ月までの種子について順次発芽試験を開始し、確認中である。全体的にラミジップアルミチャック袋では、封入した果実や種子が袋内で醗酵し、袋が膨張するものが多く見られた。

#### D. 考察

種子の発芽を誘起あるいは促進するため、昼夜変温下で試験を行ったところ、恒温条件に比べ1.6～3.6倍の高い発芽率を示す植物が確認された。タカクマムラサキおよびゴマクサは環境省のレッドデータブックで絶滅危惧1Aおよび1Bにそれぞれ指定されており、本結果は種子の生存確認判定のみならず稀少植物の保護と増殖においても極めて有用な成果である。今回、昼夜の温度較差を10℃に設定したが、較差の程度についても今後さらに検討する必要がある。

5℃で5～6年間貯蔵した種子64種、92点の発芽試験では、発芽率が70%以上のものが11種確認された。その一方で、多くの種が5年以内に発芽力を失っている。今後各植物について発芽条件とともに貯蔵条件と種子寿命についての確認も必要である。現行のポリ袋による貯蔵下では種子の吸湿、その後のカビの発生が多く見られており、今後貯蔵容器の検討も必要である。

洗浄処理したトウキ種子の低温貯蔵1年後の発芽について、発根率はいずれの処理区も高かったが、出葉率は処理により大きく異なり、洗剤24時間および無処理が高い値を示した。水および洗剤8時間処理では、発根後に根が褐変枯死するものが特に多く、また貯蔵温度が低いほどその程度が大きかった。これは処理直後の発芽時にも観察された現象で、種子の振とう処理中に侵出した発芽抑制物質が、種子に再吸収された影響によるものと推

察された。図2に貯蔵時と5℃貯蔵1年後の発芽率（発根率と出葉率）の比較を示した。発芽状況については1年間の変化がほとんど見られず、出葉率は洗剤24時間および無処理でむしろ高くなった。今年度の結果から、無処理の貯蔵1年後の発芽率が予想に反し極めて良好であったため、洗浄処理の有用性が確認できなかった。今後、貯蔵期間2年、3年後の発芽率を確認する予定である。

乾燥に弱い種子といわれているものは発芽が困難で、その確認に長期間を要するものが多い。今後発芽状況を継続して確認する予定である。今回種子の乾燥防止対策として検討した、ラミジップアルミチャック袋による脱気封入貯蔵は、種子を窒息状態にしているように思われた。一方、本方法は乾燥種子の貯蔵に有用と思われ、今後検討する予定である。

#### E. 結論

(1) 種子の発芽における昼夜変温条件（温度較差10℃）を検討した結果、キダチトウガラシ（ポナペ系）、タカクマムラサキ、コロシントウリ、ゴマクサ、エビスグサモドキが高い発芽率を示した。

(2) 5℃で5～6年間貯蔵した種子の発芽率を確認した結果、カワラケツメイ、エビスグサ、キダチトウガラシ（ネパール系）、エビスグサモドキ、キビ、ヘチマ、アサガオ（白実、黒実）、ローゼル、トウアズキおよびシロバナヨウシュチョウセンアサガオが70%以上の発芽率（発根率）を示した。

(3) 水およびアルカリ性洗剤液で洗浄処

理したトウキ種子について、5℃下で貯蔵した1年後の発芽率を調査した結果、洗剤24時間処理と無処理が同程度の高い発根および出葉率を示した。一方、その他の処理では発根までは良好であったが、その後根が褐変枯死するものが多く、出葉率が大きく低下した。

(4)乾燥に弱い種子の貯蔵法について検討した。供試種子は発芽が困難なものが多く、引き続き調査確認中である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

