

(2) 洗浄処理したトウキ種子の貯蔵3年間の発芽率の推移

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(水8h区)、b) 1%洗剤液中8時間振とう(洗剤8h区)、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24h区)、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24h区)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°C、-1°C、-20°Cで貯蔵した。5°C貯蔵は種子島研究部で、-1°Cと-20°C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、発芽試験開始日は、種子島と筑波研究部ともに同一日とし、貯蔵1年後が平成20年1月15日、同2年後が平成21年1月15日、同3年後が平成22年1月15日であった。

発芽試験：蓋付きスチロール製角形ケース(152×72×25 mm) 1個に種子50粒置床。3反復。

発芽温度：20°C(恒温)

照明条件：明暗各12時間

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(冷陰極蛍光灯)6w、5本仕様であったが、照明時間は同一とした。

発芽の確認：発根時および子葉の展開時(出葉)の2段階で確認した。

(3) 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(一部果実)を供試した。

ピロウ (*Livistona chinensis* (Jacq.) R.Br. ex Mart. var. *subglobosa* (Hassk.) Becc.) (果実, 種子), ハマビワ (*Litsea japonica* (Thunb.) Juss.), タカクマムラサキ (*Callicarpa longissima* (Hemsl.) Merr.), ヤマモガシ (*Helicia cochinchinensis* Lour.), カンラン (*Canarium album* (Lour.) Raeusch.), ヤマモモ (*Myrica rubra* Siebold et Zucc.), ニガキ (*Picrasma quassioides* (D. Don) Benn.), アカメガシワ (*Mallotus japonicus* (Thunb.) Müll. Arg.), ヤマコンニャク (*Amorphophalus hirtus* N.E.Br. var. *kiusianus* (Makino) M. Hotta), クスノキ (*Cinnamomum camphora* (L.) Siebold) (果実, 種子), マルバニッケイ (*Cinnamomum daphnoides* Siebold et Zucc.) (果実, 種子), ムベ (*Stauntonia hexaphylla* (Thunb.) Decne.) .

方法：採種後、果実および種子を直ちに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°Cおよび室内・室温下にて貯蔵した。ニガキ、ヤマコンニャク、クスノキ、マルバニッケイおよびムベでは、低温下、ポリ袋中に湿砂あ

るいは湿バーミキュライトで混和した処理を加えた。アルミチャック袋には、脱気して種子を封入した。播種床は野外では鉢、室内では蓋付きスチロール製角形ケース（シャーレ：152×72×25 mm）を用いた。発芽の確認は、鉢では出葉時、シャーレでは発根時および出葉の展開時の2段階で行った。

## C. 研究結果

### (1) 薬用植物種子の発芽条件の検討

#### 1) 発芽における昼夜変温条件の検討

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（表1）。

#### 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年産種子ではカララケツメイ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）。

#### 3) 発芽試験の規格化に関する研究

メハジキは25～30℃で高い発根・出葉率を示した。アマは15～30℃の広い温度域で高い発根・出葉率を示し、15～25℃でより良好で

あった。アイは15～20℃の低温域で、カララケツメイは25～30℃の高温域での発根・出葉率が高かった。ジギタリスはアマ同様15～30℃の広い温度域で、ほぼ同程度の発根・出葉率を示した。15℃での発芽が最も良好であったが、発芽所要日数が最も長かった。

ケイガイは平成20年ではいずれの温度においても発芽率は低く、発根率は0.7～4.0%であった。これは種子の充実度が低かったためによるものと思われた。

平成21年のケイガイは発芽が良好で、25℃で最も高い発根率および出葉率を示した。トロロアオイは25℃で最も高い発根率および出葉率を示し、カララケツメイは20～30℃でよく発芽し、高温ほど発根率および出葉率が高く、発根および出葉の所要日数が短期間であった（表4）。

#### (2) 洗浄処理したトウキ種子の貯蔵3年間の発芽率の推移

洗浄処理したトウキ種子の発芽率の推移は貯蔵1年後、2年後および3年後ともにほぼ同様の傾向を示した。図1に、5℃貯蔵3年後の発芽率の推移を示した。発根はいずれの区ともに良好で、発根率は83.3～90.0%であった。一方、出葉は洗剤24h区と無処理区が良好で、出葉率はそれぞれ84.0%、86.7%であった。その他の処理区では根が褐変枯死するものが多く、出葉率は大きく低下した（図1, 2）。無処理区の種子は、発根および出葉の開始が遅れたものの、最終的には高い発芽率を示した。

種子の貯蔵温度と発芽率の関係については、5℃貯蔵では全体的に安定した発芽率を示したが、年数が経るにつれ、低温ほど発芽率が

低下する傾向が見られた（表5）。

### (3) 乾燥に弱い種子の貯蔵法の検討

貯蔵2年後の種子の発根率または展葉率が50%以上を示したものは、低温下、ポリ袋で貯蔵したビロウ、ヤマモガシ、ハマビワ、タカクマムラサキ、カンラン、クスノキ、マルバニッケイ、並びに低温下、アルミ袋で貯蔵したタカクマムラサキ、アカメガシワのいずれも種子であった。また、低温+ポリ袋+湿砂処理ではクスノキ（種子）が100%発芽し、マルバニッケイは貯蔵中に10粒中9粒が発根した。ムベは湿砂処理により貯蔵1年目に100%が発根した（表6）。

## 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。

5°C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。ポリ袋による貯蔵では種子の吸湿、その後のカビの発生が見られており、今後貯蔵容器の検討も必要である。

種子の発芽試験の規格化に関する研究から、

発芽試験における最適温度は発根率、出葉率、所要日数から総合的に判断する必要があることが明らかとなった。

洗浄処理したトウキ種子の5°C貯蔵3年後の発芽は、洗剤24時間処理および無処理が発根率および出葉率ともに良好であった。無処理区の種子が高い発芽率を維持していたが、本種子の水分含量は3.56%と低く、低温、無酸素、乾燥状態で種子を保存することによって、トウキ種子の寿命を長くできる可能性があることが示唆された。種子の貯蔵温度は、5°Cが発芽率の変動が少なく、良好であった。

乾燥に弱い種子の貯蔵中の乾燥を防ぐため、チャック式ポリ袋さらには湿砂の併用が有用であった。密閉性に優れたラミジップアルミチャック袋の効果を期待したが、袋内で発酵し、袋が著しく膨張するものがあり、有用な結果が得られなかった。早いもので貯蔵1ヶ月後には発芽力を失うものが見られた。アルミ袋による貯蔵では、タカクマムラサキとアカメガシワが高い発芽率を示したが、タカクマムラサキは乾燥に耐える種類であることが判明し、アカメガシワ種子が唯一アルミ袋による貯蔵が有用であった。

## E. 結論

(1) 種子の発芽における昼夜変温条件（温度較差 10°C）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°C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) 発芽試験における最適温度は発根率, 出葉率, 所要日数から総合的に判断する必要があることが明らかとなった.

(4) 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, 貯蔵期間3年に渡る発芽率を調査した結果, 発根はいずれの区ともに良好で, 発根率は83.3~90.0%であった. 一方, 出葉は洗剤24h区と無処理区が良好で, 出葉率はそれぞれ84.0%, 86.7%であった. 種子の貯蔵温度と発芽率の関係については, 5°Cで貯蔵した種子が全体的に安定した発芽率を示した.

(5) 乾燥に弱い種子の貯蔵法を検討するため, 12種類の植物について, チャック式ポリ袋とラミジップアルミチャック袋を用い, 低温と室温下で貯蔵した果実と種子について, 貯蔵期間2年に渡る発芽率を調査した. 低温下, ポリ袋で貯蔵したビロウ, ヤマモガシ, ハマビロ, タカクマムラサキ, カンラン, クスノキ, マルバニッケイ、並びに低温下, アルミ袋で貯蔵したタカクマムラサキおよびアカメガシワのいずれも種子が良好な発芽を示した.

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) 飯田 修, 杉村康司, 志賀幸生, 鎌田文広, 淵野裕之, 薬用植物の種子の貯蔵と発芽に関する研究, 日本薬学会第130年会(岡山) (2010.3.29)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 平成18年(2006年)産種子の発芽率(%)

植物名	野・栽	採種日	供試数	供試温度 °C																	
				恒温		35°C		30°C		25°C		20°C		15°C		35-25°C		30-20°C		25-15°C	
				出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉
カワラケツメイ	野	2006.11.8	25		35-25,30-20,25-15									100	100	96	96	92	92		
ゲットウ	野	2006.11.2	25	20,25	35-25,30-20,25-15					100	96	92	92			68	68	100	100	80	80
ミツバ	野	2006.11.16	25		35-25,30-20,25-15											100	72	96	88	100	88
アサガオ(黒実)	栽	06.8.21~9.10	25	25	35-25,30-20,25-15					96	96					100	92	100	92	100	100
エビスグサ	栽	2006.9.15	50	30	35-25,30-20,25-15			100	100							98	96	98	98	90	90
キダチトウガラシ(ボナベ)	栽	2006.8	50	30	35-25,30-20,25-15			54	50							100	46	100	86	100	98
ゴマ(黒)	栽	2006.8.14~	50	25,30	35-25,30-20,25-15			100	96	100	100					100	100	98	96	98	98
タイワンツナン(モロヘイヤ)	栽	06.9.29~10.25	50	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ニシインドコキュウリ	栽	2006.9.27	50	20,25,30	35-25,30-20,25-15			100	98	96	96	100	68			100	100	100	100	100	84
ハトムギ(北陸大)	栽	06.8.25~9.10	25	20,25	35-25,30-20,25-15	果実 種子		100	88	96	88					88	84	92	92	100	100
ハトムギ(種子島保存系統)	栽	06.8.10~9.5	25	20,25	35-25,30-20,25-15	果実 種子		20	20	64	64					80	80	44	44	28	28
アオジソ	栽	2006.10.10	50	15,20,25,30	35-25,30-20,25-15			84	84	94	94	98	98	94	92	92	92	90	90	96	94
オオイタビ	野	2006.12.12	25		35-25,30-20,25-15											96	96	88	88	96	92
シソ	栽	2006.10.28	50	15,20,25,30	35-25,30-20,25-15			88	88	92	92	72	72	70	70	80	80	94	94	84	82
タカクマムラサキ	栽	2006	50	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	6	4	0	0	0	0	26	10	0	0	94	42	28	4	68	14
ハトムギ(岡山在来)	栽	2006.8.29	25	20,25	35-25,30-20,25-15	果実 種子		92	92	84	72					72	72	76	76	88	76
トウガラシ(タカノツメ)	栽	2006.8.1	50	25	35-25,30-20,25-15			16	16	16	16					40	32	16	16	40	32
リュウキュウマメガキ	野	2006.10.25	20		35-25,30-20,25-15			72	32							70	46	72	62	92	50
キビ	栽	2006.7.14	50	25	35-25,30-20,25-15											90	65	80	80	45	0
オオハマギキョウ	栽	2006.12.20	50	20	35-25,30-20,25-15							86	70			2	0	82	62	86	68
オオカラスウリ	野	2006.11.8	25		35-25,30-20,25-15											84	72	20	20	4	0
コロンシドウリ	栽	2006.9.18	50	25	35-25,30-20,25-15					30	8					34	2	84	46	40	2
ゴマクサ	野	2006.10.25	25	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	36	36	4	4	0	0	28	16	64	64	80	80
ミシマサイコ(和歌山)	栽	2006.10.20	50	20	35-25,30-20,25-15							60	44			18	0	72	38	74	14
エビスグサモドキ	栽	2006.12.20	50	30	35-25,30-20,25-15			44	34							72	68	40	30	32	18
ナガスサゲ	栽	2006.8.1	25	20,25,30	35-25,30-20,25-15			48	36	72	60	64	60			68	36	58	52	44	28
ウツボグサ	野	2006.8.3	25		35-25,30-20,25-15											0	0	24	0	60	60
トカドヘチマ	栽	2006.9.27	15	20,25,30	35-25,30-20,25-15			33	7	53	40	33	7			40	40	60	60	33	20
シロバナヨウシュチョウセンアサガオ	栽	2006.7.5	25	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	32	0	28	0	44	0	32	0	36	0	28	0	60	0	28	0
ペニバナ(中国)	栽	2006.6.18	50	25,25,30	35-25,30-20,25-15			16	2	54	40	58	54			44	28	56	28	46	40
アカメガシワ	野	2006.8.8	50	30	35-25,30-20,25-15			54	24							16	6	30	4	30	18
メハジキ	栽	2006.7.14	50	15,20,25,30	35-25,30-20,25-15			30	30	50	44	36	30	32	28	44	40	46	42	40	38
ボタンポウフウ	野	2006.8.11	25	20	35-25,30-20,25-15							44	24			0	0	24	0	48	4
コガネバナ(和歌山系)	栽	2006.9.27	50	15,20,25,30	35-25,30-20,25-15			34	32	46	38	38	38	20	16	26	24	40	28	36	32
インドジャボク	栽	2006.9.6	50	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	32	18	10	4	0	0	0	0	0	0	8	6	0	0	0	0
クロタラリア	栽	2006.11.7	50	20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	28	28	2	2	2	4	4				12	10	2	2	0	0
ハブソウ	栽	2006.8.28	50	20,25,30	35-25,30-20,25-15			12	8	12	10	6	4			8	8	4	4	14	10
ゴジカ	栽	2006.9.27	50	30	35-25,30-20,25-15			6	6							14	12	14	12	10	10
ケンボナン	栽	2006.9.7	25	15,20,25,30	35-25,30-20,25-15			8	4	0	0	2	0	0	0	0	0	8	8	4	4
サキシマフヨウ	野	2006.12.12	25	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	4	4	8	8	0	0
クララ(大平系)	栽	06.7.14~8.1	50	20	35-25,30-20,25-15								4	4		8	8	8	8	6	6
イイギリ	野	2006.4.20	25	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
オオハコ	野	2006.5.15	25	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ハマゴウ	野	2006.12.12	25		35-25,30-20,25-15											0	0	0	0	0	0
ムベ	野	2006.10.25	25		35-25,30-20,25-15											0	0	0	0	0	0
ヤマコンニャク(乾燥)	野	2006.8.31	15	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ヤマコンニャク(湿潤)	野	2006.8.31	10	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
アシタバ	栽	2006.1.25	20	20	35-25,30-20,25-15							0	0			0	0	0	0	0	0
クスノハガシワ	栽	2006.8.25	50	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
トウガン(沖縄)	栽	2006.11.5	15	20,25,30	35-25,30-20,25-15			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ニガキ	栽	2006.7.18	25	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ホンゴシユ	栽	2006	25	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ヤウチ(坂崎氏)	栽	2006.10.19	25	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
トウゴマ(赤莖)	逸脱	2006.10.18	20	20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

発芽試験開始日:2007.3.9

表2 平成14年(2002年)産・貯蔵期間5年種子の発芽率(%)

植物名	採種日	供試数	供試温度 °C		35°C		30°C		25°C		20°C		15°C		35-25°C		30-20°C		25-15°C	
			恒温	変温	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉
カワラケツメイ	2002.10.15	50粒	30,35		98	98	98	98												
エビスグサ	2002.9.19	50粒	30,35		96	92	92	92												
キダチトウガラシ(ネパール系)	2002.9.25	50粒	30				86	32												
エビスグサモドキ	2002.1.18	50粒	30,35		60	20	86	76												
キビ	2002.9.19	50粒	30				70	70												
ニシインドコキュウリ	2002.9.3	50粒	25						58	14										
シロバナヨウシュチヨウセンアサガオ	2002.7.15	50粒	30				52	14												
ハトムギ	2002.8.29	50粒	30,35		36	34	48	48												
ヘチマ(沖縄系)	2002.11.6	50粒	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	44	20	44	44	46	36	46	44	18	0	48	30	46	36	48	48
トウアズキ	2002.7.2	7粒	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	43	43	14	14	0	0	0	0	0	0	14	14	14	14
オオハマギキョウ	2002.11.27	50粒	20								42	38								
ケナフ	2002.2.25	50粒	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	30	24	18	14	32	22	26	26	16	0	18	14	30	18	34	28
ゲトウ	2002.11.14	50粒	20,25						20	14	16	14								
バンジロウ(果肉クリーム色)	2002.10.3	40粒	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	3	0	15	3	18	0	0	0	0	0	10	0	13	0	8	0
サンピロード	2002.11~12月	50粒	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ハブソウ	2002.9.26	50粒	20,25,30				2	0	4	2	0									
アザミゲシ	2002.5.27	50粒	15,20,25,30,35		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
アシタバ	2002.1.17	50粒	20								0	0								
インドジャボク	2002.8.30	50粒	30				0	0												
オオハコ	2002.11.20	50粒	15,20,25,30,35		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
オトギリソウ	2002.12.6	50粒	15,20,25,30,35		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
キカラスウリ	2002.12.18	50粒	30	35-25			0	0						0	0					
キマメ	2002.8.29	50粒	15,20,25,30,35		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
キンミズヒキ	2002.10.29	50粒	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
クチナシ(伊豆系)	2002.12.18	50粒	25								0	0								
クチナシ(自生種・有酸)	2002.1.18	50粒	25								0	0								
クチナシ(日大系 B122A)	2002.12.20	50粒	25								0	0								
コエンドロ	2002.5.28	50粒	15,20,25,30,35	35-25,30-20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
タカクマムラサキ	2002.1.24	50粒		35-25										0	0					
タカクマムラサキ	2002.12.10	50粒		35-25										0	0					
トウガン(沖縄系)	2002.11.11	50粒	25,30,35		0	0	0	0	0	0										
ババイヤ(ドレスデン系)	2002.6.10	50粒	25								0	0								
ヒナタイノコスチ	2002.11.20	50粒	15,20,25,30,35		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
ホソバセンナ	2002.11.15~	50粒	20,25,30				0	0	0	0	0	0								
ミンマサイコ(韓国系)	2002.11.6	50粒	20								0	0								
ミンマサイコ(筑波系)	2002.11.8	50粒	20								0	0								
ミンマサイコ(和歌山系)	2002.11.6	50粒	20								0	0								
ミツバ	2002.7.8	50粒	15,20,25						0	0	0	0	0	0						
メハジキ	2002.7.15	50粒	15,20,25						0	0	0	0	0	0						
ヤクチ	2002.8.21	14粒	15,20,25,30,35		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
オミナエシ	2002	50粒	15,20,25,30,35		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						

発芽試験開始日:2007.8.14

表3 平成13年(2001年)産・貯蔵期間6年種子の発芽率(%)

植物名	採種日	供試数	供試温度 °C		35°C		30°C		25°C		20°C		15°C		35-25°C		30-20°C		25-15°C	
			恒温	変温	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉	出根	出葉
ヘチマ(AD105)	2001.11.27	20	30			100	100													
エビスグサ(AD061)	2001.9.17	50	30			100	94													
アサガオ・白実(AD135)	2001.9.17	50	25							88	88									
ローゼル(AD080)	2001.1	50	15,20,25,30,35	35-25,30,20,25-15	40	32	66	64	74	68	80	72	76	52	68	66	62	60	80	72
トウアズキ(AD061)	2001.1.25	9	30	30-20				67	67											
シロバナヨウシュチョウセンアサガオ(AD139)	2001.7.26	50	30					72	68									78	78	
アサガオ・黒実(AD135)	2001.9.17	50	25							70	66									
ゴマ・黒(AD144)	2001.10.3	50	25							50	42									
キダチトウガラシ・小川香料(AD139)	2001.1	50	30					38	12											
ゴクラクチョウカ(AM0245)	2001.8.15	20	15,20,25,30,35	35-25,30,20,25-15	0	0	5	0	5	0	30	0	0	0	10	0	0	0	0	0
ハブソウ(AD061)	2001.9.17	50	20,25,30					22	14	28	16	22	12							
バンジロウ(ピンク)(AD108)	2001.10.15	50	30					28	8											
タイワンツナンソ(モロヘイヤ)(AD089)	2001.11.26	50	25							22	16									
ゲットウ(AM025)	2001.10.20	50	25							16	10									
サキシマフヨウ(AD090)	2001.12.14	50	30					12	12											
カワラケツメイ(AD061)	2001.10.23	50	30					4	4											
クララ(AD061)	2001.7.27	50	20									4	4							
ケンボナンシ(AD085)	2001.11.1	50	20,25							0	0	2	2							
アマタハ(AD119)	2001.1.29	50	20							0	0									
アミガサユリ(AM003)	2001.5.20	50	20	35-25,30,20,25-15										0	0	0	0	0	0	0
インドジャボク(AD132)	2001.8.23	50	25,30,35	35-25	0	0	0	0	0	0	0					0	0			
ウツボグサ(AD138)	2001.8.14	50	15,20	25-15								0	0	0	0				0	0
オオカラスウリ(AD105)	2001.10.23	25	30	35-25			0	0							0	0				
オオバコ(AD149)	2001.11.13	50	20									0	0							
オオハマギキョウ(AD153)	2001.3	50	20									0	0							
オトギリソウ(AD047)	2001.12.5	50	20									0	0							
キンミズヒキ(AD060)	2001.10.27	50	25							0	0									
ゲンノショウコ(AD063)	2001.11.7	50	20									0	0							
サジオモダカ(AM001)	2001.8.7	50	20									0	0							
サンピロード(AD143)	01.7.1~8.31	50	30					0	0											
シソ(AD138)	2001.11.27	50	25,30					0	0	0	0									
シソアオイ(AD090)	2001.1.25	50	15,20,25,30,35	35-25,30,20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
シンノウヤシ(AM016)	2001.11.26	50	30,35					0	0	0	0									
タカクマムラサキ(AD137)	2001.1.12	50		35-25											0	0				
タカクマムラサキ(AD137)	2001.12.21	50		35-25											0	0				
タラノキ(AD118)	2001.9.3	50	15,20,25,30,35	35-25,30,20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
トウガ・長実・濃緑(AD105)	2001.10.26	50	30					0	0											
トウガラシ・タカノツメ(AD139)	2001.11.30	50	25							0	0									
トウキ(AD119)	2001.7.31	50	20									0	0							
ナンゴクカモメゾル(AM133)	2001.12.14	20	15,20,25,30,35	35-25,30,20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ハトムギ(AM015)	2001.8.18	25	20,25,30					0	0	0	0	0	0							
バクバク・ドレスデン(AD103)	2001.6	50	25							0	0									
ヒキオコン(AD138)	2001.12.4	50	20,25,30					0	0	0	0	0	0							
ヒナタイノコズチ(AD021)	2001.11.7	50	20									0	0							
ホウライアオキ(AD132)	2001.11.29	50	25,30,35	35-25	0	0	0	0	0	0	0				0	0				
ホソバセンナ(AD061)	2001.10.31	50	25							0	0									
ボタンボウフウ(AD119)	2001.10.23	50	15,20									0	0	0	0					
ミシマサイコ・和歌山系(AD119)	2001.10.31	50	20									0	0							
メバジキ(AD138)	2001.7.27	50	25							0	0									
ヤウチ・在来種(AM025)	2001.8.31	50	30					0	0											
ヤボランジ(AD069)	2001.5.3	10	15,20,25,30,35	35-25,30,20,25-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

発芽試験開始日:2007.11.7

表4 発芽温度と発芽率の関係

植物名	温度 (°C)	最終 発根率 (%)	発根 開始日 (日)	発根 終了日 (日)	平均発根 所要日数 (日)	最終 出葉率 (%)	出葉 開始日 (日)	出葉 終了日 (日)	平均出葉 所要日数 (日)
平成20年(2008年)									
メハジキ	15	3.3	16.5	18.5	16.8	2.7	23.0	32.0	27.5
	20	48.0	4.0	4.7	4.0	48.0	7.7	14.0	9.3
	25	76.7	4.0	6.7	4.1	76.0	5.0	10.3	6.0
	30	89.3	4.0	5.7	4.0	87.3	4.0	11.7	5.4
ケイガイ	15	2.0	7.0	9.0	5.0	2.0	9.0	9.0	9.0
	20	4.0	4.7	6.3	5.4	2.7	6.7	7.0	6.8
	25	2.7	4.0	4.0	4.0	2.7	4.0	4.0	4.0
	30	0.7	8.0	8.0	8.0	0.7	9.0	9.0	9.0
アマ	15	94.0	3.0	6.0	3.0	92.0	6.3	10.0	7.7
	20	94.7	3.0	4.0	3.0	93.3	4.0	6.0	4.7
	25	94.7	2.0	3.0	2.1	91.3	3.0	5.0	3.4
	30	89.3	2.0	3.3	2.1	88.0	3.0	6.3	3.1
アイ	15	55.3	4.0	22.3	7.9	51.3	15.0	34.7	16.2
	20	58.0	3.0	20.0	5.6	55.3	7.7	23.7	13.8
	25	46.7	2.0	8.7	3.5	43.3	7.0	24.3	10.2
	30	40.0	2.0	7.0	3.0	33.3	5.0	24.0	10.3
カワラケツメイ	15	10.7	33.3	52.0	44.2	5.3	46.3	68.0	59.1
	20	28.0	3.0	59.7	51.1	26.7	10.0	87.0	59.4
	25	76.7	3.0	59.0	34.0	74.7	9.7	63.7	36.5
	30	70.7	3.0	30.3	15.4	60.7	6.0	25.3	15.4
ジギタリス	15	68.7	8.7	32.3	14.7	65.3	14.0	41.0	18.5
	20	58.7	7.7	15.3	10.2	56.0	8.7	18.7	11.9
	25	53.3	4.0	14.0	8.2	50.0	8.0	15.7	9.7
	30	60.0	3.0	15.3	8.1	57.3	8.0	17.7	9.7
平成21年(2009年)									
ケイガイ	15	81.3	6.0	9.3	6.3	80.7	8.0	16.3	9.3
	20	70.0	3.0	8.0	4.3	69.3	6.0	12.3	6.4
	25	89.3	2.0	9.3	2.4	89.3	6.0	10.3	6.2
	30	75.3	2.0	5.7	2.1	72.0	3.0	12.0	5.9
トロロアオイ	15	66.0	3.0	9.3	6.1	44.0	14.0	24.0	16.1
	20	82.7	2.0	16.0	3.0	78.7	4.0	16.0	8.4
	25	86.0	1.0	10.7	2.3	82.7	4.0	15.7	5.8
	30	81.3	1.0	3.3	2.1	80.0	3.0	7.0	3.7
カワラケツメイ	15	20.7	20.0	126.3	86.6	19.3	43.7	130.3	98.1
	20	77.3	3.0	106.7	71.4	76.0	8.7	128.7	75.2
	25	86.0	5.7	41.0	20.0	85.3	8.3	48.0	23.5
	30	94.0	2.7	15.0	6.3	92.0	5.7	17.3	8.1

数値は平均値(n=3:1処理50粒供試)

発根および出葉の開始日と終了日は置床後日数



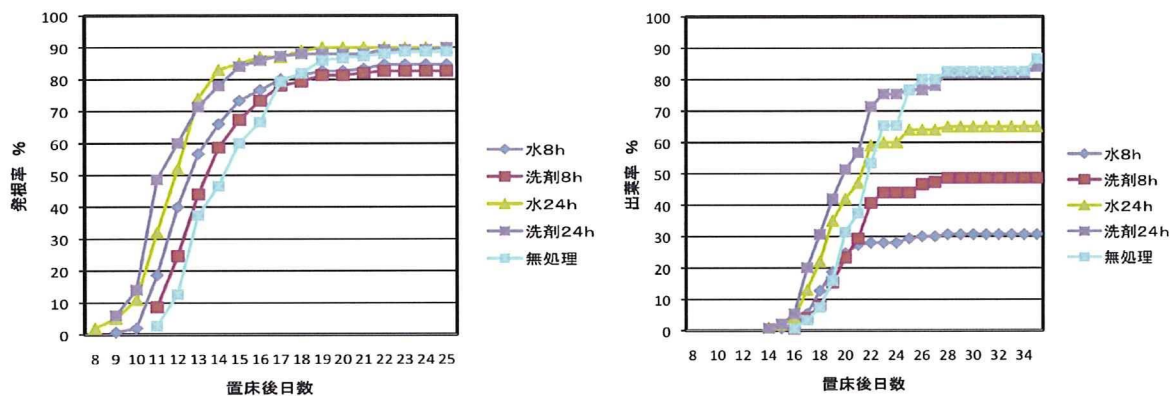


図1 洗浄処理したトウキ種子の5°C貯蔵3年後の発芽率(%)の推移  
(左:発根率, 右:出葉率)



図2 洗浄処理したトウキ種子の5°C貯蔵3年後の発芽状況  
(種子置床後21日)

上左:水8h区, 上右:洗剤8h区  
中左:水24h区, 中右:洗剤24h区  
下左:無処理区

表5 異なる温度下で貯蔵したトウキ洗浄種子の発根率(%)および出葉率(%)

貯蔵温度	貯蔵期間	水8h		洗剤8h		水24h		洗剤24h		無処理	
		発根率 %	出葉率 %	発根率 %	出葉率 %	発根率 %	出葉率 %	発根率 %	出葉率 %	発根率 %	出葉率 %
5 °C	1年	82.7	37.3	84.0	38.0	90.0	65.3	92.0	86.7	94.0	86.0
	2年	90.0	34.7	88.0	22.7	91.3	63.3	94.0	78.7	90.0	81.3
	3年	84.7	30.7	84.0	48.7	90.0	65.0	90.0	84.0	90.0	86.7
-1 °C	1年	73.3	23.3	72.0	32.0	84.0	35.3	92.0	84.0	90.0	86.0
	2年	55.3	12.7	64.7	12.7	91.3	66.0	86.0	70.0	92.0	86.7
	3年	60.0	7.3	74.0	18.7	81.3	40.7	85.3	50.7	93.3	84.7
-20 °C	1年	63.3	16.0	66.0	19.3	86.0	53.3	88.0	77.3	88.0	80.0
	2年	58.0	13.3	82.7	40.0	88.0	56.7	91.3	80.7	84.7	58.7
	3年	61.3	9.3	66.0	6.0	89.3	59.3	92.7	76.0	82.0	40.7

註1: 種子島研究部で処理, 封入した種子。貯蔵は5°Cを種子島研究部で, -1°Cと-20°Cを筑波研究部で行い, その後の発芽試験は, それぞれの研究部で同一条件下で行った。ただし, 発芽チャンパーは異なる機種を用いた。

表6 乾燥に弱い種子の貯蔵条件と発芽

植物名	採取播き 播種数	貯蔵条件		貯蔵1ヶ月後		貯蔵3ヶ月後		貯蔵6ヶ月後		貯蔵1年後		貯蔵2年後		
		播種数	発芽数	播種数	発芽数	播種数	発芽数	播種数	発芽数	播種数	発芽数	播種数	発芽数	
ピロウ	25	13	室温・ポリ袋	10	5	10	0	10	0	10	0	10	0	10
			室温・アルミ袋	10	4	10	0	10	0	10	0	10	0	10
			低温・ポリ袋	10	4	10	0	10	0	10	0	10	0	10
			低温・アルミ袋	10	5	10	0	10	0	10	0	10	0	10
			種子	25	25	10	10	3	10	0	10	0	10	0
ヤマモガシ	10	10	室温・アルミ袋	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
			室温・ポリ袋	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
			低温・ポリ袋	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
			低温・アルミ袋	10	8	10	9	10	5	10	0	10	0	10
			播種	2007.3.22	野外	2007.4.23	野外	2007.6.22	野外	2007.9.21	野外	2008.4.3	野外	2009.4.3
ハマビワ	25	25	室温・ポリ袋	20	20	25	25	25	25	25	25	25	25	
			室温・アルミ袋	20	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
			低温・ポリ袋	20	20	25	25	25	25	25	25	25	25	25
			低温・アルミ袋	20	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25
			播種	2007.4.3	シャーレ	2007.5.2	シャーレ	2007.7.3	シャーレ	2007.10.3	野外	2008.4.3	シャーレ	2009.4.3
タカクマムラサキ	50	50	室温・ポリ袋	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
			室温・アルミ袋	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
			低温・ポリ袋	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
			低温・アルミ袋	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
			播種	2007.4.3	シャーレ	2007.5.2	シャーレ	2007.7.3	シャーレ	2007.10.3	シャーレ	2008.7.23	シャーレ	2009.4.3
カンラン	25	23	室温・ポリ袋	10	10	10	2粒(2本)	10	0	10	0	10	0	
			室温・アルミ袋	10	5	10	0	10	0	10	0	10	0	
			低温・ポリ袋	10	8	10	8粒(11本)	10	7粒	10	10粒(16本)	10	7粒(10本)	
			低温・アルミ袋	10	6	10	4粒(5本)	10	7粒	10	0	10	0	
			播種	2007.4.3	シャーレ	2007.5.2	シャーレ	2007.7.3	シャーレ	2007.10.3	シャーレ	2008.4.3	シャーレ	2009.4.3
ヤマモモ	25	14	室温・ポリ袋	25	16	25	5	25	6	25	25	25	25	
			室温・アルミ袋	25	1	25	0	25	0	25	0	25	0	
			低温・ポリ袋	25	18	25	23	25	2	25	2	25	1	
			低温・アルミ袋	25	6	25	12	25	0	25	0	25	0	
			播種	2007.5.29	温室	2007.6.29	野外	2007.8.29	野外	2007.11.29	野外	2008.5.29	野外	2009.5.28

アカメガシワ	種子	50	発根41、原葉16	室温・ポリ袋	50	発根28、原葉3	50	発根28、原葉25	50	発根34、原葉24	50	0	50	0
	播種	2007.8.9	シャーレ	室温・アルミ袋	50	発根26、原葉16	50	発根23、原葉17	50	発根23、原葉23	50	0	50	0
				低温・ポリ袋	50	発根27、原葉19	50	発根28、原葉28	50	発根37、原葉24	50	0	50	0
				低温・アルミ袋	50	発根31、原葉18	50	発根37、原葉34	50	発根23、原葉14	50	26	50	28
	播種	2007.8.9	シャーレ	2007.9.10	シャーレ	2007.11.9	シャーレ	2008.2.8	シャーレ	2008.8.8	野外	2009.8.10	野外	
ニガキ	種子	25	2	室温・アルミ袋	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
				低温・アルミ袋	25	8	25	7	25	0	25	0	25	0
				低温・ポリ袋+湿砂	25	1	25	6	25	10	25	6	25	0
				低温・ポリ袋+湿砂+パーミキュ	25	0	25	5	25	9	25	14	—	—
	播種	2007.8.9	野外	2007.9.10	野外	2007.11.9	野外	2008.2.8	野外	2008.8.8	野外	2009.8.10	野外	
ヤマコンニャク	種子	40	39	室温・ポリ袋	10	1	10	—	10	—	10	0	10	確認中
				室温・アルミ袋	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
				低温・ポリ袋	10	3	10	—	10	—	10	6(1)*	10	0
				低温・アルミ袋	10	2	10	—	10	—	10	0	10	0
				低温・ポリ袋+湿砂	20	10	20	8	20	—	20	17(8)*	20	0
				低温・ポリ袋+湿砂+パーミキュ	20	13	20	5	20	—	20	17(0)*	20	0
	播種	2007.8.9	野外	2007.9.10	野外	2007.11.9	野外	2008.2.9	野外	2008.8.8	野外	209.8.10	野外	
クスノキ	果実	25	16	室温・風乾	10	6	10	5	10	0	10	0	10	0
	播種	2007.11.15	野外	低温・ポリ袋	10	4	10	5	10	0	10	0	10	0
				低温・アルミ袋	10	8	10	7	10	0	10	0	10	0
				低温・ポリ袋+湿砂	10	8	10	10	10	0	10	0	10	1
	種子	25	20	室温・風乾	10	10	10	10	10	0	10	0	10	0
	播種	2007.11.15	野外	低温・ポリ袋	10	10	10	10	10	7	10	10	10	10
				低温・アルミ袋	10	10	10	9	10	0	10	0	10	0
				低温・ポリ袋+湿砂	10	8	10	5	10	5	10	10	10	10
	播種	2007.11.15	温室	2007.12.14	温室	2007.2.14	温室	2008.5.14	野外	2008.11.27	温室	2009.11.13	温室	
マルバニッケイ	果実	25	5	室温・風乾	10	2	10	0	10	0	10	0	10	0
	播種	2007.11.15	野外	低温・ポリ袋	10	1	10	8	10	0	10	0	10	2
				低温・アルミ袋	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
				低温・ポリ袋+湿砂	10	7	10	7	10	0	10	1	10	0
	種子	25	23	室温・風乾	10	10	10	6	10	0	10	0	10	0
	播種	2007.11.15	野外	低温・ポリ袋	10	9	10	9	10	5	10	7	10	7
				低温・アルミ袋	10	8	10	4	10	0	10	0	10	0
				低温・ポリ袋+湿砂	10	8	10	10	10	3	10	7	10	10**
	播種	2007.11.15	温室	2007.12.14	温室	2007.2.14	温室	2008.5.14	野外	2008.11.27	温室	2009.11.13	温室	
ムベ	種子	25	25	室温・風乾	20	20	20	1	20	0	20	0	—	—
	播種	2007.11.27	野外	低温・ポリ袋	20	20	20	20	20	17	20	19	20	1
				低温・アルミ袋	20	12	20	18	20	16	20	1	20	3
				低温・ポリ袋+湿砂	20	19	20	20	20	20	20	貯蔵中20粒発根	20	—
	播種	2007.11.27	温室	2007.12.27	野外	2008.2.27	野外	2008.5.27	野外	2008.11.27	温室	2009.11.29	温室	
				(発芽開始日：野外温室)										

\*確認日2009.9.29、球茎数、○内は発芽(出葉)数

\*\*貯蔵時に10粒中9粒発根

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業(生物資源・創薬モデル動物研究事業))  
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(H19-生物資源-指定-001)  
分担研究報告書

薬用植物培養物の長期保存法に関する研究

分担研究者 吉松嘉代 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部・  
育種生理研究室長

協力研究者 千田浩隆 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部・  
リサーチレジデント

継代維持中の薬用植物(セリバオウレン, オウレン属植物, ケシ, オニゲシ, ケシーオニゲシ種間雑種植物及びニチニチソウ)カルスを材料にガラス化法による超低温保存条件[前培養培地の種類と期間, 脱水前処理の有無, ガラス化液(PVS2)処理温度と時間, 洗浄液の種類と洗浄時間]を検討した。ニチニチソウカルス及びケシカルスでは, 超低温保存後の再生が認められなかったが, セリバオウレン形質転換カルスでは12系統中8系統(66.7%), セリバオウレン非形質転換カルスでは1系統中1系統, オウレン属植物カルスでは5系統中4系統(80%), オニゲシカルスでは2系統中2系統(100%), ケシーオニゲシ種間雑種植物カルスでは25系統中19系統(76%)の再生に成功した。

保存のための優良クローン選抜のため, 8系統のニチニチソウ及び2系統のウラルカンゾウ培養植物体の育成, クローン化, 継続栽培と薬用成分含量調査を行った。ニチニチソウでは, シュート培養の葉およびその再生植物体の葉で高アルカロイド含量を示すCrI2, 土壌で栽培した再生植物体の葉のアルカロイド収量が高いCrIW1①, シュート培養の葉でのアルカロイド収量が高いCrIP2⑱, 未熟果実からの不定胚形成が高い矮生のCrI4を得, 特にシュート培養での保存に適した植物であると判断した。

ウラルカンゾウでは, 1年目の鉢栽培でグリチルリチン含量, 収量ともに高かったGuが根の収量, グリチルリチン含量及び収量が優れ, 2.7年の栽培で, 径1mm以上の根のグリチルリチン含量が2.6%に達した。また, Guサブクロンの養液栽培のうち, 特にGu2-3-2の生育が優れ, 1.1年栽培株の根(径1mm以上)のグリチルリチン含量は約3%に達し, 保存に適したクローンであると判断した。さらに, このクロンの養液栽培を引き続き行い, 2年後の収量, glycyrrhizin含量及びliquiritin, isoliquiritin及びglycoumarin含量を調査した。その結果, Gu2-3-2根は, glycyrrhizin含量が5.5%に達し, liquiritin 1.0%, isoliquiritin 0.29%であることが判明した。また, 閉鎖温室での養液栽培で得られたウラルカンゾウ主根の乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, 希エタノールエキス含量を調査した結果, いずれも日本薬局方規格の範囲内であることが判明した。

## A. 研究目的

熱帯多雨林地帯をはじめ地球上に分布する多様性に富んだ植物資源は、現代医療でも完治が難しいとされるアレルギー等の各種疾患や新興感染症等に有効な次世代の新薬開発原料として重要であり、欧州、米国等の先進国で特に注目されている。しかしながら、アジア、アフリカ地域での急激な人口増加、大気汚染、森林伐採の継続ならびに大気中二酸化炭素の増加による地球温暖化にともなう世界的な環境破壊および砂漠化により、地球上の植物の遺伝的多様性が失われつつある現状にあり、これらの多様性の維持および保存技術の確立は緊急性の高い課題である。本研究では、最新技術によるこれらの多様性の保存法の構築を行う。この研究で得られた技術により、現在、需要が増しながらも絶滅の危機にさらされている貴重な薬用植物資源の迅速な保護及び将来に渡っての活用が期待できる。また、現在、活発に研究が進められている宇宙開発においても、人類にとって重要である植物多様性の宇宙空間および地球外惑星への搬出が可能となる。

## B. 研究方法

### 1) 薬用植物カルスの超低温保存

材料植物 ショ糖3%, ナフトレン酢酸(NAA)1mg/l, カイネチン(Kin)2mg/l及びグルタミン10mg/l含有Woody Plant (WPG) 培地(WPGN1K2)で継代中(20°C, 暗所)のセリバオウレン(形質転換及び非形質転換), オウレン属植物カルスおよびショ糖3%, NAA1mg/l, Kin 2mg/l 含有Murashige and Skoog (MS) 培地(MSN1K2)で継代中のオニゲシ, ケシーオニゲシ種間雑種植物及びニチ

ニチソウカルス(20°C, 暗所, 但しニチニチソウは25°C, 暗所)を材料とした。

超低温保存(図1) 径約2-3mmに調製したカルスを0.2Mショ糖と1Mグリセリンを含有する液体培地[H19年度はGamborg B5 (B5) 培地, H20年度以降はWPGN1K2 (セリバオウレン及びオウレン属植物) 又はMSN1K2培地(ケシ, オニゲシ及びケシーオニゲシ種間雑種)], 20°C(但しニチニチソウは25°C), 暗所で1-5日間前培養した。前培養後の切片は、前処理(0.4Mショ糖と2Mグリセリンを含むB5液体培地, 24°C, 10分)後あるいは前処理無しで、ガラス化液(PVS2液)処理[室温(24°C)又は氷上(0°C), 15-60分間]後、液体窒素中に保存した(PVS2液1ml内で保存)。再培養は、クライオチューブを解凍(40°C, 1分間)後、1Mショ糖含有B5培地、WPGN1K2又はMSN1K2液体培地で10-20分間洗浄(10分間静置又は10分後に洗浄液を交換)し、保存前と同条件で培養した。

### 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

材料植物 シュート培養として継代維持中のニチニチソウ[Cr: 植物ホルモン無添加(HF)MS培地, 3%ショ糖, 23°C/14時間明]および新規導入種子を用いた。

発芽条件 常法により殺菌後, HF1/2MS 固形培地(2%ショ糖), 24°C/14時間明 20°C/10時間暗, 後に暗所(24時間)で培養した。発芽後のシュートは、Crと同様にHFMS培地で継代維持し、同クローンを植木鉢に植出し、グロースチャンパー(GC)内で栽培した。一部(CrMW2, CrMP2)は殺菌後の種子を

直接植木鉢に播種し、同様に栽培した。

栽培条件 3号鉢（赤玉土-クレハ培養土-堆肥=3:1:1）、24°C/12時間明 20°C/12時間暗、相対湿度60%、GC2室で栽培した。選抜後は5号鉢（同条件）に植え替え、非閉鎖温室1（20°C、相対湿度50%、日長なりゆき）で栽培した。

アルカロイド抽出 栽培植物上部の葉あるいはシュートの葉及び茎を凍結乾燥後粉末にし、日本ウォーターズ社製固相抽出カラム OasisMCX1cc/30mgを用いたアルカロイドの抽出と精製を行った。植物試料約50mgを精密に量り取って15ml容コニカルチューブに入れ、5%酢酸溶5mlを正確に加え、超音波洗浄機で30分間、ボルテックスミキサーで1分間抽出した。OasisMCX1cc/30mgカラムにメタノール1mlを入れて洗浄後、ミリQ水1mlを入れて洗浄した。5%酢酸抽出液を遠心分離（4,500rpm、3分間）後、上清1mLを正確に量りとり、OasisMCXカラムに負荷した。マニホールドを用いながらOasisMCXカラムにメタノール1mlをいれ洗浄し、さらに2%ギ酸溶液1mLで洗浄した。その後、OasisMCXカラムにアンモニア水/メタノール混液

（5:95）1mLを入れ、アルカロイドを溶出、溶媒を留去後、メタノール500 $\mu$ lに再溶解してウルトラフリーMC（ミリポア社製）、15,000rpm、20°Cで1分間遠心濾過し、HPLC分析試料とした。

HPLC条件 Waters Alliance PDA HPLC system（セパレーションモジュール：2795、フォトダイオードアレイ検出器：2996）を用い、以下の条件で分析した。

Column: TOSOH TSKgel ODS-100V 5 $\mu$ m 4.6 i.d.  $\times$ 250mm, Solv.A: 10 mM Sodium

1-heptanesulfonate pH 3.5, Solv.B: MeCN, Gradient (B%): 0-20 min 36%, 27 min 43%, 32-34 min 63%, 35 min 36%, Column temp: 28°C, Flow: 0.8 ml/min, Detection UV 254 nm（定量）、200 nm-400 nm（定性） Ajmaline, Vincamine, Ajmalicine, Catharanthine, Serpentine, Vindoline, Vincristine, Vinblastineを同時分析。

形態観察 選抜植物について形態的特性を調べた。

### 3) ウラルカンゾウ苗の大量増殖と養液栽培法の確立

材料植物 ウラルカンゾウ種子（北海道医療大学系統HK13905-96）無菌発芽個体より誘導した培養植物体（GuH, TS291-04）及び筑波研究部栽培圃場保存植物（北海道医療大学系）シュートより誘導した培養植物体（Gu, TS301-07）を材料とした。増殖は、シヨ糖3%含有植物ホルモン無添加WPG固形培地での継代培養により行った。

ストロン様組織の誘導による苗の増殖（高上馬ら：特開2005-137291） 継代培養を行っているGuシュートをクローン化し、それぞれのクローンシュートの2節茎切片を、6%シヨ糖とNAA0.01mg/l添加MS液体培地に植付け、20°C、暗所、60-100rpmで培養しストロン様培養物を得た。約2ヶ月毎に継代培養を繰り返す、生育良好なサブクローンGu2-2-1、Gu2-3-2およびGu2-5-2を得た。ストロン様培養物の節あるいは頂芽切片をNAA0.1mg/l、Kin 0.5mg/l、1%シヨ糖を含むWPG液体培地（WPG(1)N0.1K0.5）（20ml/40 $\phi$ 培養試験管、支持体：フロリアライト）に移植して、20°C、14時間照明下で培養し、再

生植物体を得た。

鉢栽培条件 閉鎖温室：温度20℃，相対湿度50%，日長14時間（早朝と夜間2時間に補光照明を使用），土壤条件：ペラボン-土（赤玉土-クレハ培養土-堆肥=3:1:1）=1:1，鉢：径15cm×高さ30cmポリエチレンポット，肥料：ハイポネックス(NPK6-10-5)1000倍液を週1回散布

養液栽培 ストロン様組織の培養により増殖させたウラルカンゾウ再生植物体

（Gu2-2-1及びGu2-3-2）は，支持体を詰めた径15cm×長さ30cmのポリエチレンポットに植え，肥料養液を入れたコンテナ内で栽培した。

グリチルリチン分析 植物体を収穫して各部位に分割し50℃で数日間温風乾燥後粉末にし，その約100mgを精密に秤量後，50%エタノール7mlを正確に加え，超音波洗浄機で30分間，ボルテックスミキサーで1分間抽出した。抽出液を遠心分離（4,500rpm，3分間）後，上清500 $\mu$ lをウルトラフリーMCに入れ，15,000rpm，20℃で1分間遠心濾過し，上清をHPLCに注入した。

HPLC条件：カラム TSKgel ODS-100V

（TOSOH，径4.6mm×250mm，5 $\mu$ m），移動相 アセトニトリル（溶媒A）-2%酢酸（溶媒B）=2:3，流速：1.0 ml/分，カラム温度 20℃，検出 UV 254 nm（定量），200-400 nm（定性）

ウラルカンゾウ二次代謝物の分析 前記 Glycyrrhizin分析と同様に抽出後，以下のHPLC条件で，glycyrrhizin，liquiritin，liquiritigenin，isoliquiritin，isoliquiritigenin，glycycoumarin及びGlabridinの7種の化合物の同時分析を行った。

HPLC条件 カラム TSKgel ODS-100V

（TOSOH，径4.6mm×250mm，5 $\mu$ m），移動相 アセトニトリル（溶媒A）-1%酢酸（溶媒B），0-42分 0-70%B，42-44分 70-100%B，44-45分 100-0%B，流速：1.0 ml/分，カラム温度 40℃，検出 UV 254 nm（定量），200-400 nm（検出ピークの同定）

局方試験 養液栽培したウラルカンゾウ根及び根茎について，日本薬局方第15改正記載に方法に従い，確認試験（TLC），乾燥減量，灰分，酸不溶性灰分，希エタノールエキス含量，グリチルリチン酸含量を測定した。

## C. 研究結果

### 1) 薬用植物カルス of 超低温保存

継代維持中の薬用植物（セリバオウレン，オウレン属植物，ケシ，オニゲシ，ケシーオニゲシ種間雑種植物及びニチニチソウ）カルス materials にガラス化法による超低温保存条件 [前培養培地の種類と期間，脱水前処理の有無，ガラス化液（PVS2）処理温度と時間，洗浄液の種類と洗浄時間] を検討した。ニチニチソウカルス及びケシカルスでは，超低温保存後の再生が認められなかったが，セリバオウレン形質転換カルスでは12系統中8系統（66.7%），セリバオウレン非形質転換カルスでは1系統中1系統，オウレン属植物カルスでは5系統中4系統（80%）（表1，図2），オニゲシカルスでは2系統中2系統（100%），ケシーオニゲシ種間雑種植物カルスでは25系統中19系統（76%）（表2，図3）の再生に成功した。

### 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種子の特徴と発芽率を表3に、1986年から培養シュートとして継代維持しているCr及び新規導入種子から誘導した植物・再生植物体をGC内で栽培し、その葉のアルカロイド含量を調べた結果を図4に示した。同時分析を行った7種のアルカロイドのうち、葉からはcatharanthine, vindoline, vinblastineの3種のアルカロイドが検出された。同ロットの種子由来植物であっても個体間のアルカロイド含量の差は大きかったが、概してCr, CrI, CrIW1, CrIW2, CrIP2由来植物の含量が高い傾向を示した。

この結果及びシュート形成能の高さより、図5に示す11系統をシュート培養で維持する系統とした。インドの白花植物由来のCrIW2は、植物1個体の種子集団から得た植物であったが、桃花及び白花が3:1の比で出現した（開花した19個体のうち、桃:15個体、白:4個体）。CrIW2は白花植物に桃花植物の花粉が交配した植物と推察され、野生植物由来の導入種子は保存前に十分な形質調査が必須であることを示唆している。なお、花色の違いによるアルカロイドパターン・含量の差は認められなかった。

選抜植物は、5号鉢に植え替え、非閉鎖温室でさらに栽培を継続し、形態観察（表4）及び葉中のアルカロイド含量（図6）及び1葉あたりのアルカロイド収量（図7）を調べた。葉試料収穫時の栽培日数及び収量を表5に示す。葉中のアルカロイド含量は、CrI2が最も高く、乾燥重量あたりcatharanthine: 0.25%, vindoline: 0.43%, vinblastine: 0.0015%であった。1葉あたりのアルカロイド収量は、CrIW1①が最も高く、catharanthine: 134.45mg, vindoline: 167.0mg, vinblastine: 2.4mgであ

った。

選抜植物について、シュート培養の葉のアルカロイド含量（図8）及び1培養試験管あたりのアルカロイド収量（図9）を調べた。シュート培養では栽培植物の葉と同様に、CrI2が最も高く、乾燥重量あたりcatharanthine: 0.88%, vindoline: 1.16%, vinblastine: 0.0038%であった。1試験管あたりのシュート培養葉のアルカロイド収量は、CrIP2⑨が最も高く、catharanthine: 991.36mg, vindoline: 1058.12mg, vinblastine: 3.53mgであった。

### 3) ウラルカンゾウ苗の大量増殖と養液栽培法の確立

ストロン様培養物での増殖効率及び閉鎖温室での鉢（土耕）栽培時の形質調査で選抜（図10）し、1.1年の養液栽培で根のglycyrrhizin含量が約3%に達したウラルカンゾウGu2-2-1及びGu2-3-2の養液栽培（図11）を引き続き行い、2年後の収量、glycyrrhizin含量及びliquiritin, isoliquiritin及びglycycoumarin含量を調査した（図12）。その結果、1株あたりの根の乾燥重量は、Gu2-2-1は19.42g, Gu2-3-2は15.18gであり、1.1年生根に比べてGu2-2-1は約1.5倍、Gu2-3-2は0.7倍の増加率であった。glycyrrhizin含量は、いずれの系統も根が最も高く、Gu2-2-1は3.7%, Gu2-3-2は5.5%に達した。Liquiritin及びisoliquiritin含量はglycyrrhizin含量と相関が認められ、いずれも根が最も高く、Gu2-3-2の方が高かった。Glycycoumarinは根茎が最も高含量であった。養液栽培ウラルカンゾウ根のglycyrrhizin含量は、Wako試薬のグリチルリチン標準品を用いての測定値と日本公定書協会の標準品を用いた局方試験結果では異なっており、



Wako試薬の標準品での測定値の方が高かった(表6)。Wako試薬は含水率未知であるため、それによる差が生じたと考えられた。局方試験での分析値では、いくつかの根の glycyrrhizin 含量は2.5%以下であり、局方規格値を下回るものがあったが、1.1年生根においても十分に局方規格値を満たす根を得ることが可能なことが確認された。また、閉鎖温室での養液栽培で得られたウラルカンゾウ根の乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、希エタノールエキス含量は、いずれも日本薬局方規格の範囲内であることが判明した(表6)。

#### D. 考察

薬用植物カルスの超低温保存では、前培養培地、解凍後の洗浄液をそれぞれの植物の継代維持に適した基本培地及び植物成長調節物質組成・濃度に変更し、前培養期間を検討することで、前年度まで超低温保存後の再生が認められなかったセリバオウレン形質転換体の66.7%の系統で再生が認められ、ケシーオニゲシ種間雑種カルスでも76%の系統で再生が認められた。今後は、カルスだけでなく、培養植物体及びシュートでの保存条件の検討が必要と思われる。

1.1年の養液栽培で根の glycyrrhizin 含量が高かった Gu2-3-2 は、養液栽培2年でも Gu2-2-1 より高含量であったが、2年目の根の収量を1.1年目と比較すると、Gu2-2-1 は1.5倍、Gu2-3-2 は0.7倍であり、根の収量増加の伸びは少なかった。従って、養液栽培年数の増加は、養液栽培での甘草生産において、効果があるとは言えず、1年の養液栽培で十分な glycyrrhizin 含量を示す栽培法あるいは品種の育成が望ましいと思われた。

#### E. 結論

継代維持中のセリバオウレン 13 系統(形質転換 12 系統及び非形質転換 1 系統)、オウレン属植物(中国産) 5 系統、ケシ 2 系統、オニゲシ 2 系統、ケシーオニゲシ種間雑種 25 系統を材料にガラス化法による超低温保存条件を検討し前培養培地、解凍後の洗浄液をそれぞれの植物の継代維持に適した基本培地及び植物成長調節物質組成・濃度に変更し、前培養期間を検討することで、前年度まで超低温保存後の再生が認められなかったセリバオウレン形質転換体の 66.7%の系統で再生が認められ、ケシーオニゲシ種間雑種カルスでも 76%の系統で再生が認められた。

ストロン様培養物での増殖効率及び閉鎖温室での鉢(土耕)栽培時の形質調査で選抜し、1.1年の養液栽培で根の glycyrrhizin 含量が約3%に達したウラルカンゾウ Gu2-2-1 及び Gu2-3-2 の養液栽培を引き続き行い、2年後の収量、glycyrrhizin 含量及び liquiritin、isoliquiritin 及び glycycomarin 含量を調査した結果、Gu2-3-2 根は、glycyrrhizin 含量が5.5%に達し、liquiritin 1.0%、isoliquiritin 0.29%であることが判明した。また、閉鎖温室での養液栽培で得られたウラルカンゾウ主根の乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、希エタノールエキス含量を調査した結果、いずれも日本薬局方規格の範囲内であることが判明した。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

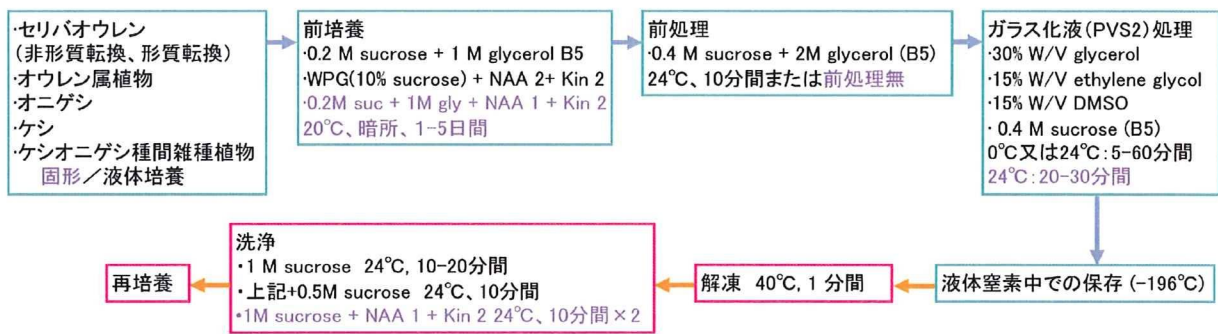
##### 1. 論文発表

なし

## 2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代, 木内文之, 川原信夫, 「ガラス化法による薬用植物カサの超低温保存」, 日本薬学会第130年会(岡山), 2010年3月29日
- 2) 吉松嘉代, 乾貴幸, 河野徳昭, 千田浩隆, 柴田敏郎, 川原信夫, 佐藤文彦, 「閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産に関する研究」, 日本生薬学会第56回年会京都2009 (2009.10.4)
- 3) Kayo Yoshimatsu, Noriaki Kawano, Takayuki Inui, Hirotaka Chida, Fumihiko Sato, Miho Ikeda, Masaru Ohme-Takagi, “Efficient production of pharmaceutically important secondary metabolites in containment greenhouse”, 238th American Chemical Society National Meeting & Exposition, Washington, DC, August 16-20, 2009 (2009.8.16).
- 4) 吉松嘉代, Mondher El JAZIRI, Christian RABEMANANTSOA, Prakash Kumar TEWARY, 木内文之: ニチニチソウの形態形成能とアルカロイド生産能, 日本薬学会第129年会(京都), 2009年3月27日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



青字はH21年度に検討した項目

図1. ガラス化法による超低温保存の手順

表1. 超低温保存後再生が認められたセリバオウレン及びオウレン属植物カルス (H21年度)

植物名	種類	クローン記号	前培養期間	PVS2処理
セリバオウレン	非形質転換体	Cj	1日間	30分間
			4日間	20分間
	Cjmdr1アンチセンス導入体	CjAntiII627-6-1	1日間	30分間
		CjAntiII627-12-2	5日間	15分間
	sGFP導入体	CjsGFPC525-5	4日間	20分間
	GUS導入体	CjGUSII627-7-1	1日間	30分間
			4日間	20分間
			CjGUSII627-7-2	4日間
	4' OMT導入体	CjHE4' II627-10	1日間	30分間
	6OMT導入体	CjIE6x I423-10	4日間	20分間
CjHE6 I423-2		4日間	20分間	
オウレン属植物	非形質転換体:ミレン	M(MS0.5/1L)	4日間	20分間
		ComP(1/2)	4日間	20分間
	非形質転換体:ガレン	G(0.5\1P)	4日間	20分間

前培養培地: 0.2 Mシヨ糖, 1 M グリセリン, NAA 1mg/l, Kin 2 mg/l含有WPG液体培地  
 洗浄液: 1 Mシヨ糖含有NAA 1mg/l, Kin 2 mg/l含有WPG液体培地

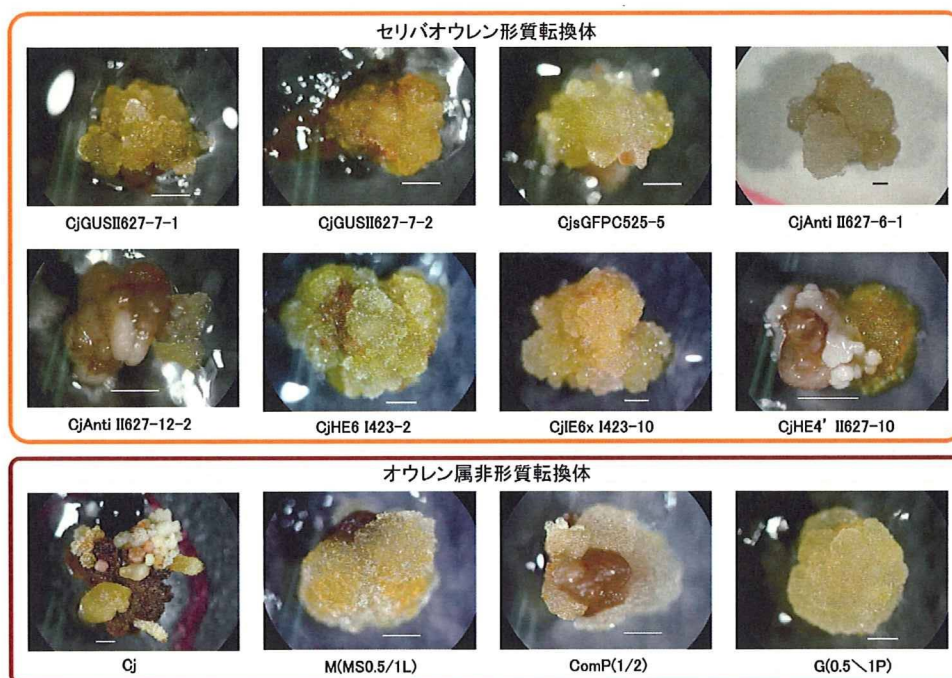


図2. 超低温保存後再生が認められたセリバオウレン及びオウレン属植物カルス  
(スケールは1 mm)

表2. 超低温保存後再生が認められたオニゲシ及びケシーオニゲシ種間雑種カルス

植物	種類	クローン記号	前培養期間	PVS2処理
ケシ(一貫種) × オニゲシ (POL2)	PSN1IK4 ♀ × POL2 ♂	1-6LF	1日間	20分間
		2-8M	1日間	20分間
		2-9LF	1日間	20分間
		#2	2日間	20分間
	PSN5IK4 ♀ × POL2 ♂	2-2M	1日間	20分間
			2日間	20分間
		2-6LF	1日間	20分間
		2-7LF	1日間	20分間
			2日間	20分間
PSN8IK2 ♀ × POL2 ♂	2-7HO	1日間	20分間	
ケシ(フランス) × オニゲシ (POL2)	PSS3F19 ♀ × POL1 ♂	#5	2日間	20分間
		#8	2日間	20分間
		#17	2日間	20分間
		#20	2日間	20分間
		#21	2日間	20分間
オニゲシ (POL2) × ケシ(一貫種)	POL2 ♀ × PSIK-3 ♂	2MOT	1日間	20分間
		2-6M	1日間	20分間

前培養培地: 0.2 Mショ糖、1 M グリセリン、NAA 1mg/l、Kin 2 mg/l含有MS液体培地  
洗浄液: 1 Mショ糖含有NAA 1mg/l、Kin 2 mg/l含有MS液体培地