

GCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGC

>NIB-121-ITS1

TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGAATCGAAGAG
CGACCCGAGAACTTGTGTTTAAGACGGGGCCAGCGGTGCTCGGCCTCGGCCCGACGGCTGCGAACCCCTAGGCCG
GGGGGCGCCAGTTGTGCCCGCCGGCCAAAACCTAACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAACCGAAACTGAA
CAGGATGCCTCCGCCCGTTTGGGGGGGTGACATCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCC
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACG

>NIB-121-ITS2

CCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTAAAGCATTGCCCTCCGCAGCTCGCTCAAAGCGAGTC
GTTGCTGTTCCGGGGGACGGAAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCACCGGAG
ATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGTCGTTAYGCACCTCTTGCCATATTGCGCTGAGCCCGTTTACTCTGTGAG
CAAAATCGACCCTTTGGCGCCGCCCCAGGTGCGCGCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCT
GAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>NIB-122-ITS1

ACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGAATCGAAGAGCGACCCGAGAACATGTTTTAAGACGGGGCCAGCGG
TCGTGCGCCTCGGCCTGACGGCTGCGAACCCCTAGGCCGGGGGGCGCCTAGTTGTGCCCGCCGGCCAAAACCT
AACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAACCGAAACTGAACAGGATGTCTCCGCCCGTTTGGGGGGNTCGACA
TCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAA

>NIB-122-ITS2

CCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTATAGCTTTGCCCTCCGCAGCTCGCTCAAAGCGAGTC
ATTGCTGTTCCGGGGGACGGAAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGGAG
ATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGCACCTCTTGCCATCTTGCGCTGAGCCCGTTTACTCCGTGA
GCAACAGCGACCCTTTGGCGCCGCCCCAGGTGCGCGCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>NIB-123-ITS1

ACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGAATCGAAGAGCGACCCGAGAACATGTTTTAAGACGGGGCCAGCGG
TCGTGCGCCTCGGCCTGACGGCTGCGAACCCCTAGGCCGGGGGGCGCCTAGTTGTGCCCGCCGGCCAAAACCT
AACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAACCGAAACTGAACAGGATGTCTCCGCCCGTTTGGGGGGNTCGACA
TCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAA

>NIB-123-ITS2

CCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTATAGCTTTGCCCTCCGCAGCTCGCTCAAAGCGAGTC
ATTGCTGTTCCGGGGGACGGAAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTCTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGGAG
ATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGCACCTCTTGCCATCTTGCGCTGAGCCCGTTTACTCCGTGA

GCAACAGCGACCCTTTGGCGCCGCCCCAGGTGCGCGCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>NIB-153-ITS1

TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGAATCGAAGAG
CGACCCGAGAACATGTTTTAAGACGGGGCCAGCGGTGCGCCGGCCTCGGCCCGACGGCTGCGAACCTAGGCCG
GGGGGCGCCAGTTGTGCCCGCCGCCAAAACCTAACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAACCGAAACTGAA
CAGGATGCCTCCGCCCCGTTTGGGGGGGTGACATCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCC
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACG

>NIB-153-ITS2

CCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTAAAGCATTGCCCTCCGCAGCTCGCTCAAAGCGAGTC
GTTGCTGTTCCGGGGGACGGAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTCGTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCACCGGAG
ATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGTCGTTACGCACCTCTTGCCATATTGCGCTGAGCCCGTTTACTCTGTGAG
CAAATCGACCCTTTGGCGCCGCCCCAGGTGCGCGCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCT
GAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>NIB-220-ITS1

ACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGAATCGAAGAGCGACCCGAGAACATGTTTTAAGACGGGGCCAGCGG
TCGTCCGCCTCGGCCTGACGGCTGCGAACCTAGGCCGGGGGGCGCCTAGTTGTGCCCGCCGCCAAAACCT
AACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAACCGAAACTGAACAGGATGTCTCCGCCCGTTTGGGGGGNTCGACA
TCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAA

>NIB-220-ITS2

CCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTATAGCTTTGCCCTCCGCAGCTCGCTCAAAGCGAGTC
ATTGCTGTTCCGGGGGACGGAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTCGTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCTCCGGAG
ATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGCACCTCTTGCCATCTTGCGCTGAGCCCGTTTACTCCGTGA
GCAACAGCGACCCTTTGGCGCCGCCCCAGGTGCGCGCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

>NIB-190/1-ITS1、2

CTGAATCGAAGAGCGACCCGAGAACATGTTTTAAGACGGGGCCAGCGGTGTCGGCCTCGGCCCGACGGCTGC
GAACCCTAGGCCGGGGGGCGCCAGTTGTGCCCGCCGCCAAAACCTAACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGA
AACCGAAACTGAACAGGATGCCTCCGCCCCGTTTGGGGGGGTGACATCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGG
CAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGATGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCAC
GTAAAGCATTGCCCTCCGCAGCTCGCTCAAAGCGAGTCGTTGCTGTTCCGGGGGACGGAATGTGACCTCCCGT
GCCTCGTCGTGCGGCTGGTTTAAAAGAGAGTCACCGGAGATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGTCGTTACGC
ACCTCTTGCCATATTGCGCTGAGCCCGTTTACTCTGTGAGCAAAATCGACCCTTTGGCGCYGCCCCAGGTGCGC

GCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTAC

>NIB-190/2-ITS1、2

CTGAATCGAAGAGCGACCCGAGAACATGTTTTAAGACGGGGCCAGCGGTCGTGGCCTCGGCCGACGGCTGC
GAACCCTAGGCCGGGGGGCGCCAGTTGTGCCCGCCGGCCAAAACCTAACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGA
AACCGAAACTGAACAGGATGCCTCCGCCCGTTTGGGGGGTTCGACATCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGG
CAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGATGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCAC
GTAAAGCATTGCCCTCCGCAGCTCGCTCAAAGCGAGTCGTTGCTGTTTCGGGGGGACGGAAWGTGACCTCCCGT
GCCTCGTCGTGCGGCTGGTTTTAAAKAGAGTCACCGGAGATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGTCRTTACGC
ACCTCTTKCCATMTTGCCTGAGCCCGTTTACTCTGTGAGCAAMATCGACCCTTTGGCGCCGCCCCAGGTGCGC
GCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTAC

>NIB-190/3-ITS1

TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGAATCGAAGAG
CAACCCGAGAACATGTTTTAAGACGGGGCCAGCTGTCGTGGCCTCGGCCTGACGTCTGCGAACCCCTAGGCCGG
GGGGCGCCTAGTTGTGCCCGCCGGCCAAAACCTAACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAACCGAAACTGAAC
AGGATGTCTCCGCCCGTTTGGGGGGTTCGACATCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCC
CGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG

>NIB-190/3-ITS2

CCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTAAAGCTTTGCCCTCCGCAGCTCGCTCGAAGCGAGTC
GTTGCTGTTTCGGGGGGACGAAAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTCGTGCGGCTGGTTTTAAAAGAGAGCCTCCGGAG
ATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGCACCTCTTGCCATCTTGCCTGAGCCCGTTTACTCTGTGAG
CAACTGCGACCCTTTGGCGCCGCCCCAGGTGCGCGCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTAC

>NIB-191-ITS1

TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGAATCGAAGAG
CGACCCGAGAACATGTTTTAAGACGGGGCCAGCGGTCGTGGCCTCGGCCTGACGGCTGCGAACCCCTAGGCCG
GGGGGCGCCTAGTTGTGCCCGCCGGCCAAAACCTAACCGGGCGCGGAATGCGCCAAGGAAACCGAAACTGAA
CAGGATGTCTCCGCCCGTTTGGGGGGTTCGACATCCTTCTGAGAAACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCC
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACG

>NIB-191-ITS2

CCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGTATAGCTTTGCCCTCCGCAGCTCGCTCAAAGCGAGTC
ATTGCTGTTTCGGGGGGACGAAAAGTGACCTCCCGTGCCTCGTCGTGCGGCTGGTTTTAAAAGAGAGTCTCCGGAG
ATCGGAAAACGCAACATTGGTGAAGGCATTACGCACCTCTTGCCATCTTGCCTGAGCCCGTTTACTCCGTGA
GCAACAGCGACCCTTTGGCGCCGCCCCAGGTGCGCGCTCGAACTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

9. ジオウ

Table 9-1 「地黄」市場品の塩基配列解読結果 (*trnK* 領域)

	サイト1	サイト2	判定
アカヤジオウ	G	A	
カイケイジオウ	A	G	
NIB-021	G	G>A	
NIB-022	G>A	G	
NIB-045	G	G	
NIB-071	A=G	G	カイケイジオウに近い
NIB-126	A>G	A>G	
NIB-127	A>G	G	カイケイジオウに近い
NIB-155	A>G	G	カイケイジオウに近い
NIB-156	A=G	G	カイケイジオウに近い
NIB-194	A>G	G	カイケイジオウに近い
NIB-195	G	G	
NIB-219	A=G	G>A	カイケイジオウに近い

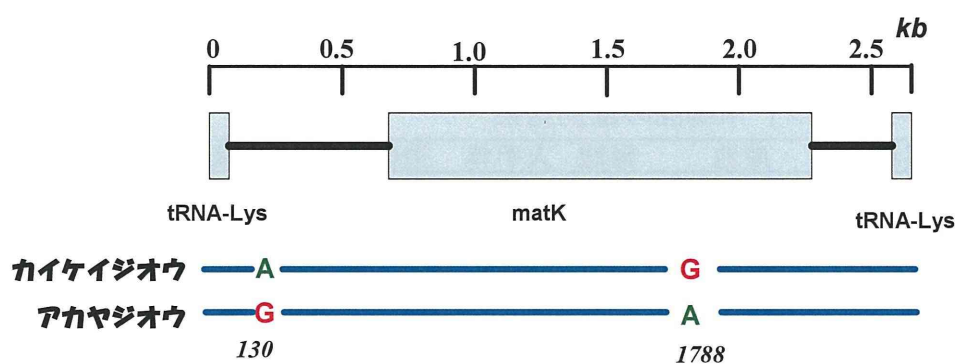


Fig. 9-1 カイケイジオウおよびアカヤジオウの *trnK* 遺伝子の塩基配列

Table 9-2 「地黄」市場品の鑑別結果

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	不明	遺伝子情報による鑑別結果	備考
NIB-021	ジオウ	中国河南省	原形	2010	不明		
NIB-022	ジオウ	中国河南省	原形	2004	不明		熟1級
NIB-045	ジオウ	中国河南省	原形	2009	不明		
NIB-071	ジオウ	中国山西省	原形	2009	カイケイジオウ (<i>Rehmannia glutinosa</i>) に近い		栽培品
NIB-126	ジオウ	中国河南省	刻み	2010	不明		栽培品・乾地黄
NIB-127	ジオウ	中国河南省	刻み	2008	カイケイジオウ (<i>Rehmannia glutinosa</i>) に近い		栽培品・熟地黄
NIB-155	ジオウ	中国山西省	刻み	2009	カイケイジオウ (<i>Rehmannia glutinosa</i>) に近い		乾ジオウ
NIB-156	ジオウ	中国山西省	原形	2010	カイケイジオウ (<i>Rehmannia glutinosa</i>) に近い		熟ジオウ
NIB-194	ジオウ	中国山西省	原形	2009	カイケイジオウ (<i>Rehmannia glutinosa</i>) に近い		
NIB-195	ジオウ	中国山西省	原形	2009	不明		
NIB-219	ジオウ	中国河南省	原形	2008	カイケイジオウ (<i>Rehmannia glutinosa</i>) に近い		熟地黄

10. シャゼンシとビャクジュツ

Table 10-1 「シャゼンシ」市場品の塩基配列解読結果 (ITS1 領域)

鑑別サイト	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	配列タイプ
NIB025	T	C	G	C	T	A	C	C	G	C	T	A	A	G	C	G	T	C	T	C	C	A	C	C	T	C	C	T	C	T	C	C	A2	
NIB047	T	C	G	C	T	A	C	C	G	C	T	A	A	G	C	G	T	C	T	C	C	A	C	C	T	C	C	T	C	T	C	C		
NIB131	T	C	G	C	T	A	C	C	G	C	T	A	A	G	C	G	T	C	T	C	C	A	C	C	T	C	C	T	C	T	C	C	A2	
NIB158	T	C	G	C	T	A	C	C	G	C	T	A	A	G	C	G	T	C	T	C	C	A	C	C	T	C	C	T	C	T	C	C	A2	
NIB198	T	C	G	C	T	A	C	C	G	C	T	A	A	G	C	G	T	C	T	C	C	A	C	C	T	C	C	T	C	T	C	C	A2	
NIB213	T	C	G	C	T	A	C	C	G	C	T	A	A	G	C	G	T	C	T	C	C	A	C	C	T	C	C	T	C	T	C	C	A2	

Table 10-2 「ビャクジュツ」市場品の塩基配列解読結果 (ITS1 領域)

	1	2	3	4	5	6	7	8	配列タイプ
NIB030	T	G	C	C/T	T	C	T	T	japonica type
NIB050	T	G	C	C/T	T	C	T	T	japonica type
NIB103	T	G/A	C	C/T	T	C	T	T	japonica type
NIB164	C	A	A	C	C	A	T	T	ovata type に類似 ¹⁾

1) 太字で示した塩基がovata typeと異なっている。

Table 10-3 「シャゼンシ」市場品の鑑別結果

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	遺伝子情報による鑑別結果	備考
NIB-025	シャゼンシ	中国江西省	原形	2008	オオバコ (<i>Plantago asiatica</i>)	
NIB-047	シャゼンシ	中国浙江省	原形	2006	オオバコ (<i>Plantago asiatica</i>)	
NIB-099	シャゼンシ	中国江西省	原形	2009	オオバコ (<i>Plantago asiatica</i>)	
NIB-131	シャゼンシ	中国江西省	原形	2008	オオバコ (<i>Plantago asiatica</i>)	栽培品
NIB-158	シャゼンシ	中国江西省	原形	2007	オオバコ (<i>Plantago asiatica</i>)	
NIB-198	シャゼンシ	中国江西省	原形	2009	オオバコ (<i>Plantago asiatica</i>)	
NIB-213	シャゼンシ	中国江西省	原形		オオバコ (<i>Plantago asiatica</i>)	

Table 10-4 「ビャクジュツ」市場品の鑑別結果

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	遺伝子情報による鑑別結果
NIB-030	ビャクジュツ	北朝鮮	原形	2010	オケラ (<i>Atractylodes japonica</i>)
NIB-050	ビャクジュツ	中国遼寧省	原形	2010	オケラ (<i>Atractylodes japonica</i>)
NIB-103	ビャクジュツ	中国黒龍江省	原形	2009	オケラ (<i>Atractylodes japonica</i>)
NIB-164	ビャクジュツ	中国浙江省	原形	2010	オオハナオケラ (<i>Atractylodes ovata</i>) に近い

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための
基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）
分担研究報告書

分担研究課題 植物組織培養情報に関する研究
—組織培養物及び効率的増殖法に関する情報—

研究分担者 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 吉松嘉代
研究協力者 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 乾 貴幸
研究協力者 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 河野徳昭
研究協力者 新潟大学農学部附属フィールド科学教育研究センター 岩本 嗣
研究協力者 島根大学生物資源科学部附属生物資源教育研究センター 松本敏一

平成16年薬事工業生産動態統計年報に基づいて作成された「特掲医薬品における漢方エキス製剤91処方の生産量と配合生薬」資料を基に、最優先のデータ取得必須の第1コア生薬5品目（甘草、生姜、人参、蒼朮、黄芩）、優先のデータ取得必須の第2コア生薬15品目（茯苓、芍薬、桂皮、当帰、柴胡、川芎、地黄、麻黄、山梔子、大黄、白朮、牛膝、車前子、黄连、蘇葉）が選定され、続いてデータ取得を行う第一優先生薬25品目（牡丹皮、桃仁、黄耆、細辛、防風、半夏、大棗、五味子、沢瀉、麦門冬、釣藤鉤、山茱萸、遠志、呉茱萸、杏仁、知母、葛根、桔梗、山藥、防己、山椒、黄柏、陳皮、厚朴、木通）、第二優先生薬30品目（阿膠、荊芥、乾姜、附子、紅参、辛夷、芒硝、石膏、竜骨、牡蛎、猪苓、滑石、粳米、枳実、麦芽、竜眼肉、樸櫨、麻子仁、独活、威靈仙、酸棗仁、白芷、薄荷、升麻、竜胆、羌活、天麻、木香、連翹、菊花）が選定された。組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のため、文献情報及び実際の実験で収集するデータ（オリジナルデータ）項目、データ内容及び各データの形式の設定と写真、図表及び文献等の名前付けのルール決めを行った。第1コア、第2コア、第1優先及び第2優先生薬基原植物について植物組織培養による効率的増殖に関する文献情報を収集した。また、第1コア及び第2コア生薬基原植物のうち、植物組織培養系誘導のための材料が入手できた植物について、効率的増殖法と培養体での維持のための植物組織培養系の誘導、効率的増殖法及び植物体再生条件の検討を行った。

A. 研究目的

漢方薬は日本独自の漢方理論に基づいて処方される医薬品であり、現在、全ての大学医学部と医科大学で漢方教育が行われている。日本漢方生薬製剤協会の漢方薬処方実態調査2011¹⁾によると、日常診療の中で漢方薬

を処方する医師はでは全体の89%に上り、今後も漢方薬の需要は増加するものと思われる。また、同協会による漢方製剤等（漢方製剤、生薬、その他の生薬及び漢方処方に基づく医薬品）の生産動態²⁾によると2009年の漢方製剤等生産金額は1,385億円であるが、

2015年には2000億円を超えると予想されている³⁾。

しかしその原料生薬の供給は約90%が海外に、特に中国に依存しており、その多くは野生植物の採取によるものである⁴⁾。従って、生薬の原料となる薬用植物資源の減少が著しく、また、主生産国である中国の近年の急激な経済成長に伴う、中国での物価や人件費上昇、中国国内での生薬の需要増加、外国での生薬の需要増加、中国での採取・輸出規制の影響により、生薬供給価格が高騰している。現に中国から直接輸入している生薬の使用上位30品目の2010年の価格は、2006年の約1.6倍である⁵⁾。

このような状況の中、漢方薬原料となる生薬の国内での安定的・戦略的確保のための基盤を整備することは、日本における漢方薬の安定的・持続的生産に貢献し、国民の健康の増進を図る上で、その意義は大きい。

植物組織培養は、限られた空間で、様々な気候区分で生育する植物を遺伝的に安定に維持でき、また、国内での増殖が困難あるいは交雑により含有成分が変化し易い植物を効率的に増殖できる優れた技術である。本研究では、漢方薬原料植物の安定的・戦略的確保のための基盤整備のため、植物組織培養による効率的増殖法に関する文献調査を行うとともに、漢方薬原料となる薬用植物の供給体制基盤構築のため、材料植物の入手、無菌培養系の確立、増殖法の確立を行う。

B. 研究方法

1) 組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のためのデータベース項目の設定

文献情報及び実際の実験で収集するデータ(オリジナルデータ)項目、データ内容及び各データの形式の設定と写真、図表及び文献等の名前付けのルール決めを行った。

2) 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献調査

第1コア、第2コア、第1優先及び第2優先生薬基原植物について、植物組織培養によ

る増殖法に関する文献調査を行い、設定したデータベース項目への入力を行った。

3) オリジナルデータ取得のための、植物組織培養物の育成

データベースオリジナルデータ取得用の植物組織培養系誘導のための材料が入手できた植物について、常法による殺菌後、各種培地への植付け及び恒温室での培養を行い、培養系の誘導、増殖法の検討を行った。

C. 研究結果

1) 組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のためのデータベース項目の設定

文献情報及び実際の実験で収集するデータ(オリジナルデータ)の項目、データ内容及び各データの形式を表2のように設定した。また、図表及び文献等の名前付けのルールを表3のように設定した。

3) 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献調査

第1コア生薬基原植物のうち、*Scutellaria baicalensis* (黄芩)、*Glycyrrhiza glabra* (甘草)、*Glycyrrhiza uralensis* (甘草)、*Zingiber Zingiber officinale* (生姜)、*Atractylodes lancea* (蒼朮)、*Panax ginseng* (人参)、及び第2コア生薬基原植物のうち、*Coptis japonica* (黄連)、*Coptis chinensis* (黄連)、*Coptis teeta* (黄連)、*Atractylodes japonica* (白朮)、*Atractylodes ovata* (白朮)、*Cinnamomum cassia* (桂皮)、*Gardenia jasminoides* (山梔子)、*Paeonia lactiflora* (芍薬)、*Plantago asiatica* (車前子)、*Perilla frutescens* (蘇葉)、*Angelica acutiloba* (当帰)、*Achyranthes fauriei* (牛膝)、*Achyranthes bidentata* (牛膝)、*Bupleurum falcatum* (柴胡)、*Rehmania glutiosa* (地黄)、*Cnidium officinale* (川芎)、*Rheum palmatum* (大黄)、*Ephedra intermedia* (麻黄)について、植物組織培養による効率的増殖に関する文献情報を収集した。その結果を表4-8に示した。また、第1優先及び第2優先生薬基原植物のうち、*Dioscorea japonica* (山薬)、*Dioscorea batatas* (山薬)、*Aconitum*

carmichaeli (附子)、*Phellodendron amurense* (黄柏)、*Citrus unshiu* (陳皮)、*Magnolia obovata* (厚朴) に関する文献情報を収集し、表 8-9 に示した。

4) オリジナルデータ取得のための、植物組織培養物の育成

現在までにオリジナルデータの内、培養植物体又は培養シュートが得られ、組織培養系が確立し、継代維持が可能となっている植物の例を図 1 に示した。第 1 コア及び第 2 コア生薬基原植物については、外植片から培養植物体に至までのオリジナルデータを収集中であり、図 2-図 4 に示したデータが得られている。

D. 考察

組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のため、文献情報及び実際の実験で収集するデータ (オリジナルデータ) 項目、データ内容及び各データの形式の設定を行い、収集した文献情報のデータシートへの入力を行った。漢方薬原料生薬の基原植物に関する情報は、英語以外の言語、中国語や韓国語で書かれたものが数多く存在し、日本語あるいは英語への翻訳が困難である。また、文献検索により要約が得られても、入手が困難なものが多い。文献情報については、日本語又は英語への翻訳方法及び文献の入手方法について検討が必要であろう。

オリジナルデータ取得時には、材料の植物系統、外植片とした部位、種子のロット等の違いにより、同じ生薬の基原植物であっても、あるいは同じ植物種であっても、殺菌が困難で初代培養物を得るのが非常に困難である例も生じている。また、文献中の植物ホルモン条件では期待した反応が認められない結果も生じている。そのため、オリジナルデータについては、殺菌条件も含め、詳細なデータを収集中である。

E. 結論

組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のため、文献情報及び実際の実験で収集

するデータ (オリジナルデータ) 項目、データ内容及び各データの形式の設定を行い、収集した第 1 コア及び第 2 コア生薬基原植物に関する文献情報のデータシートへの入力を行った。また、オリジナルデータ取得のための材料が入手できた植物については、組織培養系の誘導と効率的増殖法及び植物体再生条件について検討した。

参考文献

- 1) 漢方薬処方実態調査 (定量)、Summary Report、日本漢方生薬製剤協会報告書 2011 年 10 月 18 日、<http://www.nikkankyo.org/topix/news/111114/jittaichousa2011.pdf>, cited 15 March, 2012.
- 2) 漢方製剤等の生産動態、平成 21 年「薬事工業生産動態統計年報」から、日本漢方生薬製剤協会総務委員会・編、2011 年 5 月 20 日、<http://www.nikkankyo.org/publication/movement/h21/all.pdf>, cited 15 March, 2012.
- 3) 森田哲明、“日本が変わる、エッジが変わる”、エッジ産業分析レポート (第 2 回) 漢方薬、第 125 回 NRI メディアフォーラム、野村総合研究所、2010 年 2 月 22 日、http://www.nri.co.jp/publicity/mediaforum/2010/pdf/forum125_2.pdf, cited 15 March, 2012.
- 4) 原料生薬使用量等調査報告書、平成 20 年度の使用量、日本漢方生薬製剤協会生薬委員会、平成 23 年 7 月 15 日、<http://www.nikkankyo.org/topix/news/111001/shiyouyou-chousa.pdf>, cited 15 March, 2012.
- 5) 中国産原料生薬の価格調査について、日本漢方生薬製剤協会、2011 年 10 月 1 日、<http://www.nikkankyo.org/topix/news/111001/kakaku-chousa.pdf>, cited 15 March, 2012.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawano, N., Kiuchi, F., Kawahara, N., Yoshimatsu, K.: Genetic and Phenotypic Analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA Insertional Mutant with Altered Alkaloid Composition, *Pharmaceuticals*, **5**,133-154 (2012).
 - 2) Inui, T., Kawano, N., Shitan, N., Yazaki, K., Kiuchi, F., Kawahara, N., Sato, F., Yoshimatsu, K.: Improvement of benzyloisoquinoline alkaloid productivity by overexpression of 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase in transgenic *Coptis japonica* plants, in press (2012).
 - 3) Yoshimatsu, K. : Innovative cultivation: Hydroponics of medicinal plants in the closed-type cultivation facilities, *Journal of Traditional Medicines*, **28**, Supplement,44, The 28th Annual Meeting of Medicinal and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, August 27-28, Toyama, p.44, S2-3(2011).
 - 4) Yoshimatsu, K., Kawano, N., Inui, T.: Efficient glycyrrhizin production by hydroponic cultivation of Chinese licorice, *BIOINDUSTRY*, **28**(12),13-20 (2011).
 - 5) 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の紹介、和漢薬、No.702(2011.11),3-4(2011).
 - 6) Yoshimatsu, K.: Innovative cultivation: Hydroponics of medicinal plants in the closed-type cultivation facilities, *Journal of Traditional Medicines*, **29**, 30-34 (2012).
- 回和漢医薬学会学術大会（2011.8.27、富山）。
 - 2) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾貴幸, 千田浩隆, 柴田敏郎, 川原信夫：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 (2)ウラルカンゾウ優良株の作出と増殖。日本生薬学会第58回（2011年）年会（2011.9.24-25, 東京）。
 - 3) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾貴幸, 川原信夫, 松本敏一, 岩本嗣：漢方薬に使用される薬用植物の組織培養及び効率的増殖法に関する情報整備（1）。日本薬学会第132年会（2012.3.28-31, 札幌）。
 - 4) 松本敏一、吉松嘉代、川原信夫、山本伸一、新野孝男：薬用植物の組織培養による増殖及びプレート法による超低温保存 1. シャゼンシ及びソヨウ。農業生産技術管理学会平成23年度大会（2011.10.21-22, 平塚）。

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 出願番号 特願2011-245757
 発明者 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、千田浩隆
 特許出願人、識別番号（団体名及び弁理士事務所）鹿島建設株式会社（000001373）
 代理人：丹羽俊輔（100129300）
 発明の名称 カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法
 提出日 平成23年11月9日。

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代：栽培技術の革新：閉鎖系栽培施設における薬用植物の養液栽培。第28

表1. 組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のためのデータベース項目
(文献情報)

No	項目名(必須)	データ型(必須)	データ型備考(必須)
1	生薬コード	文字列	10文字
2	生薬名	文字列	30文字程度
3	生薬名(カナ)	文字列	30文字程度
4	植物学名コード	文字列	30文字程度
5	導入番号	数値	XXXXX ※整数5桁を意味する
6	植物学名	文字列	30文字程度
7	植物和名	文字列	30文字程度
8	データ形式	文字列	10文字程度
9	文献コード	文字列	30文字程度
10	文献: 出典(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	文字列	100文字程度
11	文献: 要約(和訳)	文字列	5000文字程度
12	文献: 目的	文字列	200文字程度
13	文献: 材料(品種, 系統, 産地, 由来)	文字列	100文字程度
14	文献: 外植片	文字列	100文字程度
15	文献: 初期培養	文字列	500文字程度
16	文献: シュート増殖	文字列	500文字程度
17	文献: 発根	文字列	500文字程度
18	文献: 馴化条件	文字列	500文字程度
19	文献: 鉢上げ・定植	文字列	500文字程度
20	文献: 栽培条件	文字列	500文字程度
21	文献: 再生植物体の形質	文字列	500文字程度
22	文献: 分析した成分	文字列	500文字程度
23	文献: 成分の抽出法	文字列	500文字程度
24	文献: 分析法	文字列	500文字程度
25	文献: 備考	文字列	500文字程度

表2. 組織培養物及び効率的増殖法に関する情報整備のためのデータベース項目
(オリジナル情報)

No	項目名(必須)	データ型(必須)	データ型備考(必須)
26	オリジナルコード	文字列	30文字程度
27	オリジナル: 公開の可否	文字列	10文字
28	オリジナル: 発表(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	文字列	100文字程度
29	オリジナル: 目的	文字列	200文字程度
30	オリジナル: 材料(品種, 系統, 産地, 由来)	文字列	100文字程度
31	オリジナル: 外植片	文字列	500文字程度
32	オリジナル: 外植片の殺菌	文字列	500文字程度
33	オリジナル: 初期培養	文字列	500文字程度
34	オリジナル: シュート増殖	文字列	500文字程度
35	オリジナル: 発根	文字列	500文字程度
36	オリジナル: 馴化条件	文字列	500文字程度
37	オリジナル: 鉢上げ・定植	文字列	500文字程度
38	オリジナル: 栽培条件	文字列	500文字程度
39	オリジナル: 再生植物体の形質	文字列	500文字程度
40	オリジナル: 成分分析法	文字列	500文字程度
41	オリジナル: 生産物	文字列	500文字程度
42	オリジナル: 参考文献(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	文字列	100文字程度
43	オリジナル: 備考	文字列	500文字程度
44	オリジナル: 材料植物の写真の説明	文字列	100文字程度
45	オリジナル: 材料植物の写真	画像	2MB程度
46	オリジナル: 外植片の写真の説明	文字列	100文字程度
47	オリジナル: 外植片の写真	画像	2MB程度
48	オリジナル: シュートの写真の説明	文字列	100文字程度
49	オリジナル: シュートの写真	画像	2MB程度
50	オリジナル: 幼植物の写真の説明	文字列	100文字程度
51	オリジナル: 幼植物の写真	画像	2MB程度
52	オリジナル: 再生植物体の写真の説明	文字列	100文字程度
53	オリジナル: 再生植物体の写真	画像	2MB程度
54	オリジナル: 栽培植物の写真の説明	文字列	100文字程度
55	オリジナル: 栽培植物の写真	画像	2MB程度
56	オリジナル: その他の写真の説明	文字列	100文字程度
57	オリジナル: その他の写真	画像	2MB程度
58	オリジナル: シュート増殖図表の説明	文字列	100文字程度
59	オリジナル: シュート増殖図表	画像	2MB程度
60	オリジナル: シュート発根図表の説明	文字列	100文字程度
61	オリジナル: シュート発根図表	画像	2MB程度
62	オリジナル: 植物体再生図表の説明	文字列	100文字程度
63	オリジナル: 植物体再生図表	画像	2MB程度
64	オリジナル: 成分構造式説明	文字列	100文字程度
65	オリジナル: 成分構造式	画像	2MB程度
66	オリジナル: 成分含量図表の説明	文字列	100文字程度
67	オリジナル: 成分取量図表	画像	2MB程度
68	オリジナル: その他図表の説明	文字列	100文字程度
69	オリジナル: その他図表	画像	2MB程度
51	オリジナル: 幼植物の写真	画像	2MB程度

表3. 図表及び文献等ファイルの名前付けのルール

項目ファイル種類	ファイル名のルール	例
9:文献コード	属名_種名-Ref-番号	Panax_ginseng-Ref-1
26:オリジナルコード	属名_種名-Exp-番号	Panax_ginseng-Exp-1
写真ファイル (jpg:Pファイル)	属名_種名-Exp-番号-P-種類番号 種類番号 1:材料, 2:外植片, 3:シュート, 4:幼植物, 5:再生植物体, 6: 栽培植物, 7:その他	Panax_ginseng-Exp-1- P-1
図ファイル (jpg 又は pdf:Fファイル)	属名_種名-Exp-番号-F-種類番号 種類番号 1:シュート増殖, 2:発根, 3:植物体再生, 4:成分構造式, 5: 成分含量, 6:成分収量, 7:その他	Panax_ginseng-Exp-1- F-1
表ファイル (jpg 又は pdf:Tファイル)	属名_種名-Exp-番号-T-種類番号 種類番号 1:シュート増殖, 2:発根, 3:植物体再生, 4:成分構造式, 5: 成分含量, 6:成分収量, 7:その他	Panax_ginseng-Exp-1- T-1

表4. 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献一覧 (第1コア-1)

生薬名	ラテン名	文献コード	出典(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	要約(邦訳)
黄芩	Scutellaria baicalensis Georgi	Scutellaria baicalensis-Ref-1	Li H et al, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62: 169-173 (2000)	<p>中医学で様々な慢性の病気の治療に用いられるコガネバナ(Scutellaria baicalensis)の効率的な増殖法を開発したので報告する。Thidiazuron (TDZ)は、コガネバナの完全実生、伸長した胚軸の切片、無菌植物の茎切片からのシュート分化に効果的であった。胚軸切片又は節切片の組織学的観察により、不定芽形成は、カルスを經由していることが明らかとなった。3種の組織片でのTDZが誘発するシュート分化を比較したところ、最適な再分化効率のためには、外植片の切り出しは不要であることが示された。切り出された胚軸切片(0.7シュート/外植片)よりもそのままの実生の胚軸(20シュート/外植片)の方が非常に多くのシュートが分化し、このことは、隣接する組織で産生された内在性の代謝物がシュート誘発のための材料となっていることを示唆している。95%以上の再分化シュートが発根し、無菌培養系あるいは温室条件下で植物体を得られた。この研究で開発した再分化手法は、薬理活性をもつ成分の同定を通じたこの作物の改良の基盤を提供し、最終的には最適化した医療用製品の開発に役立つであろう。</p>
黄芩	Scutellaria baicalensis Georgi	Scutellaria baicalensis-Ref-2	Alan A.R. et al, Plant Cell Reports, 26, 1345-1355 (2007)	<p>フローサイトメトリ(FCM)解析と形態学的解析および化学組成分析の組合せにより、インビトロで6年以上クローンを維持している Scutellaria baicalensis 系統の遺伝的安定性及び生理活性物質の多様性について調べた。若いシュート由来の各サンプルを用いた FCM 解析に基づいて、S. baicalensis の核DNA量は、0.84 pg/2Cと算出した。また、FCM 解析では、インビトロで長期間維持している系統間に核DNA量および倍數性の有意な差は認められなかった。外環境に馴化させたインビトロ維持系統の植物体は、特色のある生育および生理活性物質の生産性を示した。S. baicalensis で認められたこのような高い遺伝的安定性は、この薬用植物のよく解析された系統の長期間の無菌保存および容易な供給を可能にする。この研究は、持続的な維持管理、モニタリング、特異的な化合物を有する薬用植物組織の生産への新しいアプローチを示すものである。</p>
甘草	Glycyrrhiza uralensis Fisher	Glycyrrhiza uralensis-Ref-1	Kusano G. et al, Natural Medicines 54, 199-203 (2000)	<p>総減が危惧された甘草産地(山梨県塩山市)のウラルカンゾウ Glycyrrhiza uralensis Fisch.について、環境整備、地下茎の移植補植、茎頂培養による復活を試み、所期の目的を果たしたので、その経過を報告する。</p>
甘草	Glycyrrhiza glabra Linne	Glycyrrhiza glabra-Ref-1	Kohjiyouma M et al, Plant Tissue Culture Letters 12, 145-149 (1995)	<p>G. glabra L. の腋芽切片をNAA及びBAPを含む改良MS培地上で培養した結果、培養40日後に1 mg/L BAPを含む培地上でマルチプルシュートの形成が認められた。得られたシュートを切断し、NAA及びBAPを含む培地上へ移植した結果、培養80日後に0.01-0.05 mg/LのNAAを含む培地でシュートはよく発根し、健全な植物体へと成長した。</p>
甘草	Glycyrrhiza glabra Linne	Glycyrrhiza glabra-Ref-2	Patel RM and Shah RR, Journal of Herbal Medicine and Toxicology 1, 27-29 (2007)	<p>カンゾウの試験管内で再生は、節切片を外植片として使うことで達成された。いずれの植物ホルモン濃度でもシュートの形成がよく認められたが、特に0.5 mg/LのBAP及び0.05 mg/LのNAAを含むMS培地上では、100%の頻度でシュート形成が認められた。また、1.0 mg/LのBAPと0.05 mg/LのNAAを含むMS培地上で、早く形成したシュートほど最大長とシュートあたりの節の数が多かった。一方で、外植片あたりのシュートの最大数は、0.05 mg/LのNAA及び高温度のBAP (2.0mg/L)を含むMS培地で認められた。試験管内での発根は、BA (0.5 - 1.0 mg/L)を含むMS培地で良好であった。最大根数とシュートの最大長は、0.5 mg/LのBAで処理で記録された。さらに発根した幼植物は土壌と腐葉土を等量混ぜた土でよく馴化し、72%が活着した。この技術は、純粋かつ無菌の植物原料の効率的な周年生産への応用が期待される。</p>
生姜	Zingiber officinale Roscoe	Zingiber officinale-Ref-1	Sharma TR et al, Plant Cell Reports 13, 300-302 (1994)	<p>ショウガシュートの芽の4%アルギン酸ナトリウムゲルへの包埋に成功した。包埋した芽は、試験管内で発芽し、根とシュートを形成した。培養5週間後の包埋した芽の試験管内での発芽(新芽の出現)は、培地により異なる16.7%から81.8%であった。平均的なシュート長(2.3cm)と根長(1.7 cm)の正常な植物体は、特別な処理無しで滅菌していない土への移植が可能であった。これらの植物体は、ショウガ黄枯病(ginger yellows disease)の症状や、カビ病の症状がなかった。</p>
生姜	Zingiber officinale Roscoe	Zingiber officinale-Ref-2	Sharma TR and Singh BM, Plant Cell Reports 15, 274-277 (1995)	<p>1 mg/l BA + 2 mg/l calcium pantothenate + 0.2 mg/l GA₃ + 0.05 mg/l NAAを添加したMS液体培地で増殖させたショウガ(Zingiber officinale Rosc.)の培養シュートよりミクロ根茎の増殖に成功した。培養4週間後、培地をミクロ根茎誘導培地(8 mg/l BAP + 75 g/l ショ糖含有MS培地)に交換した。ミクロ根茎形成は、25°C、暗所での静置培養20日後から開始した。培養50-60日後、1-4個の芽を持つ重さ73.8-459 mgのミクロ根茎を収穫した。湿らせた砂中、室温で2ヶ月間保管すると、ミクロ根茎の80%が発芽し、根とシュートを形成した。</p>
生姜	Zingiber officinale Roscoe	Zingiber officinale-Ref-3	Ma X. and Gang D.R., Phytochemistry, 67, 2239-2355 (2006)	<p>ショウガは、薬用および食用として重要なハーブであり、その健康促進作用は世界的に知られている。ショウガは、種で増やすことができず、根茎を分けることでクローン増殖を行うので、世代間で病原体が蓄積、移行しやすい。加えて、このような増殖技術は、有用なストックを増やすのに時間がかかる。われわれは、これら問題の改善のため、インビトロにおける増殖法を開発した。3つの異なる系統のショウガについて、従来法により温室内で生育した株とインビトロでの増殖由来株との間に化合物組成の違いがあるかどうかを、GC/MSおよびHPLC-ESI-MSを用いたメタボリックプロファイリングにより調べた。モノおよびセスキテルペン、gingerolとその糖化化合物、ジアリールヘプタノイド、これら化合物のメチルエステル誘導体などが同定された。主成分解析および階層的クラスター解析により、系統(yellow ginger vs white ginger and blue ring ginger)と部位(根茎、根、葉、シュート)間の化合物組成の違いが明らかとなる一方で、生育法の違い(従来法による温室における生育とインビトロ増殖を経た植物)による化学的組成に有意な差はないことが示唆された。さらにANOVAの結果も、これら解析結果と一致するものであった。これら知見は、ショウガで認められる多様にわたる一連の化合物の生合成機構は、インビトロによる増殖法の影響を受けにくいことを示唆する。</p>

表5. 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献一覧 (第1コア-2)

生薬名	ラテン名	文献コード	出典(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	要約(和訳)
蒼朮	<i>Atractylodes lancea</i> DC <i>Candolle</i>	<i>Atractylodes_lancea</i> -Ref-1	Shoyama Y et al, <i>Shoyakugaku Zasshi</i> 41(4), 313-317 (1987)	ホノノケラ <i>Atractylodes lancea</i> DC.の茎頂をBAP(1及び2.5 ppm)とIAA(1 ppm)を添加した培地で4週間培養した。シュートをBAP 5 ppm+IAA 1 ppm添加培地で7週間維持培養したところ、切片当たり、約11本のシュートが形成した。一方、BAP 2.5 ppm+NAA 1 ppm添加培地で培養したところ、マルチプルシュート形成と細胞集塊の形成が誘導された。引き続き、これらのシュートをオーキシン(IAA, NAA及びBA)を含む培地あるいは植物ホルモン無添加培地に移植したところ、発根が誘導された。オーキシンのかわりにGAを含む培地、あるいは植物ホルモン無添加培地にGAを添加した培地では、塊茎の肥大が観察された。その移植は、良好であった。
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	<i>Panax_ginseng</i> -Ref-1	Choi YE et al., <i>Plant Cell Reports</i> 18, 493-499 (1999)	ニンジン(<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.)未熟種子胚の子葉外植片を植物成長調節物質を含まないMS培地で培養すると、直接不定胚を誘導でき、多数の不定胚がお互いに融合し、子葉外植片と融合していた。子葉外植片を1.0 mg/L 2,4-Dで72時間処理すると、子葉の全ての表面に個々の不定胚が形成し、外植片当たりの形成不定胚数は増加し、4倍となった。組織学的観察により、予め原形分離を促させた子葉に形成した全ての個々の不定胚は、1個の表皮細胞由来であることが示され、一方、前処理無しの子葉に形成した多数の不定胚は表皮細胞及び表皮下細胞集団由来であった。不定胚が子葉期まで成熟すると、成長が停止し、白く休眠していると思われた。1.0 mg/L以上のGAあるいは低温処理(-2°C, 6週間以上)が不定胚発芽の必要条件であった。組織観察の結果、低温やGA処理を行っていない不定胚の子葉細胞には多数の前置嚢があり、細胞質の密集、プロプラスチド、不活性型のミトコンドリアが認められ、一方、低温やGA処理後の不定胚の子葉細胞は、高度に液胞が形成し、発達した葉緑体を含み、多数のクラスターで囲まれた活性型のミトコンドリアを含んでいた。このことは、培養で得られたニンジンの不定胚は、種子胚と同様に、成熟すると休眠することを示唆している。
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	<i>Panax_ginseng</i> -Ref-2	Tang DC and Choi YE, <i>Plant Cell Reports</i> , 19, 491-496 (2000)	野生型 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> を根切片に感染させ、ニンジン(<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.)毛根株を得た。異なった色素沈着をした毛根3系統を選別した。1 mg/L 2,4-D添加Murashige and Skoog (MS)培地で不定胚形成をもつカスを選導した赤い色素沈着をした系統の不定胚形成率は37.4%であった。不定胚形成能を有するカスからの不定胚は2,4-D濃度(0.5 mg/L)を低くすることにより、効率的に誘導できた。10 mg/L GA含有培地で発芽した不定胚は、GAを含まない1/2MS培地に移植した。ニンジン形質転換植物体は、側根が豊富で活発に生育する根を有していた。ニンジン形質転換植物体の形態変化は根の収量増加に有益であろう。
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	<i>Panax_ginseng</i> -Ref-3	Choi YE et al., <i>Plant Cell Reports</i> , 17, 544-551 (1998)	ニンジン(<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.)子葉外植片を植物成長調節物質を含まないMS培地で培養すると、直接不定胚が形成した。体細胞不定胚は、子葉の成熟度によりマルチプルあるいはシングル状態が発生した。半熟の子葉の子葉外植片は、マルチプル不定胚を形成し、一方、完熟種子胚の子葉外植片は、シングル不定胚を形成した。シングル体細胞不定胚は、根とシュートを有する正常な植物体へと分化するが、マルチプル不定胚は、根を形成せず、単にマルチプルシュートへと分化した。シングル不定胚由来の植物体の根の生育は、MS基本培地ではシュートに比べると良く分化した。MS培地から硝化アンモニウムを抜くことと植物体の根の形成を促進した。シングル不定胚から再分化し、良く発達したシュートと根を持つニンジン植物体は、土壌へ移植すると、温室で良好に馴化した。
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	<i>Panax_ginseng</i> -Ref-4	Lim HT et al., <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> , 49, 179-187 (1997)	形態形成を介したニンジン(<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.)の再分化を試験した。インビトロ植物体の葉、葉柄、花梗及び根より、密集したカスを選導した。葉柄がカス誘導に最も効果的であった。2,4-D (4.5 μM) + kinetin (0.46 μM)含有Murashige and Skoog (MS)培地で誘導したカスを同培地で2週間コンディションングした。これらのカスをkinetin (4.7 μM) + チオ硫酸塩(STS) 10 μM添加1/2MS培地で培養すると不定芽へ分化した。GA ₃ (2.9 μM) + BA (4.4 μM)MS培地への添加は、試験管内発芽を効率化(86.1%)で誘導し、正常な植物体への発育に影響を与える多数の不定芽を誘導した。再分化シュートをBA 1.2 μMを含むMS20培地で6週間培養すると、良く発達した根を有する植物体を得られた。再生植物体の遺伝的安定性を調べるため、核DNA含量を測定した。DNAのサイトメトリック分析により、全ての再分化は親植物と同様に2倍体であり、細胞分裂時も安定であることが判明した。
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	<i>Panax_ginseng</i> -Ref-5	Asaka I et al., <i>Planta Medica</i> , 59, 345-346 (1993)	我々はニンジン(<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.)のマルチプルシュートを中程度の高温処理することにより胚様体を誘導する新規の技術を開発した。形成した胚様体数は、未処理の場合に比べて10倍であった。胚様体を植物ホルモン無添加培地に移植することで正常な植物体が再分化した。これらの植物体は、従来のニンジンと同様に、ginsenosides Rb ₁ , Rg ₁ 及びその他のサポニンを含有了。
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	<i>Panax_ginseng</i> -Ref-6	Arya S. et al., <i>Plant Cell Reports</i> , 10, 277-281 (1991)	ニンジン(<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.)種子胚から誘導した不定胚形成能を有する4年生の細胞株KGTG PCLよりプロトプラストを単離した。2% Cellulysin, 1% Pectinase, 1% Macerase, 12% mannitolを含む1/2 Murashige and Skoog (MS)培地で5-6時間消化すると22-25 × 10 ⁶ /g tissueの高収量のプロトプラストが得られた。1 × 10 ⁶ プロトプラスト/mlプロトプラスト培養には最適な植付量であった。アガロシ培地で初期分枝頻度10%が得られた。Myo-inositol (8%)が最も最適な浸透圧調節物質であった。不定胚形成能を有するカスから誘導したプロトプラストから体細胞不定胚が形成し、それらは幼植物まで再分化した。

表6. 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献一覧 (第1コア-3、第2コア-1)

生薬名	ラテン名	文献コード	出典(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	要約(和訳)
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	<i>Panax_ginseng</i> -Ref-7	Shoyama Y et al., <i>Planta Medica</i> , 54, 155-156 (1988)	カスを選導したニンジン(<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.)不定胚形成を若い花芽より9ヶ月で誘導した。完熟胚は、GA ₃ (1.4 μM) + BAP (2.2 μM) + 1.5%ショ糖含有1/2濃度のMurashige and Skoog (1/2 MS)培地で発芽可能であった。GA ₃ (1.4 μM) + BAP (1.1 μM)含有培地では、1シュートから切片当たり8本のシュートを持つマルチプルシュートが形成した。一方、GA ₃ (1.4 μM) + BAP (4.4 μM)添加は、花芽形成を誘導した。シュートの発根は、5.4 μM NAA含有MS培地が最良であった。引き続き、幼植物はバームキュライトに移植した。
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.	<i>Panax_ginseng</i> -Ref-8	Sarits Arya, Inder Dev Arya I & Tage Eriksson, <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> 34: 157-162, 1993.	体細胞胚とエンブリオジェニックカスが、チョウセンニンジンの未熟胚から形成した。これらの体細胞胚は2次胚、3次胚形成によって増殖し、それは培地中のホルモンに影響された。オーキシンである1.0 mg/Lの2,4-D、NAAおよびIAAは、最初の胚の胚軸や子葉から直接発生した2次胚、3次胚の形成に効果的だった。体細胞胚や不定胚の集合体は、最初の胚から誘導された。サイトカイニン(Kn, BA)は、不定胚形成を阻害した。二次不定胚は生育して、2つの過程(MS+1.0 mg/LのKnでシュート伸長、1.0 mg/LのKn+1.0 1-mg/LのGA3培地で発根)で植物体が再生した。
黄連	<i>Coptis japonica</i> Makino var. <i>dissecta</i> Nakai	<i>Coptis_japonica</i> -Ref-1	Syono K and Furuya T, <i>Experientia</i> , 28, 236 (1972)	要約無し
黄連	<i>Coptis japonica</i> Makino var. <i>dissecta</i> Nakai	<i>Coptis_japonica</i> -Ref-2	Ikuta A et al., <i>Phytochemistry</i> , 14, 1209-1210 (1975)	オウレン根茎の主要なアルカロイドはすべてカスでも確認された。含量は根茎に比べて低い。ベルベリンとヤネオラジンが、カス中の主要なアルカロイドであった。カス培養から再分化した植物の根茎では、アルカロイド含量の回復が認められた。カス培養から再分化した植物体は、元の植物体と比べ、形態学的にも生合成活性においても正常であることが示唆された。
黄連	<i>Coptis chinensis</i> Franchet	<i>Coptis_chinensis</i> -Ref-1	Songsheng H et al., <i>Journal of Wuhan Botanical Research</i> (1991)	要約無し
黄連	<i>Coptis chinensis</i> Franchet	<i>Coptis_chinensis</i> -Ref-2	Shanqiang K et al., <i>Journal of Wuhan Botanical Research</i> (1992)	この論文では、物理的および化学的な方法による <i>Coptis chinensis</i> の同調的な胚発生について報告した。体細胞胚発生は、0.5 mg/L 2,4-D と 0.2 mg/L NAA を含む MS 培地で誘導され、0.5 mg/L ABA と 0.2 mg/L NAA を含む MS 培地で 2 週間培養後、メッシュサイズの異なるふるいで体細胞胚を分離した。その結果、この方法により 60-85% の体細胞胚の同調率を達成した。結論: 植物の体細胞胚発生とその同調のカギは、適切な植物成長調節因子を適切な濃度で与えることにより体細胞胚の発達をコントロールすることであり、ふるいを使うのは単に同じサイズの体細胞を得るための方法である。
黄連	<i>Coptis teeta</i> Wallich	<i>Coptis_teeta</i> -Ref-1	Tandon P and Rathore T.S., <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> , 28, 115-117 (1992)	<i>Coptis teeta</i> の無菌播種した発芽種子より取り出した胚軸切片を 2,4-D と Kn を含む MS 培地上で培養することにより、カス培養系を確立した。このカスを Kn を含む 1/2 MS 培地上で 6-7 週間培養することでマイクロシュートが得られた。さらに切り出したマイクロシュートは BA を含む 1/2 MS 培地上で発根し、小植物体の再生に成功した。
黄連	<i>Coptis teeta</i> Wallich	<i>Coptis_teeta</i> -Ref-2	Tandon P et al., <i>Indian Journal of Biotechnology</i> , 6, 280-282 (2007)	<i>Coptis teeta</i> の成熟植物の根茎部の腋芽を 4.42 μM の BAP と 0.56 μM の IAA を含む 1/2 MS 培地で培養することにより、多芽体を得た。得られたシュートは、7.35 μM の IAA を含む 1/2 MS 培地で発根し、小植物体の再生に成功した。小植物体は、2.31 μM の Kn、及び、0.56 μM の IAA を含む Gamborg 培地で培養することで根茎切片より直接培養することも可能であった。
白朮	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi ex Kitamura	<i>Atractylodes_japonica</i> -Ref-1	Hatana K et al., <i>Planta Med.</i> 56, 131-132 (1990)	Letterのため要約無し
白朮	<i>Atractylodes ovata</i> DC.	<i>Atractylodes_japonica</i> -Ref-1	Hatana K et al., <i>Planta Med.</i> 56, 131-132 (1990)	Letterのため要約無し
桂皮	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	<i>Cinnamomum_cassia</i> -Ref-1	K. Nirmal Babu, A. Sajina, D. Minoo, G.Z. John, P.M. Mini, K.V. Tushar, J. Rema & P.N. Ravindran, <i>Plant Cell, Tissue and Organ Culture</i> 74: 179-183, 2003.	12年生シナニッケイの茎頂及び節切片からBAとカイネチン添加WPM培地で多芽体が誘導された。培養植物から得た節切片から多数のシュートが得られ、そのシュートは活性炭とBA添加のWPM培地で発根した。植物体は馴化後に野外で栽培したが、90%の生存率であった。

表7. 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献一覧 (第2コア-2)

生薬名	ラテン名	文献コード	出典(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	要約(節訳)
山梔子	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	Gardenia_jasminoides-Ref-1	Maria D. Serret, Maria I. Trillas, Josep Matas, Jose L. Araus, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 217-230, 1997.	クダナシの幼植物体の培養における増殖と順化における密閉、照明及び輪温度の効果を2つのステージ(シュート増殖と発根)と比較した。発根時の植物体は、シュート増殖時より高い光合成独立栄養となった。照度と培地輪温度を低く培養物の密閉を緩くすることで、植物体の光合成独立栄養が高まった。
芍薬	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	Paeonia_lactiflora-Ref-1	Daikie Tian, Ken M. Tilt, Fenny Dane, Floyd M. Woods, Jeff L. Sibley, Scientia Horticulturae 123 (2010) 385-389	シャクヤクの外植片からのシュート形成能をBA, TDZ, GA3添加の半形MS培地で調査した。不定芽は生長点がある組織にもから形成され、節部で最高20本のシュートが得られた。シュート形成にはBAよりTDZ(0.1-3mg/L)が適していたが、高濃度ではシュート伸長を阻害した。外植体を20mg/LのTDZ液で処理すると不定芽を直接誘導できた。GA3はシュート伸長に効果があった。
車前子	<i>Plantago asiatica</i> L.	Plantago_asiatica-Ref-1	S. GONÇALVES, N. MARTINS and A. ROMANO, BIOLOGIA PLANTARUM 53 (4): 774-778, 2009	世界的に絶滅の危険性があるシャゼンシ (<i>P. algarbiensis</i> 及び <i>P. almogavensis</i>) について、無菌播種して得られたシュートを用いて効果的な増殖法を検討した。BA添加のMS培地が両種とも増殖に適していた。両種とも発根率は高かったが、培地のマクロ成分の量やオーキシン濃度による影響は受けなかった。植物体は順化後、通常の生育をし、元の自生地へ戻された。
蘇葉	<i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton var. <i>acuta</i> Kudo	Perilla_frutescens_var_acuta-Ref-1	T.Zhang, X.Y.Wang, Z.Y.Cao, BIOLOGIA PLANTARUM 49 (3): 423-426, 2005	ソウの子葉、胚軸からの植物体再生条件を検討した。MS培地でのシュート形成率は、子葉では91%、胚軸では76%であった。ホルモンの最適な組み合わせは、4.44 μM BA(子葉)、2.22 μM BA+2.85 μM IAA(胚軸)であった。発根は、ホルモンプリーム/2MS培地で良好であった。順化率は80%であったが、再生植物に若干の形態的異常が見られた。
当帰	<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa	Angelica_acutiloba-Ref-1	A. Watanabe · S. Araki · S. Kobari · H. Sudo · T. Tsuchida · T. Uno · N. Kosaka · K. Shimomura · M. Yamazaki · Kazuki Saito, Plant Cell Reports (1998) 18: 187-192	腋芽培養により維持されているトウキの遺伝的変異の発生を検討するため、オリジナル植物とRAPDで比較したところ、変異が認められなかった。したがって、組織培養での増殖によるDNA配列や構造の変異はないと考えられる。
当帰	<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa	Angelica_acutiloba-Ref-2	Miura Y. et al., Planta Medica 54(1), 79-81 (1988).	商業栽培されているトウキ (<i>Angelica acutiloba</i>) 1本より細胞懸濁培養より誘導した体細胞不定胚を介して増殖させたクローン植物は、種子で増殖させた植物に比べて、根の医薬上有効な化学成分(リグスチライド及びピコリン)の含量が非常に均一であった。
牛膝	<i>Achyranthes fauriei</i> Lévl. et Vaniot	Achyranthes_fauriei-Ref-1	Hikino H. et al, Yakugaku Zasshi 95, 581-589 (1975)	イノコズチ属植物の生産する昆虫変態活性物質の生合成経路研究のため、イノコズチ属植物種子からのカルス誘導及び増殖、カルスからの植物体再生、根の培養について検討し、効率的な培養条件を決定した。さらに、得られた各培養組織における昆虫変態活性物質の生産をセンチニクハエの蛹化試験及び抽出物のTLC, GCにより確認した。
牛膝	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume	Achyranthes_bidentata-Ref-1	Gnanaraj W.E. et al, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2(1), 1-5 (2012)	(方法) <i>A. aspera</i> 及び <i>A. bidentata</i> の若いシュートを収穫し、0.1%のHgCl ₂ で表面殺菌後、約1 cmの節切片を調製し、外植片として使用した。外植片は、3%のシュロ糖、0.6% (w/v)の寒天、種々の濃度・組み合わせのBAP, Kin, NAA, IAAを含むMS培地に置床した。(結果) MS培地上で、節切片は偶発的に増殖したが、BAPやKinを加えることでその頻度は高まり、3 mg/LのBAPを含むMS培地でシュート形成頻度が最も高かった。また、外植片あたりのシュートの数は5 mg/LのBAPを含むMS培地で、シュートの長さは3.0 mg/LのBAPを含むMS培地で、それぞれ最大となった。発根頻度、シュートあたりの発根数、根長は、1 mg/LのBAを含む1/2MS培地で最大を記録した。70%の小植物体でポリカップへの抽出に成功し、68%の植物が温室条件下で順化した。また、65%の植物がフィールドに活着した。(結論) これら結果は、新芽を含む節を用いる方法が、信頼性のある新たな <i>A. aspera</i> 及び <i>A. bidentata</i> のクローン増殖法であることを示している。また、高効率なシュート及び根の増殖率と順化後の活着率は、本方法が容易に商業規模での大量栽培に応用可能であることを示している。
柴胡	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	Bupleurum_falcatum-Ref-1	Hiraoka N. et al., Plant Cell Reports 5, 319-321(1986)	体細胞胚経路で増殖したシマサイコ植物体の根と種子繁殖したシマサイコ植物体の根のサポニン含量を含む様々な形質を比較した。組織培養で増殖した植物は、均一な形質を示したが、根重の平均とばらつきは大きく、乾燥重レベルのサポニン含量は、ほとんど差がなかった。根中のサイコサポニンcとdの含量は、組織培養株の方が高かった。

表8. 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献一覧 (第2コア-3、第1優先-1)

生薬名	ラテン名	文献コード	出典(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	要約(節訳)
地黄	<i>Rehmannia glutiosa</i> Libosch. var. <i>purpurea</i> Makino	Rehmannia_glutiosa_var_purpurea-Ref-1	Yong-Yi C. et al, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62, 219-226 (2000)	<i>in vitro</i> の成長と <i>ex vitro</i> の生存に最適な環境を決めるために、異なる培養条件下でアカヤジオウの幼植物を4週間培養した。培養容器の空気交換の回数を増やすと、幼植物の成長は増加し、1時間当たり94回の空気交換で、シュート質量、根生体重量、葉面積、クロロフィル含量が最大となった。高濃度(30g/l)のシュロ糖は、根重を増加させた。シュートの生育は低下させた。シュロ糖が培地に添加されない時、幼植物の純光合成速度は最大であった。一方、 <i>ex vitro</i> の幼植物の生存は、シロ糖濃度によって影響されなかった。暗期の温度(DIF)、光合成光子量(PPF)、日長の差異の実験において、DIFとPPFレベルが増加すると、幼植物の成長が増加した。特に、PPFレベルの増加は、DIFレベルの増加より効果が高かった。PPFのDIF(+8 DIF)と高PPF(210 μmol m ⁻² s ⁻¹)において幼植物の成長が最大を示すので、DIFとPPFの相互作用もまた重要である。結論として、この実験の結果は、培養容器の空気交換回数の増加、シロ糖濃度の減少、PPFと高PPFレベルの組み合わせが、アカヤジオウ幼植物の成長と順化を高めることを示唆している。
地黄	<i>Rehmannia glutiosa</i> Libosch. f. <i>hueichingensis</i> (Chao et Schih) Hsiao	Rehmannia_glutiosa_f_hueichingensis-Ref-1	Xu X. H. and Davey M. R., Plant Cell Reports 2, 55-57 (1983)	カイセイジオウ培養シュートの本業プロトプラストを0.2 mg/l-INAと0.5mg/l-IBA添加MS液体または寒天培地で培養した。グルタミン、アルギニン、グリシン、アスパラギン酸の混合物は、プロトプラストの分裂を促進し、コロニー形成率は27%であった。プロトプラスト由来のコロニーは、カルスを形成し、2.0 mg/l-IAAと1.0mg/l-IBA添加MS寒天培地に移植すると、すぐにシュートを形成した。
川芎	<i>Onidium officinale</i> Makino	Onidium_officinale-Ref-1	北海道中央農業試験場園芸部 野菜花き第1科	成果報告書につき記載なし
大黃	<i>Rheum palmatum</i> Linne	Rheum_palmatum-Ref-1	北海道中央農業試験場園芸部 野菜花き第1科	成果報告書につき記載なし
麻黄	<i>Ephedra intermedia</i> Schrenk et C.A.May.	Ephedra_intermedia-Ref-1	O'Dowd N. et al., Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34, 149-155 (1993)	マオウ属の数種 (<i>E. andina</i> , <i>E. distachya</i> , <i>E. equisetina</i> , <i>E. fragilis</i> var. <i>campylopoda</i> , <i>E. gerardiana</i> , <i>E. intermedia</i> , <i>E. major</i> ssp. <i>procera</i> , <i>E. minima</i> , <i>E. saxatilis</i>) のカルス形成に及ぼす植物成長物質の濃度を検討した。すべての種は、0.25 μMカイネチンと5.0 μM 2,4-DまたはNAA添加修正MS培地でカルスを形成した。数種の胚濁培養は0.25 μMカイネチンと5.0 μM 2,4-DまたはNAA添加MS培地で確立した。バブリングバイオリアクターでの <i>E. andina</i> 胚濁培養の生体重量増加時間は70±7 h、バッチ培養では最長56 hであった。アルギニン・トリウム・ピロリン酸のバッチ培養も可能であった。 <i>E. distachya</i> , <i>E. fragilis</i> , <i>E. saxatilis</i> の製植物、培養幼植物ともにアルカロイドを産出した。他の種の培養幼植物において、トレース程度の1-エフェドリン、トレースから0.14%のd-プロピドエフェドリンが検出された。アルカロイド産生能は、連続した継代培養によって0まで減少した。
山薬	<i>Dioscorea japonica</i> Thunb.	Dioscorea_japonica-Ref-1	Masanori Kadota & Yoshiji Niimi, Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture, Scientia Horticulturae 102, 461-466, 2004	ヤママイモ (<i>Dioscorea japonica</i> Thunb.) のエリート品種の大量増殖法を改良した。初回培養時、新鮮重は0.1%ゼランガム培地で633.0mgと最大となり0.2%では204.3mgだったが、0.1%ゼランガム培地では水浸状態個体数が多くなった。シュート伸長には、節数(それぞれ6.9, 2.1個)、新鮮重(各、283.4, 51.9g)で、液体培地が固体培地より優れていた。0.44mMのBA添加で、節数7.0個、シュート数2.6本および新鮮重336.0mgとなった。LS液体培地の量(40mL, 20mL)では、節数(各18.6, 5.6個)、シュート数(3.6, 2.7本)および新鮮重(783.0, 278.0mg)となり、40mLの培地量が優れていた。静置培養では、回転培養より節数、新鮮重とも増加していた。発根においては、寒天とゼランガム培地は液体培地より発根率は優れていたが、発根数は劣っていた。順化した苗には、主な形質について変異は確認されなかった。

表9. 漢方薬原料植物の植物組織培養による増殖法に関する文献一覧 (第1優先-2、第2優先)

生薬名	ラテン名	文献コード	出典(著者, 雑誌, 巻号頁, 発行年)	要約(和訳)
山薬	<i>Dioscorea batatas</i> Decne.	Dioscorea_batatas-Ref-1	Sachiko MATSUBARA, Y oichi OHMORI, Tomomi KOMASADOMI and Hiroko T AKADA, Multiplication of Chinese Yam 'Ichouim'o' (<i>Dioscorea batatas</i> Decne.) by Multiple Buds Culture, Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University 79, 37-44, 1992	ヤマノイモ類は栄養繁殖されるのでウイルス罹病株が多く、かつ繁殖率が低いので苗イモが高価である。そのため無病のイチョウイモ(<i>Dioscorea batatas</i> Decne.)の多芽体培養による増殖を試みた。MS培地を基本培地とし、種々の支持体や植物ホルモンを添加し、シヨ糖濃度も変えた。培養条件は、25℃、2000Lux人工光による16時間日長とした。多芽体形成のために、栽培植物のムカゴを無菌培養し、発芽してきた小植物の、1枝芽を付けた茎切片を外植体とした。20mg/Lアンシミドール添加基本培地に植え付けたところ、多芽体が形成された。この多芽体を切り分け、アンシミドール0または10mg/L添加に植え付け、40日間振盪又は回転培養を行ったところ、いずれの方法でも多芽体が形成され、特にアンシミドール添加培地の振とう培養区で増殖率が高く、無添加培地では苗条が伸長した。この多芽体を切り分け、10mg/Lアンシミドール、2%シヨ糖添加液体培地で、振とう培養し、46日間隔で継代培養を7回繰り返した。増殖率、形成された多芽体の大きさに世代毎の大きな差は見られず、増殖率はほぼ30倍前後であった。これらの多芽体を苗化するため、切り分けた外植体を寒天0.3または0.7%、gelrite 0.1または0.2%添加基本培地のいずれかに植え付け、10、20、30日間培養後、順化した。いずれの区でも順化した。培養期間が長い程発根が早く、gelrite培地の方が短期間の培養でも早く発根した。多芽体を切り分け、0.2% gelriteと3%シヨ糖添加基本培地を入れた培養瓶に植え付け室内に放置しておいたところ、2-3か月後にミニチューバーが出来、冬季に一度地上部が枯れた後、春になって既に出来ていたミニチューバーが発芽し、それからの苗条が伸長し、その基部や節にまたミニチューバーが形成された。以上イチョウイモでは多芽体培養により、1年で307本の小植物を増殖出来、さらに1芽より年で約倍のミニチューバーが出来ることが分かった。
附子	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	Aconitum_carmichaeli-Ref-1	K. Hatano, Y. Shoyama, and I. Nishioka, Somatic embryogenesis and plant regeneration from the anther of <i>Aconitum carmichaeli</i> Debx., Plant Cell Reports 6:446-448, 1987.	トリカブト(<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx.)の薬を用いて、カルス誘導を試みた。5ppm 2,4-Dと1ppmのカイネチンの添加で15週間カルスが形成された。1ppmの2,4-Dを含む培地で12週間、カルスを継代培養すると、胚発生が確認された。成熟した体細胞胚は、GA 1ppmとBAP 5ppmを含む培地へ移植すると正常なシュートを形成した。IAA 0.5ppmを含む新しい培地にシュートを移植すると発根した。すべての植物は5か月間の培養で成熟個体となった。
黄柏	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	Phellodendron_a-murense-Ref-1	M.A.K. Azad, S. Yokota, T. Ohkubo, Y. Andoh, S. Yahara & N. Yoshizawa, In vitro regeneration of the medicinal woody plant <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. through excised leaves, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 43-50, 2005.	キハダにおける葉切片からのシュート形成と植物体再生法を確立した。MS培地でのシュート形成とカルス誘導およびシュート再分化を検討するため、培養個体から得られた若い葉切片を用いた。4.4 μMのBAPと1.0 μMのNAAを添加したMS培地に10日目の葉切片(1cm ²)を置くと4週間培養すると、そこからシュートが直接再生した。2.0 μMのTDZと4.0 μMの2,4-DまたはNAAを添加した培地で3週間培養したところ、葉の切り口からカルスが形成した。1.5 μMのBAPと1.0 μMのNAA添加のMS培地で4週間培養後に葉から形成したカルスから最も多くのシュートが再生した。3回目の継代培養でも最も多いシュート増殖が見られ、カルス当たり65本以上となった。発根のため、シュートを2-4 cmの長さで切り、2.0 μMのIBAを含むMS培地に植えた。3週間て2-6本の根が確認された。培養植物体は、鹿沼土に移植したところ、生存率は90%だった。
陳皮	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	Citrus_unshiu-Ref-1	Nobumasa Nito & Masao Iwamasa, In vitro plantlet formation from juice vesicle callus of satsuma (<i>Citrus unshiu</i> Marc.), Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 137-140, 1990	NAA、カイネチンとGA添加のMS培地で、温州ミカンの子ょうからカルスを誘導した。胚様体は、1mg/L以下のNAA添加培地でカルスから形成された。胚様体は胚へ成長し、1mg/LのGA添加培地で幼植物が得られた。
厚朴	<i>Magnolia obovata</i> Thunb.	Magnolia_obovata-Ref-1	Yong Wook Kim, So Young Park, In Sun Park, Heung Kyu Moon, Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of <i>Magnolia obovata</i> , Plant Biotechnol Rep 1:237-242, 2007.	ホオノキの未熟種子を用いた体細胞胚形成による植物体形成について検討した。種子の採取日は、胚細胞の誘導に重要であるようであった。最適な収穫日は開花から4週後だった。エンブリオジェニック細胞は増殖し、体細胞胚を形成し、その後最適化された培養条件下で正常な植物体となった。エンブリオジェニックカルスからの体細胞胚の形成は、グルコース培地よりもシヨ糖培地で良好であった。シヨ糖の最適濃度は、3%と考えられた。体細胞胚の約25%は、ジベレリン酸(GA3)を含む1/2MS培地で正常な植物体となった。体細胞胚の発芽時には、発芽中の体細胞胚の胚軸下部や根端部分に二次胚が顕著に観察された。人工土壌中で生存した約85%の再生苗は、育苗庫で正常に成長した。

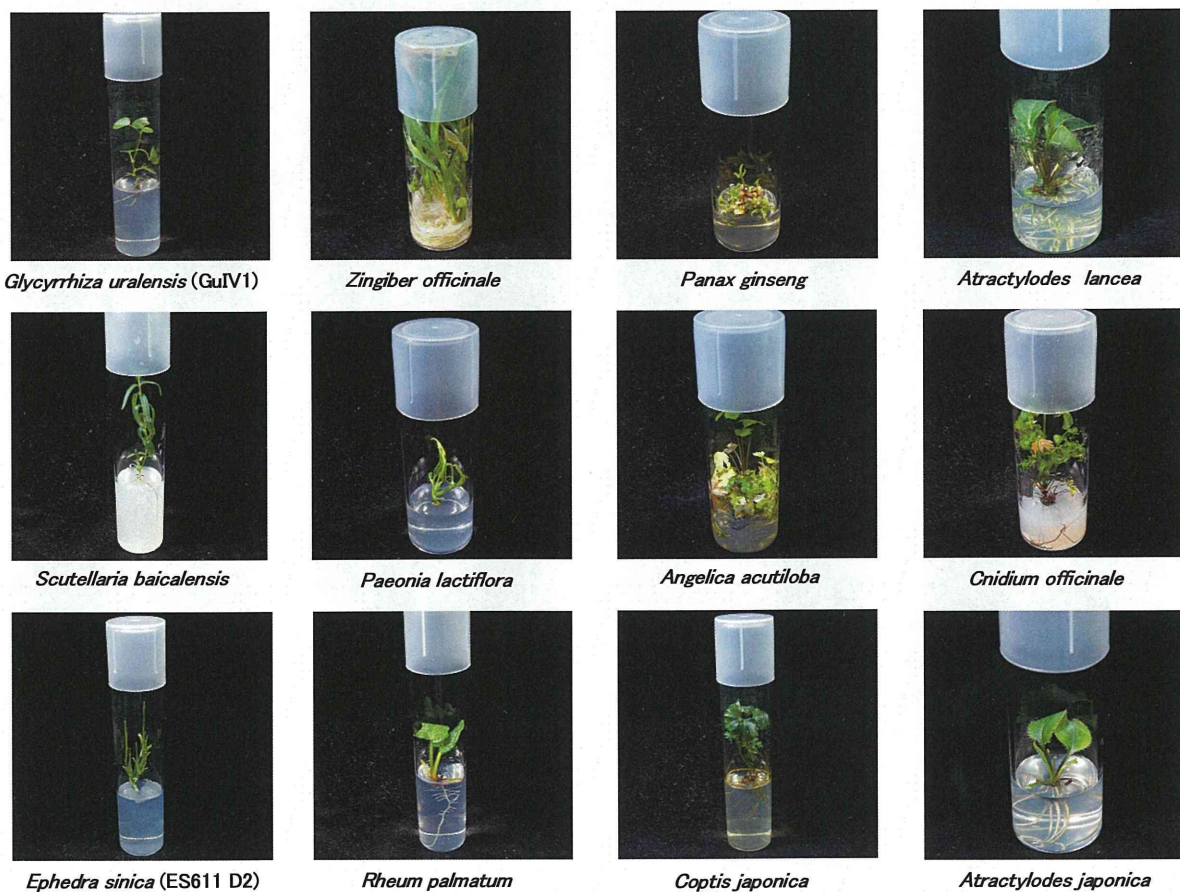


図1. オリジナルデータ例 (培養植物体又は培養シュート)



図2. オリジナルデータ例 (第1コア)

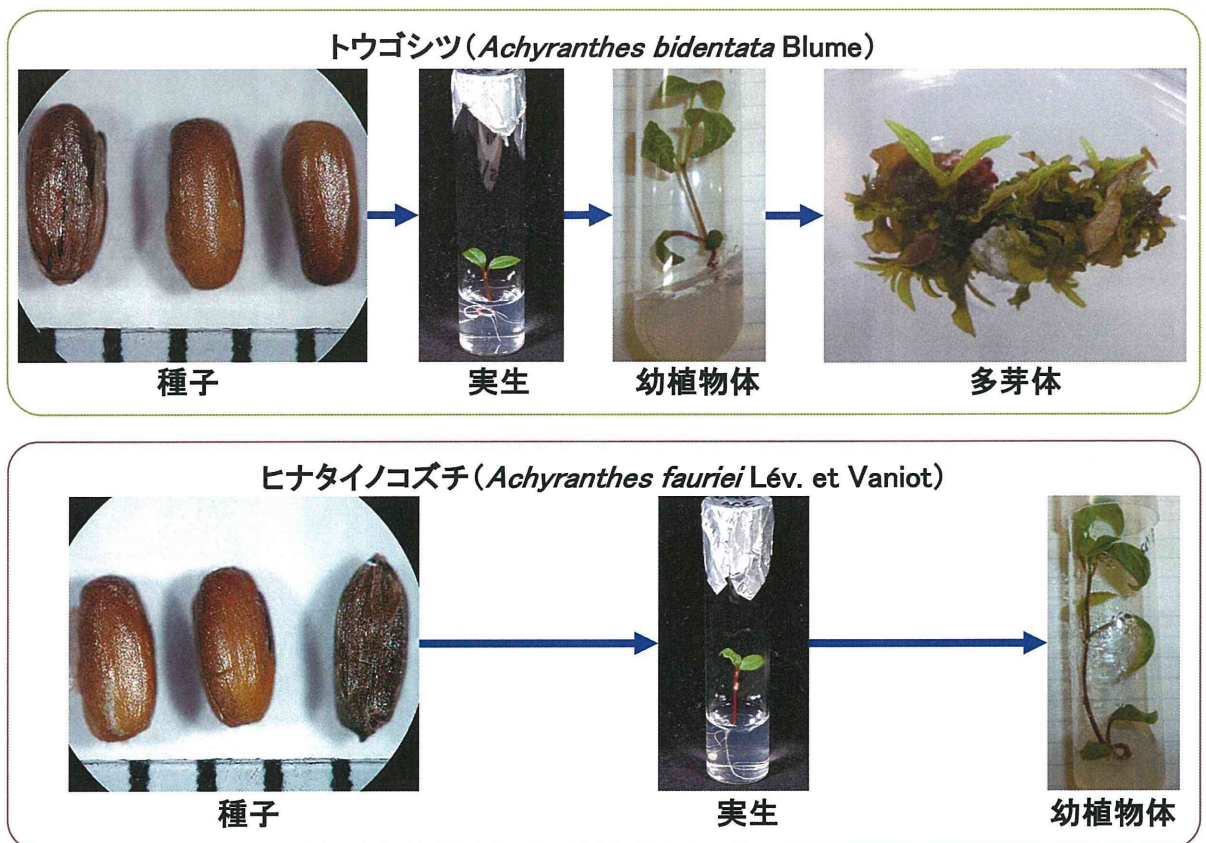


図3. オリジナルデータ例 (第2コア-1)

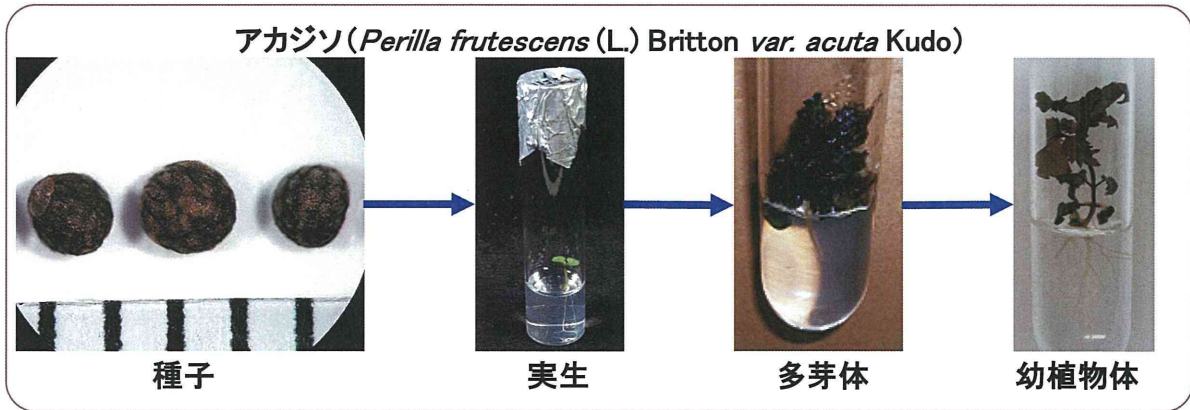
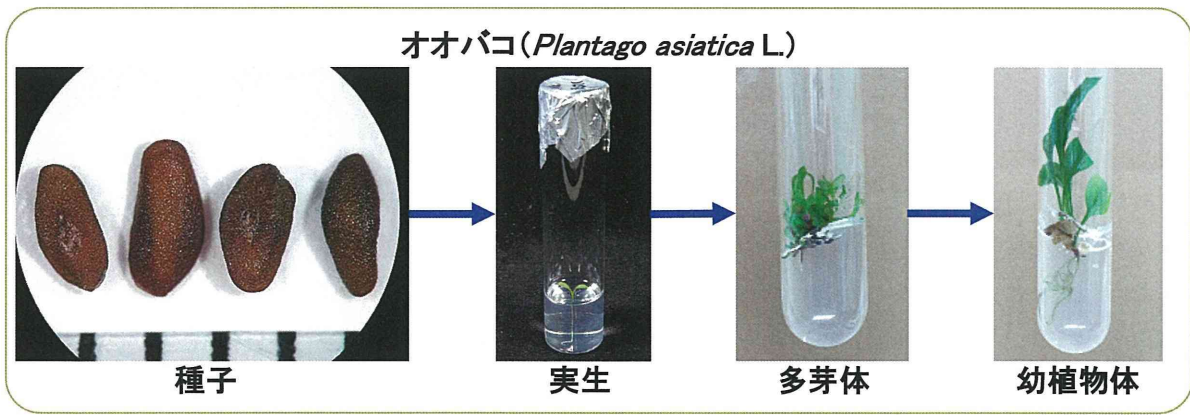


図4. オリジナルデータ例 (第2コア-2)

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究推進事業）
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための
基盤整備に関する研究（H22-創薬-総一般-013）
分担研究報告書

分担研究課題 植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報

研究分担者 菱田 敦之 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
北海道研究サブリーダー
研究協力者 大谷 克城 旭川医科大学 微生物学講座講師
研究協力者 河野 徳昭 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
研究協力者 林 茂樹 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
北海道研究部研究員
研究協力者 飯田 修 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
種子島研究リーダー
研究協力者 熊谷 健夫 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

生薬や薬用植物の総合的なデータベースを構築するために特に、植物体栽培および効率的生産法に関する情報整備のための調査研究を行った。ICP 発光分光光度計を用いた植物体の無機成分含量の測定法を検討した結果、植物体の主要元素 4 元素、同微量元素 3 元素、さらに重金属元素 6 元素（合計 13 元素）の含有量を ppm ~ % オーダーで一斉分析できることが示され、本法を応用してトウキ、ホッカイトウキおよびセンキュウの植物体の栄養診断を行い、センキュウの慣行栽培法では、植物体のリン含量が低くなる可能性が示唆された。

ホソバオケラの種苗調製法と定植方法を検討した結果、機械的に格子状に裁断する方が作業者の負担を少なくし、かつ同方法で調整された種苗が実用上問題なく使用できることが示された。ポテトプランターによる定植方法は、定植深度を浅く（約 2 cm）設定することで利用できることが明らかとなった。

植物体および生薬の生理活性を調べる目的でコガネバナ（葉、茎および根）、生薬エキスとして黄芩（14 種）、甘草（16 種）の ORAC 法を用いた抗酸化活性を。植物体では根よりも葉が高い ORAC 値を示した。生薬エキスでは、ORAC 値と各項目（産地、形態、入手年度、野生品／栽培品、分類、等級）の相関は見られないが、同一品目において 2 ~ 3 倍の抗酸化力の差が見られた。

A. 研究目的

生薬は天然物のため、栽培環境や調整方法が有効成分含量などの品質を大きく左右する。漢方医療の現場で用いられる主薬の品質は薬効に大きく影響するため、高品質な生薬の安定供給のためには生産、製造および研究の分野において生薬の十分な基礎データが求めら

れるが、薬用植物や生薬に関して、それらのデータが集約された総合的なデータベースは現在存在しない。そこで、薬学、農学、理学の各分野にまたがる総合的なデータベースを構築するべく、生薬や薬用植物の生産現場で活用可能な各種測定データや画像データを盛り込んだ植物体栽培および効率的生産法に関

する情報整備のための調査および研究を行った。

B. 研究方法

1) 生薬、薬用植物における無機成分の多元素一斉測定法の検討

トウキ、ホッカイトウキおよびセンキュウの部位別の無機成分含量を測定するために、ICP 発光分光光度計を用いた高感度多元素分析法を応用して測定した。

リン (P)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、亜鉛 (Zn)、カドミウム (Cd)、クロム (Cr)、コバルト (Co)、銅 (Cu)、ニッケル (Ni) および鉛 (Pb) の各元素は、試料 250.0 mg を硝酸-過酸化水素を用いた湿式灰化法で分解して測定試料を調製した。分解した試料溶液は、5% 硝酸溶液を用いて 50 mL に定容し、微細な粒子をろ過・除去して分析試料とした。分析試料の各元素の含量は ICP 発光分光光度計 iCAP 6300 DUO (Thermo Fisher 社) により測定した。

なお窒素含量は、250.0 mg の試料をケルダール法により分解し、分解試料中の窒素量をケルオート DTP-4 (三田村理研工業(株)) を用いて測定した。

2) ホソバオケラの機械化栽培法の検討

ホソバオケラの大規模栽培化に不可欠な効率的な種苗調製法および定植法を検討した。種苗調製法では親株を格子状に裁断する機械的裁断法、定植法ではポテトプランターを用いる方法を実施し、手作業による従来法と比較した。材料：北海道研究部にて保存栽培中のホソバオケラ *Atractylodes lancea* DC. (T系 9342-81) を用いた。

種苗の調製：従来法による種苗の調製法 細根と根茎の下部 (台) を切除し、上部の目視できる幼芽が均等に配分されるように裁断した (図 1)。機械的な調製法 細根と根茎の下部 (台) を切除した後、格子状に線を引いた台紙を中央部に根茎の上部を設置し、台紙の線に沿って根茎を裁断した (図 2)。裁断した根茎は、「中心」、「外側」および「半端」に区分して以下の実験で使用した。定植日は 2010

年 10 月 1 日。定植方法は、機械定植は、2 条式ポテトプランター PNF-2 (十勝農機株式会社) を使用し、対照区として手植え区を設置した。

3) 生薬、薬用植物の抗酸化活性 (ORAC) について

植物体および生薬の生理活性を調べる目的で、生薬「甘草 (14 点)」および「黄芩 (16 点)」から抽出された生薬エキスと、北海道研究部で保存されている黄芩の基原植であるコガネバナの植物体 (葉、茎および根の各部位) の抗酸化能を評価した。抗酸化評価法は、ORAC 値 (親水性画分を指標とした測定を行った。測定方法は次の通りである。植物体の試料調製は、フードプロセッサーにて新鮮な試料を粉砕し、50 g を精秤して凍結乾燥を行った。凍結乾燥した試料は、米国の ORAC 分析方に準じて親油性画分と親水性画分に分離し、親水性画分を測定試料とした。測定方法は、生薬エキスまたは植物体から抽出した親水性画分を 75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解して測定範囲の濃度になるように適宜希釈して調製した。調製した試料を用い、ラジカル発生剤である AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride : 活性酸素源) より発生したペルオキシラジカルによって、標識物質である Fluorescein が分解される過程を、Fluorescein の蛍光強度を経時的に測定し、減少する蛍光強度の曲線を描いた場合、この反応系に抗酸化物質が共存すると蛍光物質の蛍光強度の減少速度が遅延する。この原理に基づき、試料共存下での蛍光強度の曲線下面積 (AUC: Area Under the Curve) と、非存在下 (ブランク) での AUC との差 (net AUC) を算出した。検体の net AUC について、濃度既知の標準物質 (トロロックス: Trolox) の net AUC に対する相対値を求める。その相対値を基に Trolox 濃度に換算して検体の抗酸化力 (単位 $\mu\text{mol TE/g}$) とした。

C. 研究結果

1) 生薬、薬用植物における無機成分の多元素一斉測定法の検討

植物体に含まれる主要元素である窒素 (N)

をケルダール法により定量し、リン (P)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、さらに微量元素である鉄 (Fe)、マンガン (Mn) および亜鉛 (Zn) は ICP 発光分光高度法により多元素一斉定量を行った (表 1)。窒素の含量は植物種に関わらず葉が 1.95 ~ 3.09%、茎が 0.64 ~ 0.84%、根が 1.05 ~ 1.26% であった。リンの含量は、トウキおよびホッカイトウキの葉や茎では 0.84 ~ 1.27%、センキュウでは 0.33 ~ 0.41% であり、根では植物種に関わらず 0.25 ~ 0.48% であった。カリウムの含量は、植物種に関わらず葉や茎では 2.80 ~ 4.71%、根では 1.27 ~ 2.02% であった。

カルシウムの含量は植物種に関わらず、葉や茎が 0.86 ~ 2.18%、根が 0.25 ~ 0.48% であった。マグネシウムの含量は、植物種および部位に関わらず 0.12 ~ 0.24% であった。鉄の含量は、103.6 ~ 549.9 ppm であった。マンガンの含量は植物種に関わらず、葉が 41.1 ~ 57.4 ppm、茎および根が 9.8 ~ 34.6 ppm であった。亜鉛の含量は、トウキおよびホッカイトウキの葉や茎では 35.6 ~ 47.9 ppm、センキュウでは 16.2 ~ 17.0 ppm であり、根では植物種に関わらず 16.8 ~ 27.8 ppm であった。

重金属として分類されるカドミウム (Cd)、コバルト (Co)、クロム (Cr)、銅 (Cu) ニッケル (Ni) および鉛 (Pb) について、植物体の含量を ICP 発光分光高度法により多元素一斉定量を行った (表 2)。植物体の種類、部位に関わらずカドミウムの含量は定量検出限界値以下であり、コバルトおよびクロムは検出されなかった。トウキの各部位における銅の含量は 3.68 ~ 7.11 ppm、ニッケルの含量は 0.59 ~ 1.38 ppm、鉛の含量は 1.22 ~ 2.02 ppm であった。ホッカイトウキの各部位における銅の含量は 4.22 ~ 5.60 ppm、ニッケルの含量は 1.41 ~ 1.57 ppm、鉛の含量は 1.25 ~ 2.80 ppm であった。センキュウの各部位における銅の含量は 3.35 ~ 6.25 ppm、ニッケルの含量は 2.22 ~ 3.40 ppm、鉛の含量は 1.65 ~ 4.17 ppm であった。

2) ホソバオケラの機械化栽培法の検討

(1) 機械的切断による種苗の調製：親株を機械的切断法では、30 個の親株から「中心」が 58 個、「外側」が 101 個調製できた (表 3)。機械的裁断法により調製した種苗の重量は「中心」が 101.1g、「外側」が 84.4g であった (表 4)。

(2) 種苗の形状及び定植方法がほう芽に及ぼす影響：5月30日に手植えによる定植を行った試験区の萌芽状況を測定した結果、「中心」が 96.7%、「外側」95.6%、「半端」が 98.9% であり、従来法の種苗が 90% と比べ十分高い萌芽率を示し、種苗の機械的裁断法は実用的であることが明らかになった (図 3、4)。一方、ポテトプランターを用いた機械定植法では、5月30日の調査結果は「中心」、「外側」および「従来法」の各苗の萌芽率が 83.3 ~ 88.9% であり、手植え法に比べ低く、また「半端」は萌芽しなかった。6月20日の調査では、「半端」の萌芽率が 53.3% に上昇した (図 5)。株の一部を掘り取り調査して各試験区の定植深度を調査したところ、手植え法による定植深度は各試験区の何れも 2 cm 程度であった。一方、ポテトプランターによる機械定植は 6 cm 程度の深植え傾向にあった (図 6、7)。

(3) 種苗の形状および定植方法が収量に与える影響：各試験区の 1 m² 辺りの根茎収量を比較すると、手植え定植で「中心」の組み合わせが 200.0 g、機械定植 191.6 g、手植え定植「外側」が 170.8 g であったが、Tukey-Kramer の多重比較で検定した結果、各試験区の間には有意差が認められなかった (図 9)。分散分析法により、種苗の形状と定植方法の各要因が収量に与える影響を解析した結果、定植方法は収量に影響せず、種苗の形状は有意に影響を与えることが明らかになった (表 5)。

3) 生薬、薬用植物の抗酸化活性 (ORAC) について

生薬黄芩」ノキ原植物であるコガネバナ植物体の各部位および黄芩の生薬エキスの ORAC 値を求めた (表 6)。実験に供したコガネバナの性状を図 10 に示した。コガネバナの葉の乾燥重量当たりの ORAC 値は、葉が 352.30、茎が 187.57、根が 225.63 で

あった。黄芩の生薬エキス 14 種類の ORAC 値は、587.97 ～ 1719.76 の範囲にあった (図 11)。また甘草の生薬エキス 16 種類の ORAC 値は、623.16 ～ 1665.21 の範囲にあった (図 12)。

D. 考察

1) 生薬、薬用植物における無機成分の多元素一斉測定法の検討

トウキ、ホッカイトウキおよびセンキュウ植物体に含まれる無機成分量を測定した結果、主要元素である窒素、リンおよびカルシウムは葉および根に多く含まれ、カリウムは、葉および茎に多く含まれていた、マグネシウムは部位間の差は認められなかった。マンガン、亜鉛は概ね根、茎、葉の順で含量が増加する傾向が認められた。

鉄の含量はその測定値の標準偏差が大きく、種間および部位における傾向は認められなかった。この原因として、本試験では試料の粉碎にはウィレー式粉碎機を利用しており、粉碎機の性能上、粉碎機由来の鉄等の混入が考えられる。従って、次年度以降は、重金属分析に対応した粉碎機の利用を検討する必要があると思われる。

トウキ、ホッカイトウキおよびセンキュウの重金属の含量について、カドミウム、コバルトおよびクロムでは検出されず、ニッケルおよび鉛は 0.5～4 ppm、銅が 3 ～ 7 ppm 含まれていた。

トウキ、ホッカイトウキとセンキュウの主要元素を比較すると、部位に関わらずセンキュウのリンの含量が低い傾向にあった。従来、センキュウの栽培では、基肥の化施肥量は施用せず春のほう芽期に追肥を重点的に行っている。一般的には、リン肥料は基肥に全量施用することが多い。このことから、現行の春の追肥量ではセンキュウの生育に十分なリンの供給ができず、結果的に植物体のリン含有量が低下したと推察した。従ってセンキュウのリン肥料の施用方法について、今後、見直す必要があると思われる。

2) ホソバオケラの機械化栽培法の検討

機械的裁断法により調製された種苗の重量

は、従来法に比べ種苗の重量が大きい傾向にあった。機械的裁断法は、従来法に比べ作業が容易であり、ホソバオケラの種苗作製が未経験の作業者でも容易にできると作業者から評価された。

機械的裁断法により調製された種苗は、「中心」、「外側」および「半端」の何れにおいてもよく萌芽し、機械的裁断法が種苗調製法として有効であることが示された。

ポテトプランターによる定植法は、従来法と比較してやや萌芽率が低下した。この原因は、圃場の条件により定植作業機がその車重で沈み定植深度が深くなることに起因し、この問題はポテトプランターの定植深度を圃場の状態に応じて調整することで回避できる。従って、ポテトプランターによる定植方法は実用上問題なく有効な方法であると判断した。

生育 1 年目における収量についてはポテトプランターによる定植方法は収量に影響せず、種苗の形状が有意に影響を与えることが明らかになった。

3) 生薬、薬用植物の抗酸化活性 (ORAC) について

コガネバナの部位別の ORAC 値は、利用部位である根よりも葉が高かった。これは、ダイオウを除く、根を利用部位とする複数の薬用植物の葉、茎、根の ORAC 値の比較でも同様に、葉の ORAC 値が高かった (図 13)。

生薬エキスに関しては、ORAC 値と各項目 (産地、形態、入手年度、野生品/栽培品、分類、等級) の相関は見られないが、同一品目において 2～3 倍の抗酸化力の差が見られた。

E. 結論

ICP 発光分光光度計を用いた薬用植物の無機成分含量の測定法を検討した結果、リン (P)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、植物体の微量元素である鉄 (Fe)、マンガン (Mn) および亜鉛 (Zn)、さらに重金属元素であるカドミウム (Cd)、コバルト (Co)、クロム (Cr)、銅 (Cu) ニッケル (Ni) および鉛 (Pb) の各元素の含有量を ppm ～ % オーダーで一斉に測定できる