

Figure 5: Mass spectra and MS² spectra of compounds 1–4. (A) mass spectrum of 1; (B) MS² spectrum of 1 (C) mass spectrum of 2; (D) MS² spectrum of 2 (E) mass spectrum of 3; (F) MS² spectrum of 3 (G) mass spectrum of 4; (H) MS² spectrum of 4.

Regarding the difference in chemical composition between Chinese and Vietnamese cassia, Kondou *et al.* [13] reported that Vietnamese cassia contains larger amounts of essential oils than Chinese cassia, and the concentration of coumarin, a toxic substance to the liver, is particularly higher. Therefore, it is considered that an excess intake of Vietnamese cassia can cause adverse health effects. In the present study, the quality of water extracts of Chinese and Vietnamese cassia were compared using multivariate analysis of LC-MS data. It was confirmed that Chinese cassia contains relatively larger amounts of epicatechin (5) and procyanidin B2 (6). On the other hand, Vietnamese cassia products were characterized by relatively larger amounts of diterpenes (1–4). It has been reported that the harvesting techniques prevalent in China and Vietnam are different; Chinese products are collected from younger trees and shoots than Vietnamese products. One Vietnamese sample (sample No. 16) derived from relatively younger trees (8 years old) than the other Vietnamese products showed relatively larger amounts of epicatechin (5) and procyanidin B2 (6). It was considered that the number of years of cultivation of the trees correlated with these differences.

A range of health related properties are reported for procyanidins: protective effects against cardiovascular diseases, antioxidant and antitumor activities and an inhibitory effect on pancreatic lipase [22]. Regarding activities of diterpenes in *Cinnamomum* species, Orihara *et al.* [17] have reported the antiviral activity of diterpene 1. As procyanidins and diterpenes have different types of activity, it is important to choose the cassia that best suits the product for which it is to be used, whether in food or in herbal medicine.

Experimental

Materials and analytical sample preparation: Twenty-two crude drug samples were obtained from Japanese markets. All samples and specimens were deposited in the Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation (NIB) and the Museum of Materia Medica, Institute of Natural Medicine,

Table 1: Materials used in the present study.

Sample No.	Production area	Collected year	Voucher No.*
Chinese cassia			
1	Guangxi, China	2010	NIB-015
2	Guangxi, China	2010	NIB-043
3	Guangxi, China	2009	NIB-062
4	Guangdong, China	2007	NIB-068
5	Guangxi, China	2009	NIB-069
6	Guangdong, China	2008	NIB-078
7	Guangxi, China	2009	NIB-117
8	Guangxi, China	2009	NIB-119
9	Guangxi, China	2010	NIB-151
10	Guangxi, China	2009	NIB-171
11	Guangxi, China	2009	NIB-187
12	Guangxi, China	Unknown	NIB-222
13	Guangxi, China	Unknown	TMPW-27700
14	Guangxi, China	Unknown	TMPW-27701
15	Guangxi, China	Unknown	TMPW-27702
Vietnamese cassia			
16	Yen Bai, Vietnamese, YB-V	2009	NIB-014
17	Vietnamese	2009	NIB-070
18	Vietnamese	2009	NIB-095
19	Vietnamese	2010	NIB-118
20	Yen Bai, Vietnamese, YB-III	2010	NIB-188
21	Vietnamese	Unknown	TMPW-27703
22	Vietnamese	Unknown	TMPW-27704

*The specimen voucher number of the Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation (NIB) and the Museum of Materia Medica, Institute of Natural Medicine, University of Toyama (TMPW)

University of Toyama (TMPW). The voucher numbers are shown in Table 1.

The samples were individually pulverized. A fine powder (20 g) from each was accurately weighed and extracted with H₂O (400 mL) by boiling for 2 h. After centrifugation, each extract was evaporated *in vacuo*, then dissolved in MeOH: water (1:1, v/v) at a concentration of 10 mg/mL, and filtered through a 0.2 μm Millipore filter. One μL samples were injected into the LC–MS.

Standard samples and reagents: Epicatechin (**5**) and procyanidin B2 were purchased from Funakoshi Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Cinnzeylanine (**1**), cinnzeylanol (**2**), anhydrocinnzeylanol (**3**), and cinncasinol A (**4**) were isolated from the crude drug sample (Vietnamese cassia, TMPW No. 27708) purchased from Uchida Wakanyaku Co., Ltd. (Tokyo, Japan). The structures are shown in Figure 1. The isolated compounds were identified by comparing their ^1H and ^{13}C NMR spectra with those reported in the literature [10,16,23]. All chemicals were of analytical grade, and the chromatographic solvents were of HPLC grade (Wako Pure Chemical Ind. Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Analytical instruments: LC–MS analyses were performed using a Shimadzu LC–IT–TOF mass spectrometer equipped with an ESI interface. The ESI parameters were as follows: source voltage –3.5 kV, capillary temperature 200°C, nebulizer gas 1.5 L/min. The mass spectrometer was operated in the negative ion mode scanning from m/z 200 to 2000. A Waters Atrantis T3 column (2.1 mm i.d. \times 150 mm) was used and the column temperature was maintained at 40°C. The mobile phase was a binary eluent of (A) 5 mM $(\text{NH}_4)\text{OAc}$

solution and (B) CH_3CN under the following gradient conditions: 0–30 min linear gradient from 10% to 100% B, 30–40 min isocratic at 100% B. The flow rate was 0.2 mL/min. In the MS/MS analysis, the mass spectrometer was set to survey ions in the range m/z 100–1000 and to subject the most abundant ions in the scan to automatic MS/MS analysis.

Statistical analysis: Samples were analyzed to identify potential discriminant variables. Finding the peaks in the total ion chromatogram, identifying the abundant ions, alignment of ions by retention time and peak filtering of the negative mass spectrometric raw data were carried out using Shimadzu LC–MS solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan) and Profiler software (Phenomenome, Saskatchewan, Canada). All the statistical analyses applied to the resulting 3D-data matrix (mass spectral array table) containing accurate mass numbers of the detected peaks ($S/N > 10$), retention times and the normalized intensities of the peaks (auto-scale), were carried out using Profiler software (Phenomenome, Saskatchewan, Canada).

References

- [1] Lou ZQ, Qin B. (1995) *Species systemization and quality evaluation of commonly used Chinese tradition drugs*. Vol. 1, China Peking University Medical Press, Beijing. 203-251.
- [2] Vernin G, Vernin C, Metzger J, Pujol L, Parkanyi C. (1994) GC/MS analysis of cinnamon and cassia essential oils: a comparative study. In *Spices, Herbs and Edible Fungi*. Charalambous G. (Ed.). Elsevier Science, Tokyo. 411-425.
- [3] Bisset NG, Wichtl M, Czygan FC. (2001) *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*, 2nd ed. CRC Press FL, USA. 148-150.
- [4] Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. (2007) Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **55**, 5484-5490.
- [5] Society of Japanese Pharmacopoeia. (2011) *The Japanese Pharmacopoeia*, 16th ed. (English edition). The Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo. 1623.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission, (2010) *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (English edition). Vol. 1, Chemical Industry Press, Beijing. 109-110.
- [7] Ravindran N, Nirmal Babu K, Shylaila, M. (2004) Cinnamon and cassia – The genus *Cinnamomum*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- [8] Tochimoto-Tenkaido. (2009) 60-Year history of Tochimoto Tenkaido, Osaka, http://metabolomics.jp/wiki/Tochimoto:Cinnamomi_Cortex
- [9] Nohara T, Kashiwada Y, Murakami K, Tomimatsu T, Kido M, Yagi A, Hishioka I. (1981) Constituents of cinnamomi cortex. 5. Structures of five diterpenes, cinnassiol D1, D1 glucoside, D2, D2 glucoside, and D3. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **29**, 2451-2459.
- [10] Nohara T, Kashiwada Y, Tomimatsu T, Nishioka I. (1982) Two novel diterpenes from bark of *Cinnamomum cassia*. *Phytochemistry*, **21**, 2130-2132.
- [11] Yazaki K, Okuda T. (1990) Condensed tannin production in callus and suspension cultures of *Cinnamomum cassia*. *Phytochemistry*, **29**, 1559-1562.
- [12] Lee HS, Ahn YJ. (1998) Growth-inhibiting effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on human intestinal bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**, 8-12.
- [13] Kondou T, Kawamura T, Noro Y, Tanaka T, Inoue K. (1999) Physical and chemical features of Vietnamese and Chinese cinnamon barks on the market. *Natural Medicines*, **53**, 178-182.
- [14] González-Coloma A, Gutiérrez C, Hübner H, Achenbach H, Terrero D, Fraga BM. (1999) Selective insect antifeedant and toxic action of ryanoid diterpenes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 4419-4424.
- [15] Fragam BM, Terrero D, Gutiérrez C, González-Coloma A. (2001) Minor diterpenes from *Persea indica*: their antifeedant activity. *Phytochemistry*, **56**, 315-320.
- [16] Isogai A, Morakoshi H, Suzuki K, Tamura S. (1977) Chemistry and biological activities of cinnzeylanine and cinnzeylanol, new insecticidal substances from *Cinnamomum zeylanicum* Nees. *Agricultural and Biological Chemistry*, **41**, 1779-1784.
- [17] Orihara Y, Hamamoto H, Kasuga H, Shimada T, Kawaguchi Y, Sekimizu K. (2008) A silkworm–baculovirus model for assessing the therapeutic effects of antiviral compounds: characterization and application to the isolation of antivirals from traditional medicines. *Journal of General Virology*, **89**, 188–194.
- [18] Lu Z, Jia Q, Wang R, Wu X, Wu Y, Huang C, Li Y. (2011). Hypoglycemic activities of A- and B-type procyanidin oligomer-rich extracts from different cinnamon barks. *Phytomedicine*, **18**, 298–302.
- [19] Tanaka N, Sekiya N, Hattori M, Goto H, Shibahara N, Shimada Y, Terasawa K. (2003) Measurement of plasma procyanidin B-2 and procyanidin B-3 levels after oral administration in rat. *Phytomedicine*, **10**, 122–126.
- [20] Sun W, Miller JM. (2003) Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidin wine and B-type dehydrocatechins in anaerobic mixture of (+)-catechin and (–)-epicatechin. *Journal of Mass Spectrometry*, **38**, 438–446.
- [21] Callemien D, Collin S. (2008) Use of RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. *American Society of Brewing Chemists Journal*, **66**, 109-115.
- [22] Appeldoorn MM, Vincken JP, Gruppen H, Hollman PCH. (2009) Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *The Journal of Nutrition*, **139**, 1469-1473.
- [23] Yagi A, Tokubuchi N, Nohara T, Nonaka G, Nishioka I, Koda, A. (1980) The constituents of cinnamomi cortex. I. Structures of cinnassiol A and its glucoside. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **28**, 1432-1436.

ウラルカンゾウの養液栽培による 高効率のグリチルリチン酸生産

Efficient Glycyrrhizin Production by Hydroponic Cultivation of Chinese Licorice

吉松嘉代*¹ 河野徳昭*² 乾 貴幸*³

国内で使用される漢方製剤の7割以上に配合され、医薬品、化粧品、甘味料原料としても重要な生薬「甘草」は、その供給の100%を輸入に依存し、持続的安定供給が危ぶまれている。そのような現状を打開する一手段として、閉鎖型植物生産施設での養液栽培による「甘草」生産システムの開発と養液栽培に適した優良苗の作出を行った。

1. はじめに

ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) は、中国東北部、中北部、西北部あるいはモンゴルに自生するマメ科カンゾウ属 (*Glycyrrhiza* 属) の多年生草本である。乾燥させたウラルカンゾウの根およびストロンは生薬「甘草」として汎用され、一般用漢方製剤承認基準記載の236処方中168処方(71.2%)に、また、医療用漢方製剤148処方中109処方(73.6%)に配合されている^{1,2)}。甘草の主成分であるグリチルリチン酸は、抗炎症作用、肝臓保護作用、抗アレルギー作用等の薬理活性を有し、また、強い甘み(砂糖の200倍)³⁾を有することから、医薬品、化粧品、甘味料として広く利用されている³⁾。しかし国内での商業栽培は行われていないため、その供給の

100%は外国からの輸入品であり、そのほとんどが野生植物の採取に依存している⁴⁾。そのため、乱獲による環境破壊や資源の枯渇化が顕在化しており、主原産国の中国では、採取制限、輸出規制など、資源保護のための政策が強化されている⁴⁾。さらに、中国国内や日本以外の国でも甘草の需要が増加しており、甘草資源の持続的確保が年々困難になっている。

甘草の安定供給のため、これまでに多くの圃場栽培研究が行われてきた^{4~8)}。その1例として、優良系統の選抜と、径10 cm、長さ50 cmの塩化ビニール製のパイプに培養土を充填して植物を栽培する筒栽培法を用いた1年間の野外での栽培により、グリチルリチン酸含量5%以上の甘草の生産が報告されている^{6,8)}。しかし、甘草の栽培品は概して野生品よりもグリチルリチン酸含量が低

*¹Kayo Yoshimatsu (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 育種生理研究室 室長

*²Noriaki Kawano (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 育種生理研究室 研究員

*³Takayuki Inui (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 育種生理研究室 特任研究員

表1 閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産

- ・自然環境の影響を受けず安定的に生産可能
- ・植物種が明確で品質が安定した薬用植物の供給が可能
- ・農薬、土壌汚染を回避できる
- ・計画栽培・多角栽培が可能

く、日本薬局方の規定値2.5%以上⁹⁾を満たすためには、少なくとも3年以上の栽培期間を必要とする報告例が多い^{4,7)}。また、野外栽培は異常気象や自然災害および人為的な環境かく乱等の影響を受けやすい。

一方、閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産は、表1のような優れた点を持ち、薬用植物の安心・安全な安定供給に有効であると考えられる。

本稿では、閉鎖型植物生産施設におけるウラルカンゾウの養液栽培、養液栽培に適した優良株の選抜と遺伝子識別および産学官共同研究について紹介する。

2. 閉鎖型植物生産施設でのウラルカンゾウの養液栽培

養液栽培による薬用植物の生産は、研究室レベルでは水耕法を用いた栽培研究が行われてきたが、地上部を使用部位とする報告が多い。一般に水耕法で栽培した植物の根は分枝根が多くなり、主根部が肥大しないことから、特に肥大した根を使用する薬用植物においては水耕栽培の実用化は困難であるとされてきた。根を使用する薬用植物の水耕・養液栽培研究は、ミシマサイコ¹⁰⁾ やスペインカンゾウ^{11,12)} の例があるが、根の収量や薬用成分含量の点で満足できる成果は得られていない。

そこで、根が養液中に浸されない養液栽培装置、すなわち通気性・保水性が高い支持体が充填された植木鉢に植物体の地下部を植付け、底面給水により鉢の下部から養液が供給される養液栽培装置¹³⁾ を考案し、閉鎖温室内(温度20~25℃、相対湿度50~60%、朝夕の補光照明により明期

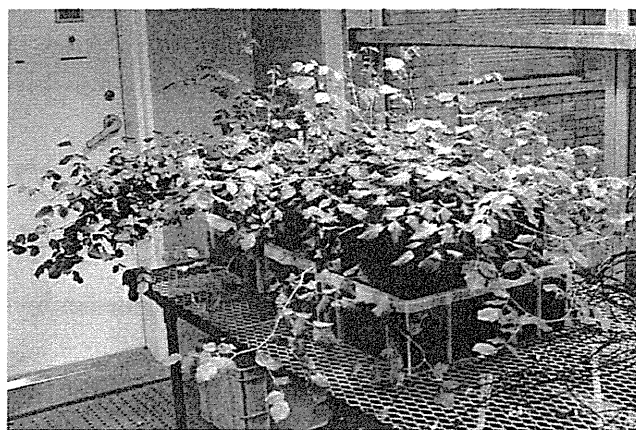


写真1 養液栽培4ヵ月後のウラルカンゾウ

14~16時間/日)でウラルカンゾウの養液栽培[電気伝導度(EC):1.12 mS/cm]を行った(写真1)。

材料植物は、培養植物体として維持・保存してきた2系統(Gu, GuH)のうち、予備的に実施した閉鎖温室内での鉢栽培(土耕)で、根の収量およびグリチルリチン酸含量がより高かったGu系統を選択し、さらに、Gu系統の培養シュートより、ストロン様組織¹⁴⁾を誘導して植物組織培養での増殖効率の高いサブクローンGu2-3-2を得、養液栽培装置への植付け材料とした。閉鎖温室内において、Guの土耕栽培では、根のグリチルリチン酸含量が2.5%以上になるまでに1,009日を要した。一方、養液栽培したGu2-3-2の根のグリチルリチン酸含量は、401日後に2.95%、740日後に5.22%となり、グリチルリチン酸の生産効率が高いことが判明した。前述の野外で筒栽培されたウラルカンゾウ2年生根は、グリチルリチン酸含量2.5%以上を満たすものの、フラボノイドであるリキリチン含量は市場品に比べて低いことが報告されている⁸⁾。リキリチンは、ウラルカンゾウの主要成分の一つで、抗うつ作用、抗酸化作用の他、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の神経変性の疾患の治療に効果的と思われる神経栄養作用が報告されており¹⁵⁾、甘草が有する多様な薬理活性の一端を担っていると思われる成分の一つである。740日間養液栽培したGu2-3-2の根は1.0%以上のリキリチンを含有していた。従って、養液

栽培法は甘草が含有するフラボノイド類の生産方法としても優れていると思われる。

3. 閉鎖型植物生産施設での養液栽培に適したウラルカンゾウ優良株の選抜

さらに甘草生産効率を高めるため、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圃場で保存栽培を行っている3系統のウラルカンゾウの種子(GuTS291-04, GuTS71-08, GuTS321-08)を材料に、優良系統の選抜を行った。3系統のうち、GuTS291-04は、前述のGuと同系統の植物体から得られた種子である。まず、3系統の種子より育成した植物体を前述の養液栽培装置に植付けて閉鎖温室内で半年および1年間栽培し、収量

と二次代謝物含量を調査した。いずれの系統も1年後の根のグリチルリチン酸含量は2.5%に満たなかった。生育および二次代謝物含量は系統間で大きく異なっており、いずれの形質もGuTS71-08系統が最高値(根の収量:10.8g, グリチルリチン酸含量:1.5%)を示した(写真2)。

次に、優良株選抜のため、グロースチャンパー室内(温度25℃, 相対湿度60%, 明期18時間/日)でGuTS71-08系統種子より育成した植物体を4ヵ月間養液栽培し、収量と二次代謝物含量を調査した。その結果、グリチルリチン酸含量が高く根の収量が良好な優良株2クローンが得られた(写真3中の表)。本株は、前述のGu2-3-2に比べて植物組織培養での増殖効率が低いものの、養

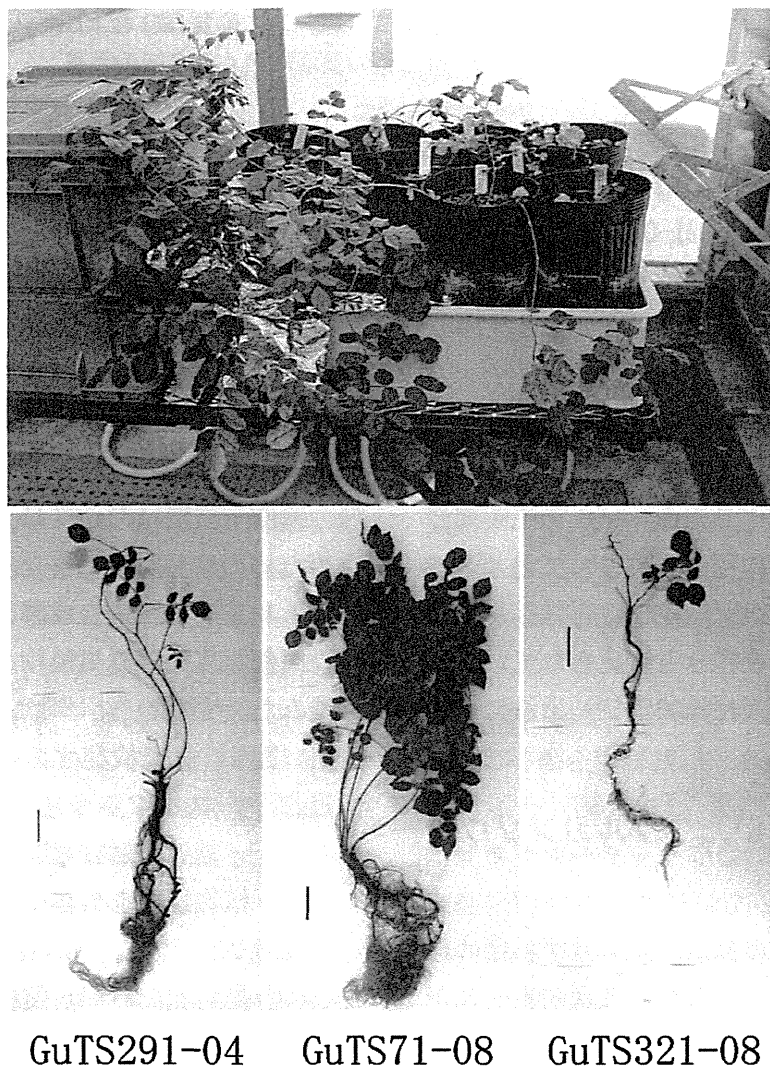


写真2 養液栽培1年後のウラルカンゾウ
(写真中のスケールは5 cm)

クローン	根の収量 (乾燥重 g)	グリチルリチン酸 含量 (%)	グリチルリチン酸 収量 (mg)
GuTS71-08IV1	7.8	2.1	161.7
GuTS71-08IV2	16.1	1.6	258.3

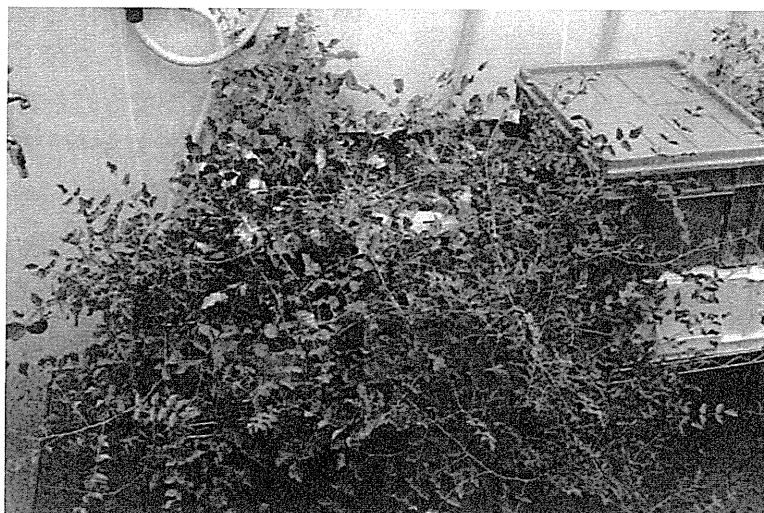


写真3 養液栽培4ヵ月後優良クローンの形質(表)および
GuTS71-08IV2挿木苗の養液栽培4ヵ月後の写真

液栽培で得たストロンを挿し穂とする増殖が可能であった。得られたGuTS71-08IV2挿木苗を同様にグロースチャンバー室内で養液栽培したところ、良好に生育し(写真3)、栽培198日後の根のグリチルリチン酸含量は2.5%、リキリチン含量は0.7%、グリシクマリン含量は0.3%であり、二次代謝物高生産性を維持していることを確認した。グリシクマリンもウラルカンゾウの主要成分の一つで、抗けいれん作用が報告されており、こむら返りに対し著効を示す漢方製剤「芍薬甘草湯」の薬理活性の一端を担うと考えられている成分である¹⁶⁾。これらの優良株および増殖法については特許を出願した¹⁷⁾。

4. 遺伝子情報を用いたウラルカンゾウ優良株の識別

優良株を知的財産権の観点から保護するためには、優良株を他系統および他株と識別する必要がある。そこで、客観的かつ迅速な識別を可能とするため、コメの優良品種の識別などに一般的に用いられている遺伝子レベルでの識別法の開発を試

みた。植物種や系統間の遺伝子識別法としては、植物に普遍的に存在する遺伝子(核リボソームDNAのITS領域、葉緑体DNAの*trnK*, *matK*および*rbcL*遺伝子など)の塩基配列の変異を進化遺伝学的に解析し分類する手法や、制限酵素断片長多型(RFLP)法、増幅断片長多型(AFLP)法が一般的である。しかし、ウラルカンゾウ優良株の遺伝子識別においては、有用物質高生産株選抜のための育種マーカーとしての応用を期待し、グリチルリチン酸生合成酵素遺伝子を用いた迅速かつ簡便なカンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発を試みた。すなわち、グリチルリチン酸の生合成経路(図1)上で機能すると考えられる2種の酵素遺伝子、スクアレン合成酵素(SQS)およびβ-amyrin 11位酸化酵素(CYP88D6)遺伝子について、植物種間や個体間で変異が多く蓄積されると期待されるゲノムDNAのイントロン領域を中心に多型情報を収集・解析し、優良株の識別が可能か否かを検討した。

スクアレン合成酵素(SQS)はグリチルリチン酸等のトリテルペン配糖体のみならず、植物ステ

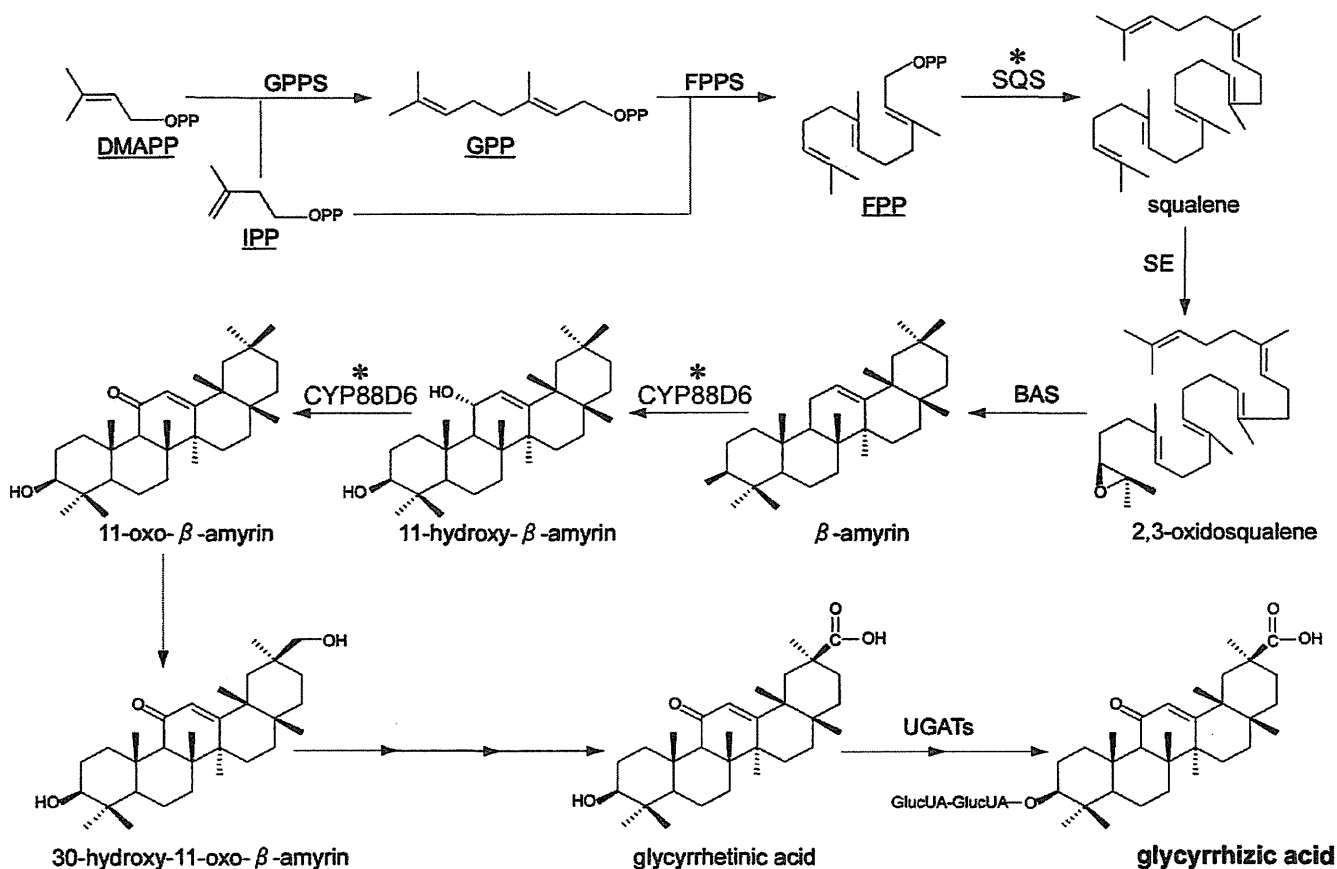


図1 カンゾウ属植物におけるグリチルリチン酸合成経路

(* : 解析対象)

DMAPP : dimethylallyl diphosphate, IPP : isopentenyl diphosphate, GPP : geranyl pyrophosphate, FPP : farnesyl diphosphate, GPPS : GPP synthase, FPPS : FPP synthase, SQS : squalene synthase, SE : squalene epoxidase, BAS : β -amyrin synthase, UGATs : UDP-glucuronosyltransferases

ロールの生合成にも関わる重要な酵素である。シロイヌナズナにおいては AtSQS1 (GenBank accession No. AF004560) および AtSQS2 (AF004396) の2種の相同遺伝子が見出されており、これらのゲノムDNA構造(エクソン・イントロン構造)においてはイントロンの挿入箇所がよく保存されている。カンゾウ属植物のSQS遺伝子においてもその構造は保存されていると推定されたため、エクソン1-3に相当する領域をPCRで増幅し、特にイントロン領域の多型情報を収集し、株間の遺伝子識別が可能か否かを検討した。

ウラルカンゾウ2株(GuTS71-08IV2およびGu2-3-2)より調製したゲノムDNAを鋳型に、SQS遺伝子増幅用プライマーでPCRを行い、増幅産物の塩基配列を解析した結果、各株より、それぞれSQS相同遺伝子(GuSQS1およびGuSQS2)

のエクソン1-3領域の塩基配列が得られた。これらの塩基配列の株間の変異点について設計した識別用プライマーセット2種を使用し、GuTS71-08IV2およびGu2-3-2各植物試料由来ゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。GuSQS2を標的としたプライマーセットでは、GuTS71-08IV2に約250 bpの増幅産物が得られ、一方、Gu2-3-2では増幅産物が検出されず、両者の識別が可能であった(図2右)。また、GuSQS1を標的としたプライマーセットでは、GuTS71-08IV2の方が増幅産物のサイズがGu2-3-2よりも若干大きく、その差異で識別が可能であった(図2左)。

CYP88D6は、グリチルリチン酸合成経路において β -amyrinの11位の酸化を触媒し、グリチルリチン酸非生産性のカンゾウ属植物では、相同遺伝子がコードする酵素の活性がかなり低いこ

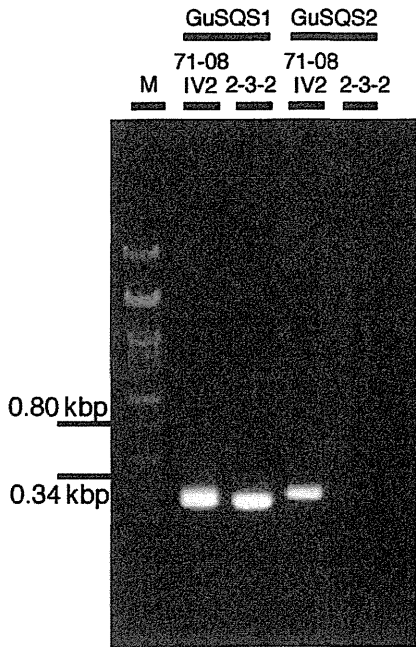


図2 GuSqs1 および GuSqs2 特異的プライマーによる GuTS71-08IV2 と Gu2-3-2 の識別
71-08IV2 : GuTS71-08IV2, 2-3-2 : Gu2-3-2, M : DNA サイズマーカー

とが報告されており¹⁸⁾, グリチルリチン酸生合成において CYP88D6 が重要な機能を担っていることが示唆されている。また, CYP88D6 が属する CYP88D サブファミリー遺伝子はマメ科植物に特異的に見出される遺伝子群であり, マメ科で特異的に進化し, トリテルペンサポニンの代謝に関与すると考えられている。このうち, ゲノム情報が公開されているタルウマゴヤシ, ミヤコグサの CYP88D 遺伝子では, エキソン・イントロン構造がよく保存されていた。そこで, これらのゲノム DNA 情報より, カンゾウ属植物の CYP88D6 遺伝子のエキソン・イントロン構造を予測し, データベース上の CYP88D6 遺伝子のコーディング配列 (AB433179.1) をもとに, イントロン6 および7を含む領域を増幅するプライマーを設計し, 株間の CYP88D6 イントロン領域の塩基配列変異に着目した識別を試みた。

GuTS71-08IV2 および Gu2-3-2 について, CYP88D6 のイントロン6 および7を含む領域を PCR 増幅し, 塩基配列解析を行った結果, イントロン6 に関しては変異に富む配列が得られたが,

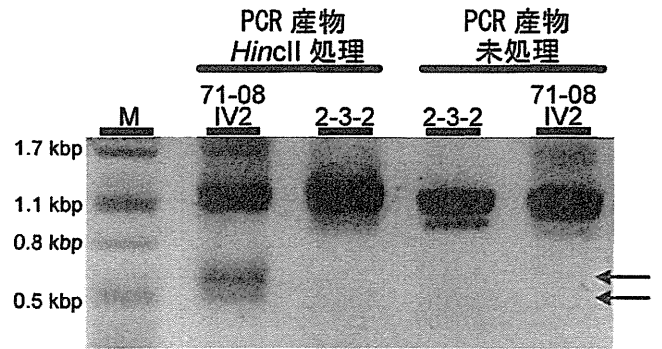


図3 PCR-RFLP による GuTS71-08IV2 と Gu2-3-2 の識別

71-08IV2 : GuTS71-08IV2, 2-3-2 : Gu2-3-2, M : DNA サイズマーカー, 矢印 : *Hinc* II 処理による PCR 産物の断片

株特異的ではなく, 本領域による識別は難しいと考えられた。一方, イントロン7では, 大きく分けて2種の配列が得られた。このうち, 一方は, GuTS71-08IV2 に特異的であり, もう一方の共通配列には認められない *Hinc* II サイトを含んでいたことから, PCR 増幅産物の *Hinc* II 処理を行った。その結果, GuTS71-08IV2 由来の PCR 増幅産物特異的に, 約 600 bp および 500 bp の制限酵素断片が得られ (図3), PCR-RFLP 法により, 簡単に GuTS71-08IV2 と Gu2-3-2 を識別できることが示された。

さらに, イントロン7の配列情報を精査した結果, GuTS71-08IV2 と他のウラルカンゾウ系統およびスペインカンゾウ等のカンゾウ属植物とを識別可能であることも判明した。これらの変異点は, 少ないものでは数塩基であったが, 他の遺伝子領域の変異情報と組み合わせることにより, より精度の高い識別法が確立できるものと期待される。

5. 甘草の人工水耕栽培システムの開発

ウラルカンゾウの養液栽培に関する研究は, 「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発 / 植物利用高付加価値植物質製造基盤技術開発」(経済産業省), 「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」(厚生労働省科学研究費補助金) の一環として2006年頃より開始し, 2008年下半期からは, 三者共同研究 (医

薬基盤研究所, 鹿島建設, 千葉大学)「甘草の人工水耕栽培システムの開発」として実施している。また, 遺伝子情報を用いた優良株の識別は, 「優良形質を持った薬用植物新品種の育成およびそれら種苗の安定供給体制構築のための保存, 増殖に関する基盤的研究」(厚生労働省科学研究費補助金)の一環として他の薬用植物での開発を含め, 研究を継続中である。

三者共同研究(医薬基盤研究所, 鹿島建設, 千葉大学)「甘草の人工水耕栽培システムの開発」において, 医薬基盤研究所は, 養液栽培に適した優良株の育成と増殖法の開発および人工水耕栽培で生産された甘草の品質評価を担当し, 鹿島建設は新規の人工水耕栽培装置の設計と当該装置での栽培を, 千葉大学は人工栽培環境制御を担当した。その成果として, 短期間の水耕栽培で肥大した根が生産可能な人工水耕栽培装置および生産システムの開発に成功し, 2010年10月28日にプレスリリースを行うとともに特許を出願した¹⁹⁾(写真4)本成果は2011年9月22日, 第9回産学官連携功労者表彰において, 厚生労働大臣賞を受賞した。

6. おわりに

閉鎖型植物生産施設での養液栽培による甘草の実生産を具現化する上で, 本稿で紹介した支持体を用いた底面吸水式の養液栽培装置は, 1株当りの根の収量が低く(1年間の栽培で10~20g乾

燥重量), 現時点では商業生産に適した栽培システムではない。しかし, 表2のような優れた点を持ち, 他の薬用植物, 生薬「黄連」の基原植物であるセリバオウレン(*Coptis japonica* Makino var. *dissecta* Nakai)や生薬「ベラドンナ根」の基原植物であるベラドンナ(*Atropa belladonna* Linné)の閉鎖型植物生産施設内での養液栽培においても, わずか半年間で日本薬局方規格値以上の薬用成分(セリバオウレン根茎:ベルベリン塩化物として4.2%以上, ベラドンナ根:ヒヨスチアミン0.4%以上)が得られることを確認している。特に, セリバオウレン根茎で得られた含量は, 圃場栽培5年間に匹敵する。

一方, 三者共同研究で開発した新規の人工水耕栽培装置は, 支持体を使用しておらず, また, 写真4に示したように短期間で高収量の根が生産可能である。従って, 甘草の商業生産を指向した閉鎖型植物生産施設・システム設計により適していると思われる。このような装置や施設の設計・開発やシステム構築は, 筆者らが所属する独立行政

表2 支持体を用いた底面給水式の養液栽培装置

- ・わずか4ヵ月間の栽培で優良株の選抜が可能
- ・クローン増殖のための植物材料の生産が2~3ヵ月で可能
- ・限られた空間内で多数の植物体を栽培可能
- ・二次代謝物高含量の地下部(根, 根茎など)を生産可能

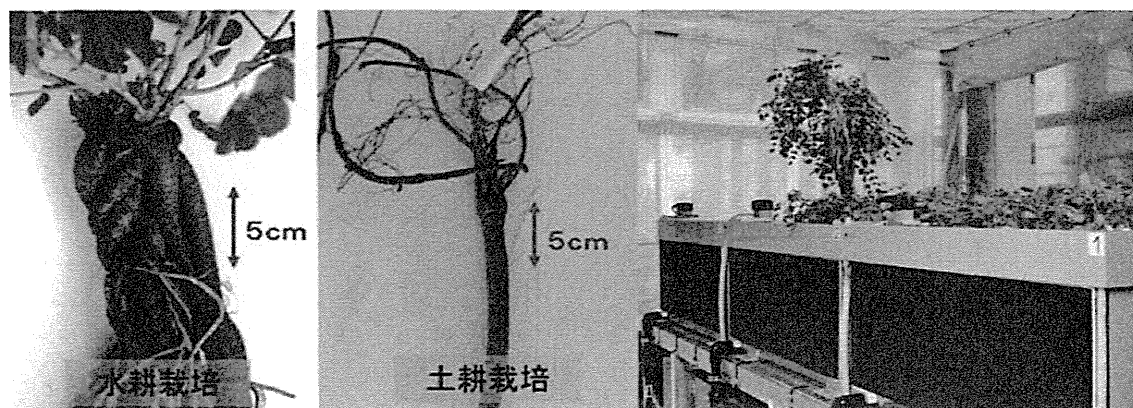


写真4 栽培300日後のウラルカンゾウ根(左:水耕栽培, 中:土耕栽培)および新規人工水耕栽培装置(右, 写真はウラルカンゾウ植物体を引き上げたところ)

法人の研究所や大学単独ではなし得なかったことである。

人工栽培環境下で栽培された生薬が医薬品として製品化された事例は未だない。また、生薬・漢方製剤業界内では、野生品を栽培品より良品とする傾向が強い。しかしながら、生薬の持続的安定供給のための手段として、また、生薬資源および自然環境の保全のため、さらには天災や人災による生薬資源枯渇防止のためにも、人工栽培環境下での生薬の生産は不可欠な技術であり、我々の研究が安心・安全な生薬の持続的供給の一助となり、日本国民の健康の増進・維持に貢献できれば幸いである。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局，一般用漢方製剤承認基準，厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知，pp.1-51 (2010)
- 2) 日本医薬品集，医療薬，2007年版，p.2651，じほう (2007)
- 3) H. Hayashi, H. Sudo, *Plant Biotechnology*, **26**, 101 (2009)
- 4) Y. Yamamoto, T. Tani, *J. Trad. Med.*, **22** (Suppl.1), 86 (2005)
- 5) 尾崎和男ほか，生薬学雑誌，**61** (2), 89 (2007)
- 6) 尾崎和男ほか，生薬学雑誌，**64** (2), 76 (2010)
- 7) M. Kojoma *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **34** (8), 1334 (2011)
- 8) 芝野真喜雄, 尾崎和男, *Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences*, **5**, 59 (2011)
- 9) 第十六改正日本薬局方, 1474, 厚生労働省 (2011)
- 10) 南基泰ほか，薬学雑誌，**115**, 832 (1995)
- 11) 角谷晃司ほか，*Natural Medicines*, **51**, 447 (1997)
- 12) 角谷晃司，*Bull. Pharm. Res. Technol. Inst.*, **12**, 133 (2003)
- 13) 吉松嘉代，特願 2009-131442「栽培装置，及び，栽培方法」(2009)
- 14) 高上馬希重ほか，特開 2005-137291，カンゾウ属植物の組織培養方法 (2005)
- 15) Z. Chen *et al.*, *Cytotechnology*, **60**, 125 (2009)
- 16) Y. Sato *et al.*, *Journal of Ethnopharmacology*, **105** (3), 409 (2006)
- 17) 吉松嘉代ほか，特願 2010-250700，カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法 (2010)
- 18) 澤井学ほか，第 27 回日本植物細胞分子生物学会講演要旨集，p.167 (2009)
- 19) 澤田裕樹ほか，特願 2010-250701，養液栽培システム及び養液栽培方法

生薬・薬用植物の資源確保，生産流通および品質規格の動向 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターの取り組み

川原信夫

Nobuo KAWAHARA

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター長

1 はじめに

2010年10月，生物多様性条約第10回締約国会議(COP10)が名古屋で開催され，生物資源を巡る利益配分に関する議論が大きな話題を呼び，国内栽培化の推進ならびに生薬の安定供給の重要性が再認識された。一方，生薬類の品質，規格に関しては2006年に第15改正日本薬局方(以下，JP15)が施行され，生薬関連分野では6種の漢方処方エキスが新規収載される等，大きな改正が行われた。日本薬局方生薬等委員会では引き続き，新規収載品目の選定，各種試験法の検討，規格値の設定等について検討を行い，本年4月には第16改正日本薬局方(以下，JP16)の施行が予定された。

本稿では，日本漢方生薬製剤協会が行った最新の調査結果に基づく生薬・薬用植物の生産・流通の現状ならびにJP16に収載された生薬類の品質，規格に関する最近の動向について解説する。また，医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターの薬用植物資源に関する近年の取り組みについて紹介する。

2 生薬の生産，流通の現状

生薬・薬用植物の用途は，医薬品類をはじめ化粧品，香料，食品等，多岐にわたっているが，漢方生薬製剤として使用される原料生薬の数量は最近まで把握できていなかった。日本漢方生薬製剤協会では原料生薬の流通データの重要性をかんがみ，2008年度における医薬品原料として使用した品目ごとの数量および入手相手国の調査を生薬276品目について行った(表1)。この結果，全体の使用数量は約2.02万トンで，海外から入手している数量は約1.78万トン(87.8%)，そのうち中国からは約1.68万トン(83.0%)，日本は約0.25万トン(12.2%)であることが判明し，日本における生薬の自給率が12%程度であることが明らかとなった。調査対象276品目のうち使用実績のあったものは248品目で，日本のみは22品目，日本および中国43品目，日本およびその他5品目，中国のみ113品目，中国およびその他28品目，日本および中国・その他19品目であった。中国から入手している生薬は数量ベースで83%，品目数ベースで203/248品目に及んでおり，中国への依存度が高いことが改めて示された。これに対し，日本での入手は数量ベース12%であるが，品目数ベースでは89/248品目となっており，種類では約4割近くの生薬が国内で生産されていた。

数量における頻度では，上位52品目で全体の90%を，上位117品目で99%を占めていることも判明した。使用実績のあった248品目のうち，148品目がJP収載生薬，37品目が日本薬局方外生薬規格(以下，局外生規)収載生薬であった。これを数量ベースで換算するとJP収載生薬は92%を占め，局外生規収載生薬を合計すると94%に達した。したがって我が国では，医薬用原料として数量ベース94%の生薬がJP等の公的基準の中で管理されていることが確認された。

表1 医薬品原料として使用された生薬の使用量と供給国(2008年度)

(単位: kg)

No.	生薬名	使用量	供給国		
			日本産	中国産	その他
1	カンゾウ	1,267,395		1,267,395	
2	シャクヤク	1,164,126	41,019	1,123,107	
3	ケイヒ	1,033,793		836,645	197,148
4	ブクリョウ	996,311		961,722	34,589
5	タイソウ	675,997		675,997	
6	ハンゲ	629,063		629,063	
7	ニンジン	610,092	498	608,946	648
8	トウキ	580,607	204,471	376,136	
9	マオウ	568,686		568,686	
10	コウイ*	555,718	555,718		
11	カッコン	553,999	61	546,098	7,840
12	ソウジュツ	501,647		501,647	
13	ヨクイニン	449,253	600	373,528	75,125
14	サイコ	443,811	23,244	399,212	21,355
15	ダイオウ	439,590	95,418	344,172	
16	ビャクジュツ	427,357		419,624	7,733
17	センナ	426,230			426,230
18	ジオウ**	397,512	2,715	394,659	138
19	オウゴン	383,969	15	383,954	
20	セッコウ	380,348		380,348	
21	センキユウ	373,432	313,739	59,693	
22	タクシャ	358,951		358,951	
23	ショウキョウ	343,660	162	343,408	90
24	カッセキ	297,806		297,806	
25	ボタンビ	285,726	37	285,689	
26	オウギ	283,727	12,555	271,172	
27	キキョウ	268,651		268,586	65
28	クマザサ葉	240,000	240,000		
29	チンピ	232,043	133,975	98,068	
30	カンキョウ	215,833		215,833	
	上位30品目合計	15,385,333	1,624,227	12,990,145	770,961
	総合計(248品目)	20,274,022	2,477,611	16,829,773	966,638
			12.2%	83.0%	4.8%

*1: コウイはマルトース含む。

*2: ジョウは熟ジョウ含む。

3. 生薬の品質、規格の動向

JP 15 が施行されて以来、現在までに JP 15 第一追補, JP 15 第二追補, JP 16 において生薬の品質、規格に関する改正が順次行われた。以下、JP 16 における生薬および漢方処方エキス
の主な改正点を示す、①新規収載品目;カッセキ, コウイ, コウベイ, ゴマ, 黄連解毒湯エキス,
柴胡桂枝湯エキス, 柴朴湯エキス, 芍薬甘草湯エキス, 十全大補湯エキス, 小柴胡湯エキス,
小青竜湯エキス, 無コウイ大建中湯エキス, 釣藤散エキス, 麦門冬湯エキス, 六君子湯エ
キス, ②英名, ラテン名, 基原・本質の表記整備; インヨウカク, キョウニン, コウカ, コウ
ボク, シンイ, ソウジュツ, チンピ, ボウイ, ウラウルシ, カンテン, ゴシユユ, サンソウニ
ン, シゴカ, ショウマ, ハチミツ, ハマボウフウ, ビャクシ, ビャクジュツ, ブクリョウ, ボ

ウフウ、ウイキョウ油、コンズランゴ、③生薬の性状の表現改正：アマチャ、カッコン、キササゲ、タクシャ、タクシャ末、チョレイ末、トチュウ、ボレイ、ボレイ末、④確認試験法の記載変更、追加；ビヤクシ、オンジ、オンジ末、コウジン、ニンジン、ニンジン末、トウニン末、⑤新規定量法の設定；チンピ、⑥参考情報の新規収載；JP収載生薬の学名表記について(JP収載生薬の基原植物の学名表記は、分類学的に用いられている学名表記と一部相違点があるため、両者の関係が分かるように学名表記対照表を「参考情報」に掲載した)、さらにJP16において成分含量測定法は、サフランを成分含量に変更することを除きすべて定量法に置き換えられる(35品目)。

4 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおける薬用植物資源への取り組みについて

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター(以下、センター)は、2005年4月に国立医薬品食品衛生研究所薬用植物栽培試験場から組織変更され、医薬基盤研究所の生物資源部門として新しいスタートを切った。センターは日本で唯一の薬用植物等の総合研究センターであり、薬用植物リファレンスセンターとしての機能を果たすことを目的としている。以下に示す第1期中期目標(2005～2010年)に従い、薬用植物等に関する情報を整備するとともに、薬用植物資源提供体制整備の構築を行った。

第1期中期目標

- ア)薬用植物等の積極的な収集、保存、確実な情報整備および行政的要請への正確な対応を行う。
- イ)薬用植物等の保存、増殖、栽培、育種に必要な技術ならびに化学的、生物学的評価に関する研究開発を行う。

また、有用性の高い新品種の育成および薬用植物栽培の低コスト化に関する研究、薬用植物等に含まれる生物活性物質の探索とその生合成に関与する遺伝子の解明を行った。以下に、その成果を記載する。

1. 薬用植物等の収集、保存、情報整備および行政的要請への対応に関する成果

1) 薬用植物資源の収集・維持管理に関する業績

センターでは約4,000系統の植物を栽培・維持するとともに、種子交換、保存用種子の採取・収集を行い、5年間の総計は2,545点となった。

2) ソロモン諸島有用植物調査の成果

2008年度より高知県立牧野植物園が中心となって開始された文部科学研究事業「ソロモン諸島における有用植物、特に薬用植物の資源探査と天然物化学的研究」の分担研究機関として、ソロモン諸島の植物調査を行い、現在までにさく葉標本*3,580点、化学分析用サンプル445点、生植物標本116点および種子標本38点を収集し、維持・管理している。

3) 薬用植物資源の提供および行政支援対応に関する実績

種子交換目録(index seminum 2005～2010)を年度ごとに作成し、2009年度は395機関(62か国)に送付した。同年度の種子交換目録に基づく種子の請求数に対し、1,455点(102機関)の種子を送付した。また、種子交換以外での薬用植物資源提供実績としては、大学および公的研究機関等に対し、2006～2009年度の4年間で種子398点、植物体431点、標本133点および分析用サンプル1,156点を供給した。さらに「麻薬関連植物に関する講習会」を毎年開催し、

* さく葉標本についての用語解説は、434頁参照。

5年間で880名の参加者を受け入れている。

4) 薬用植物栽培・品質評価指針の作成

イカリソウ、エンゴサク、カキドウシ、クソニンジンおよびトウガンの5品目について、「薬用植物 栽培と品質評価」Part 12の原稿を作成した。

5) 薬用植物データベースの構築

薬用植物資源の高度利用化を目的として、センター保有の重要薬用植物等100種について、その特性、成分、生物活性等の情報をデータベース化し、2010年3月末よりセンターHP上に公開した。

2. 薬用植物等の保存、増殖、栽培、育種に必要な技術ならびに化学的、生物学的評価に関する研究開発の成果

1) 薬用植物資源の新品種育成に関する研究

北海道研究部において育成されたハトムギ(生薬ヨクイニンの基原植物)新品種「北のはと」は2007年3月に品種登録され、2008年には商業生産が開始された。現在、北海道において約9haの面積で生産栽培されている。筑波研究部で育成された温暖地向けハトムギ新品種の「はとろまん」は、現在種苗登録申請中である。北海道研究部において育成されたシャクヤク新品種の「べにしずか」は、収量および各種成分含量のバランスが良好で、根が白く開花率が極めて低い省力型のユニークな品種であり、現在品種登録出願中である。

2) 薬用植物資源の系統選抜および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に関する研究

薬用植物等の種々の増殖法に関する検討および野生あるいは海外産薬用植物の国内栽培化を目的として、重要生薬カンゾウの高グリチルリチン酸含有系統の育成を行い、JPの規格値(2.5%)を超える高収量系統2種と、WHOの規格値(4.0%)をも超える高グリチルリチン酸含量系統7種の選抜に成功した。本成果は現在、特許出願中である。

3) 薬用植物資源の種子および培養物等の長期保存条件の検討に関する研究

発芽抑制物質の影響で時間の経過とともに発芽率が低下するトウキ種子について、洗浄処理の有用性を検討した。また、植物組織培養物の超低温保存に関する研究では、継代維持中の薬用植物カルスを材料に組織・細胞の構造を氷の結晶で破壊することなく、超低温で保存する方法(ガラス化法)による保存条件を検討した。この結果、セリバオウレン形質転換カルス、セリバオウレン非形質転換カルス、オウレン属植物カルス、オニゲシカルスおよびケシ-オニゲシ種間雑種植物カルスにおいて、高頻度の再生に成功した。

4) 薬用植物資源の養液栽培ならびに遺伝子導入技術に関する研究

カンゾウの養液栽培において、約400日間の栽培期間でJP規定値を満たす系統の作出に成功した。また、シロイヌナズナ由来転写因子によるセリバオウレンおよびペラドンナの形質改変を行い、単位容積あたりのアルカロイドの生産効率の向上に成功した。さらに、減圧・エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入法により、世界に先駆けてハトムギへの遺伝子導入に成功した。

5) 薬用植物資源の各種活性スクリーニングに関する研究

薬用植物エキスの熱帯感染症に対するスクリーニングを継続的に行い、5年間の総計は343種となった。スクリーニング対象薬用植物エキスは、主としてペルー、ミャンマー、ソロモン、アラブ首長国連邦の薬用植物であり、特にペルー産薬用植物からは数種の新規化合物を含む種々の活性化化合物を単離、構造決定している。また、メタボリックシンドロームの予防・改善

に関連した生物活性物質の探索も開始し、数種の活性化合物を得ることに成功した。

3. 第2期中期目標および今後の展望について

センターでは第2期中期目標を以下のように設定し、2010年4月から新たな5か年計画による研究業務を開始した。

第2期中期目標

ア)薬用植物等の重点的保存、資源化、戦略的確保および情報集積、発信に関する基盤的研究を行う。

イ)薬用植物資源のより高度な活用に資するため、薬用植物ファクトリーおよび薬用植物EST(expressed sequence tag)ライブラリーに関する応用研究を行う。

さらに2010年度厚生労働科学研究事業「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」も採択された。本研究は既に公開された薬用植物データベースを基盤として、化学分析データ、遺伝子鑑別情報、植物組織培養物情報、内部形態情報、官能データ等の生データを含む各種情報を集積して薬用植物に関する総合データベースを構築するものである。当センターが中心となり、国立医薬品食品衛生研究所、富山大学和漢医薬学総合研究所、金沢大学、岐阜薬科大学、慶應大学薬学部、日本漢方製剤協会、日本生薬連合会、東京生薬協会、日本試薬協会、医薬品医療機器総合機構等の協力を仰ぎながら、現在研究を推進している。

5 おわりに

今回、日本漢方製剤協会のご厚意により、生薬・薬用植物の生産・流通に関する重要かつ詳細なデータを示すことができた。本データが流通状況把握の一助となり、原料生薬の安定確保、ひいては漢方生薬製剤等の安定供給に資することを期待している。また、生薬および漢方処方には保健衛生上重要かつ有用な医薬品であり、その品質を確保し、常に良質な製品を供給していくためには、適正な規格設定が必須である。引き続き日本薬局方生薬等委員会では、第17改正日本薬局方の作成に向けた検討を行っている。

一方、センターでは、薬用植物の資源保護・系統保存、栽培・育種研究等、民間企業では実施できない研究事業を遂行している。特に、100%輸入に依存している薬用植物資源の国内栽培化および栽培期間の短縮化に関する研究では、重要生薬カンゾウの国内栽培においてグリチルリチン酸含量がJP規格値を超える系統の作出に成功するとともに、養液栽培でも高グリチルリチン酸含量系統の作出に成功している。また、現在までに日本に導入された生きた資源植物は、遺伝資源として言わば何物にも代えがたい宝であり、これら植物資源を大切に栽培、系統保存することは今後ますます重要な課題となると考えられる。

2010年4月の行政刷新会議における事業仕分けにより、医薬基盤研究所の研究部門は事業縮減との評価結果が下され、当研究所を取り巻く社会的環境は非常に厳しい現状である。しかしながら、生物資源研究は現在、そして未来も日本の科学技術の基盤を支える重要な研究分野であり、その灯を絶やすことのないよう、関係各位のご理解とご協力を賜れば幸いである。

謝辞：本報の作成に際し、貴重なデータを提供いただいた日本漢方製剤協会生薬委員会の皆様へ深謝いたします。

薬用植物・生薬の栽培、育種、組織培養及び品質評価 The researcher consortium that carries the future

研究交流、情報交換の場としての生薬・薬用植物研究者コンソーシアムの設立について
独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 川原 信夫

1. はじめに

2010年10月、生物多様性条約第10回締約国会議(COP10)が名古屋で開催され、生物資源を巡る利益配分に関する議論が大きな話題を呼びました。このような背景から漢方製剤の原料となる薬用植物の国内栽培化の推進並びに生薬の安定供給の重要性が再認識されています。一方近年、生薬学の根幹である生薬の内部及び外部形態、基原植物の同定、分類等に関する研究に携わっている方々が減少し、特にこれら研究の中心を担う30～40歳代の研究者が非常に少なくなっている現状です。さらに全国の薬系大学並びに各種機関が運営する薬用植物園につきましては財政難等からその維持管理に苦慮されている状況です。以前より筆者は生薬・薬用植物研究の今後の更なる発展のためには若手、中堅研究者の育成による研究の底上げが必須であると認識しておりました。この度、その一助として株式会社ウチダ和漢薬様のご厚意により月刊誌「和漢薬」に連載形式の生薬・薬用植物研究者コンソーシアムを立ち上げ、生薬・薬用植物研究者の方々に各自の研究内容あるいは薬用植物園等の業務内容等を積極的に寄稿していただき、研究交流、情報交換の場として広く活用していただくこととなりました。その第一歩として僭越ながら筆者が所属する独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターの紹介をさせていただきます。

2. 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターの紹介

独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター(以下、センター)は、2005年4月に国立医薬品食品衛生研究所薬用植物栽培試験場から組織変更され、独立行政法人医薬基盤研究所の生物資源部門として新しいスタートを切りました。センターは北海道研究部(名寄市)、筑波研究部(つくば市)、筑波研究部和歌山圃場(日高川町)及び種子島研究部(中種子町)の3研究部1圃場から構成されており、10名の研究員(ポストドクを含む)と圃場の管理を行う8名の専門員が事務関係職員、技術補助職員等の方々のサポートを受けて各種薬用植物の研究、維持管理業務を遂行しております。当センターは日本で唯一の薬用植物等の総合研究センターであり、薬用植物リファレンスセンターとしての機能を果たすことを目的とし、主として以下に示すような試験研究業務を行っております。

1) 研究者並びに行政に提供する薬用植物等に関す



筑波研究部本館

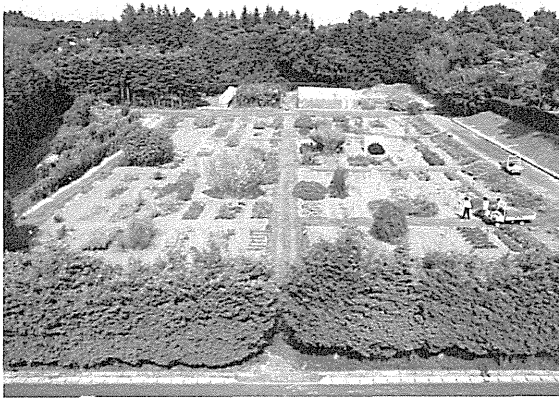
る情報整備

- 2) 生薬、医薬品原料等として利用されている薬用植物等を植物体として維持し、研究・開発資源としての薬用植物等を収集・保存して、研究者等に提供する体制整備
- 3) 有用性の高い新品種の育成並びに薬用植物栽培の機械化による栽培の低コスト化の実現
- 4) 薬用植物等に含まれる生理活性物質の探索並びに薬用植物有効成分の生合成に関与する遺伝子の解明とその遺伝子操作等による成分の改変等への応用

続いてセンターの薬用植物資源業務並びに研究について簡単に紹介させていただきます。

3. 薬用植物資源の収集、保存、情報整備及び行政的要請への対応

- 1) 薬用植物資源の収集・維持管理について
センターでは約4,000系統の植物を栽培・維持すると共に、種子交換・保存用種子の採取、収集を行い、現在約13,000点の種子を各種温度において保存し、適宜発芽試験等も実施しております。
- 2) ソロモン諸島有用植物調査について
平成20年度より高知県立牧野植物園が中心となって開始された文部科学研究事業の分担研究機関として、ソロモン諸島の植物調査を行い、現在までにさく葉標本7,084点、化学分析用サンプル507点、生植物標本230点及び種子標本53点を収集し、維持・管理しております。
- 3) 薬用植物資源の提供及び行政支援対応について
種子交換目録(Index Seminum 2005-2011)を年度毎に作成し、平成22年度は397機関(62カ国)に送付し、その請求に対し1,147点(81機関)の種



標本園

子を送付しました。また、種子交換以外での薬用植物資源提供実績として、大学及び公的研究機関等に対して、平成18～22年度の5年間に種子480点、植物体497点、標本139点及び分析用サンプル1,398点を供給しております。

4) 薬用植物栽培・品質評価指針の作成

イカリソウ、エンゴサク、カキドオシ、クソニンジン及びトウガンの5品目について「薬用植物栽培と品質評価」Part 12の原稿を作成し、刊行しました。

5) 薬用植物データベースの構築

センター保有の重要薬用植物等100種について、その特性、成分等の情報をデータベース化し、平成22年3月31日よりインターネット公開（センターHP）しております。

4. 薬用植物等の保存、増殖、栽培、育種に必要な技術並びに化学的、生物学的評価に関する研究開発

1) 薬用植物資源の新品種育成に関する研究

有用性の高い新品種の育成を目的として薬用植物の育種に取り組みハトムギ新品種「北のはと」、「はとろまん」及びシャクヤク新品種「べにしずか」の育成に成功しました。

2) 薬用植物資源の系統選抜及び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に関する研究

薬用植物等の種々の増殖法に関する検討及び野生あるいは国外産薬用植物の国内栽培化を目的として、カンゾウの高グリチルリチン酸含有系統の育成を行い、日本薬局方規格値を超える系統9種の選抜に成功しました。さらに大規模機械化栽培による薬用植物等の低コスト栽培法の確立に関しては、野菜類の収穫、選別及び洗浄等に用いる既存の農業機器を薬用植物等の栽培及び調製に応用し、一部の機器において充分適用可能であることが確認されています。

3) 薬用植物資源培養物等の長期保存条件の検討に関する研究

植物組織培養物の超低温保存に関する研究では、継代維持中の薬用植物カルスを材料にガラス化法による超低温保存条件を検討し、数種の薬用植物において高頻度の再生に成功しました。



植物培養物

4) 薬用植物資源の養液栽培並びに遺伝子導入技術に関する研究

カンゾウの養液栽培において、約400日間の栽培期間で日本薬局方規定値を満たす系統の作出に成功しました。またセリバオウレン及びベラドンナの形質改変を行い、単位容積あたりのアルカロイドの生産効率の向上に成功しております。

5) 薬用植物資源の各種活性スクリーニングに関する研究

薬用植物エキスの抗リーシュマニアスクリーニングを継続的に行い、特にペルー産薬用植物からは数種の新規化合物を含む種々の活性化化合物を単離、構造決定しております。

5. 今後の展望

センターでは第2期中期目標を策定し、2010年4月から新たな5カ年計画による研究業務が開始されています。今期は新たに薬用植物ファクトリー及び薬用植物ESTライブラリーに関する応用研究を行う予定です。さらに平成22年度から厚生労働科学研究事業「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」も採択され、薬用植物総合データベースの構築に関する研究がスタートしています。

6. おわりに

センターでは、薬用植物の資源保護・系統保存、栽培・育種研究等、民間企業では実施できない研究事業を展開しています。特に現在までにセンターに導入された生きた資源植物は、遺伝資源としていわば何物にも代えがたい宝です。これら貴重な植物資源を大切に栽培、系統保存することがセンターに与えられた重要な責務であると強く認識し、今後も職員一丸となって一層の努力を注いでまいります。

さらには本コンソーシアムが生薬・薬用植物研究の将来を担う研究者の交流広場となり、産官学の垣根を越えた活発な情報交換により新しい方向性を示す道標となれば幸いです。皆様の積極的な寄稿をお願い申し上げます。

なお、次号では当センター筑波研究部育種生理研究室の吉松嘉代室長から寄稿していただく予定です。

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
—薬用植物の組織培養物コレクション—

独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 吉松 嘉代

独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物研究センター育種生理研究室は、前身の国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場（後に国立医薬品食品衛生研究所と改称）発足（1980年2月1日）に伴って新設された研究室で、下村講一郎先生（元育種生理研究室長、現東洋大学生命科学部教授）が同研究室研究員として着任した1984年より、薬用植物の組織培養に関する研究が本格的に開始されました。著者は1986年に同研究室研究員として配属されましたが、その当時から既に多くの薬用植物の組織培養物が育成されており、それらの組織培養物を活用した優良クローンの選抜と大量増殖、有用二次代謝物の生産、土壌細菌アグロバクテリウムにより形質転換された植物細胞による有用二次代謝物生産に関する研究が行われていました。著者は薬学部の薬理学教室の出身で、学生時代はうつ病モデルラットの作製とそれを利用した抗うつ薬の効果を調べる実験を行っており、植物組織培養は全くの初心者でしたが、育種生理研究室配属とともに薬用植物のバイオテクノロジー研究に携わることとなりました。現在の当研究室では、植物バイオテクノロジーを応用した新しい薬用植物資源の開発と保存（植物組織培養による薬用植物の効率的増殖法、薬用植物組織培養物の超低温保存、閉鎖型植物栽培施設における薬用植物の生産、薬用成分の生産と生合成、組換え薬用植物の開発、薬用植物のゲノム研究など）を行っています（図1）。

大学等での研究では、実験を担当していた学生の卒業あるいは就職に伴い、確立された薬用植物の組織培養物が失われることが多々あります。当研究室では、今までに在籍した外部研究者が確立した組織培養物も含め、種々研究のために育成した薬用植物の組織培養物の多くは新しい薬用植物資源を開発するためのツールとして継代培養による維持・保存を行っています。これら研究資源としての薬用植物の組織培養物は、1986年から2004年までは、手作りの照明付き棚を設置した研究本館内の実験室（培養室）と居室内に設置した恒温ユニット内と冷蔵庫型の培養庫内で継代培養により維持・管理してきました。2004年からは、遺伝子組換え薬用植物の栽培が可能な閉鎖温室、非閉鎖温室及びグローブチャンバー室を備えた新設の薬用植物資源研究棟（写真1）2階に設置された恒温室（写真2）と培養庫内で維持・管理を行っています。

研究本館内で組織培養物を維持・管理していたときは、エアコンの故障による温度上昇、天井のエアコン吹き出し口及び換気口の汚れが原因の培養物への雑菌・カビの混入、培養室内での小型昆虫の繁殖（夏場の玄関・扉の開放や見学者等の出入りが原因と思われる）など、たびたび危機に見舞われました。また、特に春から夏にかけての季節の変わり目はエアコントラブルが頻発し、休日返上となることが多くありました。管理場所が新設の研究棟に移ってからは、閉鎖温室内で繁殖した小型昆虫の培養室への侵入と培養試験管内への侵入（体長1mm以下のアザミウマの仲間等は、驚いたことに培養試験管とプラスチックキャップの間のわずかな隙間からも試験管内部に侵入し、繁殖しました）に見舞われまし

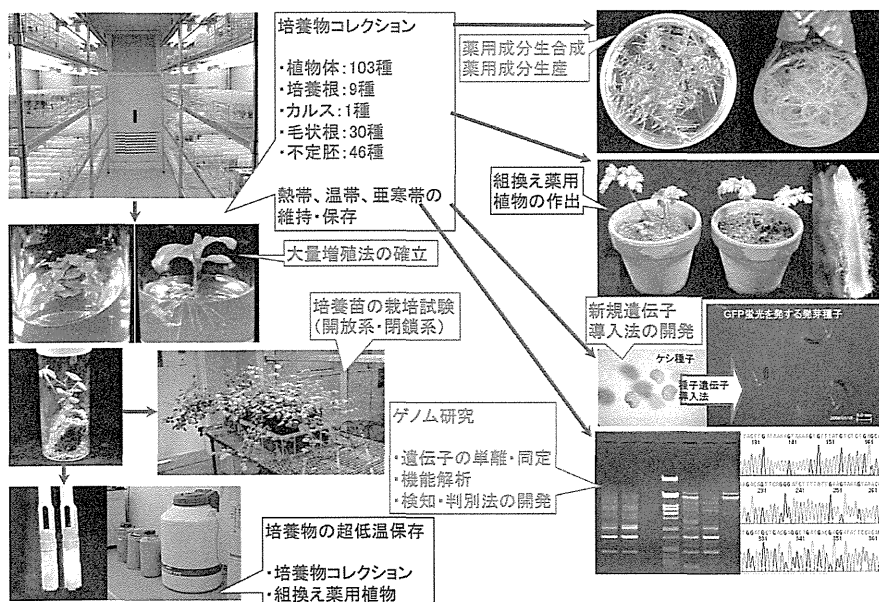


図1. 育種生理研究室：植物バイオテクノロジーを応用した新しい薬用植物資源の開発と保存

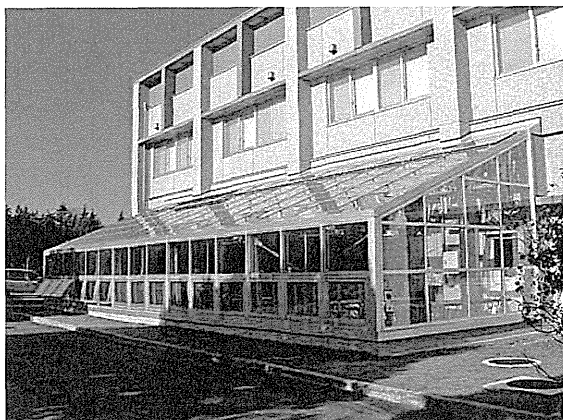


写真 1. 2004年10月に竣工した薬用植物資源研究棟(手前のガラス室は組換え薬用植物の栽培が可能な閉鎖温室)

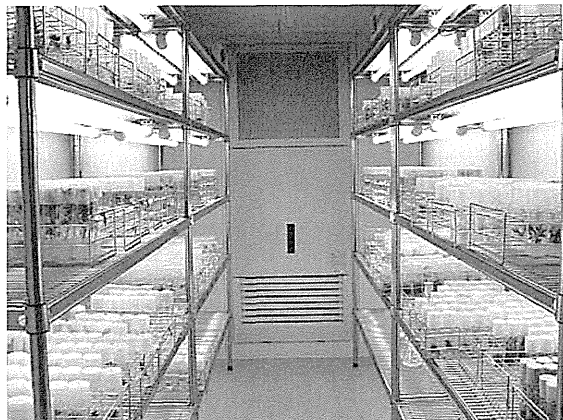


写真 2. 薬用植物資源研究棟 2階の恒温室

たが、出入室管理の徹底と閉鎖温室周辺の改善(温室周りの芝生、植木を除き、コンクリート張りにしました)により昆虫の駆除ができ、今では安定した組織培養物の維持・管理が行えています。平成 23 年 3 月 11 日の大震災では、多くの培養試験管が落下し損傷を受けましたが、幸い全ての培養物が失われた系統は、わずかに数系統で済み、震災後数回の継代培養を経て、ほとんどの系統が復旧できています。

そうして、現在薬用植物資源として継代・維持しているものは、植物体 103 種(同じ植物種で系統が異なるものは別にカウントし組換え及び形質転換薬用植物を含みます)、培養根 9 種、毛状根 30 種、カルス 1 種、不定胚 46 種(組換え薬用植物を含みます)です(ただし、現在試験中あるいは新たに育成中のものの数量は含んでいません)。植物組織培養では、人工的に生育環境を制御(温度、明期と暗期)するため、世界中の植物の維持・保存が可能であり、上記の薬用植物の原産地は、熱帯、温帯、亜寒帯と多様です。薬用植物それぞれに適した温度及び明暗条件で管理しています。また、植物種及び系統により、試験管内での生育に適した栄養分や固化剤が異なることから、数種類の基本培地成分(Murashige & Skoog, Gamborg B5 など)と固化剤(寒天、ゲルライト)を使い分け、継代培養時に調製する植付け

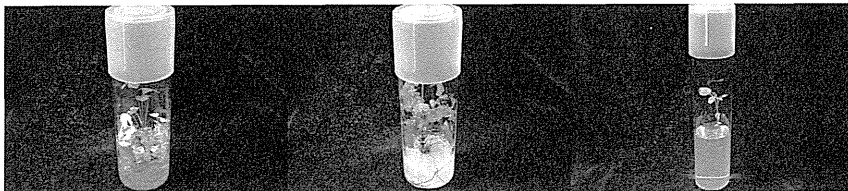
片の種類も個々の植物により異なっています。また、継代培養の間隔も、植物系統により変えています。写真 3 に継代・維持・管理を行っている代表的な薬用植物 6 種(トウキ、センキュウ、ウラルカンゾウ、セリバオウレン、ダイオウ、ショウガ)の組織培養物を示しました。

薬用植物資源研究センターでは、生物資源に関する業務の一環として、研究・試験のための薬用植物の種子、種いも、苗、苗木、植物体を有償分譲しています。しかし、上記のように、薬用植物の組織培養物は、維持・管理のための知識、技術及び施設が必須であり、また、限られた空間での保存のため個々系統の保管数量を制限していることから、通常の有償分譲の対象とはしていません。当研究室との共同研究の目的である場合に限り、無償で分譲しています。

昨年度より、厚生労働科学研究費補助金(創薬総合推進研究事業)「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」(研究代表者:川原信夫 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター長)がスタートしました。著者は分担研究「組織培養物及び効率的増殖法に関する研究」を担当しています。現在までに維持・管理している薬用植物の組織培養物は、必ずしも漢方薬原料植物ではありません。そこで昨年より、漢方薬としての使用頻度が高い植物より順次、新たな材料を入手し、組織培養物の育成と増殖法の検討を行っ

ています。また、増殖・維持法が確立出来たものは、閉鎖系栽培施設での養液栽培条件の検討を始めています。本研究にご興味を持って頂き、実験材料を提供して下さる研究者がおられましたら、ご連絡頂ければ幸いです。

なお、次号では当センター 筑波研究部育種生理研究室の河野徳昭研究員から寄稿していただく予定です。



トウキ

センキュウ

ウラルカンゾウ



セリバオウレン

ダイオウ

ショウガ

写真 3. 育種生理研究室で継代・維持・管理を行っている薬用植物の組織培養物

薬用植物資源の高度利用化に向けて

—ポストモデル植物時代の生薬ゲノミクス—

The researcher consortium that carries the future

(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 育種生理研究室 研究員 河野 徳昭

薬用植物総合データベースの構築

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターでは、生薬の基原となる薬用植物をはじめとする多種多様な植物について、保存、栽培、成分研究、そして遺伝子工学的研究等、我が国随一の薬用植物のリファレンスセンターとして幅広い研究を行っている。近年、当センターでは、保有する植物体およそ4千系統、種子およそ1万3千点にのぼる膨大な量の薬用植物資源に、「情報」という付加価値を付与し管理・提供することをコンセプトとした「高度利用化」への取り組みを進めている。本稿では、その一環として行っているデータベース構築、そして、薬用植物の遺伝子情報収集について紹介したい。

当センターでは、重要薬用植物約100種について植物の基本情報、生薬の情報、そして栽培情報を掲載した薬用植物データベース (<http://www.wts9.nibio.go.jp/mpdb.html>) を作製し、平成22年春より公開を開始した。本データベースは、研究者、製薬関係者、薬学生、そして一般の方々まで幅広い層のユーザーを想定しており、私の担当したシステム設計では、マウスのクリックだけで直観的な操作が可能な「眺めて楽しい図鑑」となるように心がけた。栽培情報は「薬用植物 栽培と品質評価」をベースとしており、薬用植物分野では、実生産の視点に立った唯一のデータベースであり、また、千点を超える写真ライブラ

リーには、種子から生育中の様子、収穫、調製、そして生薬に至るまでの写真が掲載されている。

この「初代」データベースを基本骨格として、大幅な肉付けをした発展形が、平成22年度よりスタートした厚生労働科学研究事業「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」で構築中の「総合情報データベース」(以下、総合DB)である。総合DBは、「初代」の基本骨格を引き継ぎ、直観的な操作性を維持しつつ、ユーザーの専門性に応じて化合物情報や日本薬局方情報、さらにはTLCの展開後の写真やLC-MSのチャートまで閲覧可能な高度なデータベースとなる予定であり、日本漢方生薬製剤協会、日本生薬連合会、東京生薬協会の関係各社様のご協力をいただき、国内に流通している生薬の成分、遺伝子配列の実データを測定解析し、データベース化する点を最大の特徴としている。これらの一生薬・多検体について収集された各種のデータはいずれ、産地や品種、系統等のパラメータによる比較が可能になり、産地による成分等の特性の解析や、遺伝子マーカーの開発等に寄与できるものと期待される。本総合DBは2012年春より順次公開し、最終的には図のような多彩な情報を満載したデータベースとして完成を目指している。

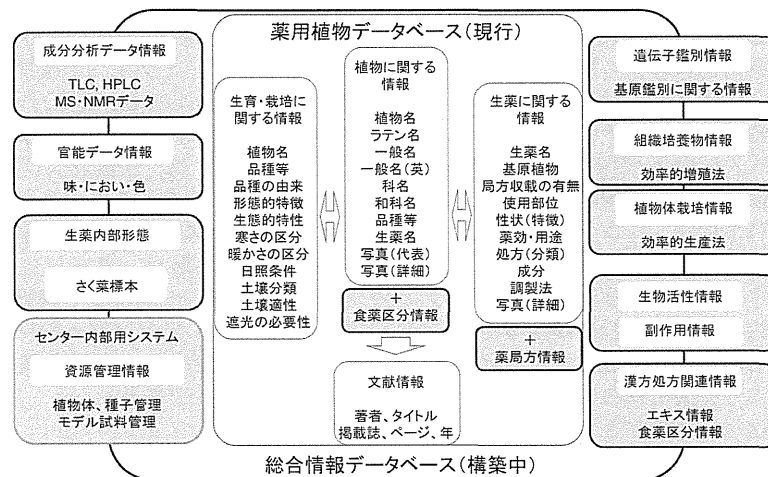


図 「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース」の構造