

201208015B

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

優良形質を持った薬用植物新品種の育成  
及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

平成22年度～24年度 総合研究報告書  
(H22-創薬総合-指定-015)

研究代表者 飯田 修

平成25(2013)年3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

優良形質を持った薬用植物新品種の育成及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・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

飯田 修

#### (資料)

1. 生薬の品質評価における新しい定量法の開発に関する研究について・・・・・・24  
 淵野裕之、大根谷章浩、新井玲子、竹脇大気、高橋 豊、菱田敦之、林 茂樹

II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・32

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・35



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

優良形質を持った薬用植物新品種の育成及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

（H22-創薬総合-指定-015）

研究代表者

飯田 修（独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 種子島研究リーダー

漢方等に利用される原料生薬の国内使用量の88%が海外からの輸入に依存しているが、資源の枯渇等により価格の高騰や安全性の面から生産履歴の明確な国内生産品を求める要望が高まってきている。薬用植物の国内栽培を推進するためには、各地域の環境に適した収量性の高い、日本薬局方の品質基準を満たす品種の育成と、それらの種苗の安定供給が必要である。そこで、本研究では①新品種の育成と普及に関する研究、②種苗の保存に関する研究および③種苗の効率的増殖法に関する研究を行う。

①新品種の育成と普及に関する研究では、薬用植物資源研究センターで育成したハトムギ品種‘北のはと’および‘はとろまん’の普及の促進と拡大を図るため、生産栽培および試験栽培の現地実態調査と栽培指導を行った。ハトムギ‘北のはと’の生産栽培は、3年間で栽培面積が10.2 haから18.5 haに増え、規格品の収量は23.5トンから32.7トンに増加した。平成22年度から24年度の間、‘北のはと’を原料とした医薬品（局方ヨクイニン）、薬用スキンケアコンディショナー（医薬部外品）および加工食品が販売された。ハトムギ‘はとろまん’の試験栽培を埼玉県で2年間行った。優良系統の育成では、カンゾウの高グリチルリチン含有系統No.70およびNo.10の栄養繁殖による種苗増殖を試みた。シャクヤクについては、品種登録申請中の‘べにしずか’および次期品種登録申請候補のNo.513について種苗増殖および栽培5年目株の収量調査を実施した。ハトムギ新品種の育成を目指し、種子島選抜系統、‘あきしずく’、‘はとろまん’、‘北のはと’および岡山在来種5系統の栽培比較試験を行い、種子島選抜系統が環境適応性に優れていることを明らかにした。ナイモウオウギ種子への直接遺伝子導入法を確立するため、種子へ緑色蛍光タンパク質遺伝子をエレクトロポレーションした結果、約6%の実生で顕著な緑色蛍光を観察し、活着植物体のうち約2%で葉のゲノムDNAへの緑色蛍光遺伝子の挿入を確認し、形質転換植物体の作出に成功した。ウラルカンゾウのグリチルリチン生合成経路の鍵酵素のスクアレン合成酵素（SQS）遺伝子、 $\beta$ -アミリン11位酸化酵素（CYP88D6）遺伝子、11-オキソ- $\beta$ -アミリン30位酸化酵素（CYP72A154）遺伝子の各ゲノムDNAの塩基配列情報を用いることにより、優良系統間の識別および優良系統と他系統との識別が可能であり、カンゾウ属植物の種間識別にも有用であった。葉緑体DNAおよびリボソームDNAの部分配列についてハトムギ7系統の塩基配列を決定し、品種識別を検討した。ウラルカンゾウ「北農試系」の来歴について、DAN塩基配列情報および文献調査か

ら考察した。新しい定量法の開発について、カンゾウ 9 成分の一斉定量法に関しては、LCMS を用いて行うことが十分可能と考えられた。シコン中のシコニン色素の含量評価は、操作が簡便な分光測色計によって行うことができ、新しい生薬シコンの評価法になるものと思われた。メハジキ葉の成分の Labdane 系ジテルペン は、揮発ではなく溶液中で容易に化学変化を起こすことを明らかにした。

②種苗の保存に関する基盤的研究では、ウイキョウ、キバナオウギ、コガネバナ、ダイオウなど 33 種類 2 系統の薬用植物の発根、出葉に及ぼす温度条件の影響を調査し、各植物の発芽試験法の規格化を行った。また、ムラサキ種子の発芽は低温湿潤処理により発芽率が高くなることを明らかにした。ベニバナおよびインドジャボクの種子を用いて、テトラゾリウム塩 (TTC:2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium Chloride) による発芽力の簡易検定法について検討した。ハトムギ種子を用い、3 年間保存した種子の形質変異に関する実証試験を行ったところ、生育特性、外部形態特性、果実の収量性に大きな変化はなく、生産栽培可能な特性を十分維持していた。培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験では、センキュウ、セリバオウレンおよびウラルカンゾウの培養苗は増殖効率が高くなる一方で、品質面での低下が認められ、これらは生薬生産用の苗ではなく、圃場における種苗生産用の苗としての適性が高いと考えられた。ウコンおよびショウガの培養苗由来の根茎は高い増殖率を示し、再生植物体は外部形態的には問題は見られず、生薬生産用および種苗生産用双方の種苗としての適性が高いと判断した。

③種苗の効率的増殖法に関する研究では、7種類の生薬、蒼朮、白朮、黄芩、生姜、地黄、麻黄および遠志の基原植物である8種の植物、ホソバオケラ、オケラ、コガネバナ、ショウガ、カイケイジオウ、アカヤジオウ、シナマオウおよびイトヒメハギについて、組織培養による効率的増殖法を検討し、ホソバオケラ、オケラ、コガネバナ、ショウガ、カイケイジオウについて、植物組織培養による効率的増殖法と優良クローンの育成に成功した。アカヤジオウおよびイトヒメハギは、培養シュートの育成まで完了した。シナマオウについては、シュート増殖能が高く、生育良好なクローンの育成に成功し、培養シュートを挿し穂とした光独立栄養培養が、シナマオウシュートの発根と苗の育成に有効な手法であった。種苗の効率的増殖法について、カノコソウの圃場栽培における被覆処理の効果を検討し、根収量は稲わら処理区で最も高く、黒マルチ区、裸地区で減収し、カノコソウ栽培において稲わらの被覆処理は有効であることを明らかにした。チョウジの挿し木による発根率は極めて低く、増殖は困難であったが、取り木では発根率が高まり、有用な繁殖法であった。挿し木による増殖では、ゴシュユは3月処理が、カギカズラは太い枝の先端部が、インドボダイジュは先端部がそれぞれ高い発根率を示した。薬用植物栽培における農薬の適性使用に関する研究では、カノコソウの除草剤試験、シソの殺菌剤施用試験およびキバナオウギの種子消毒試験において薬害は認められず、カノコソウおよびシソにおける薬剤の残留値は、基準値よりも十分に低い値であることが明らかとなった。

研究代表者（平成22年度）

柴田敏郎

（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 北海道研究リーダー

研究分担者

川原信夫

（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター センター長

瀧野裕之  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究室長  
吉松嘉代  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究室長  
菱田敦之  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 北海道研究サブリーダー  
熊谷健夫  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 主任研究員  
河野徳昭  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 主任研究員  
杉村康司  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究員  
林 茂樹  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究員  
  
研究協力者  
乾 貴幸  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 特任研究員  
北澤 尚  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 技術専門員  
香月茂樹  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 客員研究員  
大根谷章弘  
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター  
御影雅幸  
金沢大学薬学部 教授  
高上馬希重  
北海道医療大学薬学部 准教授  
新井玲子  
東京理科大学薬学部  
竹脇大気  
東京理科大学薬学部  
高橋 豊

エム・エスソリューションズ  
根岸直希  
日本製紙株式会社

#### A. 研究目的

長寿社会で重要な役割が期待される漢方薬やサプリメントの原料生薬や薬用植物は、現在国内使用量の80%以上が低価格な中国やアジア諸国など海外からの輸入に依存している。しかし、それらの国々の経済発展並びに乱獲等による資源枯渇にともない価格が高騰しつつある。一方、中国における土壌汚染および農薬問題等、安全性の面から生産履歴の明確な国内生産品を求める意見が業界からも高まっており、品質の一定した安全な生薬を生薬を医療の場へ安定的に供給することは、国民の健康を保証する立場からも必要となっている。薬用植物の国内栽培を推進するためには、栽培技術の改良研究とともに、各地域の気象条件や環境に適した収量性の高い、日本薬局方の品質基準を満たす品種の育成が必要であるが、それらの組織的な研究は行われておらず、新品種の育成は急務である。新品種の育成には、従来の選抜育種法とともに、組織培養や外来遺伝子の導入による短期間での育成技術の確立や、育成品種の知的財産権保護のためのDNAマーカーの解明が必要であり、一部の農産物では既に実用化されている。

このような状況に対処するために、薬用植物の選抜育種法による新品種育成と普及および種苗増殖に関する研究、外来遺伝子導入など先端的な品種育成技術や品質評価法の研究、および育成品種の権利保護のためのDNAマーカーに関する研究を行い、さらに種子の発芽試験法および種子の発芽能力の簡易検定法の確立や長期保存の影響、培養苗由来再生植物体の形質への影響および種苗の効率的増殖方法を明らかにし、薬用植物栽培における農薬の適性使用について検討し、育成された品種の種苗を安定して供給可能と

する体制を構築することを目的として研究を行った。

本研究の結果は国内での薬用植物栽培生産を促進し、生産履歴の明確な生薬や薬用植物の安定確保に貢献できるものであり、品質が均一で安全な原料生薬を将来にわたって医療の場へ安定的に供給することによって医療の安心や国民の健康に大きく貢献することが期待される。

## B. 研究方法

### 【新品種の育成に関する基盤的研究】

#### 1. 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究

(1) 薬用植物資源研究センターで育成したハトムギ品種‘北のはと’の生産栽培と試験栽培および‘はとろまん’の試験栽培を行い、普及状況および生育状況を調査し、栽培指導を行った。

北海道内での生産栽培を士別市、二海郡八雲町、虻田郡豊浦町で行った。さらに試験栽培を名寄市および有珠郡壮瞥町で行った。

北海道研究部における栽培条件は次のとおり。供試材料：ハトムギ‘北のはと’*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman.) Stapf. ‘KITANOHATO’ 育苗：移植栽培用ハトムギ苗は培養土（プラグエース）を充填した128穴セルトレイに播種して温室内で育苗した。播種および定植日：5月中旬～6月上旬に播種および定植した。施肥量：基肥として化成S121

(10-20-10)を10a当り50kg施用した。収穫日：9月下旬～10月上旬に収穫した。調査方法：収穫した後、豆選別機を用いて収穫物した子実を1番（規格品）と2番（規格品外）に選別し、温室内に設置した平行乾燥機で十分に乾燥して収穫量を求めた。

ハトムギ‘はとろまん’の試験栽培は、平成23、24年度の2年間、埼玉県秩父市上吉田の休耕田を利用して行った（川原、柴田、飯田、菱田、林、渕野、熊谷、杉村）。

(2) 国内における圃場栽培でも規格を満たすカンゾウを育成することを目的として、グリチルリチン酸（GL）高含有系統の特性調査、選抜、増殖を試みるとともに種子繁殖の可能性について検討した。

種子繁殖により圃場栽培した5年生株約600個体から生育およびGL含量を指標として6系統を第一次選抜し、その栄養系について圃場の土を用いたポット栽培で形質再現性を評価するとともに第二次選抜を行った。また、選抜系統について、圃場における栄養繁殖1年目株の開花率、人工受粉が結莢率（莢数/小花数）へ及ぼす影響および自殖第一代（S<sub>1</sub>）の生育およびGL含量を調査した（林、菱田、柴田、高上馬）。

(3) シャクヤクの優良系統の育成について、各種成分および根の色に関する品質が高水準であり、摘花が省力可能な品種登録申請中のシャクヤク‘べにしずか’について摘花所要時間を計測したほか、埼玉県秩父市において実証栽培を開始し、その現地調査を行った。また、育成中の53系統から成分・収量・根の色を指標として6系統を選抜し、その特性調査結果から次期品種候補を選抜した（林、菱田、柴田）。

(4) ハトムギの新品種の育成を目指し、種子島など九州地域で生産栽培可能なハトムギの系統を検討するため、種子島選抜系統、‘あきしずく’、岡山在来種、‘はとろまん’、‘北のはと’の5系統の栽培比較試験を行い、各種の栽培特性を明らかにした。

材料：種子島選抜系統（種子島2009年採取）、あきしずく（九州沖縄農業研究センター2011年採取）、岡山在来種（筑波2010年採取）、はとろまん（筑波2009年採取）、北のはと（北海道2008年採取）の種子を用いた。

特性調査：各系統の収穫日にあわせて実施した。調査項目は草丈、茎数、主稈節数、果稔実果実の粒数、稔実率、稔実果実の乾燥重量、穂発芽数、種子と果実の

100粒重ならびに100ml容積重である（杉村、飯田、香月）。

(5) ケシの高コデイン含量品種の育成を目指し、自殖二世代の隔離採種と選抜を行った（杉村、飯田、吉松、河野）。

## 2. 外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究

従来法による形質転換が困難であるマメ科のナイモウオウギを材料に、種子への遺伝子導入を行うにあたって必要な硬実打破・催芽条件、遺伝子導入形質転換体の選抜に必要な可視的選抜マーカーの使用の可否、エレクトロポレーション

(EP) 後の種子の育成条件等について検討し、次いで、蛍光タンパク質遺伝子をナイモウオウギ種子へ導入し、その導入効率を検証した（河野、乾）。

## 3. 遺伝子マーカーの解明による品種識別技術の確立

水耕栽培に適し、高グリチルリチン酸含有量を示すウラルカンゾウの優良系統をモデルとして、グリチルリチン酸生合成経路の鍵酵素遺伝子3種(スクアレン合成酵素 (SQS)、 $\beta$ -アミリン11位酸化酵素 (CYP88D6)、および、11-オキソ- $\beta$ -アミリン30位酸化酵素 (CYP72A154)) のゲノムDNA塩基配列の多型を利用したウラルカンゾウ優良系統の識別を試みた。

本実験では、以下のカンゾウ属植物 5 種 1 変種 20 系統および市場品生薬 16 試料を対象とした。

ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

・GuTS71-08 (北海道農業試験場系統由来の実生) : 6 系統

GuTS71-08 VII1, GuTS71-08 IV2,

GuTS71-08 C2, GuTS71-08 i,

GuTS71-08 C5, GuTS71-08 #11

・Gu2 (北海道医療大学系統 導入番号 TS301-07 シュートより誘導した培養植物のサブクローン) : 6 系統

Gu2-3-2, Gu2-3-2 i, Gu2-1-3 (1),

Gu2-2-1 (1), Gu2-3-2 (B), Gu2-5-2、

(独) 医薬基盤研究所筑波研究部圃場等において系統保存されている以下の各系統。

ウラルカンゾウ (*G. uralensis* Fisch.) 2 系統

Gu (導入番号 : 0125-93)

GuKY (甘草屋敷系統, 0366-95)

スペインカンゾウ (*G. glabra* L.) 2 系統

Gg1 (0469-79), Gg2 (SC-15)

ロシアカンゾウ (*G. glabra* L. var. *glandulifera* (Waldst. et Kit.) Reg. et Herd.) 1 系統

Ggg (1659-84)

イヌカンゾウ (*G. pallidiflora* Maxim.) 1 系統

Gp (0330-80)

シナカンゾウ (*G. echinata* L.) 1 系統

Ge (0451-79)

シンキョウカンゾウ (*G. inflata* Bat.) 1 系統

Gi

甘草市場品生薬 16 試料

NIB003 (原形生薬、中国内蒙古自治区産、西北甘草・丁)、NIB004 (原形生薬、中国

寧夏、西北甘草・丁)、NIB005 (原形生薬、中国内蒙古自治区産、東北甘草・1号)、

NIB006 (原形生薬、中国内蒙古自治区産、東北甘草・2号)、NIB007 (原形生薬、中国

内蒙古自治区産、東北甘草3号)、NIB037 (原形生薬、中国内蒙古自治区産、東北甘草・3号)、

NIB038 (原形生薬、中国甘肅省/内蒙古自治区産、西北甘草・丁)、NIB054 (原形生薬、中国吉林省産)、

NIB074 (刻み生薬、中国甘肅省産、西北甘草・野生品)、NIB090 (刻み生薬、中国

寧夏産、西北甘草)、NIB107 (刻み生薬、中国寧夏産、西北甘草・丙級・野生品)、

NIB108 (刻み生薬、中国寧夏産、西北甘草・乙・野生品)、NIB109 (刻み生薬、中国

内蒙古自治区産、東北甘草・丙・野生品)、NIB146 (刻み生薬、中国甘肅省産、

西北甘草)、NIB168 (原形生薬、中国内

古自治区産、野生品)、NIB176 (原形生薬、中国内蒙古自治区産、東北甘草・2号・野生品) (河野、乾)。

#### 4. DNA塩基配列情報に基づく薬用植物の品種識別法の開発に関する研究

品種の識別技術および原産地の推定を行うため、DNA塩基配列情報に基づく評価方法の開発を試みた。

供試材料：ハトムギ‘北のはと’ *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman.)

Stapf. ‘KITANOHATO’および国内で流通するハトムギ7系統。北海道研究部に保存されているウラルカンゾウ *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 保存系統の北農試系、医療大系および北大系の3系統。

鋳型DNAの調製：各サンプルの種子または葉から、市販のキットを用いて鋳型DNA溶液を調製した。ターゲット領域の増幅：植物の種および品種の識別で汎用される葉緑体DNAおよびリボソームDNAの3領域をターゲット領域とした。ハトムギでは、*rpl16*および*rpl16-rpl14*、*atpF-atpA*、*trnS-trnT*、ITS4-ITS5を解析領域とした。ウラルカンゾウではITS、*rbcL*、*matK*および*trnH-psb*を解析領域とした。ターゲット領域を特異的に増幅するプライマーを用いPCR法で増幅した。塩基配列の決定：シーケンス反応にはABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitを用い、シーケンス解析にはABI 3100 Genetic Analyzerを用いた (菱田、林)。

#### 5. 生薬の品質評価における新しい定量法の開発に関する研究について

(1) 22年度はカンゾウの新規成分分析手法の開発を目的として、2DTLC-MSを用いた品質評価法を検討した。

23年度はカンゾウの成分を LCMS を用いて一斉定量を行うことを試みた。

24年度は生薬シコン中のシコニン類含量を一旦 HPLC にて定量を行い、それらを分光色相計を用いて測定し、それらの相関関係を求めて色相値からシコン中シコ

ニン含量を求める新たな簡易な方法を提案した (渕野、大根谷、新井、竹脇、高橋、菱田、林)。

(2) メハジキの温度変化に伴う成分変異と品質評価法を検討した。採取直後のメハジキ地上部を15, 40, 50, 70, 90°Cの5段階で4日間乾燥し、TLCMSおよびGCMSで成分の変化を確認した (川原、渕野)。

#### 【種苗の保存に関する基盤的研究】

#### 1. 薬用植物種子の発芽試験法に関する研究

##### (1) 発芽試験の規格化に関する研究

##### 1) 発芽試験について

材料：平成 22 年 (2010 年)：コガネバナ、コエンドロ、キササゲ、ゴマ、キカラスウリ、ミシマサイコ、ヒキオコシ、カワラヨモギ、ヒロハクララ、ベニバナ、エビスグサ

平成 23 年 (2011 年)：キバナオウギ、ダイオウ、モッコウ、オケラ、ホッカイトウキ、ヤマトトウキ、エビスグサ、ハトムギ、トウゴマ、ハブソウ、オトギリソウ、キキョウ

平成 24 年 (2012 年)：メボウキ、カワミドリ、ウイキョウ、ニラ、カミツレ、コロシント、ノリアサ、オランダセンニチ、キバナオランダセンニチ、アサガオ、チョウセンアザミ

##### 2) ムラサキ *Lithospermum*

*erythrorhizon* Siebold et Zucc. の種子発芽に及ぼす低温湿潤処理の影響について

試験 1：(1) 5°C ラミジップ保存無処理、

(2) 5°C 砂湿潤処理 120 日

試験 2：(1) 5°C ラミジップ保存 (296 日) 無処理、(2) 5°C 砂湿潤処理 (246 日)、(3) -1°C ラミジップ保存 (296 日) 無処理

方法：蓋付きスチロール角形ケース (148 × 84 × 32 mm) 1 個に種子 50 粒置床。下記温度条件下でそれぞれ 3 反復で実施。

試験温度：発芽チャンバーを用い、15、20、25、30°C の恒温条件で行った。

照明条件：明暗各 12 時間 発芽の確認：発根時および出葉 (子葉展開) 時の 2 段



階で確認した（熊谷）。

## (2) 種子の発芽力簡易検定の検討

ベニバナおよびインドジャボクの種子を用い、テトラゾリウム塩（TTC）による発芽能力検定法を試みた。

ベニバナでは、2010年産種子を用い、1%TTC（2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride）溶液に種子を直接浸漬する方法と種子を予め水に18時間浸漬処理した後、種子を切り、胚を含む部分を取り出して、染色する方法を比較した。インドジャボクでは、2006年、2007年、2009年および2011年産種子を用い、種子を被う固い殻を半分に割り、1%TTC溶液に浸漬し、その後胚を取り出し染色程度を観察した。同じ年度の種子を土に播種し発芽させ、採取年毎の発芽率を調査し、TTC液による胚の染色程度との関係について検討した（熊谷、飯田、杉村）。

## 2. 保存種子の形質変異に関する研究

ハトムギ種子島在来種の2009年産保存種子を用いて、2010年から3年間継続して栽培試験を行い、形質の変化について検討した。

材料：種子島で2009年に採取した種子島在来種の種子を用いた。

生育相調査：発芽開始日、発芽揃い日、出穂開始日、出穂期、開花開始日、開花盛期、収穫日、発芽率について、2010年、2011年、2012年の調査結果を比較した。特性調査：草丈、最上位果の高さ、莖数、稈径、主稈節数、分枝数、稔実果実の粒数、稔実率、稔実果実の乾燥重量、稔実果実の100粒重について行い、2010年と2012年の調査結果を比較した（杉村、飯田）。

## 3. 培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験

センキュウ、セリバオウレン、ウラルカンゾウ、ウコンおよびショウガについ

て、培養苗由来植物と圃場で生産された苗（圃場苗）由来植物の生育関連形質を調査し、培養苗由来の再生植物体が形質へ及ぼす影響を検討した。

組織培養により作出した培養苗と圃場で生産された圃場苗をワグネルポット（センキュウ、セリバオウレン）または圃場（ウラルカンゾウ）へ定植し、生育および品質を比較した。ウコン、ショウガは培養苗を馴化後2年間、温室内の鉢で根茎を育成し、3年目に培養苗と圃場苗由来のほぼ同じ大きさの根茎を圃場に定植し、外部形態および生育を比較した（林、菱田、吉松、飯田、杉村）。

## 【種苗の効率的増殖法に関する研究】

### 1. 人工環境制御下での種苗の保存と効率的増殖に関する研究

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漢方薬原料植物の安定的・戦略的確保のため、植物組織培養による優良系統の選抜と効率的増殖法の確立を行い、さらに人工環境制御下での生薬生産の基盤を確立する。

ホソバオケラ、オケラ、ショウガ、カイケイジオウ、アカヤジオウは圃場栽培植物を組織培養物誘導材料とした。また、コガネバナ、シナマオウおよびイトヒメハギは圃場栽培植物より採取した種子を組織培養物の誘導材料とした。

各種植物材料より外植片を調製して常法により殺菌処理を行い、各種培地に植え付けて、植物組織培養物の育成、継代・増殖・植物体再生方法の検討を行った。

ホソバオケラおよびオケラ培養苗を、ハイドロボールを支持体とした底面給水型の養液培養装置に移植し、閉鎖温室内で養液栽培を行い、生育および根茎の収量を調査した（吉松、河野、乾、北澤、飯田、御影、根岸）。

### 2. 種苗の効率的増殖に関する研究

#### (1) カノコソウの圃場栽培における被覆処理効果

カノコソウの根収量に及ぼす圃場への稲わら被覆処理および黒マルチ処理の効果について検討した。

種苗：カノコソウ *Valeriana fauriei* Briq.

定植日：平成22年10月7日

試験区：稲わら被覆区、黒マルチ区、裸地区（無被覆）

収穫：平成23年9月27日。根茎部を収穫・水洗後、戸外で風乾し、風乾重を測定した（熊谷）。

### (2) 栄養繁殖による増殖法の検討

チョウジの挿し木と取り木、ゴシュユ、カギカズラおよびインドボダイジュの挿し木による増殖を処理時期、処理部位を変えて検討した（飯田、杉村）。

## 3. 薬用植物栽培における農薬の適正使用に関する研究

将来的な薬用植物の農薬整備を目指し、農薬散布による省力化の適否、薬効および薬害、さらに農薬の残留性について基礎的な知見を得ることを目的とした。

供試材料：ゲンチアナ *Gentiana lutea* L.、ケイリンサイシン *Asiasarum heterotropoides* (F. Schmidt) F. Maekawa var. *mandshuricum* F. Maekawa、キバナオウギ *Astragalus membranaceus* Bunge、シソ *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *crispa* Decne.、カノコソウ *Valeriana fauriei* Briq. を用い、慣行法に従い栽培を行い、除草剤試験実施基準および各農薬の標準的な用法に従い試験を行った（菱田、林）。

## C. 研究結果

### 【新品種の育成に関する基盤的研究】

#### 1. 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究

(1) 平成22年度から平成24年度の北海道におけるハトムギ‘北のはと’の生産栽培の栽培面積と生産量は、平成22年度では栽培面積が10.2 ha、生産量が23.5 トン、平成23年度では、作付面積が19.2 ha、規格品の収穫量が20.1トン、平成24年度では作付面積が18.5 ha、規格品の

収穫量が32.7トンであった。

北海道研究における連作試験の8年度では、移植栽培区の10a当たりの収量が60.9 kg、直播栽培区が81.6 kg、新規栽培試験では約55.7 kgであった。

主な気象災害は、平成23年度に北海道全域で冷害があり、当該年度のハトムギの収量は全般的に減収した。平成24年度に名寄市、士別市を含む上川北部で5月中旬から6月下旬にかけて干ばつが続き、士別地区の生産栽培、北海道研究部の試験栽培は減収した。

主な病害虫は、平成23年度に二海郡八雲町でタマナヤガの幼虫が大発生してハトムギが著しく食害を受けた。平成24年度に葉枯病が局所的に認められ、栽培地の南下に従い発生が多くなる傾向が認められた。

‘北のはと’を原料とした医薬品、化粧品（医薬部外品）および食品が発売された。平成22年度は、薬用スキンコンディショナー（(株)アルビオン化粧品）、平成23年度は、ハトムギクッキー（(株)北菓楼）、平成24年度は日本薬局方ヨクイニン（(株)栃本天海堂）、ハトムギ入りのべひや麦（さんか製麺）が製品化された。

埼玉県秩父市上吉田で行ったハトムギ‘はとろまん’の試験栽培では、平成23年度には3箇所、5,077m<sup>2</sup>の圃場から合計848.19 kgの乾燥果実を収穫し（170.0 kg/10 a）、平成24年度には6箇所、11,643 m<sup>2</sup>の圃場から合計427.62 kgの乾燥果実を収穫した（36.73 kg/10 a）。

(2) カンゾウのGL含量については親株と栄養系の間には強い正の相関関係（ $r=0.903$ ,  $p<0.001$ ）が認められ、根重およびGL含量が安定的に高かった系統No.10（GL 3.42%）およびNo.70（GL 3.19%）が第二次選抜された。No.10の開花個体率は栽培1年目から50%と極めて高く、また人工授粉を行わなかった花の結莢率（3%）は人工授粉（80%）と比較して極

めて低かった。一方、No.10のS<sub>1</sub>は播種後200日後までの生存率が40%と低く、播種後約700日にGL含量が規定値2.5%を満たしたのは全体の29%であった。

(3) シャクヤク既存品種は10a当たりの蕾(花)数が32,756個、摘花所要時間が7.8時間であるのに対し、‘べにしずか’は219個、0.5時間となった。また、埼玉県秩父市において実証栽培が開始され、生存株では健全な生育が認められたものの、生存率の低下が認められた。

選抜試験について、草丈、葉緑素値、茎葉重、さび病抵抗性および収量はNo.513が最も高く、シャクヤクの収量と茎葉重の間に正の相関関係が( $r=0.824$ ,  $P<0.05$ )、さび病被害指数との間には負の相関関係( $r=-0.810$ ,  $P<0.05$ )がそれぞれ認められた。

(4) ハトムギの品種比較試験では、発芽開始日、発芽揃い日、出穂開始日、出穂期、開花開始日、開花盛期は北のはとが最も早く、次いで種子島選抜系統が早い傾向が見られた。

各系統別の生育特性について、種子島在来種は茎数と主幹節数がやや少なく、1株当たりの稔実果実数がやや少ない傾向があるが、稔実率は80%以上と高い傾向が見られた。

各系統別の果実ならびに種子の乾燥重量について、果実の100粒重は、北のはと<あきしずく≒岡山在来種<種子島選抜系統<はとろまんの順に重く、種子の100粒重は、北のはと<あきしずく<岡山在来種<種子島選抜系統<はとろまんの順に重い傾向が見られた。それに対して、果実と種子の100ml容積重は、はとろまん<岡山在来種<北のはと<あきしずく<種子島選抜系統の順に重い傾向が見られた。

(5) ケシの高コデイン含有品種の育成を目指し、自殖二世代の隔離採種と選抜

を行った結果、選抜系統C×I 2-10のあへん採取量は、3回目まで採取できたものが少なく、総量は0.2gに満たない株が多いが、種子量は全体的に多いこと、あへん中のモルヒネ含量は4.3~11.6%と一貫種より低く、一方、コデイン含量は2.2~12.1%で、一貫種より高い株が多いことが明らかとなった。

## 2. 外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究

### 1) 硬実打破条件の検討

精米機処理、サンドペーパー処理、乳鉢・乳棒処理、ビーズ破砕機処理による硬実打破について最適条件を検討した結果、ナイモウオウギ種子の硬実打破条件としては、種子を均一に破砕したビーナスライト粉末およびステンレスビーズ2個とともにビーズ破砕装置で、インターバルの間に力の偏りがなくなるようになるように中身をよく振り混ぜながら、2,000rpm、150~180秒間の処理を2回行うのが適当であった。

### 2) 実生における自家蛍光確認

赤色および緑色蛍光の観察から、ナイモウオウギ芽生えではいずれも顕著な自家蛍光は認められなかったが、EP処理後の実生は、EP処理ストレスにより、赤色の自家蛍光強度が大きく上昇したことから、可視的選抜マーカーとして緑色蛍光タンパク質を使用する方が適切と考えられた。

### 3) エレクトロポレーション後の種子の育成条件の検討

本葉が伸び始めてから、本葉が展開する直前の状態が植出し時期として最適であった。

### 4) 種子のエレクトロポレーションによる遺伝子導入

ナイモウオウギ種子に対してエレクトロポレーションにより緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した結果、約6%の芽生えで導入遺伝子によると考えられる顕著な緑色蛍光を認めた。また、約1ヶ月

育成した植物体の本葉より抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、活着植物の約 2% で本葉のゲノム DNA への遺伝子導入を確認し、形質転換植物体の作出に成功した。

### 3. 遺伝子マーカーの解明による品種識別技術の確立

#### 1) SQSイントロン領域を用いたウラルカンゾウ優良系統の遺伝子識別

カンゾウ属植物 SQS 増幅用プライマーを用い、カンゾウ属植物 2 種、GuTS71-08 IV2、Gu2-3-2 より調製したゲノム DNA を鋳型に PCR を行った結果、GuSQS1-1S + 282A の組み合わせで約 1.1kbp と約 0.6 kbp の 2 種の増幅産物が得られた。GuSQS1-61S+282A では約 550 bp、GuSQS1-157S + 282A では約 500 bp のほぼ単一の増幅産物が得られた。

GuSQS2 S1 + A1 のプライマーセットでは GuTS71-08 IV2 では約 250 bp の増幅産物が得られたのに対し、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。また、GuSQS1 S1 + A1 のプライマーセットでは増幅産物のサイズが GuTS71-08 IV2 の方が Gu2-3-2 よりも若干大きく、そのサイズの差異で識別が可能であった。

#### 2) CYP88D6イントロン領域を用いたカンゾウ属植物の遺伝子識別

カンゾウ属植物 2 種、GuTS71-08 IV2、Gu2-3-2 より調製したゲノム DNA を鋳型に CYP88D6 のイントロン 6~7 領域を PCR により増幅し、配列解析を行った結果、イントロン 7 領域において、GuTS71-08 IV2 と Gu2-3-2 間で差異を認めた。

より広範なウラルカンゾウ系統およびカンゾウ属植物のイントロン 7 配列の多型について検討するため、PCR-RFLP を行った結果、増幅・切断パターンにより、これらカンゾウ属植物系統を 3 種類に分類可能であった。さらに系統識別に有効な領域を含む約 300bp のイントロン 7 部分配列を比較した結果、ウラルカンゾウは、

PCR-RFLP の結果と同様に 3 グループに大別が可能であった。

#### 3) CYP72A154イントロン領域を用いたカンゾウ属植物の遺伝子識別

ウラルカンゾウの優良系統 3 系統 (Gu2-3-2、GuTS71-08 IV1、GuTS71-08 IV2) 由来のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、増幅配列の塩基配列情報を収集・比較した結果、Gu2 系統 (Gu2-3-2) では、いずれのイントロンでも 1 type の配列のみが得られた。一方で、GuTS71-08 系統 (GuTS71-08 IV1、GuTS71-08 IV2) では、イントロン 2 を除く、イントロン 1、イントロン 3、イントロン 4 において、配列長の異なる 2 type の配列を取得した。PCR により増幅バンド本数の違いから両系統の識別が可能であった。

エキソン領域を含む PCR 増幅産物を 1% アガロースゲル電気泳動した結果、71-08 配列特異的プライマーを用いた PCR では、GuTS71-08 系統でのみ増幅を認め、Gu2-3-2 系統と GuTS71-08 系統を明確に識別可能であった。

#### 4) 甘草市場品生薬のCYP88D6イントロン7部分配列の出現頻度と成分含量の関係

CYP88D6 遺伝子のイントロン 7 部分配列について甘草成分含量の遺伝子マーカーとしての利用の可能性を検討するため、得られた配列の出現頻度と成分含量の関係について、*G. uralensis* に広く認められる共通配列 (a)、GuTS71-08 グループ① (IV1 系統等を含む) に特徴的な配列 1 (b)、GuTS71-08 グループ② (IV2 系統等を含む) に特徴的な配列 (c)、*G. glabra* と相同性の高い配列 (d)、及びそれらの組合せについて、それぞれの試料からクロニングされた全配列に占める出現頻度を計算し、成分含量との相関性を比較した結果、グリチルリチン酸含量は、d と強い負の相関性を示し、グリチルリチン酸含量は、a~c おおのこの配列出現頻度とは高い相関性は認められなかったが、b と c を合わせた出現頻度との間には、強い正の



相関性が認められた。

#### 4. DNA塩基配列情報に基づく薬用植物の品種識別法の開発に関する研究

1) ハトムギ‘北のはと’の品種識別を行う目的で、葉緑体DNAの部分配列3領域、リボソームDNAの部分配列1領域を決定して比較した。‘北のはと’のターゲット領域の部分配列は、*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域の塩基長が536bp、*atpF-atpA*介在配列領域の塩基長が350bp、*trnS-trnT*領域の塩基長は1238bpおよびリボソームDNAのITS4-ITS5の遺伝子間領域の塩基長が574bpであった。他の7系統の塩基配列を決定して比較したところ、何れの領域でも品種を区別できる塩基の変異は認められなかった。

2) ウラルカンゾウ北農試系の来歴を明らかにするため、DNA塩基配列情報に基づく産地の推定と文献等の調査を行った。DNA塩基配列情報に基づく産地の推定では、北農試系は内モンゴルで多く見られる種の遺伝子型と一致した。文献調査では1953年に「長野県（ソ連北東部および中国を原産とするウラルカンゾウ）から北海道農業試験場に導入された記載があり、北海道研究部の種苗は記載された種苗の可能性が高いと思われた。

#### 5. 生薬の品質評価における新しい定量法の開発に関する研究について

##### (1) 新しい定量法の開発

##### 22年度 カンゾウの TLCMS の検討

各種TLC展開条件にて二次元TLC展開を行ったが、X軸にブタノールを用いた展開溶媒では成分が良く分離した。しかしながら展開時間が長時間かかり（1展開に6時間以上、2展開に10時間以上）、複数枚の展開が困難である。

##### 23年度 カンゾウの LCMS による定量法の検討

##### 1) HPLC による検討

HPLC 条件を検討した結果、0.1%TFA/H<sub>2</sub>O と CH<sub>3</sub>CN 混液のグラジエント条件がもっ

とも分離がよかった。またカラム種類も検討した結果、ODS 系のカラムを用いることとした。

##### 2) LCMS による定量

四重極を用いた LCMS においては定量が可能であり、さらに MS/MS 測定を行うことにより、広範囲の成分における MRM ( Multiple Reaction Monitoring : 多重反応モニタリング) 定量を行うことができる。

##### 24年度 シコン中のシコニン類含量の分光測色計による定量法の開発

##### 1) HPLC によるシコン中シコニン類の定量

上記分析条件にてすべてのシコニン類化合物は良好な分離チャートを与えた。シコン抽出試料溶液についても良好な分離であった。

##### 2) シコン試料溶液の分光測色計による表色測定について

分光測色計を用いた検定においては、L\*a\*b\*の表色系によりデータを算出した。

##### (2) メハジキ葉中の成分

メハジキの葉から高温で消失する成分を見出し、抽出液を放置すると当該成分の明確な減少が認められた。当該成分の Labdane 系ジテルペンは揮発ではなく溶液中で容易に化学変化を起こすことが明らかとなった。

#### **【種苗の保存に関する基盤的研究】**

##### 1. 薬用植物種子の発芽試験法に関する研究

##### (1) 発芽試験の規格化に関する研究

##### 1) 発芽試験について

発芽率が高く、発芽適温と考えられた温度はコガネバナ、コエンドロ、キバナオウギ、ダイオウ、ホッカイトウキ、ヤマトウキ、オトギリソウ、ウイキョウ、カミツレ、アサガオは 15～20℃、オケラは 15～25℃、ミシマサイコ、ヒキオコシ、カワラヨモギ、キカラスウリ、モッコウ、キキョウ、ニラ、カワミドリ、メボウキ、

ノリアサ、オランダセンニチ、キバナオランダセンニチは20～25℃、エビスグサ、ハブソウ、チョウセンアザミは20～30℃、キササゲ、ゴマ、ヒロハクララ、ハトムギ、コロシントは25～30℃、ベニバナは25℃であった。

2) ムラサキの種子発芽に及ぼす低温湿潤処理の影響について

ムラサキの発芽は5℃砂潤処理した区で発芽率が高く、120日処理区では発芽温度10℃、15℃区で36.0～37.3%の発根率を示したのに対して、無処理区では0～22.7%であった。また、5℃砂潤処理246日区の10℃、15℃区では68.7～72.0%の発根率を示し、120日処理に比べて高かった。

## (2) 種子の発芽力簡易検定の検討

ベニバナ種子を直接1%TTC溶液に浸漬したが、染色は明確にみられなかった。種子を水に浸漬して柔らかくした後種子を切り、胚を含む部分を取り出してTTC溶液に浸漬すると鮮明に染色した。染色の程度を5段階に分けて規準を設けて調査した。染色程度は30℃で20℃より短時間で濃く染色され、30℃6時間でほとんど濃赤色に染色された。

インドジャボクでは、2011年、2009年、2007年、2006年産種子の1%TTC溶液により濃赤色に染色した胚の割合はそれぞれ35%、25%、13%、14%であったが、実際の発芽率はそれぞれ14%、40%、0%、0%であり、染色率と実際の発芽率に関連性は見られなかった。

## 2. 保存種子の形質変異に関する研究

発芽開始日、発芽揃い日、出穂開始日、出穂期、開花開始日、開花盛期、収穫期は大きな変化はなく、発芽率も3年間をとおして高い値を維持していた。

植物体、果実、種子の形状は、3年間を通じて大きな差異が見られなかった。

草丈、最上位果の高さ、稈径、分枝数、

稔実果実粒数、稔実率、稔実果実の乾燥重量、稔実果実の100粒重は、3年間に渡って大きな違いは見られなかったが、2011年と2012年の1株当たりの稔実果実数と稔実果実の乾燥重は、2010年に比べて少し減少していた。茎数と主稈節数は、播種時期の違いにかかわらず、少し変動が見られた。

## 3. 培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験

センキュウの培養苗では全ての個体で抽苔が観察され、ソロバン根（節間が伸長してソロバン玉状になった根茎）の数が圃場苗よりも有意に多くなった。

セリバオウレンの培養苗ではウイルスフリーとなったことにより、茎葉の枯れ上がりが遅くなり、地下部での腐敗が観察されなかったことから、根茎増殖率および根重が圃場苗を上回った。

ウラルカンゾウについては、培養苗で生育が旺盛になる一方で、根部の肥大が顕著となり、グリチルリチン酸含量が低下した。

ウコンは培養苗に比べ、圃場苗の開花率が高く、地上部と地下部の成長量は大きく、また側根茎表面の色や大きさにやや違いが見られた。

ショウガは草丈、茎数、根の状態、芽の色さらに地上部と地下部の成長量に圃場苗と培養苗の差異が見られた。

### **【種苗の効率的増殖法に関する研究】**

#### 1. 人工環境制御下での種苗の保存と効率的増殖に関する研究

ホソバオケラ、オケラ、コガネバナ、ショウガ、カイケイジオウに関しては、植物組織培養での増殖能が高く、生育良好な優良クローンの育成に成功し、健全な苗の大量増殖が可能となった。得られた優良クローンは、培養植物体として継代・維持を行っており、苗の増産体制を構築した。

ホソバオケラおよびオケラについては、培養苗の閉鎖温室内での養液栽培を行い、養液栽培が可能であることを確認した。

アカヤジオウおよびイトヒメハギは、培養シュートの育成まで完了し、培養苗の大量増殖のための培養条件の検討を継続中である。

シナマオウについては、シュート増殖能が高く、生育良好なクローンの育成に成功した。組織培養での安定的なシナマオウ苗の生産には至らなかったが、培養シュートを挿し穂とした光独立栄養培養が、シナマオウシュートの発根と苗の育成に有効な手法であることを確認した。

## 2. 種苗の効率的増殖法に関する研究

(1) カノコソウの圃場栽培における被覆処理効果を検討した結果、根収量は稲わら処理区で最も高く、黒マルチ区、裸地区で減収した。10a 当たり根の風乾収量は稲わら処理区 30.8kg、黒マルチ区 9.1kg、裸地区 3.5kg で、黒マルチ処理区、裸地区は稲わら処理区に比べて、それぞれ、71%、89%根収量が減少した。カノコソウ栽培において稲わらの被覆処理は有効であった。

(2) チョウジの挿し木を5月、6月、7月、9月、11月、12月に総数618本行い、11本発根した(発根率1.8%)。取り木は親木2本を処理し、発根良好株では処理数47本から14本が発根した(発根率29.8%)。ゴシュユ、カギカズラおよびインドボダイジュの挿し木の発根率は、ゴシュユの3月処理で93.3%、カギカズラおよびインドボダイジュでは9月処理でそれぞれ33.3%、30.0%であった。

## 3. 薬用植物栽培における農薬の適正使用に関する研究

1) ケイリンサイシン栽培における土壌処理型除草剤ロロックス水和剤の実用性を検討した結果、播種直後の秋に1回と萌芽直前の春1回の合計2回の処理法が有望であった。

2) ゲンチアナ栽培における茎葉処理型除草剤ラウンドアップ液剤とロロックス水和剤を検討した結果、ロロックス施用区では発芽が認められず、薬害の可能性が示唆された。ラウンドアップ液剤は、雑草に対して抑草効果が認められたが、ゲンチアナにおいても抑草効果を示し、生存株の生育、特に根の肥大や乾燥重量を低下させることが判明した。

3) ベンレート水和剤を用いたキバナオウギの種子消毒は、その発芽および生育に影響を与えず、一般農作物の栽培で用いられている種苗消毒法がキバナオウギでも適用できることを明らかにした。

4) シソの登録農薬である殺菌剤ダコニールおよびベンレート水和剤を施用し、薬剤が生育に及ぼす影響と収穫後の各薬剤の残留値を評価した。

5) カノコソウ栽培における登録農薬除草剤の適用拡大のため、ロロックス水和剤、トレファノサイド乳剤およびレナパック水和剤3種の土壌処理型除草剤の効果、薬害、残留値などの基礎的な試験を行った。各薬剤に共通して、秋に定植した後施用する秋処理と春に萌芽前施用する春処理を組み合わせた秋春2回処理の抑草効果が高く、特にレナパック秋春2回処理の抑草効果が極めて高かった。

## D. 考察

### 【新品種の育成に関する基盤的研究】

ハトムギ‘北のはと’の生産栽培は、この3年間で栽培面積が10.2haから18.5haに増え、規格品の収穫量は23.5トンから32.7トンに増加した。栽培地が北海道北部の士別地区、北海道南部の八雲町、その中間地域の滝川市と広範囲で栽培することにより、気象災害のリスクを減らし、安定した収量が得られるようになった。また、八雲町では、ハトムギ栽培が大豆栽培との輪作化により地域の農業として定着した。

北海道研究部における‘北のはと’の8年間の連作試験では連作による減収は

認められず、本種が連作に強い薬用植物であることが示された。

気象災害による減収は、平成 23 年度において北海道全域で 5 月から 7 月にかけて降雨が続き低温傾向にあったため、生育温度が高い条件を好むハトムギでは、植物体が十分に生育できず収量に影響したと思われる。平成 24 年度において北海道上川北部地域では 5 月中旬から 6 月下旬の期間は干ばつが続き、北海道研究部の栽培試験区、士別市の生産栽培地は発芽不良、初期生育不良が顕著に認められた。

八雲町で発生したタマナヤガの幼虫によるハトムギの食害は、本来北海道に分布しない農業害虫による被害である。その発生原因は、春先にタマナヤガの成虫が中国大陸からの気流に乗って飛来して産卵し、その卵から発生した幼虫と思われる。タマナヤガは、北海道では越冬できない性質があり、平成 24 年度はこの虫害は発生しなかった。八雲町、豊浦町で認められた葉枯病は局所的に発生し、滝川市、士別市でも軽微な発生が認められている。本州ではハトムギの葉枯病は深刻な問題となるが、北海道では地域全体に蔓延する恐れはないと思われ、播種の際にベンレート水和剤による種子消毒、生育期において殺菌剤ロブラール水和剤を散布することで十分対応できると思われる。

平成 22 年度から 24 年度の間ハトムギ‘北のはと’を原料とした医薬品（局方ヨクイニン）、薬用スキンコンディショナー（医薬部外品）および加工食品が販売された。‘北のはと’は冷涼な北海道で栽培することにより、病虫害の発生が少なく、農薬散布の必要がほとんど必要ないことから、安全で高品質な原料として受け入れられたと思われる。

埼玉県秩父市における‘はとろまん’の試験栽培における栽培上の問題点は、平成 23 年度では雑草の繁茂、平成 24 年度では干ばつ、雑草の繁茂および猪の食

害であった。

カンゾウの栄養系においては GL 含量の形質再現性が極めて高く、第二次選抜した No.10 および No.70 は圃場での栄養繁殖による実生産を可能とする系統であることが示された。また、カンゾウの受粉には媒介が必要であること、No.10 は栽培 1 年目から開花率が高く種子繁殖に適した系統であることが明らかとなった。一方、S<sub>1</sub>については、近交弱勢により生存率が低下したことから、種子繁殖による実生産を可能とするためには更なる自殖世代の更新、高 GL 含量系統間の放任受粉および F<sub>1</sub> 品種の育成等の検討を要すると思われた。

シャクヤク‘べにしずか’は既存品種と比較して着生する蕾と花数が著しく少なく、摘花に要する時間が大幅に削減されることが実証された。秩父市での生存率の低下は定植の遅延、高温多湿が要因と推察された。また、茎葉重とさび病被害指数がシャクヤクの収量性を決定づける主要因であることが判明し、旺盛な生育と高いさび病抵抗性により高収量を獲得している No.513 が次期品種候補として選抜された。

ハトムギ種子島選抜系統は、低温下での発芽率が高く成長が比較的早いこと、1 株当たりの稔実果実数が気候の変化などにあまり影響を受けることなく安定していることに加えて、稔実率が高く穂発芽数が少ないこと、病虫害の影響をあまり受けにくいこと、などの多くの利点を有し、他の系統に比べて環境適応力に優れていることが明らかになった。しかし、あきしづくに比べると、1 株当たりの稔実果実数が少なく収量性がやや低いため、九州地域に特化した新品種作出のための育種素材として重要性が高い系統であると考えられる。

高コデイン含有ケン選抜系統 C×I 2-10 は、コデイン含量は高く、世代間の相関関係は比較的高いことから、選抜効果は認められた。しかし、果実が大きい



ため折れ易く、果皮が薄く、あへん採取量が少ない等、本系統自体の実用性は低く、育種素材としての利用が期待される。

ナイモウオウギ種子への直接遺伝子導入法の適用可能性について検討した。ナイモウオウギ種子は硬実種子のため、未処理では発芽率が低く、硬実打破処理が必要であり、ビーズ破碎装置による処理が最適であった。

赤色および緑色蛍光の観察から、ナイモウオウギ芽生えではいずれも顕著な自家蛍光は認められなかったが、EP 処理後の実生は、EP 処理ストレスにより、赤色の自家蛍光強度が大きく上昇したことから、可視的選抜マーカーとして緑色蛍光タンパク質を使用する方が適切と考えられた。

EP 処理後のジィフィーポットへの植出し時期は本葉が伸び始めてから、本葉が展開する直前の状態が植出し時期として最適であった。

EP 処理により緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した結果、約 6%の芽生えで導入遺伝子によると考えられる顕著な緑色蛍光を認めた。また、活着植物の約 2%で本葉のゲノム DNA への遺伝子導入を確認し、形質転換植物体の作出に成功した。本エレクトロポレーションを用いた種子への遺伝子直接導入法は、単子葉植物のイネ科ハトムギから、双子葉植物のマメ科のナイモウオウギまで、広範な薬用植物種に応用可能な方法であることが示唆された。

ウラルカンゾウの優良系統をモデルとして、グリチルリチン酸生合成における鍵酵素遺伝子 3 種 (SQS, CYP88D6, CYP72A154) のイントロン領域を中心とするゲノム DNA 領域の配列解析を行った結果、いずれの遺伝子でも GuTS71-08、Gu2-3-2 両系統の識別が可能であった。さらに、CYP88D6 遺伝子のイントロン 7 領域については、解析に供したウラルカ

ンゾウ系統を PCR-RFLP により、3 グループに分類可能であることを示した。また、カンゾウ属植物の種間での変異点を明らかとし、生合成酵素遺伝子のイントロン領域を中心としたゲノム DNA 配列の多型がカンゾウ属植物の種間識別にも有用であることを示唆する結果を得た。

甘草市場品生薬の分析では、優良系統 (GuTS71-08 系統) に特徴的に認められた配列の出現頻度とグリチルリチン酸含量との間に良い相関性があることを明らかとした。本配列は、地下部を収穫してグリチルリチン酸含有量を確認することなく、地上部からゲノム DNA を抽出し配列を比較することで高グリチルリチン酸含量カンゾウ系統の選抜を可能とする遺伝子マーカーとしての応用が期待される。

ハトムギ「北のはと」の品種識別を行うためには、遺伝子や遺伝子間の配列を利用した識別法ではなく、DNA 上に多く存在するリピート配列領域 (マイクロサテライト領域) を利用した識別法を検討する必要があると判断した。

ウラルカンゾウ「北農試系」について DNA 塩基配列情報に基づく産地の推定と文献調査は矛盾がなく、ウラルカンゾウ北農試系の産地は、中国からロシアを含む内モンゴル地域で採集され、少なくとも 1953 年以前に導入された種苗であると推定した。

新しい定量法の開発について、22 年度は 2DTLCMS の各種条件を検討し、フラボノイド配糖体およびカンゾウの最重要成分であるグリチルリチンのスポットは、今回の条件で定性が可能であることが判明した。23 年度はカンゾウの 9 種類の成分の一斉定量を HPLC および LCMS において検討した。HPLC による定量においては、Liquiritin と Glycyrrhizin の同時定量は可能と考えられたが、他成分については含量が低く、高感度の LCMS を用いる必

要性があり、LCMS による定量を検討した。24 年度はシコン中のシコニン色素の分析方法を検討し、HPLC 定量値と分光測色計による結果の間に非常に良い相関が得られたことから、今後分光測色計によるシコニン類含量の測定が可能になると考えられる。

メハジキの葉から高温で消失する成分を見出し、抽出液を放置すると当該成分の明確な減少が認められた。当該成分の Labdane 系ジテルペンは揮発ではなく溶液中で容易に化学変化を起こすことが明らかとなった。今後成分と薬効との関わりを解明することにより、メハジキ類の新品種育成の品質に関わる重要な基礎データとなると予想された。

#### 【種苗の保存に関する基盤的研究】

薬用植物種子の発芽条件の規格化を図るため、コガネバナ、コエンドロ、キササゲ、キバナオウギ、ダイオウ、ウイキョウ、カミツレなど 33 種 2 系統の植物の発根、出葉に及ぼす温度条件の影響を調査し、それぞれの植物について発芽試験法の規格化を行った。ムラサキの発芽は低温湿潤処理をすると発芽率が高くなり、処理期間が長くなるほど発芽率が高くなることが明らかになった。

ベニバナおよびインドジャボク種子を用いて、テトラゾリウム塩による発芽力検定法を試みたところ、ベニバナでは種子の胚を含む部分を取り出して染色すると、30℃では 20℃より短時間で濃く染色され、30℃、6 時間でほとんど濃赤色に染色された。今後は長期保存種子を用いて、発芽試験による方法との相関を調査する必要がある。

インドジャボクでは、1%TTC 溶液により濃赤色に染色した胚の割合と実際の発芽率は異なり、染色率と発芽率に関連性は見られなかった。

2009年に貯蔵を開始したハトムギ種子島在来種の種子は、貯蔵3年目をむかえても生育特性、外部形態特性、果実の収量性に大きな変化がなく、生産栽培可能な特性を十分に維持していると考えられる。

2011年と2012年の4月に播種したハトムギにおける稔実果実数と稔実果実乾燥重の低下は種子の劣化ではなく、果実の成長時期の天候不良の影響を受けたものであり、また、茎数と主幹節数についても分けつ時期における気候の影響を受けたものと考えられる。

培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験において、センキュウ、セリバオウレンおよびウラルカンゾウの培養苗では健全で旺盛な生育となり、枯れ上がりが遅く生育期間が延長され、その結果、増殖効率が高くなることが判明した。一方で、センキュウではソロバン根の増加、ウラルカンゾウではグリチルリチン酸含量低下等の品質面での低下が認められた。これらのことから、培養苗は生薬生産用の苗ではなく、圃場における種苗生産用の苗としての適性が高いと考えられた。

ウコンの開花率および成長量における圃場苗と培養苗の差異は、植え付け時の種イモの大きさに起因するものと思われた。ショウガの形態的、成長量における両者間の差異は、種苗の育成過程の違いによるものではなく、供試した根茎の品種間の差異と推察された。ウコンおよびショウガの培養苗由来の根茎は高い増殖率を示し、再生植物体は外部形態的には問題は見られず、生薬生産用および種苗生産用双方の種苗としての適性が高いと判断した。

#### 【種苗の効率的増殖法に関する研究】

組織培養による効率的増殖法について、ホソバオケラ、オケラ、コガネバナ、ショウガ、カイケイジオウでは、本研究で

得られた培養苗の圃場および水耕での栽培と、それらの方法により生産された生薬の評価が今後の課題である。

本研究において、ショウガは4品種の根茎、シナマオウは3系統の種子を材料とした。ショウガでの増殖・植物体再生のための培養条件は品種間による差が少なかったが、シナマオウ種子は、発芽のための光条件が系統により異なっていた。ショウガの品種は栄養繁殖で栽培の歴史が長く、シナマオウの親植物は野生植物由来である。野生植物由来の植物材料、特に種子は、系統間あるいは種子間で組織培養のための条件が大きく異なっている可能性が示された。

カノコソウの圃場栽培における被覆処理による効率的増殖法を検討した結果、10a当たり根の風乾収量は黒マルチ処理区、裸地区は稲わら処理区に比べて、それぞれ71%、89%根収量が減少した。カノコソウ栽培において稲わらの被覆処理は有効であった。

チョウジの挿し木による発根率は極めて低く、増殖は困難であったが、取り木では29.8%の発根率があり、有用な繁殖法であった。ゴシュユの挿し木3月処理は高い発根率を示した。カギカズラの挿し木は太い枝の先端部が、インドボダイジュも先端部の発根率が高かった。

カノコソウの除草剤試験、シソの殺菌剤施用試験およびキバナオウギの種子消毒試験では、一般作物で広く利用されている農薬を選び各薬剤の標準的な施用方法に従い処理して評価した。これらの試験では薬害は認められず、カノコソウおよびシソにおいては薬剤の残留値は基準値よりも十分に低い値を示した。本研究により一般作物の登録農薬を薬用植物に適用拡大することが可能であることが明らかになった。

ケイリンサイシン、ゲンチアナの栽培で除草剤を使用すると、発芽不良やその

後の生育に影響を与えた。これは、ケイリンサイシンおよびゲンチアナの播種において、覆土は浅くもしくはしないことが慣行され、このため薬液が栽培対象となる種子に直接触れたため薬害が発生したと思われ、今後の研究では農薬の施用を前提とした栽培方法の開発が併せて必要である。

## E. 結論

### 【新品種の育成に関する基盤的研究】

ハトムギ‘北のはと’の生産栽培は、この3年間で栽培面積が10.2 haから18.5 haに増え、規格品の収穫量は23.5トンから32.7トンに増加した。栽培地が北海道北部の士別地区、北海道南部の八雲町、その中間地域の滝川市と広範囲で栽培することにより、気象災害のリスクを減らし、安定した収量が得られるようになった。平成22年度から24年度の間ハトムギ‘北のはと’を原料とした医薬品(局方ヨクイニン)、薬用スキンコンディショナー(医薬部外品)および加工食品が販売された。

埼玉県秩父市におけるハトムギ‘はとろまん’の試験栽培を行った結果、期待した収量が得られなかった。栽培圃場が休耕田として長期間未利用であったため、雑草の密度が高く、今後抜本的な除草対策が必要であった。

カンゾウの栄養系においてはGL含量の形質再現性が極めて高く、第二次選抜したNo.10およびNo.70は圃場での栄養繁殖による実生産を可能とする系統であることが示された。また、カンゾウの受粉には媒介が必要であること、No.10は栽培1年目から開花率が高く種子繁殖に適した系統であることが明らかとなった。

シャクヤク‘べにしずか’は既存品種と比較して着生する蕾と花数が著しく少なく、摘花に要する時間が大幅に削減されることが実証された。秩父市での生存率の低下は定植の遅延、高温多湿が要因と推察された。また、茎葉重とさび病被

害指数がシャクヤクの収量性を決定づける主要因であることが判明し、旺盛な生育と高いさび病抵抗性により高収量を獲得している No.513 が次期品種候補として選抜された。

ハトムギ種子島選抜系統は、他の系統に比べて環境適応力に優れているが、あきしづくに比べると1株当たりの稔実果実数が少なく収量性がやや低いため、九州地域に特化した新品種作出のための育種素材として重要性が高い系統であることを明らかにした。

ケシでは、コデイン含量が高い選抜系統 C×I 2-10 群は、育種素材として有用であることを明らかにした。

従来法による形質転換が困難であるマメ科のナイモウオウギを材料に種子への直接遺伝子導入法の適用可能性について、サンドペーパーもしくはビーズ破碎装置を用いて硬実打破を行い一晩吸水した種子へ緑色蛍光タンパク質遺伝子をエレクトロポレーションした結果、約6%の実生でベクターコントロール導入株と比較して顕著な緑色蛍光を観察し、約1ヶ月間育苗した活着植物体のうち約2%で葉のゲノムDNAへの緑色蛍光遺伝子の挿入を確認し、形質転換植物体の作出に成功した。

ウラルカンゾウの優良系統をモデルとして、グリチルリチン酸生合成経路の鍵酵素のゲノム DNA 配列に着目し、それらの多型情報をもとに系統間の識別を試みた。その結果、スクアレン合成酵素 (SQS) 遺伝子、 $\beta$ -アミリン 11 位酸化酵素 (CYP88D6) 遺伝子、11-オキソ- $\beta$ -アミリン 30 位酸化酵素 (CYP72A154) 遺伝子の各ゲノム DNA の塩基配列情報を用いることにより、PCR 法ならびに PCR-RFLP 法により優良系統間の識別及び優良系統と他系統との識別が可能であった。また、本手法はカンゾウ属植物の種間識別にも有用であった。

CYP88D6 遺伝子については、識別に有効であったイントロン7領域の部分配列について、甘草市場品生薬試料の塩基配列情報を収集した結果、市場品生薬試料の多くに優良系統に特徴的な配列と相同な配列が含まれることを明らかとした。また、クローニングした甘草市場品生薬試料の塩基配列のうち優良系統に特徴的な配列と相同な配列の出現頻度とグリチルリチン酸含量との間には高い相関性があることを見いだした。以上の結果は、本配列が高グリチルリチン酸含量を示す優良系統の選抜を可能とする遺伝子マーカーとしての利用できることを示唆するものである。

ハトムギ‘北のはと’の品種識別を行う目的で、葉緑体DNAの部分配列3領域、リボソームDNAの部分配列1領域についてハトムギ7系統の塩基配列を決定して比較したところ、何れの領域でも品種を区別できる塩基の変異は認められなかった。

ウラルカンゾウ「北農試系」について DNA 塩基配列情報に基づく産地の推定と文献調査は矛盾がなく、ウラルカンゾウ北農試系の産地は、中国からロシアを含む内モンゴル地域で採集され、少なくとも 1953 年以前に導入された種苗であると推定した。

新しい定量法の開発について、カンゾウの TLCMS による分析法においては 2 次元 TLC の展開溶媒で  
第1回目：CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (65:30:5)  
第2回目：EtOAc-MeOH-AcOH (3:1:2)  
の条件で展開した場合、数種類のフラボノイド配糖体とグリチルリチンの成分スポットが分離良く展開され、TLCMS の検討が可能であった。

カンゾウ9成分の一斉定量法に関しては、LCMS を用いて行うことが十分可能と考えられた。

シコン中のシコニン類の分光測色計に