

201307030A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

人工水耕栽培システムにより生産した甘草等
漢方薬原料生薬の実用化に向けた実証的研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

(H24-創薬総合-一般-007)

研究代表者 吉松 嘉代

平成26(2014)年3月

目次

I. 総括研究報告

- 人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1
吉松嘉代

II. 分担研究報告

1. 人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究—新規ウラルカンゾウ優良株の栽培と新規植物生長促進剤の開発
及びセリバオウレン培養苗の増殖に関する研究—・・・・・・・・・・・・・・32
吉松嘉代、川原信夫、河野徳昭、乾 貴幸、寺岡秀興、北澤 尚、
菱田敦之、林 茂樹、杉村康司、武田修己、田村幸吉、新穂大介、
桑原侑己、工藤 善
2. 人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究—人工水耕栽培システムにより生産したウラルカンゾウ優良苗の
圃場栽培試験—・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43
吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸
3. 人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究—ウラルカンゾウの筒栽培及び水耕栽培に関する研究—・・・・・・48
吉松嘉代、田村幸吉、新穂大介
4. 人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究—養液栽培で育成したウラルカンゾウ優良株の地上茎挿し木苗を
用いた露地栽培の実証試験について—・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・56
吉松嘉代、福田達男、石川 寛
5. 人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究—「甘草」等の種苗生産システム構築・・・・・・・・・・・・・・61
吉松嘉代、根岸直希、小川健一
6. 人工水耕栽培システムによる生薬の生産と化学的・遺伝的安定性に関する研究
—遺伝子情報を活用した薬用植物の有用物質生産性向上に関する研究—・・64
河野徳昭、吉松嘉代、乾 貴幸、寺岡秀興、田村幸吉、新穂大介
7. ハイテク生薬生産システム構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・82
工藤 善、後藤英司、彦坂晶子、川原信夫、吉松嘉代、河野徳昭、
乾 貴幸、武田修己
8. 人工水耕栽培システムにより生産した生薬の化学的評価に関する研究・・・・・・92
川原信夫、高橋 豊、渕野裕之

9. 人工水耕栽培システムにより生産した生薬の化学的評価に関する研究—人工水耕栽培システムにより生産した生薬の日本薬局方試験に関する研究—・・・113
川原信夫、武田修己、吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、北澤 尚、菱田敦之、林 茂樹、杉村康司、工藤 善
10. 人工水耕栽培システムにより生産した生薬・食品添加物の性能、均質性及び安全性試験に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・148
穂山 浩、大月典子、杉本直樹、伊藤裕才、建部千絵、佐藤恭子、能勢充彦、川原信夫、淵野裕之、吉松嘉代
11. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究・・・・・・・・・・162
小松かつ子、伏見裕利、数馬恒平、朱 姝、葛 躍偉、平 修、川原信夫、菱田敦之、田村隆幸、村上守一、児玉 容、磯田 進、足立理絵子、川本元裕
12. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—切花及び生薬の安定生産を目指したシャクヤク園芸品種の採花方法の検討—・・・171
小松かつ子、田村隆幸
13. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—遺伝的・成分的評価に基づくシャクヤク園芸品種の薬用資源としての可能性：加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化——・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・176
小松かつ子、朱 姝、村上守一、田村隆幸
14. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—イメージングMSを用いたシャクヤクの主要成分の局在解析—・・・・・・・・182
小松かつ子、平 修
15. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—シャクヤクの地下部に含有される無機成分に関する研究—・・・・・・・・188
小松かつ子、伏見裕利
16. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—長野県菅平薬草栽培試験地におけるダイオウの栽培試験—・・・・・・・・193
小松かつ子、児玉 容
17. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—北海道におけるダイオウ自生種導入系統の栽培適性評価に関する研究—・・・・・・・・200
小松かつ子、菱田敦之、川原信夫
18. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—長野県菅平で栽培されたダイオウ5年生株の局方試験と成分分析—・・・・・・・・207
小松かつ子、足立理絵子、葛 躍偉

19. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究 —LC/MS によるダイオウの網羅的成分分析—	223
小松かつ子、数馬恒平	
20. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究 —エゾウコギの養液栽培と葉の成分探索—	238
小松かつ子、村上守一、田村隆幸、川本元裕、葛 躍偉、磯田 進	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	247

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成25年度総括研究報告書

人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究

(H24-創薬総合-一般-007)

研究代表者

吉松嘉代 （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
育種生理研究室長

要旨 1)「甘草」等の種苗生産システムの構築 ウラルカンゾウ優良株 3 種を、昨年度に確立した水耕栽培植物の地上茎を挿し穂とする大量増殖法で増殖し、得られた苗を種々条件で栽培した。その結果、パミス水耕栽培だけでなく、北海道野外圃場で 434 日間栽培した植物の根もグリチルリチン酸 (GL) 含量が 2.5%以上であり、日本薬局方 (日局) 規格値を満たすことを確認した。また、茨城県稲敷郡での野外圃場栽培では定植 132 日後に GL 含量 1.5-2.3%、広島県福山市の野外圃場筒栽培では定植 163 日後に GL 含量 1.5%の乾燥根が得られた。しかし、定植直後の乾燥による枯死、虫害による生育障害及び枯死が頻発し、その対策が必要であることが判明した。現在、神奈川県相模原市 (北里大学) も含め、種々栽培環境での試験を継続中である。

未利用部位である地上部の利用法の開発のため、ウラルカンゾウ挿し穂の水滲出液が他の植物の種子の発芽と生育に及ぼす影響を調べた結果、生長促進効果があることを発見し特許を申請した。

人工水耕栽培システムによる生薬の生産を、他の重要生薬「黄連」に展開するため、植物組織培養によるセリバオウレン優良苗の増殖を行い、鹿島建設水耕栽培装置でのハイテク生薬生産システム構築のための実験材料に供した。その結果、1 年間のパミス水耕で日局規格値を満たす「黄連」の生産が可能なセリバオウレン培養苗は、水耕システムが異なる鹿島技術研究所での 588 日間の水耕栽培においても日局規格値を満たす「黄連」の生産が可能であることを確認した。

ウラルカンゾウ優良株 4 種及びシナマオウ 1 種について、光独立栄養培養による効率的な挿し木増殖法を検討し、炭酸ガス 1,000ppm、光強度 10,000 lux において、全てのウラルカンゾウで発根率 78%以上、シナマオウで発根率 50%を達成し、さらに酸化型グルタチオン 50 mg/L の培地への添加により、シナマオウの発根率 68%を達成した。

効率的な GL 生産に寄与する基盤情報整備のため、GL 生合成酵素遺伝子の配列多型を利用した優良系統等の遺伝子識別法の開発、及び、ウラルカンゾウ挿し木苗の根を材料とした GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析を行った。遺伝子識別については、これまでにカンゾウ属植物間及びウラルカンゾウ優良系統株間の識別法を開発していたが、本年度は、CYP88D6 相同遺伝子のイントロン 7 の塩基配列情報を用いた、より高精度なカンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発に成功した。また、ウラルカンゾウ優良株挿し木苗における GL 生合成遺伝子群の発現解析では、根の径が太い根基部の方が、径の細い根端部と比較して各遺伝子の発現量が高い傾向があることが明らかになった。

2) ハイテク生薬生産システム構築 ウラルカンゾウ：従来よりも UV の波長域が狭い UV 光源を用い、暗期に UV-B を照射することで、明期より少ない UV 量で明期照射と同様の効果が得られるのかを調査した。ウラルカンゾウ苗を人工環境下で栽培し、UV-B (1.32、0.66、0.33 W m⁻²) を照射した。その結果、地上部への障害は見られず、UV-B 照射区の根の GL、リクイリチン (LQ)、リクイリチゲニン (LG) およびイソリクイリチゲニン (ISLG) 濃度は、無照射区よりも大となる傾向がみられた。特に UV-B 0.33 W m⁻² 区の根の ISLG 濃度は無照射区よりも有意に高くなった。本試験では暗期中の UV-B 照射でも同様に薬用成分濃度が増加することが示された。この結果より、暗期の UV-B 照射では強度が低い場合も LG および ISLG の濃度を増加させることが示された。また、水耕液循環量試験では、循環水量 16 L min⁻¹ で生育量及び GL 含量が最大となった。

セリバオウレン：水耕栽培液の最適な肥料濃度を検討した。肥料濃度 1/8 で生育が最大となったが、さらに低い水耕液濃度で最大となる可能性がある。ベルベリン含量は、肥料濃度にかかわらず日局規格値よりも高い値となった。また、光合成蒸散測定試験を行い、セリバオウレンの光合成速度が最大となる気温、相対湿度、光強度及び CO₂ 濃度を明らかにした。

3) 生薬「甘草」等の評価（安全性・有効性） 人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」の有効成分、有効性、安全性における同等性を市場流通「甘草」との比較の中で評価する研究の一環として、人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」と国内市場流通「甘草」、および「その他の甘草類」を、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) により分析し、そのデータを多変量解析することで、含有成分の観点から、これら一連の甘草の同等性や差異を評価した。甘草類のメタノール抽出液の LC-MS/MS により得られた全イオン電流 (Total Ion Current; TIC) クロマトグラムにおいて、全甘草類において大きな差異は見られなかった。一方、観測された全成分 (約 300) を対象にした負イオン検出データの多変量解析においては、水耕栽培品と国内市場流通品を含む *G. uralensis* の群と、その他 (*G. glabra* および *G. inflata*) の群に、明確にグループ分けされた。多変量解析によって両グループを特徴付ける成分を探索したところ、両グループを区別する指標となる“マーカー成分”に成り得る成分が幾つか見出された。

人工水耕栽培システムにより生産された黄連及び甘草について日局試験及び個別元素分析を実施した。黄連は水耕液 (大塚 A 処方) の濃度を変えた 4 試験区 15 個体について、日局試験及び個別元素を測定した。甘草は水耕栽培月数、循環量が異なる 2 クローン 23 検体について、GL を定量した。また、水耕栽培甘草の特徴を明らかにするために、同様の苗で支持体を用いた養液栽培 (パミス水耕及びハイドロボール水耕) 甘草及び圃場栽培 (北海道、つくば、種子島) 甘草について性状の確認及びグリチルリチン酸の定量を行い、規格に適合した試料について日局理化学試験及び個別元素分析を実施した。黄連、甘草とも性状は市場品と比較し、道管径が小さい等いくつか異なる傾向を認めたが、各々日局オウレン及びカンゾウに適合すると判断された。水耕栽培黄連は全個体でベルベリン含量及び理化学試験が日局規格値を満たした。一方、今回調査した水耕栽培甘草は GL 含量が低く、日局規格値 (2.5%以上) を満たした検体は 1 個体のみであった。支持体養液栽培 (パミス水耕及びハイドロボール水耕) 甘草は全個体、圃場栽培甘草は北海道栽培品で GL 含量が日局規格値を満たした。水耕栽培黄連および支持体養液栽培甘草は灰分が高い傾向を認め、使用した水耕液中の無機塩類の影響が考えられた。灰分以外の理化学試験は日局規格に適合した。水耕栽培においては、使用する養液の組成が、生薬の品質に影響を及ぼす可能性が示唆された。

カンゾウエキは、様々な病態マウスモデルを用いた抗アレルギー作用が既に報告されている。異なる機序により発症する二つのアレルギーマウスモデルを構築し、検討した。T細胞依存的な炎症が誘導される接触性皮膚炎モデルを用いた評価系では、有効成分であるグリチルリチン酸含有量を同一にしたカンゾウエキの経口投与により、市場流通品3品、水耕栽培品3品ともに抗アレルギー活性が示された。両活性に関しては有意な差はなかったことから市場流通品と水耕栽培品のカンゾウエキは同等の効果があると示唆された。IgE依存的な三相の炎症反応を誘導するマウスのアレルギーモデルを用いた評価系では、惹起後72時間での炎症抑制が示された。

3) 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

シクヤク：「1株に8本の茎を残す採花」は、園芸と薬用の双方で安定した生産を実現するための採花方法となる可能性が示唆された。イメージングMSによる4成分の組織内分布、根の加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化などを検討し、根の周皮にはAlbiflorinが局在し、またCatechinも多い傾向にあり、「皮去り」により2成分の含量が減少することが示された。また、根の低温貯蔵はPaeoniflorin含量を増加させる傾向が見られた。

ダイオウ：*Rheum palmatum*由来でRPII型Rp5タイプの系統29及びRPI型Rp4タイプの系統38は長野県菅平及び北海道北部の環境に適した系統であることが示された。栽培5年生の根（根茎）17検体について日本薬局方（日局）試験を行った結果、11検体は日局ダイオウとして使用可能であった。日局適の検体はRPII型Rp5タイプの系統17、18で多く、系統29では1検体のみであった。ただし、この検体では新たにProcyanidin類など6化合物が同定され、系統29は多様な成分を含有していることが明らかになった。

エゾウコギ：後熟処理及び休眠打破処理を行った種子を閉鎖環境下で養液栽培し、発根・発芽から育苗、屋内馴化までを行い、種子611粒中100個体の育苗に成功した（16.4%）。さらに、86個体を屋外に馴化させ、次年度の圃場への定植を可能にした。屋内馴化時に収穫した葉にカフェオイルキナ酸類の1,5-Dicaffeoylquinic acid及び1,5-Dicaffeoyl-3-methoxyoxaloylquinic acidなどが検出され、さらに屋外馴化により1-Caffeoylquinic acid及びHyperosideが増加することが明らかになった。

研究分担者		渕野裕之	同	筑波研究部
川原信夫	（独）医薬基盤研究所			栽培研究室長
	薬用植物資源研究センター	北澤 尚	同	筑波研究部
	センター長			主任技術専門員
河野徳昭	同 筑波研究部 主任研究員	菱田敦之	同	北海道研究部
工藤 善	鹿島建設株式会社			研究サブリーダー
	上席研究員	林 茂樹	同	北海道研究部 研究員
穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所	杉村康司	同	種子島研究部
	食品添加物部 部長			研究サブリーダー
小松かつ子	富山大学和漢医薬学総合	田村幸吉		丸善製薬株式会社研究開発本部
	研究所 教授			甘草研究所 所長
研究協力者		新穂大介	同	甘草研究課 主任
乾 貴幸	（独）医薬基盤研究所	桑原侑己	同	甘草研究課 研究員
	薬用植物資源研究センター	福田達男		北里大学薬学部附属薬用植物園
	筑波研究部 特任研究員			准教授
寺岡秀興	同 筑波研究部 特任研究員	石川 寛	同	助教

根岸直希 日本製紙株式会社
アグリ・バイオ研究所 主査

小川健一 岡山県農林水産総合センター
生物科学研究所植物レドックス
制御研究グループ グループ長

後藤英司 千葉大学大学院園芸学研究科
教授

彦坂晶子 同 准教授

高橋 豊 エムエス・ソリューションズ株式
会社 代表取締役

武田修己 東京生薬協会

大月典子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 協力研究員

杉本直樹 同 第二室長

伊藤裕才 同 主任研究官

建部千絵 同 主任研究官

佐藤恭子 同 第一室長

能勢充彦 名城大学薬学部 教授

伏見裕利 富山大学和漢医薬学総合研究所
准教授

数馬恒平 同 助教

朱 姝 同 助教

葛 躍偉 同 研究員

平 修 福井県立大学生物資源学部
准教授

田村隆幸 富山県薬用植物指導センター
主任研究員

村上守一 同 元所長

児玉 容 長野県健康福祉部薬事管理課
主査薬剤師

磯田 進 昭和大学薬用植物園 講師

足立理絵子 (株)ウチダ和漢薬製造部
品質管理課

川本元裕 北陸機材株式会社 専務

A. 研究目的

超高齢社会の日本において漢方薬市場は急成長している。生薬「甘草」は漢方処方70%以上に配合され、漢方薬原料として最重要であり、食品添加物としても重要である。しかしその供給はほぼ100%海外に依存し、主生産国の中国の物価・人件費上昇、需要増加、採取・輸出規制、生物多様性条約の「遺伝子資源へのアクセスと利益配分」のルールづく

り等により、レアアースと同様に今後その確保が困難になると予想されている。他の多くの生薬も同様に安定供給が危惧されている。

我々はこれまでに、最も重要な漢方薬原料生薬である甘草について、人工水耕栽培環境下で、短期間で安定的に生産するシステムを世界で初めて開発した。

本研究では、人工水耕栽培により生産した甘草等の生薬の確実な実用化を推進するため、より経済性・汎用性の高い栽培システムの構築、生薬の有効性・安全性の評価を行い、実証データを蓄積する。また、生薬の国内生産基盤構築と推進モデルの実証のため、地域企業との連携によるブランド生薬（シャクヤク、ダイオウ、エゾウコギ）の開発を富山県において実施する。

本研究で高品質の生薬を安定供給することが可能となれば、有効性・安全性・品質の高い漢方製剤の安定的な供給が図られ、臨床現場での質の高い医療の提供を可能とし、国民医療に貢献できると考えられる。

B. 研究方法

1) ウラルカンゾウ優良株の水耕栽培

ストロン挿しあるいは地上茎挿し木により増殖させたウラルカンゾウ優良株は、閉鎖温室内（温度25℃、相対湿度50-60%、補光照明4灯の使用により16時間照明）あるいはグロースチャンパー（GC）室内（25℃、16時間明期、相対湿度60%）で、ハイドロボール又はパミス®（大江化学工業）を支持体とする水耕栽培を行った（ハイドロボール水耕、パミス水耕）。

2) ウラルカンゾウ優良株挿し木苗の育成

水耕栽培した植物の地上茎を採取し、葉を切り落として2節を含む茎切片を調製し、1時間の流水処理を行った。アラシシステム（ビーエム機器株式会社）にバーミキュライト（福島バーミ社製、覆土・目土用）を積層、純水で良く湿潤させた後、処理後の挿し穂を挿し、GC室（25℃、16時間明期、相対湿度60%）で栽培した。挿し木2〜3週間後より、マグアンプK中粒（ハイポネックスジャパン、5g/

トレー：水量約5L)を与え、発根後の苗はマグァンプK中粒に加え、ハイポネックス原液6-10-5(1000倍液、1回/週)を与えながら、閉鎖温室(温度25℃、相対湿度60%、補光照明4灯の使用により16時間照明)で育成した。

3) ウラルカンゾウ優良株の栽培と評価

得られた挿し木苗は、GC室内でのパミス®を支持体とする水耕栽培(パミス水耕)、北海道研究部野外圃場栽培(北海道野外)、筑波研究部野外圃場筒栽培(筑波野外筒)、種子島研究部ビニールハウス内筒栽培(種子島ハウス筒)を行った。10月上旬に根を収穫し、洗浄後、新鮮重量、根長、最大根幅を測定後、50℃以下で数日間温風乾燥し乾燥重量を測定した。得られた甘草根の各種測定は、東京生薬協会(日本薬局方試験、ICP-MSによる元素分析)で行った。

また、茨城県稲敷郡の農家での圃場栽培を行い、11月上旬に一部を収穫し、同様に各形質の調査及びグリチルリチン酸(GL)含量の測定を行った(東京生薬協会で実施)。

さらに、丸善製薬株式会社総合研究所内野外圃場での筒栽培、野外温室(夜間温度設定15℃)でのパミス水耕栽培、及び、恒温室内(25℃、明期16時間)でのパミス水耕及び水耕栽培を行った。10月上旬に野外圃場筒栽培植物の一部を収穫し、前述と同様に各形質を調査後、乾燥根に含まれる二次代謝物を分析した(丸善製薬で実施)。

地上茎挿し木苗の露地栽培への移行条件の検討のため、ウラルカンゾウ優良株6種を北里大学薬学部附属薬用植物園圃場(神奈川県相模原市)に定植し、生育状況を観察した。

4) ウラルカンゾウ地上茎水浸出液の調製

水耕栽培した植物の地上茎を採取し、葉を切り落として2節を含む茎切片を調製して2Lポリビーカーに入れた純水中に約1時間浸し、水浸出液(茎切片7-10 g/L:Gu水)を調製した。

5) 発芽試験

アクアプランターフロートミニ(アクア

カルチャー社製)の養液槽に純水(一部蒸留水)またはGu水を入れて植物種子(サラダ水菜、スイートバジル、ミニトマト、トウモロコシ、シロウリ、ニラ、ベビーリーフ)を播種し、GC室(20℃、14時間明期、相対湿度60%、又は25℃、16時間明期、相対湿度60%)で栽培した。約2-3週間後、養液槽の液を微粉ハイポネックス6.5-5-19(1 g/L、ハイポネックスジャパン)に交換し栽培を継続した。また、ツリーポット(株式会社 山利製作所製)にバーミキュライト(福島バーミ社製、覆土・目土用)を積層し、長野県産オタネニンジン芽きり種子を播種し、純水又はGu水を供給しながら15℃の培養庫又は4℃の保冷库で栽培した。

6) セリバオウレン培養苗の育成

植物ホルモン無添加(HF)、3%ショ糖、10 mg/Lグルタミン含有、Woody Plant(WPG)培地(WPGHF培地)での継代培養(20℃、14時間明期、弱光)により、セリバオウレン培養苗の増殖と育成を行った。

7) 光独立栄養培養

4クローンのウラルカンゾウ及び、シナマオウの組織培養物(培養シュート)は独立行政法人 医薬基盤研究所で育成した。それらより挿し穂を採取し、発根培養を行った。培養条件は25℃、16時間明期、IBA 2 mg/L添加、1/5B5液体培地(無糖)をオアシスに湿潤したものを培地として使用し、炭酸ガス濃度を1,000ppmに制御し、光強度350 luxもしくは、10,000 lux条件下における発根率の違いを調査した。また、シナマオウでは、酸化型グルタチオン(興人) 50 mg/Lを培地に添加し、同様に発根率の違いを調査した。発根率の調査は、ウラルカンゾウは3週間後、シナマオウは2ヶ月後に行った。

8) カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発

植物材料は、*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (Gu)、*G. glabra* L. (Gg)、*G. inflata* Batalin (Gi)を含むカンゾウ属植物の乾燥根、もしくは、乾燥ストロン、22試料について

て、それぞれ、独立した 3-4切片（この切片が独立した個体由来か、同一個体由来かは不明）より、75% エタノールで洗浄したメス、解剖鉋、ピンセット等を使って、それぞれ 200-400 mg をサンプリングした。このうち、試料①に関しては、同一試料を分割し、一部は遺伝子解析に、残りの一部は、成分分析に用いた。

各試料より 20-50 mg を 2.0 mL 容滅菌凍結保存チューブ（ワトソン）に取り、ステンレスビーズ（φ4.8 mm、トミー精工）2個とともに、液体窒素で凍結後、ビーズ破碎装置 Micro Smash MS-100（トミー精工）を用いて、3,000 rpm、60秒間の条件で1回破碎し、DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いて、付属のマニュアルに従って、ゲノムDNAを抽出した。次いで、得られたゲノムDNAを鋳型とし、GoTaq Green Master Mix（Promega）を用いて、PCRを行い、増幅産物は1%アガロースゲル電気泳動により確認した。

PCR 産物 4.0 μ L に対して、illustra ExoStar（GE healthcare）の Exonuclease I 及び Alkaline phosphatase を、それぞれ、0.5 μ L ずつ加え、37°C で 30 分間、80°C で 15 分間反応し、未反応のプライマー等を除去した。ExoStar 反応液のうち 2 μ L を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（ABI）を用いてマニュアルに従い、CYP88D6 intron7 Fw、あるいは、Rv プライマーにより cycle sequence 反応を行った後、Fast gene Dye Terminator 除去キット（日本ジェネティクス）で精製し、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer（ABI）を用いて塩基配列を解析した。

甘草試料（試料①、22 サンプル）をビーズ破碎装置、あるいは、乳鉢・乳棒を用いて粉末にまで破碎し、そのうち約 50 mg を精密に秤量後、50% エタノール 7 mL を正確に加え、超音波洗浄機で 30 分間、ボルテックスミキサーで 1 分間抽出した。抽出液を 4,500 rpm で 3 分間、遠心分離した後、上清 300 μ L を ultrafree-MC（Millipore）に取り、15,000 rpm、20°C で 1 分間遠心濾過した。その上清 5 -20 μ L を HPLC 分析に供し、グリ

チルリチン酸（GL）、リクイリチン（LQ）、イソリクイリチン（IL）、グリシクマリニン（GC）、グラブリジン（GB）の定量を行った。

9) ウラルカンゾウESTライブラリーの解析
ウラルカンゾウ優良株GuTS71-08#11（枝番：1-1、培地略号：MES(1)IB0.1、培養期間：シュート植え継ぎ後約2ヶ月、以下Gu#11）及び、Gu2-3-2（培地略号：WPG、培養期間：シュート植え継ぎ後約2ヶ月）の2クローンを材料とした。培養条件は、温度23°C、14時間明、10時間暗である。

前述の植物材料より調製したtotal RNAについてそれぞれ、かずさDNA研究所において、*de novo*トランスクリプトーム解析を行った。以下にその概要を記す。

試料のtotal RNAより次世代シーケンサー用試料を調製し、Hiseq1000（Illumina）を用いペアエンド（2×100 bp）の解析を行った。ここで得られた配列情報をQualityおよびlength（49 base cut）でtrimmingし、公開ESTデータとして整理するとともに、*de novo*アセンブリに供した。ここで、同一植物種・複数系統の場合はリードを混合してcontigを作製した。

作製されたcontigデータについて、150 bp以下のもの及び公開ESTデータに含まれないものを除外し、得られたユニークな配列をunigeneとし、Blastxによる機能アノテーションを行った。

さらに、同一植物種・複数系統の試料の場合はcontig配列情報について発現量の目安となる Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads (RPKM) 値の算出を行った。

10) ウラルカンゾウ挿し木苗におけるGL生合成酵素遺伝子の発現解析

GuIV1、GuIV2、Gu#11各クローン水耕栽培株の地上部よりバーミキュライトに挿し木したものを材料とした。

ウラルカンゾウ挿し木苗の根はMilli-Q水で洗浄したのち、上部（地上部基底部直下）と中下部（中央から下の部分）に分け、RNeasy

Plant Mini Kit (QIAGEN)でtotal RNAを調製した。

根試料約100 mgをステンレスボール2個及び、buffer RLT 600 μ L、 β -ME 6 μ Lと共に2mLチューブに入れMS-100で3,000 rpm x 2回粉碎を行った。以後キットのプロトコルに従い調製を行い、最終的に60 μ Lのtotal RNA溶液を得た。このtotal RNA溶液の2 μ Lを使用し、分光光度計ND-1000 (Thermo)を用い、吸光スペクトルの測定を行い品質及び濃度の確認を行った。また、同溶液の3 μ Lをアガロースゲル電気泳動に供した。

得られたtotal RNAはTURBO DNA Free (Ambion)でDNase処理し、total RNAとして350 ngをRT-PCR及び定量real-time PCRに使用した。

半定量的RT-PCRにはSekiらの報告 [Seki *et al.*, *Plant Cell* **23**, 4112-4123 (2011)]に記載のプライマーセットを使用した。*CYP72A154*用のプライマーについてはgenome DNAのコンタミネーションの影響を受けないよう、*CYP72A154*のExon4とExon5のボーダー上でプライマーCYP72A154-1131Sを設計した。

GuIV1のESTライブラリーのグリチルリチン合成酵素遺伝子相同遺伝子について定量real-time PCR用プライマーをPrimer Express Software (Life Technologies)を用い設計した。

半定量的RT-PCR

各クローンの根試料より調製したDNase処理済みtotal RNAについて、逆転写酵素にSuperscript III (Invitrogen)、PCRにExTaq (TakaraBio)を使用し、RT-PCRを行った。

PCRサイクル数は*CYP88D6*のみ35 cycleで、他は30 cycleで行った。なお、コントロールには恒常的に発現する β -tubulinを解析対象として設定した。PCR反応終了後、反応液はアガロース電気泳動に供し、増幅産物のバンドのサイズ及び強度を解析した。

定量realtime-PCR

各試料より調製したtotal RNA 350 ngを鋳型として、PrimeScript® RT reagent Kit

(Perfect Real Time) (Takara Bio)を使用し、逆転写反応を行った。この反応液を5倍希釈したものを試料として、SYBR® Premix Ex Taq™II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio)を用い、定量real-time PCR (反復well数: 3)を行った。なお、リアルタイムPCRの機器はABI PRISM® 7000 (Life technologies)を使用した。各遺伝子の発現量は β -tubulinの発現量を基準とし、 $\Delta\Delta Ct$ 法により求めた。

11) 生育速度及び薬用成分含量向上の検討

ウラルカンゾウの挿し木苗を湛液水耕で4ヶ月間育苗した。育苗から処理期間を通じて、白色蛍光灯を用い、PPF 360 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ 、CO₂濃度1000 μ mol mol^{-1} で栽培した。気温および明期は育苗期間で25/20°C (明期/暗期)、16時間、処理期間で22.5°C一定、12時間とした。UV-B光源 (TL20W/01RS; Philips Co., Ltd.)を用い、暗期に12時間連続照射した。UV強度は栽培パネル面上で0.33、0.66、1.32 $W m^{-2}$ に設定し、それぞれBL区、BM区、BH区とした。処理後10日に部位別乾物重、根基部の直径および根中の薬用成分濃度を調査した。主要薬用成分であるトリテルペノイドのグリチルリチン酸 (GL) ならびに薬理活性を持つフラボノイド類のリクイリチン (LQ)、リクイリチゲニン (LG) およびイソリクイリチゲニン (ISLG) の濃度をLC/MS/MSで測定し、主根乾物重あたりで算定した。

12) 水耕栽培における水耕液循環量の検討

供試苗 (GuIV-1) はバーミキュライトにて挿し木、発根した個体を水耕栽培に移行後、約2ヶ月養生した苗を用い、1試験区あたり4個体とした。栽培は温室内で、最低気温が15°C以下にならないように制御した。また、短日条件下とならないように10~3月は補光 (植物上部で100-120 μ mol $m^{-2} s^{-1}$) を行い、明期時間を12時間以上に維持した。

栽培装置は150mm×720mm×500mmHの栽培槽と270mm×750mm×300mmHの貯水槽からなり、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプにて水を循環した。

ポンプは60分稼働した後、5分間停止する

ことにより栽培槽の水位を下げ、根が空気に暴露する時間を設けた。

循環ポンプは観賞魚用の水中ポンプ（カミハタ製・リオプラスパワーヘッド1400、1700、2100、2500、3100）を用いた。この水中ポンプの機種（能力）を変えることにより循環流量を5試験区（13、14、16、17、20 L min⁻¹）設定した。

供試苗は2012年8月に定植した。そして2013年7月に収穫し重量を測定し、グリチルリチン酸（GL）含量を測定した（東京生薬協会で実施）。

13) セリバオウレンの人工環境下での水耕栽培における肥料濃度の検討

供試植物は、医薬基盤研究所で育成・増殖したセリバオウレンの培養苗を水耕栽培で馴化養生した苗を用い、1試験区6個体とした。栽培は、人工気象室内で、東芝製Hf蛍光灯（昼白色）を用い、PPF 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、CO₂濃度1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ で栽培した。気温および明期は育苗期間で22/16℃（明期/暗期）、14時間とした。

栽培装置は350mm×1200mm×110mmHの栽培槽と450mm×550mm×250mmHの貯水槽からなり、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプにて水を連続循環した。

肥料濃度を1/2、1/4、1/6、1/8と変えて4試験区設定した。栽培は588日間で栽培終了後、重量を測定しベルベリン量を測定した（東京生薬協会で実施）。

14) 人工環境下における様々な環境条件がセリバオウレンの光合成・蒸散速度に与える影響

供試植物は医薬基盤研究所で育成・増殖したセリバオウレンの培養苗を水耕栽培で馴化養生し、馴化後の葉に全て更新された苗を用いた。光合成・蒸散測定には、小糸工業製KMC-2005型改良機を使用した。

チャンバーのサイズは178mm×275mm×400mmHとした。また、光源として東芝製Hf蛍光灯（昼白色）を使用した。

セリバオウレンは水耕栽培に馴化後、90

～120日間育成後の個体で、葉の枚数は3～4枚の個体であった。測定は基本となる環境条件を設定した。また、水耕液条件は栽培時と同様である。この各環境要因を変化させた場合の光合成速度と蒸散速度を1回の測定に1個体用いて、4個体計測した。

セリバオウレン光合成蒸散測定基本条件

気温：20℃、相対湿度：60%

光強度：180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

CO₂濃度：1,000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$

15) 液体クロマトグラフィー質量分析法

（LC-MS/MS）を用いた多変量解析による化学的同等性評価

人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」と市場流通生薬「甘草」をLC-MS/MSにより分析し、そのデータを多変量解析することで、両甘草の同等性や差異に関する検討を行った。

分析試料の甘草は、以下のとおりである（括弧内は基原植物情報）。

No. 1～5：アフガニスタン産（Gg）

No. 6～10：中国（新疆）産（Gi）

No. 11：中国（遼寧）産（Gu）

No. 12～13：カザフスタン産（Gg）

No. 14：ウズベキスタン産（Gg）

No. 15：CIS（中央アジア）産（Gg）

No. 16～17：モンゴル産（Gu）

No. 18～20：中国市場流通品（広州：Gu）

No. 21～22：中国市場流通品（湖北：Gu）

NIB-003、NIB-0074、NIB-0090：日本国内市場流通品（Gu）

GuIV2③-43（水耕-①）、GuIV2⑥-13（水耕-②）、GuIV2⑥-2（水耕-③）：水耕栽培品

各甘草試料より、メタノール抽出液を調製（乾燥試料重量の50倍量のメタノールを加え、超音波洗浄機で45分間抽出）し分析した。

16) 人工水耕栽培システムにより生産した生薬の日本薬局方（日局）試験

人工水耕栽培システムにより生産された

黄連及び甘草について日本薬局方（日局）試験及び個別元素分析を実施した。

黄連は水耕液（大塚A処方）の濃度を変えた4試験区15個体について、日局試験（性状、乾燥減量、成分定量、確認試験、灰分、酸不溶性灰分）及び個別元素（ヒ素、カドミウム、水銀、鉛）を測定した。

甘草は水耕栽培月数、循環量が異なる2クローン23検体について、グリチルリチン酸（GL）を定量した。また、水耕栽培甘草の特徴を明らかにするために、同様の苗で支持体を用いた養液栽培（パミス水耕及びハイドロボール水耕）甘草及び圃場栽培（北海道、つくば、種子島）甘草について性状の確認及びグリチルリチン酸（GL）の定量を行い、規格に適合した試料について日局理化学試験（乾燥減量、確認試験、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量）及び個別元素（ヒ素、カドミウム、水銀、鉛）分析を実施した。

17) 市場流通品NIB-003と水耕栽培品GuIV2H2-1の熱水抽出エキスの純度比較

市場流通品と水耕栽培品のカンゾウエキスの有効性を比較するために、本試験で使用するカンゾウ熱水抽出エキスの純度を HPLC で分析し確認した。

18) T 細胞依存的炎症・接触性皮膚炎モデルマウスへのカンゾウエキス経口投与による有効性評価

BALB/c（7週令、雌）の側腹部の体毛を感作開始二日前に眼科用はさみと電気シェーバーで剃毛した（day -2とする）。感作開始日をday 0とし、アセトンに溶解した5%TNCB（2, 4, 6-trinitrochlorobenzene）溶液を100 μ L側腹部に塗布した（感作日をday 0とする）。Day 7に1% TNCBアセトン溶液を右耳介の表裏に10 μ Lずつ塗布し（惹起日をday 7とする）、day 8（24時間後）、day 9（48時間後）の耳介の腫脹を測定した。耳介の腫脹の測定にはダイヤル・シックネス・ゲージ（G-1A、株式会社尾崎製作所）を用い、1匹につき3回測定し、その平均値を実測値とした。

肥厚の変化は(1)の式により算出した。

Δ Ear swelling (μ m)

= [各測定時の実測値(μ m)] - [初回測定時(day 0)の実測値(μ m)] ----- (1)

カンゾウエキス経口投与群は、グリチルリチン酸量に換算し100 mg/kgを設定した。1匹当たり最大200 μ L以内の投与量になるよう、グリチルリチン酸として10 mg/mLに精製水（大塚蒸留水、大塚製薬、東京）で調製し、day 0より惹起1日前のday 6まで計7回反復投与した。

19) IgE依存的炎症・三相型アレルギーモデルマウスへのカンゾウエキス経口投与による有効性評価

BALB/c（7週令、雌）に抗TNP（2, 4, 6-Trinitrophenol）-IgE抗体（100 μ g/mice）を尾静脈より注射し、疑似感作状態を獲得した（感作日をday -3とする）。感作3日後にオリーブオイルに溶解した1%TNCBを右耳介の表裏に10 μ Lずつ塗布し（惹起日をday 0とする）炎症を惹起した。

抗アレルギー活性評価のために、惹起後4時間までは1時間間隔で（1、2、3、4h）、その後10時間までは2時間間隔で（6、8、10h）、以降は24時間間隔で、24時間後（day 1）、48時間後（day 2）、72時間後（day 3）、と168時間後（day 7）に至るまで耳介の腫脹を測定した。

カンゾウエキス経口投与群は、グリチルリチン酸量に換算し100 mg/kgの量で、惹起1時間前に単回投与を行った。

20) 動物実験

有効性評価のための動物実験はヘルシンキ宣言に示された倫理的原則の遵守と、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に基づき、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験審査委員会および、名城大学学部等委員会・動物実験委員会の承認を得て行った。

21) 血中グリチルレチン酸の測定

BALB/c（7週令、雌）を27匹ずつ、2群

に分け、グリチルリチン酸の量に換算して、40 mg/kg の精製グリチルリチン酸(GL)、市場流通品カンゾウエキス(KZT) を経口投与した。

血中グリチルレチン酸の濃度は、投与 1、2、3、4、6、8、10、12、24 時間後に各 3 匹のマウスより採血した試料を HPLC により測定した。試料の前処理にはアセトニトリルを用いた除タンパクを行った。

22) 地域企業との連携によるブランド生薬の開発—実験材料

1. シャクヤク

i. 栽培—採花が植物体へ及ぼす影響について：植え付け 5 年目の薬用利用可能な園芸品種「エジュリスパーバ」

ii. 加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化：栽培 4 年目の薬用品種「梵天」の根

iii. 有機化合物の組織内分布：栽培 6 年目の園芸品種「エジュリスパーバ」の根

iv. 無機元素の組織内分布：栽培 4～9 年目の園芸品種「春の粧」と「エジュリスパーバ」、薬用品種「梵天」と「北宰相」及び中国産生薬の「白芍」と「赤芍」

(上記の園芸品種と薬用品種は、富山県薬用植物指導センターの栽培品)

2. ダイオウ

i. 栽培—長野県菅平薬草栽培試験地：富山大学で保有しているダイオウの種子から 16 系統 (*matK* 遺伝子の塩基配列において 5 遺伝子型 7 タイプ) を富山県薬用植物指導センターで育苗し、2011 年 6 月 12 日に菅平の圃場に定植した。

ii. 栽培—北海道(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部：ダイオウ 19 系統の種子を北海道研究部で育苗するかまたは富山県薬用植物指導センターで育苗し、2011 年 6 月 28 日に北海道研究部の圃場

に定植した。

iii. 日局試験：菅平薬草栽培試験地で 2012 年に収穫された栽培 5 年目のダイオウ 6 系統(系統 15、17、18、29、43、45) の地下部 17 検体。成分の単離：青海省産大黄 (TMPW No. 27830)

iv. 網羅的成分分析：栽培 5 年目のダイオウの系統 29 と系統 42、他。

3. エゾウコギ

2012 年に薬用植物資源研究センター北海道研究部より供与されたエゾウコギの 5 系統の種子を富山県薬用植物指導センター及び昭和大学薬学部薬用植物園で後熟処理し、その後休眠打破処理を行ったもの。

23) 地域企業との連携によるブランド生薬の開発—方法

本研究では、学(富山大学和漢研、福井県立大学)と官(医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター、富山県、長野県)が連携し、付加価値のある薬用植物の選抜、栽培方法の確立、作出物の加工調製方法の確立を行う。さらに、養液栽培については富山県内企業が参画する。各々の過程で各種機器分析を駆使して科学的根拠を得る。

1. シャクヤク

i. 栽培：36 株を 3 群に分け、各群の採花方法を「無採花」、「1 株に 8 本の茎を残すように採花」及び「着蕾茎数の半数を採花」と設定した。2012 年は 6 月、2013 年は 5 月に茎を地際で切り取った。2013 年 5 月に茎数を計測、10 月 29 日に根を掘り取り、根の径により 2 群に分けてそれぞれ乾燥前・後の重量を測定した。

ii. 加工・乾燥法の違いによる成分含量の変化：1 株から 24 本の根を得、これを全部で 36 個体になるように調整した。これらを 12 群に分け、12 通りの加工・乾燥法(低温処理の有無、周皮の有無、湯通し有無、自然乾

乾燥または機械乾燥)を行った。終了後、36個体の根について8成分の含量を測定した。

iii. 有機化合物の組織内分布：根の切片の表面にイオン化支援剤(2,5-Dihydroxybenzoic Acid: DHB)をスプレーし、マトリックス支援レーザー脱離イオン化型(MALDI)質量分析装置を用い、ポジティブモードでイメージング質量分析測定を行った。検討した化合物は、Albiflorin、Paeoniflorin、Paeonol 及び Catechin。

iv. 無機元素の組織内分布：根の断面及び外皮についてエネルギー分散型蛍光X線分析装置を用い、12元素のマッピングを行った。

2. ダイオウ

i. 栽培—菅平薬草栽培試験地：2011年6月12日定植後、2012年6月28日、2013年6月27日、8月8日及び9月11日に生育調査を実施し、11月5日に一部の株を収穫して地下部の形態と重量を調べた。

ii. 栽培—薬用植物資源研究センター北海道研究部：2011年6月28日定植後、2013年8月16日及び10月22日に生育調査を実施し、10月22日に収穫して、地下部の形態と重量を調べた。

iii. 日局試験：性状、粉末の検鏡、確認試験、純度試験(重金属、ヒ素、ラポニン)、乾燥減量、灰分、エキス含量(希エタノールエキス)及び定量法の各試験を実施した。また、大黃から化合物を単離・同定した後、系統29の検体2の根の含有成分を検討した。

iv. 網羅的成分分析：Procyanidin類に特化した分析法を開発するため、分子ふるいクロマトグラフィー(size exclusion chromatography, SEC)、及び親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)、シリカゲルクロマトグラフィーで分析した。

3. エゾウコギ

i. 栽培：閉鎖環境下に養液栽培のための装

置を組み、播種、緑化、育苗、屋内馴化までを行い、さらに屋外で植物体を馴化させた。

ii. 葉の成分分析：養液栽培で得られた植物体の葉及び屋外馴化後の葉に含有される成分をLC/MSで分析した。対象として中国で収集した野生のエゾウコギの葉を用いた。

C. 研究結果

1) 種々栽培環境条件下でのウラルカンゾウの生育と収量及びその評価

前年度に開発し特許を申請した、植物組織培養よりもより簡便で、大量の苗の増殖が可能な水耕栽培植物の地上茎を挿し穂とする大量増殖法で生産した苗の甘草生産用種苗としての適性、及び種々優良株の栽培特性を明らかにするため、各種栽培試験(2012-2013年：パミス水耕、北海道野外、筑波野外筒、種子島ハウス筒)を実施した。さらに、2013年は、茨城県稲敷郡での圃場栽培(定植2013年4月25日)、広島県福山市での圃場筒栽培(定植日2013年4月22日)、神奈川県相模原市での圃場栽培(定植2013年7月19日)を実施した。

2012-2013年(定植2012年)の野外及びハウス栽培において、定植時期は2013年春の萌芽率に大きく影響を与え、10月定植の筑波野外筒及び種子島ハウス筒では、萌芽率が著しく低かった[筑波野外筒 全体：0.7% (1/150)、Gu#11：0.0% (0/35)、GuIV1：0.0% (0/35)、GuIV2：1.3% (1/80)；種子島 全体：10.0% (4/40) GuIV1：0.0% (0/20)、GuIV2：20.0% (4/20)]。一方、北海道野外では、7月31日定植のGuIV1は萌芽率57.5%(23/40)であった。しかし、その10日後の8月10日に定植したGuIV2は、著しく萌芽率が低下し、10.0% (4/40)であった。

2013年10月の収穫時において、北海道野外の地上部は完全に枯れていた。しかし、筑波以南で栽培した株の地上部は緑を保っており、特に種子島ハウス筒の地上部の生育状態は良好であった。

野外、野外筒及びハウス筒栽培の根長はいずれもパミス水耕よりも長く、根長の平均値

は、パミス水耕の平均値の2倍以上であった。一方、最大根幅は、パミス水耕の方が野外、野外筒及びハウス筒栽培よりも太かった。根の収量(乾燥重量)の平均値は、パミス水耕、北海道野外、筑波野外筒、種子島ハウス筒とも同程度の値であった。パミス水耕の1株は、ストロンの形成が顕著であったが、その他のパミス水耕、野外、野外筒、ハウス筒栽培株ではストロン形成がほとんど認められなかった。

収穫・乾燥した甘草(根)を径0.5 cm以上と径0.5 cm未満に分割してそれぞれ乾燥重量を測定後、粉末にし、日本薬局方(日局)試験及びICP-MSによる有害元素(ヒ素:As、カドミウム:Cd、水銀:Hg、鉛:Pb)含量測定を行った。日本薬局方性状に記載の径0.5 cm以上の甘草(根)の比率(%)は、筑波野外筒、種子島ハウス筒が高く、北海道野外が最も低かった。パミス水耕はその中間の値を示した。

供試甘草(根)のうち、北海道野外(GuIV1)及びパミス水耕(GuIV2)は、径の太さに関わらず、GL含量が日局規格値2.5%以上を満たした。これらの試料について、他の日局試験を行った結果、パミス水耕では灰分が高く、日局規格を満たさないものがあったが、北海道野外は全ての他の試験においても日局規格に適合していた。

4種の有害元素含量は、径0.5 cm未満の甘草(根)において高い傾向が認められた。栽培法別では、パミス水耕はAsが、北海道野外はCdが、筑波野外筒(径0.5 cm未満)及び種子島ハウス筒はPbが高い傾向が認められた。

茨城県稲敷郡での圃場栽培では、定植直後の乾燥のため、多くの株が枯死し、生存率は定植苗数の1~3割程度であった。しかし、生存した株の生育は良好で、収穫時の根の乾燥重量が10 g以上のものも存在した。各株の乾燥根のGL含量の平均値は、GuIV1が $1.84 \pm 0.42\%$ (最大値2.28%)、GuIV2が $1.53 \pm 0.39\%$ (最大値2.09%)、Gu#11が2.29%であり、ストロンを発生した個体の乾燥根のGL含量は、ストロンがないものに比べ、有

意に低い値を示した($p=0.0004$)。

広島県福山市での圃場筒栽培では、生存率はGuIV2、GuIV1、Gu#11の順に高く、草丈はGu#11、GuIV2、GuIV1の順に高かった。収穫時に根の乾燥重量が3 g以上であったGu#11は、GL含量1.47%を示した。栽培期間中、圃場筒栽培ではシロチョウ科の幼虫による食害が、恒温室内ではハダニによる食害が発生し、生育障害及び株の枯死が生じた。

神奈川県相模原市の圃場栽培では、2013年12月30日現在で、定植した18株のうち、17株の生存が確認された。

2) ウラルカンゾウ地上茎水浸出液の植物生長促進効果

水耕栽培で得たウラルカンゾウ優良株地上茎の水浸出液(Gu水)が、植物の発芽と初期生育に及ぼす影響を調べた結果、シロウリ、ニラでは純水又は蒸留水と比較して、顕著な効果が認められなかった。一方、サラダ水菜、スイートバジル、ベビーリーフ、ミニトマト、トウモロコシでは、顕著な初期生育促進効果が認められ、Gu水を養液に交換後もその生育促進効果は持続した。オタネニンジン芽きり種子では、15℃において、純水と比較して顕著な発芽促進効果が認められた。一方、4℃においては、栽培初期に純水と比較して顕著な発芽促進効果が認められたが、117日以降は発芽率の差が認められなくなった。15℃の試験区においては、葉数が2枚(通常は1枚)の実生の割合が増加した。本Gu水は、新規植物生長剤として特許を出願した。

3) セリバオウレン培養苗の増殖と育成

圃場栽培株の葉柄切片より誘導した不定胚より再分化して得られたセリバオウレン培養植物体は、2-4ヶ月毎に、株分けしてWPGHF培地で継代培養することにより、2-3ヶ月で約2.6倍に増殖した。本培養苗は、1年間のパミス水耕で、日局規格を満たす生薬「黄連」の生産が可能であることを確認している。本培養苗の他生産システムにおける有用性の評価とスケールアップに向けた取り組みとして、鹿島技術研究所での水耕栽培を実

施した。その結果、588 日間の栽培で、日局規格を満たす黄連の生産に成功した。

4) 光独立栄養培養による効率的な挿し木

炭酸ガス 1,000ppm、光強度 10,000 lux 条件下において、各ウラルカンゾウクローンで高い発根率を示した (GuTS71-08IV2:80.0%、GuTS71-08IV1 : 78.2%、Gu2-2-1 : 85.0%、Gu2-3-2 : 91.5%)。また、シナマオウにおいても 50%の発根率となった。さらにシナマオウについて、酸化型グルタチオン 50 mg/L 添加の効果を調べた結果、発根率 68%を得た。

5) カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発

基原植物として、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草試料より、ゲノム DNA を抽出し、抽出 DNA を鋳型に *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の増幅を行った。その結果、これら PCR 産物は、増幅の有無やサイズの違いから、(a) 約 300 bp の増幅が認められる Gu 由来の IV2 タイプ、(b) 約 450 bp の増幅が認められる IV1/g タイプ (増幅サイズだけでは、Gu 由来の IV1 タイプと Gg 由来の g タイプ配列の区別は困難)、(c) a、b 両方の増幅が認められる IV1/g + IV2 タイプ、(d) 増幅が認められないタイプの 4 タイプに分類可能であった。なお、(d) タイプで増幅が認められなかった原因としては、ゲノム DNA の品質等により PCR が機能しなかった可能性、プライマー設計部位に変異がある可能性 (例 : Gu2 タイプ) 等が考えられる

また、基原植物情報が Gg の試料において、これまで Gu に特異的に認められていた IV2 タイプの配列と同サイズの増幅が認められたなど、一部試料で基原植物情報と矛盾する結果が得られた。このことから、異なる基原植物の混入の可能性、あるいは、これまで得られていなかった新規配列の存在が示唆された。

次いで、得られた PCR 増幅産物について、PCR 産物の一部を精製し、配列解析を行った。PCR ダイレクトシーケンスの結果、単一配列が増幅された試料も認められたが、複数配列

が増幅された試料も多く認められた。このような場合、本来であれば、それぞれの増幅産物をクローニング後、シーケンスする必要があるが、これまでの配列解析結果をもとに含まれる配列を推定可能なため、推定配列を混合した際の予測波形と実際に得られたシーケンスの波形データに矛盾がないか検証することにより、含まれる配列を推定した。

塩基配列の解析の結果、*CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の遺伝子型により推定される植物種は、ほとんどのサンプルで基原植物情報と一致した。しかし、M06-② (基原植物情報 : Gi ⇔ 遺伝子型 : IV1+IV2)、M10-① (Gi ⇔ IV1+g)、M12-①、② (Gg ⇔ IV1+g)、M21-① (Gu ⇔ g) など、一部で基原植物情報と異なる遺伝子型が検出された

また、今回の分析試料からは、基原植物情報が Gg の試料の一部より新規配列として、従来得られていた Gg の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列 (g1) と比較し、約 120 bp の欠失が認められた配列 (g2)、及び、3 bp の欠失が認められた配列 (g1-3) が得られた。

成分分析の結果、すべての試料より、GL が検出されたが、その含量は、0.7%~6.0% であり、日本薬局方の規格値 2.5% 以上を満たしているのは、22 試料中 12 試料であった。基原植物が Gu の試料に着目すると、規格値を満たす試料は、8 試料中 3 試料であり、そのうち遺伝子型を決定できた 2 試料 (M18-①、M19-①) の遺伝子型は、いずれも、IV1+IV2 タイプであった。

Gu の一部は、特徴的に GC を含有することが知られているが、今回分析した Gu 試料の中に GC を含有する試料は認められなかった。一方で、Gi 試料のうち、2 試料 (M07-①、M10-①) で GC が検出された。このうち、M10-①の遺伝子型は、IV1+g であった。

Gg は、特徴的に GB を含有することが知られているが、今回分析した Gg 試料からは、すべて GB が検出された。さらに、Gi 及び Gu 試料の一部 (M08-①、M09-①、M21-①) から GB が検出され、特に基原植物情報が Gu の M21-①の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7

配列の遺伝子型は、Gu タイプ (IV1 or IV2) ではなく、Gg タイプ (g1) であった。

6) ウラルカンゾウ EST ライブラリーの解析

ウラルカンゾウ無菌培養物2クローンのリードを混合して得られた全contigの発現量をプロットした結果、発現量に差のある遺伝子が相当数あることが明らかになった。11位の酸化に関わる *CYP88D6* はGu2-3-2においては発現が検出されなかった。*CYP88D6* はこれらの酵素のなかでも発現量が低いと考えられ、とくに幼植物期におけるGL生産量のボトルネックになっていることが示唆された。

7) ウラルカンゾウ挿し木苗におけるGL生合成酵素遺伝子の発現解析

半定量RT-PCR解析の結果、*CYP88D6* は部位間での発現量の差が *bAS*、*CYP72A154* と比較して大きいことが判明した。

定量 realtime-PCR の結果も半定量 RT-PCR と同様の傾向を示し、各遺伝子の発現量は、根上部の方が根中下部と比較して高い傾向が認められた。すわなち、根の成長(太さ) と関係するものと考えられる。とくに、*CYP88D6* は部位間での発現量の差が *bAS*、*CYP72A154* と比較して大きく、GL生産のボトルネックとなっていると考えられる。

8) ウラルカンゾウの生育速度及び薬用成分含量向上の検討

UV-B の照射による乾物重への影響はみられなかったが、可視障害として、BH および BM 区の地上部で一部葉が黄化した。昨年度実施した Sun らの試験 (Sun et al., 2012) で報告している黄化葉よりも本試験での黄化葉は少なかった。

4種の薬用成分濃度は Cont. 区よりも全ての UV-B 照射区で大となる傾向がみられ、特に ISLG 濃度は BL 区で有意に大となった。また、本試験の範囲において暗期 UV-B 照射では強度が低いほど薬用成分濃度が高まる傾向がみられた。

9) ウラルカンゾウ水耕栽培における水耕液

循環量の検討

7月に栽培を終了し根部を収穫した。栽培終了時の地下部乾燥重量及び根頭部根径の測定を行った。また、GL 含量の測定を行った。供試苗の開始時の根頭部根径がばらついているために、実測値では生育比較ができないので、試験開始時の測定値との増加割合による成長率にて比較することとした。

根頭部根径、地下部乾燥重量のいずれも 16 L min^{-1} が最大となった。また、GL 含量も 16 L min^{-1} が最大となり、日本薬局方の規格値である 2.5% を越える個体があった。

10) セリバオウレンの人工環境下での水耕栽培における肥料濃度の検討

1試験区6個体で試験を開始したが、肥料濃度の高い区ほど枯死する個体が頻出し、1/2 では5個体、1/4 では3個体、1/6 では1個体が枯死した。

乾燥根茎重量は、1/2 濃度が著しく劣り、1/4 以上では大きな差はないが水耕液濃度が低いほど大きくなる傾向を示した。

ベルベリン含量はいずれの区も 7% 以上となり、日本薬局方規格値である 4.2% 以上の値となった。

11) 人工環境下における様々な環境条件がセリバオウレンの光合成・蒸散速度に与える影響

測定基本条件下で明期の気温を $16 \sim 26^{\circ}\text{C}$ に変化させて光合成・蒸散測定を行った。光合成速度は、測定条件下ではほぼ一定であった。蒸散速度は高温になるに従って減少し、 22°C 以上ではほぼ一定となった。

測定基本条件下で、相対湿度を 50~80% に変化させて光合成・蒸散測定を行った。光合成速度は、測定条件下ではほぼ一定であった。蒸散速度は相対湿度が上昇するに従って減少した。

測定基本条件下で、光強度を $0 \sim 350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に変化させて光合成・蒸散測定を行った。光強度が増すに従って光合成速度も増加し $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で最大となった。蒸散速度は、光強度が増すに従って蒸散速度も増

加した。

光強度条件は $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、それ以外は測定基本条件下で、 CO_2 濃度を $400 \sim 1,600 \mu\text{mol mol}^{-1}$ に変化させて光合成・蒸散測定を行った。 CO_2 濃度は、他の環境条件よりも光合成速度の値のばらつきが大きくなった。 CO_2 濃度が増加するに従って、光合成速度も増加し $1,200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ 以上ではほぼ一定となった。蒸散速度は CO_2 濃度が増加するに従って若干減少し、 $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$ 以上ではほぼ一定となった。

12) 人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」、国内市場流通「甘草」および「その他各種甘草類」のメタノール抽出エキスの正イオン検出 LC/MS/MS 分析、多変量解析

全甘草類の TIC クロマトグラムにおいて、殆どの試料で保持時間約 9.7 分の GL がメインピークであるのに対して、中国（新疆）産の Gi の No. 7 と No. 10 は、保持時間 11.7 分のピークがメインピークとなった。このピーク（保持時間 11.7 分）の抽出イオンクロマトグラム（XIC）においては、 m/z 339.1581 イオンが顕著に観測されており、このイオンの m/z 値（ m/z 339.15-339.16）で作成した XIC を、甘草水耕栽培品、国内市場流通品（NIB-3, 74）、中国（新疆）産（No. 7、10 ; Gi）で比較したところ、国内市場流通品 2 種と中国（新疆）産 2 種で同様のパターンおよびピーク強度を示した。

これら中国（新疆）産 2 種は、TIC クロマトグラムのパターンではその他の甘草と異なる結果であったが、その特徴となるピーク（成分）は、国内市場流通品と同程度の含有量であり、水耕栽培品ではその成分の含有量が少ないことが判明した。

多変量解析によって得られたスコアプロットにおいて、水耕栽培品と国内市場流通品は、同じグループには分類されていないが、No. 7 や 10 などの試料と比べると、水耕栽培品は相対的には国内市場流通品に近いと考えられた。

ローディングプロットにおいて、国内市場流通品や水耕栽培品が分類されている左

上の方に位置している成分として、保持時間約 11 分の m/z 369 と、保持時間約 5.8 分の m/z 257 が挙げられている。

m/z 369.13-369.14 の XIC を、水耕栽培品、国内市場流通品 2 種（NIB-3、74）、中国（新疆）産（No. 7、10 ; Gi）で比較した。

上記 7 種類の試料について、XIC ピーク強度を比較したところ、水耕栽培品と国内市場流通品では同程度の強度であったが、中国（新疆）産の No. 7、10 では二桁以上低い強度であった。この m/z 369 イオンを与える成分は、負イオン検出データではほぼ同じ保持時間に m/z 367 イオンを与える成分が観測されていることから、そのノミナル質量は 368 であり、 m/z 369 イオンの推定組成は $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ である。

また、保持時間約 5.8 分の m/z 257 について、その上記 7 試料の XIC を比較すると、水耕栽培品 & 国内市場流通品 vs. 中国（新疆）産（No. 7、10）で、ピークパターンが異なることが示された。そこで、XIC（ m/z 257）のピークパターンによって、国内市場流通品に近いかな否かを判別できるのではないかと考え、全試料について XIC（ m/z 257）を確認した。保持時間 6 分付近のピークパターンが試料によって異なっており、国内市場流通品と同様なパターンを示したのは、水耕栽培品 3 種、中国（遼寧）産（No. 11 ; Gu）および No. 17~22（モンゴル産、中国市場流通品 ; Gu）であった。

13) 人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」、国内市場流通「甘草」および「その他各種甘草類」のメタノール抽出エキスの負イオン検出 LC/MS/MS 分析、多変量解析

全甘草類の TIC クロマトグラムを比較したところ、ピークパターンの若干の違いは見られたが、その差異は正イオン検出データに比べると小さかった。従って、負イオン検出データについては、多変量解析でのみ差異解析を行った。

多変量解析によって得られたスコアプロットにおいて、水耕栽培品と国内市場流通品は、同じグループ内にまとまった。同グルー

プに含まれる試料は、水耕栽培品と国内市場流通品以外も全て Gu であった。

ローディングプロットにおいて、Gu に特徴的な成分として、「保持時間約 6 分の m/z 417」、「保持時間約 7.1 分の m/z 417」、「保持時間約 11 分の m/z 367」、「保持時間約 11.4 分の m/z 353」が挙げられる。

Gu における 4 成分の XIC ピーク強度は、その他の Gg や Gi に比べると、1 桁～3 桁高い値を示している。これら 4 成分は、Gu vs. Gg & Gi を区別するための指標となる可能性が示唆された。ただ一点、No. 6 [中国 (新疆) 産、Gi] の試料については、4 成分の XIC ピーク強度は、Gu に似た傾向を示した。

ここで示した m/z 417 の成分は、その推定組成 ($C_{21}H_{21}O_9$) およびプロダクトイオンスペクトルより、リクイリチンとその異性体であると考えられた。

14) 人工水耕栽培システムにより生産した生薬の日本薬局方 (日局) 試験—外部形態 <黄連> 水耕栽培品は、不整の円柱形で、長さ 2～4cm、まれに 10cm に達し、径 0.2～0.7cm で多少湾曲し、しばしば分枝する。外面は灰黄褐色を呈し、輪節があり、多数の根の基部を認める。おおむね一端に葉柄の残基がある。弱いにおいがあり、味は極めて苦く、残留性で、だ液を黄色に染める。

以上の性状は日局収載オウレンの性状に一致する。ただし、水耕栽培品は市場品と比べて 1. 表面に葉柄の残基が瓦状に重なり、2. 多数の分枝がみられる点で異なる。支持体養液栽培品は全体的に小さなことを除いて、水耕栽培品とほぼ同じ特徴を有していた。

<甘草> 水耕栽培品は 2012 年度調査品と同様の傾向を示した。すなわち細長い円錐形～円柱形を呈し、分枝する。外面は赤褐色で細かい縦じわと多数の皮目がある。横切面では、皮部と木部の境界がほぼ明らかで、放射状の構造を示す。

水耕栽培品は野生品に対して 1. 細長い円錐形をし、分枝する点、2. 多数の皮目をつける点、3. 横切面が緻密で、放射状に裂け目が

見られない点が異なる。特に 1. は日局の性状記載とは異なるが、野生品においても個体全体を見れば円錐形であり、分枝しないことは無い。野生品は加工調製した結果、円柱形で分枝しない状態に整えられて流通すると考えられ、代表的な市場品の記載が日局の性状であることを考えると、水耕栽培品はこれから大きく外れるものではないと考える。

圃場栽培品は、細長い円柱形を呈し、水耕栽培品に比べて分枝は少ない。細根がある点が野生品と異なる。

15) 人工水耕栽培システムにより生産した生薬の日本薬局方 (日局) 試験—内部形態 <黄連> 日局オウレンの内部形態性状の記載と比較したところ、水耕栽培品は、以下の特徴を有していた。

1. コルク層は薄膜のコルク細胞からなる。
2. 水耕液 1/8 のみで皮部柔組織中にはコルク層に近い部位に石細胞群、形成層に近い部位に黄色の師部繊維を認めるが、水耕液 1/2、1/4、1/6 ではどちらも認めない。日局性状では認めるものが多いとしている。
3. 木部は主として道管、仮道管、木部繊維からなり、放射組織は明らかで、髄は大きい。
4. 髄中には石細胞又は厚膜木化した細胞を伴う石細胞を認めない。日局性状では認めることがあるとしている。
5. 柔細胞には細かいでんぷん粒を含む。

以上の結果から、水耕栽培品は日局の内部形態性状記載と一致するといえる。ただし、水耕栽培品は、6. 市場品黄連に較べて木部が少なく、発達が弱いという特徴を有していた。また、前記 2. のとおり、皮部柔組織中の石細胞群、師部繊維の有無は水耕液の肥料濃度と相関があることが示唆された。

支持体養液栽培品は市場品よりも水耕栽培品に類似していた。

<甘草> 水耕栽培品、圃場栽培品の横切面には、黄褐色の多層のコルク層とその内層に 1～3 細胞層のコルク皮層がある。皮部には放射組織が退廃師部と交互に放射状に配列し、師部には結晶細胞列で囲まれた厚壁で木