

化不十分な師部繊維群がある。木部には黄色で巨大な道管の列と 3～10 細胞列の放射組織が交互に放射状に配列する。道管は結晶細胞列で固まれた木部繊維及び木部柔細胞を伴う。柔細胞はでんぷん粒を含み、また、しばしばシュウ酸カルシウムの単品を含む。

以上の特徴は日局性状記載に一致する。なお、日局において、道管は「巨大」とされているが、その具体的数値は示されていないため、日局性状に合致すると判断した。ただし、水耕栽培品は野生品と比べて、1. 道管が少ない、2. 道管径が小さい、3. シュウ酸カルシウム単品が多い点で異なる。

圃場栽培品は 1.、3. に関しては水耕栽培品と同様であり、2. の道管径に関しては、野生品と水耕栽培品の中間的な特徴を有していた。

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—成分含量
＜黄連＞ 全個体が日局オウレンのベルベリン含量規格値(4.2%以上)に適合しており、全試料の平均値は 7.42%であった。また、水耕液濃度を変えた試験区を比較した結果、濃度によるベルベリン含量への影響は認めなかった。

＜甘草＞ いずれの試料も径 0.5cm 以上及び径 0.5cm 未満に分別し、各々について GL 含量を測定した。水耕栽培品及び支持体養液栽培品は、いずれも市場品に比べて細く、径 0.5 cm 以上の部位がない個体もあった。

水耕栽培甘草は全試験区とも日局カンゾウの GL 含量規格（2.5%以上）に不適合であった。但し、個体別では 23 検体中、1 検体は 2.88%であり、日局規格値を満たしていた。一方、支持体養液栽培甘草は、試験したすべての検体で日局含量規格に適合しており、圃場栽培甘草は北海道栽培の GuIV1 株 6 検体及び GuIV2 株 1 検体が日局規格値を満たした。

17) 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—理化学試験
＜黄連＞ 全個体がすべての日局理化学試

験項目（確認試験 TLC、乾燥減量、灰分及び酸不溶性灰分）において、日局規格値に適合した。

＜甘草＞ 支持体養液栽培甘草について実施した日局理化学試験のうち、確認試験 TLC、乾燥減量、酸不溶性灰分及びエキス含量はすべて日局規格値に適合していた。しかしながら、灰分は市場品と比較して高い傾向にあり、日局規格値に不適合な検体があった。

圃場栽培甘草は全項目が日局規格値に適合した。

18) 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—個別元素分析
＜黄連＞ 全個体が香港生薬標準限度値（ヒ素 2.0、カドミウム 1.0、水銀 0.2、鉛 5.0ppm）以下であった。

＜甘草＞ 全個体が香港生薬標準限度値（ヒ素 2.0、カドミウム 1.0、水銀 0.2、鉛 5.0ppm）以下であった。支持体養液栽培甘草では、ヒ素含量が高い検体を認めた。

19) 市場流通品 NIB-003 と水耕栽培品 GuIV2H2-1 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、確認したところ、市場流通品（NIB-003）、水耕栽培品（GuIV2H2-1）ともに保持時間 26 分付近にグリチルリチン酸のピークが検出された。多波長で三次元に展開すると、紫外部から近紫外部にかけてそれぞれ複数の吸収が認められた。

このクロマトグラムとスペクトルデータの結果より、市場流通品（NIB-003）と水耕栽培品（GuIV2H2-1）の熱水抽出エキスは、グリチルリチン酸以外に、ほぼ同程度のカンゾウ由来成分を含有し、明らかな差は認められないものとして、有効性評価試験に使用した。

20) 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

既に我々は予備的な検討で、T細胞依存的に炎症が誘導される接触性皮膚炎モデルマウスにおいて、70 mg/kg の精製グリチルリチン酸経口投与によるアレルギー反応の抑制効果を確認していた。その効果と比較するために、精製グリチルリチン酸と並行して、市場流通品エキス、水耕栽培品エキス、各1品を、初回の検討対象とした。

7週令 BALB/c 健常マウスの体重は 18.5 ± 0.7 g (平均 $\pm$ SD) であった。耳介の厚さは実測値で 200 μ m から 210 μ m の範囲内であった。我々の確立した接触性皮膚炎マウスモデルは、TNCB 感作後 7 日目に、同抗原を再投与する。その後 24 時間を最大として、48 時間にかけて耳介の腫脹を認めた。

抗原感作の後、精製水のみ投与したポジティブコントロール群は、惹起後の耳介の腫脹が 24 時間後で 97.3 ± 3.8 μ m (耳介厚変化: Δ の平均 $\pm$ SEM)、48 時間後で 68.3 ± 4.4 μ m であった。これに対して精製グリチルリチン酸投与群は 24 時間後で 62.0 ± 5.3 μ m、48 時間後で 48.0 ± 3.6 μ m と、グリチルリチン酸投与により腫脹が抑制された。

一方、カンゾウエキス投与群では市場流通品 NIB-003 は 24 時間後で 75.0 ± 3.8 μ m、48 時間後で 52.0 ± 1.3 μ m、水耕栽培品 GuIV2H2-1 は、24 時間後で 70.7 ± 2.7 μ m、48 時間後で 43.0 ± 3.0 μ m であった。

ネガティブコントロール群である健常マウスは、実験開始後 9 日目に相当する 48 時間後の耳介の厚さの変化は 1.0 ± 2.4 μ m であった。また、ネガティブコントロール群以外のアレルギー誘導マウス群 4 群間 (ポジティブコントロール、精製グリチルリチン酸、NIB-003、GuIV2H2-1 投与群) で、投与物質の違いによる有意な体重の変化は認められなかった。

この結果により、精製グリチルリチン酸投与群同様、市場流通品 NIB-003、水耕栽培品 GuIV2H2-1 とともに、カンゾウエキス経口投与により、耳介の腫脹の抑制が示された。

さらに他の市場流通品、水耕栽培品、各2品のカンゾウエキスについて、同様の検討を

行った。実験開始時のすべてのマウスの体重は 18.5 ± 0.8 g (平均 $\pm$ SD) で、前回とほぼ同様であった。

ポジティブコントロール群は、24 時間後で 156.0 ± 14.8 μ m、48 時間後で 84.7 ± 6.7 μ m であった。これに対して精製グリチルリチン酸投与群は 24 時間後で 104.0 ± 6.8 μ m、48 時間後で 58.3 ± 6.2 μ m と、グリチルリチン酸投与により腫脹が抑制された。

一方、市場流通品エキスでは NIB-074 投与群は 24 時間後で 95.3 ± 6.7 μ m、48 時間後で 56.3 ± 4.9 μ m であった。NIB-176 投与群は 24 時間後で 64.3 ± 9.6 μ m、48 時間後で 52.3 ± 4.1 μ m であった。

水耕栽培品エキスでは GuIV2H2-4 投与群は 24 時間後で 69.0 ± 14.0 μ m、48 時間後で 47.0 ± 6.4 μ m、GuIV1-16L 投与群は 24 時間後で 87.0 ± 3.7 μ m、48 時間後で 46.0 ± 2.5 μ m であった。

健常マウス群は、実験開始後 9 日目の耳介の厚さの変化は 0.6 ± 0.6 μ m であり、アレルギー誘導マウス群 6 群間で、投与物質の違いによる有意な体重の変化は認められなかった。

以上の結果により、本検討で用いた市場流通品 3 品と水耕栽培品 3 品はグリチルリチン酸 100 mg/kg 相当の熱水抽出エキスを経口投与することにより、T細胞依存性の炎症が誘導される接触性皮膚炎モデルマウスのアレルギー反応を抑制することが示された。また、市場流通品、水耕栽培品各 3 品間のグリチルリチン酸 100 mg/kg 相当熱水抽出エキスによるアレルギー抑制効果は有意な差は認められなかった。

21) 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

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で、カンゾウエキス経口投与による炎症反応抑制が過去に報告されている。我々は過去の報告をもとに実験系の構築を行い、評価方法を検討した。

我々の構築した実験系では、第一相は惹起

後 1-2 時間で即時性の激しい耳介の腫脹を生じ、第二相は準即時相として 10 時間前後に穏やかな腫脹を生じる。さらに第三相として 48-72 時間後に遅発性のやや激しい腫脹が観察される。しかしながら、第二相の穏やかな腫脹を評価の対象とするためにはさらなる条件設定が必要であったため、今回、評価から除外した。1-2 時間後の第一相と 48-72 時間後の第三相に観察される耳介の腫脹について、カンゾウエキス経口投与の効果の評価することとした。

アレルギー抑制効果について検討するために、構築した実験系を用いて、精製グリチルリチン酸、市場流通品 NIB-003、水耕栽培品 GuIV2H2-1 のカンゾウエキスをを用いて、初回の評価を行った。

惹起一時間前に精製水のみ経口投与したポジティブコントロール群は、第一相の反応である惹起 1 時間後に $60.0 \pm 11.4 \mu\text{m}$ 、2 時間後に $60.0 \pm 10.8 \mu\text{m}$ 、第三相の反応である惹起 48 時間後に $20.0 \pm 2.8 \mu\text{m}$ 、72 時間後に $20.0 \pm 1.6 \mu\text{m}$ の耳介の腫脹を示した。

一方、精製グリチルリチン酸を投与した群は、1 時間後に $44.3 \pm 10.5 \mu\text{m}$ 、2 時間後に $55.3 \pm 7.5 \mu\text{m}$ 、48 時間後に $4.18 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 、72 時間後に $-0.33 \pm 2.9 \mu\text{m}$ であった。また、カンゾウエキス投与群では、市場流通品 NIB-003 は、1 時間後に $39.0 \pm 10.2 \mu\text{m}$ 、2 時間後に $40.0 \pm 11.3 \mu\text{m}$ 、48 時間後に $8.0 \pm 3.3 \mu\text{m}$ 、72 時間後に $5.7 \pm 1.9 \mu\text{m}$ であった。

水耕栽培品 GuIV2H2-1 は、1 時間後に $49.7 \pm 10.5 \mu\text{m}$ 、2 時間後に $61.0 \pm 9.7 \mu\text{m}$ 、48 時間後に $9.0 \pm 3.7 \mu\text{m}$ 、72 時間後に $8.0 \pm 2.3 \mu\text{m}$ であった。

アレルギーを誘導したマウス群 4 群間で、腫脹のパターンは一致していた。また、疑似感作時から第三相の測定を行う 8 日間にわたり、ネガティブコントロールを含めた 5 群間での体重の変化には有意な差はなかった。

これらの結果より、惹起前 1 時間の単回投与では、第一相の惹起後 1-2 時間では精製グリチルリチン酸投与も含めカンゾウエキ

ス投与による腫脹の抑制が認められなかった。さらに第三相の 48 時間後では、精製グリチルリチン酸投与群のみ有意な腫脹の抑制を認め、72 時間後に、精製グリチルリチン酸、市場流通品 NIB-003、水耕栽培品 GuIV2H2-1 とともに有意な腫脹の抑制が示されたが、膨張程度が比較的微小のため、今後再検討の必要があると思われた。

22) 血中グリチルレチン酸濃度の測定

精製グリチルリチン酸、あるいはカンゾウエキスの経口投与後の薬物動態を解析するために、グリチルリチン酸のアグリコンであるグリチルレチン酸の血中濃度を測定した。グリチルリチン酸 40 mg/kg に相当する量の精製グリチルリチン酸あるいはカンゾウエキスを経口投与後、精製グリチルリチン酸では 3 時間後に約 50 ng/mL、カンゾウエキスでは 2 時間後に約 25 ng/mL の血中グリチルレチン酸が検出された。

その後、血中濃度は上昇し、精製グリチルリチン酸で 14 時間後、カンゾウエキスでは 12 時間後を最大としてそれぞれ約 150 ng/mL の濃度を示した。

12 時間以降は 24 時間後まで未測定だが、24 時間後ではそれぞれ約 50 ng/mL の濃度を示した。

この結果から、グリチルリチン酸、あるいはカンゾウ熱水抽出エキスをマウスへ経口投与すると、2-3 時間後に血中でグリチルレチン酸として検出されるレベルまで代謝され、さらに血液中からのクリアランスには 24 時間以上の時間がかかる可能性が示された。

23) 地域企業との連携によるブランド生薬の開発—シャクヤク

2013 年 5 月の茎数は、「無採花」群が 17.8 本であったのに対し、「8 本残して採花」群では 16.0 本とわずかな減少であったが、「着蕾茎数の半数採花」群では 10.3 本と約 60% に減少した。10 月 29 日に収穫した根の乾燥後の合計重量は、「無採花」群が 647g であったのに対し、「8 本残して採花」群では 362.2g、

「着蕾茎数の半数採花」群では 317.3g であった。

個体間におけるばらつきが大きいものの、新鮮な根を約 1 ヶ月間低温貯蔵し、水洗後、湯通しして、周皮を竹べらで除き、室内で自然乾燥する方法が最もよい成分含量を示した。新鮮な根を約 1 ヶ月間低温貯蔵することにより、顕著ではないものの Paeoniflorin 含量が増加する傾向が認められた。また、皮去り加工により Albiflorin 及び (+)-Catechin の含量が減少した。

Albiflorin を検出するため、根の切片表面を m/z 481 と m/z 197 でそれぞれイメージングした結果、両者で見られる Albiflorin の局在は一致し、周皮に局在し、皮層にも認められた。Paeonol または Catechin の検出では m/z 167 または m/z 291 でイメージングを行い、Paeonol は皮層と師部付近に局在し、一方 Catechin は全体に見られるものの、周皮と皮層に多い傾向が見られた。

シャクヤクの根では、カリウムは皮層と木部の中心部またはほぼ全体に検出され、外皮にも存在した。一方、カルシウムは形成層のすぐ内側の木部に多く検出され、外皮にも存在した。硫黄は、栽培植物にはわずかに検出される程度であったが、白芍、特に Paeoniflorin sulphonate が検出された白芍でやや明らかであった。

24) 地域企業との連携によるブランド生薬の開発—ダイオウ

菅平薬草栽培試験地：*Rheum palmatum* の系統 29、38、41、42、A1、D5 が良好な生育を示したが、特に過去の研究で高品質と結論付けた系統 38 が比較的高い生育率 (55.6%) を示した。系統 29 (RPII 型 Rp5 タイプ) 及び系統 38 (RPI 型 Rp4 タイプ) では根の断面が橙黄色を呈し、さらに二次皮層に粘液の分泌が見られた。

夏期の生育期に雨天が続き、その結果土壌湿害によるダイオウの枯死が多く発生した。このような気象条件下で、他の系統と比較して富 29 系統の 1 株当たりの収量は根茎が 174.8g、根が 509.5g、富 38 系統は根茎が

29.2g、根が 32.3g と多く、また生存率は前者が 23.3%、後者が 30.0%と高かった。

定量法以外の日局試験 (性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、灰分、エキス含量) において 17 検体すべてが日局の規格内であった。定量法では、17 検体の内 11 検体で Sennoside A 含量が 0.25%以上を示し、これらは日局ダイオウとして使用可能であることが明らかになった。RPII 型 Rp5 タイプである系統 17、18 で日局の規定を満足する検体が多かったが、系統 29 では 1 検体のみであった。一方、この検体ではこれまで定量した 17 化合物以外に Procyanidin 類など 6 化合物が同定され、系統 29 が多様な成分を含有していることが明らかになった。

LC-MS による分析を考えた場合には、HILIC カラム (Tosoh Amide-80) が分離パターン、使用溶媒とイオン化法との適切な組み合わせ等を鑑みたとき、最も優れた方法であり、縮合度が 4 までの Procyanidin 類の検出は比較的容易であった。

25) 地域企業との連携によるブランド生薬の開発—エゾウコギ

未熟種子の後熟処理—休眠打破処理を行った種子に対して、養液栽培を行い、発根、発芽、緑化、育苗及び屋内馴化までの一連の操作に成功した。播種した種子 611 粒の内、育苗まで至ったものは 100 個体であり、その割合は 16.4%であった。育苗まで至った植物体については、屋外馴化までを順調に行うことができた。今回は 86 個体を屋外で馴化させた。2013 年 12 月にすべての葉が落ちたが、2014 年 3 月現在、温室内で葉を展開させている。

葉の成分を LC/MS で分析した結果、カフェオイルキナ酸類の 5 化合物、フラボノイドの Rutin と Hyperoside 及びオリゴ糖を検出した。屋内馴化時の植物体の葉では 1,5-Dicaffeoylquinic acid、1,5-Dicaffeoyl-3-methoxyoxaloylquinic acid 及びオリゴ糖が主で、フラボノイドは少ないのに対し、屋外で約 2 ヶ月間馴化・栽培した植物体の葉では、1-Caffeoylquinic acid と

Hyperoside が増加した。

D. 考察

1) 「甘草」等の種苗生産システムの構築

閉鎖系栽培施設での水耕栽培に適し、高 GL 含量を示すウラルカンゾウ優良株を種々栽培条件で栽培した結果、北海道野外圃場では、わずか 434 日の栽培で、日本薬局方規格を満たす甘草が生産できることを確認し、本優良株は、圃場栽培での甘草生産にも適していることが確認できた。しかし、8 月及び 10 月に定植を行った株では翌春の萌芽率が著しく低下し、野外での栽培においては、定植時期及び移植初期の水管理が特に重要であることが判明した。より効果的な生産システム構築のためには、活着率及び萌芽率向上のための条件探索が必要である。

パミス水耕は 372-373 日間の栽培で、GL の日本薬局方規格値 2.5%以上を満たす根が得られ、収量も高く、性状に記載の径 0.5 cm 以上の根の割合も高かった。しかし、灰分が北海道野外の 1.7 倍であり、日本薬局方規格に適合しないものがあつた。灰分含量を低下させるための条件検討が必要である。

2013 年に実施した圃場栽培及び圃場筒栽培においては、4 月末定植の場合、約半年後に GL 含量 1.5%以上の根が得られることを確認したが、定植直後の乾燥による枯死（茨城県稲敷郡）、及び害虫の食害による生育障害と枯死が発生し、株の生存率低下の主因となつた。

厳密な水管理を実施した神奈川県相模原の圃場では、7 月中旬の乾燥期の定植であつたにも関わらず、高い生存率（18 株中 17 株生存：94.4%）が得られていることから、本優良株を用いた圃場栽培での安定した甘草生産には、定植直後の土壌中の水分管理、及び、地上部を食害する害虫の駆除が必須であると思われた。

水耕栽培で得られた地上茎を利用した甘草苗大量生産時に、副産物として得られる水滲出液は、他の植物の生育促進剤として利用出来ることを発見し特許を出願した。本発明は、未利用部位の新しい活用法を開拓する成

果である。

黄連水耕栽培においても、パミス水耕で有望であつたセリバオウレン培養苗は、他施設、他システムでの水耕栽培でも有望であつた。水耕栽培及び人工水耕一圃場ハイブリッド栽培による生薬生産の実用化には、特に優良苗の増殖と育成が重要であると思われる。

甘草、黄連以外の植物への展開として、麻黄の基原植物であるシナマオウについて、培養シュートを材料とした光独立栄養培養による効率的挿し木増殖法を検討し、68%の高い発根率が得られた。シナマオウについては、現在までに植物組織培養や挿し木による効率的増殖法に関してはほとんど報告がなく、特筆すべき成果である。

本年度は、基原植物として、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草 22 ロット・66 試料よりゲノム DNA を抽出し、その多くより *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 の部分配列を取得した。これらの配列中には、Gg 由来の新規イントロン配列が 2 種含まれていた。このうち、一方の配列は、約 300 bp であり、IV2 タイプのイントロン配列と増幅サイズが近いことから、本領域では、PCR の増幅サイズのみで基原植物を判別できないことが判明した。したがって、今後、確実に *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の遺伝子型を IV2 タイプと判定するには、PCR 産物の制限酵素処理、あるいは、配列解析等が必要であると考えられた。

Gi 試料 (M06-10) では、PCR の増幅が困難なものが多く、試料の状態からゲノム DNA の抽出が困難である可能性、プライマー設計部位に変異がある遺伝子を有している可能性等が考えられ、今後、*CYP88D6* 遺伝子の別部位、あるいは、*CYP72A154* 等、別遺伝子に対するプライマーを用いて検証する必要があると考えられた。また、以前、昭和大学の磯田先生より御供与いただいた Gi の葉のゲノム DNA からは、Gi 特異的な *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列として、Gg の g1 と 1 塩基異なる配列 (i1) を得ていたが、今回の Gi サンプルからは、i1 を得るこ

とができなかった。従って i1 配列は、昭和大学の株に特徴的な変異であった可能性が考えられ、g1 を有し、i1 を持たない個体も Gg であるとは言えない可能性が明らかとなった (Gg と Gi 両方の可能性あり)。ただし、成分分析結果から、Gi サンプルの一部からは、Gu 特徴的成分である GC、あるいは、Gg 特徴的成分である GB が検出されており、今後、Gi に特徴的成分であるリコカルコン A の分析を含め、より詳細な成分分析、あるいは、既に Gi の遺伝子識別において報告のある *matK* 領域等、他の遺伝子の配列情報と合わせて植物種を同定する必要があると考えられる。

配列情報を得ることができた 54 試料中 5 試料 (M06-②: Gi ⇔ IV1+IV2、M10-①: Gi ⇔ IV1+g1、MS12-①, ②: Gg ⇔ IV1+g1、M21-①: Gu ⇔ g1) で、基原植物情報と異なる *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列の遺伝子型が検出された。このうち、成分分析の結果から、M10-①では、Gu に特徴的成分 GC が、また、M12-①、M21-①では、Gg に特徴的成分 GB が検出されるなど、特に、M10-①及び M21-①では、遺伝子型のデータを裏付ける結果が得られた。

以上より、今後、これら基原植物情報と遺伝子型が一致しなかった試料については、より詳細な成分分析や他の遺伝子領域の配列情報と合わせて総合的に基原植物を判断する必要はあるが、本遺伝子領域が、甘草試料中の基原植物の識別 (Gu と Gg) にも有用であることが示された。

ウラルカンゾウにおける環境因子と GL 生産性の関係については、温度や土壌中の塩濃度等の GL 生産性に与える影響については研究例があるが、GL の生合成に関わる酵素遺伝子レベルでの環境因子との相関を解析した例はない。今回得られた GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析結果は、ウラルカンゾウの挿し木苗が GL 生合成酵素遺伝子群の発現変動の解析モデルとして使用できることを示すもので、今後、栽培環境因子等と各種遺伝子の発現変動との相関を解析に用いることができると考えられる。

ウラルカンゾウ組織培養物 Gu#11 及び、Gu2-3-2 のトランスクリプトーム解析により Gu2-3-2 において、*CYP88D6* の発現が検出されなかった。両者は、サンプリング個体の写真を見ると、Gu#11 においては、根の成長は認められるが細根の成長が芳しくないのに対し、Gu2-3-2 においては細根の成長が良い。この形態の差は、細根において *CYP88D6* の発現量が低いという realtime-PCR の解析の結果と矛盾しない。なお、両培養物は、使用する培地が異なっており、とくに植物ホルモンの添加が *CYP88D6* の発現レベルに影響した可能性もある。植物ホルモンの GL 生合成遺伝子群の発現調節に与える影響についても興味深い。

2) ハイテク生薬生産システム構築

今年度実施の UV 照射試験では、昨年度 (Sun et al., 2012) よりも黄化葉が少なかった。積算 UV 照射量は昨年度の試験で 456 kJ m^{-2} ($76.0 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1} \times 6$ 日間)、本試験では 570 kJ m^{-2} ($57.0 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1} \times 10$ 日間) であったことから、積算 UV 照射量と葉の黄化の程度との間には一定の関係はみられない。おそらく昨年度使用した UV-B の蛍光灯に含まれる UV-C 域の波長が原因と考えられた。

本試験における積算 UV 照射量は BL 区で 14.2 kJ m^{-2} であり、昨年度実施した Sun らの試験 (Sun et al., 2012) にある積算 UV 照射量 45.6 kJ m^{-2} より明らかに小であった。本試験と Sun らの報告とでは、苗齢や UV 光源の分光分布などが若干異なるものの、供試したウラルカンゾウのクローンや栽培方式、育苗時の栽培環境条件などは同じであり、ウラルカンゾウにおいても、暗期 UV 照射によって明期 UV 照射よりも少ない UV 照射量で薬用成分濃度を高められるものと推察した。

以上の結果より、本試験の範囲では 0.33 W m^{-2} の暗期 UV-B 照射では地上部の生育を阻害せず、ウラルカンゾウの根の薬用成分濃度を高められることが示された。

ウラルカンゾウ水耕栽培における水耕液循環量を検討した。ウラルカンゾウの生育量と GL 含量は、同様の傾向を示した。生育の

促進が GL 含量の増大に繋がることが示唆された。循環量 16 L min^{-1} では、いずれの個体も GL 含量が 2% 以上となったので、UV 照射など薬用成分含量向上を促す処理を行えば、GL 含量 2.5% 以上の個体を安定的に得られることが考えられる。

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を検討した。今回実施した試験では水耕液濃度が $1/8$ で最大となったが、より低い濃度で最大となる可能性があり、生産コストを考慮すればより低い濃度の水耕液での生育検討も必要であると考えられる。水耕液濃度はベルベリン含量に影響がないと考えられる。

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を調べた。光合成速度の値は、気温及び相対湿度に関わらずほぼ一定であるが、蒸散速度は気温や相対湿度が小さい方が大きい。蒸散速度が大きいとより水耕液を吸収することが推察されるので、生長速度は、高まることも考えられる。

光強度は $300 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で最大となったが、このような光強度で長時間照射すると葉焼け現象を起こすと考えられる。従って高い光強度で栽培する場合は、気温を下げるなど、焼けを防ぐ処置が必要であると思われる。

CO_2 濃度は、 $1,200 \mu \text{ mol mol}^{-1}$ で最大となったが、 $1,000 \mu \text{ mol mol}^{-1}$ 以上での差は少ないので、生産コストを考慮すれば $1,000 \mu \text{ mol mol}^{-1}$ で十分であると考えられる。

3) 生薬「甘草」等の評価 (安全性・有効性)

正イオン検出データを用いた多変量解析では、水耕栽培「甘草」と国内市場流通「甘草」は違うグループとして区別され、その違いを示す成分が数種見出されたが、「他のカンゾウ属生薬類」に比べると相対的に近い位置にグループ分けされた。一方、負イオンデータを用いた多変量解析では、水耕栽培「甘草」と国内市場流通「甘草」は同じグループとして認識され、「他のカンゾウ属生薬類」と区別するための指標成分が幾つか見出された。

黄連水耕栽培品は、市場流通品に比べて木部が少なく、発達が弱かった。道管や木部の発達が弱くなるのは、水耕栽培により水分が潤沢になったことに対する適応と考えられる。また、木部繊維群、石細胞群、師部繊維の発達が弱いのは、機械組織で植物体の強度を高める必要性が低下した結果と推定される。

甘草水耕栽培品は野生品に比べて道管径が小さいが、これは水耕栽培では水分が潤沢にあり、水分の通道にそれほど資源分配しなくてもよいよう適応した結果と推定される。また、シュウ酸カルシウム単晶が多数見られることは、養液中の塩類が野生状態に比べて多いことと対応している可能性が示唆される。

水耕栽培黄連全個体のベルベリン含量の平均値は 7.42% であり、市場品 5 検体の平均値 6.15% と比較して高い傾向であった。水耕栽培により日局のベルベリン規格値を満たす黄連の栽培が可能であることが確認された。

水耕栽培甘草は GL が日局規格値を満たす個体が 1 個体のみであった。試験区を比較すると、循環栽培方式は非循環方式と比較して、含量が高い傾向であった。また、栽培期間 29 ヶ月は 14 ヶ月と比較して含量が低く、栽培期間が長い個体でも、日局規格値への適合は認めなかった。GL 含量に対しては、栽培期間よりも循環方式の影響が大きいことが示唆された。

黄連、甘草とも乾燥減量、酸不溶性灰分については市場品とほぼ同様の範囲にあった。灰分は、市場品よりも高い傾向にあった。要因としては、水耕栽培時に使用する養液中の無機塩類の影響が考えられた。

水耕栽培黄連のヒ素及び水銀含量は市場品と比較してほぼ同様の範囲にあった。カドミウムと鉛含量は市場品と比較して特に低い傾向であり、水耕栽培品の有用性が示唆された。

支持体養液栽培甘草において、ヒ素含量が高かった要因として、養液中の成分組成の影響が考えられた。

更に GuIV1 の方が GuIV2 よりもヒ素含量が高い個体が多かったことから、株（クローン）による差の可能性も考えられた。

今年度、カンゾウ熱水抽出エキスの抗アレルギー活性の評価法として、機序の異なる二つのアレルギーモデルを構築し評価した。一つは T 細胞依存性アレルギー（IV 型アレルギー・遅延型アレルギー）の接触性皮膚炎モデルであり、もう一つは IgE 依存性アレルギー（I 型アレルギー・即時型アレルギー）の三相型のアレルギーモデルである。評価法はともに耳介の腫脹を測定する方法であり、測定技術の安定により信頼性の高いデータを得ることができた。

接触性皮膚炎モデルでは、100 mg/kg 相当のグリチルリチン酸を含むカンゾウエキスを、感作当日から惹起前日まで 7 日間反復投与することによる抗アレルギー効果が示された。今回の検討では市場流通品 3 品、水耕栽培品 3 品ともにほぼ同等の抑制効果が示されている。現在までに接触性皮膚炎におけるグリチルリチン酸、あるいはウラルカンゾウエキスの経口投与について評価している報告はなく、今回の結果は初めて示した結果である。

一方、三相型アレルギーモデルでは、抗 IgE 抗体による疑似感作後、TNCB でアレルギー反応を惹起させる一時間前に 100 mg/kg 相当のグリチルリチン酸を含むカンゾウエキスを単回投与することにより惹起後 72 時間経過した第三相の耳介の腫脹のみ抑制した。過去、Yamamoto ら (Yamamoto Y, et al., *Biol. Pharm. Bull.* 26(8): 1144-1149, 2003) は、45 mg/kg 相当のグリチルリチン酸を含むウラルカンゾウエキスの経口投与で、即時相、準即時相、遅発相の三相ともに炎症が抑制されたことを報告している。まず、この結果の違いを、最も激しい腫脹を示す第一相の抑制について考察した。彼らのカンゾウエキスの初回投与が惹起二時間前であったのに対し、今回の方法では惹起一時間前に投与したことが原因ではないかと考えられた。

そこでグリチルリチン酸の薬物動態について理解するために血中グリチルリチン酸

濃度を測定した。代謝物が血中に運搬されるのは少なくとも経口投与後 2-3 時間は必要であることが示された。さらに、ほぼ 12 時間後までは血中濃度が上昇し続けたことから、惹起前の経口投与を 2-8 時間前に設定すると、第一相の炎症抑制が顕在化する可能性が考えられた。

次に第三相の抑制についても検討した。Yamamoto らのモデルでは第三相の炎症が惹起後 7 日以降に誘導されているため、惹起翌日から 6 日後にかけて反復投与を行っている。ところが今回の実験系では第三相が惹起後 2-3 日に誘導されているため、マウスへの負担を考え、惹起後の投与を行わなかった。これも、抑制が認められなかった一因と考えられる。

しかしながら単回投与にも拘わらず、惹起後 72 時間での炎症抑制が示されていることから、グリチルリチン酸、あるいはカンゾウエキスの薬効は投与から 72 時間持続している可能性が考えられた。あるいは、第一相から第三相に至る炎症は一つのカスケードとして誘導され、異なる細胞群がエフェクターであることが報告されていることから、第一相の炎症を効果的に抑制することによって、それに続く第三相の炎症抑制にも影響する可能性が考えられた。

今後の改善点をあげると、1) 惹起前のエキス投与を 2-8 時間前にする、2) 必要であれば惹起後翌日にエキス投与を行う、の 2 点があげられた。さらに耳介の腫脹を測定する評価系では、データの信頼性を高める上で、ある程度の腫脹を誘導した病態から抑制効果を示すことが重要である。そのため、現在、疑似感作に用いる抗体濃度の検討を行っており、今後、最適な評価法を樹立しなおし検討を行う予定である。

今回我々が検討した二つの病態マウスモデルは、いずれもよく行われる実験系である。T 細胞依存型（遅延型）と IgE 依存型（即時型）という二つの機序の違いを示したが、いずれも初回の感作には、抗原提示細胞のアレルゲン提示による T 細胞の活性化、そして T 細胞依存的な B 細胞の活性化が必要だと考

えられている。T細胞依存的なアレルギーの発症は、アレルゲンを記憶したメモリーB細胞が再度アレルゲンに出会った時に反応し、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞を活性化し、炎症が誘導される。この反応は再度の抗原認識から数日間の時間が必要であるため、遅延型アレルギー反応と呼ばれる。それに対してIgE依存的なアレルギーの発症は、メモリーB細胞がIgE抗体を産生する形質細胞に分化して、過剰な抗原特異的なIgE抗体が既に産生されている状態である。抗原特異的IgE抗体は、一部、組織中の肥満細胞上のレセプターに結合し、再度アレルゲンに出会ったときにアレルゲンを認識して肥満細胞にシグナルを送り、炎症性化学物質を放出させる。これが、即時に発症する第一相、第二相のアレルギー炎症である。そして、肥満細胞同様、IgE受容体を発現している血中の好塩基球が遅発相である第三相の炎症を引き起こすと考えられている。

ヒトの場合、遅延型アレルギーである接触性皮膚炎は、医薬品、化学物質、天然物、金属などの低分子物との接触により感作が成立することが多い。また即時型アレルギーには花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどがあげられる。しかしヒトは、常に複数の抗原にさらされており、連続した感作を受けている。また他の炎症と合併することも珍しくなく、マウスのように明確ではない。そのような理由から、有効性評価のためにいくつかのタイプのアレルギーモデルを検討する必要があると考えられた。

本研究で我々は、T細胞依存的に炎症誘導されるアレルギー性接触性皮膚炎モデルマウスに対して、市場流通品カンゾウ、水耕栽培品カンゾウ、各3品の熱水抽出エキスが抗アレルギー効果を有することを示した。また、IgE依存的に炎症誘導される三相型アレルギーモデルマウスについては、好塩基球がエフェクターとなっていると思われる遅発相の炎症が一部抑制される傾向にあったが、未だ明らかではない。今後、実験系の改善を含め、さらなる検討を行うとともに、カンゾウエキスで病態の改善が報告されている、細菌性肝

炎、アレルギー性喘息モデルなど、他のアレルギー性疾患についても検討を試みようと考えている。

4) 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：シャクヤクの採花方法として「1株に8本の茎を残すように採花」は、「着蕾茎数の半数を採花」と比較して、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。ただし、根の収量の減少は避けられなかった。今後、採花なし及び採花方法の異なる2方法における根の成分含量を比較し、「1株に8本の茎を残すように採花」で得られた根の薬用の可能性を明らかにする予定である。

根の加工調製法については、根を約1ヶ月間低温貯蔵することにより、顕著ではないもののPaeoniflorin含量が増加傾向を示した。また、皮去り加工によりAlbiflorin及びCatechinの含量の減少が見られた。個体間の成分含量のばらつきが大きかったため、再度個体数を増やし、最適な加工・乾燥法を決定する予定である。

根における4化合物の組織内分布をイメージングMSで検討した結果、Albiflorinは周皮に局在し、皮層にも存在し、Catechinは周皮と皮層に多い傾向が認められた。Paeonolは皮層と師部付近に局在が見られた。したがって、皮去り加工でAlbiflorin及びCatechinの含量の減少が見られた結果は、2化合物の存在部位からも当然の結果であった。今回、Paeonolについては定量結果がないが、材料が白芍系の「梵天」であったからである。赤芍においてPaeonolの存在は薬効に係わるものと考えられることから、赤芍系の園芸品種については皮去り加工は行うべきでないを考える。一方、デンプン質に富む栽培品種を白い芍薬として作り出すためには、酵素失活のための熱処理（湯通し）、乾燥を容易にするための皮去りが必要となる。「芍薬」ではPaeoniflorinやPentagalloylglucoseが重要であるため、これらの組織内分布を調べる必要がある。

Paeoniflorin については、MALDI-TOF-MS による分析で、Albiflorin と異なり $[M+Na]^+$ (m/z 503) のみが検出された。さらに、ポストソース分解を行ったところ、 m/z 179 のフラグメントイオンが観察された。今後、Paeoniflorin のフラグメントパターンなどを詳細に検討し、Paeoniflorin の検出を試みる予定である。

ダイオウ：長野県菅平の薬草栽培試験地においても、北海道名寄の薬用植物資源研究センター北海道研究部においても、*R. palmatum* の系統 29 と系統 38 が比較的良好な生育を示した。

系統 29 は太い根が数本発達するという本来の形態を維持していたが、系統 38 は紡錘形の根茎ができず、本来の形態ではなかった。現在の栽培品の形態では、系統 29 が収量の点で優れている。一方、中国産の生薬「大黃」で品質評価を行った結果から、RPI 型 Rp4 タイプに属する系統 38 の方が優れていると予想される。RPII 型 Rp5 タイプ(系統 29 など)がこれに次ぐ。系統 38 については日本で育てた 5 年生株の地下部について未だ成分研究を行っていない。現在、3 年生株の地下部について検討中であり、3~5 年生の根茎及び根の成分研究の結果を見て、品質を判断したい。なお、系統 38 に関しては紡錘形の根茎を如何に作らせるかが課題である。

栽培 5 年目の *R. palmatum* 6 系統(系統 15, 17, 18, 29, 43, 45) 17 検体は、昨年度の成分分析の結果において、根または根茎の Sennoside A 含量が 0.23%以上を示した。そこで、これらについて局方試験を実施した結果、11 検体が日局「ダイオウ」として使用可能であることが明らかになった。RPII 型 Rp5 タイプである系統 17, 18 で日局の規定を満足する検体が多かったが、系統 29 では 1 検体のみであった。

Sennoside A 含量が昨年度に比べ低値を示した理由として、乾燥した根または根茎からのサンプリングの仕方が係わっていると考えられる。材料を少量取って粉末にするか、比較的多量を粉末にして、定量試験に供する

かどうかの違いであろう。少量を取る場合は、Sennoside A 含量が 0.40%以上でないと局方試験時には合格しないという結果であった。系統 29 では 1 検体だけが Sennoside A 含量が 0.25%以上であったが、この検体を LC/MS で分析した結果、昨年度定量した 17 化合物以外に、Procyanidin 類など 6 化合物が同定され、系統 29 が多様な成分を含有していることが明らかになった。HILIC カラム (Tosoh Amide-80) を用いた分析でも Procyanidin 類の dimer から tetramer までは検出された。以上の結果から、昨年度の結論と同様に、系統 29 が優れたダイオウの系統であり、今後は Sennoside A 含量を高める方策を考える必要がある。

エゾウコギ：エゾウコギの種子に対し、後熟処理から育苗、馴化まで一連の栽培を行い、今回設定した方法で養液栽培が可能であることが明らかになった。ただし、育苗までの成功率は 16.4%であった。低かった要因として、未熟種子の後熟処理及び休眠打破処理の期間の長さが考えられる。富山県薬用植物指導センターで後熟処理及び休眠打破処理を行った種子では、発根率や育苗まで至った個体数に系統間で差が見られ、No. 10 が良好で No. 1~No. 3 は劣った。一方、昭和大学薬用植物園で同処理を行った種子では、No. 1 と No. 3 で育苗まで至った個体数が多かった。両機関の方法を比べた場合、後熟処理の期間、休眠打破処理の期間がともに昭和大学薬用植物園の方が長かった。次期の栽培ではこの点を改善する計画である。

E. 結論

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に供し、得られた苗を種々条件で栽培した。2012-2013 年の栽培試験の結果、パミス水耕栽培だけでなく、北海道野外圃場で 434 日間栽培して得た植物の根も GL 含量が 2.5%以上であり、日本薬局方規格値を満たすことを確認した。2013 年に実施し

た茨城県稲敷郡での野外圃場栽培、及び広島県福山市での野外圃場筒栽培では、定植後約半年の乾燥根の GL 含量が 1.5%以上であることを確認した。また、ウラルカンゾウ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。さらに、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結果、1 年間のパミス水耕で日本薬局方規格値を満たす「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本薬局方規格値を満たす「黄連」の生産が可能であることを確認した。甘草、黄連以外の植物への展開として、麻黄の基原植物であるシナマオウについて、培養シュートを材料とした光独立栄養培養による効率的挿し木増殖法を検討し、炭酸ガス 1,000ppm、光強度 10,000 lux 条件下において、酸化型グルタチオン 50 mg/L を培地に添加することにより、68%の高い発根率が得られた。

カンゾウ属植物の優良株等の遺伝子識別法開発を目的とし、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草 22 ロット・66 試料について、主成分の GL 生合成の鍵酵素の一つと考えられる *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列の解析を行った。その結果、Gg 由来の新規配列 2 種を含むカンゾウ属植物の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列情報を集積し、より精度の高いカンゾウ属植物の遺伝子識別が可能となった。一部試料では、基原植物情報と異なる遺伝子型が検出されたが、成分分析情報から判定遺伝子型が裏付けられ、本遺伝子領域が、甘草試料中の基原植物の識別 (Gu と Gg) にも有用であることが示された。

また、ウラルカンゾウの根における GL の高効率生産条件の探索を目的とし、ウラルカ

ンゾウ優良株 3 種の挿し木苗の根における、 β -アミリン合成酵素遺伝子 (*bAS*)、シトクロム P450 遺伝子 (*CYP88D6* および *CYP72A15A*) の 3 種の遺伝子の発現量を、解析、比較した。その結果、根の径が太い根基部の方が、径の細い根端部と比較して、3 遺伝子とも、その発現量が高い傾向があることが明らかになった。これらの GL 生合成経路の酵素遺伝子の発現量は根の成長 (径) と関係があるものと考えられる。また、上記の結果は、ウラルカンゾウ挿し木苗の根が GL 生合成遺伝子群の環境因子等に因る発現変動の解析モデルとして使用できる可能性を示すものである。

2) ハイテク生薬生産システム構築

・ウラルカンゾウ

暗期中の UV-B 照射でも明期照射と同様に薬用成分濃度が増加することが示された。また、暗期の UV-B 照射では明期よりも少ないエネルギー量で薬用成分濃度を高められることが示された。

水耕液循環量 16 L min^{-1} で生育量及び GL 含量が最大となり、薬用成分含量向上を促す処理を行えば、安定的に GL 含量 2.5%以上の個体を得られる可能性が示された。

・セリバオウレン

水耕液濃度 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、水耕液濃度にかかわらず日本薬局方の規格値よりも高い値となった。

光合成蒸散測定試験の結果を総合的に判断すると気温・相対湿度を低い値に設定し、光強度・ CO_2 濃度を高い値に設定すると生育を促進できる可能性が高いと考えられる。

3) 生薬「甘草」等の評価 (安全性・有効性)

人工水耕栽培「甘草」と国内市場流通「甘草」の同等性や差異を評価する方法として、中国市場流通品など「他のカンゾウ属生薬類」を含めた試料の LC-MS/MS 分析を行い、正負両検出データを用いた多変量解析を行った。

負イオン検出データを用いた多変量解析

において、水耕栽培「甘草」と国内市場流通「甘草」の同等性を示すデータが得られた。

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（性状、乾燥減量、成分定量、確認試験、灰分、酸不溶性灰分）及び個別元素を測定した。甘草は水耕栽培月数、循環量が異なる2株（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。

カンゾウ水耕栽培品熱水抽出エキスの抗アレルギー活性の評価を行った。T細胞依存性アレルギーである接触性皮膚炎マウスモデルにカンゾウエキスを経口投与したところ、グリチルリチン酸単独、あるいは市場流通品カンゾウエキスと同等の抗アレルギー活性を示した。接触性皮膚炎におけるカンゾウエキスの効果についての初めての報告である。一方、IgE依存性の三相型アレルギー

モデルについて、第一相と第三相に誘導される炎症について抑制効果を検討したが、部分的な抑制効果しか得られなかった。エキス投与時間と、誘導する炎症の程度について改善の余地があるため、今後も検討を続ける。

4) 地域企業との連携によるブランド生薬の開発

シャクヤク：シャクヤク園芸品種の切花収穫時に「1株に8本の茎を残すように採花」する方法の採用により、根の収量減少は避けられないものの、翌年の着蕾茎数にはほとんど影響せず、園芸と薬用の双方で安定した生産が期待できることが明らかになった。

収穫した根は新鮮な状態のまま約1ヶ月間低温貯蔵し、水洗後、湯通しして、周皮を竹べらで除き、室内で自然乾燥する方法が最もよい成分含量を示したが、個体間の成分含量のばらつきも大きく、再検討が必要である。また、品種が白芍系か赤芍系か、「白芍」と「赤芍」のどちらの生薬を生産するのかにより、加工方法を変える必要もある。皮去り加工によりAlbiflorin及びCatechinの含量の減少が見られたが、イメージングMSによるこれら2化合物の組織内分布の結果もこれを指示した。すなわち、Albiflorinは周皮に局在し、皮層にも存在し、Catechinは周皮と皮層に多い傾向認められた。Paeonolは皮層と師部付近に局在していたことから、「赤芍」を生産する場合、皮去りを考慮する必要がある。中国産「白芍」では白く仕上げる目的で硫黄による燻蒸が行われることがあるが、この硫黄はPaeoniflorin sulphonateとして検出される。生薬に残留する硫黄の検出にはHPLC法の他、蛍光X線分析も有用な手法であった。

ダイオウ：*R. palmatum*の系統でRPII型Rp5タイプの系統29とRPI型Rp4タイプの系統38は、菅平薬草栽培試験地及び薬用植物資源研究センター北海道研究部の圃場において比較的良好な生育を示し、両系統が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唆された。

栽培 5 年目の根（根茎）17 検体について局方試験を行った結果、11 検体は日局ダイオウとして使用可能であったが、6 検体は Sennoside A 含量が 0.25%未満で、日局不適であった。日局適の検体は RPII 型 Rp5 タイプの系統 17 及び系統 18 で多かったが、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。今後、系統 29 において Sennoside A 含量を増やす工夫が必要である。今回は Procyanidin 類の単離同定と LC-MS 分析法の検討を行い、HILIC カラムが分離パターン、使用溶媒とイオン化法との適切な組み合わせ等を鑑み、最も優れた方法であり、縮合度が 4 までの Procyanidin 類の検出が比較的容易であることを示した。

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。一方、屋内馴化時に収穫した葉を LC/MS 分析し、カフェオイルキナ酸類の 1,5-Dicaffeoylquinic acid 及び 1,5-Dicaffeoyl-3-methoxyoxaloylquinic acid が主要な化合物であることを明らかにした。さらに、養液栽培後、屋外で約 2 ヶ月間馴化させることにより、1-Caffeoylquinic acid 及びフラボノイドの Hyperoside が増加することも明らかにした。これらの化合物には各種生物活性が報告されていることから、葉を健康食品として利用することは可能であろう。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉松嘉代、乾貴幸：植物工場における薬用植物の栽培・生産。特産種苗、**16** (9)、35-41 (2013)。

- 2) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、湊野裕之、川原信夫、工藤善、高橋豊、新穂大介、田村幸吉、大月典子、亀山浩：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。甘草研究最前線 2013、第 6 回甘草に関するシンポジウム研究発表記録、甘草に関するシンポジウム実行委員会編、50-61、2013。
- 3) 大月典子、亀山浩、工藤善、杉山圭一、阿部裕、六鹿元雄、伊藤裕才、多田敦子、杉本直樹、湊野裕之、吉松嘉代、川原信夫：人工水耕栽培により生産した甘草の安全性評価に関する研究。甘草研究最前線 2013、第 6 回甘草に関するシンポジウム研究発表記録、甘草に関するシンポジウム実行委員会編、62-66、2013。
- 4) Sun, R., Hikosaka, S., Goto, E., Sawada, H., Saito, T., Kudo, T., Ohno, T., Yoshimatsu, K., Kawano, N., Inui, T. and Kawahara, N.: Effects of post-harvest storage and drying temperatures on four medicinal compounds in the root of Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*), Environmental Control in Biology, 54, 149-155 (2013)。
- 5) 杉本直樹、亀山浩：コチニール色素とアレルギー、公衆衛生、77、833-837 (2013)
- 6) Minegishi, Y., Mano, J., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R.: Development and evaluation of a novel DNA extraction method suitable for processed foods, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 20, 96-104 (2013)。
- 7) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Teshima, R., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K.: Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection

- Method for Genetically Modified 55-1
Papaya, *J. AOAC Int.*, 96, 1054-1058
(2013)
- 8) Ohmori, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Hamaoka, S., Makiyama, H., Sakata, K., Kasahara, M., Kitta, K., Fujimaki, T., Teshima, R.: A DNA Extraction and Purification Method using an Ion-exchange Resin -type Kit for the Detection of Genetically Modified Papaya from Processed foods, *Food Control*, 32, 728-735 (2013).
 - 9) Takabatake, R., Takashima, K., Kurashima, T., Mano, J., Furui, S., Kitta, K., Koiwa, T., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Minegishi, Y.: Interlaboratory Study of Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Maize Events MON810, Bt11 and GA21, and CaMV P35S, *J. AOAC Int.*, 96, 1-7 (2013)
 - 10) Takabatake, R., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Kurashima, T., Mano, J., Furui, S., Kitta, K.: Development and Interlaboratory Validation of Quantitative PCR Method for Screening Analysis of Genetically Modified Soybeans. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 36, 131-134 (2013)
 - 11) Koizumi, D., Shirota, K., Akita, R., Oda, H., Akiyama, H.: Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods, *Food Chem.*, 150, 348-352 (2014).
- ## 2. 学会発表
- 1) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、淵野裕之、川原信夫、工藤善、高橋豊、新穂大介、田村幸吉、大月典子、穂山浩：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. 第6回甘草に関するシンポジウム (2013. 7. 6、札幌)
 - 2) 大月典子、穂山浩、工藤善、杉山圭一、阿部裕、六鹿元雄、伊藤裕才、多田敦子、杉本直樹、淵野裕之、吉松嘉代、川原信夫：人工水耕栽培により生産した甘草の安全性評価に関する研究. 第6回甘草に関するシンポジウム (2013. 7. 6、札幌)
 - 3) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代：新規カンゾウ優良株選抜法. 日本生薬学会第60回年会 (2013. 9. 7-8、札幌)
 - 4) 河野徳昭、吉松嘉代、鈴木秀幸、斉藤和季、川原信夫：薬用植物総合情報データベースの構築-薬用植物のEST情報の整備-. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12、札幌)
 - 5) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代：ウラルカンゾウ新規優良株の育成. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12、札幌)
 - 6) 乾貴幸、矢野宏、酒井あゆみ、加藤さやか、河野徳昭、川原信夫、吉松嘉代：オタネニンジン実生苗の水耕栽培. 日本薬学会134年会 (2014. 3. 28-30、熊本)
 - 7) 河野徳昭、乾貴幸、吉松嘉代、川原信夫：ウラルカンゾウにおけるグリチルリチン酸生合成酵素遺伝子の発現解析. 日本薬学会134年会 (2014. 3. 28-30、熊本)
 - 8) 彦坂晶子、吉野千里、孫蕊、後藤英司、澤田裕樹、工藤善、大野貴子、早雲まり子、吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、川原信夫：温室環境下におけるカンゾウの生育および薬用成分の季節変動と補光効果. 日本生物環境工学会2013年香川大会講演要旨、p 118-119 (2013. 9. 2-5、香川)
 - 9) 小俣洋奈、久木田卓弥、片山茂、大月典子、穂山浩、中村宗一郎：THP-1 由

- 来樹状細胞のハプテン抗原を標的としたアレルギー性評価法の確立」、第 26 回日本動物細胞工学会 (2013. 10)
- 10) 多田敦子、石附京子、末松孝子、有福和紀、伊藤裕才、大槻 崇、大月典子、吉松嘉代、川原信夫、山崎 壮、杉本直樹、穠山 浩：カンゾウ油性抽出物の成分組成に基づく解析、日本食品化学学会第 19 回 総会・学術大会 (2013. 8)
 - 11) 片山 茂、小俣洋奈、大月典子、穠山浩、中村宗一郎：THP-1 由来樹状細胞の抗原提示能を指標としたコチニール色素のアレルギー性評価、日本食品化学学会第 19 回 総会・学術大会 (2013. 8)
 - 12) 大月 典子、杉本 直樹、伊藤 裕才、建部 千絵、佐藤 恭子、梅本 尚之、深溝慶、穠山 浩：カルミン酸とタンパクの反応性に関する検討、第106回日本食品衛生学会学術講演会 (2013. 11)
 - 13) 朱姝、于曉麗、白石史遠、小松かつ子、村上守一、田村隆幸：Genetic characterization of White/Red Peony roots and the horticultural cultivars of *Paeonia lactiflora* by nuclear rDNA ITS sequences. 日本薬学会第133年会 (2013. 3. 28-30、横浜)
 - 14) 于曉麗、朱姝、吳煜秋、小松かつ子、村上守一、田村隆幸：芍薬の成分的多様性の解析(2) —白芍・赤芍の成分的差異と園芸品種の薬用資源としての可能性. 日本薬学会第133年会 (2013. 3. 28-30、横浜)
 - 15) 平修、朱姝、小松かつ子、磯田進、吉松嘉代：イメージング質量分析を用いたダイオウの二次代謝産物の組織内分布. 第30回和漢医薬学会学術大会 (2013. 8. 31-9. 1、金沢).
 - 16) 小松かつ子、冷正鵬、白焱晶、朱姝、葛躍偉、伏見裕利、村上守一、田村隆幸、中曾根亨、吉松嘉代：ダイオウの圃場栽培と優良系統の選抜. 日本生薬学会第60回(2013年)年会 (2013. 9. 7-8、北海道)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸：植物生長促進剤 出願番号 特願 2013-105525、出願日 平成 25 年 5 月 17 日
 - 2) 新穂大介、吉松嘉代：皮膚化粧品及び頭髮化粧品 出願番号 特願 2013-234010、出願日 平成 25 年 11 月 12 日
 - 3) 乾貴幸、吉松嘉代、河野徳昭：ウコギ科薬用植物の栽培方法 出願番号 特願 2013-263365、出願日 平成 25 年 12 月 20 日
 - 4) 根岸直希、浦田信明、大島玲子、河岡明義：挿し木苗の生産方法 出願番号 特願 2013-109139、出願日：2013 年 5 月 23 日
 - 5) 澤田裕樹、工藤 善、大野貴子、早雲まり子、後藤英司、彦坂晶子：カンゾウ属植物の薬用成分濃度向上方法 特願 2013-114417、出願日：平成 25 年 5 月 30 日

平成25年度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（H24-創薬総合一般-007）
分担研究報告書

分担研究課題：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—

研究分担者 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 ウラルカンゾウ優良株3種、GuTS71-08IV1（以下、GuIV1）、GuTS71-08IV2（以下、GuIV2）及びGuTS71-08No. 11（以下、Gu#11）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に供し、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日間栽培して得た植物の根もグリチルリチン酸含量が2.5%以上であり、日本薬局方規格値を満たすことを確認した。また、ウラルカンゾウ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。さらに、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本薬局方規格値を満たす「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本薬局方規格値を満たす「黄連」の生産が可能であることを確認した。

研究協力者

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

河野徳昭 同 筑波研究部 主任研究員
乾 貴幸 同 筑波研究部 特任研究員
寺岡秀興 同 筑波研究部 特任研究員
北澤 尚 同 筑波研究部
主任技術専門員

菱田敦之 同 北海道研究部
研究サブリーダー

林 茂樹 同 北海道研究部 研究員

杉村康司 同 種子島研究部
研究サブリーダー

武田修己 東京生薬協会

田村幸吉 丸善製薬株式会社研究開発本部
甘草研究所 所長

新穂大介 同 甘草研究課 主任

桑原侑己 同 甘草研究課 研究員

工藤 善 鹿島建設株式会社 上席研究員

A. 研究目的

超高齢社会の日本では漢方薬を処方される例が増え漢方薬市場は急成長している。生薬「甘草」は、漢方処方の70%以上に配合され、漢方薬原料として最も重要であり、また、食品及び食品添加物としても重要である。しかし、その供給は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、今後益々その確保が困難になると予想されている。また、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、最も汎用され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薬を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の推進のため、経済性・汎用性の高い栽培システムの構築を行う。

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、ミリオンA 50 g、ハイドロボール中粒 1000 g、ハイドロボール小粒 1000 gを積層させたポリポット（上径 15 cm、下径 10.5 cm、高さ 30.5 cm）またはパミス®（大江化学工業）を積層させたポリポット（同上）に植付け、養液肥料（大塚ハウス 1 号 6.0g + 大塚ハウス 2 号 4.0 g/8L、適宜濃度を変更）をポット下方より与えながら閉鎖温室内（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バー（GC）室内（25℃、16 時間明期、相対湿度 60%）で水耕栽培した。

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/トレイ：水量約 5L）を与え、発根後の苗はマグアンプ 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。

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。

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

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 (図 1) 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 (図 2)。

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 (図 2)。

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 (図 3)。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。

2) 種々栽培環境条件下で生産した甘草 (根) の評価

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 (図 4)。

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、グリチルリチン酸含量が日局規格値 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 (図 4)。

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 (図 5)。

3) 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（図 6～8）。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（図 9）。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（図 10）。本 Gu 水は、新規植物生長剤として特許を出願した。

4) 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（図 11）。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（図 12）。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。

D. 考察

閉鎖系栽培施設での水耕栽培に適し、高グリチルリチン酸含量を示すウラルカンゾウ優良株を種々栽培条件で栽培した結果、北海道野外圃場では、わずか 434 日の栽培で、日本薬局方規格を満たす甘草が生産できることを確認し、本優良株は、圃場栽培での甘草生産にも適していることが確認できた。しかし、8 月及び 10 月に定植を行った株では翌春の萌芽率が著しく低下し、野外での栽培においては、定植時期及び移植初期の水管理が特に重要であることが判明した。より効果的

な生産システム構築のためには、活着率及び萌芽率向上のための条件探索が必要である。

パミス水耕は 372-373 日間の栽培で、グリチルリチン酸の日本薬局方規格値 2.5%以上を満たす根が得られ、収量も高く、性状に記載の径 0.5 cm 以上の根の割合も高かった。しかし、灰分が北海道野外の 1.7 倍であり、日本薬局方規格に適合しないものがあつた。灰分含量を低下させるための条件検討が必要である。

水耕栽培で得られた地上茎を利用した甘草苗大量生産時に、副産物として得られる水滲出液は、他の植物の生育促進剤として利用出来ることを発見し特許を出願した。本発明は、未利用部位の新しい活用法を開拓する成果である。

黄連水耕栽培においても、パミス水耕で有望であつたセリバオウレン培養苗は、他施設、他システムでの水耕栽培でも有望であつた。

水耕栽培及び人工水耕—圃場ハイブリッド栽培による生薬生産の実用化には、特に優良苗の増殖と育成が重要であると思われる。

E. 結論

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に供し、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 日間栽培して得た植物の根もグリチルリチン酸含量が 2.5%以上であり、日本薬局方規格値を満たすことを確認した。また、ウラルカンゾウ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。さらに、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結果、1 年間のパミス水耕で日本薬局方規格値を満たす「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本薬局方規格値を満たす「黄連」の生産が可能であることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉松嘉代、乾貴幸：植物工場における薬用植物の栽培・生産. 特産種苗、**16** (9)、35-41 (2013).
- 2) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、湊野裕之、川原信夫、工藤善、高橋豊、新穂大介、田村幸吉、大月典子、穂山浩：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. 甘草研究最前線 2013、第6回甘草に関するシンポジウム研究発表記録、甘草に関するシンポジウム実行委員会編、50-61、2013.
- 3) 大月典子、穂山浩、工藤善、杉山圭一、阿部裕、六鹿元雄、伊藤裕才、多田敦子、杉本直樹、湊野裕之、吉松嘉代、川原信夫：人工水耕栽培により生産した甘草の安全性評価に関する研究. 甘草研究最前線 2013、第6回甘草に関するシンポジウム研究発表記録、甘草に関するシンポジウム実行委員会編、62-66、2013.
- 4) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代：新規カンゾウ優良株選抜法. 日本生薬学会第60回年会 (2013. 9. 7-8、札幌)
- 5) 河野徳昭、吉松嘉代、鈴木秀幸、斉藤和季、川原信夫：薬用植物総合情報データベースの構築-薬用植物の EST 情報の整備-. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12、札幌)
- 6) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代：ウラルカンゾウ新規優良株の育成. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12、札幌)
- 7) 乾貴幸、矢野宏、酒井あゆみ、加藤さやか、河野徳昭、川原信夫、吉松嘉代：オタネニンジン実生苗の水耕栽培. 日本薬学会134年会 (2014. 3. 28-30、熊本)
- 8) 河野徳昭、乾貴幸、吉松嘉代、川原信夫：ウラルカンゾウにおけるグリチルリチン酸生合成酵素遺伝子の発現解析. 日本薬学会134年会 (2014. 3. 28-30、熊本)

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、湊野裕之、川原信夫、工藤善、高橋豊、新穂大介、田村幸吉、大月典子、穂山浩：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. 第6回甘草に関するシンポジウム (2013. 7. 6、札幌)
- 2) 大月典子、穂山浩、工藤善、杉山圭一、阿部裕、六鹿元雄、伊藤裕才、多田敦子、杉本直樹、湊野裕之、吉松嘉代、川原信夫：人工水耕栽培により生産した甘草の安全性評価に関する研究. 第6回甘草に関するシンポジウム (2013. 7. 6、札幌)
- 3) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代：新規カンゾウ優良株選抜法. 日本生薬学会第60回年会 (2013. 9. 7-8、札幌)
- 4) 河野徳昭、吉松嘉代、鈴木秀幸、斉藤和季、川原信夫：薬用植物総合情報データベースの構築-薬用植物の EST 情報の整備-. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12、札幌)
- 5) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代：ウラルカンゾウ新規優良株の育成. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12、札幌)
- 6) 乾貴幸、矢野宏、酒井あゆみ、加藤さやか、河野徳昭、川原信夫、吉松嘉代：オタネニンジン実生苗の水耕栽培. 日本薬学会134年会 (2014. 3. 28-30、熊本)
- 7) 河野徳昭、乾貴幸、吉松嘉代、川原信夫：ウラルカンゾウにおけるグリチルリチン酸生合成酵素遺伝子の発現解析. 日本薬学会134年会 (2014. 3. 28-30、熊本)

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸：植物生長促進剤. 出願番号 特願 2013-105525、出願日 平成 25 年 5 月 17 日
- 2) 新穂大介、吉松嘉代：皮膚化粧料及び頭髮化粧料. 出願番号 特願 2013-234010、出願日 平成 25 年 11 月 12 日
- 3) 乾貴幸、吉松嘉代、河野徳昭：ウコギ科薬用植物の栽培方法. 出願番号 特願 2013-263365、出願日 平成 25 年 12 月 20 日