

表 1. 分析甘草試料

No.	ID	基原	入手先		入手年	形態	サンプリング量 (mg)			
							①	②	③	④
M01	GgA①	<i>G. glabra</i>	アフガニスタン	①	2001年3月	原形	282	253	335	319
M02	GgA②	<i>G. glabra</i>	アフガニスタン	②	2003年11月	原形	348	295	344	—
M03	GgA③	<i>G. glabra</i>	アフガニスタン	③	2006年3月	原形	310	257	252	262
M04	GgA④	<i>G. glabra</i>	アフガニスタン	④	2012年1月	原形	280	281	231	313
M05	GgA⑤	<i>G. glabra</i>	アフガニスタン	⑤	2013年1月	原形	226	305	296	303
M06	GiS①	<i>G. inflata</i>	中国(新疆)	①	2000年3月	原形	271	334	348	—
M07	GiS②	<i>G. inflata</i>	中国(新疆)	②	2007年2月	原形	318	327	306	—
M08	GiS③	<i>G. inflata</i>	中国(新疆)	③	2007年10月	原形	265	232	253	238
M09	GiS④	<i>G. inflata</i>	中国(新疆)	④	2012年6月	原形	225	299	213	213
M10	GiS⑤	<i>G. inflata</i>	中国(新疆)	⑤	2012年11月	原形	267	297	280	274
M11	GuCN①	<i>G. uralensis</i>	中国(寧夏)	①	2011年12月	原形	330	368	392	—
M12	GgK①	<i>G. glabra</i>	カザフスタン	①	2008年3月	原形	250	315	313	—
M13	GgK②	<i>G. glabra</i>	カザフスタン	②	2009年10月	原形	276	243	253	255
M14	GgU①	<i>G. glabra</i>	ウズベキスタン	①	2010年7月	原形	279	313	291	323
M15	GgC①	<i>G. glabra</i>	CIS (中央アジア)	①	2012年1月	原形	297	224	269	308
M16	GuMK①	<i>G. uralensis</i>	モンゴル(Khovd)	①	2009年5月	原形	302	253	250	289
M17	GuMB①	<i>G. uralensis</i>	モンゴル(Bayan Khongor)	②	2009年5月	原形	337	290	264	245
M18	GuCG①	<i>G. uralensis</i>	中国市場品(広州)	①	2009年11月	刻み	302	253	250	289
M19	GuCG②	<i>G. uralensis</i>	中国市場品(広州)	②	2009年11月	刻み	337	288	264	245
M20	GuCG③	<i>G. uralensis</i>	中国市場品(広州)	③	2013年6月	刻み	282	285	283	274
M21	GuCH①	<i>G. uralensis</i>	中国市場品(湖北)	①	2010年8月	刻み	251	240	257	251
M22	GuCH②	<i>G. uralensis</i>	中国市場品(湖北)	②	2010年8月	刻み	2個	2個	3個	4個
							296	242	294	254
							1個	2個	1個	3個

サンプリング試料のうち、①は、遺伝子解析及び成分分析に使用し、
②、③は、遺伝子解析に使用

表 2. *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の PCR 増幅産物のサイズから予測された各甘草試料の遺伝子型

No.	M01	M02	M03	M04	M05	M06	M07	M08	M09	M10	M11
ID	GgA①	GgA②	GgA③	GgA④	GgA⑤	GiS①	GiS②	GiS③	GiS④	GiS⑤	GiCN①
基原	<i>G. glabra</i>	<i>G. glabra</i>	<i>G. glabra</i>	<i>G. glabra</i>	<i>G. glabra</i>	<i>G. inflata</i>	<i>G. inflata</i>	<i>G. inflata</i>	<i>G. inflata</i>	<i>G. inflata</i>	<i>G. uralensis</i>
試料1	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	x	IV1/g	IV1/g	IV2
試料2	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV2+IV1/g	IV1/g	IV1/g	x	IV1/g	IV2
試料3	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	x	IV1/g	x	IV1/g	x	IV2+IV1/g
No.	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22
ID	GgK①	GgK②	GgU①	GgC①	GuMK①	GuMB①	GuCG①	GuCG②	GuCG③	GuCH①	GuCH②
基原	<i>G. glabra</i>	<i>G. glabra</i>	<i>G. glabra</i>	<i>G. glabra</i>	<i>G. uralensis</i>	<i>G. uralensis</i>	<i>G. uralensis</i>	<i>G. uralensis</i>	<i>G. uralensis</i>	<i>G. uralensis</i>	<i>G. uralensis</i>
試料1	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV1/g	x	IV2+IV1/g	IV2+IV1/g	IV2+IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV2
試料2	IV1/g	IV1/g	IV2+IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV2+IV1/g	x	IV2+IV1/g	IV1/g	IV2	IV2
試料3	IV1/g	IV1/g	IV1/g	IV2	IV2	IV2+IV1/g	IV2+IV1/g	IV2+IV1/g	IV2+IV1/g	IV2	IV2

x は、電気泳動にて増幅産物が確認されなかった試料を示す

表 3. PCR 及びダイレクトシーケンスによる各試料の *CYP88D6* 相同遺伝子型判定結果

No.	ID	基原	試料①	試料②	試料③	判定遺伝子型
M01	GgA①	<i>G. glabra</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	Gg
M02	GgA②	<i>G. glabra</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	<i>g1+g2</i>	Gg
M03	GgA③	<i>G. glabra</i>	<i>g1</i>	?	<i>g1</i>	Gg
M04	GgA④	<i>G. glabra</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	Gg
M05	GgA⑤	<i>G. glabra</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	Gg
M06	GiS①	<i>G. inflata</i>	<i>g1</i>	<i>IV2+IV1</i>	—	Gg 及び <i>GuIV2+GuIV1</i>
M07	GiS②	<i>G. inflata</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	Gg
M08	GiS③	<i>G. inflata</i>	—	<i>g1</i>	—	Gg
M09	GiS④	<i>G. inflata</i>	<i>g1</i>	—	<i>g1</i>	Gg
M10	GiS⑤	<i>G. inflata</i>	<i>IV1+g1</i>	?	—	<i>GuIV1+Gg</i>
M11	GuCN①	<i>G. uralensis</i>	<i>IV2</i>	<i>IV2</i>	<i>IV2+IV1</i>	<i>GuIV2</i> 及び <i>GuIV2+GuIV1</i>
M12	GgK①	<i>G. glabra</i>	<i>IV1+g1</i>	<i>IV1+g1</i>	<i>g1</i>	<i>GuIV1+Gg</i> 及び Gg
M13	GgK②	<i>G. glabra</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	<i>g1</i>	Gg
M14	GgU①	<i>G. glabra</i>	<i>g1</i>	<i>g1+g2</i>	<i>g1</i>	Gg
M15	GgC①	<i>G. glabra</i>	<i>g1</i>	x	<i>g2</i>	Gg
M16	GuMK①	<i>G. uralensis</i>	—	<i>IV1</i>	<i>IV2</i>	<i>GuIV2</i> 及び <i>GuIV1</i>
M17	GuMB①	<i>G. uralensis</i>	<i>IV2+IV1</i>	<i>IV2+IV1</i>	<i>IV2+IV1</i>	<i>GuIV2+GuIV1</i>
M18	GuCG①	<i>G. uralensis</i>	<i>IV2+IV1</i>	—	<i>IV2+IV1</i>	<i>GuIV2+GuIV1</i>
M19	GuCG②	<i>G. uralensis</i>	<i>IV2+IV1</i>	<i>IV2+IV1</i>	<i>IV2+IV1</i>	<i>GuIV2+GuIV1</i>
M20	GuCG③	<i>G. uralensis</i>	<i>IV1</i>	<i>IV1</i>	<i>IV2+IV1</i>	<i>GuIV1</i> 及び <i>GuIV2+GuIV1</i>
M21	GuCH①	<i>G. uralensis</i>	<i>g1</i>	<i>IV2</i>	<i>IV2</i>	<i>GuIV2</i> 及び Gg
M22	GuCH②	<i>G. uralensis</i>	<i>IV2</i>	—	x	<i>GuIV2</i>

- : PCR 未増幅試料
- X : シーケンスで顕著なシグナルが認められなかった試料
- ? : シーケンスでシグナルが認められたものの、含まれる配列を推定できなかった試料
- 試料①～③の斜体は、基原植物情報と遺伝子型が一致しなかった試料を示す

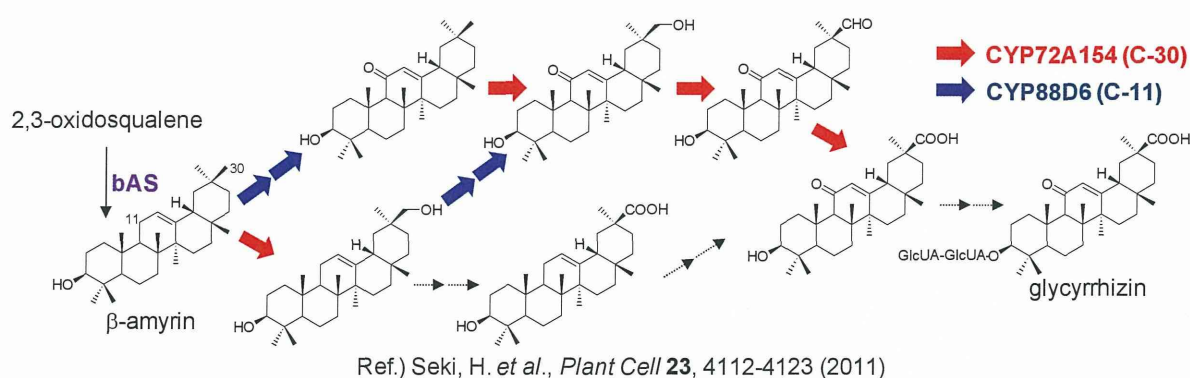


図8. 本研究で発現解析を行ったGL生合成酵素遺伝子

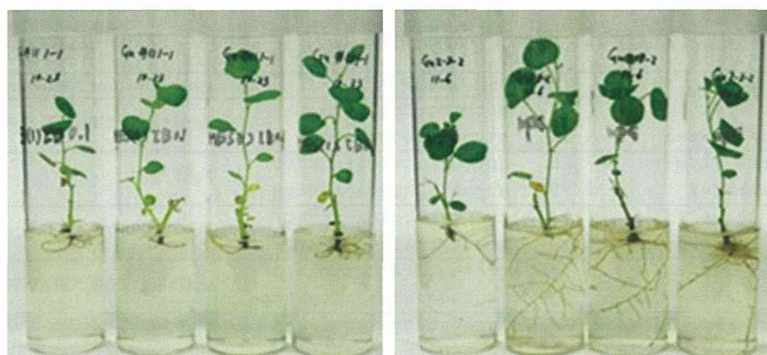


図9. ウラルカンゾウ優良系統無菌培養物
左：Gu#11、右：Gu2-3-2

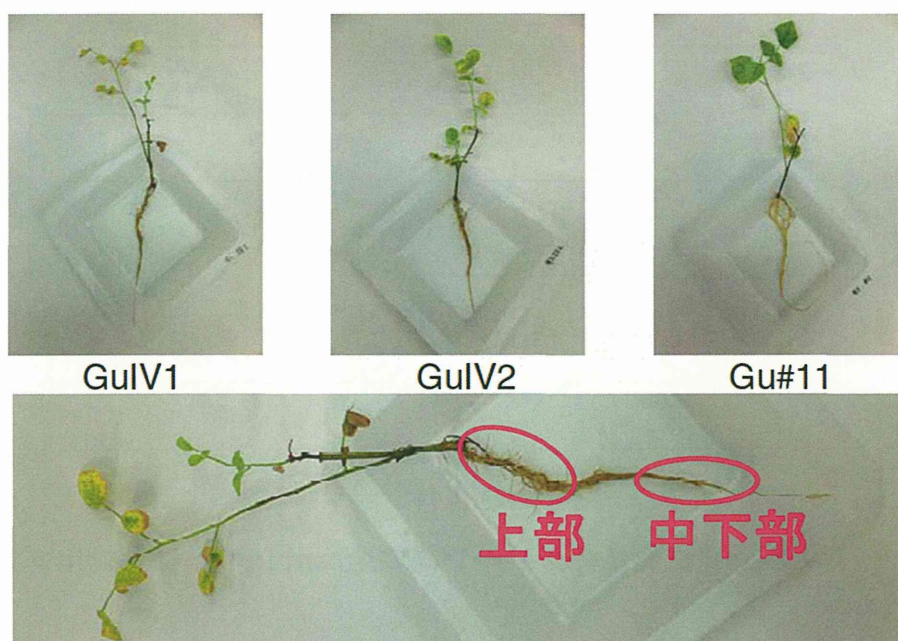


図10. ウラルカンゾウ挿し木苗のサンプリング時の形態及びサンプリング部位

表4. ウラルカンゾウ挿し木苗サンプリング時の生育状況

ID	description	挿木後日数(d)	地上高(cm)	根長(cm)
GuIV1	GuIV1 stolon 10, 130419挿木	117	12.5	13.2
GuIV2	GuIV2 H4③St1 130312挿木	155	12.2	10.6
Gu#11	Gu#11-1-2 130326挿木	141	14.8	23
Gu#11	(2013Aprサンプル) 挿木株	45	13.1	10.8

表5. 定量realtime-PCRに使用したプライマーの塩基配列

target	primer name	mer	sequence (5' -> 3')	base contig or sequence (Accession No.)
bAS	bAS sense1 (upper)	18	gatgccgctcgtctccat	deg7180000065087, FJ627179
	bAS anti-sense-1	18	gtcgccacagggccttgac	
bAS	bAS sense2 (lower)	20	ggttcgcacttggtggtctt	FJ627179
	bAS antisense2	20	gcgaatagcagcacaattgg	
CYP88D6	CYP88D6 sense	19	ggcttttttcgacgcctcat	deg7180000090524, 5, AB433179
	CYP88D6 anti-sense	20	acattgctagcgccttgtga	
CYP72A154	CYP72A154 sense	21	ggcagggatatgctttgatga	scf7180000096824-CYP72A154, AB558153
	CYP72A154 anti-sense	22	tggtagaagccaccataatgga	
b-tubulin	b-tubulin sense	20	cagatgtgggatgccaagaa	deg7180000049397-b-tubulin
	b-tubulin anti-sense	17	acgaccgtggcgaggat	Glycyrrhiza21_contig00000435-bTUB

primers designed by Primer Express

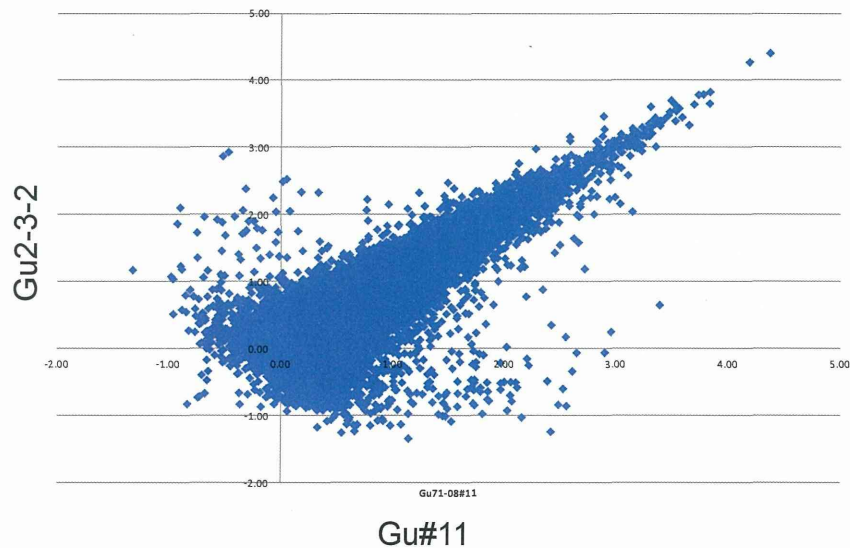


図11. ウラルカンゾウ優良株クローン間の全contigの発現量対比プロット

表6. ウラルカンゾウ無菌培養物2クローン間でのGL合成酵素遺伝子のRPKM値の比較

Contig ID	Gene function	blast hits	Score	e-value	Gene length [bp]	Gu71-08#11 log ₁₀ RPKM	Gu2-3-2 log ₁₀ RPKM
contig00028880	bAS	BAA89815.1 beta-amyrin synthase [<i>G. glabra</i>]	744	0	1088	0.36	0.35
contig00026931	bAS	ACV21067.1 beta-amyrin synthase [<i>G. uralensis</i>]	453	e-125	634	0.30	-0.29
contig00034106	bAS	BAA89815.1 beta-amyrin synthase [<i>G. glabra</i>]	293	1.00E-77	423	0.07	0.19
contig00022465	CYP88D6	BAG68929.1 CYP88D6 [<i>G. uralensis</i>]	531	e-149	804	0.10	発現なし ND
contig00035935	CYP88D6	BAG68929.1 CYP88D6 [<i>G. uralensis</i>]	219	2.00E-55	312	0.30	発現なし ND
contig00004669	CYP72A154	BAL45207.1 cytochrome P450 [<i>G. uralensis</i>]	932	0	1461	1.25	1.06
contig00017540	CYP72A154	BAL45207.1 cytochrome P450 [<i>G. uralensis</i>]	123	1.00E-26	274	1.27	1.11
contig00000435	β-tubulin	AGE44289.1 beta-tubulin [<i>Dimocarpus longan</i>]	668	0	1447	2.30	2.39
contig00003633	β-tubulin	CAA38613.1 beta-tubulin 1 [<i>Pisum sativum</i>]	563	e-158	1282	1.59	1.73

ND: not detected

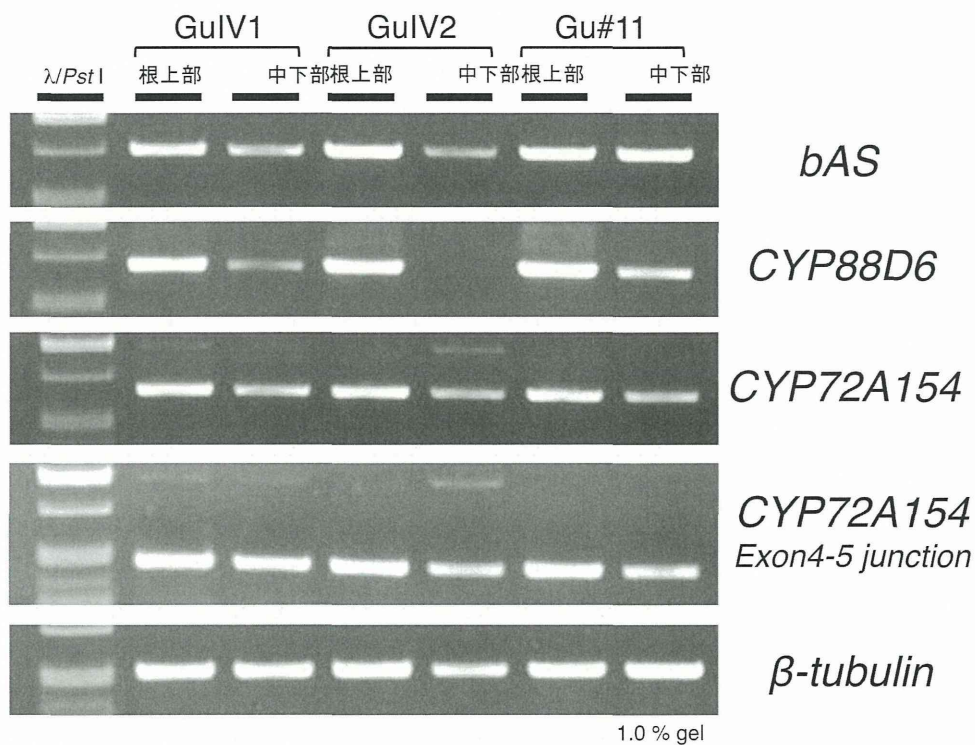
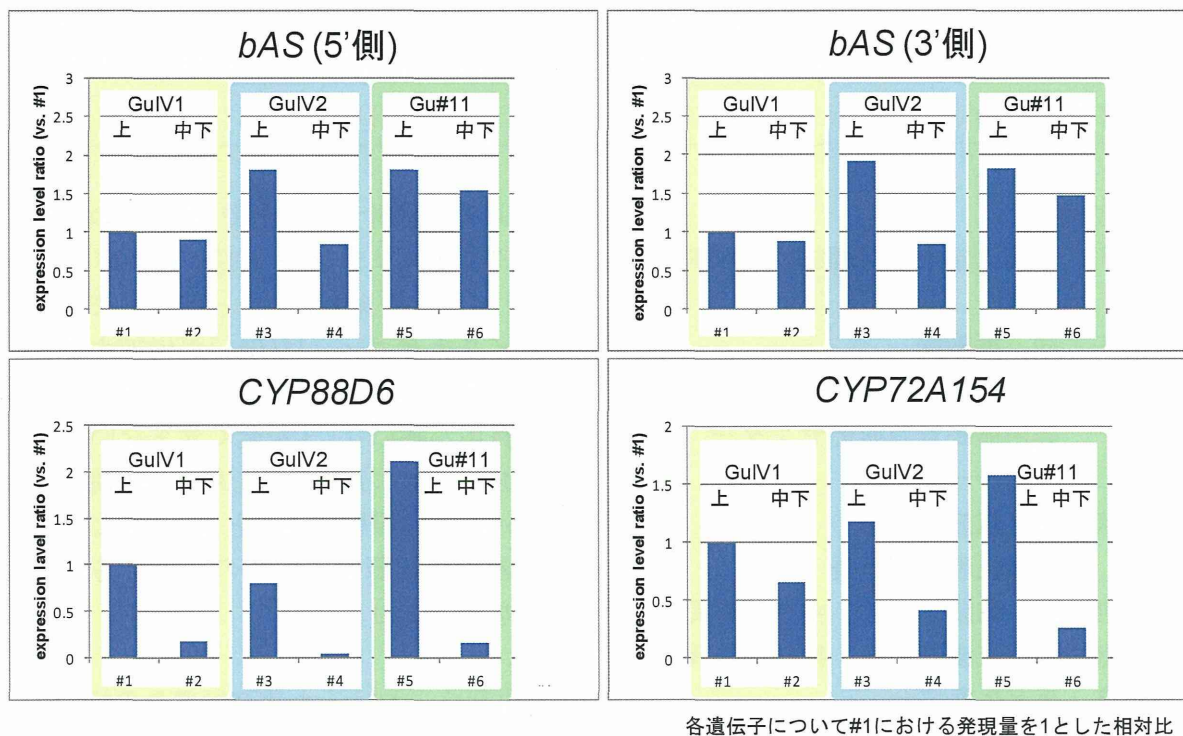


図12. ウラルカンゾウ挿し木苗根におけるGL生合成酵素遺伝子群の半定量RT-PCR結果



各遺伝子について#1における発現量を1とした相対比

図13. ウラルカンゾウ挿し木苗根におけるGL生合成酵素遺伝子群の定量realtime-PCR結果

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（H25-創薬総合-一般-007）分担研究報告書

分担研究課題：ハイク生薬生産システム構築

研究分担者 工藤 善 鹿島建設株式会社 上席研究員

要旨 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、0.33W 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照射区の根のグリチルリチン酸（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で生育量及びグリチルリチン酸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本薬局方の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。

研究協力者

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

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

吉松嘉代 同 筑波研究部
育種生理研究室長

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

武田修己 東京生薬協会

部にUV-Bを照射することで、地下部の薬用成分〔グリチルリチン酸（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）〕が増加することを明らかとした。今年度は、従来よりもUVの波長域が狭い（UV-Cを全く含まないシャープな波形をもつ）UV光源を用い、暗期にUV-Aまたは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。

・水耕栽培における水耕液循環量の検討（試験②）

A. 研究目的

・生育速度及び薬用成分含量向上の検討（試験①）

昨年度までに、明期にウラルカンゾウ地上

昨年度より継続している試験で、水耕栽培液の循環水量を変え、生育や二次代謝産物産生に最適な循環水量を検討した。

・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（試験③）

セリバオウレンは、樹林下に自生する植物で生育速度は緩慢である。生育速度が速くないことから要求する肥料量も少ないことが推察される。市販されている水耕液肥料は、生育の旺盛な野菜向けに調合された製品であるので、セリバオウレンの肥料量としては多すぎるものが考えられる。そこで、市販の水耕液濃度を希釈することにより、生育や薬用成分含量の向上に最適な水耕液濃度を検討した。

・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（試験④）

セリバオウレンは、強い光を必要としない人工環境下での栽培に適した植物である。人工環境下では、気温や光強度などの環境条件を精度高く制御できることから植物の適した環境条件を把握することが必要である。そこで、セリバオウレンの最適な栽培環境条件を見いだすために、光環境、気温、相対湿度、 CO_2 を変化させて、光合成蒸散測定と評価を行った。

B. 研究方法

・生育速度及び薬用成分含量向上の検討（試験①）

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 $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 CO_2 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 $25/20^\circ\text{C}$ （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。

・水耕栽培における水耕液循環量の検討（試験②）

供試苗（IV-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 $100\text{--}120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）を行い、明期時間を12時間以上に維持した。

栽培装置は $150\text{mm} \times 720\text{mm} \times 500\text{mmH}$ の栽培槽と $270\text{mm} \times 750\text{mm} \times 300\text{mmH}$ 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（図1、2）。

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、 20L min^{-1} ）設定した。

水耕液条件は表1の条件で行い、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）。

・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（試験③）

供試植物は、医薬基盤研究所より提供され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 $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 CO_2 濃度 $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ で栽培した（図3）。気温および明期は育苗期間で $22/16^\circ\text{C}$ （明期/暗期）、14時間とした。

栽培装置は $350\text{mm} \times 1200\text{mm} \times 110\text{mmH}$ の栽培槽と $450\text{mm} \times 550\text{mm} \times 250\text{mmH}$ 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。

水耕液条件は表2の条件で行い、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)。

・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(試験④)

供試植物は医薬基盤研究所より提供され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(図4)。

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(表3)。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。

C. 研究結果

・生育速度及び薬用成分含量向上の検討(試験①)

UV-Bの照射による乾物重への影響はみられなかった(図5)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(図6)。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。

・水耕栽培における水耕液循環量の検討(試

験②)

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ないために、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(図7、8)。

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(図9)。

・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(試験③)

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(図10)。

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(図10)。

・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(試験④)

③-1 気温変化

測定基本条件下で明期の気温を16～26℃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(図11)。蒸散速度は高温になるに従って減少し、22℃以上ではほぼ一定となった(図12)。

③-2 相対湿度変化

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(図13)。蒸散速度は相対湿度が上昇するに従って減少した(図14)。

③-3 光強度変化

測定基本条件下で、光強度を0～350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 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（図15）。蒸散速度は、光強度が増すに従って蒸散速度も増加した（図16）。

③-4 CO₂濃度変化

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、CO₂濃度を400～1,600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ に変化させて光合成・蒸散測定を行った。CO₂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。CO₂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（図17）。蒸散速度はCO₂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（図18）。

D. 考察

・生育速度及び薬用成分含量向上の検討（試験①）

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。

・水耕栽培における水耕液循環量の検討（試験②）

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の検討（試験③）

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（試験④）

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。

CO₂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。

E. 結論

・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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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).

2. 学会発表

- 1) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特願 2013-114417 発明者 澤田裕樹、工藤 善、大野貴子、早雲まり子、後藤英司、彦坂晶子 特許出願人、識別番号(団体名及び弁理士事務所) 鹿島建設株式会社(000001373) 代理人: 丹羽 俊輔(100129300) 発明の名称 カンゾウ属植物の薬用成分濃度向上方法 出願日 平成 25 年 5 月 30 日

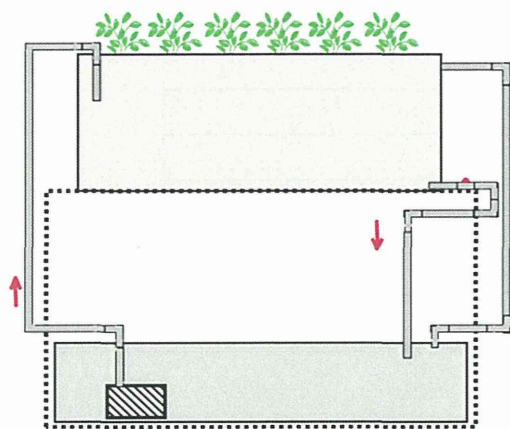


図1 水耕栽培装置模式図



図2 カンゾウ水耕栽培装置

表1 カンゾウ水耕栽培条件

水	調布市水道水 p H : 7.3、E C : 0.3mS
肥料	大塚A処方1/4、E C : 0.8mS
p H	5.5－6.8で管理
交換頻度	1ヶ月に1回、全交換



図3 セリバオウレン水耕栽培装置

図4 光合成蒸散測定装置

表2 セリバオウレン水耕栽培条件

水	調布市水道水 p H : 7.3、E C : 0.3mS
肥料	大塚A処方1/2～1/8、E C : 0.5～1.4mS
p H	5.5－6.8で管理
交換頻度	1ヶ月に1回、全交換

表 3 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 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
CO ₂ 濃度	1,000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$

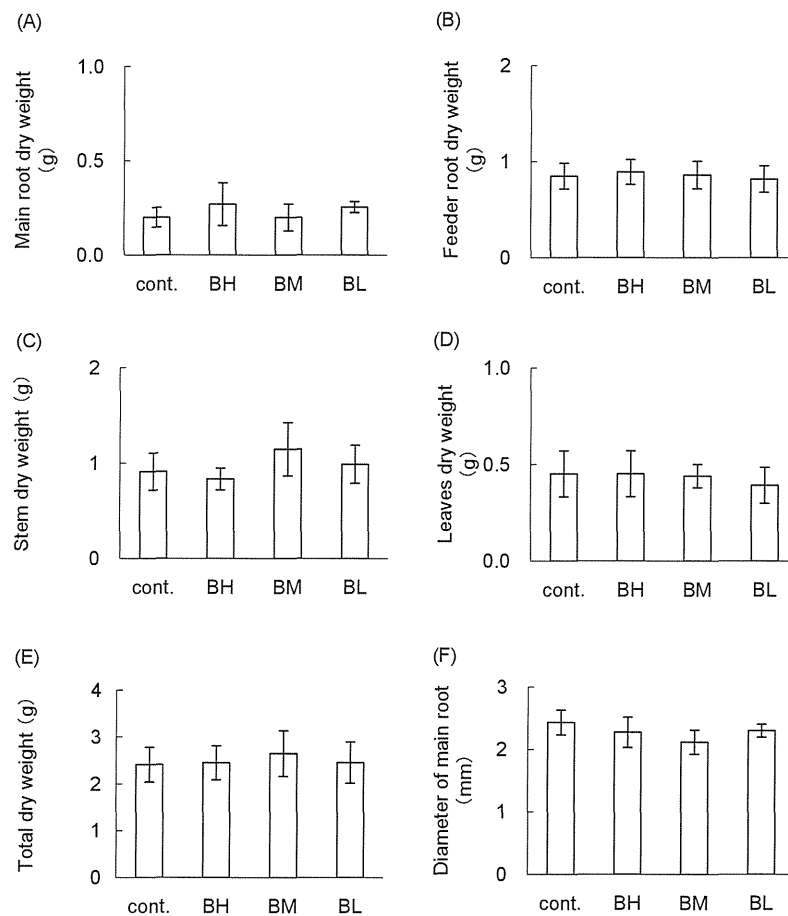


図 5 暗期における UV-B 照射強度がウラルカンゾウの生育に及ぼす影響
 図中のバーは標準誤差を示す (n=5)

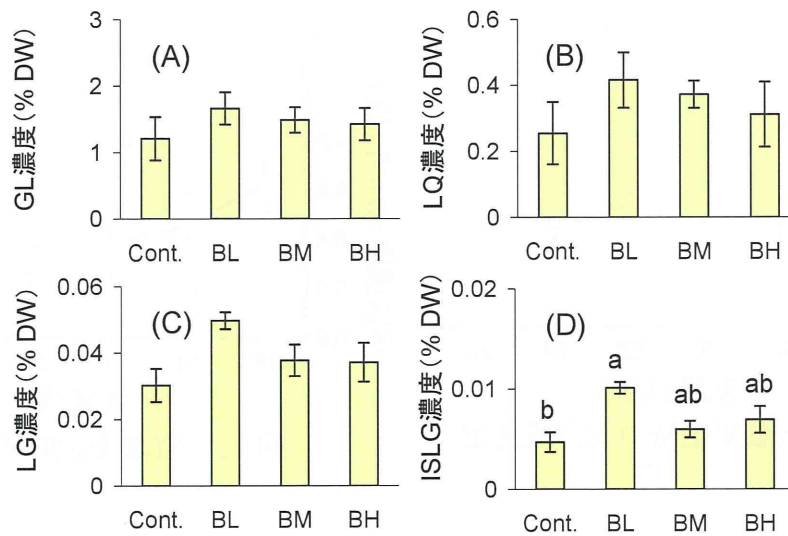


図6 暗期における UV-B 照射強度がウラルカンゾウの GL、LQ、LG および ISLG 濃度に及ぼす影響

図中のバーは標準誤差を示す (n=5)

異なる英小文字は Tukey-Kramer 法において 5%水準で試験区間に有意差があることを示す

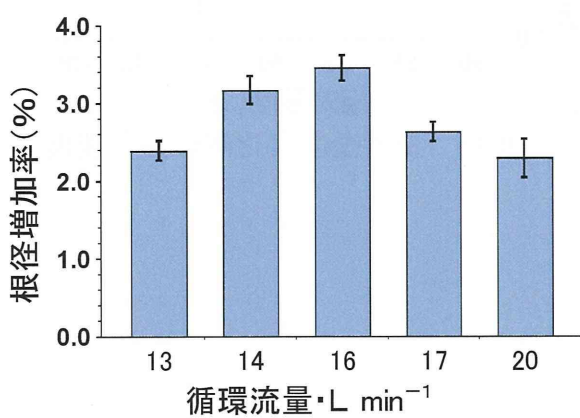


図7 根頭根径増加率 (バーは標準誤差 (n=4))

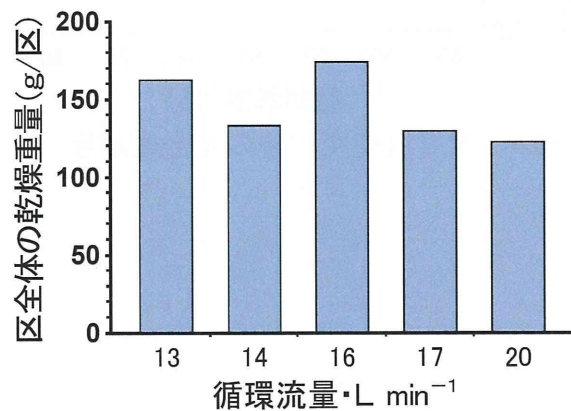


図8 地下部乾燥重量

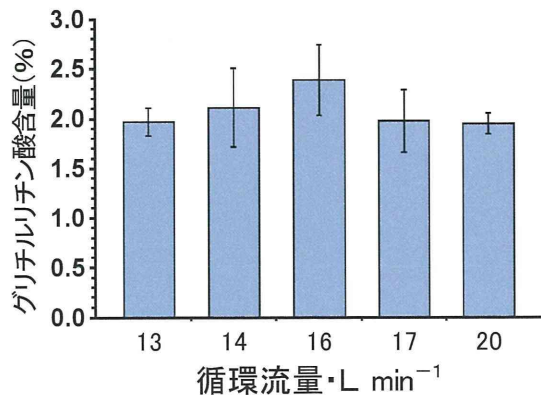


図9 グリチルリチン酸含量 (バーは標準誤差 (n=3))

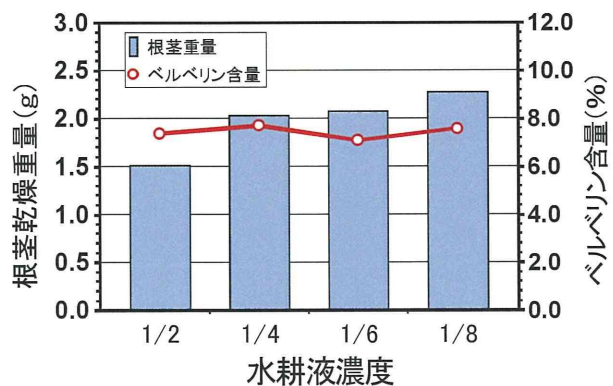


図10 根茎重量とベルベリン含量

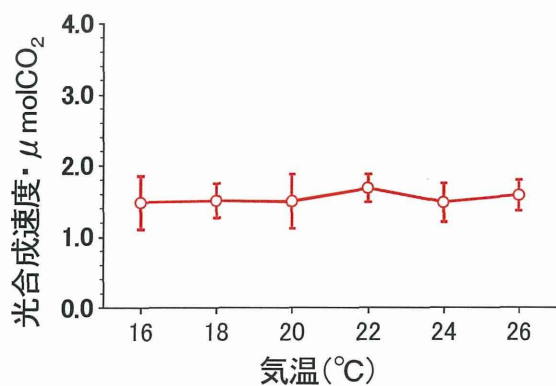


図 11 気温変化時の光合成速度

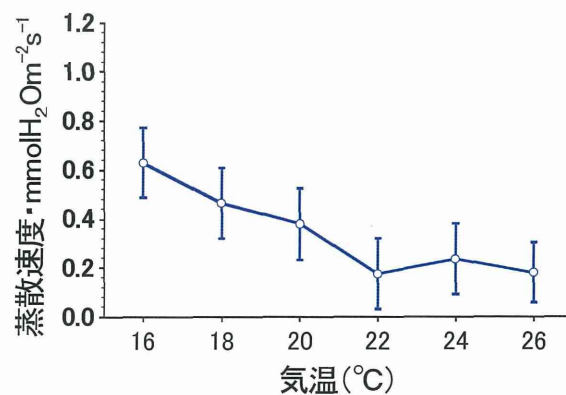


図 12 気温変化時の蒸散速度

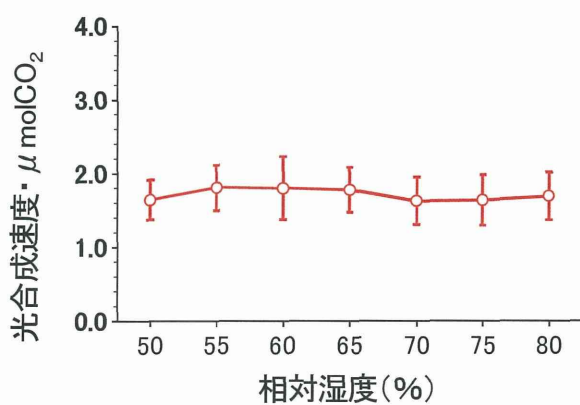


図 13 相対湿度変化時の光合成速度

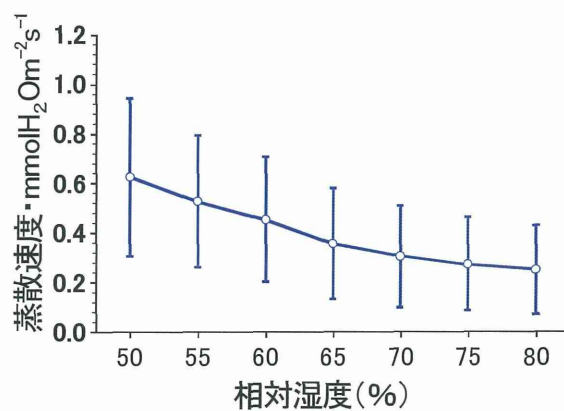


図 14 相対湿度変化時の蒸散速度

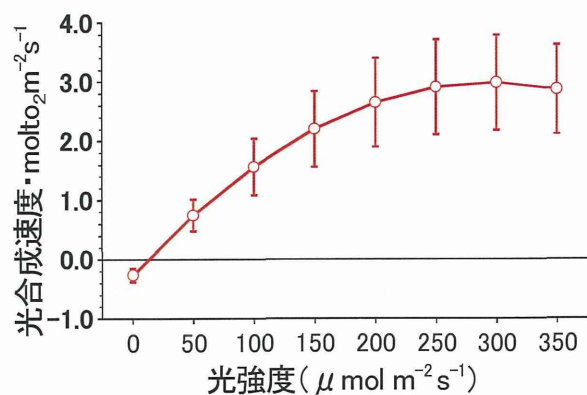


図 15 光強度変化時の光合成速度

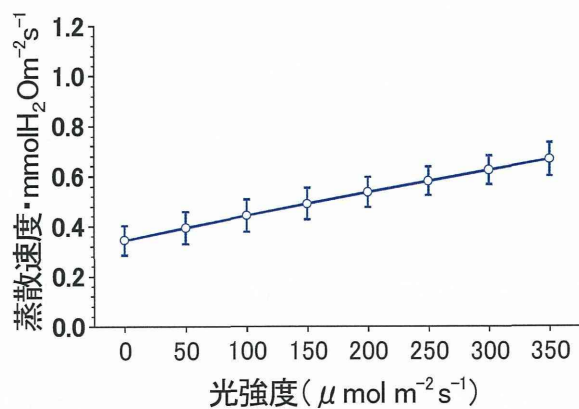


図 16 光強度変化時の蒸散速度

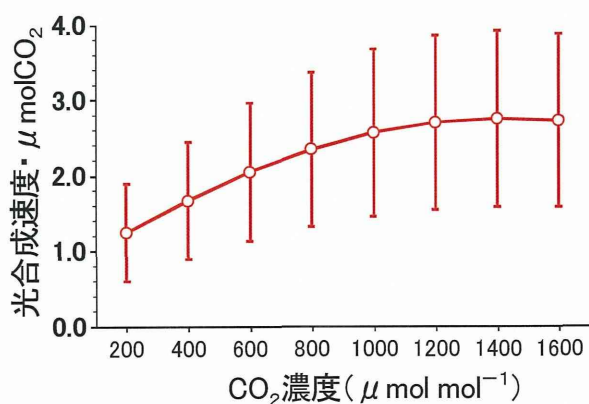


図 17 CO₂濃度変化時の光合成速度

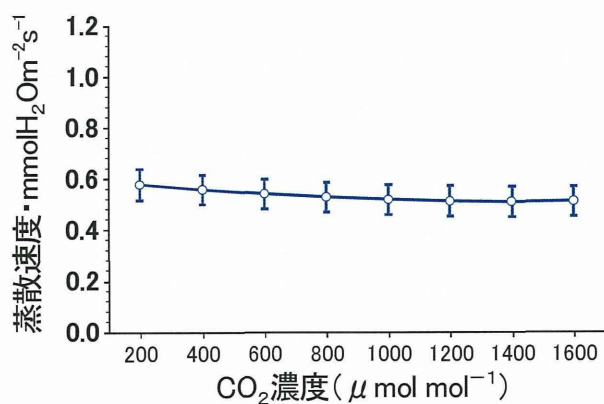


図 18 CO₂濃度変化時の蒸散速度

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（H25-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生薬の化学的評価に関する研究

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

要旨 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。

研究協力者

高橋 豊 エムエス・ソリューションズ株式
会社 代表取締役

淵野裕之 （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 栽培研究室長

とを目的として、昨年に引き続き、人工水耕栽培環境下で生産された「甘草」と市場流通生薬「甘草」について液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）を用いた化学的同等性評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

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。

各種機器の測定条件を以下に記載する。甘草類試料より、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。

A. 研究目的

現在までに日本において、人工水耕栽培環境下で栽培された生薬が、製品化された事例は見出されていない。従って、上記のような生薬の使用に対して漢方・生薬業界、医師、薬剤師、患者等の潜在的な不安が存在することは否定できない状況である。

そこで本研究では、本法により生産された生薬、特に「甘草」の有効成分、有効性、安全性に担保し、漢方・生薬関連企業及び一般の方々の理解を深め、その普及を促進するこ

【測定条件】

○ MS : ThermoFisher Scientific, LTQ Orbitrap Elite

- ESI ニードル電圧 $\pm 3,500$ V
- キャピラリー温度 275°C
- ヒーター温度 450°C
- 測定 m/z 範囲 $100\sim 2,000$
- スペクトル記録スピード 0.1 秒/スペクトル
- 設定質量分解能 $30,000$
- CID 電圧 35 V
- プリカーサー m/z 範囲 3.5

○ HPLC : ThermoFisher Scientific, Ultimate 3000

- カラム
Thermo Scientific Acclaim RSLC 120 C18、 $2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$ 、 $2.2\text{ }\mu\text{m}$
- 移動相
A = 0.1% 酢酸/超純水、
B = 0.1% 酢酸/アセトニトリル
B = $2 - 60\%$ (10 min) - 100% (12 min) - 100% (13 min)
- 移動相流量 0.3 mL/min
- カラム温度 40°C
- DAD 波長範囲 $190 - 400\text{ nm}$

○ 試料：今回の分析に用いた全甘草類のリストと前処理法を表 1 に示す。

C. 研究結果

1. 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

図 1 に示した全甘草類の 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 分の成分 [マススペクトルおよびマススペクトル上のメインピークの m/z 値 (m/z $823.40\sim 823.42$) から作成した抽出イオンクロマトグラム (XIC) のピークパターンよりグリチルリチン酸であることを確認済み] がメインピークであるのに対して、No. 7 と No. 10 に関しては、保持時間 11.7 のピーク

が TIC クロマトグラム上でメインピークとなっている。

このピークから得られたマススペクトルと XIC を図 2 に示す。保持時間 11.7 分のマススペクトルにおいては、 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 $339.15\sim 339.16$) 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 ; *G. inflata*) 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分かった。

多変量解析によって得られたスコアプロットを図 3 に、ローディングプロットを図 4 に示す。

図 3 において、水耕栽培品は赤○で示したグループに、国内市場流通品は青○で示したグループに分類されている。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る。

図 4 の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向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。

前者のデータを図 5 に示す。 m/z $369.13\sim 369.14$ 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 ; *G. inflata*) で比較した。上記 7 種類の試料について、XIC ピーク強度を表 2 にまとめた。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を図6に示す。これらを比較すると、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；*G. uralensis*）およびNo. 17～22（モンゴル産、中国市場流通品；*G. uralensis*）であった。

2. 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を図7に、ローディングプロットを図8に示す。

図7において、水耕栽培品と国内市場流通品は、同じ黄○内にまとまった。黄○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 *G. uralensis* であった。

ローディングプロットにおいて、*G. uralensis* 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。それらのXICおよびマススペクトルデータを図9～12に示す。また、それら4成分のXICピーク強度を、表3に示す。

表3に示すように、*G. uralensis* における4成分のXICピーク強度は、その他の *G. glabra* や *G. inflata* 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、*G. uralensis* vs. *G. glabra* & *G. inflata* 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の試料については、*G. inflata* でありながら、4成分のXICピーク強度は、*G. uralensis* 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。

D. 考察

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別けされた。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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1 分析に用いた甘草類一覧

カンゾウ根サンプル(2013年6月)						
No.			入庫(入手)日	秤量値(mg)	メタノール量	超音波(min)
1	アフガニスタン	G.glabra	2001.3	82	4.1	45
2	アフガニスタン	G.glabra	2003.11	82.9	4.15	45
3	アフガニスタン	G.glabra	2006.3	83.2	4.15	45
4	アフガニスタン	G.glabra	2012.1	84.9	4.25	45
5	アフガニスタン	G.glabra	2013.1	84.7	4.25	45
6	中国(新疆)	G.inflata	2000.3	79.4	3.95	45
7	中国(新疆)	G.inflata	2007.2	86.5	4.35	45
8	中国(新疆)	G.inflata	2007.1	80.8	4.05	45
9	中国(新疆)	G.inflata	2012.6	77.6	3.85	45
10	中国(新疆)	G.inflata	2012.11	68.6	3.45	45
11	中国(遼寧)	G.uralensis	2011.12	84.1	4.2	45
12	カザフスタン	G.glabra	2008.3	74.6	3.75	45
13	カザフスタン	G.glabra	2009.1	87.1	4.35	45
14	ウズベキスタン	G.glabra	2010.7	79.5	4	45
15	CIS	G.glabra	2012.1	83.3	4.15	45
16	モンゴル	G.uralensis	2009.5	81.7	4.1	45
17	モンゴル	G.uralensis	2009.5	81.7	4.1	45
18	中国市場品(広州)	G.uralensis	2009.11	78.3	3.9	45
19	中国市場品(広州)	G.uralensis	2009.11	87.7	4.4	45
20	中国市場品(広州)	G.uralensis	2013.6	87.2	4.35	45
21	中国市場品(湖北)	G.uralensis	2010.8	80.6	4.05	45
22	中国市場品(湖北)	G.uralensis	2010.8	84.5	4.25	45
NIB-0003				70	3.5	45
NIB-0074				71.6	3.6	45
NIB-0090				72	3.6	45
GulV2 [®] -43	水耕①			65.4	3.25	45
GulV2 [®] -13	水耕②			73.5	3.7	45
GulV2 [®] -2	水耕③			73.3	3.65	45

