

201407016A

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26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27(2015)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
実証的研究ーウラルカンゾウの植物組織培養物バンクの確立ー・・・・・・・・・・ 25
吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、田村幸吉、新穂大介
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
実証的研究ーシナマオウのシュート培養系の確立ー・・・・・・・・・・・・・・・・ 36
吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、飯田 修
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
実証的研究ーキダチマオウの挿し木増殖に関する研究ー・・・・・・・・・・・・ 41
吉松嘉代、根岸直希、小川健一
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
実証的研究ーウラルカンゾウ人工水耕ー圃場ハイブリッド栽培システムの確立
に関する研究ー・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43
吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、北澤 尚、武田修己
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
実証的研究ー北海道名寄市におけるウラルカンゾウ系統 GuIV1 および GuIV2 の
露地栽培試験ー・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 66
吉松嘉代、菱田敦之、林 茂樹、乾 貴幸、河野徳昭、武田修己
6. 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
実証的研究ー種子島におけるウラルカンゾウ優良株の試験栽培に関する研究ー
・・ 71
吉松嘉代、杉村康司、乾 貴幸、河野徳昭、武田修己
7. 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
実証的研究ー人工水耕栽培システムにより生産したカンゾウ苗の育苗順化条件
検討ー・・ 74
吉松嘉代、吉岡琢磨、武田修己、乾 貴幸、河野徳昭
8. 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
実証的研究ー人工水耕栽培システムにより生産したカンゾウ苗の圃場栽培試験
(圃場定植 2 年目)ー・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 77
吉松嘉代、吉岡琢磨、武田修己、乾 貴幸、河野徳昭

9. 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圃場栽培に関する研究—・・・83
吉松嘉代、田村幸吉、新穂大介、乾 貴幸、河野徳昭
10. 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—水耕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—・・・90
吉松嘉代、福田達男、石川 寛、乾 貴幸、河野徳昭、武田修己
11. 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—西表島におけるウラルカンゾウ優良株の栽培に関する研究—・95
吉松嘉代、渡辺 信、乾 貴幸、河野徳昭、武田修己
12. 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—オタネニンジン実生苗の水耕栽培に関する研究—・・・99
吉松嘉代、乾 貴幸、河野徳昭、矢野 宏、酒井あゆみ、上月さやか
13. 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—・117
河野徳昭、吉松嘉代、乾 貴幸
14. ハイテク生薬生産システム構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・126
工藤 善、後藤英司、彦坂晶子、乾 貴幸、吉松嘉代
15. 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—甘草について—・・・・・・・・・・142
川原信夫、高橋 豊、淵野裕之、吉松嘉代、乾 貴幸、河野徳昭、菱田敦之、林 茂樹、田村幸吉、工藤 善
16. 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—黄連について—・・・・・・・・・・167
川原信夫、高橋 豊、淵野裕之、吉松嘉代、乾 貴幸、工藤 善
17. 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—・190
川原信夫、武田修己、吉松嘉代、乾 貴幸、河野徳昭、北澤 尚、菱田敦之、林 茂樹、福田達男、石川 寛、渡辺 信
18. 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—水耕栽培により生産したカンゾウ・オウレンの生薬・食品添加物としての安全性及び有効性評価—・・・212
龜山 浩、能勢充彦、大月典子、滝口 肇、杉本直樹、多田敦子、淵野裕之、吉松嘉代、乾 貴幸、河野徳昭、菱田敦之、林 茂樹、川原信夫、工藤 善

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	227
	小松かつ子、朱 姝、数馬恒平、葛 躍偉、伏見裕利、平 修、 川原信夫、菱田敦之、田村隆幸、村上守一、児玉 容、磯田 進、川本元裕	
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—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—	236
	小松かつ子、田村隆幸、朱 姝	
21.	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—	248
	小松かつ子、朱 姝、田村隆幸、村上守一	
22.	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を用いたダイオウ及びシャクヤクの主要成分の 局在解析—	256
	小松かつ子、平 修	
23.	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—	263
	小松かつ子、伏見裕利	
24.	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—	268
	小松かつ子、児玉 容、村上守一、田村隆幸、葛 躍偉	
25.	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—	276
	小松かつ子、菱田敦之、川原信夫	
26.	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 薬草栽培試験地で栽培されたダイオウの品質評価—	280
	小松かつ子、葛 躍偉	
27.	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—	287
	小松かつ子、数馬恒平	
28.	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～圃場栽培と葉の成分探索—	305
	小松かつ子、村上守一、川本元裕、葛 躍偉、磯田 進、菱田敦之	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	316

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成26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 これまでに育成したウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) 優良クローンを、遺伝的・形質的変異を誘発することなく、確実に保存し活用するため、水耕栽培植物の地上部を外植片に植物組織培養系の誘導、継代・維持、増殖、植物体再生条件を検討し、植物組織培養物バンクを確立した。

マオウ国内栽培の基盤構築のため、新たに由来の異なる3系統のシナマオウ (*Ephedra sinica* Stapf) のシュートの先端を材料に、植物組織培養系の確立を検討し、シュート増殖能の高いシュート培養の育成に成功した。

キダチマオウ (*Ephedra equisetina* Bunge) の圃場栽培株の枝を材料に、無菌培養系への導入を行ったところ、培養シュートの旺盛な生育が認められ、これを挿し木材料として、炭酸ガス濃度 1,000ppm、光強度 10,000lux の環境下で酸化型グルタチオンを添加した培地を用いて発根培養を行った結果、5個の挿し穂のうち、1個体で発根が認められた。

効率的なグリチルリチン酸 (GL) の生産に寄与する基盤情報の整備を目的とし、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。ウラルカンゾウ優良株挿し木苗の根に疑似乾燥ストレスまたは塩ストレス処理を施し、GL 生合成経路の3酵素遺伝子 (*bAS*、*CYP88D6*、*CYP72A15A*) のストレス応答を解析した。その結果、塩ストレスは *CYP88D6* の発現量を、また、疑似乾燥ストレスは3遺伝子共に発現量を低下させ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 経済性・汎用性の高い生薬生産システムとしての人工水耕-圃場ハイブリッド栽培システム (ハイブリッド栽培) の構築及び国内栽培基盤構築のため、人工水耕栽培したウラルカンゾウより育成した挿し木苗を材料に、筑波研究部での圃場栽培 (筑波圃場筒栽培、筑波圃場短筒栽培及び筑波圃場マルチ栽培)、ビニールハウス栽培 (筑波ハウス筒栽培)、北海道研究部での圃場栽培 (北海道圃場栽培)、種子島研究部でのシックスライトハウス筒栽培 (種子島ハウス筒栽培)、茨城県稲敷郡での圃場栽培 (稲敷圃場栽培)、広島県福山市での圃場筒栽培 (福山圃場筒栽培)、神奈川県相模原市での圃場マルチ栽培 (相模原圃場マルチ栽培)、西表島での野外鉢栽培 (西表野外鉢栽培) 試験を行った。苗の定植時期と定植方法が、翌年の萌芽率に大きく影響した。定植時期は、夏至までが適しており、それ以降に定植した株は、翌年の萌芽率が低かった。定植方法は、挿し穂とした地上茎の地際の節が土上にある場合は、ストロンの形成が抑えられ、根の肥大とGL含量増加が認められた。

しかし、冬季に新芽が形成する節が障害を受け、翌春は萌芽しなかった。

一方挿し穂とした地上茎の節を含む部分、あるいは節を含む地上茎部分が土中にあり、ストロンが形成した株は、翌年も萌芽し、その後も順調に生育した。北海道圃場栽培（定植後818日）の径0.5 cm以上の根（太根）は、分析した4検体の全てでGLの日本薬局方（日局）の規格値2.5%以上を満たし、径0.5 cm未満の根（細根）も1検体を除き、日局規格値を満たした。また、筑波圃場筒栽培（定植後420日）、相模原圃場マルチ栽培（定植後447日）は、太根、細根の両方でGLの日局規格値を満たすものが存在し、筑波圃場筒栽培（定植後420日）、筑波圃場短筒栽培（定植後388日）、筑波圃場マルチ栽培（定植後383日）、相模原マルチ栽培（定植後447日）では、GLの日局規格値を満たす細根が存在した。福山市以南ではGLの日局規格値を満たす根は得られなかった。以上よりウラルカンゾウ優良苗による人工水耕—圃場ハイブリッド栽培システムは、関東地方においても定植後1～1年3ヶ月の短期間でGLの日局規格値を満たす甘草を生産する方法として優れていることが判明した。

オタネニンジンについて、芽切り種子より育成した実生を材料に、人工水耕栽培による生薬「人参」の生産を検討した。栽培方法は、バーミキュライトに播種し、純水もしくは養液を供給しながら、144日間育苗した後、水耕栽培装置に移植し、バーミキュライトを支持体とする「底面灌水」、養液中に空気を供給する「バブリング」、養液を根に直接噴霧する「ミスト」の3方式で207日間栽培し、その生育及びギンセノシド含量を比較した。

育苗の結果、養液を供給した実生は、水のみで育成した実生と比べ、播種後約1ヶ月から生育が促進され、根の基部が肥大化した。また、その後の水耕栽培においても、播種後約100日から養液を供給した実生（水育苗）と比較し、播種後約1ヶ月から養液で育苗した実生（養液育苗）の方が、生育が良い傾向が認められた。特に、底面灌水方式と比較し、バブリング方式では根の肥大が、ミスト方式では根の伸長が促進される傾向が認められ、養液育苗区において両栽培方式とも、207日間の水耕栽培により最大径0.5 cm以上の根を得た。さらにギンセノシド含量を測定した結果、いずれの試験区でも、ギンセノシド Rg1 含量は0.25%以上、ギンセノシド Rb1 含量は0.37%以上に達し、各試験区間で明瞭な含量差は認められなかった。以上、播種約1ヶ月後に養液供給を開始し、バブリング、もしくは、ミスト方式で水耕栽培することにより、播種から約1年の短期間で、日局記載の性状（主根の径：0.5-3 cm）に合致し、薬用成分の規格値（Rg1：0.10%以上、Rb1：0.20%以上）を満たす人参を得ることに成功した。

甘草の効率的生産のため、昨年度に引き続き太陽光利用型植物工場（環境制御型の温室）に設置した水耕栽培装置で、薬効成分が高含量となるウラルカンゾウ株 GuIV1 を夏季から秋季まで栽培した。従来法では、収穫後に貯蔵せず50°Cの温熱乾燥を行うが、本試験では収穫した株の根を分割して貯蔵温度処理を行い、凍結乾燥後の薬用成分含量を測定し、従来法との比較を行った。その結果、乾燥温度が高い従来法に比べ、低温での貯蔵処理及び凍結乾燥によりGL以外の主要薬用成分含量の低下を抑え、あるいは高められることが明らかとなった。また、高含量株で根を十分に成長させた場合であっても、栽培条件によってはGL含量が2.5%に満たない場合があることが明らかとなった。また、散気量を変化させた水耕栽培試験を行い、散気量 2 L min^{-1} で生育が最大となる傾向となったが、GL含量を高められる条件は、明確にはならなかった。

黄連水耕栽培の環境条件において最適な光強度環境条件を検討した。最適な光強度は $150\sim 210 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($10.37 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)、であることが明らかとなった。

3) 生薬「甘草」等の評価（品質・有効性・安全性）

甘草の化学的評価に関しては、新規「人工水耕栽培甘草」と、「ハイブリッド栽培甘草」を試料として加え、これらの比較を中心に、市場流通品も合わせて、甘草の同等性や差異を評価した。H26年度に追加で測定した「人工水耕栽培甘草」と「ハイブリッド栽培甘草」は、H25年度に測定した「水耕栽培品」や「国内市場流通品」と同様に *G. uralensis* の群に分類され、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。

甘草以外の生薬に関しても化学的同等性評価を行う目的で、重要生薬「黄連」について、日本産「黄連」より人工水耕栽培された「黄連」と市場流通生薬「黄連」の LC-MS/MS 分析と多変量解析を行った。その結果、「人工水耕栽培黄連」は「日本産の市場流通黄連」と同等性が認められ、「中国産の市場流通黄連」と明確に区別されることが判明した。

「ハイブリッド栽培甘草」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。栽培地、栽培方法、栽培日数、挿し木苗の性状及びクローンが異なる 30 検体について、外部形態を観察した後に 5 試験区の検体について内部形態観察をおこなった。次に、日局性状に記載される径 0.5cm 以上及び 0.5cm 未満に分け、各々について GL を定量した。さらに、GL 含量が規格に適合した検体について、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 4 元素定量（As, Pb, Hg, Cd）を実施した。

外部形態は全検体が、内部形態は観察した 5 検体全てが日局カンゾウに適合していた。なお、道管径、シュウ酸カルシウム単晶の数においては水耕栽培品と圃場栽培品の両方の特徴を有することを確認した。径が 0.5cm 以上の部分で GL 含量が日局規格値（2.5%以上）を満たした検体は 8 検体であった。これら 8 検体は、日局理化学試験規格に適合した。

北海道栽培品は GL 含量が高い傾向を示し、この要因を明らかにすることで、ウラルカンゾウ優良株挿し木苗のハイブリッド栽培の実用化の可能性が検証できると考えられる。

新規技術で生産した甘草（人工水耕栽培、又は人工水耕－圃場ハイブリッド栽培）及び黄連（人工水耕栽培）の有効性評価検証のため、2 種の生薬の熱水抽出エキスの接触性皮膚炎モデルマウスに対する T 細胞依存型アレルギー反応抑制効果について検証を行った。甘草においては、水耕栽培品及びハイブリッド栽培品と市場流通品間の抗アレルギー活性に有意な差は見られず、いずれも同等の抗アレルギー活性を示すことが示唆された。また、黄連においては、市場流通品・水耕栽培品間の抗アレルギー活性に有意な差は見られず、市場流通品・水耕栽培品ともに同等の抗アレルギー活性を示すことが示唆された。黄連について Ames 試験による変異原性の測定を行った。市場流通品・水耕栽培品ともに陽性となったが、両サンプルの比活性値を比較すると、水耕栽培品の比活性値は市場流通品よりも低い傾向にあると示唆された。この結果から、黄連水耕栽培品は、市場流通品よりも変異原性が低くなる傾向にあることが示唆された。

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

シャクヤク：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り得ることを、根の収量と Paeoniflorin 含量から示唆した。根の低温貯蔵により Paeoniflorin 含量が安定して高値を示し、また湯通し加工により 1, 2, 3, 4, 6-Penta-*O*-galloyl- β -D-glucose、Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が増加したが、皮去り加工により Albiflorin と (+)-Catechin の含量が減少した。低温貯蔵と湯通し加工を行えば、乾燥機による乾燥でも成分に変化は見られなかった。

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。この 2 系統が成分的に優れていることを、栽培 5 年目及び栽培 3 年目の根茎及び根における Lindleyin の含量から示した。タンニン類を遠心式限外ろ過フィルターで順次分離し、分子量の異なる分画を LC-MS 分析することにより、重合度が 6 までのプロシアニジン類を測定することが可能であった。濃縮される分画のパターンにサンプル間で差が見られたことから、本法を品質評価に応用できる可能性が示唆された。

エゾウコギ：屋外馴化させた 88 株のうち 84 株を越冬させ、圃場栽培に移行させた。富山市の高地で栽培した 23 株はほぼ良好な生長経過を辿った。挿し穂による養液栽培の結果、硬質鹿沼土と日向土の 3:1 の混合土が栽培に適することがわかったが、発根率は 6% 程度であった。葉の成分としてカフェオイルキナ酸類を中心に 10 化合物を同定した。またサポニン成分の含有を確認した。

研究分担者	菱田敦之	同 北海道研究部
川原信夫	(独) 医薬基盤研究所	研究サプリーダー
	薬用植物資源研究センター	同 北海道研究部 研究員
	センター長	同 種子島研究部
河野徳昭	同 筑波研究部 主任研究員	研究サプリーダー
工藤 善	鹿島建設株式会社	国立医薬品食品衛生研究所
	上席研究員	食品添加物部 協力研究員
穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所	国立医薬品食品衛生研究所
	食品添加物部 部長	食品添加物部 協力研究員
小松かつ子	富山大学和漢医薬学総合	同 第二室長
	研究所 教授	同 主任研究官
研究協力者	小川健一	岡山県農林水産総合センター
乾 貴幸	(独) 医薬基盤研究所	生物科学研究所
	薬用植物資源研究センター	植物レドックス制御
	筑波研究部 特任研究員	研究グループ グループ長
瀧野裕之	同 筑波研究部	富山県薬用植物指導センター
	栽培研究室長	主任研究員
飯田 修	同 筑波研究部 研究員	同 元所長
北澤 尚	同 筑波研究部	長野県健康福祉部薬事管理課
	主任技術専門員	主査薬剤師

福田達男	北里大学薬学部 附属薬用植物園 准教授
石川 寛	同 助教
渡辺 信	琉球大学熱帯生物圏 研究センター西表研究施設 准教授
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
能勢充彦	名城大学薬学部 教授
朱 姝	富山大学和漢医薬学総合 研究所 助教
数馬恒平	同 助教
葛 躍偉	同 研究員
伏見裕利	同 准教授
平 修	福井県立大学生物資源学部 准教授
磯田 進	昭和大学薬用植物園 講師
武田修己	東京生薬協会
吉岡琢磨	東京生薬協会
田村幸吉	丸善製薬株式会社 研究開発本部 甘草生薬研究グループ グループ長
新穂大介	同 甘草研究グループ 主任
根岸直希	日本製紙株式会社 アグリ・バイオ研究所 主査
矢野 宏	パナソニック株式会社 エコソリューションズ社 コア技術開発センター
酒井あゆみ	同上
上月さやか	同上
高橋 豊	エムエス・ソリューションズ 株式会社 代表取締役
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、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ことを目的とする。また、生薬の国内生産基盤構築と推進モデルを実証するため、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。

B. 研究方法

1) ウラルカンゾウ植物組織培養物バンクの確立

閉鎖温室及び植物インキュベーターで水耕栽培中のウラルカンゾウの地上茎より外植片を調製し、植物組織培養物誘導のための、前処理（流水処理）、各種培地、培養条件を検討した。得られた培養シュートは、各種培地での培養を繰り返し、増殖・維持、発根と植物体再生を検討した。

2) シナマオウシュート培養系の確立

非閉鎖温室及び野外圃場で鉢栽培中のシナマオウのシュートの先端より、外植片を調製して1%ショ糖、インドール酪酸 (IB) 0.1 mg/L 含有、DKW/JUGLANS (DKW) 固形培地 (0.13%Gelriteで固化) [DKW(1)IB0.1]に植付けて各種条件で培養し、植物組織培養物の誘導を検討した。得られた培養シュートは、継代培養を行い、増殖・維持、発根と植物体再生を検討した。

3) キダチマオウの挿し木増殖

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センタ

一筑波研究部の圃場で栽培しているキダチマオウから枝を採取し、日本製紙株式会社アグリ・バイオ研究所にて、新芽の部分を70%エタノールと次亜塩素酸ナトリウムで滅菌処理し、寒天培地にて無菌的に組織培養を行った。約3ヶ月後に培養シュートの旺盛な増殖が見られた部分を挿し木材料として、5個の挿し穂について発根培養を行った。培養条件は25°C、16時間明期、インドール酪酸 (IB) 2mg/Lと酸化型グルタチオン (興人) 50mgを添加、主要無機塩類が1/5濃度のGamborg B5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10,000lux条件とした。2ヶ月後に発根状況を確認した。

4) ウラルカンゾウにおけるグリチルリチン酸 (GL) 生合成酵素遺伝子の発現解析

水耕栽培植物の地上茎の挿し木により増殖したウラルカンゾウ優良株 Gu#11 (挿し木苗) を材料とした。バーミキュライトを充填したアラシステムに挿し木後、約7か月水耕栽培した株、7個体 (1個体は予備) を各ストレス処理及びコントロールに使用した。

ウラルカンゾウ水耕栽培苗に付加するストレス条件として下記条件を設定した。

塩ストレス (S) : 200 mM NaCl (RO 水に溶解)
浸透圧 (疑似乾燥状態) ストレス (P) : 15% PEG6000 (RO 水に溶解)
コントロール (C) : RO 水

挿し木苗を水耕栽培のアラシステムトレイより各ストレス負荷試験トレイに移動し、地表部よりストレス試験水耕液を供給し、支持体 (バーミキュライト) 中の水耕液を置換することにより、試験を開始した。試験開始 (0d) 1日後 (1d)、または3日後 (3d) に各試験区それぞれ3株をサンプリングした。

ストレス処理した苗及び対照区の根の、基部から5cmの部分のサンプリングし、新鮮重測定後、液体窒素で凍結し、以降の処理まで-80°Cフリーザーにて保存した。Total RNAの調製には RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) をプロトコルに準拠し使用した。

得られた total RNA は TURBO DNA Free

(Ambion) で DNase 処理し、RT-PCR 及び定量 real-time PCR に使用した。

GL 生合成酵素各遺伝子 (*bAS*、*CYP88D6*、*CYP72A15A*) の発現量は、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio) を使用し、各検体の total RNA 240 ng を鋳型として逆転写反応を行ったものを5倍希釈し、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, Takara Bio) を用い real-time-PCR 法 (反復 well 数: 3) により定量した。

ウラルカンゾウ水耕栽培苗と同様のストレス負荷試験をシロイヌナズナに対して行い、処理開始前 (0d)、1日後 (1d)、3日後 (3d)、5日後 (5d) の地上部の状態を観察した。

5) ウラルカンゾウ人工水耕一圃場ハイブリッド栽培 (ハイブリッド栽培) システムの確立

人工水耕栽培したウラルカンゾウより育成した挿し木苗を、培養土に植え替えて育成した後定植し、国内各地 (北海道名寄市、茨城県つくば市、茨城県稲敷郡阿見町、神奈川県相模原市、広島県福山市、鹿児島県熊毛郡中種子町: 種子島、沖縄県八重山郡竹富町: 西表島) での各種栽培試験 (圃場栽培、圃場筒、圃場短筒栽培、圃場マルチ栽培、ビニールハウス筒栽培、野外鉢栽培) を行った。適宜、生存率 (萌芽率)、草丈を測定した。

9-12月にかけて、株の掘り上げを行い、水洗後に地下部の新鮮重量を測定した。各部位 (根及びストロン) に分割後、50°Cで数日間温風乾燥し、乾燥重量を測定した。

各種栽培条件及び苗種別毎に根の収量の高い3-4検体を選び、東京生薬協会において、径0.5cm以上と径0.5cm未満に分割して日本薬局方 (日局) に従いグリチルリチン酸 (GL) を定量した。また、広島県福山市での筒栽培の検体は、丸善製薬で成分分析を行った。

6) オタネニンジン実生苗の水耕栽培

芽切り種子 (長野県2011年産) を湿らせたキムタオルに包み、4°Cの保冷庫で5ヶ月間以上保存し、保冷庫内で発根・発芽あるいは発根していた種子を材料とした。

種子をバーミキュライトに播種し、純水もしくは養液（標準濃度の1/8の大塚A処方）を供給しながら、閉鎖温室[20℃、相対湿度60%、明期14時間（太陽光+補光照明）]内で144日間育苗した。得られた実生を水耕栽培装置に移植し、バーミキュライトを支持体とする「底面灌水」、養液中に空気を供給する「バブリング」、養液を根に直接噴霧する「ミスト」の3方式で207日間栽培し、その生育及びギンセノシド含量を比較した。

7) 太陽光利用型植物工場での甘草の生産

甘草の効率的生産のため、昨年度に引き続き太陽光利用型植物工場（環境制御型の温室）に設置した水耕栽培装置で、薬効成分が高含量となるウラルカンゾウ株 GuIV1 を夏季から秋季まで栽培した。また、収穫した根の貯蔵温度処理を行った後に凍結乾燥、薬用成分定量を行い、従来法（貯蔵せずに50℃で温風乾燥）との比較を行った。

さらに、散気量を変化させた水耕栽培試験を行い、最適条件を検討した。

8) 人工水耕栽培環境下での黄連の生産

黄連人工水耕栽培の環境条件において最適な光強度環境条件を検討した。

9) 甘草の化学的同等性評価

人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」、
「人工水耕-圃場ハイブリッド栽培甘草」および市場流通生薬「甘草」をLC-MS/MSにより分析し、そのデータの多変量解析を行い、両甘草の同等性や差異に関する検討を行った。

10) 黄連の化学的評価

人工水耕栽培環境下で生産した「黄連」と市場流通生薬「黄連」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、両黄連の同等性や差異を検討した。

11) ハイブリッド栽培甘草の日本薬局方

（日局）試験および個別元素（As、Pb、Hg、Cd）の定量

「ハイブリッド栽培甘草」について、日局

試験及び個別元素分析を実施した。栽培地、栽培方法、栽培日数、挿し木苗の性状及びクローンが異なる30検体について、外部形態を観察した後に5試験区の検体について内部形態観察をおこなった。次に、日局性状に記載される径0.5cm以上及び0.5cm未満に分け、各々についてGLを定量した。さらに、GL含量が規格に適合した検体について、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4元素定量（As、Pb、Hg、Cd）を実施した。

12) 接触性皮膚炎モデルマウスによる遅延型アレルギーの病態誘導と抗アレルギー作用の評価

BALB/c（7週令、雌）の側腹部の体毛を、感作開始2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day0として、アセトンに溶解した5%TNCB（2,4,6-trinitrochlorobenzene）溶液を100μl側腹部に塗布した。Day7に1%TNCBアセトン溶液を右耳介の表裏に10μlずつ塗布し、24時間後、48時間後の耳介腫脹を測定した。耳介腫脹の測定にはダイヤルシクネスゲージを使用し、1匹につき3回測定し平均値を実測値として用いた。肥厚の変化は以下の式（A）を用いて算出した。

$$\Delta \text{Ear swelling} (\mu\text{m}) = [\text{各測定時の実測値} (\mu\text{m}) - \text{初回測定時の実測値} (\mu\text{m})] \cdots \cdots \cdots (A)$$

被験エキスは、それぞれの生薬の熱水抽出物とした。

甘草エキス経口投与群は、GL量に換算し100 mg/kgを設定した。経口投与量の体積は1匹当たり最大200μL以内になるよう、GL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。

黄連エキス経口投与群は、ベルベリン量に換算し30 mg/kgを設定した。経口投与量の体積は1匹当たり最大200μL以内になるように、ベルベリン10 mg/mlに精製水で調製し、day0

より惹起1日前のday6まで計7回反復投与した。

13) 黄連エキスのAmes試験

試料エキスを秤量し、DMSO (Dimethyl sulfoxide, 和光純薬工業株式会社, 大阪)を加えた後、超音波処理により懸濁し、調製液とした(本試験 I : 50.0 mg/mL、本試験 II : 6.25 mg/mL)。この濃度を最高濃度とし、以下同溶媒で2倍ずつ段階希釈をした(用時調製)。使用細菌株は、ヒスチジン要求性細菌株として *Salmonella typhunurium* TA102 (一塩基変異検出)、TA98 (フレームシフト型変異検出)を用いた。

陰性対照にはエキス調製液の希釈媒体(DMSO)を100 µL加え、陽性対照については変異誘導物質を加えて上記と同様の操作を行った。

陰性対照あるいは陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値あるいは陽性対照値とした。サンプルにおける変異コロニー数の値が、陰性対照値の倍以上となっているものを陽性、それ以外のものを陰性とした。なお、陰性対照値および陽性対照値は同時に実施した4試験は共通に用いた。

14) ブランド生薬の開発：シャクヤク

採花方法の検討：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「過剰採花(茎数の半数を採花または6本を残して採花)」と設定した。2012年は6月、2013年と2014年は5月に茎を地際で切り取った。2014年12月1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。さらに、採花2年目の根(栽培5年目、2013年10月29日に採取し、11月8日まで30°Cで送風乾燥)について8成分を定量した。

加工調製法の検討：直径2.0 cm前後の根を選別し、それらを均等に15グループに分けた(各8個体)。15グループの根に対してそれぞれ15通りの加工・乾燥法(低温処理の有無、周皮の有無、湯通しの有無、室内乾燥、

室外乾燥または機械乾燥)を行った。終了後、各グループ中5個体の根についてそれぞれ8成分を定量した。また、分光色差計を用いて根の横断面の色を評価した。

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(DHB)をスプレーし、MALDI-TOF MSを用い、Pentagalloylglucose (PGG)はネガティブモードで、Albiflorin、Paeoniflorin、Paeonol及びCatechinは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。

無機元素の含量と溶出量：シャクヤクの根または生薬本体、及び煎じ液中に溶出される無機元素の種類と含量を、ICP発光分析装置を用いて測定した。

15) ブランド生薬の開発：ダイオウ

栽培—菅平薬草栽培試験地：2011年6月12日定植後、無肥料で栽培し、2012年6月28日、2013年6月27日、8月8日及び9月11日、2014年6月17日、7月15日及び9月18日に生育調査を実施した。2013年11月5日に10系統、2014年11月6日に11系統のそれぞれ一部の株を収穫した。形態観察した後、地下部を根茎と根に分け、それぞれ自然乾燥後、通風乾燥した。新鮮時と乾燥後にそれぞれ重量を測定した。

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、施肥をして栽培し、2012年8月14日、2013年8月16日及び10月22日、2014年10月8日に生育調査を実施した。10月8日に収穫して地下部の形態を調べ、また根茎と根の重量を測定した。その後、根茎と根を自然乾燥した後、通風乾燥し、異物を除去して評価用サンプルとした。

品質評価：HPLC分析によりLindleyinを定量した。LC/MS分析及び単離した化合物との比較などにより、系統29などの含有成分を同定した。

網羅的成分分析：試料の 80%アセトンエキスを遠心式限外ろ過フィルターで順次分離した。濃縮された分画を LC/MS や MALDI-TOF MS を用いて分析し、プロシアニジン類の組成を調べた。

16) ブランド生薬の開発：エゾウコギ

栽培：昨年度、播種による養液栽培で育て、屋外馴化まで進んだ植物体を、圃場栽培に移行させた。また予備実験として、2013 年 11 月中旬に採取した若い枝を冷蔵保存し、翌年 2 月 26 日に枝を調製した後、3 種類の土に挿した。その後、養液栽培を実施した。

葉の成分分析：昨年度に継続して葉の LC/MS 分析を行い、含有成分を同定した。

C. 研究結果

1) ウラルカンゾウ植物組織培養物バンクの確立

GL を高蓄積するクローンに特徴的な *CYP88D6* 遺伝子配列 (GuIV1 及び GuIV2 タイプ) を持たない Gu2-2-1 及び Gu2-3-2 は、植物組織培養系の確立が容易で、3% ショ糖、グルタミン 10 mg/L 含有、植物ホルモン無添加 (HF)、Woody Plant (WP) 固形培地 (WPG HF) での継代維持、増殖と植物体再生が可能であった。一方、GuIV1 及び GuIV2 タイプの配列を持つクローンは同条件での組織培養系の確立は困難であったが、各種培地を検討した結果、GuIV1 及び Gu#11 (GuIV1 タイプ) は、ショ糖 1%、MES 0.5 mg/L 含有、インドール酪酸 (IB) 0.1 mg/L 添加 Murashige and Skoog (MS) 固形培地 [MES (1) IB0.1] での継代維持、増殖、植物体再生が可能な組織培養系を確立した。さらに難培養性のクローンについては、外植片を採取後、流水処理を行うことにより、MES (1) IB0.1 での継代維持、増殖、植物体再生が可能な組織培養系を確立し、これまでに育成した全てのクローンの植物組織培養物バンクの確立に成功した。

2) シナマオウシュート培養系の確立

新たに由来の異なる 3 系統のシナマオウ

(EsTK、EsTU 及び EsTA) のシュートの先端を材料に、植物組織培養系の確立を検討した結果、すべてのシナマオウにおいて、DKW (1) IB0.1 で培養することにより、シュート増殖能の高いシュート培養の育成に成功した。

3) キダチマオウの挿し木増殖

今回行った滅菌処理ではほぼカビの発生が無く、キダチマオウを無菌培養系へ導入出来き、その後も培養シュートは旺盛な生育を示した。これを挿し木材料として 5 個の挿し穂について発根培養の結果、1 個体で発根が認められた。

4) ウラルカンゾウにおけるグリチルリチン酸 (GL) 生合成酵素遺伝子の発現解析

地上部の生育に関してはストレス処理区とコントロール (RO 水) 区において、ストレス処理後 11 日間 (11d) まで両者に顕著な差異は認められなかった。

1 日間ストレス処理を施した場合、塩ストレス (NaCl) 処理においては *CYP88D6* の発現レベル低下が認められた。疑似乾燥ストレス (PEG6000) 処理においては、3 遺伝子とも低下したが、*BAS*、*CYP88D6* においては有意であり、とくに *CYP88D6* の発現レベル低下が顕著であった。

3 日間ストレス処理を施した場合は、コントロールの個体間の各遺伝子の発現レベル差異が大きかった。塩ストレス処理においては *CYP88D6* の発現レベル低下が認められた。疑似乾燥ストレス処理においては、3 遺伝子とも発現レベルが低下したが、有意差は認められなかった。ストレス処理区における発現応答の全体的な傾向は 1d と類似していた。

シロイヌナズナは 3d 以降、塩、疑似乾燥ストレス両条件下において葉にダメージが生じはじめた。これに対してウラルカンゾウは、いずれの条件下でも 3d 以降、落葉が生じはじめ、5d には葉の褐変化が認められた。11d に地上部はほぼ枯れたが、地下部 (根) は生存しており、シロイヌナズナと比較してこれらのストレスに耐性を示すことが明らか

かになった。

なお、ウラルカンゾウにおいては対照区 (R0 水) においてもストレス区と同様に地上部が枯れていることから、地上部の枯死は水耕液を R0 水ベースのストレス試験溶液に変更したことによる養分の不足が原因と考えられる。

5) ウラルカンゾウ人工水耕—圃場ハイブリッド栽培システムの確立

人工水耕栽培したウラルカンゾウより育成した挿し木苗を、国内各地で各種栽培試験を実施した結果、苗の定植時期と定植方法が、翌年の萌芽率に大きく影響した。定植時期は、つくば市以南は夏至までが、北海道では 7 月末までが適しており、北海道で 8 月以降、その他の地域で 9 月以降に定植した株は翌年の萌芽率が低かった。定植方法は、挿し穂とした地上茎の地際の節が土上にある場合は、ストロンの形成が抑えられ、根の肥大と GL 含量増加が認められた。しかし、冬季に地上茎が障害を受け、翌年の萌芽率は低くなった。

一方、挿し穂とした地上茎の節を含む部分、あるいは節を含む地上茎部分が土中にあり、ストロンが形成した株は、翌年も萌芽し、その後も順調に生育した。

北海道圃場栽培 (定植後 818 日) の径 0.5 cm 以上の根 (太根) は、分析した 4 検体の全てで GL の日局の規格値 2.5% 以上を満たし、径 0.5 cm 未満の根 (細根) も 1 検体を除き、日局規格値を満たした。また、筑波圃場筒栽培 (定植後 420 日)、相模原マルチ栽培 (定植後 447 日) は、太根、細根の両方で GL の日局規格値を満たすものが存在し、筑波圃場筒栽培 (定植後 420 日)、筑波圃場短筒栽培 (定植後 388 日)、筑波圃場マルチ栽培 (定植後 383 日)、相模原マルチ栽培 (定植後 447 日) では、GL の日局規格値を満たす細根が存在した。しかし、福山市以南では GL の日局規格値を満たす根は得られなかった。

以上より、ウラルカンゾウ優良株挿し木苗による人工水耕—圃場ハイブリッド栽培システムは、関東地方においても、定植後 1—

1 年 3 ヶ月の短期間で GL の日局規格値を満たす甘草を生産する方法として優れていることが判明した。

6) オタネニンジン実生苗の水耕栽培

オタネニンジンの水耕栽培による生産について検討した結果、育苗時に播種 1 ヶ月後より養液を供給すると、苗の生育が促進された。また、その後の水耕栽培では、底面灌水方式と比較し、バブリング方式では根の肥大が、ミスト方式では根の伸長が促進される傾向が認められた。これら結果より、播種後約 1 ヶ月から養液を供給し、ミスト方式、もしくは、バブリング方式で水耕栽培することにより、播種から約 1 年の短期間で、最大径が 0.5 cm 以上、かつ、ギンセノシド Rg1 含量が 0.25% 以上、ギンセノシド Rb1 含量が 0.37% 以上と日局の成分含量規格を満たす根を得ることに成功した。

7) 太陽光利用型植物工場での甘草の生産

温室への既存の細霧冷房装置と遮光カーテンの利用により、夏季の明期平均気温を 28°C 程度にでき、従来型よりも株あたりの培養液量が少ない水耕栽培装置でも十分生育させることができた。ウラルカンゾウは生育の程度に個体差が大きいことから、それらを同様に扱くと、環境条件などの処理による影響が不明瞭になる。そこで本試験では、栽培した同一の株の根を 4 分割して貯蔵温度処理を行った。

GL は、凍結乾燥または -80°C の低温貯蔵 (凍結乾燥) を行うことで、従来法の 50°C 乾燥よりも GL 濃度が増加する株がみられた (30 株中 17 株) が、顕著な濃度差ではなかった。

水耕栽培における散気量の検討は、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。

根頭部根径増加率は 2 L min⁻¹ で最大となったが、大きな差は生じなかった。地下部 (根) の乾燥重量は、顕著な差が生じて 2 L min⁻¹ が最大となった。GL 濃度 (50°C 乾燥) は、

いずれの処理区も日局に基づく GL 2.5%に達した株はなかった。

また、GuIV1 と GuIV2 の株間で地下部(根)乾燥重と GL 濃度 (50℃乾燥) の比較を行った。GuIV2 は地下部 (根) 重量が大きい、GL 含量は約 1.2%と低い値となり、GuIV1 は地下部 (根) 重量が小さい、GL 含量は約 1.8%と、IV1 と IV2 は逆の傾向を示した。

散気量処理区ごとに収穫後の貯蔵温度・乾燥処理の比較を行った。

GLは、2.5%に達した株はなかった。凍結乾燥または-30℃、4℃の低温貯蔵 (凍結乾燥) を行うことで、従来法の50℃乾燥よりもGL濃度が増加する区がみられた。しかしながら、傾向は一様ではなく散気処理区ごとに最も高い濃度となる処理法は異なっていた。

8) 人工水耕栽培環境下での黄連の生産

栽培中に葉焼けの症状が生じることも懸念されたが、光強度が強くなるにしたがって、葉がやや黄色味が強くなったり、葉縁部が赤褐色味を帯びたりしたが、葉焼け現象は生じなかった。栽培終了時の根茎部、地上部及び地下部乾燥重量の測定を行った結果、根茎部は、光強度 $240\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ が少なくなっているが、他の3区は大きな差は生じなかった。地上部は光強度が強くなるにしたがって減少し、 $240\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で大きく減少した。

地下部は光強度が強くなるにしたがって減少する傾向で、 $210\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ から大きく減少した。

9) 甘草の化学的同等性評価

昨年度の人工水耕栽培「甘草」に加え、新規人工水耕栽培甘草、人工水耕栽培で生産した苗を圃場栽培した「人工水耕-圃場ハイブリッド栽培甘草」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 を行い、正負両検出データを用いた多変量解析を行った。

正負イオン検出いずれにおいても、全イオン電流クロマトグラム (TICC) 上の大きな差異は認められなかった。

多変量解析においては、各グループを特徴付けられると思われるマーカー成分が幾つか見出された。

10) 黄連の化学的評価

人工水耕栽培環境下で生産した「黄連」と市場流通生薬「黄連」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、両黄連の同等性や差異を検討した。測定結果の解析は、黄連の既知化合物の構造を考慮し、正イオン検出を中心に行った。

正イオン ESI/LC/MS/MS により測定した TICC において、市場流通品は、そのパターンより2つのグループ、9~10分に3本のピークが顕著に観測され且つ11分に2本のピークが観測されるグループ(グループA)と、9~10分のピーク群の、3本のうちの1ないし2本のピーク強度が低く且つ11分に1本のピークが観測されているグループ(グループB)に大別でき、4種類の水耕栽培黄連はグループBに分類されることが推測された。多変量解析により、それぞれのグループを特徴づける成分を解析し、各グループを識別できるマーカーが得られた。さらに、水耕黄連をさらに二分できる可能性のあるマーカーも得られた。

11) ハイブリッド栽培甘草の日本薬局方(日局)試験および個別元素(As、Pb、Hg、Cd)の定量

栽培地、栽培方法、栽培日数、挿し木苗の性状及びクローンが異なる30検体について、外部形態を観察した後に5試験区の検体について内部形態観察をおこなった結果、外部形態は全検体が、内部形態は観察した5検体全てが日局カンゾウに適合していた。なお、道管径、シュウ酸カルシウム単晶の数においては水耕栽培品と圃場栽培品の両方の特徴を有することを確認した。径が0.5cm以上の部分でGL含量が日局規格値(2.5%以上)を満たした検体は8検体であった。これら8検体は、日局理化学試験規格に適合した。

また、個別元素分析では、評価した全検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。

12) 接触性皮膚炎モデルマウスによる遅延型アレルギーの病態誘導と抗アレルギー作用の評価 [CHS (Contact hypersensitivity reaction) 試験]

甘草においては、水耕栽培品及びハイブリッド栽培品と市場流通品との抗アレルギー活性に有意な差は見られず、いずれも同等の抗アレルギー活性を示すことが示唆された。また、黄連においては、市場流通品・水耕栽培品との抗アレルギー活性に有意な差は見られず、市場流通品・水耕栽培品ともに同等の抗アレルギー活性を示すことが示唆された。

13) 黄連エキスの Ames 試験

Ames 試験では市場流通品、水耕栽培品の両サンプルとも TA98 株において陽性となったが、比活性値を比較したところ、水耕栽培品の比活性値は市場流通品の値より低い値を示した。

全サンプルの比活性値を算出し比較した結果、市場流通品 THS-88835 の比活性値が他のサンプルに比べ有意に高い値を示したことから、オウレンの主要成分であるベルベリンの濃度と、変異原性の相関を調べるため、それぞれのサンプル中のベルベリン濃度を測定した。その結果、NIB-0185 では 12.6%、THS-88835 では 20.5%、オウレン 1 では 18.0%、オウレン 4 では 20.5%であり、比活性値との相関は無い可能性が示唆された。

14) ブランド生薬の開発：シャクヤク

栽培：採花 3 年目の採花前の茎数は、無採花群、8 本温存採花群及び過剰採花群でそれぞれ 15.7 本、13.4 本及び 12.1 本となり、各群間に有意差は認められなかった。採花 3 年目の乾燥根重については、根の径に係わらず無採花群と 8 本温存採花群は同等で、2 群の合計値ではそれぞれ 635.1 g、665.0 g であった。一方、過剰採花群では合計値が 365.0 g で、有意に収量が減少した。

採花 2 年目の根の成分含量については、

Paeoniflorin 含量が 47.7~58.5 mg/g であり、採花群によって大差はなかったが、過剰採花群が最も高く、次いで 8 本温存採花群であった。Albiflorin、(+)-Catechin でも同様の含量順位となった。また、PGG、Paeonol、Gallic acid 及び Benzoic acid はいずれも 8 本温存採花群で最も高く、次いで過剰採花群という結果であった。

加工調製法の検討：約 1 ヶ月間の低温貯蔵を経た 6 グループでは Paeoniflorin 含量が安定しており、高い値を示した。これらの内、湯通し加工を行っていない 4 グループでは最も高い L*値を示し、ほぼ白色であった。一方、低温貯蔵を行わず、また湯通しをせずに周皮を除いて乾燥した 3 グループ及び周皮をつけたまま熱風乾燥した 1 グループでは Paeoniflorin 含量が低下し、反対に Benzoic acid 含量が増加した。これら 4 グループでは顕著な変色が認められ、L*値が低かった。また、湯通し加工を行った 5 グループでは、PGG、Gallic acid 及び Methyl gallate の含量が増加した。これらのグループでは安定した L*値を示し、さらに澱粉が糊化されたことにより内部が淡黄色を呈して、b*値が比較的高い傾向にあった。なお、皮去り加工により Albiflorin 及び (+)-Catechin の含量の減少が見られた。

有機化合物の組織内分布：Albiflorin はプロトン付加体 m/z 481 とフラグメントイオン m/z 197、Paeonol はプロトン付加体 m/z 167、Catechin はプロトン付加体 m/z 291、PGG は脱プロトン体 (m/z 939) でそれぞれイメージングすることにより、根の切片表面における各化合物の局在を確認できることが判明した。Albiflorin、Paeonol 及び Catechin はシャクヤクの根の皮層周辺に存在し、一方 PGG は根の全体に分布し、特に木部に多い傾向が見られた。

無機元素の含量と溶出量：ICP 発光分析により 11 種類の無機元素の含量を測定した結果、シャクヤクの根にはカルシウムが多く、次い

でカリウム、マグネシウム、ナトリウムの順であった。根を煎じた場合の水溶液中にもこれら4種類の元素が溶出していたが、特にカリウムが多かった。生薬「赤芍」では他の芍薬に比して2.1-2.6倍のカルシウム含量を示した。

15) ブランド生薬の開発：ダイオウ

栽培—菅平薬草栽培試験地：定植した16系統の内、系統38が4年目までの生存率87.5%を示し、系統41、42、43、A1が43~57%を示した。高い生存率を示した系統は、*R. palmatum*のRPII型・Rp5タイプに属するものが多かったが、同タイプの系統29は30.0%であった。また、系統38はRPI型・Rp4タイプで、これまで生育が難しい系統であった。RPII型・Rp5タイプを示す系統では、根茎が短く、太い根が数本以上付くという共通した特徴が見られた。系統38では根茎の発達が良好であった。さらに、系統29と系統38は根の断面が橙黄色でかつ粘液の分泌が顕著であった。

栽培—薬用植物資源研究センター北海道研究部：定植した19系統の内、3年目（2013年10月）まで生存した系統は8系統であった。その内、4年生株として収穫できた系統は、5系統であった（系統18、29、38、41、45）。生存率は系統38が30.0%、系統45が20.0%、系統29が16.7%であり、1株当たりの地下部の収量は系統29が340.0~370.7g、系統45が113.2~290.2g、系統38が201.0gであり、これら3系統が土壌湿害に適応性があり、収量も高かった。

品質評価：*R. palmatum*の系統29の検体2の根の成分として新たに1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose、Procyanidin B-2 3-*O*-gallate、Procyanidin B-5 3-*O*-gallate、Resveratrol 4'-*O*- β -D-glucopyranoside、Procyanidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate、Resveratrol 4'-*O*- β -D-(2''-*O*-galloyl) glucopyranoside、1-*O*-galloyl-2-*O*-cinnamoyl-glucopyranosideを同定した。

Lindleyin は、2012年に収穫した栽培5

年目の11系統のうちで、系統17、18、29、43、45において比較的高含量であった。これらの系統はすべてRPII型・Rp5タイプに属した。2013年に収穫した栽培3年目の系統29、38でも高含量であった。HPLCクロマトグラムの比較では、これら2系統ともに栽培5年目の系統29に比べて検出される化合物が少なかった。系統38は29に類似するが、Sennoside A、1-*O*-galloyl- β -D-glucose、6-*O*-galloyl- β -D-glucose は系統38で、Resveratrol 4'-*O*- β -D-(6''-*O*-galloyl) glucopyranoside は系統29で多そうであった。

網羅的成分分析：80%アセトンエキスを分画分子量がそれぞれ30kDa、10kDa、5kDa、2kDaと異なるフィルターに逐次通過させたところ、タンニン類が濃縮される分画のパターンにサンプル間で差が見られた。これらの分画のLC/MS分析では重合度が最大で6までのプロシアニジン類と考えられる質量数を観測した。

16) ブランド生薬の開発：エゾウコギ

栽培：屋外馴化させたエゾウコギの植物体88株のうち84株をガラス温室で越冬させ、2014年5月に富山県などの圃場に定植させた。富山市粟巣野及び大長谷で圃場栽培した23株の生長経過はほぼ良好であった。挿し穂による養液栽培では、挿し穂に適した土壌として硬質鹿沼土と日向土の3:1の混合土を選択することができたが、発根率は6%程度であった。

葉の成分：カフェオイルキナ酸類を中心に10種類の化合物を同定できた。またサポニン成分の含有を確認した。

D. 考察

1) 「甘草」等の種苗生産システムの構築

ウラルカンゾウ植物組織培養物バンクは、ウラルカンゾウ国内栽培推進のための種苗増殖の基盤となるだけでなく、ウラルカンゾウにおける有用遺伝子探索、機能解析、育種

マーカー探索、二次代謝物生合成機構の解明等の研究素材として、学術的にも価値が高いと考えられる。

麻黄は、風邪の治療を目的とする漢方薬に汎用される重要な生薬であるが、原産国である中国からの輸入は厳しく制限されている。しかし、日本での栽培、生産はなく、今後の安定確保が危惧されている。

今回、新たに由来の異なる3系統のシナマオウについて、植物組織培養によるシュート増殖が可能となった。発根、苗化は今後の課題であるが、今回確立したシュート培養は、培養シュートからの挿し木による苗化に成功している金沢大学系のシナマオウとほぼ同様の反応を示しており、同じ手法が応用可能と考えられる。

キダチマオウは、圃場から採取した枝をそのまま挿し穂として、挿し木を行っても発根が認められなかった。しかし、植物組織培養を行ったことで幼若化現象が起り、発根に至ったと思われる。今後さらに組織培養を継続し、供試数を増やして行くことで、発根率の上昇は見込まれると思われる。こうした組織培養物で発根性が良くなることはその他の植物でも見受けられる。薬用植物は一般的に挿し木が困難な品目が多いことから、薬用植物に組織培養を利用することは効果的と考えられる。また、発根条件についてはこれまでシナマオウ (*Ephedra sinica* Stapf) で有効であった炭酸ガス 1,000ppm、光強度 10,000lux の環境が適していると思われ、光合成活性の増加が発根には重要な役割を果たしていることが改めて示唆された。

ウラルカンゾウ幼植物(挿し木苗)におけるストレス応答実験の結果から、GL 生合成酵素遺伝子3種のなかでは、*CYP88D6* 遺伝子の発現量のストレス負荷による変動がもっとも顕著であった。これは、昨年度実施した、幼植物根の基部と先端部における GL 生合成遺伝子群の発現解析において、両部位における遺伝子発現の差が *CYP88D6* においてももっとも顕著であったこととよく対応し、本遺伝子が、ウラルカンゾウの GL 生合成経路のボトルネックとなっていることを裏付けるもの

と考えられる。

ウラルカンゾウ水耕栽培苗の根におけるストレス応答実験の結果から、少なくとも今回供試したような幼植物期においては、高塩濃度や(疑似)乾燥状態は GL の生合成遺伝子の発現量を低下させ、ひいては GL の生産を抑制すると考えられる。

ウラルカンゾウは乾燥地域に自生し、日本のような高温多湿の気候は栽培に不向きと一般に認識され、乾燥した風土や、土壤中の塩分によるストレスが二次代謝産物である GL の生産を誘導する可能性があると考えられていたが、今回の結果はこれを否定するものであり、水耕栽培においては、水分が過剰な状況においても旺盛に生育し、十分量の GL を生産することと矛盾がない。

中国東北部で、自然環境下、乾燥または塩分濃度の高い地域に生育しているウラルカンゾウは、生産量は少ないが長期間を経て GL を生産・蓄積していると考えられる。

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいては、ウラルカンゾウの EST、トランスクリプトーム情報の解析・収集を行っている。今後、ウラルカンゾウ水耕栽培苗を材料とした発現解析モデルシステムとこれらの情報を活用し、より詳細なウラルカンゾウの栽培及び、GL 生産に適した栽培条件の最適化を進めることができると考えられる。また、これらのモデル実験で蓄積された知見は、幼植物苗のみならず、圃場栽培植物の根における土壌条件や気候条件の差異が GL 生産におよぼす影響の解析の基盤情報となるものと期待される。

2) ハイテク生薬生産システム構築

ウラルカンゾウ人工水耕-圃場ハイブリッド栽培システム構築のため、昨年度に引き続き、人工水耕栽培植物を材料に増殖、育成した挿し木苗の国内各地での圃場及びビニールハウスでの栽培試験を行った。その結果、人工水耕栽培植物を材料に増殖させたウラルカンゾウ優良苗は、北海道圃場だけでなく、関東地方圃場での1年-1年3ヵ月の栽培でも、GL の日局規格値を満たす甘草生産が可

能なことが判明した。

定植時期、定植方法、栽培方法等の最適化により、本研究で育成したウラルカンゾウ優良株を用いた本新規栽培方法は、甘草国内生産に大きく貢献できるものと思われる。

オタネニンジンについて、芽切り種子より育成した実生を材料に、人工水耕栽培による生薬「人参」の生産を検討した。水育苗は、播種約1ヶ月後における活着率は67%であったが、本葉展開後も根腐れ等により枯死する株が認められたことから、水条件や支持体等について検討を加えることで、活着率をより高めることができる可能性が考えられた。また、養液供給の開始時期については、播種約1ヶ月後より開始することで、生育を促進することが可能であり、育苗時のみならず、その後の水耕栽培においても、初期より養液で育苗した株の方が総じて優れた生育を示したことから、本葉展開後まもなくの地上部がまだ成長しきっていない時期、遅くとも播種1ヶ月後までに養液供給を開始することが適当であると考えられた。一方、養液育苗区では、主根の先端が褐変し、伸長が止まっている株が確認されたことから、根の先端が養液に触れることにより、傷害を受けている可能性が考えられ、発芽初期における最適な養液濃度に関しては検討の余地があると考えられた。

オタネニンジンの芽切り種子を播種し、播種後351日目（アラシステムによる育苗144日＋水耕装置による栽培207日）まで育成した結果、栽培方式や育苗方法によらず、日局の含量の規格値を播種後約1年間と短期間の栽培で超えることが可能であることが明らかとなった。また、播種約1ヶ月後より養液で育苗を行い、バブリング方式、あるいは、ミスト方式で水耕栽培を行うことにより、径5mm以上の乾燥根を得ることができ、底面灌水方式や水育苗区と比べて収量の増加に成功した。

以上より、環境を人為的に制御できる閉鎖系栽培施設を利用して、養液を播種後比較的初期に加えて育苗したオタネニンジン苗を、バブリング方式あるいはミスト方式により

水耕栽培することで、気象条件や自然災害の影響を受けることなく、また、病害虫、農薬、重金属等の汚染の少ない、安心・安全な人参を従来の1/5以下の短期間の栽培で効率的に生産できる可能性が示された。

今後の課題としては、発芽および活着率を高める育苗条件、あるいは、組織培養等による増殖について検討することでより効率的な苗の供給条件を見出す必要がある。また、今回の栽培では、地上部が枯死後、休眠状態に入り、生育が止まったことから、より短期間で収量を高めるためには、簡便な新芽の萌芽条件について検討する必要があると考えられる。

甘草の実証的な栽培方法として太陽光利用型植物工場での水耕栽培を行った。本試験で用いた水耕栽培装置のように、株あたりの培養液量が少ない栽培装置を用いる場合、培養液温度が気温に追従して変化しやすく、また、培養液組成や濃度も変化しやすい。特に、夏季には培養液温度が高くなりやすく、それに伴う酸素欠乏が生じやすい。しかし、細霧冷房などで昇温を抑制しながら行った本試験では、エアポンプにより十分な酸素が供給されており、従来法と同じ期間で培養液の追液と更新を行うことでウラルカンゾウを正常に生育させることができた。昨年度の試験で、温室内の暖房や補光により、ウラルカンゾウの生育を冬季も継続可能であることが示されている。したがって、環境制御を適切に行うことで温室でのカンゾウの周年栽培は十分可能と考えられた。

水耕甘草の収穫後の貯蔵温度処理試験の結果、GL濃度が2.5%に達した株は少なく、高含量株で根を十分に成長させた場合であっても、栽培条件によってはGL濃度が2.5%に満たない場合があることが明らかとなった。GL濃度は根の生体重や乾物重、あるいは基部根茎幅には影響されず、貯蔵や乾燥方法、さらに次亜塩素酸の混入による変動もみられなかった。GLは他の薬用成分（フラボノイド類）よりも多量に含まれており、本試験の結果からも、収穫前のストレス処理（次亜塩素酸の混入）や収穫後の貯蔵温度や乾燥

方法によらず安定していると考えられた。

黄連人工水耕栽培における光強度を検討した結果、光強度 $240\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では生育が抑制されるが、 $150\sim 210\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下では、大きな差は生じなかった。株が大きくなるにしたがって葉が重なり合い、株の内部では光強度が減衰することを考慮すれば、栽培初期は $150\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で栽培し、株の成長に合わせて光強度を大きくするのが適当と考えられる。

3) 生薬「甘草」等の評価（品質・有効性・安全性）

甘草の化学的同等性評価のため、LC-MS/MS 分析および多変量解析を行った結果、H26 年度に追加した「人工水耕栽培甘草」と「人工水耕-圃場ハイブリッド栽培甘草」のメタノール抽出エキスの正負両イオン検出において、両者には微妙な差異が見られた。特に負イオン検出データを用いた多変量解析において、 m/z 549.15 - 549.17 でトレースした XIC のピークパターンに若干の違いが見られた。しかし、H26 年度に追加した全試料を *G. uralensis* として 25 年度測定済みの *G. uralensis* 群試料データと共に同じグループとし、25 年度測定済みの全データを含めて多変量解析を行った結果では、26 年度に追加した全試料は、25 年度の *G. uralensis* 群試料と同様の傾向を示し、栽培方法に関わらず、*G. uralensis* 由来の甘草の化学的同等性は高いものと判断できた。

LC-MS/MS による多変量解析により、人工水耕栽培環境下で生産した「黄連」と市場流通生薬「黄連」の同等性や差異を検討した結果、黄連類は中国産市場流通品及び日本産市場流通品の 2 つのグループに分類され、4 種の水耕栽培黄連は全て日本産市場流通品の同じグループに属した。今回、水耕栽培に使用した黄連はすべて日本産黄連由来であり、水耕栽培においても日本産黄連の成分的特徴を有していると考えられた。

また、両グループを識別できるマーカー成分が幾つか見出されると共に水耕栽培黄連を含むグループを更に二分できる可能性の

あるマーカーも見出された。

主成分である Berberine の XIC ピーク強度は、いずれの試料においても有意な差はなかった。

ハイブリッド栽培甘草について、日局試験及び個別元素分析を実施した。内部形態観察の結果、径 0.5cm 以上の根の横切片において、木部中に木部柔組織が規則的に並ぶ年輪様の構造があり、これは径 0.5cm 未満では認めなかった。径 0.5cm 未満の部分は圃場栽培期間に形成されたと考えられることから、年輪様構造は、水耕栽培から圃場栽培への移植に伴うものと考えられる。昨年度までの観察では、水耕栽培品と野生品では道管径が異なっており、2013 年度には、『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いよう適応した結果、道管数が少なく、道管径が小さい』と考察した。今年度は北海道における露地（圃場）栽培、茨城県における筒栽培、茨城県における短筒栽培、北里大学（神奈川県）におけるマルチ栽培といった異なる圃場栽培方法が内部構造に与える影響を評価した。各試験区における植物が使用可能な水分量についての情報は無いが、一般的に、マルチ > 短筒 > 筒 > 露地と想定される。道管数および道管径に着目すると、道管数はマルチ < 短筒 < 筒であり、また道管径はマルチ = 短筒 < 筒となる傾向を認めた。一方、露地栽培においては、道管数は少なく、道管径も小さかった。このことは、露地栽培を除けば、2013 年度の生育環境中の水分量と道管数・道管径の関係に対する考察とも一致する。

一方、今回の露地栽培環境において水分が潤沢だったか、もしくは、全く別の要因が道管数・道管径に寄与しているかは明らかではない。

人工水耕栽培甘草を挿し木して得られた苗を圃場栽培した甘草において、皮部柔組織中のシュウ酸カルシウム単晶数は、径 0.5cm 以上、つまり水耕栽培期間を経た部位で多く、径 0.5cm 未満で少ない傾向が認められ、環境中の塩類濃度の差異を反映したものと考えられた。

北海道栽培品において、GL 含量が高い傾