

B. 研究方法

1. 植物材料

非閉鎖温室で鉢栽培中のシナマオウ（東京都系 TS0002-14：EsTK）及び野外ワグネルポットで栽培中のシナマオウ 2 系統（ツムラ系 TS0149-13：EsTU、武田薬品系 TS0776-13：EsTA）のシュートの先端を外植片採取材料とした。

2. 殺菌と培養

2-4 節を含むシュート切片を調製し、そのまま、あるいはガーゼ袋に入れて径 9 cm のガラスシャーレに入れ、75%エタノールで 1 分間殺菌し、滅菌水 50mL で洗浄後、75%エタノールで殺菌したピンセットを用いて、ガラスビーカーに入れた殺菌液（0.1% v/v Tween 20 を含む 2%あるいは 3% w/v 次亜塩素酸ナトリウム溶液）に浸け、攪拌しながら室温（約 25℃）で 10-20 分間殺菌した。クリーンベンチ内で、殺菌後の材料を滅菌した径 9 cm のガラスシャーレに入れ、滅菌水 50mL で 7 回洗浄した。ガラスシャーレに傾斜をつけて静置して余分な水分を取り除いた後、植物材料を新しい径 9 cm の滅菌シャーレに移し、殺菌液により傷んだ切り口部分を切り取って切片を調製し、インドール酪酸 (IB) 0.1 mg/L、1% ショ糖含有 DKW/JUGLANS 培地 [DKW(1)IB0.1] (0.25% Gelrite で固化) (30 mL/径 3 cm 高さ 15 cm 培養試験管) に植付け、23℃、14 時間明期 [白色 LED 管：3,000 lux、50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ 又は蛍光管：6,000 lux、100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$] あるいは 23℃、暗所で培養した。得られたシュートは 2 節を含む頂芽片あるいは 2 節を含む茎切片を調製し、同培地で継代培養を行った。

C. 研究結果

1. EsTK（東京都系 TS0002-14）の組織培養系の確立

非閉鎖温室で鉢栽培しているシュートの先端より、2 節を含む頂芽切片 (St) を調製して DKW(1)IB0.1 に植付け、23℃、14 時間明期 (白色 LED) 及び 23℃、暗所で培養し、シュート形成を検討した。41 日後、14 時間明

期ではシュート再生率 100%、形成シュート数 4.4 本と良好であったが、暗所の培養物は生育不良であった。形成したシュートより、2 節を含む頂芽片を調製し、同培地同条件で継代培養を行った結果、81 日後の 14 時間明期では形成シュート数 6.9 本、シュート長 4.7 cm と良好であったが、暗所では形成シュート数 2 本、シュート長 0.5 cm と不良であった (図 1)。14 時間明期で誘導したシュート培養は、同培地での継代維持、増殖が可能であった。

2. EsTU (ツムラ系 TS0149-13) 及び EsTA (武田薬品系 TS0776-13) の組織培養系の確立

野外ワグネルポット栽培植物のシュートの先端より、3 節又は 4 節を含む頂芽片を調製して DKW(1)IB0.1 に植付け、23℃、14 時間明期 (蛍光管) で 30 日間培養した結果、EsTU、EsTA のいずれも高効率にシュートが誘導された (シュート形成率はそれぞれ 95%及び 100%) (図 2)。EsTU、EsTA の形成シュート数はいずれも 8.6 本、シュート長はそれぞれ 15.6 cm 及び 16.2 cm とほぼ同様の値を示した。これらのシュートは同培地での継代維持、増殖が可能であった。

D. 考察

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。

E. 結論

マオウ国内栽培の基盤構築のため、昨年度

までに確立した金沢大学由来のシナマオウの植物組織培養系誘導、継代維持、増殖条件を基に、新たに3系統のシナマオウの地上茎を材料に、植物組織培養系の確立を行った。その結果、いずれのシナマオウにおいても、金沢大学系統と同様に、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉松嘉代：水耕栽培システムによる生薬の生産とその評価、*Labcab*、Vol.08、13-14 (2014)。
- 2) 吉松嘉代、乾貴幸：第2章 植物工場における薬用植物の栽培と生育制御，監修：川原信夫、*ファインケミカルシリーズ、薬用植物・生薬の最前線～国内栽培技術から品質評価、製品開発まで～*、シーエムシー出版、東京都、pp.9-19 (2014)。

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代：「水耕栽培システムによる甘草等漢方薬原料生薬の生産とその評価」、*アカデミックフォーラム*、5月16日 ACA-4、主催：リード エグジビション ジャパン株式会社、東京ビッグサイト BIO tech 会場内（東京都、2014年5月16日）
- 2) Kawano N., Inui T., Kawahara N., Yoshimatsu K. : Expression Analysis of Glycyrrhizin Biosynthetic Genes in Licorice, International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014)
- 3) Yoshimatsu K., Kawano N., Inui T., Araho D., Tamura Y., Kawahara N. : Establishment of tissue culture bank for *Glycyrrhiza uralensis* (Chinese licorice), International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Victoria, Australia, Aug.

10-15, 2014).

- 4) Inui T., Kawano N., Araho D., Tamura Y., Iida O., Kawahara N., Yoshimatsu K. : Development of discrimination and selection method of *Glycyrrhiza uralensis* strains with high-glycyrrhizin contents using DNA sequence polymorphisms in glycyrrhizin biosynthetic genes, International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014)
- 5) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、新穂大介、田村幸吉、川原信夫：薬用植物の組織培養物バンクの確立-ウラルカンゾウについて、第32回植物細胞分子生物学会（盛岡）大会・シンポジウム（2014.8.21-22、盛岡）。
- 6) 乾貴幸、河野徳昭、川原信夫、吉松嘉代：水耕栽培を用いたセリバオウレン生産の可能性、第32回植物細胞分子生物学会（盛岡）大会・シンポジウム（2014.8.21-22、盛岡）。
- 7) Yoshimatsu K., Inui T., Kawano N., Fuchino H., Kudo T., Takahashi Y., Araho D., Tamura Y., Otsuki N., Akiyama H., Komatsu K., Kawahara N. : Feasibility study for the utilization of crude drug including *Glycyrrhiza* produced by the artificial hydroponic cultivation system, The 14th International Symposium on Traditional Medicine in Toyama 2014, “Towards Sustainable and Effective Uses of Traditional Medicines & Traditional Medicine-based Drug Development” (Oct 27-28, Toyama, 2014)
- 8) 吉松嘉代：国内外における生薬に関わる諸問題と生薬の優良種苗の確保及び国産化に関する今後の展望、北里WHO・COIシンポジウム（兼漢方診療標準化プロジェクト第2回シンポジウム）、III 生薬

評価システム (2014.12.6、横浜)

- 9) 吉松嘉代、乾貴幸、河野徳昭、北澤尚、林茂樹、菱田敦之、杉村康司、中村理恵、吉岡拓磨、山路弘樹、武田修己、川原信夫：ウラルカンゾウの人工水耕-圃場ハイブリッド栽培システムの構築
日本薬学会第135年会(神戸)
(2015.3.25-28)

G. 知的財産権の出願，登録状況

- 1) 特許番号：特許第5633666号、登録日：平成26年10月24日、出願番号：特願

2009-131442、発明の名称：植物栽培装置、及び、栽培方法、発明者：吉松嘉代、出願日 2009年5月29日。

H. 参考文献

- 1) 吉松嘉代他、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、61-63、2014年3月。

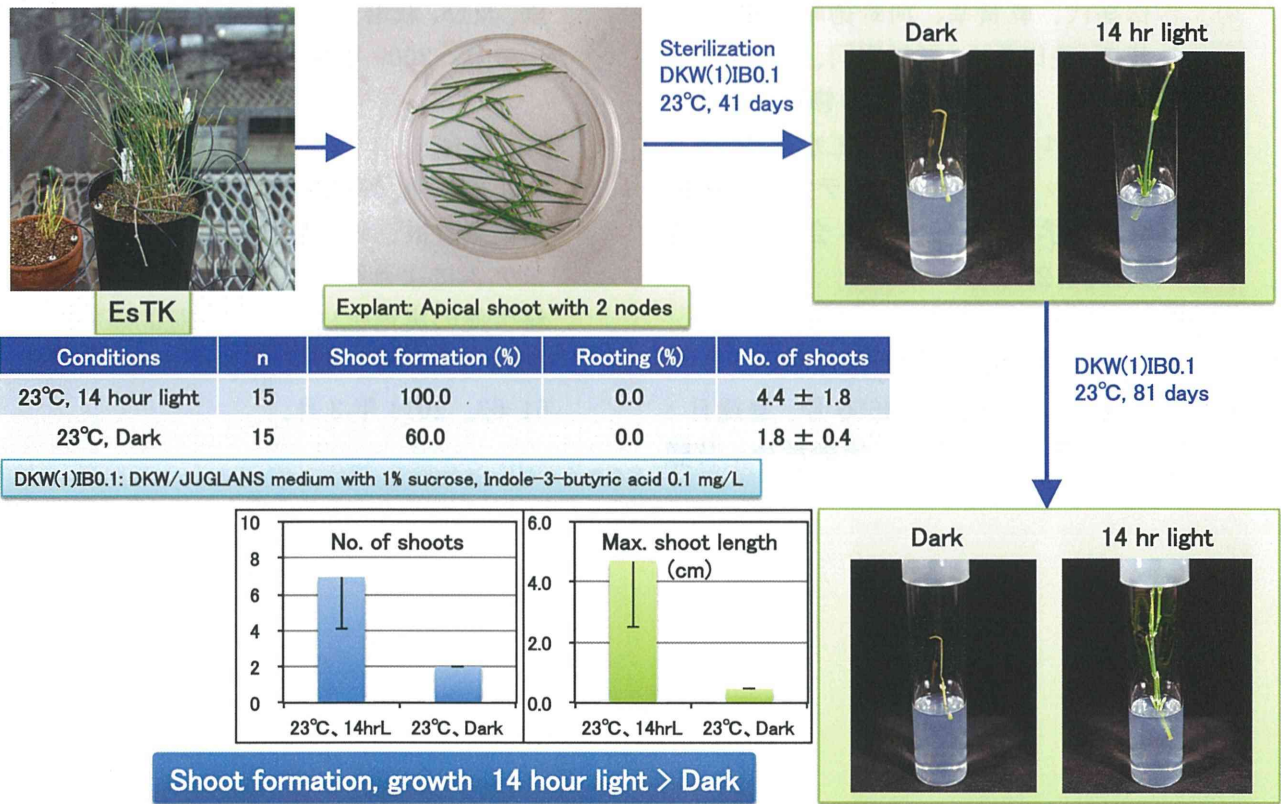


図1. EsTK 組織培養系の誘導と培養

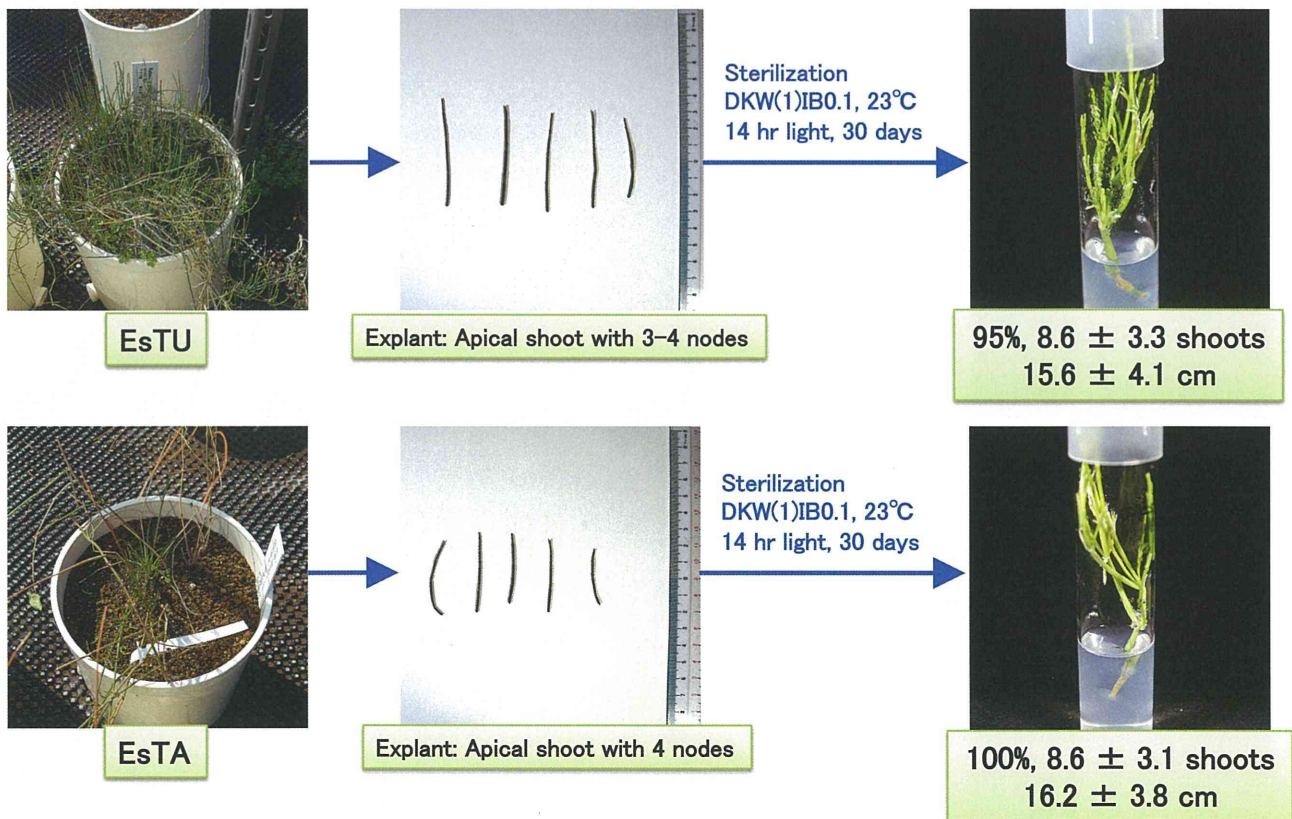


図2. EsTU & EsTA 組織培養系の誘導と培養

平成26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

－キダチマオウの挿し木増殖に関する研究－

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 重要な漢方薬原料である麻黄について、日本薬局方記載のキダチマオウ（*Ephedra equisetina* Bunge）の挿し木増殖法について検討を行った。圃場から採取した枝を材料として挿し木を行なったが発根は認められなかった。そこで、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。

研究協力者

根岸直希 日本製紙株式会社 研究開発本部
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

A. 研究目的

日本薬局方記載のキダチマオウ（*Ephedra equisetina* Bunge）の挿し木増殖を行う。

B. 研究方法

独立行政法人 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センターの圃場で栽培しているキダチマオウから枝を採取した。これを日本製紙株式会社 アグリ・バイオ研究所に持ち帰り、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℃、16時間明期、インドール酪酸(IBA) 2mg/Lと酸化型グルタチオン(興人) 50mgを添加、主要無機塩類濃度が1/5のGamborg B5(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10,000luxとした。2ヶ月後に発根状況を確認した。

C. 研究結果

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を行った結果、1個体で発根が認められた(図)。

D. 考察

今回のキダチマオウについて、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、組織培養を行ったことで幼若化現象が起こり、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。こうした植物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、全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 (*E. 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。

E. 結論

植物組織培養により得られた挿し穂を材料として発根培養を行う事で、キダチマオウについても発根することを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し。

2. 学会発表

無し。

G. 知的財産権の出願，登録状況

無し。

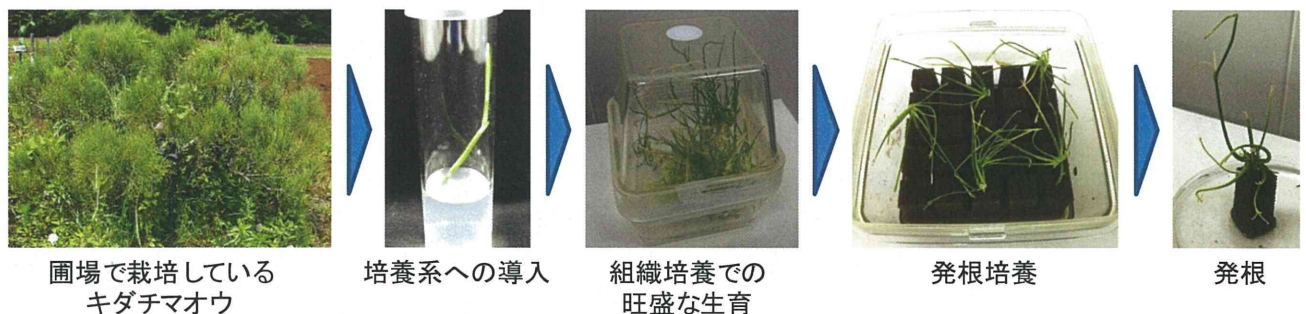


図 キダチマオウの組織培養と挿し木増殖

平成26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

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

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 これまでに育成したウラルカンゾウ優良株の実用化の推進、経済性・汎用性の高い生薬生産システム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試験（圃場筒栽培、圃場短筒栽培及び圃場マルチ栽培）及びビニールハウス栽培（ビニールハウス筒栽培）試験を行った。

2013年6月24日に定植した筒栽培植物（6/24筒）は、翌春の萌芽が良好で2014年5月13日の全体の萌芽率は73.4%で良好に生育した。一方、同時期（2013年6月21日）に定植したビニールハウス筒栽培植物（6/21ハウス筒）の翌春の萌芽率は著しく低く、2014年5月13日の全体の萌芽率は6.7%であり、6/24筒よりも生育が劣っていた。また、2013年9月6日に定植した圃場筒栽培（9/6筒）、圃場短筒栽培（9/6短筒）、圃場マルチ栽培植物（9/6マルチ）の翌春の全体の萌芽率は、それぞれ39.1%、16.2%、30.4%であり、6/24筒よりも低い値であったが、生育は良好で、特に9/6マルチは、6/24筒に匹敵する地上部の生育を示した。2013年9月6日に定植したクローンでは、特にGu71#23及びGu71#31の萌芽率はそれぞれ59%及び63%と良好であった。

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、径0.5 cm以上と径0.5 cm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）を定量した結果、圃場筒栽培、圃場短筒栽培、圃場マルチ栽培において、定植後1年～1年3ヶ月の栽培で、GLの日局規格値2.5%以上を示す甘草が得られ、特に径0.5 cm未満の根のGL含量が高かった。

以上、ウラルカンゾウ優良株は、圃場栽培用の種苗としても優れており、人工水耕ー圃場ハイブリッド栽培システムは、つくば圃場においてわずか定植後1～1年3ヶ月でGLの日局規格値を満たす甘草の生産が可能で、優れた栽培システムであることが示された。

研究協力者

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
北澤 尚 同 筑波研究部
主任技術専門員
武田修己 同 東京生薬協会

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、経済性・汎用性の高い栽培システムの構築を行うことを目的とする。

我々は昨年度までに、人工水耕栽培システムにおいて、短期間で日本薬局方（日局）規格を満たす甘草が生産可能な、複数のウラルカンゾウ優良株を育成し、水耕栽培植物の地上茎を挿し穂とする簡便で高効率な種苗増産方法を確立した¹⁾。これらのウラルカンゾウ優良株の、国内栽培推進のための種苗としての有用性評価、より経済性・汎用性の高い生薬生産システムの構築及び国内栽培基盤構築のため、人工水耕栽培した植物より育成した挿し木苗の筑波研究部での圃場栽培試験とビニールハウス栽培試験を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 植物材料及び各種条件での栽培

挿し木苗は、培養土に植え替えて育成した後定植し、各種栽培試験（圃場筒栽培、圃場短筒栽培、圃場マルチ栽培、ビニールハウス筒栽培）を行った。その概況を図1に示す。適宜、生存率（萌芽率）、草丈を測定した。

2. 収穫及び分析

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℃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0.5 cm以上と径0.5 cm未満に分割して日局に従いグリチルリチン酸（GL）を定量した。

C. 研究結果

1. 圃場筒栽培の生育（定植：2013年6月24日：6/24筒）

6/24筒のウラルカンゾウは、標本園のウラルカンゾウ地上部が枯れている2013年11月15日（定植後144日）においても、緑の葉が付いた地上部があり、標本園植栽植物よりも耐寒性が高いと考えられた（図2）。

2013年11月21日（定植後150日）の地上部の生存率は50.0-90.9%（最高：GuIV1地上茎苗：90.9%、最低：GuIV2ストロン苗：50.5%、クローン毎：GuIV1：89.3%、GuIV2：65.2%、苗種別毎：地上茎苗：78.6%、ストロン苗84.3%、全体：82.3%）であった（図2）。統計的には正しくないが、参考までに各クローンの生存率データを、地上茎苗、ストロン苗、地上茎+ストロン苗の生存率3群としてT検定を行うと、GuIV1の生存率はGuIV2に比べて有意に高かった（図2、 $P=0.045$ ）。同様にT検定すると、地上茎苗—ストロン苗間での生存率の違いは認められず、苗の種類よりもクローンの影響の方が大きいと考えられた（図2）。

2013年11月21日（定植後150日）の草丈は、22.7-45.3 cm（最高：GuIV1ストロン苗：45.3 cm、最低：GuIV2ストロン苗：22.7 cm、クローン毎：GuIV1：43.9 cm、GuIV2：34.0 cm、苗種別毎：地上茎苗：37.5 cm、ストロン苗：43.7 cm、全体平均：41.6 cm）であり、GuIV1はGuIV2に比べて有意（ $P=0.026$ ）に高く、ストロン苗は地上茎苗に比べ有意（ $P=0.041$ ）に高かった（図2）。

6/24筒のGuIV1及びGuIV2は標本園及びコンクリートポットのウラルカンゾウでは萌芽が認められない2014年3月26日（定植後275日）に萌芽が観察され、萌芽率は9.1-28.9%であり、前記と同様にT検定を行うと、クローン間の差は認められなかったが、ストロン苗の方が地上茎苗に比べて高い傾

向 ($P=0.081$) が認められた (図 3)。

2014 年 5 月 13 日 (定植後 323 日) の萌芽率は 45.5-86.7%、全体では 73.4%であり、4 月以降急激に上昇した。前記と同様に T 検定を行うと、クローン間の差は認められなかったが、ストロン苗の方が地上茎苗に比べて高かった ($P=0.023$) (図 4)。

2014 年 5 月 13 日 (定植後 323 日) の草丈は 17.7-30.8 cm、全体平均 27.6 cm であり、T 検定を行うと、クローン間では GuIV1 が、苗種別ではストロン苗の方が有意に高かった (図 4、クローン間： $P=0.019$ 、苗種別間： $P=0.006$)。

2014 年 4 月以降、萌芽した植物の生育が活発になり、2014 年 5 月 26 日 (定植後 336 日) に観察した GuIV2 地上茎苗では 10 株中 2 株に開花が認められた (開花率 20.0%、図 5)。同日の 6/24 筒の萌芽率は 36.4-91.1%、全体で 74.7%であり、同様に T 検定を行うと、クローン間の差は認められなかったが、ストロン苗の方が地上茎苗に比べて高かった ($P=0.029$) (図 5)。

2014 年 5 月 26 日 (定植後 336 日) の草丈は 26.7-46.5 cm、全体平均 40.6 cm であり、T 検定を行うと、クローン間では GuIV1 が、苗種別間ではストロン苗の方が有意に高かった (図 5、クローン間： $P=0.012$ 、苗種別間： $P=0.011$)。

2014 年 5 月 13 日から 5 月 26 日までの草丈の伸長率 (cm/日) を比較したところ、クローン間では GuIV1 が、苗種別間ではストロン苗が有意に高かった (クローン間： $P=0.014$ 、苗種別間： $P=0.014$)。

同様に 1 ヶ月ごとに 2014 年 8 月 26 日まで生育調査を行った結果を図 6-8 に示した。5 月 26 日以降、新たな萌芽は認められなかった。草丈は 8 月末まで伸長を続け、最大値は GuIV1 ストロン苗の 90.3 cm であった (図 8)。伸長率は、5 月 13 日-5 月 26 日間で最大 (0.97 cm/日) で、その後は減少した (図 5-8)。

2. 圃場筒栽培の生育 (定植：2013 年 9 月 6 日：9/6 筒)

2014 年 3 月 26 日 (定植後 201 日後) の萌

芽率は 0.0-100% (100%は $n=1$ のため参考値)、体で 19.0%であった (図 3)。

2014 年 5 月 13 日 (定植後 249 日) の萌芽率は 0.0-85.7%、全体で 38.1%であり、6/24 筒と同様に萌芽率の急激な上昇が認められた (図 4)。同日の草丈は 5.2-12.1 cm、平均 10.8 cm であり、6/24 筒-9/6 筒の地上茎苗間で T 検定を行うと、6/24 筒の方が 9/6 筒よりも有意に高かった (図 4、 $P=0.095$)。

2014 年 4 月以降、6/24 筒と同様に、萌芽した植物の生育が活発になったが、2014 年 5 月 13 日 (定植後 249 日) 以降は新たな萌芽は認められなかった。

2014 年 5 月 26 日 (定植後 262 日) の草丈は 7.8-24.4 cm、平均 20.6 cm であり、6/24 筒-9/6 筒の地上茎苗間での違いは認められなかった (図 5)。また、2014 年 5 月 13 日から 5 月 26 日までの草丈の伸長率 (cm/日) も、定植時期の違いによる差は認められなかった (図 5)。同日に萌芽が確認された 8 個体中、6 個体が Gu71#23 (萌芽率 85.7%) であり、特に生育が良好であった (草丈 24.4 cm)。

同様に 1 ヶ月ごとに 2014 年 8 月 26 日まで生育調査を行った結果を図 6-8 に示した。草丈は 8 月末まで伸長を続け、最大値は Gu71#23 の 83.1 cm であった (図 8)。伸長率は、5 月 13 日-5 月 26 日間で最大 (0.76 cm/日) で、その後は減少したが、6 月 26 日-7 月 25 日間の伸長率では、6/24 筒-9/6 筒間で 9/6 筒が有意に高かった (図 5-8)。

3. ビニールハウス筒栽培 (定植 2013 年

6 月 21 日：6/21 ハウス筒) の生育
2013 年 11 月 21-22 日 (定植後 153-154 日) の地上部の生存率は、GuIV2：19.2%、Gu#11：54.0%、全体：48.0%であり、GuIV2 について、ほぼ定植時期が同じ 6/24 筒の GuIV2 地上茎苗の生存率 70.6% (図 2) と比較すると著しく低かった (図 9)。一方、草丈は GuIV2：31.3 cm、Gu#11：36.0 cm、平均：35.7 cm であり、GuIV2 の値は 6/24 筒 (図 2、36.8 cm) とほぼ同等であった (図 9)。

2014 年 3 月 26 日 (定植後 278 日) に萌芽

した苗の生育（図 10）は、6/24 筒及び 9/6 筒（図 3）よりも良好であったが、萌芽率は、GuIV2：3.8%、Gu#11：4.8%、全体：4.7%であり、6/24 筒の GuIV2 地上茎苗の萌芽率 17.6%（図 3）と比較すると著しく低かった（図 10）。

2014 年 5 月 13 日（定植後 326 日）の萌芽率は、GuIV2：3.8%、Gu#11：7.3%、平均：6.7%であり、圃場筒栽培の GuIV2 地上茎苗の萌芽率 58.8%（図 4）と比較すると著しく低かった（図 11）。また、草丈は、GuIV2：10.2 cm、Gu#11：27.3 cm、平均：25.6 cm であり、GuIV2 の値は 6/24 筒（図 4、GuIV2 地上茎苗：19.5 cm）よりも低かった（ビニールハウス GuIV2 は 1 株のため T 検定不可）。

2014 年 5 月 26 日（定植後 339 日）においても生育は 6/24 筒に劣り、萌芽率、草丈、草丈の伸長率（cm/日）、いずれの項目も 6/24 筒（図 5）より低かった（図 12）。

同様に 1 ヶ月ごとに 2014 年 8 月 26 日まで生育調査を行った結果を図 13-15 に示した。5 月 26 日以降、新たな萌芽は認められなかった。草丈は 8 月末まで伸長を続けたが、6 月以降はハダニによる食害を受け、地上部が障害を受けた（図 13-15）。

4. 圃場短筒栽培（定植 2013 年 9 月 6 日：9/6 短筒）の生育

2013 年 11 月 21 日（定植後 76 日）の地上部の生存率は、Gu#11：89.4%、Gu71#1：100.0%、Gu71#12：100.0%、全体：95.5%であり、草丈は Gu#11：32.7 cm、Gu71#1：26.7 cm、Gu71#12：29.6 cm、全体平均：30.7 cm であった（図 16）。

2014 年 3 月 26 日（定植後 201 日）に 6/24 筒及び 9/6 筒と同様に萌芽が観察され、萌芽率は、Gu#11：6.4%、Gu71#1：66.7%、Gu71#12：8.2%、平均：9.0%であったが、6/24 筒及び 9/6 筒よりも萌芽率は低かった（図 17）。

2014 年 5 月 13 日（定植後 249 日）の萌芽率は、Gu#11：8.5%、Gu71#1：66.7%、Gu71#12：19.7%、平均：16.2%、草丈は Gu#11：16.6 cm、Gu71#1：10.7 cm、Gu71#12：15.6 cm、平均：15.3 cm であり、9/6 筒よりも高い傾向を示した（図 18）。

2014 年 5 月 26 日（定植後 262 日）の萌芽率は、5 月 13 日以降に枯死した株、新たに萌芽した株があり、Gu#11：6.4%、Gu71#1：66.7%、Gu71#12：18.0%、全体：14.4%であった（図 19）。同日の草丈は、Gu#11：24.4 cm、Gu71#1：14.0 cm、Gu71#12：22.5 cm、平均：21.8 cm、2014 年 5 月 13 日から 5 月 26 日間の草丈の伸長率（cm/日）は、Gu#11：0.49、Gu71#1：0.25、Gu71#12：0.53、平均：0.49 であり、9/6 筒と同様な値であった（図 19）。

同様に 1 ヶ月ごとに 2014 年 8 月 26 日まで生育調査を行った結果を図 20-22 に示した。5 月 26 日以降、新たな萌芽は認められなかった。草丈は、9/6 筒と同様な値を示しながら、8 月末まで伸長を続けた（図 20-22）。

5. 圃場マルチ栽培（定植 2013 年 9 月 6 日：9/6 マルチ）の生育

圃場でマルチ栽培を行ったウラルカンゾウの 2013 年 11 月 21-22 日（定植後 76-77 日）の地上部の生存率は、Gu#11：66.7%、Gu71#1：96.6%、Gu71#12：100.0%、Gu71#23：90.9%、Gu71#25：100.0%、Gu71#28：66.7%、Gu71#31：100.0%、平均：94.6%、草丈は Gu#11：15.5 cm、Gu71#1：27.5 cm、Gu71#12：31.9 cm、Gu71#23：43.6 cm、Gu71#25：18.1 cm、Gu71#28：27.7 cm、Gu71#31：27.6 cm、平均：31.6 cm であり、同日に定植した圃場短筒栽培とほぼ同様であった（図 23）。

2014 年 5 月 13 日（定植後 249 日）の萌芽率は、Gu#11：33.3%、Gu71#1：27.6%、Gu71#12：12.5%、Gu71#23：50.5%、Gu71#25：0.0%、Gu71#28：33.3%、Gu71#31：66.7%、全体：30.4%で 9/6 短筒よりも高く、草丈は Gu#11：10.3 cm、Gu71#1：27.5 cm、Gu71#12：17.0 cm、Gu71#23：18.5 cm、Gu71#28：25.3 cm、Gu71#31：13.9 cm、平均：16.9 cm であり、9/6 短筒とほぼ同等であった（図 24）。

2014 年 5 月 26 日（定植後 262 日）の萌芽率は、Gu#11：33.3%、Gu71#1：27.6%、Gu71#12：12.5%、Gu71#23：54.5%、Gu71#25：0.0%、Gu71#28：33.3%、Gu71#31：66.7%、全体：31.5%で、Gu71#23 が新たに 1 本萌芽した。草丈は、Gu#11：23.0 cm、Gu71#1：25.3 cm、Gu71#12：

30.3 cm、Gu71#23 : 31.7 cm、Gu71#28 : 34.5 cm、Gu71#31 : 25.0 cm、平均 : 28.7 cm、2014年5月13日から26日間の草丈の伸長率(cm/日)は、Gu#11 : 0.98、Gu71#1 : 0.72、Gu71#12 : 1.02、Gu71#23 : 1.13、Gu71#28 : 0.71、Gu71#31 : 0.85、平均 : 0.95 であり、9/6 短筒よりも萌芽率、草丈、草丈の伸長率のいずれも高かった(図25)。

評価圃場マルチ栽培では萌芽が認められなかった株のほとんどにおいて、根の生存が確認された(図26)。

同様に1ヵ月ごとに2014年8月26日まで生育調査を行った結果を図27-29に示した。5月26日以降、新たな萌芽は認められなかった。草丈は、8月末まで伸長を続け、6/24筒及び9/6筒よりも高い傾向を示した(図27-29)。

6. 根の収量

2014年9月末より12月末にかけてウラルカンゾウ栽培株を掘上、収穫した。乾燥重量(根全体)を図30に示した。6/24筒のGuIV1ストロン苗が最も収量が多く、平均150.7gであった。個体別では6/24筒のGuIV2地上茎苗が最大値を示し、382.5gであった。

9/6筒のGu71#23は、前述のGuIV1及びGuIV2に匹敵する収量が得られ、最大値は225.9gであった。

7. 根のGL含量

収穫した根の一部(各種栽培条件、苗種別毎に各3-4検体、計19検体)について、径0.5cm以上と径0.5cm未満に分割し、日局記載の方法に従い、GL含量を測定した結果を図31に示した。

6/21ハウス筒のGu#11の1検体を除き、分析したウラルカンゾウは、径0.5cm以上の太い根よりも径0.5cm未満の細い根の方が高い値を示した。

径0.5cm未満の根では、6/24筒のGuIV1ストロン苗、9/6筒のGu71#23地上茎苗、9/6短筒のGu71#12、9/6マルチのGu71#31の8検体が局方規格値2.5%以上を示し、9/6筒のGu71#23が最も高い値(3.55%)を示した。

径0.5cm以上の根では、前述のGu71#23の2検体が2.5%以上を示した(図31)。

8. 2013年9月6日定植苗の萌芽率

9/6筒、9/6短筒、9/6マルチ栽培のクローン毎の2014年5月26日の萌芽率を図32に示した。2013年9月6日定植の苗は、概して6/24筒よりも低い萌芽率であったが、Gu71#23及びGu71#31の2クローンは、それぞれ62.1%、62.5%の6/24筒に匹敵する高い萌芽率を示した(図32)。これら2クローンは、定植後わずか1年で2.5%以上のGLを含有する根が生産できており、筑波圃場での栽培に適したクローンであると思われる。

D. 考察

昨年度に引き続き、水耕栽培植物を材料に増殖、育成した挿し木苗の圃場及びビニールハウスでの栽培試験を行った。

6/24筒は、翌年の萌芽率が全体で73.4%と、2012年10月17日に定植した昨年の結果(翌年の萌芽率0.6%)よりも、はるかに良好であった。一方、2013年9月6日に定植した苗の翌年の萌芽率は、9/6筒39.1%、9/6短筒16.2%、9/6マルチ30.4%であり、6/24筒よりも低い値であった。従って、つくばでの圃場栽培では、ウラルカンゾウ苗の定植は、少なくとも夏至よりも前に行う必要があると思われる。また、マルチ栽培は短筒栽培よりも萌芽率が高く、生育も良好であったことから、筒栽培に替わるウラルカンゾウ栽培方法として期待できると思われる。

6/21ハウス筒は、翌年の萌芽率が全体で6.7%と非常に低く、また、圃場栽培植物に比べて生育が顕著に劣っていた。従って、つくばでのビニールハウス筒栽培は、ウラルカンゾウの栽培には不適と思われる。

特にマルチ栽培植物において、萌芽は認められないものの、根の状態は良好である個体が多数存在した。ウラルカンゾウは根から不定芽が形成しないため、地上茎苗において新芽が形成する部位は、腋芽が形成する地上茎の節部分のみである。根だけの状態で生存が確認できたものは、地上茎部分が障害を受け

ていた (図 26)。従って、地上茎挿し木苗の定植は、挿し穂部分を土中に植えるようにする、あるいは基部の節を含む地上茎部分を冬場に保護する等の工夫をすることにより、翌年の萌芽率の上昇が可能と思われる。

今回の結果から、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、つくば圃場での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が判明した。

E. 結論

水耕栽培植物を材料に増殖させたウラルカンゾウ苗の圃場及びビニールハウスでの各種栽培試験を行った結果、圃場筒栽培、圃場短筒栽培、圃場マルチ栽培において、良好な生育と根の収量を認め、定植後わずか1年-1年3ヶ月の栽培で、GLの日局規格値2.5%以上を示す甘草の生産に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉松嘉代: 水耕栽培システムによる生薬の生産とその評価、*Labcab*、Vol. 08、13-14 (2014)。
- 2) 吉松嘉代、乾貴幸: 第2章 植物工場における薬用植物の栽培と生育制御、監修: 川原信夫、*ファインケミカルシリーズ、薬用植物・生薬の最前線~国内栽培技術から品質評価、製品開発まで~*、シーエムシー出版、東京都、pp. 9-19 (2014)。

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代: 「水耕栽培システムによる甘草等漢方薬原料生薬の生産とその評価」、*アカデミックフォーラム*、5月16日 ACA-4、主催: リード エグジビション ジャパン株式会社、東京ビッグサイト BIO tech 会場内 (東京都、2014年5月16日)
- 2) Kawano N., Inui T., Kawahara N., Yoshimatsu K.: Expression Analysis of Glycyrrhizin Biosynthetic Genes in

Licorice, International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014)

- 3) Yoshimatsu K., Kawano N., Inui T., Araho D., Tamura Y., Kawahara N.: Establishment of tissue culture bank for *Glycyrrhiza uralensis* (Chinese licorice), International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014).
- 4) Inui T., Kawano N., Araho D., Tamura Y., Iida O., Kawahara N., Yoshimatsu K.: Development of discrimination and selection method of *Glycyrrhiza uralensis* strains with high-glycyrrhizin contents using DNA sequence polymorphisms in glycyrrhizin biosynthetic genes, International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Victoria, Australia, Aug. 10-15, 2014)
- 5) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、新穂大介、田村幸吉、川原信夫: 薬用植物の組織培養物バンクの確立-ウラルカンゾウについて、第32回植物細胞分子生物学会 (盛岡) 大会・シンポジウム (2014. 8. 21-22、盛岡)。
- 6) 乾貴幸、河野徳昭、川原信夫、吉松嘉代: 水耕栽培を用いたセリバオウレン生産の可能性、第32回植物細胞分子生物学会 (盛岡) 大会・シンポジウム (2014. 8. 21-22、盛岡)。
- 7) Yoshimatsu K., Inui T., Kawano N., Fuchino H., Kudo T., Takahashi Y., Araho D., Tamura Y., Otsuki N., Akiyama H., Komatsu K., Kawahara N.: Feasibility study for the utilization of crude drug including *Glycyrrhiza* produced by the artificial hydroponic cultivation system, The 14th International Symposium on

Traditional Medicine in Toyama 2014, “Towards Sustainable and Effective Uses of Traditional Medicines & Traditional Medicine-based Drug Development” (Oct 27-28, Toyama, 2014)

- 8) 吉松嘉代: 国内外における生薬に関わる諸問題と生薬の優良種苗の確保及び国産化に関する今後の展望、北里 WHO・COI シンポジウム (兼漢方診療標準化プロジェクト第 2 回シンポジウム)、III 生薬評価システム (2014. 12. 6、横浜)
- 9) 吉松嘉代、乾貴幸、河野徳昭、北澤尚、林茂樹、菱田敦之、杉村康司、中村理恵、吉岡拓磨、山路弘樹、武田修己、川原信夫: ウラルカンゾウの人工水耕-圃場ハイブリッド栽培システムの構築

日本薬学会第 135 年会 (神戸)
(2015. 3. 25-28)

G. 知的財産権の出願, 登録状況

- 1) 特許番号: 特許第 5633666 号、登録日: 平成 26 年 10 月 24 日、出願番号: 特願 2009-131442、発明の名称: 植物栽培装置、及び、栽培方法、発明者: 吉松嘉代、出願日 2009 年 5 月 29 日.

H. 参考文献

- 1) 吉松嘉代他、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 24 年度総括・分担研究報告書、18-44、2013 年 3 月.

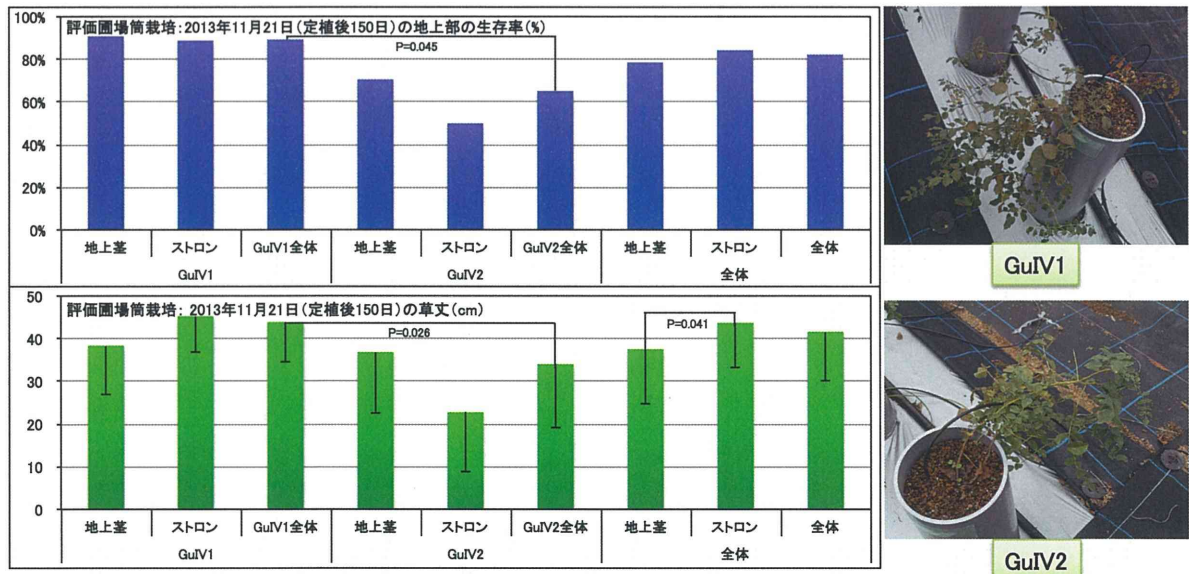
筑波研究部 簡栽培条件	評価圃場	栽培面積: 2.3 a	クローン	種別	株数		
	2012/9/13	深耕深種2.3a, 深さ1mのトレンチャーによる土壌深耕を実施	GuIV1	地上茎	11		
	2012/9/27	基肥 堆肥(200 kg/a):460 kg		ストロン	45		
				小計	56		
	2012/10/5	施肥 普土石灰(10 kg/a):23 kg 深さ約30 cmまで耕耘し整地	GuIV2	地上茎	17		
				ストロン	6		
				小計	23		
				合計	79		
	2013/6/24	定植 評価圃場の表土, 堆肥, 普土石灰, 化成肥料0-0-0, ようりんを混合したものを充填 簡上部から8 cmのところまで土を入れ, 植物を下草に植付け, 覆土としてSERAMSを充填					
	2013/7/24	移植 挿し芽箱の底に厚さ約1 cmのパーミキュライトを敷き, その上にビニールポットを置き, 底穴から根が出るように移植. 培養土はパーミキュライトを使用	クローン	株数			
2013/9/6	定植 簡上部から8 cmのところまで土を入れ, 植物を下草に植付け, 覆土としてSERAMSを充填	Gu#11	1				
		Gu71#12	3				
		Gu71#23	7				
		Gu71#25	4				
		Gu71#28	3				
		Gu71#31	2				
		GuIV154	1				
		合計	21				

筑波研究部 簡栽培条件	評価圃場	栽培面積: 0.62 a	クローン	株数		
	2013/5/2	栽培予定地に堆肥, 普土石灰, 化成肥料, ようりんを入れ, 深さ約30 cmまで耕耘し整地	GuIV2	26		
		基肥 堆肥(馬糞)(200 kg/a):164 kg	Gu#11	124		
			合計	150		

筑波研究部 簡栽培条件	評価圃場	栽培面積: 2.3 a	クローン	株数		
	2012/9/13	深耕深種2.3a, 深さ1mのトレンチャーによる土壌深耕を実施	Gu#11	47		
	2012/9/27	基肥 堆肥(200 kg/a):460 kg	Gu71#1	3		
			Gu71#12	61		
			合計	111		
	2012/10/5	施肥 普土石灰(10 kg/a):23 kg 深さ約30 cmまで耕耘し整地	マルチ	株数		
			Gu#11	3		
			Gu71#1	29		
			Gu71#12	24		
			Gu71#23	22		
2013/7/24	移植 挿し芽箱の底に厚さ約1 cmのパーミキュライトを敷き, その上にビニールポットを置き, 底穴から根が出るように移植. 培養土はパーミキュライトを使用	Gu71#25	5			
2013/9/6	定植 株間20 cm, 列間40 cm, 千鳥	Gu71#28	3			
		Gu71#31	6			
		合計	92			

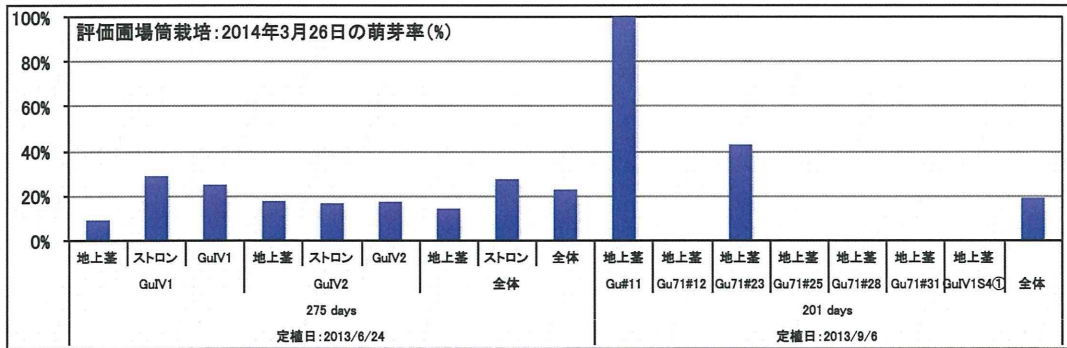
筑波研究部 簡栽培条件	評価圃場	栽培面積: 2.3 a	クローン	株数		
	2012/9/13	深耕深種2.3a, 深さ1mのトレンチャーによる土壌深耕を実施	Gu#11	47		
	2012/9/27	基肥 堆肥(200 kg/a):460 kg	Gu71#1	3		
			Gu71#12	61		
			合計	111		
	2012/10/5	施肥 普土石灰(10 kg/a):23 kg 深さ約30 cmまで耕耘し整地	マルチ	株数		
			Gu#11	3		
			Gu71#1	29		
			Gu71#12	24		
			Gu71#23	22		
2013/7/24	移植 挿し芽箱の底に厚さ約1 cmのパーミキュライトを敷き, その上にビニールポットを置き, 底穴から根が出るように移植. 培養土はパーミキュライトを使用	Gu71#25	5			
2013/9/6	定植 株間20 cm, 列間40 cm, 千鳥	Gu71#28	3			
		Gu71#31	6			
		合計	92			

図1. 筑波研究部におけるウラルカンゾウ挿し木苗の圃場栽培及びハウス栽培の概況



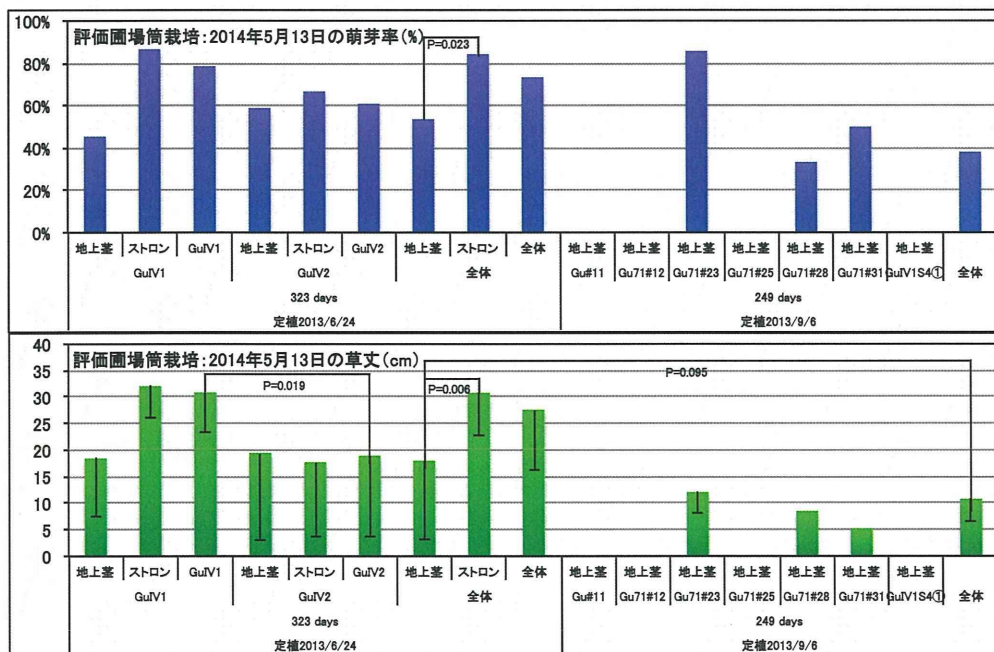
統計的には正しくないが、平均値も生存率の1データとすると有意差が観測される
 生存率 GuIV1 > GuIV2 生存率はクローンの影響が大きい
 草丈 GuIV1 > GuIV2、地上茎苗 > ストロン苗 1年目の生育はクローン間及び挿し穂間で差がある

図2. 筒栽培ウラルカンゾウ(定植2013/6/24)の生存率と草丈(2013/11/21)



筒栽培のウラルカンゾウは、コンクリートポット及び圃場栽培のウラルカンゾウ優良株よりも早く萌芽
Gu#11は1株だけなので萌芽率は参考値

図 3. 筒栽培ウラルカンゾウ (定植 2013/6/24、2013/9/6) の萌芽率 (2014/3/26)



平均値も萌芽率の1データとすると 萌芽率は ストロン苗 > 地上茎苗 (定植2013/6/24)
草丈 GuIV1 > GuIV2 (6/24)、ストロン苗 > 地上茎苗 (6/24)、地上茎苗(6/24) > 地上茎苗 (9/6)

図 4. 筒栽培ウラルカンゾウ (定植 2013/6/24、2013/9/6) の生育 (2014/5/13)

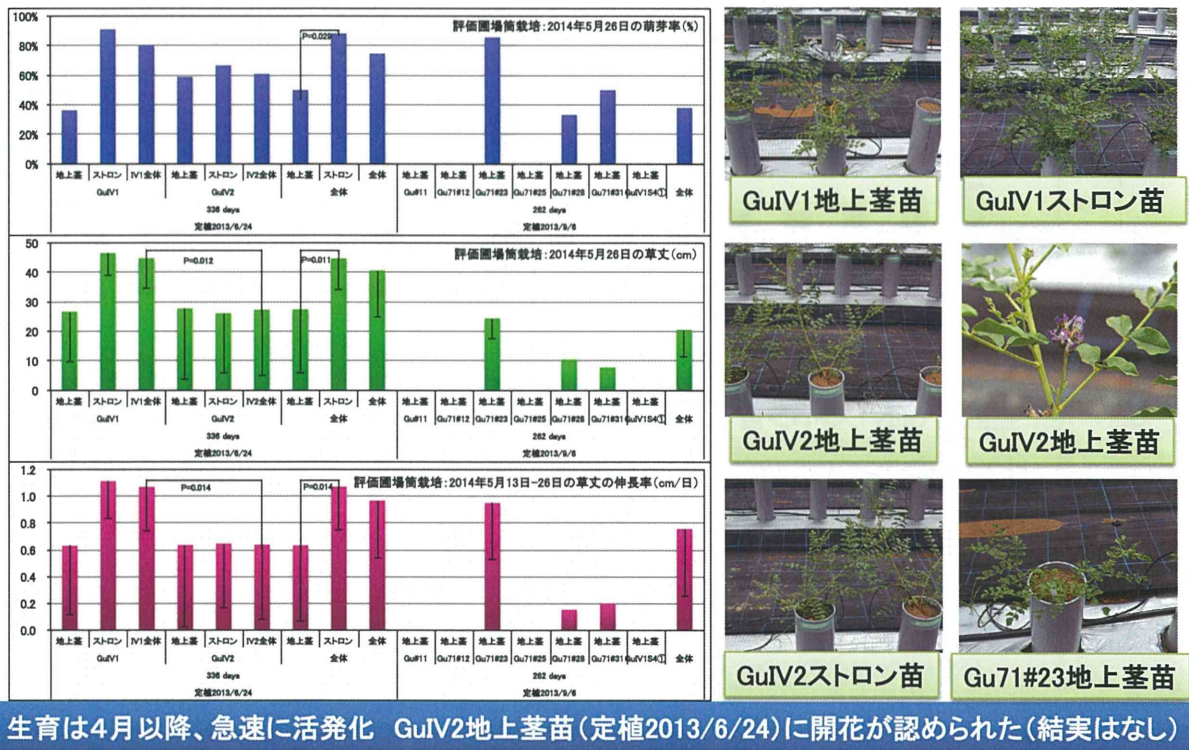


図 5. 筒栽培ウラルカンゾウの生育と開花 (2014/5/26)

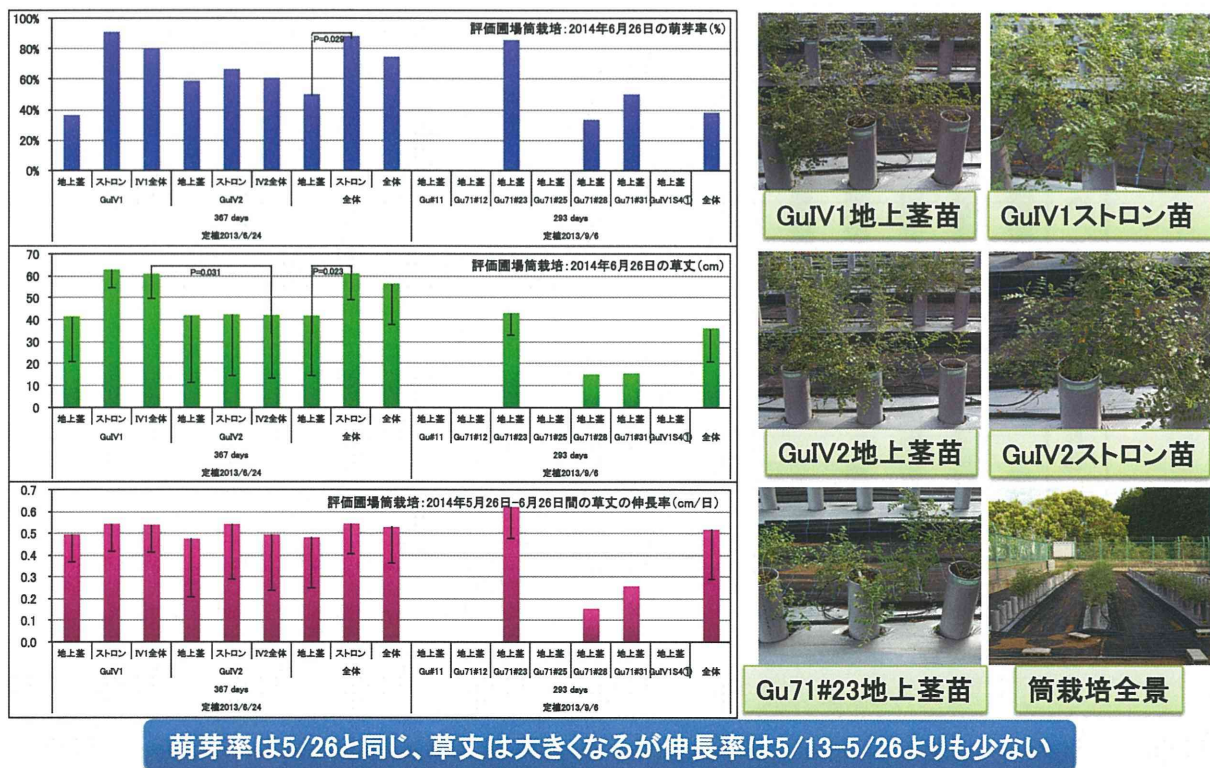
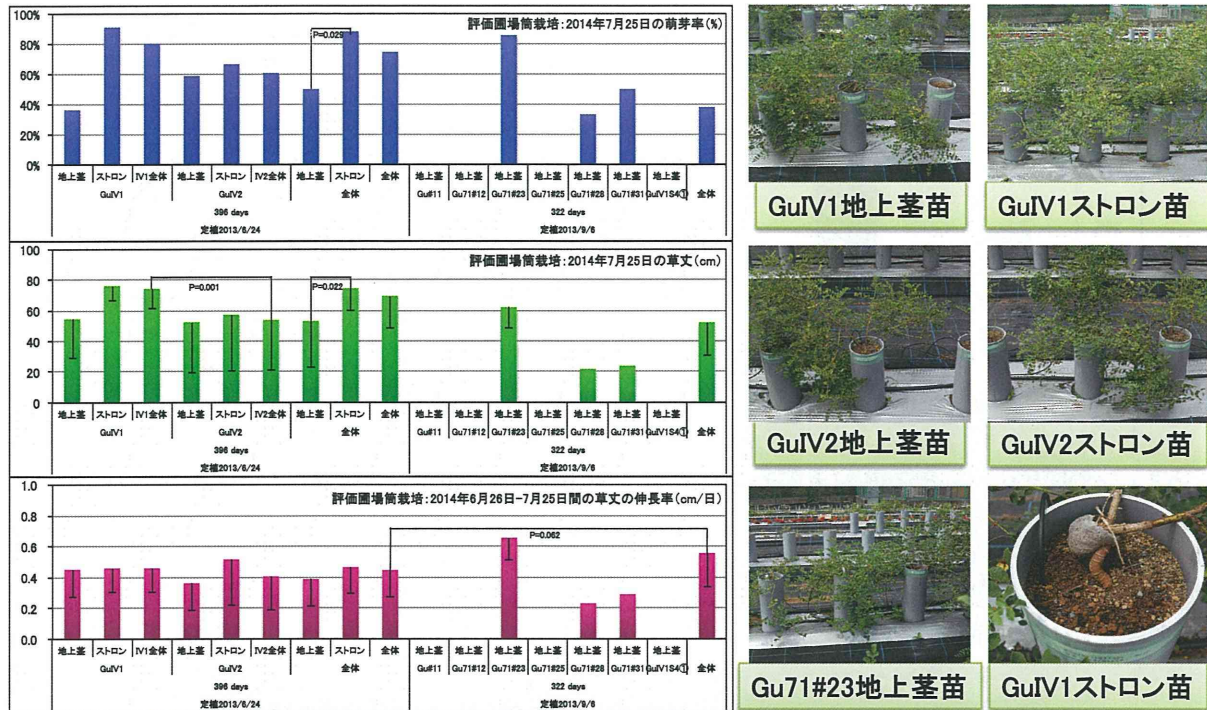
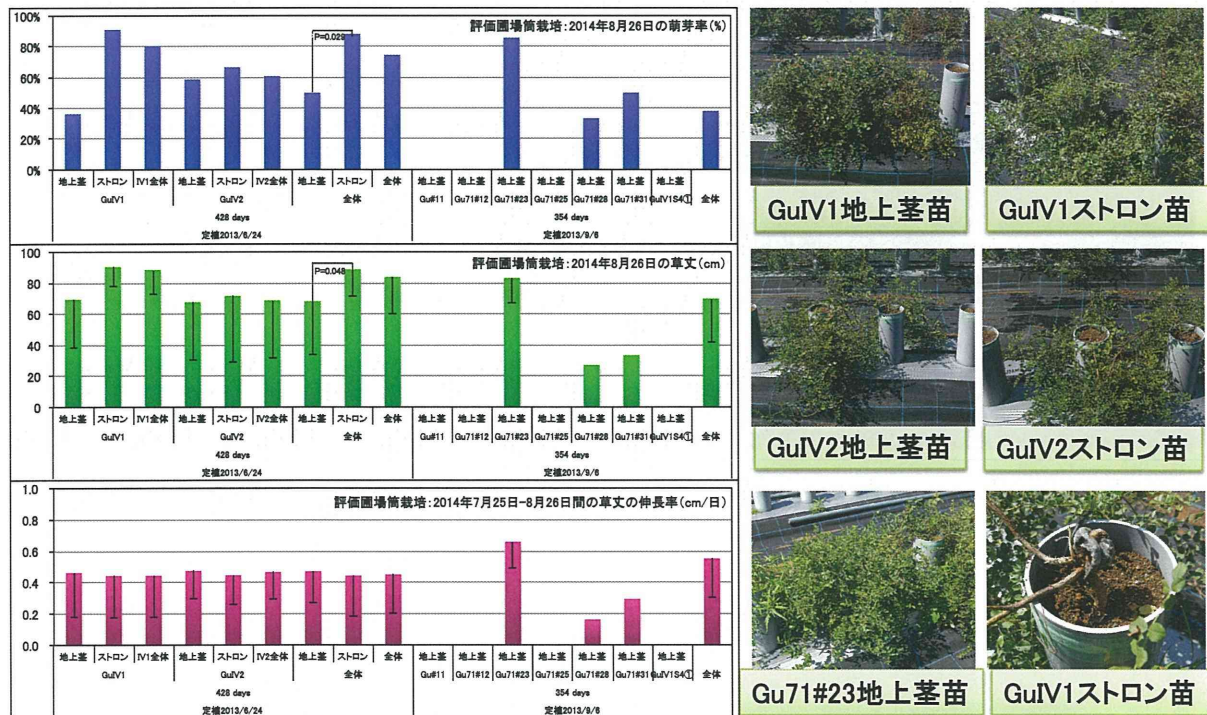


図 6. 筒栽培ウラルカンゾウの生育 (2014/6/26)



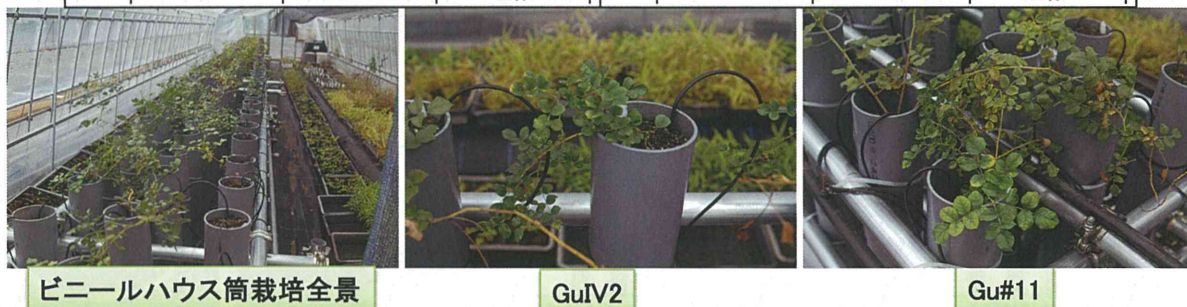
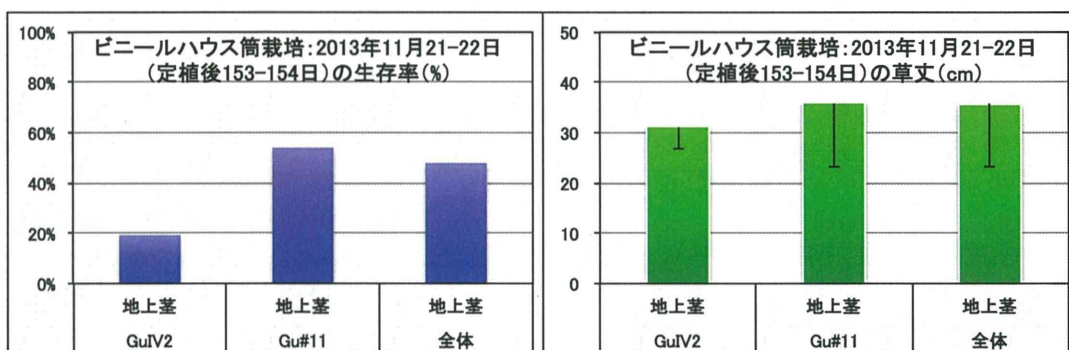
萌芽率は5/26と同じ、草丈は大きくなるが伸長率は5/26-6/26よりも少ない

図7. 筒栽培ウラルカンゾウの生育 (2014/7/25)



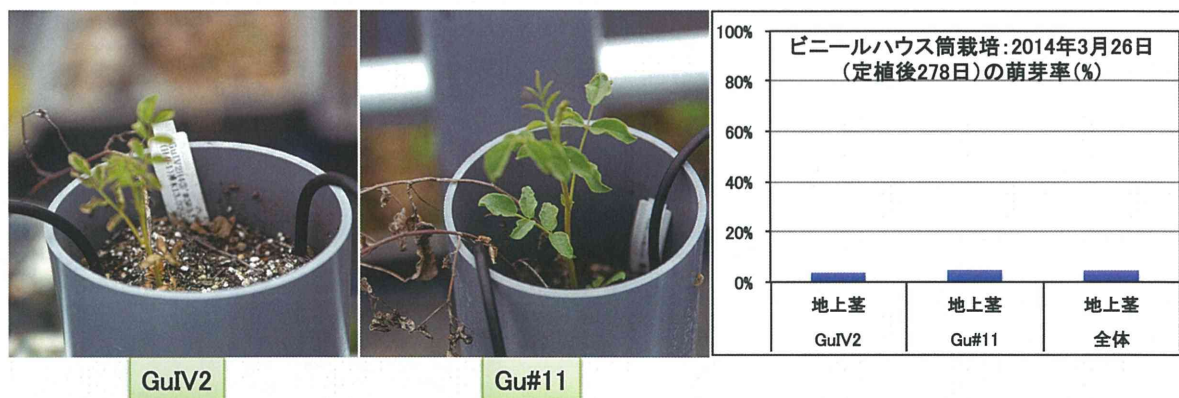
萌芽率は5/26と同じ、草丈は大きくなるが伸長率は5/26-6/26よりも少ない

図8. 筒栽培ウラルカンゾウの生育 (2014/8/26)



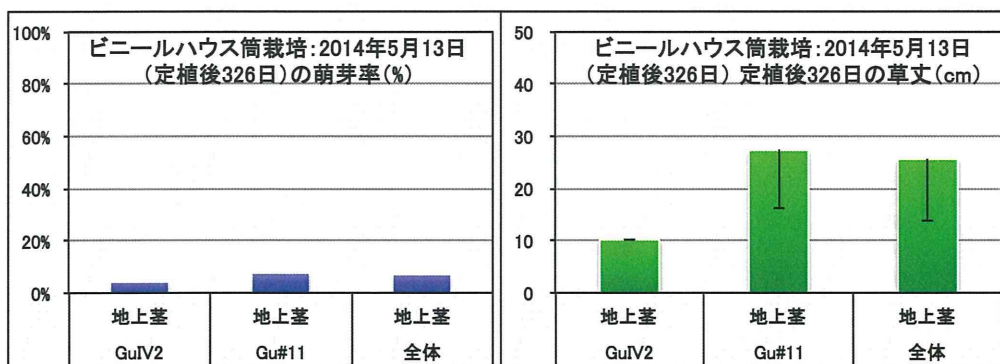
ビニールハウス筒栽培のウラルカンゾウは圃場筒栽培(定植2013/6/24)に比べて生存率が低い

図 9. ビニールハウス筒栽培ウラルカンゾウ(定植 2013/6/21)の生育(2013/11/21-22)



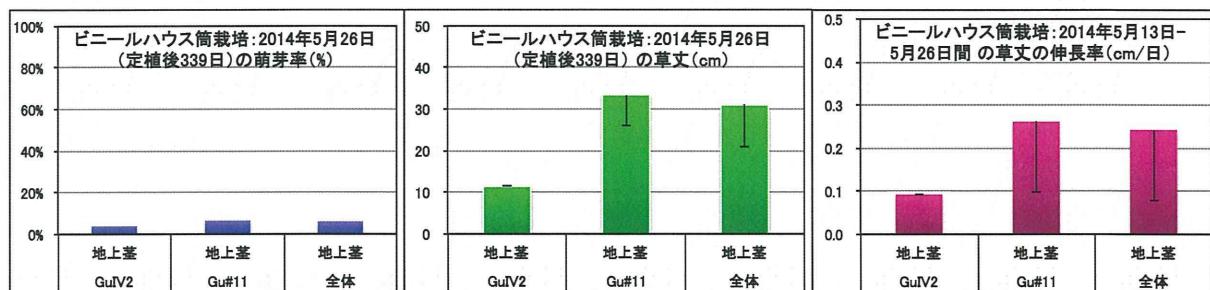
ビニールハウス筒栽培のウラルカンゾウは圃場筒栽培(定植2013/6/24)に比べて生育が良い
しかし、萌芽率が著しく低い

図 10. ビニールハウス筒栽培ウラルカンゾウ(定植 2013/6/21)の萌芽(2014/3/26)



ピニールハウス筒栽培のウラルカンゾウの草丈は圃場筒栽培(定植2013/6/24)より低い傾向萌芽率が著しく低い

図 11. ビニールハウス筒栽培ウラルカンゾウ (定植 2013/6/21) の生育 (2014/5/13)



全景



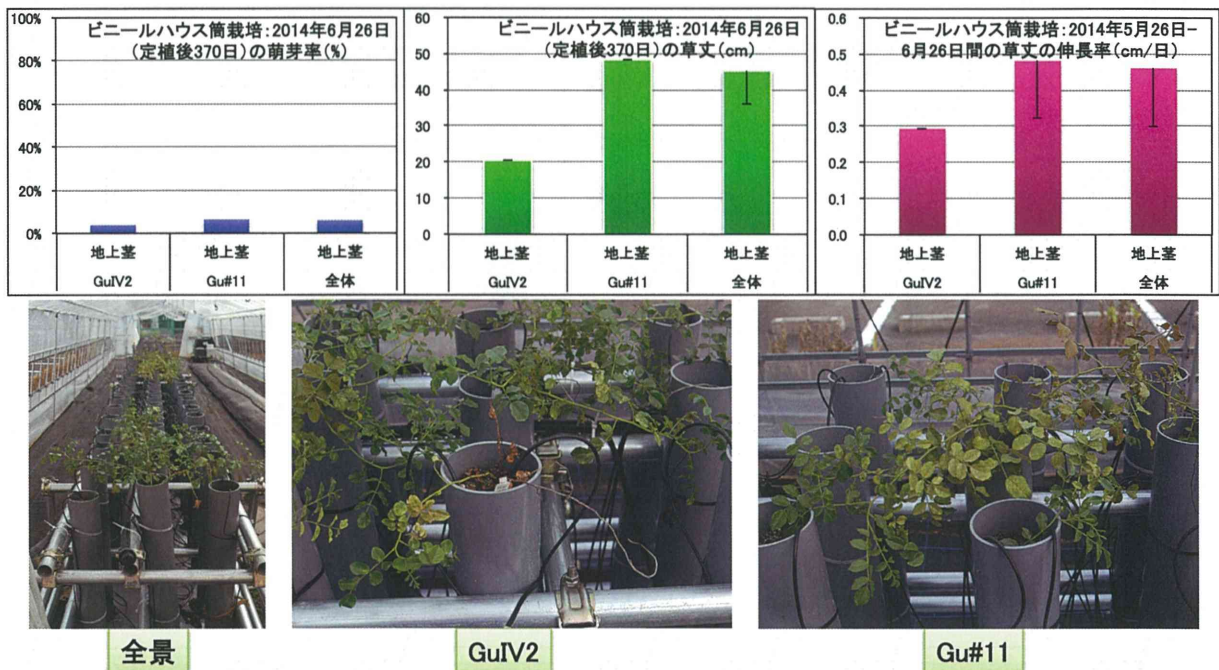
GuIV2



Gu#11

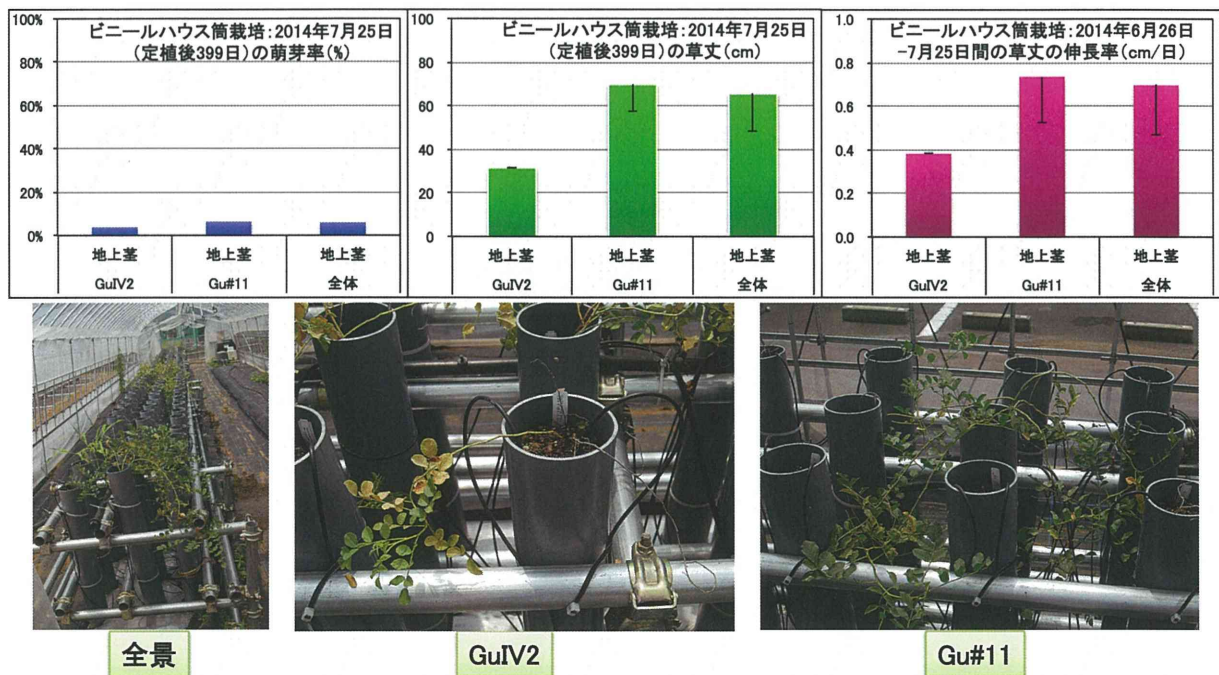
ピニールハウス筒栽培のウラルカンゾウの生育は圃場筒栽培(定植2013/6/24)より劣る

図 12. ビニールハウス筒栽培ウラルカンゾウ (定植 2013/6/21) の生育 (2014/5/26)



ビニールハウス筒栽培のウラルカンゾウの生育は圃場筒栽培(定植2013/6/24)より劣る

図 13. ビニールハウス筒栽培ウラルカンゾウ (定植 2013/6/21) の生育 (2014/6/26)



ビニールハウス筒栽培のウラルカンゾウの生育は圃場筒栽培(定植2013/6/24)より劣る

図 14. ビニールハウス筒栽培ウラルカンゾウ (定植 2013/6/21) の生育 (2014/7/25)