

201407016B

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～26年度 総合研究報告書

(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. 総合研究報告

- 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

(資料)

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－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－・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39
吉松嘉代、吉岡琢磨、武田修己、乾 貴幸、河野徳昭
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－養液栽培で育成したウラルカンゾウ優良株の地上茎挿し木苗
を用いた露地栽培の実証試験について－・・・・・・・・・・・・ 42
吉松嘉代、福田達男、石川 寛、乾 貴幸、河野徳昭、武田修己
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－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－・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44
吉松嘉代、杉村康司、乾 貴幸、河野徳昭
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－ウラルカンゾウの筒栽培及び水耕栽培に関する研究－・・・・・・ 48
吉松嘉代、田村幸吉、新穂大介、乾 貴幸、河野徳昭
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－光独立栄養培養による薬用植物の挿し木に関する研究－・・・・・・ 53
吉松嘉代、根岸直希、小川健一
6. 人工水耕栽培システムによる生薬の生産と化学的・遺伝的安定性に関する研究
－遺伝子情報を活用した薬用植物の有用物質生産性向上に関する研究－・・・・ 55
河野徳昭、吉松嘉代、乾 貴幸、寺岡秀興、田村幸吉、新穂大介
7. ハイテク生薬生産システム構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 68
工藤 善、後藤英司、彦坂晶子、乾 貴幸、吉松嘉代、武田修己
8. 人工水耕栽培システムにより生産した生薬の化学的評価に関する研究・・・・・・ 98
川原信夫、高橋 豊、渕野裕之、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

9. 人工水耕栽培システムにより生産した生薬の化学的評価に関する研究—人工水耕栽培システムにより生産した生薬の日本薬局方試験に関する研究—	101
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、工藤 善	
10. 人工水耕栽培システムにより生産した生薬・食品添加物の性能、均質性及び安全性試験に関する研究—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—	104
穂山 浩、能勢充彦、大月典子、滝口 肇、杉本直樹、多田敦子、 browse 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	
11. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究	123
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、足立理絵子	
12. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—切花及び生薬の安定生産を目指したシャクヤク園芸品種の採花方法の検討—	137
小松かつ子、田村隆幸、朱 姝	
13. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—遺伝的・成分的評価に基づくシャクヤク園芸品種の薬用資源としての可能性—	150
小松かつ子、朱 姝、田村隆幸、村上守一	
14. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—イメージングMSを用いたダイオウ及びシャクヤクの主要成分の局在解析—	164
小松かつ子、平 修	
15. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—ダイオウと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—	174
小松かつ子、伏見裕利	
16. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—長野県菅平薬草栽培試験地におけるダイオウの栽培試験—	181
小松かつ子、児玉 容、村上守一、田村隆幸、葛 躍偉	
17. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—薬用植物資源研究センター北海道研究部栽培試験地におけるダイオウの栽培試験—	193
小松かつ子、菱田敦之、川原信夫	

18. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究—長野県菅平 薬草栽培試験地で栽培されたダイオウの品質評価—	196
小松かつ子、葛 躍偉、村上守一、児玉 容、田村隆幸	
19. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究 —LC/MS によるダイオウの網羅的成分分析—	208
小松かつ子、数馬恒平	
20. 地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究 —エゾウコギの養液～圃場栽培と葉の成分探索—	222
小松かつ子、村上守一、川本元裕、葛 躍偉、磯田 進、菱田敦之	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	236
III. 研究成果の刊行物・別刷	242

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成24年度～26年度総合研究報告書

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 グリチルリチン酸（GL）生合成酵素遺伝子の配列を利用したウラルカンゾウ優良株選抜法を考案し、5 種の新規ウラルカンゾウ優良株を育成した。GL 生合成酵素遺伝子の配列多型を利用した優良系統等の遺伝子識別法を開発した。ウラルカンゾウ優良株の大量栽培・大量生産実用化推進のため、人工水耕栽培植物の地上茎挿し木による効率的な大量増殖法を開発した。また、ウラルカンゾウ人工水耕栽培植物の地上茎、シナマオウ培養シュート、キダチマオウ培養シュートを挿し穂に光独立栄養培養（炭酸ガス濃度 1,000 ppm、光強度 10,000 lux）による挿し木増殖に成功し、マオウ属植物においては酸化型グルタチオン 50 mg/L の培地への添加が効果的であることを明らかにした。これまでに育成したウラルカンゾウ優良株を、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 系統のシナマオウ圃場栽培株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。人工水耕栽培等の栽培法に適した形質等を有する薬用植物の有用・優良系統について、有用成分の高生産株や、生育の旺盛な株を選抜する遺伝子マーカーの構築を目的に、水耕栽培したウラルカンゾウ優良株より構築したリファレンス EST ライブラリーに含まれる二次代謝関連遺伝子の解析を行い、GL 生合成酵素遺伝子が含まれていること、また、チトクローム P450 や糖転移酵素等の二次代謝関連酵素遺伝子が多数含まれていることを確認した。ウラルカンゾウ優良株挿し木苗における GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析を行い、根の径が太い根基部の方が径の細い根端部と比較して各遺伝子の発現量が高い傾向があることを明らかにした。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て GL 生合成経路の 3 酵素遺伝子（*bAS*、*CYP88D6*、*CYP72A154*）のストレス応答を解析し、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を明らかにした。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た。人工水耕栽培システムによる生薬の生産を、他の重要生薬「黄連」に展開するため、植物組織培養によるセリバオウレン優良苗の増殖を行い、鹿島建設水耕栽培装置でのハイテク生薬生産システム構築のための実験材料に供しセリバオウレン培養苗の有用性を評価した。

2) ハイテク「甘草」等生産システムの構築 ウラルカンゾウ優良株を種々人工栽培環境条件で水耕（支持体）栽培してその形質を調査し、白色 LED の使用により、生育促進、二次代謝物含量増加が可能であることを明らかにした。支持体、頻繁な水位変動を必要としない簡便な新規水耕栽培装置を考案し、本装置は、根の肥大と GL をはじめとする二次代謝物生産に適していることを確認した。生育速度と薬用成分含量を高め、生産効率を向上させることを目的として、ウラルカンゾウ（GuIV1 及び GuIV2）苗を温室環境（太陽光）下で栽培し、収穫適期が 7 月頃から 12 月までであることを明らかとした。次いで、人工環境（人工光）下で栽培し、地上部及び地下部の生育に適した光環境（例：明期 16 h d^{-1} 、PPF $230\text{--}350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ）及び培養液温度（ 25°C ）を明らかとした。また、収穫前の UV-B 照射や低培養液温度（ 15°C ）、収穫後の貯蔵温度、乾燥温度（ $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ ）によって、根の主要な薬用成分[GL、リクイリチン（LQ）、リクイリチゲニン（LG）、イソリクイリチゲニン（ISLG）]濃度を高められることを明らかとした。さらに、循環水量を変化させた水耕栽培試験を行い、循環水量 16 L min^{-1} が生育には適していることを明らかにした。ウラルカンゾウにおいて、従来よりも UV の波長域が狭い UV 光源を用い、暗期に UV-B を照射することで、明期より少ない UV 量で明期照射と同様の効果が得られるのかを調査した。ウラルカンゾウ苗を人工環境下で栽培し、UV-B（ 1.32 、 0.66 、 0.33 W m^{-2} ）を照射した結果、地上部への障害は見られず、UV-B 照射区の根の GL、LQ、LG および 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。水耕液循環量試験では、循環水量 16 L min^{-1} で生育量及び GL 含量が最大となった。甘草の効率的生産のため、H25 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 含量が日本薬局方（日局）規格値の 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。

セリバオウレンの人工水耕栽培条件を検討した。最適な肥料濃度を検討した結果、肥料濃度 1/8 大塚 A 処方で生育が最大となり、ベルベリン含量は、肥料濃度にかかわらず日局規格値を満たした。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 CO_2 濃度を明らかにした。最適な光強度環境条件を検討した結果、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。

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。H25年度の結果では、北海道圃場栽培の根（定植後434日）はGL含量が2.5%以上であり、日局規格値を満たすことを確認した。また、稲敷圃場栽培では定植132日後にGL含量1.5-2.3%、福山圃場筒栽培では定植163日後にGL含量1.5%の乾燥根が得られた。H26年度結果では、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の日局規格値の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。

3) 生薬「甘草」等の評価（品質・有効性・安全性） 人工水耕栽培システムにより生産した生薬と市場流通生薬を、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の同等性と差異を評価した。H24 年度は甘草について検討した。両甘草の熱水抽出エキスの 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、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）を対象にした多変量解析においては、両者の違いを示す成分が複数見出され、GL の代謝物と考えられる成分が、水耕栽培品に特徴的という結果が得られた。次に TIC クロマトグラム上、顕著に観測されている約 30 の成分を抽出し、そのデータを基に多変量解析を行ったところ、いくつかの成分についてはそのシグナル強度差において、両甘草の差異を示す指標として観測された。熱水抽出によるエキスの作製操作において、用いる試料量が両甘草において異なるという問題が示唆されたため、粉末化した各種甘草のメタノール抽出液を測定し、同様の解析を行った。その結果、熱水抽出エキスの差異は認められなかったが、両者の違いを示す成分が数種観測された。H25 年度は、中国で入手した生薬も含む甘草類も含めて検討した。甘草類のメタノール抽出液の 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 *Glycyrrhiza 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。H26 年度は、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。

日局試験については、H24 年度は、人工水耕栽培システムにより生産された甘草 2 種（GuIV1、GuIV2）11 検体について実施した。性状（外観）では 0.5 cm 以上に満たない部分を認めたが、その他の性状及び内部形態は日局カンゾウの性状に適合すると判断された。GL 含量については、GuIV1 の 2 検体が 2.89%および 3.62%を示し日局規格（2.5%以上）に適合していた。しかしながら各株の平均値は日局規格値に適合しなかった。GL 含量が 2.5%以上であった 2 個体（3 検体）で理化学試験をおこなった結果、3 検体とも全項目で日局規格値に適合していた。H25 年度は、人工水耕栽培システムにより生産された黄連及び甘草について日局試験及び個別元素分析を実施した。黄連は水耕液（大塚 A 処方）の濃度を変えた 4 試験区 15 個体について、日局試験及び個別元素を測定した。甘草は水耕栽培月数、循環量が異なる 2 クローン 23 検体について GL を定量した。さらに、支持体を用いた水耕栽培（パミス水耕及びハイドロボール水耕）甘草及びハイブリッド栽培（北海道、つくば、種子島）甘草について性状の確認及びグリチルリチン酸の定量を行い、規格に適合した試料について日局理化学試験及び個別元素分析を実施した。

黄連、甘草とも性状は市場流通品と比較し、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、支持体水耕栽培（パミス水耕及びハイドロボール水耕）甘草は全個体、ハイブリッド栽培甘草は北海道圃場栽培品で 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水耕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。H26 年度は、継続して栽培した「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。栽培地、栽培方法、栽培日数、挿し木苗の種別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。

甘草の市場流通品 3 種と人工水耕栽培品 3 種について、それぞれ熱水抽出エキスをを用い、復帰突然変異試験（Ames test）を行った結果、市場流通品及び水耕栽培品ともに遺伝子突然変異誘発性は認めなかった。市場流通品 4 検体および人工水耕栽培品 3 検体に含まれるヒ素および重金属（鉛、カドミウム、水銀）を ICP-MS を使用して定量した結果、市場流通品からは 3 検体からヒ素（0.16-0.49 ppm）、1 検体からカドミウム（0.13 ppm）、4 検体すべてから鉛（0.2-0.49 ppm）が定量された。一方、水耕栽培品のヒ素は検出限界以下、カドミウム、水銀は定量下限以下であった。また鉛については市場流通品同様、すべての検体から定量値を得た（0.21-0.36 ppm）。いずれの甘草も、ヒ素、鉛に関しては日局、食品添加物公定書の基準値の 1/10 以下の濃度であった。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。

甘草及び黄連の有効性評価に関しては、H24 年度に異なる機序により発症する二つのアレルギーマウスモデルを構築し、H25 年度から試験を実施し検討した。T 細胞依存的な炎症が誘導される接触性皮膚炎モデルを用いた評価系では、有効成分である GL 含有量を同一にしたカンゾウエキスの経口投与により、市場流通品 3 品、水耕栽培品 3 品ともに抗アレルギー活性が示された。両活性に関しては有意な差はなかったことから市場流通品と水耕栽培品のカンゾウエキスは同等の効果があると示唆された。IgE 依存的な三相の炎症反応を誘導するマウスのアレルギーモデルを用いた評価系では、惹起後 72 時間での炎症抑制が示された。

H26 年度は、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を調べ、人工水耕栽培甘草の有効性検証、ハイブリッド栽培甘草、人工水耕栽培黄連の有効性評価を行った。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の間の抗アレルギー活性に有意な差は認められず、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・水耕栽培品の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。

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。栽培 5 年生の根（根茎）17 検体について日局試験を行った結果、11 検体は日局ダイオウとして使用可能であった。日局適の検体は RPII 型 Rp5 タイプの系統 17、18 で多く、系統 29 では 1 検体のみであった。ただし、この検体では新たに Procyanidin 類など 6 化合物が同定され、系統 29 は多様な成分を含有していることが明らかになった。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：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水耕栽培し、発根・発芽から育苗、屋内馴化までを行い、種子 611 粒中 100 個体の育苗に成功した（16.4%）。さらに、86 個体を屋外に馴化させ、次年度の圃場への定植を可能にした。屋内馴化時に収穫した葉にカフェオイルキナ酸類の 1,5-Dicaffeoylquinic acid 及び 1,5-Dicaffeoyl-3-methoxyoxaloylquinic acid などが検出され、さらに屋外馴化により 1-Caffeoylquinic acid 及び Hyperoside が増加することが明らかになった。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

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
工藤 善 鹿島建設株式会社
上席研究員
穠山 浩 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 部長
小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合
研究所 教授

研究協力者

乾 貴幸 (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 特任研究員
寺岡秀興 同 筑波研究部 特任研究員
洲野裕之 同 筑波研究部
栽培研究室長
飯田 修 同 筑波研究部 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
大月典子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 協力研究員
滝口 肇 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 協力研究員
杉本直樹 同 第二室長
伊藤裕才 同 主任研究官
建部千絵 同 主任研究官
佐藤恭子 同 第一室長
多田敦子 同 主任研究官
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
田村隆幸 富山県薬用植物指導センター
主任研究員
村上守一 同 元所長
中曽根亨 長野県健康福祉部薬事管理課
児玉 容 同 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
桑原侑己 同 研究員
根岸直希 日本製紙株式会社
アグリ・バイオ研究所 主査
足立理絵子 (株)ウチダ和漢薬製造部
品質管理課
川本元裕 北陸機材株式会社 専務
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

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) 「甘草」等の種苗生産システムの構築

新規ウラルカンゾウ優良株の育成

ウラルカンゾウ種子を材料に、新たにウラルカンゾウ実生クローン株の培養植物体を誘導し、1-2 ヶ月毎に継代培養を行った。

ウラルカンゾウの支持体水耕栽培

既出のウラルカンゾウ優良株及び新規誘導実生クローン株の培養苗、ストロン挿し苗及び地上茎挿し木苗を種々栽培環境条件下で水耕（支持体）栽培し、生育、収量及び根の二次代謝物含量を調査した。

グリチルリチン酸 (GL) 生合成酵素遺伝子の解析

ウラルカンゾウ葉より DNA を抽出し、GL 生合成酵素であるスクワレン合成酵素 (SQS)、 β -アミリン 11 位酸化酵素 (CYP88D6)、11-オキソ- β -アミリン酸化酵素 (CYP72A154)

遺伝子の塩基配列を解析した。既出のウラルカンゾウ優良株について、各優良株間の識別が可能な配列を精査し、識別のためのプライマーの設計と PCR 条件の検討を行った。

ウラルカンゾウ地上茎の挿し木

水耕栽培で得られたウラルカンゾウ地上茎を材料に、挿し木のための条件（挿し穂部位、挿し穂調製・前処理方法、挿し穂栽培条件）を検討した。

ウラルカンゾウ二次代謝物の分析

植物体を収穫して各部位〔茎、根（径 1mm 又は 2 mm 以上）、細根、ストロン〕に分割し 50℃で数日間温風乾燥した。乾燥した植物試料を粉末にし、50%エタノール又はエタノールで抽出を行い、分析試料を作製した。HPLC 及び UPLC により、GL、リクイリチン (LQ)、リクイリチゲニン (LG)、イソリクイリチン (IL)、イソリクイリチゲニン (ISLG)、グリシクマリニン (GC) 及びグラブリジン (GB) の同時分析を行った。

ウラルカンゾウ EST ライブラリーの作製と解析

水耕栽培したウラルカンゾウ優良株 GuIV1 の根より、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を調製し、ダナフォーム社（横浜市鶴見区）に委託し EST ライブラリーの構築を行った。得られた EST ライブラリーについて、GL 生合成酵素遺伝子が含まれているか確認するため、EST ライブラリーの fasta データ (G. uralensis. deg. fasta, G. uralensis. scf. fasta, G. uralensis. singleton. fasta) について BioEdit の local blast 機能を使用し、相同遺伝子を検索した。また、EST ライブラリーを二次代謝等に関連するキーワードにより検索した。これらについて EST ライブラリーのアノテーションリスト (annotated_transcripts_wgs_top_hit) 29,624 件中の "hit_title" の項目を検索した結果（ヒット数）を集計した。さらに、二次代謝関連と考えられる遺伝子群のうち、ス

テロール代謝、糖転移酵素、メチル基転移酵素、チトクローム P450、そして転写調節因子群のそれぞれについて EST ライブラリーを検索し、関連遺伝子の抽出を行い、出現頻度を解析した。

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。

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、グロースチャンバー（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。

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。

光独立栄養培養

4クローンのウラルカンゾウ及び、シナマオウの組織培養物（培養シュート）は独立行政法人 医薬基盤研究所で育成した。また、キダチマオウは、医薬基盤研究所圃場栽培株の枝を採取し、日本製紙にて培養シュートを

育成した。それらより挿し穂を採取し、発根培養を行った。培養条件は25℃、16時間明期、インドール酪酸（IBA）2 mg/L添加、主要無機塩類が1/5濃度のGamborgB5液体培地（1/5B、無糖）をオアシスに湿潤したものを培地として使用し、炭酸ガス濃度を1,000ppmに制御し、光強度350 luxもしくは、10,000 lux条件下における発根率の違いを調査した。また、シナマオウ、キダチマオウでは、酸化型グルタチオン（興人）50 mg/Lを培地に添加し、同様に発根率の違いを調査した。発根率の調査は、ウラルカンゾウは3週間後、シナマオウ及びキダチマオウは2ヶ月後に行った。

カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発

植物材料は、*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (Gu)、*G. glabra* L. (Gg)、*G. inflata* Batalin (Gi) を含むカンゾウ属植物の乾燥根、もしくは、乾燥ストロン、22試料について、それぞれ、独立した3-4切片（この切片が独立した個体由来か、同一個体由来かは不明）より、75% エタノールで洗浄したメス、解剖鉋、ピンセット等を使って、それぞれ200-400 mg をサンプリングした。このうち、一部に関しては、同一試料を分割し、一部は遺伝子解析に、残りの一部は、成分分析に用いた。

各試料20-50 mgより DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、付属のマニュアルに従って、ゲノムDNAを抽出した。次いで、得られたゲノムDNAを鋳型とし、GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いて、PCRを行い、増幅産物は1%アガロースゲル電気泳動により確認した。

PCR 産物 4.0 μ L に対して、illustra ExoStar (GE healthcare) の Exonuclease I 及び Alkaline phosphatase を、それぞれ、0.5 μ L ずつ加え、37℃で30分間、80℃で15分間反応し、未反応のプライマー等を除去した。ExoStar 反応液のうち2 μ L を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてマニュアルに従い、CYP88D6 intron7 Fw、あるいは、Rv プライマーにより cycle sequence 反応を行った後、

Fast gene Dye Terminator 除去キット（日本ジェネティクス）で精製し、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer (ABI) を用いて塩基配列を解析した。

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

ウラルカンゾウ EST ライブラリーの解析

ウラルカンゾウ優良株 Gu#11 及び、Gu2-3-2 の 2 クローンを材料とした。培養条件は、温度 23°C、14 時間明、10 時間暗である。前述の植物材料より調製した total RNA についてそれぞれ、かずさ DNA 研究所において、*de novo* トランスクリプトーム解析を行った。作製された contig データについて、150 bp 以下のもの及び公開 EST データに含まれないものを除外し、得られたユニークな配列を unigene とし、Blastx による機能アノテーションを行った。さらに、同一植物種・複数系統の試料の場合は contig 配列情報について発現量の目安となる Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads (RPKM) 値の算出を行った。

ウラルカンゾウ挿し木苗における GL 生合成酵素遺伝子の発現解析

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

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

得られた total RNA は TURBO DNA Free

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

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

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

半定量的 RT-PCR

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

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

定量 realtime-PCR

各試料より調製した total RNA 350 ng を鋳型として、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio) を使用し、逆転写反応を行った。この反応液を 5 倍希釈したものを試料として、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) を用い、定量 real-time PCR (反復 well 数 : 3) を行った。なお、リアルタイム PCR の機器は ABI PRISM® 7000 (Life technologies) を使用した。各遺伝子の発現量は β -tubulin の発現量を基準とし、 $\Delta \Delta Ct$ 法により求めた。

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。

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) IB 0.1] 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。

ウラルカンゾウ挿し木苗におけるGL生合成酵素遺伝子の発現解析（ストレス処理）

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（R0 水に溶解）
浸透圧（疑似乾燥状態）ストレス (P) : 15% PEG6000（R0 水に溶解）
コントロール (C) : R0 水

挿し木苗を水耕栽培のアラシ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5 cm の部分をサンプリングし、新鮮重測定後、液体窒素で凍結し、以降の処理まで-80℃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*、*CYP72A154*) 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。

2) ハイテク生薬生産システム構築

ウラルカンゾウの生育速度及び薬用成分含量向上の検討

ウラルカンゾウの生育速度と薬用成分含量を高め、生産効率を向上させることを目的として、ウラルカンゾウ (GuIV1 及び GuIV2) 苗の温室環境（太陽光）下での収穫適期、人工環境下での地上部及び地下部の生育・薬用成分濃度を高めるのに適した光環境及び培養液温度を探索した。また、収穫前の紫外線照射、収穫後の貯蔵及び乾燥温度が根の主要な薬用成分濃度に及ぼす影響について調査した。

ウラルカンゾウ水耕栽培における水耕液循環量の検討

水耕栽培液の循環水量を変えてウラルカンゾウの水耕栽培を行い、生育や二次代謝産物産生に最適な循環水量を検討した。

生育速度及び薬用成分含量向上の検討

ウラルカンゾウの挿し木苗を湛液水耕で4ヶ月間育苗した。育苗から処理期間を通じて、白色蛍光灯を用い、PPF 360 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、CO₂濃度 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ で栽培した。気温および明期は育苗期間で 25/20℃（明期/暗期）、

16時間、処理期間で22.5℃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GLならびに薬理活性を持つフラボノイド類のLQ、LGおよび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

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

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

ポンプは60分稼働した後、5分間停止することにより栽培槽の水位を下げ、根が空気に暴露する時間を設けた。

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

供試苗は2012年8月に定植した。そして2013年7月に収穫し重量を測定し、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

供試植物は、医薬基盤研究所で育成・増殖したセリバオウレンの培養苗を水耕栽培で馴化養生した苗を用い、1試験区6個体とした。栽培は、人工気象室内で、東芝製Hf蛍光

灯（昼白色）を用い、PPF 180 μmol m⁻² s⁻¹、CO₂濃度1000 μmol mol⁻¹で栽培した。気温および明期は育苗期間で22/16℃（明期/暗期）、14時間とした。

栽培装置は350mm×1200mm×110mmHの栽培槽と450mm×550mm×250mmHの貯水槽からなり、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプにて水を連続循環した。肥料濃度を1/2、1/4、1/6、1/8と変えて4試験区設定した。栽培は588日間で栽培終了後、重量を測定しベルベリン量を測定した（東京生薬協会で実施）。

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

供試植物は医薬基盤研究所で育成・増殖したセリバオウレンの培養苗を水耕栽培で馴化養生し、馴化後の葉に全て更新された苗を用いた。光合成・蒸散測定には、小糸工業製KMC-2005型改良機を使用した。チャンバーのサイズは178mm×275mm×400mmHとした。また、光源として東芝製Hf蛍光灯（昼白色）を使用した。セリバオウレンは水耕栽培に馴化後、90～120日間育成後の個体で、葉の枚数は3～4枚の個体であった。測定は基本となる環境条件を設定した。また、水耕液条件は栽培時と同様である。この各環境要因を変化させた場合の光合成速度と蒸散速度を1回の測定に1個体用いて、4個体計測した。

セリバオウレン光合成蒸散測定基本条件

気温：20℃、相対湿度：60%

光強度：180 μmol m⁻² s⁻¹

CO₂濃度：1,000 μmol mol⁻¹

ウラルカンゾウ優良株の支持体水耕栽培及び人工水耕-圃場ハイブリッド栽培（ハイブリッド栽培）と評価

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、GC室内でのパミス®を支持体とする水耕栽培

(パミス水耕) 及びハイブリッド栽培: 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。H25年度は、10月～11月上旬に、H26年度は9月末から12月にかけて根を収穫し、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 (日局試験、ICP-MSによる元素分析) 又は丸善製薬で行った。

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℃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ンノシド含量を比較した。

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、H25 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。

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。

3) 生薬「甘草等」の評価 (品質・有効性・安全性)

化学的同等性評価

人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」、「ハイブリッド栽培甘草」及び市場流通生薬「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。また、水耕黄連についても同様に、市場流通黄連との同等性や差異に関する検討を行った。

日局試験

日局の記載に基づき、甘草 (水耕栽培品、支持体水耕栽培品、ハイブリッド栽培品、市場流通品) 及び黄連 (水耕栽培品、市場流通品) の日局試験を実施し、適合性を評価した。

個別元素測定 (ヒ素、鉛、カドミウム、水銀)

甘草 (水耕栽培品、支持体水耕栽培品、ハイブリッド栽培品、市場流通品) 及び黄連 (水耕栽培品、市場流通品) 中のヒ素、鉛、カドミウム、水銀含量を ICP-MS を用いて定量した。

変異原性試験

甘草 (水耕栽培品: GL 含量が日局を満たすもの、市場流通品) 及び黄連 (水耕栽培品、市場流通品) より熱水抽出エキスを作製し、復帰突然変異試験 (Ames test) を実施した。

T 細胞依存的炎症・接触性皮膚炎モデルマウスへの経口投与による有効性評価

BALB/c (7週令、雌) の側腹部の体毛を感作開始二日前に眼科用はさみと電気シェーバーで剃毛した (day -2 とする)。感作開始日

をday 0とし、アセトンに溶解した5%TNCB (2, 4, 6-trinitrochlorobenzene) 溶液を100 μ L 側腹部に塗布した(感作日をday 0とする)。Day 7に1% TNCBアセトン溶液を右耳介の表裏に10 μ Lずつ塗布し(惹起日をday 7とする)、day 8 (24時間後)、day 9(48時間後)の耳介の腫脹を測定した。耳介の腫脹の測定にはダイヤル・シックネス・ゲージ (G-1A、株式会社尾崎製作所)を用い、1匹につき3回測定し、その平均値を実測値とした。

肥厚の変化は(1)の式により算出した。

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

被験エキ스는、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。1匹当たり最大200 μ L以内の投与量になるよう、GLとして10 mg/mLに精製水(大塚蒸留水、大塚製薬、東京)で調製し、day 0より惹起1日前のday 6まで計7回反復投与した。

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 200 μ L以内になるように、ベルベリン10 mg/mLに精製水で調製し、day 0より惹起1日前のday 6まで計7回反復投与した。

IgE依存性炎症・三相型アレルギーモデルマウスへの甘草エキス経口投与による有効性評価

BALB/c (7週令、雌)に抗TNP (2, 4, 6-Trinitrophenol) -IgE抗体 (100 μ g/mice)を尾静脈より注射し、疑似感作状態を獲得した(感作日をday -3とする)。感作3日後にオリーブオイルに溶解した1%TNCBを右耳介の表裏に10 μ Lずつ塗布し(惹起日をday 0とする)炎症を惹起した。抗アレルギー活性評価のために、惹起後4時間までは1時間間隔で(1、2、3、4h)、その後10時間までは2時間間隔で(6、8、10h)、以降は24時間間隔で、24時間後(day 1)、48時間後(day 2)、72時間

後(day 3)、と168時間後(day 7)に至るまで耳介の腫脹を測定した。

甘草エキス経口投与群は、GL量に換算し100 mg/kgの量で、惹起1時間前に単回投与を行った。

動物実験

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

血中グリチルレチン酸の測定

BALB/c (7週令、雌)を27匹ずつ、2群に分け、GLの量に換算して、40 mg/kgの精製GL、市場流通品カンゾウエキス(KZT)を経口投与した。血中グリチルレチン酸の濃度は、投与1、2、3、4、6、8、10、12、24時間後に各3匹のマウスより採血した試料をHPLCにより測定した。試料の前処理にはアセトニトリルを用いた除タンパクを行った。

4) 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℃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。

5) 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。

日局試験: 性状、粉末の検鏡、確認試験、純度試験 (重金属、ヒ素、ラポンチシン)、乾燥減量、灰分、エキス含量 (希エタノールエキス) 及び定量法の各試験を実施した。

品質評価: HPLC分析によりLindleyinを定量した。大黄から化合物を単離・同定した。

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。

6) ブランド生薬の開発: エゾウコギ

栽培: 閉鎖環境下に養液栽培のための装置を組み、播種、緑化、育苗、屋内馴化までを行い、さらに屋外で植物体を馴化させた。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: 養液栽培で得られた植物体の葉及び屋外馴化後の葉に含有される成分を LC/MS で分析した。対象として中国で収集した野生のエゾウコギの葉を用いた。

C. 研究結果

1) 「甘草」等の種苗生産システムの構築

既出のウラルカンゾウ優良株のうち、特に水耕栽培した根の GL 含量が高い GuIV1 及び GuIV2 について、GL 生合成酵素遺伝子の配列を解析した結果、CYP88D6 遺伝子のイントロン 7 の部分配列において特徴的な配列が見出され、甘草市場流通品 (野生のウラルカンゾウ根及びストロン) における本配列の出現頻度が甘草の GL 含量と高い相関性を示すことを発見した。そこで、新規ウラルカンゾウ実生クローン株を育成し、本配列の存否と水耕栽培した根の GL 含量を調べた結果、本配列が含まれる株は高い GL 含量を示すことが判明し、新たに 5 種のウラルカンゾウ優良株の育成に成功した。新規ウラルカンゾウ優良株 Gu#11 については 1 年間水耕栽培した根の GL 含量が 2.5% 以上であることを確認した。

これまでに育成した 4 種のウラルカンゾウ優良株 (GuIV1、GuIV2、Gu2-2-1 及び

Gu2-3-2) 及び新規ウラルカンゾウ優良株 Gu#11 のグリチルリチン酸合成酵素 (SQS、CYP88D6 及び CYP72A154) 遺伝子の DNA 配列解析結果より、各株間を識別するプライマーの設計及び PCR 条件の検討を行い、各遺伝子配列の PCR を組み合わせることで、各株を識別できる PCR 法を開発した。

ウラルカンゾウ優良株の大量栽培・大量生産実用化推進のため、植物組織培養やストロン挿しよりもさらに高効率な地上茎挿し木による効率的増殖法を検討し、通常のグロースチャンバーでの挿し木では、挿し穂材料、挿し穂調製時の流水処理、挿し床の種類、栽培環境 (温度、湿度、光) が重要であることを明らかにし、1 本の優良株から理論値で年間 16,000-940,000 本の増殖に成功した。

人工水耕栽培等の栽培法に適した形質等を有する薬用植物の有用・優良系統について、有用成分の高生産株や、生育の旺盛な株を選抜する遺伝子マーカーの構築を目的に、水耕栽培したウラルカンゾウ優良株 GuIV1 の根より EST ライブラリーを構築した。本ライブラリーは、総遺伝子数: 42,280、クラスター数: 40,280、アノテーションのついた遺伝子数: 29,624、GO アノテーションのついた遺伝子数: 11,540、Interpro アノテーションのついた遺伝子数: 14,669、KEGG ID がアノテーションされた遺伝子数: 2,214、EC number がアノテーションされた遺伝子数: 903 であり、リファレンス EST ライブラリーとして満足できるものが得られた。

本ライブラリーに含まれる二次代謝関連遺伝子の解析を行った結果、GL 生合成酵素遺伝子が含まれていること、また、チトクローム P450 や糖転移酵素等の二次代謝関連酵素遺伝子が多数含まれていることが確認された。これらの情報は、遺伝子マーカーの構築の基盤情報である。

未利用部位の利用法開拓のため、水耕栽培で得たウラルカンゾウ優良株地上茎の水浸出液 (Gu 水) が、植物の発芽と初期生育に及ぼす影響を調べた結果、シロウリ、ニラでは純水又は蒸留水と比較して、顕著な効果が認められなかった。一方、サラダ水菜、スイ

ートバジル、ベビーリーフ、ミニトマト、トウモロコシでは、顕著な初期生育促進効果が認められ、Gu 水を養液に交換後もその生育促進効果は持続した。オタネニンジン芽きり種子では、15℃において、純水と比較して顕著な発芽促進効果が認められた。一方、4℃においては、栽培初期に純水と比較して顕著な発芽促進効果が認められたが、117 日以降は発芽率の差が認められなくなった。15℃の試験区においては、葉数が 2 枚 (通常は 1 枚) の実生の割合が増加した。本 Gu 水は、新規植物生長剤として特許を出願した。

甘草以外の生薬の人工水耕栽培のため、重要生薬「黄連」の基原植物であるセリバオウレンの植物組織培養による増殖を行った。圃場栽培株の葉柄切片より誘導した不定胚より再分化して得られたセリバオウレン培養植物体は、2-4 ヶ月毎に、株分けして WPGHF 培地で継代培養することにより、2-3 ヶ月で約 2.6 倍に増殖した。本培養苗は、1 年間のパミス水耕で、日局規格を満たす生薬「黄連」の生産が可能であることを確認している。

光独立栄養培養による効率的な挿し木法を検討した結果、炭酸ガス 1,000ppm、光強度 10,000 lux 条件下において、各ウラルカンゾウクロンで高い発根率を示した (GuTS71-08IV2:80.0%、GuTS71-08IV1:78.2%、Gu2-2-1:85.0%、Gu2-3-2:91.5%)。また、シナマオウにおいても 50%の発根率となった。さらにシナマオウについて、酸化型グルタチオン 50 mg/L 添加の効果を調べた結果、発根率 68%を得た。キダチマオウでは、酸化型グルタチオン 50 mg/L の培地への添加により、5 個の培養シュート挿し穂のうち 1 個体で発根が認められた

GL 生合成酵素遺伝子の多型を利用したカンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発を行った。基原植物として、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草試料より、ゲノム DNA を抽出し、抽出 DNA を鋳型に CYP88D6 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の増幅を行った。その結果、これら PCR 産物は、増幅の有無やサイズの違いから、(a) 約 300 bp の増幅が認められる Gu