

7. カロテノイド摂取と食物アレルギー発症の予防

穂山 浩 大月 典子

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

カロテノイドは強い抗酸化作用を有するため、活性酸素を抑制し、アレルギー疾患を抑制することが示されている。カロテノイドの中で緑黄色野菜に多いβ-カロテン摂取は、オボアルブミン経口感作を抑制し、肥満細胞からのケミカルメディエーターを介した即時型アレルギーの発症と、Th2細胞優位な食物アレルギー状態への移行を抑制した。コホート研究においてもβ-カロテンとの関連については、妊婦および乳児の血中β-カロテン濃度が高いほど、出生後の乳児のアレルギー症状の発症リスクが低いことが示されている。本稿では、β-カロテンを中心にカロテノイドのアレルギー予防に関する有効性について紹介する。

●キーワード

β-カロテン、プロビタミンA 活性、レチノール、レチノイン酸、経口免疫寛容、コホート研究

はじめに

花粉症やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の罹患者数は年々増加しているが、その原因としてわが国の食生活の変化が関与している。戦前においては米と芋類などを含む雑穀が主食で、動物性蛋白質の供給源はほぼ魚類に限られていた。戦後においては野菜や米などの摂取の割合は徐々に減少し、肉、卵、乳製品、油脂の摂取の割合が急激に

増加して欧米型の食生活に移行し始めた。この食生活の急激な変化がわが国におけるアレルギー疾患の増加や症状の増悪の原因の一つであると言われている¹⁾。特に食品摂取が原因で起こる食物アレルギーは乳児期に発症することが多く、一度発症すると年齢によってアレルギー症状や抗原が変わる「アレルギーマーチ」を誘発すると考えられている。つまり、食物アレルギーの発症を抑えることはアレルギーマーチの抑制でもあり、長期にわたるアレルギー症状の予防も可能であると予想

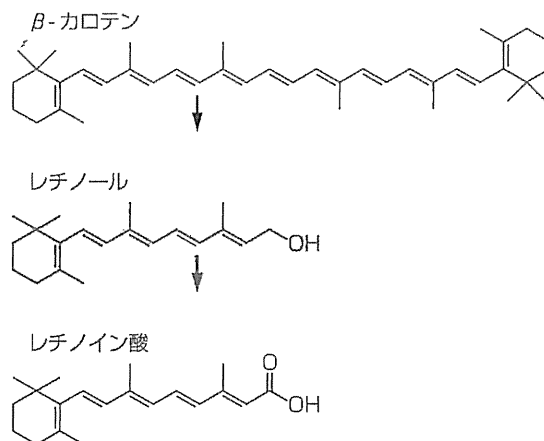


図1 β-カロテンとレチノール, レチノイン酸

され、その方法が望まれている。また、食品をバランス良く摂取すれば、アレルギー疾患の予防やアレルギー症状の改善が期待できると考えられる。本稿ではβ-カロテンを中心に、カロテノイドのアレルギー予防や抑制作用に着目して解説した。

1 カロテノイドとビタミンA

自然界には750種類以上のカロテノイドが存在するが、脂溶性ビタミンであるビタミンA（レチノール）に関して分類すると、レチノールに変換されるレチノール前駆体（プロビタミンA活性を有する）であるものと、プロビタミンA活性を有しないものに分類される。プロビタミンA活性を有するカロテノイドには、β-カロテン、α-カロテン、β-クリプトキサンチン、γ-カロテンなどがあり、プロビタミンA活性のないカロテノイドにはアスタキサンチン、フコキサンチンなどがある。プロビタミンA活性を有するカロテノイドは、体内でレチノールに変換されたのち代謝され（図1）、発生、生殖、免疫ならびに上皮細胞分化、骨分化など、さまざまな生理学的過程において重要な役割を果

たしているといわれている²⁾。レチノールは多くの食品から摂取することができるが、動物性食品にはレチノールと脂肪酸が結合したレチニルエステルとして、植物性食品では、レチノール前駆体のβ-カロテンなどのカロテノイドとして含まれている。栄養状態の悪い国々では、乳幼児死亡の原因として、感染症を伴う持続性の下痢が深刻な問題となっていたが、現在ではレチノールの補給でこの状況を改善できることが報告されている。

2 カロテノイドによるアレルギー性疾患の症状改善

すべてのカロテノイドは、強い抗酸化作用を有する。特に活性酸素（reactive oxygen species: ROS）、なかでも酸化力の強い一重項酸素の消去に有効であることが知られている。ROSは慢性疾患やアレルギー疾患の原因の一つとみなされており、生体内酸化ストレスを促進する。

喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の炎症局所では、活性化した単球、顆粒球（好中球、好塩基球、好酸球、肥満細胞）により過剰のROSが産生される。特に喘息において、酸化的ストレスは、気管支および

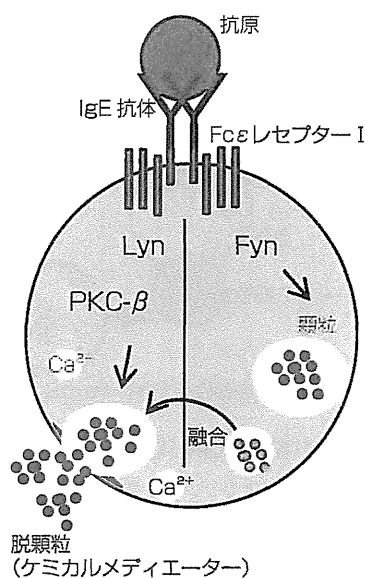


図2 肥満細胞上の Fcεレセプターからのシグナル

肺の上皮細胞に障害を与え、気管支収縮と気道過敏症を引き起こすことが知られている。カロテノイドの摂取量および血中の濃度と、呼吸器の機能との間に正の相関関係があることを示す報告は多い。また、喘息の罹患者群と健常人群における末梢血中のカロテノイド濃度を比較した調査から、カロテノイド摂取が喘息の症状を抑制する可能性が示唆されている。さらに種々のカロテノイドの細胞膜へのアプローチおよび局在も明らかにされつつあり、摂取されたカロテノイドの局在の違いによる抗酸化機序の多様性も興味深い。

3 β-カロテン摂取とI型アレルギー

佐藤、穂山らは、抗原（オボアルブミン）を投与して誘導したマウスI型アレルギーモデルにおいて、β-カロテンの経口投与が抗原特異的IgE抗体産生の抑制、また能動型全身性アナフィラキシー誘導時の血中ヒスタミンの上昇と即時型の耳介の腫脹を抑制し、

アレルギーの病態を改善する可能性を報告した^{3,4)}。この結果から、消化管より吸収されたβ-カロテン代謝物質が、抗原特異的IgE抗体産生の抑制を通して、肥満細胞や好塩基球からのケミカルメディエーターの脱顆粒を阻害した可能性が示唆された。カロテノイドによる肥満細胞の機能抑制メカニズムについては、分子レベルで検証した報告がある⁵⁾。脱顆粒を誘導する際に、細胞株をカロテノイドで前処理した場合、未処理の群と比較して、細胞上のFcεRI (Fcε-レセプターI: 高親和性IgEレセプター)の脂質ラフト^{注1)}への凝集が阻害され、FcεRIの下流にシグナルを伝達するチロシンリン酸化酵素LynおよびFynのリン酸化抑制、さらにLynの下流のPKC-β活性化の抑制と細胞内カルシウム濃度の抑制が起こることが示されている(図2)。

^{注1)} 脂質ラフト (lipid rafts) : 細胞膜上の機能分子が凝集し、効率的に反応し得るための脂質膜で形成された「いかだ状」の機能ドメイン。

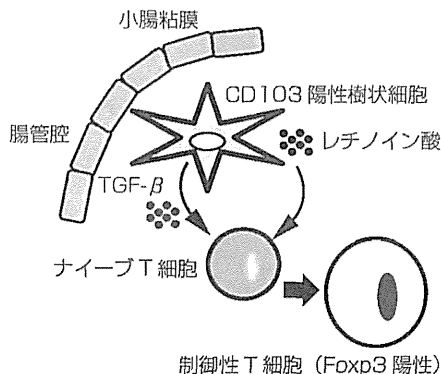


図3 腸管関連リンパ組織 (GALT) で誘導される抑制性 T 細胞
 CD103陽性樹状細胞から放出されたレチノイン酸にホーミング分子を誘導されたナイーブ T 細胞はリンパ組織に集結し、TGF-βの刺激を受けて抑制性 T 細胞へと分化していく。

4 レチノール代謝と経口免疫寛容

生体の免疫系は自己と非自己を識別する機能をもっているが、非自己の蛋白に対して免疫応答を賦活化せずに、自己に有益な蛋白質を生体に取り入れるシステムを有している。特に腸管粘膜が食品蛋白質を取り入れるシステムは「経口免疫寛容」と呼ばれている。経口免疫寛容が正常に機能することにより、食品蛋白質は拒絶されず、消化・吸収される。食物アレルギーはこのシステムに破綻が生じた場合に起こり、食品蛋白質に対して免疫応答が惹起され、食物アレルギーを発症する。

経口免疫寛容を成立させるためには、腸管粘膜免疫の成熟が必要である。この成熟に不可欠なのが粘膜を介して分泌される IgA 抗体である。IgA 抗体産生の低下とアレルギー増悪は相関するという報告は数多くある。乳幼児期に食物アレルギーを発症しやすいのは、IgA 産生能が未発達であることも要因だと考えられている。近年、レチノール代謝物であるレチノイン酸 (retinoic acid: RA) が

経口免疫寛容の誘導に重要な意義をもつ可能性が明らかになった。腸管には特有の腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue: GALT) が存在する。GALT 中の樹状細胞 (DC) は、腸管のナイーブ T 細胞上に RA によりホーミング分子の発現を誘導し GALT に集積する⁶⁾、さらに2007年、ナイーブ T 細胞を集積させたのは CD103陽性 DC であり、その DC が産生する RA と TGF-β により、抗原特異的制御性 T 細胞 (iTreg) 分化が誘導され、同時に炎症性 IL-17産生 T 細胞 (Th17) への分化を抑制することが報告された (図3)⁷⁾。このような抗原特異的制御性 T 細胞は、経口免疫寛容においては食物抗原の免疫応答の制御に関与していることが示唆されている⁸⁾。

5 β-カロテン経口投与による慢性アレルギーの改善

佐藤らは、オボアルブミン (OVA) を連続経口投与することで、感作誘導可能な B10A マウスを用いて、β-カロテン強化食摂取による OVA 経口感作への影響を報告し

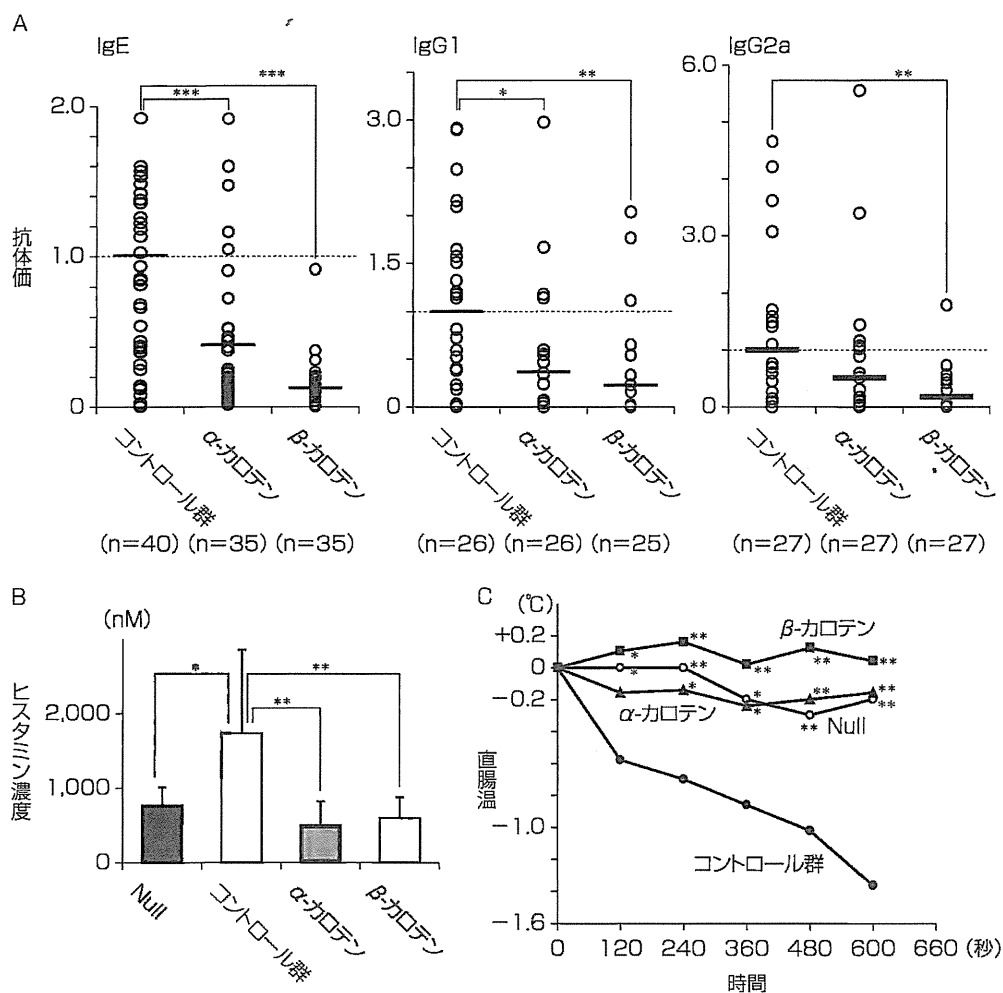


図4 OVA 特異的経口アレルギー誘導マウスモデルにおけるカロテノイド摂取の影響

コントロール群: OVA + 通常食群 α -カロテン: OVA + α -カロテン強化食群

β -カロテン: OVA + β -カロテン強化食群

Null: 未感作・通常食マウスにOVAの腹腔内投与のみ行った群

A: 血清中の抗体価

※感作後、OVAを腹腔内投与し、誘導したアナフィラキシーによる。

B: 血中ヒスタミン濃度。

C: 直腸温の変化。

た⁹⁾。 β -カロテン強化食摂取開始2週目より9週間OVAの連日経口投与を行い、OVA感作し、OVAに対するアレルギーの状態を誘導する。通常食群と β -カロテン強化食群を比較したところ、血清中OVA特異的抗体価(IgE, IgG1, IgG2a)では、 β -カロテン摂

取群は、対照群に比べて有意に低値を示した(図4A)。誘導したアナフィラキシー(ASA)誘導後の体温および血中ヒスタミン濃度では、 β -カロテン摂取群は、対照群に比べて体温低下および血中ヒスタミン濃度上昇が有意に抑制された(図4B, C)。さらに両群の

培養脾細胞に OVA を添加し、上清中のサイトカインを測定したところ、 β -カロテン摂取群は通常食群と比べ IL-2 産生が増強し、IL-5, IL-6 産生が抑制された。

これらのことから、 β -カロテンの摂取は OVA 経口感作を抑制し、その結果、IgE 依存的に誘導されたケミカルメディエーターを介した即時型アレルギーの発症と、Th2 細胞^{注2)} 優位な食物アレルギー状態への移行を抑制することが示唆された。この報告では、腸間膜リンパ節およびパイエル板の制御性 T 細胞の比率の比較では、両群で有意な差は認められなかった。RA が経口免疫寛容誘導に寄与する制御性 T 細胞を誘導することが報告されているが、このことは β -カロテン経口摂取が腸管免疫系の制御性 T 細胞の誘導に有意な影響を与えていない可能性を示唆している。また、 β -カロテンはレチノールに代謝されることが知られているが、肝臓中のレチノールは両群で検出され、両群間で有意な差は認められなかった。肝臓中 β -カロテン濃度については、摂取群のみが β -カロテン蓄積していた。これらのことから、 β -カロテン摂取の OVA 経口感作抑制作用は、レチノールおよび RA への代謝促進増大によるものではなく、ほかの経路によるものと推察された。

^{注2)} Th2 細胞：ヘルパー T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞) は、ナイーブ T 細胞が IL-4, IL-13 などのサイトカインにより分化が誘導される。Th2 細胞は IL-4 や IL-5, IL-13 などを産生する細胞で、過剰な活性化によりアレルギー性疾患の発症に関与する。

6 β -カロテン摂取のコホート研究

近年、アレルギー発症に関わる要因として、出生後の乳幼児の環境のみならず、胎内環境、すなわち母体の食生活の重要性が報告されている。妊娠中からの胎児の食環境におい

て、ビタミン類、無機塩類、あるいは特定の食品成分などの摂取は、出生後の食物アレルギー発症に影響することが示唆されている。 β -カロテンとの関連については、妊婦および乳児の血中 β -カロテン濃度が高いほど、乳児におけるアレルギー症状の発症リスクが低いという報告がある¹⁰⁾。三宅らは、わが国において妊婦の β -カロテンの血中濃度と出生後 16 ~ 24 月齢の乳児における緑黄色野菜と柑橘類の摂取量の関係を調べ、摂取量が多いほどアレルギー性皮膚炎の発症リスクが有意に低いことを報告している¹¹⁾。また β -カロテンを含む野菜、果物類の摂取量とアレルギー発症リスクの調査では、多くの研究者が同様の可能性を報告している。

おわりに

β -カロテンを中心に、カロテノイドのアレルギー予防に関する有効性について論じた。 β -カロテンを含むカロテノイド摂取のアレルギー発症の予防に関してはいまだ不明な点が多い。しかし、初乳に β -カロテンが高い濃度で含まれていることや多くの臨床コホート研究の報告から、腸管免疫の未熟な新生児が口から摂取する際の食品蛋白質の初遭遇において、 β -カロテンを含むカロテノイドは重要な意義があるように考えられ、その解明が期待される。

● 筆者プロフィール

穂山 浩 (あきやま ひろし)

1993年千葉大学大学院薬学専攻科博士課程修了、国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)食品部研究員、1999~2000年科学技術庁科学技術振興局併任科学技術庁長期在外研究員、カナダマックマスター大学医学部留学、2001年国立医薬品食品衛生研究所食品部第3室長、2007年同研究所代謝生化学部第2室長、2010年同研究所食品添加物部長、現在に至る。

参考文献

- 1) Willams H et al: Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol* 103(1 Pt 1): 125-138, 1999
- 2) Kastner P et al: Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83(6): 859-869, 1995
- 3) Akiyama H et al: The effect of feeding carrots on immunoglobulin E production and anaphylactic response in mice. *Biol Pharm Bull* 22(6): 551-555, 1999
- 4) Sato Y et al: The feeding of beta-carotene down-regulates serum IgE levels and inhibits the type I allergic response in mice. *Biol Pharm Bull* 27(7): 978-984, 2004
- 5) Sakai S et al: Inhibitory effect of carotenoids on the degranulation of mast cells via suppression of antigen-induced aggregation of high affinity IgE receptors. *J Biol Chem* 284(41): 28172-28179, 2009
- 6) Iwata M et al: Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21(4): 527-538, 2004
- 7) Mucida D et al: Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317(5835): 256-260, 2007
- 8) Weiner HL et al: Oral tolerance. *Immunol Rev* 241(1): 241-259, 2011
- 9) Sato Y et al: Dietary carotenoids inhibit oral sensitization and the development of food allergy. *J Agric Food Chem* 58: 7180-7186, 2010
- 10) Nurmatov U et al: Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: Systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 127(3): 724-733, 2011
- 11) Miyake Y et al: Consumption of vegetables, fruit, and antioxidants during pregnancy and wheeze and eczema in infants. *Allergy* 65(6): 758-765, 2010

特集 技術開発 2 栽培技術

植物工場における薬用植物の栽培・生産

(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 **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 特任研究員 **乾 貴幸**

1. はじめに

超高齢化社会の日本では、生活習慣病、認知症、更年期障害等の、現代医学（西洋医学）だけでは治療が困難な疾患が増加している。最近、これらの疾患に対し、漢方薬が有効なことが科学的に証明されるようになり、臨床現場においても漢方薬の使用量は増加しており、漢方薬を処方する医師は全体の89.0%に上る（2011年の日本漢方生薬製剤協会の調査）。また、厚生労働省においても、2010年より「統合医療プロジェクトチーム」を設置し、臨床現場における漢方薬の安全性・有効性の科学的根拠の創出を推進している。現在、漢方薬市場は着実に成長している（図1）。

その一方、漢方薬の原料となる生薬（その多くは植物生薬）の供給は、その約90%（2008年の日本漢方生薬製剤協会の調査では87.8%、2011年の東日本大震災後はさらに上昇）を海外からの輸入に依存している（表1）。そして、その多くが中国産である（同調査において83.0%）。

漢方薬は通常複数の生薬より構成されており、たとえば、風邪の引き始めにしばしば処方される葛根湯は、甘草、葛根、麻黄、桂枝、芍薬、生姜、大棗の7種類の生薬より製造される。漢方薬は、一生薬でも欠けると製造できなくなるため、多品目の生薬が必要である。しかし、個々の生薬の使用量は、日々の食糧となる野菜や穀物等の農作物に比べてはるかに少なく、原産国においても栽培化は進んでいない。生薬の供給の多くは、依然として、野生植物の採取に依存している。従って、輸出国の気象や経済・政治状況などによって影響を受け、恒常的な需要

を満たすには不安定な状態であり、現に麻黄（表1：9位）や甘草（同：1位）の輸入は制限されている。

一般に薬用植物は、栽培期間が長く、栽培が難しく費やす労力が大きいため、農業労働者の高齢化が進む日本では栽培が敬遠される傾向が強い[厚生労働省 薬用植物の利用開発等に関する検討について（中間まとめ）平成14年3月]。また、その含有する薬用成分の組成・含量は、生育環境により大きく左右され、収穫時期や乾燥・保管及び加工条件も生薬の薬用成分含量に影響を与える。

このような背景の中、植物工場における薬用植物の栽培（植物生薬の生産）は、表2に示すような優れた点を持ち、生薬の安心・安全な安定供給に有効である。

本稿では、生薬「甘草」の基原植物であるウラルカンゾウと、生薬「黄連」の基原植物であるセリバオウレンについて、植物工場における薬用植物の栽培・生産について紹介する。

2. 「甘草」について

日本薬局方¹⁾において、生薬の「甘草」は、「本

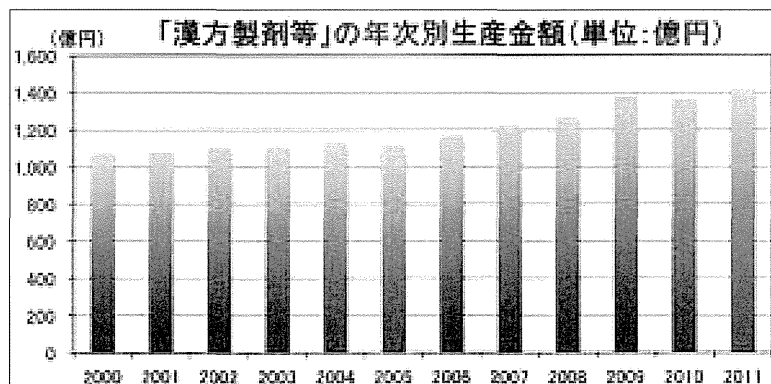


図1 「漢方製剤等」の年次別生産金額（平成23年「薬事工業生産動態統計年報」より）

表1 2008年の使用量上位20生薬の使用量及び生産国（原料生薬使用量等調査報告書-平成20年度の使用量-平成23年7月15日 日本漢方生薬製剤協会生薬委員会より）

順位	生薬名	使用量 ton	生産国			使用量に対する 中国産の割合(%)	備考
			日本	中国	その他の国		
1	カンゾウ	1,267	0	1,267	0	100.0%	
2	シャクヤク	1,164	41	1,123	0	96.5%	
3	ケイト	1,034	0	837	197	80.9%	
4	ブクリョウ	998	0	982	35	98.5%	菌類生薬
5	タイソウ	678	0	676	0	100.0%	
6	ハンゲ	629	0	629	0	100.0%	
7	ニンジン	610	0	609	1	99.8%	
8	トウキ	581	204	378	0	64.9%	
9	マオウ	569	0	569	0	100.0%	
10	コウイ	558	558	0	0	0.0%	水飴(原料:もち米)
11	カッコン	554	0	546	8	98.6%	
12	ソウジュツ	502	0	502	0	100.0%	
13	ヨクイニン	448	1	374	75	83.1%	
14	サイコ	444	23	399	21	90.0%	
15	ダイオウ	440	95	344	0	78.3%	
16	ビャクジュツ	427	0	420	8	98.2%	
17	センナ	426	0	0	426	0.0%	漢方製剤には不使用
18	ジオウ	398	3	395	0	99.3%	
19	オウゴン	384	0	384	0	100.0%	
20	セッコウ	380	0	380	0	100.0%	植物生薬

品は *Glycyrrhiza uralensis* Fischer 又は *Glycyrrhiza glabra* Linné (*Leguminosae*) の根及びストロンで、ときには周皮を除いたもの（皮去りカンゾウ）である。本品は定量するとき、換算した生薬の乾燥物に対し、グリチルリチン酸 (C₄₂H₆₂O₁₆: 822.93) 2.5%以上を含む」と規定されている。前記2種の植物のうち、日本で漢方・生薬製剤等の原料として使用されているのは *Glycyrrhiza uralensis* Fischer (ウラルカンゾウ) より製造された「甘草」である。

「甘草」は、漢方薬としての使用頻度及び使用量が最も多く、医療用漢方製剤148処方中109処方(73.6%)に、また、一般用漢方製剤294処方中213処方(72.4%)に配合されている^{2, 3)} (図2)。その主成分であるグリチルリチン酸 (図3) は、抗炎症、肝臓保護、抗アレルギー作用等の薬理活性を有し、また、砂糖の200倍とされる強い甘み⁴⁾ を有することから、医薬品、化粧品、甘味料として広く利用されている⁴⁾。

「甘草」の供給のほとんどは中国からの輸入品(主に野生植物より製造)である(表1、図2)⁵⁾。近年、「甘草」資源の枯渇化が顕在化しているため、中国では資源保護のための政策(採取制限、輸出規制等)が強化されている⁵⁾。さらに、中国や欧

表2 植物工場における薬用植物の栽培・生産の利点

- ・ 自然環境(気温、日照量、降水量、湿度、土質等)の影響を受けずに安定的な生産が可能
- ・ 植物種が明確で品質が安定した薬用植物の供給が可能
- ・ 農業、土壌汚染や人為的環境攪乱を回避できる
- ・ 連作障害がなく、計画栽培・多角栽培が可能
- ・ 人手がかからない(耕うん、土壌改良、除草等が不要で収穫が容易)
- ・ 短期間で収穫可能
- ・ 野外・水耕栽培に適した優良苗の選抜・育成が短期間で可能
- ・ 野外・水耕栽培用の優良クローン苗の効率的増殖が短期間で可能

米でも「甘草」の需要は増加し、また、最近の中国の著しい経済成長に伴う物価・人件費上昇も相まって供給価格が高騰し、「甘草」資源の持続的確保が困難になっている。「甘草」は、第二のレアアースとも呼ばれるようになっている。

「甘草」の安定確保あるいは国内商業生産を目指し、これまでに多くの圃場栽培研究が行われてきた⁵⁻¹⁰⁾。最近ではいくつかの成功例が報告されているが、多くの報告例において「甘草」の栽培品は概して野生品よりもグリチルリチン酸含量が低く、日本薬局方の規定値2.5%以上¹⁾を満たすためには、少なくとも3年以上の栽培期間が必要とされている^{5, 8)}。野外栽培は、異常気象や2011年の東日本大地震のような自然災害及び原発事故のような人為的な環境かく乱等の影響を受けやすい。

我々は、2001年頃からウラルカンゾウの組織培養物の誘導と効率的増殖に関する研究を開始し、2006年頃より植物工場での「甘草」生産に関する研究を開始した。2008年下半期からは、医薬基盤研究所、鹿島建設、千葉大学の三者の共同研究「甘草の人工水耕栽培システムの開発」を実施した（但し、2009年は豊田通商を加えた四者）（図4）。本研究は、産官学の高次元での連携の好例として第9回産学官連携功労者表彰（2011年9月22日）において、厚生労働大臣賞を受賞した。

3. 植物工場におけるウラルカンゾウの水耕栽培

一般に、水耕法で栽培した植物の根は分枝根が多く根部が肥大しないことから、肥大した根を生薬として使用する薬用植物の生産において、水耕栽培の実用化は困難であるとされてきた。我々は、1990年頃より、循環型湛液水耕法による薬用植物の生産に関する研究を実施し、地上部を使用部位とするケシ、キダチコミカンソウ、ジギタリス、ハッカ、クソニンジン等の薬用植物については、生育期間の短縮、薬用成分含量と収量において良好な結果が得られた。しかし、地下部を使用部位とする生薬の生産には不向きであった。

そこで、植物工場内でのウラルカンゾウの水耕栽培のための水耕栽培装置（根が水耕液中に浸されず、植物体の根部は hidroボール、パミスサンド等の支持体中で生育し、下方から毛細管現象により肥料養液が供給される）¹¹⁾ を考案し、閉鎖温室内（温度20-25℃、相対湿度50-60%、明期

「甘草」の主な用途
グリチルリチン酸
肝炎治療薬・抗アレルギー薬・甘味料
抽出物（グリチルリチン酸以外）
食品添加物や化粧品等

甘草の結湯は食品、化粧品業界等にも影響大！

甘草の国内での確保・供給システム
実用化が喫緊の国家的課題

- > 中国のカンゾウの採取規制強化
- > 日本の多くの産地では、日本薬局方規格（2.5% グリチルリチン酸）を満たすには3年以上

図2 「甘草」を取り巻く状況

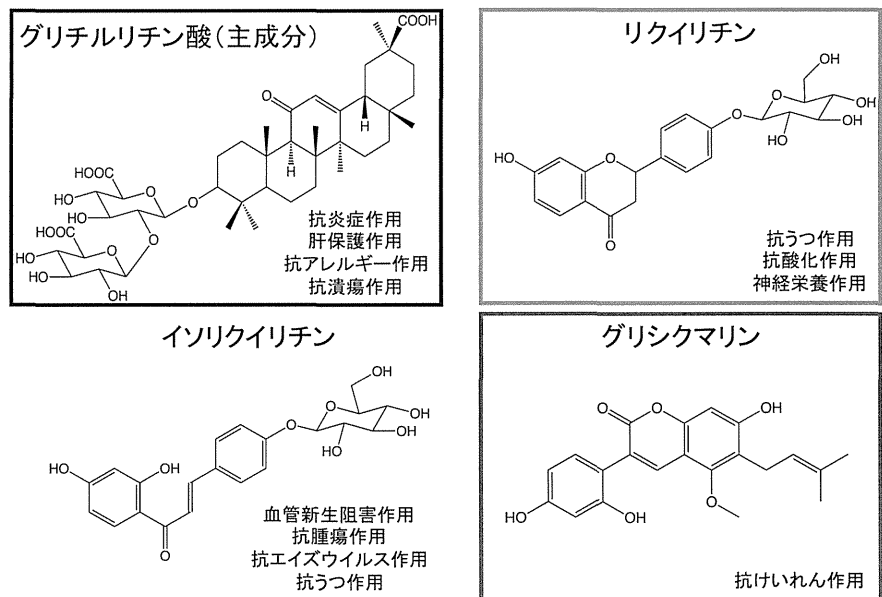


図3 ウラルカンゾウに含有される代表的な薬用成分とその作用

14-16時間/日)でウラルカンゾウ培養苗の水耕栽培を行った。植物材料は、ウラルカンゾウ組織培養体2系統のうち、閉鎖温室内での土耕栽培（鉢栽培）で、根の収量及びグリチルリチン酸含量がより高かった系統を選択し、さらに、本系統の培養シュートより、植物組織培養での増殖効率の高いサブクローンを得、水耕栽培装置へ植付けた。閉鎖温室内の土耕栽培（鉢栽培）では、根のグリチルリチン酸含量が2.5%以上になるまでに1000日以上を要した。一方、水耕栽培で得た根（Gu2-3-2）のグリチルリチン酸含量は、400日後



図4 「甘草人工水耕栽培システムの開発」(2008-2011)

に2.95%、740日後に5.22%となり、同生育環境の土耕栽培に比べてグリチルリチン酸の生産効率が高く、同水耕「甘草」は、日本薬局方の他の規格：確認試験(TLC法)、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量(希エタノールエキス)においても規定値を満たした(図5)。

ウラルカンゾウの野外での筒栽培で生産された、グリチルリチン酸含量2.5%以上を満たす「甘草(2年生根)」は、フラボノイドであるリクイリチン含量が、市場品に比べて低いと報告されている⁹⁾。リクイリチン(図3)は、「甘草」の主要成分の一つで、抗うつ、抗酸化や神経栄養作用(アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の神経変性の疾患の治療に効果的とされている)が報告されている¹²⁾。我々が約2年間(740日)の水耕栽培で得た甘草(根)は1.0%以上のリクイリチンを含有していたことから、植物工場での水耕栽培は甘草が含有するフラボノイド類の生産方法としても優れていることが判明した。

4. 植物工場での水耕栽培に適したウラルカンゾウ優良株の選抜と育成

栽培環境に適した薬用植物優良系統の選抜は、

生薬生産効率をより高めるために重要な要素の一つであり、種々(導入元や形質が異なる)系統の種子は選抜材料として好適である。筑波研究部圃場栽培のウラルカンゾウは開花・結実が困難なため、北海道研究部で採取した3系統のウラルカンゾウ種子を材料に水耕栽培に適した優良系統の選抜及び優良株の選抜を行った。

ウラルカンゾウの原産地は中国北部、モンゴルである。1993年の生物多様性条約(CBD)発行以降、各国で「遺伝子資源へのアクセスと利益配分(ABS)」のルールづくりが行われ、資源保有国が自国の天然資源に対する主権的権利を主張するようになっている。そこで、供試種子は1993年以前から国内に保有されていたことが確認できた植物の種子を用いた。

まず系統間の形質の差の確認のため、3系統それぞれの種子より育成した植物体を、前述の水耕栽培装置に植付けて閉鎖温室内で半年及び1年間水耕栽培して根の収量と二次代謝物含量を調査し、いずれの形質も最高値を示した1系統を選抜した。

次に、グロースチャンバー室内(温度25℃、相対湿度60%、明期18時間/日)で前述の選抜系統の種子より育成した植物体(20個体)を水耕栽培

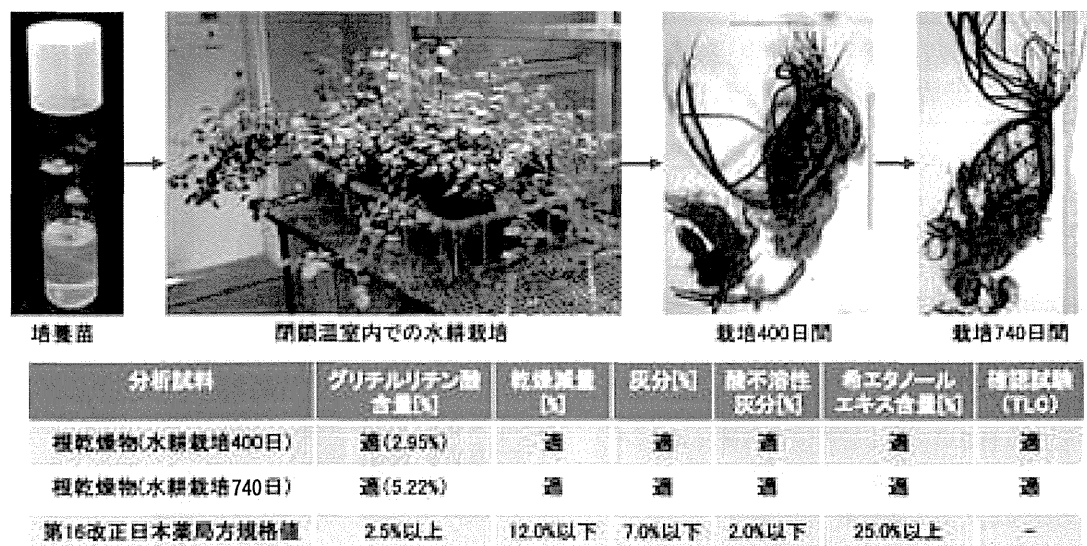


図5 ウラルカンゾウ選抜サブクローン (Gu2-3-2) の水耕栽培

して根の収量と二次代謝物含量を調査し、グリチルリチン酸含量が高く根の収量が良好な優良株2クローンを選抜した。本株は、植物組織培養での増殖効率が低いものの、水耕栽培で得たストロンを挿し穂とする挿木増殖が可能であり、本優良株の苗 (GuTS71-08IV2) を同様に200日間水耕栽培した結果、二次代謝物高生産性が維持されていることを確認した (根中の含量：グリチルリチン酸2.5%、リクイリチン0.7%、グリシクマリニン0.3%)。これらの優良株及び増殖法については特許を出願した¹³⁾。

5. 植物工場におけるセリバオウレンの水耕栽培

生薬「黄連」は、日本薬局方¹⁾において、「オウレン *Coptis japonica* Makino, *Coptis chinensis* Franchet, *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 又は *Coptis teeta* Wallich (*Ranunculaceae*) の根をほとんど除いた根茎である」と規定されている。

黄連は、苦味健胃、整腸、止瀉等の作用を有し、胃炎、二日酔い、高血圧、神経症等に用いられる黄連解毒湯のほか、漢方処方約1割に配合される重要生薬の一つである²⁾。また、その主成分であるベルベリンは、抗菌、抗炎症作用に加えて、血中LDLコレステロール濃度や血糖値を低下させる作用^{14, 15)} などメタボリックシンドロームに対する効果からも注目されている。

日本産黄連の品質は高く、かつては海外にも輸

出されていた。しかし、日本薬局方の規格を満たす生薬の生産には、畑栽培で5年、林床栽培では15年以上の長い栽培期間を必要とし、農家の高齢化に加え、薬価の低下や安価な中国産黄連に押されて国内栽培は衰退し、2008年には静岡県、富山県、福井県等で350kgが生産されるのみで、その使用量の9割以上を海外からの輸入に依存している^{16, 17)}。

そこで、高品質かつ安心・安全な黄連の効率的な生産技術の確立を目指し、セリバオウレン (*C. japonica* Makino var. *dissecta* Nakai) の植物工場での水耕栽培を試みた。

組織培養により継代・増殖したセリバオウレンの培養苗を材料に、20℃、相対湿度60%、14時間明期 (約100 μmol/m²s) の条件で、支持体にパミスサンド (大江化学工業、粒度2.4~5.0mm) を使用し、養液に推奨の1/4~3/4濃度のマツザキ1号・2号 (マツザキアグリビジネス、推奨濃度：1号6.0g + 2号4.0g/8 L) を用い、底面灌水方式 (図6)¹¹⁾ にて、半年及び1年間水耕栽培した。

収穫根茎は、葉柄、茎及び根をなるべく除去し、50℃で3~4日間乾燥し、第16改正日本薬局方の黄連の項に準じて、確認試験 (TLC法)、鏡検 (内部形態の確認)、純度試験 (ヒ素)、灰分、酸不溶性灰分、乾燥減量、ベルベリン含量の測定等、各種日本薬局方試験を行い、その適否を判断した (いくつかの試験はスケールダウンで実施)。

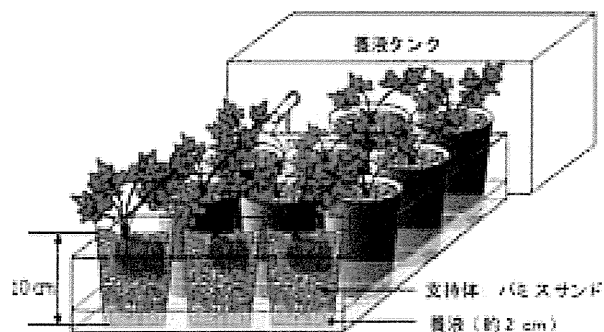


図6 セリバオウレンの水耕栽培概要

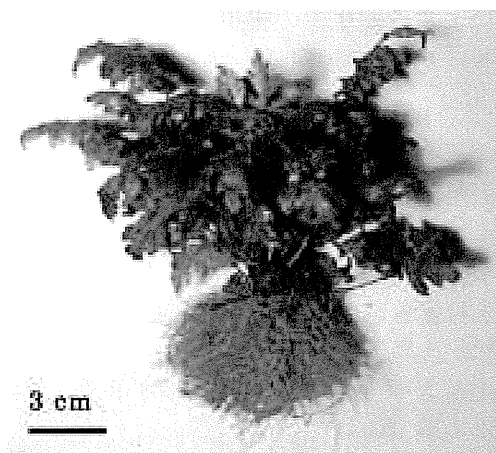
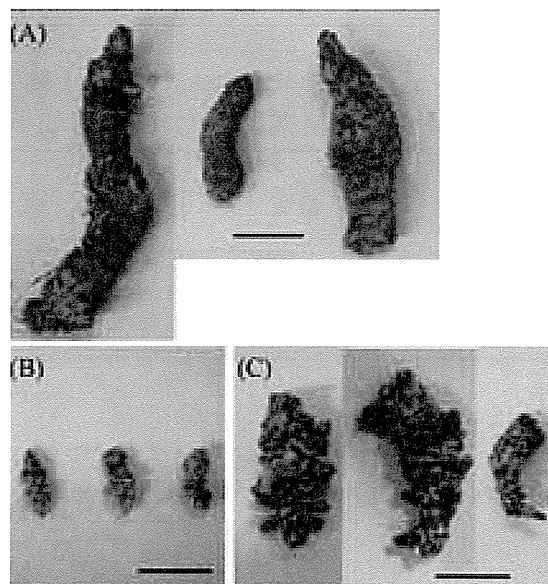


図7 水耕栽培セリバオウレン (約1年間)

水耕栽培の結果、図7に示すような植物体を得られ、水耕栽培品の根茎乾燥物を畑で5年間栽培した日本産黄連市場流通品と比較すると、形状は比較的似ていたが、水耕栽培1年品では分岐が増加する傾向が認められた(図8)。また、確認試験(TLC法)の結果、水耕栽培品は、市場流通品の日本産黄連、中国産黄連と同様にベルベリン標準品とほぼ同じRf値(0.5付近)に黄緑色の蛍光スポットが得られ、日本薬局方規格に適合していた。また、中国産黄連には、日本産黄連には認められないスポットがRf値0.3付近に認められるが、本水耕栽培品は、日本産黄連と同一のTLCパターンを示し、水耕栽培品においてもTLCにより日本産オウレンを基原とすることを確認可能であった(図9)。さらに鏡検(内部形態観察)、及び、純度試験(ヒ素)、灰分、酸不溶性灰分、乾燥減量の測定の結果、いずれの項目も日本薬局方の規格に適合していた(表3)。

第16改正日本薬局方では、黄連のベルベリン含



(A) 畑作5年品、(B) 水耕栽培半年品、(C) 水耕栽培1年品、—:1 cm

図8 畑作及び水耕栽培オウレンの根茎

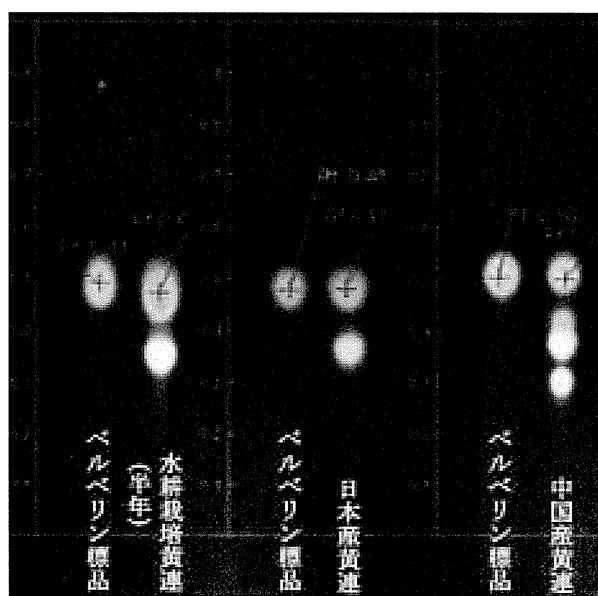


図9 市場流通品黄連及び水耕栽培黄連の確認試験(TLC法)結果

量の規格値として、「換算した生薬の乾燥物に対し、ベルベリン[ベルベリン塩化物($C_{20}H_{18}ClNO_4$:371.81)として]4.2%以上を含む。」と規定されている。HPLC法によりベルベリンを定量した結果、水耕栽培では約半年間とわずかな栽培期間で8%以上の高いベルベリン含量を示し、栽培1年後でも高含量が安定的に維持されていることが明らかとなった。

上記結果をもとに、栽培1年間あたりに換算し

表3 水耕栽培黄連の各種日本薬局方試験結果

	性状 (検鏡)	純度試験 (ヒ素)	灰分 [%]	酸不溶性 灰分 [%]	乾燥減量 [%]	ベルベリン 含量 [%]	確認試験 (TLC)
水耕栽培1年 根茎乾燥物	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合
第16改正日本 薬局方規格値	-	5 ppm 以下	4.0% 以下	1.0% 以下	11.0% 以下	4.2% 以上	-

た栽培面積当たりの根茎収量及びベルベリン収量を算出すると、水耕栽培半年品は根茎収量が13g/m²・年、ベルベリン収量が1.1g/m²・年であった。同じく、水耕栽培1年品は根茎収量が40g/m²・年、ベルベリン収量が3.3g/m²・年であった。すなわち、栽培期間を半年間から2倍の1年間に延長することにより、根茎収量・ベルベリン収量を約3倍に高めることが可能であった。また、これら収量は、畑栽培の1年間当たりの換算収量の一例、根茎収量が10g/m²・年、ベルベリン収量が0.74g/m²・年を上回った。

以上、今後、栽培条件の最適化による更なる収量増加も期待され、植物工場における水耕栽培により、日本薬局方の規格に適合した黄連を短い栽培期間で効率的に生産可能であることが示された。

6. おわりに

以上のように、植物工場での水耕栽培に適した薬用植物優良苗とそれぞれの薬用植物に好適な装置及び栽培環境の組合せにより、生薬あるいは薬用成分の効率的生産が短期間で可能であることが示された。

植物工場で生産された生薬が医薬品として製品化された事例は未だなく、また、生薬・漢方製剤業界内では、野生品を栽培品より良品とみなす傾向が強い。そこで、2012年度から、医薬基盤研究所を中心に、厚生労働科学研究「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」を開始し、複数の企業・大学の協力のもと、「甘草」をはじめとした漢方薬原料生薬の安心・安全な安定供給を目指し、水耕

栽培による生薬生産の実用化を進めるとともに、生産された生薬の安全性・有効性の検証を進めている。

7. 参考文献

- 1) 第十六改正日本薬局方, 厚生労働省 (2011)
- 2) 厚生労働省医薬食品局, 一般用漢方製剤承認基準, 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知, 1-59, (2012)
- 3) 日本医薬品集, 医療薬, 2007年版, じほう, 2651-2733 (2007)
- 4) Hayashi H., et al, Plant Biotechnology, 26, 101-104 (2009)
- 5) Yamamoto Y., et al, J. Trad. Med., 22 (Suppl. 1), 86-97 (2005)
- 6) 尾崎和男ら, 生薬学雑誌, 61 (2), 89-92 (2007)
- 7) 尾崎和男ら, 生薬学雑誌, 64 (2), 76-82 (2010)
- 8) Kojoma M., et al, Biol. Pharm. Bull., 34 (8), 1334-1337 (2011)
- 9) 芝野真喜雄ら, Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 5, 59-68 (2011)
- 10) 戸田則明ら, 生薬学雑誌, 66 (2), 65-70 (2012)
- 11) 吉松嘉代, 特願2009-131442「栽培装置、及び、栽培方法」(2009)
- 12) Chen, Z. et al., Cytotechnology, 60, 125-132 (2009)
- 13) 吉松嘉代ら, 特願2011-245757, 「カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法」(2011)
- 14) Kong W., et al, Nature Medicine, 10, 1344-1351 (2004)
- 15) Zhang H., et al, Metabolism, 59, 285-292 (2010)
- 16) 財団法人日本特産農産物協会, 「薬用植物(生薬)に関する資料」(20年度産)
- 17) 日本漢方生薬製剤協会 生薬委員会「原料生薬使用量等調査報告書-平成20年度の使用量-」1-23 (2011)

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

○吉松嘉代¹、河野徳昭¹、乾貴幸¹、瀧野裕之¹、川原信夫¹、工藤善²、高橋豊³、新穂大介⁴、田村幸吉⁴、大月典子⁵、穂山浩⁵

(¹医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター、²鹿島建設株式会社 技術研究所、³エムエス・ソリューションズ株式会社、⁴丸善製薬株式会社、⁵国立医薬品食品衛生研究所)

【はじめに】

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（図1）。複数生薬より構成される漢方薬は一生薬でも欠けると製造できないため、漢方処方の70%以上に配合されている生薬「甘草」は最も重要であり、また食品添加物原料としても汎用されている。甘草の供給は、ほぼ100%海外に依存し、主生産国の中国における採取や輸出の規制、国内需要の伸び、「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、今後甘草の確保が困難になり、「第2のレアアース」になる恐れが顕在化している。従って甘草をはじめ、生薬を国内で確保・供給できるシステムを実用化することは喫緊の国家的課題である（図2）。

我々は産学官連携の研究成果として、水耕栽培により1～1年半の短期間で安定的に高品質な甘草を生産する手法を世界で初めて開発し、甘草の人工水耕栽培の実用化に向けての基盤を整備した。本成果は産学官連携で研究成果をあげた好例として高い評価を受け、2011年9月22日第9回産学官連携功労者表彰において厚生労働大臣賞を受賞した（図3）。

この研究成果を基盤に、確実に実用化を推進するため、平成24年度より、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）」を開始した（図4）。人工水耕栽培は、圃場栽培や野生植物の利用と比較し優れた点がある（図5）が、実用化に際しては、経済性や汎用性など、クリアすべき課題があり、また、人工水耕栽培により生産した生薬の製品化事例はないため、そのような新技術で生産された生薬に対する潜在的な不安があるのは否めない。

そこで本研究課題では、人工水耕栽培システムによる生薬生産の着実な実用化を推進するため、1)「甘草」等の種苗生産システムの構築、2)ハイテク「甘草」等生産システムの構築、3)生薬「甘草」等の評価（安全性・有

効性)を、また、生薬の国内生産基盤構築と推進モデル実証のため、4) 地域企業との連携によるブランド生薬の開発を、富山県において実施中である。

本シンポジウムでは、「甘草」に関する前述の 1) -3) の成果を報告する。

【材料および方法】

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。

ウラルカンゾウの養液栽培（水耕栽培）：既出のウラルカンゾウ優良株¹⁾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養液栽培した。一定期間栽培後、生育、収量及び根の二次代謝物含量を調査した。

グリチルリチン酸生合成酵素遺伝子（図6）の解析：ウラルカンゾウ葉よりDNAを抽出し、グリチルリチン酸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：養液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2mm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、グリチルリチン酸、リクイリチン、リクイリチゲニン、イソリクイリチン、イソリクイリチゲニン、グリシクマリニン及びグラブリジン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：養液栽培したウラルカンゾウ優良株 GuTS71-08IV1(以下、GuIV1)の根より、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて total RNA を調製し、ダナフォーム社に委託し EST ライブ

ライリーの構築を行った。得られた GuIV1 株の EST ライブラリーについて、グリチルリチン酸生合成酵素遺伝子の相同遺伝子を検索した。また、EST ライブラリー（エクセルデータ）を二次代謝等に関連するキーワードにより検索した。これらの検索結果（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、及び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。

評価試験用甘草：以下の化学的評価、変異原性試験、ヒ素及び重金属の測定は、医薬基盤研究所所有の甘草市場流通品（化学的評価及び変異原性試験は 3 品、ヒ素及び重金属の測定は 4 品）と鹿島建設株式会社の水耕栽培システムで生産した甘草水耕栽培品 3 品 [GuTS71-08IV2(以下、GuIV2)、人工水耕栽培 9 ヶ月、グリチルリチン酸含量が 2.5%以上の根]を使用した。また、日本薬局方（以下日局）試験は、鹿島建設株式会社の水耕栽培システムで生産した甘草水耕栽培品（GuIV1: 3 品及び GuIV2: 8 品、人工水耕栽培 15 ヶ月の根、グリチルリチン酸含量未分析）を使用し、性状及び内部形態の比較対照として医薬基盤研究所所有の甘草市場流通品を使用した。

甘草水耕栽培品の化学的評価：甘草の水耕栽培品 3 品と市場流通品 3 品より熱水抽出エキス及びメタノールエキスを調製後、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS/MS）法より分析し、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。

甘草水耕栽培品の日局試験：日局の記載に基づき、各種試験（性状の確認、グリチルリチン酸定量、確認試験 TLC、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分及びエキス含量の測定）を行った。性状の比較対象として市場流通品を使用した。

甘草市場流通品および水耕栽培品熱水抽出エキスの変異原性試験：甘草市場流通品 3 品および水耕栽培品 3 品より熱水抽出エキスを作製し、復帰突然変異試験（Ames test）を行った。

甘草市場流通品および水耕栽培品に含まれるヒ素および重金属の測定：甘草市場流通品 4 品および水耕栽培品 3 品中に含まれるヒ素、鉛、カドミウム、水銀含量を ICP-MS を用いて定量した。

【結果および考察】

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育成法の開発と優良株の育成

既出のウラルカンゾウ優良株¹⁾のうち、特に養液栽培した根のグリチルリチン酸含量が高い GuIV1 及び GuIV2 について、グリチルリチン酸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グリチルリチン酸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、本配列の存否と養液栽培した根のグリチルリチン酸含量を調べた結果、本配列が含まれる株は高いグリチルリチン酸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を育成した。本新規優良株育成法、新規優良株、後述の挿し木増殖法及び新規水耕栽培装置については特許を出願した²⁾。新規優良株1種（Gu#11）については1年間養液栽培した根のグリチルリチン酸含量が2.5%以上であることを確認した。

人工水耕栽培実用化推進のため、また、生薬の国内生産基盤構築のためには、圃場環境も含めた様々な生育環境に適したシステム開発を可能とする多種多様な栽培種の育成が不可欠である。本成果は、新規ウラルカンゾウ優良株の育成に要する労力の大幅な削減と期間の大幅な短縮が期待できる。

ウラルカンゾウ優良株識別法の開発

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）¹⁾及び新規優良株Gu#11のグリチルリチン酸生合成酵素（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、各遺伝子配列に対する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増殖法の開発

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²⁾。本法は、育成途中の新規ウラルカンゾウ優良株候補の植物体クローンを、簡便かつ大量に増殖できるため、種々優良形質を有する株

の育成にも有効であり、また、植物組織培養のための特別な施設・設備・試薬を必要としないため、安価で経済性・汎用性が高いと考えている。

ウラルカンゾウ EST ライブラリーの作製と解析

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、グリチルリチン酸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となるものである。

2) ハイテク「甘草」等生産システムの構築

既出のウラルカンゾウ優良株 (GuIV1 及び GuIV2)¹⁾ を種々人工栽培環境条件で養液栽培してその形質を調査し、汎用されるセラミックメタルハライドランプ及び白色蛍光管と光特性が異なる白色 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。また、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²⁾ し、本装置は、根の肥大とグリチルリチン酸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。

3) 生薬「甘草」等の評価 (安全性・有効性)

LC-MS/MS による「甘草」の化学的評価

甘草水耕栽培品と市場流通品を、LC-MS/MS 法により分析し、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両甘草の同等性と差異を評価した。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、水耕栽培品に特徴的な成分としてグリチルリチン酸の代謝物（推定元素組成とプロダクトイオンスペクトルからグリチルリチン酸+グルコース+2Hと推測される）と考えられる成分が観測された。ローディングプロットにより各甘草に特徴的であると認識された代表的成分のそれぞれについて、その m/z 値でトレースした抽出イオンクロマトグラム（Extracted Ion Chromatogram; XIC）ピーク強度を調べた結果、市場流通品に特徴的として観測された成分は水耕栽培品にも観測されるが、水耕栽培品に特徴的として観測された成分は、ほとんど市場流通品には観測されなかった。

全成分（約 300）での多変量解析で、水耕栽培品・市場流通品それぞれに特徴的として観測された成分は、存在量の極めて少ないマイナー成分である可能性が考えられたため、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。その結果、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が、それらの成分は、全データ使用時とは異なっていた。全データ使用時と同様に、ローディングプロットにより、各甘草に特徴的であると認識された代表的成分のそれぞれについてXICピーク強度を調べた結果、水耕栽培品でのみ観測されている成分は確認されず、調べた全ての成分（水耕栽培品に特徴的として観測された代表的 3 成分および市場流通品に特徴的として観測された代表的 3 成分）が両方の甘草に検出された。

全成分での多変量解析において、水耕栽培品にのみ観測される成分が存在した原因として、熱水抽出エキス調製時の条件の違い（水耕栽培品は試料量が少ないため、抽出スケールが小さい）が影響している可能性を排除できないため、同条件で両甘草よりメタノール抽出液を作製し、直接 LC-MS/MS により分析し、得られたデータを多変量解析した。その結果、熱水抽出エキスほど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。

以上の結果より、甘草水耕栽培品及び市場流通品の熱水抽出エキス及びメタノールエキスは、多変量解析においては両者の違いを示す成分が観測されたが、両者の TICクロマトグラムパターンはほぼ同一であり、両者の化学的同等性はあると判断している。

甘草水耕栽培品の日局試験

甘草水耕栽培品の日局試験を実施し、適合性を評価するとともに、性状について市場流通甘草（野生品）との比較を行った。

水耕栽培品の性状（外部形態及び内部形態）は、市場流通品とは異なる点