

# 生薬「甘草」の国内生産を目指して:

ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) の栽培品種の育成と  
その化学的品質に関する研究

博士学位論文  
(大阪薬科大学)

2014

尾崎和男

## 目 次

緒論	1
本論	
第 1 章 生薬・甘草についての調査と育種目標設定	4
第 2 章 茎頂培養法を用いたクローン苗の育成	
2.1. 基本培地組成がシュートの成長に及ぼす影響	9
2.2. 窒素形態比がシュートの成長に及ぼす影響	9
2.3. 総窒素量と sucrose 濃度がシュートの成長に及ぼす影響	10
2.4. 幼植物体の育成（順化方法）	11
2.5. 小括	12
第 3 章 選抜を目的とした栽培方法（評価系）の確立	
3.1. 塩化ビニール製のパイプを用いた栽培法（筒栽培法）	15
3.2. 栽培筒の長さが地下部の生育に及ぼす影響	15
3.3. 種苗として供試材料の比較	16
3.4. 主根基部からの部位別による GL 含量の比較	18
3.5. 小括	19
第 4 章 京都薬用植物園で保有している 7 系統の評価	
4.1. 地上部の外部形態形質	22
4.2. 遺伝子多系の分析	23
4.3. 地下部の生育量とその GL 含量の比較	24
4.4. 小括	26
第 5 章 自然交雑で得られた実生個体の評価	
5.1. 地下部の生育量とその GL 含量	27
5.2. 一次選抜した個体の評価	29

5.3. 小括	30
<b>第 6 章 栽培甘草の化学的品質評価法の検討</b>	
6.1. 指標成分の検討	32
6.2. サンプル調製法	33
6.3. HPLC 分析条件	34
6.4. 小括	35
<b>第 7 章 地下部の生育量と成分に関する年次的変化</b>	
7.1. 地下部の生育量の年次的変化	36
7.2. GL 含量の年次的変化	36
7.3. GL 含量の季節的变化	38
7.4. フラボノイド含量の年次的変化	40
7.5. 小括	41
<b>第 8 章 栽培品種の開発とその特性</b>	
8.1. A-19(♀)×G-6(♂)の交雑育種	43
8.2. Strain C-1 および同 C-2 の特性 (外部形態)	46
8.3. 優良個体 (Strain C-2) の生育量と品質評価	47
8.4. 小括	50
まとめ	52
謝辞	55
実験の部	56
論文目録	72
引用文献	74

## 緒 論

2010年10月に名古屋で開催された生物多様性条約第10回締約国会議(COP10)をきっかけに、日本国内で生薬資源の確保について関心が高まった。一方、尖閣諸島問題に関連して、中国がレアアース(希土類)の輸出を中止するという事態が巻き起こり、国内半導体メーカーや自動車メーカーが大きな影響を受けた。これは、日本を代表する電子機器産業で使われるレアアースの9割以上が中国依存であったことに起因していた。今後も日中関係の改善が見込めないとされており、中国一国に資源依存を集中させることは危険であるとの見方が国内で広まった。これと同様の事が、日本の医療で欠くことの出来ない漢方薬にも起こっているのである。すなわち、漢方薬を構成している生薬の80%以上が中国からの輸入に頼っており、自給率は僅か12%に過ぎない<sup>1)</sup>。

最近、日本漢方生薬製剤協会(日漢協)は、平成20年に実施された会員企業74社に対して漢方生薬製剤等に使用される医薬品原料としての生薬の品目数や生薬の総使用量と供給国についてのアンケート調査結果をホームページ(<http://www.nikkankyo.org/>)にて一般公開した。それらの調査結果からは、全体の使用数量は約2万トンで、海外から入手している数量は約1.8万トン、そのうち中国からは約1.7万トン、日本は約0.2万トンであり、パーセンテージにすると中国83%、日本12%、その他の国5%であると報告している。さらに、これらのデータをもとに、中国産のみが使用されている生薬の上位10位を資料-1にまとめた。これら全ての生薬は、漢方薬に繁用されるものである。

資料-1 中国産のみが使用されている生薬10位

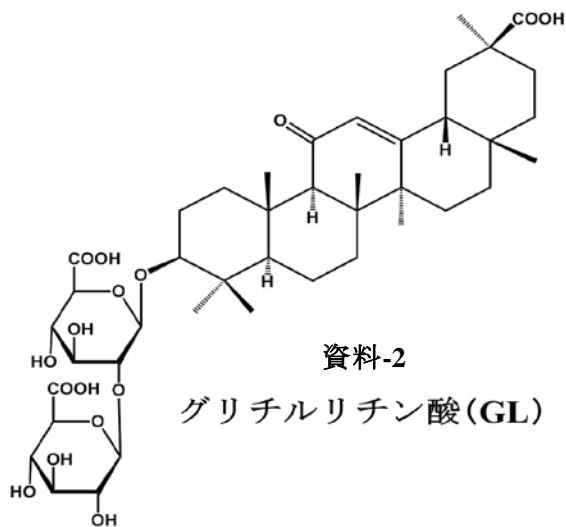
	生薬名	使用量 (kg)
1	カンゾウ	1,267,395
2	タイソウ	675,997
3	ハンゲ	629,063
4	マオウ	568,686
5	ソウジュツ	501,647
6	セッコク	380,348
7	タクシャ	358,951
8	カッセキ	297,806
9	カンキョウ	215,833
10	バクモンドウ	211,785

従って、生薬の国内生産の推進ならびに安定供給の重要性が再認識され、この分野の研究推進が重要な課題となっている。また、現在、厚生労働省医政局経済課、農林水産省生産局農産部地域作物課および日漢協が中心となり、国内における薬用植物

栽培振興への具体的な出口を示す取り組みが開催されている。

以上のように、漢方薬原料生薬の国内栽培化が急速に進行しつつある。現在、これらの最重要課題の一つが漢方処方(医療用漢方製剤 148 処方、一般用漢方製剤 294 処方)の約 70 %に配合されている重要生薬『甘草』の国内栽培化による安定的確保の推進である。

そこで、著者は、国内での甘草生産を目指し、その基原植物であるウラルカンゾウの栽培化に向けて研究を開始した。育種目標としては『1株当たりの収量(新鮮根重量)が 200g 以上、主成分のグリチルリチン酸含量(以下 GL と略)が 2.5% 以上』の 2 点に搾って検討することにした(第 1 章)。なお、比較実験ならびに育種検定に供する遺伝的に均一なクローン苗を確保するための茎頂培養法を検討した(第 2 章)。次に優良個体を選抜するには、均一な栽培条件において比較検討する必



要があり，主根の成長に着目した新たな栽培方法として塩化ビニール製のパイプを用いた筒栽培を検討した（第 3 章）．また，供試材料としては実生由来，ストロン由来および培養由来があり，同一個体から育成したそれぞれのクローン個体について比較検討した．

このようにして評価系が確立した段階で，保有する 7 系統について比較検討を行った（第 4 章）．しかし，育種目標に達する系統を見出すことができなかったことから，遺伝的に変異幅が拡大すると想定される種子を経由した実生個体について検討して優良な 2 個体を選抜した（第 5 章）．また，栽培甘草の化学的品質評価法の検討を行い，主成分の GL 含量測定に加え，フラボノイド成分の分析法を開発した（第 6 章）．さらに，栽培期間による生育量と成分含量の変化を調査した（第 7 章）．また，試験栽培の結果から機械化に適応した栽培種としては，直立性の外部形態を備えることが望まれた．そこで，選抜 2 個体の交雑を行い，圃場栽培に適応した個体を見出した（第 8 章）．以上のように，本論文では栽培に適応した品種として作出した **Strain C-2** について，育成経過とその化学的品質について詳述する．

## 本 論

### 第 1 章 生薬・甘草についての調査と育種目標設定

『甘草』は洋の東西を問わず古くから重要な医薬品として使用されてきた。日本においても、医療用漢方製剤 148 処方中、109 処方（73.6%）に配合されており、漢方薬の効果発現に大きく関与している重要生薬である。すなわち、品質の安定した甘草の確保が不可欠であり、甘草の品質低下は漢方薬の約 7 割の品質に影響を与えることになる<sup>2-5)</sup>。また、国内で漢方薬に使用される甘草のすべてが、中国からの輸入品である。しかしながら、近年、中国政府は、貴重な甘草資源を確保すると同時に、砂漠化問題などの環境保全の観点から資源保護のための政策（採取制限、輸出規制等）を強化している。そのことが、産出量の減少による価格の高騰や品質の変動につながり、今後、良質な甘草を安価に確保することがますます難しくなると予想される<sup>6-9)</sup>。これらの背景から甘草の国産化に向けた取組みの重要性が増大している<sup>10-14)</sup>。

第 16 改正日本薬局方において、『甘草』の基原は *Glycyrrhiza uralensis* Fischer（ウラルカンゾウ）および *G. glabra* Linn.（スペインカンゾウ）の根およびストロンと規定されている<sup>15)</sup>。また、含量規定としては、主成分であるグリチルリチン酸（GL）が 2.5%以上含むとされている。しかし、漢方薬に使用される甘草は、主にウラルカンゾウを基原としたものであり、それぞれの基原植物に対する用途を資料-3 にまとめた。すなわち、スペインカンゾウは、主に GL 抽出原料、一般医薬品への配合、医薬部外品などに使用されている<sup>16)</sup>。

### 資料-3 カンゾウ属植物の種類とその用途

#### 漢方処方原料

ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*)

#### グリチルリチン酸抽出原料, 医薬部外品, 食品

スペインカンゾウ (*G. glabra* L. var. *typica*)

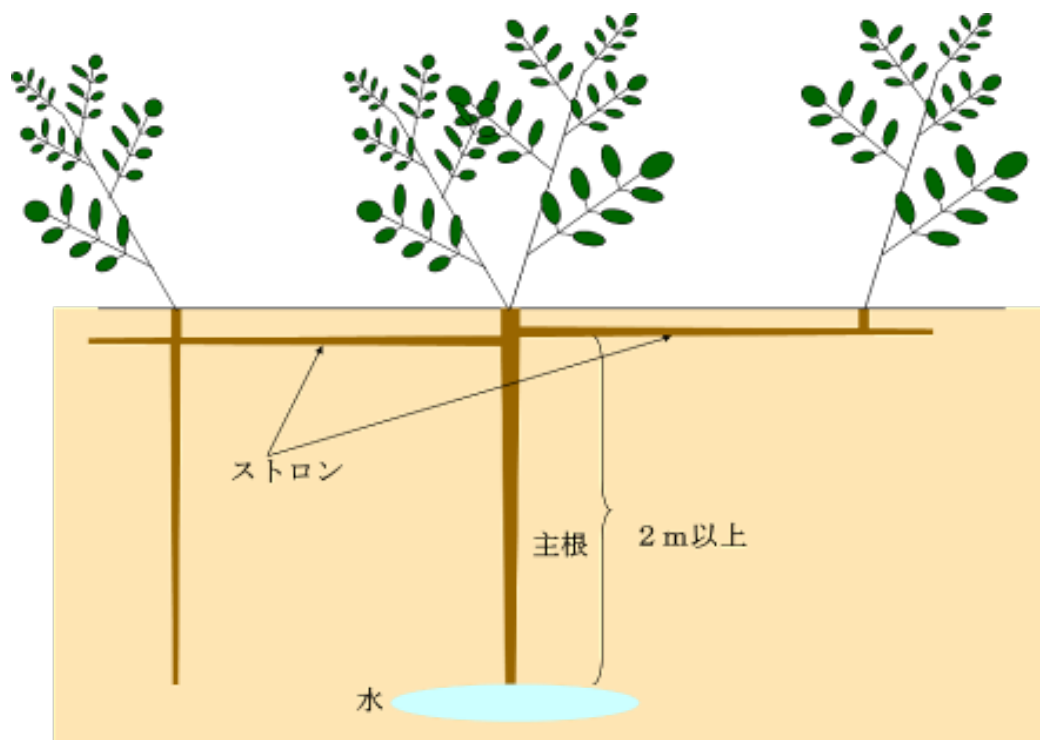
ロシアカンゾウ (*G. glabra* L. var. *glandulifera*)

ウラルカンゾウ (*G. uralensis*)

新疆甘草 (*G. inflata*)

このように、甘草の使用範囲は非常に広く、国内の総使用量は生薬に換算すると年間 50,000～60,000t と言われている。これらのほぼ 100%が野生植物の採取によるものである。すなわち、半砂漠

地域に生育するウラルカンゾウやスペインカンゾウを大量に採取することが、砂漠化を進め、その環境破壊が世界の大きな問題となっている。資料-4 には、ウラルカンゾウの自生の様子を示したが、ストロンが四方八方に伸び、主根は地下深くの地下水にまで伸びている。この地下部 1 kg を採取するのに約 10 m<sup>2</sup> の土地を砂漠化するとされている。



資料-4 乾燥した砂地の草原に自生するウラルカンゾウの模式図



わが国での甘草栽培の研究は、これまでにスペインカンゾウを中心に多くの薬学研究者が中心となり行ってきたが、GL 含量の日本薬局方の規定値 2.5%以上をクリアできないという共通の問題点があった。これは、中国国内での栽培研究でも同様であったが、最近、わが国の研究グループが中国での自生地において栽培年数 2 年で、GL 含量 2.5 %を確保できたことを報告している。その単位面積当たりの収量は、10 アールあたりに換算すると約 100kg であった<sup>17-19)</sup>。

そこで、著者は、採算性（コスト）を考慮した生産栽培において、いかに太い根を形成させ、単位面積あたりの収量を増し、GL 含量を高め、収穫までの期間を短縮するかという課題を検討した。さらに、自生地とは異なる環境条件で栽培する場合、耕土の深さ、土質、気象条件、地下水位などを考慮して栽培法を検討する必要がある。

以下に示した検討課題 1～10 を挙げ、育種目標の設定を行った。

## 検討課題

1. 育種目標を設定
2. 選抜に対応した栽培法を確立（評価系）
3. 比較試験に供試する種苗を確保
4. 保有系統を評価
5. 育種素材の拡大を図り再評価
6. 化学的品質の評価法の検討
7. 選抜個体の年次的変動を検討
8. 機械化の推進
9. 対応した個体（系統）の育成
10. 農薬の使用

## 育種目標の設定

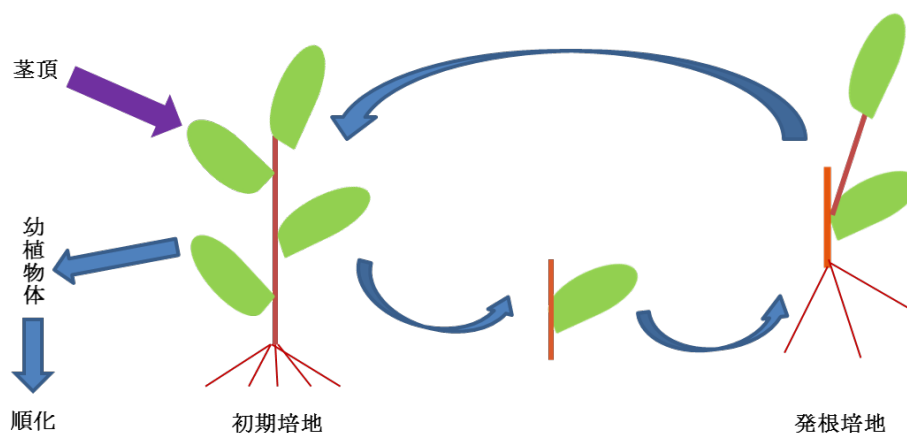
地下部（根）の新鮮重は、200g／株を目標値とした。この数値は生産栽培を想定した場合、例えば10アールあたり10,000株（畦幅50cm，株間20cm）を植付けた時、40%の乾燥歩留りで80g／株となり、800kg／10aの収穫量が見込まれる。一方、GL含量は、医薬品として使用される日本薬局方の規定値2.5%以上とした。

この目標値の達成は、甘草の国産化を可能にするものであると考えた。すなわち、本研究は、100%輸入に頼っていたわが国の生薬に対する安定的な供給の事例として、また、多くの患者に対しては安心・安全を提供するものである。さらには、世界的な大問題になっている砂漠化の是正（環境保全）に繋がるものと確信している。

## 第2章 茎頂培養法を用いたクローン苗の育成<sup>20)</sup>

栄養繁殖性の植物の増殖については、組織の一部を取出して培養する方法（茎頂培養法）がきわめて一般的な技術として普及しており、中でもラン類、イチゴ、カーネーション、ジャガイモなどではウイルスフリー優良苗の大量生産が恒常的なものとなっている。ウラルカンゾウの繁殖は、わが国ではほとんど結実が見られないことから、薬用部位となる根茎部（ストロン）を用いることが一般的であった。

カンゾウ属植物の増殖に際しては資料-5の通り、生長点（茎頂部）を一旦無菌状態に持ち込み幼植物体を培養できれば、その後の増殖は比較的容易になる<sup>21)</sup>。また、茎頂培養で得られた植物は遺伝的に均一であり、生育ステージを統一できる点から各種の実験材料に適している。しかし、植物の成長に好適な培地組成は、それぞれの植物種によって異なるものと考えられた。特に窒素分の形態と添加量、sucroseの濃度などは茎頂の成長に大きく影響する。そこで、ウラルカンゾウの腋芽を30日間培養して、基本培地、窒素形態比および窒素量とsucrose濃度の影響について検討した。



資料-5 茎頂培養による個体増殖の模式図

## 2.1. 基本培地組成がシュートの成長に及ぼす影響

基本培地に関しては，植物組織培養で一般的によく用いられる Murashige & Skoog(MS) ， Linsmaier & Skoog(LS) ， Gamborg(B5) および Nagata & Takebe(NT)基本培地について比較検討した<sup>22-24)</sup>。その結果，調査項目の草丈，根数，根長などについて，培地間に有意な差は見られなかったものの，概して LS 培地と NT 培地で高い値を示した(Table 1)。

**Table 1 Effects of the Basal Culture Media on Shoot Growth and Rooting**

Culture media	Shoot length(cm)	No. of nodes per explant	No. of roots per explant	Root length(cm)
MS	6.0 ± 1.8	6.1 ± 1.1	3.1 ± 1.1	3.9 ± 1.7
LS	6.6 ± 1.4	6.4 ± 0.5	2.6 ± 1.2	7.5 ± 4.8
B5	5.6 ± 2.0	5.7 ± 1.3	2.4 ± 1.1	5.1 ± 1.9
NT	6.6 ± 2.1	6.5 ± 1.1	2.5 ± 1.2	5.6 ± 2.5

15 explants were cultured on each medium containing 0.1mg/l IBA, 3% sucrose and 0.3% gellan gum for 30 days. (Mean ± S.D.)

## 2.2. 窒素形態比がシュートの成長に及ぼす影響

窒素形態比については，総窒素量を MS 培地と同じく 60mM として，硝酸態窒素 ( $\text{KNO}_3$ ) とアンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) をモル比で組合せた 9 試験区で比較した。その結果，アンモニア態窒素の比率が高くなるにしたがって生育は著しく阻害され，1 : 5( $\text{NO}_3 : \text{NH}_4$ )以上の試験区では全く成長せず，置床した腋芽はすべて褐変化した(Table 2)。硝酸態窒素の比率が同等以上の試験区では健全な成長が認められ，草丈および根長は MS 培地の窒素形態比( $\text{NO}_3 : \text{NH}_4$ )である 2 : 1 区で高い値を示したのに対し，根数では硝酸態窒素のみを添加した 1 : 0 区で高い値となった。

**Table 2 Effects of the Ratio of NO<sub>3</sub> : NH<sub>4</sub> on Shoot Growth and Rooting**

Ratio of NO <sub>3</sub> : NH <sub>4</sub>		Shoot length(cm)	No. of nodes per explant	No. of roots per explant	Root length(cm)
NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>				
1	0	5.4 ± 1.0	9.1 ± 0.7	4.3 ± 1.1	3.9 ± 1.6
11	1	5.5 ± 1.4	9.0 ± 1.3	4.3 ± 2.5	4.2 ± 2.6
5	1	4.6 ± 2.1	8.1 ± 2.7	2.7 ± 1.9	4.2 ± 2.9
3	1	4.8 ± 1.9	7.8 ± 1.8	2.8 ± 2.0	4.7 ± 3.4
2	1	5.9 ± 1.5	8.4 ± 1.0	3.0 ± 2.3	6.8 ± 3.8
1	1	5.8 ± 1.8	7.3 ± 1.4	3.2 ± 1.9	4.9 ± 3.8
1	2	2.8 ± 3.0	4.7 ± 2.5	2.0 ± 2.1	3.0 ± 5.6
1	5	0.0	0.0	0.0	0.0
0	1	0.0	0.0	0.0	0.0

12 explants were cultured on each medium containing 0.1mg / l IBA, 3% sucrose and 0.3% gellan gum for 30 days. (Mean ± S.D.)

### 2.3. 総窒素量と sucrose 濃度がシュートの成長に及ぼす影響

総窒素量と sucrose 濃度については、MS 培地の窒素量 60mM と sucrose 濃度 3%をそれぞれ基準に組合せた 12 試験区で比較した。その結果、置床した腋芽の生育は、炭素源である sucrose の添加量によって大きく影響された。すなわち、草丈および根数は sucrose を 1%添加した試験区でいずれも高い値を示し、その量が増加するにしたがって低下する傾向を示した (Table 3)。また窒素無添加区ではほとんど成長が見られず、いずれも 1.5cm 以下の草丈であった。一方、窒素を添加した試験区では、いずれも生育に大差なく、ほぼ同等の値を示した。なお、sucrose 濃度が 3%の試験区では、1%区に比して葉の色が濃緑色で、やや茎が太くなる傾向が観察された。

**Table 3 Effects of Amount of Total Nitrogen and Sucrose on Shoot Growth and Rooting**

Total nitrogen (mM)	Sucrose (%)	Shoot length(cm)	No. of nodes per explant	No. of roots per explant	Root length(cm)
0	1	1.3 ± 0.9	3.1 ± 1.7	2.8 ± 1.8	1.6 ± 1.0
30	1	7.5 ± 1.3	9.9 ± 1.3	3.6 ± 1.3	2.8 ± 1.7
60	1	7.7 ± 2.3	9.7 ± 1.5	3.4 ± 2.6	1.4 ± 0.8
90	1	7.5 ± 1.3	9.7 ± 0.7	3.6 ± 1.5	2.0 ± 1.3
0	3	1.3 ± 0.4	3.3 ± 0.7	1.6 ± 1.3	1.0 ± 1.1
30	3	6.6 ± 3.1	8.5 ± 2.9	2.6 ± 1.7	2.9 ± 2.3
60	3	6.9 ± 1.6	8.9 ± 1.6	2.9 ± 1.5	3.8 ± 2.5
90	3	6.1 ± 0.8	8.0 ± 0.9	2.5 ± 1.3	5.9 ± 4.5
0	6	1.4 ± 0.6	3.7 ± 0.8	2.0 ± 1.3	2.8 ± 2.2
30	6	4.6 ± 3.2	6.4 ± 2.6	1.9 ± 1.4	4.8 ± 4.9
60	6	2.7 ± 0.9	5.1 ± 1.1	1.4 ± 0.8	1.4 ± 1.9
90	6	4.4 ± 2.1	6.9 ± 1.9	1.6 ± 1.0	4.4 ± 5.3

10 explants were cultured on each medium containing 0.1mg / l IBA and 0.3% gellan gum for 30 days. (Mean ± S.D.)

#### 2.4. 幼植物体の育成（順化方法）

培養由来の幼植物体の順化手順としては、継代培養して5～6葉に成長したシュートの各節を切り出して発根培地に置床することで、シュートの伸長とともに不定根の形成が促進され幼植物体を得られる。その後、幼植物体を培養容器から取出して屋外のバーミキュライト等の用土を入れたポットに移植した後、湿度の十分保った状態で順化させる方法が一般的である。しかし、湿度過多の培養容器で育成された幼植物体は、不完全な気孔を形成する本葉とともに、根毛の未発達な不定根を伴っており、順化に際しても、ビニールシート等で被覆し加湿状態にする必要がある。また、幼植物体をポット植えにする時、雑菌の繁殖を防止するために不定根に付着した固形培地を取り除く必要があり、その際に不定根を傷つけることが多く、それらが活着率の低下の原因となっていた。

そこで、順化に際しては、バーミキュライトを満たした培養容器に発根初期の幼植物体を移植し、滅菌水を適量注ぎ入れ、無菌下で外的環境に対応できる根の形成を促した。その後、培養容器内で成長した植物体を屋外に持ち出して 2~3 週間かけて外的環境に慣らした後、排水良好な園芸用土に植付けて苗を育成することで健全な培養由来の植物体を 100%得られることができた（写真 1）。



シュートの育成過程



外的環境への順化



育成した幼植物体

写真-1 茎頂培養を経由して育成された培養苗

## 2.5. 小括

培地の組成が培養組織（シュート）の成長に及ぼす影響を検討するとともに、活着率 100%を目指した培養由来の植物体の順化方法について検討した。

1. シュートの成長に対しては、用いた 4 種の基本培地の間に有意な差は見られなかった。
2. 草丈および根長は、培地の窒素比( $\text{NO}_3 : \text{NH}_4$ )が 2 : 1 区で高い値を示したのに対し、根数では硝酸態窒素( $\text{NO}_3$ )のみを添加した 1 : 0 区で高い値となった。

3. 置床した腋芽の生育は，炭素源である sucrose の添加量によって大きく影響された．
4. 無菌下で外的環境に対応できる根の形成を促す培養順化方法によれば，健全な培養由来の植物体を活着率 100% で得られた．

このように培養由来の植物体を容易に増殖できたことは，遺伝的に均一なクローン苗を育成することであり，有効成分などの比較実験ならびに育種検定への材料を整えることができた．さらに，生産栽培においては，初期段階における基礎種苗の確保が可能となった．



### 第3章 選抜を目的とした栽培法（評価系）の確立

自生地とは異なる環境条件であるわが国で本種を栽培する場合、耕土の深さ、土質、気象条件、地下水位などを考慮して栽培法を検討する必要があった。2000年6月に数系統で開花結実が見られ、育成した実生苗の主根が大きく発達することが観察された（写真2）。また、本種の自生地の状況を検討したところ、砂壤土で乾燥には比較的強いことが推察された。

次に、GL高含量を含む優良個体を選抜するためには、均一な栽培条件において比較検討する必要があった。そこで、主根の成長に着目した新たな栽培方法として塩化ビニール製のパイプを用いた筒栽培を考案した。また、種苗に関しては、実生由来、培養由来およびストロン由来のそれぞれの苗を用いて、地下部の生育量とそのGL含量について比較検討した。

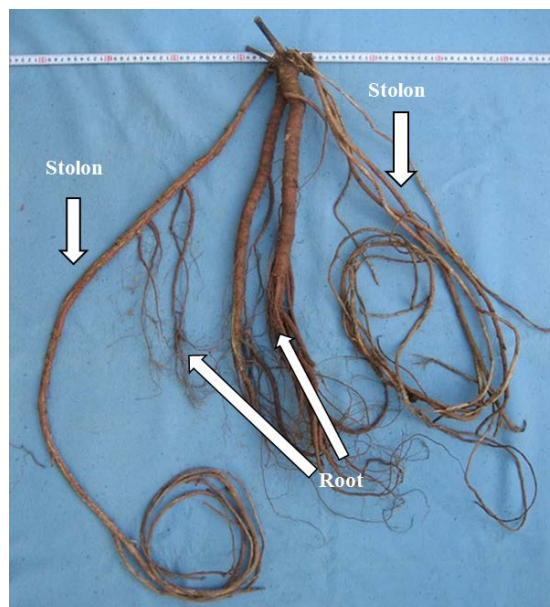


写真-2 ウラルカンゾウの地下部

### 3.1. 塩化ビニール製のパイプを用いた栽培法（筒栽培法）

予備検討として 50 および 100cm の筒にタケダ 86-419 系統のストロンを植え付けて栽培を試みたところ、ストロンから発生した主根は、100cm 筒においても約 3 ヶ月の期間で筒の下部まで達して順調に生育していた。また、筒の底部にある排水用の穴からは主根の先端部（調査対象外）が露出しており、それは設置面の湿潤な圃場中で分枝して多くの細根を有しているのが観察された。このことから真夏の乾燥時においても枯れることなく、限られた容積の筒で生育できた要因と推察された。この状態は自生地の環境を人工的に再現させたものと考えられた（写真 3, 4）。

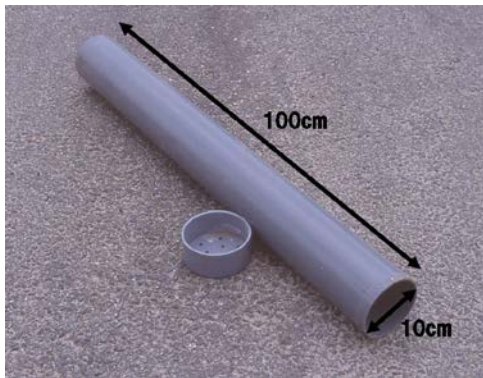


写真-3 栽培に用いた塩化ビニール製のパイプ



写真-4 栽培筒で生育するウラルカンゾウ

### 3.2. 栽培筒の長さが地下部の生育に及ぼす影響

筒の長さを 50, 75 および 100cm に設定して地下部の生育量を比較検討したところ、主根は直根として発達し、その長さは筒長に比例し、それぞれ 42.8, 67.4 および 80.2 cm を計測した（写真 - 5, Table 4）。

主根基部ならびに基部から 50 cm 下の根の直径（根径）は、50 cm 区 > 100 cm 区 > 75cm 区の傾向が見られ、50 cm 区の主根基部が 2.9 cm で、その 50 cm 下が 1.5 cm の値を示したものの、75 cm 区との差は約 3 mm であった。なお、いずれの試験区においても基部から 50 cm 下の根径は、

主根基部の約半分の数値を示し細くなる形状であった。主根から分枝した根（側根）の数量は、50 cm 区で 1.3 本が発生しているのに対し、75 cm 区では 0.4 本と少ないものであった。

一方、新鮮重量は主根の長さに比例せず、100 cm 区が 222.5g で最高値を示したものの、次に 50 cm 区の 201.4g で、75 cm 区が 150.2g の最低値であった。GL 含量は、いずれも 0.5–0.6 % の値を示した。



写真-5 異なる長さの栽培筒で生長した主根

Table 4 Compared of Growth of the Taproot Grown in Difference Tube's Length

Strain	Source material	Tube's length (cm)	Diameter (cm)		Length of taproots (cm)	Number of lateral root	Weight (g)		Glycyrrhizin contents (%)
			Rs	R50			Fresh	Dry	
86-419	SP	50	2.9 ± 0.4	1.5 ± 0.3 *	42.8 ± 1.1	1.3 ± 0.8	201.4 ± 74.2	100.6 ± 34.0	0.6 ± 0.1
		75	2.6 ± 5.3	1.3 ± 0.5	67.4 ± 5.4	0.4 ± 0.5	150.2 ± 50.5	74.8 ± 26.2	0.5 ± 0.2
		100	2.7 ± 0.2	1.4 ± 0.3	80.2 ± 2.6	0.8 ± 1.2	222.5 ± 73.3	114.1 ± 41.3	0.5 ± 0.3

SP: seedling plant Rs: basal root, R50: 50cm point from the base of the root

Each value represents the mean ± standard error (n=5) \* 40cm point from the base of the root

### 3.3. 種苗としての供試材料の比較

タケダ 97-211 および同 86-419 の両系統を用いて、地下部の形状とし

て主根の根径を比較した。両系統ともに主根基部の根径は実生由来区>培養由来区>ストロン由来区であったが、50cm 下の根径はその逆の傾向を示した。実生由来区における根の形状は、両系統とも筒長に関する実験と同様に主根基部と基部から 50cm 下の差が大きく先細りの形状であったのに対し、ストロン由来区ではその差が小さく緩やかに細くなるものであった (Table 5)。

**Table 5 Compared of Growth of the Taproot Grown from SP, CP, and RP**

Strains	Source material	n	Diameter (cm)		Length of taproots (cm)	Number of lateral root	Weight (g)		Glycyrrhizin contents (%)
			Rs	R50			Fresh	Dry	
97-211	SP	5	1.3 ± 0.2	0.7 ± 0.2	63.6 ± 4.7	0.6 ± 0.8	42.6 ± 14.1	22.4 ± 7.5	1.7 ± 0.4
	CP	6	1.2 ± 0.2	0.6 ± 0.3	72.0 ± 11.7	1.7 ± 0.5	46.9 ± 24.9	26.3 ± 13.3	2.9 ± 0.3
	RP	9	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	53.1 ± 8.6	1.0 ± 1.3	56.9 ± 37.1	31.2 ± 20.4	2.9 ± 0.3
86-419	SP	5	2.6 ± 0.5	1.3 ± 0.5	67.4 ± 5.4	0.4 ± 0.5	150.2 ± 50.5	74.8 ± 26.2	0.5 ± 0.3
	CP	2	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.3	69.0 ± 9.0	1.0 ± 0.0	215.0 ± 27.0	105.3 ± 9.5	2.0 ± 0.5
	RP	2	2.1 ± 0.4	2.0 ± 0.4	59.5 ± 1.5	1.0 ± 1.0	231.0 ± 103.0	111.8 ± 47.6	2.2 ± 0.4

SP: seedling plant, CP: cultured plant, RP: plant from stolon Rs: basal root, R50: 50cm point from the base of the root  
Each value represents the mean ± standard error

主根からの分枝根の数は、両系統ともに実生由来区では平均 0.4–0.6 本を計測し、それらは主根の中間部から発生していたのに対し、ストロン由来区および培養由来区では平均 1.0–1.7 本で実生由来区に比して多く、それらは主根の基部および中間部から発生していた。新鮮重量は両系統ともにストロン由来区>培養由来区>実生由来区の傾向を示し、タケダ 86-419 のストロン由来区が 231.0g で最高値であった。

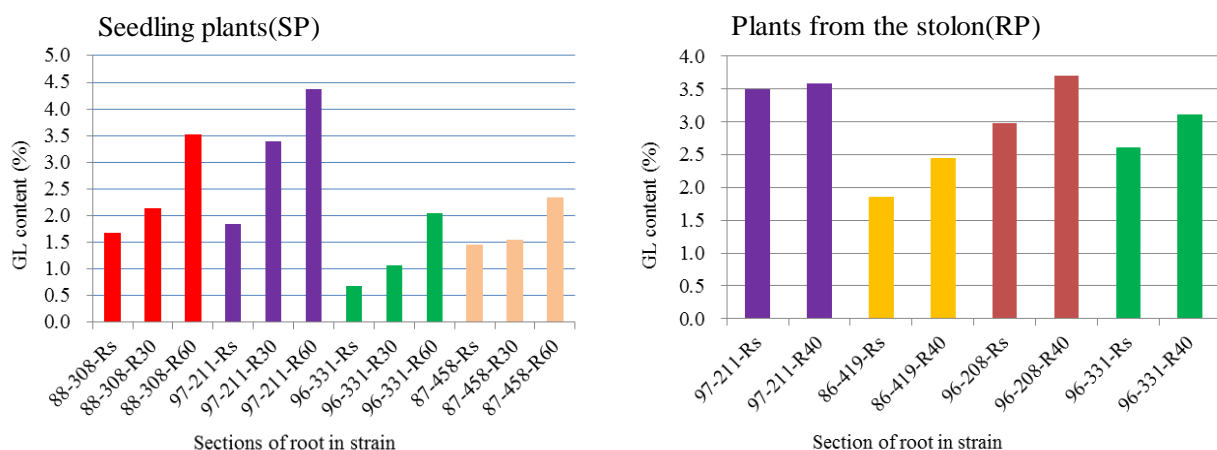
GL 含量は、ストロン由来 ≥ 培養由来 > 実生由来の傾向を示しており、特にタケダ 86-419 において顕著であった。なお、タケダ 97-211 のストロン由来区および培養由来区で GL 含量 2.9% の最高値を示した。

### 3.4. 主根基部からの部位別による GL 含量の比較

部位別の GL 含量の比較実験は，京都薬用植物園が保有する 6 系統の実生由来ならびにストロン由来を材料として比較検討した．サンプリング部位は実生由来の場合，主根基部を含めた 3 点（基部 0cm，30cm および 60cm）を，ストロン由来は主根基部を含めた 2 点（基部 0cm および 40cm）で実施した．

主根の形状について，実生由来の場合は前述と同様に主根基部から先端に向かって先細りの形状であったのに対し，ストロン由来区ではその差が小さく緩やかに細くなるものであった．

GL 含量は系統によって含量に差は見られたものの，主根基部からの位置（基部からの長さ）によって異なり，供試したすべての系統において基部から先端に向って高くなる傾向が見られ，それらは実生由来において顕著なものであった（Fig. 1）．



**Fig. 1. Differences in the GL Contents in Sections of the Root from SPs or RPs. □**

Rs: basal root, R30, R40, R60 : 30, 40, 60cm point from the basal root

### 3.5. 小括

選抜を目的とした栽培方法として塩化ビニール製のパイプを用いた「筒栽培」を検討するとともに、種苗としての供試材料の比較検討を行った。

#### 筒栽培方法の検討

1. 筒栽培法は植付けた種苗から発生した主根が極性に従って伸長する特性を利用したものであり、既知の地下に埋設するナガイモ、ゴボウ等の栽培とは異なり、地上に設置して栽培する方法はこれまでにない斬新な栽培法で、乾燥地域に自生するカンゾウ属植物の栽培に適した方法と考えられた。
2. 適正な筒の長さとしては、筒の容積と新鮮根重から見て、容積の最も小さい 50cm 筒が効率的と考えられた。また、栽培実験を想定した場合、培養土の搬入や移動、収穫作業を含め、その取り扱いには重労働を要することから労働面においても 50cm 筒が適切であった。

このように筒栽培法は、収穫作業も既存の方法（圃場栽培）に比べて簡便で、栽培年次の明らかな地下部が収穫できた。具体的には筒から抜き取るだけで無傷の真っ直ぐな主根を簡便に収穫でき、その調製は容易であった。また、立体的な栽培法であるため、小面積で比較検討を要する実験が可能となった。各種比較栽培試験ならびに育種選抜の実験系としても最適と考えられた。

## 種苗としての供試材料の比較

種苗の供試材料として実生由来，培養由来およびストロン由来の苗を用いて検討したところ，それぞれに長所と短所が認められた．

資料-6 種苗としての供試材料の比較

種苗形態	初期生育	栽培難度	種苗の確保	変異幅	GL含量
実生苗	◎	◎	△	●	△
培養苗	○	○	○	×	◎
ストロン苗	△	○	◎	×	◎

◎:良好 ○:普通 △:低い(難有り) ●:大きい ×:なし

1. 実生由来は発芽と同時に発根が見られ，順調な生育を示したが，GL含量は他の供試材料に比べて極めて低かった．また，わが国では種子の量の確保が困難であり，遺伝的な均一性も確認されていない．
2. 培養由来は遺伝的には均一であり，順化した段階で苗が育成されることから植付け後の生育は順調で，生育ステージを斉一にできる点から各種の実験材料として最適と考えられた．しかし，培養に要する技術，施設，期間等を考慮すると実質的な生産栽培には不向きであるが，生産栽培の初期段階における種苗を確保するには有益な方法となる．
3. ストロン由来はこれまでわが国の試験栽培に供試してきた材料であり，遺伝的に均一で本実験での生育量ならびにGL含量の結果から見て好適な材料と判断された．しかし，ストロン由来は他の供試材料に比べ萌芽が不揃いであること，また，萌芽して少し遅れて発根すること

とから育苗を含めた課題を解決することが重要と考えられた。

### 主根基部からの部位別による GL 含量の比較

GL 含量は根の部位（基部からの長さ）によって異なり，供試したすべての系統において基部から先端に向って高くなる傾向が見られ，特に実生由来において顕著なものであった。このことから個体の品質を評価する際には，根の一部を用いて成分分析するのではなく，全量を細かく切断した後に適切な検体採取法で評価することが重要であった。



## 第4章 京都薬用植物園で保有している7系統の評価

筒栽培法による評価系が確立した段階で、選抜目標の数値を示す個体を見出すことを目的に京都薬用植物園で保有する7系統のストロン由来苗を用いて、地上部の外部形態形質ならびに地下部の生育量とそのGL含量を比較検討した。

### 4.1. 地上部の外部形態形質

保存7系統の葉、花、果実などの外部形態について比較検討したところ、それらは小葉の形態（波打ち度）から3つの型に区分できた。小葉のふちが波打たないタケダ 88-308 など2系統は、草丈が低く倒伏し易い特徴を有しているのに対し、他の波打つ系統は茎が太く直立性を呈していた。さらに、タケダ 88-308 は他系統に比べて小葉が大きい特徴を有していた。

ウラルカンゾウの花芽形成に関する要因については明らかではないものの、2000年以降で多くの系統で開花および結実が観察できた。いずれもウラルカンゾウの特徴である湾曲した莢果（果実）を形成し、若果時には、赤色の腺毛を有していた。なお、タケダ 88-308 および同 97-211 の莢果は、他系統に比して明らかに大きく、種子重でも1.5~2倍の値を示した（Table 6, 写真6）。

このように同じウラルカンゾウであっても系統間で小葉、花、果実などの形状に差が見られた。

**Table 6 Botanical Characteristics of Glycyrrhiza uralensis Kept in Takeda Garden for Medicinal Plant Conservation, Kyoto**

Strains	Maxium height (n=5) (cm)	Leaflet (n=33)			Legume(cm)		100 seeds weight (g)
		Length (cm)	Width (cm)	Shape	Length	Width	
88-308	44.4 ± 3.6	5.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1	not sinuate	5.9	0.8	1.50
97-211	25.8 ± 2.8	3.6 ± 0.1	2.4 ± 0.1	not sinuate	3.9	0.9	1.86
86-419	74.8 ± 4.6	4.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1	sinuate (leaf apex)	4.5	0.5	1.05
97-260	66.4 ± 4.5	3.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	sinuate (leaf apex)	—	—	—
96-208	45.4 ± 4.1	3.9 ± 0.1	2.4 ± 0.1	sinuate	—	—	—
96-331	54.8 ± 3.9	3.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	sinuate	3.8	0.6	1.02
87-458	50.0 ± 3.5	4.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1	sinuate	3.3	0.5	0.82

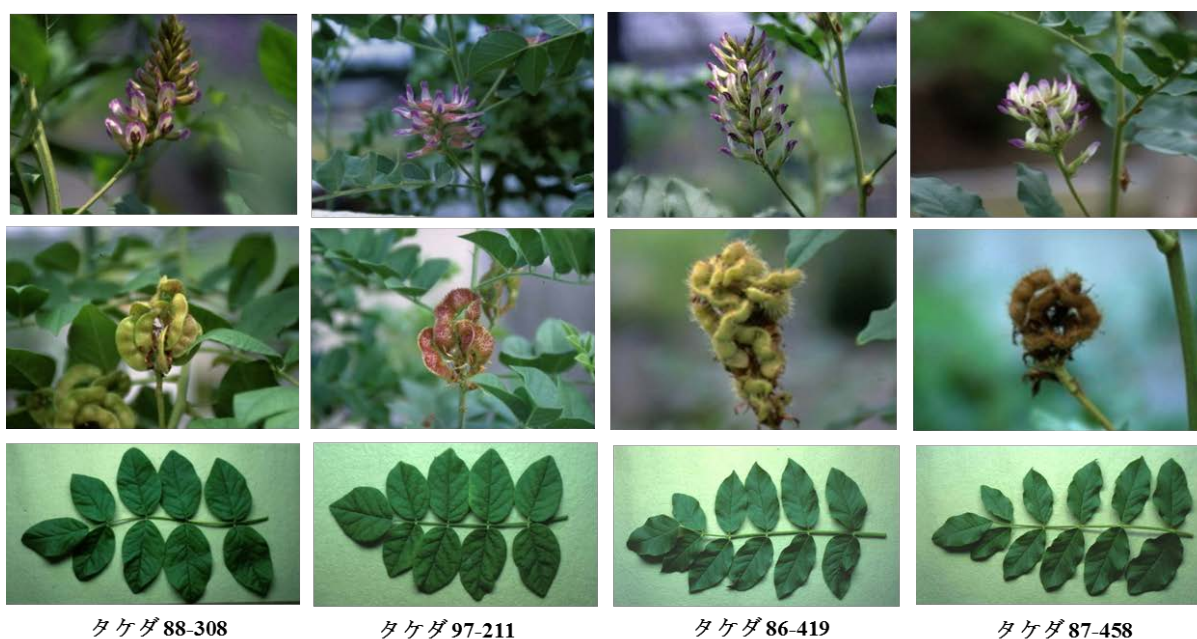


写真-6 調査したウラルカンゾウ4系統の花, 果実および小葉

#### 4.2. 遺伝子多系の分析

植物の種間の鑑別のためには, 葉緑体 DNA のうち, リブローズニリン酸カルボキラーゼ大サブユニット ribulose-1, 5-bisphosphate

carboxylase/oxygenase largesubunit (*rbcL*) 遺伝子やマチュラーゼ K matulase K (*matK*) 遺伝子の塩基配列が比較される。すなわち、ウラルカンゾウとスペインカンゾウとの間には、*rbcL* や *matK* のシークエンスに数塩基の置換があり、鑑別に有用である<sup>25)</sup>。さらに、ウラルカンゾウ内においても *rbcL* では 2 塩基置換したアデニン-チミン型 (AT) とグアニン-アデニン型 (GA) の二つのタイプに分離されることが報告されている<sup>26,27)</sup>。そこで、保有しているウラルカンゾウ 7 系統について調査した結果、タケダ 86-419 は AT 型に属し、その他の 6 系統は GA 型に属していた。このような情報は、今後の優良品種選抜に有用になるかもしれない。

#### 4.3. 地下部の生育量とその GL 含量の比較

保存 7 系統のストロン由来の 2 年生について、地下部の生育量および GL 含量を調査したところ、小葉が波打たないタケダ 88-308 は、主根の基部径が 0.7 cm の細い形状を示し、その新鮮根重は 19.3g と最も低い値であった。一方、小葉が上部あるいはすべてで波打つ系統は、いずれも 1 cm 以上の基部径を示し、タケダ 86-419、同 96-331 および同 87-458 では 2 cm 以上の太い主根を形成していた。それらの新鮮根重は、いずれも 100g 以上の値を示し、最大はタケダ 86-419 の 346.3 g であった (Table 7)。

生薬の品質を評価する時、その色も重要視される。そこで、主根の外皮と内部の色調について観察したところ、小葉が波打たない 2 系統の外皮は赤味を帯び、内部は濃い黄色味を呈していた。一方、他系統の外皮は赤味を帯びず、内部が淡い黄色味を呈するものが多かった。

GL 含量調査では、新鮮根重の結果に反して、小葉が波打たない 2 系

統が日本薬局方の規定値である 2.5% を達成していた。特にタケダ 88-308 は調査した系統の中で最高値の 3.85% であった。一方、波打つ他の系統では、いずれも 2.00% 以下の値であった。このように地下部の新鮮根重と GL 含量には、相関関係 ( $R^2=0.4586$ ) が認められた (Fig. 2)。

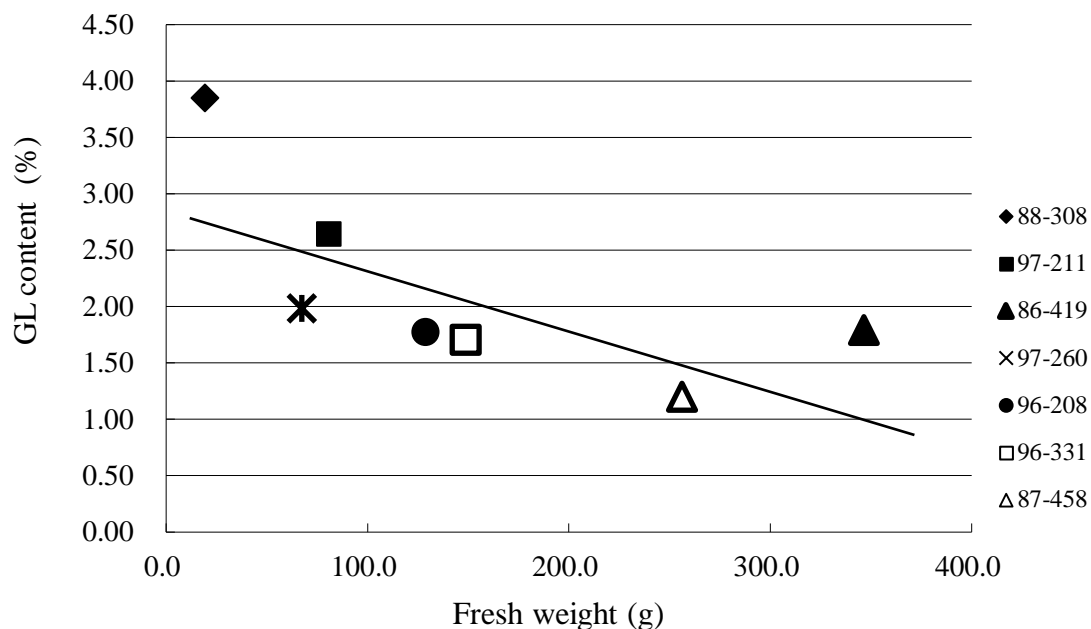
**Table 7 Comparison of Roots and Contents of Glycyrrhizin in Seven Strains**

Strains	Source material	N	Diameter(cm)		Length of taproots (cm)	Number of lateral roots	Weight(g)		Glycyrrhizin contents (%)
			Rs	R50			Fresh	Dry	
88-308	RP	4	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.2	35.3 ± 12.8	0.0 ± 0.0	19.3 ± 15.5	7.8 ± 6.5	3.85 ± 0.88
97-211	RP	14	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	60.6 ± 5.8	0.3 ± 0.1	80.8 ± 17.3	34.7 ± 7.3	2.64 ± 0.15
86-419	RP	10	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.2	58.6 ± 0.7	0.9 ± 0.2	346.3 ± 51.0	138.3 ± 21.0	1.79 ± 0.14
97-260	RP	3	1.3 ± 0.3	0.9 ± 0.3	55.0 ± 5.0	0.0 ± 0.0	67.5 ± 29.9	26.8 ± 13.9	1.98 ± 0.60
96-208	RP	8	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	53.1 ± 1.7	1.5 ± 0.6	129.0 ± 25.5	45.4 ± 10.8	1.77 ± 0.22
96-331	RP	4	2.1 ± 0.0	1.3 ± 0.3	48.3 ± 4.6	0.8 ± 0.3	148.9 ± 15.4	56.3 ± 6.6	1.70 ± 0.09
87-458	RP	12	2.6 ± 0.1	2.2 ± 0.2	43.9 ± 1.2	1.0 ± 0.3	256.2 ± 28.0	95.3 ± 11.3	1.20 ± 0.09

RP: plant from stolon

Rs: basal root, R50: 50cm point from the base of the root

Each value represents the mean ± standard error



**Fig. 2. Relation Ship Between the Root Weight and Content of Glycyrrhizin in Seven Strains**

#### 4.4. 小括

保有する 7 系統について地上部の外部形態形質を調査するとともに、地下部の生育量とその GL 含量を比較検討した。

1. 小葉の形態（波打ち度）から 3 つの型に区分できた。小葉のふちが波打たない系統は、概して倒伏し易い特徴を有しているのに対し、他の波打つ系統は茎が太く直立性を呈していた。また、莢果はウルカンゾウの特徴である湾曲した形状であった。
2. 葉緑体 DNA を解析した結果、二通りある遺伝子の塩基配列は 6 系統がグアニン-アデニン型（GA 型）に属し、タケダ 86-419 はアデニン-チミン型（AT 型）であった。
3. 供試した 7 系統について比較検討した結果、地下部の新鮮根重と GL 含量には相反する傾向が認められ、育種目標を満たす系統を見出せなかった。

今後は遺伝的に異なる系統を供試して優良個体（系統）を作出する必要性が示唆された。

## 第 5 章 自然交雑で得られた実生個体群の評価

比較調査した 7 系統では，地下部の新鮮根重と GL 含量は相反する傾向が見られ，目標とした系統を見出すことができなかった．そこで，遺伝的に変異幅が拡大すると想定される実生由来から優良な個体を選抜することが不可欠と考え，2000 年に採種した GL 含量で高い値を示したタケダ 88-308 および同 97-211 と，新鮮根重で大きい値を示したタケダ 86-419，同 96-331 および同 87-458 の計 5 系統の種子を経由した実生個体で検討した．

### 5.1. 地下部の生育量とその GL 含量

実生由来苗の本数は，高 GL 含量のタケダ 88-308 が 28 個体，生育旺盛な同 86-419 が 14 個体など合計 59 個体であった．2 年生（栽培 20 ヶ月）の各系統の生育量と GL 含量を Table 8 に示した．各系統の平均値を見ると，新鮮根重はタケダ 86-419 および同 87-458 の個体群がそれぞれの採種親と同様に高い値を示した．一方，タケダ 88-308 および同 97-211 の個体群は，いずれも主根径が太く，その新鮮根重は前者が 79.7g，後者が 127.4g で明らかに採種親に比して高い値を示した．また，GL 含量については，系統比較実験と同様の傾向を示したものの，いずれの個体群もその平均値は 2.0% 以下であった．

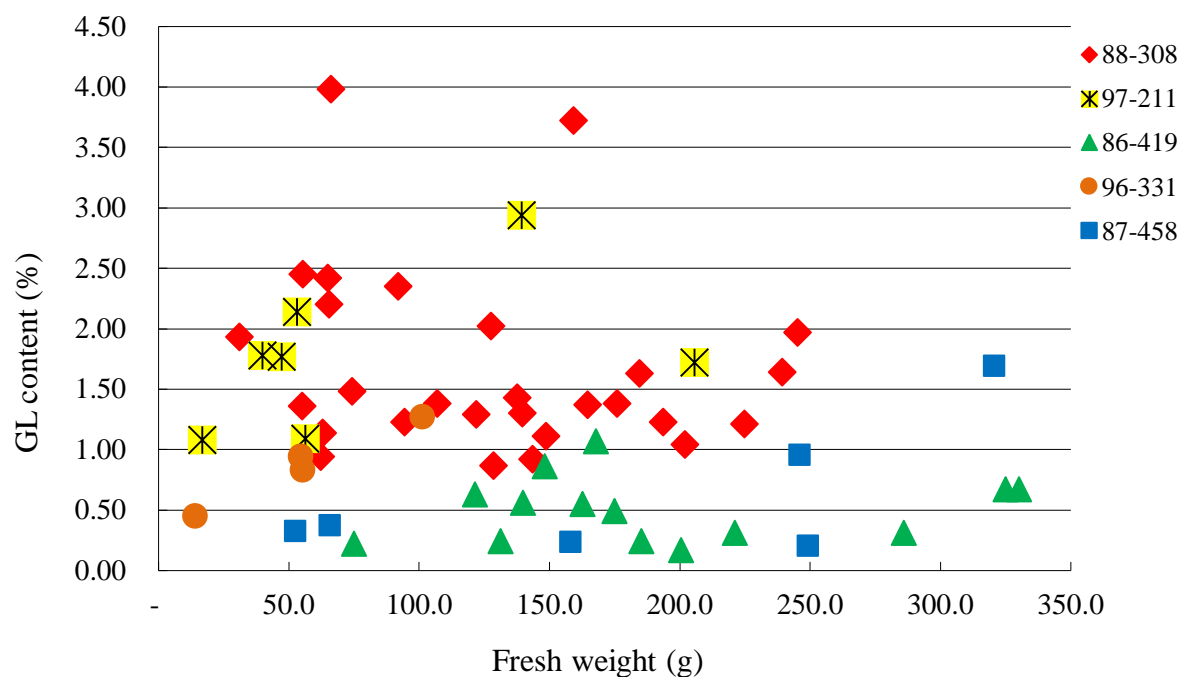
つぎに個体別の新鮮根重と GL 含量の関係を Fig. 3 に示した．新鮮根重 200g 以上を示した個体は，タケダ 88-308 で 4 個体，同 97-211 で 1 個体，同 86-419 で 4 個体および同 87-458 で 3 個体の計 4 系統 12 個体であった．一方，GL 含量 2.5% 以上は，系統比較実験において高い値を示し

**Table 8 Comparison of Roots and Contents of Glycyrrhizin in Biennial Plants from Five Strains**

Strains	Source material	Number of plantlets	Diameter (cm)		Length of taproots (cm)	Number of lateral roots	Weight (g)		Glycyrrhizin contents (%)
			Rs	R <sub>50</sub>			Fresh	Dry	
88-308	SP	28	2.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	60.7 ± 2.0	0.8 ± 0.2	127.4 ± 11.5	61.4 ± 5.5	1.68 ± 0.14
97-211	SP	7	1.5 ± 0.2	0.8 ± 0.1	64.1 ± 1.7	1.6 ± 0.7	79.7 ± 25.5	41.7 ± 13.3	1.79 ± 0.24
86-419	SP	14	2.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	64.9 ± 4.3	0.8 ± 0.3	190.6 ± 20.4	96.2 ± 10.6	0.50 ± 0.07
96-331	SP	4	1.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1	71.8 ± 2.0	1.3 ± 0.5	56.3 ± 17.8	30.4 ± 9.4	0.87 ± 0.17
87-458	SP	6	2.6 ± 0.2	1.2 ± 0.3	69.2 ± 1.2	2.0 ± 0.7	182.1 ± 44.2	93.5 ± 22.8	0.63 ± 0.24

SP: seedling plant Rs: basal root, R<sub>50</sub>: 50cm point from the base of the root

Each value represents the mean ± standard error



**Fig. 3 . Relationship Between the Root Weight and Content of Glycyrrhizin in Fifty-nine Biennial Plants**

たタケダ 88-308 で 2 個体および同 97-211 で 1 個体に認められたが、それらの新鮮根重は 200g 以下であった。

このように選抜の目標値であった『新鮮根重が 200g 以上で、GL 含量が 2.5% 以上』を示す個体は出現しなかった。なお、これまでの研究から、

同一個体（クローン）であっても供試材料（実生由来，培養由来およびストロン由来）の違いにより，GL 含量が変化することを報告してきた．すなわち，その GL 含量は，実生由来の根<培養由来の根<ストロン由来の根となる．そこで，目標値に順ずる値を示したタケダ 88-308（以下 Strain A とする）から育成した A-17 と A-19 および同 87-458（以下 Strain G とする）から育成した G-6 を一次選抜個体とした．また，それぞれの系統から低 GL 含量であった A-16 および G-2 を比較対照個体とした．

## 5.2. 一次選抜個体の評価

一次選抜した 5 個体のストロン由来の苗を供試して検討した結果，A-17，A-19 および A-16 の新鮮根重は，いずれも実生由来の 2 年生より高い値を示した．特に A-19 は 197g を計測し，採種親（Strain A）の 19g に比較して 10 倍以上という極めて高い値であった．一方，GL 含量調査においても，A-19 が 5.0% で最も高く，比較対照個体である A-16 のそれは 2.1% と低い値であった．また，いずれも実生由来 2 年生の値より高まる傾向を示した．その傾向は，Strain G の 2 個体（G-6 および G-2）においても同様の結果であった（Table 9）．

このように実生由来における GL 含量の個体間差は，ストロン由来においても同様の傾向を示した．さらに，A-19 および G-6 は，いずれも目標値の新鮮根重 200g/株以上と同等で，GL 含量も日本薬局方の規定値である 2.5% 以上を示す優良な個体として二次選抜した．



**Table 9 Comparison of Roots and Contents of Glycyrrhizin in Five Strains from SP and RP**

Strains	Source material	Period of cultivation (months)	N	Diameter(cm)		Length of taproots (cm)	Number of lateral root	Weight(g)		Glycyrrhizin contents (%)
				Rs	R <sub>50</sub>			Fresh	Dry	
G-2	SP	20	1	2.9	1.9	65.0	0.0	249.2	122.2	0.20
	RP	8	2	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.7	74.5 ± 2.5	0.5 ± 0.5	218.3 ± 161.6	94.8 ± 70.9	0.67 ± 0.10
	RP	20	2	3.3 ± 0.4	2.8 ± 0.3	63.5 ± 3.5	4.0 ± 3.0	602.9 ± 137.1	270.5 ± 68.2	0.49 ± 0.09
G-6	SP	20	1	3.3	1.7	68.0	4.0	320.8	162.0	1.71
	RP	8	4	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.2	62.3 ± 4.0	1.3 ± 0.5	220.3 ± 64.0	103.2 ± 31.7	2.67 ± 0.15
	RP	20	5	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.2	68.0 ± 3.0	4.0 ± 1.1	616.7 ± 73.6	270.1 ± 32.8	3.13 ± 0.26
A-16	SP	20	1	2.3	1.4	65.0	0.0	128.4	57.7	0.87
	RP	8	3	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	58.7 ± 16.9	0.3 ± 0.3	30.3 ± 14.7	12.7 ± 6.5	3.09 ± 0.35
	RP	20	3	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.4	82.5 ± 12.5	1.5 ± 0.5	220.1 ± 66.6	99.9 ± 30.0	2.07 ± 0.10
A-17	SP	20	1	1.9	1.6	36.0	0.0	91.8	49.0	2.35
	RP	8	4	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	61.0 ± 9.4	1.0 ± 0.7	64.9 ± 21.0	30.7 ± 10.1	4.06 ± 0.27
	RP	20	4	1.6 ± 0.2	2.0 ± 0.3	61.8 ± 2.0	0.0 ± 0.0	156.6 ± 50.6	73.1 ± 24.0	4.42 ± 0.22
A-19	SP	20	1	2.4	1.4	44.0	2.0	159.3	80.6	3.72
	RP	8	4	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2	62.3 ± 1.4	0.5 ± 0.3	76.4 ± 30.3	32.8 ± 12.8	4.98 ± 0.42
	RP	20	5	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2	65.4 ± 5.3	0.6 ± 0.2	196.8 ± 45.0	89.7 ± 23.2	4.52 ± 0.40

SP: seedling plant RP: plant from stolon Rs: basal root, R50: 50cm point from the base of the root

Each value represents the mean ± standard error

### 5.3. 小括

5 系統から得られた種子を經由した実生由来の苗を供試して、地下部の生育量とその GL 含量を検討した。

1. 実生由来の 59 個体について検討したが、選抜の目標値であった新鮮根重が 200g 以上で、GL 含量が 2.5% 以上を示す個体は出現しなかった。しかし、同一個体のストロン由来で GL 含量が高まることが知られており、目標値に順ずる値を示したタケダ 88-308 (Strain A) および同 87-458 (Strain G) の 3 個体および対照としてそれぞれの低 GL 含量の 2 個体を含む計 5 個体を一次選抜した。

2. 一次選抜した5個体のストロン由来について再検討したところ、**A-19**はGL含量が5.0%以上と高く、新鮮根重が197gであった。**G-6**はGL含量が3.0%以上で、新鮮根重は600g以上の生育旺盛で直立性を示した。

このように実生由来の個体群から、当初の育種目標の値を示す2個体を2年間の栽培で見出すことができた。これらの個体は、生産栽培に適した有望な個体であるとともに、今後の育種素材として重要であると推定された。さらに、これまでウラルカンゾウは日本国内での開花・結実は非常に困難であると認識されてきたが、二次選抜した**A-19**はGL含量が高く、容易に開花・結実する個体であった。これは交雑母本株として栽培に適応した品種の開発に際し、非常に重要な形質を有する個体の発見であった。

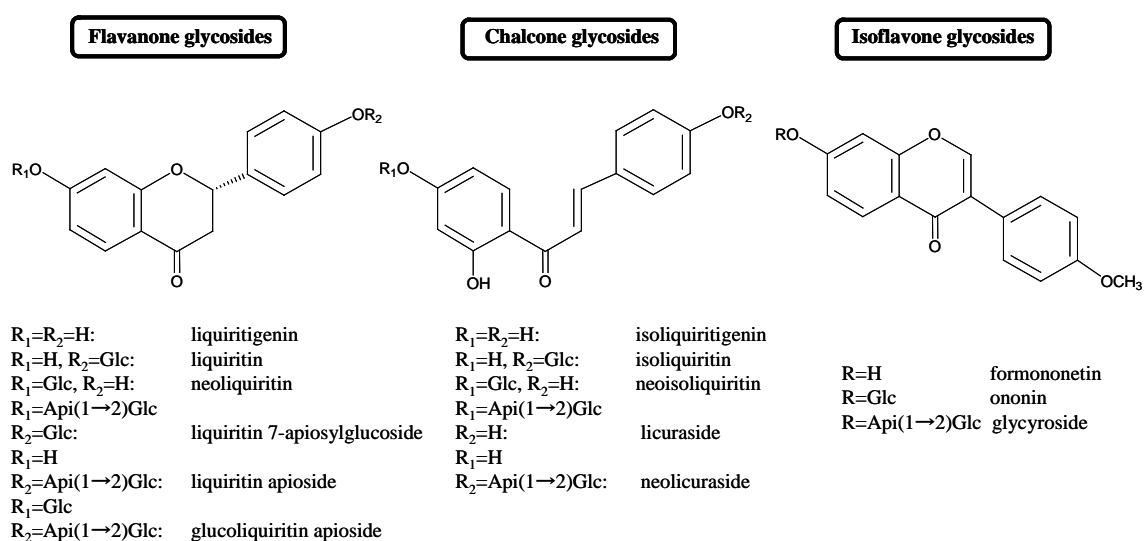
## 第 6 章 栽培甘草の化学的品質評価法の検討<sup>28)</sup>

現在まで漢方薬に使用されてきている甘草は、その全てが中国からの輸入品であり、野生植物の採取により調製されてきたものである。一方、漢方医学や中医学を基盤とする医師や薬剤師の中には、生薬の産地まで考慮し、処方を組み立てる人も多くいる。このように、生薬は、味が日本薬局方において適否の判断基準になっているなど、特殊な取扱いをされることが多い医薬品である。すなわち、これまで使用経験の無い栽培甘草が漢方薬に受け入れられるためには、主成分の GL 含量の達成だけでは不十分であると考えられた。そこで、より多くの成分を考慮した栽培甘草の化学的品質評価法を検討した。

### 6.1. 指標成分の検討

第 16 改正日本薬局方において、甘草は主サポニン成分であるグリチルリチン酸 (GL) を 2.5 % 以上含むことと規定されており、品質評価には GL 含量測定は不可欠なものである。しかしながら、甘草には Fig. 4 に示したように多くのフラボノイド配糖体が含有されており、抗酸化活性、抗炎症活性、抗腫瘍活性、発癌抑制活性など多くの薬理活性も報告されている<sup>29-33)</sup>。すなわち、これらフラボノイド成分も甘草にとって重要な生物活性成分であると考えられている。そこで、これらのフラボノイドを指標成分とし、定量法を検討することにした。しかし、多数のフラボノイド成分を個々に定量することは非常に困難であった。そこで、これら多数のフラボノイド成分が flavanone 誘導体である liquiritigenin (LIQ) の配糖体群、chalcone 誘導体である isoliquiritigenin (ISO) の配糖体群、そ

して isoflavone 誘導体である formononetin (FOR)の配糖体群の 3 つにグルーピングできることに注目した. すなわち, これらのフラボノイド配糖体を加水分解すると, 非糖部である LIQ, ISO, FOR が生成することになる. 以上の考えから, 栽培甘草の化学的な品質を GL, LIQ, ISO, FOR の 4 種類の化合物を定量することで評価することとした.



**Fig. 4. Structures of the Principal Flavanones, Chalcones and Isoflavone Glycosides from Licorice**

## 6.2. サンプル調製法

甘草の粉末 300 mg を精秤し, 30 mL のナス型フラスコに入れ 35% HCl-MeOH(1:6)の溶液 8 mL を加え, 2 時間還流した. 冷後, 14% アンモニア性 MeOH 3.5 mL により中和処理後, ろ過液を MeOH で 20 mL にメスアップし, HPLC 用サンプルとした. 還流時間の設定は, LIQ 4'-glucoside である liquiritin 3.0 mg を 1-3 時間還流しその非糖部の生成量を調べた. その結果, 1 時間, 1.5 時間, 2 時間, 3 時間での理論値に対する生成率(%)はそれぞれ, 85.7%, 91.7%, 98.1%, 97.9%であった. ただし, これらの値は liquiritin の加水分解では LIQ および ISO が 68.7

±2.1 : 33.1±2.0 の割合で生成するため、それぞれのトータル量として計算したものである(Fig. 6).

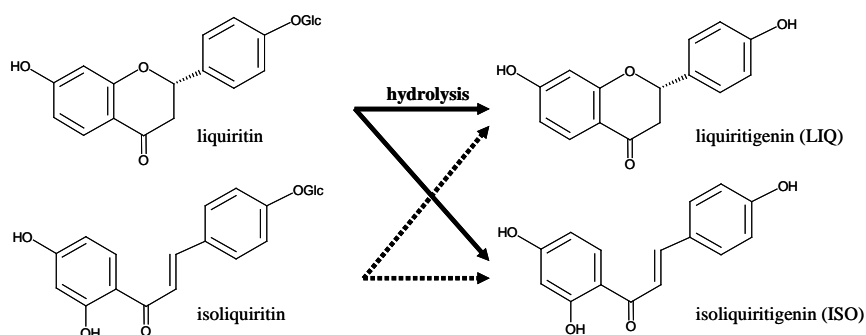


Fig. 5. Acid Hydrolysis Reaction of Liquiritin and Isoliquiritin

### 6.3. HPLC 分析条件

3 種類のフラボノイドは、カラムとして、Simpack XR-ODS III (2.0mm ×150mm i.d.; 2.2 μm, Shimadzu) を用いた HPLC 法により定量することにした。移動相は H<sub>2</sub>O (1% acetic acid)–acetonitrile (77 : 23) で、流速は 0.4 mL/min. カラム温度は 40℃. 検出波長は UV 254 nm を用いた。また、サンプル注入量は 5 μL とした。サンプル分析時の代表的なクロマトグラムを Fig. 7 に示した。LIQ, ISO, FOR のそれぞれの保持時間は 4.1 分, 13.8 分, 15.6 分であった。

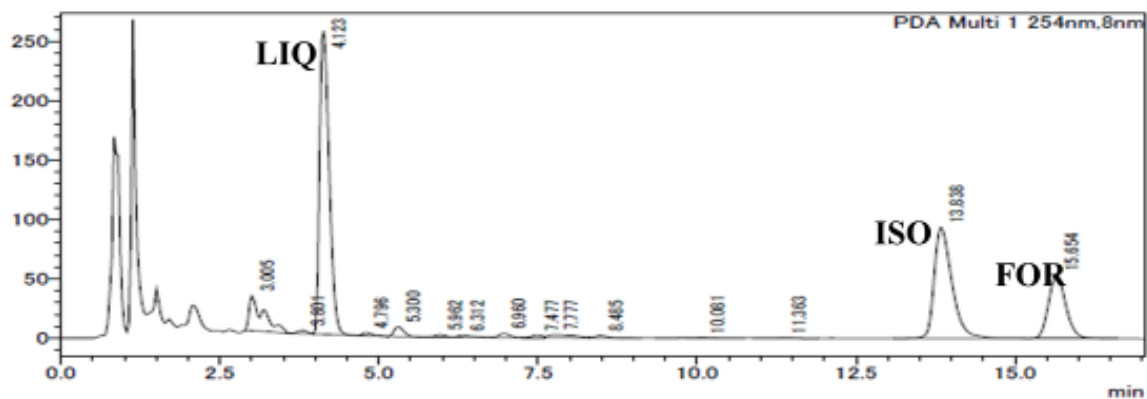


Fig. 6. HPLC Chromatogram of a Licorice Sample

検量線については、LIQ 標準液：0.64 mg/mL, 0.32 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.04 mg/mL (calibration curve:  $y = 16794516x + 26736$ ,  $r = 0.9998$ ); ISO 標準液：0.22 mg/mL, 0.11 mg/mL, 0.055 mg/mL, 0.0275 mg/mL, 0.01375 mg/mL (calibration curve:  $y = 30517101x + 28567$ ,  $r = 0.9999$ ); FOR 標準液：0.12 mg/mL, 0.06 mg/mL, 0.03 mg/mL, 0.015 mg/mL, 0.0075 mg/mL (calibration curve:  $y = 74088236x + 26513$ ,  $r = 0.9999$ )であった。また、添加回収実験では、LIQ：97.8 ± 1.7% (RSD = 1.76%)、ISO：99.3 ± 0.3% (RSD = 0.33%)、FOR：97.84 ± 1.6% (RSD = 1.61%)であり、良好であった。さらに定量限界は、LIQでは0.31 µg/mL、ISOでは0.11 µg/mL、FORでは0.06 µg/mLであった。

#### 6.4. 小括

これまで栽培甘草の使用経験が無い国内の漢方医や薬剤師に向けて、栽培甘草の品質を保証する必要があった。そこで、日本薬局方の化学的品質評価のための規定値（GL含量が2.5%以上）に加えて、甘草の効能に大きく関与していると考えられた甘草含有フラボノイド成分の一斉分析法を開発した。この評価法を用いて、次章の育種評価や市場品甘草の調査研究を行った。

## 第7章 地下部の生育量と成分に関する年次的変化

二次選抜した 2 個体は、いずれも当初の目標値であった新鮮根重が 200g/株以上と同等で、GL 含量は 2.5%以上を示す優良な個体であった。一方、生産栽培においては栽培期間と収穫時期の検討は重要な課題の一つである。そこで、二次選抜した **A-19** および **G-6** の培養由来の苗を供試して地下部の生育量とともに、成分含量の季節的ならびに年次的変化を検討した。また、国内栽培甘草が市場に受け入れられるための重要な情報と考えられる市場品甘草の成分比較も行った。

### 7.1. 地下部の生育量の年次的変化

地下部の根基部径ならびに新鮮根重は、年次とともに高くなまる傾向を示した (Table 10, Fig. 7)。すなわち **A-19** の新鮮根重を年次的に見ると、1年生が 30g であったのに対し、2年生では 132g を示し、約 4 倍量に増加していた。3年生では 155g でその増加は緩やかなものであった。それらは当然のことながら年次とともに増大する傾向を示し、栽培 5 年目にはそれぞれ 3.1cm および 320g の値であった。この傾向は **G-6** においても同様の結果であった。しかし、前述 (第 5 章) の選抜個体の結果と比較して新鮮根重が低いのは、主根から分枝した側根数あるいは供試材料の違い (RP と CP) に起因していると考えられた。

### 7.2. GL 含量の年次的変化

**A-19** の GL 含量の年次的変化は、1年生から 5.0%以上の値を示しており、その数値は緩やかな傾向で高まり、4年生には 6.30%の最高値を示

した (Table 10, Fig. 8)。これらの傾向は **G-6** においても同様の結果であったが、その数値は 3.00% 前後で、**A-19** に比較して低いものの日本薬局方の規定値を超える値であった。

1 株あたりの GL 生産量 (主根の乾重量 × GL 含量) を算出したところ、**A-19** の 1 年生が 0.80g であったのに対し、2 年生では 3.43g を示し、新鮮根重と同様に約 4 倍量に増加していた。3 年生では 4.04g を示したものの 2 年生に比較してその増加は 1.2 倍程度となった。それ以降も増加し、5 年生では 7.78g の最高値を示した。しかし、最適な栽培年数として、GL 生産量は一つの目安であり、コスト面を考慮した最適な栽培年数を検証する必要がある。なお、これらの傾向は **G-6** においても同様の結果であった。

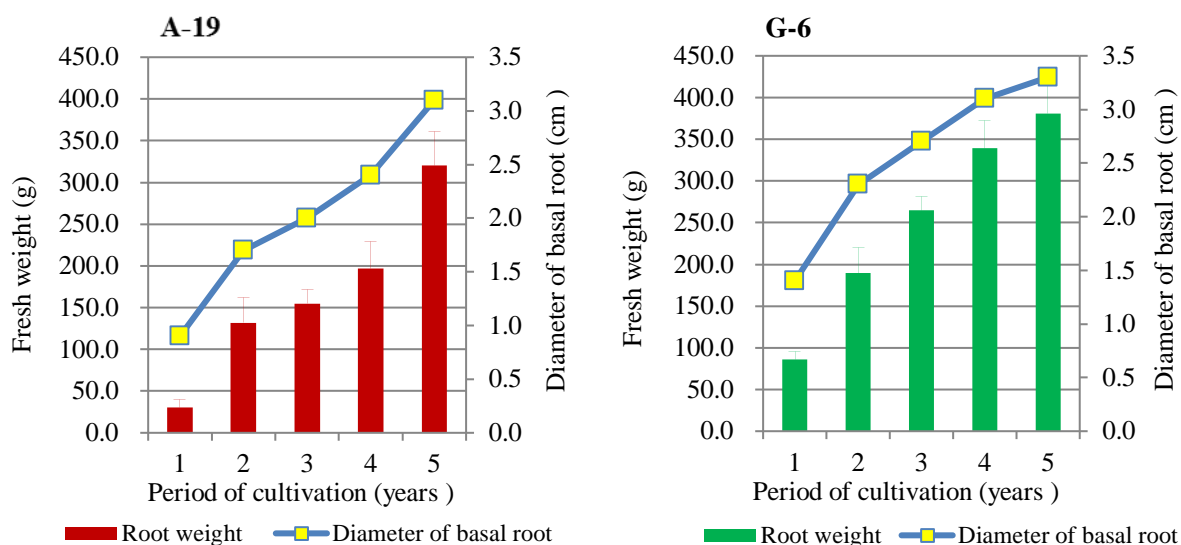
**Table 10 Time Course of the Growth and Glycyrrhizin Contents of Selected Two Strains (A-19 and G-6)**

Strains	Source material	Collecting date	Period of cultivation (years)	Length of taproots (cm)	Diameter of basal roots (cm)	Weight(g)		Glycyrrhizin contents (%)	Yield of glycyrrhizin (g)	Total flavonoid content (%)
						Fresh	Dry			
<b>A-19</b>	CP	2006 Dec.	1	64.8 ± 3.4	0.9 ± 0.1	30.3 ± 9.3	15.7 ± 5.1	5.04 ± 0.20	0.80 ± 0.26	1.02 ± 0.05
		2007 Dec.	2	56.6 ± 2.2	1.7 ± 0.2	131.9 ± 30.8	62.6 ± 15.3	5.50 ± 0.13	3.43 ± 0.83	1.38 ± 0.16
		2008 Dec.	3	59.6 ± 3.7	2.0 ± 0.2	154.9 ± 16.6	68.4 ± 7.8	6.09 ± 0.58	4.04 ± 0.34	1.46 ± 0.14
		2009 Dec.	4	56.6 ± 1.5	2.4 ± 0.2	196.6 ± 33.0	80.4 ± 12.6	6.30 ± 0.76	4.89 ± 0.70	1.69 ± 0.14
		2010 Dec.	5	58.0 ± 1.5	3.1 ± 0.2	320.3 ± 40.6	128.2 ± 13.0	6.22 ± 0.90	7.78 ± 1.12	1.65 ± 0.26
<b>G-6</b>	CP	2006 Dec.	1	56.4 ± 0.9	1.4 ± 0.1	86.2 ± 14.6	47.7 ± 8.6	2.77 ± 0.10	1.35 ± 0.28	0.73 ± 0.09
		2007 Dec.	2	52.8 ± 0.6	2.3 ± 0.2	189.3 ± 43.1	91.4 ± 20.6	3.32 ± 0.13	3.00 ± 0.65	0.69 ± 0.04
		2008 Dec.	3	56.6 ± 2.4	2.7 ± 0.2	264.6 ± 55.0	124.3 ± 25.3	3.25 ± 0.54	3.81 ± 0.54	1.06 ± 0.03
		2009 Dec.	4	52.0 ± 2.2	3.1 ± 0.3	339.0 ± 56.8	147.4 ± 26.9	2.88 ± 0.34	4.23 ± 0.87	0.90 ± 0.06
		2010 Dec.	5	51.8 ± 3.7	3.3 ± 0.1	380.5 ± 27.2	152.5 ± 8.6	3.01 ± 0.07	4.59 ± 0.26	0.97 ± 0.03

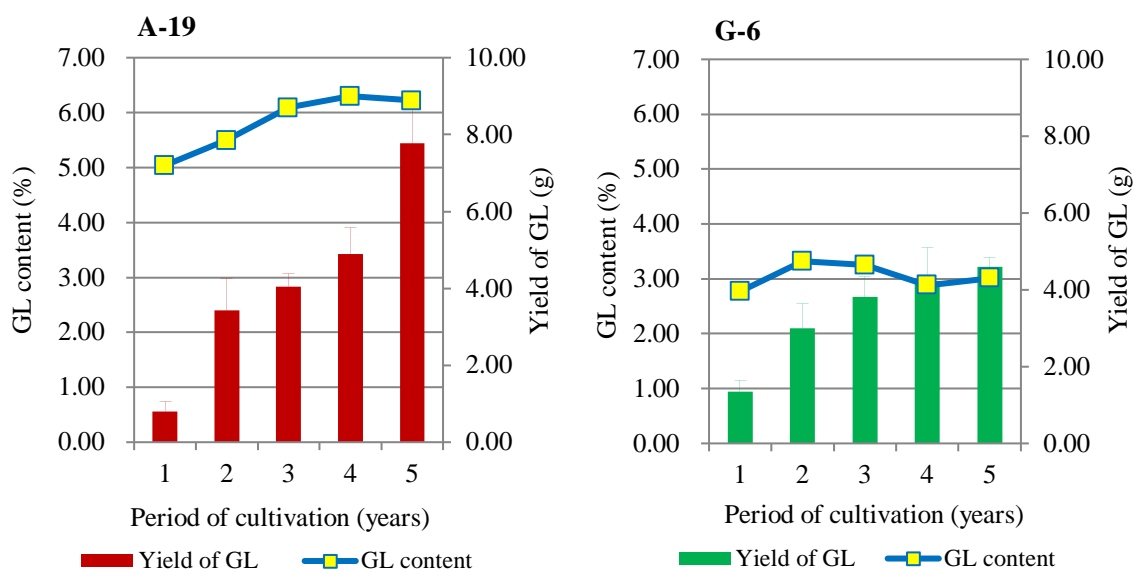
CP: cultured plant      Each value represents the mean ± standard error. (n=5)

Yield of glycyrrhizin (from one plant) = Glycyrrhizin content × Dry weight





**Fig. 7. Comparison Between Head Diameter and Fresh Weight of the Root Grown for Five Years**

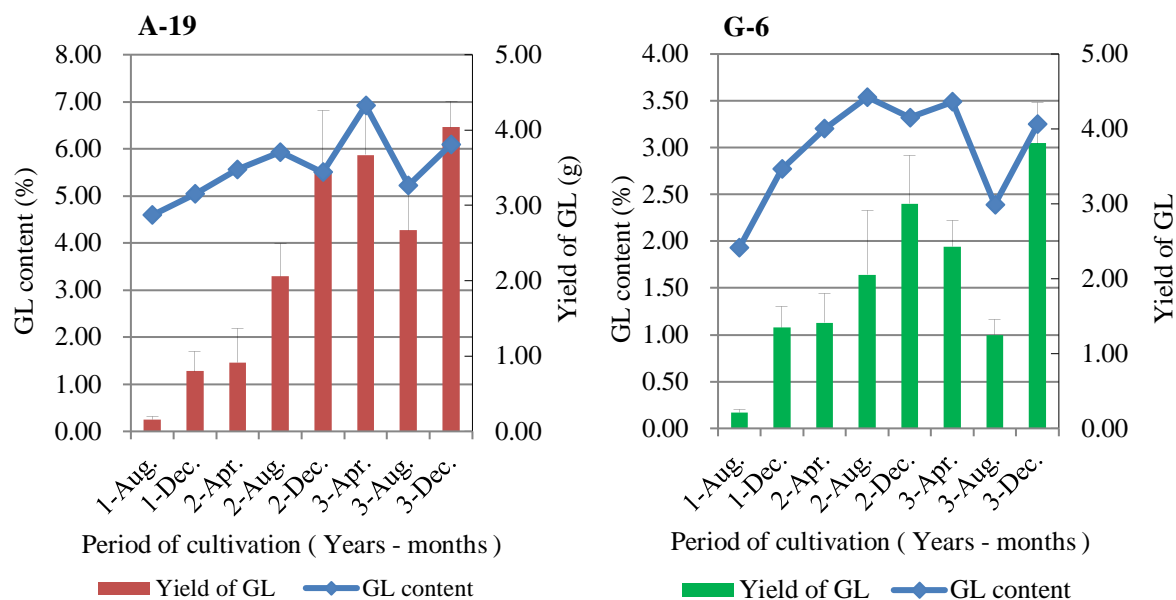


**Fig. 8. Time Course of the Glycyrrhizin Contents of Strains A-19 and G-6**

### 7.3. GL 含量の季節的変化

**A-19** の GL 含量は、1 年目の 8 月（栽培 4 ヶ月）で日本薬局方の規定値（2.5%）を超える 4.59%に達し、同 12 月(栽培 8 ヶ月)では 5.04%の高い数値を示した(Fig. 9). 最高値は **A-19** の 3 年目の 4 月（栽培 24 ヶ月）に採取したもので 6.92%に達した. この GL 含量が 4 月に高まる傾向は

G-6 においても同様の結果を得た。この理由は、萌芽の際に、根に貯蔵された糖類が消費されるためだと推測できた。



Strains	Source material	Collecting date	Period of cultivation (months)	Length of taproots (cm)	Diameter of basal roots (cm)	Weight(g)		Glycyrrhizin contents (%)	Yield of glycyrrhizin (g)	
						Fresh	Dry			
<b>A-19</b>	CP	2006	Aug.	4	57.2 ± 3.0	0.6 ± 0.1	6.1 ± 1.0	3.6 ± 0.8	4.59 ± 0.13	0.16 ± 0.04
			Dec.	8	64.8 ± 3.4	0.9 ± 0.1	30.3 ± 9.3	15.7 ± 5.1	5.04 ± 0.20	0.80 ± 0.26
		2007	Apr.	12	57.4 ± 2.7	0.9 ± 0.2	31.5 ± 16.1	15.9 ± 7.8	5.56 ± 0.26	0.91 ± 0.45
			Aug.	16	65.4 ± 4.7	1.5 ± 0.2	80.8 ± 19.9	36.9 ± 10.2	5.93 ± 0.41	2.06 ± 0.43
		2008	Dec.	20	56.6 ± 2.2	1.7 ± 0.2	131.9 ± 30.8	62.6 ± 15.3	5.50 ± 0.13	3.43 ± 0.83
			Apr.	24	62.6 ± 2.8	2.1 ± 0.1	125.1 ± 22.2	54.5 ± 9.6	6.92 ± 0.91	3.67 ± 0.71
			Aug.	28	68.4 ± 2.5	2.0 ± 0.2	146.6 ± 29.2	49.8 ± 8.8	5.22 ± 0.36	2.67 ± 0.59
			Dec.	32	59.6 ± 3.7	2.0 ± 0.2	154.9 ± 16.6	68.4 ± 7.8	6.09 ± 0.58	4.04 ± 0.34
<b>G-6</b>	CP	2006	Aug.	4	58.4 ± 5.0	1.1 ± 0.1	26.6 ± 3.0	10.4 ± 1.4	1.93 ± 0.19	0.21 ± 0.04
			Dec.	8	56.4 ± 0.9	1.4 ± 0.1	86.2 ± 14.6	47.7 ± 8.6	2.77 ± 0.10	1.35 ± 0.28
		2007	Apr.	12	49.6 ± 2.5	1.5 ± 0.2	88.3 ± 22.8	43.1 ± 11.9	3.20 ± 0.18	1.41 ± 0.39
			Aug.	16	53.2 ± 1.2	1.7 ± 0.2	98.3 ± 24.2	50.8 ± 12.4	3.54 ± 0.67	2.05 ± 0.86
		2008	Dec.	20	52.8 ± 0.6	2.3 ± 0.2	189.3 ± 43.1	91.4 ± 20.6	3.32 ± 0.13	3.00 ± 0.65
			Apr.	24	59.6 ± 2.5	2.5 ± 0.2	182.6 ± 35.9	75.8 ± 15.3	3.49 ± 0.40	2.43 ± 0.34
			Aug.	28	49.6 ± 2.2	2.2 ± 0.3	169.0 ± 41.9	53.5 ± 9.9	2.39 ± 0.13	1.25 ± 0.20
			Dec.	32	56.6 ± 2.4	2.7 ± 0.2	264.6 ± 55.0	124.3 ± 25.3	3.25 ± 0.54	3.81 ± 0.54

CP: cultured plant

Each value represents the mean ± standard error. (n=5)

Yield of glycyrrhizin (from one plant) = Glycyrrhizin content × Dry weight

Fig. 9. Seasonal Deference of GL Contents of the Root Grown from Strains A-19 and G-6

#### 7.4. フラボノイド含量の年次的変化

**A-19** および **G-6** について年次的な GL 含量調査に加えて、第 6 章で述べた加水分解法を用いた LIQ, ISO, FOR の測定により total-フラボノイド (LIQ+ISO+FOR) 含量を求め、化学的品質評価を行った。すなわち、選抜 2 個体について 5 年間の追跡調査を実施した結果、**A-19** では 1 年生で total-フラボノイド含量が 1.02%であったものが、栽培年次を経過するとともに増加する傾向が見られ、5 年生では 1.65%の数値を示した。一方、**G-6** は、1 年生で total-フラボノイド含量が 0.73%であったが、5 年を経過しても、その値は 1.1%以上に増加することはなかった (Table 10, Fig. 10)。これは、フラボノイド成分の含量差異も GL 含量と同様、栽培年数による要因よりも遺伝的要因によるものが大きいことを示している。

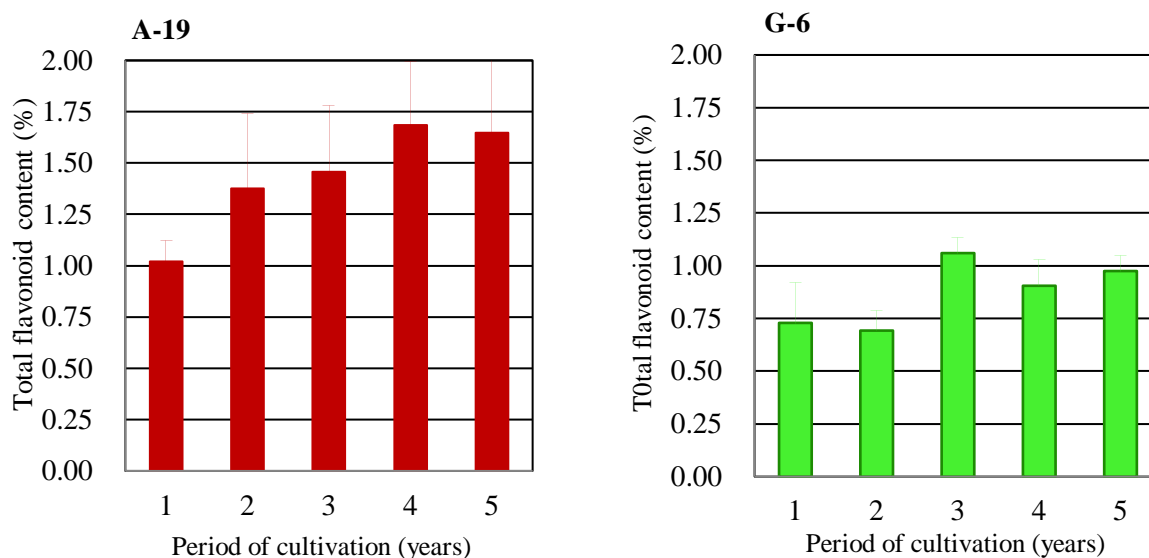


Fig. 10. Time Course of the Total Flavonoid Contents of Strains A-19 and G-6

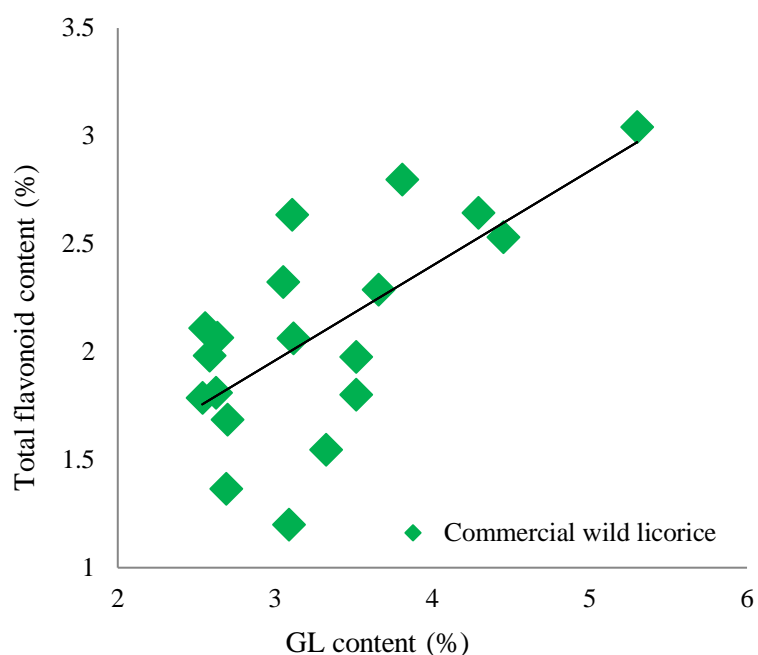


Fig. 11. GL and Total Flavonoid Contents of Commercial Licorice

一方で、栽培甘草の total-フラボノイド含量目標値の設定のため、市場品甘草 19 品目についても同様の調査を行った。その結果は Fig. 11 に示したように相関関係 ( $R^2=0.4541$ ) が認められ、その平均値は GL 含量が  $3.29 \pm 0.75\%$ 、total-フラボノイド含量が  $2.09 \pm 0.49\%$ であった。

### 7.5. 小括

二次選抜した **A-19** および **G-6** の培養由来の苗を供試して地下部の生育量とともに、成分含量の季節および年次的変化を検討した。また、市場品の甘草の成分調査を行った。

1. 新鮮根重は年次とともに増加する傾向が見られ、**A-19** の増加率は 1 年生に比較して 2 年生で約 4 倍、5 年生で約 10 倍の値を示した。

2. GL 含量の年次的変化は，1 年生から高い値を示しており，その数値は緩やかな傾向で高まり，**A-19** の 4 年生において 6.30% の最高値を示した．
3. GL 含量の季節的变化は，萌芽の始まる春期（4 月）に高まる傾向を示し，**A-19** の最高値は 3 年生 4 月（栽培 24 ヶ月）の 6.92% であった．
4. フラボノイド含量については，個体間に大きな差が見られ，**A-19** は 3 年生で 1.46% の数値を示した．
5. 甘草成分の GL 含量と total-フラボノイド含量には相関関係が認められた．

以上ことから生産効率を含めた経済的（コスト面）な栽培期間としては，本実験における生育量（新鮮根重），GL 含量および GL 生産量から見て 2 年目の秋（12 月）あるいは 3 年目の春（4 月）が収穫時期として妥当と推察された．

なお，GL 含量ならびに total-フラボノイド含量などの質的課題に関しては，遺伝的要因が大きく関与しており，**A-19** のような優良な個体を選抜することが必須であった．一方，収量に直結する新鮮根重などの量的課題に関しては，遺伝的要因とともに栽培年数を含めた技術的な要素が大きく関与するものであり，圃場における栽培方法の詳細な検討が必要不可欠と考えられた．

## 第 8 章 栽培品種の開発とその特性

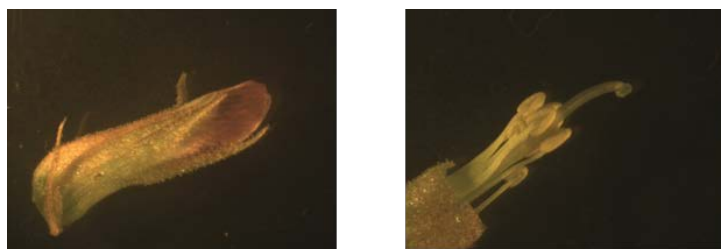
二次選抜した **A-19** は，ストロン由来の苗を植付けた当年に開花が観察されるなど，他の系統と異なり開花結実が容易な特徴を有していた。しかし，地上部の茎径は細くはないものの，容易に倒伏する形状を示すことから，機械化を視野に入れた大規模な栽培にはやや不適切な面も見られた。一方，**G-6** は地上部の茎数も多く，茎径は **A-19** と同等であったが，その形状は直立性を示した。そこで，栽培に適応した品種の作出を目的に，外部形態形質の変化を期待して GL 含量が高い **A-19** を母株(♀)とし，生育旺盛で直立性を示す **G-6** を父株(♂)として交雑させた。また，GL 含量の高含量化に対しても市場品との同等性を視野に入れた。

### 8.1. **A-19(♀)×G-6(♂)の交雑育種**<sup>34)</sup>

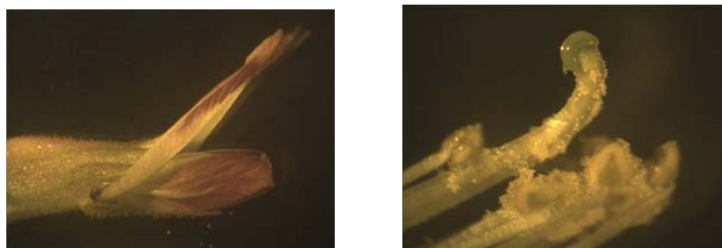
**A-19** (♀) と **G-6** (♂) の交雑を 2005 年 6 月に実施した。交雑に際しては，事前に葯の裂開および柱頭の状況を調査した。すなわち，開花時にはすでに葯が裂開して花粉が飛散した状況であり，柱頭の部分も湿潤状態を呈していた。一方，開花 3～4 日前と推定される蕾を観察したところ，未だ葯の裂開が認められていなかった(写真 7)。

そこで **A-19** の開花推定 3～4 日前の蕾の花弁を開いて裂開していない葯をピンセットで切除して除雄した後，硫酸紙で作製した袋を被せて虫の飛来を防いだ。その 4 日後に処理(除雄)した 10 花のそれぞれの柱頭に **G-6** および **A-19** (自家授粉) の花粉を個別に授粉させ，再度袋掛けを実施した。開花が終了した段階(4 日後)で袋を取り除いた。14 日後に果実の肥大を確認し，同年 7 月に採取した果実を調整した(写真-8)。交

雑種子は 5 粒，自家授粉（自殖）した種子は 15 粒を得た．



未開花(蕾)



開花時

写真-7 花の開花と葯の裂開および柱頭の状況



写真-8 A-19(♀)×G-6(♂)の人工授粉により形成した果実

育成した実生由来は，交雑 2 個体（Strain C-1 および同 C-2）と自殖（自家授粉）10 個体（Strain S-1～S-10）の計 12 個体であった．2 年生の各個体の生育量と GL 含量を Table 11 に示した．Strain C-1 および同 C-2 の主根径はいずれも 2.5cm を計測し，その新鮮根重はそれぞれ 67.2g および 89.0g であった．一方，自殖した 10 個体については，Strain S-8 が

主根径 2.2cm および新鮮根重 46.1g を示したものの、他の 9 個体はいずれもストロンの形成とその伸長が抑制され、そのうち 3 個体は新鮮根重 5g 以下の値であった（写真 9）。これは自殖による遺伝的な劣化が影響して生育障害が発生したものと推察された。なお、プランターで栽培した 2 年生の生育状況は、既存の筒栽培法より根長は短く、生重量も小さい傾向を示した。Strain C-1 および同 C-2 の外部形態形質については、生育が十分でないことから、それらのストロン由来の苗を用いて再調査することにした。



Strain C-1(左)とC-2(右)

Strain S-8(左)S-1(中)S-5(右)

写真-9 交雑(C)ならびに自殖(S)個体の地下部の形状

GL 含量に関しては、Strain C-2 が 3.45% を示したのに対し、自殖個体では生育不良で測定不能な 2 個体（Strain S-5 および同 S-9）を除いて、いずれも 2.5% 以上を示し、その最高値は Strain S-10 の 3.80% であった。なお、実生由来の個体群の平均値としては、これまでの中で最も高い数値を示した。



**Table 11 Comparison Between Growth and Glycyrrhizin Content of the Root from Seedling Plants (C-1, C-2, and S1-S10)**

Strains	Taproots (cm)		The number of stolons	Weight (g)		Glycyrrhizin contents (%)
	Diameter	Length		Fresh	Dry	
C-1	2.5	29	6	67.2	33.3	2.97
C-2	2.5	38	6	89.0	41.6	3.45
S-1	1.3	30	0	34.2	17.0	3.18
S-2	0.9	10	0	4.3	1.8	2.43
S-3	1.8	22	1	22.8	10.7	2.62
S-4	1.9	28	1	39.5	19.5	3.65
S-5	0.4	8	0	0.8	-	-
S-6	1.2	25	0	23.7	9.4	2.87
S-7	1.2	20	0	19.8	9.1	2.97
S-8	2.2	32	3	46.1	22.9	3.72
S-9	0.4	8	0	0.7	-	-
S-10	1.1	30	0	23.1	10.8	3.80

## 8.2. Strain C-1 および同 C-2 の特性（外部形態）

交雑親とその実生個体について、生育旺盛な 2008 年 8 月に草丈、茎の本数ならびに茎の太さを調査した。その結果、草丈は交雑親（♂）の **G-6** が 82.3cm で最も高く、つぎに Strain **C-2** の 72.9cm で、同 **C-1** が最も低い 36.0cm であった。茎数は **A-19** および **G-6** が 3.4 本および 3.5 本であったのに対し、Strain **C-2** が 1.7 本と少ない値であった。地上部の倒伏に関係する茎の太さは、Strain **C-2** が 8.9mm で最も太い形状を示し、つぎに **A-19** が 6.2mm で、Strain **C-1** が最も細い 4.6mm で、それぞれに有意な差が認められた。

外観的な草姿を観察したところ、茎の太さに比例して Strain **C-1** は倒伏しやすく、**A-19** はやや倒伏する傾向であったのに対し、茎の太い Strain **C-2** は倒伏しにくい直立性を示していた（Table 12, 写真 10）。

**Table 12 Comparison of Aerial Parts of Strains A-19,G-6, C-1, and C-2**

Strains	The number of samples	Stems		
		Height (cm)	Number	Diameter (mm)
A-19	9	62.3 ± 3.7	3.4 ± 0.6	6.2 ± 0.2
G-6	8	82.3 ± 2.1	3.5 ± 0.4	6.3 ± 0.2
C-1	8	36.0 ± 3.1	1.9 ± 0.4	4.6 ± 0.3
C-2	7	72.9 ± 2.5	1.7 ± 0.3	8.9 ± 0.6

Each value represents the mean ± standard error



写真-10 Strain C-2(左)とA-19(右)の茎の太さの比較

### 8.3. 優良個体 (Strain C-2) の生育量と品質評価

Strain C-1 および同 C-2 のストロン由来の 2 年生 (栽培 20 ヶ月) について地下部の生育量ならびに GL 含量を調査した結果を Table 13 に示した. Strain C-1 の主根径は 1.8cm で, その新鮮根重は 107.4g であったのに対し, Strain C-2 はそれぞれ 2.0cm および 148.8g を示し, 実生由来 2 年生と同様にいずれの項目においても Strain C-2 がより高い値であった. その外皮は, いずれも赤味を帯び, 内部は濃い黄色味を呈していた.

GL 含量についても, 生育量と同様に Strain C-2 が 3.61% で, 同 C-1 の 2.61% より高い値を示した. なお, いずれも日本薬局方の規定値の 2.5% を超える値であった.

**Table 13 Comparison Between Growth and Glycyrrhizin Content of the Root from RPs (Strains C-1 and C-2)**

Strains	Diameter (cm)	Length of taproots (cm)	The number of lateral roots	Weight (g)		Glycyrrhizin content (%)
				Fresh	Dry	
C-1	1.8 ± 0.1	54.8 ± 2.9	1.0 ± 0.4	107.4 ± 11.6	48.7 ± 4.8	2.61 ± 0.18
C-2	2.0 ± 0.1	58.6 ± 3.3	1.0 ± 0.3	148.8 ± 19.6	64.6 ± 8.9	3.61 ± 0.24

Each value represents the mean ± standard error (n = 5)

つぎに Strain C-2 の培養由来の苗を用いて再検討した結果、1年生（栽培 8 ヶ月）の主根径は 1.0cm で、その新鮮重量は 34.8g であった。2年生（栽培 20 ヶ月）では、それぞれ 1.7cm, 123.4g に増加していた。一方、GL および total-フラボノイド含量は、1年生（栽培 8 ヶ月）がそれぞれ 3.56% および 1.05% で、2年生（栽培 20 ヶ月）がそれぞれ 3.83% および 1.37% であった（Table 14）。

**Table 14 Growth and Glycyrrhizin Content of the Root from Cultured Plants (Strain C-2)**

Strain	Cultivation period (months)	Diameter (cm)	The number of lateral roots	Weight (g)		Glycyrrhizin content (%)	Total flavonoid content (%)
				Fresh	Dry		
C-2	8	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.2	34.8 ± 5.5	15.5 ± 2.4	3.56 ± 0.32	1.05 ± 0.04
	20	1.7 ± 0.1	0.9 ± 0.3	123.4 ± 19.2	49.9 ± 8.1	3.83 ± 0.20	1.37 ± 0.03

Each value represents the mean ± standard error (n= 10)

Strain C-2 については、ストロン由来の苗を供試して北海道地区の圃場で試作栽培した結果、2年生（栽培 24 ヶ月 n=12）の GL 含量は日本薬局方の規定値を超える 3.25 ± 0.49% で、total-フラボノイド含量も 1.98 ± 0.17% を示した（写真-11 Fig. 12）。これらの値は調査した市場品甘草（GL 含量が 3.29 ± 0.75 %，total-フラボノイド含量が 2.09 ± 0.49%）の平均値と同等の値であった。なお、前述の培養由来における total-フラボノ

イド含量 ( $1.37 \pm 0.03\%$ ) の結果より高い値を示したことから、栽培地を含めた外的環境が影響したとも考えられ、今後の検討課題として捉えた。

試作栽培 3 年生 (栽培 36 ヶ月  $n=15$ ) の GL 含量は  $4.05 \pm 0.57\%$  を、total-フラボノイド含量は  $2.56 \pm 0.28\%$  を示し、それぞれ 2 年生に比較して 1.2 倍強に増加した。



写真-11 北海道地区における Strain C-2 の試作栽培状況

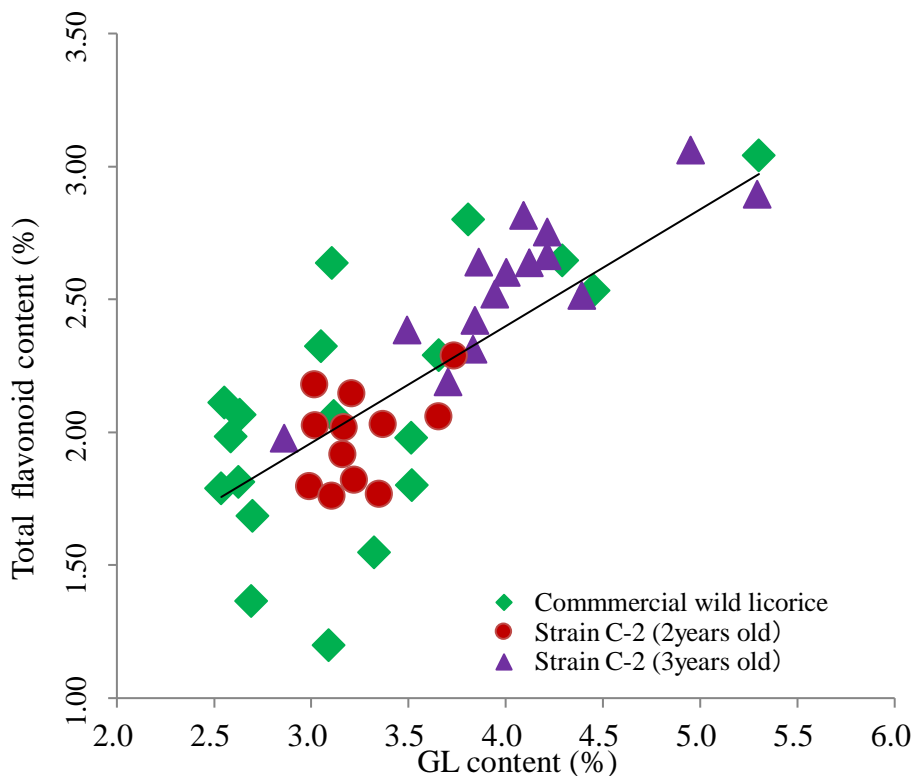


Fig. 12. GL and Total Flavonoid Contents of Commercial Licorice and Strain C-2

#### 8.4. 小括

栽培管理面では倒伏しない地上部の形状が望ましいことから，外部形態形質の変化を期待して **A-19**（♀）と **G-6**（♂）の交雑を実施した．

1. 交雑で得られた **Strain C-1** および同 **C-2** の生育は順調で，その **GL** は日本薬局方の規定値を超える値であった．一方，**A-19** の自殖 10 個体の地下部は，伸長が抑制されるなどの生育障害が見られたことから，種子生産に関する問題点として他家授粉の必要性が示唆された．
2. 交雑親よりも茎径の太い **Strain C-2** は，倒伏しにくい直立性を示していた．この形質は栽培管理する上で，機械化に適応した形態であり，除草等の管理作業の効率化が図れるものと考えられた．
3. **Strain C-1** と同 **C-2** を比較検討したところ，調査項目のすべてにおいて **Strain C-2** が高い値を示した．なお，それらの主根外皮の色調は，赤味を帯び，内部は濃い黄色味を呈していた．
4. 培養由来の **Strain C-2** の **GL** 含量と total-フラボノイド含量は，それぞれ 3.83% および 1.37% であった．
5. 北海道地区の圃場で試作栽培した **Strain C-2** は，2 年生において市場品甘草の **GL** 含量ならびに total-フラボノイド含量と同等の値を示し，圃場栽培の可能性が示唆された．また，成分含量は栽培期間によって増加する傾向が認められた．

選抜 2 個体の交雑により育成した **Strain C-2** については，その草丈が高く，茎は太く直立性で，地下部（主根）の生育量が大きいなどの特徴を有していた．また，その成分量として **GL 含量**と **total-フラボノイド含量**は市場品と同等であった．このように他のウラルカンゾウと明らかな区別性が認められたことから 2010 年にウラルカンゾウの栽培品種として『都 1 号』の名称で農林水産省に品種登録を出願した（写真 12）．



写真-12 品種登録に出願した「都1号」の開花状況

## ま と め

生薬『甘草』は、そのすべてを海外からの輸入に頼っている。特に、漢方薬に使用される甘草（ウラルカンゾウを基原としている）は、中国一国からの輸入である。近年、中国政府は、カンゾウ属植物の採取、輸出を規制しており、産出量の減少による価格の高騰と品質の低下が問題となっており、今後、良質な甘草を安価に確保することがますます難しくなると予想される。

そこで国内での栽培化に向けた取組みとして、栽培に適応した品種を作出することを目指し、次の3項目の栽培条件を明らかにした。

1. 遺伝的に均一な種苗（クローン）を確保する技術として、培養由来の植物体を容易に増殖できることが可能となった。
2. 地上に設置した筒栽培法は、植付けた種苗から発生した主根が極性に従って伸長する特性を利用したものであった。この栽培は半砂漠地域に自生するカンゾウ属植物の特性を利用したもので、これまでにない新規な栽培法である。さらに、栽培年数の明らかな地下部が収穫できることから、育種選抜の栽培評価系として最適と判断された。
3. 種苗として供試する部位として3種類（実生由来、ストロン由来、培養由来）を検討したが、それぞれに一長一短があり、目的に応じて使い分ける必要があると判断された。

つぎにコスト面を考慮した育種目標に向けて以下について取組んだ。

『1株あたりの新鮮根重が200g以上，GL含量が2.5%以上』

1. 保有する7系統を検討したが，地下部の生育量とGL含量には相反する傾向が認められ，結果的に目標値を満たす系統が見出せなかった。
2. 遺伝的に変異幅が拡大すると想定される種子を経由した5系統59実生個体について検討して，育種目標の数値を示した2個体（**A-19**および**G-6**）を選抜した。
3. 生産効率を含めた経済的（コスト面）な栽培期間としては，2年生の秋（12月）あるいは3年生の春（4月）が収穫時期として妥当と推察された。
4. 国内栽培に適応した栽培品種としては，これまでの数値目標に加え機械化に適応した倒伏し難い形態が望まれた。そこで，選抜された2個体の交雑を行い，適応した形状を有する **Strain C-2** を見出した。
5. 得られた **Strain C-2** は，母本株の **A-19** に順ずる成分含量を示し，それは市場品と同等の値を示した。また，茎の太さは，明らかに交雑親よりも太く倒伏しない直立性であった。

さらに，これまで栽培甘草の使用経験が無い国内の漢方医や薬剤師に向けて，栽培甘草の品質を保証する必要があった。そこで，日本薬局方



の化学的品質評価のための規定値（GL 含量が 2.5%以上）に加えて、甘草の効能に大きく関与していると考えられた甘草含有フラボノイド成分の一斉分析法を開発し、市場品との比較を行った。また、これは育種段階から考慮した。

なお、本研究では栽培品種の育種目標について、当初は GL 高含量を目指して **A-19**（5%以上）を育成したが、甘草を含む漢方製剤を処方する場合、「偽アルドステロン症」の副作用の危険性が高まると考えられた。しかし、交雑することで育成した **Strain C-2** は、倒れにくい地上部の形状とともに、その GL 含量と total-フラボノイド含量は市場品と同等の値を示した。また、北海道地区での試作栽培の結果から、圃場栽培による生薬「甘草」の生産が現実的となった。

#### 総括：

このように育成した **Strain C-2** については、地上部の外部形態形質ならびに地下部の生育量において有益な形質を有しており、その成分含量は市場品と同等であったことから、2010 年には世界初のウラルカンゾウの栽培品種として『**都 1 号**』の名称で農林水産省に登録出願した。

生薬「甘草」の国産化を目指した本研究は、100%を輸入に頼っていたわが国の生薬に対する安定的な供給の一つの事例となるものと考えられる。また、漢方薬を必要される多くの患者に対しては安心・安全を提供するものであった。さらには、地球規模で問題となっている急激な砂漠化に対して、地球環境保全にも繋がるものと考えられた。なお、野生品が主体となっている他の生薬に対して、日本国内での薬用植物資源の育成に繋がる指針となるものと期待している<sup>35)</sup>。

## 謝 辞

本研究は，大阪薬科大学 芝野真喜雄准教授との共同研究で進めてきたものであり，謹んで感謝の意を表します．

優良個体の遺伝子解析を含め，種々の研究においてご協力いただいた岩手医科大学薬学部 林宏明准教授に謹んで感謝の意を表します．また，技術的なご助言をいただいた医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターセンター長 川原信夫博士，同研究センター北海道研究部前リーダー 柴田敏郎博士，同研究センター 林茂樹博士ならびに武田薬品工業（株）京都薬用植物園前園長 渡辺斉氏に深謝いたします．

本研究の完遂にあたり，ご理解とともに種々のご助言を賜りました元大阪薬科大学教授 草野源次郎先生，馬場きみ江名誉教授，谷口雅彦教授に厚くお礼申し上げます．また，成分分析等においてご協力いただいた大阪薬科大学生薬科学研究室の諸氏に深謝いたします．

北海道において試作栽培にご協力いただいた橋本正和氏を始めとする栽培者の方々に厚くお礼申し上げます．

そして，本研究の機会を与えていただき，その完遂にご配慮いただいた武田薬品工業（株）京都薬用植物園園長 今村芳功氏，同社ヘルスケアカンパニー 吉富史郎主席部員に深く感謝いたします．

## 実験の部

### 略語

MS ; Murashige and Skoog	B5 ; Gamborg	NT ; Nagata and Takebe
LS ; Linsmaier and Skoog	BAP ; ベンジルアミノプリン	
IAA ; 3-インドール酢酸	IBA ; 3-インドール酪酸	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; 硝酸態窒素	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ; アンモニア態窒素	

### 栽培地

保有するウラルカンゾウ (*G. uralensis* Fisher) の各系統は、京都市左京区一乗寺竹ノ内町の武田薬品工業 (株) 京都薬用植物園内のコンクリートポット (60 × 60 × 60 cm) で保存栽培しており、栽培実験も同園内で実施した。実験に使用した系統を以下に示した。

タケダ 88-308 ; 東京大学薬学部 (Strain A)

タケダ 97-211 ; 山梨県甘草屋敷

タケダ 86-419 ; ロシア 1(Hortus Botanicus Instituti Viar, USSR)

タケダ 97-260 ; 中国・瀋陽薬科大学

タケダ 96-208 ; 医薬基盤研北海道

タケダ 96-331 ; 北海道医療大学

タケダ 87-458 ; ロシア 2 (Strain G) (Hortus Botanicus Instituti Plantarum  
Medicinalium Moscow, USSR)

## 第 2 章に関する実験（茎頂培養）

### 実験材料

タケダ 86-419 のストロン由来の苗を供試した。

### 実験方法

#### 初期培養（無菌植物の育成）

ストロンを約 5cm に切断してバーミキュライトを床土とした鉢に埋めて出芽させた。その後、未だ展開していない芽を採取してクリーンベンチ内に持ち込み 70% エタノールで約 1 分間、1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 5 分間浸漬し、滅菌水で 3 回洗う。その後、実態顕微鏡下で茎頂の先端部のみを切り出し、予め滅菌しておいた培地（1/3 濃度に希釈した MS 培地に IAA0.1mg/L, BAP0.2mg/L, 1% sucrose を添加した固形培地）に置床した。

#### 培養条件

固形培地は予め培養ポット（麒麟社製）に入れて滅菌処理を実施する。培養は通常 25°C・16 時間照明条件下で行い、5～6 枚の葉数まで成長した時点で、次の増殖段階に移すことができる。1 枚の葉を付けた各節を切り出して新たな培地に置床する。その後は 30 日間隔で継代培養を繰り返す。継代培地は 1/3 濃度に希釈した MS 培地に IBA0.1mg/L, 1% sucrose を添加した固形培地を用いた。

#### 試験区

窒素比に関しては、総窒素量を MS 培地の 60mM とし、 $\text{KNO}_3$ （硝酸態として）と  $\text{NH}_4\text{Cl}$ （アンモニア態として）を用いた。その比率( $\text{NO}_3$ : $\text{NH}_4$ )は、1:0, 55:5, 50:10, 45:15, 40:20, 30:30, 20:40, 10:50, 0:60

の 9 試験区を設けた。なお、減少分の成分（カリウム）については、塩化カリウム（KCl）で補った。

総窒素量と sucrose 濃度に関しては、前者を MS 培地の 60mM（ $\text{KNO}_3$ :1900mg/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ :1650mg/L）を基本に 0mM（無添加）、30mM、60mM および 90mM とし、後者を 1%、3% および 6% として組み合わせた 12 試験区で実施した。

## 調査項目

培養 30 日後にシュートの長さ、節数、根の長さおよび根数を調査した。

## 第 3 章に関する実験（栽培方法の確立）

### 実験材料

栽培方法の検討にはタケダ 86-419 の実生由来の苗を用い、供試材料の比較にはタケダ 97-211 および同 86-419 のストロン由来、培養由来および実生由来の苗を用い、主根の基部からの位置（長さ）に関してはタケダ 88-308、同 97-211、同 96-331 および同 87-458 の実生由来の苗と、タケダ 97-211、同 86-419、同 96-208 および同 96-331 のストロン由来の苗を供試して検討した。

## 実験方法

### 栽培方法

栽培筒には下水道管として汎用されている径 10 cm の塩化ビニール製のパイプを 50、75 および 100 cm の長さに切断し、排水用として 7 mm

の穴を5ヶ所に空けたキャップを接着したものをを用いた。培養土としては廃棄植物を5年間堆積させて作製した腐植壤土(pH6.2-6.3)を8mmの篩にかけ、乾燥牛肥と消石灰をそれぞれ40:2:1の割合で混合したものをを用いた。このようにして調整した培養土を50, 75および100cmの筒にそれぞれ4.0, 6.0および8.0Lを充填して上下に3回程度振動して鎮圧した。

予備検討とした筒栽培は、50および100cmの栽培筒にタケダ86-419のストロンを1998年3月23日に植え付けて栽培を開始し、1999年12月2日に掘り上げて地下部の形状を観察した。

栽培筒の長さに関する実験には50, 75および100cmの長さに調節した栽培筒を、供試材料に関する実験には75cmの栽培筒を、主根の位置に関する実験には50cm(ストロン由来苗)と75cm(実生由来苗)の栽培筒を用いた。

供試苗としては、ストロン由来は5cmの長さに切断したストロンを2002年3月26日に、培養由来は順化して育成した苗を同年4月16日にそれぞれの筒に植付けた。実生由来は同年1月30日に発芽前処理として一昼夜25℃の水に浸した種子2粒を筒に直播して加温ハウスで育成した後、発芽が揃った同年2月20日に間引きして1本に整え、同年4月16日に圃場に移動した。

栽培条件として、それぞれの長さに調節した栽培筒を地上40cmに固定した市販のワイヤーメッシュ(100×200cm 15cm角)の枠内に市松状に39本/2m<sup>2</sup>を搬入して倒伏を防止した。管理面では適宜灌水ならびに殺虫剤(オルトラン)を散布した。また、2002年12月1日には培養土の沈下が5-10cm見られたことから培養土を補充した。

## 調査項目

2003年12月1日に2年生（栽培22ヶ月）として各区2-9本を掘上げ、筒で生育した地下部の形状と生育量ならびにそのGL含量について調査した。主根の基部からの位置（長さ）に関しては主根基部とその60cm下（実生由来）と50cm下（ストロン由来）について調査した。なお、筒長の影響を調査する実験における50cm区は40cm下を調査対象とした。

## グリチルリチン酸（GL）含量測定

### 装置

日本分光(株)JASCO製の高速液体クロマトグラフ：PU980（ポンプ）、UV-1575（検出器）、CO-960（カラムオーブン）、AS-2055（オートサンプラー）、807-IT（インテグレーター）を用いた。

### サンプル調製

検体は40℃で温風乾燥した後、全量を粉砕して試料とした。甘草粉末50mgを精秤し、内部標準物質（*p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-プロピル）0.01mg/mLを含む50%EtOHを10mL加え、20min超音波抽出した。その抽出液を0.45μmのフィルターでろ過し、HPLCのサンプルとした。

### 分析条件

2点検量線内部標準法で行った。グリチルリチン標準品はナカライテスク（株）より購入した。含量計算は1検体につき3点を分析し、それぞれの含量の平均値で算出した。

カラム：Crestpak C18T（i.d. 4.6mm × 150mm）

移動相：酢酸水(1⇒15)：CH<sub>3</sub>CN=3：2

流速：0.6mL/min

温度：40°C

検出：254nm

注入量：20 μL

## 第4章に関する実験（保有系統の評価）

### 実験材料

タケダ 88-308, 同 97-211, 同 86-419, 同 97-260, 同 96-208, 同 96-331  
および同 87-458 の 7 系統のストロン由来の苗を供試材料とした。

### 実験方法

#### 栽培方法

ストロンはそれぞれ約 5 cm の長さに切断して 2000 年 3 月に培養土を充填した 50cm の筒に植付けた。管理面は第 3 章に準じた。

#### rbcL 遺伝子の増幅と塩基配列の決定

ウラルカンゾウの乾燥した葉より、cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)法により全 DNA を抽出した。次に、rbcL 遺伝子において、ウラルカンゾウとスペインカンゾウの間で 2 塩基の置換がみられる領域 (240-bp) を 2 種のプライマー、5' -TTTATGGGTTGGAGAGACCG-3' と 5' -AAGTAGACCATTATCTCGGC-3' を用いて増幅させた。PCR 反応は、95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分の過程を 30 サイクル行い、その産物を ExoSAP-IT(Amersham Pharmacia Biotech)でプライマーを除いた後、ジデオキシ法で 373A DNA sequencer (PE Biosystems)を用いてシ



ークエンスした。

## 調査項目

系統間の地上部形態形質については、コンクリートポットで4年間栽培した各系統の地上部の草丈ならびに中位に展開する生育旺盛な複葉（3～4葉）を採葉し、その複葉を形成する7～13枚の小葉について縦長（葉身）と横長（葉幅）をそれぞれ33枚調査した。葉の波打ちについては全体の状況を生育旺盛な8月に観察した。また、2000年6月あるいは9月に開花結実した5系統の莢果を採取し、その大きさと種子100粒の重量を測定した。

ストロン由来の苗を植付けて2001年12月に2年生（栽培20ヶ月）として各系統3～14本を掘上げ、地下部の生育量（主根の太さ、長さ、本数および新鮮重量）ならびにそのGL含量について調査した。主根の太さに関しては主根の基部とその50cm下について測定した。

## グリチルリチン酸（GL）含量測定

第3章に記載した通りで実施した。

## 第5章に関する実験（実生個体の評価）

### 実験材料

タケダ 88-308（Strain A）、同 97-211、同 86-419、同 96-331 および同 87-458（Strain G）の実生由来の苗を供試材料とした。また、一次選抜した5個体（A-16、A-17、A-19、G-2 および G-6）については、それぞれに形成されたストロン由来の苗を用いた。

## 実験方法

### 栽培方法

開花結実した5系統の種子を2001年3月に発芽前処理として一昼夜25℃の水に浸し、70cmの筒に種子1粒ずつを直播して加温ハウスで育成した後、発芽が揃った同年4月に圃場に移動した。さらに、一次選抜された5個体については、それぞれの個体で形成されたストロンを約5cmの長さに切断して2003年3月に培養土を充填した70cmの筒に植付けた。管理面は第3章に準じた。

### 調査項目

2002年12月に2年生（栽培20ヶ月）として各個体群4～28本を掘上げて第4章と同様の項目で調査した。選抜の目標値としては地下部（主根）の新鮮根重が200g/株以上、GL含量は2.50%以上とした。また、ストロンについては、発生が不定期で栽培（生育）年次が不明瞭な点、ならびに繁殖材料となることから選抜の指標からは除くことにした。

一次選抜した5個体については、ストロン由来の苗を用いた栽培を開始して2003年12月に1年生（栽培8ヶ月）として各個体2～4本を、2004年12月に2年生（栽培20ヶ月）として各個体2～5本を掘上げて第4章と同様の項目で調査した。

### グリチルリチン酸（GL）含量測定

第3章に記載した通りで実施した。

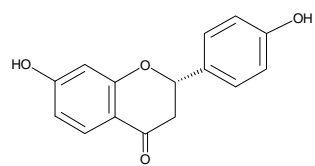
## 第 6 章に関する実験（化学的評価）

### 装置

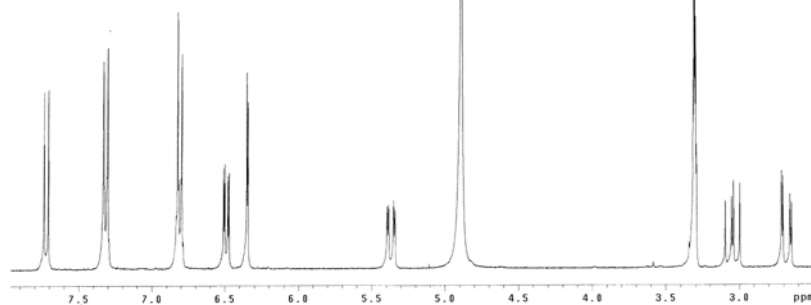
分析用として，島津製超高速液体クロマトグラフ Prominence Nexera X（LC-30AD, SIL-30AC, SPD-M20A, CTO-20A, DGU-20A5）を用いた．また，分取 HPLC には，島津製 LC-10AT（ポンプ），SDP-10A（検出器），SCL-10A（コントローラー）を用いた．

### 標準品の単離精製

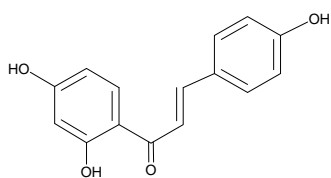
市場品甘草の刻み 300g をメタノール 3L で 3 時間還流抽出し，この操作を 3 回繰り返した．その抽出液を減圧下，濃縮し，メタノール抽出エキスを 78.5g 得た．次に，このエキスを 35% HCl-H<sub>2</sub>O-MeOH（1：2：2）250mL を加え，2 時間，加水分解した．冷後，10% NaOH 水溶液で中和し，シリカゲルカラムクロマトグラフィー（Wako gel 400g, 5.3cm×50cm, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 50:1→1:1）に付し，51 フラクシオンを得た．この Fr.22-31 を分取条件 1 により分取 HPLC に付し，イソリクイリチゲニン（ISO）を 65mg，フォルモノネチン（FOR）16mg を得た．また，Fr.32-44 を分取条件 2 により分取 HPLC に付し，リクイリチゲニン（LIQ）を 151mg，を得た．それぞれの同定は，核磁気共鳴スペクトル法（NMR）および質量分析法（MS）により行った．



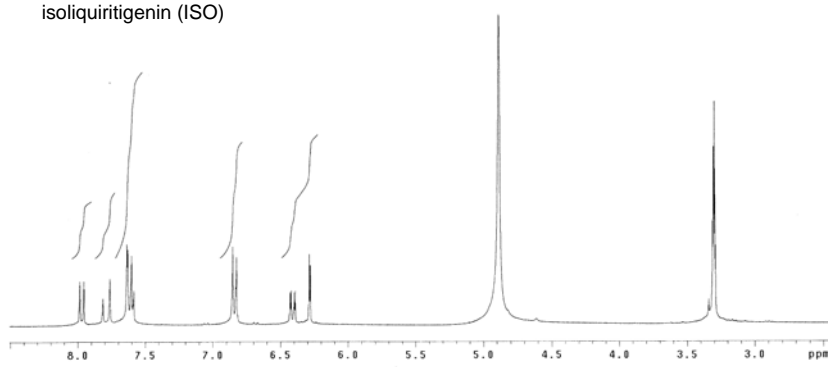
liquiritigenin (LIQ)



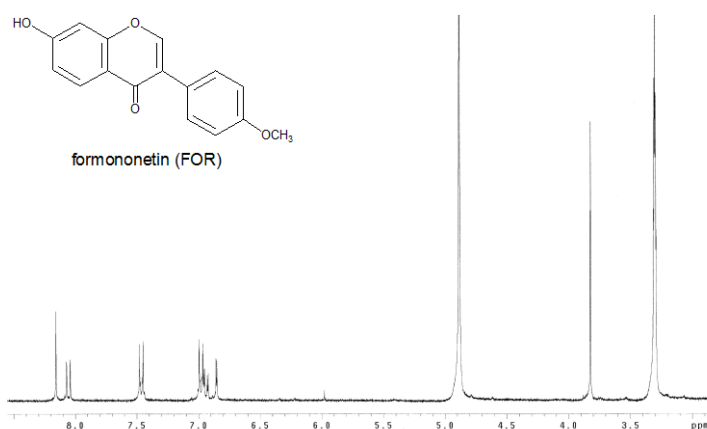
$^1\text{H-NMR}$  spectrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300MHz) of LIQ



isoliquiritigenin (ISO)



$^1\text{H-NMR}$  spectrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300MHz) of ISO



<sup>1</sup>H-NMR spectrum (CD<sub>3</sub>OD, 300MHz) of FOR

### 分析条件

カラム : Simpack XR-ODS III 2.0mm×150mm (SHIMADZU)

移動相 : 23% アセトニトリル (1% 酢酸)

流速 : 0.4mL/min 温度 : 40°C

検出 : UV254nm 注入量 : 5 μL

### Regression Equations and Respective Correlation Coefficients for the Quantitative Determination of LIQ, ISO and FOR

Concentration (mg/mL)	Mean peak area (N = 5)	% RSD	Correlation coefficient : (r)	Slope	Intercept
LIQ			0.9998	16794516	26736
0.04	605022	1.10			
0.08	1389679	0.61			
0.16	2769298	0.63			
0.32	5459210	0.71			
0.64	10735674	0.54			
ISO			0.9999	30517101	□□28567
0.01375	373155	1.10			
0.0275	818308	0.45			
0.055	1667665	0.71			
0.11	3321771	0.67			
0.22	6684180	0.38			
FOR			0.9999	74088236	□□26513
0.0075	500848	0.97			
0.015	1106839	0.53			
0.03	2232946	0.69			
0.06	4378080	0.38			
0.12	8874239	0.14			

## 検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ)

検出限界付近のデータを集めるため、検量線作成に用いた最も低濃度の標準溶液 LIQ (0.04 mg/mL), ISO (0.01375 mg/mL), FOR (0.0075 mg/mL)をメタノールでさらに希釈した 10 倍, 100 倍, 200 倍溶液を得て分析した。その結果、検量線の傾き (S) は  $S_{\text{LIQ}}=15208750$ ,  $S_{\text{ISO}}=29052727$ ,  $S_{\text{FOR}}=65733148$  となり、測定値の標準偏差 ( $\sigma$ ) をあてはめ、次式によりフラボノイド成分の定量限界を求めた。

$$\text{LOD} = 3.3 \sigma / S; \text{LOQ} = 10 \sigma / S$$

## サンプル調製

甘草の粉末 300mg を精秤し、35% HCl:MeOH(1:6)10mL を加え、2 時間還流した。14%アンモニア性 MeOH3.5mL により中和処理後、ろ過液を MeOH で 20mL にメスアップし、HPLC サンプルとした。

## 成分定量 (total-フラボノイド含量)

フラボノイド成分に関しては、リクイリチゲニン、イソリクイリチゲニン、フォルモノネチンの含量の総計を total-フラボノイド含量とした。

## ピーク純度

各フラボノイド成分のピーク純度は、HPLC 条件を変更して確認した。

カラム : Nucleosil 100-5PE 4.6mm×150mm (Machery-Nagel)

移動相 : 28%アセトニトリル (1%酢酸) 流速 : 0.6mL/min

温度 : 40°C 検出 : UV254nm 注入量 : 5  $\mu$  L

## 精度 (日内変動及び日差変動)

同一の甘草サンプルを異なった 3 日間で分析することにより、それ

ぞれのフラボノイド成分の定量を行い，日内および日差変動のデータの相対標準偏差（%RSD）を算出した．

**Intraday and Intraday Precision of the HPLC Method for the Quantitative Determination of LIQ, ISO and FOR**

Analyte	Mean content	Mean content	Mean content	% RSD intraday			% RSD interday
	(% of dry weight) n=5 day 1	(% of dry weight) n=5 day 2	(% of dry weight) n=5 day 3	( day 1 / day 2 / day 3 )			
LIQ	1.096	1.091	1.084	2.14	1.38	2.13	0.50
ISO	0.487	0.493	0.491	2.01	1.80	1.05	0.51
FOR	0.022	0.022	0.022	1.05	1.05	1.26	0.00

### GL 含量測定

サンプル調製法は，第 3 章で述べた方法に準じたが，分析条件は以下のように改良し，絶対検量線法にて測定した．

カラム：Cosmosil 2.5C<sub>18</sub>-MS-II 2.0mm×100mm（ナカライテスク）

移動相：28%アセトニトリル（6.7% 酢酸）

流速：0.4mL/min 温度：40℃

検出：UV254nm 注入量：5 μL

グリチルリチン酸標準品は，日本公定書協会のもを使用し，標準液を 8.0mg/10mL, 4.0mg/10mL, 2.0mg/10mL, 0.4mg/10 mL, 0.2mg/10mL に調製し，検量線を得た．（ $y = 1499965x - 8185$ ,  $r = 0.999$ ）

## 第 7 章に関する実験（年次的変化）

### 実験材料

二次選抜した 2 個体（**A-19** および **G-6**）の年次的あるいは季節的変化に関しては，それぞれの培養由来の苗を供試した．市場品サンプルは，親和物産（株），（株）栃本天海堂，（株）ウチダ和漢薬，三國（株），福田商店，（株）ヤマダ薬研などから購入または分与された甘草（主に

東北甘草，西北甘草）19 品目とした．

## 実験方法

### 栽培方法

それぞれの培養由来苗を 2006 年 4 月に培養土を充填した 50cm の筒に植付けた．管理面は第 3 章に準じた．

### 調査項目

二次選抜した 2 個体の季節的消長に関しては，植付け後 4 ヶ月毎に各 5 本を掘上げ，3 年目以降は年次的として各 12 月に各 5 本を掘上げて調査した．

### 化学成分含量測定

GL 含量および total-フラボノイド含量は第 6 章に記載した通りで実施した．

## 第 8 章に関する実験（交雑品種の評価）

### 実験材料

**A-19** と **G-6** の交雑で得られた **Strain C-1** と同 **C-2** および **A-19** の自家受粉（自殖）によって得られた **Strain S-1**～**S-10** については，実生由来，培養由来およびストロン由来の苗をそれぞれの比較実験で供試した．なお，地上部の形状を比較する実験には，**Strain C-1** および同 **C-2** に加えて，交雑親である **A-19** および **G-6** のストロン由来苗を供試した．



## 実験方法

### 栽培方法

交雑実生苗に関しては，発芽後の生育状態が懸念されることから，管理面を考慮して直径 55cm の円形プランター（450）で栽培することにした．2005 年 3 月に種子を発芽前処理として一昼夜 25 °C の水に浸し，育苗ポット（直径 6cm）に 1 粒ずつ播種して加温ハウス内で育成した後，本葉 2 枚を展開した同年 4 月に培養土を充填したプランターに植付けて圃場に移動した．

Strain **C-1** および同 **C-2** のストロン由来の栽培については，それぞれのストロンを約 5 cm の長さに切断して 2007 年 4 月に培養土を充填した 50cm の筒に植付けた．また，Strain **C-2** の培養由来の栽培については，順化育成した苗を 2009 年 4 月に養土を充填した 50cm の筒に植付けた．いずれも用土ならびに管理面は第 3 章に準じた．

北海道地区の試作栽培に関しては，2010 年 9 月に掘り上げた Strain **C-2** のストロンを約 5cm の長さに切断して供試材料とした．調整したストロンを同年 10 月に約 20cm 間隔（条間 60cm）で圃場に埋設（直播き）した．

### 調査項目

Strain **C-1** と同 **C-2** および Strain **S-1**～**S-10** の実生由来については，2006 年 12 月に 2 年生（栽培 20 ヶ月）として掘上げ，地下部の生育量ならびにその GL 含量について調査した．主根の根径に関してはその基部を測定した．

Strain **C-1** と同 **C-2** および，それらの交雑親の Strain **A-19** と同 **G-6**

のストロン由来については、生育最盛期の 2008 年 8 月（栽培 15 ヶ月）に草丈、萌芽している茎数ならびに茎の太さ（地際 10cm 上）を調査した。また、Strain C-1 および同 C-2 については、2008 年 12 月に 2 年生（栽培 20 ヶ月）として各 5 本を掘上げ、上述と同様の項目で調査した。

Strain C-2 の培養由来については、2009 年 12 月に 1 年生（栽培 8 ヶ月）として、2010 年 12 月に 2 年生（栽培 20 ヶ月）として各 10 本を掘上げ、上述と同様の項目で調査した。

北海道地区の試作栽培に関しては、2012 年 10 月に 2 年生（栽培 24 ヶ月）として 12 株を、2013 年 10 月に 3 年生（栽培 36 ヶ月）として 15 株をそれぞれ掘上げて調査した。

## 化学成分含量測定

GL 含量および total-フラボノイド含量は第 6 章に記載した通りで実施した。

## 論文目録

本学位論文は以下の原著論文に基づいている。

1. Comparative Analysis of Ten Strains of *Glycyrrhiza uralensis* Cultivated in Japan.

Hiroaki Hayashi, Kenichiro Inoue, **Kazuo Ozaki** and Hitoshi Watanabe, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1113-1116 (2005)

2. 甘草の国内生産を目指して(1) :

ウラルカンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis*)の筒栽培について

**尾崎和男**, 芝野真喜雄, 草野源次郎, 渡辺 齊, 生薬学雑誌, **61**, 89-92 (2007)

3. 甘草の国内生産を目指して(2) :

ウラルカンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis*)の優良個体の選抜について

**尾崎和男**, 芝野真喜雄, 草野源次郎, 渡辺 齊, 生薬学雑誌, **64**, 76-82 (2010)

4. Determination of Flavonoids in Licorice Using Acid Hydrolysis and Reversed-Phase HPLC and Evaluation of the Chemical Quality of Cultivated Licorice.

Makio Shibano, **Kazuo Ozaki**, Hitoshi Watanabe, Masahiko Taniguchi, Kimiye Baba, *Planta Med.*, **76**, 729-733 (2010)

5. Aim for Production of Glycyrrhizae Radix in Japan (3):

Development of the New Licorice Cultivar.

**KazuO Ozaki**, Makio Shibano, *Journal of Natural Medicines*, **68**,  
358-362(2014)

参考論文

1. 甘草屋敷のウラルカンゾウ復活

草野源次郎, 芝野真喜雄, 鈴木直樹, 渡辺 斉, **尾崎和男**, 柴田敏郎,  
畠山好雄, 飯島 泉, *Nat. Med.*, **54**, 199-203 (2000)

2. ウラルカンゾウの培養と栽培

**尾崎和男**, 渡辺 斉, 薬用植物研究, **24**, 23-30 (2001)

3. 数種のカンゾウ属植物に関する薬用植物学的研究

草野源次郎, 芝野真喜雄, 渡辺 斉, **尾崎和男**, 薬学雑誌, **123**, 619-631  
(2003)

4. 植物二次代謝産物の高効率生合成グリチルリチン高含有量個体の育成

**尾崎和男**, 芝野真喜雄, *Bio. Ind.*, **28**, 12-26 (2011)

## 引用文献

- 1) 姜東孝, 大阪府薬雑誌, **63**, 22-25 (2012)
- 2) 柴田承二, 現代東洋医学, **2**, 46-55 (1981)
- 3) 高木敬次郎, 現代東洋医学, **2**, 34-37(1981)
- 4) 岡野正憲, 現代東洋医学, **2**, 29-33(1981)
- 5) 西本和光, 安田一郎, 現代東洋医学, **2**, 56-62(1981)
- 6) 華原龍津, 第1回甘草シンポジウム (山梨県塩山), 43-46 (2001)
- 7) 近藤健児, 植物研究雑誌, **74**, 53-59 (1999)
- 8) 大西佳二, 第2回甘草シンポジウム (山梨県清里), 5-7 (2003)
- 9) 米田諄典, 現代東洋医学, **14**, 74-79 (1993)
- 10) 芝野真喜雄, 川瀬さおり, 村上理恵, 喜多優二, 草野源次郎, 柴田敏郎, 畠山好雄, 縣 功, *Nat. Med.*, **54**, 70-74 (2000)
- 11) 熊谷健夫, 第1回甘草シンポジウム (山梨県塩山), 6-11 (2001)
- 12) 柴田敏郎, 第3回甘草シンポジウム (北海道名寄), 3-7 (2005)
- 13) 林 茂樹, 柴田敏郎, 第5回甘草シンポジウム (京都), 6-13 (2011)
- 14) 芝野真喜雄, 薬用植物研究, **33**, 7-9 (2011)
- 15) 第十六改正日本薬局方, 日本公定書協会 (2006)
- 16) 吉川展司, 伊藤 眞, *FFI JOURNAL*, **217**, 38-46 (2012)
- 17) Yamamoto Y., Tani T., *J. Trad. Med.*, **19**, 87-92 (2002)
- 18) Yamamoto Y., Majima T., Sasaki I., Tani T., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1144-1149 (2003)
- 19) 戸田則明, 佐々木聡子, 武田修巳, 魏 勝利, 王 文全, 王 永剛, 施 樺, 李 剛, 生薬学雑誌, **66**, 65-70 (2012)

- 20) 尾崎和男, 第1回甘草シンポジウム(山梨県塩山), 12-16 (2001)
- 21) 角谷晃司, 尾崎和男, 渡辺 斉, 友田勝巳, *Nat. Med.*, **51**, 447-451(1997)
- 22) Murashige T., Skoog F., *Physiol. Planta*, **15**, 473 (1962)
- 23) Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K., *Exp. Cell Res.*, **50**, 151 (1968)
- 24) Nagata T., Takebe I., *Planta*, **99**, 12 (1971)
- 25) 角谷晃司, 尾崎和男, 渡辺 斉, 芝野真喜雄, 草野源次郎, 友田勝巳, *Nat. Med.*, **55**(6), 287-293 (2001)
- 26) Hayashi H., Hosono N., Kondo M., Hiraoka N., Ikeshiro Y., Shibano M., Kusano G., Yamamoto H., Tanaka T., Inoue K., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 602-606 (2000).
- 27) Hayashi H., Hattori S., Inoue K., Sarsenbaev K., Ito M., Honda G., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 867-871 (2003).
- 28) 芝野真喜雄, 尾崎和男, 薬用植物研究, **32**, 3-8 (2010)
- 29) Chin Y.W., Jung H.A., Liu Y., Su B.N., Castoro J.A., Keller W.J., Pereira M.A., Kinghorn A.D., *J. Agric. Food. Chem.*, **55**, 4691-4697 (2007)
- 30) Kwon G.T., Cho H.J., Chung W.Y., Park K.K., Moon A., Park J.H.Y., *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 663-676 (2009)
- 31) Jayaprakasam B., Doddaga S., Wang R., Holmes D., Goldfard J., Li X.M., *J. Agric. Food. Chem.*, **57**, 820-825 (2009)
- 32) Ma J., Fu N.Y., Pang D.B., Wu W.Y., Xu A.L., *Planta Med.*, **67**, 754-757 (2001)
- 33) Kumar S., Sharma A., Madan B., Singhal V., Ghosh B., *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 1602-1612 (2007)

- 34) 佐田義尚, 田中重雄, 田端守, 尾崎和男, 小宮威弥, 生薬学雑誌,  
**47**, 235-242 (1993)
- 35) 小池 宙, 吉野雄大, 松本紘太郎, 竹原朋宏, 竹本 治, 松浦恵子,  
渡辺賢治, *Kampo Med.*, **63**, 238-244 (2012)