

重要漢薬の組織培養によるクローン増殖 と有用二次代謝産物の生産に関する研究

ミシマサイコ、カギカズラ、
リンドウ、サフラン、クチナシについて

1996年
奈女良 昭

重要漢薬の組織培養によるクローン増殖 と有用二次代謝産物の生産に関する研究

ミシマサイコ、カギカズラ、
リンドウ、サフラン、クチナシについて

1996年1月
奈女良 昭

目次

緒論	1
第1章 ミシマサイコの組織培養について	7
第1節 苗条原基の形成によるクローン増殖法	9
第1項 苗条原基形成に適した植物ホルモン濃度の検討	9
第2項 苗条原基の苗化に適した植物ホルモン濃度の検討	12
第3項 染色体数の調査	14
第4項 土壌への移植	17
第5項 まとめ	17
第2節 薄層クロマトグラフィーによる成分の検討	19
第1項 各組織の成分検討	19
1-1. 苗条原基の生産する成分検討	19
1-2. 苗化させた植物体の根の成分検討	19
1-3. カルスの成分検討	19
第2項 まとめ	19
第2章 カギカズラの組織培養について	21
第1節 カルス培養によるアルカロイドの生産	22
第1項 カルス誘導の検討	22
第2項 アルカロイド生産の確認	23
第3項 カルス増殖の検討	24
第4項 植物ホルモンの検討	24
第5項 基本培地の検討	26
第6項 糖濃度の検討	27
第7項 固形化剤の検討	28
第8項 窒素源の検討	29
第9項 生長曲線	30
第10項 まとめ	31
第2節 アルカロイドの分析	31
第1項 アルカロイドの抽出法の検討	31
第2項 定量法の検討	31
第3項 検量線の作成	32
第4項 まとめ	33

第3節	カルス成分の単離	33
第1項	カルス増殖と成分抽出	33
1.	カルス増殖の検討	33
2.	カルス成分の抽出	33
第2項	化合物の同定	34
第3項	まとめ	37
第3章	リンドウの組織培養について	38
第1節	多芽体形成による大量増殖法	39
第1項	茎頂培養による多芽体形成培地の検討	39
1.	GAとBAPとの組み合わせによる検討	39
2.	IAAとBAPとの組み合わせによる検討	41
3.	NAAとBAPとの組み合わせによる検討	41
第2項	多芽体形成の最適条件の検討	41
第3項	発根条件の検討	43
第4項	まとめ	44
第2節	培養生株の品質評価	45
第1項	定量法の検討	45
第2項	検量線の作成	45
第3項	培養生株の均質性	46
第4項	まとめ	47
第4章	サフランの組織培養について	48
第1節	サフランの各器官からの柱頭様組織の形成	49
第1項	柱頭様組織の形成に適した植え付け器官の検討	49
1.	柱頭・花柱部植え付け	50
2.	花被・やく・花糸部植え付け	50
3.	花被から子房へ続く部分植え付け	50
4.	子房および胚珠部植え付け	50
第2項	柱頭様組織の形成に適した植物ホルモン濃度の検討	51
1.	LS培地での検討	51
2.	G培地での検討	51
第3項	まとめ	54
第2節	柱頭様組織の大量増殖	54
第1項	柱頭様組織の成熟化	54

第2項	培養により形成された柱頭様組織からのカルス及び	
	柱頭様組織の形成	56
第3項	まとめ	56
第3節	柱頭様組織の成分検討および定量	58
第1項	柱頭様組織の成分検討	58
第2項	柱頭様組織中の crocin の定量	58
1.	定量法の検討	58
2.	検量線の作成	59
第3項	まとめ	59
第5章	クチナシの組織培養について	60
第1節	クチナシの各器官から黄色色素の生産	61
第1項	黄色色素の生産に適した器官の検討	61
1.	子房部植え付け	62
2.	果実部植え付け	62
第2項	黄色色素の生産に適した植物ホルモンの検討	62
1.	NAAとBAPとの組み合わせによる検討	62
2.	IAAとBAPとの組み合わせによる検討	62
3.	IBAとBAPとの組み合わせによる検討	64
第3項	まとめ	64
第2節	カルスの成分検討および定量	64
第1項	カルスの成分検討	64
第2項	カルス中の crocin の定量	64
第3項	まとめ	66
実験の部		67
一般法		67
第1章に関する実験		68
1.	材料	68
2.	切片の調製	68
3.	培地の調製	68
4.	培養条件	70
5.	超薄切片作成	70
6.	走査型電子顕微鏡試料作成	71
7.	染色体観察	72

8. 土壌への移植	74
第2章に関する実験	75
1. 材料	75
2. 切片の調製	75
3. 培地の調製	75
4. 培養条件	75
5. アルカロイド生産条件の検討	75
6. アルカロイド類の成分分析	75
7. アルカロイドの抽出法	76
8. アルカロイドの定量	76
9. アルカロイド定量の装置および測定条件	76
10. カルスの抽出および単離精製	77
第3章に関する実験	79
1. 材料	79
2. 切片の調製	79
3. 培地の調製	79
4. 培養条件	79
5. 成分定量の試料調製	79
6. 成分定量の装置および測定条件	80
第4章に関する実験	81
1. 材料	81
2. 切片の調製	81
3. 培地の調製	81
4. 培養条件	81
5. 成分確認および定量の試料調製	81
6. 成分確認の装置および測定条件	82
7. 成分定量の装置および測定条件	82
第5章に関する実験	83
1. 材料	83
2. 切片の調製	83
3. 培地の調製	83
4. 培養条件	83
5. 成分確認および定量の試料調製	83
6. 成分確認の装置および測定条件	84

7. 成分定量の装置および測定条件	84
総括	85
引用文献	88
論文目録	92
謝辞	93

本論文中の略語

本論文中では、用いた基本培地および植物生長調節物質を以下のように略した。

1. 基本培地

MS : Murashige & Skoog medium

LS : Linsmaier & Skoog medium

G : Gamborg B5 medium

W : White medium

2. 植物生長調節物質 (植物ホルモン)

2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

NAA : α -naphthaleneacetic acid

IAA : 3-indoleacetic acid

IBA : 3-indolebutyric acid

BAP : 6-benzylaminopurine

Kin : kinetin

GA : gibberellin A₃

3. 検討培地の表記法

種々の濃度で植物生長調節物質を添加した検討培地は、各基本培地および植物生長調節物質の頭文字をとって以下のように表記した。ただし、IAAとIBAに関しては、2文字で表記した。

MN7B6 : NAA (10^{-7} M) + BAP (10^{-6} M) 添加MS培地

GIA4B3*5 : IAA (10^{-4} M) + BAP (3×10^{-5} M) 添加G培地

緒論

植物組織培養とは、「植物体の一部を母体から分離し、これを適当な条件下で無菌的に培養し生育させる技術である。」と White は定義した (1936)。

この植物組織培養は、20世紀の始まりと共に芽生えた分野である。1902年、Haberlandtは、「植物の体細胞は、生きている限り、単独状態でも適当な条件下に置かれれば、最小単位の生き物として機能し、分裂と増殖を行い、1個の植物体に至るまでの発育能力を潜在的にもつ」という全形成能 (totipotency : 分化全能性) に関する仮説を提唱した。彼自身、オドリコソウ属植物の葉やムラサキツユクサの葉やおしべなどから細胞を分離して培養を試みたが、分裂細胞の誘起には至らなかった。

その後多くの研究者による試行錯誤の結果、オーキシンやサイトカイニンなどの植物生長調節物質 (植物ホルモン) の発見、培地組成の改良が行われ、1934年 Gautheretが、初めてカルス (不定形の細胞集団) 培養に成功した。そして1970年には、Banks-Husemann と Reinert により Haberlandt の提唱していた全形成能が、単一細胞からの不定胚形成過程の様々な段階を示す一連の写真によって示された。

今日まで広範な研究が行われた結果、茎頂培養によるウイルスフリー株の作出、クローン植物の大量増殖、花粉培養による半数体植物の作出、さらにはカルス培養による物質生産・物質変換などの研究へと発展し、近年、植物バイオテクノロジーとして注目を集めている。また最近では、プロトプラストによる体細胞雑種の作出、遺伝子操作による外来遺伝子の導入およびトランスジェニック植物の作出の研究が活発に行われ、農薬耐性植物やウイルス耐性植物の作出に成功している。

農学、園芸の分野においては、早くからこの技術が取り入れられ、すでにイチゴ、カーネーション、ランなどにおいてウイルスフリー株の育成、大量増殖法が確立、実用化されている。

一方、薬学分野における研究には、物質生産・物質変換と育種・育苗を目指した二つの方向性がある。前者は、植物の細胞、組織、器官を培養し、それらを増殖させるとともに有用物質を生産させるもので、薬学領域では研究の歴史も古く、数多くの報告例がある。そのいくつかを Table 1 に示すが、ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* の培養細胞によるシコニンの生産やオタネニンジン *Panax ginseng* のカルス培養によるサポニン成分の生産は有名である。

Table 1. 植物組織培養による二次代謝産物に関する研究

植物名	原植物（学名）	主要二次代謝産物
オウレン	<i>Coptis japonica</i>	berberine ¹⁾
ムラサキ	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	shikonin ²⁾
ケシ	<i>Papaver somniferum</i>	sanguinarine ³⁾
カンゾウ	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	glycyrrhizin ⁴⁾
ベニバナ	<i>Carthamus tinctorius</i>	carthamin ⁵⁾
マオウ	<i>Ephedra gerardiana</i>	ephedrine ⁶⁾
オタネニンジン	<i>Panax ginseng</i>	ginsenoside類 ⁷⁾
コガネバナ	<i>Scutellaria baicalensis</i>	baicalin ⁸⁾
インドジャボク	<i>Rauwolfia serpentina</i>	reserpine ⁹⁾
キジュ	<i>Camptotheca acuminata</i>	camptothecine ¹⁰⁾
イチイ	<i>Taxus brevifolia</i>	taxol ¹¹⁾

後者の育種・育苗への応用研究は、これまで主に農学分野で研究が進められてきたものであるが、薬学領域においても Table 2 に示すように、復原植物の作出がなされ、各種薬用植物の大量育苗法の研究が行われている。

ところでクローン clone(Klon) とは、分球や地下茎あるいは挿木などの栄養繁殖によって生じ、遺伝子型が均一な個体群に対して用いられた用語であったが、現在では広く体細胞由来の同一な個体群をクローンと呼んでいる。クローン増殖の技術は、株分け法、挿木法、接木法として古くから行われてきたが、近年、植物組織培養の技術が導入され、小組織片から培養生株（復原植物、再生植物）の作出が可能となり、増殖効率の飛躍的向上、ウイルスフリー植物の育成、新品種の作出など、めざましい発展を遂げている。

Table 2. 組織培養による復原植物作出に関する研究

復原植物

オウレン	<i>Coptis japonica</i> ¹²⁾
トウキ	<i>Angelica acutiloba</i> ¹³⁾
オタネニンジン	<i>Panax ginseng</i> ¹⁴⁾
ミシマサイコ	<i>Bupleurum falcatum</i> ¹⁵⁾

クローン植物

トチバニンジン	<i>Panax japonicus</i> ¹⁶⁾
シロバナノムシヨケギク	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> ¹⁷⁾
ステビア	<i>Stevia rebaudiana</i> ¹⁸⁾
ケジギタリス	<i>Digitalis lanata</i> ¹⁹⁾
センキュウ	<i>Cnidium officinale</i> ²⁰⁾
ハシリドコロ	<i>Scopolia japonica</i> ²¹⁾
アカヤジオウ	<i>Rehmannia glutinosa</i> var. <i>purpurea</i> ²²⁾
ホソバオケラ	<i>Atractylodes lancea</i> ²³⁾
カラスビシャク	<i>Pinellia ternata</i> ²⁴⁾
トリカブト	<i>Aconitum carmichaeli</i> ²⁵⁾
アミガサユリ	<i>Fritillaria thunbergii</i> ²⁶⁾

このような組織培養によるクローン増殖には、現在 Chart 1 に示すように (1) 早生分枝 (小植物体、precocious branching, mericlone) の形成、(2) 苗条原基 (shoot primordium: 長期間にわたり遺伝的に安定で、かつ増殖率が高く、また苗化が容易な分裂細胞集塊) の形成、(3) カルスからの不定苗条 (adventitious shoot) の形成、(4) カルスからの不定胚 (adventitious embryo) 形成、(5) カルスを経由しない不定胚形成による方法がある。

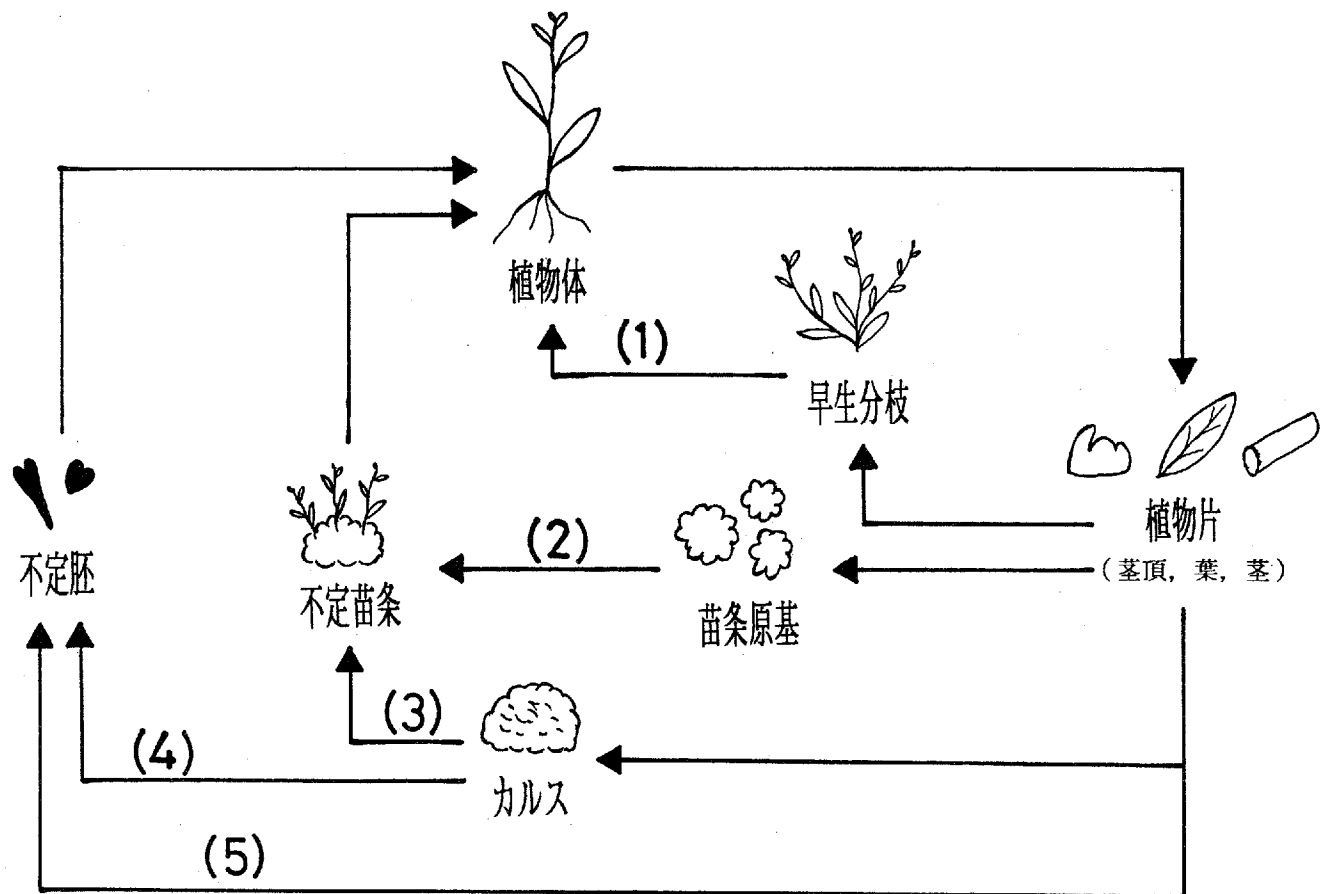


Chart 1. 植物組織培養技術の相互関係

(1)、(2) および (5) の方法で作出された培養生株は親と遺伝的に同質で、かつ安定であり、厳密な意味でのクローン植物である。これに対し(3)および(4)の方法では変異を多発するので、これを利用して培養生株から有用変異株を選抜し、新品種の作出に応用される。この(1)、(2)および(5)の方法により、クローン個体を短期間に多数作ることをマイクロプロパゲーション micropropagation (Krikorian, 1982) と呼んでいる。

苗条原基(shoot primordium)とは、Tanaka and Ikeda²⁷⁾により、一年生植物のうち遺伝子型および染色体型として維持していくことが困難な植物、すなわち雑種強勢(ヘテロリシス)、F₁雑種、異数性等の特性を示す植物を多年的的にクローン化する研究の結果見いだされた分裂細胞集塊であり、長期間にわたって遺伝的に安定で、かつ増殖率が高く、また苗化が容易であるという特徴を持っている。この苗条原基法は、1分間に2回転の低速な垂直式回転培養で、約10,000 luxの強い光を当てることを特徴とする培養法であり、この培養法によって苗条原基を誘導、

維持することができる。この苗条原基の誘導は、一年生植物のみならず多年生植物においても雑種強勢、種間雑種や属間雑種、三倍性無種子植物、不稔性、異数性染色体構造、各種遺伝子型などの遺伝学上の諸現象の学術的および実用的活用が可能となり、育種の領域が拡大することになる。現在までに、草本、木本植物を含め70種以上の植物において苗条原基が誘導されている²⁸⁾が、薬用植物においてはニンニク²⁹⁾やカワラヨモギ³⁰⁾などまだ数例でしか誘導されていない。

近年、本邦において漢方医学が再認識され、生薬の需要が急激に増加している。漢方製剤の生産額も1993年には、約1,800億円（対全医薬品構成比3%）に達し、10年前の約4倍になっている。しかし、その原料となる生薬の80~90%は海外からの輸入品で、中でも約80%を中国からの輸入に依存している。また生薬の生産は、野生植物の採取あるいは野生種の栽培によるものがほとんどであり、育種のなされた原料植物は皆無に等しい。この野生種は遺伝的に雑多であり、これから製造される生薬の品質に著しい格差が生じることは免れ得ないところである。また、野生植物の乱獲による生薬資源の枯渇も危惧されている。かかる現状から、薬用植物の国内生産、優良品種の育成、生薬の均質化は緊急な課題と言えよう。

著者は、薬用植物の前述した問題点を解決する一助とするため組織培養の取り組みを行ってきた。その一環として、日本薬局方収載生薬「柴胡」の基原植物であるミシマサイコについて、育種・育苗を目的として均質な優良品種の育成と資源確保のための増殖法を検討し、前述 Chart 1（2）の苗条原基形成によるクローン植物の育成に成功した。またこのクローン植物の遺伝的均一性と根の成分についても検討したので、第1章に述べる。

次に日本薬局方外生薬規格集収載生薬「釣藤鈎」の基原植物であるカギカズラを材料として、物質生産を目的としたカルス培養を行い、初めてインドールアルカロイド hirsuteine、hirsutine、 3α -dihydrocadambineなどを生産させることに成功した。またそれらのアルカロイドの効率的な生産条件について検討したので、第2章に述べる。

更に日本薬局方収載生薬「竜胆」の基原植物であるリンドウを材料として、育種・育苗を目的として均質な優良品種の育成と資源確保のための増殖法を検討し、多芽体の形成によるクローン植物の増殖に成功したので、第3章に述べる。

また、日本薬局方収載生薬「サフラン」の基原植物であるサフランの開花前の花芽を材料として、有効に柱頭様組織の分化・誘導できる器官を明らかにし、柱頭様組織の成熟化および大量増殖に成功した。さらに黄色色素 crocin などの有用物質

の生産も確認したので、第4章に述べる。

最後に日本薬局方収載生薬「山梔子」の基原植物であるクチナシの結実前の子房および結実後の果実を材料として、初めてカルス培養による黄色色素 crocin などの有用物質の生産に成功したので、第5章に述べる。

第1章 ミシマサイコの組織培養 について

ミシマサイコ (*Bupleurum falcatum* Linne、セリ科 Umbelliferae) はヨーロッパからシベリア、中国、朝鮮をへて日本まで広く分布する多年生の草本であり、わが国では、福島県以南の海岸や丘陵地などの岩が散在する乾燥した日当たりの良い草原に自生する。

その根を乾燥したものを『柴胡』といい、「神農本草経」の上品に収載され、その薬能は「心腹を主どり、腸、胃中の結気、飲食積聚、寒熱邪気を除き、云々」と記載されている。柴胡は、小柴胡湯、大柴胡湯などの「柴胡剤」と称される漢方処方方の要薬であり、日本薬局方にも収載されている重要生薬である。

その成分研究は、サポニン成分を中心に行われ、saikosaponin-a~f³¹⁾やフィトステロール類³²⁾などが含まれていることが報告されている。その含有成分の中で強い生理活性を示すのは、saikosaponin-a, -dであり、中枢抑制、解熱、鎮痛、抗炎症、抗アレルギー作用を示すと言われている³³⁻³⁵⁾。

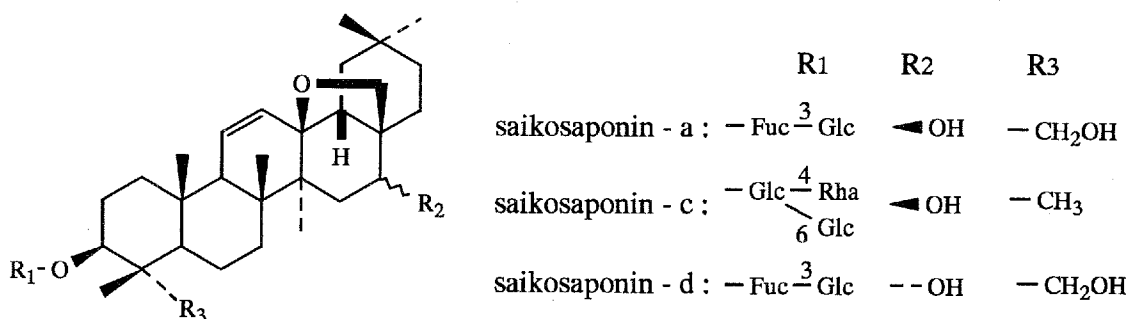


Chart 2. Saponins from Roots of *Bupleurum falcatum*

柴胡の基原植物に関しては、時代や国により変遷と学名の混乱が認められる。本来、*B. falcatum* Linne なる学名は、ヨーロッパ産のものに命名したもので、これは日本まで分布するとなっているが、ヨーロッパのものに当てた学名を日本のミシマサイコに当ててよいものか疑問視する研究者もいる。しかし日本薬局方（第十二改正）では、「ミシマサイコ (*Bupleurum falcatum* Linne) 又はその変種(セリ科)

の根」と規定されている。

本種は自生地によって地上部や根の形態などに変異が認められるなど、著しく多形であり、研究者によっては分類学的取扱いが異なっていることがある。さらに我が国に自生するミシマサイコの染色体数が、 $2n=20, 26$ および 32 と報告されている^{36,37)}ことから、外部形態ばかりでなく遺伝形質にも変異があり、産地による品質の不均一性が危惧される。また野生品も乱獲により枯渇しつつあり、各地で栽培や試作がさかんに行われている³⁸⁾が、根腐病などの栽培上の問題点が多く残されている。さらに栽培品も個体変異が激しく、品質の一定したものを供給することは非常に困難となっている³⁹⁾。

柴胡の品質は、三島付近に野生するミシマサイコで、外面の色が濃く、あまり繊維性でなく、ひげ根が少なく、芳香のあるものが品質が良いとされてきた。しかし最近の需要の増大にともない、三島付近の野生品も乱獲により枯渇し、高知、群馬、宮崎、熊本、茨城、静岡などで年間約200トン程度生産されているが需要を充たしきれず、大部分（年間約1,000トン）を中国および韓国からの輸入に頼っている。中国産柴胡は、唐柴胡と総称されるが、*B. chinense* DC（北柴胡）および *B. scorzonerifolium* Willd.（南柴胡）を基原とするものであり、輸入時には北柴胡（津柴胡）の名称で扱われることがある。この中国産柴胡の形状にはかなりの変異があり、外部および内部形態から見ても数タイプあり、品質だけでなく均一性にも問題がある。また韓国産「柴胡」は、*B. falcatum* Linne あるいはこれに極めて近縁な植物の栽培品で植柴胡の名称で扱われているが、野生品に比べて柴胡特有のにおいが弱く、良質であるとはいいがたい。

このような現状から、本研究は、組織培養による均質なミシマサイコの育成とそのクローン増殖による資源確保を目的とした。

ミシマサイコの組織培養に関しては、葉およびつぼみを材料として、カルスを経由した不定胚形成によるクローン植物の大量増殖法が報告されている¹⁵⁾。しかしこの方法は、カルスを経由しているために、再分化させた植物体の染色体数に変異が多く見られた。またカルス培養によるサイコサポニン生産の研究も行われているが、その生産には至っていない⁴⁰⁾。そこで、茎頂を材料として用いた液体回転培養法を検討し、苗条原基の形成によるミシマサイコの大量クローン増殖法を確立した。

第1節 苗条原基の形成によるクローン増殖法

材料には福岡県平尾台産ミシマサイコを用いた。本産ミシマサイコは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるサイコサポニン類の定量の結果、他産地のミシマサイコに比べて活性成分であるサイコサポニン類の含量が高く、乾燥重量あたり2～6%含有していた。また地上部の形態において、葉序の開度が180°であり、葉が2列に並んで見えるなど外見的にも特徴があった。

第1項 苗条原基形成に適した植物ホルモン濃度の検討

苗条原基とは、緒論でも述べたように長期間にわたり遺伝的に安定しており、増殖が速く、かつ植物体への苗化が容易な分裂細胞集塊のことであり、組織培養により本組織を誘導することは遺伝的に安定した植物体を大量に得るうえで非常に有用である。

ミシマサイコ苗条原基の誘導は、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、6000 lux、24時間照明下、1分間に2回転の垂直式回転培養で、Murashige & Skoog (MS)⁴¹⁾ および Gamborg B5 (G)⁴²⁾を基本培地として用い、Table 3 に示す各植物ホルモン添加した液体培地について検討を行った。MS培地における培養3ヶ月後までの結果をTable 3 に示す。

培養1～2週間後、NAA : BAP ($0 \sim 10^{-6}\text{M} : 0 \sim 2 \times 10^{-5}\text{M}$) の各添加MS培地において、葉が1～2枚展開した shoot が伸長したが、4週間後にはほとんどが褐色化した。

培養9週間後、MN7B6培地（略語の項を参照）において褐色化した shoot の基部から緑色の細胞集塊とともに葉の発生が見られた（Photo 2）。

培養20週間後までは緑色の細胞集塊の増殖とともに葉の伸長がみられた。しかし培養24週目以降は緑色の細胞集塊のみの増殖が認められ、形態学的に見て表面がドーム状で、コンペイトウ状の集塊をなし、苗条原基に特徴的な形態をしていた（Photo 3）。この緑色集塊の増殖率は、約3倍/1ヶ月であった。

誘導された緑色細胞集塊の細胞学的所見を得るため、組織切片（培養17ヶ月の組織）を作成した（Photo 4）。外層には細胞質に富んだ細胞が一層に並び、内層には分裂細胞のある、苗条原基に特徴的な二層構造が認められた。このことからMN7B6培地において誘導された緑色細胞集塊は苗条原基であることが示唆された。



Photo 1. *Bupleurum falcatum*

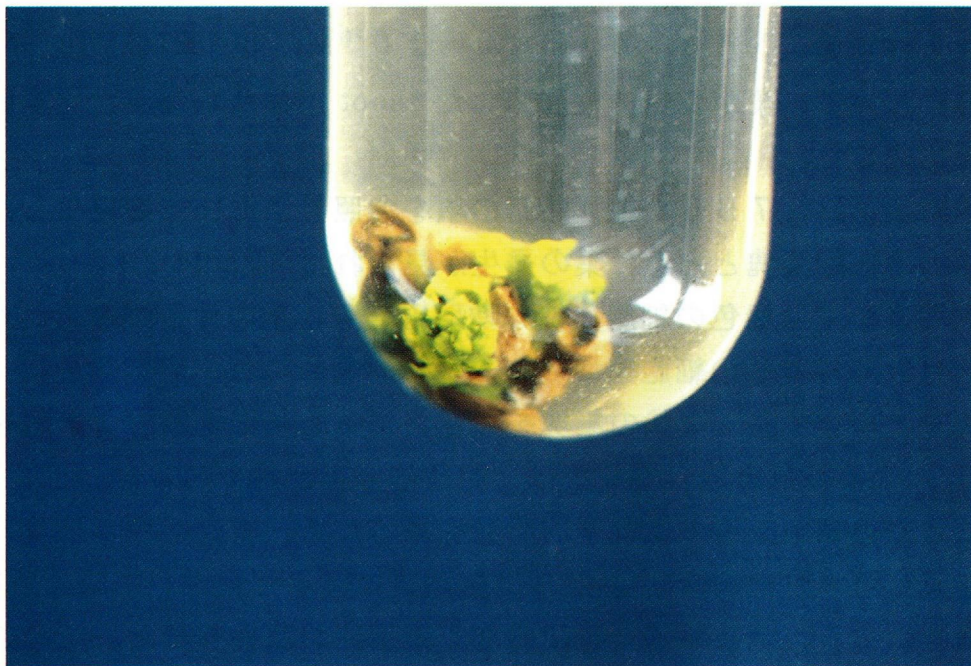
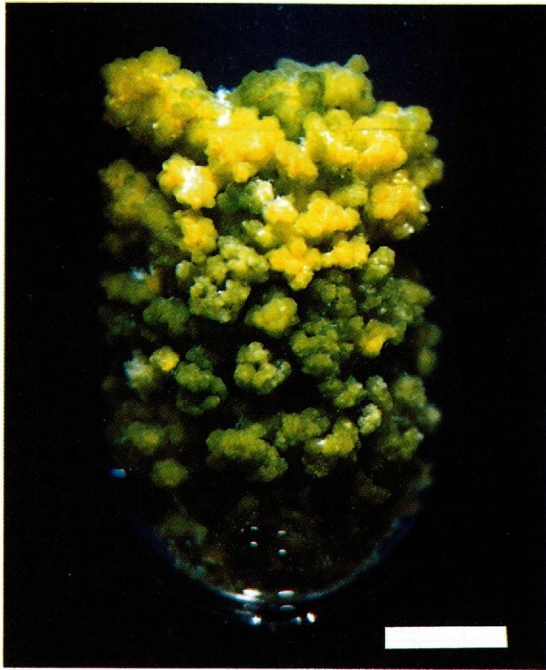
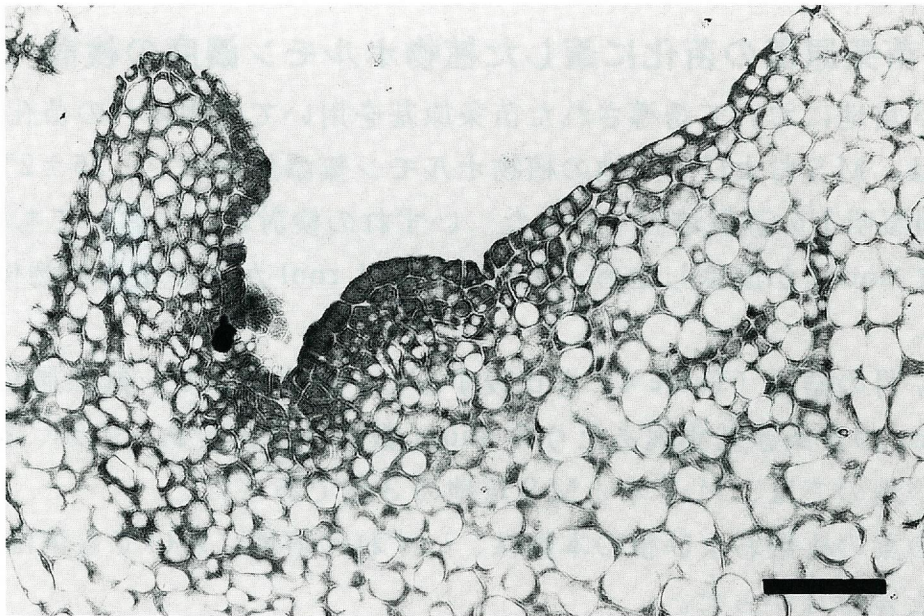


Photo 2. Small Lumps of Leaf Induced from Shoot Apex of *Bupleurum falcatum* in MS Liquid Medium Supplemented with NAA(10^{-7} M) and BAP(10^{-6} M)



**Photo 3. A : Mass of Shoot Primordia Induced in MS Liquid Medium
Supplemented with NAA(10^{-7} M) and BAP(10^{-6} M)
B : Close-up Photograph of Shoot Primordia**



**Photo 4. Parts of Cross Section of The Mass of Shoot Primordia
Bar indicates 0.2mm.**

Table 3. Effects of NAA and BAP on Tissue Mass Formation in MS Liquid Medium

NAA	BAP				
	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	$2 \times 10^{-5} M$
0	shoot	shoot	shoot	shoot embryo callus	shoot
10^{-7}	shoot	shoot	shoot SP	shoot	callus
10^{-6}	callus	shoot	callus	shoot callus	—
10^{-5}	—	—	—	—	—
$2 \times 10^{-5} M$	—	—	—	—	—

The tissues were cultured for 3 months.

SP : shoot primordia, — : no growth

第2項 苗条原基の苗化に適した植物ホルモン濃度の検討

MN7B6培地において誘導された苗条原基を用いて植物体への苗化を試みた。苗化の検討は、MSおよびG培地の植物ホルモン無添加培地で、 $25 \pm 2^\circ C$ 、2500 lux、16時間照明下の静置培養で行った。いずれの検討培地においても植え付け後2～3週間でshootが成長し始め、4週間後にはrootが伸び始め植物体となった(Photo 5)。

移植後1ヶ月の結果(Table 4)を比較すると、植物ホルモン無添加MS培地では、 $5 \times 5 mm$ の苗条原基集塊あたりのshoot数が3.8本であったが、植物ホルモン無添加G培地では、11.2本とMS培地の3倍であった。

株あたりの葉の枚数および根の本数は、いずれの培地においても葉は1.6枚、根は1.2本と差はなかった。

以上の結果から、苗条原基の苗化には植物ホルモン無添加G培地が適していることが明らかとなった。



Photo 5. Regenerated Plantlets from Shoot Primordia Induced in MS Liquid Medium Supplemented with NAA(10^{-7} M) and BAP(10^{-6} M)

Table 4. Effects of Basal Medium on Plantlets Propagation from Mass of Shoot Primordia

Basal Medium	Number of shoot per mass	Number of leaf per stock	Number of root per stock
M S	3.80 ± 0.20	1.67 ± 0.03	1.29 ± 0.02
G	11.2 ± 0.23	1.59 ± 0.01	1.21 ± 0.01

Culture conditions : $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, for 16hr light, for 1 month

第3項 染色体数の調査

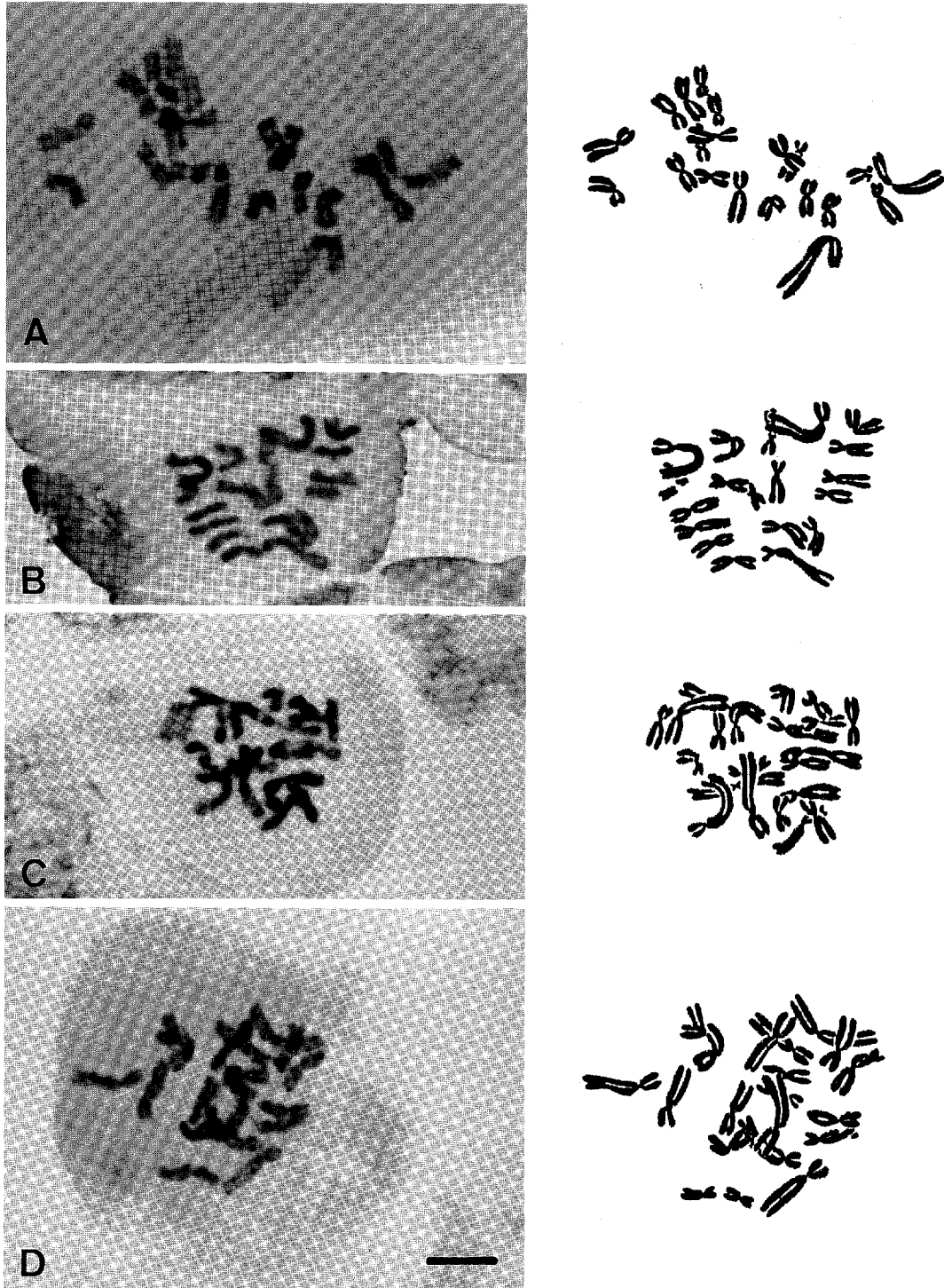
材料として用いた親植物（福岡県平尾台産ミシマサイコ）の根端、MN7B6培地において誘導された苗条原基、およびその苗条原基から苗化させた植物体の茎頂と根端の染色体数を調べた結果を Table 5 に示す。またそれぞれの染色体像を Photo 6 に示す。

その結果、MN7B6液体培地において誘導された苗条原基およびその苗条原基から苗化させた植物体の染色体数は $2n=20$ のものが 99% 以上と極めて遺伝的に安定していた。このことは、太田ら⁴³⁾の報告にあるように平尾台の個体は $2n=20$ が主であることをも裏付けた。

Table 5. Results of Chromosome Count in The Shoot Primordia, Regenerated Plantlets and Original Plants of *Bupleurum falcatum* ($2n=20$) collected from Hiraodai

Cell		Chromosome number ($2n$)			Total
		19	20	40	
Shoot Primordia		0	105(99.1)*	1(0.9)	106
Regenerated Plants	Shoot tip	0	92(100)	0	92
	Root tip	1(0.9)	110(99.1)	0	111
Original Plants	Root tip	0	102(100)	0	102

* () = %



**Photo 6. Mitotic Metaphase Chromosomes in a Cell of Root Tip of Original Plants (A:2n=20), in that of Shoot Primordia (B:2n=20), and in that of Regenerated Shoot Tip (C:2n=20) and Root Tip (D:2n=20)
Bar indicates 5 μ m.**

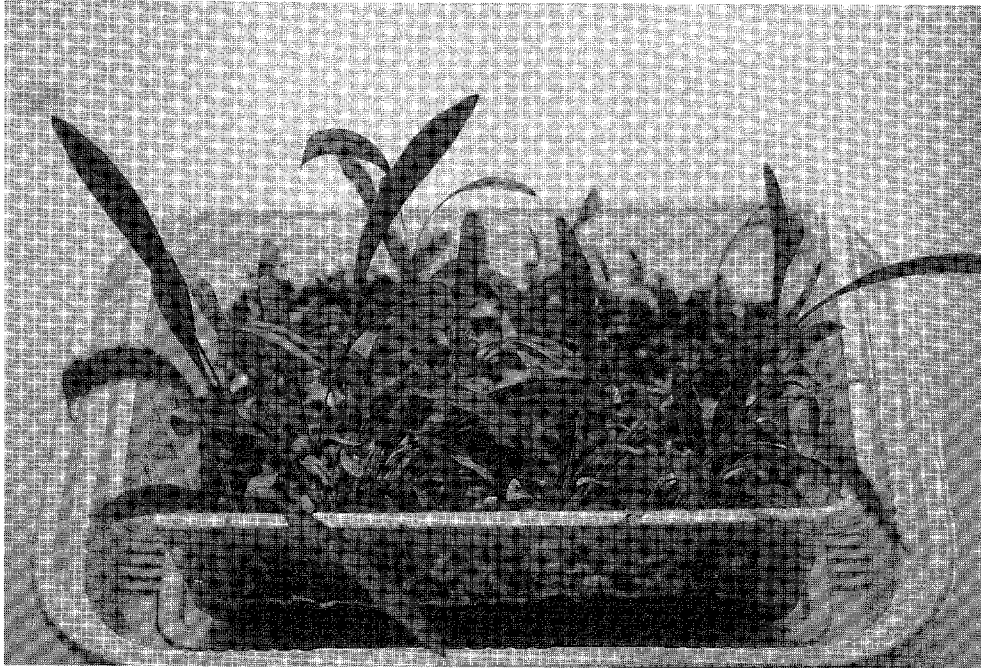


Photo 7. Transplantation of Plantlets Regenerated *in vitro* to Vermiculite



Photo 8. Regenerated Plantlets Transferred in Soil
A: before transferring in soil, B: after 4 months

第4項 土壌への移植

苗条原基より苗化させた植物体について土壌活着率を調べた。苗化させた植物体を滅菌したバーミキュライトに移植し (Photo 7)、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、16 時間照明下で1カ月間栽培した後、土壌へ移植した。土壌への活着率は100%であった。土壌移植直前の幼植物体と土壌移植後4ヶ月後の植物体を示す (Photo 8)。

第5項 まとめ

ミシマサイコの茎頂をMN7B6液体培地に植え付け、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、6000 lux、24時間照明下、1分間に2回転の垂直式回転培養を行うことにより苗条原基が得られた。苗条原基であることの確認は、形態学的方法、細胞学的方法および染色体分析により行った。さらにここで得られた苗条原基を $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、2500 lux、16時間照明下で植物ホルモン無添加G培地で静置培養を行うことにより、ミシマサイコの植物体を得られた。得られた苗条原基および苗条原基から苗化した植物体の染色体数は、 $2n=20$ のものが99%以上と遺伝的にも安定していた。また、苗条原基の誘導にはMS培地が適し、その苗化にはG培地が適していたことから、苗条原基の形成およびその苗化には、培地の窒素濃度や窒素形態が影響していると思われる。

この方法により (Fig.1)、継代期間を1ヶ月として計算すると1個のミシマサイコの茎頂から1年間に 5×10^6 個の遺伝的に均一なミシマサイコの植物体を得られることになり、生薬柴胡の安定供給が可能となった。

今後の課題としては、苗条原基から苗化させた植物体を圃場にて栽培を行い、サイコサポニン類の均質性について検討を行うことであり、現在、国立衛生試験所ならびに各地の栽培試験場と共同で、この苗条原基法で作出したミシマサイコの栽培を行っている。また、圃場にて栽培した植物体から種子を採取し、遺伝的均一性が次世代にまで受け継がれているかを検討することである。

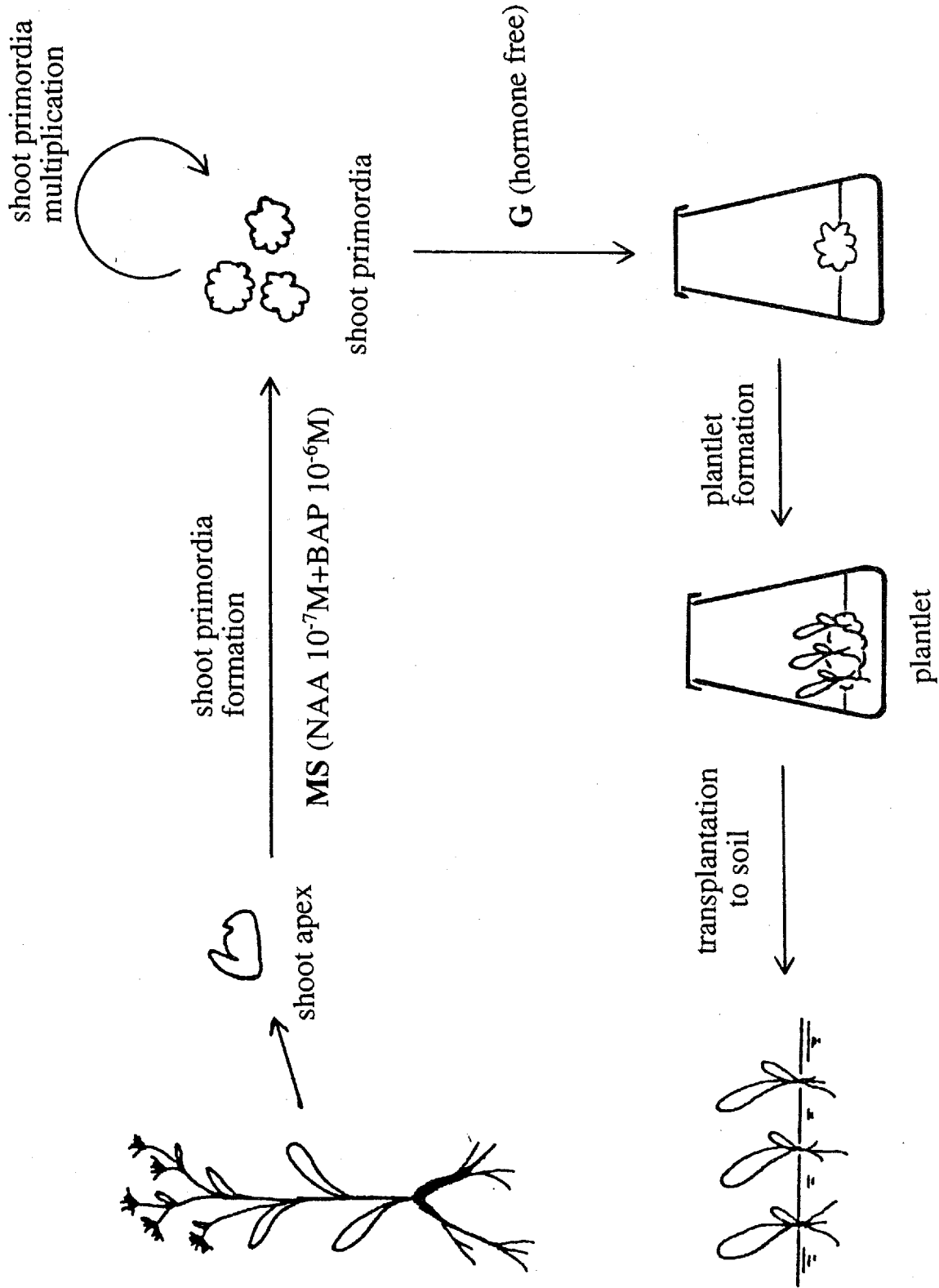


Fig.1. *In Vitro* Propagation of *Bupleurum falcatum* through Shoot Primordia

第2節 薄層クロマトグラフィーによる成分の検討

各条件より得られた苗条原基、苗条原基から苗化させた植物体の根およびカルスのメタノールエキスについて、シリカゲル薄層クロマトグラフィー（TLC）によるサイコサポニン類の生産について検討を行った（Photo 9）。

第1項 各組織の成分検討

1-1. 苗条原基の生産する成分検討

これまでハプロパプス⁴⁴⁾やカワラヨモギ³⁰⁾などの苗条原基において母植物の茎や葉と同様に、細胞内に油体が形成され、二次代謝産物の生産されていることが報告され、苗条原基においても二次代謝産物の生産能のあることが示された。

そこで今回ミシマサイコの茎頂から誘導した苗条原基においても、その二次代謝産物の生産能について検討したところ、サイコサポニン類に相当するRf値にスポットが認められ、サイコサポニン類を生産していることが確認された。

1-2. 苗化させた植物体の根の成分検討

苗条原基から苗化させた植物体の根のサイコサポニン類と、材料として用いた親植物の根のサイコサポニン類について検討した。苗条原基から苗化させた植物体の根において、柴胡の活性成分であるサイコサポニン類の生産が確認され、材料として用いた親植物の根のサイコサポニン類とTLCパターン上、差は認められなかった。

1-3. カルスの成分検討

これまで多くの研究者により、ミシマサイコのカルスによるサイコサポニン類の生産が検討されてきたが、未だその生産には至っていない。そこで今回誘導されたカルスについてもサイコサポニン類の検討を行ったが、サイコサポニン類を生産しているカルスは認められなかった。

第2項 まとめ

苗条原基から苗化させた植物体の根のサイコサポニン類は、材料として用いた親植物の根のサイコサポニン類と、TLCパターン上、差は認められなかった。さらに苗条原基でも、サイコサポニン類の生産が確認されたが、カルスにおいてはその生産は、TLC上では認められなかった。

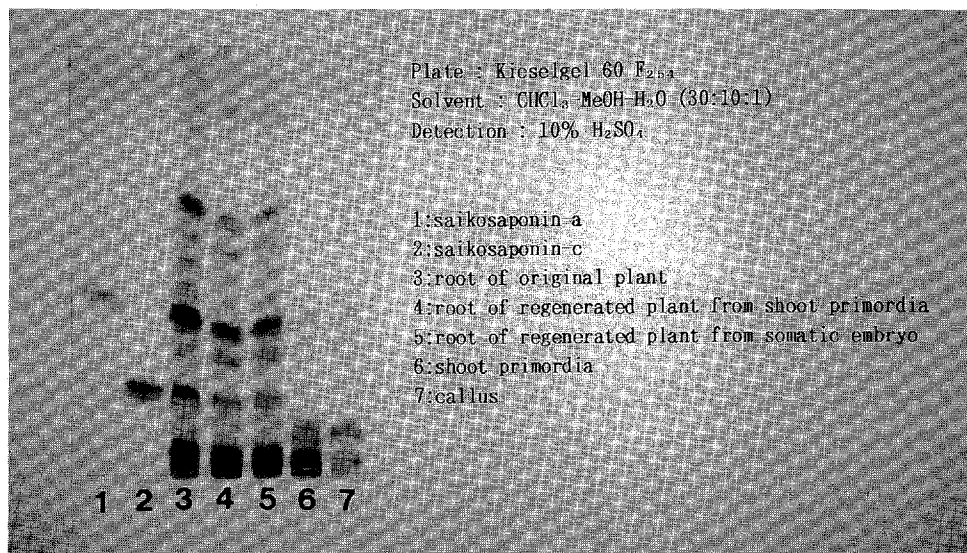


Photo 9. TLC Chromatogram of MeOH Ext. of *Bupleurum falcatum* and Its Culture Tissues

第2章 カギカズラの組織培養について

カギカズラ (*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miquel、アカネ科 Rubiaceae) は、温帯・亜熱帯に分布するつる性の木本であり、わが国においては房総半島以西に自生している。通常、葉腋に曲がったカギを双性または単性に着生する。そのカギをつけた小枝を乾燥したものを『釣藤鈎』と称し、古くから鎮痙・鎮痛を目的として釣藤散や抑肝散などの漢方処方に配合されている。また近年、釣藤鈎が血圧降下作用を示すことも見いだされ、その活性本体は、 3α -dihydrocadambine であることが判明した⁴⁵⁾。

わが国における釣藤鈎の需要は伸びているにもかかわらず、国内産の釣藤鈎は、カギが小さいく、生産量も少ないために生薬市場にはあまり見られず、ほとんどを中国からの輸入に依存している。日本産釣藤鈎は、*U. rhynchophylla* (Miq.) Miquel を基原とするものであるが、中国産釣藤鈎は、*U. rhynchophylla* Miquel var. *kouteng* Yamazaki、*U. sinensis* Haviland や *U. macrophylla* Wallich を基原とするもの等多数あり、品質の一定したものを安定供給するには困難である。このような現状からカギカズラの栽培・育種の研究⁴⁶⁾も始められている。

その成分としては、indole alkaloid、oxindole alkaloid、indole alkaloid 配糖体が単離、構造決定され⁴⁷⁾、強い生理活性を示すものもあることから、医薬品の創薬研究上興味を持たれている。薬理作用については、降圧 (hirsutine, hirsuteine, rhynchophylline, isorhynchophylline, 3α -dihydrocadambine)、鎮静 (hirsutine, hirsuteine, isorhynchophylline)、抗不整脈作用 (hirsutine, hirsuteine, rhynchophylline) などが報告されている⁴⁸⁾。

これらのアルカロイド類の生合成は、Scott⁴⁹⁾によって研究が行われ、tryptophane と secologanine 類より生合成されることが見いだされている。またその全合成⁵⁰⁾や indole alkaloid 類と oxindole alkaloid 類との間での相互変換⁵¹⁾も研究されている。しかし全合成においては、ラセミ体での合成が報告されているにすぎない。

この有用な indole alkaloid 類および oxindole alkaloid 類を制御された条件下で生産させ、それらの効率的な生産条件を明らかにするため、*Uncaria rhynchophylla* の組織培養を試みた。



Photo 10. *Uncaria rhynchophylla*

第1節 カルス培養によるアルカロイドの生産

組織培養によりカルスを誘導する場合、分裂能の高い組織を植え付ける必要があり、一般に胚軸や葉、葉柄が植え付け材料として用いられている。すでにカギカズラおよび釣藤鈎におけるインドールアルカロイド類とオキシインドールアルカロイド類の分布が、各部位により異なっていることが報告されており⁵²⁾、薬用部位である「カギおよび小枝」と葉は、アルカロイド類の分布パターンが類似していた。

そこで釣藤鈎とアルカロイド類の分布パターンが類似しており、分裂能の高い若葉をカルス誘導の材料とした。

第1項 カルス誘導の検討

カルスの誘導は、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) : kinetin (Kin) ($0 \sim 10^{-4}M$: $0 \sim 10^{-4}M$)、NAA : Kin ($0 \sim 10^{-4}M$: $0 \sim 10^{-4}M$) 添加MS寒天培地で行った。暗黒下および照明下でカルスの誘導を検討したが、照明下ではカルスが誘導されなかった。また暗黒下においてもカルスが誘導されにくく、MN4K6、MN4K5およびMN4K4寒天培地においてのみ、葉脈の切り口からカルスが誘導された。MN4K6カルスとMN4K5カルスは、淡褐色で柔らかく、細い不定根が多数見られた。MN4K4カルスは、橙色の固いカルスであった。

第2項 アルカロイド生産の確認

上記3系統のカルスを1年以上同一の植物ホルモン組成培地で継代培養した後、TLCを用いてアルカロイド類の生産の有無を分析した。その結果、MN4K4カルスのみにドラーゲンドルフ試薬で橙色に呈色するアルカロイドと思われるスポットを7つ確認した。この呈色するスポットをChart3に示す標品とTLCおよびHPLCにより比較したところ、hirsuteine、hirsutine、 3α -dihydrocadambine、isocorynoxine、isorhynchophylline、corynoxine、rhynchophyllineであることを確認した。しかし corynantheine、dihydrocorynantheine、geissoschizine methyl ester は確認できなかった。

MN4K4カルスのHPLC分析の結果、hirsuteine と hirsutine の生産量が多く、また hirsuteine と hirsutine のピーク付近に妨害するものがないことから、hirsuteine と hirsutine の生産量をアルカロイド生産の指標とすることとした。

更に、アルカロイドを生産していないMN4K6カルスをMN4K4寒天培地に移して培養し、そのカルス(MN4K4Cカルスとする)の成分をTLCで検討したところ、MN4K4カルスと同様にアルカロイドを生産していた。このことから添加する植物ホルモンの種類、濃度などの培養条件を選ぶことによりアルカロイドの生産が可能であることが示唆された。

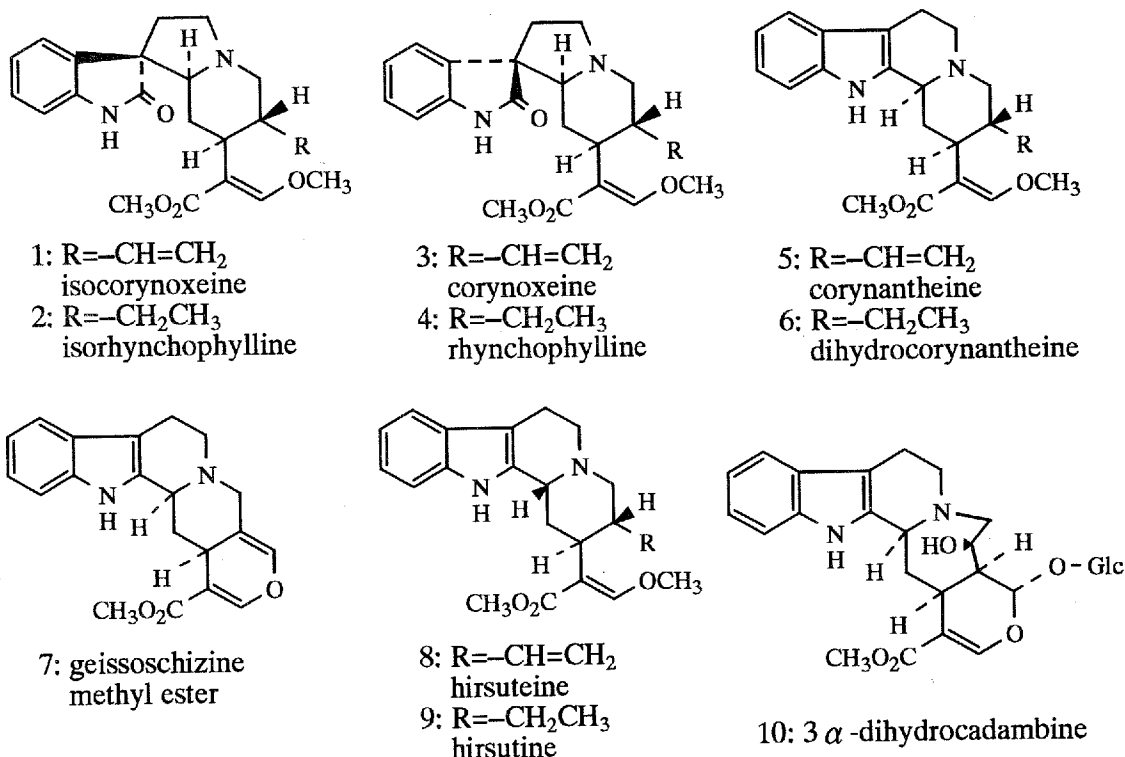


Chart 3. Alkaloids from Hooks and Stems of *Uncaria rhynchophylla*

第3項 カルス増殖の検討

アルカロイド生産の最適条件を検討する上で均一なカルスが大量に必要となるが、継代培養中のMN4K6、MN4K5、MN4K4寒天培地のいずれのカルスも成長が芳しくなく、6週間で2~3倍の生長しか示さなかった。そこでMN4K4カルスをGN4K4およびGN4B4寒天培地に移して培養したところ、培養2~3代で生長が一時衰えたが、GN4B4寒天培地において6週間で7~8倍と比較的生長の良好なカルスが得られた。このGN4B4カルスにおいてもアルカロイドを生産していることがTLCおよびHPLC分析の結果から確認された。

第4項 植物ホルモンの検討

カルスの生長とアルカロイド生産に対する植物ホルモンの影響を検討した。基本培地にはB5培地を用い、5週間ずつ3代継代培養した3代目の結果を Fig.2 に示す。

2,4-D-BAP添加条件(A)では、カルスの生長・アルカロイド生産共に芳しくなかった。

IBA-BAP(B)、NAA-BAP(C)およびNAA-Kin(D)添加条件では、カルスの生長は良好であり、GIB3*5B5添加培地において、生重量で3.2g/5週間と検討培地中最高の値を示した。しかしアルカロイドの生産量は低かった。これらの生長の良いカルスに共通して言えることは、柔らかい水っぽいカルスで、生重量に対する乾燥重量が少なかった。

IAA-BAP(E)およびIAA-Kin(F)添加条件では、カルスの生長・アルカロイドの生産量共に良好であり、GIA4B3*5添加培地において、乾燥重量で1.9g/5週間、アルカロイド生産量も1.73mg/g dry weight、0.156mg/tube/5週間と最高の値を示した。これらのカルスは、生重量に対する乾燥重量が多く固いカルスであった。

今回、サイトカイニンとしてBAPとKinを用いたが、カルスの生長はKin添加培地が良好で、アルカロイド生産はBAP添加培地が良好となる傾向であった。

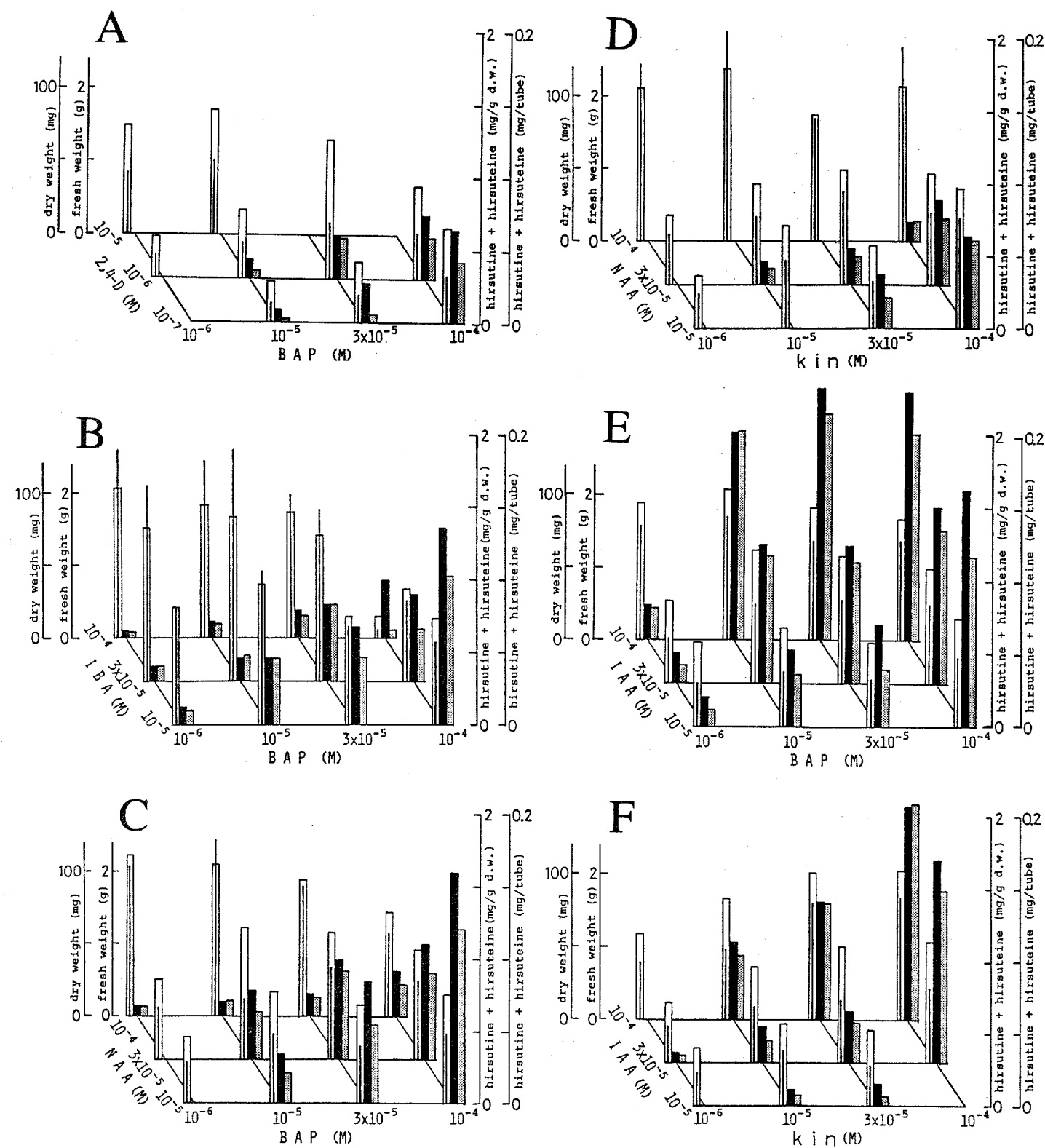


Fig.2. Effects of Growth Hormones on Growth and Hirsuteine-Hirsutine Production in Callus Cultures of *Uncaria rhynchophylla*

Combination of 2,4-D – BAP(A), IBA – BAP(B), NAA – BAP(C), NAA – Kin(D), IAA – BAP(E), IAA – Kin(F) on Gamborg B5 Medium

□: dry weight (mg), —: fresh weight (g), ■: hirsuteine-hirsutine content (mg/g dry weight), ▨: hirsuteine-hirsutine content (mg/tube)

第5項 基本培地の検討

カルスの生長およびアルカロイド生産に対する基本培地の影響を検討するために、MS、GおよびWhite (W)⁵³⁾の3培地による比較を試みた。添加する植物ホルモンは、上記検討(第4項の植物ホルモンの検討)でカルスの生長およびアルカロイド生産共に良好であったG I A 4 B 3 * 5 (条件A)とカルスの生長が良好であったG I B 3 * 5 B 5 (条件B)を用いた。MSおよびG培地は、培養3代目の結果を、W培地は、2代目でカルスが褐変・枯死してしまったので2代目の結果をFig.3に示す。

アルカロイド生産は、G培地とW培地が高いが、乾燥重量当たりでは、生長の劣るW培地は低くなり、G培地において最高の値を示した。

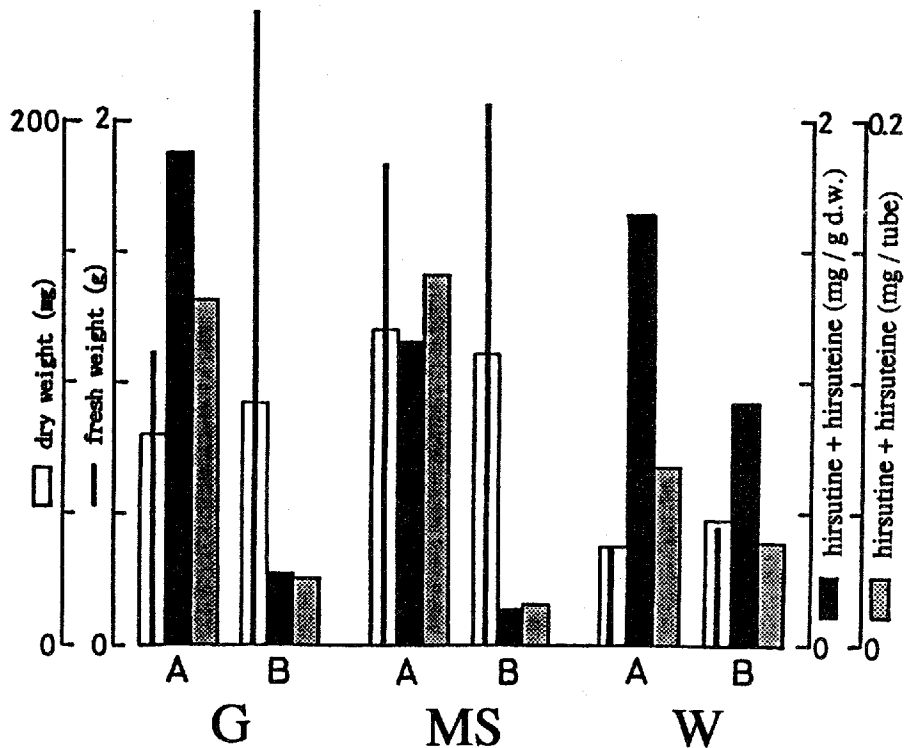


Fig.3. Effects of Basal Medium on Growth and Hirsuteine-Hirsutine Production in Callus Cultures of *Uncaria rhynchophylla*

A: 10^{-4} M IAA - 3×10^{-5} M BAP, B: 3×10^{-5} M IBA - 10^{-5} M BAP

G: Gamborg B5, MS: Murashige-Skoog, W: White

第6項 糖濃度の検討

カルスの生長およびアルカロイド生産に対する糖濃度の影響を検討するために B5 培地で、添加する sucrose 濃度を 1%、2%、3%、4% にして検討した。添加する植物ホルモンは、上記の 2 条件で検討した。その結果を Fig.4 に示す。

添加する sucrose 濃度が高くなるほどカルスの生長も良くなり、sucrose 濃度が 3% でカルスの生長が最高となったが、sucrose 濃度が 4% になるとカルスの生長に阻害がかかってきた。しかし乾燥重量当たりのアルカロイド生産は、sucrose 濃度が 2% で最高となり、培養試験管当たりでは、sucrose 濃度が 2% と 3% でほぼ同様の値を示した。以上の結果より、sucrose 濃度は 2% が良いと考えられた。

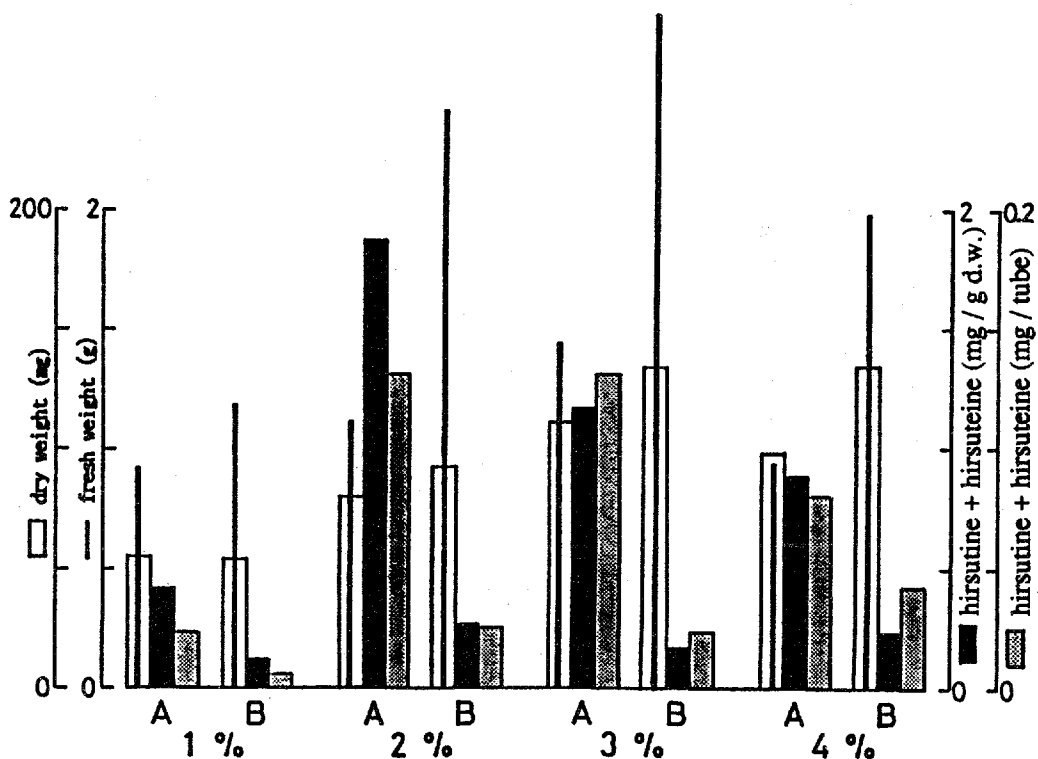


Fig.4. Effects of Sucrose Concentration on Growth and Hirsuteine-Hirsutine Production in Callus Cultures of *Uncaria rhynchophylla* in Gamborg B5 Medium

A: 10^{-4} M IAA - 3×10^{-5} M BAP, B: 3×10^{-5} M IBA - 10^{-5} M BAP

第7項 固形化剤の検討

カルスの生長およびアルカロイド生産に対する固形化剤の影響を検討するために、G培地に寒天（0.7%）および Gelrite（0.2%）を添加して検討した。添加する植物ホルモンは、上記の2条件で検討した。その結果を Fig.5 に示す。

条件Aでは、カルスの生長・アルカロイド生産共に寒天の方が良好であった。しかし条件Bでは、カルスの生長に差は見られなかったが、アルカロイド生産は Gelrite の方が良好であった。培養試験管当たりのアルカロイド生産量から、条件Aで寒天を添加することが良いと考えられた。また添加する植物ホルモンの種類あるいは濃度によって固形化剤の効果の違うことが示唆された。

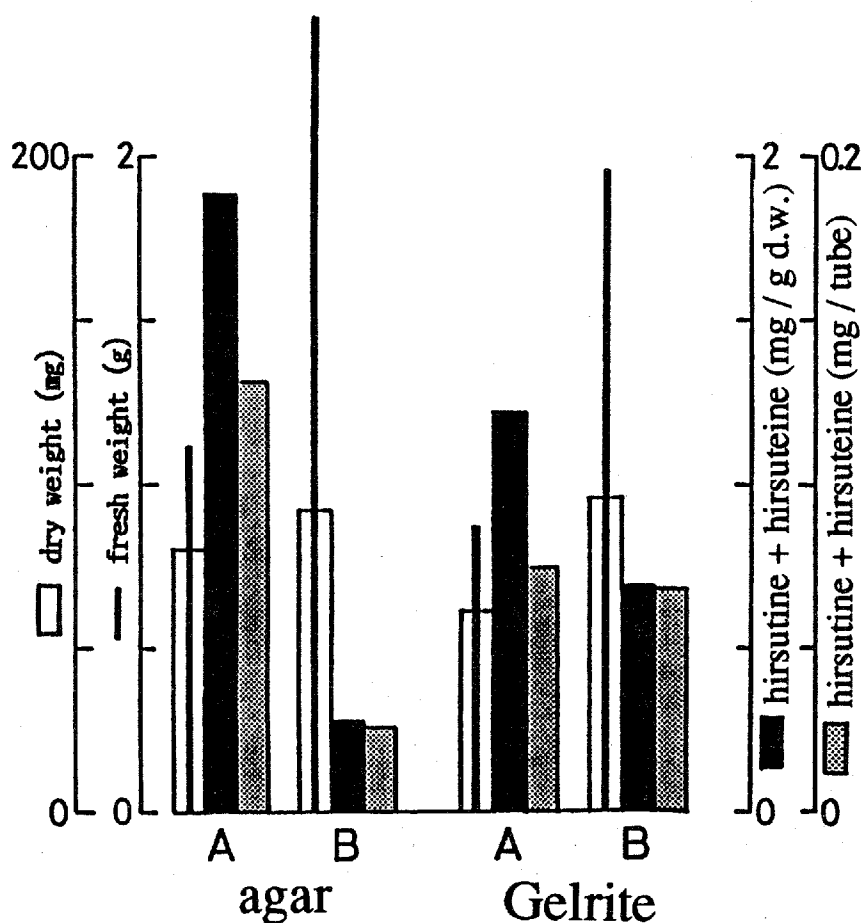


Fig.5. Effects of Gelling Agents on Growth and Hirsuteine-Hirsutine Production in Callus Cultures of *Uncaria rhynchophylla* in Gamborg B5 Medium

A: 10^{-4} M IAA - 3×10^{-5} M BAP, B: 3×10^{-5} M IBA - 10^{-5} M BAP

第8項 窒素源の検討

二次代謝産物の生産は、添加する窒素源の濃度やその組成比の影響を大きく受けることが多い⁵⁴⁾。そこでこれまでの検討でカルスの生長・アルカロイド生産に最適であったG培地の条件Aで、添加する硝酸性窒素とアンモニア性窒素の組成比を変化させてその影響を検討した。ただし硝酸性窒素の濃度は、25mMで一定とした。その結果を Fig.6 に示す。

カルスの生長は、アンモニア性窒素濃度が0~6mMの範囲では差が見られなかったが、アンモニア性窒素濃度が12mMと高くなると悪くなった。またアルカロイド生産もアンモニア性窒素濃度の上昇にともない高くなり、6mMの時に最高値を示し、12mMになると減少した。以上の結果から、アンモニア性窒素は6mMが最適であった。

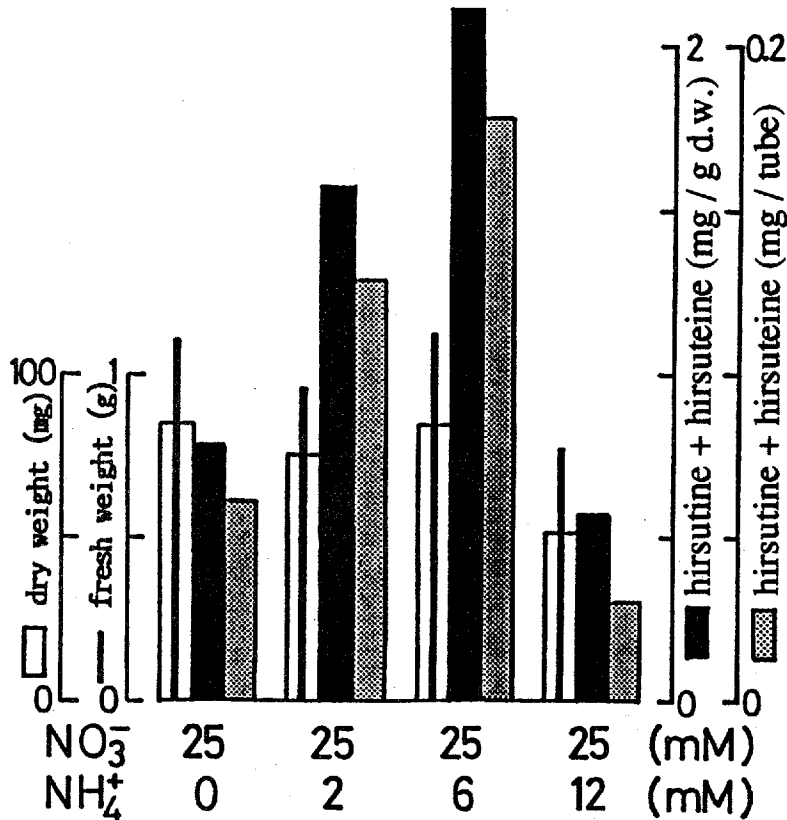


Fig.6. Effects of Nitrogen Sources on Growth and Hirsuteine-Hirsutine Production in Callus Cultures of *Uncaria rhynchophylla* in Gamborg B5 Medium
 A: 10^{-4} M IAA - 3×10^{-5} M BAP, B: 3×10^{-5} M IBA - 10^{-5} M BAP

第9項 生長曲線

G I A 4 B 3 * 5 培地で培養したカルの生長曲線を示す (Fig.7)。カルの生長は、培養 46 日まで続き、その後定常状態となった。乾燥重量当たりのアルカロイド生産量は、培養 35 日でピークに達し、その後はカルスが生長を続けるにもかかわらず、急速に減少していった。培養シャーレ当たりのアルカロイド生産量は、カルの生長がピークに達するのと同時期にピークとなり、その後急激に減少した。以上のことより 35 日周期で継代することが良いと考えられる。

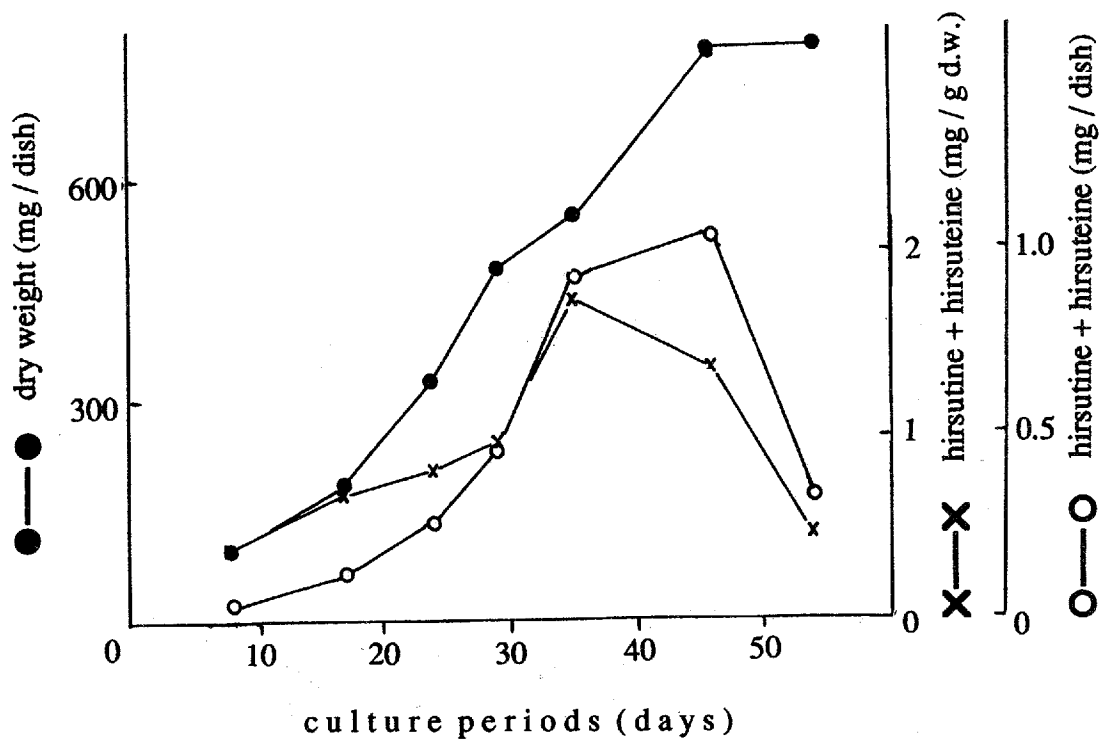


Fig.7. Kinetics of Growth and Hirsuteine-Hirsutine Production in Callus Cultures of *Uncaria rhynchophylla*

第10項 まとめ

カギカズラの若葉からカルスの誘導を試みたところ、暗黒下、MN 4 K 6、MN 4 K 5 および MN 4 K 4 寒天培地においてのみカルスが誘導された。また MN 4 K 4 寒天培地で継代したカルスにおいてアルカロイドを生産していることが確認されたので、カルスの生長およびアルカロイド生産に最適な培養条件を検討した。植物ホルモン、基本培地、sucrose 濃度、固形化剤、および窒素源の条件を検討したところ、植物ホルモンには I A 4 B 3 * 5、基本培地には G 培地、sucrose 濃度は 2%、固形化剤は寒天、また窒素源は硝酸性窒素 (25mM) : アンモニア性窒素 (6mM) が最適であることが明らかとなった。

また、この最適条件下で培養したカルスにおいては、乾燥重量で 1.9g / 5 週間、アルカロイド生産量も 1.73mg / g dry weight、0.156mg / tube / 5 週間となることが明らかとなった。これらアルカロイドの生産は、カルスの生長に比例して増加し、培養約 35 日で最高値に達した。

本成果により、初めてカギカズラのカルス培養によるアルカロイドの生産法が確立されたことにより、これらのアルカロイドが医薬品の創薬研究などへ応用されることが期待される。

第2節 アルカロイドの分析

第1項 アルカロイドの抽出法の検討

アセトニトリル-水-酢酸 (50:100:1) 混液で一晩冷浸する方法、前記混液でカルスをホモジナイズする方法、あるいはアルカリ性クロロホルムで加温抽出した後、一度酸性にしてアルカロイドを水層に移行させ、再度アルカリ性にしてクロロホルムで分配する方法⁵²⁾でアルカロイドを抽出する方法を試みた。ホモジナイズする方法は、後処理に遠心分離する必要があり多数のサンプルを取り扱うには不向きであった。またアルカロイドの抽出効率に冷浸の場合と差がなかった。分配によりアルカロイドを抽出する方法は、操作が煩雑であり、やはり多数のサンプルを取り扱うには不向きであった。また 50mg のカルスを用いた場合、再現性に問題があった。

以上の検討から、簡便さと再現性を鑑みてアセトニトリル-水-酢酸 (50:100:1) 混液で一晩冷浸する方法でアルカロイドを抽出することとした。

第2項 定量法の検討

これまでカギカズラあるいは釣藤鈎のアルカロイド類の HPLC 分析には、順相

系クロマトグラフィー⁵⁵⁾、イオンペーククロマトグラフィー⁵⁶⁾、逆相系クロマトグラフィー⁵²⁾ (Radial Pak C8) などが用いられていた。今回の分析には、広範な分離能を持つ逆相系C18カラムを用いて分離条件を検討し、移動相にアセトニトリル-水-酢酸 (50:100:1) を用いることによって、標品として用いたカギカズラの9種の既知アルカロイドの良好な分離が得られた (Fig.8)。

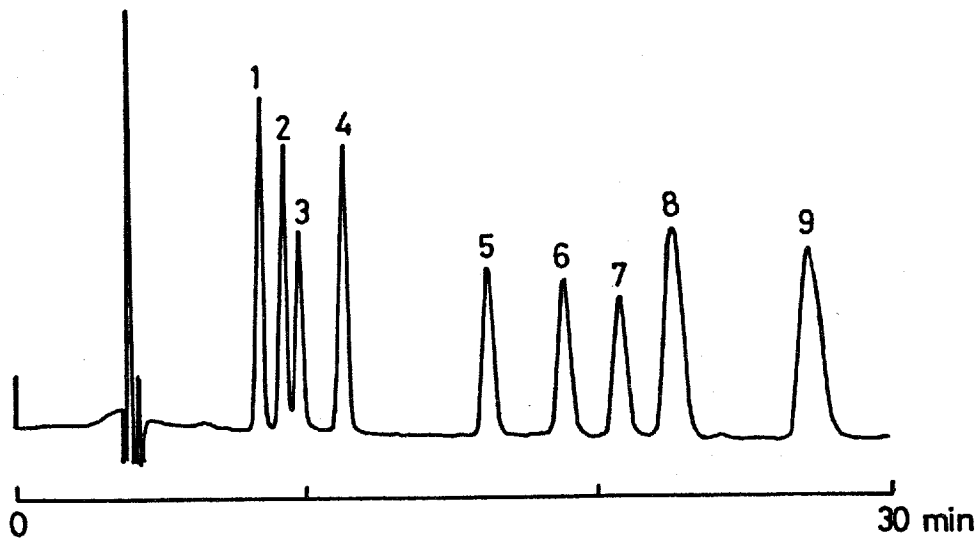


Fig.8. HPLC Chromatogram of nine authentic alkaloids of *Uncaria rhynchophylla*

1:isocorynoxine, 2:isorhynchophylline, 3:corynoxine,
4:rhynchophylline, 5:corynantheine, 6:dihydrocorynantheine
7:geissoschizine methyl ester, 8:hirsuteine, 9:hirsutine

第3項 検量線の作成

上記条件で hirsuteine、hirsutine の検量線を作成したところ、0～1 μ g の範囲で良好な直線を示した (Fig.9)。回帰方程式および相関係数 (r) は、hirsuteine が $Y(\text{peak area}) = 17.40X(\text{concentration}) - 0.02$ ($r = 0.9999$)、hirsutine が $Y(\text{peak area}) = 20.98X(\text{concentration}) - 0.07$ ($r = 0.9999$) であった。

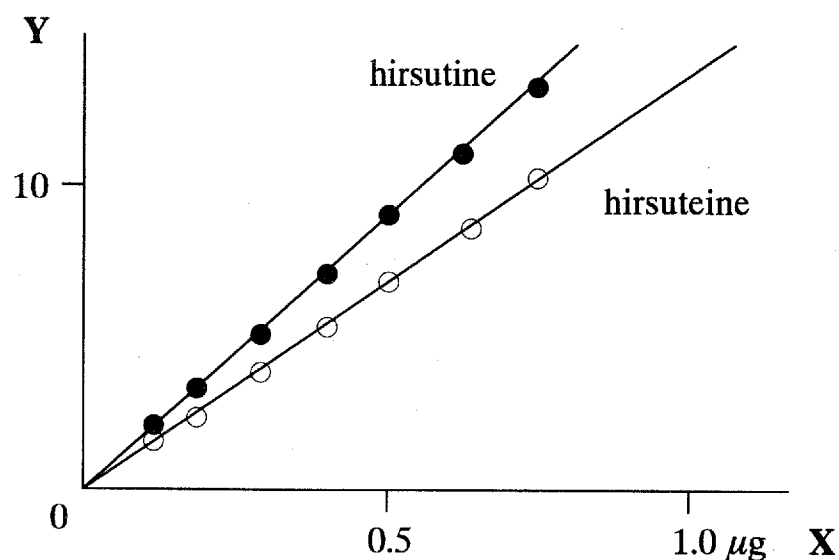


Fig.9. Calibration Curve of Hirsuteine and Hirsutine
 X:hirsuteine(hirsutine)content, Y:hirsuteine(hirsutine)peak area

第4項 まとめ

以上に述べたように、逆相系C18カラムで、移動相にアセトニトリル-水-酢酸(50:100:1)を用いることによって、カギカズラの9種の既知アルカロイドの良好な分離が可能となった。また、移動相を抽出溶媒に用いて、一晚冷浸することにより、カルス中のアルカロイドを簡便かつ再現性よく定量できることを明らかにした。

第3節 カルス成分の単離

第1項 カルス増殖と成分抽出

1. カルス増殖の検討

カギカズラのカルスは、若葉より誘導したものをカルスの生長およびアルカロイド生産に最適であったG I A 4 B 3 * 5寒天培地に植え付け、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、暗黒下で培養した。上記培地に移植したカルスは5週間毎に継代し、同時に残ったカルスを収穫した。

2. カルス成分の抽出

収穫したカルスは凍結乾燥後(80g)、ベンゼン、メタノールで順次抽出し、ベンゼンエキス1.1g、メタノールエキス31.0gを得、以下Chart 4に示すように各種

クロマトグラフィーを繰り返して精製した。ベンゼンエキスから Compound 1 (63mg)、Compound 4 (13mg) を、メタノールエキスから Compound 2 (60mg)、Compound 3 (18mg) を単離した。

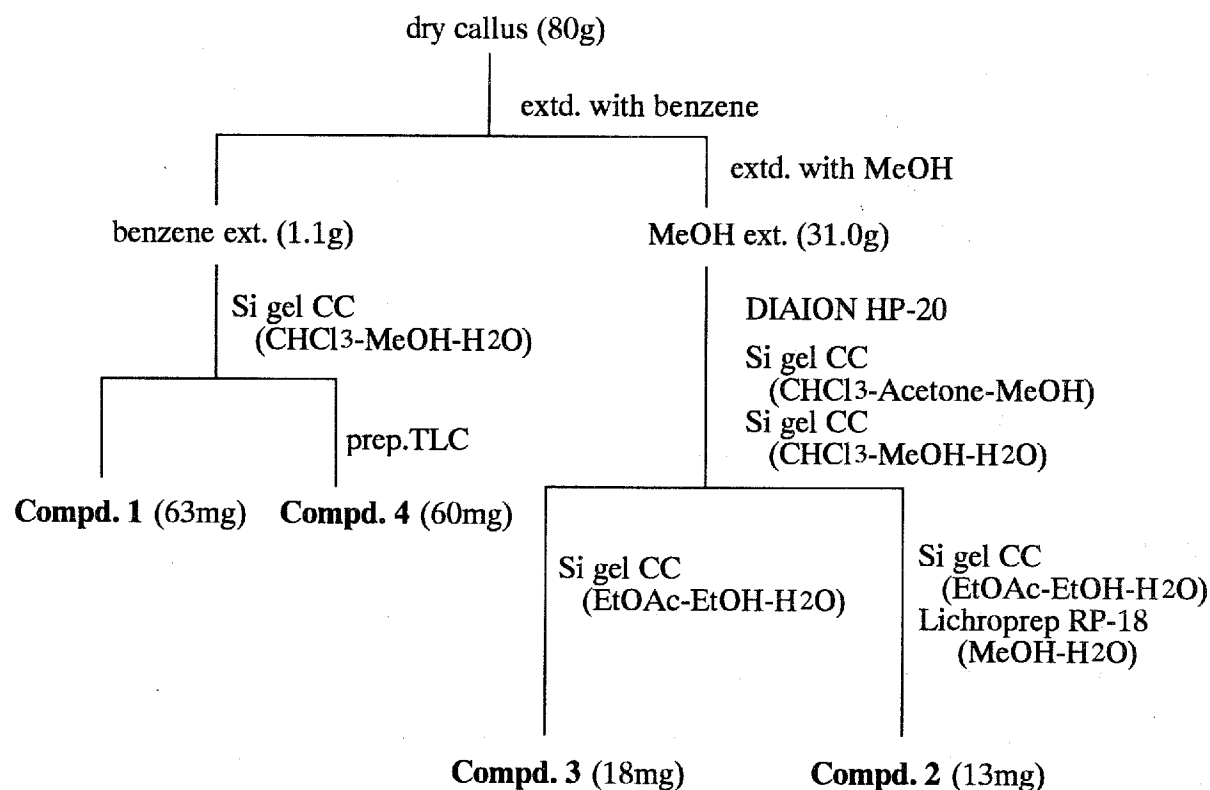


Chart 4. Isolation of Alkaloids and a Triterpene from Callus Induced from Leaf of *Uncaria rhynchophylla*

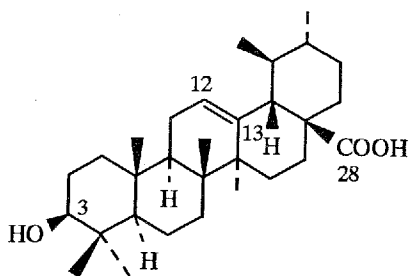
第2項 化合物の同定

Compound 1 は、 ^{13}C -NMRにおいて30本のシグナルが観測されたことよりトリテルペンであることが推定された。またカルボン酸 (δ 179.7)、水酸基 (δ 78.0) およびオレフィン (δ 125.6、139.2) の存在が示唆され、7本のメチル基 (δ 15.7、16.5、17.4、17.5、21.4、23.9、28.8) が観測された。これらことから oleanolic acid または ursolic acid であることが推定された。融点、比旋光度などの物理定数を文献値⁵⁷⁾と比較することにより、ursolic acid と同定した。

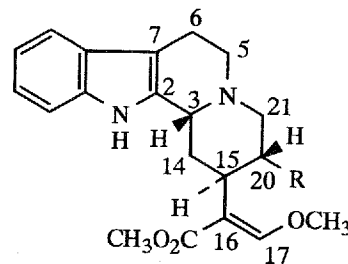
Compound 2 は、ドラーゲンドルフ試薬で橙色に呈色すること、および各種スペクトルデータ (UV λ max : 226、282、290nm ; ^1H -NMR : δ 7.4~6.9、4H) よりインドールの存在が推定された。また ^1H -NMR、 ^{13}C -NMRデータより β -

glucose ($^1\text{H-NMR}$: δ 5.56、1H、d、 $J=9\text{Hz}$; $^{13}\text{C-NMR}$: δ 101.3、78.7、78.4、74.5、71.5、62.7) およびメチルエステル ($^1\text{H-NMR}$: δ 3.79、3H、s ; $^{13}\text{C-NMR}$: δ 167.1、50.9) の存在が推定された。IR、UV、比旋光度などの物理定数を文献値⁴⁵⁾と比較することにより、すでに釣藤鈎や *Anthocephalus cadamba* Miquel⁵⁸⁾ などから単離されている 3α -dihydrocadambine と同定した。なお、材料として用いたカギカズラの葉にも 3α -dihydrocadambine が含まれていることを HPLC により確認した。

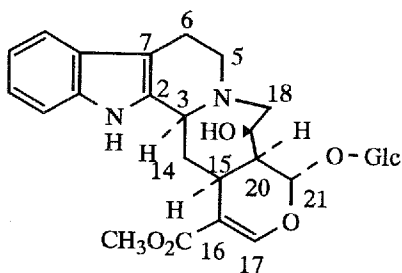
Compound 3 は、compound 2 と同様にドラージェンドルフ試薬で橙色に呈色すること、および各種スペクトルデータ (UV λ max : 224、283、292nm ; $^1\text{H-NMR}$: δ 6.9~7.4、4H) よりインドールの存在が推定された。また $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ データよりメトキシ ($^1\text{H-NMR}$: δ 3.67、3H、s ; $^{13}\text{C-NMR}$: δ 61.6) およびメチルエステル ($^1\text{H-NMR}$: δ 3.75、3H、s ; $^{13}\text{C-NMR}$: δ 168.7、51.3) の存在が推定された。IR、UV、比旋光度などの物理定数を文献値⁴⁷⁾と比較することにより、hirsutine と同定した。なお TLC、HPLC においても標品の hirsutine と良い一致を示した。



ursolic acid (1)



hirsutine (3) : R = $-\text{CH}_2\text{CH}_3$
hirsuteine (4) : R = $-\text{CH}_2=\text{CH}_2$



3α -dihydrocadambine (2)

Chart 5. Structures of Isolated Compounds from Callus Cultures of *Uncaria rhynchophylla*

Compound 4 は、compound 3 の¹H-NMR、¹³C-NMRデータに類似していた。しかし compound 4 には末端ビニル基 (¹H-NMR : δ 4.95、2H、m ; δ 5.28、1H、m ; ¹³C-NMR : δ 115.4、139.3) の存在が推定された。IR、UV、比旋光度などの物理定数を文献値⁴⁷⁾と比較することにより、hirsuteine と同定した。なおTLC、HPLCにおいても標品の hirsuteine と良い一致を示した。

Table 6. ¹³C-NMR Data of Compounds 1 – 4

Carbon	Compounds				Carbon	Compounds			
	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^b		1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^b
1	39.1				21	31.1	97.0	50.4	51.2
2	28.0	136.1	131.2	132.7	22	37.3	167.1	168.7	168.7
3	78.0	63.1	54.6	54.1	23	28.8			
4	39.3				24	16.5			
5	55.8	55.2	51.1	51.2	25	15.7			
6	18.8	22.8	16.7	17.0	26	17.4			
7	33.6	108.3	106.9	107.8	27	23.9			
8	40.0	127.8	127.4	127.8	28	179.7			
9	48.0	118.4	117.9	117.9	29	17.5			
10	37.3	119.2	119.5	119.3	30	21.4			
11	23.6	121.4	121.7	121.3	COOMe		50.9	51.3	51.2
12	125.6	111.6	111.5	111.2	OMe			61.6	61.4
13	139.2	137.6	136.3	136.0					
14	42.5	36.7	31.1	31.1					
15	28.8	33.0	34.2	34.0	glc-1		101.3		
16	24.9	110.2	111.0	111.6	-2		74.5		
17	48.0	152.5	160.1	159.6	-3		78.7		
18	53.5	58.6	11.1	115.4	-4		71.5		
19	39.3	65.8	24.1	139.3	-5		78.4		
20	39.3	44.1	38.0	42.9	-6		62.7		

a:in C₅D₅N, b:in CDCl₃

第3項 まとめ

カギカズラの葉より誘導したカルスから主生成物として ursolic acid、hirsutine、hirsuteine、 3α -dihydrocadambine を単離した。オキシインドールアルカロイド類である rhynchophylline、corynoxene などは単離できなかったが、カルス中で生産されていることを HPLC により確認した。

カギカズラの葉、小枝、鈎のアルカロイド組成比は同じようなパターンを示し、オキシインドールアルカロイド類が大部分を占めることが報告されている⁵²⁾。しかし今回、葉を材料として用いたにもかかわらず、誘導されたカルスのアルカロイド組成は、インドールアルカロイドである hirsutine、hirsuteine が大部分を占め、カギカズラの地下部のアルカロイド組成に類似していた。

また、今回単離した 3α -dihydrocadambine は、すでに鈎藤鈎からも単離されており^{45,59)}、血圧降下作用を持つことが報告されている。鈎藤鈎からの収率は、0.0015%であるのに比べ、カルスからの収率は0.075%と50倍の高収率であった。原植物では微量にしか生産されない 3α -dihydrocadambine が、カルス培養によって主アルカロイドとして高濃度で生産されることは興味深いことであった。

第3章 リンドウの組織培養について

リンドウ (*Gentiana scabra* Bunge var. *buergeri* (Miwuel) Maximowicz、リンドウ科 Gentianaceae) は、本州、四国、九州の丘陵地、山地に自生する多年生の草本である。その根及び根茎を乾燥したものを『竜胆』と称し、「神農本草経」の上品にも収載され、その薬能は、「骨間寒熱、驚癇、邪気を主どる。云々」と記載されている。竜胆は、日本薬局方にも収載され、竜胆瀉肝湯などの尿路疾患用薬に配合される他、苦味健胃薬の配合剤として用いられている重要生薬である。

わが国の生薬市場において日本産竜胆の占める割合は少なく、ほとんどが中国東北部、内モンゴル産の輸入品で「関竜胆」と称するものである。関竜胆の基原植物としては、*G. scabra* Bunge、*G. manshurica* Kitagawa、*G. triflora* Pallas、*G. rigescens* Franchet などである。また類似生薬としてエゾリンドウ *G. triflora* Pallas var. *japonica* Hara、オヤマリンドウ *G. makinoi* Kusnezov、トウヤクリンドウ *G. algida* Pall (高山性) なども薬用として供される。

その成分としては、セコイリドイド配糖体 gentiopicroside やキサントン gentisin などが含まれている。その含有成分の中で苦味を示すのは、gentiopicroside で、生薬中 2~4% 含まれている⁶⁰⁾。この含量は、産地によって異なるが、株によっても異なると言われている。しかし個々の野生株における gentiopicroside 含量の均一性や季節による変化についての調査がなされていないため、竜胆中の gentiopicroside 含量の差は、個体差によるものか草令によるものかは明らかではない。

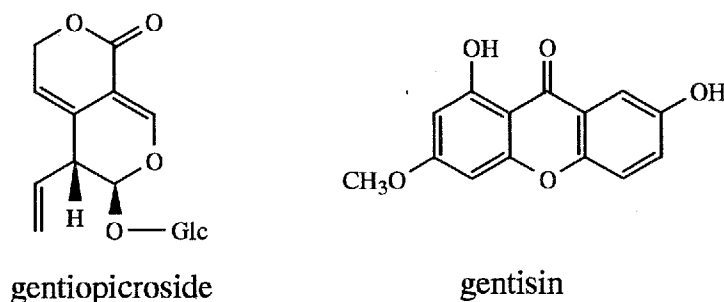


Chart 6. Constituents from roots of *Gentiana scabra* var. *buergeri*

このような現状から、本研究は、組織培養によるリンドウの優良品種の育成とその増殖による資源確保を目的とした。

リンドウの組織培養に関しては、多芽体形成による増殖法⁶¹⁾や苗条原基形成 (オ

クエゾリンドウ)による増殖法⁶²⁾が報告されているが、いずれも増殖率が低く、改良の必要性を述べている。そこで茎頂を材料として用いた培養法を検討し、多芽体形成によるリンドウの大量増殖法を確立した。

第1節 多芽体形成による大量増殖法

第1項 茎頂培養による多芽体形成培地の検討

茎頂からの多芽体形成に関して、GAとBAP、IAAとBAP、NAAとBAPを0.1~1.0mg/lの濃度で組み合わせたMS培地で検討を行った。

1. GAとBAPとの組み合わせによる検討

植え付け切片は、培養1~2週間で第1葉が展開し、shootを形成した。培養60日間後には、節からもshootを形成し、多芽体へと生育した(Photo 12)。GA : BAP (0.1~1.0mg/l : 0.1~1.0mg/l) 添加した全ての培地において多芽体が形成された。特にGA : BAP (1.0mg/l : 1.0mg/l) 添加培地において平均shoot数18.5本と最適であった(Table 7)。

Table 7. Multiple Shoot Formation from Axillary Bud

Hormone (mg/l)		Shoot No. per culture	Multiple shoot forming culture	Fresh weight (mg)
GA	BAP			
0.1	0.1	8.8	4/5	224
0.1	0.5	8.0	3/5	282
0.1	1.0	11.8	4/5	388
0.5	0.1	9.0	3/4	346
0.5	0.5	6.5	3/4	332
0.5	1.0	8.0	3/4	225
1.0	0.1	13.3	3/4	456
1.0	1.0	18.5	4/4	509

Culture condition: MS medium, 25 ± 1°C, 16h light, 60days

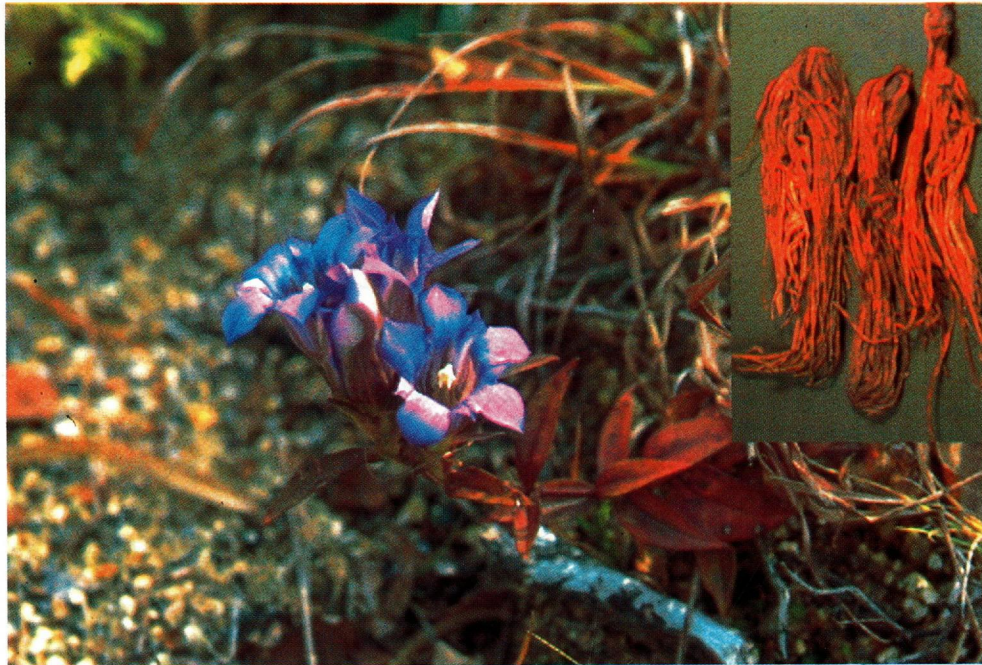


Photo 11. *Gentiana scabra* var. *buergeri*

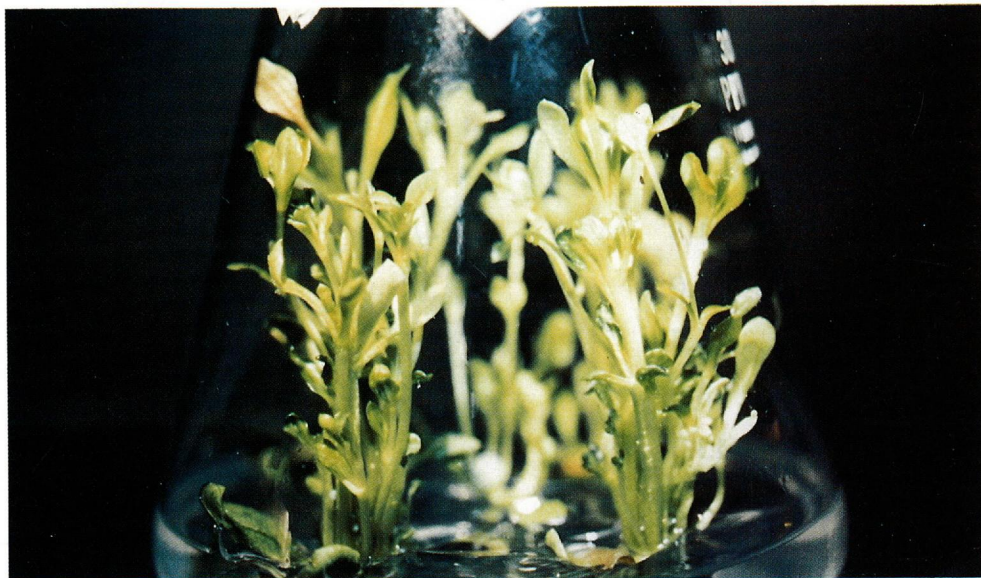


Photo 12. Multiple Shoot Formation from Axillary Bud in MS Medium Supplemented with GA(1.0mg/l) and BAP(1.0mg/l)

2. IAAとBAPとの組み合わせによる検討

IAA : BAP (0.1~1.0mg/l : 0.1~1.0mg/l) 添加した全ての培地において多芽体が形成された。しかし、平均 shoot 数が 2.5~3.2 本と GA : BAP の組み合わせよりも多芽体の形成は不良であった (Table 8)。

3. NAAとBAPとの組み合わせによる検討

NAA : BAP (0.1~1.0mg/l : 0.1~1.0mg/l) 添加した全ての培地において多芽体が形成された (Table 8)。NAA : BAP (1.0mg/l : 1.0mg/l) 添加培地において平均 shoot 数が 11.0 本と多芽体の形成の良い培地もあったが、shoot の基部にカルスが形成されるものがあり、遺伝的に均一な植物体を得るには不適であった。

Table 8. Multiple Shoot Formation from Axillary Bud

Hormone (mg/l)		Shoot No. per culture	Hormone (mg/l)		Shoot No. per culture
IAA	BAP		NAA	BAP	
0.1	0.1	3.2	0.1	0.1	4.3
0.1	1.0	3.0	0.1	1.0	6.0
0.5	0.1	2.8	0.5	0.1	3.3 ^{a)}
0.5	1.0	2.8	0.5	1.0	9.5
1.0	0.1	2.8	1.0	0.1	1.3 ^{a)}
1.0	1.0	2.5	1.0	1.0	11.0

Culture condition: MS medium, 25 ± 1°C, 16h light, 60days

a) Callus forming segment

第2項 多芽体形成の最適条件の検討

GA : BAP の組み合わせにより、1 個の茎頂から平均 18.5 本の shoot を得ることができた。この得られた shoot を材料にして、より多くの多芽体を得るべく GA、BAP の濃度を検討した (Table 9)。

GA は 0.5、1.0、2.5mg/l で、BAP は 2.5、5.0mg/l を組み合わせて検討を行った。

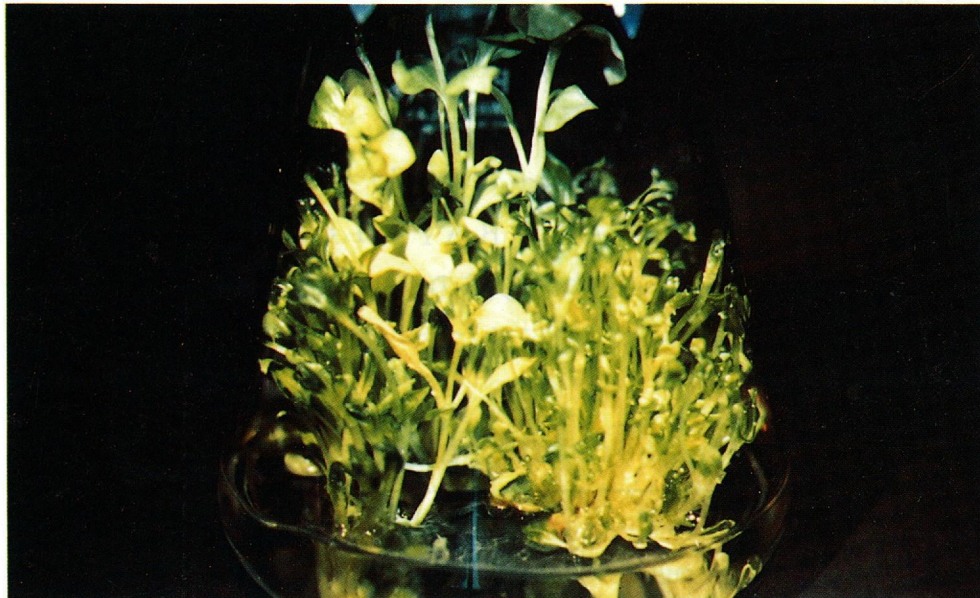


Photo 13. Multiple Shoot Formation from *In Vitro* Cultivated shoot in MS Medium Supplemented with GA(2.5mg/l) and BAP(2.5mg/l)



Photo 14. *In Vitro* Flower Formation of *Gentiana scabra* var. *buergeri*

その結果、全ての検討培地において、平均40本以上の多芽体が得られた。特にGA : BAP (2.5mg/l : 2.5mg/l) 添加培地においては、1本のshootから平均70.7本のshootが得ることが明らかとなった (Photo 13)。

Table 9. Multiple Shoot Formation from Regenerated Shoot

Hormone (mg/l)		Shoot No. per culture	Multiple shoot forming culture	Fresh weight (mg)
GA	BAP			
0.5	2.5	54.5	6/6	1128
0.5	5.0	38.6	7/7	973
1.0	2.5	63.8	8/8	1105
1.0	5.0	42.3	8/8	966
2.5	2.5	70.7	7/7	2097
2.5	5.0	44.0	7/7	1323

Culture condition: MS medium, 25 ± 1°C, 16h light, 60days

第3項 発根条件の検討

発根条件の検討は、MS培地にNAA、IAA、IBAをTable 10に示す濃度で添加するか、植物ホルモン無添加の培地で60日間培養することによって行った。

IAA 0.5mg/l 添加培地において、植え付けたshootの80%から発根し、得られた根の生重量も841mgと良好であった。NAA添加培地においては、1.0mg/l 添加培地において発根率が86%と高かったが、shootの基部からカルスが形成されてきた。IBA添加培地においては、発根率が50%と低く不良であった。

一方、植物ホルモン無添加培地においては、その95%が発根し、得られた根の生重量も895mgと最高の値が得られた。

以上の結果より、shootの発根には、植物ホルモン無添加培地が適していることが明らかとなった。

ところでshootを植物ホルモン無添加培地に移植して培養していると、多くのshootから発根すると同時に花芽を形成し、試験管内で開花するものも見られた (Photo 14)。

Table 10. Root Formation of Propagated Shoot

Hormone (mg/l)	Root No. per culture	Root forming culture	Fresh weight (mg)	
N A A	0.1	4.3	4/6 ^a)	487
	1.0	9.1	6/7 ^a)	263
I A A	0.1	6.4	8/10	841
	1.0	4.2	7/10	315
I B A	0.1	3.4	4/8	470
	1.0	3.6	4/8	445
F H ^b)	10.7	19/20	895	

Culture condition: MS medium, 25 ± 1°C, 16h light, 60days

a) Callus forming segment, b) Hormone free medium

第4項 まとめ

以上に述べたように、GA : BAP 添加MS培地において多芽体を得ることができた。またここで得られた shoot を植物ホルモン無添加MS培地に移植することによって発根させ、植物体を得ることができた。この方法により、1個の茎頂から初代培養で平均 18.5 本、後の継代培養で平均 70.7 本の shoot の得られることから、計算上1個の茎頂から年間 5×10^8 個のリンドウの植物体を得られることになる。

本成果により、これまでリンドウの組織培養において大きな問題点となっていた増殖率の低さを克服することができた。

今後の課題としては、多芽体形成によって得られたリンドウの栽培を進め、染色体数などの遺伝的均一性の調査などが残されている。

第2節 培養生株の品質評価

第1項 定量法の検討

これまで竜胆およびゲンチアナ中の gentiopicroside の定量法は、TLC-かきとり法⁶⁰⁾とTLC-デンストメーター法⁶⁰⁾およびHPLC法⁶³⁾があるにすぎない。そこで今回の分析には、広範な分離能を持ち、繁用性の高い逆相系C18カラムを用いてHPLCによる分離条件を検討した。その結果、移動相に酢酸ナトリウム(0.01M) : メタノール(1:1)を用いることにより、約10分以内に良好な再現性を持つシャープなピークとして gentiopicroside を溶出させることができた (Fig.10)。

また *p*-anisic acid を内部標準物質として添加し、内部標準法で定量を行った。

第2項 検量線の作成

p-anisic acid を内部標準物質として添加した gentiopicroside 標準品をHPLCに付した。gentiopicroside 量と *p*-anisic acid 量の比をX軸に、それをHPLCに付したときの gentiopicroside のピーク高さと *p*-anisic acid のピーク高さの比をY軸にとったとき $Y = 0.8966X - 0.0011$ ($r = 0.9999$) と良い直線性が得られた (Fig.11)。

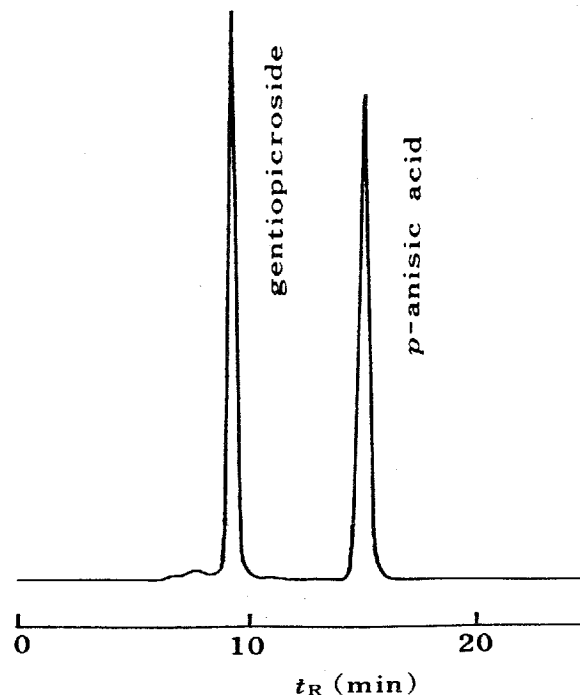


Fig.10. Chromatogram of HPLC for Quantitative Analysis of Gentiopicroside and *p*-Anisic acid

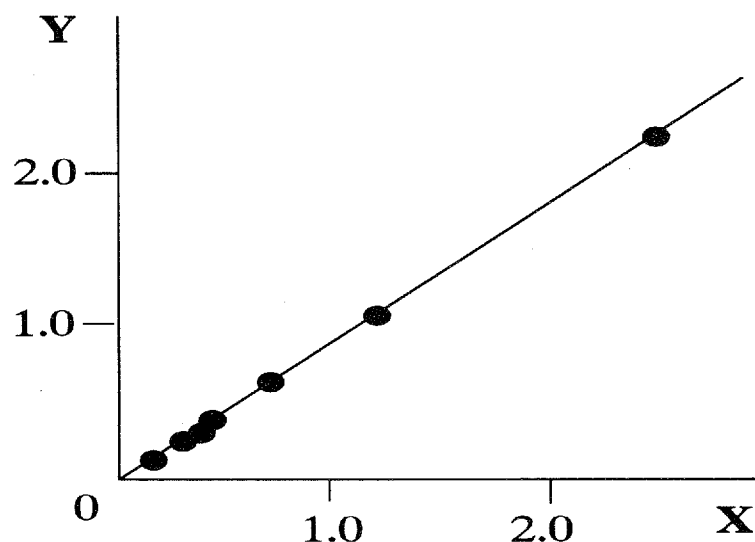


Fig.11. Calibration Curve of Gentiopicroside
X: content ratio (gentiopicroside/*p*-anisic acid),
Y: peak height ratio

第3項 培養生株の均質性

多芽体形成によって得られた培養株 (material 1) と同一系統の種子を播種して得られた栽培株 (material 2) における gentiopicroside 含量とそのばらつきを検討した。その定量結果を Table 11 に示す。

その結果、今回培養により得られたリンドウの gentiopicroside 含量はやや低いものの、栽培品よりも gentiopicroside 含量のばらつきが小さくなり、均質な生薬の得られることが確認された。

Table 11. Gentiopicroside Contents of Clonally Propagated Plantlets(1) and Cultivated Strain(2) of *Gentiana scabra* var. *buergeri*

Material	N	% of dry weight	% of C.V.
1	30	8.07 ± 0.91	11.3
2	25	11.72 ± 2.21	18.8

第4項 まとめ

以上に述べたように、HPLC（逆相系C₁₈カラム）による定量法を検討し、*p*-anisic acid を内部標準物質として添加する内部標準法で定量を行った。

その結果、多芽体形成によって得られた培養株は同一系統の種子を播種して得られた栽培株よりも gentiopicroside 含量はやや低いものの、gentiopicroside 含量のばらつきが小さくなり、均質な生薬「竜胆」の得られることが明らかとなった。また、これまで gentiopicroside 含量の変化が、産地や株、草令によるものかが不明であったが、各産地のリンドウを本方法で増殖させ、圃場で栽培を進めることにより、gentiopicroside 含量の変化に関与する因子が何であるかを解明する手掛かりが得られるであろう。

第4章 サフランの組織培養について

サフラン (*Crocus sativus* Linne、アヤメ科 Iridaceae) は、地中海沿岸部からアジア西部に自生する多年生草本で、その柱頭部を乾燥したものを Saffron『サフラン』といい、鎮静・通経などの婦人用薬として用いられる他、着色料・香辛料などの天然食品色素材料としても用いられている日本薬局方収載生薬である。このような広範な用途をもちながら年に1回、10~11月の開花期の僅か2週間の間しか収穫されないこと、また天候による収穫量の変動が大きく、生産行程のほとんどが手作業であることなどから、生薬のなかでも最も高価なものの一つとなっている。

その柱頭部には、crocin⁶⁴⁾などのカロチノイド系黄色色素や苦味配糖体の picrocrocin⁶⁵⁾、芳香成分である safranal などの有用物質を含んでいる。

サフランの栽培の現状は、採花・収蕊に多くの労力を要すること、球茎は栽植中に病害が発生し、増殖を妨げる等の理由で、需要の多い割に栽培面積は増加していない。わが国では、鳥取、熊本、大分県下（日本一の産量）で栽培され、年間約500kgを生産しているが、これだけでは国内需要を賄いきれず、スペインなどの諸外国から年間約1,600kgを輸入している。

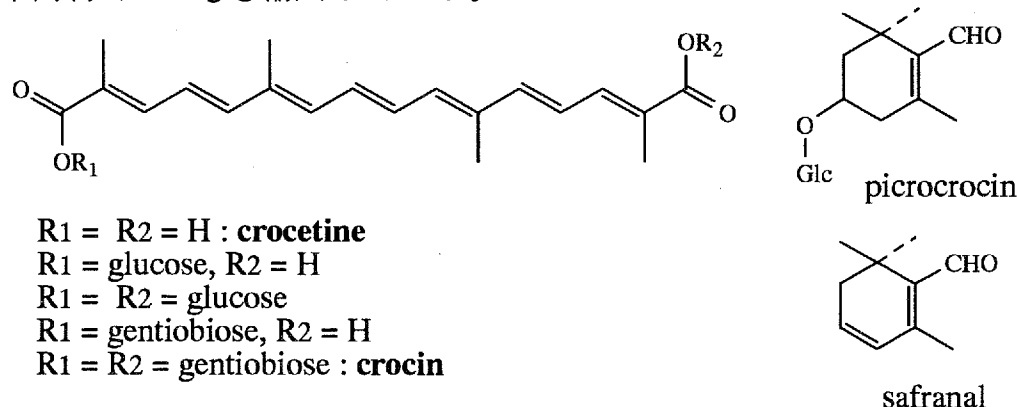


Chart 7. Constituents from Stigma of *Crocus sativus*

サフランの組織培養に関しては、その球根を材料としてカルスを誘導し、色素生産⁶⁶⁾や植物体復原^{67,68)}を試みた報告がある。しかし色素生産に関しては、多くの研究機関において、カルス培養が試みられているにもかかわらず、未だ crocin などの有用物質の生産には至っていない。これらの化合物は開花期のサフランの柱頭部のみに局在しており、器官分化と二次代謝系の発現が密接に関係していることが考えられる。このことは山田ら⁶⁹⁾が、タバコの若いステージの柱頭部を I A A および B A P を含む培地で培養することにより柱頭・花柱様組織を誘導し、柱頭に特

有な物質の生産を確認していることから示唆される。これらのことから、サフランにおいても柱頭器官を分化させることにより、crocin などの有用物質の生産が有望であると考えられる。

このような発想から小山、神田ら^{70,71)}がサフランの柱頭部を用いた培養法を検討し、柱頭様組織の分化・誘導に初めて成功し、crocin などの有用物質の生産についても確認した。著者は、さらに効率的に柱頭様組織を誘導することを目的に開花前の若い花芽全体を用い、植え付ける器官の違いによる柱頭様組織形成能の差および大量増殖について検討した。

第1節 サフランの各器官からの柱頭様組織の形成

第1項 柱頭様組織の形成に適した植え付け器官の検討

これまで花の生長制御に関しては、Hicks and Mchughen⁷²⁾ や Hicks and Sussex⁷³⁾ がタバコを材料に用いて検討を行い、雌しべの原基をカイネチン存在下で培養すると雌しべは自律的生長を示すこと、また胎座組織を植物ホルモンの無い条件で培養すると、通常の生長パターンを失い、柱頭・花柱様組織が形成されることを見いだした。このような現象の起こる原因は、柱頭や胎座をまわりの器官から切り離す操作が影響しているものと推定されている。

- | | |
|-------------------|---------|
| a. 柱頭上部 | h. 子房上部 |
| b. 柱頭中部 | i. 子房下部 |
| c. 柱頭下部 | j. 胚珠 |
| d. 柱頭・花柱 | k. 子房の下 |
| e. 花柱上部 | l. やく上部 |
| f. 花柱中部 | m. やく下部 |
| g. 花柱下部 | n. 花糸 |
| | r. 花被 |
| o. 花被から子房へ続く部分の上部 | |
| p. 花被から子房へ続く部分の中部 | |
| q. 花被から子房へ続く部分の下部 | |

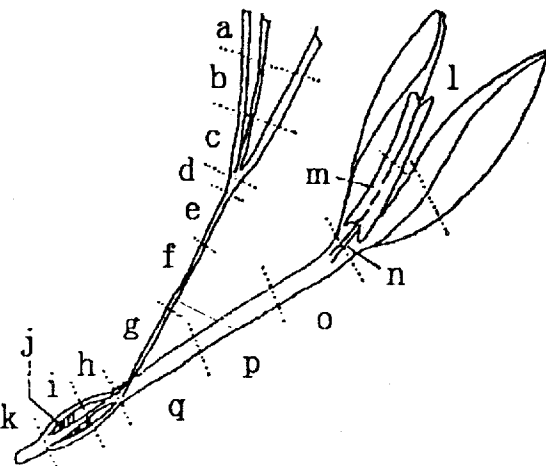


Fig.12. Cultured Parts of Flower Bud Explants of *Crocus sativus*

サフランにおいても小山、神田ら^{70,71)}が、開花前の若い柱頭部を用い、柱頭の三叉下部 (Fig.12,c) のみから柱頭様組織の形成に成功したことから、さらにタバコと同様に胎座の培養も考えられた。しかし胎座自体が小さく分離が困難であることから、開花前の若い花芽をまわりの器官から切り離して培養することにより、柱頭様組織の形成能を検討した。

切片の調製は、開花前の若い花芽全体を Fig.12 に示すように、柱頭、花柱、花被から子房へ続く部分は3等分、やく、子房は2等分し、合計18個の切片として、それぞれの柱頭様組織への分化能力の差について検討を行った。

1. 柱頭・花柱部植え付け

培養2～3週間で植え付けた柱頭・花柱切片の湾曲・肥大が見られ、切り口付近からカルスの誘導が認められた。培養5～6週間には、カルスの生長とともに、その表面から白～黄色の小さな柱頭様組織が形成されてきた。培養2～3ヶ月後には、2～5mmの黄色～橙色の柱頭様組織に生長し、長いものでは1cmに達するものも見られた。

柱頭様組織形成能は、花柱のほうが柱頭よりも高く、また花柱の中でも、子房に近いgが高く、次にf、eの順であった。培養5ヶ月後において、gの部位で1切片当たり100本程度の柱頭様組織が形成された。

2. 花被・やく・花糸部植え付け

花被、やくおよび花糸について、培養2～3週間で植え付けた切片の湾曲・肥大が見られたが、培養5～6週間後にいたってもカルスの誘導は認められなかった。

3. 花被から子房へ続く部分植え付け

柱頭・花柱と同様に、培養2～3週間で植え付けた切片の湾曲・肥大が見られ、切り口付近からカルスの誘導が認められた。培養5～6週間には、カルスの表面から白～黄色の小さな柱頭様組織が形成され、培養2～3ヶ月後には、2～5mmの黄色～橙色の柱頭様組織に生長し、長いものでは1cmに達するものも見られた。

柱頭様組織形成能は、qの部位で高く、次にp、oの順であった。培養5ヶ月後において、qの部位で1切片当たり100～150本 (Photo 16) と最も有効に柱頭様組織が形成された。

4. 子房および胚珠部植え付け

培養2～3週間で植え付けた切片の肥大が見られ、切り口付近からカルスの誘導

が認められた。培養5～6週間には、カルスの表面から白～黄色の小さな柱頭様組織が形成されたが、1切片当たり50本程度しか形成されなかった。また、胚珠(j)では正常なサフランの柱頭の様にシリンダー状にならず、シート状に幾重にも重なっている黄色の組織が観察された。

子房および胚珠については、柱頭様組織よりも葉身様組織の形成が目立った。

第2項 柱頭様組織の形成に適した植物ホルモン濃度の検討

これまで小山、神田ら^{70,71)}によって詳細に検討が行なわれているが、その中で柱頭様組織形成の良好であったNAA : BAP ($10^{-6} \sim 5 \times 10^{-5} \text{M} : 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-5} \text{M}$) 添加培地で検討を行った。NAAおよびBAPの濃度は、Table 12に示す。

1. LS培地での検討

柱頭様組織の形成は、NAA : BAP ($10^{-5} \sim 5 \times 10^{-5} \text{M} : 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-5} \text{M}$) 添加培地で良好で、中でもBAP濃度の高いNAA : BAP ($10^{-5} \sim 5 \times 10^{-5} \text{M} : 3 \times 10^{-5} \text{M}$) 添加培地で最高であった (Table 12)。しかしBAP濃度が低い培地では、柱頭様組織があまり形成されず、根状組織の形成が見られた。このことからLS培地における柱頭様組織の形成には、BAPの濃度が影響していることが推察された。

2. G培地での検討

柱頭様組織の形成は、NAA : BAP ($10^{-5} \sim 3 \times 10^{-5} \text{M} : 10^{-6} \sim 10^{-5} \text{M}$) 添加培地で良好で、LS培地の場合と比較するとBAP濃度のやや低い培地が良好であった (Table 13)。しかし柱頭様組織の形成量は、LS培地に比べて劣っていた。

Table 12. Effects of NAA and BAP on Tissue Formation in LS Medium

NAA	BAP		
	10^{-6}	10^{-5}	$3 \times 10^{-5}M$
10^{-6}	C LT RT	C LT ST RT	C LT ST
10^{-5}	C LT ST RT	C LT ST PT	C LT ST
$5 \times 10^{-5}M$	C LT ST	C LT ST	C LT ST

The tissues were cultured for 3 months.

C : Callus, ST : Stigma-like tissue, LT : Leaf-like tissue, RT : Root-like tissue, PT : Perianth-like tissue

Table 13. Effects of NAA and BAP on Tissue Formation in G Medium

NAA	BAP		
	10^{-6}	10^{-5}	$3 \times 10^{-5}M$
10^{-6}	C LT RT	C LT ST	C LT ST
10^{-5}	C LT ST	C LT ST	C LT ST
$5 \times 10^{-5}M$	C LT ST	C LT ST	C LT ST

The tissues were cultured for 3 months.

C : Callus, ST : Stigma-like tissue, LT : Leaf-like tissue, RT : Root-like tissue,



Photo 15. *Crocus sativus*



Photo 16. Stigma-like Tissues Formation of *Crocus sativus* in LS Medium Supplemented with NAA(5×10^{-5} M) and BAP(3×10^{-5} M) (q part in Fig.12)

第3項 まとめ

以上に述べたように、各器官の柱頭様組織形成能は、花被から子房へ続く部分（o～q）で高く、特に、花被から子房へ続く部分の下部（q）で最も有効に柱頭様組織が形成された。さらに花被から子房へ続く部分、柱頭や花柱の各々について見ると、子房に近い部分（q、c、g）が花被および柱頭に近い部分（o、a、e）よりも柱頭様組織形成能の高いことが明らかとなった。

これらを総合すると、qの部位をNAA：BAP（ 10^{-5} ～ 5×10^{-5} M： 3×10^{-5} M）添加LS培地に植え付けることにより、1切片当たり100～150本の柱頭様組織を得ることができ、これまでの柱頭三叉下部よりも効率的に柱頭様組織を形成させることが可能となった。

第2節 柱頭様組織の大量増殖

誘導された柱頭様組織は、継代を続けるうちに次第に柱頭様組織の形成能が低下し、かつ色素も薄くなってきた。そのため、より長く、色の濃い成熟した柱頭様組織の形成を促す目的で培養条件を検討した。また、継代による柱頭様組織形成能の低下を克服するため、*in vitro*で成熟化した柱頭様組織からのカルスおよび柱頭様組織の再形成を検討した。

第1項 柱頭様組織の成熟化

より長く、色の濃い成熟した柱頭様組織の形成を促す目的で培養条件を検討した結果、高濃度の植物ホルモンを添加したLSおよびG培地で形成された柱頭様組織をLN7B7およびLIA7B7培地に移植し、約1ヶ月培養すると15～20mmの長さに伸長し、かつ色も橙色から赤色へと着色していった（Photo 17）。

ここで形成された組織に花柱が形成されているかは、内部形態を観察していないために不明である。

このようにして成熟化した柱頭様組織を3分割し、その先端部のcrocin含量を定量した。その結果、crocinを $14.5 \mu\text{g/g}$ 含んでおり、生薬「サフラン」（crocin含量 $20.5 \mu\text{g/g}$ ）の約70%のcrocin含量であった。



Photo 17. Stigma-like Tissues Transferred to LS Medium supplemented with NAA(10^{-7} M) and BAP(10^{-7} M) from NAA(5×10^{-5} M) and BAP(3×10^{-5} M)



Photo 18. Developed Stigma-like Tissues from Cultivated Stigma-like Tissues Explants

第2項 培養により形成された柱頭様組織からのカルス及び柱頭様組織の形成

継代による柱頭様組織形成能の低下を克服するため、第1項で成熟化した柱頭様組織からのカルス及び柱頭様組織の再形成を検討した。材料は、成熟化した柱頭様組織を3分割し（Fig.13）、柱頭様組織の形成に適していたNAA：BAP両ホルモン濃度の高いLS培地に植え付けた。

その結果、やや色のついた中間部と無色の基部からはカルスが形成され、やがて柱頭様組織が形成されてきた（Photo 18）。しかし、赤色になった先端部からは、カルスは形成されなかった。

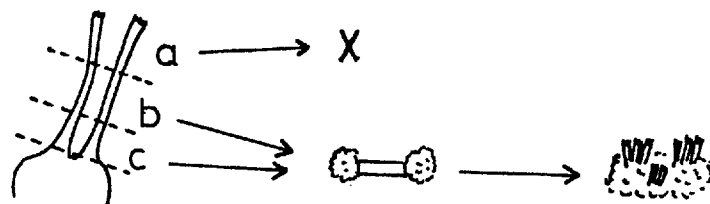


Fig.13. Cultured Parts of Cultivated Stigma-like Tissues Explants

第3項 まとめ

以上に述べたように、形成された柱頭様組織を植物ホルモン濃度の低いLN7B7培地に移植することにより、crocinを $14.5 \mu\text{g/g}$ と、生薬「サフラン」（crocin含量 $20.5 \mu\text{g/g}$ ）の約70%にまで上昇させ、生薬サフランに匹敵する培養サフランへと成熟させることを可能にした。

さらに成熟化させた柱頭様組織の基部を培養することにより、再度カルスを誘導し、柱頭様組織を形成させることが可能であることも明らかにした。

本成果により、柱頭様組織の形成能の低下などの問題点が克服され、Fig.13に示すサイクルを経ることにより、培養サフランの大量増殖法が確立された。さらにこの方法によって、培養サフランの量産化が期待される。

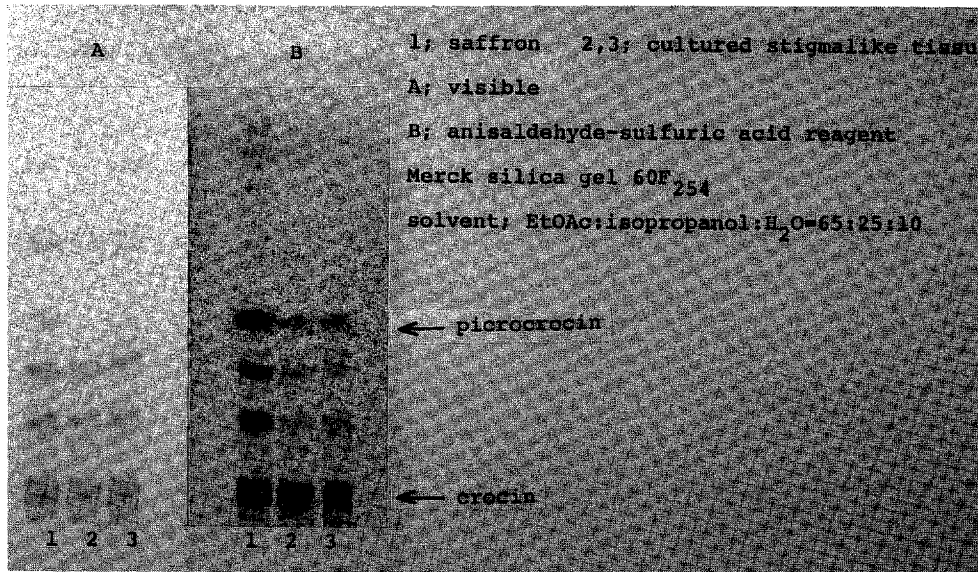


Photo 19. TLC Chromatogram of 90% Aqueous MeOH Ext. of Saffron (*Crocus sativus*) and Its Cultured Stigma-like Tissue

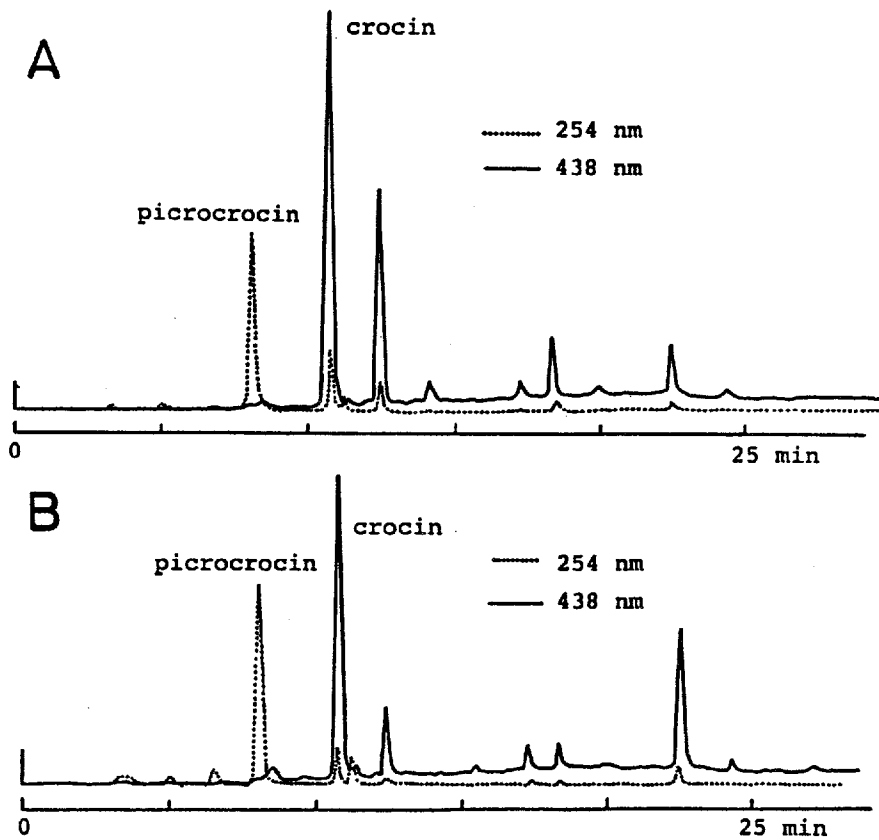


Fig.14. HPLC Chromatograms of 90% Aqueous MeOH Ext. of Saffron (*Crocus sativus*)[A] and Its Cultured Stigma-like Tissue[B]

第3節 柱頭様組織の成分検討および定量

第1項 柱頭様組織の成分検討

得られた柱頭様組織の90%メタノールエキスについてTLC (Photo 19) およびHPLC (Fig.14) による成分検討を行った。

その結果、生薬サフランと同様のTLCパターンを示し、またサフランの特徴的な成分である crocin および picrocrocin とともに生産していることが確認された。

第2項 柱頭様組織中のcrocinの定量

1. 定量法の検討

これまでサフラン中の crocin の定量法はTLC法によるものしかなく、日本薬局方においては、重クロム酸カリウム水溶液と比色を行い、その含量規定を行っている。

Pfander and Rychener⁷⁴⁾は、サフラン中のカロチノイド系色素の単離、構造決定を行っているが、その過程で各種HPLCの条件を検討している。そこで彼らが報告している条件の中でも crocin のピークがシャープで分離の良い、逆相系で、移動相に60%メタノールを用いることとした。

その結果、約10分以内に良好な再現性を持つシャープなピークとしてcrocinを溶出させることができた (Fig.15)

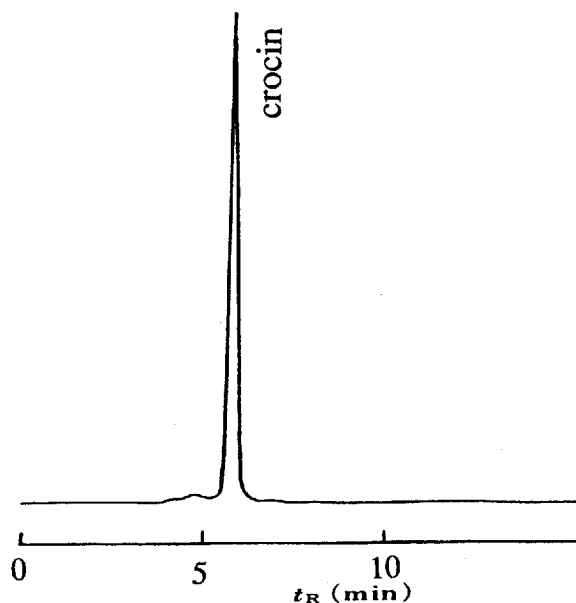


Fig.15. HPLC Chromatogram for Quantatative Analysis of Crocin

2. 検量線の作成

上記条件で crocin の検量線を作成したところ、0～10 μg の範囲で良好な直線を示した。回帰方程式および相関係数 (r) は、 $Y(\text{peak height}) = 8.73X(\text{crocin concentration}) - 0.12$ ($r=0.9997$)であった (Fig.16)。

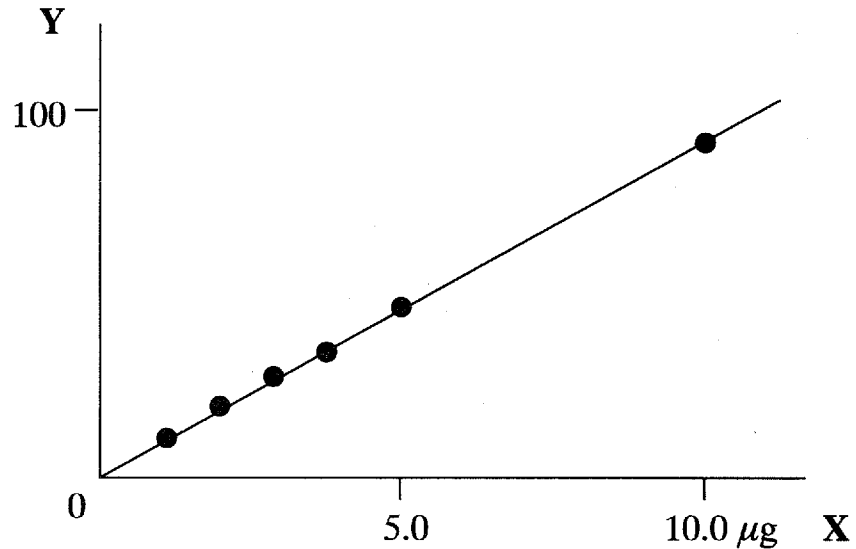


Fig.16. Calibration Curve of Crocin
X: crocin content, Y: peak height

第3項 まとめ

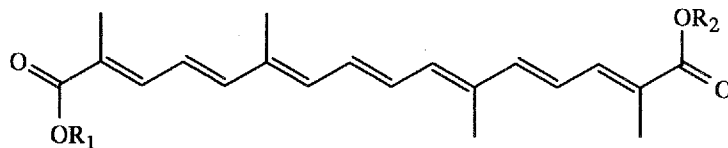
以上に述べたように、HPLCによる定量法を検討し、C18逆相系カラムで、移動相に60%メタノールを用いることにより、サフラン中の crocin の定量が可能であることを明らかにした。

第5章 クチナシの組織培養について

クチナシ (*Gardenia jasminoides* Ellis f. *grandiflora* Makino、アカネ科 Rubiaceae) は、日本の南西部から台湾および中国の暖地にかけて自生する常緑の低木である。

その果実を乾燥したものを「山梔子」といい、「神農本草経」の中品に収載され、その薬能は、「五内の邪気、胃中の熱、画赤酒皰、白癩、赤癩、瘡瘍を主どる」と記載されている。漢方では、消炎・止血・解熱・利胆・鎮痛薬として、特に充血・吐血・黄疸・不眠を治す目的で用いられ、日本薬局方にも収載されている重要生薬である。また山梔子は、古来から黄色染料として汎用されてきたが、現在では染料としてよりも薬用として用いられ、一般に染料としては、類似生薬である台湾産の「水梔子」が用いられている。

有効成分としては、crocin などのカロチノイド系黄色色素⁷⁵⁾や geniposide や gardenoside などのイリドイド配糖体⁷⁶⁾の含まれていることが知られている。この crocin などは、黄色の天然食品色素素材としても利用され、近年その需要が急激に高まり、国内生産だけでは需要をまかないきれず、中国や韓国から年間約200トンを入力している。



R1 = R2 = H : crocetine
R1 = R2 = gentiobiose : crocin

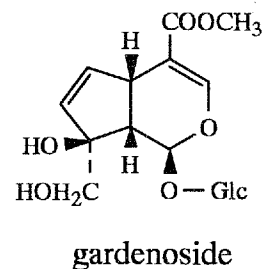
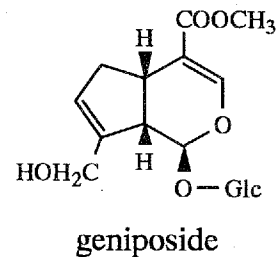


Chart 8. Constituents from Fruits of *Gardenia jasminoides* f. *grandiflora*

これまでクチナシの組織培養に関する研究には、葉や胚軸を材料としてカルスを誘導し、イリドイド配糖体の生産およびその生合成に関する研究がある⁷⁷⁾。しかしサフランと同様に、未だ crocin などのカロチノイド系黄色色素の生産には至っていない。これらの化合物は、果実にのみ存在し、器官分化と二次代謝系の発現が

密接に関与していると考えられる。これらのことから、茎や葉を伸張させる栄養生長から花や果実を形成する生殖生長に移った段階でカルスを誘導すれば、crocin などの有用物質の生産が可能であると考えられる。

このような発想から、生殖生長に移った段階で結実前の子房および結実後の果実を材料に用いることにより、crocin などの有用物質の生産を検討した。

第1節 クチナシの各器官からの黄色色素の生産

第1項 黄色色素の生産に適した器官の検討

サフランなどの場合からも分かるように、植え付ける器官や部位により二次代謝産物の生産能に差が見られることから、黄色色素の生産に適した器官および部位の検討を行った。

まず結実前の子房については、花柄をなるべく残すようにして、蕾を枝から切り取り、花冠・萼を取り除いて Fig.17 に示すように4分割した。また結実後の果実については、果柄をなるべく残すようにして、果実を枝から切り取り、萼を取り除いて Fig.17 に示すように果皮・果柄部は4分割、果肉・種子部は3分割した。

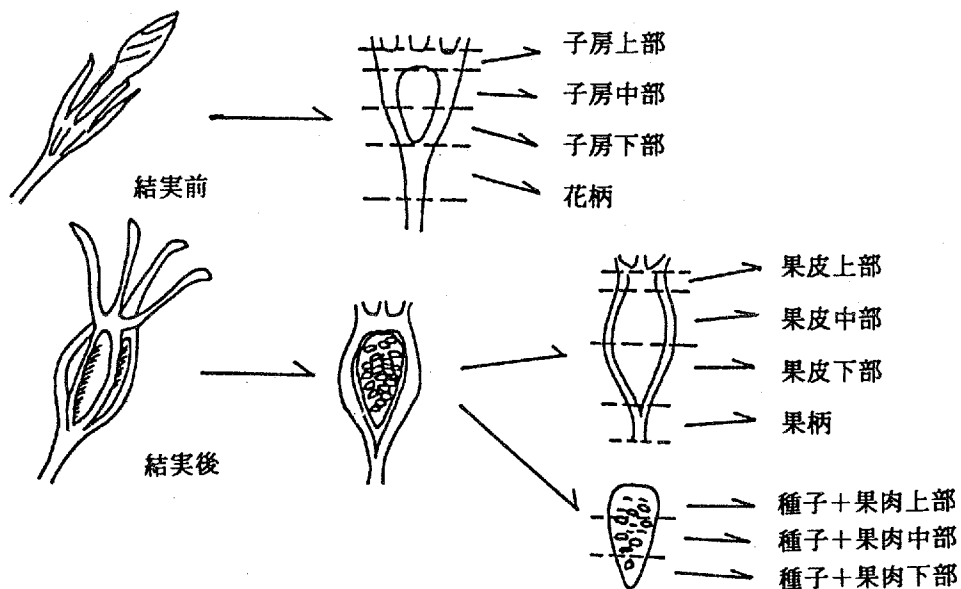


Fig.17. Cultured Parts of Ovary and Fruit Explants of *Gardenia jasminoides f. grandiflora*

1. 子房部植え付け

培養1～2週間で植え付けた子房の切片の切り口からカルスが誘導され始めた。培養3～4カ月後には、淡黄色からオレンジ色に色素生産をしているカルスが認められた。

植え付けた部位の違いによる色素生産能およびカルス生育の優位な差は認められなかった。

2. 果実部植え付け

培養1～2週間で植え付けた果皮・果柄部および果肉・種子部の切片の切り口からカルスが誘導され始めた。培養3～4カ月後には、果皮・果柄部において誘導されたカルスの中に、淡黄色からオレンジ色に色素生産をしているカルスが認められた。

果皮・果柄部においては、植え付けた部位の違いによる色素生産能およびカルス生育の優位な差は認められなかった。

しかし、果肉・種子部より誘導されたカルスの中には、色素生産をしているカルスは全く認められなかった。

第2項 黄色色素の生産に適した植物ホルモンの検討

黄色色素生産に適した植物ホルモンを検討するために、NAAとBAP、IAAとBAP、IBAとBAPの組み合わせで、LSおよびGの基本培地で検討を行った。

1. NAAとBAPとの組み合わせによる検討

子房部および果実・果皮部ともにNAA、BAPの両植物ホルモンの低濃度の培地において、色素生産能およびカルスの生育が良好であった。基本培地については、LSおよびG培地で優位な差は認められなかった。特にNAA : BAP (10^{-7} M : 10^{-7} M) 添加LS培地において、カルスの生育が、2カ月で11倍に増加し、crocin 含量も $1.1\mu\text{g/g dry wt.}$ となった (Photo 21)。

2. IAAとBAPとの組み合わせによる検討

子房部および果実・果皮部ともにIAAの濃度が高く (10^{-5} ~ 2×10^{-5} M)、BAPの濃度が低い (10^{-7} M ~ 10^{-6} M) 培地において、色素生産能およびカルスの生育が良好であった。基本培地については、LS培地が適していた。



Photo 20. *Gardenia jasminoides* f. *grandiflora*



Photo 21. Yellowish Callus Cultures of *Gardenia jasminoides* f. *grandiflora* in LS Medium Supplemented with NAA(10^{-7} M) and BAP(10^{-7} M)

3. IBAとBAPとの組み合わせによる検討

子房部および果実・果皮部ともにIBA、BAPの両植物ホルモン濃度が高い ($10^{-5} \sim 2 \times 10^{-5} \text{M}$) 培地において、色素生産能およびカルスの生育が良好であった。基本培地については、G培地が適していた。

第3項 まとめ

以上に述べたように、子房部および果実・果柄部を材料として用いることにより、初めてカルス培養による黄色色素である crocin の生産に成功した。

材料として用いた子房部および果実・果柄部の部位の違いによる色素生産能やカルス生育の優位な差は認められなかった。

また、色素生産能を持つカルスの誘導には、NAA、BAPの両植物ホルモンの低濃度のLSおよびG培地、IAAの濃度が高く、BAPの濃度が低いLS培地およびIBA、BAPの両植物ホルモン濃度が高いG培地が適していた。その中でも特に、NAA : BAP ($10^{-7} \text{M} : 10^{-7} \text{M}$) 添加LS培地が最適であった。

今後の課題としては、crocin の生産性をさらに上げる培養条件を検討することや、液体懸濁培養による crocin の生産へと発展させることである。

第2節 カルスの成分検討および定量

第1項 カルスの成分検討

オレンジ色に着色しているカルスを凍結乾燥し、メタノールで抽出したメタノールエキスについてTLCおよびHPLC (Fig.18) による成分検討を行った。

その結果、オレンジ色に着色しているカルスは、確かに crocin を生産していることを確認した。また、イリドイド配糖体である geniposide や gardenoside も同時に生産していることも確認した。

第2項 カルス中のcrocinの定量

サフラン中の crocin を定量した場合、逆相系で、移動相に60%メタノールを用いることで、検量線が0~10 μg の範囲で良好な直線を示したので、クチナシ中の crocin の定量もこの条件で行うこととした。

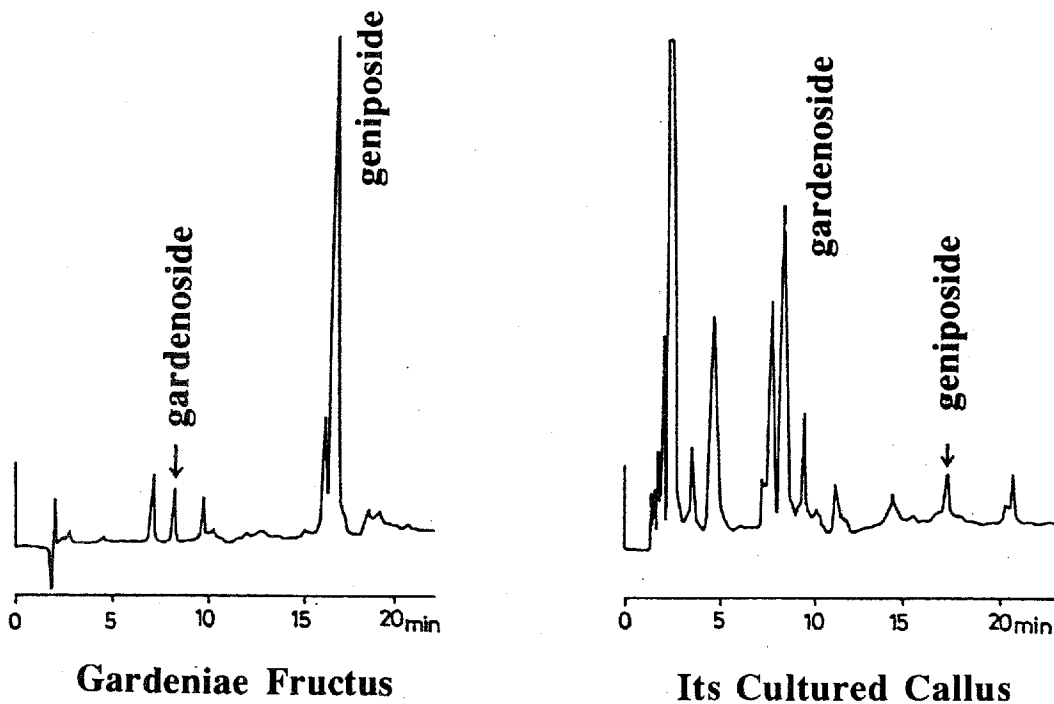
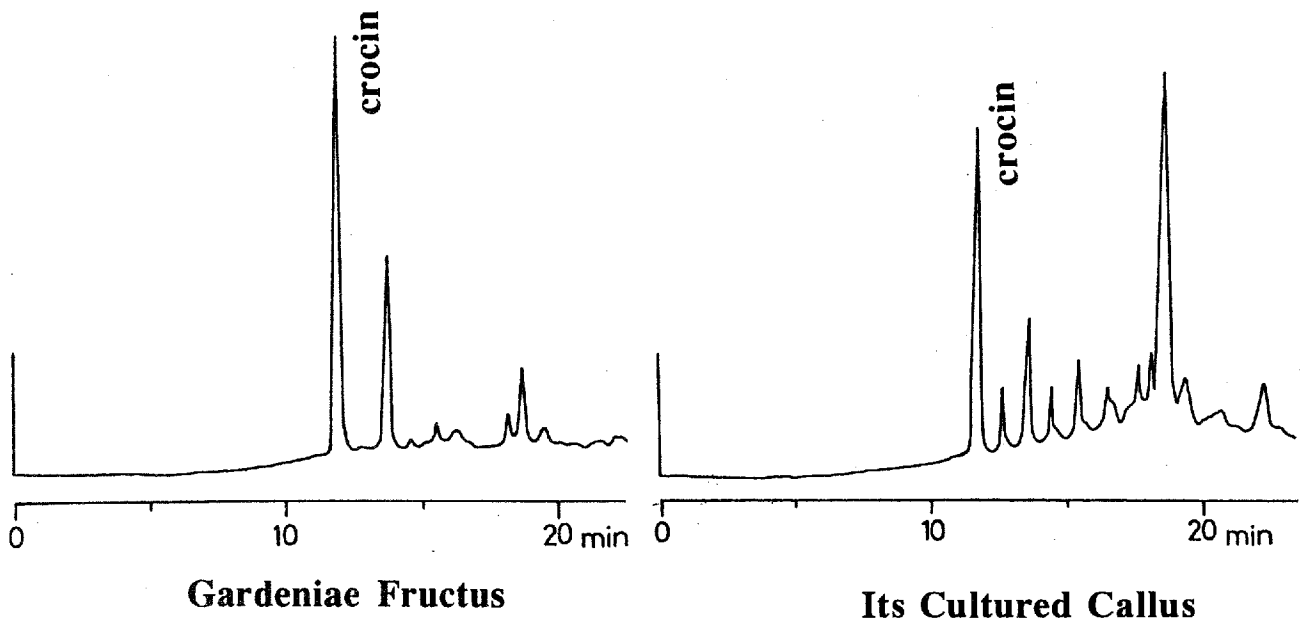


Fig.18. HPLC Chromatograms of MeOH ext. of Gardeniae Fructus and Its Cultured Callus

HPLC condition (crocin) ; column : TSKgel ODS-80TM (4.6mm i.d. × 250mm)

eluent : primary ; 5% aqueous MeOH, secondary ; 95% aqueous MeOH

secondary 50%-100%, 2.5%/min, linear gradient

flow rate : 0.6 ml/min, column temp. : room temp., detection : 438 nm

HPLC condition (geniposide, gardenoside) ; column : TSKgel ODS-80TM (4.6mm i.d. × 250mm)

eluent : primary ; H₂O-CH₃CN-MeOH (10:0.1:1), secondary ; H₂O-CH₃CN-MeOH (10:0.5:5)

secondary 0%-100%, 5%/min, linear gradient

flow rate : 0.7 ml/min, column temp. : room temp., detection : 254 nm

第3項 まとめ

以上に述べたように、サフランと同じ条件、つまりC18逆相系カラムで、移動相に60%メタノールを用いることにより、山梔子およびクチナシカルス中の crocin の定量が可能であることを明らかにした。

実験の部

一般法

[1] 核磁気共鳴 (NMR)

装置は J E O L NM-FX100 を使用した。 ^{13}C -NMR は 25 MHz、 ^1H -NMR は 100 MHz で測定し、溶媒は重ピリジン、重メタノール、重クロロホルムを用い、内部標準物質としてテトラメチルシラン (TMS) を使用した。

[2] 旋光度

装置はユニオン技研 PM-101 を使用し、層長 1 cm で測定した。

[3] 融点

装置は柳本製作所微量融点測定器 (未補正) を使用した。

[4] 赤外吸収スペクトル

装置は島津 IR-408 型赤外分光光度計を使用した。

[5] 紫外吸収スペクトル

装置は日本分光工業 UVIDEC-460 型ダブルビーム分光光度計を使用した。

[6] 各種クロマトグラフィー用担体

シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Kieselgel 60 (Art. 7734, Merck)、Kieselgel 60H (Art. 7736, Merck) を、逆相カラムクロマトグラフィーには、Lichroprep RP-18 (Merck) を、また多孔性樹脂の DIAION HP-20 (三菱化成) を使用した。

薄層クロマトグラフィーには、Kieselgel 60F254 (Art. 5554, Merck) を使用した。

第1章に関する実験

1. 材料

広島大学医学部附属薬用植物園において栽培している *Bupleurum falcatum* Linne (平尾台産ミシマサイコ) の茎頂部および腋芽を用いた。

2. 切片の調製

2～3 cmに調製した茎頂部および腋芽を流水で1時間洗浄した後、0.2% Tween 20 含有1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に10分間、70%エタノールに2～3秒間浸して滅菌し、滅菌水で5回洗浄した。この滅菌した茎頂部および腋芽を実体顕微鏡下で無菌的にメス、ピンセットを用いて茎頂ドーム 0.2～0.3mm を摘出し、植え付け切片とした。

3. 培地の調整

液体培地 基本培地には Murashige & Skoog (MS) 培地および Gamborg B5 (G) 培地を用い、MS 培地には sucrose 3%、B5 培地には sucrose 2% を添加した。これに植物生長調節物質 (植物ホルモン) として α -naphthaleneacetic acid (NAA) および 6-benzylaminopurine (BAP) をそれぞれ $0 \sim 2 \times 10^{-5}$ M の濃度で組み合わせて添加し、0.1N KOH および 0.1N HCl で pH を 5.7～5.8 に調整した。その後、 $\phi 30 \times 200$ mm の試験管に 25ml ずつ分注し、オートクレーブ中 (120°C , $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$) で 15 分間滅菌した。植物ホルモンの組み合わせは Table 3 に示した通りである。

固形培地 pH 調整までは、液体培地と同様に行った。その後 Gelrite を 0.2% 添加してオートクレーブで加熱溶解し、100ml の三角フラスコには 33ml ずつ、300ml のメルクローン用フラスコには 100ml ずつ分注し、オートクレーブ中 (120°C , $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$) で 15 分間滅菌した。

**Table 14-1. Organic Compositions of Murashige & Skoog(MS) ,
Gamborg B5(G) and White(W) Medium**

	MS ⁴¹⁾	G ⁴²⁾	W ⁵¹⁾
(mg/l)			
KNO ₃	1,900	2,500	80
NH ₄ NO ₃	1,650		
Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O			300
(NH ₄) ₂ SO ₄		134	
KH ₂ PO ₄	170		
NaH ₂ PO ₄		150	16.5
KCl			65
CaCl ₂ •2H ₂ O	440	150	
MgSO ₄ •7H ₂ O	370	250	720
NaSO ₄			200
Fe ₂ (SO ₄) ₂			2.5
FeSO ₄	27.8	27.8	
Na ₂ •EDTA	37.3	37.3	
MnSO ₄ •4H ₂ O	22.3		7.0
MnSO ₄ •H ₂ O		10.0	
ZnSO ₄ •7H ₂ O	8.6	2.0	3.0
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	1.5
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.025	0.025	0.001
Na ₂ MoO ₂ •2H ₂ O	0.25	0.25	
MoO ₃			0.0001
KI	0.83	0.75	0.75
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.025	0.025	

Table 14-2. Inorganic Compositions of Murashige & Skoog(MS) , Gamborg B5(G) and White(W) Medium

	MS ⁴¹⁾	G ⁴²⁾	W ⁵¹⁾
(mg/l)			
myo-inositol	100	100	
thiamine HCl	0.1	10	0.1
pyridoxine HCl	0.5	1	0.1
nicotinic acid	0.5	1	0.5
glycine	2.0		3.0
sucrose	30,000	20,000	20,000

4. 培養条件

液体回転培養は、広島大学医学部附属薬用植物園管理舎内の培養室（25±2℃）において 6000 lux, 24 時間照明下、2 rpmで行った。また静置培養は、同管理舎内の無菌室（25±2℃）において 2500 lux, 16 時間照明下で行った。

継代培養は、液体回転培養においては1ヶ月おきに、静置培養においては2ヶ月おきに行った。

5. 超薄切片作成⁷⁸⁾

10%ホルマリンで4℃、24 時間固定後、2-メトキシエタノール、エタノール（無水）、1-プロパノール、1-ブタノール（無水）の各々で順次脱水し、グリコールメタクリレート（94.5%）、2,2'-アゾビス（2-メチルプロピオニトリル）（0.5%）、ポリエチレングリコール（5%）のモノマーミクスチャーを浸透させた後、加温重合させて包埋した。これを滑走式マイクロトームで4～5 μmの厚さに切片を切り、0.05%トルイジンブルーで染色してプレパラート作成し、光学顕微鏡で観察した（手順はTable 15 に示す）。

グリコールメタクリレートは不純物除去の為にアンバーリスト A-21（非水用イオン交換樹脂）のカラムを通し、pH が7付近であることを確認した。モノマーミクスチャーは、上記3種の混合物をスターラーで1時間攪拌した後に濾過して用いた。

Table 15. Preparation of Tissue's Section⁷⁸⁾

1) Fixation	
10% Formaline solution ^{a)}	4°C, 24hr
2) Dehydration	
2-Methoxyethanol	4°C, 24hr
Ethanol(anhydride)	4°C, 24hr
1-Propanol	4°C, 24hr
1-Butanol(anhydride)	4°C, 24hr
3) Infiltration with "monomer mixture ^{b)} "	4°C, 24hr, 3 times
4) Embedding	40°C, 2days and 60°C, 1day
5) Section with microtome	
6) Stain with 0.05% toluidine blue	10~15min

a) 10% Formaline solution

10% Formaldehyde	4ml
0.1M KH ₂ PO ₄	3ml
0.1M Na ₂ HPO ₄	3ml

b) monomer mixture

Purified glycol methacrylate	20ml
2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile)	0.1g
Polyethylene glycol 400	1ml

6. 走査型電子顕微鏡試料作成

2.5%グルタルアルデヒドで固定した後、四酸化オスミウム、タンニン酸で処理し、エタノールで脱水した。その後、酢酸イソアミルを浸透させて臨界点乾燥し、真鍮試料台に載せて金蒸着し走査型電子顕微鏡で観察した（手順は Table 16 に示す）。

Table 16. Preparation of Scannig Electric Microscope

1)2.5% Glutaraldehyde	2hr
2)Rinse with 0.1M phosphate buffer	10min, 3times
3)1% Osmium tetroxide	1hr
4)Rinse with 0.1M phosphate buffer	10min, 6times
5)2% Tannic acid	2hr
6)Rinse with 0.1M phosphate buffer	10min, 3times and over night
7)1% Osmium tetroxide	1hr
8)Rinse with 0.1M phosphate buffer	10min, 6times
9)Dehydration with aqueous ethanol 70, 80, 90, 95 aqueous EtOH, EtOH	30min, each
10)Isoamyl acetate	
11)Critical point dry	
12)Mount on brass sample stage	
13)Coating with gold	

7. 染色体観察

8-ヒドロキシキノリン (2 mM) で前処理し、根端はエタノール-酢酸 (3:1) で、茎頂および苗条原基はエタノール-酢酸-クロロホルム (2:1:1) で固定した。固定した標本を2%アセトオルセインで染色し、押しつぶし法によりプレパラートを作成し、光学顕微鏡で観察した。(手順はTable 17 に示す。)

ただし苗条原基は固定後、フォイルゲン二重染色法⁷⁹⁾にて染色した。(手順はTable 18 に示す。)

Table 17. Process of Preparation

	<u>Shoot Tip</u> Regenerated Plant	<u>Root Tip</u> Regenerated Plant	Original Plant
Pretreatment(18°C) 2mM 8-hydroxyquinoline	3.5hr	3.5hr	4.0hr
Fixation(4°C) 24hr	EtOH-CHCl ₃ -AcOH 2:1:1	EtOH-CHCl ₃ 3:1	
Maceration(60°C) 10~15sec	1N HCl-45% AcOH 2:1		
Stained with 2% aceto-orcein 10~15sec			
Squash			

Table 18. Preparation of Feulgen's Stain⁷⁹⁾

1) Pretreatment	
2mM 8-Hydroxyquinoline	18°C, 3.5hr
2) Fixation	
EtOH-CHCl ₃ -AcOH(2:1:1) or EtOH-AcOH(3:1)	4°C, 1day
3) Wash	
70%, 50%, 30%, 15% aqueous EtOH	5min, each
Distillated water	2times
4) Maceration	
1N HCl	5min, room temp.
1N HCl	5min, 60°C
1N HCl	5min, room temp.
Distillated water	5times
5) Stain	
Staining solution ^{a)} (closed)	1hr
Sulfite solution ^{b)}	2min, 2times
Distillated water	5times

a) Staining solution

Basic Fuchsin	5g
Distillated water	1000ml(100°C)
1N HCl	100ml
Potassium Pyrosulfite	5g

b) Sulfite solution

10% Sodium Pyrosulfite	5ml
1N HCl	5ml
Potassium Pyrosulfite	100ml

8. 土壌への移植

底に穴を開けたポリビニール製のパックを70%エタノールで拭き、滅菌したバーミキュライトを敷き詰めて下から水を吸わせる。発根した幼植物体を無菌的に移植し、最初は乾燥しないようにもう1枚のパックを蓋にし、灌水しながら徐々に蓋をずらして乾燥に馴らしていく。バーミキュライトに移植して約1ヶ月後に露地に移植した。

第2章に関する実験

1. 材料

広島大学医学部附属薬用植物園において栽培している *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miquel (広島県産カギカズラ) の葉を用いた。

2. 切片の調製

若葉を70%エタノールに10秒間、8%さらし粉濾液に10分間浸して滅菌した後、滅菌水で2回洗浄した。この滅菌した若葉を主脈を含むように5mm四方に調製し、植え付け切片とした。

3. 培地の調整

基本培地には、MS培地、G培地およびW培地を用い、MS培地には sucrose 3%、GおよびW培地には sucrose 2%を添加した。これに植物ホルモンとして、カルス誘導時には、2,4-D、NAAおよびKinを、植物ホルモン検討時には、2,4-D、NAA、IAA、IBA、KinおよびBAPをそれぞれ組み合わせて添加し、0.1N KOH および 0.1N HCl で pH を5.7 ~ 5.8 に調整した。その後、寒天 (0.7%) および Gelrite (0.2%) を添加してオートクレーブで加熱溶解し、 $\phi 30 \times 200\text{mm}$ の試験管に 25ml ずつ分注し、オートクレーブ中 (120°C , $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$) で15分間滅菌した。

4. 培養条件

培養は、広島大学医学部附属薬用植物園管理舎内の培養室 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) において暗黒下および 2000~2500 lux 16時間照明で行った。ただし照明下での実験は、カルス誘導の検討の際に行ったのみで、他の全ての実験は暗黒下で行った。

5. アルカロイド生産条件の検討

アルカロイド生産条件の検討は、カルス $200 \pm 5\text{mg}$ (生重量) を植え付け、条件あたり4本ずつ、5週間、3代培養し、3代目の結果によって検討を行った。ただし生長曲線の検討の場合は、カルス 1.2~1.3g (生重量) を植え付けた。

6. アルカロイド類の成分分析

凍結乾燥したカルスを熱メタノールで抽出し、そのメタノールエキスを4%ギ酸

／10%メタノール-クロロホルムで分配した。その水層をアンモニア水でアルカリ性にした後、クロロホルムで抽出しTLCサンプルとした。

展開溶媒にアセトン：メタノール（20:1）および n-ヘキサン：酢酸エチル(1:1)を用い、254 nm の紫外吸収およびドラージェンドルフ試薬による呈色反応によって検出した。化合物生産の有無は、アルカロイド標品とのRf値を比較することによって行った。

7. アルカロイドの抽出法

常法に従い、凍結乾燥したカルスをクロロホルム-アンモニア混液で加熱抽出し、ベンゼン：酢酸エチル：メタノール（2:2:1）にてアルミナカラムに付し、更にベンゼン：酢酸エチル（2:1）／10%硫酸で分配した。その水層をアンモニア水にてアルカリ性にし、クロロホルムで抽出し、サンプルとした。

生カルスをクロロホルム-アンモニア水でホモジナイズし、1500 rpm、15分間遠心分離した後、クロロホルム層をとりサンプルとした。

またアセトニトリル-水-酢酸（50:100:1）混液で一晩冷浸し、ミリポアフィルターでろ過し、サンプルとした。

8. アルカロイドの定量

凍結乾燥したカルス50mgをアセトニトリル-水-酢酸（50:100:1）混液 2 mlで一晩冷浸し、ミリポアフィルターで濾過し、HPLC用試料溶液とした。

9. アルカロイド定量の装置および測定条件

高速液体クロマトグラフィーには、東ソー製CCPD型ポンプおよびUV8000型紫外可視検出器を用いた。カラムは、TSKgel ODS-120T（4.6mm i.d. × 250mm）を用いた。測定条件は、以下の通りである。

HPLC測定条件

移動相：アセトニトリル-水-酢酸（50:100:1）

流速：0.75 ml/min

カラム温度：40℃

検出波長：254 nm

感度：0.02 AUF

試料注入量：10 μl

10. カルスの抽出および単離精製

IAA ($10^{-4}M$) - BAP ($3 \times 10^{-5}M$) 添加G培地、暗黒下、 $25 \pm 2^\circ C$ で増殖させたカルスを凍結乾燥後、80.0 gの乾燥カルスを得、ベンゼンで3回、続いてメタノールで4回抽出し、各々のエキスを1.1 g、31.0 gを得た。

得られたベンゼンエキスをシリカゲルカラムクロマト (溶媒; クロロホルム、クロロホルム:メタノール) に付し、クロロホルム:メタノール (50:1) 溶出画分を、クロロホルム-メタノールで結晶化することにより Compound 1 (63mg, 0.079%) を得た。さらにクロロホルム:メタノール (25:1) 溶出画分を薄層用シリカゲルプレート (展開溶媒; クロロホルム:アセトン=1:1) に付し、かき取り行うことにより、Compound 4 (16mg, 0.016%) を得た。

得られたメタノールエキスを多孔性樹脂カラムクロマト (DIAION HP-20) (溶媒; 15、30、50、80含水メタノール、メタノール、クロロホルム) に付した。80%含水メタノール、メタノール、クロロホルム溶出画分を合し、シリカゲルカラムクロマト (溶媒; クロロホルム:アセトン:メタノール) に付し、メタノール溶出画分を更にシリカゲルカラムクロマト (溶媒; クロロホルム:メタノール:水) に付した。クロロホルム:メタノール:水 (15:4:0.4) 溶出画分を更にシリカゲルカラムクロマトを繰り返すことにより、Compound 2 (60mg, 0.075%) を得た。またクロロホルム:メタノール:水 (15:2:0.2) 溶出画分を更にシリカゲルカラムクロマトを繰り返すことにより、Compound 3 (18mg, 0.023%) を得た。

Compound 1 (ursolic acid)

white powder, m.p.: $258-260^\circ C$ [lit.⁵⁷) $278-280^\circ C$], $[\alpha]_D^{21} +68^\circ$ (c=0.27, MeOH) [lit.⁵⁷) $[\alpha]_D^{21} +76.8^\circ$]

^{13}C -NMR Data : Table 6 (本文中 p.36) を参照

Compound 2 (3 α -dihydrocadambine)

pale yellow powder, m.p.: $179-184^\circ C$ (decomp.) [lit.⁴⁵) amorphous], $[\alpha]_D^{21} -103^\circ$ (c=0.67, MeOH) [lit.⁴⁵) $[\alpha]_D -91^\circ$], UV λ max(MeOH)nm(log ϵ): 226(4.44), 274(3.66), 282(3.68), 290(3.59), IR ν max(KBr)cm⁻¹: 3300(NH, OH), 1680(C=O), 1630(C=C), 1H -NMR(CD₃OD): δ ; 3.79(3H, s, OMe), 4.29(1H, broad t, J=6Hz), 5.56(1H, d, J=9Hz), 6.9-7.4(4H), 7.54(1H, s)

^{13}C -NMR Data : Table 6 (本文中 p.36) を参照

Compound 3 (hirsutine)

amorphous, $[\alpha]_D^{20} +46^\circ$ (c=1.2, CHCl₃)[lit.⁴⁷] $[\alpha]_D^{30} +66.5^\circ$], UV λ max (CHCl₃)nm(log ϵ): 224(4.17), 283(3.76), 292(3.68), IR ν max(CHCl₃)cm⁻¹: 3450 (NH), 1700(C=O), 1645(C=C), ¹H-NMR(CDCl₃): δ ; 0.78(3H), 3.67 (3H, s, OMe), 3.75(3H, COOMe), 4.63(1H, m), 8.75(1H, NH)

¹³C-NMR Data : Table 6 (本文中 p.36) を参照

Compound 4 (hirsuteine)

amorphous, $[\alpha]_D^{22} +60^\circ$ (c=0.83, CHCl₃)[lit.⁴⁷] $[\alpha]_D^{29} +68.5^\circ$], UV λ max (CHCl₃)nm(log ϵ):224(4.15),282(3.73),292(3.65), IR ν max(CHCl₃)cm⁻¹: 3450 (NH), 1690(C=O), 1640(C=C), 930(-CH=CH₂), ¹H-NMR(CDCl₃): δ ; 3.68 (3H, s, OMe), 3.71(3H, COOMe), 4.50(1H, m), 4.95(2H, m), 5.28(1H, m), 8.20 (1H, NH)

¹³C-NMR Data : Table 6 (本文中 p.36) を参照

第3章に関する実験

1. 材料

福岡県飯塚市および広島県作木村において入手した *Gentiana scabra* Bunge var. *burgeri* (Miwuel) Maximowicz (リンドウ) を用いた。

2. 切片の調製

1～2 cm に調製した茎頂部および腋芽を流水で1時間洗浄した後、0.1% Tween 80 含有3%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に10分間、70% EtOH に30秒間浸して滅菌した後、滅菌水で2回洗浄した。この滅菌した茎頂部および腋芽を実体顕微鏡下で無菌的にメス、ピンセットを用いて葉原基2枚を含む茎頂ドーム 1.0～2.0mm を摘出し、植え付け切片とした。

3. 培地の調整

基本培地には、MS培地を用い、sucrose 3%を添加した。これに植物生長調節物質としてNAA、IAA、IBA、BAPおよび gibberellin A₃ (GA) をTable 9～12 に示した濃度で組み合わせて添加し、0.1N KOH および 0.1N HCl で pH を 5.7～5.8 に調整した。その後、Gelrite を 0.2% 添加してオートクレーブで加熱溶解し、300ml のメリクロン用フラスコに 100ml ずつ分注し、オートクレーブ中 (120℃, 1.2kg/cm²) で 15 分間滅菌した。

4. 培養条件

培養は、25±2℃、2500 lux、16時間照明下で行った。継代培養は、約2ヶ月おきに行った。

5. 成分定量の試料調製

収穫した根および根茎を乾燥し、粉末にして50mgを正確に量りとり、メタノール5mlで超音波処理により15分間冷浸した。この操作を3回繰り返した。それぞれの抽出エキスを合わせて溶媒を減圧乾固し、その残渣を水0.5mlに溶解した。これを Sep-Pak C18 カートリッジに負荷し、水15mlで洗浄後、50%メタノール15mlで溶出した。この溶出液を減圧乾固後、HPLCの移動相である 0.01M 酢酸ナトリウム (pH 4.6) : メタノール (1:1) 溶液で正確に2mlとした。内部標準物質として *p*-anisic acid を最終濃度が0.25mg/mlとなるように添加した。

6. 成分定量の装置および測定条件

高速液体クロマトグラフィーには、ガスクロ工業製の model 576 を用いた。カラムは、Inatosil ODS (4.6mm i.d. ×250mm) を用いた。

測定条件は、以下の通りである。

HPLC 測定条件

移動相：0.01M 酢酸ナトリウム (pH 4.6) : メタノール (1:1)

流速：0.5 ml/min

カラム温度：室温

検出波長：265 nm

感度：0.16 AUF

試料注入量：10 μ l

第4章に関する実験

1. 材料

広島県双三郡作木村より購入および国立衛生試験所和歌山薬用植物栽培試験場より分与された *Crocus sativus* Linne (サフラン) を用いた。

2. 切片の調製

開花前のサフランの球根から6から15cmに伸びた花茎を切り取り、オスバン(塩化ベンザルコニウム)100倍希釈液に5分間、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に5分間浸した後、70%エタノールに2~3秒間浸して滅菌した後、滅菌水にて3回洗浄して滅菌を行った。滅菌した花茎から花芽を無菌的に取り出し、柱頭・花柱・花被から子房へ続く部分は3等分、やく・子房は2等分して合計18の植え付け切片とした (Fig.12)。

3. 培地の調整

基本培地にはLinsmaier & Skoog (LS) 培地およびG培地を用い、LS培地には sucrose 3%、G培地には sucrose 2% を添加した。これに植物生長調節物質としてNAA、BAPおよびGAを0~ 3×10^{-5} Mの濃度で組み合わせて添加し、0.1N KOH および 0.1N HCl で pH を 5.7 ~ 5.8 に調整した。その後、Gelrite を 0.2% 添加してオートクレーブで加熱溶解し、100mlの三角フラスコには33mlずつ分注し、オートクレーブ中 (120°C, 1.2kg/cm²) で15分間滅菌した。GAは滅菌した培地が固まらないうちにミリポアフィルター (0.22 μm) で濾過滅菌して添加した。

4. 培養条件

培養は、広島大学医学部附属薬用植物園管理舎内の培養室および無菌室のインキュベーター (25±1°C) において暗黒下で行った。

継代培養は、約2ヶ月おきに行った。

5. 成分確認および定量の試料調製

収穫した柱頭様組織を乾燥し、50mgを正確に量りとり、90%含水メタノール1mlで一昼夜冷浸した。その後、ミリポアフィルターでろ過し、正確に2mlとした。生薬サフランも同様の操作を行った。

6. 成分確認の装置および測定条件

高速液体クロマトグラフィーには、東ソー製 C C P Mポンプ、UV-8000 型紫外吸収検出器を用いた。カラムは、TSKgel ODS-80TM (4.6mm i.d. ×150mm) を用いた。測定条件は、以下の通りである。

HPLC 測定条件

移動相 : primary ; 5% aqueous MeOH, secondary ; 95% aqueous MeOH
secondary 50%-100%, 3.3%/min, linear gradient

流速 : 0.6 ml/min

カラム温度 : 室温

検出波長 : 254 nm, 438 nm

感度 : 0.08 AUF

試料注入量 : 10 μ l

7. 成分定量の装置および測定条件

高速液体クロマトグラフィーは、6 と同じく、測定条件は、以下の通りである。

HPLC 測定条件

移動相 : 60% 含水メタノール

流速 : 1.0 ml/min

カラム温度 : 室温

検出波長 : 438 nm

感度 : 0.08 AUF

試料注入量 : 10 μ l

第5章に関する実験

1. 材料

広島大学医学部附属薬用植物園において栽培している *Gardenia jasminoides* Ellis f. *grandiflora* Makino の子房および果実を用いた。

2. 切片の調製

(a) 子房部

花柄をなるべく残すようにして蕾を枝から切り取り、花冠・萼を取り除いて、流水で1時間洗浄した。70%エタノールに30秒間、0.2% Tween 20 含有1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に20分間浸した後、滅菌水にて3回洗浄して滅菌を行った。滅菌した子房部を4等分して植え付け切片とした (Fig.17)。

(b) 果実部

果柄をなるべく残すようにして果実を枝から切り取り、萼を取り除いて滅菌した。滅菌条件は、(a)と同様である。滅菌した果皮・果柄部は4等分、果肉・種子部は3等分して植え付け切片とした (Fig.17)。

3. 培地の調整

基本培地にはL S培地およびG培地を用い、L S培地には sucrose 3%、G培地には sucrose 2% を添加した。これに植物生長調節物質としてNAA、IAA、IBAおよびBAPを $0 \sim 3 \times 10^{-5} M$ の濃度で組み合わせて添加し、0.1N KOH および0.1N HClでpHを5.7~5.8に調整した。その後、Gelriteを0.2%添加してオートクレーブで加熱溶解し、100mlの三角フラスコには33mlずつ分注し、オートクレーブ中 ($120^{\circ}C, 1.2kg/cm^2$) で15分間滅菌した。

4. 培養条件

培養は、広島大学医学部附属薬用植物園管理舎内の培養室および無菌室のインキュベーター ($25 \pm 1^{\circ}C$) において暗黒下で行った。

継代培養は、約2ヶ月おきに行った。

5. 成分確認および定量の試料調製

収穫したカルスを凍結乾燥し、50mgを正確に量りとり、メタノール1mlで一昼夜冷浸した。その後、ミリポアフィルターでろ過し、正確に2mlとした。

6. 成分確認の装置および測定条件

高速液体クロマトグラフィーには、東ソー製 C C P M ポンプ、U V - 8000 型紫外吸収検出器を用いた。カラムは、TSKgel ODS-80TM (4.6mm i.d. ×150mm) を用いた。測定条件は、以下の通りである。

H P L C 測定条件 (crocin)

移動相 : primary ; 5% aqueous MeOH, secondary ; 95% aqueous MeOH
secondary 50%-100%, 2.5%/min, linear gradient

流速 : 0.6 ml/min

カラム温度 : 室温

検出波長 : 438 nm

感度 : 0.08 AUF

試料注入量 : 10 μ l

H P L C 測定条件 (geniposide, gardenoside)

移動相 : primary ; H₂O-CH₃CN-MeOH (10:0.1:1),
secondary ; H₂O-CH₃CN-MeOH (10:0.5:5)
secondary 0%-100%, 5%/min, linear gradient

流速 : 0.7 ml/min

カラム温度 : 室温

検出波長 : 254 nm

感度 : 0.08 AUF

試料注入量 : 10 μ l

7. 成分定量の装置および測定条件

用いた装置および測定条件は、第4章のサフランの項と同じである。

総括

近年、本邦において漢方医学が再認識され、生薬の需要が急激に増加しているが、その原料となる生薬の80~90%は海外からの輸入に依存している。また生薬の生産は、野生植物の採取あるいは野生種の栽培によるものがほとんどであり、育種のなされた原料植物は皆無に等しい。野生種は遺伝的に雑多であり、これから製造される生薬の品質に著しい格差が生じることは免れ得ないところである。また、野生植物の乱獲による生薬資源の枯渇も危惧されている。かかる現状から、薬用植物の国内生産、優良品種の育成、生薬の均質化は緊急な課題と言えよう。

本研究は、薬用植物の組織培養に関する研究の一環として、均一な優良品種の育成と生薬原料としての資源確保を目的とし、主としてミシマサイコ（柴胡）およびリンドウ（竜胆）の組織培養法による大量クローン増殖法について検討した。またカギカズラ（釣藤鈎）、サフランおよびクチナシ（山梔子）については、有用物質の安定供給を目的とし、組織培養法による有用二次代謝産物の生産について検討した。

第1章では、生薬「柴胡」の均質化と安定供給を目的に、基原植物であるミシマサイコの茎頂を材料とした液体回転培養法を検討し、苗条原基の形成によるミシマサイコの大量クローン増殖法を確立した。

まず、茎頂を液体回転培養することにより苗条原基を誘導し、増殖した苗条原基を幼植物体に復原させる方法を確立した。継代培養による苗条原基の増殖能および再分化能の低下は認められなかった。また得られた苗条原基および復原植物体の染色体数は親株と同数で遺伝的にも安定していた。

苗条原基から復原した植物体の根の成分と、材料に用いた植物体の根の成分を比較した結果、TLCパターン上差は認められず、品質においても親植物と同一であることが明らかとなった。

本成果により、多年生薬用植物において初めて苗条原基によるクローン増殖法が確立され、ミシマサイコ1個の茎頂から1年間に 5×10^6 個のクローン植物体を得ることが可能となった。この方法によって、生薬「柴胡」の均一な優良品種の育成と生薬原料としての資源確保が可能となった。

第2章では、カギカズラのカルス培養によるアルカロイド生産について検討し、効率的なアルカロイド生産に適した培養条件を得た。また、最適条件下でカルスを増殖させ、3種のアルカロイドとトリテルペンを単離した。

まず、カギカズラの若葉からカルスを誘導し、カルスにおいて hirsuteine、hirsutine などのアルカロイドが生産されていることを確認した。カルスの生長およびアルカロイドの生産性を上げるため、植物ホルモン、基本培地、sucrose 濃度、固形化剤および窒素源の条件を検討した結果、植物ホルモンには I A A - B A P ($10^{-4}M : 3 \times 10^{-5}M$)、基本培地には Gamborg B5 培地、sucrose 濃度は 2%、固形化剤は寒天、また窒素源は硝酸性窒素 (25mM) : アンモニア性窒素 (6mM) が最適であることが明らかとなった。

また、最適条件下で培養したカルスから主生成物として ursolic acid、hirsutine、hirsutein、 3α -dihydrocadambine を単離した。葉を材料として用いたにもかかわらず、誘導されたカルスのアルカロイド組成は、インドールアルカロイドである hirsutine、hirsuteine が大部分を占め、カギカズラの地下部のアルカロイド組成に類似していた。

今回、単離した 3α -dihydrocadambine は、釣藤鈎からの収率が、0.0015%であるのに比べ、カルスからの収率は0.075%と50倍の高収率であった。原植物では微量にしか生産されない 3α -dihydrocadambine が、カルス培養によって主アルカロイドとして高濃度で生産されることは興味深いことであった。

第3章では、生薬「竜胆」の均質化を目的として、基原植物であるリンドウの茎頂を材料に組織培養による大量増殖法について検討し、多芽体形成による大量増殖法を明らかにした。

まず、茎頂を G A : B A P 添加培地で培養することにより多芽体を誘導し、増殖した多芽体を発根させて幼植物体を得る方法を確立した。継代培養による多芽体の増殖能および再分化能の低下は認められなかった。本法によれば、1個の茎頂から年間 5×10^8 個の幼植物が得られることになる。

また、多芽体形成によって得られた培養生株の根および根茎中の主成分である gentiopicroside を定量した結果、同一系統の種子を播種して得られた栽培株よりも含量のばらつきが小さくなり、均質な生薬「竜胆」の得られることが明らかとなった。

第4章では、サフランの開花前の若い花芽を用いた器官培養による黄色色素 crocin の生産について検討し、効率的に柱頭様組織を形成できる器官およびその成熟化に適した培養条件を明らかにした。

まず、開花前の若い花芽全体を用いて植え付ける器官の違いによる柱頭様組織の形成量の差について検討を行い、花被から子房へ続く部分および花柱で有効に柱頭様組織が形成されることを明らかとした。その中でも柱頭様組織の形成に最適であったのは、子房に近い花被部であった。

また形成された柱頭様組織を植物ホルモン濃度の低い N A A : B A P 添加培地に移植することにより、crocin 含量を生薬サフランに匹敵させることが可能となった。

さらに成熟化させた柱頭様組織の基部を培養することにより、再度カルスを経由して、柱頭様組織を形成させることが可能であることも明らかとした。このサイクルを経ることにより、培養サフラン雌しべの大量増殖が可能であると考えられる。

今回、植え付ける器官の違いによる柱頭様組織の形成量の差を検討したが、柱頭から遠い花被部で、柱頭様組織が効率よく形成されたことは、形態発生上および遺伝子発現を探る上で非常に興味を持たれるところである。

第5章では、クチナシの結実前の子房および結実後の果実を材料に用いて、カルス培養による黄色色素 crocin の生産について検討し、crocin の生産およびカルスの生育に適した培養条件を明らかにした。

材料として用いた子房部および果実・果柄部の部位の違いによる色素生産能やカルス生育の優位な差は認められなかった。

また色素生産能を持つカルスの誘導には、N A A、B A P の両植物ホルモンの低濃度の L S および G 培地、I A A の濃度が高く、B A P の濃度が低い L S 培地および I B A、B A P の両植物ホルモン濃度が高い G 培地が適していた。

引用文献

1. T.Furuya, K.Syono and A.Ikuta, *Phytochemistry*, **11**,175(1972)
2. M.Tabata,H.Mizukami,N.Hiraoka and M.Konoshima, *ibid*,**13**,927(1974)
3. D.D.Songstad,K.L.Giles,J.Park,D.Novakouski,D.Epp and L.Friesen,
J.Plant Physiol.,**136**,236(1990)
4. E.Tamaki,N.Nishida,K.Kato and T.Matsumoto, *Japan Patent*,No.48-4560(1973)
5. J.Shikata,Y.Sekiya and S.Miyano, *Japan Patent*,No.62-69984(1987)
6. K.G.Ramawat and H.C.Arya, *Phytochemistry*,**18**,484(1979)
7. T.Furuya and T.Ishii, *Japan Patent*,No.48-31917(1973)
8. H.Yamamoto,N.Chatani,A.Kitayama and T.Tomimori, *Plant Cell Tissue
Organ Cult.*,**5**,219(1986)
9. S.Ohta and M.Yatazawa, *Agric.Biol.Chem.*,**43**,297(1979)
10. K.Sakata,H.Tanaka,N.Mukai and M.Misawa, *Agric.Biol.Chem.*,**38**,217(1974)
11. A.Fethneto,F.DiCosmo,W.F.Reynolds and K.Sakata, *Biotechnol.*,**10**,1572
(1992)
12. K.Shono and T.Furuya, *Experientia*,**28**,236(1972)
13. Y.Miura,H.Fukui and M.Tabata, *Planta Med.*,**54**,79(1988)
14. W.Chang and Y.Hsing, *Nature*,**284**,341(1980)
15. 平岡昇, 児玉知子, 富田裕, 生薬学雑誌, **37**,62(1983)
16. Y.Shoyama,I.Nishioka,N.Fujioka,H.Kohda and K.Yamasaki, 生薬学雑誌,
41,333(1987)
17. F.M.Wambugu and T.S.Rangan, *Plant Science Letters*,**22**,219(1981)
18. H.Miyagawa,N.Fujioka,H.Kohda,K.Yamasaki,K.Taniguchi and R.Tanaka,
Planta Med.,321(1986)
19. I.Erdei,Z.Kiss and P.Maliga, *Plant Cell Rep.*,**1**,34(1981)
20. 下村講一郎, 手嶋大輔, 正山征洋, 西岡五夫, 生薬学雑誌,**34**,306(1980)
21. 下村講一郎, 正山征洋, 西岡五夫, 生薬学雑誌,**35**,115(1981)
22. Y.Shoyama,M.Nagano and I.Nishioka, *Planta Med.*,**48**,124(1983)
23. Y.Shoyama,R.Tareno and I.Nishioka, 生薬学雑誌,**41**,313(1987)
24. Y.Shoyama,M.Nagano and I.Nishioka, *Planta Med.*,**49**,14(1983)
25. K.Hatano,K.Kamura,Y.Shoyama and I.Nishioka, *ibid*,152(1988)
26. 松本まさみ, 長野益子, 正山征洋, 西岡五夫, 生薬学雑誌,**40**,198(1986)
27. R.Tanaka and H.Ikeda, *Jpn.J.Genet*,**58**,65(1983)

28. 田中隆莊, 谷口研至, 宮川秀樹, 藤重郁子, 池田秀雄, *薬学雑誌*, **108**,1023 (1988)
29. 綾部昌則, 佐藤禎浩, 岩田光, 谷口研至, 田中隆莊, *育種学雑誌*, **37**,132 (1987)
30. H. Hamada, T. Hoshino and K. Ohsato, *植物組織培養*, **8**,190(1991)
31. H. Ishii, M. Nakamura, S. Seo, K. Tori, T. Tozyo and Y. Yoshimura, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**,2367(1980)
32. 武田健一, *代謝*, **10**,676(1973)
33. M. Yamamoto, A. Kumagai and Y. Yashimura, *Arzneim-Forsch*, **25**,1021(1975)
34. M. Yamamoto, A. Kumagai and Y. Yashimura, *ibid*, **25**,1240(1975)
35. H. Abe, M. Sakaguchi, H. Konoshi, T. Tani and A. Arichi, *Planta Med.*, **34**,160 (1978)
36. 飯田修, 佐竹元吉, 葵一八, 西孝三郎, 堀越司、日本生薬学会第32年会 (岡山) 講演要旨集, p56(1985)
37. 天野明美, 藤本賢治, 大橋裕, 佐藤美香, 水上元, *生薬学雑誌*, **43**,192(1989)
38. 西本和光、*現代東洋医学*, **1**,51(1980)
39. 霜川由志子, 奥田生世, 桑野美都子, 大橋裕, *生薬学雑誌*, **34**,239(1980)
40. 魚森温子, 妹尾修次郎, 冨田裕, *生薬学雑誌*, **28**,152(1974)
41. T. Murashige and T. Skoog, *Physiol. Plant.*, **15**,473(1962)
42. O. L. Gomborg R. A. Miller and K. Ojima, *Exp. Cell Res.*, **50**,151(1968)
43. 太田茂樹, 三橋博, 田中隆莊, *植物研究雑誌*, **61**,212(1986)
44. 田中隆莊, “種苗産業と育種新技術” CMC, 東京, p171(1983)
45. K. Endo, Y. Oshima, H. Kikuchi, Y. Yoshihara and H. Hikino, *Planta Med.*, **49**,188 (1983)
46. 川添禎浩, 水上元, 大橋裕, *生薬学雑誌*, **47**,316(1993)
47. 萩庭丈寿, 坂井進一郎, 相見則郎, 山中悦二, 新聞信夫, *薬学雑誌*, **93**,448 (1973)
48. Y. Ozaki, M. Harada and S. Sakai, *Japan J. Pharmacol.*, **30**,137(1980)
49. A. I. Scott, *Accounts Chem. Res.*, **3**,151(1974)
50. R. T. Brown, M. F. Jones and M. Wingfield, *J. C. S. Chem. Commun.*, 847(1984)
51. N. Finch and W. I. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**,3871(1962)
52. 山中悦二, 君塚ゆみ子, 相見則郎, 坂井進一郎, 萩庭丈寿, *薬学雑誌*, **103**, 1028(1983)

53. P. M. White, *The Cultivation of Animal and Plant Cells*(2nd ed), Ronald Press, New York, 1963
54. Y. Fujita, Y. Hara, J. Ogino and C. Suga, *Plant Cell Rep.*, **1**, 59(1981)
55. S. Hara, N. Yamaguchi, C. Nakae and S. Sakai, *Anal. Chem.*, **52**, 33(1980)
56. 西村正, 先名淳, 中島久美子, 弓岡栄三郎, 日本薬学会第102年会(大阪)講演要旨集, p580(1982)
57. S. Seo, Y. Tomita and K. Tori, *J. C. S. Chem. Commun.*, 954(1975)
58. T. Brown and S. B. Fraser, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 1957(1974)
59. K. Aisaka, Y. Hattori, T. Kihara, T. Ishihara, K. Endo and H. Hikino, *Planta Med.*, 424(1985)
60. 林輝明, 薬学雑誌, **96**, 356(1976)
61. 丸田一成, 清野澄夫, 松本悦夫, 長野県野菜花き試験場報告, **5**, 57(1989)
62. Y. Amano, H. Nishizawa, K. Taniguchi, K. Kondo and S. Nishimura, *Jpn. J. Breed.*, **39**, 112(1989)
63. 赤田良信, 河野貞子, 山岸正治, 棚瀬弥一郎, 薬学雑誌, **99**, 1047(1979)
64. R. Kuhn and A. Winterstein, *Ber.*, **67**, 344(1934)
65. E. Winterstein, *Z. physiol. Chem.*, **120**, 141(1922)
66. 山口彦之, 恩命, 第9回植物組織培養シンポジウム大会講演要旨集, p133(1985)
67. Bing Bao-zu, Bai Shu-hua, Wu Yi and Fan Xiao-ping, *Acta Bot. Sinica*, **23**, 419(1981)
68. I. Ilahi, M. Jabeen and Firdous, *J. Plant Physiol.*, **128**, 227(1987)
69. T. Matsuzaki, A. Koiwai, S. Iwai and Y. Yamada, *Plant and Cell Physiol.*, **25**, 197(1984)
70. A. Koyama, Y. Ohmori, N. Fujioka, H. Miyagawa, K. Yamasaki and H. Kohda, *Planta Med.*, 357(1987)
71. A. Koyama, Y. Ohmori, N. Fujioka, H. Miyagawa, K. Yamasaki and H. Kohda, 生薬学雑誌, **41**, 226(1987)
72. G. S. Hicks and A. Mchughen, *Planta*, **121**, 193(1974)
73. G. S. Hicks and I. M. Sussex, *Can. J. Bot.*, **48**, 133(1970)
74. H. Pfander and M. Rychener, *J. Chromatogr.*, **234**, 443(1982)
75. 梅谷康子, 福井宏至, 田端守, 薬学雑誌, **100**, 920(1980)
76. 井上博之, 武田美雄, 斉藤節生, 西村洋, 桜木菱子, 薬学雑誌, **94**, 577(1974)
77. S. Ueda, K. Kobayashi, T. Muramatsu and H. Inoue, *Planta Med.*, **41**, 186(1981)

78. N. Feder and T. P. O'Brien, *Am. J. Bot.*, **55**, 123 (1968)

79. R. Feulgen and H. Rossenbeck, *Z. physiol. Chem.*, **135**, 203 (1924)

論文目録

本論文の内容は、以下の雑誌に公表した。

第 1 章に関する報文

1. H.Kohda, A.Namera, Y.Hamamoto and T.Okamoto
Propagation of *Bupleurum falcatum* by Shoot Tip Culture
– Induction of Shoot Primordia –
生薬学雑誌, 44, 38-41 (1990)

第 2 章に関する報文

2. H.Kohda, A.Namera, A.Koyama, K.Yamasaki and T.Tani
Indole Alkaloid Production in Callus Cultures of *Uncaria rhynchochylla*
(Miq.)Miquel
Chem.Pharm.Bull., accepted for publication

第 3 章に関する報文

3. Y.Yamada, Y.Shoyama, I.Nishioka, H.Kohda, A.Namera and T.Okamoto
Clonal Micropropagation of *Gentiana Scabra* Bunge var. *buergeri* Maxim.
and Examination of the Homogeneity Concerning the Gentiopicroside Content
Chem.Pharm.Bull., 39, 204-206 (1991)

第 4 章に関する報文

4. 奈女良昭, 小山篤子, 藤岡尚美, 山崎和男, 神田博史
サフランの培養による柱頭様組織と色素生産について (2)
生薬学雑誌, 41, 260-262 (1987)

第 5 章に関する報文

5. 奈女良昭, 田中あゆみ, 小山篤子, 藤岡尚美, 山崎和男, 神田博史
クチナシ培養細胞による有用色素生産について (1)
生薬学雑誌, 42, 252-255 (1988)

謝辞

終りに臨み、本研究の機会を賜り、終始御指導と御鞭撻を戴きました広島大学医学部附属薬用植物園・神田博史助教授に謹んで感謝の意を表します。

学部生として在籍していた当時から、有益な御助言、御鞭撻を戴きました広島大学医学部総合薬学科・山崎和男教授に深く感謝いたします。

本論文を審査し、適切な御助言を戴きました広島大学医学部総合薬学科・穂下剛彦教授、笠井良次助教授に深く感謝いたします。

また、本研究の機会を賜りました、住友金属工業(株)バイオメディカル事業部・谿忠人部長、武野秀一次長、岡田達室長に謹んで感謝の意を表します。

また、有益な情報、御助言を戴きました九州大学・西岡五夫名誉教授、九州大学薬学部生薬学教室・正山征洋教授、広島市立大学・田中隆荘学長(元広島大学学長)、広島大学理学部附属植物遺伝子保管実験施設・谷口研至講師、また走査型電子顕微鏡の操作に御指導、御助言を戴きました広島大学医学部総合薬学科・西尾廣昭助教授に深く感謝いたします。

最後に、本研究を進行するにあたって、有益な御助言、御指導を戴きました藤岡尚美博士、宮川秀樹修士、小山篤子修士に深く感謝いたします。また、共に実験を行なって戴いた北本(旧姓、浜本)木綿子学士、伊丹和代学士、岡本誉充修士に深く感謝いたします。研究室で席を並べた、武田理修士、小松(旧姓、原井)美加学士、田中誠司修士、山岡康利修士に深く感謝いたします。