

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）安心・安全・高品質な漢方薬原料生薬の持続的利用を指向した薬用植物バイオナーサリーの構築とブランド生薬の開発に関する研究

（英語）Research on establishment of medicinal plants bio-nursery system and branded crude drugs toward sustainable use of safe, secure and high quality crude drugs as raw materials for Kampo medicines

研究開発実施期間：2015年4月1日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）吉松 嘉代

（英語）Kayo Yoshimatsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター筑波研究部
育種生理研究室 室長

（英語）Head of Breeding and Physiology Laboratory, Tsukuba Division, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

II 研究開発の概要

1) バイオナーサリー基盤の構築（医薬健栄研、千葉大、新日本製薬、武田薬品）

シナマオウ（Es）及びキダチマオウ（Ee）培養シュートの植物組織培養での増殖と発根を検討し、植物組織培養での増殖に適したクローン及びサブクローンを選抜した。Es 培養シュートでは、一部のクローンにおいて、培養2ヶ月後の発根率43%が得られた。また、Ee 培養シュートでは、酸化型グルタチオン（GSSG）施肥下でのグロースチャンバー室内での挿し木により、挿し木42日後の発根率33%が得られた。さらなる発根率及び土壌移植後の活着率の改善のため、無菌水耕栽培法を検討し、発根率の向上と土壌移植後の活着率向上に成功した。又、シャクヤクの植物組織培養での増殖と発根を検討し、薬用品種北宰相の種子より、植物組織培養での増殖と発根が可能な優良株 PLKD2 の育成に成功した。

11種23系統の薬用植物について、無菌培養植物を対象に、その良好な生育、腋芽などからの増殖、シュートからの発根などに関する培養条件を検討した。その結果、ショウガ、センキュウ、アカヤジオウ、カイケイジオウ、オケラ、ホソバオケラ、コガネバナ、ハナトリカブトの8種13系統については、ある程度効率の良い増殖及び発根条件を確立することができた。とくにジオウ2種については、炭素源としてマルトースが増殖

に適しており、トウキ類に関しては、トレハロースを用いると生育の不安定性が改善された。又、イトヒメハギは弱光下での培養が必要であったが、炭素源を 3%ショ糖から 2%トレハロースに変更することで、通常的光条件下で生育、増殖が可能となった。

オケラ (1 系統 10 個体)、ホソバオケラ (1 系統 20 個体)、ジオウ (5 系統 50 個体) 及びコガネバナ (3 系統 50 個体) の無菌培養個体の維持を継続した。

薬用植物優良株の選抜及び識別に有効な遺伝子マーカーの探索、並びに薬用植物バイオナーサリー構築における育苗・栽培条件の最適化に資する基盤情報整備の一環として、ジオウ属植物の根肥大に関わるマーカー遺伝子の探索、及び、ウラルカンゾウのグリチルリチン酸 (GL) 生合成酵素遺伝子の発現解析を行った。ジオウ属植物については、ダイコンの根肥大時に発現量が亢進するスクロース合成酵素遺伝子の相同遺伝子が、ジオウにおいても根肥大化の鍵酵素遺伝子として機能すると考え、ジオウ属植物 EST ライブラリーより同遺伝子ホモログの *in silico* スクリーニングを行った。その結果、抽出された contig6997 についてジオウ属植物の葉及び根における発現量解析を行ったところ、葉と比較し根において発現量が顕著に高いことが示され、ジオウ属植物の根肥大化に関わる鍵酵素遺伝子である可能性が高いことが示唆された。さらに、根の非肥大時と肥大時における発現遺伝子の網羅的比較解析を行い、根の肥大化時に葉と根の両方で発現量が増大する遺伝子群を抽出し、これらの遺伝子群について発現解析を行ったところ、そのうち植物ホルモン応答性の遺伝子の一つが、根の肥大時に葉において発現量が増大することを確認した。本遺伝子は根の肥大化マーカーとして有望と考えられる。ウラルカンゾウについては、水耕栽培株の根を用い、GSSG 施用の GL 生合成酵素遺伝子群の発現に及ぼす影響について検討を行った。ウラルカンゾウ優良株 Gu#11 の水耕栽培植物地上部より挿し木により増殖した水耕栽培苗を GSSG 処理 (GSSG: 50 mg/L) し、GL 生合成酵素 3 遺伝子 (*bAS*、*CYP88D6* 及び *CYP72A154*) の発現量変動を解析した。その結果、即時応答的には GSSG はウラルカンゾウの根における GL 生合成酵素遺伝子の発現に正、負両面の影響を及ぼすことが明らかになった。

2) バイオナーサリー実用化の基盤構築 (医薬健栄研、富山大、北里大、ツムラ、丸善製薬、栃本天海堂、パナソニック、新日本医薬、片倉コープアグリ、武田薬品、岡山県)

より経済性・実用性の高いウラルカンゾウ優良株種苗増殖方法開発のため、人工水耕一圃場ハイブリッド栽培 (ハイブリッド栽培) で得られたストロンを材料としたストロン挿し増殖方法を検討した。その結果、ストロン挿しの挿し床に、GSSG を施用することにより、ストロン苗の生育促進、発根促進、圃場定植時の活着率向上、圃場定植 2 年目の萌芽率向上と生育促進、水耕栽培植物の地下部の GL をはじめとする薬用成分の含量増加効果があることを明らかとした。また、地上茎挿し木苗を 2016 年 5 月中旬に岡山県圃場に定植し、GSSG 施用及び無施用での生育の比較を行った。処理濃度と資材を変えた 2 つの試験区で対照区よりも生育が良好であり、高濃度の処理区では対象区に比べて圃場定植 2 年目の萌芽率が有意に上昇することを確認した。

スペインカンゾウ優良株選抜のため、培養植物体 25 クロウンを、20-30 日毎に 2-5 倍の割合で増殖させた後、馴化育成し、2016 年 5、6 月より、3 通りの方法 (ハウス内筒栽培、ハウス内短筒栽培及び路地短筒栽培) での試験栽培を開始した。2016 年 10、11 月に各クロウン 3 本を収穫し、根の収量、GL 含量およびグラブリジン (GB) 含量を調査した結果、いずれもハウス内短筒栽培が高い値を示した。1 年生栽培品の調査結果より 12 系統を 1 次選抜し、これらについて 2 年生栽培品の調査を行った結果、3 系統を優良系統として選抜した。

ウラルカンゾウの挿し木による効率的増殖法の検討を行い、最適な挿し床用培地を明らかにし、高温下における苗の最適な増殖方法を開発し発根率を向上させた。又、ウラルカンゾウ挿し木苗、ストロン苗を用いた圃場栽培を継続し、2 年目の萌芽を確認した。組織培養苗 (ウラルカンゾウ、ジオウ属植物、オケラ属植物、ショウガ、センキュウ、ハナトリカブト、トウキ) の馴化条件 (床土の種類等) の検討を行い、オケラ属植物、ショウガ等については高い確率で馴化に成功し、定植可能苗にすることができた。ハナトリカブト、アカヤジオウについては馴化途中での枯死が多く、最適な馴化条件の設定に至らなかった。

培養由来のカンゾウ類（3種42系統232個体）及びショウガ（3系統30個体）における生育及び成分評価のための鉢栽培を実施した。

コガネバナの組織培養苗系統 Sb、SbT1 及び SbT5 の暖地における適応性及び表現型を評価するため、栽培1年目～3年目の生育形質を調査した。SbT5 の開花期が6月25日と他系統（6月17日）より遅く、茎のアントシアニン着色が強であり（他系統 弱～強）、草丈が92.8cmと高く（Sb：70.1cm、SbT1：63.0cm）、区別性が認められた。いずれの系統も栽培2年目まで生存率が100%であったが、栽培2年目に約2割の株で根の黒変化現象が確認され、3年目ではほとんどが枯死した。以上の結果から、開花期や地上部の形質で系統間に区別性が認められ、SbT5 は草丈が高いことに加え地上部の枯れ上がりが遅く、生育に有利な形質を有していることが判明した。一方で、排水良好な土壌でありながら、栽培2年目から根に黒変化が生じ、3年目にほぼ全株が枯死したことから、高温多湿および台風に伴う塩害がコガネバナの生理障害を引き起こしたと推察される。種子島のような暖地での生産を考慮すると遅くとも栽培2年目までに収穫を行う必要がある。ショウガの組織培養苗系統 ZoK2、ZoO2 及び ZoS1 の特性を評価するため、2期にわたり生育形質を調査した。2015年はZoS1の草丈、偽茎径、偽茎数、最大葉長および最大葉幅が他系統よりも大きく、地上部の枯れ上がりが遅い傾向にあった。2016年は夏期に立枯病(Rhizome rot)及び腐敗病(Bacterial rot)が発生し、ZoO2の半数、ZoS1の全個体が枯死したが、ZoK2については全個体が生存し、感染程度に系統間差が認められた。これに関連してZoK2の草丈、偽茎数、最大葉長および地上部の新鮮重はZoO2より有意に大きかった。病害抵抗性からみるとZoK2が有望と考えられるが、明確な結論を得るためにはさらに複数年の評価が必要である。

カンゾウ属植物の培養苗及び水耕苗、並びに、ミシマサイコ及びトウキの培養苗の圃場における実証栽培を行った。ウラルカンゾウは、定植翌年以降における生存率が低く、冬季の新芽の保護が課題であった。圃場栽培したミシマサイコ、トウキ培養苗の根の品質評価のため、第十七改正日本薬局方（JP17）各種試験を行った結果、ミシマサイコ根は、概ねJP17規格に適合していたが、根の形状から土壌の除去が困難であったため、灰分、酸不溶性灰分がJP17規格を満たさなかった。トウキ根は、一部、灰分が不適となる試料が認められたが、概ねJP17規格に適合し、培養苗はJP17規格を満たす当帰を生産可能であることを実証した。ミシマサイコ、オタネニンジン、シャクヤクの水耕栽培条件を検討し、オタネニンジンの2年生苗、株分けしたシャクヤクの根茎及び組織培養苗を水耕栽培することにより、JP17の成分含量規格を満たす根の生産に成功した。カンゾウ属植物培養苗の水耕栽培を実施し、高いGL含量を示すクローンを選抜した。

優良な薬用植物組織培養苗（セリバオウレン、ジオウ属植物、トリカブト及びホソバオケラ）及びウラルカンゾウ挿し木苗を、圃場にて栽培することにより、優良株の生産拡大に取り組んでいる。ウラルカンゾウは、芽の保護により寒冷地における越冬率の向上が確認できた。2年栽培での定植時期を検討し、収量、GL含量ともに8月よりも6月定植の方が高い値を示した。セリバオウレンは、完全人工水耕栽培システムの支持体、養液条件、照度、養液供給形態を検討し、最適化した。また、夏期の夜間冷房により葉数の増加を確認できた。トリカブトとホソバオケラは、馴化・定植後の生育不良のため十分な調査することができなかった。カイケイジオウの組織培養苗（RehN1 及び RehN2）について、組織培養苗の収穫物を定植し、2年目、3年目の生育調査（再現性）を行い、収量性の維持を確認できた。2年目の収穫物で薬用部位を凍結乾燥品し慣行苗との比較検討を行い、検討内容（内部組織、成分のパターン及び灰分と重金属の含量測定）においては慣行栽培品と差異がないことが判明した。

ウラルカンゾウ培養苗の7系統を3年間栽培した。2年目と3年目の収穫物を比較すると、個体間の変動が大きかったが、収穫量及び成分含量は、3年目の方がやや高い結果となった。GL含量（2%以下）は、市場流通品（3.3%）と比べて低かった。コガネバナのバイオ苗3系統を3年間栽培した。2年目と3年目の収穫物を比較すると、収穫量は変わらず、バイカリン含量は3年目が高い結果となった。バイカリン含量（15.7-18.3%）は、市場流通品（14.9%）とほぼ同等であった。

エゾウコギの人工水耕圃場ハイブリッド栽培を4年間実施し、未熟種子の段階から112株を生育させるこ

とができ、基盤技術をほぼ確立した。それらの内5株の根茎について薬効成分の含量を調べた結果、生薬「刺五加」と同等であった (eleutherosides B, E の含量はそれぞれ 0.78 mg/g, 1.24 mg/g)。葉にはトリテルペンサポニン成分が含有され、機能性が確認された。オケラのハイブリッド栽培も基盤をほぼ確立することができたが、1年間の栽培であったため、根茎に *atractylon*, *atractylenolide I* が含有されることは確認できたが、*atractylenolide III* は検出されなかった。ダイオウでは3回目の栽培実験を行い、*Rheum palmatum* の系統 29 が成分から判断して多様な作用を期待できる優良系統であり、栽培は富山県で播種・育苗した苗を長野県菅平薬草栽培試験地に定植し、施肥を施さずに栽培して、4年目に地下部を収穫する方法が最適であることを見出した。さらに *senosides* などに着目して菅平系統保存種 (*R. coreanum* × *R. palmatum*) の系統 C も選抜した。シャクヤクでは付加価値のある品種として、核 ITS 配列、主要成分組成及び抗アレルギー作用の点から「赤芍」に類似する1品種を選抜した。さらに、薬効成分含量の点で高品質を保つことができる最適な加工法を決定した。以上、新規栽培法による局方生薬の確保及び新規機能性表示食品の開発に繋げることができる成果が得られた。

3) 生薬等の評価 (医薬健栄研、北里大、東北大、名城大、ツムラ、丸善製薬、栃本天海堂、小太郎漢方)

ハイブリッド栽培で生産した甘草および市場流通品甘草の熱水抽出エキスを作製してマウスに経口投与し、血中主代謝産物であるグリチルレチン酸濃度を市場品甘草エキスと比較検討した。その結果、ハイブリッド栽培品エキスは、市場流通品エキスとは若干異なる経時変化を示したものの、市場流通品エキスのバラツキの範囲内であり、栽培方法や栽培地が異なるにもかかわらず類似した結果を示した。

ウラルカンゾウ及びコガネバナのI型アレルギー抑制作用に関与するヒアルロニダーゼ活性阻害作用及びヘキササミニダーゼ遊離抑制作用を検討した。カンゾウは市場流通品と同等の活性を示した。コガネバナは、ヒアルロニダーゼ活性阻害作用は市場流通品と同等であったが、ヘキササミニダーゼ遊離抑制作用は個体間のばらつきが大きく、市場流通品より活性が低い個体が多かった。

シャクヤクの市場流通品を用いて、LC/MSによる分析条件の検討を行った。又、サンプリングの際の参考情報とするために、圃場で栽培していたシャクヤク(梵天)の地下部を、新、旧、細根に分けて分析した。標準品として入手可能であった *albiflorin*, *paeoniflorin*, *paeonol* を用いて、市場流通品における含量比較を行った。シャクヤク水耕栽培品を用いて主要成分の含量比較及び多変量解析を行い、市場流通品との同等性評価を行った結果、多変量解析において、水耕栽培品は市場流通品とは別の群を形成した。マオウについて各節毎の *ephedrine*, *pseudoephedrine* 含量を LC/MS 分析により求めた。マオウの節毎のアルカロイド含量は、主茎側に比べて末端側が低かった。コガネバナとショウガの培養由来苗を国内各地(コガネバナ:北海道、筑波、富山、福山及び種子島 ショウガ:筑波、種子島)で定植し栽培して得た生薬試料(オウゴン及びショウキョウ)について LC/MS 測定を行い、主要成分の含量比較及び多変量解析を行い市場流通品との同等性評価を行った。オウゴンは種子島栽培ではフラボノイド含量は高いが他地域での栽培では市場流通品と同様のパターンであった。ショウキョウは市場流通品と比較し各地で定植した試料は 6-gingerol は高く、6-shogaol は低い傾向を示した。また、オウゴンに含有される金属元素の定量を行ったところ、1ppm 以下であるが、富山産、福山産及び種子島産の試料の一部に鉛が検出された。さらにショウキョウについて JP17 試験及びエキス含量測定を行なった結果、栽培品は市場流通品に比べてエキス含量が高く、一部に灰分含量が JP17 規定値を満たさないものが認められ、土砂の除去が不十分であることが示唆された。

カンゾウ含有健康食品素材に関し、薬用成分である GL の JP17 に従った定量を行った。その結果、一部の健康食品中に GL が高含量で含まれていることが判明した。また、カンゾウ属植物を含む健康食品 6 品及び食品原料 6 品について、その基原を明らかとするため、*G. uralensis*, *G. glabra*, *G. inflata* のそれぞれに特徴的な成分の有無を調べるとともに、植物片を含む 5 品に関しては、ITS、*matK* 領域の遺伝子型の解析を行った。その結果、健康食品 1 品及び食品原料 4 品の基原には *G. uralensis* が、健康食品 4 品及び食品原料 2 品の基

原には *G. glabra* が含まれることを明らかとした。

カンゾウ生薬、カンゾウ由来健康食品原料（以下健食原料）及びカンゾウ含有健康食品（以下健食）について、機能性成分グラブリジン（GB）及び薬効成分 GL の成分分析を実施した。GB は、生薬ではスペインおよび新疆カンゾウから検出され、ウラルカンゾウからは検出されなかった。健食原料及び健食には *in vitro* のエストロゲン活性が検出された。生薬、健食材料及び健食の抗酸化能を測定したところ、グラブリジン以外にも抗酸化活性を有する成分が含まれることが示唆された。マウスにおける高用量のカンゾウ摂取は、肝臓 CYP に関する安全性を評価するモデル系として有用である可能性を示した。培養苗由来オウゴンと市場流通生薬のオウゴンについて、含有成分の比較検討を行うとともに、安全性・有効性評価として、肝臓の薬物代謝酵素（CYP）に着目し、正常マウスを用いて検討した。その結果、培養苗由来品は市場流通品と比較して脂質、ナトリウム及びカリウム含有量が少なく、リン及び亜鉛の含有量が多いことが示唆された。一方、有効性・安全性評価については、培養苗由来品と市場流通品では、一部の肝臓薬物代謝酵素活性への影響が異なる可能性が示された。

多数の甘草試料を対象として ¹H-NMR によるメタボリックプロファイリングを行った結果、伝統的に高品質とされてきた「東北（甘草）二号」と類似したプロファイルを有するいくつかの有望な試料を見出すことができた。日本薬局方（JP）で規定されている GL 含量（2.0%以上）や性状（径 0.5~3 cm）を満たすだけでは、いわゆる「高品質甘草」とは全く異なる品質を有することが確認できた。又、甘草の品質には、一次代謝産物としてスクロース、二次代謝産物として各種フラボノイド及びその配糖体の含有量が大きく関与していることが示唆された。以上の結果から、メタボリックプロファイリングによる品質評価の重要性が再確認できた。筑波産のハイブリッド甘草の 2 年栽培試料の一部は高品質甘草の近傍に存在したが、これら筑波産の試料は GL 含量が JP の規定値を満たしていないものがほとんどであった。しかし、これらの試料では、栽培年数重ねることで種々の二次代謝産物の含有量が上昇することが期待できる。実際、筑波でさらに 1 年栽培した 3 年栽培甘草の全形生薬を用いて、その切断面の直径を測定後に全形生薬の一部を粉末化した試料について ¹H-NMR と GL 含量、根径を測定し、上記のマッピングに加えたところ、全般に 2 年目より高品質甘草に近づき、かつ課題であった JP の規定値に適合する試料も多く存在した。これによって栽培上有望な株と栽培方法に関する目処が得られた。

種子島産のキッピー（タチバナの果皮）よりポリメトキシフラボノイドが高含量の優良種を選抜した。選抜したタチバナの果皮エキスに、マウスで非選択的 NMDA 受容体遮断薬誘発性記憶障害の抑制が認められた。さらに、神経毒性のある可溶性 A β オリゴマーに対する脳防御システムとして知られているソマトスタチン-ネプリラysin系と神経栄養因子の遺伝子発現を賦活する活性を見出した。オンジの熱水抽出エキスは、海馬神経培養系で長期記憶の形成に不可欠な CRE 依存的転写活性の促進を示した。

1) Establishment of bio-nursery system

Elite shoot culture clones of *Ephedra sinica* (Es) and *E. equisetina* (Ee) have been selected by their propagation capability *in vitro*. The Es shoot clone performed maximum 43% rooting in the tissue culture studies, though the Ee shoot clones failed. On the other hand, 33% of the Ee shoot clone cuttings rooted when being planted on the vermiculite supplemented with oxidized glutathione (GSSG). An axenic hydroponics have been studied for the improved rooting efficiency and survival after transplanting to soil. Es cultured shoots that subjected to axenic hydroponics successfully rooted and established to soil. In addition, elite *Paeonia lactiflora* clone PLKD2, which being capable of efficient propagation and rooting through tissue culture, has been established.

In vitro aseptic cultures of plantlets were subjected to establish suitable culture conditions for enhancing favorable growth, shoot proliferation from axillary buds, rooting from shoots, etc. in 23 strains of 11 medicinal plant species. As the results, appropriate culture conditions were

successfully established in 13 strains of 8 species. In 2 kinds of *Rehmania glutinosa* (Reh), the use of maltose as a carbon source was favorable for the in vitro propagation of plantlets. In *Angelica acutiloba*, stable normal growth of plantlets was achieved by replacing sucrose with trehalose. Although *Polygala tenuifolia* requires low light intensity for the normal growth of in vitro plantlets, replacement of 3% sucrose by 2% trehalose also enabled normal growth under ordinary light conditions.

Periodical subculture has been performed for the maintenance of following medicinal plant species and strains, *Atractylodes*: 30 samples, 2 lines, 2 species; *Rehmannia*: 50 samples, 5 lines, 1 species; *Scutellaria*: 50 samples, 3 lines, 1 species.

For a development of new cultivation technology and to evaluate its effect on genetic stability, we have performed a developmental research on genetic markers for important medicinal plant species such as *Rehmannia* and *Glycyrrhiza*. By the data mining of transcriptome dataset obtained from two different growth stage and two organs of *Rehmannia* plants, several genes were found to be differentially expressed both in the leaves and the roots of soil grown plant. Of those genes, one of the plant hormone inducible genes was confirmed to be highly expressed in the leaves of a plant with tuberous root by the expression analysis, which is a promising candidate for a genetic marker for tuberous root development. For *Glycyrrhiza* plant, the effect of oxidized glutathione (GSSG) treatment on glycyrrhizic acid (GL) biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis* (Gu) was evaluated. The expression analyses on three GL biosynthetic genes, *bAS*, *CYP88D6*, and *CYP72A154* after GSSG treatment were carried out, which revealed that GSSG treatment has both positive and negative regulative effect on GL biosynthesis.

2) Establishment of bio-nursery infrastructure

Efficient propagation of Gu elite clones has been investigated by using stolon cuttings derived from the plants cultivated by artificial hydroponic-field hybrid cultivation system for the improvement of economics and feasibility. The results demonstrated that addition of GSSG into nursery bed of the stolon cuttings enhanced plant growth, rooting, survival rate in field, sprouting rate and plant growth in the second year. It is also effective to increase secondary metabolite accumulation, including GL, in roots of the regenerated plants that being hydroponically cultivated. Gu plantlets propagated by aerial stem cuttings of hydroponically cultivated plants were planted in the field in Okayama Prefecture in the middle of May, 2016 and cultivation trial has been performed to investigate plant growth, roots harvest and secondary metabolites productivity including GL whether with or without periodical dressing using 2 types of GSSG concentration and material. The growth was better in the plants with 2 types of the GSSG dressing than ones without GSSG dressing. Sprouting rate of high dose GSSG dressing at the second year was significantly increased when compared to control without GSSG dressing.

Twenty-five clones of *Glycyrrhiza glabra* (Gg) were propagated through tissue culture in the ratio of 2-5 times every 20-30 days and acclimatized to soil in a greenhouse. Greenhouse-hardened plants were transplanted into 3 types of cultivation apparatus (long cultivation cylinder in a vinyl house, vinyl pot in a vinyl house and vinyl pot in a field) in May or June, 2016. One-year old plants (3 individuals each) were harvested in October or November, 2016 and roots harvests and contents of GL and glabridin (GB) in the roots were analyzed. Cultivation in vinyl pot in a

vinyl house demonstrated all the best results. Twelve Gg clones were selected from these results and subjected to second selection using 2-year old plants. Finally, 3 elite Gg clones were selected with their GL contents and root harvests.

Efficient propagation method for Gu by cuttings has been investigated and optimum condition, such as cutting bed materials and growth method of seedling at high temperature, has been determined to improve rooting rate. Field-cultivation of Gu cutting and stolon seedlings has been continued and sprouting in the second year has been confirmed. In addition, acclimatization condition (ex. seedling bed soil, etc) for medicinal plant (Gu, genus *Rehmannia*, genus *Atractylodes*, *Zingiber officinale*, *Cnidium officinale*, *Aconitum carmichaeli* and *Angelica acutiloba*) tissue culture seedlings (plantlets) has been examined. Plantlets of genus *Atractylodes*, *Zingiber officinale*, etc., successfully acclimatized at a high rate and grew into nursery plants capable of transplant to field. On the other hand, most of *Aconitum carmichaeli* and *Rehmannia glutiosa* Libosch. var. *purpurea* Makino plantlets died during acclimatization, thus optimum condition for these plants could not be determined.

Licorice (Gu, Gg and *Glycyrrhiza inflata*:Gi:232 samples, 42 lines) and ginger (*Zingiber officinale*: 30 samples, 3 lines) derived from tissue culture were cultivated in pots for the purpose of growth research and analysis of components.

In order to evaluate the adaptability and phenotype of three *Scutellaria baicalensis* clones (Sb, SbT1 and SbT5) derived from tissue culture in the warm temperate zone, the growth characteristics of the first to third years of cultivation were investigated in Tanegashima region. The SbT5 plants was distinguished from other clones in time of flowering (late), intensity of anthocyanin coloration of stem (strong) and the plant height (high). This clone, which has vigorous aerial part growth and late burning up, seems to be suitable for field-cultivation. On the other hand, since most plants died in the third year, this plant should be harvested in the second year in the warm temperate zone. The growth characteristics of three *Zingiber officinale* clones (ZoK2, Zo02 and ZoS1) derived from tissue culture were evaluated in Tanegashima region. The growth of aerial part of the ZoS1 plants was larger than that of other clones, and the time of burning up of this clone tended to be late. In the summer of 2016, many plants died due to serious diseases (Rhizome rot and Bacterial rot), whereas all plants of the ZoK2 survived. The ZoK2 plants with high disease resistance should be suitable for cultivation in this area.

Field-cultivation has been carried out using plantlets propagated by tissue culture or stem cuttings of hydroponically cultivated plants to develop and evaluate novel technologies for production of crude drugs. It revealed that Gu plantlets derived from tissue culture and stem cuttings required the protection of buds in winter because of their low survival rate in the second year. To evaluate the quality of Angelicae and Bupleuri Radix derived from tissue culture, we performed various tests according to the Japanese Pharmacopoeia Seventeenth Edition (JP17). The roots of *Bupleurum falcatum* (Bf) were almost conformable to the JP17 standards, though ash and acid insoluble ash of the roots did not satisfy the JP17 standards because of its difficulties to remove soil from the intertwined roots. Processing roots of *Angelica acutiloba* (Aa) were conformable to the JP17 standards without ash. This result demonstrated that Angelicae Radix accordance with the JP17 standards could be produced using plantlets propagated by tissue culture. Hydroponic growing conditions of *Panax ginseng* (Pg), *Paeonia lactiflora* (Pl) and Bf were investigated. As a result,

hydroponically cultivated roots of two-year-old Pg plantlets, divided Pl rhizome and Pl plantlets derived from tissue culture successfully achieved the JP17 content standards. Elite clone candidates of *Glycyrrhiza* plant (*G. glabra* and *G. inflata*) that showed high GL content in hydroponic cultivation have been selected.

Production of excellent medicinal plant clones is being enlarged by acclimatization and cultivation of excellent medicinal plants seedlings derived from plant tissue culture. Gu can be confirmed to improve the overwintering rate in cold climates by protection of buds. Gu which planted in June showed higher yield and more GL content than in August in the following year. Influences on *Coptis japonica* (Cj) of the illuminance and nutrient solution circulation were examined, then condition of them were optimized. The number of leaves in Cj increased with cooling system which lower night temperature. Field-cultivation studies of *Aconitum carmichaelii* and *Atractylodes lancea* derived from tissue cultures have not been done because of insufficient growth after acclimatization and planting to the field. Growth reproducibility of field-cultivated *Rehmannia glutinosa* (RehN 1 and RehN 2) was confirmed using the seedling of one-year field-cultivated plants derived from tissue culture. Similar result obtained two-year cultivated plants. Comparable studies on internal structure, pattern of ingredients, ash and heavy metals contents were performed between the RehN1 and RehN2, and the conventional plants using the freeze-dried roots. It was confirmed that there was no difference between the both roots.

Seven clones of Gu plantlets derived from tissue culture were field-cultivated in Fukuyama City for 3 years. The growth and GL content varied among individuals. In comparison with the crop of the third year and the second year, the amount of the crop and GL content were higher in the third year. GL content (less than 2 %) is lower than in the commercial (3.3%). Three *Scutellaria baicalensis* clones derived from tissue culture were field-cultivated in Fukuyama city for 3 years. In comparison with the crop of the third year and the second year, the amount of the crop was almost the same and baicalin content was higher in the third year. Baicalin content (15.7 -18.3%) is slightly higher than in the commercial (14.9%).

Artificial hydroponic-field hybrid cultivation of *Eleutherococcus senticosus* has been carried out for 4 years to make 112 plants grow successfully. The rhizomes of 5 randomly selected plants contained 0.78 mg/g and 1.24 mg/g of eleutherosides B and E on average, respectively, which is comparable to *Eleutherococcus Senticosus* Rhizome available in Japanese market. The leaves contained a variety of triterpene saponins with biological activities. Thus, cultivation system for production of *Eleutherococcus Senticosus* Rhizome has been established. Hybrid cultivation of *Atractylodes japonica* has also been investigated and successful result has been obtained. Cultivation system for production of Rhubarb with anti-inflammatory and antioxidant effects besides purgative effect has been investigated. *Rheum palmatum* strain 29 was selected on the basis of shape, weight and chemical compositions of the underground part, as well as survival rate of the plant. Moreover, suitable cultivation as raising seedling in Toyama Pref. for 2.5 months, and then settled in Sugadaira, Nagano Pref. for 4 year-cultivation without organic fertilizer was established through 3 times trials. From the preservation stock of *R. coreanum* × *R. palmatum* in Sugadaira strain C was selected as a characteristic strain with high content of sennosides. Genetic, chemical and pharmacological studies on a number of horticultural cultivars of *Paeonia lactiflora* have been conducted, and one candidate with the similar ITS sequence, main components composition and anti-

allergic activity to Red Peony Root was highlighted. Furthermore, an optimized and practicable processing method for production of Peony root has been developed, which ensure high contents of the main active components in the produced root.

3) Evaluation of crude drugs and plant products

In order to prove bioequivalence between commercial glycyrrhiza and Gu roots produced by artificial hydroponic-field hybrid cultivation (hybrid cultivation), the serum concentration of glycyrrhetic acid (GA), the major metabolite of GL, was determined in mice after oral administration of hot water extracts of them. Slight differences in time course of GA serum concentration were observed between the extracts of commercial glycyrrhiza and of the roots from hybrid cultivation. However, the bioavailability, such as AUC, C_{max} and T_{max} , of the extracts from hybrid cultivation, fell within that from commercial glycyrrhiza. There are no differences in bioavailabilities within the extracts from hybrid cultivation regardless of cultivation methods and districts.

Hyaluronidase inhibitory activity and hexosaminidase release inhibitory activity involved in type I allergy were tested. Their two activities of cultivated *Glycyrrhiza* were equal to commercial *Glycyrrhiza*. Hyaluronidase inhibitory activity of cultivated *Scutellaria* was equal to commercial *Scutellaria*, whereas hexosaminidase release inhibitory activity varied among individuals and was lower than commercial *Scutellaria*.

LC/MS analytical condition of Peony root using standard crude drugs distributed in the markets was examined. Peony root (Bonten) cultivated in NIBIOHN was separated into 3 parts, new, old, and rootlet, and then subjected to LC/MS analysis. Albiflorin, paeoniflorin, and paeonol were quantitatively analyzed by LC/MS. Equivalence evaluation between hydroponic samples and standard crude drugs was conducted by LC/MS multivariable analysis. Various components in the hydroponic samples showed different patterns from standard samples. The ephedrine and pseudoephedrine contents in each branch node in Ephedra herb were investigated by LC/MS/MS analysis. The alkaloid content in each node was lower in the terminal branch than in the inner branch. *Scutellaria baicalensis* and *Zingiber officinale* clones derived from tissue culture were field-cultivated in five (Hokkaido, Tsukuba, Toyama, Fukuyama and Tanegashima) or two (Tsukuba and Tanegashima) districts, respectively, and crude drugs thus obtained were evaluated. *Scutellaria* roots cultivated in the Tanegashima showed high flavonoid content, while components of other samples were nearly the same as those in commercial samples according to LC/MS analysis. Ginger derived from tissue culture showed higher 6-gingerol content and lower 6-shogaol content than commercial samples. In addition, metals in *Scutellaria* root samples derived from tissue culture were quantified and less than 1ppm lead was detected in some samples of Toyama, Fukuyama and Tanegashima. Ginger (commercial crude drugs and dried rhizomes derived from tissue cultures) was subjected to JP17 tests and the extract content measurement. The extract contents of ginger derived from tissue culture were higher than those of commercial crude drugs. Ash of some ginger derived from tissue culture did not satisfy the JP17 standards because of insufficient removal of soil.

GL contents in the licorice-containing health food (hereinafter referred to as "health food") were examined using Japanese Pharmacopoeia protocol. In some health foods, high content of GL was detected. To confirm original plant source of the health foods, the presence or absence of species-

specific constituents in health foods and licorice origin health food ingredient (hereinafter referred to as "health food ingredient") was examined. Furthermore, genotypes of samples that contained plant pieces were investigated based on polymorphism in the internal transcribed spacer regions of the nuclear ribosomal DNA and the chloroplast *matK* gene. As a result, the original plant source of one health food and four ingredients was Gu and that of four health foods and two ingredients was Gg.

Contents of GB as a functional component and GL as a medicinal component were determined for licorice herbal medicine, licorice origin health food ingredient (hereinafter referred to as "health food ingredient") and licorice-containing health food (hereinafter referred to as "health food"). GB was detected in Spanish and Xinjiang licorice in herbal medicine and was not detected in Ural licorice. Estrogen activity in vitro was detected in health food ingredients and health foods. Antioxidant capacities of herbal medicines, health food ingredients and health foods suggested that some antioxidant other than GB were contained. High dose of licorice intake in mice showed the possibility of being useful as a model system for evaluating safety on liver CYP. The contents of food components such as nutrients and contaminants in *Scutellaria* root derived from tissue-cultured plant were compared with those of the commercial crude drugs. It was suggested that the contents of lipid, sodium and potassium in the *Scutellaria* root from tissue culture were lower than those in the commercial model crude drugs, and the contents of phosphorus and zinc were high. It was shown that the influence on some liver drug metabolizing enzyme gene expressions may differ between the *Scutellaria* root from tissue culture and the commercial crude drugs.

The ¹H-NMR metabolic profiling of the crude drugs of Licorice root obtained by 2-year hybrid cultivation showed completely different pattern from the classification by the GL content and root thickness those are described in JP17. Thus, the qualification by Japanese Pharmacopoeia alone could not predict the clinically required quality for the medical facilities specialized in traditional Kampo medicine, such as Kitasato University Oriental Research Center. The ¹H-NMR metabolic profiling of the crude drug of licorice root also suggested that the contents of sucrose, flavonoid and their glycosides as the important factors determining the quality of licorice root. Interestingly, the ¹H-NMR metabolic profiling of the crude drugs of Licorice root obtained by 3-year hybrid cultivation showed much better quality than those by 2-year hybrid cultivation. And some samples with the quality conforming to the Japanese Pharmacopoeia standard mapped in vicinity of the high quality licorice "Tohoku 2 gou" in the ¹H-NMR metabolic profiling.

The extract of an select excellent variety with high contents of polymethoxyflavonoids, Citrus Peel (*Citrus tachibana*) from Tanegashima, which showed the ability to prevent non-selective NMDA receptors-impaired memory formation in mouse, was able to facilitate somatostatin-neprilysin system known as a brain defense system against neurotoxic soluble A β oligomers and neurotrophin genes expression in the hippocampus. The effect of hot-water extract of polygala roots was evaluated on CRE-mediated transcription associated with long-term memory formation in the hippocampus. It was found that the polygala root extracts could facilitate the transcriptional activity in rat hippocampal neurons in culture.