

冬虫夏草の人工培養法の確立 ～宿主を用いない培養を目指して～

(横手高校生物班) 齊藤大斗 進藤優丞 菅奏汰
高橋凜 宮本健太郎 湯川遙音
(指導教員) 岡本由佳子

● はじめに

- ・冬虫夏草は虫の養分を利用して生育するキノコである。
また、冬虫夏草は主に昆虫を宿主とし、宿主から子実体が形成・伸長する。

● 背景

- ・岩手大学の研究によると、蚕を培地として生育したハナサナギタケからナトリド(新規物質)が発見され、その物質は中枢神経系の疾患の新しい治療薬になる可能性があるということが報告されている(参考文献3)。
- ・有用成分を含む冬虫夏草の中でも、コルジセピンは抗癌作用が認められている(参考文献10)。
- ・天然の冬虫夏草は大変貴重であり、そのために蚕を用いた人工培養法が確立されているが、依然として高価である。

● 目的

有用な成分を含む冬虫夏草を、虫を使用せず、安価に入手できる材料を用いて大量に栽培する方法を確立する。

● 仮説と検証

▼ 事前準備

① 事前準備(目的の菌体を得る)

[方法]

自生する冬虫夏草を目当てに本校周辺の山林を探索したが発見できなかったため、菌体が存在する可能性が高いスポット(図1, 発生適地)で土壌を採取する方法に切り替えた。そして得た土壌にハチノスツヅリガの幼虫を埋めて菌に感染させた。この手法を取ることで、土中に冬虫夏草の菌が存在していれば、幼虫に菌が感染し、菌体を得ることができると考えた。(写真1)

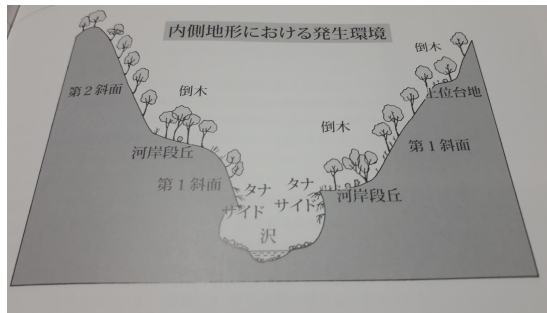


図1 発生適地 (参考文献1)



写真1 ハチノスツリガの飼育

[結果]

・次の菌体を得た。

ハナサナギタケ(*Isaria japonica*)、(写真2)

赤きょう菌(*Cordyceps fumosorosea*)、(写真3)

イザリア・カテニアニューラータ(*Isaria cateniannulata*)、(写真4)

ボーベリア・バシアーナ(*Beauveria bassiana*)、(写真5)

・研究に協力していただいた小林様より、次の菌体を提供いただいた。

サナギタケ(*Cordyceps militaris*)



写真2 ハナサナギタケ



写真3 赤きょう菌



写真4 イザリア・カテニアニューラータ



写真5 ボーベリア・バシアーナ

② 同定

[方法]

光学顕微鏡で孢子(以後、分生子と呼ぶ)を観察し、菌の種類を特定する。

[結果]

図鑑に記載されていた各菌体の分生子の特徴(図2,3)から同定を試みたが、顕微鏡から撮影された画像(写真6,7)からは特定できず、各種類の菌体で違いがあることだけが分かった。

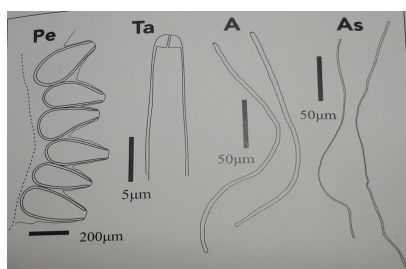


図2 ハナサナギタケの分生子モデル(文献1より引用)

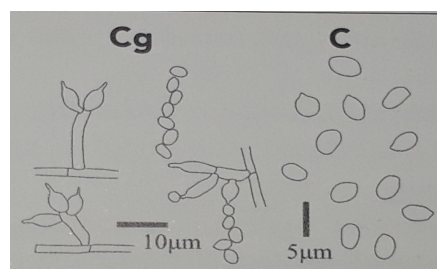


図3 イザリア・カテナニユラータの分生子モデル (文献1より引用)

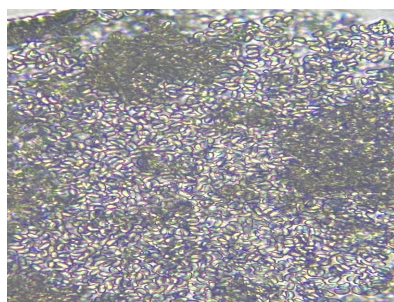


写真6 ハナサナギタケの分生子

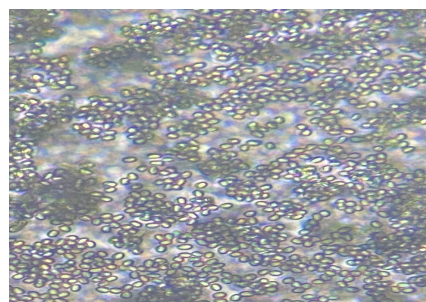


写真7 イザリア・カテナニユラータの分生子

▼ 子実体形成のための培養実験

③ 培養(寒天培地)

仮説【子実体形成には菌種ごとに適した栄養成分がある】

[方法]

以下の培地を使用し、25°C前後の環境下で培養した。

基本培地, 米ぬか粉末, 米ぬか浸出液, トレハロース, 玉ねぎ醤油

※玉ねぎ醤油培地は冬虫夏草の生育に効果があるとされているために使用した(参考文献4より)。

- 精製水1Lあたり ・基本培地(ペプトン10g、寒天15g)
 ・米ぬか粉末培地(米ぬか粉末10g、ペプトン10g、寒天15g)
 ・米ぬか浸出液培地(米ぬか浸出液10g、ペプトン10g、寒天15g)
 ・トレハロース培地(トレハロース15g、ペプトン10g、寒天15g)
 ・玉ねぎ醤油培地(玉ねぎ浸出液250ml、醤油15g、スクロース15g)

[結果] 表1 培地ごとの培養結果

◎ 子実体形成あり ○菌糸が伸長 △少し伸長 ×全く生えなかった

	基本培地	米ぬか粉末	米ぬか浸出液	トレハロース	玉ねぎ醤油
赤きょう菌	◎	○	×	○	◎
ハナサナギタケ	◎	◎	×	○	○
サナギタケ	○	△	×	○	○
イザリア	×	○	×	○	○
ポーベリア	○	○	×	○	○

- ・表1より、ハナサナギタケや赤きょう菌は総じて生育がよい。
米ぬか粉末やトレハロース、玉ねぎ醤油は比較的生育しやすい栄養成分といえる。
- ・ハナサナギタケと赤きょう菌の子実体を得ることができた(写真8,9)

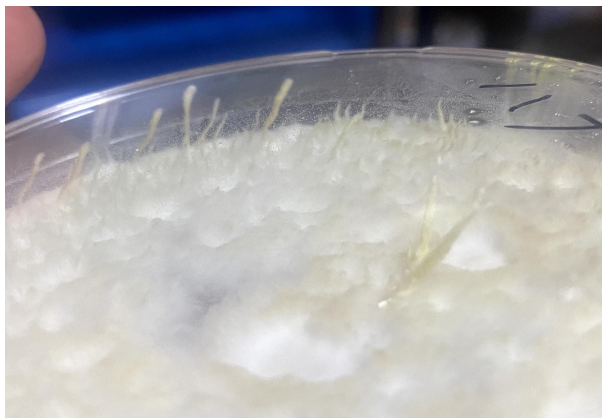


写真8 ハナサナギタケ

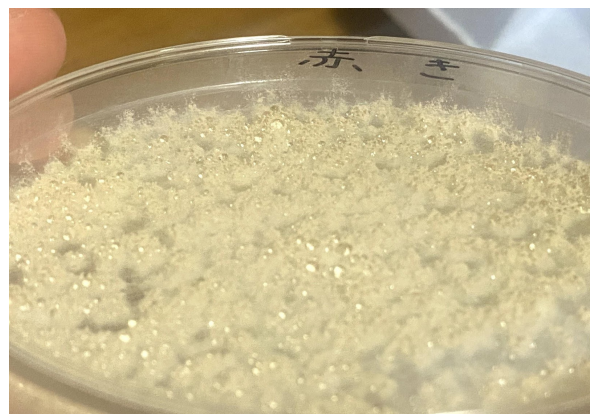


写真9 赤きょう菌

※どちらも米ぬか粉末培地、213時間が経過したもの

④ 液体培養

仮説 1【栄養成分量により菌糸の生育の程度に違いがある】

2【栄養成分量が少ないほど子実体形成が起きやすい】

※2の仮説を立てた根拠は、栄養成分量が低ければ子実体を形成しやすいとされているためである(参考文献11)。

[方法]

- ・寒天培地の培養で、菌糸の成長が大きかった培地・菌糸に絞って実験した。

培地 米ぬか粉末, トレハロース, 玉ねぎ醤油

菌糸 サナギタケ, ハナサナギタケ, 赤きょう菌

- ・使用した培地ごとの栄養成分量の割合

1.5% (15g), 0.75% (7.5g), 0.25% (2.5g)

※培地ごとの栄養成分量の割合を以下のように示すこととする。

例. 水1000gに対して米ぬか粉末10g → 1%

- ・液体培地を山菜瓶の中に注ぎ、菌糸を植えたあと、23℃に設定した恒温器の中で培養した。(写真10)



写真10 サナギタケ 米ぬか粉末 1.5%

[結果]

表2 1.5%

	米ぬか粉末	米ぬか浸出液	トレハロース	玉ねぎ醤油
赤きょう菌	○	△	×	○
ハナサナギ	×	×	○	○
サナギタケ	○	△	○	○

表3 0.75%

	米ぬか粉末	米ぬか浸出液	トレハロース	玉ねぎ醤油
赤きょう菌	×	△	×	○
ハナサナギ	○	×	○	×
サナギタケ	○	×	×	○

表4 0.25%

	米ぬか粉末	米ぬか浸出液	トレハロース	玉ねぎ醤油
赤きょう菌	○	△	×	○
ハナサナギ	×	×	×	×
サナギタケ	×	×	△	○

表2～4より

- ・どの栄養成分でも菌糸は生える
- ・培養途中だが子実体は形成されていない

→ 仮説2は否定される

[培養実験の考察]

実験結果より、実験結果より、子実体は液体培地で形成されず寒天培地で形成されたこと、子実体が生えている寒天培地はどれも乾燥していて水分が少かったことから、培地の水分が少ないほうが子実体を形成しやすいと考えられる。

▼ 人工培養した冬虫夏草と天然冬虫夏草との比較検証

⑤ 植え戻し

仮説【人工培養で得た冬虫夏草にも宿主への感染力がある】

[方法]

培養した菌糸を幼虫に付着させて飼育する。

[結果]

幼虫から菌糸が生えて感染が確認された。

⑥ 有用成分の分析(日本食品分析センターに分析依頼)

[方法]

ハナサナギの子実体と菌糸(5.52mg)の分析を依頼した。(表5)

表5 ハナサナギに含まれるコルジセピンの分析結果

分析試験項目	結果	定量下限	方法
コルジセピン	検出せず	0.01g/100g	高速液体クロマトグラフィー

[結果と考察]

- ・コルジセピンは検出されなかった。
- ・今回、検出には2.0~5.0gの子実体が必要であったが、検体として提出できたのは5.52mgだった。採取できた検体の量が少なかったためコルジセピンが検出されなかった可能性がある。冬虫夏草を大量に生産する手法を確立する必要がある。

● 考察のまとめ

- ・寒天培地では、基本培地と米ぬか培地でハナサナギタケの、基本培地と玉ねぎ醤油にて赤きょう菌の子実体が形成されていた。今回の実験から入手しやすく安価であることから栄養成分は米ぬかが適している。
- ・子実体が生えている寒天培地はどれも乾燥していて水分が少なかったことから、培地の水分が少ない寒天培地のほうが子実体を形成しやすいと考えられる。

● 課題と今後に向けて

- ・子実体形成に最適な培地の栄養成分量(%)を調べ、培養法を確立する。
- ・大量に子実体を生育させ、天然の冬虫夏草と人工のもので成分を比較し、有用成分の有無を調べる。

● 参考文献・引用

- 1 冬虫夏草生態図鑑 日本冬虫夏草の会・著 出版 誠文堂新光社
- 2 冬虫夏草ハンドブック 盛口満・著 出版 文一総合出版
- 3 新規の環状ペプチド(ナトリード)が、培養したグリア細胞と神経細胞の相互作用を調節し
老化促進マウスモデルの加齢障害を改善する (著者) (株)バイオコクーン研究所
[A novel cyclic peptide \(Naturido\) modulates glia-neuron interactions in vitro and reverses ageing-related deficits in senescence-accelerated mice \(nih.gov\)](#)
- 4 ハナサナギタケの培養特性について<http://ffpsc.agr.kyushu-u.ac.jp/kfs/kfr/55/bin090521124536009.pdf>
- 5 冬虫夏草菌株の収集とその生態https://taffrc.pref.toyama.jp/nsgc/shinrin/webfile/t1_34544714bc47000e27b6d884e228585f.pdf
- 6 応用微生物学実験 実験書
https://ocw.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2021/04/2010_ouyoubiseibutsugakujikken_00.pdf
- 7 キノコの人工培養
https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu1962/8/5/8_5_320/_pdf
- 8 無菌操作と培地の作り方
<http://www.ed.ehime-u.ac.jp/~muko-lab/img/file7.pdf>
- 9 培地について
<https://www.nite.go.jp/nbrcc/cultures/cultures/cultures.html#A>
- 10 サナギタケ培養液のがん細胞増殖抑制作用に関する研究
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcam/10/1/10_51/_article/-char/ja/
- 11 きのご類における栄養成長から生殖成長への切換えに関わる分子スイッチの特定
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-17H03798/17H03798seika.pdf>

● 謝辞

今回の研究についてご指導、ご協力くださった方々に深く感謝いたします。

- ・日本冬虫夏草の会 小林 徹 様
- ・国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門
研究推進部長 井原 史雄 様
- ・秋田県立大学 生物資源学部 応用生物科学科 准教授 村口 元 様
- ・指導教員 岡本 由佳子 先生