

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) の液体培養
(第1報)

宮下良平・米山 誠

(株) 応微研きのご総合研究センター
〒406-0107 山梨県北巨摩郡双葉町宇津谷本屋敷 4548-1

Liquid Culture of *Cordyceps sinensis* I.

Ryohei MIYASHITA and Makoto YONEYAMA

General Mushroom Research Center, JAMRI,
Ltd., 4548-1 Honyashiki Utsunoya Futaba-cho,
Kitakoma-gun, Yamanashi, 407-0108, Japan

Abstract

The liquid culture condition was examined on *C. sinensis* of the Cordyceps genus. As the result, initial pH was widely spread between 3.5~8.0, and growth was proven. The growth increment reached a maximum in the inside of pH 5.0. There were 8 kinds of organic nitrogen on the nitrogen source. The growth was better than the growth when inorganic nitrogen was added, the yeast extract was most suitable, and the maximum for the concentration was 4%. As a result of examining 7 types of alditol, polysaccharide, disaccharide, monosaccharide as a carbon source, glycerol and mannitol were the most suitable. This sugar was also alditol on any-way. Then, the growth in glycerol, erythritol, sorbitol and the medium, which was added to the mannitol, was good because it cultivated *C. sinensis* by increasing the type of alditol in 5 types. In addition, it was proven that it was the glycerol of the alditol as a carbon source which was most suitable and that the concentration was 3% as a result of 4 kinds of concentration of this alditol which changed at 0~6% and cultivated it.

論文

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) の液体培養
(第1報)

宮下良平・米山 誠

(株) 応微研きのご総合研究センター
〒406-0107 山梨県北巨摩郡双葉町宇津谷本屋敷 4548-1Liquid Culture of *Cordyceps sinensis* I.

Ryohei MIYASHITA and Makoto YONEYAMA

General Mushroom Research Center, JAMRI,
Ltd., 4548-1 Honyashiki Utsunoya Futaba-cho,
Kitakoma-gun, Yamanashi, 407-0108, Japan

Abstract

The liquid culture condition was examined on *C. sinensis* of the Cordyceps genus. As the result, initial pH was widely spread between 3.5~8.0, and growth was proven. The growth increment reached a maximum in the inside of pH 5.0. There were 8 kinds of organic nitrogen on the nitrogen source. The growth was better than the growth when inorganic nitrogen was added, the yeast extract was most suitable, and the maximum for the concentration was 4%. As a result of examining 7 types of alditol, polysaccharide, disaccharide, monosaccharide as a carbon source, glycerol and mannitol were the most suitable. This sugar was also alditol on anyway. Then, the growth in glycerol, erythritol, sorbitol and the medium, which was added to the mannitol, was good because it cultivated *C. sinensis* by increasing the type of alditol in 5 types. In addition, it was proven that it was the glycerol of the alditol as a carbon source which was most suitable and that the concentration was 3% as a result of 4 kinds of concentration of this alditol which changed at 0~6% and cultivated it.

緒 言

昆虫やクモ類の生体内に寄生し、内生菌核を作りこれから有柄の棍棒形~球形状の子座を形成させる麦角菌科の菌群は冬虫夏草属^{1,3)}と呼ばれている。これらの菌群の中の1種である *Cordyceps sinensis* (写真1) は鱗翅類のコウモリ蛾の幼虫に寄生し、分布上中国の四川・雲南・青海・甘肅・貴州・湖北および折江の各州とチベットからネパール・ヒマラヤの高山地帯にかけ標高 3,000 m の荒草原に自生している^{4,6)}。この *C. sinensis* の子座は棍棒型で単一または 2~3 個を生じ、高さは 4~10 cm, 結実部は上部に形成されふくらみのある披針状の円筒形、その先端は細まり、ときに柄の先端が突出する。結実部の高さ 1.4~2.8 cm. 暗褐色から焦褐色、子嚢果は裸生⁷⁾。また *C. sinensis* の子

座は古くから中国で滋養強壯の目的で食され⁸⁾、その生理活性成分として核酸関連物質、マンニトール⁹⁾、セレン^{10,11)} およびメラトニン¹²⁾ を含有している。近年特に生理活性成分として、ガン細胞抑制・結核菌に対して強い抗菌作用を示すコルジセピンがサナギタケ (*Cordyceps militaris*) から単離^{13,14)} され注目された。この *C. militaris* のみならず本研究の *C. sinensis* にもコルジセピンが含まれていることが報告^{15,16)} されている。ところが *C. sinensis* が日本ではまだ確認されていない。さらにこのキノコの子座形成のための人工栽培に関する報告例も見当たらず、人工栽培技術が確立されているとはいいがたく、したがって市場にあまり出回らない。そこで、ガンや結核菌に強い生理活性を示すこの *C. sinensis* を短期間に大量に市場に出回らせるには培養条件を整える必要がある。本研究では、まず始めに *C. sinensis* の菌体を大量に得るため、そ



写真1 冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*)
天然冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) の乾燥品の写真

の成長に適した液体培養条件を明らかにしようと詳細に検討した。本研究の一部は平成 13 年度日本木材学会大会および平成 13 年度日本応用きのこ学会大会で報告した。

材料および方法

1) 供試菌および前培養

C. sinensis の供試菌には、当社きのこ総合研究センター保有の Csi101 菌株を用いた。この菌株を 25°C、暗期条件下で PDA (ポテトデキストロース寒天) 培地上で 14 日間平面培養して得られた前培養菌体を、内径 4 mm のコルクボーラーで切りとり実験に供した。

2) 培養方法

1. 初発 pH ペプトン 3%, グルコース 1%, KH_2PO_4 0.1%, Na_2HPO_4 0.1% で初発 pH を 1N の HCl で 5.5 に調整した液体培地 (以下、基本培地とする) を、300 ml 容リム無し三角フラスコに 100 ml 充填して 121°C、10 分間オートクレーブで滅菌した。さらに、基本培地の初発 pH の 5.5 の代わりに 1N の HCl あるいは 1N の KOH で、3.0~8.0 までの範囲で 0.5 ぎざ

みの合計 11 区分に調整し基本培地と同様の方法でオートクレーブで滅菌した。これらの液体培地に前培養で得られた *C. sinensis* の供試菌を接種し 25°C、暗期条件下で 14 日間培養した。培養後、菌体を、米山らの方法に従い¹⁷⁾、ろ過し蒸留水で充分洗浄し、105°C で 24 時間乾燥させ、その重量を測定した。

2. 窒素源の添加 基本培地のペプトンの代わりに有機態窒素のソイトン、イーストエキス、カザミノ酸 (タンパク質加水解物)、無機態窒素の KNO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 NH_4Cl および $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ をそれぞれ 3% になるように添加して初発 pH を 5.5 に調整し、初発 pH での培養方法と同様の方法で 14 日間静置培養した。さらにペプトン、イーストエキスについては濃度を 0~6% に変化させ、同様の方法で培養した。培養後は初発 pH と同様の方法で菌体重量を測定した。

3. 炭素源の添加 基本培地のグルコースの代わりにフラクトース、スクロース、デキストリン、コーンスターチ、糖アルコールのマンニトールおよびグリセロールの 6 種類の炭素源をそれぞれ 1% になるように添加して初発 pH を 5.5 に調整し、これらの液体培地に初発 pH での培養と同様の方法で 14 日間静置培養した。培養後は初発 pH と同様の方法で菌体重量を測定した。

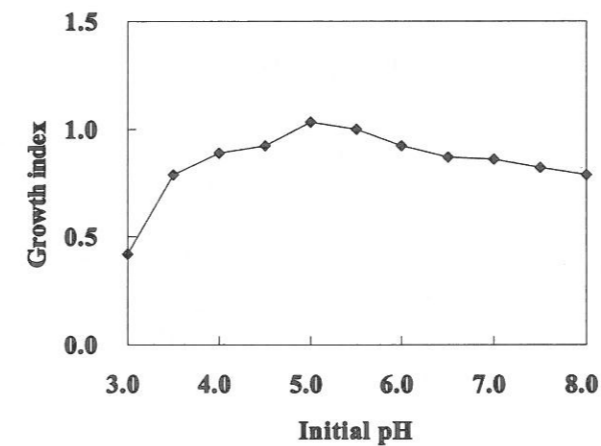


図1 *C. sinensis* 菌糸体の成長に及ぼす初発 pH の効果

初発 pH5.5 の液体培地で培養した菌糸体の乾燥重量を Growth index1.0 として他と比較した。横軸には検討を行った初発 pH をあらわした。

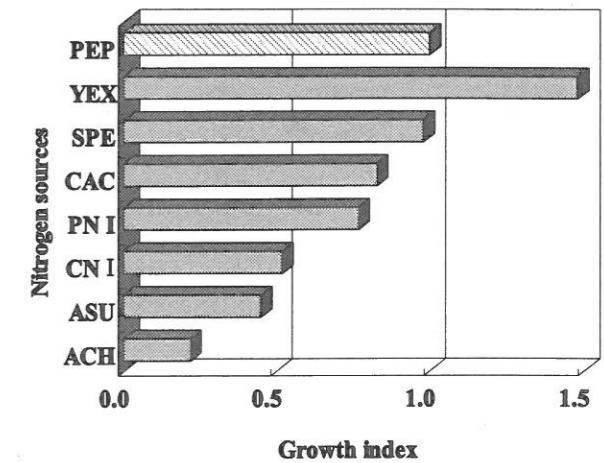


図2 *C. sinensis* 菌糸体の成長に及ぼす窒素源の効果

ペプトン 3% の液体培地で培養した菌糸体の乾燥重量を Growth index1.0 として他と比較した。

PEP ペプトン YEX イーストエキス
SPE ソイペプトン CAC カザミノ酸
PNI 硝酸カリウム CNI 硝酸カルシウム
ASU 硫酸アンモニウム ACH 塩化アンモニウム

4. 糖アルコールの添加 初発 pH, 窒素源の添加および炭素源の検討の結果, 最適初発 pH は 5.0, 最適窒素源はイーストエキストラクト 4.0%, 炭素源は基本培地のグルコースの代わりに糖アルコールのマンニトールおよびグリセロールを添加した培地での菌体成長が最も良好なことから, さらにソルビトール, キシリトール, エリスリトール, ラクチトールおよびマルチトールをそれぞれ 1% になるように添加して初発 pH を 5.5 に調整し, これらの液体培地に初発 pH での培養と同様の方法で 14 日間静置培養した。培養後は初発 pH と同様の方法で菌体重量を測定した。さらに, これら 7 種類の糖アルコールについては濃度を 0~6% に変化させ, 同様の方法で菌体重量を測定した。

結 果

1) 初発 pH の菌体成長に及ぼす影響

初発 pH5.5 のときの *C. sinensis* の液体培養における菌体成長量を 1.0 として他の初発 pH での成長量を

Growth index で表した (図 1)。 *C. sinensis* は初発 pH が 3.0 を除き 3.5~8.0 までの広範囲にわたり成育が可能であることがわかった。その中で初発 pH が 5.0 付近のとき成長量が最大となり, 担子菌のナメコやエノキおよびマイタケ¹⁸⁻²⁰⁾ などの食用キノコと同様の結果が得られた。

2) 窒素源の菌体成長に及ぼす影響

8 種類の窒素源を用いて *C. sinensis* の菌体成長量を比較し, ペプトンでの成長量を 1.0 として他を Growth index で表した。図 2 に示したように, イーストエキスが約 1.5 倍で最大に達し, ソイトンでは大差がないことが明らかとなった。他の 5 種類の窒素源では *C. sinensis* の液体培養には適さないと考えられた。そこでイーストエキスおよびペプトンの 2 種類の窒素源を用いて, さらに濃度を 0~6% に変化させて成長量を比較した (図 3)。ペプトンでは濃度が 5% まで成長量が増加したがイーストエキスを添加した全ての濃度の成長量には及ばないことがわかった。一方, イーストエキスでは濃度が 4% まで成長量が増

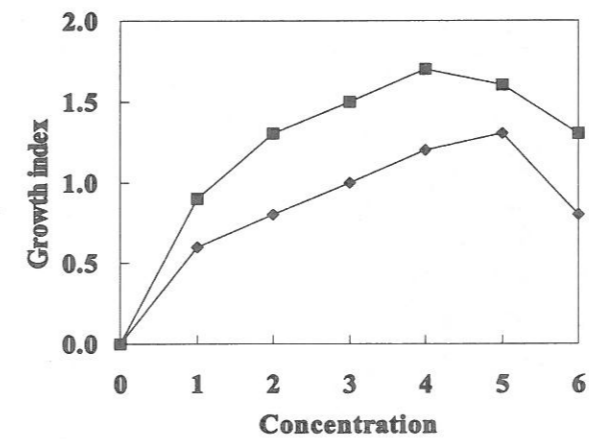


図3 *C. sinensis* 菌糸体の成長に及ぼす窒素源添加濃度の効果

ペプトン添加濃度3%の液体培地で培養した菌糸体の乾燥重量を Growth index 1.0 として他と比較した。添加濃度は重量%として横軸に表した。

■イーストエキス ◆ペプトン

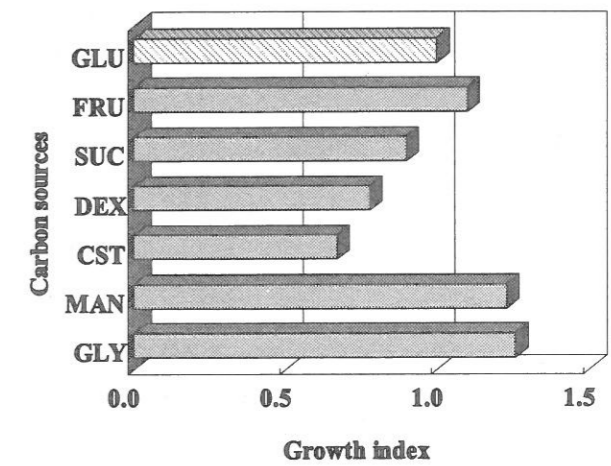


図4 *C. sinensis* 菌糸体の成長に及ぼす炭素源の効果

炭素源をグルコース1%とした液体培地で培養した菌糸体の乾燥重量を Growth index 1.0 として他と比較した。

GLUグルコース FRUフルクトース
SUCスクロース DEXデキストリン
CSTコンスターチ MANマンニトール
GLYグリセロール

加し、その濃度を超えると成長が阻害されることがわかった。よって *C. sinensis* の窒素源としてはイーストエキスが本研究条件下では最も適していることが判明した。その最適濃度は4%であった。

3) 炭素源の菌体成長に及ぼす影響

7種類の炭素源を用いて基本培地のグルコースでの *C. sinensis* の菌体成長量を1.0として他を Growth index で表して比較した結果(図4)、単糖類のグルコースおよびフルクトース、二糖類のスクロース、それに糖アルコールのマンニトールおよびグリセロールでの成長が良好であった。中でも特にマンニトールおよびグリセロールでの成長が良好であり、それらは何れも糖アルコールであった。

4) 糖アルコール類の菌体成長に及ぼす影響

3)の結果より、糖アルコールの添加により *C. sinensis* の成長が良好になることから、さらに糖アルコールの種類を増やし、すなわち6種類の糖アルコールで *C. sinensis* の成長量を検討した。単糖類のグル

コースの *C. sinensis* の成長量を1.0として他の糖アルコールを Growth index で表して比較した。その結果、図5に示したようにグリセロール、エリスリトール、ソルビトールおよびマンニトールの4種類の糖アルコールで良好な成長が見られ、その内グリセロール添加での成長量が最大であった。一方、他のキシリトール、ラクチトール、マルチトールはグルコース添加での成長量と比較しても、かなり劣り、*C. sinensis* の培養には適さないと考えられた。そこで、*C. sinensis* の培養に適していると考えられたグリセロール、エリスリトール、ソルビトールおよびマンニトールの4種類の糖アルコールは、さらに濃度を0~6%まで変化させて検討した。その結果、エリスリトールを除き、いずれの糖アルコールも濃度が3%まで菌体の成長量が増加し、濃度が3%を越えると成長が阻害された(図6)。したがって、これら糖アルコールの内、グリセロールが *C. sinensis* の培養に最も適しており、その濃度が3%であることが明らかとなった。前述の炭素源としての糖の検討から、さらに糖アルコールの検討を加え、*C. sinensis* の培養に最も適した炭

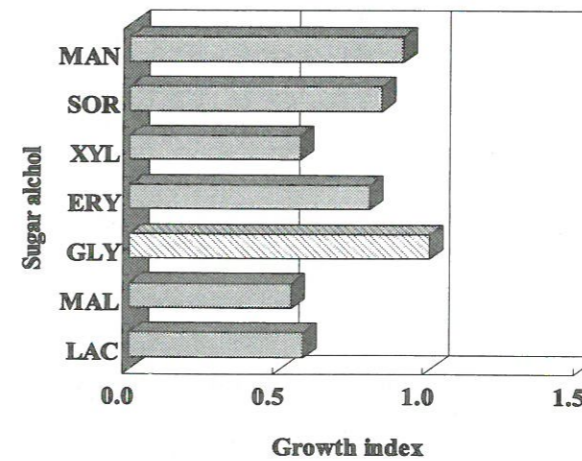


図5 *C. sinensis* 菌糸体の成長に及ぼす糖アルコールの効果

グリセロール1%の液体培地で培養した菌糸体の乾燥重量を Growth index1.0として他と比較した。
 MAN マンニトール SOR ソルビトール
 XYL キシリトール ERY エリスリトール
 GLY グリセロール LAC ラクトール
 MAL マルチトール

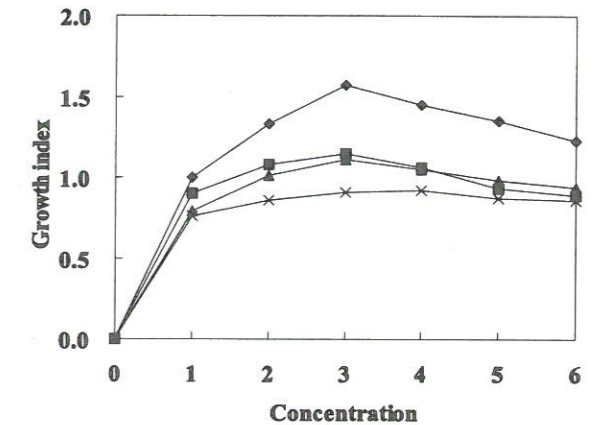


図6 *C. sinensis* 菌糸体の成長に及ぼす糖アルコール添加濃度の効果

◆グリセロール ■マンニトール
 ▲ソルビトール ×エリスリトール

グリセロール1%の液体培地で培養した菌糸体の乾燥重量を Growth index1.0として他と比較した。
 添加濃度は重量%で横軸に表した。

素源としては、本研究条件下ではグリセロールで、その濃度は3%であることが明らかとなった。

考 察

C. sinensis は海拔 3,000 m 以上の亜高山帯に生息している鱗翅類のコウモリ蛾 (*Hepialus armoricanus* OBER.) の幼虫に寄生するため、この条件を満たす地域が限られ、主に中国のチベットでしか見られない。このため *C. sinensis* の生態が不明な部分が多く、このキノコを栽培するためには、まず培養条件を明らかにする必要があった。

そこで、一般の担子菌類の特に栽培の比較的容易な木材腐朽菌と称されるキノコの培地組成をモデルに米山ら¹⁷⁾の液体培養条件の決定方法に従って *C. sinensis* の培養条件の検討を試みた。その結果、初発 pH は pH4.0~6.0 付近で比較的良好に成長し、pH5.0 付近でその成長量が最大となった。この結果は担子菌のナメコやエノキおよびマイタケなどの木材腐朽菌の培養条件¹⁸⁻²⁰⁾にほぼ類似していた。しかし、*C. sinensis* は

初発 pH が 3.5 の酸性度が強い培地でも成長が可能で初発 pH 3.5~8.0 まで担子菌よりも広範囲に成長できることもわかった。これは *C. sinensis* の発生場所のチベット地方が主に腐葉土で構成され、それゆえ酸性に傾く土壌環境に適合していったため獲得した能力ではないかと考えられた。

次に、*C. sinensis* の培養に適した窒素源について検討した結果、8種類の窒素源のうち塩化アンモニウムや硝酸カルシウムなどの無機態窒素よりもペプトン、イーストエキスおよびソイトンなど有機態窒素のほうが菌体の成長が良好であった。したがって、窒素源の種類については担子菌のヒラタケなどの木材腐朽菌の培養条件にほぼ類似していたものの、その最適濃度は4~5%と担子菌と比較して約7~13倍も高く²¹⁾、*C. sinensis* の培養には高濃度の窒素源が必要であることが明らかとなった。この結果は *C. sinensis* が木材腐朽菌とは異なり動物性タンパク質を窒素源として摂取して成長しているため、それに見合うような高濃度の窒素源が必要になるのではないかと考えられた。

次に *C. sinensis* の培養に適した炭素源を検討しようとして、初め7種類の糖で調べた結果、単糖類の

グルコースおよびフルクトース、二糖類のスクロースでも良好に成長し担子菌のブナシメジおよびヒメマツタケとほぼ類似していたが^{22, 23)}、それらの糖よりもグリセロールおよびマンニトールの糖アルコールを添加した培地での成長が、さらに上まわることがわかった。我々はこの結果に基づき、他の糖アルコールでも *C. sinensis* の培養に、より適するものがあるのではないかと予想されたので、さらに5種類の糖アルコールを追加し検討した。その結果、4価のエリスリトールおよび6価のソルビトールでも成長が良好であったが当初の糖の検討のときに添加して成長を比較した3価のグリセロールおよび6価のマンニトールでの成長量には及ばなかった。他のキシリトール、ラクチトールおよびマルチトールの3種類の糖アルコールでは、成長がかなり劣った。したがって *C. sinensis* の培養に適さないと考えられた。そこで、さらにグリセロール、エリスリトール、ソルビトールおよびマンニトールの4種類の糖アルコールを濃度0~6%に変化させて、*C. sinensis* の培養に適した糖アルコールとその濃度を検討したところ、グリセロールでの成長が全ての濃度で他の糖アルコールよりも上まわり、本研究条件下では、*C. sinensis* に最も適した炭素源としては、糖アルコールのグリセロールで、その濃度が3%であることが明らかとなった。

C. sinensis は9月ごろ担子菌のキノコも発生しない高草原の土中でコウモリ蛾の幼虫に寄生し越冬して翌年の5~6月ごろ子座を形成する。ところでコウモリ蛾の幼虫は2年もの間、土中で脱皮を繰り返しながら成長し続け越冬する。この越冬をすることによりコウモリ蛾の幼虫などが厳寒をしのいでいるが、やはり体内の組織液あるいは細胞質が凍ることが生体にとり最も危険の要因となる。当然のことながら、それらが凍れば微妙な細胞の構造が損なわれ、タンパク質を変性するような高い塩濃度になり死にいたるであろう。この組織液などの凍結を防ぐ方法のひとつとして、コウモリ蛾の幼虫は体内に糖アルコールであるグリセロールを蓄えているという²⁴⁾。いわば不凍液を作り凝固点降下を利用して体内を凍結から守るような働きをしているのであろう。たとえば、小さい寄生蜂のコマユバチは血液中に5Mのグリセロールを保持して-47°Cでも耐えられ、そのときの凝固点降下は17°Cにも達するという²⁵⁾。

ところで地方名でゆきわり²⁶⁾とも言われている担子

菌のエノキタケは晩秋から春にかけて子実体を形成しながら越冬するキノコで液体培養における炭素源として用いられる糖アルコールはグリセロールよりもマンニトールのほうがより適している。しかし単糖類、二糖類および多糖類のほうが糖アルコールと比較して、適しており成長が良好であることが知られている^{21, 27)}。本研究の麦角菌科の *C. sinensis* がエノキタケなどの担子菌に適している炭素源とは異なり、特異的に糖アルコールのグリセロール添加培地での成長が良好なことから、海拔3,000m以上の亜高山帯で生息するにはコウモリ蛾の幼虫のような体内に糖アルコールを蓄えて越冬するような昆虫に寄生し、糖アルコールを摂取して自らの菌体内を凍結から防ぐ必要があったのではないかと考えられ、このような理由から糖アルコールのグリセロールが成長に最も適した炭素源として *C. sinensis* は利用しているのではないかと考えられた。

引用文献

- 1) 戴如琴・沈南英・邵愛娟：冬虫夏草，「中国药用真菌学」（中国药用真菌学編委会編，北京医科大学中国协和医科大学総合出版社，北京，pp. 369-371 (1997)
- 2) 小林義雄・清水大典：冬虫夏草，「冬虫夏草菌図譜」（小林義雄・清水大典編，保育社，大阪，pp. 163-165 (1983)
- 3) 大谷吉雄：サナギタケ，「原色日本新菌類図鑑（II）」（今関六也・本郷次雄編，保育社，大阪，pp. 278-279 (1999)
- 4) 大谷吉雄：日本冬虫夏草の学会誌 2，9-10 (1982)
- 5) 金城典子：冬虫夏草の成分と薬効，「98年版きのこ年鑑」（きのこ年鑑編集部編，農村文化社，東京，pp. 259-260 (1999)
- 6) 金城典子：冬虫夏草の薬的作用，「きのこハンドブック」（衣川堅二郎・小川眞編，朝倉書店，東京，pp. 223-224 (2000)
- 7) 清水大典：冬虫夏草，「冬虫夏草図鑑」（清水大典編，家の光協会，東京，p. 79 (1997)
- 8) 劉波：冬虫夏草，「中国の薬用菌類」（難波恒雄，布目慎勇訳，自然社，東京，pp. 16-18 (1982)
- 9) 難波恒雄：冬虫夏草，「キノコの化学・生化学」（水野卓・川合正允編），学会出版センター，東京，pp. 256-257 (1992)
- 10) 水野卓：キノコ類の薬効と食効とその利用（11）冬虫夏草，「キノコの薬効と食効」（静岡大学農学部生物化学研究室編，東海美術社，静岡，pp. 9-17 (1999)
- 11) 徐良：冬虫夏草，「中国名貴药材规范化栽培与产业化开发新技术」（徐良編），中国协和医科大学出版社，北京，

- pp. 225-228 (2001)
- 12) 金城典子：メラトニン，「究極の生薬冬虫夏草」（金城典子編），リオン社，東京，pp. 162-189 (1999)
- 13) Cunningham, K. G., Hutchinson S. A., Manson, W., Spring, F. S.: J. Chem. Soc., 2299-2300 (1951)
- 14) Jagar, D. V, Mredich, N., Guarino, A. J.:Canser Res., **21**, 216-217 (1961)
- 15) 季宇彬：冬虫夏草，「抗癌中薬薬理と応用」（抗癌中薬薬理と応用編），黒龍江科学技術出版社，黒龍江，pp. 494-501 (1999)
- 16) 張顕科・劉文：菌物系統 **16** (1), 78-80 (1997)
- 17) 米山誠・目黒貞利・河内進策：日本木材学会誌 **43** (4), 349-355 (1997)
- 18) 谷口實：pH, 「きのこの増殖と育種」（最新バイオテクノロジー全書編集委員会編）pp. 52-57 (1992)
- 19) 衣川堅二郎：pH, 「キノコの事典」（中村克哉編），朝倉書店，東京，pp. 58-62 (1997)
- 20) 松本晃幸・大平郁男：菌叢研前所研究報告 **20**, 140-147 (1982)
- 21) 北本豊，鈴木彰：窒素源，「きのこ学」（古川久彦編），共立出版，東京，pp. 86-87 (1992)
- 22) 寺下隆夫・盧成金・吉川賢太郎・獅子山慈孝：きのこの科学 **2** (1), 15-20 (1995)
- 23) 江口文陽・吉本博明・吉本高明・檜垣宮都：日本木材学会誌 **40** (6), 666-671 (1994)
- 24) 園部治之：カイコの胚休眠，「昆虫生理学—現象から分子へ—」（大西英爾・園部治之・遠藤克彦編）朝倉書店，東京，pp. 160-175 (1990)
- 25) Mordue, W.: 温度の影響，「モーデュ昆虫生理学入門」（高橋正三訳），弘学出版，東京，p. 185 (1983)
- 26) 柴田尚：エノキタケ，「改訂版山梨のきのこ」（柴田尚編），山梨日日新聞社，山梨，p. 76 (1995)
- 27) 北本豊：ヒラタケ，「2000年版きのこ年鑑」（きのこ年鑑編集部編），農村文化社，東京，pp. 95-96 (1999)

(2002年6月15日受理)