

慶應義塾大学経済学部研究プロジェクト

最終成果論文（2020年度）

# 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性 の評価

経済学部 3年 学籍番号：21805694

氏名：笠原悠二

（指導教員：糟谷大河先生）

# 目次

<b>1.</b>	<b>はじめに .....</b>	<b>1</b>
1.1.	冬虫夏草類の分類.....	1
1.1.1.	冬虫夏草の概要 .....	1
1.1.2.	冬虫夏草の系統分類学的研究の歴史 .....	4
1.2.	シネンシストウチュウカソウの希少性.....	5
1.2.1.	漢方薬としての評価 .....	5
1.2.2.	シネンシストウチュウカソウの入手可能性 .....	7
1.2.3.	取引市場と規制 .....	10
1.3.	試料の個体識別及び産地識別の方法について.....	11
1.3.1.	分子系統解析 .....	11
1.3.2.	クロマトグラフィー・同位体比分析 .....	12
1.3.3.	その他の方法 .....	13
1.4.	本研究の目的 .....	14
<b>2.</b>	<b>材料及び方法.....</b>	<b>16</b>
2.1.	材料.....	16
2.2.	方法.....	20
2.2.1.	DNA 抽出 .....	20
2.2.2.	遺伝子領域の増幅.....	21
2.2.3.	シーケンシング.....	22
2.2.4.	子実体の同定 .....	24
2.2.5.	分子系統解析 .....	24
<b>3.</b>	<b>結果.....</b>	<b>26</b>

3.1.	BLAST の相同性検索による子実体の分子同定の結果 .....	26
3.2.	最節約法による系統解析.....	26
3.3.	最尤法による系統解析 .....	27
<b>4.</b>	<b>考察.....</b>	<b>30</b>
4.1.1.	シネンシストウチュウカソウの真正性について .....	30
4.1.2.	<i>Ophiocordyceps camponoti-bispinosi</i> に近縁の学名未記載種について .....	31
4.1.3.	<i>Metarhizium cylindrosporum</i> のテレオモルフについて .....	32
4.1.4.	<i>Metarhizium</i> 属の学名未記載種について .....	34
4.1.5.	ツクツクボウシタケ ( <i>Isaria cicadae</i> ) とツクツクボウシセミタケ ( <i>Cordyceps sinclairii</i> ) の系統関係.....	36
4.1.6.	その他の標本の LSU 領域の系統解析の評価 .....	37
4.1.7.	結論.....	39
<b>5.</b>	<b>謝辞.....</b>	<b>41</b>
	参考資料一覧[文献一覧見出し].....	42

# 1. はじめに

## 1.1. 冬虫夏草類の分類

### 1.1.1. 冬虫夏草の概要

「冬虫夏草」とは、元来中国の高山帯 3,000 m~5,000 m で観察されるコウモリガ類を宿主に生じた棍棒型の子実体を有する、シネンシストウチュウカソウ (*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora)につけられた名称である。冬虫夏草という名称は歴史を通じて段々とその意味する範囲を拡大し、広義には、昆虫を宿主とする菌類全般に用いられる。これまで「冬虫夏草」は次のように扱われてきた。

- ① 中国とその近隣の高山帯で観察されるシネンシストウチュウカソウ *O. sinensis* とその近縁種、*O. aspera* や *O. crassispora* などを指す場合(狭義の冬虫夏草)
- ② 昆虫など(クモ、菌類および一部高等植物の果実)に *Cordyceps* 属やその近縁菌が寄生しているいろいろな形の子実体を生じたもので、生殖器官として子座上に子囊殻を形成して内生的に微小な子囊を形成し、その中で減数分裂により子嚢胞子が作られる。つまり、テレオモルフ(有性世代)を有するものを指す場合で、例えばサナギタケ *C. militaris*、セミタケ *O. sobolifera* などを指す。
- ③ ②に加え、昆虫などから生じるきのこ状(子実体)の表面に無性的に粉状か、粘液質の分生子を作るアナモルフ(無性世代)。また、アナモルフのみの菌類も含めて広義に用いる。例えば、ハナサナギタケ *Isaria japonica* マユダマタケ *Polycephalomycetes* sp. などを指す。(日本冬虫夏草の会, 2014, p. 12)

本論においては、③に該当する広義の冬虫夏草を対象に解析を行うが、その解析は①の指す *O. sinensis* を中心に行う。冬虫夏草の生殖様式には、テレオモルフ(有性世代)を形成し、有性生殖により子実体から胞子を作ることによるものと、アナモルフ(無性世代)を形成し、自らと同じ遺伝子を持つ分生子を作ることによる無性生殖がある。学名の命名方法において、従来は同一の遺伝子配列を持つ子実体についても、アナモルフとテレオモルフに別々の学名が与えられ識別されている場合が存在したが、系統的に同一と判断された子実体については、2つの学名を統一するという「One fungus, one name」の動きが進んでいる(Liu et al., 2002/ Ban et al., 2015)。多くの冬虫夏草類には、テレオモルフの形態とアナモルフの形態が存在するが、本研究においては対象をそれぞれの種におけるどちらかの形態に必ず

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

しも絞ることなく、同様の処理を施し解析を行った。

本研究において、実際に解析に用いる標本は、宿主がアリ生、セミ生、カメムシ生など様々である。図1は今回の実験で解析に用いたツクツクボウシタケ (*Isaria cicadae* Miq)、クビオレアリタケ (*Ophiocordyceps satoi* Araújo, H.C. Evans & D.P. Hughes)、カメムシタケ (*Ophiocordyceps nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora)などの画像である。A,Bは埼玉県久喜市菖蒲町で採取したツクツクボウシタケの画像である。Bの画像を見ると分かるように、セミの幼虫全体が白い菌糸で覆われ、セミの頭部から分生子柄束が数本生じている。分生子は先の太った棒状になっており、粉状の組織が集まって形成されているため、手で叩くなどすると飛散する。Cはaの薄茶色の棒状に膨らんだ部分がテレオモルフ (*Cordyceps sinclairii* Berk)<sup>1</sup>、bの白色の突起物が複数広がっている部分がアナモルフ (*Isaria cicadae*)である。両者は別々の学名が存在するが、明確に系統的な同一性を確かめた例はこれまで存在しない。Dはカメムシタケである。菌が寄生した宿主も、Dのように表面には翅の形状の組織を残して見える場合もある。しかし、切断して中身を見ると宿主の中身が全て菌糸に置き換わっており、内部まで感染が進んでいることが確認できる。E、F、G、Hはいずれも本研究に用いた標本である。形態的観察の結果から、それぞれクビオレアリタケ、アカンソマイシス ノボギネンシス (*Akanthomyces novoguineensis* Samson & B.L. Brady)、アマミヤリノホセミタケ (*Metarhizium owariense* f. *viridescens* (Uchiy. & Udagawa) Kepler, S.A. Rehner & Humber)、タイワンアリタケ (*Cordyceps unilateralis* (Tul. & C. Tul.) Sacc)と推定した。

---

<sup>1</sup> Sato et al. (2010)などの先行研究において、*Cordyceps kobayashii* Koval という名称が使用されているが、同種のことを指している。日本では *C. kobayashii* という名称が用いられることが多い一方で、国際的な系統解析を用いた先行研究では、*C. sinclairii* が多く用いられていることから、本論では、後者を用いる。



- A : ツクツクボウシタケの子実体の地表部分(KPR046)  
B : ツクツクボウシタケの全体図(KPR046)  
C : ツクツクボウシセミタケ(KPR064, aは子嚢殻を形成したテレオモルフの部分、bは分生子を形成したアナモルフの部分)  
D : カメムシタケ(KPR052)  
E : クビオレアリタケ(KPR019)  
F : アカンソマイシス ノボギネンシス(KPR041)  
G : アマミヤリノホセミタケ(KPR015)  
H : タイワンアリタケ(KPR023)

図 1 本研究で用いた標本の一部

### 1.1.2. 冬虫夏草の系統分類学的研究の歴史

冬虫夏草類の系統分類については、多くの先行研究が存在するが、特に先行研究が豊富な手法として、宿主となる昆虫や子実体の形状などの視覚情報を利用する方法と、遺伝情報を利用する方法の2種類が存在する。1つ目の方法については、事前に性質を把握することで対象とする冬虫夏草の分類を簡便に推定することができることが特徴である。観察すべき点としては、宿主、子実体の色や質、子囊殻の形状、子囊の形状、子嚢胞子の形状が挙げられる。形態的観察による主要な研究として、Kobayasi (1941)があり、世界中の冬虫夏草の分類をまとめたモノグラフが作成されている。これにより、研究者によって属などの分類方法の見解が分かれていた問題に一定の解決を示した。また、Kobayasi (1980, 1981)によって、東アジアや南北アメリカで採取された冬虫夏草類についても広く分類が行われ、特に *Cordyceps* 属について形態的特徴が具体的に示された。Sato et al. (2010)においては、Kobayasi(1941)の分類の再検討及び整理がなされた。現代では、系統学的方法による分類と併せることによって、分類の正当性が検証されることが多く、形態的特徴によって冬虫夏草を属レベルで推定することが可能となっている。付図1では、一例として主要な冬虫夏草類の4つの属についてその形態的特徴を示している。付図2は冬虫夏草全体の仕組みの概要及びその結実部の形状を示しており、形態的特徴については宿主に加えて結実部の形状も種の同定に重要な要素であることが分かる。これらに示した形態的特徴に基づき、分類学的研究が行われてきた。

2つ目の方法は、遺伝子配列を用いて系統進化関係を明らかにすることで系統樹を作成する方法であるため、1つ目の方法に比べてより客観的に分類学的な位置づけを明らかにできることが特徴である。このことは、突然変異遺伝子が新たな形態学的形質あるいは生理学的性質をもたらすならば、同じ遺伝子にまた突然変異が起きないかぎり、その形質は全子孫に引き継がれていくという特性に由来する(根井, 2006, p.2)。分子系統学的手法を用いた系統分類の研究は世界的に進められており、Sung et al. (2007)の研究により、全世界の分類群を対象とした冬虫夏草類の分類体系が示されている。系統学的分類手法の発展

は、形態的特徴の類似性の観点から同種とされていた種の分類や、アネモルフとテレオモルフの関係の明示など冬虫夏草研究において重要な意味が存在する。

## 1.2. シネンシストウチュウカソウの希少性

### 1.2.1. 漢方薬としての評価

シネンシストウチュウカソウは古来より漢方薬として利用されており、その発祥地たる中国を中心として高い効能があると信じられてきた。奥沢(2012)によると、紀元 780 年の『蔵〔チベット〕本草』にも冬虫夏草の「潤肺、補腎」効果が記載され、これがおそらく中国で最も早い冬虫夏草の薬用価値に関する記述であろうとしている(奥沢, 2012, p. 243)。中国で薬剤として用いられるようになってきたのは清の雍正帝や乾隆帝の時代であり、そのころの中国薬店や経典には、「夏草冬虫根」あるいは「夏草冬虫」などと記載されていた(日本冬虫夏草の会, 2014, p. 18)。奥沢(2012)によると、「冬虫夏草」という言葉の初出は、清の呉敬梓(1701-54)が書いた風刺小説『儒林外史』(1746 頃)とされる(奥沢, 2012, pp.236-237)。乾隆帝の時代には、『四庫全書』の編纂をはじめとした文化的大事業が行われたため、本草学についても整理が進む中で多くの書物の中で冬虫夏草が薬の 1 つとして扱われるようになったと考えられる。しかし、『柳崖外編』(1793)の記述を見ると、現代の漢方薬としての利用とは異なる面があることが分かる。

冬虫夏草という産物がある。冬は虫になり、夏は草となる。(中略)夏になると虫は頭を地面の下に入れ、尾は自然に草のようになり、錯綜した蔓草の間に入り混じるので、それが虫となっていることがわからない。冬になり草が枯れて黄色になると、やっと地面に出て、身をくねらせ動く(原文は『本草綱目拾遺』からの引用、読み下し文は奥村が作成) (奥沢, 2012, p. 239)。

これを見ると、「冬虫夏草」という名前の通り、一つの生物が季節によって姿を変えて現れると考えられており、冬虫夏草が一種の伝説としての扱いも受けていたことが分かる。

日本における冬虫夏草の利用は江戸時代中期にまで遡ってその記載がある書物が見受

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

けられる(奥沢, 2012, pp. 70-80)。これは、中国の清において冬虫夏草についての記載のある書物が増加してきた時期と一致しており、その薬効を期待されて輸入品として一部の人々に利用されたと考えられる。多紀元簡(1755-1810)の『医賸附録』(1809)には、『柳崖外編』、『西域見聞録』、『本草従新』などから冬虫夏草についての記述が参照されており、その後の日本国内の文献の冬虫夏草の記載に多大の影響を与えている(奥沢, 2012, p. 79)。

シネンシストウチュウカソウの薬効は伝承として語られているのみならず、実際に様々な薬効が存在することが、先行研究において明らかにされている。一例として、抗炎症作用や増殖する腫瘍細胞の活性化を抑える作用が存在する(Rao et al., 2007)。このような作用はシネンシストウチュウカソウを摂取することで、異常のある細胞を自然の生理作用の過程で排除するアポトーシス効果が強化されることで引き起こされる。薬効の存在は、細胞レベルでの作用の観察及びマウスや成人を対象として行われた多くの研究によって確認されている(Buenz et al., 2005)。加えて、アナモルフの段階(*Hirsutella sinensis* X.J. Liu, Y.L. Guo, Y.X. Yu & W. Zeng)については、複数個体の遺伝子を詳細に調べることによって、薬理学的効果を生み出す複数の酵素の生成に関わる遺伝子領域が発見されている(Liu et al., 2015)。しかし、薬効を得るための適切な摂取量は明確にはされていない。

シネンシストウチュウカソウに限らず、広義の冬虫夏草についても薬効があることが示唆されている。冬虫夏草類の薬効に関する従来の研究の多くは、シネンシストウチュウカソウ、サナギタケ(*Cordyceps militaris* (L.) Fr.)を中心に行われてきた。一方で、ツクツクボウシタケなどについても薬効の存在が示唆されており、抗腫瘍作用や腎保護作用、免疫調整作用の存在が示されている(Olatunjia et al., 2018)。冬虫夏草は宿主を酵素によって分解する過程で、生理活性作用を持つ化合物を生成する場合がある。このような成分は副作用を伴うことが少なく比較的安全であるため、創薬のための新たな資源として注目される(Olatunjia et al., 2018)。既存の研究がなされている種に限らず生理化学的アプローチを複数の種について取ることで、人体への作用のメカニズムの解明や薬効の存在する種の同定など今後の研究成果が待たれる。

### 1.2.2. シネンシストウチュウカソウの入手可能性

シネンシストウチュウカソウは、コウモリガ類、*Thitarodes* 属の幼虫を宿主とする地生型の冬虫夏草である。特に第四齢から第五齢の幼虫に感染するとされるため、自然感染には2年ほどかかると推測される(日本冬虫夏草の会, 2014, p.17)。本菌は子囊菌門、ボタノタケ目、オフィオコルジケプス属に属し、主に中国やネパールなどの高山帯に発生する。具体的には、6,000 m から 8,000 m 級の山々が無数に連立するヒマラヤ山脈(西側のナンガパルバットから東側のナムチャバルワにいたる約 2,400 km の地域)や、周辺山脈の標高約 3,000 m から 5,500 m 級の中国チベット自治区、雲南省、四川省、青海省およびネパールなどの近隣諸国で観察される(同, p. 16)。したがって、地理的に限られた地域にしか存在しないのにも関わらず、人間が長時間の作業を行うのに適さない高山帯であるため、入手するためには地理的、環境的な制約が存在する。このような高山帯に発生するのは、高度な自然淘汰の結果と考えられる。シネンシストウチュウカソウに光、温度変化、物理的刺激などの 10 の刺激を与えて経過観察を行った研究では、低温によるストレスが最も分生子の増殖に影響を与えたことが明らかにされている(Ren and Yao, 2013)。シネンシストウチュウカソウのゲノム解析を行った研究では、タンパク質生成による遺伝子の複雑化に関わる配列が縮小されている一方で、低温環境下への適応に関わる遺伝子や病原性に関わる遺伝子が増幅されていることが明らかにされた。(Xia et al.,2017)。

シネンシストウチュウカソウは地面から直接生える地生型の冬虫夏草であり、子実体の部分は 2~10 cm 程度の柱状で、褐色から暗褐色である(同, p.14)。そのため、目視で確認する場合、周囲の土や草と間違えることが多く、発見することは困難である。図 2 の C,D,E はネパールで採取されたシネンシストウチュウカソウの実際の写真であるが、地表部分が 6 cm 程度で、残り半分の宿主部分が地中に埋没している。このように、宿主の部分が地中に埋没しているため、採取の際には破損しないように注意する必要がある。そのため、採取には機械を用いることが困難であり、人の手を用いる必要があるなどの物理的な制約が存在する。上記の限定された厳しい環境を生息地としている点や生息地における発見・採

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

取が困難である点は流通量を硬直的するような影響を及ぼすと考えられる。実際、Cunningham and Long (2019)によると、2002年から2017年にかけてのシネンシストウチュウカソウの価格推移には希少性及び気候が大きな要素として関わっているとされる(図3)。

一方で、天然のシネンシストウチュウカソウの入手困難性から、菌糸を利用して培養した人工栽培の可能性について研究が行われている。その一つとして、人工的に用意された低温の実験環境下において、シネンシストウチュウカソウの宿主となるコウモリガ類である *Thitarodes jianchuanensis* (Yang, 1994)及び *T. armoricanus* (Oberthür, 1909)の幼虫の飼育を行った例が存在する(Tao et al., 2016)。また、人工栽培されたシネンシストウチュウカソウについては、天然の標本との化学組成比較が行われており、アデノシンなどの成分については同様であることが示されている。(Zhang, 2018)。人工栽培されたものの薬効については抗酸化作用や糖尿病の予防の効果が示唆されている(Wang et al., 2015/Wang et al, 2018)。現時点では、子実体については人工栽培が成功した例は報告されておらず、アナモルフについてのみ人工栽培に成功しているが、人工栽培品の薬効は天然品に比べると劣る(大賀, 2015)。人工栽培手法についての研究が進むことで、野生のシネンシストウチュウカソウの生態や薬効成分の特定及びその生成過程に関する研究にも寄与することが期待される。一方で、現時点では、人工栽培品より天然品の方が薬効成分の含有量から薬学的な価値が高く、天然品の方が流通量の少なさから経済的な価値も高い。したがって、野生の個体の品質管理や市場価格形成の観点からは、より詳細な個体識別手法の確立が必要とされることとなる。



A：収穫された後まとめられているシネンシストウチュウカソウ  
B：本研究で試料の1つとして用いたシネンシストウチュウカソウ(KPR003)  
C：ナムナ(ブータン北西部)で自生しているシネンシストウチュウカソウ  
D：ナムナで自生していたシネンシストウチュウカソウの地表を掘り起こした様子  
E：ブータンにおいて売られる前のシネンシストウチュウカソウ  
(C,D,Eの写真はCannon(2009)より引用。)

図 2 シネンシストウチュウカソウ(*O. sinensis*)の子実体

### 1.2.3. 取引市場と規制

天然のシネンシストウチュウカソウはその薬効と希少価値の大きさから、中国を中心に大きな市場を形成している。各地域で採取されたものについて共通の取引市場が存在するわけではないので、正確な数字は必ずしも明らかではないが、2009年の時点で年間の生産量は85tから180tだと推測されている(Winkler, 2009)。同時点で、取引価格は平均的な質の商品では60,000ドル/kg、最高級品質の商品では160,000ドル/kgとなっており、市場規模は少なくとも18億円程度であった(同)。図3は2002年から2017年にかけての様々な品質のシネンシストウチュウカソウの価格変動の様子を表したグラフであるが、これを見ると、長期的には価格が上昇する傾向にあるが、マクロ的な経済動向や気候などの影響を受けて価格が頻繁に上下していることが分かる(Cunningham and Long, 2019)。

価格が上昇する一方で、生産量が限定されているシネンシストウチュウカソウは金のような投資目的の商品としての性質を帯びている。よって、価格上昇を期待した購買行動の増加により急激に需要量が増大し、資源の供給が追いつかなくなるおそれがある。そのため、持続的な供給量を維持するために、採取について一定の制限を設けるなどの対策の必要性が示唆されている(Shrestha and Bawa, 2013)。また、気候の変動という観点からも生産量の減少が懸念されている。気候の変動によりシネンシストウチュウカソウの宿主であるコウモリガの生息域が狭くなることで、生息数が減少するため、個々の地域における生息状況を把握し、自然保護区を設けるなどの対策の必要性も示唆されている(Yan et al., 2017)。対策の必要性については、個人当たりの採取量の減少からも明らかである。採取については、該当地域の住民の人の手を中心に行われており、規制については、彼らの家計をどのように支援するのか、中国やネパールを中心としたグローバルサプライチェーン全体の協力体制をどのように築くのかなどが問題となる(Pouliot et al., 2018)。ネパールでは、既に自然保護区の設置や取引に関する具体的な指針の提示が行われており、オークション形式の販売取引を導入したことにより、地域経済では取引から一定の所得が得られる状態が維持されている(Cannon et al., 2009)。今後は国際的な協定としてこのような取り組みを拡大

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

する必要があり、近年の取引市場についての研究はこれを支えるものである。

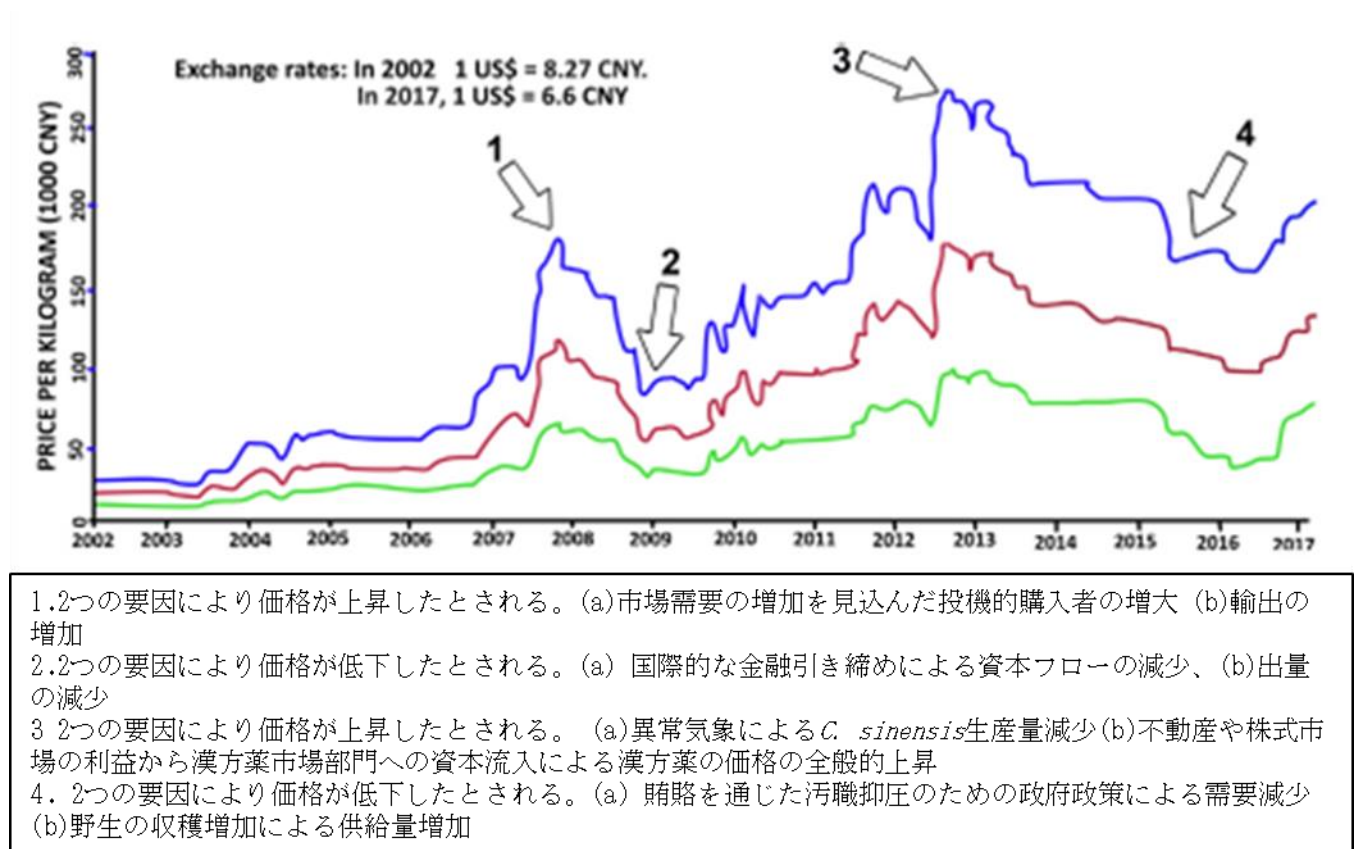


図 3 2002 年から 2017 年の *O. sinensis* の価格変動の要因(Cunningham and Long, 2019 を  
改変)

### 1.3. 試料の個体識別及び産地識別の方法について

#### 1.3.1. 分子系統解析

分析方法のうち、最も用いられている方法は、対象の遺伝情報を用いる系統解析の手法である。この方法は、個体の塩基配列の情報を比較する手法であるため、個体識別及び産地識別に用いられるだけでなく、形態的特徴が類似する菌類の分類を行う観点からも広く利用されている。Sung et al.(2007)は、7つの遺伝子領域を解析し、最節約法と最尤法およびベイズ法の 3 つの方法で系統樹を作成した上で、それらを照らし合わせることで冬

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

虫夏草類の属の分類及びより詳細な種間の位置づけについて概観した。この結果は Johnson et al.(2009)により、改訂され、現代の冬虫夏草類の分類体系の基礎をなしている。

系統解析は、膨大な遺伝子領域のうちの一部を取り出し、PCR による増幅などで行う。取り出す遺伝子領域は解析の目的に合わせて、種ごとの変異のしやすさなどを考慮して決定されるが、冬虫夏草類の研究においては菌類のバーコーディング領域である内部転写領域(ITS)が多くの場合で用いられる(Schoch et al, 2012)。解析した結果は、アライメントの後に、最小二乗法、近隣接合法、最節約法、最尤法、ベイズ法などの方法によって系統樹の作成を行い、評価する。ITS 領域を活用した解析の手順は Liu et al.(2017)により研究されており、PCR のために有用なプライマーが示されている。一方で、ITS 領域のみでは、異種間での変異を適切に識別できず、種の同定に至らない場合があるなどの問題点も存在する(Xu, 2016)。そのため、同一標本の複数の領域をサンプリングし解析を行うことで、より精度の高い個体識別及び系統学的分類を行うことが行われている。Wen et al. (2016)は、ITS、nrSSU、EF-1 $\alpha$ 、RPB1 の 4 つの遺伝子マーカーを用いることの有効性を主張し、特に ITS 領域のみを用いる場合よりも種内及び種間の変異をより適切に識別することが可能であることを示した。

分子系統解析の手法は、異なる産地間の遺伝子変異を観察することで、高い精度で対象の地理的来歴を明らかにする系統地理解析としても用いられている。シネンシストウチュウカソウについて ITS 領域を用いて系統地理解析を行った研究では、高度などの地理的特性が異なる場合においては、同一種の種内における差異を判別することが可能な場合があることを示唆している(Chen et al., 2004)。

### 1.3.2. クロマトグラフィー・同位体比分析

分析方法の内、物質の構成要素を化学的に分析する手法として、クロマトグラフィーや同位体比分析が存在する。これらの手法は、遺伝的には大きな差異が見られない個体間においても比較を行うことが可能である点が優れている。クロマトグラフィーによる分析

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

手法には一般的にガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、超臨界流体クロマトグラフィーが存在するが、シネンシストウチュウカソウの分析においては、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)を用いた研究が多く存在する。HPLCを用いることで、異なる種間や人工的に栽培された個体と天然の個体の識別をすることが可能である(Cheng et al., 2017)。また、他の手法と併せることによって、個体内の品質管理にも有用であることが示唆されている(Chen et al., 2018)。日本においても、「機能性表示食品」制度が設けられたことから、成分分析の手法としてクロマトグラフィーを用いた方法が注目されており、薬効成分の1つであるヌクレオシド類のアデノシン及びイノシンを用いた定量分析により、シネンシストウチュウカソウの人工栽培品および天然品の識別、その他の *Cordyceps* 属の冬虫夏草類の識別が可能であることが示唆されている(和田ほか, 2016)。

同位体比分析とは、陽子数が同じで中性子の数が異なる同位体の存在比を分析することで、標本の時間経過の程度や地理的来歴などの標本の特性を把握する手法である。先述のクロマトグラフィーと同じく、物質の構成要素を化学変化によって分離することで行うが、分析の過程で同位体をイオン化する点異なる。同位体比分析には、放射性同位体と安定同位体を用いる手法が存在するが、本研究プロジェクトにおける共同研究では、安定同位体比解析を用いて解析を行った。シネンシストウチュウカソウについて安定同位体比解析を用いた例としては、炭素を用いたものが存在する。Guo et al.(2017a)では、シネンシストウチュウカソウの同一個体の宿主及び子実体の部分を細かく分割した上での炭素同位体比分析が行われ、宿主から子実体への栄養段階の移行が表れていることを示唆した。Guo et al.(2017b)では、異なる産地の野生の標本に炭素同位体比分析を行うことによって、シネンシストウチュウカソウにおいても同位体の存在比に地域差が見られることを示すと共に、体内における化合物生成の過程で同位体比が変化していることが示唆された。

### 1.3.3. その他の方法

上記で説明した方法の他には、シネンシストウチュウカソウの個体識別の方法は、光や

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

電波を利用した方法などが存在する。この方法では、様々な光を当てて形状や強度、透過度などの素材に固有のパターンを反映する程度の比較を行うことで検査を行う。Yang et al.(2009)は、FT-IR(フーリエ変換赤外分光法)及び 2D-IR(二次元相関赤外分光法)により、異なる産地間の標本の比較を行い、品質判定や偽造判定に有効である可能性を示唆した。

### 1.4. 本研究の目的

本研究の目的は、共同研究において位置付けられるものと、本研究に個別に位置付けられるものの大きく2つが存在する。共同研究の前提として、シネンシストウチュウカソウの偽造問題が挙げられる。シネンシストウチュウカソウは薬効の高さから需要量が多い一方で、野生の発生量が少ないため、偽造を行うための動機付けが存在する。偽造の方法は大きく2種類が存在し、シネンシストウチュウカソウの子実体に異物を混入させ、重量の水増しを行う方法およびシネンシストウチュウカソウとは異なる冬虫夏草類を加工した模造品を用いる方法が存在する。前者の方法については X 線を用いた検査により偽造を明らかにすることが出来るが、後者の方法の偽造に対しては、明確な解決策は示されていない(Wen, 2016)。また近年、食品衛生管理の観点から、菌類においても流通する製品に対して産地の明記を求めるトレーサビリティの視点を求める動きが強くなっている(El Sheikha and Hu, 2018)。そのため、天然由来のシネンシストウチュウカソウについて産地識別の手法を確立することで、薬としての品質管理及びトレーサビリティを強固にすると共に、薬効の存在しない偽造製品の流通を排除することが可能となる。共同研究においては、従来シネンシストウチュウカソウを対象に用いられてきた系統解析の手法の他に、安定同位体比分析及び次世代シーケンサーによる Mig-seq 解析を用いることにより、シネンシストウチュウカソウの産地識別方法の確立のための予察を行うことが目的となる。共同研究における本研究の位置づけは、実験に用いる標本の系統学的位置づけを明らかにすることにある。冬虫夏草類の種の同定は形態的特徴のみから判断することが容易ではな

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

い。研究で用いる標本の真正性は共同研究全体の実験結果及び研究成果全体を左右する重要な問題である。そのため、系統解析を行うことによって、共同研究において用いる標本の個体識別の基礎を提供することが本研究の主要な目的である。

次に、本研究の個別の目的はシネンシストウチュウカソウの真正性の評価を行うことにある。漢方薬としての重要性から、シネンシストウチュウカソウについては多くの研究が行われているが、研究のための標本自体も入手困難である。実際に、先行研究で用いられている標本のうち、人工栽培したものや入手元が不確かなものを野生の入手元が確かな標本と同様に扱っている場合が数多く存在することが示されている (Dong and Yao, 2011)。本研究においては、新たに入手したシネンシストウチュウカソウを含む冬虫夏草類の標本 51 点の他に **GenBank** から入手した塩基配列データ 124 点を用いて、解析を行いその系統学的位置づけを明らかにすることで、過去に先行研究で用いられたデータの真正性についての評価を行う。

## 2. 材料及び方法

### 2.1. 材料

2018年10月から2020年8月にかけて、日本国内では宮城県、埼玉県、茨城県、千葉県を中心に、日本国外では中国のチベット及び青海より合計51点の標本の収集を行った。新たに入手したシネンシストウチュウカソウの標本は、中国の現地協力者に依頼して取得したが、入手経路が標本により異なるため、産地の信頼度について差が生じている。KPR003は、2018年10月にチベット大学薬学部保存されていたチベット産の標本を、西安交通大学の王嗣荅教授・周小靖教授から、慶應義塾大学自然科学研究教育センターの伊永隆史訪問教授経由で取得したものであり、産地の信頼性が高い。KPR004はKPR003と同時に同様の経路で取得したが、チベット産を称する市販のものであるため、産地の信頼度はKPR003に劣る。KPR005は2019年3月に別途、伊永訪問教授経由で取得したものであるが、チベット産を称する市販のものであるため、産地の信頼度はやはりKPR003に劣る。KPR006及びKPR007はKPR005と同時に取得した青海省産の標本であり、産地の信頼性が高い。採集した子実体は、プラスチック製容器に入れてシリカゲルで包埋した後、冷蔵庫(4 °C)で自然乾燥させて乾燥標本を作製し、紙製の標本袋に入れて保存した。入手した子実体及び宿主部分について、Hosaka and Castellano (2008)、Kasuya et al. (2012)の方法に従い、子実体及び、宿主内部の菌糸の一部を切り取り、ジメチルスルホキシド(DMSO)バッファー<sup>2</sup>中に浸漬し、4 °Cで保存した。日本で収集した冬虫夏草類については、形態観察の結果からハナサナギタケ(*Isaria japonica* Yasuda)、ツクツクボウシタケ(*Isaria cicadae*)、カメムシタケ(*Ophiocordyceps nutans*)と推定されるものを中心とした。宿主は様々である。入手した標本は、解析の前に形態的観察を行い、宿主及び種名に関する情報

---

<sup>2</sup> DMSO バッファーは 100 mM Tris-HCl(pH 8.0)および 0.1 M 亜硫酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)を添加して作成した(Seutin et al. 1991)。

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

の推定を行った。表 1 は、収集した標本の入手地域と宿主をまとめたものである。標本を収集した段階で、形態的観察を行い、宿主又は形態的特徴から推定される種名について記載した。以上の標本について、DNA 抽出、遺伝子領域(核リボソーム DNA 遺伝子の内部転写スペーサー領域(ITS 領域)および核リボソーム DNA 遺伝子の小サブユニット(LSU))の増幅、シーケンシングを行った。

系統樹の作成については、本研究により新たに得られた塩基配列のうち、シネンシストウチュウカソウの標本について、正常に増幅及びシーケンシングが行われた LSU の塩基配列データのみを用いて行った。系統解析は、今回新たに入手した標本 51 点の他、GenBank<sup>3</sup>から入手したデータ標本 124 点を加え、合計 175 点で解析を行った。GenBank から入手したデータは、新たに入手した標本について形態的特徴を踏まえた上で分類上近縁種と考えられる種を含むよう、Sung et al. (2007)で用いられたデータを参考に LSU 領域を含む塩基配列を集めてデータセットを作成した。表 2 は、GenBank から収集した塩基配列の登録番号及び登録されている種名の対応を示したものである。

---

3 GenBank とは、NCBI(米国生物工学情報センター)が提供する塩基配列データベースである。データ登録の申請は世界中の研究機関が自由に行うことが出来るため、登録されている塩基配列データが必ず表示されている種のものであるとは限らない。

系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

表 1 本研究で採取した標本の種及び入手地域

標本番号	宿主又は種名に関する情報	入手地域
KPR003	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	中国チベット自治区
KPR004	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	中国チベット自治区
KPR005	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	中国チベット自治区
KPR006	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	中国青海省
KPR007	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	中国青海省
KPR014	<b>アリ生</b>	千葉県鴨川市清澄
KPR018	<i>Isaria japonica</i>	千葉県鴨川市天津
KPR019	<i>Ophiocordyceps satoi</i>	千葉県鴨川市天津
KPR021	<i>Metarhizium owariense</i> f. <i>viridescens</i>	千葉県鴨川市天津
KPR023	<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	千葉県鴨川市天津
KPR024	<b>カンピレームシタケ</b> ( <i>Metarhizium</i> sp.)	千葉県鴨川市天津
KPR029	<i>Isaria japonica</i>	千葉県銚子市高神西町
KPR031	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県鴨川市天津
KPR034	<i>Ophiocordyceps nutans</i>	栃木県宇都宮市
KPR035	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県君津市折木沢橋ノ木台
KPR036	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県鴨川市天津
KPR038	<b>アリ生</b>	千葉県鴨川市天津
KPR041	<i>Akanthomyces novoguineensis</i>	北海道北見市富里
KPR042	<i>Ophiocordyceps yakusimensis</i>	千葉県鴨川市天津
KPR044	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県銚子市高神西町
KPR046	<i>Isaria cicadae</i>	埼玉県久喜市菖蒲町上栢間
KPR048	<i>Cordyceps militaris</i>	宮城県大崎市鳴子
KPR049	<i>Isaria japonica</i>	宮城県仙台市青葉区青葉の森
KPR050	<i>Isaria japonica</i>	宮城県大崎市鳴子
KPR051	<i>Isaria cicadae</i>	東北大学北青葉山キャンパス
KPR052	<i>Ophiocordyceps nutans</i>	宮城県大崎市鳴子
KPR053	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県鴨川市天津
KPR055	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県鴨川市清澄高天神
KPR056	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県鴨川市天津
KPR062	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県銚子市高神西町
KPR063	<b>アリ生</b>	千葉県君津市折木沢橋ノ木台
KPR064	<i>Cordyceps sinclairii</i>	千葉県鴨川市四方木亀ノ沢
KPR065	<i>Cordyceps sinclairii</i>	千葉県鴨川市四方木亀ノ沢
B1736	<i>Purpureocillium atypicola</i>	千葉県佐倉市城内町
B1745	<i>Purpureocillium atypicola</i>	茨城県つくば市筑波
B1811	<i>Purpureocillium atypicola</i>	千葉県佐倉市城内町
B1812	<i>Purpureocillium atypicola</i>	千葉県佐倉市城内町
B1813	<i>Purpureocillium atypicola</i>	千葉県佐倉市城内町
B2057	<i>Isaria cicadae</i>	千葉県佐倉市城内町
B2227	<i>Cordyceps militaris</i>	千葉県佐倉市飯野
B2558	<i>Purpureocillium atypicola</i>	千葉県佐倉市飯野
B2559	<i>Purpureocillium atypicola</i>	千葉県佐倉市城内町
B2560	<i>Purpureocillium atypicola</i>	茨城県つくば市筑波
B2561	<i>Purpureocillium atypicola</i>	千葉県佐倉市飯野
B2562	<i>Purpureocillium atypicola</i>	千葉県佐倉市城内町
B2563	<i>Purpureocillium atypicola</i>	茨城県つくば市筑波
B2696	<i>Ophiocordyceps nutans</i>	東京都西多摩郡奥多摩町川野
B3576	<i>Isaria fumosorosea</i>	千葉県香取郡東庄町小南
B3681	<i>Ophiocordyceps tuberculata</i>	茨城県久慈郡大子町栃原
B3682	<i>Ophiocordyceps tuberculata</i>	茨城県久慈郡大子町栃原
B3688	<i>Ophiocordyceps tuberculata</i>	茨城県常陸大宮市盛金

系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

表 2 GenBank から取得した塩基配列データ情報

登録番号	種名	登録番号	種名	登録番号	種名
GQ249974	<i>Akanthomyces novoguineensis</i>	KR494278	<i>Isaria fumosorosea</i>	EF468827	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>
MF416521	<i>Akanthomyces tuberculatus</i>	KU933411	<i>Isaria sinclairii</i>	MF40303	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>
MF416546	<i>Akanthomyces tuberculatus</i>	MH141403	<i>Isaria tenuipes</i>	MH753680	<i>Ophiocordyceps</i> sp.
AF339520	<i>Beauveria caledonica</i>	MH141361	<i>Isaria tenuipes</i>	MH753679	<i>Ophiocordyceps</i> sp.
JN941397	<i>Codyceps tuberculata</i>	KM283781	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	MH668080	<i>Ophiocordyceps sphaerocephala</i>
DQ518754	<i>Cordyceps agriota</i>	KM283780	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	JN941449	<i>Ophiocordyceps stylophora</i>
KJ130981	<i>Cordyceps cardinalis</i>	KM283779	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	JN941448	<i>Ophiocordyceps stylophora</i>
FJ765252	<i>Cordyceps cf takaomontana</i>	AF339565	<i>Lecanicillium attenuatum</i>	KX713626	<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>
EF468838	<i>Cordyceps cf takaomontana</i>	MH871316	<i>Lecanicillium fusisporum</i>	DQ239888	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
MH879599	<i>Cordyceps cylindrica</i>	MH877977	<i>Lecanicillium fusisporum</i>	HQ232163	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
MH879597	<i>Cordyceps cylindrica</i>	EF468815	<i>Metacordyceps liangshanensis</i>	AB363751	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
KJ878880	<i>Cordyceps cylindrica</i>	EF468814	<i>Metacordyceps liangshanensis</i>	AY213717	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
KJ878872	<i>Cordyceps cylindrica</i>	HQ165721	<i>Metacordyceps owariensis</i>	MH753681	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
EF468841	<i>Cordyceps cylindrica</i>	HQ165722	<i>Metacordyceps owariensis</i>	EF468847	<i>Phytocordyceps ninchukispora</i>
KJ878879	<i>Cordyceps cylindrica</i>	HQ165730	<i>Metacordyceps owariensis</i>	EF468846	<i>Phytocordyceps ninchukispora</i>
AF327377	<i>Cordyceps cylindrica</i>	GU979949	<i>Metacordyceps taii</i>	AB709833	<i>Pochonia rubescens</i>
AF327382	<i>Cordyceps cylindrica</i>	MH872319	<i>Metapochonia goniodes</i>	AB709832	<i>Pochonia rubescens</i>
HM140633	<i>Cordyceps gunni</i>	AF339550	<i>Metapochonia goniodes</i>	MH900178	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
AY465959	<i>Cordyceps kyushuensis</i>	MH873830	<i>Metapochonia rubescens</i>	LC158641	<i>Simplicillium obclavatum</i>
HM140635	<i>Cordyceps militaris</i>	MW049194	<i>Metapochonia rubescens</i>	NG042398	<i>Torubeliella wallacei</i>
MF416531	<i>Cordyceps nelumboides</i>	HQ165718	<i>Metarhizium cylindrosporae</i>	JN941451	<i>Hypocrea lutea</i>
AF339524	<i>Cordyceps scarabaeicola</i>	HQ165717	<i>Metarhizium cylindrosporae</i>	JN941451	<i>Hypocrea lutea</i>
AB067708	<i>Cordyceps sinensis</i>	MH873892	<i>Metarhizium cylindrosporae</i>	U00756	<i>Sphaerostilbella berkeleyana</i>
EF468833	<i>Cordyceps sp</i>	MH878000	<i>Metarhizium marquandii</i>	MH87031	<i>Sphaerostilbella berkeleyana</i>
KC610749	<i>Cordyceps tuberculata</i>	MH876751	<i>Metarhizium marquandii</i>		
DQ518767	<i>Cordyceps tuberculata</i>	AB047212	<i>Nomuraea atypicola</i>		
JN941399	<i>Cordyceps tuberculata</i>	HQ165731	<i>Nomuraea rileyi</i>		
JN941400	<i>Cordyceps tuberculata</i>	AB968419	<i>Ophiocordyceps coccidiicola</i>		
JN941398	<i>Cordyceps tuberculata</i>	EF468809	<i>Ophiocordyceps entomorrhiza</i>		
GQ249984	<i>Cordyceps tuberculata</i>	MH697674	<i>Ophiocordyceps gracilis</i>		
GQ249987	<i>Cordyceps tuberculata</i>	MH697673	<i>Ophiocordyceps gracilis</i>		
GQ249985	<i>Cordyceps tuberculata</i>	MH697672	<i>Ophiocordyceps gracilis</i>		
GQ249986	<i>Cordyceps tuberculata</i>	AY489722	<i>Ophiocordyceps heteropoda</i>		
JN941404	<i>Elaphocordyceps capitata</i>	MT235759	<i>Ophiocordyceps irangiensis</i>		
JN941403	<i>Elaphocordyceps capitata</i>	MT235760	<i>Ophiocordyceps irangiensis</i>		
KR857692	<i>Haptocillium balanoides</i>	KJ917567	<i>Ophiocordyceps nutans</i>		
AF339546	<i>Haptocillium sinense</i>	MH753674	<i>Ophiocordyceps rhizoidea</i>		
AF339545	<i>Haptocillium sinense</i>	MH753673	<i>Ophiocordyceps rhizoidea</i>		
MN913553	<i>Isaria cicadae</i>	EF468826	<i>Ophiocordyceps robertsii</i>		
MN576816	<i>Isaria cicadae</i>	AB067709	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
MF416554	<i>Isaria farinosa</i>	AB067710	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
AF172340	<i>Isaria farinosa</i>	KC242639	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
MF416553	<i>Isaria farinosa</i>	HM595904	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
KC242635	<i>Isaria farinosa</i>	HM595900	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
KP743163	<i>Isaria farinosa</i>	MK984580	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
KP743161	<i>Isaria farinosa</i>	KU239985	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
JF415979	<i>Isaria farinosa</i>	AB067704	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
DQ518773	<i>Isaria farinosa</i>	AB06771	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
EF469080	<i>Isaria farinosa</i>	HM595903	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
KP743162	<i>Isaria farinosa</i>	AB067705	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
AF172341	<i>Isaria farinosa</i>	AB067707	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		
AF172342	<i>Isaria farinosa</i>	AB067712	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>		

外群

## 2.2. 方法

### 2.2.1. DNA 抽出<sup>4</sup>

1. DMSO バッファーに浸漬して保存していた直径 1 mm 程度の粒状の試料を乳鉢に取り出す。
2. 乳鉢に液体窒素を加え、搗り潰して細胞壁を破壊する。
3. 細胞の組織の色が薄くなるまで 2. を繰り返す。
4. 乳鉢に CTAB<sup>5</sup>溶液を 1.5 ml 加えシャーベット状になるまで混ぜる。
5. シャーベット状になった混合物を新しいチューブに 1.5 ml 入れる。
6. 作成したチューブを -30 °C で冷凍保存する。
7. 12,000 rpm で 5 分、遠心分離を行う。
8. 上澄み溶液を 700  $\mu$ l 取り出し、クロロホルム・イソアミルアルコール(CIA)を 700  $\mu$ l 加える。
9. 混合した溶液を転倒混和する。
10. 12,000 rpm で 15 分、遠心分離を行う。
11. 上澄み 350  $\mu$ l を新しいチューブに入れる。
12. ⑪で作成した溶液に 6 M ヨウ化ナトリウム(NaI)(pH 6.8)<sup>6</sup>を 1ml 加える。
13. グラスミルク<sup>7</sup>を 25  $\mu$ l 加える。
14. 5 分ごとに攪拌を行いながら、45 分間室温でインキュベートする。
15. 12,000 rpm で 5 秒間遠心分離を行った後、上澄み部分を除去する。

---

<sup>4</sup> 以下の実験手順は Hosaka (2009)、Hosaka and Castellano (2008)、Kasuya et al. (2012)を参考にした改良 CTAB 抽出法で行われた。

<sup>5</sup> 2% CTAB(臭化セトリモニウム)に 100 mM Tris(pH 8)、20 mM EDTA、1.4 M NaCl を添加して作成する。

<sup>6</sup> 50mM Tris (pH 7.4)に 10mM EDTA、6M NaI、0.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O を添加して作成する。

<sup>7</sup> silica(Sigma S-5631)500 mg に H<sub>2</sub>O 1000  $\mu$ l を添加し、上澄み 500  $\mu$ l を除去する。その後、500  $\mu$ l の純水を添加し、沈殿物が 500  $\mu$ l 程度になるまで、上澄みを排除する工程を繰り返す。

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

16. New Wash<sup>8</sup>を 500  $\mu$ l 加え、攪拌する。
17. 12,000 rpm で 5 秒間遠心分離を行った後、上澄み部分を除去する。
18. 16. ~17. の工程をもう一度繰り返す。
19. 55 °C で 5 分間放置し、乾燥させる。
20. TE<sup>9</sup>を 120  $\mu$ l 乾燥させたチューブに加えた後、攪拌する。
21. 常温で 10 分間放置する。
22. 12,000 rpm で 1 分間遠心分離を行う。
23. 新しいチューブに上澄み 120  $\mu$ l を移す。
24. -30 °C でチューブを保存する。

### 2.2.2. 遺伝子領域の増幅

1. 新しいチューブに浮動用溶液(ITS・LSU プライマー溶液)<sup>10</sup>をそれぞれ 9  $\mu$ l 取り出す。
2. 2.1.1 で保存した DNA を ITS・LSU の各浮動用溶液に 1  $\mu$ l ずつ加える。
3. 卓上遠心機で攪拌した後、PCR 機(Applied Biosystems™ VeritiPro™ Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, 東京)に設置。
4. PCR 機で ITS 領域および LSU 領域を増幅する。

増幅は以下のプログラムで行われた。

- ① 前処理、94° C 3 分を 1 サイクル
- ② 熱変性、94° C 35 秒、アニーリング、51° C 30 秒、伸長、72° C 1 分を 35 サ

---

<sup>8</sup> 10mM Tris (pH 7.4)に 1 mM EDTA、100 mM NaCl、50% EtOH、H<sub>2</sub>O を添加して作成する。

<sup>9</sup> 10 mM Tris に 1 mM EDTA、H<sub>2</sub>O を添加して作成する

<sup>10</sup> 当溶液は、Emetag5  $\mu$ l、水(H<sub>2</sub>O)3.5  $\mu$ l、プライマー①0.25  $\mu$ l、プライマー②0.25  $\mu$ l の混合液である。

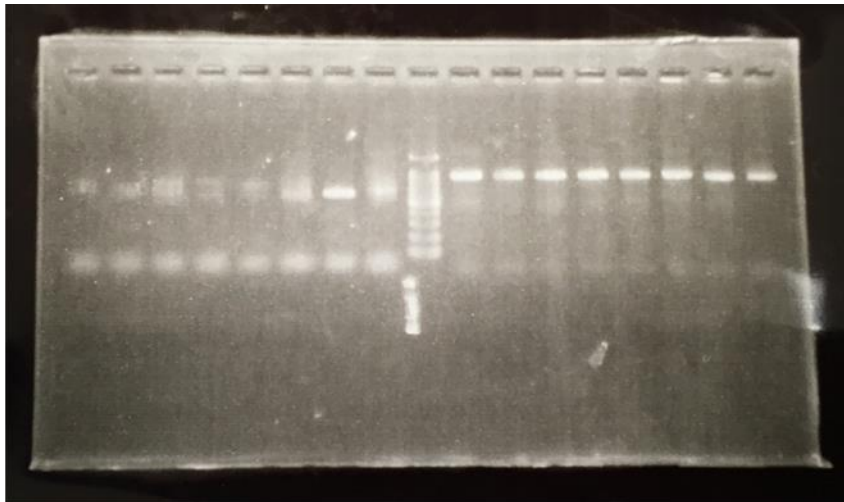
<sup>11</sup> ITS 領域のプライマーは ITS1F(CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA)/ITS4(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)の 2 種類、LSU 領域のプライマーは LR0R(ACC CGC TGA ACT TAA GC)/LR5(ATC CTG AGG GAA ACT TC)の 2 種類である(Gardes and Bruns, 1993)/Vilgalys and Hester, 1990)。

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

イクル

③ 後処理, 72° C 10 分を 1 サイクル。

5. PCR 産物を 1%アガロースゲル<sup>12</sup>で電気泳動する。
6. エチジウムブロマイド(EtBr)により染色し、紫外線照射により可視化させた(図 4)。これにより遺伝子の増幅を確認した。



左からサンプル番号KPR003, KPR004, KPR005, KPR006, KPR007, KPR014, KPR018, KPR019, KPR021、左8つがITS領域、右8つがLSU領域

図 4 紫外線により可視化した電気泳動結果の一部

### 2.2.3. シークエンシング

1. ExoSAP-IT™(Thermo Fisher Scientific, 東京)を用いて定法により前処理を行う。
2. オートサイクル
  - ① 前処理、96 °C 1 分を 1 サイクル
  - ② 熱変性、96 °C 10 秒、アニーリング、50 °C 5 秒、伸長、60 °C 4 分を 25 サイクル

<sup>12</sup> アガロースゲルは、TAE100 ml に対し、アガロース 1.5 g を溶解させ作成した。

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

- 3 M 酢酸ナトリウム(NaOAc)を 0.15  $\mu$ l、100% エタノール(EtOH)を 12.5  $\mu$ lを加える。
- 4,000 rpm で 15 分間遠心分離を行う。
- 上澄みを除去した後、再度 4,000 rpm で 15 分間遠心分離を行う。
- 70% EtOH を 35  $\mu$ l 加える。
- 4,000 rpm で 5 分間遠心分離を行う。
- 52  $^{\circ}$ C で 2 分間乾燥させる。
- HiDi を 10  $\mu$ l 加える。
- 95  $^{\circ}$ C で 2 分間の加熱を行う。
- 氷で 3 分間冷やす。
- シーケンサー (Applied Biosystems<sup>®</sup> 3500xL Genetic Analyzers, Thermo Fisher Scientific, 東京)によりダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定する。

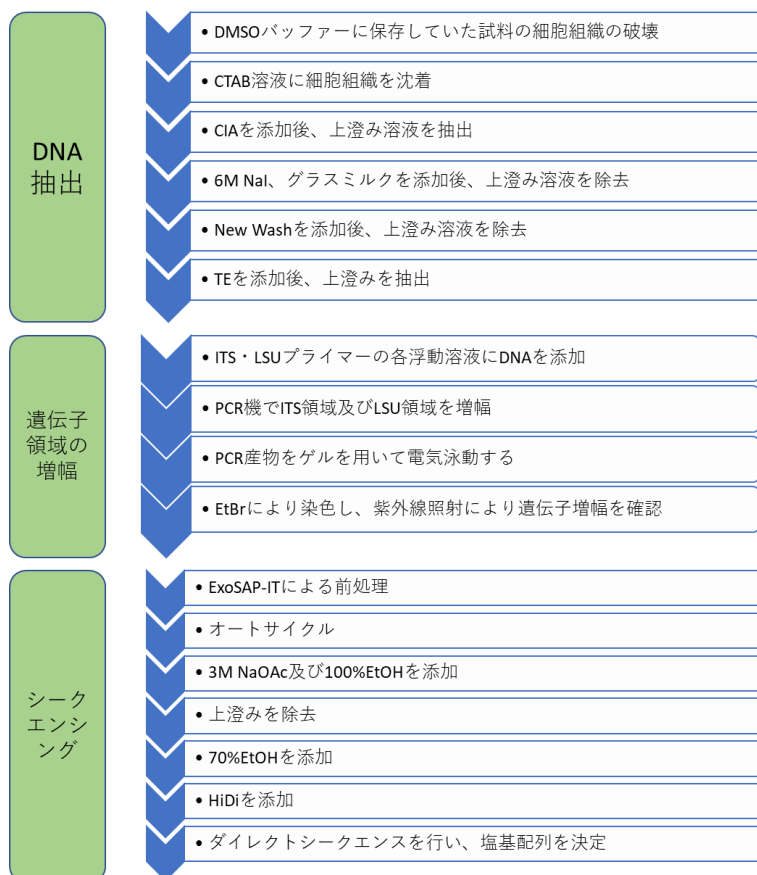


図 5 実験手順の概観図

#### 2.2.4. 子実体の同定

入手した標本の塩基配列のうち ITS 領域 42 点、LSU 領域 51 点の塩基配列について、シーケンシングに成功した。これらの配列について、BLAST(Altschul et al, 1990)による相同性検索を行い、分子同定した。なお、今回供試したシネンシストウチュウカソウの 5 標本について、ITS 領域の塩基配列を得ることはできなかった。一方、これらについて LSU の塩基配列は得ることができた。

#### 2.2.5. 分子系統解析

本研究により新たに得られた塩基配列のうち、シネンシストウチュウカソウを含むより多くの標本のシーケンシングに成功した LSU 領域について分子系統解析に基づく系統樹の作成を行った。得られた塩基配列は ATGC Ver. 6 ( GENETYX、東京) を用いてアセンブルを行った。その後、GenBank から得られたシネンシストウチュウカソウとされる塩基配列を含む 124 点の塩基配列を加えて、データセットを作成した。データセットのアライメントは Muscle ver. 3.6 により行った。アライメントした結果は BioEdit ver. 7.0.5 を用いて目視で確認すると共に、必要に応じてファイルの修正を行った。

系統解析は、同様の LSU 領域の配列をアライメントした結果に対して最節約法及び最尤法を用いて行った。最節約法については、PAUP\* ver. 4.0b10 (Swofford 2002) を用いて系統樹を作成した。最節約系統樹の探索には MULTREES オプションを用いて 1,000 回反復を行った。アライメントデータのギャップは missing data として扱った。すべてのキャラクターは unordered および equal weight とした。枝の位置交換は tree-bisection-reconnection (TBR) に設定した。相対一致指数 (consistency index = CI)、ホモプラシー指数 (Homoplasy index)、保持指数 (retention index = RI)、修正一致指数 (rescale consistency index = RC) についても求めた。最節約法により得られた系統樹の各枝の支持率は、ブートストラップ解析を 10,000 回反復して求めた。

最尤法による解析では、MEGA-X を用いて系統樹を作成した (Kumar et al., 2018)。解析

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

に際してあらかじめ MEGA-X を用いて、最も適した進化モデルを決定した。その結果、ガンマ分布率の不均一性と不変部位の割合(Gamma Distributed (= G))を持つ田村 3 パラメータ(Tamura, 1992) モデル(T92+G)が選択された。Gap 及び missing data の取扱いは完全削除とした。Branch Swap Filter は Moderate を選択した。枝の横には、関連する分類群が一緒にクラスタリングされている木の割合を示す。発見的探索法による検索の初期木は、田村 3 パラメータモデルを用いて推定したペアワイズ距離の行列に近隣結合法と BioNJ 法を適用し、対数尤度の優れたトポロジーを選択することで自動的に取得した。解析の際には 1,000 回のブートストラップ解析を行い、各枝の支持率を評価した。最尤法と最節約法の双方の解析において、Sung et al. (2007)に準拠し、外群には、GenBank から得た *Hypocrea lutea* (Tode) Petch (JN941457, JN941458)、*Sphaerostilbella berkeleyana* (Plowr. & Cooke) Samuels & Cand(U00756, MH870301)の配列データを用いた。

### 3. 結果

#### 3.1. BLAST の相同性検索による子実体の分子同定の結果

本研究で得られた ITS 領域と LSU 領域の塩基配列を用いて BLAST の相同性検索を行った(表 3)。その結果、中国から得られた 5 点のシネンシストウチュウカソウの標本から取得した LSU の塩基配列は、GenBank に登録されているシネンシストウチュウカソウの LSU の配列と 99-100% の相同性を示した。その他の標本についても標本番号 KPR014 及び KPR024 を除き、GenBank に登録されている冬虫夏草類の配列と 98.7% 以上の相同性を示した。KPR014 及び KPR024 はいずれも相同性が 95% を上回る配列が GenBank 上に存在しなかった。

表 3 BLAST の相同性検索による子実体及び分生子の分子同定の結果の一部

標本番号	同定された種名	GenBank登録番号	相同性(%)
KPR003	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	JX968030	100
KPR004	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	HM595890	100
KPR005	<i>Cordyceps sinensis</i>	AB067737	100
KPR006	<i>Cordyceps sinensis</i>	AB067737	99.89
KPR007	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	HM595885	100
KPR014	<i>Ophiocordyceps camponoti-bispinosa</i>	KX713614	94.91
KPR021	<i>Metarhizium cylindrosporum</i>	MH873892	99.67
KPR024	<i>Metarhizium marquandii</i>	MH483783	88.66

#### 3.2. 最節約法による系統解析

LSU 領域を用いて最節約法による系統解析を行った結果、1,000 サイトから構成される LSU 領域の部分配列の内、325 サイトに変異があり、それらは最節約法における系統学上、

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

有用な情報であった。PAUP\*ver. 4.0b10 を用いた最節約法による解析では、1,427 ステップからなる 10,000 の系統樹が得られた(CI=0.2390, HI=0.7610, RI=0.7103, RC=0.1697)。図 6 は実際に構築された系統樹である。この結果、本研究で新たに入手したシネンシストウチュウカソウの標本は 1 つのクレード(Clade 4)に含まれた。GenBank から入手したシネンシストウチュウカソウとされる配列データ 16 点は 4 つのクレード(Clade 1, Clade 2, Clade 3, Clade 4)に分割された。その内の 12 点は本研究で新たに入手した標本と同一のクレード(Clade 4)に含まれた。これらの 4 つのクレードは最節約法のブートストラップ値により系統性が強く支持された。

### 3.3. 最尤法による系統解析

最節約法と同様の LSU 領域の配列を用いて最尤法による系統解析を行った結果、MEGA-X を用いて示された対数尤度が最も高い木 (-1044.92) を示す。図 7 は実際に得られた系統樹である。この結果、本研究で新たに入手したシネンシストウチュウカソウの標本は 1 つのクレードに含まれた。GenBank から入手したシネンシストウチュウカソウとされる配列データ 16 点は 4 つのクレード(Clade 1', Clade 2', Clade 3', Clade 4')に分割された。その内の 12 点は本研究で新たに入手した標本と同一のクレード(Clade 4')に含まれた。また、Clade 4'には、GenBank から取得した *Ophiocordyceps coccidiicol* G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora とされる塩基配列(AB968419)が含まれた。ブートストラップ解析を行った結果、支持率が 50%を超えるような有意な分岐については、図 7 に赤字で示す部分のみに留まり、多くはなかった。そのため、本研究における考察においてはこれを補助的に利用するにとどめ、基本的には最節約法の系統樹を利用して主に考察を行うこととする。

系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）



図 6 最節約法により得られた系統樹

系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）



図 7 最尤法により得られた系統樹

## 4. 考察

### 4.1.1. シネンシストウチュウカソウの真正性について

図 6 及び図 7 によると本研究において新たに入手したシネンシストウチュウカソウとされる 5 点の標本(KPR003, KPR004, KPR005, KPR006, KPR007)の LSU 領域の配列については、最節約法、最尤法いずれの系統樹においても単一のクレード(Clade 4, Clade 4')に含まれた。同標本について、BLAST 検索を行った結果、5 点の標本のいずれも GenBank から得られたシネンシストウチュウカソウの LSU 領域の配列と 99%以上の相同性を示した。

GenBank から得られたシネンシストウチュウカソウとされる LSU 領域の配列は最節約法において 4 つのクレードに分割され、最尤法においても 4 つのクレードに分割された。最節約法において分轄された 4 つのクレードの標本の組み合わせは、最尤法で 4 つのクレードに分割された標本の組み合わせとそれぞれ一致していた。Clade 4 は、シネンシストウチュウカソウとされる配列データ 21 点のうち、本研究で新たに入手した標本 5 点を含む 17 点の配列データを含んでいた。このことから、Clade 4 は真のシネンシストウチュウカソウの配列を示していると考えられ、その他の 3 つのクレードに含まれる標本は、異なる種であると考えられる。Clade 4 が真のシネンシストウチュウカソウを示すクレードであることは、本研究で新たに入手した標本 5 点の BLAST 検索の結果からも支持される。

GenBank に登録されている *O.sinensis* とされる塩基配列が系統学的解析の結果、*O.sinensis* ではないと考えられる場合が複数にわたり存在した。Clade 1 に含まれる標本(AB067709)は、いずれの系統樹上でも近縁と考えられる種は存在しなかった。Clade 2 に含まれる標本(AB067710, KC242639)は、いずれの系統樹上でも *Paecilomyces lilacinus* とされるデータに近縁とされた。Clade 3 に含まれる標本(HM595904)は、いずれの系統樹上でも *O. sinensis* に近縁であったが、Clade 4(Clade 4')と一定程度の系統樹上での距離が存在したため、別種と考えられる。先行研究において用いられていた、冬虫夏草類の標本の真正性自体に問題がある場合があることが系統学的に示された。また、Clade 4 に含まれる

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

標本について、本研究で新たに入手した標本はチベット及び青海で入手されたものである。このことから、シネンシストウチュウカソウの系統地理解析の評価において、LSU 領域のみを用いた系統解析は有意な結果は得にくいと考えられる。

### 4.1.2. *Ophiocordyceps camponoti-bispinosi* に近縁の学名未記載種について

本研究で新たに千葉県鴨川市清澄において入手した KPR014 の標本の LSU 領域の DNA 配列データについて、BLAST の相同性検索を行った。その結果、配列データが GenBank 上の *Ophiocordyceps camponoti-bispinosi* J.P.M. Araújo, H.C. Evans & D.P. Hughes とされる配列データ (KX713614) と 94.91% と最大の相同性を示した。この割合は、2 つの配列間に同種の個体から得られたと判断することが出来ないほど大きな変異が存在することを示している。したがって、KPR014 の配列は先行研究がなされていない学名未記載種のものであると推定される。最節約法の系統樹によると、KPR014 は系統樹上では台湾アリタケ (*Ophiocordyceps unilateralis*) と近縁であり、このことはブートストラップ値からも支持される。このことから、KPR014 の標本は、アリを宿主とする *Ophiocordyceps* 属の未記載種であると言える。

*O. unilateralis* をはじめとするアリを宿主とする *Ophiocordyceps* 属の冬虫夏草については、Araújo et al.(2018) によって系統解析を用いて詳細な分類がなされており、15 種の新種が報告されている。Araújo et al.(2018) においては、アリ生の *Ophiocordyceps* 属の冬虫夏草の生育環境や形態的特徴の比較が行われているが、本研究で報告された標本はいずれの種とも異なる新種であると推測され、今後さらに詳細な形態学的・系統学的検討が必要である。



図 8 本研究で収集された *Ophiocordyceps camponoti-bispinosa* に近縁の学名未記載種 (KPR014)

#### 4.1.3. *Metarhizium cylindrosporum* のテレオモルフについて

本研究で新たに千葉県鴨川市天津において入手した KPR021 の標本の LSU 領域の DNA 配列データについて、BLAST の相同性検索を行った。その結果、配列データが GenBank 上の *M. cylindrosporum* Q.T. Chen & H.L. Guo とされる配列データ (KX713614) と 99.67% と高い相同性を示した。また、最節約法の系統樹によると、*M. cylindrosporum* の配列 (MH873892) と近く、同種と考えられる関係にある。KPR021 の標本は解析前の形態的観察では、アマミヤリノホセミタケ (*Metarhizium owariense* f. *viridescens*) と推定していたが、これらの系統学的解析により *M. cylindrosporum* と同種であることが明らかとなった。

*M. cylindrosporum* は Tzean et al.(1993)により、形態的観察の結果、*Nomuraea* 属の *Nomuraea cylindrospora* として報告されている。*Metarhizium* 属は、緑色の分生子を特徴とする無性世代の冬虫夏草類を指す属であったが、Kepler(2014)の系統解析を用いた研究により、従来有性世代を示す属の 1 つであった *Metacordyceps* 属の大部分と *Nomuraea* 属と *Chamaeleomyces* 属の一部分を含む形で再編がなされている。Kepler(2014)によって、*Metarhizium* 属の再編が行われた結果、従来 *N. cylindrospora* として扱われていた種は、

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

*M. cylindrosporum* として系統的な位置づけが明確にされた。この際には緑色の分生子を形成して無性生殖をするアナモルフの形態のみが報告され、有性生殖を行い子嚢胞子を形成するテレオモルフの形態は報告されていない。KPR21 は宿主としているセミの頭部から、暗褐色から黒色の短い子実体が 4~6 cm 程度伸びていることから、*M. cylindrosporum* のテレオモルフであると考えられる(図 9,B)。図 9 の A は、2020 年 7 月 11 日に千葉県鴨川市天津で KPR21 の標本を採取した際に、同時に採取された *M. cylindrosporum* のアナモルフと推定される標本の画像である。*M. cylindrosporum* のアナモルフはアブラゼミやヒグラシの成虫に夏から秋にかけて発生する(日本冬虫夏草の会, 2014, 271)。それに対して、B の画像のように、テレオモルフはセミの幼虫を宿主とし発生している。

本研究で行った系統解析によって、従来未発見であった *M. cylindrosporum* のテレオモルフが初めて報告された。今後は、今回の系統解析により見出された本菌のテレオモルフについて、形態的・生態的特徴を観察するとともに、アマミヤリノホセミタケなどの近縁種と比較を行う必要がある。



図 9 本研究で収集された *Metarhizium cylindrosporum* のアナモルフ及びテレオモルフと推定される標本

#### 4.1.4. *Metarhizium* 属の学名未記載種について

本研究で新たに千葉県鴨川市天津において入手した、KPR024 の標本の LSU 領域の DNA 配列データについて、BLAST の相同性検索を行った。その結果、配列データが GenBank 上の *Metarhizium marquandi* とされる配列データ (MH483783) と 88.66% と高い相同性を示した。この割合は、2 つの配列間に同種の個体から得られたと判断することが出来ないほど大きな変異が存在することを示している。最節約法の系統樹によると、*Metarhizium rileyi* (HQ165731) と近縁である。また、KPR024 は *Metarhizium* 属のクレードに含まれているため、KPR024 の配列は *Metarhizium* 属の学名未記載種のものであると推定される。

KPR024 の形態的観察を行うと、子実体は 2 cm 程度の棍棒型であり、斜埋生型の子嚢殻を持ち、淡白緑色であった。形態的特徴より同種は通称カンピレームシタケと呼ばれる *Metarhizium* 属の冬虫夏草類の 1 種であると推定した。同種は清水 (1994, p. 242) で *Cordyceps* sp. として報告がなされている。採取が困難であり、西表島などの東シナ海の離島や岡山県、愛知県などで発見の報告がなされているが、報告数は多くはない。未発表の情報として、日本の菌類研究者の間では、宿主はカリバチあるいは甲虫の成虫であるという説が存在する。その分類は、形態的特徴から *Metarhizium* 属の一種として通称が存在するにとどまっておらず、系統的な位置づけは明らかになっていない。本研究では、BLAST の相同性検索において、*Metarhizium* 属の冬虫夏草と最も高い相同性を示すと共に、LSU 領域の系統解析の結果、*Metarhizium* 属のクレードに位置づけられることが明らかとなった。

一方で、*Metarhizium* 属のその他の冬虫夏草全体からどのように位置づけられるかは明らかではない。そのため、より広く *Metarhizium* 属の冬虫夏草や宿主が類似する冬虫夏草を含め、LSU 領域以外の遺伝子領域を含めた系統解析を行うことによって、より詳細な系統学的位置づけを明らかにすることが期待される。



- A: カンピレームシタケ(テレオモルフ)の地表部分(KPR024)
- B: カンピレームシタケ(アナモルフ)(KPR024)
- C: カンピレームシタケの子実体(KPR024)
- D: カンピレームシタケの宿主部分(KPR024)
- E: カンピレームシタケの全体図(KPR024)

図 10 本研究で収集されたカンピレームシタケと推定される標本

#### 4.1.5. ツクツクボウシタケ (*Isaria cicadae*) と ツクツクボウシセミタケ (*Cordyceps sinclairii*) の系統関係

本研究で新たに千葉県鴨川市四方木亀ノ沢において入手した KPR064 及び KPR065 の標本の LSU 領域の DNA 配列データについて、BLAST の相同性検索を行った。その結果、配列データが GenBank 上の *Isaria cicadae* とされる配列データ (JX488475) と 100% の相同性を示した。最節約法の系統樹によると、これらの標本の配列はツクツクボウシタケと推定した他の 11 点のデータ及び GenBank 上から取得した *I. cicadae* とされる 2 点のデータと共に、*I. cicadae* クレードを形成している。したがって、KPR64 及び KPR65 の標本は *I. cicadae* と同種であると考えられる。このことはブートストラップ値からも支持される。

ツクツクボウシセミタケは Kobayasi(1949)によって *Cordyceps sinclairii* として示されている。ツクツクボウシをはじめとしたセミの幼虫を宿主とする地生型の冬虫夏草で、子実体は黄白色から黄褐色の棍棒型で宿主の頭部から 1-10 本発生する(日本冬虫夏草の会, 2014,p. 126)(図 11C,D)。その後 Sato et al.(2012)により形態的特徴が再度整理されている。ツクツクボウシセミタケのアナモルフの形態として、ツクツクボウシタケが確認されている。本種は、ツクツクボウシなどのセミの幼虫を宿主とし、セミの幼虫全体を白い菌糸で多い、分生子柄束を頭部から形成し、地上部は 2-3 cm となる(日本冬虫夏草の会, 2014, p. 270)。ツクツクボウシセミタケについては、他の子実体を形成する種と共に多くの系統解析がなされており、*Ophiocordyceps* 属の中でも *Ophiocordyceps sphecocephala* などと姉妹群を形成することが明らかにされている(Thanakitpipattana et al., 2020)。ツクツクボウシタケについても系統解析を用いた分類学的な研究はなされており、本属は、一時期 *Paecilomyces* 属に統合されていたが、遺伝子レベルの解析が進んだ結果、再び *Isaria* 属として独立した属となった(Luangsa-ard et al., 2005)。

一方で、ツクツクボウシセミタケ及びツクツクボウシタケの関係を、系統解析を通じて明らかにした例は報告されていなかった。今回、本研究によって両種の系統的同一性が初めて明らかにされた。この結果は、近年のテレオモルフ世代とアナモルフ世代の系統解析

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

を通じて、学名の統一化を図る流れに寄与するものである。ツクツクボウシタケ *Isaria cicadae* はツクツクボウシセミタケ *Cordyceps sinclairii* より早期に学名が命名されており、国際藻類・菌類・植物命名規約(ICN) 深圳規約(Turland et al., 2018)によれば、同種は *Isaria cicadae* に学名を統一するべきであると考えられる。



- A：ツクツクボウシタケ(アナモルフ)の地表部分(図1より再掲)  
B：ツクツクボウシタケの全体図(図1より再掲)  
C：ツクツクボウシセミタケ(テレオモルフ)の地表部分(KPR064)  
D：ツクツクボウシセミタケの全体図(KPR064)

図 11 本研究で収集されたツクツクボウシタケ及びツクツクボウシセミタケの標本

### 4.1.6. その他の標本の LSU 領域の系統解析の評価

本研究で新たに入手した標本 51 点及び GenBank から入手したデータ 124 点の LSU 量

## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

良いの配列データを用いて最節約法及び最尤法で系統樹を作成した(図 6, 図 7)。GenBankより取得した *Ophiocordyceps coccidiicola* とされる配列(AB968419)は、最節約法の系統樹上では、他の配列データとは独立した系統的な位置づけに存在する(図 12)。一方で、最尤法による系統樹上では、真の *O. sinensis* とされるクレード(Clade 4')に含まれる形で位置づけられている。2つの方法で示された同データの系統学的位置づけは異なっており、両系統樹共にブートストラップ値による支持が得られていないことから、本研究で用いた標本数及び LSU 領域のみでの系統解析では、系統学的な位置づけを明らかにすることはできないと考えられる。このことから、より詳細な系統関係を明らかにするには、標本数を増やす、又は他の遺伝子領域も併せて系統解析を行うなどの系統解析手法の改善を行うことが必要となる。

最節約法の系統樹によると、*Isaria cicadae* とされる標本群は単一のクレードに含まれている。この標本群は、宮城県、埼玉県、千葉県で得られた標本を含んでおり、系統樹上では有意な遺伝的差異は表れていない。このことから、LSU 領域のみを用いた系統解析は、*O. sinensis* 以外の冬虫夏草類の産地についても、地理的な差異を評価することは困難であると考えられる。



## 系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

ソウとされる標本 5 点及び関連菌群を含む合計 51 点の標本を用意し、それらから DNA の塩基配列情報を取得して、BLAST の相同性検索を行った。新たに得られた塩基配列情報は、GenBank から得られた 124 点の塩基配列と共に系統解析を行い、その結果に基づき系統樹を作成すると共に、系統学的評価を行った。その結果、本研究で入手した標本 5 点はシネンシストウチュウカソウと遺伝的に同種であることが明らかとなった。また、いくつかの標本(KPR14,KPR21,KPR24)を除き、形態的特徴の観察による種の推定と同様の評価を得た。これらのことから、共同研究の安定同位体比分析や次世代シーケンサーによる Mig-seq 解析に用いられる標本の真正性が示されると共に、これらの分析から得られる個体識別に関する情報の基礎を形成することができた。

次に、本研究の個別の目的はシネンシストウチュウカソウの真正性の評価を行うことであつた。シネンシストウチュウカソウは漢方薬としての重要性から、多くの研究が行われているが、研究のための標本自体も入手困難であつた。実際に、先行研究で用いられている標本のうち、人工栽培したものや入手元が不確かなものを野生の入手元が確かな標本と同様に扱っている場合が数多く存在することが示されていた(Dong, 2011)。本研究においては、シネンシストウチュウカソウとされる新たに入手した標本 5 点及び GenBank から入手した塩基配列 16 点を用いて解析を行い、その系統学的位置づけを明らかにすることで、過去に先行研究で用いられたデータの真正性についての評価を行った。結果として、シネンシストウチュウカソウとされていた配列データは 4 つのクレードに分割され、本物とされるクレードに含まれるデータが 12 点、それ以外のクレードに含まれるデータが 4 点となった。このことは、シネンシストウチュウカソウの先行研究において、標本の真正性が確保されていない場合が存在することを明らかとしている。標本の真正性は、自然科学領域の研究において、結果及び研究成果の評価を左右する重要かつ広範な問題である。冬虫夏草類の研究において、化学的手法による分析を行うに際しても、まずは最低限の系統学的解析を行い、標本の真正性を確かにするのが求められる。

## 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました慶應義塾大学経済学部生物学教室准教授糟谷大河博士には深く感謝申し上げます。

試料収集にあたっては、東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林千葉演習林の村川功雄氏ならびに嶋崎拓氏に、また東北大学大学院情報科学研究科教授の須川敏幸博士、北海道北見市の内田暁友氏、栃木県宇都宮市の泉匠氏に多大なご協力を頂きました。また、慶應義塾大学自然科学研究教育センター訪問教授の伊永隆史博士にはシネンシストウチュウカソウの標本をご提供頂くとともに、本研究に関して有益なご助言を賜りました。分子系統解析実験においては、南京沃氏、保坂健太郎博士をはじめとする国立科学博物館植物研究部の皆様にご教示頂きました。以上の皆様に心より御礼申し上げます。

## 参考資料一覧[文献一覧見出し]

[文献一覧]

- Altschul S.F. et al. (1990) 「Basic Local Alignment Search Tool」 (『Journal of Molecular Biology』 vol. 215, pp. 403-410)
- Araújo J.P.M. et al. (2018) 「Zombie-ant fungi across continents: 15 new species and new combinations within *Ophiocordyceps*. I. Myrmecophilous hirsutelloid species」 (『Studies in Mycology』 vol. 90, pp. 119-160)
- Ban Sayaka et al. (2015) 「*Isaria takamizusanensis* is the anamorph of *Cordyceps ryogamimontana*, warranting a new combination, *Purpureocillium takamizusanense* comb. nov.」 (『International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology』 vol. 65, pp. 2459-2465)
- Buenz E.J. et al. (2005) 「The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis」 (『Journal of Ethnopharmacology』 vol. 96, pp. 19-29)
- Cannon P.F. et al. (2009) 「Steps towards sustainable harvest of *Ophiocordyceps sinensis* in Bhutan」 (『Biodivers Conserv』 vol. 18, pp. 2263-2281)
- Cheng W. et al. (2017) 「Determination and comparative analysis of 13 nucleosides and nucleobases in natural fruiting body of *Ophiocordyceps sinensis* and its substitutes」 (『Mycology』 vol. 8, No. 4, pp. 318-326)
- Chen L.H. et al. (2018) 「Analysis of the High-Performance Liquid

- Chromatography Fingerprints and Quantitative Analysis of Multicomponents by Single Marker of Products of Fermented *Cordyceps sinensis*」 (『Journal of Analytical Methods in Chemistry』 vol. 2018) DOI:10.1155/2018/5943914
- Chen Y.Q. et al. (2004) 「Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different geographical regions in China」 (『FEMS Microbiology Letters』 vol. 230, pp. 153-158)
- Cunningham A.B. and Long X. (2019) 「Linking resource supplies and price drivers: Lessons from Traditional Chinese Medicine (TCM) price volatility and change, 2002–2017」 (『Journal of Ethnopharmacology』 vol. 229, pp. 205-214)
- Dong C.H. and Yao Y.J. (2011) 「On the reliability of fungal materials used in studies on *Ophiocordyceps sinensis*」 (『Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology』 vol. 38, pp. 1027-1035)
- El Sheikha A.F. and Hu D.M. (2018) 「How to trace the geographic origin of mushrooms?」 (『Trends in Food Science & Technology』 vol. 78, pp. 292-303)
- Gardes M and Bruns T.D. (1993) 「ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts.」 (『Molecular Ecology』 vol.2, pp. 113-118)

- Guo L.X. et al. (2017a) 「Fungus-larva relation in the formation of *Cordyceps sinensis* as revealed by stable carbon isotope analysis」 (『Scientific Reports』) DOI:10.1038/s41598-017-08198-1
- Guo L.X. et al. (2017b) 「Stable Carbon Isotope Composition of the Lipids in Natural *Cordyceps Sinensis* from Major Habitats in China and Its Substitutes」 (『molecules』 vol. 22, No. 9, 1567)
- Hosaka K. (2009) 「Phylogeography of the Genus *Pisolithus* Revisited with some Additional Taxa from New Caledonia and Japan」 (『Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany』 vol. 35, No.3, pp. 151-167)
- Hosaka K. and Castellano M.A. (2008) 「Molecular Phylogenetics of Geastrales with Special Emphasis on the Position of *Sclerogaster*」 (『Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B Botany』 vol. 34, No.4, pp. 161-173)
- Johnson Desiree et al. (2009) 「Systematics and evolution of the genus *Torrubiella* (*Hypocreales*, *Ascomycota*)」 (『Mycological Research』 vol. 113, pp. 279-289)
- Kasuya T. et al. (2012) 「Phylogenetic placement of *Geastrum melanocephalum* and polyphyly of *Geastrum triplex*」 (『Mycoscience』 vol. 53, No. 6, pp. 411-426)

- Kepler R.M. et al. (2014) 「Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics」 (『Mycologia』 vol. 106, No. 4, pp. 811-829)
- Kumar S. et al. (2018) 「MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms」 (『Molecular Biology and Evolution』 vol. 35, pp. 1547-1549)
- Kobayasi Y. (1941) 「The genus *Cordyceps* and its allies」 (『Science reports of the Tokyo Bunrika Daigaku』 vol. 5, No.84, pp.53-260)
- Kobayasi Y. (1949) 「Several species of the genus *Cordyceps* and their conidial forms」 (『The journal of Japanese botany』 vol. 24, pp. 176-180)
- Kobayasi Y. (1980) 「*Cordyceps* Species from Japan」 (『Bulletin National Science Museum Series B Botany』 vol. 6, pp. 79-96)
- Kobayasi Y. (1981) 「Revision of the Genus *Cordyceps* and Its Allies」 (『Bulletin National Science Museum Series B Botany』 vol. 7, pp.123-129)
- Liu Yang et al. (2017) 「Detection of *Ophiocordyceps sinensis* and Its Common Adulterates Using Species-Specific Primers」 (『Frontiers in Microbiology』 vol. 8) DOI: 10.3389/fmicb.2017.01179
- Liu Z.Q. et al. (2015) 「Transcriptome sequencing and analysis of the entomopathogenic fungus *Hirsutella sinensis* isolated from *Ophiocordyceps sinensis*」 (『BMC Genomics』

- vol. 16) DOI: 10.1186/s12864-015-1269-y
- Liu Z.Y. et al. (2002) 「Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences」 (『The British Mycological Society』 vol. 106, No. 9, pp.1100-1108)
- Luangsa-Ard J.J. et al. (2005) 「On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species」 (『The British Mycological Society』 vol. 109, No. 5, pp. 581-589)
- Olatunja O.J. et al. (2018) 「The genus *Cordyceps*: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology」 (『Fitoterapia』 vol. 129, pp. 293-316)
- Pouliot M. et al. (2018) 「High altitude organic gold: The production network for *Ophiocordyceps sinensis* from far-western Nepal」 (『Journal of Ethnopharmacology』 vol. 218, pp. 59-68)
- Rao Y.K. et al. (2007) 「Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts」 (『Journal of Ethnopharmacology』 vol. 114, pp. 78-85)
- Ren S.Y. and Yao Y.J. (2013) 「Evaluation of nutritional and physical stress conditions during vegetative growth on conidial production and germination in *Ophiocordyceps sinensis*」 (『Federation of European Microbiological Societies』 vol. 346, pp. 29-35)

- Sato H. et al. (2010) 「Reassessment of type specimens of *Cordyceps* and its allies described by Dr. Yosio Kobayasi preserved in the mycological herbarium of the National Museum of Nature and Science (TNS). Part 1: the genus *Torrubiella*」 (『Mycoscience』 vol. 51, pp. 154-161)
- Sato H et al. (2012) 「Reassessment of type specimens of *Cordyceps* and its allies, described by Dr. Yosio Kobayasi and preserved in the mycological herbarium of the National Museum of Nature and Science (TNS). Part 3: *Cordyceps* s. l. on Cicadidae」 (『Mycoscience』 vol. 53, pp. 402-408)
- Schoch C.L. et al. (2012) 「Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi」 (『Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America』 vol. 109, No. 16, pp. 6241-6246)
- Seutin G. et al. (1991) 「Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses」 (『Canadian Journal of Zoology』 vol. 69, pp. 82-90)
- Shrestha U.B. and Bawa K.S. (2013) 「Trade, harvest, and conservation of caterpillar fungus (*Ophiocordyceps sinensis*) in the Himalayas」 (『Biological Conservation』 vol. 159, pp. 514-520)
- Sung G.H. et al. (2007) 「Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi」 (『Studies in Mycology』 vol.

- 57, pp. 5-59)
- Tamura Koichiro (1992) 「Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases」 (『Molecular Biology and Evolution』 vol. 9, No. 4, pp. 678-687)
- Tao Zui et al. (2016) 「Laboratory Rearing of *Thitarodes armoricanus* and *Thitarodes jianchuanensis* (Lepidoptera: Hepialidae), Hosts of the Chinese Medicinal Fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae)」 (『Ecology and Behavior』 vol. 109, No. 1, pp. 176-181)
- Thanakitpipattana D. et al. (2020) 「Fungal pathogens occurring on *Orthoptera* in Thailand」 (『Persoonia』 vol. 44, pp. 140-160)
- Turland N.J. et al. (2018) 「International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017. Regnum Vegetabile 159.」 (『Koeltz Botanical Books』 Glashütten, 254 pp.)
- Tzean S.S. et al. (1993) 「*Nomuraea cylindrospora* Comb. Nov.」 (『Mycologia』 vol. 85, No. 3, pp. 514-519)
- Vilgalys R. and Hester M. (1990) 「Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species」 (『Journal of Bacteriology』 vol.

172, No. 8, pp. 4238-4246)

- Wang Chao et al. (2018) 「Artificially Cultivated *Ophiocordyceps sinensis* Alleviates Diabetic Nephropathy and Its Podocyte Injury via Inhibiting P2X7R Expression and NLRP3 Inflammasome Activation」 (『Journal of Diabetes Research』 vol. 2018) DOI: 10.1155/2018/1390418
- Wang Junqiao et al. (2015) 「A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis*」 (『LWT - Food Science and Technology』 vol. 63, pp. 2-7)
- Wen T.C. et al. (2016) 「Multigene phylogeny and HPLC analysis reveal fake *Ophiocordyceps sinensis* in markets」 (『Mycosphere』 vol. 7, No. 6, pp. 853-867)
- Winkler Daniel (2009) 「Caterpillar Fungus (*Ophiocordyceps sinensis*) Production and Sustainability on the Tibetan Plateau and in the Himalayas」 (『Asian Medicine』 vol. 5, pp. 291-316)
- Xia E.H. et al (2017) 「The caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis*, genome provides insights into highland adaptation of fungal pathogenicity」 (『scientific reports』 No. 1806) DOI:10.1038/s41598-017-01869-z
- Xu Jianping (2016) 「Fungal DNA barcoding」 (『Genome』 vol. 59, pp. 913-932)
- Yang Ping et al. (2009) 「Differentiation and quality estimation of *Cordyceps* with infrared spectroscopy」 (『Spectrochimica Acta

- Part A』 vol. 74, pp. 983-990)
- Yan Yujing et al. (2017) 「Range shifts in response to climate change of *Ophiocordyceps sinensis*, a fungus endemic to the Tibetan Plateau」 (『Biological Conservation』 vol. 206, pp. 143-150)
- Zhang Xu et al. (2018) 「A comparative proteomic characterization and nutritional assessment of naturally- and artificially-cultivated *Cordyceps sinensis*」 (『Journal of Proteomics』 vol. 181, pp. 24-35)
- 大賀祥治 (2015) 「冬虫夏草の魅力」(『生物工学会誌』93 巻 pp.769-773)
- 和田光弘ほか (2016) 「機能性食品及びサプリメントの有効成分の分析と機能性評価」(『分析化学』65 巻, 6 号, pp. 301-308)
- 奥沢康正 (2012) 『冬虫夏草の文化誌』(石田大成社)
- 清水大典 (1994) 『原色 冬虫夏草図鑑』(誠文堂新光社)
- 日本冬虫夏草の会 (2014) 『冬虫夏草生態図鑑』(誠文堂新光社)
- 根井正利、S. クマー (2006) 『分子進化と系統解析学』(培風館)

系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

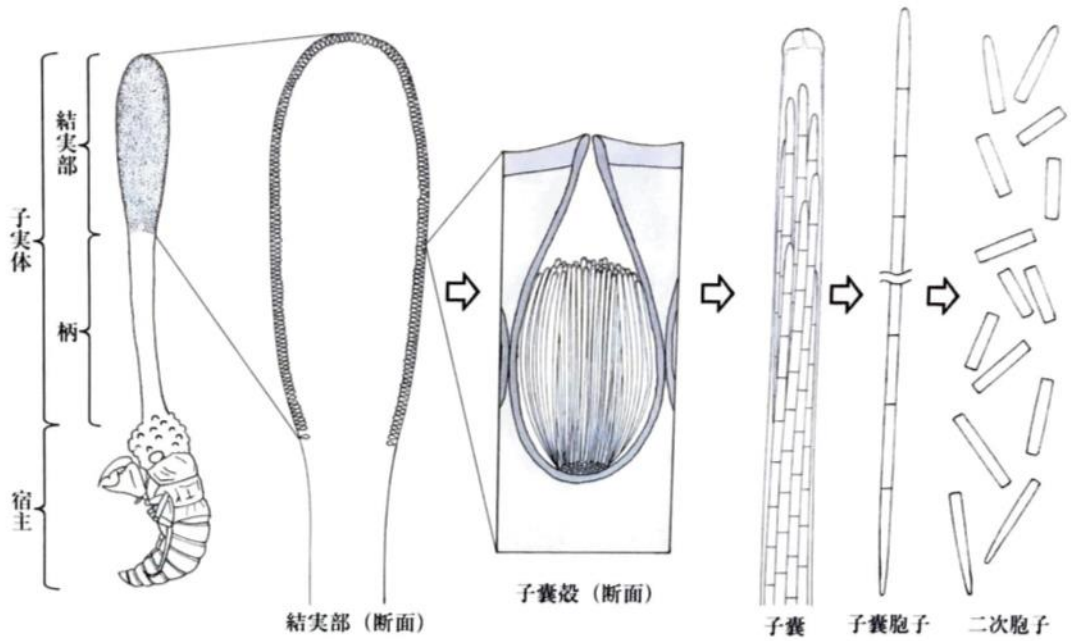
[付図]

付図 1 冬虫夏草の主要 4 属と形態的特徴の対応(日本冬虫夏草の会, 2014, p. 52 を改変)

形態的特徴			属名(代表種の例)			
宿主は <i>Elaphomyces</i> 属菌(ツチダンゴ)			<i>Elaphcordyceps</i> 属 (ハナヤスリタケ)			
宿主は節足動物	宿主は成虫	結実部の色は薄く、クリーム色～白色、ガの成虫		<i>Cordyceps</i> 属 (ガヤドリナガミノツブタケ)		
		宿主はガ以外で柄および結実部はよく成長	柄および結実部は黄色、やわらかな肉質、宿主はコガネムシ		<i>Cordyceps</i> 属 (コガネムシタケ)	
			柄および結実部は薄くまたは濃く着色、硬い肉質、円柱状または頭頂部が膨らむ	結実部は明るい色を含み子嚢殻は埋生、宿主はアリ、ハチなど		<i>Ophiocordyceps</i> 属 (カメムシタケ)
				結実部は暗く着色、柄の途中に形成、宿主はアリ		<i>Ophiocordyceps</i> 属 (カメムシタケ)
	宿主は成虫以外	柄および結実部は薄い色～明るい色	柄および結実部は薄く、クリーム色～白色、繊維質、宿主はコウチュウ目の幼虫		<i>Elaphcordyceps</i> 属 (フトクブクチキムシタケ)	
			柄および結実部は黄色～オレンジ～赤、やわらかな肉質		<i>Cordyceps</i> 属 (サナギタケ)	
		柄および結実部は普通濃く着色し褐色～黒色、例外的に白～紫、子嚢殻も同色から濃く着色	柄および結実部はオリーブ色から茶色、繊維質、結実部は柄の先に明確な球形～棍棒型、宿主はセミの幼虫		<i>Elaphcordyceps</i> 属 (フトクブクチキムシタケ)	
			柄および結実部は褐色～黒、薄く色が付いたり、まれに白から紫色	結実部は白～紫色、緑、乾燥すると黒、繊維質		<i>Metacordyceps</i> 属 (ミドリトサカタケ)
				結実部はオリーブ色から茶色・黒、まれに薄い色		<i>Ophiocordyceps</i> 属 (シネンシストウチュウカソウ)

付図 2 冬虫夏草の分類と仕組み(日本冬虫夏草の会, 2014, p. 46)

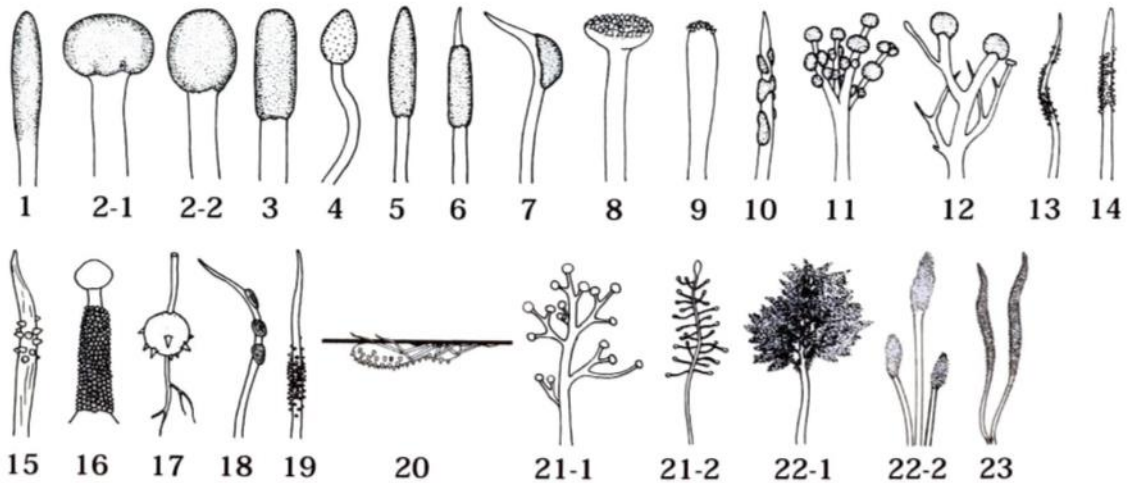
### 冬虫夏草の各部の名称



子実体 (fruiting body)、宿主 (host)、結実部 (fertile part)、柄 (stem)、子囊殻 (perithecium, pl. perithecia)、子囊 (ascus, pl. asci)、子囊胞子 (ascospore [s])、二次胞子 (secondary spore [s], part spore [s])

結実部は子囊殻が形成される部位。その形状は多彩で、種ごとに特徴ある形状を示す。次に結実部の形状をまとめた。

### 結実部の形状



1.棍棒型、2.タンポ型、3.円筒型、4.ミミカキ型、5.ハナヤスリ型、6.突き抜き型、7.首折れ型、8.ハスの実型、9.先太型、10.張り付き型、11.かんざし型、12.枝打ち型、13.針タケ型、14.太針型、15.ツブタケ型、16.こけし型、17.宙吊り型、18.円盤型、19.宿りツブタケ型、20.トルビエラ型、21.虫ピン型、22.イザリア型、23.ギベルラ型

系統解析による漢方薬冬虫夏草の真正性の評価（笠原悠二）

↓論文印刷前に、下の行を選択して右クリック「フィールドの更新」すること↓

- 本文 35 字×25 行×43 ページ、全 34897 文字