

糸状菌の同定技術の習得と 同定システム評価に関する研究

Study on Identification of Filamentous Fungi, and an Evaluation of the Biological Identification System

松山 治義

Haruyoshi MATSUYAMA

I. はじめに

糸状菌(カビ)を同定する為の2通りの方法すなわち①伝統的な形態観察法 ②生化学的解析手法について東京家政大学一戸正勝教授に指導を受けた。

そして、土壌からたんぱく分解酵素(卵殻膜分解酵素)を産生する糸状菌を土壌からスクリーニングし、両手法で比較し同定することができた。

II. 実験材料及び実験方法

2-1. 形態観察

寒天培養プレート上の肉眼での観察、実体顕微鏡により糸状菌叢の観察、そしてプレパラート作製後に顕微鏡観察を行なった。

供試菌株:

①接合菌(1種)

Syncephalastrum racemosum

②子囊菌類(11種)

Emericella nidulans, *Emericella rugulosa*,
Eurotium herbariorum, *Eurotium chevalieri*,
Eurotium amstelodami, *Neosartorya fischeri*,
Neosartorya hiratsukae, *Chaetomium globosum*,
Taralomyces flavus, *Eupenicillium brefeldianum*,
Corynascus sepedonium (= *Thielavia sepedonium*)

③子囊菌タイプの不完全菌(28種)

Aspergillus 属(10種)

Aspergillus versicolor, *Aspergillus fumigatus*,
Aspergillus penicillioides, *Aspergillus nidulans*,
Aspergillus tamaritii, *Aspergillus clavatus*,
Aspergillus parasiticus, *Aspergillus nomius*,
Aspergillus ostianus, *Aspergillus ochraceus*

Penicillium 属(9種)

Penicillium camemberti, *Penicillium digitatum*,
Penicillium frequentans (= *P. glabrum*),
Penicillium islandicum, *Penicillium citrinum*,
Penicillium expansum, *Penicillium italicum*,
Penicillium roqueforti, *Penicillium cyclopium*

④上記以外の他属の不完全菌類(9種)

Alternaria alternata, *Botrytis cinerea*,
Curvularia geniculata, *Epicoccum nigrum*,
Fusarium solani, *Geotrichum candidum*,
Trichothecium roseum, *Paecilomyces variotii*,
Phoma sp.

2-2. BIOLOG による同定システム

GSI クレオス社の BIOLOG SYSTEM Release.4.2 で解析を行なった。

この BIOLOG SYSTEM の原理は、微生物細胞が炭素源を資化し呼吸することでテトラゾリウム色素の発色の変化としてとらえられ検出するものである。これにより異なった炭素源の入れられた96穴プレートの発色パターンデー

タが得られる。真菌類の場合は、619株のデータベースの中から、解析された結果を照合して最も近い順番に種名を出力する。

本学食品衛生学研究室で分離され、既に形態観察により同定された表1の*Fusarium*株9種・12株を用いて解析した。なお、これらの*Fusarium*株は当研究室にてハトムギ等の雑穀類から分離され、同定された糸状菌株である。

また、FFマイクロプレート、FF-IF（孢子懸濁用の試液）は(株)GSIクレオス社製を使用した。

表1. BIOLOG 解析の対象とした
*Fusarium*菌株

<i>Fusarium graminearum</i>	H-7-1
<i>Fusarium graminearum</i>	横-2-1
<i>Fusarium equiseti</i>	H-6-9
<i>Fusarium semitectum</i>	H-7-2
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	H-8-2
<i>Fusarium moniliforme</i>	HH-1-3
<i>Fusarium moniliforme</i>	H-7-20
<i>Fusarium proliferatum</i>	H-17-19
<i>Fusarium proliferatum</i>	H-8-9
<i>Fusarium camptocerus</i>	H-8-6
<i>Fusarium longipes</i>	H-2-1
<i>Fusarium subglutinans</i>	

主な操作の流れは次の通りであった。

プレート培養

スラントから BIOLOG 用 2% MEA プレートに接種 7~10 日間培養

マイクロプレート接種

孢子を専用綿棒でプレートから集め、FF-IF に懸濁し濁度計で透過率 75% の値に合わせ、FF マイクロプレートに接種

培養・解析

乾燥を防ぐためビニール袋内・密閉状態で 2~4 日間 25℃ のインキュベーターで培養し、2, 3, 4 日培養後にマイクロプレートリーダーで解析した。

2-3. 難分解性卵殻膜分解菌のスクリーニング及び同定

ケラチン、コラーゲン、エラスチンなど硬たんぱく質を分解する酵素は産業的価値がある。本研究では、同じく難分解性のたんぱく質である卵殻膜の分解活性をスクリーニング指標として選択し、土壌から糸状菌をスクリーニングした。

2-3-1. 1次スクリーニング

出発材料となる土壌は、タイ、ベトナムそして沖縄のサトウキビ畑で採取され、篩過・乾燥後、本研究室に保存されていた 15 検体を使用した。

なお、本検体は農作物のマイコトキシン汚染調査の目的で農林水産省の許可を得て我が国に持ち込まれた土壌検体であり、希釈操作の後はオートクレーブ処理して殺菌した。

本報告で菌株番号、例えば TS-16-1 は、タイ国の土壌で No.16 と記載されていた土壌から 1 次スクリーニング寒天プレート上に検出された 1 番目の株であることを示す。2 次スクリーニング後の純粋分離後の菌株は識別の為に「TS-16-1-2」のように記載した。頭文字は土壌の起源地場所であり、それぞれ TS:タイ V:ヴェトナム Y:沖縄県読谷村を意味する。

土壌からの抽出には、ストマッカー (Seward Medical UAC House 社製 LABBENDER400 Model No.BA6021) を使用し、1 分間抽出操作を行なった。

土壌の希釈液には、0.1% 寒天入り 0.05% Bactopeptone 溶液を用いた。

最初に 10 倍希釈 (検体 5g + 希釈液 45mL) したものを専用ポリエチレン袋に入れてストマッカーにかけた。これを希釈し最終的に 1000 倍と 10000 倍希釈したところで、塗抹法で各プレートに 1mL 培地表面に広げた。(なお、混濁法も試みたが、この方法は同一検体であっても透明帯の形成は見られなかった。) この後 25℃ で 3, 4 日培養した。

1 次スクリーニング用のプレート培地は次の

組成で行なった。一般真菌分離用の DRBC 培地組成中の Peptone をサンカクマク ST に置き換えた組成である。以下にその組成を示す。

Glucose	10g
サンカクマク ST[太陽化学(株)社製]	5.0g
KH ₂ PO ₄	1.0g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.5g
Rose Bengal	0.025g
Dichroran	0.002g
Chloramphenicol	0.1g
Agar	15g
Distilled water	1000m
Lp H5.6 ±0.2	

3, 4 日後に卵殻膜由来の培地の白濁が抜け円い透明帯が観察され, 拡大鏡を見ながら白金耳で分生子頭又はコロニー中心を PDA 寒天培地のスラントへ移植し, 25℃で培養した。

2-3-2. 2次スクリーニング

酵素活性の高い株に絞り込む為の2次スクリーニングを実施した。

すなわち1次スクリーニングで獲得した株を, フスマを原料とした固体培養培地に接種, 培養した麴(こうじ)の水抽出液の酵素活性を測定し, 高活性の株を選択した。

固体培養

培地調製から検体採取までは次の通り。

種培養 22m x 200mm の振とう試験管に B 扇フスマ 8.3% (塩酸で pH4.8 調整) 10mL 121℃, 30分殺菌

↓

スラントより1エーゼ接種後 25℃, 2日間振とう培養(振とう条件 500 spm)

↓

2日後本培養培地(三角フラスコ1本当たり小麦フスマ5gに水を4.4mL加え121℃, 30分オートクレーブ殺菌する)に乾熱滅菌したガラス管で2mLの種培養液を入れ, ステンレス棒

で1分間混合した。

(培養開始時点での乾燥減量は約55%)

培養水槽で4日間培養

↓

ステンレス棒で粉碎し50mL水入れて5℃保存

↓

綿ろ過して冷凍保存

酵素活性測定

卵殻膜たんぱく質のサンカクマク ST を基質とし, 酵素により分解された低分子たんぱくの量としてフェノール試薬により発色させ OD 660nm の吸収 (A1) を測定した。

一般的なたんぱく消化力試験ではミルクカゼインを基質とし, 反応時間は10分であるが本法では基質を卵殻膜に替えて, 反応時間を16時間とした。ブランクとしてはエンザイムブランク A0 を並行して調製し, 次の計算式で算出した。

卵殻膜分解活性 (U/mL) = (A1 - A0) × 1000

基質の調製方法

1gのサンカクマク ST と 0.7g のリン酸1カリウム (KH₂PO₄) を計量し, 200mL ガラス製ビーカーに入れた。次に, 約100mL の蒸留水を入れ, 間接沸騰水浴槽に5分間かけた後水道水で冷却した。そして, 100μL の10%クロラムフェニコールのエタノール溶液を添加し, pH6.5 に 1 NHCl で調整後100mLとした。

アッセイ方法

キャップ付試験管に基質溶液を5mLずつ分注し, 回転子(マグネット攪拌子)(3mm幅×10mm長)1個入れた。

50μL の粗酵素液を入れ, 16時間, 37℃恒温槽にて攪拌し反応させた。

↓

規定時間後遠心用ポリプロピレンコニカルチューブにいれ遠心(3000 rpm / 5000 g)した。

↓

遠心上清 0.4mL に 0.55M Na₂CO₃ 1mL と 3 倍希釈フェノール試薬 (Folin-チオカルトール試薬) 0.2 mL を入れ, 37°C で 30 分反応させた。

↓

水道水冷却 1 時間 静置して白濁を沈むのを待ち, 上清の OD 660nm を測定した。

純粋分離

単菌分離操作は 0.1% ペプトンを含む 1.5% 寒天プレートに 2 次スクリーニングを終えたスラントから調製した分生子懸濁液を画線して 1 日培養後, 拡大鏡を覗きながら白金耳で発芽胞子 1 個の載った寒天断片を PDA スラントへ移植した。

2-3-3. 同定 (使用したプレート培地等)

糸状菌の同定には Samson ら²⁾ 及び Pitt³⁾ の本記載に準拠して下記の培地の寒天プレートを用いて各培養温度で培養を行なった。

(形態観察)

CLA²⁾ : Carnation leaf agar (Fisher et al., 1982)

エチレンオキシドガス滅菌されたカーネーションの葉をシャーレ内に素寒天 (WATER AGAR 2%) に乗せ調製した。

CREA²⁾ : Creatine Sucrose agar

CYA²⁾ : Czapek yeast (autolysate) extract agar (Samson and Pitt, 1985)

CZ20S²⁾ : Czapek agar with 20% sucrose
0.1% TMS 添加

CZ²⁾ : Czapek agar (CBS)

G25N³⁾ : 25% Glycerol nitrate agar (Pitt1973)

MEA²⁾ : Malt Extract agar (according to Blakeslee)

PDA : Potato-dextrose agar

市販のポテトデキストロース寒天培地 '栄研' を使用した。

PSA²⁾ : Potato-Sucrose agar

TMS²⁾ : Trace metal solution per 100mL

water

YES²⁾ : Yeast Extract Sucrose agar
Water agar 2%²⁾

各属の株には次の培地 (温度) で培養を行なった。主には 25°C で 1 週間後に観察を行なったが, *Fusarium* 属では 4 日及び 10 日後に観察した。同定には, 文末記載の参考文献の書籍 1) ~ 5) を参考にした。

属	培地の種類・温度	参考文献
<i>Aspergillus</i>	CYA25, MEA, CYA37, CZ20S, CZ	2), 4)
<i>Penicillium</i>	CYA25, MEA, CR EA, YES, CZ, G2 5N, (CYA5 [*] , CYA37 [*])	1), 2), 3)
<i>Fusarium</i>	CLA, PDA, PSA	2), 5)

*CYA5, CYA37 : は CYA で培養温度 5°C, 37°C の場合を示す。

(BIOLOG)

BIOLOG にて胞子を形成する為のプレート培地である 2% MEA 培地 (Malt Extract agar) は次の組成であった。

BIOLOG 用 2% MEA :

モルトエキス (OXOID 社製) 20g
寒天 15g
蒸留水 1000mL

Ⅲ. 結果及び考察

3-1. 形態観察による同定手法の修得

糸状菌の同定において学んだことをポイント毎に列挙した。

プレート観察による培養学的性状：

コロニー直径	
コロニー表面性状	
滲出液の有無	
裏の色	
可溶性色素の有無, その色	
菌核の有無	

顕微鏡観察：

分生子柄 stipes	長さ, 幅, 表面
頂のう vesicles	直径, 形
フィアライドとメトレ phialide(&metula):	長さ, 幅, 形
分生子 conidia	直径, 表面, 形
子嚢菌であった場合：	
子嚢殻 ascoma または	
閉子嚢殻 cleistothecia	直径, 形
子嚢 ascus:	直径, 形
子嚢胞子 ascospores:	直径, 形

糸状菌の形態観察においては, その分生子・孢子形成がなくては全く何もできず, 分生子を作り出す細胞(分生子形成細胞)を良く観察することが重要であることを学んだ。

また, *Aspergillus* 属の場合, 分生子の粗/滑面の違いが, *Penicillium* 属の場合, 分生子柄の粗/滑面の違いにより全く別の種となるので注意を要する。

そして菌核形成菌の場合, さらに約1月培養後も菌核にとどまるのか, 閉子嚢殻に発展するかどうかを見ないと同定判断できないことを学んだ。

3-2. BIOLOG による同定方法の修得

表2は, 当研究室の *Fusarium* 属9種を本システムに適応させた結果を示した。①は2% MEA プレートから②は CLA 培養のカーネー

ション葉から分生子懸濁液を調製した場合である。

表2. *Fusarium* 株の BIOLOG 解析結果
①2%MEA プレート培養

供試菌	結果	
	72時間培養	96時間培養
<i>Fusarium graminearum</i> H-7-1	<i>F.crookwellense</i> 0	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0
<i>Fusarium equiseti</i> H-6-9	<i>F.ventricosum</i> 0.67 ID 決定	<i>F.ventricosum</i> 0.87 ID 決定
<i>Fusarium semitectum</i> H-7-2	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.75 ID 決定	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.65 ID 決定
<i>Fusarium semitectum</i> H-8-4	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.42	<i>Fusarium graminearum</i> 0.38
<i>Fusarium sporotrichioides</i> H-8-2	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.62	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.63 ID 決定
<i>Fusarium moniliforme</i> HH-1-3	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.74 ID 決定	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.69 ID 決定
<i>Fusarium moniliforme</i> H-7-20	<i>Giberella subglutinans</i> 0.63	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.62 ID 決定
<i>Fusarium proliferatum</i> H-7-19	<i>F.oxisporum</i> 0.56	<i>F.sacchari</i> 0.41
<i>Fusarium proliferatum</i> H-8-9	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.56	<i>F.graminearum</i> 0.23
<i>Fusarium camptocerus</i> H-8-6	<i>F.sporotrichioides</i> var. <i>sporotrichioides</i> 0.56	<i>F.sporotrichioides</i> var. <i>sporotrichioides</i> 0.68 ID 決定
<i>Fusarium longipes</i> H-2-1	<i>F.crookwellense</i> 0	<i>F.juruanum</i> 0
<i>Fusarium subglutinans</i> (84%)	<i>F.chlamydosporum</i> var. <i>chlamydosporum</i> 0.43	<i>F.globosum</i> 0.42

()内%は分生子懸濁液の透過率を示す。

種名下の数字は SIMILARITY を示す。

②CLA 培養

供試菌	結果	
	72時間培養	96時間培養
<i>Fusarium graminearum</i> H-7-1 [92%]	<i>F.crookwellense</i> 0.32	<i>F.crookwellense</i> 0.33
<i>Fusarium graminearum</i> 横-2-1 [95%]	<i>F.crookwellense</i> 0.45	<i>F.graminearum</i> 0.33

[]内%は分生子懸濁液の透過率を示す。

表2に示したように *Fusarium* 属菌では、大部分が先に決められた形態的方法による同定名称と解析結果とは異なっていた。

この原因はデータベース作成に用いた菌株が菌株保存機関で長期間保存されてきた株であり、自然から採取してきて間もない株とは代謝の違いがある為ではないかと推測された。

Fusarium graminearum は小型分生子を作らない種で、これを他の菌種と同じように一定の分生子懸濁液の濁度(透過率75%)に合わせることは、カーネーションリーフから分生子懸濁液を作製した場合もできなかった。

BIOLOGによる同定精度を高めるためには、炭素源の組み合わせの改良と顧客の目的とする菌株範囲に特化したデータベースの構築を試みるのがよいのではないかと考えられた。

今回この試みは、BIOLOGシステムを用いて、最近厚生労働省の規制の対象となったニバレノール、デオキシニバレノールといったマイコトキシンを産生する麦汚染菌の *Fusarium graminearum* をこのシステムで簡単に同定することができないかを検討することも目的としていた。

3-3. 土壌スクリーニングと同定結果

タイ土壌から卵殻膜たんぱく分解活性の高い糸状菌が採取され、純粋分離後同定した。同定した株は *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* であった。

3-3-1. 1次スクリーニングの結果

タイ土壌9検体から57株、沖縄土壌4検体からは16株、ベトナム土壌2検体からは7株、以上合計80株が採取できた(この他にも7株検出されたが、*Trichoderma*による汚染の為使えなくなった)。

今回土壌から分離された活性を有する糸状菌は大別すると次の3グループに分けられた。

Aspergillus niger グループ/*Penicillium* グループ/*Fusarium* グループ

表3 土壌毎の採取した菌株数

土壌検体		採取株数
タイ 9検体	<i>Aniger</i> グループ	28
	<i>Penicillium</i> グループ	28
	<i>Fusarium</i> グループ	1
	合計	57
沖縄 4検体	<i>Aniger</i> グループ	11
	<i>Penicillium</i> グループ	5
	5 <i>Fusarium</i> グループ	0
	合計	16
ベトナム 2検体	<i>Aniger</i> グループ	5
	<i>Penicillium</i> グループ	2
	<i>Fusarium</i> グループ	0
	合計	7

3-3-2. 2次スクリーニングの結果

1次スクリーニングの80株を小麦フスマ固体培養により浸出液を採取し、卵殻膜分解活性の高い順に上位10株を列挙したのが次の表4である。

最も高かったのは *Fusarium* 株でありその次が *Penicillium* 株であった。また *Aspergillus* 株では低活性であった(表5)。

このように、全てタイのサトウキビ土壌由来の株(TS)に高活性株は集中していた。

表4. 酵素活性の高い10株

順位	菌 株	卵核膜分解活性 (u/mL)
1	<i>Fusarium</i> TS-12-2	531
2	<i>Penicillium</i> TS-15-5	362
3	<i>Penicillium</i> TS-17-9	212
4	<i>Penicillium</i> TS-17-5	171
5	<i>Penicillium</i> TS-17-10	170
6	<i>Penicillium</i> TS-16-10	161
7	<i>Penicillium</i> TS-17-4	144
8	<i>Penicillium</i> TS-17-7	142
9	<i>Penicillium</i> TS-17-6	123
10	<i>Penicillium</i> TS-17-8	121

各グループ毎の酵素活性を大きく3つに分けてまとめたものが次の表5である。

表5. 各グループ毎の酵素活性

卵殻膜分解活性 (u/mL)		株数
<i>Fusarium</i> グループ 1株	100以上	1
	10~100まで	0
	10以下	0
<i>Penicillium</i> グループ 35株	100以上	9
	10~100まで	3
	10以下	23
<i>Aspergillus niger</i> グループ 44株	100以上	0
	10~100まで	3
	10以下	41

3-4. スクリーニング選択株の同定

選択した糸状菌4株を純粋分離し、次の番号の5株を同定株として選択した(表6)。

表6. 各グループ毎から同定に選択した株

分 類	株の記号	
<i>Fusarium</i> グループ	TS-12-2-6	
<i>Penicillium</i> グループ	菌核なし	TS-15-5-1
		TS-15-5-2
	菌核あり	TS-17-9-2
<i>Aspergillus niger</i> グループ	TS-16-1-2	

ここで、TS-15-5株について2株同定することになった経緯について説明を付け加える。

本株は、2次スクリーニング後の純粋分離の段階で、異なる2種類の株が検出された。それ故、卵殻膜分解活性をどちらかが全く示さないようならばそれを同定対象から除外すべき可能性が生じた。

そこで純粋分離株を再度2次スクリーニングで行なった小麦フスマ固体培養の卵殻膜分解活性を調べたところ、表7のようにいずれも卵殻膜分解活性を持つことが確認された。この中ではTS-15-5-2株が最も高かった。

なお、形態観察上TS-15-5-1と-3とは、形態観察により形態が同一であったので、同定を行なう株はTS-15-5-1とTS-15-5-2の2株とした。

表7 単菌分離後のコルベシ培養の酵素活性

菌 株	活性(u/mL)
<i>Penicillium</i> TS-15-5-1	294
<i>Penicillium</i> TS-15-5-2	333
<i>Penicillium</i> TS-15-5-3	274
TS-15-5 (単菌分離前)	362

3-4-1. TS-12-2-6株

TS-12-2株は *Fusarium* 属であることが1次スクリーニングの段階で PDA スラントの顕微鏡観察で予想された。

本株は CLA 培養の気中菌糸を観察すると小型分生子を多く生じるが、その連鎖は全く認められなかった。分生子形成細胞は単純フィアライドであった。そして小型分生子は長円、紡錘形、卵形があり、大型分生子は太めの Foot cell (胞子形成細胞に付着した部分) が明確でなかった。

以上の特徴から *Fusarium oxysporum* か又は *Fusarium solani* に種は絞られた⁵⁾。さらに、小型分生子を産生する分生子柄の長さが両者の違いであるが、本株の場合は顕微鏡観察の結果 Samson 記載²⁾ *Fusarium solani* のそれと比較し、さほど長くなく、*Fusarium oxysporum* に近かった(表8)。

一方、BIOLOG の結果は表9のように *Fusarium oxysporum* を示唆していた。*F. udum*, *F. sacchari* とは生育状態と形態で明らかに異なっていた。

以上の結果、*Fusarium oxysporum* と決定した。

表8. TS-12-2-6株の生育状態と形態

観察項目	培地	観察結果
集落の直径	PDA	3.0~3.4 cm
	(25°C, 4日間) PSA	3.0~4.0 cm
集落表面の色	PDA	羊毛状, 綿状, 放射状に広がる白色菌糸
	PSA	羊毛状, 綿状
集落裏面の色	PDA	赤褐色~赤色
	PSA	赤褐色~赤紫色
プレパラート観察		
分生子柄	直径	10~14 μm
	形, 長さ	円筒形, 短い
分生子形成様式	単純フィアライド	
CLA 小型分生子を多く産生する。		
大型分生子	形	三日月型, 無色, 3~5細胞
	大きさ	30~40×4 μm
小型分生子	形	卵型, 楕円形, 無色, 単細胞性
	大きさ	4~10×2~4 μm
* CLA (カーネーションリーフ・アガー) 培養プレートの直接顕微鏡観察では気中菌糸観察して連鎖を形成しなかった。		

表9. TS-12-2-6株 BIOLOG の結果

n	48時間	72時間	96時間
1	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium udum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
	0.89	0.91	0.61
	ID 決定	ID 決定	ID 決定
2	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium udum</i>	<i>Fusarium udum</i>
	0.89	0.82	0.33
	ID 決定	ID 決定	

種名下の数値は SIMILARITY 値を示す。

3-4-2. TS-15-5-1株

TS-15-5-1は、形態観察では *Penicillium bilaii* に近かったが、*P. bilaii* の場合、輪生体が厳密に単輪生体のところ、観察した中には複輪生の輪生も容易に確認でき、孢子表面は滑面であり、*P. bilaii* とは異なっていた。

一方、BIOLOG では ID 確定ではなかったが、*Penicillium citrinum* を示唆していた。(表 11) しかし、その特徴である複輪生は割合少なく、単輪生が主であった。

P. tricolor, *P. raistrickii* 等は分生子柄が粗面であり、形態的に異なり BIOLOG で名前の上がったもの全てがあてはまらなかった。

従って以上のことから、TS-5-5-1 株は、*Penicillium* sp. と同定した。

表 10. TS-15-5-1 株の生育状態と形態

観察項目	培地	観察結果
集落の直径 (25°C, 4 日間)	CYA	2.2~2.4 cm
	MEA	1.8~2.0 cm
	YES	2.4~2.5 cm
	CZ	1.4~1.5 cm
	G25N	1.5~1.6 cm
集落表面の色	CYA	外輪郭白で中心緑, ビロード状
	MEA	外輪郭白で中心緑, ビロード状 (透明滲出液有り)
	YES	外輪郭白で中心緑, ビロード状
	CZ	外輪郭白で中心緑, ビロード状 (透明滲出液有り)
	G25N	全体白で, ビロード状
集落裏面の色	CYA	黄色
	MEA	茶褐色
	CZ20S	黄色
	CZ	茶褐色
	G25N	うすい黄褐色
集落の直径	CYA (37°C, 7 日間)	0.9~1.0cm
	CYA (5°C, 7 日間)	0 (生育なし)
酸産生の有無	CREA	なし
分生子柄	大きさ	20~40 μm
	表面	滑面
フィアライド	大きさ	8×2~3 μm
	形	とっくり型
メトレ	大きさ	12×2 μm
ペニシリ	形	大部分単輪生だが複輪生も有り
	分生子	形 球状~垂球形
	直径	2~2.5 μm
	表面	滑面

表 11. TS-15-5-1 株 BIOLOG の結果

n	結 果		
	48 時間後	72 時間後	96 時間後
1	<i>Penicillium raistrickii</i>	<i>Penicillium tricolor</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
	0.57	0.39	0.26
2	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium bilaiae</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
	0.55	0.24	0.37

種名下数値は SIMILARITY 値を示す。

ID 決定 なし。

3-4-3. TS-15-5-2株

本株の顕微鏡観察では、等しい長さの2~5本のメトレで分岐末端が構成されるのペニシリが特徴であった。また、CYAの裏の色も黄色であった。

P. citrinum と異なる特徴として MEA での集落の直径の違いがあった。すなわち、Pitt のテキスト³⁾ [14-18(22)mm と記載] に比べて大きめ (23~24mm) であった。しかし、Samson のテキスト²⁾ では範囲内 (15-24mm) となった。

一方 BIOLOG でも *Penicillium citrinum* を有力な候補として挙げていた。*Penicillium raistrickii* 及び *Penicillium bilaiae* は形態的に一致せず、また *Penicillium citreonigrum* は集落表面の色が異なっていた。

以上の結果、TS-15-5-2は形態、BIOLOG 両方法ともに *Penicillium citrinum* に一致した。

表 12. TS-15-5-2 株の生育形態と形態

観察項目	培地	観察結果
集落の直径 (25°C, 4日間)	CYA	2.0~2.7 cm
	MEA	2.3~2.4 cm
	YES	3.2~3.4 cm
	CZ	1.6~1.8 cm
	G25N	1.4~1.6 cm
集落表面の色	CYA	外輪郭白で中心緑, ビロード状
	MEA	外輪郭白で中心緑, ビロード状 (透明滲出液有り)
	YES	外輪郭白で中心緑, ビロード状
	CZ	外輪郭白で中心緑, ビロード状 (透明滲出液有り)
	G25N	全体白で, ビロード状
集落裏面の色	CYA	黄色
	MEA	茶褐色
	CZ20S	黄色
	CZ	茶褐色
	G25N	うすい黄褐色
集落の直径	CYA (37°C, 7日間)	1.0~1.2cm
	CYA (5°C, 7日間)	0 (生育なし)
酸産生の有無	CREA	なし
分生子柄	大きさ	80~100 μm
	表面	滑面
フィアライド	大きさ	8×2~3 μm
	形	とっくり型
メトレ	大きさ	12×2 μm
	形	単輪生+複輪生 (大半)
分生子	形	球状~亜球形
	直径	2~2.5 μm
	表面	滑面

表 13. TS-15-5-2 株 BIOLOG の結果

n	結 果		
	48 時間後	72 時間後	96 時間後
1	<i>Penicillium raistrickii</i> 0.41	<i>Penicillium citrinum</i> 0.60	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> 0.19
	<i>Eupenicillium euglaucum</i> (ana. <i>Penicillium citreonigrum</i>) 0.75 ID 決定	<i>Penicillium bilaiae</i> 0.45	<i>Penicillium citrinum</i> 0.66 ID 決定

種名下数値は SIMILARITY 値を示す。

3-4-4. TS-16-1-2株

TS-16-1株は *Aspergillus niger* グループの糸状菌であることは1次スクリーニングの段階でPDA スラントの顕微鏡観察で予想された。

表にアンダーラインで示した MEA と CZ での伸長が Klich の記載⁴⁾に比べ短い点が異なっていた。

以上形態観察の結果では *Aspergillus niger* と判断したが, *Aspergillus awamori* の可能性もあった。

一方, BIOLOG の結果では *Aspergillus niger* を支持していた。*Aspergillus phoenicis* は孢子直径3.0~3.5 μm と小さい点で異なっていた。

Aspergillus 属 Section *nigri* に属する *Aspergillus awamori* と *Aspergillus niger* との違いは孢子の粗面/滑面が同定上分岐点であり⁴⁾, その他の明確な線引きが困難な種同士であることが改めて認識された。

表 14. TS-16-1-2株の生育状態と形態

観察項目	培地	観察結果	
集落の直径 (25°C, 7日間)	CYA	6 cm	
	MEA	3.0~4.0 cm	
	CZ20S	6 cm以上	
	CZ	3.6~3.7 cm	
集落の直径 (37°C, 7日間)	CYA	6 cm以上	
	集落表面の色	CYA	黒 粉状, 羊毛状
		MEA	黒 粉状, 羊毛状
		CZ20S	黒 粉状, 羊毛状
CZ		黒 粉状, 羊毛状	
集落裏面の色	CYA	やや黄色	
	MEA	なし	
	CZ20S	なし	
	CZ	なし	
分生子柄	大きさ	1200~2000 μm	
	表面	滑面	
頂のう	直径	20~60 μm	
	形	球状	
Serialation:		biseriate	
分生子	形	球状	
	直径	3~6 μm	
	表面	粗面~細かな粗面	

表 15. TS-16-1-2株 BIOLOG の結果

n	結 果		
	48時間後	72時間後	96時間後
1	<i>Aspergillus sepultus</i>	<i>Emericella striata</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	0.65	0.40	0.71 ID 決定
2	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus phoenicis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	0.45	0.66 ID 決定	0.88 ID 決定

種名下数値は SIMILARITY 値を示す。

3-4-5. TS-17-9-2株

TS-17-9株は、*Penicillium*であることが1次スクリーニング後のPDAスラントの顕微鏡観察で予想されていた。

形態観察の結果、1週間培養したMEA培地上で、顕微鏡観察すると楕円形Hulle細胞に似た細胞が覆う菌核とみられる楕円形組織が見られた。また、1ヶ月間培養してもプレート培地上に閉子嚢殻の形成は見られなかった。その為、これは*Eupenicillium*ではなくSclerotigenic *Penicillium*であること示唆された。Pittの記載³⁾の中では、*Penicillium donkii*が形態的に近かったが、*P. donkii*はペニシリが厳密に単輪生でなくてはならないのに対し、本株では複輪生も見られ、異なっていた。

菌核形成性のSclerotigenic *Penicillium*は、その他に*P. sclerotiorum*, *P. simplicissimum*, *P. turbatum*, *P. sclerotigenum*, *P. raistrickii*などがあるが、分生子柄表面や生育性状等から、いずれも本株とは異なっていた。

一方、BIOLOGでは表17のようにID決定に至らず、*P. raistrickii*, *Eupenicillium brefeldianum*, *Eupenicillium javanicum*を示唆していた。その中で、*E. brefeldianum*及び*E. javanicum*ではCYA37°Cでの生育ありとされているが、この株は生育が見られず閉子嚢殻も形成されなかった。菌核形成性の*P. raistrickii*は、分生子柄表面が粗面とPittの記載³⁾にある為、異なっていた。

以上のように両手法ともに確信をもつに至らず、本株は*Penicillium* sp.と同定した。

表16. TS-17-9-2株の生育状態と形態

観察項目	培地	観察結果
集落の直径 (25°C, 7日間)	CYA	6 cm
	MEA	3.0~4.0 cm
	YES	6 cm以上
	CZ	3.6~3.7 cm
	G25N	1.6~1.7 cm
集落表面の色	CYA	全体白色, 中心緑色, ビロード状
	MEA	全体白色, 中心緑色, ビロード状
	YES	全体白色, 中心黄色, 綿状
	CZ	全体灰緑色, ビロード状
	G25N	全体白色, ビロード状
集落裏面の色	CYA	灰褐色
	MEA	—
	CZ20S	—
	CZ	白~褐色
	G25N	—
集落の直径	CYA (37°C, 7日間)	0
	CYA (5°C, 7日間)	0
酸産生有無	CREA	あるが弱い
菌核	直径	80~160 μm
分生子柄	大きさ	60~160×2~3 μm
	表面	滑面
フィアライド	大きさ	6~10×3~4 μm
	形	角ばったとっくり型
ペニシリ	形	単輪生, 複輪生ともあ
分生子	形	球状~垂球形
	直径	1.5~2.0 μm
	表面	滑面

表17. TS-17-9-2株 BIOLOG の結果

n	結 果		
	48時間後	72時間後	96時間後
1	<i>Penicillium simplicissimum</i> 0.39	<i>Penicillium simplicissimum</i> 0.23	<i>Penicillium raistrickii</i> 0.45
2	<i>Eupenicillium brefeldianum</i> 0.39	<i>Penicillium raistrickii</i> 0.60	<i>Eupenicillium m javanicum</i> 0.53

種名下数値はSIMILARITY値を示す。

ID 決定 なし。

IV. まとめ

1. 本学において2種類の同定手法、すなわち①糸状菌の形態観察による方法および②BIOLOG システムによる同定法を一戸正勝教授に指導のもとで修得することができた。
2. *Fusarium* 株について BIOLOG での同定結果を調べたところ、形態学的に決定した名称と一致することはなかった。
3. 卵殻膜分解能を指標に1次スクリーニングにより80株の糸状菌株を採取し、そして2次スクリーニングの結果をもとに5株の同定を行なった。
その結果は表18のように、5株中3株までの種名を決定した。しかし、他の *Penicillium* 2株は、属名止まりで種名(種形容名)を決定できなかった。

表18. 同定結果とその卵殻膜分解活性

Strain No.	同定結果	卵殻膜分解活性(U/mL)
TS-12-2-6	<i>Fusarium oxysporum</i>	5 3 1
TS-15-5-1	<i>Penicillium</i> sp.	2 9 4
TS-15-5-2	<i>Penicillium citrinum</i>	3 3 3
TS-16-1-2	<i>Aspergillus niger</i>	4 3
TS-17-9-2	<i>Penicillium</i> sp.	2 1 2

終わりに、懇切丁寧な御指導を頂きました本学栄養学科食品衛生学第2研究室の一戸正勝教授に厚く御礼申し上げます。

また、BIOLOG の操作方法を直接御指導頂きました GSI クレオス(株)社の福井謙一主任と新井亜希子氏に御礼申し上げます。

VI. 引用文献

1. 宇田川俊一・椿啓介 他：菌類図鑑(上・下) 講談社サイエンスフィク, 1979
2. R.A.Samson, E.S.Hoekstra, J.C.Frisvad, O.Filtenborg : Introduction to food-and Airborne fungi (6thEdition) (CBS) Utrecht, The Netherland, 2000
3. J.I.Pitt : The Genus *Penicillium*, Academic Press Inc., London, 1979
4. M.A.Klich : Identification of common *Aspergillus* species(CBS)Utrecht, The Netherland, 2002
5. 厚生省生活衛生局編：食品衛生検査指針微生物編, 社団法人日本衛生協会, 東京, 1990