

食品品質プロフェッショナルズ 講習会

千里山コミュニティセンター 2026年6月25日(木)

『食品製造や室内環境で問題になるカビの検査方法』

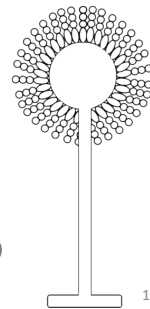
～カビの基礎知識、培養、同定方法～

株式会社テクノスルガ・ラボ

技術部 喜友名 朝彦 (tk_1014@tecsrg.co.jp)



株式会社テクノスルガ・ラボ
TechnoSuruga Laboratory Co.,Ltd.



1

自己紹介（略歴） き ゆ な と も ひ こ 喜友名 朝彦

- 1999年 琉球大学理学部生物学科卒業
- 2003年 琉球大学理工学研究科
海洋自然科学専攻(修士課程)修了
「沖縄の菌類相調査(きのこ、カビ)、マングローブ植物基質の分解菌類調査」
- 2003年 株式会社エヌシーアイエムビージャパン入社
(現在の株式会社テクノスルガ・ラボ)
- 2013年 筑波大学生命環境科学研究科 論文博士 博士(農学)
「Polyphasic Analysis of the Fungal Biodeterioration of Mural Paintings and Plaster Walls of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli, Nara, Japan
高松塚・キトラ両古墳における壁画・漆喰壁の菌類による生物劣化の多相的解析」

- ・現在: 株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部 同定課 主席研究員
- ・職務内容: 菌類(カビ・酵母・きのこ)の分離培養・同定、微生物株(細菌、菌類)の保存
- ・専門(研究分野): 菌類系統分類学

2

株式会社テクノスルガ・ラボの紹介

- ・ 1997年創業（エヌシーアイエムビー・ジャパン）
- ・ 英国NCIMB研究所と技術提携
- ・ **「微生物同定専門」の受託分析会社**としてサービス開始
（当時、民間企業で国内唯一）
- ・ 微生物の新種提唱などに関する**各種微生物試験サポート**
- ・ 食品や製菓メーカー様の衛生管理や基礎研究のための微生物試験などをサポート
- ・ 微生物に関する学術的研究の推進、サポート
- ・ 取引先：医薬・化粧品、食品・飲料・生活用品、製造（化学、その他）、
大学・公的研究機関



微生物同定試験 （細菌・カビ・酵母）

衛生管理向け
研究向け
形態観察
生理・生化学性状
分離・培養
DNA解析
MALDI / IR-Biotyper

群集構造解析 （生体・環境） 理化学分析

アンプリコンシーケンス
T-RFLPフローラ
リアルタイムPCR
糞便理化学分析

製品販売 技術提供

糞便採取キット
微生物同定システム[ENKI]
微生物株保存品作製
（アンプル）

テクニカルトレーニング

3

内容

講義

1. カビの基本的な特徴
 - 1-1. 基本的な特徴：形態、生活環
 - 1-2. カビの増殖に影響を与える要因
 - 1-3. カビの分類～系統分類学的位置
2. カビ検査に必要な機器・器具類、培地および分離培養法
3. 食品製造や室内環境で問題となるカビの種類と特徴
 - 3-1. 好乾性カビ
 - 3-2. 耐熱性カビ
 - 3-3. カビ毒（マイコトキシン）産生カビ
4. カビの同定方法
 - 4-1. 形態観察による同定法
 - 4-2. DNA塩基配列解析およびMALDI-TOF MS法による同定法
 - 4-3. 現場における実践的な同定法

実習～カビの形態観察法の実践～簡易的な顕微鏡観察方法～

1. カビの取扱い方法について
2. コロニー性状観察
3. 形態観察～プレパラート作製および顕微鏡観察方法

4

4

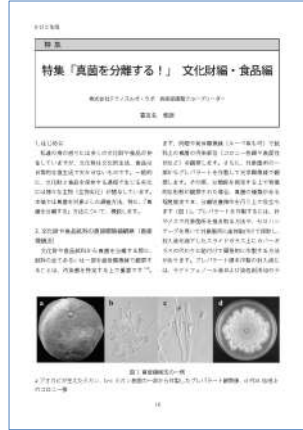
参考資料



参考資料1
微生物の見分け方、ダニ汚染
喜友名 (2023a)



参考資料2
カビのプレパラート作製
喜友名 (2023b)



参考資料3
カビの分離培養について
喜友名 (2020)

参考資料

【参考資料】 2025.11.26

食品・室内環境から検出される代表的なカビの特徴および形態

- *Aspergillus*属 (コウジカビ)
- *Penicillium*属 (アオカビ)
- *Fusarium*属
- *Cladosporium*属 (クロカビ)
- *Geotrichum*属
- *Aureobasidium*属 (黒色酵母の仲間)
- *Exophiala*属 (黒色酵母の仲間)
- *Alternaria*属 (スカビ)
- *Epicoccum*属
- *Phoma*属
- *Wallemia*属 (アズキイロカビ、好乾性カビ)
- *Eurotium*属 (*Aspergillus*属、好乾性カビ)

食品製造や室内環境で問題になるカビの検査方法
＜主要参考文献一覧＞

書名	発行年	著者	出版社	巻数
1. 微生物検査法およびカビの検出・培養・同定の基礎的な技術 (初心者向け)				
1-1. 微生物検査法				
① 微生物検査法	2019	日本微生物学会編	日本微生物学会	第10版
② 食品微生物検査法	2019	食品微生物検査法編纂委員会編	食品微生物検査法編纂委員会	第10版
③ 食品微生物検査法	2019	食品微生物検査法編纂委員会編	食品微生物検査法編纂委員会	第10版
④ 食品微生物検査法	2019	食品微生物検査法編纂委員会編	食品微生物検査法編纂委員会	第10版
1.2. カビの検出・培養・同定の基礎的な技術 (初心者向け)				
① 食品微生物検査法	2019	食品微生物学会編	日本微生物学会	第10版
② 食品微生物検査法	2019	食品微生物学会編	日本微生物学会	第10版
③ 食品微生物検査法	2019	食品微生物学会編	日本微生物学会	第10版
④ 食品微生物検査法	2019	食品微生物学会編	日本微生物学会	第10版
2. カビの検出・培養・同定の基礎的な技術 (初心者向け)				
① 食品微生物検査法	2019	食品微生物学会編	日本微生物学会	第10版
② 食品微生物検査法	2019	食品微生物学会編	日本微生物学会	第10版
③ 食品微生物検査法	2019	食品微生物学会編	日本微生物学会	第10版
④ 食品微生物検査法	2019	食品微生物学会編	日本微生物学会	第10版

参考資料5: 主要参考文献

参考資料4: 代表的なカビ図版

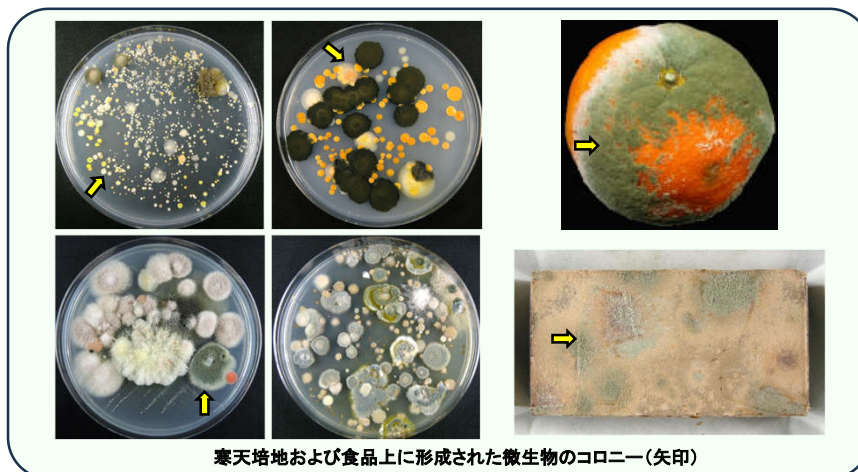
1. カビの基本的な特徴

- 1.1. 基本的な特徴: 形態、生活環
- 1.2. カビの増殖に影響を与える要因
- 1.3. カビの分類～系統分類学的位置

7

7

1.1. 基本的な特徴



肉眼で「菌」が生えていると認識している“モノ”

→ **「コロニー colony」**(微生物細胞の集合体)

8

8

【微生物の定義】

- 微小で、肉眼では観察できないような生物に対する便宜的な総称(顕微鏡による観察が必要となる)
- 全ての原核生物(細菌・藍色細菌・古細菌)と真核生物の一部(菌類・微細藻類・原生生物)、ウイルスなどを
含む

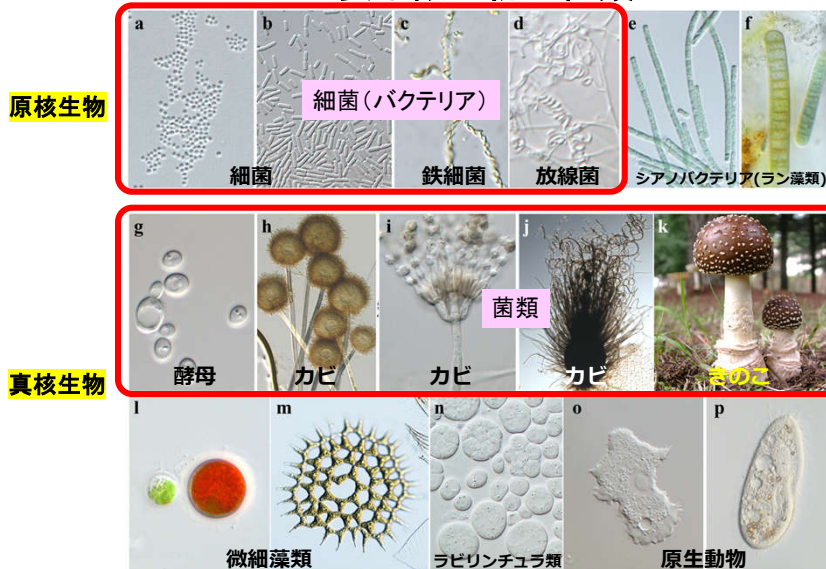
(岩波生物学辞典第5版, 2013)



9

9

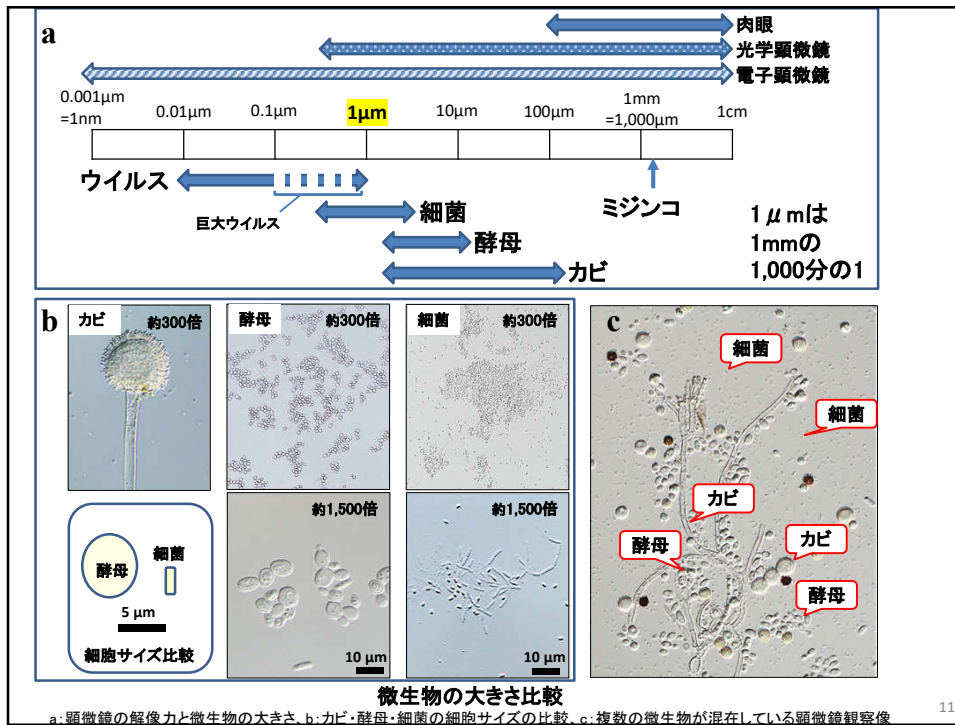
主要な微生物の種類



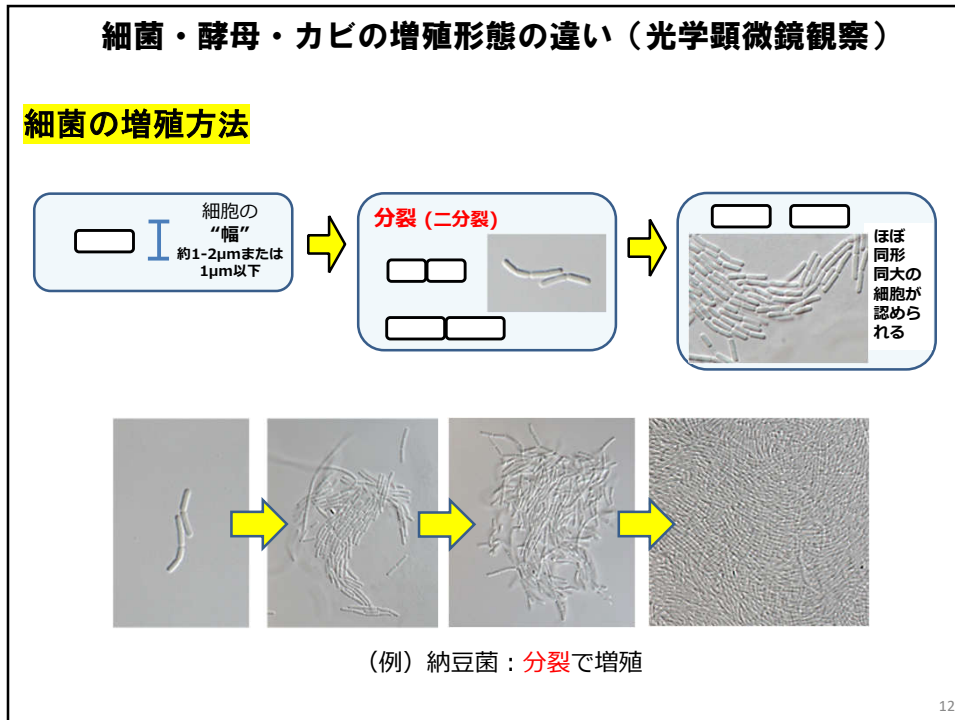
(a-f 原核生物, g-p 真核生物: a-b 細菌, c 鉄細菌, d 放線菌, e-f シアノバクテリア, g-k 菌類 (g 酵母, f-j カビ, k きのこ), l-m 微細藻類, n ラビリンチュラ類, o-p 原生動物), a *Staphyrococcus aureus*, b *Bacillus subtilis*, c *Gallionella ferruginea*, d *Streptomyces* sp., e-f *Oscillatoria* spp., g *Saccharomyces cerevisiae*, h *Aspergillus niger*, i *Penicillium* sp., j *Chaetomium* sp., k *Amanita* sp., l *Haematococcus* sp., m *Pediastrum* sp., n *Aurantiochytrium* sp., o アメーバ類 *Acanthamoeba* sp., p ソウリムシ類 *Paramecium* sp. (喜友名・立里 2022を改変)

10

10



11



12

酵母の増殖方法

細胞の“幅” 約2μm以上

出芽

娘細胞

母細胞

出芽痕

培養初期は大きさが異なる細胞が混在し、培養後期はほぼ同形同大の細胞が認められる

(例) パン酵母：出芽で増殖

コロニー形成

出芽

酵母コロニーの寒天培地表面の発達段階模式図(側面図)

→ 酵母と細菌のコロニーは、基質(寒天培地など)の表面上に生育する

13

カビの増殖方法

胞子が基質に付着

胞子発芽 → 菌糸伸長

菌糸の集合体(菌糸体)を形成 → コロニー形成(肉眼で認識可)

菌糸伸長

色素/カビ毒産生

基質(栄養源)

分解酵素

栄養吸収

栄養源を細かく分解(例：多糖→単糖)

胞子(分生子)

胞子(分生子)形成細胞

分生子柄(柄)


菌糸体

(例)アオカビPenicillium属の形態模式図

→ カビの菌糸体は基質(寒天培地など)の表面～内部まで伸長する(立体的にコロニー形成)

14

微生物(細菌・酵母・カビ)の簡易的な判別法



接眼レンズは15倍(または10倍)

対物レンズ10倍

コロニー周縁部観察像(接眼レンズからの観察視野)
(例: 観察倍率150倍 = 接眼レンズ15倍 × 対物レンズ10倍)

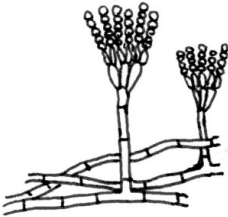
細菌	酵母	カビ
細胞の形は判別困難 コロニー周縁部の内側(写真の左側)に何かしらの物質が詰まっているのが分かる程度で、細胞の形までは判別困難	細胞の形は判別可能 コロニー周縁部の内側(写真の左側)に、形が判別できる大きさの粒状の細胞が詰まっている様子が分かる	糸状細胞が判別可能 コロニー周縁部は糸状の細胞(菌糸)が櫛状に並んでいる様子が分かる
この観察方法だと、細胞サイズが大きい細菌の場合、細菌なのか酵母なのかの判断に迷う場合がある。その場合は、プレパラートを作製して高倍率で細胞形態の顕微鏡観察を行う必要がある。		放線菌の成熟したコロニーを観察すると、カビのような菌糸が観察できるが、放線菌の菌糸はカビよりもひと回りも細い(幅が1μm以下)ことから、ある程度識別可能である。

光学顕微鏡を用いた微生物コロニー周縁部の観察方法(左)および識別ポイント(右)
(参考資料1-喜友名2023a参照) 15

15

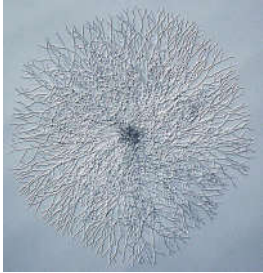
カビとは？

- ・菌類(きのこ、酵母)の仲間
- ・基本構造が“菌糸体”
- ・胞子で増殖

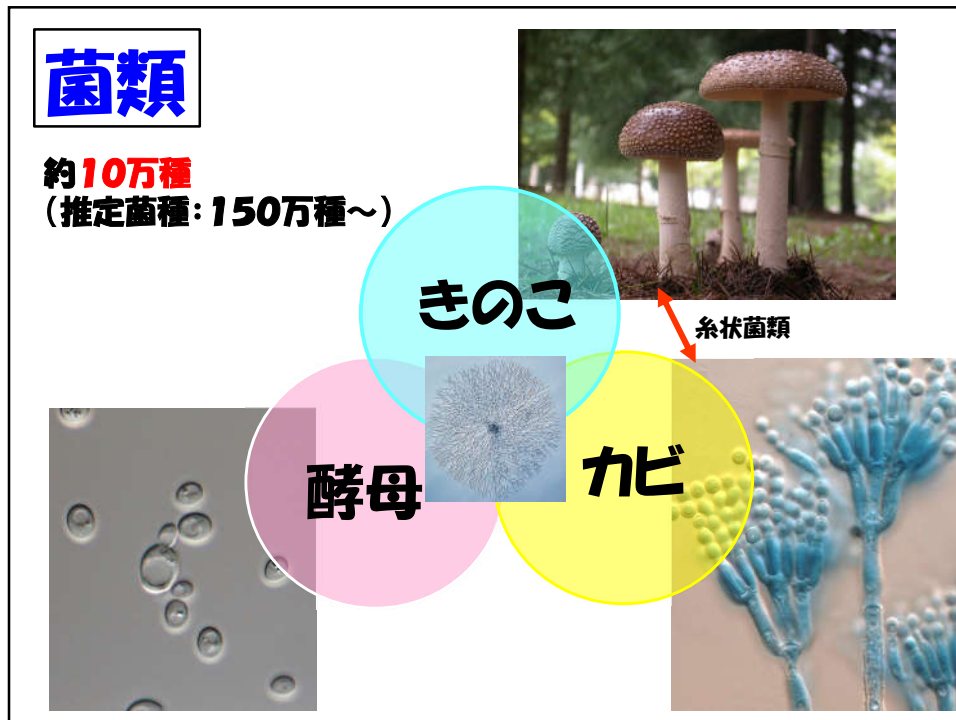


カビの胞子 = 細菌の胞子(芽胞)

- ・必ずしも耐久性のある構造ではない。
- ・無性/有性胞子がある。
- ・有性胞子～担子胞子、子嚢胞子、接合胞子など
- ・無性胞子～分生子、孢子嚢胞子、厚膜胞子など
- ・一般的にカビの胞子は“分生子”を指す。



16

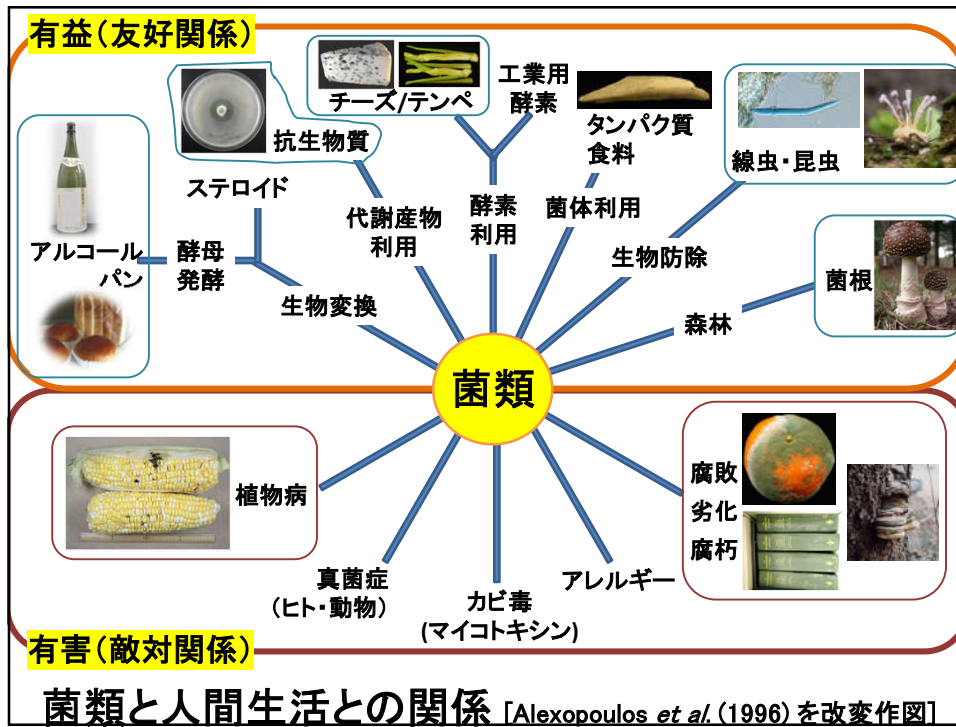


17

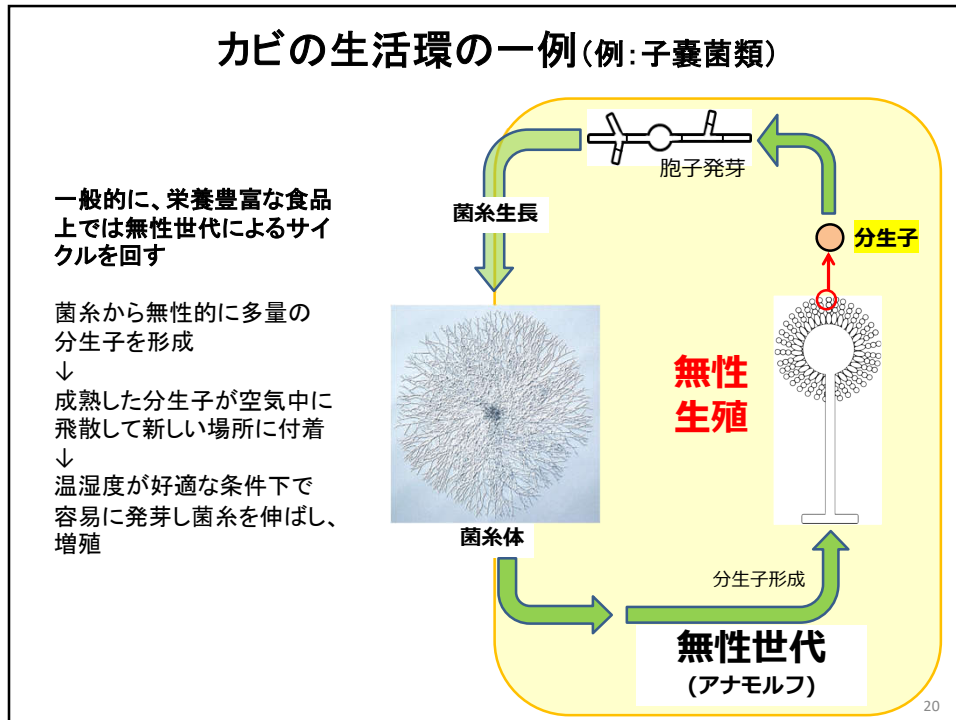
- カビ・きのこ・酵母は形態的特徴による便宜的なグループであり、分類学的な分け方でない。

グループ	形態的特徴	特徴 (人間生活における有益(O)、有害(x))
カビ	菌糸・胞子による増殖 細胞の大きさ(約1~数10(-100) μm) 集合体は肉眼で識別可能	○抗生物質などの人間生活に有用な代謝産物の産生 ×カビ毒や人の病原菌ともなる
きのこ	菌糸・胞子による増殖 肉眼で識別できる子実体(きのこ:菌糸の集合体)を形成する	○きのこそのものが食用となる ○人間生活に有用な代謝産物の産生や有害物質の分解 ×木材建築物の腐朽(分解・劣化)
酵母	出芽による増殖 (一部、分裂or菌糸形成) 細胞の大きさ(約1~5 μm) 集合体は肉眼で識別可能	○発酵食品の代表生物 ○人間生活に有用な代謝産物の産生 ×人の病原菌ともなる種類も含まれる

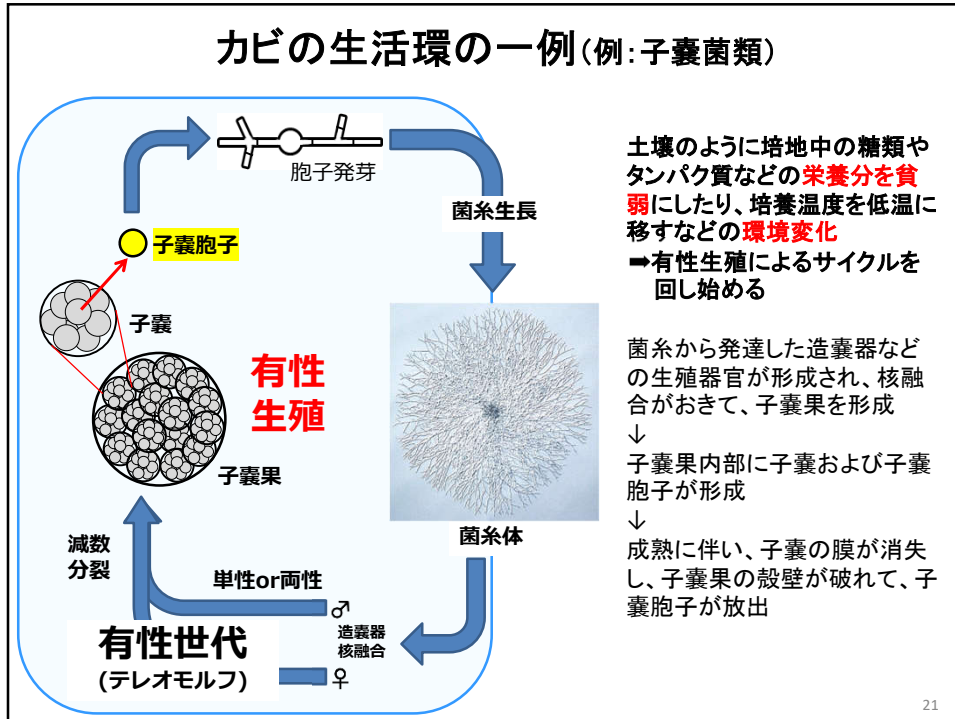
18



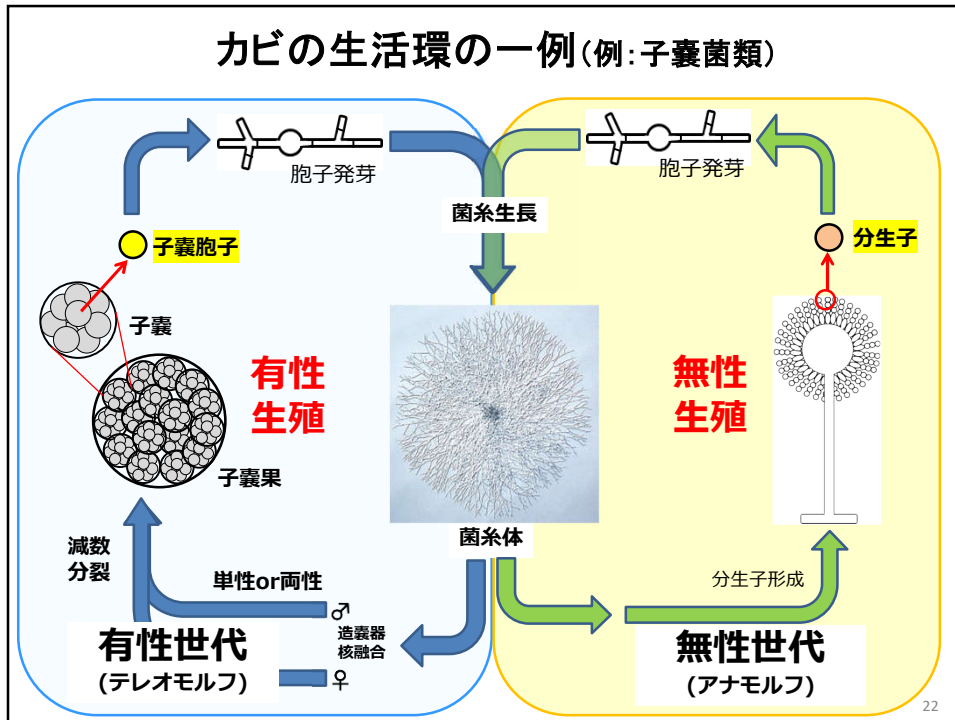
19



20



21



22

1.2. カビの増殖に影響を与える要因

物理・化学的因子	温度 湿度、水分活性 浸透圧 光線・放射線 圧力 水素イオン濃度 (pH) 水分活性 酸素
栄養的因子	栄養素 (炭素源、窒素源) 無機塩 (リン、マグネシウム、硫黄、亜鉛など) 微量元素 ビタミン
生物的因子	共生 生物間干渉 拮抗

23

温度

微生物の増殖は温度に依存することが多く、それぞれの微生物は一定の生育温度範囲および至適生育温度がある。

生育する最も低い温度を最低温度、生育の速度が最も速くなるのは至適温度、生育する最も高い温度を最高温度という。最低温度から最高温度の間は微生物の生育温度範囲であり、最も良い生育を示す範囲が至適温度になる。一般的に微生物の至適生育温度は生育温度範囲の中間から、少し高い温度となることが多い。

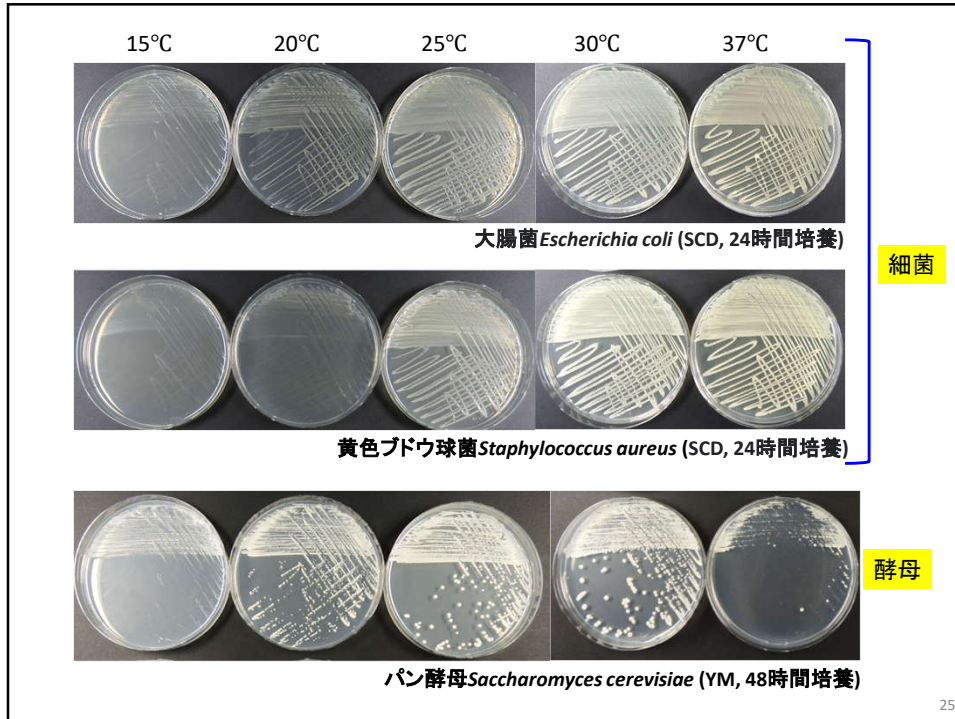
最適増殖温度域に基づく分類 (高鳥ら, 2016をもとに作成)

	生育温度範囲(至適生育温度)
低温菌 (psychrophile)	0~20°C (15~20°C)
中温菌 (mesophile)	15~45°C (25~40°C)
高温菌 (thermophile)	40~75°C (50~60°C)

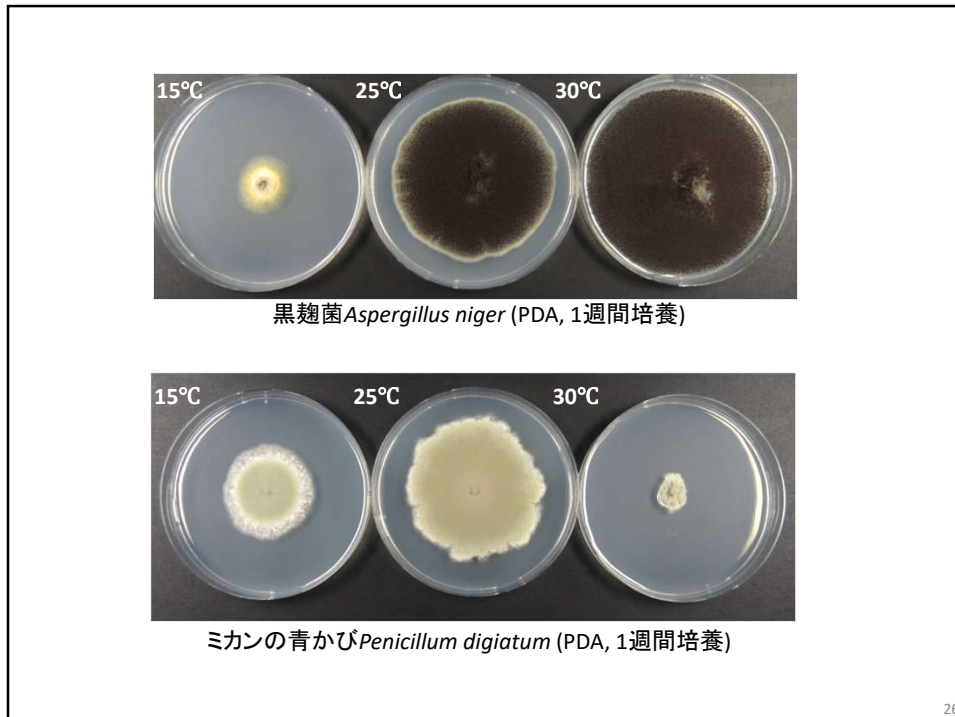
一般的な生育温度帯

微生物	生育温度範囲	生育特性
細菌	30~37°C	
酵母	25~30°C	30°C以上では生育が鈍くなることが多い
カビ	20~25°C	→ ヒトや動物の病原性カビ・酵母は37°Cで生育良好なことが多い

24



25



26

湿度

湿度は、気圏中の水蒸気濃度や割合で、通常は気圏中の水蒸気分圧をその温度の飽和水蒸気圧で割った飽和%（**相対湿度、%RH**）で示す。
水分は微生物の代謝、細胞形態の維持などに必要となる。

生育する相対湿度に基づく分類（高島ら, 2016をもとに作成）

相対湿度	乾湿	主な微生物
100%	絶対好湿性(水分環境を好む)	細菌や酵母の大部分
90%	好湿性(湿っぽい環境)	一般的なカビ(クロカビ、ススカビなど)
80%	耐乾性/中湿性(やや乾燥気味な環境)	一般的なカビ(コウジカビ、アオカビなど)
70%	好乾性(乾燥した環境)	カワキコウジカビ、ワレミアなど

→カビ・酵母は乾燥した環境でも生育できる種類が多い

27

27

水素イオン濃度pH

微生物の増殖にはそれぞれ増殖可能な範囲および最も適したpHがある。微生物の生息環境などにもよるが、一般に多くの微生物が増殖できる至適pHは中性（pH7.0）付近にある。

一般的な微生物の増殖pH域

一般細菌	pH5.0～pH9.0(至適pH7.0～8.0)
乳酸菌	pH3.3～pH8.0(至適pH5.5～6.6)
カビ・酵母	pH2.0～9.0(至適pH4.0～6.0)

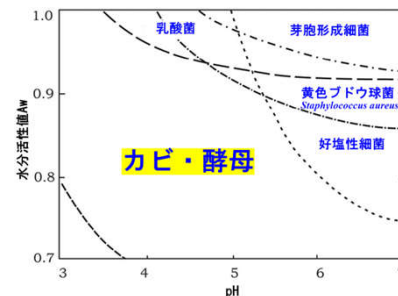
→弱酸性域で生育可

水分活性 (Aw, water activity)

基質に微生物が利用できる水分がどの程度含まれているかなどの指標値
完全に乾燥した基質は0、純粋は1
Aw1.00が相対湿度100%に相当する
食品業界で用いられることが多い

一般的な微生物の生育に必要な最低限の水分活性値

細菌	0.90以上
酵母	0.88以上
カビ	0.80以上



主な微生物(細菌と菌類)の増殖と水分活性値AwとpHとの関係 (Pitt & Hocking 2009を改変) 28

28

酸素

微生物の増殖における酸素の要求性はさまざまであり、増殖に酸素が必要な**好気性菌**と酸素を必要としない**嫌気性菌**に大きく分けられ、さらに酸素の要求性の度合いに応じて以下のように分類される。

→ 一般的に細菌と酵母は酸素が少ない条件下でも生育できる
カビの生育には酸素が必要

微生物増殖と酸素要求度に伴う分類

	増殖時の 酸素 の必要性	代表例
偏性好気性菌 obligate aerobe	必須 (酸素存在下で生育)	枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i> 、 緑膿菌
好気性菌 aerobe	酸素存在下で増殖 (無酸素条件下では増殖不能)	酢酸菌 大部分の菌類 (カビ・酵母)
微好気性菌 microaerophile	少量の酸素存在下で増殖 大気中よりも低い酸素濃度 (約20%) 以下で生育	ピロリ菌
通性嫌気性菌 facultative anaerobe	あってもなくても増殖可能 酸素存在の有無に応じて好氣的/嫌氣的代謝を行う	酵母 、大腸菌、乳酸菌、 ブドウ球菌
嫌気性菌 anaerobe	不必要 無酸素条件下で増殖	破傷風菌、ボツリヌス菌
偏性嫌気性菌 obligate anaerobe	忌避/酸素の存在で死滅 (無酸素条件下で増殖)	<i>Clostridium</i> 属など メタン生成菌

29

29

1.3. カビの分類～系統分類学的位置

分類とは…

分類形質によって各分類群の限界を定め、定義し、分類群を体系化する**帰納的**
(低次から高次分類群へ) 作業のこと

分類学 taxonomy とは…

① 分類 classification

単位を群の中に秩序正しく配列すること

② 命名 nomenclature

①分類によって定義された単位に名前を付けること

③ 同定 identification

①分類/②命名によって定義され「命名」された単位により未知のものを「同定」すること

Cowan ST & Hill LR (ed.)(1978)/ 駒形ら 訳(1998)

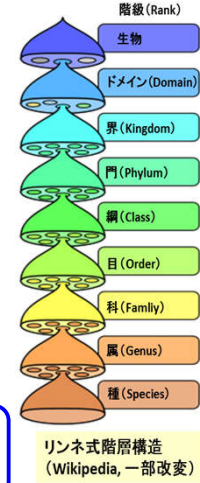
30

30

生物の分類の階層構造

～リンネの階層(7階層)+最上位の階級(ドメイン)

階級	学名(例: 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i>)
ドメイン domain	真核生物 (Domain Eukaryota)
界 kingdom	菌類界 (Kingdom Fungi)
門 phylum	子囊菌門 (Phylum Ascomycota)
綱 class	ユーロチウム (エウロチウム) 綱 (Class Eurotiomycetes)
目 order	ユーロチウム (エウロチウム) 目 (Order Eurotiales)
科 family	マユハキタケ科 (Family Trichocomaceae)
属 genus	<i>Aspergillus</i> 属 (Genus <i>Aspergillus</i>)
種 species	<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) Cohn, 1884

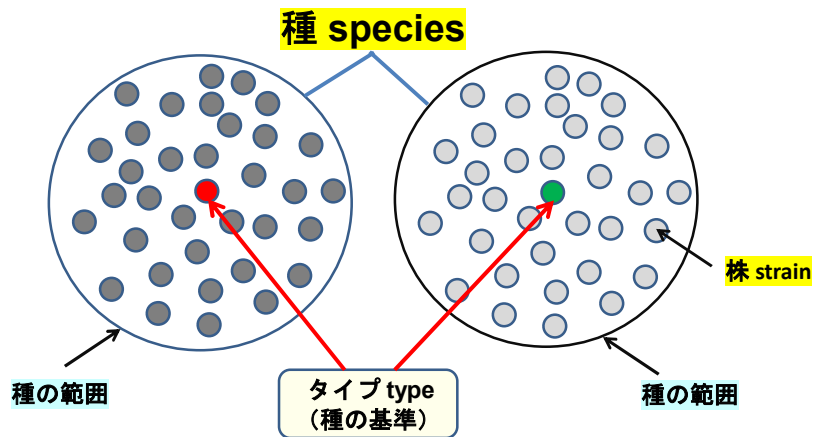


→分類体系の基本的な単位は、「種」

一般的な微生物同定は「属」あるいは「種」

31

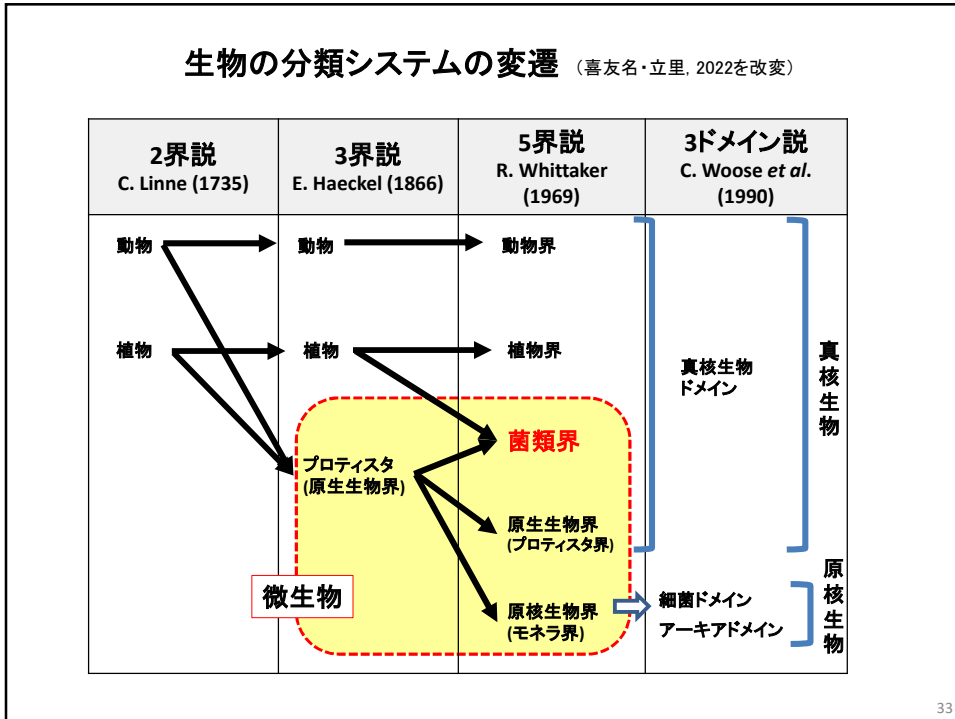
微生物の種同定には、対象種のタイプとの比較が重要！



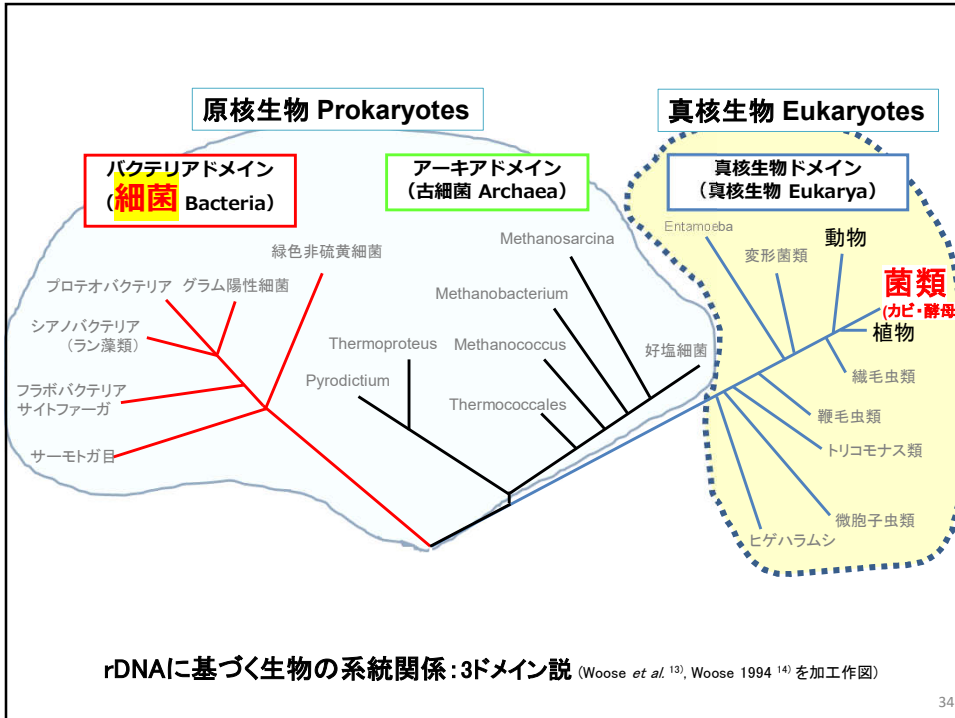
細菌・酵母	基準株 type strain
カビ・きのこ	タイプ/基準標本 type specimen タイプ由来株 ex-type strain

(注意)「種」の基準および範囲の考え方、「種」の基準となるタイプの呼称は微生物の種類によって異なる 32

32



33



34

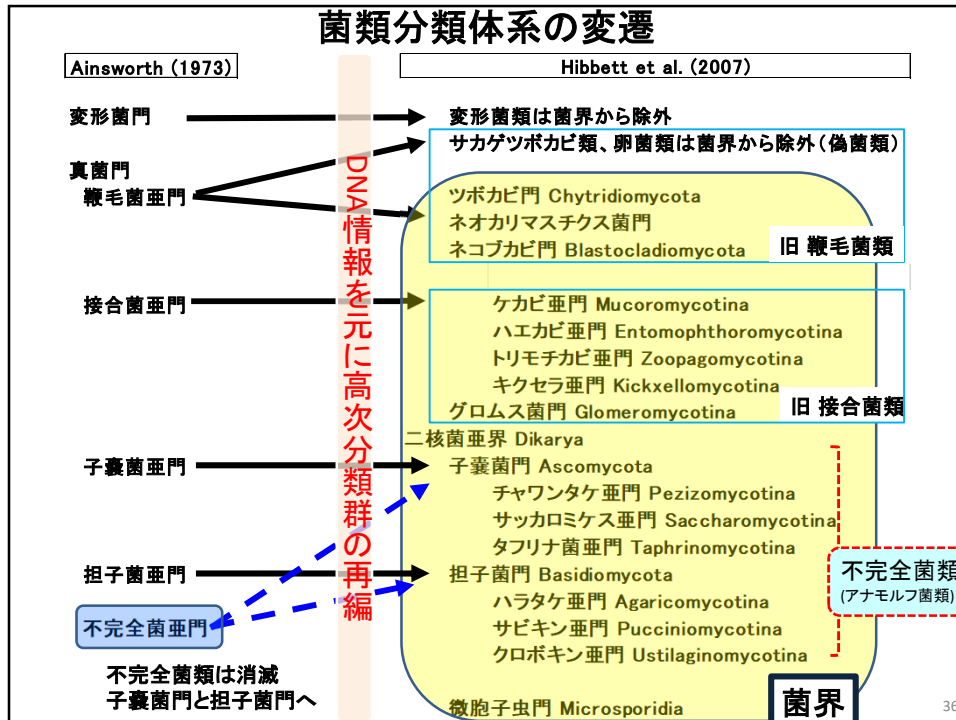
Ainsworth体系における菌類の高次分類群の特徴

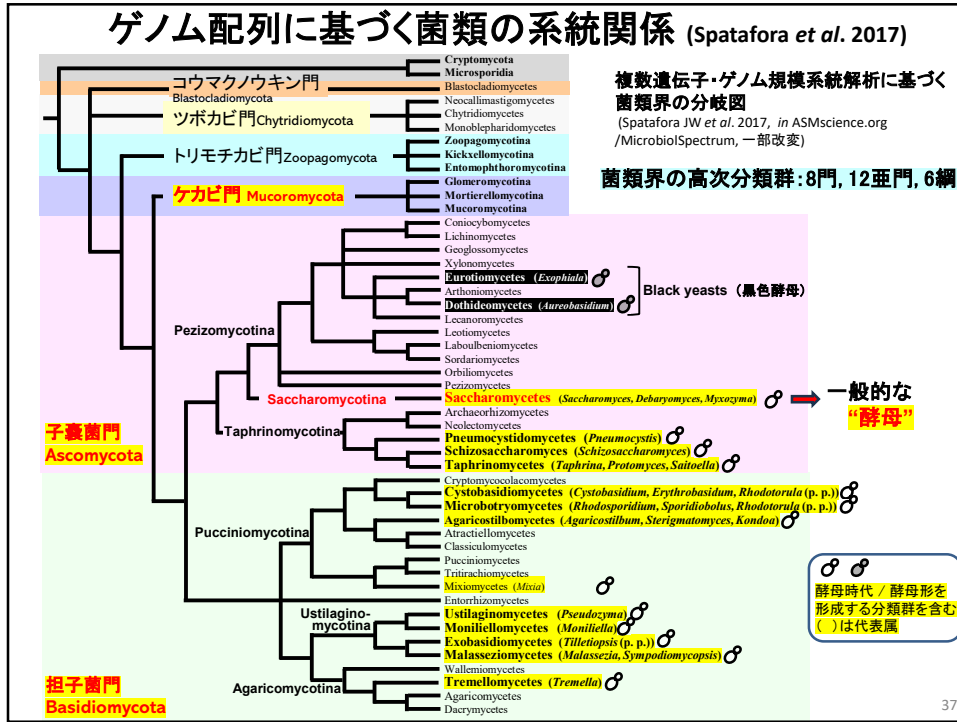
真菌門 Eumycota						
	変形菌門 Myxomycota	鞭毛菌亜門 Mastigomycotina	接合菌亜門 Zygomycotina	子嚢菌亜門 Ascomycotina	担子菌亜門 Basidiomycotina	不完全菌亜門 Deuteromycotina
無性生殖	遊走子	遊走子 遊走子のう	胞子のう	分生子柄 分生子 スポロトキア	菌嚢胞子 さび胞子 葉胞子嚢	
有性生殖	遊走子接合	遊走子接合 卵胞子	接合胞子	子のう殻 子のう座 子のう殻 子のう座	菌嚢胞子 不生子 担子 担子嚢	未詳
栄養体(菌体)	変形体 (アメーバ様)	菌糸・隔壁無 多核	菌糸・隔壁無 多核	菌糸・隔壁有	菌糸・隔壁有	菌糸・隔壁有
細胞壁	無(未詳)	卵殻膜 キチン グルカン	キチン グルカン	キチン グルカン	キチン グルカン	キチン グルカン
リ合ジ成ン系	アミノア ジピン酸?	アミノア ジピン酸 ジアミノ ジピン酸 ビメリン酸	アミノア ジピン酸	アミノア ジピン酸	アミノア ジピン酸	アミノア ジピン酸

形態的特徴に基づく分類

図出典：久能均他著. 1999. 新編植物病理学概論. 養賢堂.

菌類分類体系の変遷





37

食品製造で問題となるカビの 分類学的位置づけ

- ・ケカビ門 (旧: 接合菌類)
 - ・子嚢菌門
 - ・担子菌門
- } 無性世代は
“アナモルフ菌類(不完全菌類)”
と呼ばれることが多い
➡ 検出されるカビ・酵母の大部分は無性世代

38

38

【参考情報】カビの名称(俗名)

1. カビのコロニーを肉眼的に見た際の色調、に由来
→クロカビ、アオカビ、アカカビ、アズキイロカビなど
2. 生えた状態がどのように見えるか、何に似ているか、主な発生源など、に由来
→ケタマカビ(毛玉のように見える)、ケカビ(毛のように見える)
クモノスカビ(クモの巣のように見える)、ミルク腐敗カビ(乳原料、製品に多い)

分類群(門)	学名(属名)	俗名
接合菌類	<i>Absidia</i>	ユミケカビ
	<i>Mortierella</i>	クサレケカビ
	<i>Mucor</i>	ケカビ
	<i>Rhizopus</i>	クモノスカビ
	<i>Syncephalastrum</i>	ハリサシカビモドキ
	<i>Thamnidium</i>	エダカビ
子のう菌類	<i>Chaetomium</i>	ケタマカビ
	<i>Eurotium</i>	カワキコウジカビ
	<i>Monascus</i>	ベニコウジカビ
	<i>Neurospora</i>	アカパンカビ

39

39

分類群(門)	学名(属名)	俗名
“不完全菌類”	<i>Alternaria</i>	ススカビ
	<i>Aspergillus</i>	コウジカビ
	<i>Aspergillus niger</i>	クロコウジカビ
	<i>Aspergillus oryzae</i>	キコウジキン(黄麹菌)
	<i>Aureobasidium</i>	黒色酵母(黒色酵母様菌)
	<i>Botrytis</i>	ハイイロカビ
	<i>Cladosporium</i>	クロカビ
	<i>Fusarium</i>	アカカビ
	<i>Geotrichum</i>	ミルク腐敗カビ
	<i>Penicillium</i>	アオカビ
	<i>Trichoderma</i>	ツチアオカビ
	<i>Walleimia</i>	アズキイロカビ

【注意】

- ・俗名は特定の種ではなく、「属」を示すことが多い
- ・俗名は「学名」と異なり、世界共通の命名規則はない
- ・俗名が色調を示す場合、生息する環境によって、その見た目(色調など)は変わることに注意する

40

40

2. カビ検査に必要な機器・器具類、 培地および分離・培養法

- 2.1. 検査に必要な機器・器具類
- 2.2. カビの培養に使用される主な寒天培地
- 2.3. カビの分離・培養法

41

41

2.1. 検査に必要な機器・器具類

実験台、ガス栓、ガスバーナー、水道、流し台
 クリーンベンチ、安全キャビネット
 培養器(インキュベーター)
顕微鏡(光学・実体)
 冷蔵庫、遠心機
 オートクレーブ(湿熱)、高温滅菌器(乾熱)



顕微鏡

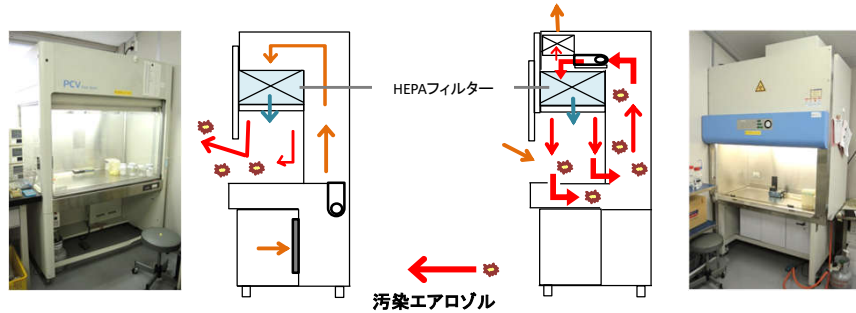
→カビの観察には実体顕微鏡と光学顕微鏡(生物顕微鏡)が必須

顕微鏡の種類	用途	観察倍率
実体顕微鏡 (透過光/落射照明)	コロニー性状の観察	10～60倍程度
光学顕微鏡 (生物顕微鏡)	細胞形態の観察 (細胞、菌糸体、等)	接眼レンズ: 15x(または10x) 対物レンズ: 10x、20x、40x、100x 総合倍率: 100x～600x、1500x (細菌・酵母の観察、カビ孢子形態の微細構造などの観察には1500倍が必要)

42

42

クリーンベンチと安全キャビネットの構造の違い



クリーンベンチ

外部からの汚染を防ぐことを目的としている
汚染されたエアロゾルは作業者へ曝露される

安全キャビネット

(バイオハザード対策用 クラスII)

操作中の微生物を外部に排出
させないように設計されたもの

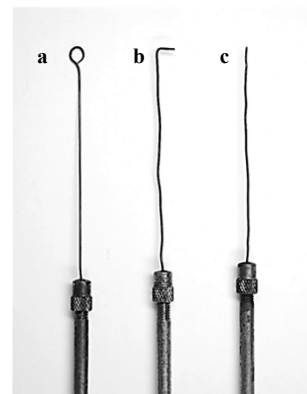
喜友名・立里 (2022)

43

43

道具(常用消耗品)

- ・シャーレ
- ・スライドグラス
- ・カバーグラス
- ・白金耳、白金鉤、白金線
- ・メス (先端が鋭利なタイプ)
- ・柄付き針 (先端が細いもの)
- ・ピンセット
- ・ライター
- ・マウント液、マネキュア



カビの植菌操作に使用する道具

- a 白金耳
(先端がループ状、塗抹・画線操作)
- b 白金鉤
(先端がかぎ状、カビなどの植菌操作等)
- c 白金線
(先端が針金状、穿刺培養、植菌操作等)

44

44



45

2.2. カビの培養に使用される主な寒天培地

培地名称(略称)	主な使用分野	対象
ポテト・デキストロース寒天培地 Potato Dextrose Agar (PDA)	幅広い分野	カビ(酵母) (ジャガイモエキス使用もあり)
麦芽エキス寒天培地 Malt extract agar (MA)	幅広い分野 (土壌環境などからの分離培養)	カビ・酵母
コーンミール寒天培地 Corn Meal Agar (CMA)	幅広い分野	カビ・酵母 (孢子形成促進に効果あり)
サブローデキストロース寒天培地 Sabouraud Dextrose agar (SDA)	臨床微生物 衛生管理	カビ(病原菌類など) (低pH、高濃度のブドウ糖含有)
YM培地 Yeast Malt agar (Yeast extract-malt extract-glucose agar)(YM)	幅広い分野	酵母(カビ)
M40Y寒天培地 (M40Y) MY20寒天培地 (MY20)	室内環境 食品衛生	好乾性菌(乾燥や高浸透圧環境下 で生育する菌類対象) 糖濃度が高い培地
ジクロラン・グリセロール培地 Dichloran-Glycerol Agar(DG18)	室内環境 食品衛生	好乾性菌(乾燥や高浸透圧環境下 で生育する菌類対象) 16%グリセロール含有のため、低い水分 活性値 (Aw 0.95)

46

カビの培養に使用される主な抗生物質

抗生物質	添加量	対象	備考
クロラムフェニコール	30-50(-100) μg/ml	細菌 (グラム陽性・陰性)	オートクレーブでも失活しない
ペニシリン	1μg/ml	細菌(グラム陽性菌)	熱失活する 培地分注直前に添加
ストレプトマイシン	100μg/ml	細菌(グラム陰性菌)	熱失活する 培地分注直前に添加
ローズベンガル	50μg/ml	菌類全体 生育が速いカビを抑制	オートクレーブでも失活しない
シクロヘキシミド	50μg/ml	菌類全体 (特に発育の速いカビ)	オートクレーブでも失活しない



PDA

ローズベンガル添加PDA 47

47

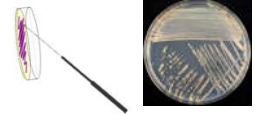
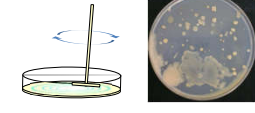
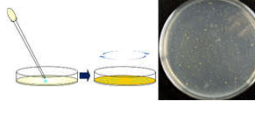
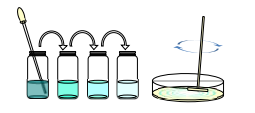
2.3. カビの分離・培養法

→参考資料3：喜友名（2020）

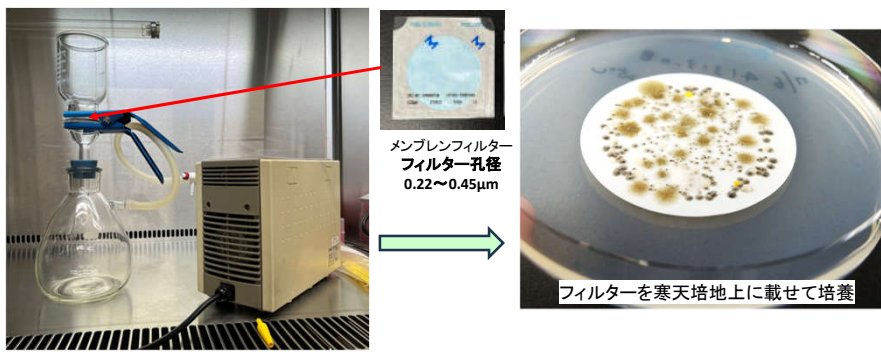
- ・分離とは？ ～検査試料より純粋培養株を得るための操作
- ・分離する前の検査試料の前処理※
 - ※ 分離方法を決定する前に、顕微鏡観察で検査試料中の構成微生物の種類や量を大まかに把握することが重要
- ・基本的に**好気培養**（酵母は嫌気培養も適用可）
- ・カビの分離方法
 - 細菌・酵母と同様な方法
 - 画線法、表面塗抹法、希釈平板法、混釈法、メンブレンフィルター法など
 - カビ特有の方法**
 - 直接分離法、直接接種法、湿室法など

48

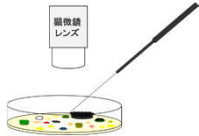


48

カビの主な分離方法		
画線法	検査材料の懸濁液(希釈液)を1白金耳とり、平板培地に画線塗抹する	
表面塗抹法	懸濁液100μlを平板培地に滴下し、コンラージ棒で寒天の表面に均一に広げてコロニーを形成させる 希釈液の液量が多すぎると、寒天の表面が乾かず、独立したコロニーができにくい	
土壌平板法(混釈法)	少量の試料をシャーレに加え、固化直前の寒天培地をシャーレに加えてよく混合し、静置して固化させる →混釈することで培地中がやや酸素が欠乏し、カビの生育が少しゆっくりになる (適用例: 土壌など)	
希釈平板法	試料を滅菌水中に懸濁し、適当に希釈した後、平板培地上に表面塗抹する → 試料中の生菌数測定に用いられる → 試料中の低密度の菌は分離されにくい (適用例: 食品、土壌、など)	

49

洗浄分離法(表面殺菌法)	植物基質(葉や根など)等の試料表面に付着している胞子や分生子を滅菌水洗い流して、試料中に菌糸状態である活性菌を対象に分離する方法 (表面洗浄時に、70%エタノールで表面殺菌処理する場合もある) (適用例: 植物基質など)
メンブレンフィルター法	液体試料を滅菌メンブレンフィルターでろ過し、フィルター上に捕捉された微生物をフィルターごと培養する →フィルターを寒天培地表面に載せて、そのまま培養する →大量の液体あるいは菌濃度が薄い試料からの分離が可能
 <p>メンブレンフィルター フィルター孔径 0.22~0.45μm</p> <p>フィルターを寒天培地上に載せて培養</p>	

50

直接分離法 (直接観察法)	<p>実体顕微鏡 (or 光学顕微鏡) 下で基質上に伸長してきた菌糸や生殖器官を直接、分離する。</p> <p>→ 低倍率下で落射光により試料上に形成されている分生子柄や孢子嚢柄などを探す。対象菌が見つかったら柄付針(火炎滅菌後、寒天平板等で冷やすなどの操作が必要)を近づけて、対象菌に軽く触れて(あるいは寒天小片ごと切り出し)、あらかじめ用意した寒天平板に接種する</p> <p>→ 表面に現れたものしか観察、分離できず、微小なものは見逃されやすい</p> <p>(適用例: 落葉落枝などの植物基質、動物死骸や糞など)</p>	
直接接種法	<p>比較的大きい試料塊を寒天平板の中央に置き、試料上あるいは試料周囲に伸長してくる菌を観察、分離する (適用例: 土壌、動物糞、植物基質など)</p>	
湿室法	<p>試料を湿度が保てる容器に入れて培養し、実体顕微鏡で適時観察を行い、試料上に生育してくる菌を分離する 容器の底に滅菌水で湿らせたろ紙等を敷き、その上に試料を載せたりする (適用例: 食品、植物基質からのカビ分離、など)</p>	

51

51

【注意点】 分離作業平板などからの釣菌操作について

1. 基本的に**実体顕微鏡(あるいは光学顕微鏡)**下で、観察しながら行う
→ カビの菌糸体は立体的(空間的)に生育するため隣のコロニー上に菌糸が伸びていることが多いため、要注意

→ シャーレを持ち上げて肉眼で見ながら釣菌しない
(孢子飛散を防ぐため)
2. 低倍率・落射照明下で試料上に形成されている孢子形成構造(分生子柄や孢子嚢柄など)を探す。滅菌※した柄付針を用いて、対象菌に軽く触れて(あるいは寒天小片ごと切り出し)、釣菌する。

※ 火炎滅菌後、寒天培地などで冷やすなどの操作が必要



52

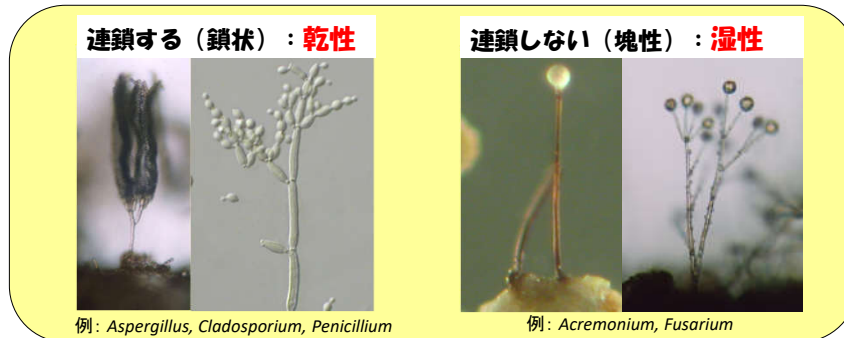
52

カビの植菌・培養方法

植菌操作

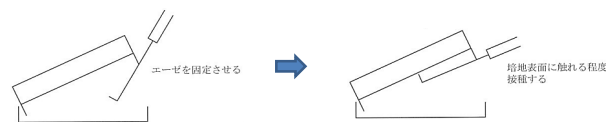
- 1) カビの菌体を直接寒天平板培地へ接種するには、柄付針またはエーゼを用いる
(使用直前に柄付針の先端はバーナー等で火炎滅菌する)
- 2) 菌体を多く取りすぎないように注意する。多量の胞子を形成するカビのコロニーからの採取は操作中に胞子が飛散しやすく、汚染の原因となる
→ カビの胞子タイプ(乾性、湿性)※に応じて作業の注意点が異なる

※胞子のタイプ(性質)によって、飛散しやすさも異なる！



53

- 3) 平板培地上のコロニーから採取する際は、シャーレを実験台上に静置したまま蓋を軽く開け、ごく少量を静かに掻き取るようにする
シャーレを持ち上げて菌体を採取する操作はカビの胞子の飛散等の汚染につながるため行わない(培養初期で胞子をそれほど形成していない時期は問題ない)
- 4) 採取した菌体を寒天平板培地へ接種する際は、シャーレを実験台上に裏向きに静置、シャーレの皿部分の一方を軽く持ち上げた状態で、菌体を培地表面に接種する
→接種位置を固定するために、エーゼをシャーレの縁に当てた状態で接種する



平板培地への接種の方法の一例

- 5) 菌体採取と接種の作業を実体顕微鏡あるいは光学顕微鏡のステージ上に平板培地を載せた状態で、目的コロニーの一部あるいは菌体のみを柄付針で釣菌し、平板培地に接種すると、コンタミの少ない単一コロニーを得ることが出来る

54

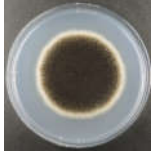
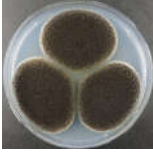
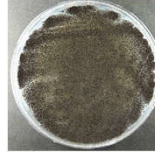



- 6) 使用後の柄付針などの先端部はバーナー等で火炎滅菌する
 → (注意)使用直後にそのままバーナー等で焼くと、菌体が焦げ付く、あるいはエアロゾルとして菌体が周囲に飛散するリスクがある

→ 70%エタノールを染み込ませたキムワイプ等で先端部をふき取る、
 あるいは、70%エタノール溶液(ガラスビーズ含)に柄付針などを入れて、ガラスビーズで菌体をこそぎ落とした後、キムワイプ等でふき取る



55

カビの植菌方法による生育の違い

方法	点接種		画線塗抹
	中央に1点	均等に3点	平板全体
植菌箇所	中央に1点	均等に3点	平板全体
使用器具	白金線/白金鉤、柄付針、等		白金耳
<i>Aspergillus</i> 属 ～生育速い			
<i>Cladosporium</i> 属 ～生育遅い			
長所	コロニー性状が 分かりやすい	複数コロニーの平均的な 性状の観察	多量の胞子を形成するカビ の場合、集菌作業が容易
短所	コロニー性状は 1コロニーのみの特徴	(生育の速いカビの場合) 各コロニーが接触するため、 各コロニー直径の計測困難	コロニー性状が 分かりにくい
目的	カビの同定～コロニー性状の特徴が観察しやすい		カビ胞子懸濁液作製 ～菌体(主に胞子)を大量に 回収しやすい

56

培養操作

- ・一般的なカビの多くは中温性のため培養温度は25℃前後で行う。
- ・菌体を接種した平板は培地の乾燥を防ぐために、パラフィルムやビニールテープ等で封をするか、数枚を1つのビニール袋やポリ容器に入れて、培養する。
- ・培養中および観察時は孢子の飛散を防ぐために、なるべくシャーレを乱暴に扱わない、(何度もひっくり返さない)。
- ・培養期間はカビの種類、培養の目的に応じて異なる。
一般的なカビであれば約1～2週間、孢子形成や孢子形成構造の成熟に時間を要する場合は2週間以上培養を要することもある(特に、子嚢菌類などの有性生殖器官の形成や成熟には4週間前後の時間を要することが多い)。

※ 恒温器内(暗所)で培養した際、孢子形成が悪い場合の対処法

- ・室温培養に切り替える(または、窓際等の温度変化のある場所で培養)
- ・蛍光灯や太陽光の光照射、
- ・コロニーの一部をメス等で傷を付ける
→ 物理・化学的影響で孢子形成が促進されることがある

57

- ・培養シャーレは上向き、下向き、どちらで培養するべきか？

上向き～多量の孢子を形成するカビの場合、観察のためにシャーレをひっくり返したりするなどの操作でシャーレ中に孢子が飛散するため、蓋をあけた際に周囲へのカビ汚染につながることもある。そのため、最初から上向きで培養するとそのような事態を避けることができる。また、上向きで培養していると、寒天培地からの水分によって培地表面に水分がたまりやすく、コロニーが流れてしまうこともある。

下向き～コンタミ防止や培地の乾燥抑制などの目的のため、広く使用されている。しかし、多量の孢子を形成するカビの場合には上述の理由から望ましくない。また、カビの種類によっては空中菌糸が重力の影響で下向きになり、若干コロニー外観が上向きの場合と変わることもある。粘性のある流動性のあるコロニーを形成する酵母などを培養する際、下向きで培養する時は注意が必要である。

- ・カビの培養平板を廃棄する際は、蓋が開かないように注意する。
→オートクレーブ滅菌(121℃、15～30分)

58

★培地中の増殖特性

カビ: 平板、斜面培地 (液体培地は注意※)

酵母: 平板、斜面、液体培地

※カビの液体培養

カビを液体培養すると液体表面にコロニーを形成し、液体中では塊を形成して、分散しにくい (細菌と酵母は液体中で分散する)

- カビは菌糸体で成長し、生育に酸素が必要
- 液体培養では菌糸体を回収することは可能
- 孢子懸濁液調製のために孢子を回収したい場合は寒天培地上で培養する方が効率が良い



振とう培養 3日目



液体中でマリモ状塊形成

3日間振とう培養→2日間静置培養



液体表面でコロニー形成

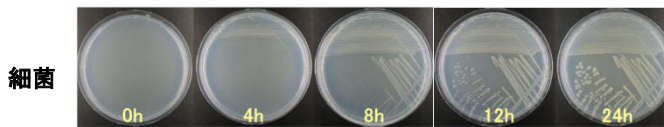
Aspergillus niger (PDブロス、25°C)

59

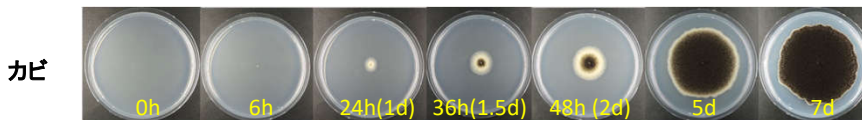
59

★培養期間

細菌とカビで増殖のスピード(培養期間)が異なる



例) 大腸菌 *Escherichia coli* の培養平板の経時観察像 (LB, 37°C)



例) 黒麹菌 *Aspergillus niger* の培養平板の経時観察像 (PDA, 25°C)

カビ: 数日~1週間

(菌糸成長と孢子形成に要する時間が異なることに注意!)

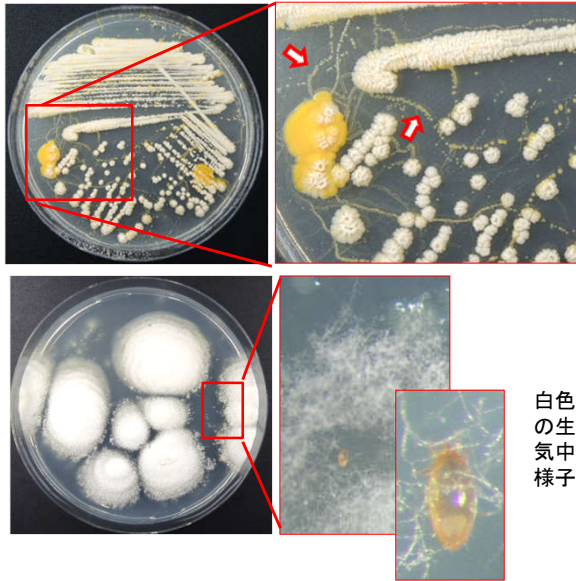
(種類によっては数週間~数か月) →特徴が出るのに時間を要する!

酵母: 2~3日

60

60

<注意> 実験室におけるダニ汚染 喜友名(2023a)
→参考資料1



酵母を画線培養した箇所以外で、ダニが歩いた跡に黄色の細菌コロニーが形成されている様子

白色カビコロニーの周辺に細菌コロニーの生育が認められたり、コロニー表面の気中菌糸がダニによって食べられている様子

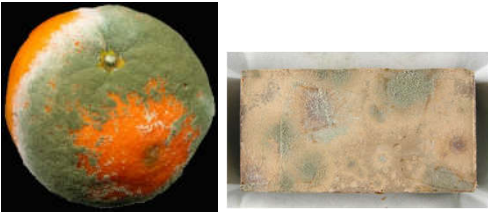
→ダニが混入した平板はすぐに廃棄処分する
→廃棄できない場合はシャーレをテープで封してから、袋に入れて冷蔵庫で保管する

61


61

3. 食品製造で問題となるカビの種類と特徴

- 3.1. 好乾性カビ
- 3.2. 耐熱性カビ
- 3.3. カビ毒(マイコトキシン)



食品関連のカビの観察および分離培養法は添付の参考資料3を参照願います



62

62

食品製造で問題となるカビ・酵母の種類

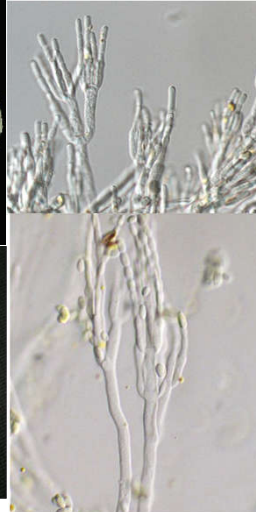
食品の種類	カビ	酵母
青果物	好湿性カビ (<i>Fusarium</i> 属, <i>Penicillium</i> 属など)	<i>Candida</i> 属など
常温流通食品 (穀物、菓子類など)	好乾性カビ (<i>Eurotium</i> 属, <i>Wallemia</i> 属など)	<i>Pichia</i> 属 <i>Saccharomycopsis</i> 属など
飲料・レトルト	耐熱性カビ (<i>Neosartorya</i> 属, <i>Paecilomyces</i> 属)	<i>Wickerhamomyces</i> 属 (旧; <i>Pichia</i> 属)など
低温流通食品	低温性カビ (<i>Cladosporium</i> 属, <i>Penicillium</i> 属など)	<i>Candida</i> 属など

63

63

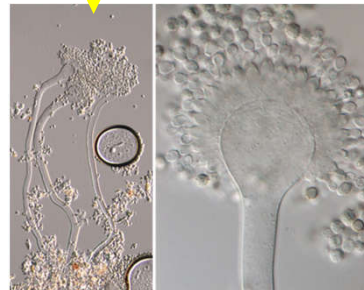
食品に生えるカビの一例

みかん



Penicillium digitatum
(好湿性カビ)

チョコレート



Aspergillus penicillioides
(好乾性カビ)

64

64

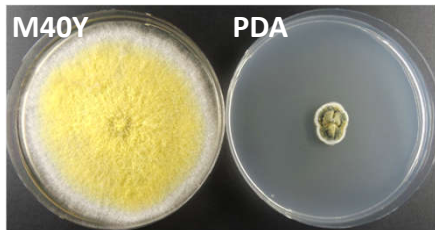
3.1. 好乾性カビ

1) 好乾性カビとは。

胞子が少なくとも水分活性値 **Aw0.80以下で発芽** することができ、Aw0.95で最適の発育が認められるカビ
(Aw0.65~0.75付近で増殖可能)

2) 好乾性カビの検出方法

水分活性値が低い培地を使用する → 次スライド参照



好乾性カビ *Eurotium* sp. (*Aspergillus* sp.)
→水分活性値(Aw)が低い培地で良好な生育

主な好乾性カビ

*Aspergillus*属 *Aspergillus*節 (= *Eurotium*属)

*Aspergillus*属 *Restrict*節

A. penicillioides, *A. restrictus*など

*Basipetospora*属

*Chrysosporium*属

*Wallemia*属

*Xeromyces*属

65

65

好乾性カビ検出用培地の水分活性値 (Samson & Lustgraaf, Mycopathologia, 64, 13 (1978))

培地の種類	水分活性値(Aw)
一般培地 (PDAなど)	0.998~0.990
MY20寒天培地 (MY20)	0.97
ジクロラン・グリセロール培地 Dichloran-Glycerol Agar (DG18) →16%グリセロール含有のため水分活性値は低く、 ジクロランが一部の成長が速いカビの生育抑制効果 →好乾性と中湿性カビ・酵母を幅広く検出	0.95
M40Y寒天培地 (M40Y)	0.93
MY50G寒天培地	0.89
MY60G寒天培地	0.85
MY70GF寒天培地	0.76

一般的に
使用される

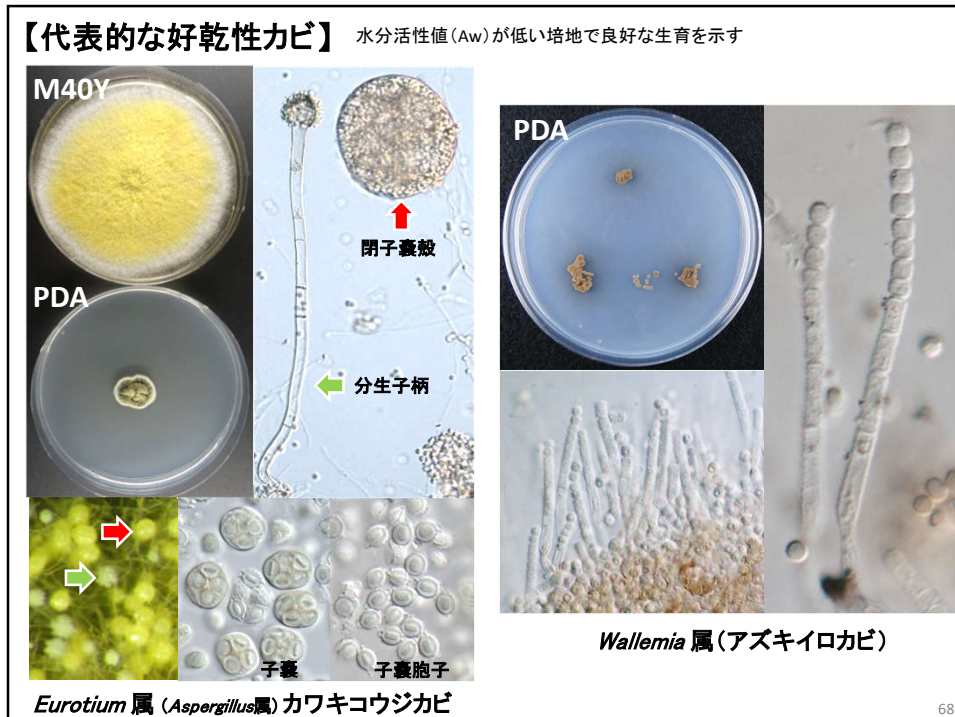
→試料の状態に応じて一般培地とM40Yなどを併用することが望ましい

66

66

食品等の水分活性値(Aw) と主な微生物の生育・増殖との関係 (宇田川およびPitt & Hockingをもとに作成)				
Aw	食品例 (Aw)	その他	主な微生物 (生育できる最低Aw)	
			細菌	菌類 (カビ・酵母)
1.00	野菜, 牛乳, 食肉などの生鮮食品(0.98以上)	血液 海水		
0.95	保存期間1~2日間 パン, ハム, チーズ (0.89-0.95)		ボツリヌス菌 (0.94) サルモネラ (0.93) 大部分の細菌 (0.91)	大部分の土壌菌類
0.90	発酵ソーセージ, ドライチーズ (0.90)		ブドウ球菌 (嫌氣的) <i>Staphylococcus aureus</i> (0.90)	ケカビ類 <i>Fusarium</i>
	ウエの庵辛 (0.892) シラス干し (0.866)			大部分の酵母 (0.88) <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
0.85	保存期間1~2週間 フルーツケーキ, サラミ (0.73~0.85)		ブドウ球菌 (好氣的) <i>Staphylococcus aureus</i> (0.85)	<i>Rhizopus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
0.80	塩タラ (0.785)			大部分のカビ (0.80) <i>Aspergillus flavus</i> 耐乾性 <i>Penicillium</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>
0.75	蜂蜜, ジャム	塩湖	好塩性細菌 (0.75)	<i>Wallemia</i> , <i>Eurotium</i> 耐乾性 <i>Aspergillus</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>
0.70	穀類, 塩辛, 乾燥食品 (0.75~0.60)			<i>Chrysosporium</i> <i>Eurotium halophilicum</i>
0.65	保存期間1-2年 乾燥果実, キャラメル			<i>Xeromyces bisporus</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
0.60	保存期間不定 クッキー			

67



68

3.2. 耐熱性カビ

1) 耐熱性カビとは。

75℃、30分の加熱(湿熱)でも生残する孢子を形成するカビ

→耐熱性を示す器官: 子嚢孢子、厚膜孢子、厚壁化した菌糸や分生子

2) 耐熱性カビの検出方法

・変敗の認められない原材料や製品からの分離

➡ 試料を加熱処理した後、一般的な培地で分離培養する

(60~80℃、5分~1時間程度、(例: 75℃/5分間、80℃/35分間))

➡ 加熱による孢子の活性化(休眠打破)が必要

・事故品からの分離は、菌体をそのまま寒天培地に分離培養可能

主な耐熱性カビ

*Byssochlamys*属 (*Paecilomyces*属)

*Eupenicillium*属 (*Penicillium*属の一部)

*Hamigera*属

*Neosartorya*属 (*Aspergillus*属 *Fumigati*節)

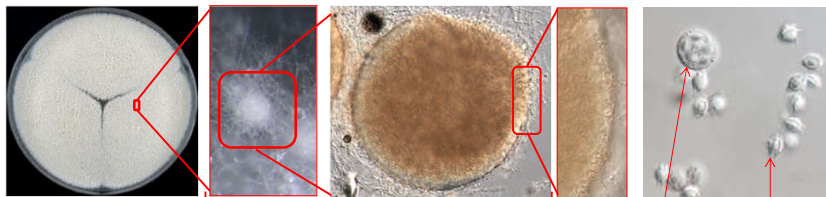
*Rasamsonia*属

*Thermoascus*属

69

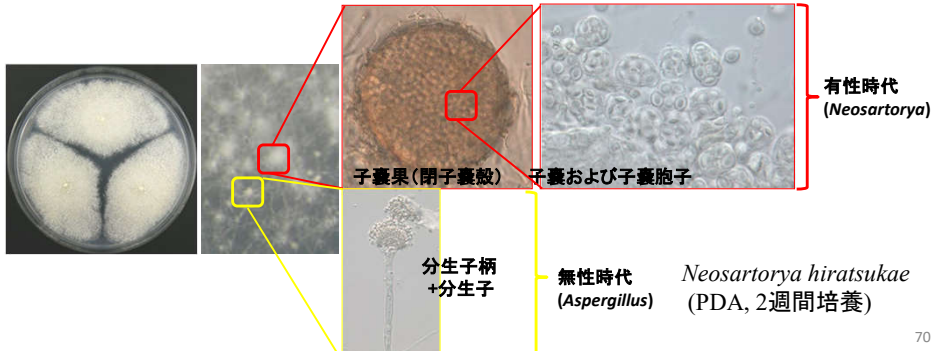
69

【代表的な耐熱性カビ】耐熱性子嚢菌類 *Neosartorya*属 (*Aspergillus*属)



子嚢果(閉子嚢殻) 殻壁 子嚢および子嚢孢子

Neosartorya pseudofischeri (PDA, 2週間培養)



有性時代
(*Neosartorya*)

子嚢果(閉子嚢殻) 子嚢および子嚢孢子

分生子柄
+分生子

無性時代
(*Aspergillus*)

Neosartorya hiratsukae
(PDA, 2週間培養)

70

70

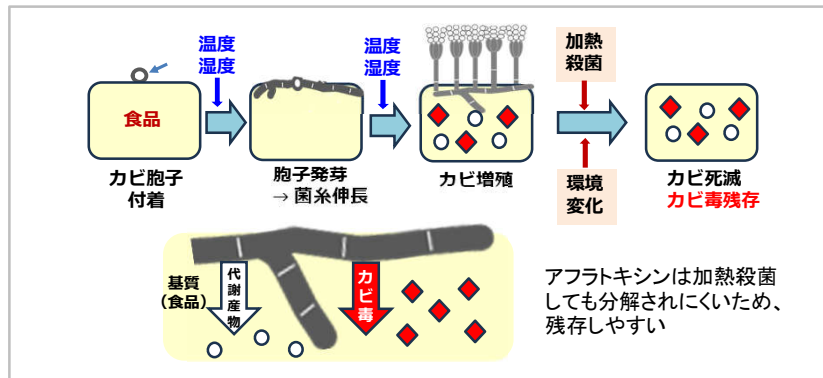
3.3. カビ毒(マイコトキシン)

カビ毒(マイコトキシン)とは。

カビの産生する二次代謝産物の中で、ヒトや家畜に発ガン性、変異原性、腎・肝障害性などの毒性を示す化学物質の総称

・すべてのカビがカビ毒を産生するのではない。

→温度・湿度などの条件が整うとカビ毒が産生される



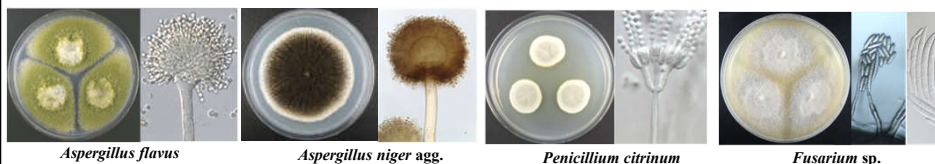
71

71

主なカビ毒、その産生菌と障害(宇田川, 2004)


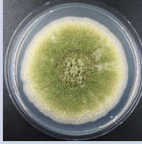
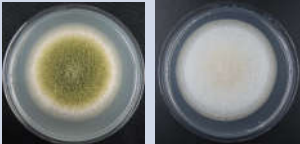



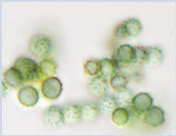
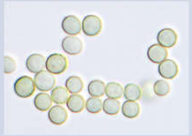

カビ毒	主な産生菌	主な障害
アフラトキシン	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> など	肝障害、肝癌など
シトリニン	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Monascus</i> spp. など	腎障害など
オクラトキシンA	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> など	腎癌、腎障害、肝障害
パツリン	<i>P. expansum</i> など	出血、毛細管障害、など
フモニシン	<i>Fusarium fujikuroi</i> , <i>F. proliferatum</i> など	肝癌、肝障害、肺浮腫など

→カビ毒産生菌: *Aspergillus*属、*Penicillium*属、*Fusarium*属が多い



72

72

	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. oryzae</i>
コロニー	暗緑色 (濃緑色) ビロード状 	黄緑色 ビロード状 	黄緑色～黄(茶)褐色～白色 ビロード～状羊毛状 
分生子頭	単輪生 	単～二輪生 	単～二輪生 
分生子	粗面 3.5-5.5μm 	平滑～粗面 (3-)3.5-4.5(-6)μm 	平滑～粗面 4.5-8μm 
生息環境	世界中に分布、土壌、穀類、食品類		醸造環境
カビ毒	アフラトキシン産生		産生しない

参考文献: Food and Indoor Fungi 1st/2nd ed. (Samson et al., 2010, 2019)

73

4. カビの同定方法

- 4.1. 形態観察による同定
- 4.2. DNA塩基配列解析およびMALDI-TOF MS法による同定
- 4.3. 現場における実践的な同定方法

74

74

4.1. 形態観察による同定

培養性状および形態観察

- 1) 培養性状(コロニー性状)
- 2) 形態的特徴～主に実体／光学顕微鏡観察による

生理・生化学性状試験（主に酵母）

カビの表現形質による簡単な同定方法

75

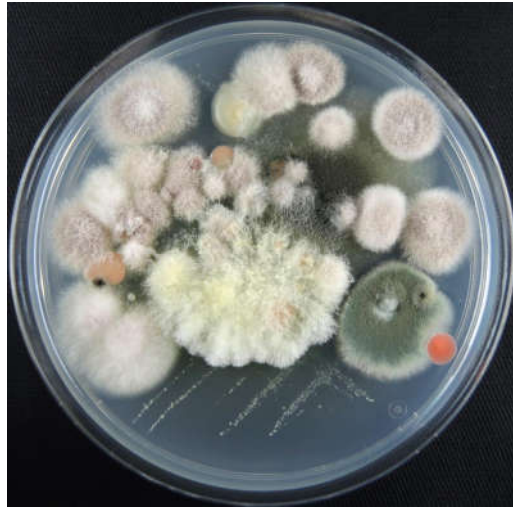
75

カビを同定するためのチェック項目

項目	観察ポイント		観察方法
培養性状	生育速度、表面性状、色調(表面と裏面)、色素産生、等		肉眼 ルーペ 実体顕微鏡
形態	菌糸(菌糸体)	隔壁の有無、色、壁の厚さ、表面性状	実体顕微鏡
	孢子(分生子)の着生様式	連鎖の有無(鎖状、塊状) 分生子柄、分生子柄束、分生子層、分生子殻	
	孢子(分生子)形成様式	分節型、アレウロ型、ポロ型、シンポジオ型、出芽型、フィアロ型、アネロ型、バソジック型、等	光学顕微鏡
	分生子(孢子)	形、色、細胞数、表面構造	

76

1) 培養性状(コロニー性状)



複数の微生物が生育した寒天平板培地

→ 各微生物コロニーの特徴をちゃんと観察するためには、各コロニーを釣菌して、純粋培養が必要

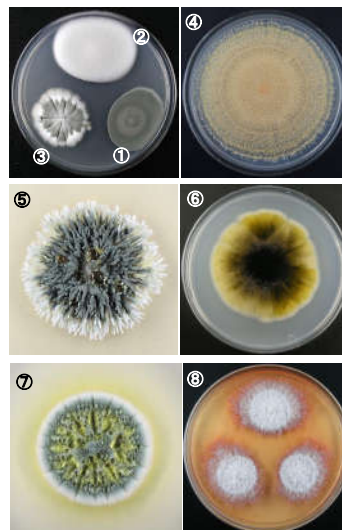
77

77

1) 培養性状(コロニー性状)

→ 寒天培地あるいは基質上のコロニー観察(肉眼・実体顕微鏡)

観察項目	観察内容
生育速度	コロニーの大きさ(直径)
表面性状	コロニー表面の形態 ピロッド状 ^① 、羊毛状 ^② 、なわ状、束状 ^⑤ 、粒状 ^④ 、粉状、湿性 ^⑥ 、平坦、中央隆起、放射状の溝 ^③ 、輪紋状、等
周縁性状	コロニー周縁部の特徴 全縁(平滑)、波状、菌糸状、など
色調	表面と裏面
浸出液 ^⑦ の有無・色	コロニー表面上の水滴を指し、生成する場合はろ紙で吸い取り、その色調を記録する
可溶性色素 ^⑧ の有無・色	寒天培地中に産生される色素の色について記録する
匂い	分生子を多量に吸い込まないように間接的に匂いを嗅ぎ、その種類を記録する



※酵母の培養性状の観察は細菌とほぼ同じ

78

78

① **生育速度**

一定期間培養後のコロニーの大きさ(直径, mm)
 通常は7日間または14日間
 →属レベルの同定: 厳密な計測不要
 種レベルの同定: 計測必要
 (複数コロニーの計測値を範囲で示す、35-40mm)



生育遅い

中程度

生育速い

(例) PDA、25°C、1週間培養

Exophiala lecanii-corni, *Penicillium citreonigrum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium fujikuroi* complex

79

79

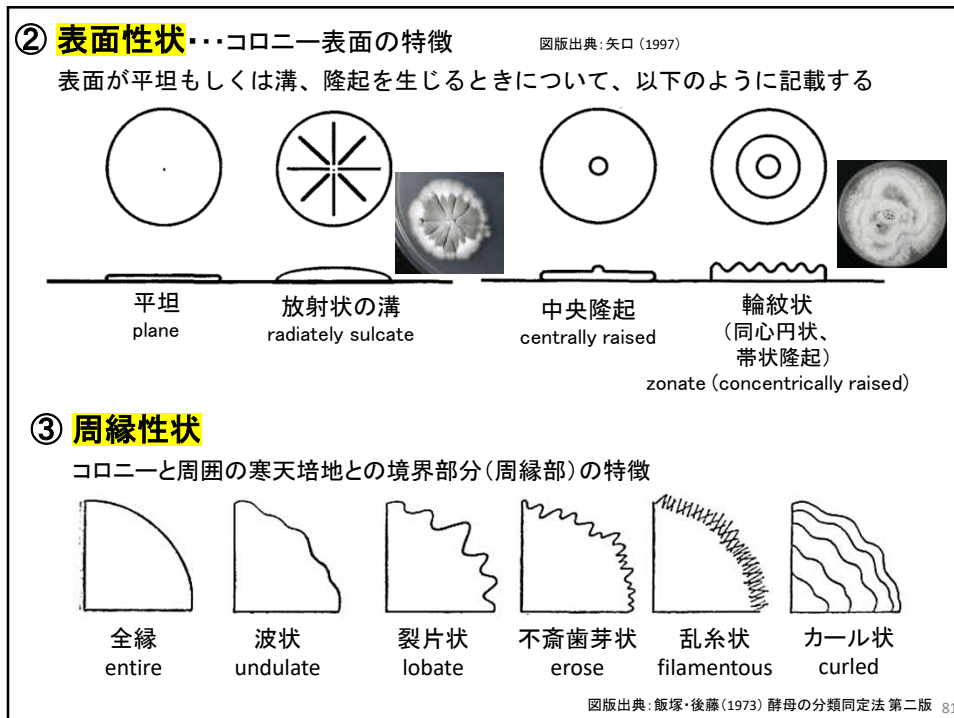
② **表面性状**...コロニー表面の特徴(コロニー平面像と断面模式図)

「分生子柄」
= 胞子形成構造体

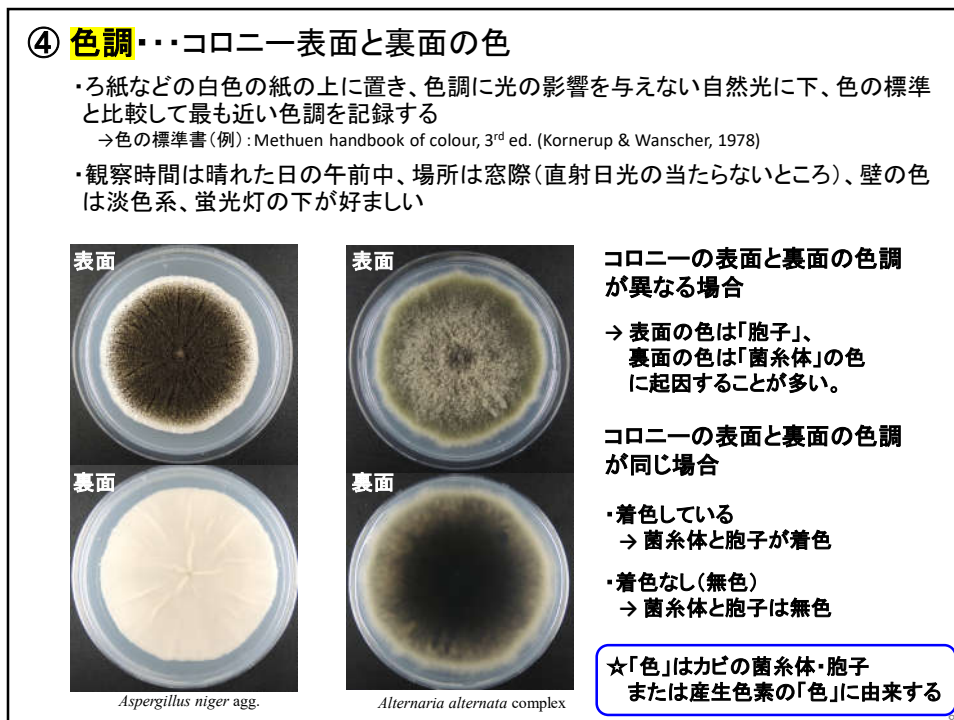
<p>ピロード状</p> <p>分生子柄が基底菌糸層(寒天培地上の菌糸)から均一に密生する</p>	<p>羊毛状</p> <p>分生子柄が基底菌糸層および気生菌糸からゆるく生じる</p>		
<p>粒状</p> <p>菌糸が集合して組織化した構造が培地表面あるいは寒天中に形成される</p>	<p>束状</p> <p>分生子柄および菌糸体が集合して束状になる</p>	<p>湿性</p> <p>酵母コロニー状に湿った性状</p>	<p>粉状</p> <p>乾燥した性質の分生子が多量に形成され、表面が粉っぽくなる</p>

80

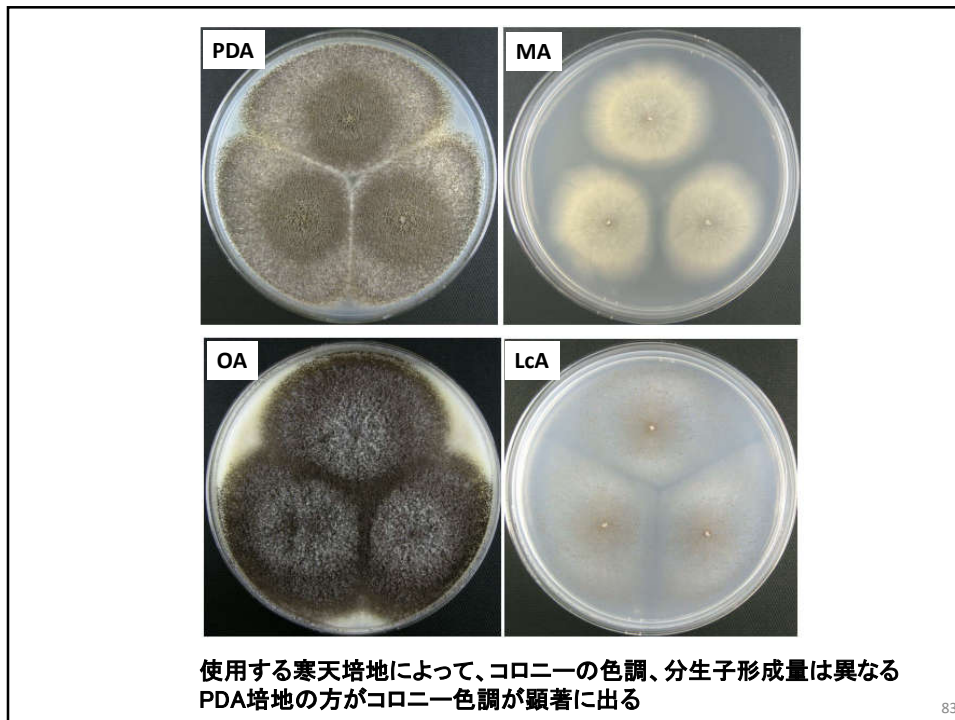
80



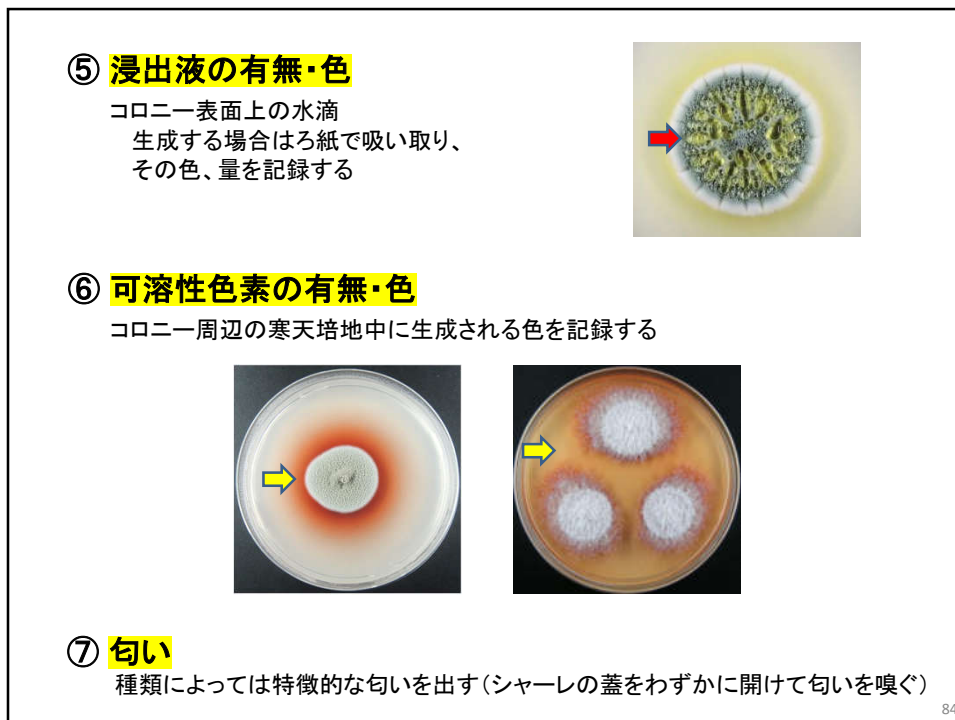
81



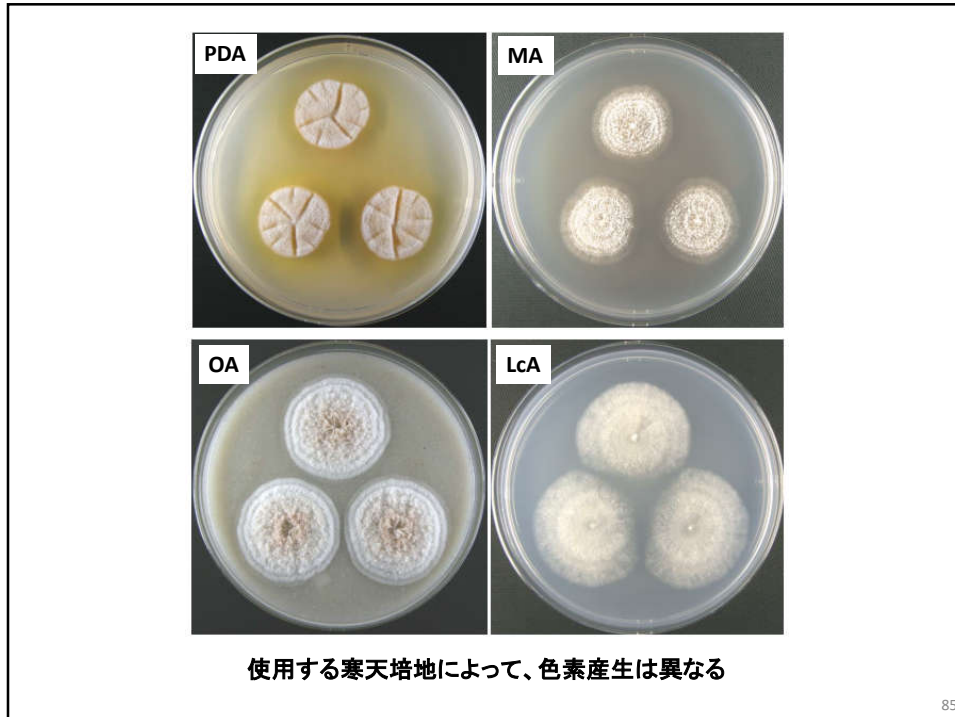
82



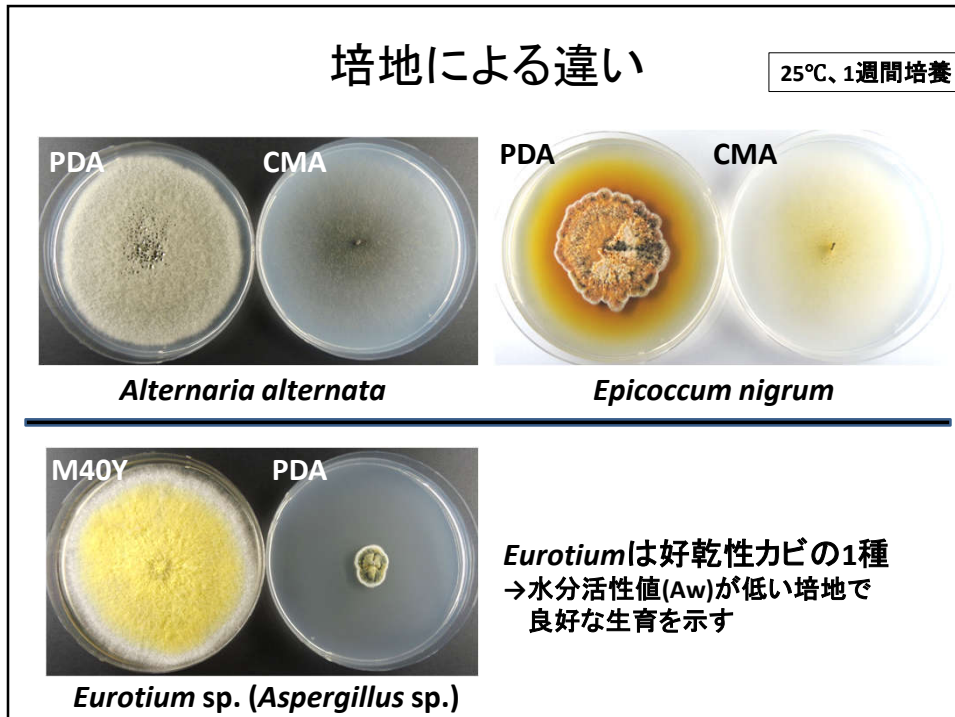
83



84

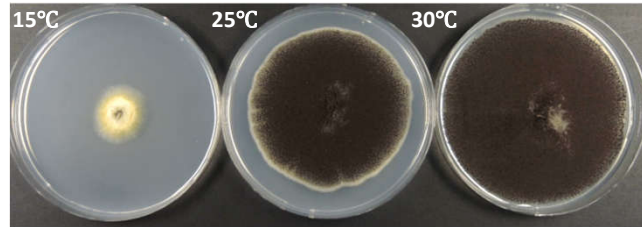


85

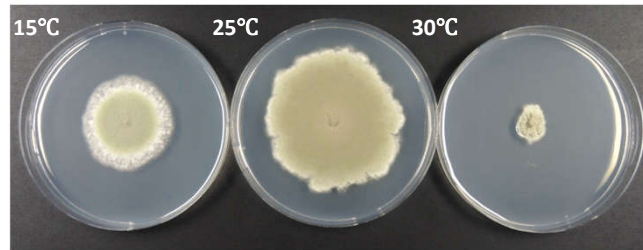


86

培養温度による違い



黒麹菌 *Aspergillus niger* (PDA, 1週間培養)



ミカンの青かび *Penicillium digitatum* (PDA, 1週間培養)

87

87

2) 形態的特徴～主に実体／光学顕微鏡観察による

【カビの形態観察方法～プレパラート作製方法】

方法	内容	適用分類群
直接法	<ul style="list-style-type: none"> 培養平板を顕微鏡のステージに載せて直接検鏡する 培養平板より柄付針等で菌体の一部を取り出し、プレパラートを作製する 胞子と菌糸がバラバラになりやすく、同定が難しい分類群がある ⇒そのような分類群にはスライド培養法を適用 	接合菌類 (<i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> など) <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Trichoderma</i> など 酵母の仲間
スライド培養法	<ul style="list-style-type: none"> 同定の基準となる分生子形成様式を観察できる(胞子と菌糸がバラバラになりやすい分類群に適している) 標本作製に培養期間が必要 	<i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Acremonium</i> など 酵母の菌糸/仮性菌糸形成、等
セロハンテープ法	セロハンテープの接着面を観察対象部分に貼り付け、軽く押しつけて剥がした後、そのままスライドガラス上にマウント液で封入する。	<ul style="list-style-type: none"> 食品や製品など(現場での簡易観察に適している) 様々なカビ(分生子果や子嚢果など組織化した構造を形成するカビには不適)

88

88

光学顕微鏡観察用のプレパラート作製時には、目的に応じて、様々なマウント液や種染色液を用いる(一時的な観察であれば滅菌水でも可)

→ 観察の基本は染色液を使用せず、無染色で観察を行うことが望ましい
(カビの場合、**グラム染色による観察は通常行わない**)

主なマウント液(封入液)の組成

種類	組成	特徴
ラクトフェノール液	結晶石炭酸(フェノール) 10 g 乳酸 10 ml グリセリン 20 g 蒸留水 10 ml	菌本来の色調を見るのに優れている。 乾燥しにくい
ラクトフェノール・ コットンブルー液	ラクトフェノール液 50 ml コットンブルー 0.025 g	無色のカビの微細形態を観察するのに適している (黒色系カビには不適)
水/滅菌水(無菌水)		光の透過率が良く、顕微鏡写真撮影用に適している。 乾燥しやすいため、一時的な観察用とする。

(その他)ドライウェル(界面活性剤の1種。フィルム写真現像用水滴防止剤。0.1-1.0%水溶液)

<ラクトフェノール・コットンブルー液について>

高濃度のフェノールが細胞溶解酵素を不活化するため細胞は溶解しないが、菌は殺菌される。乳酸は防腐剤として働き、菌の構造体を保持する。グリセロールは乾燥を防ぎ、コットンブルーは菌の細胞壁にあるキチンを染色する。

89

「染色」と「無染色」による見え方の違い

例: クロカビの1種 (*Cladosporium* sp.)、マウント液: ラクトフェノール液



無染色

○: 菌体本来の色調がわかる
→ 菌体が着色している場合は無染色観察が適している

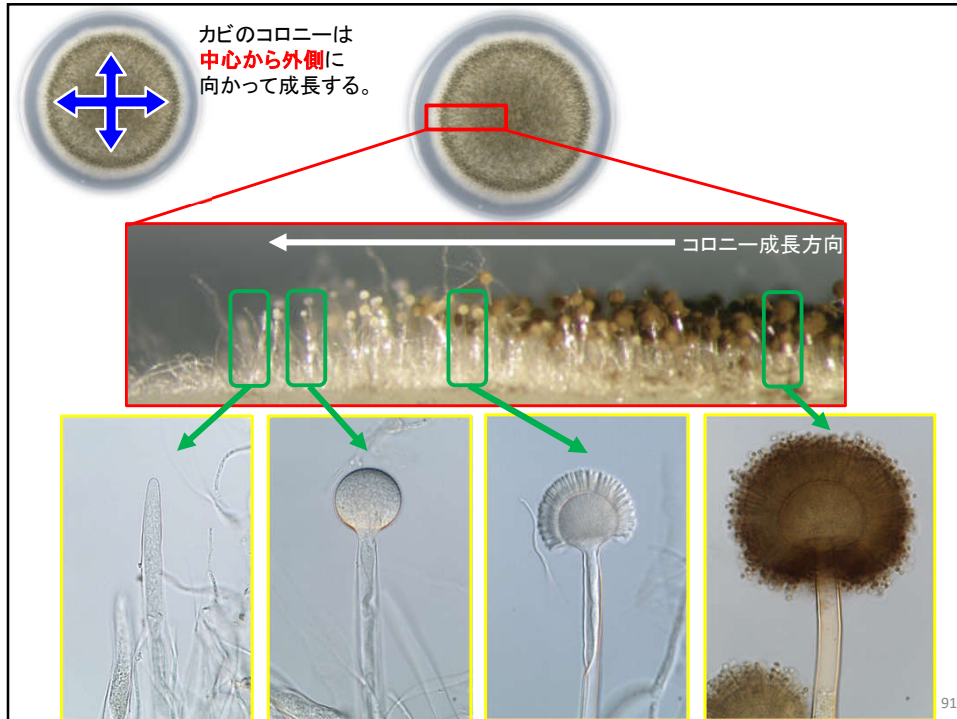


コットンブルー染色 (菌体が青く染まる)

×: 菌体本来の色調がわかりにくい
→ 菌体が着色していない場合は染色観察が適している
→ カビの微細構造の観察に適している

90

90



91

コロニーから直接プレパラート作製する際のポイント

カビの生育方法を理解した上で、形態観察用のプレパラート作製を行う。コロニーのどの部位を観察するかが重要となる。

コロニー中心部

- 菌糸密度が高く、孢子等の形成が多いため、プレパラート作製困難。
- 孢子形成構造が壊れている場合が多い。
- 成熟した孢子の表面構造の観察には適している(種レベルの同定には必要)。

コロニー中間部

- 菌糸密度および孢子形成は良い。プレパラート作製は比較的しやすく、同定する際の特徴となる孢子形成構造が観察しやすいことが多い。
- 孢子が未成熟なことも多い→種レベルの同定には不十分

コロニー周辺部

菌糸密度が低く、孢子形成も少なく、プレパラート作製はしやすいが、孢子形成が不十分なため同定する際の特徴が見つけ難い

- 一番、活性が高い場所。

(注意)分類群、培地によって、観察に適した箇所は異なる

92

92

カビのプレパラートを作製する際の菌体を探る箇所の目安の一例

PDA培地上のコロニー像（a-f枠内が菌体採取箇所）とプレパラート作製時の菌体採取箇所の拡大像（矢印で示したような箇所を選択的に切り出します）

a *Aspergillus niger*、 b *Trichoderma atroviride*、 c *Pestalotiopsis* sp.、 d *Phoma saxea*、 e *Chaetomium coarctatum*、 f *Epicoccum nigrum*

（参考資料 2：喜友名, 2023） 93

93

カビを同定するためには、“**胞子がどのように形成されているか**”を観ることが重要となる。そのためには胞子がどのように形成されているか、が分かるような**プレパラート作製**が重要となる（染色は必ずしも必要ではない）。

コロー周囲部で着色している部分からカネ型エーゼでかきとる。または、メスで厚み1mm前後、長さ1cm前後の集落片を切り取る

平板

封入液を滴下する

封入液

スライドガラス

平板から釣ったかびを静かにのせる

カバーガラスをかける

カバーガラスの四辺をマニキュア（ネイルエナメル）で封じる

完成標本（半永久標本）

顕微鏡観察

ポイント！
胞子がどのように形成されているかが分かるプレパラートを作製する。

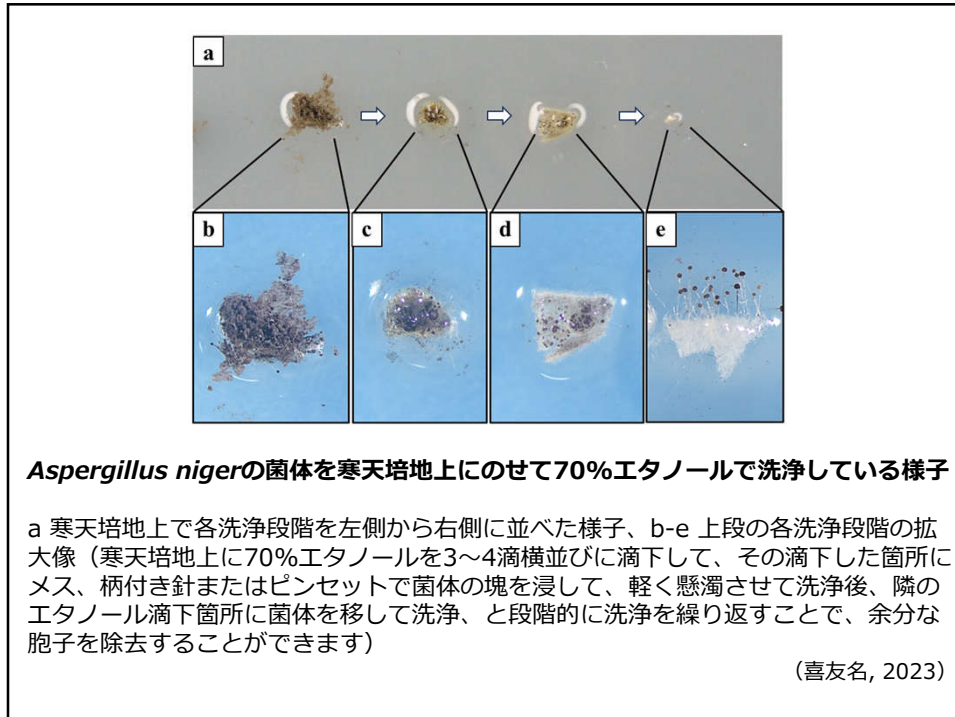
直接掻き取った場合

重要！ 余分な菌糸と胞子を除く！
エタノール等で余分な胞子を洗浄
→ 柄付針やメスなどで菌体の塊をほぐす

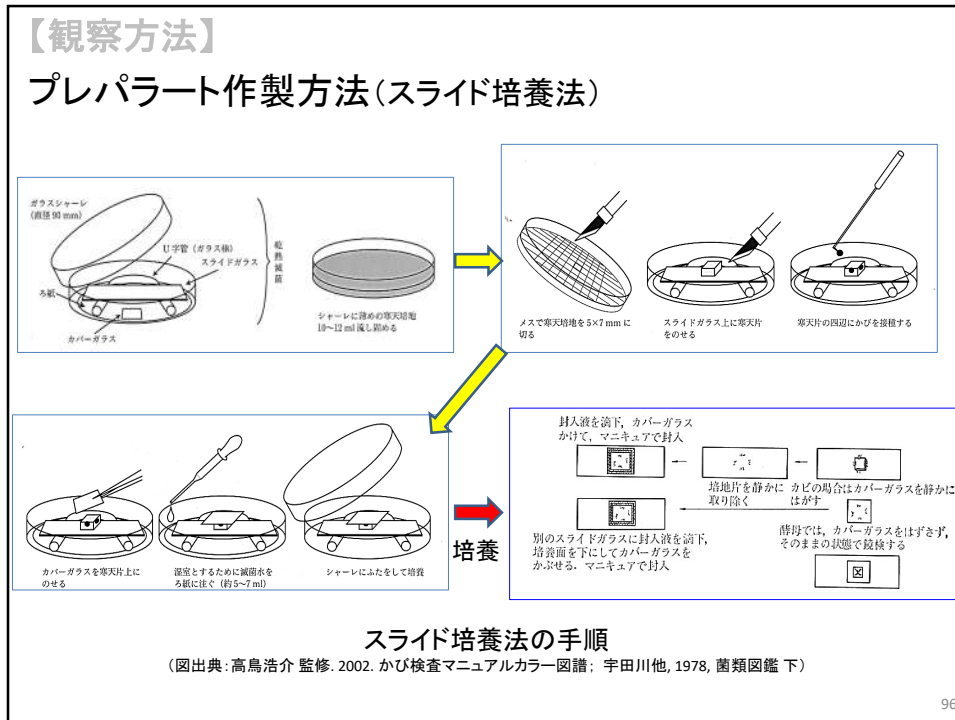
図出典：高島浩介 監修, 2002. かび検査マニュアルカラー図譜, テクノシステム, 東京.

→プレパラート作製方法は参考資料2を参照 94

94



95



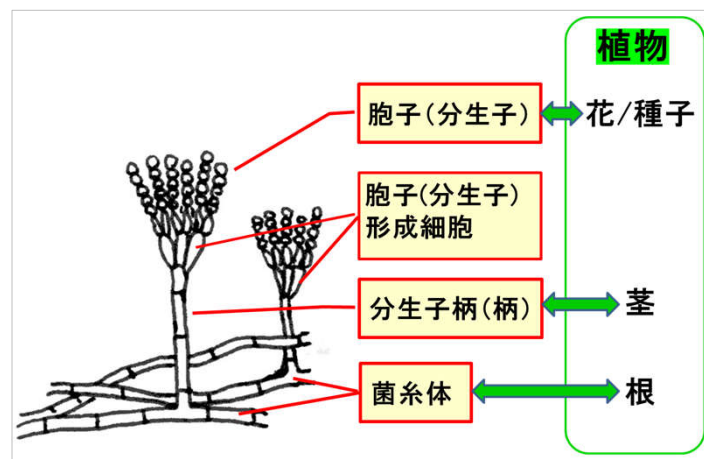
96

カビの形態観察項目 ～主に実体／光学顕微鏡観察による

構造	観察項目
菌糸(菌糸体)	隔壁、かすがい連結(クランプ連結)の有無 表面の色調・性状(平滑、粗面、いぼ状など) 菌糸壁の厚さ 真(正)菌糸、偽菌糸(仮性菌糸～主に酵母で認められる)
生殖器官 (孢子形成構造)	<p>1. 無性生殖器官</p> <ul style="list-style-type: none"> 分生子形成器官 <ul style="list-style-type: none"> 組織化する(分生子殻、分生子座～分生子果不完全菌類) 組織化しない(分生子柄、分生子柄束～糸状不完全菌類) 着生様式～鎖状、粘塊状 形成様式～分節型、出芽型、フィアロ型など 分生子(形態、色、細胞数、表面構造) 厚膜孢子(形態、色、細胞数) 菌核(形態、色) <p>2. 有性生殖器官(例:子嚢菌類)</p> <ul style="list-style-type: none"> 子嚢果(形態、色、剛毛の有無など) 子嚢(形態、成熟時の膜の消失の有無、子嚢孢子数) 子嚢孢子(形態、色、細胞数、付属糸有無など)

97

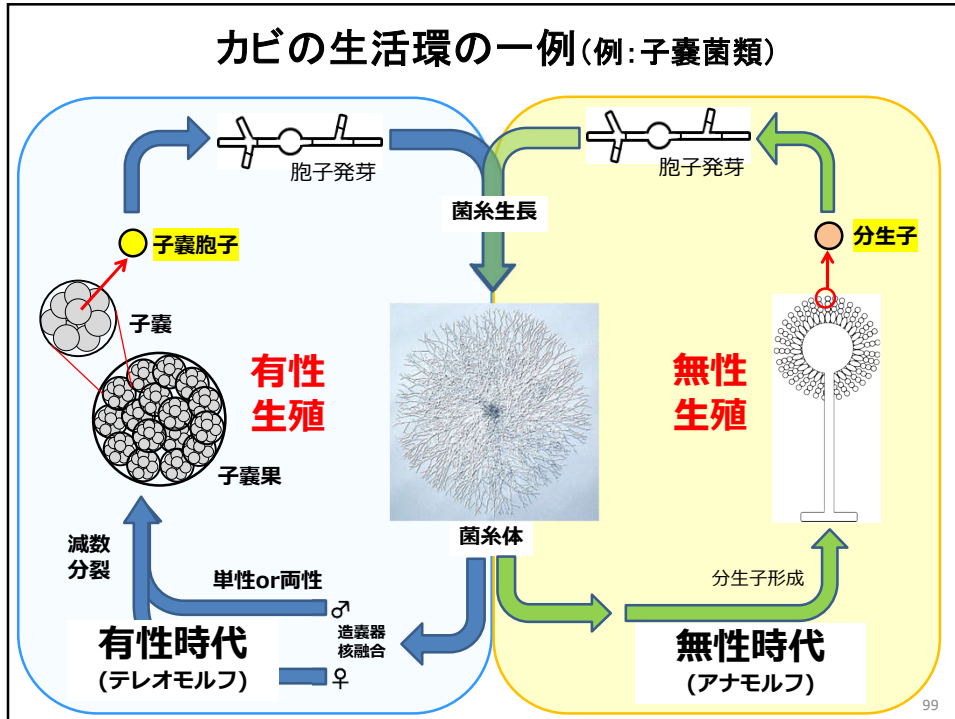
カビの基本構造 = 菌糸(菌糸体) + 生殖器官(孢子形成構造など)



- すべての構造がカビの同定には必要
→ 特に、「**孢子がどのように形成されるか**」が重要！

98

98



99

1) 菌糸(菌糸体)

~隔壁の有無、かすがい連結(クランプ連結)の有無、色調、壁の厚さ、表面性状(平滑、粗面、いぼ状、など)

菌糸体

かすがい連結

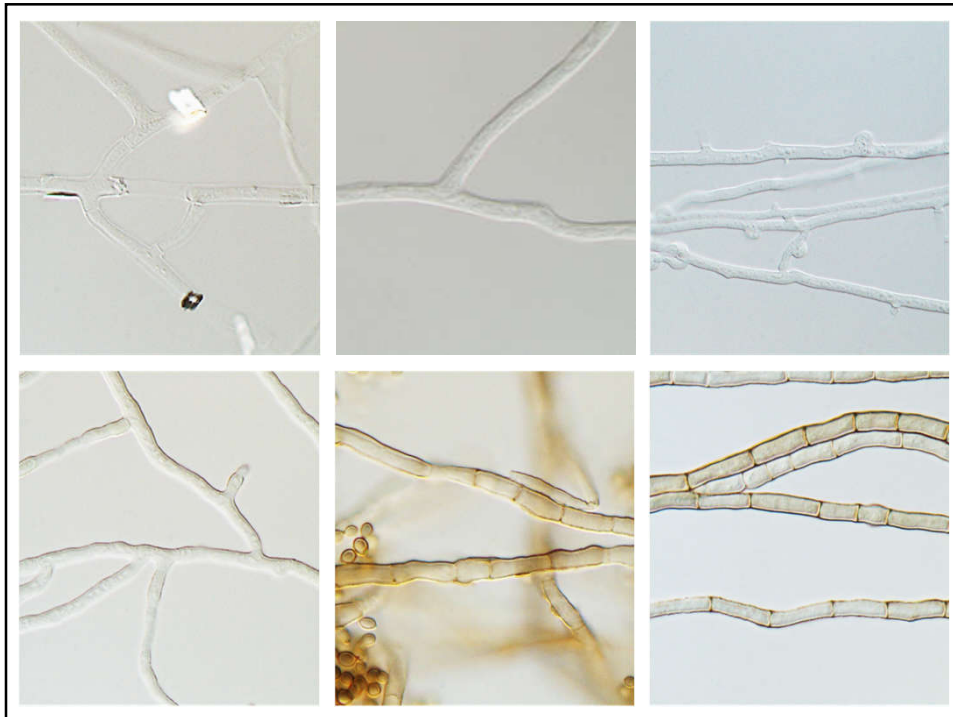
隔壁なし

隔壁

表面が小さいぼ状の菌糸

假性菌糸(偽菌糸)
隔壁を持たず、菌糸状に連鎖した細胞~酵母の仲間と認められる

100



101

2) 生殖器官 胞子形成構造の観察

1. 無性生殖器官

- ・分生子形成器官
 - 組織化する(分生子殻、分生子座～分生子果不完全菌類)
 - 組織化しない(分生子柄、分生子柄束～糸状不完全菌類)
- ・着生様式～鎖状、粘塊状
- ・形成様式～分節型、出芽型、フィアロ型など
- ・分生子(形態、色、細胞数、表面構造)
- ・厚膜胞子(形態、色、細胞数)
- ・菌核(形態、色)

2. 有性生殖器官(例:子嚢菌類)

- ・子嚢果(形態、色、剛毛の有無など)
- ・子嚢(形態、成熟時の膜の消失の有無、子嚢胞子数)
- ・子嚢胞子(形態、色、細胞数、付属糸の有無など)

102

カビ～孢子(分生子※)の形成様式

※無性的に形成される孢子。一般的なカビの“孢子”とは分生子を指します。

① 形成器官

対物レンズ

コロニーを肉眼あるいは実体顕微鏡ステージに載せて顕微鏡観察する。

糸状不完全菌類

分生子柄

分生子柄束

分生子果不完全菌類

分生子殻

分生子層

103

103

② 着生様式

※無性的に形成される孢子。一般的なカビの“孢子”とは分生子を指します。

対物レンズ

コロニーを直接、光学顕微鏡のステージに載せて顕微鏡観察する。

連鎖する
(鎖状)
:乾性

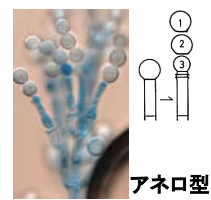
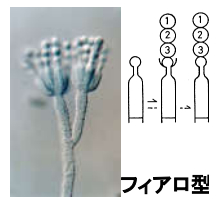
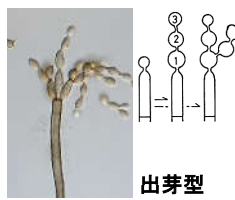
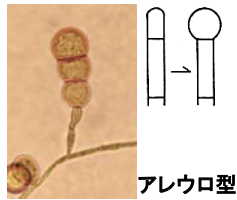
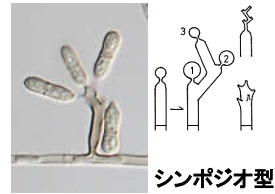
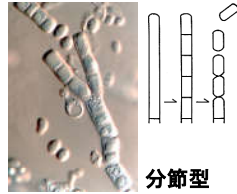
連鎖しない
(粘塊状)
:湿性

104

104

③ 形成様式

カビの同定には「孢子(分生子)の形成様式」が同定する際の**最重要項目**となる。



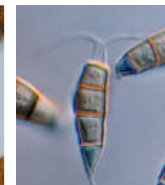
※これらの形質を観察するためには、丁寧にプレパラートを作製することが重要である。

模式図出典: 三浦宏一郎(1981)目で見える菌類の採集と観察 講談社

105

105

孢子(分生子)の形態～形、色、細胞数、表面構造



カビの孢子

≠ 細菌の孢子(芽胞)

- ・必ずしも耐久性のある構造ではない
- ・無性/有性孢子がある
- ・有性孢子～担子孢子、子嚢孢子、接合孢子など
- ・無性孢子～分生子、孢子嚢孢子、厚膜孢子など
- ・一般的にカビの孢子は“分生子”を指す

106

106

カビ～有性生殖器官(例:子囊菌類)

PDA, 2週間培養

子嚢果 (閉子嚢殻) 殻壁 子嚢および子嚢胞子
子嚢胞子は子嚢の中に形成される (内生)

有性時代 (テレオモルフ) (*Neosartorya*)

無性時代(アナモルフ) (*Aspergillus*)

分生子柄+分生子

コロニー上に有性/無性時代の両方が形成される種類もある。

(例) *Neosartorya* 属 (アナモルフ *Aspergillus*属)

従来、菌類は有性時代・無性時代、それぞれに学名が与えられてきた。
⇒ 1菌種に学名が2つ存在する! ⇒ 今後、1菌種1学名に統一される予定である。

107

酵母の形態的特徴

① 栄養増殖様式～出芽(budding)、分裂

一極(単極)出芽 二極(兩極)出芽 多極出芽

② 栄養細胞の形態

- 細胞の形: 球形, 卵形, 楕円形, レモン形
- 菌糸体と仮性菌糸(偽菌糸) ~ 隔壁を持たず、菌糸状に連続した細胞

③ 有性生殖器官の形成

- 子嚢/子嚢胞子(→)
- 担子器/担子胞子

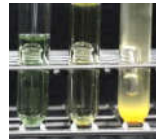
108

生理・生化学性状試験(主に酵母株の特徴付けを行う)

酵母(一部のカビ)を同定する際に、糖の発酵性、炭素源や窒素源の資化性、等の生理・生化学性状が必要な項目となる。

① 発酵性試験

～グルコース(ブドウ糖)などの糖類の発酵(ガスの発生)の有無の確認



② 資化性試験

～炭素源や窒素源を資化する(栄養源として取り入れる)かの確認

③ 生育温度試験

～生育温度範囲を調べる(低温性:0-20℃、中温性:25-35℃、高温性:37℃以上)

④ その他の試験

～耐塩性、酸の生成、油脂の分解、ビタミンを生育に必要とするか、など

109

109

カビの表現形質による簡単な同定方法

カビの高次分類群の同定検索表

(Samson et al., 2019; Food and Indoor Fungi 2nd を一部改変)

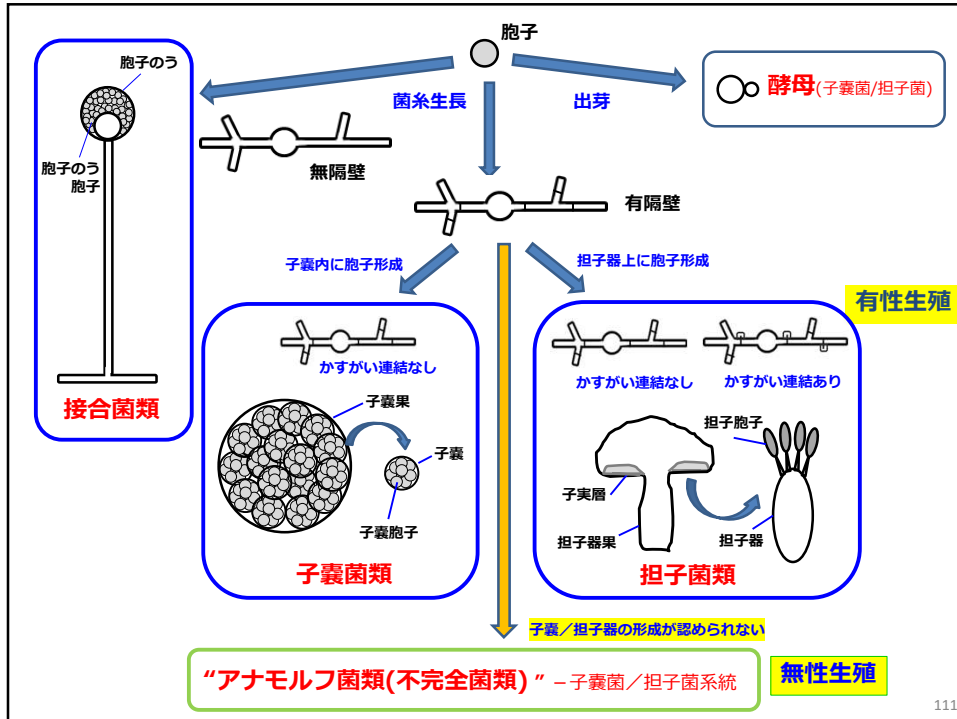
- 1a. 増殖は(主に)出芽により、一部、仮性菌糸あるいは真菌糸による増殖・・・**酵母**
- 1b. 増殖は栄養菌糸体により、分化した細胞上に胞子が形成される・・・2
- 2a. 菌糸は無隔壁あるいは偽隔壁で、ほとんどの無性胞子は胞子嚢内に形成される
・・・**ケカビ類(旧:接合菌類)**
- 2b. 菌糸は有隔壁で、胞子は胞子嚢内に形成されない・・・3
- 3a. 無性胞子(分生子)は分生子形成細胞から形成される・・・**不完全菌類(アナモルフ菌類)**
- 3b. 有性胞子は子嚢内あるいは担子器上に形成される・・・4
- 4a. 胞子は子嚢内に形成される(子嚢胞子)・・・**子嚢菌類**
- 4b. 胞子は担子器上に形成される(担子胞子)・・・**担子菌類**

【ポイント】胞子がどのように形成されるか？

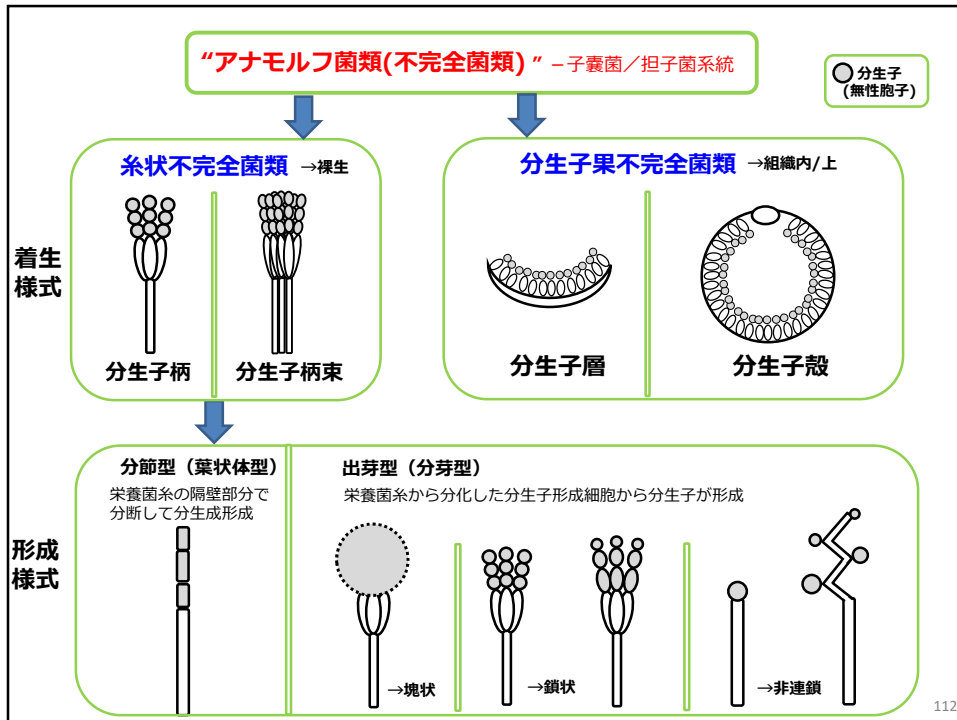
- **出芽**による増殖 → **酵母**
- **胞子嚢内**に形成される → **接合菌類(ケカビ類)**
- **子嚢内**に形成される → **子嚢菌類**
- 胞子が**菌糸あるいは分化した構造上**に形成される(露出状態で形成)
→ **不完全菌類(アナモルフ菌類)**～普段、目にする事の多いカビが含まれる

110

110



111

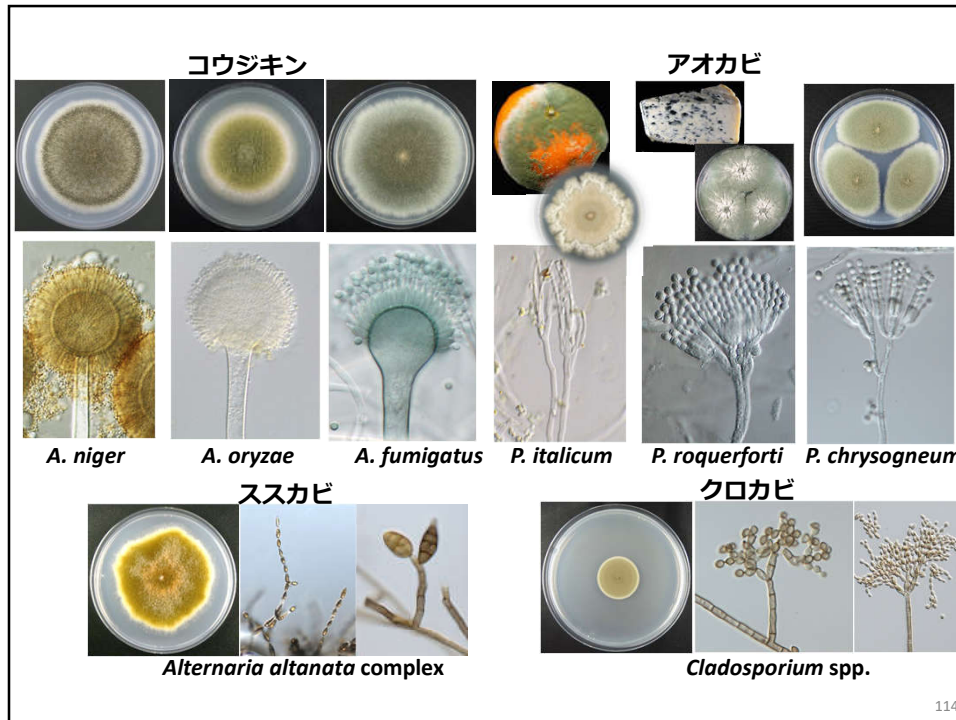


112

カビの表現形質による簡易同定 ~ コロニー性状と形態的特徴の組み合わせで同定

分類群 (属)	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Eurotium Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>
コロニー性状	ピロード状 粉状	ピロード状 粉状	粒状 ピロード状	ピロード状	ピロード状 羊毛状
コロニー色調	黒、緑、黄緑、青 緑、青、茶、白、黄 土	青緑～青	M40Y: 黄色 (生育速い) PDA: 黄緑 (生育遅い) ⇒ 好乾性	オリーブ 茶褐、緑褐 (生育遅い)	白、クリーム、 黄土、赤紫、紫
形態 胞子形成構造 (胞子形態)	ねぎぼうず状 (球形～亜球形) 	ほうき状 (球形～亜球形) 	粒状/ ねぎぼうず状 (球形～亜球形) 	樹枝状 (球形/レモン形) 	菌糸上に粘塊 (三日月/楕円形)

113



114

4.2. DNA塩基配列解析およびMALDI-TOF MS法による同定

- 1) DNA塩基配列解析法
- 2) MALDI-TOF MS法
- 3) DNA塩基配列解析法とMALDI-TOF MS法の比較

115

115

1) DNA塩基配列解析法

- ・塩基配列の違い = 生物種の違い、という考え方
- ・細菌(放線菌含む)および菌類(カビ・酵母)の分類・同定では、
リボソームRNA遺伝子(rDNA)が用いられる。

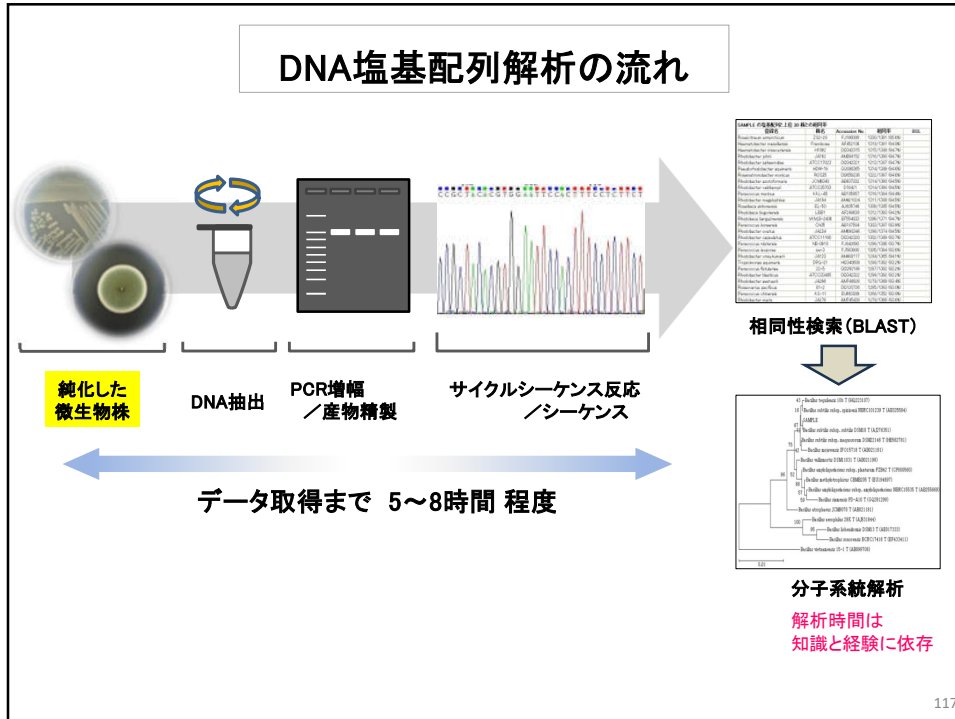
区分	対象遺伝子	特徴
細菌・放線菌	16S rDNA	既知種のほぼすべてのデータが登録
酵母	26S rDNA-D1/D2領域	
カビ(きのこ)	ITS領域	既知種の約半分程度?(以下?) → 食品衛生や臨床学的に有害なカビのDNAデータの登録数は多い

リボソームRNA遺伝子(rDNA)とは

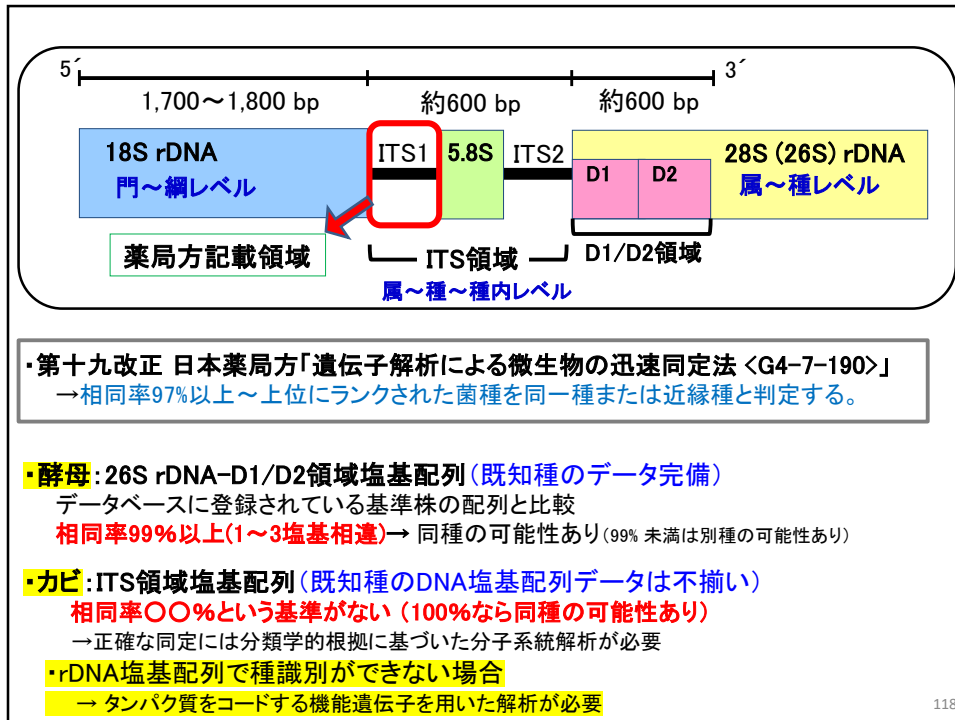
- ・リボソームはすべての生物の細胞に存在するタンパク質合成を担う器官
- ・すべての生物細胞内に存在する遺伝子であり、適度な保存性(共通性)がある
- ・ユニバーサルプライマーが設計されている(PCR増幅が容易)
- ・データベースが充実しており、微生物の属・種名まで同定可能なことが多い

116

116



117



118

NCBI BLAST検索 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

Nucleotide [Advanced](#) [Help](#)

Nucleotide

The Nucleotide database is a collection of sequences from several sources, including GenBank, RefSeq, TPA and PDB. Genome, gene and transcript sequence data provide the foundation for biomedical research and discovery.

Using Nucleotide	Nucleotide Tools	Other Resources
Quick Start Guide	Submit to GenBank	GenBank Home
FAQ	LinkOut	RefSeq Home
Help	E-Utilities	Gene Home
GenBank FTP	BLAST	SRA Home
RefSeq FTP	Batch Entrez	INSDC

119

119

NCBI BLAST検索ページ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Nucleotide BLAST

blastx translated nucleotide → protein

tblastn protein → translated nucleotide

Protein BLAST protein → protein

BLAST Genomes

Enter organism common name, scientific name, or tax id

Human Mouse Rat Microbes

Standalone and API BLAST

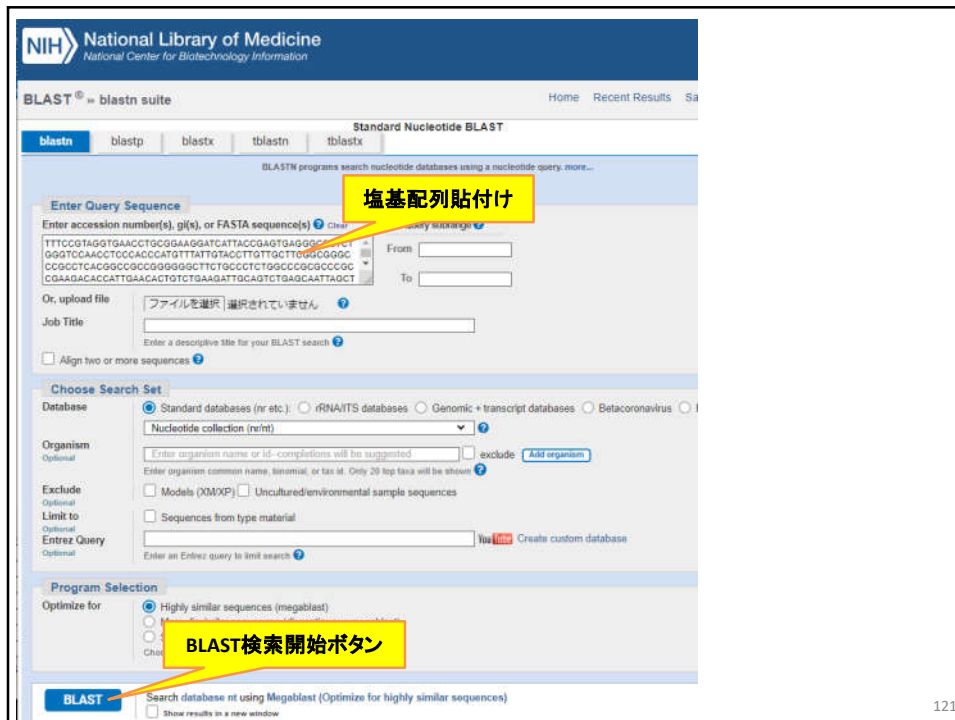
Download BLAST Get BLAST databases and executables

Use BLAST API Call BLAST from your application

Use BLAST in the cloud Start an instance at a cloud provider

120

120



121

通常のBLAST検索結果(一例)

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show

select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Penicillium corylophilum isolate CMV006B4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Penicillium cor...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium corylophilum isolate E20335 ITS small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence;...	Penicillium cor...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium corylophilum culture CBS 330.79 strain CBS 330.79 small subunit ribosomal RNA gene...	Penicillium cor...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium albidum culture CBS 254.29 strain CBS 254.29 small subunit ribosomal RNA gene, part...	Penicillium albi...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium corylophilum strain KAS5701 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trans...	Penicillium cor...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium corylophilum genes for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA ITS2, 28S rRNA, partial and compl...	Penicillium cor...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium corylophilum strain AY843 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; intern...	Penicillium cor...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium corylophilum isolate CV1.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; intern...	Penicillium cor...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium corylophilum strain ELM.C2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; intern...	Penicillium cor...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium sp. JCM 28093 genes for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA ITS2 and 28S rRNA, partial and...	Penicillium sp...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Uncultured Penicillium clone IRL 2451 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	uncultured Pen...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Penicillium chloroleucon strain CBS 127808 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr...	Penicillium chl...	1046	1046	100%	0.0	100.00%
Fungal endophyte culture-collection STRI-ICBG-Panama-TK1669 18S ribosomal RNA gene, partial...	fungal endophyte	1046	1046	100%	0.0	100.00%

122

122

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

BLAST® = blastn suite Home Recent Results Sa

Standard Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTn programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

塩基配列貼付け

TTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTCCGAGTGAAGGCTCT
GGGTCCACCCGCCACCCATGTTATTGTACCTGTTGCTTGCGGGC
CCGGCTACGGCCCGCGGGGGCTTCTGCGCTCTGGCCCGCGCCCG
CGAAGACACCATTAAGACTGTCTGAAGATTGCACTCTBAGCAATTAGCT

From To

Or, upload file 選択されていません

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Standard Nucleotide

Organism

Exclude Models Sequences from type material

Limit to Sequences from type material

Sequences from type material

Entrez Query

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast) Other

BLAST 検索開始ボタン

BLAST Search database nt using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

Show results in a new window

123

123

【 Sequences from type material】にチェックを入れて
BLAST検索を行った結果(一例)

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium corylophilum</i> strain FRR 802 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal trans...	<i>Penicillium cor...</i>	1042	1042	99%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium rubefaciens</i> culture CBS 145.83 strain CBS 145.83 small subunit ribosomal RNA gene...	<i>Penicillium rub...</i>	1035	1035	100%	0.0	99.65%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium fagi</i> CBS 689.77 ITS region, from TYPE material	<i>Penicillium fagi</i>	1029	1029	100%	0.0	99.47%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium fagi</i> culture CBS 689.77 str						99.47%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium maclemnaniae</i> culture CBS						98.76%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium velutinum</i> culture CBS 250.32 strain CBS 250.32 small subunit ribosomal RNA gene, p...	<i>Penicillium vel...</i>	1007	1007	100%	0.0	98.76%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium corylophilum</i> NRRL 802 ITS region, from TYPE material	<i>Penicillium cor...</i>	1007	1007	96%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium corylophilum</i> strain NRRL 802 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene...	<i>Penicillium cor...</i>	1007	1007	96%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium diabolicalicense</i> strain KAS 1726 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal J	<i>Penicillium da...</i>	1003	1003	99%	0.0	98.76%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium diabolicalicense</i> DACMC 250542 ITS region, from TYPE material	<i>Penicillium dia...</i>	1003	1003	99%	0.0	98.76%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium terenum</i> CBS 313.67 ITS region, from TYPE material	<i>Penicillium terr...</i>	1002	1002	100%	0.0	98.59%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Penicillium smithii</i> culture CBS 276.83 strain CBS 276.83 small subunit ribosomal RNA gene, parti...	<i>Penicillium smi...</i>	1002	1002	100%	0.0	98.59%

Penicillium corylophilumのタイプ由来データと相同率100%
であることがわかる

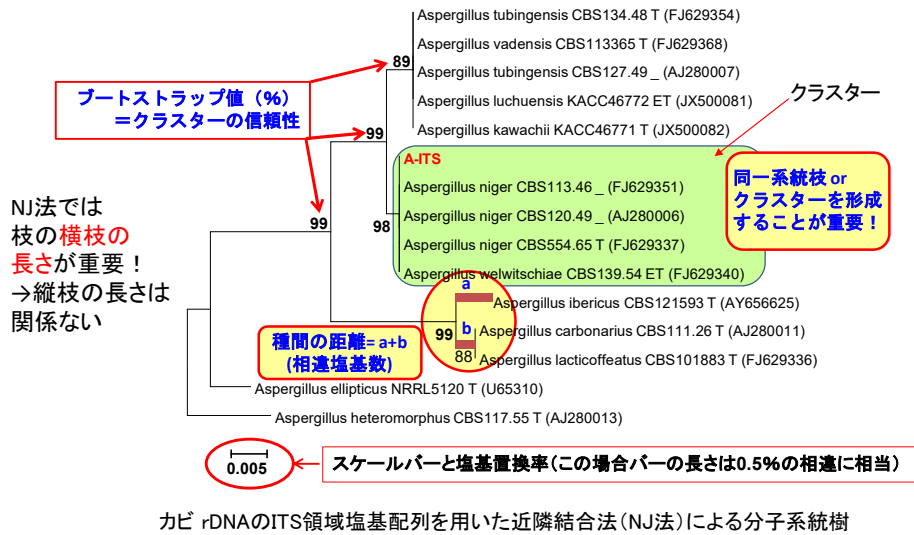
→信頼性の高い同定結果を表示できる

124

124

分子系統解析による同定～分子系統樹(NJ法)の見方

正確な同定には相同性検索だけでなく、基準株／基準標本等との配列比較および分子系統解析が重要！



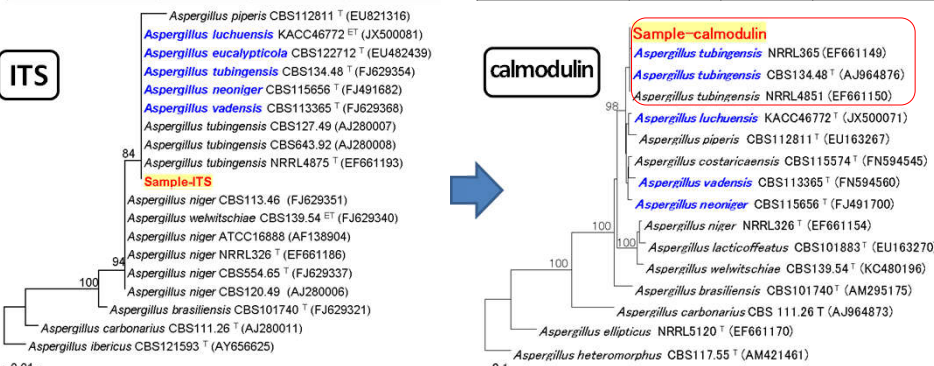
125

125

分子系統解析による同定の一例(カビ)

各遺伝子の塩基配列とデータベース上の塩基配列との相同率(相同性検索結果)

ITS				calmodulin			
登録名	株名	Accession No.	相同率	登録名	株名	Accession No.	相同率
<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS127.49	AJ280007	581/581 (100.0%)	<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS134.48	AJ964876	694/695 (99.9%)
<i>Aspergillus vadensis</i>	CBS113365	FJ629368	579/579 (100.0%)	<i>Aspergillus luchuensis</i>	KACC46772	JX500071	704/725 (97.1%)
<i>Aspergillus luchuensis</i>	KACC46772	JX500081	560/560 (100.0%)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CBS101740	AM295175	623/698 (89.3%)
<i>Aspergillus neoniger</i>	CBS115656	FJ491682	464/464 (100.0%)	<i>Aspergillus vadensis</i>	CBS113365	FN594560	503/519 (96.9%)
<i>Aspergillus eucaalypticola</i>	CBS122712	EU482439	446/446 (100.0%)	<i>Aspergillus neoniger</i>	CBS115656	FJ491700	444/455 (97.6%)



ITSでは5菌種が100%一致するため、同定できないが、calmodulinでは*A. tubingensis*と同定できる。
→カビの場合、*Aspergillus*属、*Penicillium*属、*Cladosporium*属や*Fusarium*属はITSで識別困難な種が多い

126

126

2) MALDI-TOF MS法

MALDI-TOF MS を用いた微生物同定法 とは

- 【特徴】**
- 微生物の主にタンパク質のマススペクトルを測定
 - 「マススペクトルの違い=生物種の違い」という考え方
 - データベースに登録されているマススペクトルと照合
 - どの菌種(菌株)のマススペクトルに類似するかにより菌種を同定

- ヨーロッパで臨床現場を中心とした機関で導入
- 国内では2010年頃から大学病院などを中心に普及が進む
- 2013年 **病原微生物の迅速同定技術**としてアメリカ食品医薬品局(FDA)から認可



品質・衛生管理の現場での応用が期待され、
製薬会社・食品製造企業などで導入が進む

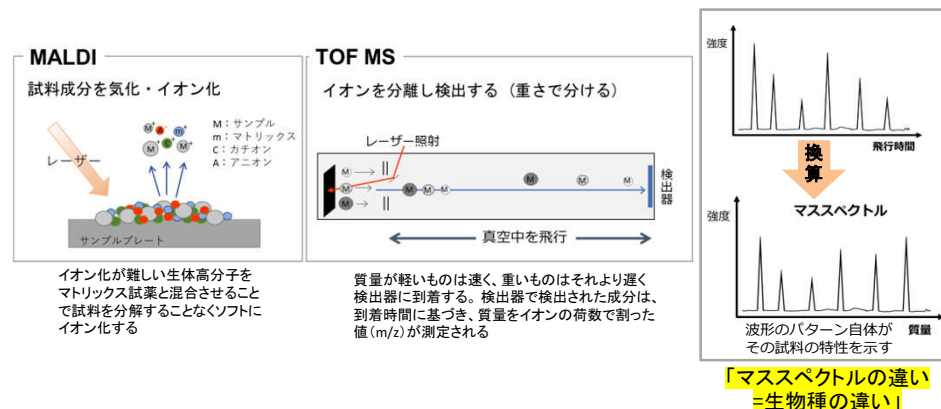
(日本国内ではブルカー社のMALDI Biotyperとビオメリュエ社のVITEK MSシリーズが普及)

127

127

MALDI-TOF MS法(原理)

MALDIとTOF-MSの2つの技術の組み合わせにより、生体高分子(タンパク質など)の質量を決定する方法



MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法)
試料成分のイオン化を支援する方法。試料成分にマトリックスと混ぜ合わせて、窒素レーザー光をあてることで、マトリックスのごく一部が急速に加熱され、試料成分とともに気化、イオン化される。

TOF MS: Time of Flight Mass Spectrometry (飛行時間型質量分析法)
試料中の成分の質量を測る方法。イオン検出器に到達するまでの時間差を検出することで質量を測定する。

128

128

解析手順(例: MALDI Biotyper, ブルカー社)

純化した微生物コロニー → 爪楊枝などでスライドに菌体を塗布 → マトリックス試薬添加 (試薬を滴下・混合結晶化 (風乾)) → 分析/測定 → マスペクトルをデータベースと自動で照合

← 前処理時間: わずか 数分 → 分析測定～解析: +数分 →

【前処理方法】～細胞膜・細胞壁が固い菌の場合は、ギ酸添加あるいはエタノール・ギ酸抽出法を選択することで、菌種同定に適したスペクトル取得可

セルスマエ法	菌体をプレートに塗布後にマトリック試薬を滴下・乾燥させる(前処理なし)	グラム陰性菌、ほとんどのグラム陽性菌
ギ酸添加法 (ギ酸ダイレクト法)	菌体をプレートに塗布後、その上から70%ギ酸を滴下し、直接菌体の細胞壁を破壊する前処理法	酵母(酵母様真菌) 嫌気性菌、ムコイド型コロニー菌など、セルスマエ法で難しい菌
エタノール・ギ酸抽出法	菌体コロニーを水・エタノールで洗浄し、菌体沈査をギ酸・アセトニトリルで懸濁することで、タンパク質を液層に抽出することで夾雑物などを除外する方法	カビ(1-3日間回転培養後に抽出) 上記処理法で難しい菌

129

ライブラリー照合結果(例: MALDI Biotyper)

Bruker MALDI Biotyper Identification Results

Result Overview

結果概要						サンプル毎の詳細			
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value	Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
F1 (+++) (A)	12345_01_1 (unassigned)	<i>Penicillium citrinum</i>	2.95	<i>Penicillium citrinum</i>	1.88	1 (+++)	<i>Penicillium citrinum</i> MPA 1376 MPA	2.95	J29088727
F1 (+++) (A)	12345_01_2 (unassigned)	<i>Penicillium citrinum</i>	2.95	<i>Penicillium citrinum</i>	1.88	2 (-)	<i>Penicillium citrinum</i> DSM 1997 DSM	1.88	J29088727
F1 (C) (C)	12345_02_1 (unassigned)	No Organism Identification Possible	1.68	No Organism Identification Possible	0.68	3 (-)	<i>Penicillium citrinum</i> DSM 1179 DSM	1.73	J29088727
F1 (C) (C)	12345_02_2 (unassigned)	No Organism Identification Possible	1.68	No Organism Identification Possible	0.68	4 (-)	<i>Trichoderma tomentosum</i> CG6 111301 IMDS	1.68	J29088727
						5 (-)	<i>Trichoderma esquinum</i> CG6 DSM 12284 DSM	0.61	J29088727

※スコア(結果)の見方

色	スコア	解釈
緑	2.00～3.00	信頼性の高い同定結果(種レベル)
黄	1.70～1.99	信頼性がやや低い同定結果(属レベル)
赤	0.00～1.69	信頼性が低く、同定不可

スコア値によって色分けされており、同定結果の信頼性がどの程度か一目でわかる

130

3) DNA塩基配列解析法とMALDI-TOF MS法の比較

	DNA塩基配列解析法 (rDNA)	MALDI TOF-MS法
長所	1) データベースの登録数が多い → 多くの既知種について照合可能 → 既知種と異なる場合も近縁種を推定可能 2) 結果の再現性が高い 3) 培養条件は影響しない	1) 迅速性 ～約数十分程度で結果判明 2) 前処理など簡便な操作性、 解析はデータベースとの自動照合 → 特別な知識・技術は不要 3) 試薬等の消耗品が少ない → ランニングコストが低い 4) 同定結果が明確 (データベース登録の種～近縁種レベルでの同定)
短所	1) 専門的な技術・知識を要する (実験技術、分類学的な知識) 2) 結果の取得までに時間がかかる (1日～2日程度) 3) 試薬等の消耗品などのランニングコストが高い	1) 同定結果はデータベースに依存する → 登録がなければ同定不可 (DNAに比べて登録種数は少ない) 2) 近縁種間の同定精度は低い 3) 株レベルの識別はできない 3) 培養条件 (培地や培養時間) によって スペクトルパターンに差異が生じる (菌体の生育状態でタンパク質組成変化)

131

131

<糸状菌 (カビ) の同定項目～新種提唱>

* 試験項目は分類群によって異なる

【必須】

・ **rDNA-ITS領域塩基配列** / または LSU (D1/D2) 領域塩基配列

・ 複数の機能遺伝子解析 (MLSA)

・ **形態学的特徴 (実体顕微鏡、光学顕微鏡)**

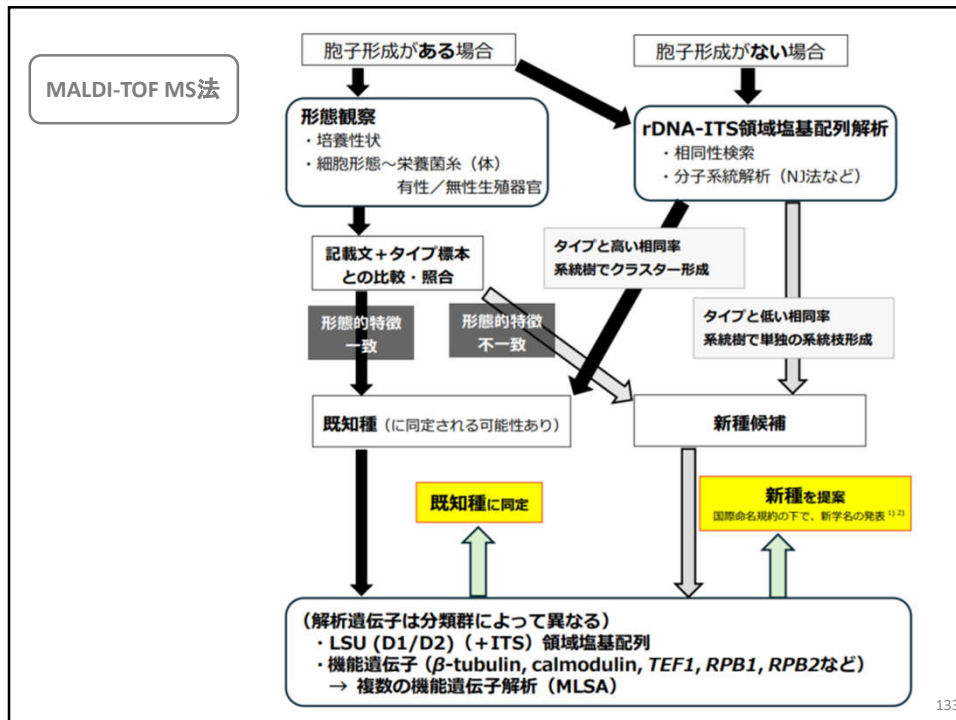
- ・ 培養性状 (コロニーなど)
- ・ 菌糸・菌糸体
- ・ 有性/無性生殖器官 (有性/無性胞子の形態と形成様式など)

【オプション～分類群によって異なる】

- ・ ゲノム (塩基) 配列 (ゲノムシーケンス)
- ・ 電子顕微鏡による微細構造観察 (菌糸 [体] や胞子形成構造など)
- ・ 生理・生化学的特徴 (発酵性、炭素源/窒素源資化性、酵素活性など)
- ・ 生育条件 (気相、温度、pHなど)

132

132



133

4.3. 現場における実践的な同定法

134

134

微生物分析の流れ

1. 異物混入や異変の確認(目視確認)

2. **顕微鏡観察**(プレパラート作製)

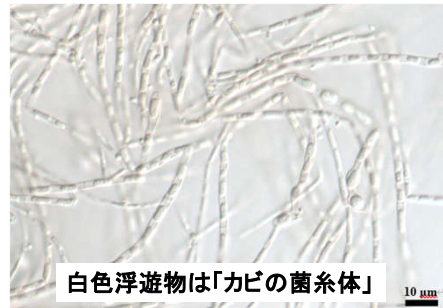
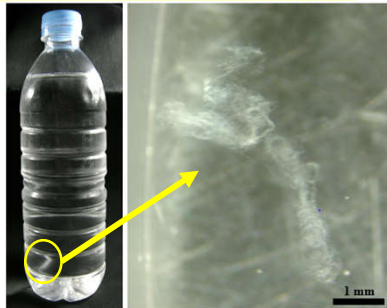
→ 生物(微生物)か否かの判定

→→ 生物(微生物)の場合、その種類は?(細胞形態に特徴がある場合、分類群推定可能)

135

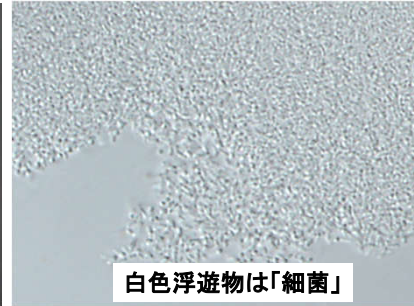
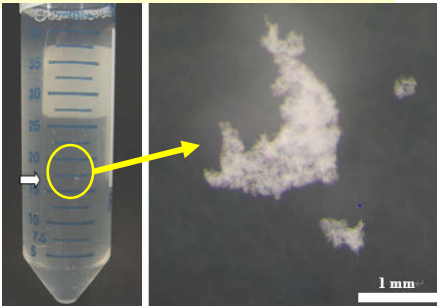
135

<実例> 飲料水中の白色浮遊物



白色浮遊物は「カビの菌糸体」

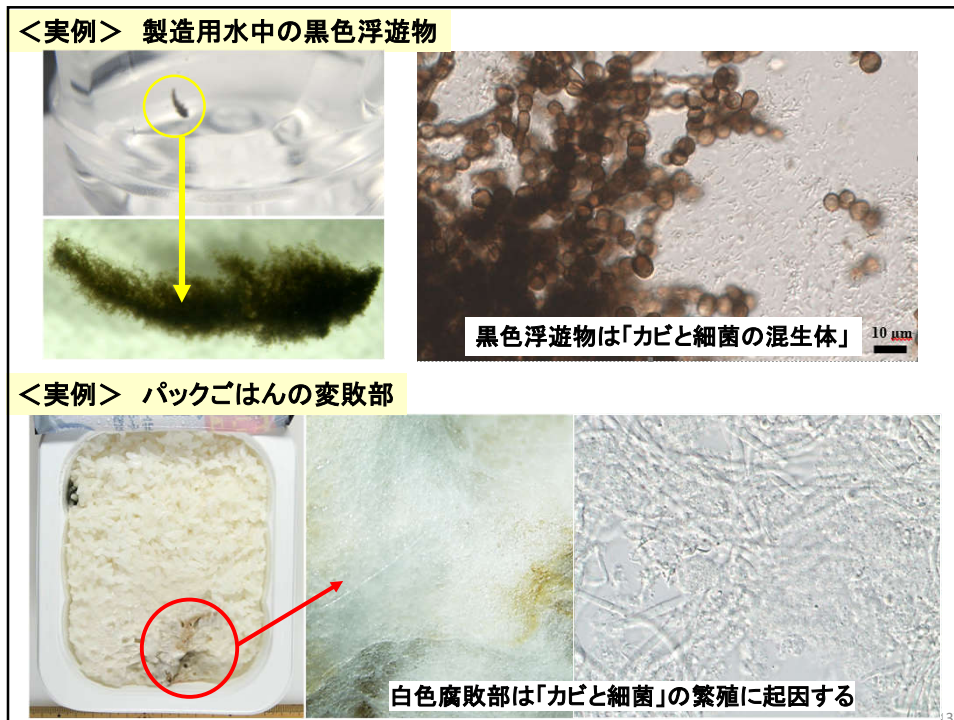
<実例> 製造用水中の白色浮遊物



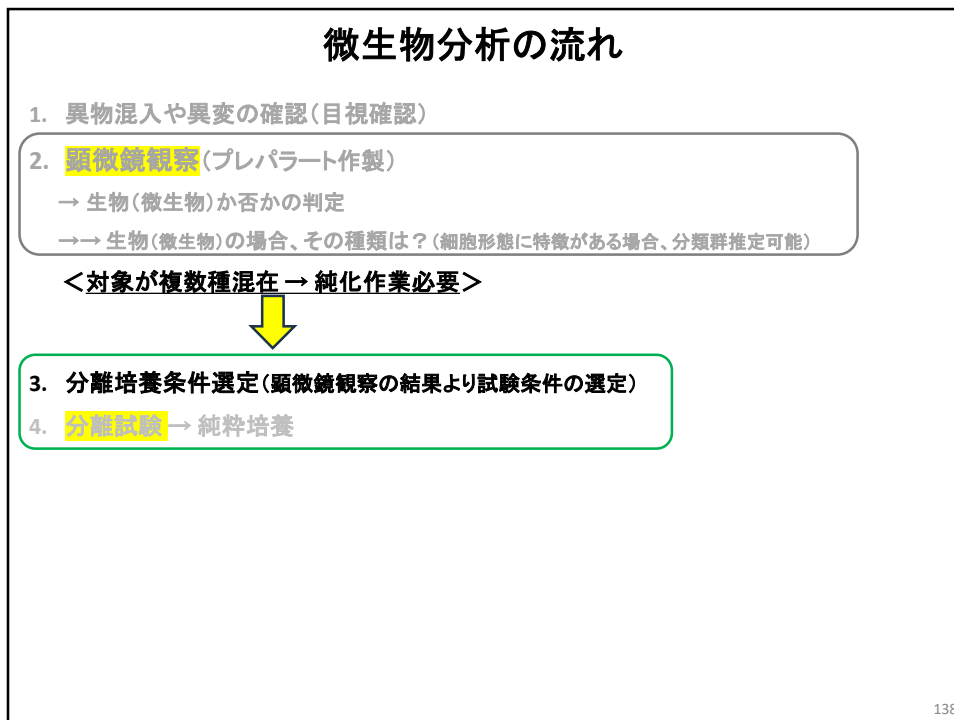
白色浮遊物は「細菌」

136

136

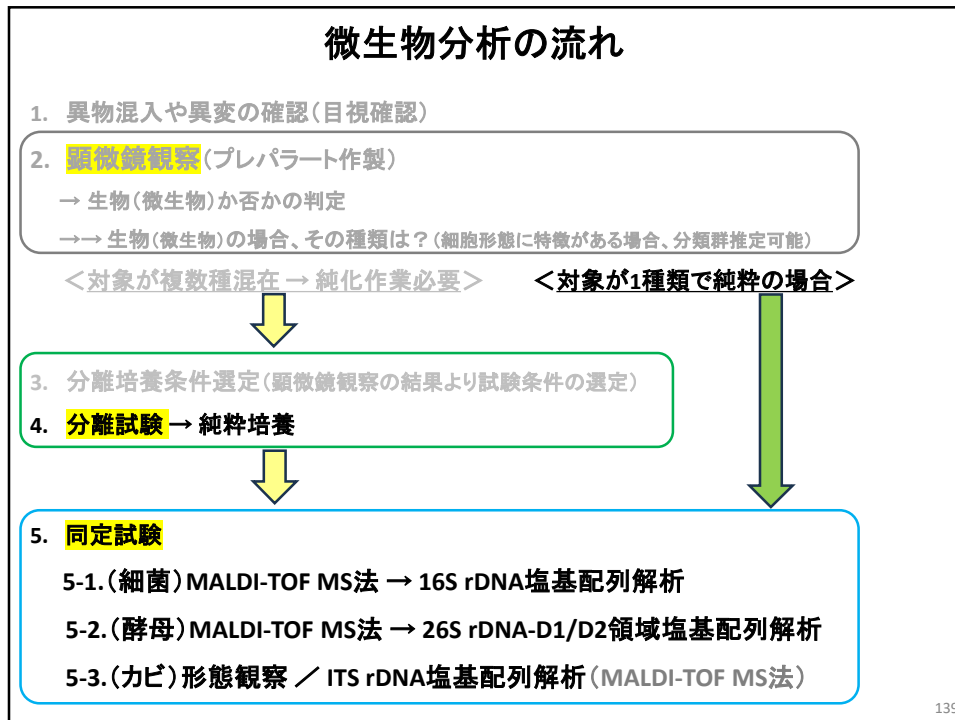


137

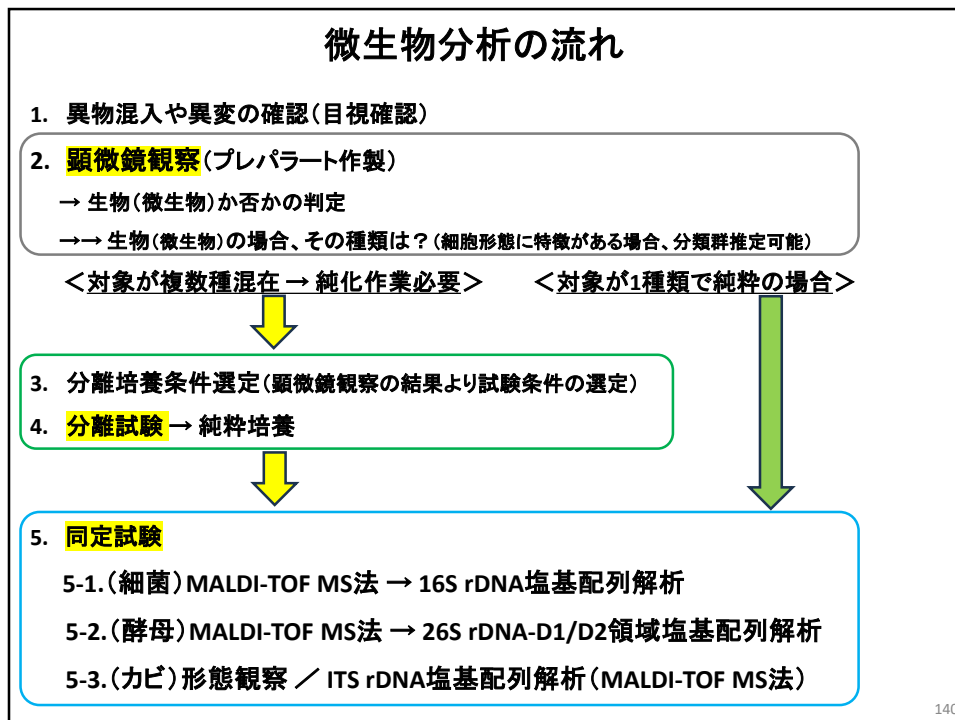


138

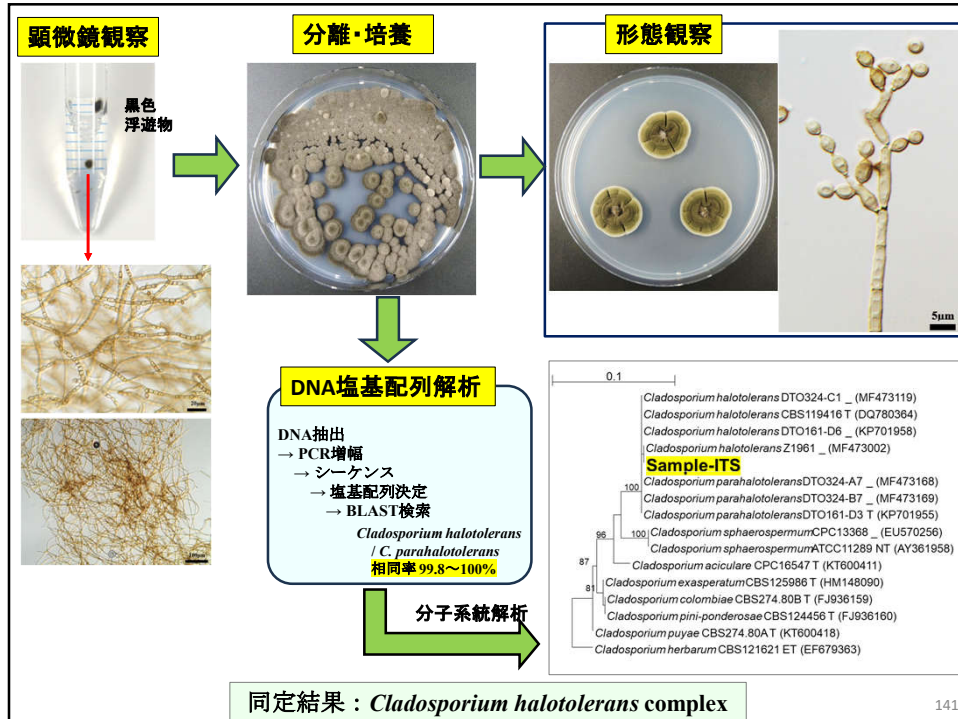
138



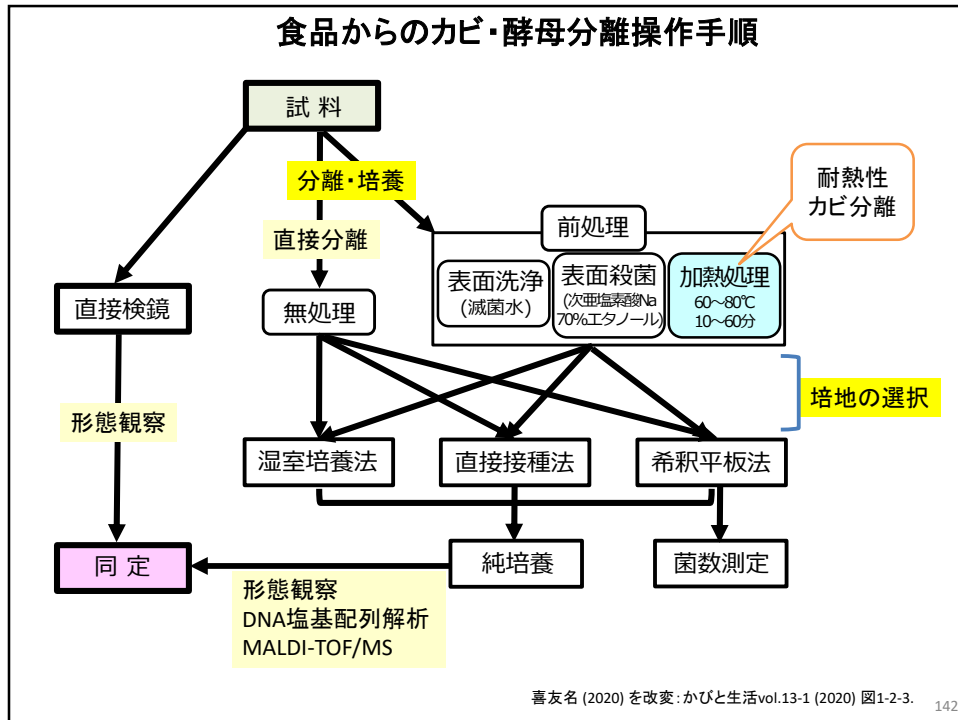
139



140



141



142

微生物試験に関するテクニカルトレーニング

<https://www.tecsrg.co.jp/services/products-and-tec/training/>



- 実際に手を動かして技術を学ぶトレーニングスタイル
- 最大3名の少人数制(貸切による講義内容のカスタマイズも可能(要事前相談))

コース名	内容
コース① 微生物取扱い 初心者コース	微生物の検査に不可欠な培養操作・純粋性確認に関する基礎的な知識と実技の研修
コース② カビ取扱い形態観察 初心者コース	カビの培養操作、取扱い、観察に関する基礎的な知識と実技の研修
コース③ 遺伝子解析 細菌・放線菌コース	細菌・放線菌のDNA塩基配列解析におけるDNAの調製・DNA塩基配列の解読・結果の評価に関する基礎的な知識と実技の研修
コース④ 遺伝子解析 カビ・酵母コース	カビ・酵母のDNA塩基配列解析におけるDNAの調製・DNA塩基配列の解読・結果の評価に関する基礎的な知識と実技の研修
コース⑤ MALDI BIOTYPER 微生物同定コース	MALDI-TOF MSを用いた微生物同定に必要な基礎知識と実技の研修

143

143

ご清聴ありがとうございました



株式会社テクノスルガ・ラボ
TechnoSuruga Laboratory Co.,Ltd.

〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎330番地

Tel: 054-349-6211 Fax: 054-349-6121

E-mail: tk_1014@tecsrg.co.jp (個人アドレス)

tsl_contact@tecsrg.co.jp (代表アドレス)

弊社Web siteもご覧下さい。

<https://www.tecsrg.co.jp/>



144

144

補足資料

145

145

室内環境でよくみられるカビ

Absidia corymbifera	Eurotium amstelodami	<i>Penicillium</i> rugulosum
Acremonium murorum	<i>Eurotium</i> chevalieri	<i>Penicillium</i> simplicissimum
<i>Acremonium</i> strictum	<i>Eurotium</i> herbariorum	<i>Penicillium</i> spinulosum
Alternaria tenuissima	<i>Eurotium</i> rubrum	<i>Penicillium</i> variabile
Aspergillus calidoustus	Exophiala dermatitidis	Phialophora fastigiata
<i>Aspergillus</i> candidus	Fusarium culmorum	<i>Phialophora</i> verrucosa
<i>Aspergillus</i> clavatus	<i>Fusarium</i> solani	Phoma glomerata
<i>Aspergillus</i> flavus	<i>Fusarium</i> verticillioides	<i>Phoma</i> macrostoma
<i>Aspergillus</i> fumigatus	Geomyces pannorum	Pyrenoma domesticum
<i>Aspergillus</i> niger	Geotrichum candidum	Rhizopus stolonifer
<i>Aspergillus</i> penicillioideus	Mucor circinnolides	Rhodotorula mucilaginoso
<i>Aspergillus</i> restrictus	<i>Mucor</i> plumbeus	Schizophyllum commune
<i>Aspergillus</i> sydowii	<i>Mucor</i> racemosus	Scopulariopsis brevicaulis
<i>Aspergillus</i> terreus	Oidiodendron griseum	<i>Scopulariopsis</i> candida
<i>Aspergillus</i> versicolor	<i>Oidiodendron</i> rhodogenum	<i>Scopulariopsis</i> fusca
<i>Aspergillus</i> westerdijkiae	Paecilomyces lilacinus	Serpula lacrymans
Aureobasidium pullulans	<i>Paecilomyces</i> variotii	Sistotrema brinkmannii
Botrytis cinerea	Penicillium brevicompactum	Sporobolomyces roseus
Candida peltata	<i>Penicillium</i> chrysogenum	Stachybotrys chartarum
Chaetomium aureum	<i>Penicillium</i> citreonigrum	<i>Stachybotrys</i> (Memnoniella) echin
<i>Chaetomium</i> globosum	<i>Penicillium</i> citrinum	Syncephalastrum racemosum
Chrysonillia sitophila	<i>Penicillium</i> commune	Trichoderma harzianum
Cladosporium cladosporioides	<i>Penicillium</i> corylophilum	<i>Trichoderma</i> longibrachiatum
<i>Cladosporium</i> herbarum	<i>Penicillium</i> crustosum	<i>Trichoderma</i> viride
<i>Cladosporium</i> macrocarpum	<i>Penicillium</i> decumbens	<i>Tritirachium</i> oryzae
<i>Cladosporium</i> sphaerospermum	<i>Penicillium</i> expansum	Ulocladium alternariae
<i>Cryptococcus</i> laurentii	<i>Penicillium</i> funiculosum	<i>Ulocladium</i> atrum
Curvularia lunata	<i>Penicillium</i> glabrum	<i>Ulocladium</i> chartarum
Emericella nidulans	<i>Penicillium</i> olsonii	Wallemia sebi
Epicoccum nigrum	<i>Penicillium</i> palitans	

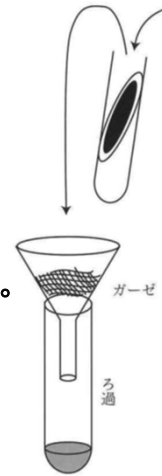
特に多い属
Aspergillus
Cladosporium
Penicillium

Samson (2011) In: Fundamentals of mold growth in indoor environments., pp. 101-116

146

カビ孢子懸濁液の調製方法

1. 前培養(平板or斜面): 約7~14日
2. 界面活性剤※添加生理食塩水を少量ずつ培養容器に入れて、スクレーパー等で孢子を中心に集菌する。
3. ガーゼ(または目の粗いろ紙)を漏斗にかぶせて、漏斗を試験管あるいはチューブに設置する。
4. 集菌した孢子液をガーゼでろ過する。2~3回繰り返すことで、孢子以外の菌糸体等の混入を減らすことができる。
5. 4.でろ過した孢子液の濃度(孢子数)を血球計算盤で計数する***。



<注意点>

調製した孢子液は早めに使用する。使用直前まで冷蔵庫で保管する。

図版出典: 高鳥浩介 監修. 2002. かび検査マニュアルカラー図譜. 株式会社テクノシステム, 東京

147

※ カビ孢子懸濁液調製に使用される主な界面活性剤添加生理食塩水

0.05 (0.1) % Tween80 生理食塩液

Tween 80 (ポリソルベート80)	0.5 ml
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 ml

0.005 (0.01) %ラウリル硫酸ナトリウム生理食塩液

ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)	0.05 (0.1) g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 ml

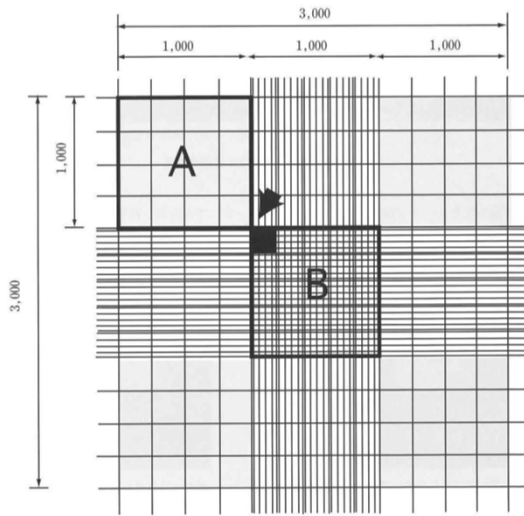
0.005%スルホコハク酸ジオクチルナトリウム生理食塩液

スルホコハク酸ジオクチルナトリウム	0.05 g
NaCl	8.5 g
精製水	1,000 ml

他に、滅菌水、滅菌生理食塩水の使用

148

※※ 血球計算盤（改良型ノイパウエル）による孢子数測定方法



1. 1 mm² 中 (太枠 A) にある孢子数を測定する。

→ この枠内に孢子が a 個あった場合、1mlあたりの孢子数は $a \times 10^4 / \text{ml}$ となる。 a 個は 100~200 が望ましい。

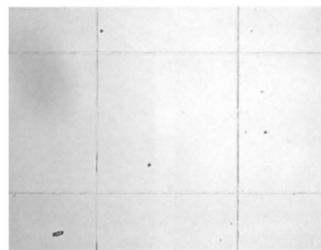
2. 孢子数が多かった場合には、B枠内の黒塗り部分 (矢印) の孢子数を測定する。

→ この黒塗り部分に孢子が b 個あった場合、1mlあたりの孢子数は、 $b \times 25 \times 10^4 / \text{ml}$ となる。

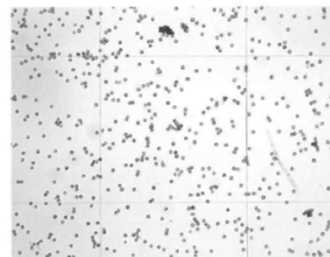
図版出典：高鳥浩介 監修. 2002. かび検査マニュアルカラー図譜. 株式会社テクノシステム, 東京

149

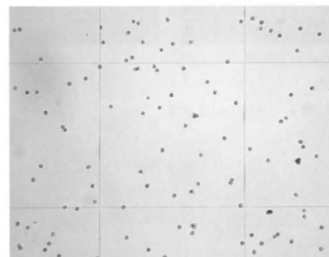
血球計算盤使用時の観察視野の一例



不適 少なすぎる



不適 多すぎる



適 (約 $10^5 / \text{ml}$)

図版出典：高鳥浩介 監修. 2002. かび検査マニュアルカラー図譜. 株式会社テクノシステム, 東京

150

微生物の学名表記のルールとその見方

学名 Scientific name とは？

学名とは、地球上のすべての生物名を正しく表記し、正確に伝達するためにつくり出された**世界共通の科学上の生物名**

(国際藻類・菌類・植物命名規約《深圳規約》2018 日本語版, 2019)

<微生物の学名の例>

Bacillus subtilis, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus oryzae*

(注意) 「大腸菌」や「麹菌」などの一般的に使用される日本語表記は「和名」と呼ばれる(日本国内でしか通用しない呼称)
→特定の「種」ではなく、「菌群」を示すこともある

151

151

学名表記のルール

1. 種の学名は属名と種小名(種形容語)で構成(→**二語名法/二命法**)される。
イタリック体(斜体)で表記する。
2. 属名は**大文字**で、種小名(種形容語)は**小文字**から始める。
3. 属名は**名詞**、種形容語(種小名)は**形容詞**である。
4. 学名は**ラテン語**または**ラテン語化したギリシャ語**
⇒ラテン語は名詞に「男性、女性、中性」の性があるため、属名である名詞の性に合わせて種形容語(種小名)の形容詞が語尾変化することに注意する。
5. 種以下のカテゴリー(ランク)の表記において、学名に必ずそのランクを示し、亜種や変種などのランクを示す部分はイタリック体にしない。
例) *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*
ただし、動物の場合、学名に種以下のランクを示す必要はなく、種名の次に亜種名を記す(三名式)。 例) ニホンアナグマ *Meles meles anakuma*
6. 学名表記は命名規約に基づく。
菌類は「**国際藻類・菌類・植物命名規約**」、細菌は「**国際原核生物命名規約**」
7. 学名の読み方・発音に統一規則はない。
ローマ字の発音にほぼ等しいとされているが、その国の言語の習慣によって、英米では英語流、ドイツではドイツ流、日本ではローマ字式に発音している。

152

152

微生物の学名の見方(例: 麹菌)

***Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn (1884)**

属名 種小名 命名者名 発表年

基礎異名 Basionym: *Eurotium oryzae* Ahlb. 1878

(Ahlb.) Cohn は最初に記載した人の名前。
Cohnは再記載した人の名前。

→動物学では「種名」
植物学（菌類含）では「種小名／種形容語」
細菌学では「種形容語」



属名と種小名はヒトの名前でいうと、個人の姓と名に相当する

【参考情報】*Aspergillus oryzae* の学名の由来（語源：etymology）

日本に教師として招かれたヘルマン・アールブルク Hermann Ahlburgが1876年清酒麹からコウジカビの1種を分離した。分類学的研究の結果、既知種とは異なる新種として命名した。米麹より分離したことからイネの学名(属名)*Oryzae*に因んで、*Eurotium oryzae*と記載した。その後、1884年に教師として日本に招聘されたフェルディナント・コーンFerdinand Julius Cohnが再度同定を行い、*Eurotium*属から*Aspergillus*属へ転属して、*Aspergillus oryzae*として再記載を行った。

153

153

学名には意味がある。

学名はその生物の特徴／性状や産地／分離源に由来する名前が多い。

	ラテン語	英語	日本語
名詞	bacillus	Small rod	短い棒
	bacter / bacterium	Rod, staff	棒
	coccus	Coccus, grain	球、粒
	myces	fungus	菌
	vibrio	Vibrating organism	振動するもの
形容詞	-cola	inhabiting	～の住人
	-oides / -oideus	-like	～様な
	-philus	-loving	～好き
	-ensis / -ense	from	～産の

また、その微生物の研究に関連深い人や著名な研究者の名前を学名に献名することがある（例：酵母の属名 *Sugiyamaella* 属は、杉山純多博士に献名された学名）

<注意> 学名提案者が自分自身の名前を学名に付けることは無作法とされている。

154

154

属名の主要な後節（語尾）

語尾(名詞の性)	意味	語源
-bacter(男性) -bacterium(女性)	細菌	ギリシャ語のbakteriaは「杖」「棒」の意味、ラテン語化すると前者がbacteria、後者がbacterium
-coccus(男性)	つぶ(細菌)	ギリシャ語のkokkosは「穀粒」「種子」の意味。そこから転じて-coccusと「つぶ」すなわち細菌の意味に用いられる
-monas(女性)	独立した一つの単位 (細菌)	ギリシャ語のmonasには「孤独の」という意味と「単位」という意味がある
-myces(男性)	キノコ(細菌)	ギリシャ語のmykēsは「キノコの」の意味。 「菌」=英語fungus, ドイツ語Pilz, ラテン語fungus, ギリシャ語mykēs ギリシャ語のmykēs (mycesとラテン語化)は生物学では「キノコ」または「細菌」の意味にも用いられる

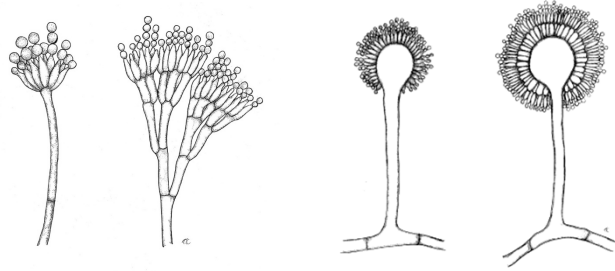
155

155

	主要な学名（属名または種名）	意味／語源
細菌	<i>Agrobacterium</i>	畑の細菌
	<i>Bacillus</i>	小さい棒 (⇒桿菌)
	<i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌)	種形容語は「繊細な」「微細な」
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	種形容語は「チューリンゲンの」、発見地のドイツのThüringneに因む 基本的に地名の形容詞を作る時は「-ensis」を付す。
	<i>Lactobacillus</i>	Lacto-は「乳の」
	<i>Lactobacillus casei</i>	種形容語は「チーズ」
	<i>Micrococcus</i>	小さなつぶ(細菌)
	<i>Pseudomonas</i>	偽のモノド。Pseudo- = 「偽の」
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (緑膿菌)	種形容語は「錆だらけの、緑青の」
	<i>Staphylococcus</i> (ブドウ球菌)	ブドウ状のつぶ(細菌)(スタフィロコックス)/ギリシャ語のstaphylēは「ブドウの房」の意味
	<i>Streptococcus</i> (レンサ球菌)	柔軟な細菌、ねじれた細菌
	<i>Streptococcus lactis</i>	種形容語は「乳の」
	<i>Streptomyces</i> (放線菌)	Strepto-はギリシャ語のstreptosに由来し、「しなやかな」「曲がった」「たやすくねじれる」
	菌類	<i>Aspergillus</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>		種小名は「米」の意味。
<i>Penicillium</i>		ラテン語のpēnicilliumの縮小形で「小さい刷毛」「小さい画筆」
<i>Saccharomyces</i>		砂糖のキノコ(ギリシャ語のsakchar = sakcharon(砂糖)とギリシャ語のmykes(キノコ)の複合語)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		種小名は「ビール」の意味。ビール(麦酒)のラテン名cerevisiae = cervisiaの属格 cerevisiaeを用いたもの。

156

カビの写真撮影の心構え、注意点



157

157

写真撮影の対象および使用機器

撮影対象	使用機器
検体 (容器、平板培養物)	デジタルカメラ+写真撮影装置 (+三脚)
コロニー性状	デジタルカメラ+写真撮影装置 実体顕微鏡 (+ 顕微鏡デジタルカメラ)
細胞形態	光学顕微鏡 (+ 顕微鏡デジタルカメラ) (明視野/微分干渉/位相差)

158

158

検体を撮影する際の注意点

- ・対象物の外観が分かるような構図で撮影
- ・背景に余計なものが入らないようにする



実験台上にアングルを組んで、暗幕で覆い、その中で、写真撮影装置を設置



撮影ボックスの使用



写真撮影一例

159

159

検体を撮影する際の注意点（背景および撮影方法）



・左写真(←)のようにカメラ撮影台のカメラ固定棒を手前に曲げて検体をほぼ水平にして撮影をしているため、撮影するのに手間がかかり、場所をとってしまう。

・間仕切り用の紙製板を机に立てかけて、被写体(検体)の背景として使用した場合、背景に統一感がなく、背景に机との境目と板の横線が写ってしまう(右写真参矢印)。



背景を変更することで、背景が均一になる。



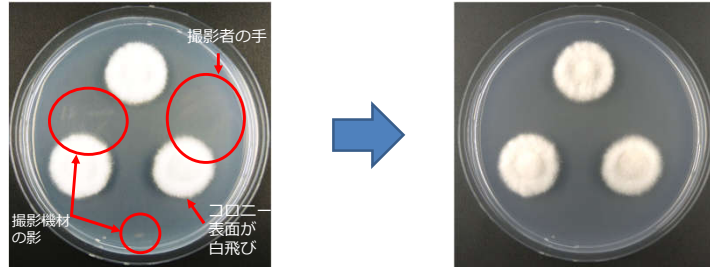
- ・撮影用背景に画用紙4ツ切サイズ380×540mmを使用する
 - 背景が均一になる
- ・画用紙は黒と白の2種類を用意(被写体に応じて、黒と白を使い分ける)

カメラ固定にミニ三脚を使用することで、撮影時の作業手間が軽減され、省スペースで撮影が可能



160

シャーレ（平板培養物）を撮影する際の注意点

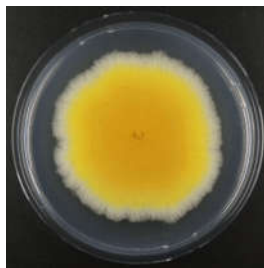


- ① 撮影者の手および機材の影が写り込まないようにする
→ 左右の反射光照明器の角度を調整する。
- ② コロニー表面が白飛び
→ 反射光照明器の角度を調整する。
→ デジタルカメラのシャッタースピードを速くする
(例：マニュアルモード、遅い1/2 → 速い1/125)

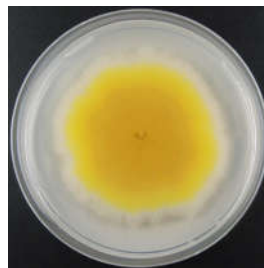
161

161

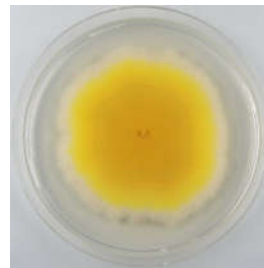
平板培養物を撮影する際の背景 (1)



背景：黒色紙



背景：黒色紙+ろ紙*

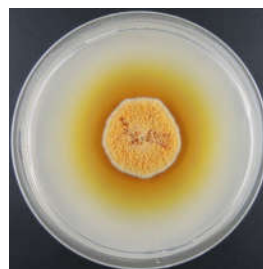


背景：白色紙



背景：黒色紙

色素産生の特徴
が分かるような
背景を選択する



背景：黒色紙+ろ紙

コロニーの特徴が
はっきりとだせる
ように都度、背景
を変更する！

※ろ紙をプラスチック
シャーレの蓋に入れたもの
を平板の底にかぶせる

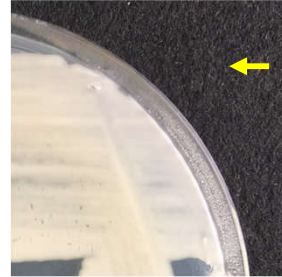
162

162

平板培養物を撮影する際の背景 (2)



習字用の下敷き(毛氈^{モウゼン})
あるいは黒色布



背景に毛羽立ちが写り込む



色画用紙 (黒色、白色)



背景が均一となる

163

163

顕微鏡写真を撮影する際の注意点

・プレパラートを丁寧に作製する

- ～菌糸体の塊をほぐす
- ～余剰な分生子等はエタノール等で洗い流す
- ～背景に余計なものが映らないように、

・カビの分類群の特徴が分かるような構図で撮影

- ～対象物は中心に、上下・縦横を意識する
- ～低倍率で全体像、高倍率で微細構造

カビの写真が多く掲載されている
書籍を参考にする



164

164

微生物の保存管理方法

- ・継代培養法
- ・乾燥保存法～L-乾燥法・凍結乾燥法
- ・凍結保存法

165

165

微生物株の保存

微生物は世代時間が短いため変異が起こりやすいうえ、種類によってはきわめて短期間(2-3日)で死滅する。

→試験等で重要な微生物株は適切な保存を行う必要がある。

【微生物を保存するために広く用いられている方法】

継代培養法 平板／斜面培養	乾燥保存法 L-乾燥法 凍結乾燥法	凍結保存法
		

166

166

主要な微生物保存法の比較				
	継代培養法	L-乾燥法	凍結乾燥法	凍結保存法
保存形態	平板培地・斜面培地	アンプル	アンプル	凍結チューブ
保存方法の概要	平板培地や斜面培地(スラント)に細菌・培養し、保存する方法	細胞内水分の大部分を占める水(自由水)を乾燥させて、代謝活動の場である液層を除いてこれを停止させ、細胞を休止状態にすることで長期保存を図る方法 蒸発による液相からの乾燥	昇華による固相からの乾燥	細胞を凍結し代謝活動を停止させ、細胞を休眠状態にすることで長期の生存を図る方法
適用範囲	大多数の細菌・放線菌・酵母・カビ・きのこ(一部)	大多数の細菌・放線菌・酵母・胞子を形成するカビ(胞子を形成しないカビ、きのこ等は不可)		大多数の微生物(胞子を形成しないきのこ類にも適用可)
保存条件	室温または冷暗所(4°C前後)	冷暗所(4°C前後)		-80°C(冷凍保存)又は液体窒素の気相中(-170°C付近)
長所	作製が容易 生菌のため、培養が容易	加速保存試験を行うことで長期保存性の予測が可能 凍結感受性の微生物に有効	長期保存性、株の安定性に優れる	作製が容易
短所	長期保存には不適 生菌のため、株の変異や死滅が起こりやすい コンタミネーション危険性 適時、植継ぎが必要	作製に凍結乾燥機が必要	作製に凍結乾燥機が必要 凍結感受性微生物は不適	凍結感受性微生物は不適 保管に冷凍庫(-80°C)が必要 ※-20°C付近は温度変化の影響を受けやすいため保存には不適

⇒ L-乾燥法、凍結乾燥法および凍結法は微生物の生存率および形質を維持する上で優れていると言われている。

167

継代培養法の注意点 (宇田川他 1978; 横山 1992; 中川2016)

- ・継代間隔は微生物の種類や株によって異なる。
- ・一定期間ごとに新鮮な培地に移植し、培養物を保存する際、低温(5~10°C)で保管することが一般的。
→ 微生物の種類によっては室温程度がよく、低温では死滅しやすいものもある。

<カビの場合>

- ・炭素源濃度の小さい培地を用い、窒素源の種類に注意するほか、各種天然培地を交代させたり、温度、湿度、光などに配慮する必要があり、種々の植物エキスや土壌エキスの添加が、もとの形質維持に有効な場合が多い。
- ・移植する場合、なるべく斜面上端部、あるいはコロニー周縁部にある若い菌糸体を極少量切り取って、新しい培地の斜面中央部よりやや下に一か所のみ接種する。
→ 接種源に古い培地の部分をなるべく含まないようにする。
古い培地中には菌糸生長を阻害する物質(代謝産物)が蓄積されている。

168

168

乾燥保存法（L-乾燥法）の注意点（坂根ら, 1996）

・微生物の種類に応じて、保護剤を使い分ける

→「一般細菌、放線菌」「好塩性（海洋性）細菌」
「酵母」「真菌（糸状菌/カビ）」
「乾燥感受性好塩性細菌」「Azotobacter属細菌」「乾燥感受性細菌（好酸好熱性アーキアなど）」
「高度好塩性アーキア」「Mycoplasma類」「独立栄養細菌（硫黄酸化細菌、鉄酸化細菌、硝化細菌など）」
「中性域pH感受性鉄細菌」「Synechococcus属」

・保護剤の主成分の役割について

「リン酸緩衝液」～乾燥過程におけるpHの変化を防止
「グルタミン酸ナトリウム」～リン酸カルシウムの結晶化を防止するとともに過度の乾燥や酸素からの細胞を保護
「アドニトール」「システイン」～乾燥により引き起こされる突然変異を減らす効果

・菌濃度が高いほど保存できる細胞数が多くなる。

可能であれば対数増殖期後期の培養物で、 10^9 cfu/ml以上の菌液を使用するのが望ましい

・アンプル溶封時の作業ミスでピンホールが開いている場合、溶封直後はアンプル内部が常圧に戻るのに時間を要する。そのため、真空度チェックは溶封直後ではなく、一晚冷蔵庫で保管した後に行う。

169

169



170

・凍結保存法

凍結保存法で常用される保護剤（凍結防止剤）の組成および保存温度

一般細菌	10~15% グリセロール溶液	調製した菌液、あるいは1-2白金耳量を懸濁する	保存温度 -80℃※2 (-70℃以下)
	7~10% ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液		
酵母	10% グリセロール溶液	平板培養したコロニー片を接種 (胞子を多量に形成する菌種では孢子液を懸濁する方法も可)	
カビ	10% グリセロール溶液 + 5% トレハロース※1 10% ジメチルスルホキシド (DMSO) + 5% トレハロース※1		



※1 5%トレハロース(w/v)を加えることで凍結傷害を起こしやすい菌株の保存性が向上するといわれている。

※2 -20~-40℃の冷凍庫で保存した場合、扉の開閉による温度上昇によって融解・凍結が繰り返されたり、氷の結晶構造が変化したりすることにより菌体が損傷し、生残性が低下することがある。

参考情報

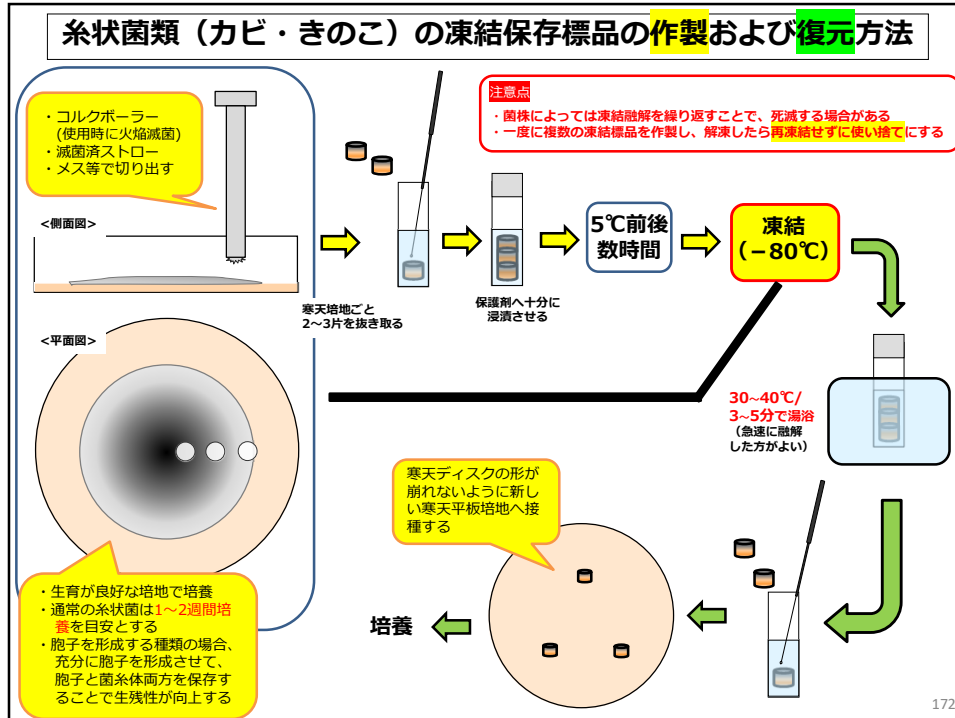
凍結感受性の菌株の場合、プログラムフリーザーで緩慢凍結（約-1℃/分）することが必要になることがある。

→ CoolCell（クールセル）で代替可能 <<https://www.funakoshi.co.jp/contents/65106>>

171

171

糸状菌類（カビ・きのこ）の凍結保存標品の作製および復元方法

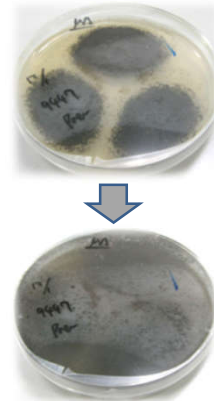


172

172

非常時の対応～カビが発育したシャーレを落とした場合の対応

1. 慌てず、落ち着く
2. 空調(エアコン)の電源をオフにする
3. 空中、机上、床面などシャーレを落とした周辺の広範囲にエタノールを噴霧する。噴霧量は壁から垂れるくらい十分に。
4. 少し置いてからシャーレを落とした周辺をエタノール綿で丁寧に拭く。
5. 再度、エタノールを噴霧する
6. エタノールが完全に乾くまではその実験台周辺は使用しない
7. 作業時に着ていた白衣は対応後、すぐに消毒する



- ※ 胞子を多量に産生する種類や病原性の知られている菌種の場合は、消毒作業時にマスク等を着用する。また、上記作業2～4の工程を繰り返す行う。
- ※ 胞子を床に落下させ、消毒殺菌することが基本となる。

173