



食品の真菌検査—同定と観察—

東京都立衛生研究所

諸角 聖

カビの観察と同定

カビは主に集落の特徴と顕微鏡下の形態によって識別される。他方、酵母の同定は細菌と同様に形態の特徴に加え生化学性状が重要な鑑別点となっており、生化学性状を調べるための簡易検査キット、性状を判定するためのコンピュータープログラムなども開発され、市販されている。紙面の都合もあり、ここではカビの観察方法を述べることにする。

1)カビの形態観察

カビの同定は主に顕微鏡による形態観察によって行われる。観察しやすい顕微鏡標本を作製するためには、活発に孢子形成が行われている状態の菌株を使用することである。通常、観察用プレパラートは以下の手順で作製される。

(1)観察用プレパラートの作製

方法：(図1参照)作製した観察用プレパラートに孢子が多すぎて分生子柄などの器官が観察しにくいときは、かき取った菌塊をシャーレまたはスライドグラス上に数滴置いた洗浄液(低濃度の界面活性剤水溶液などを使用する)中に取り、余分な孢子を除去後、再度前述の方法で観察用プレパラートを作製する。また、観察用の試料として、メス、安全剃刀などを用いて集落の一部を寒天ごと薄く切り出したものを使用しても良い。

(2)のせガラス培養法(スライドカルチャー法)

検査方法：ガラスシャーレ内にろ紙を敷き、その上にU字状のガラス棒を置き、さらにスライドグラス及びカバーグラスを入れ、フタをかぶせて全体を滅菌したものを予め準備しておく。平板培地から滅菌したメスやスパーテルを用いて寒天片を5～7mm 角の大きさに切り出し、シャーレ内のスライドグラス上に置く。寒天片の4辺に菌を接種し、カバーグラスをかける。シャーレ内のろ紙に滅菌水を加えて湿潤させたのち、フタをかぶせて23～25℃で4～5日間培養する。培養終了後、そのまま低倍率で観察し、孢子などが形成されていればカバーグラスを静かにはがし、封入液を1滴置いた別のスライドグラス上にかぶせ、高倍率で観察する。また、スライドグラスも寒天片を取り除いたのち、封入液を1滴置き、新しいカバーグラスをかけて観察用プレパラートとする。

前記(1)及び(2)の方法で作製した観察用プレパラートのカバーグラスの周辺にバルサムまたはマニキュア(ネイルエナメル)を塗り、封入液の乾燥を防ぐことでしばらく保存することができる。

2)カビの同定

カビは集落の特徴と顕微鏡下の形態によって識別されるが、そのためにはカビの特徴が観察できるような集落及び観察用プレパラート(前項参照)を作製する必要がある。集落性状は以下の方法で作製した巨大集落を観察することが望ましい。

方法：純培養とした菌株の孢子あるいは菌糸を白金鉤でかきとり、寒天平板の中心に1カ所、*Aspergillus* 及び *Penicillium* では平板の3カ所、3角形に等間隔に接種する。この際、培地表面へ孢子の飛散するのを避けるため被検菌を下側から接種し、裏向きのまま静かに培養する。特に孢子の飛散しやすい *Aspergillus* や *Penicillium* などを接種する場合には、予め孢子浮遊液を作製し、それを接種に用いる。巨大集落の作製には一般にPDA培地などが使用されるが、*Aspergillus* や *Penicillium* の観察にはツアペック寒天培地、ツアペック・酵母エキス寒天培地(CYA)、麦芽エキス寒天培地(MA)などが用いられる。

a) 集落性状の肉眼的観察

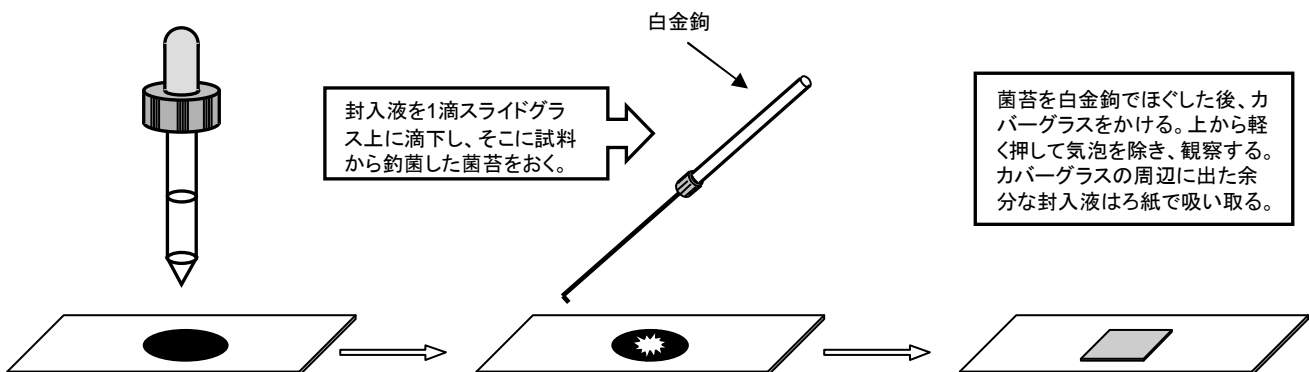
主要観察事項：①集落の生育速度、②集落表面及び裏面の色調やビロード状、綿毛状などの構造的な特徴、③分生子の形成状態、④集落周辺の寒天の色調変化など。



表1 食品から分離される主要なカビとその特徴

菌名および集落の特徴	形態
<p>Aspergillus: コウジカビ属</p> <p>あらゆるものから検出される。酒、味噌などの食品製造、有機酸などの薬品製造に利用される反面、食品などを汚染し、品質の低下を招く。マイコトキシン産生菌も多い。また、<i>A.fumigatus</i>など感染症の原因菌も含まれる。乾燥食品、菓子類などにしばしば生育するEurotiumはsection <i>Aspergillus</i>の有性世代である。集落は培養初期には白色調を呈するが、分生子(無性孢子)が形成されると集落は緑色、黒色、黄色など、菌種特有の色調となる、また、顕微鏡下でアスペルジラと呼ばれるネギボウズに似た特徴的な分生子構造が観察できる。</p>	
<p>Alternaria: アルタナリア属</p> <p>灰白色から黒褐色の綿毛状の集落を形成する。胞子は大型・多細胞、こん棒状からトックリ型で、連鎖状に形成される。各種の植物に病原性を示す。空中や穀類などからも分離されるが、土壌中など比較的湿った環境を好む。住宅では壁などに黒クス状に生える。</p>	
<p>Cladosporium: クラドスポリウム属</p> <p>住宅内のカビ発生の半数以上はこのカビの発育による。本菌のなかでクロカビあるいはクロカワカビと呼ばれる菌種は暗緑褐色の集落を形成する。胞子は1または2細胞で、菌糸の先端から出芽によって形成され、枝別れて樹枝状となる。乾燥や低温にも強く、食品をはじめ住宅、繊維、革製品などあらゆるところに生育する。</p>	
<p>Fusarium: フザリウム属</p> <p>麦類、豆類の病原菌として知られ、多くの菌種が土壌棲息菌として環境中に広く分布する。<i>Fusarium</i>はヒトや動物の日和見感染の原因菌となるばかりでなく、真菌中毒症の原因物質であるトリコテセン系毒素をはじめ、ゼアラレノン、フモニンなどのマイコトキシンを産生する。集落は赤色綿毛状となる菌種が多く、菌種によっては白色、黄色、青色の集落を形成する。本菌は多細胞で鎌形の特徴的な大型分生子を形成し、一部の菌種は楕円形、洋ナシ型などの小型分生子も同時に形成する。</p>	
<p>Mucor: ケカビ属</p> <p>接合菌類、ケカビ目、ケカビ科に属する。無性胞子は孢子嚢胞子と呼ばれ、孢子嚢柄の先端に形成される黒色の孢子嚢の中に多数形成される。有性生殖により接合胞子を形成するが、食品や培地上で形成されることはまれである。若い菌糸は隔壁を欠く。生育速度の早いものが多く、食品上でも短期間で灰白色から淡褐色で綿毛状の集落を形成する。土壌に広く分布し、野菜、果実、腐敗物、空中などから検出され、貯蔵野菜をはじめ低温に保存した食品などにしばしば発生する。</p>	
<p>Penicillium: アオカビ属</p> <p>わが国の食品、空気、土壌などから最も高頻度に検出される。本属には食品や医薬品製造に重要な菌種が含まれるが、食品繊維製品、建築物などの変質・変敗、あるいは劣化の原因となる菌種も数多く含まれる。本菌は、菌糸から分岐した分生子柄の先端に複数のフィアライドが形成され、さらにその先端で分生子(無性孢子)が形成されるため、分生子柄の先端はペニシリ(Penicilli、帚状体)と呼ばれるホウキを逆にしたような形態となる。</p>	
<p>Wallemia: ワレミア属</p> <p>やや乾燥した環境(水活性0.7~0.85)を好む菌(好乾菌)で居住環境ではカーペットなど、食品では糖分の多い羊羹、アン、饅頭、カステラ、ジャムなどの食品や乾燥食品にしばしば生育する。褐色からチョコレート色の小さな集落をつくり、球形から円筒型の胞子を形成する球形の胞子は分散するが、円筒型の胞子は通常4つの胞子がつながったまま1つの胞子のように見える。</p>	

図1 観察用スライドの作成



b) 光学顕微鏡による微細構造の観察

主要観察事項:①胞子の形態及び色調、②胞子の形成方法と着生状況、③分生子柄をはじめとする胞子形成器官の形態、④菌糸の色調、隔壁や壁面の性状、⑤厚膜胞子、菌核、子嚢、子嚢果などの形態的特徴など。

後日構造などが判るように写真撮影または形態図を作製しておくことが望ましい。また、食品から分離される代表的なカビの特徴を表1に示した。

文末にカビ同定に必要なと思われる参考図書を示したが、それらに記載されている識別表や検索表は用語も含めて初心者には難しいと思われる。代表的な真菌菌株を菌株保存機関から入手し、それを観察してみることで真菌に慣れておく必要がある。

真菌検査のための参考図書

- 1) 厚生省生活衛生局監修:食品衛生検査指針、微生物編、p259-333、日本食品衛生協会(1990)
- 2) R.A.Samson,E.S.Reenen-Hoekstra,Introduction to Food Borne Fungi,Centraalbureau Voor Schimmelcultures (1995)
- 3) 宇田川俊一ら:菌類図鑑、(上)、(下)、講談社(1978)

「今回は esNO.26 の続編です。es NO.26 とあわせてお読みください。」

