

JIS Z 2911 かび抵抗性試験菌株の入れ替わりについて

中桐 昭*, 岡根 泉

(独) 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部 生物遺伝資源部門 (NBRC)
〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

On replacement of tester strains for the methods of test for fungus resistance (JIS Z 2911)

Akira Nakagiri* and Izumi Okane

National Institute of Technology and Evaluation, Department of Biotechnology,
NITE Biological Resource Center (NBRC)
2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan

1. はじめに

2009年3月に、日本工業規格(JIS規格)のひとつJIS Z 2911(2000)かび抵抗性試験方法において試験に用いる菌株として指定されている菌株(表1)のうち、クロコウジカビ(アスペルギルス ニゲル *Aspergillus niger*)の2株(NBRC 6341およびNBRC 6342)が入れ替わっている事実が判明した。JIS規格や日本薬局方などの公的試験方法で規定されている指定菌株は、製品の性能や安全性を保証する試験を実施するために用いられる菌株であり、企業の研究者をはじめ多数のユーザーが頻繁に使用している菌株である。NBRCでも分譲数がたいへん多い菌株である。調査の結果、我が国の複数の菌株保存機関で保存、提供されていた上記の2菌株およびそれらの同一由来株が恐らく50年以上前から入れ替わっていたと推定され、過去のかび抵抗性試験結果の有効性、さらにはこれまでに認定された製品の性能保証への影響が懸念された。そこで、NITEでは、菌株の入れ替わりがもたらすかび抵抗性試験の判定結果への影響について明らかにするために、産業技術総合研究所(産総研)と合同で調査委員会を組織して調査を行うとともに、NBRCを中心に他の菌株保存機関とも連携して善後策を講じた。調査委員会による調査結果は、幸いにも菌株の違いは軽微で、かび抵抗試験の判定結果への影響はないと判定された。NITEは、JIS規格を管轄し

ている経済産業省の担当部局とも連絡をとりながら調査結果の公表と今後の試験に用いるべき菌株についての案内を行い、菌株ユーザーからの問い合わせに対応するとともに、代替え菌株の提供を行った。

本稿では、菌株入れ替わりの事実の発見から調査、対策、事態の収拾まで、この菌株入れ替わり事件の顛末の詳細を記述する。この記録が菌株保存機関にとって教訓となることを期待しつつ、菌株保存機関としての今後の対策などについて考察したい。

2. 菌株入れ替わりの発見

1) 発見の発端

2008年9月、ある菌株ユーザーの方からNBRCの菌株保存担当者に対して、「*Aspergillus niger* NBRC 9455と同一由来株のATCC 16404は、ATCCでは菌名を*Aspergillus brasiliensis*としているが、NBRCでは菌名をどのように扱うのか？」という問い合わせがあった。NBRC 9455は、日本薬局方の無菌試験法の指定菌株のひとつである。2007年に公表されたVarga *et al.* (IJSEM 57, 1925-1032)の論文では、*A. niger*菌株のうち、主に β -チューブリン遺伝子他の塩基配列の系統解析で認識できる一群に対して、*A. brasiliensis*が新たに命名された。Varga *et al.*はこの論文の中で、*A. brasiliensis*は*A. niger*(狭義)に非常に近いが、ITS領域、 β -チューブリン遺伝子、カルモジュリン遺伝子の塩基配列を用いた系統解析によって区別できること、分生子表面に顕著なトゲを持つこと、二次代謝産物にも特徴が見られることなどを理由

*Corresponding author

E-mail: nakagiri-akira@nite.go.jp

表1 JIS Z 2911:2006 かび抵抗性試験 (追補1) 試験に用いるかび

3. に規定するかびの種類		同一系統のかびの種類
第1群	a) アスペルギルス ニゲル NBRC 6341	ATCC 6275, CBS 131.52, IMI 45551, NRRL 334, QM 334458, USDA 215-4247
	b) アスペルギルス ニゲル NBRC 6342	ATCC 9642, CBS 246.65, IMI 91855, QM 386
	c) アスペルギルス テレウス NBRC 6346	ATCC 10690, CBS 377.64, IMI 45543, NRRL 571, QM 82j
	d) ユーロチウム トノヒルム NBRC 8157	ATCC 16440, IMI 108299ii
第2群	a) ペニシリウム シトリナム NBRC 6352	ATCC 9849, CBS 342.61, IMI 61272, NRRL 756, QM 1226
	b) ペニシリウム フニコロスム NBRC 6345	ATCC 9644, CBS 170.60, IMI 87160ii, NRRL A-5245, QM 391
第3群	a) リゾープス オリゼ NBRC 31005	ATCC 10404, IMI 61269, QM 387
第4群	a) クラドスポリウム クラドスポリオイデス NBRC 6348	IAM F 517
	b) オーレオバジジウム プルランス NBRC 6353	IAM F 24
	c) グリオクラジウム ピレンス NBRC 6355	ATCC 9645, CBS 430.54, IMI 45553ii, QM 365
第5群	a) ケトミウム グロボスム NBRC 6347	ATCC 6205, CBS 148.51, IMI 45550ii, NRRL 1970, QM 459, USDA 1042.4
	b) フザリウム モニリホルメ NBRC 6349	ATCC 10052, CBS 263.54, IMI 58292 および 61274, QM 1224, USDA 1004.1
	c) ミロテシウム ベルカリア NBRC 6113	ATCC 9095, CBS 328.52, NRRL 2003, QM 460, USDA 1334.2

に別種として記載したが、このような *A. niger* の種の細分化の妥当性については議論があるところであろう。それはともかく、ATCC 菌株の菌名はこの提案を採用したものであった。NBRC として、菌名の取り扱いをどのように対応するか検討するために、まずは保有している *A. niger* の全菌株について遺伝子解析を行うこととした。これは、この菌名の問題は NBRC 9455 だけの問題ではなく、NBRC が保有しているすべての *A. niger* 株、さらには関連株をも含めた問題であり、保有菌株間で菌名の不統一や食い違いがないように総合的に取り扱う必要があるからである。

2) NBRC での内部調査

このようにして、NBRC の全 *A. niger* 菌株と関連株併せて 27 株を対象に、それらの β -チューブリン遺伝子の塩基配列を解析した。Varga *et al.* (2007) は、355 bp の短い領域を使っていたが、我々は 7 つのイントロン領域を含む約 1500 bp を解読して解析を行った。その結果、意外な事実が明らかとなった。つまり、Varga *et al.* (2007) の論文で *A. brasiliensis* とされた CBS 246.65 株と同一由来であるはずの NBRC 6342 が *A. brasiliensis* ではなく *A. niger* (狭義) の配列を持っていることがわかり、さらに、菌株の由来関係から *A. niger* (狭義) であるはずの NBRC 6341 が *A. brasiliensis* の配列を示したのである。

上述のような 2 菌株の食い違いが発見されたの

で、まず NBRC に保管してあるこの 2 株のすべての標品作製ロット (NBRC 6341 については、2002 年に NBRC に菌株が移管される前の IFO 時代から保管されている 1959 年のオリジナル凍結標品、1991 年、1997 年、1998 年、2004 年の L-乾燥アンプル; NBRC 6342 については、1959 年のオリジナル凍結標品、2007 年の L-乾燥アンプル) を復元して、 β -チューブリン遺伝子の塩基配列を解析した。その結果、菌株ごとにロット間での塩基配列は完全に一致した。つまり、IFO での菌株受入から NBRC へ移管されて現在までの約 50 年の保管期間中に、菌株の取り違いは起こっていなかったことが確認できた。次に、他の菌株保存機関が保有している菌株の状況を確認し、この菌株の入れ違いが菌株来歴のどの段階で起こったのかを明らかにする目的で、菌株が入手可能な保存機関 (JCM, 産総研, CBS (オランダ), NRRL (USDA)) から交換で菌株の提供を受けた。ATCC からは購入により同一由来株を入手した。これらの菌株の β -チューブリン遺伝子の塩基配列を解析して描いた分岐図が図 1 である。また、NBRC 6341 と NBRC 6342 の菌株来歴、および他の保存機関が保有しているそれらと同一由来株の系譜をそれぞれ図 2 と図 3 に示す。

まず、NBRC 6341 について見ると、図 1 の分岐図で A、B 2 つのグループに分かれた菌株と図 2 の菌株来歴に示された同一由来の菌株番号とを比べてみると明らかのように、本来同一由来株であるはずの



図1 NBRC 6341 および NBRC 6342 関連株の β -チューブリン遺伝子塩基配列 (約 1500 bp) に基づく分岐図 (NJ 法) A は、狭義の *A. niger*, B は Varga *et al.* (2007) が *A. brasiliensis* とした菌群. A と B とでは 88 サイトで塩基置換が見られた. 四角で囲んだ菌株, 囲みのない菌株どうしはそれぞれ同一由来とされている株.

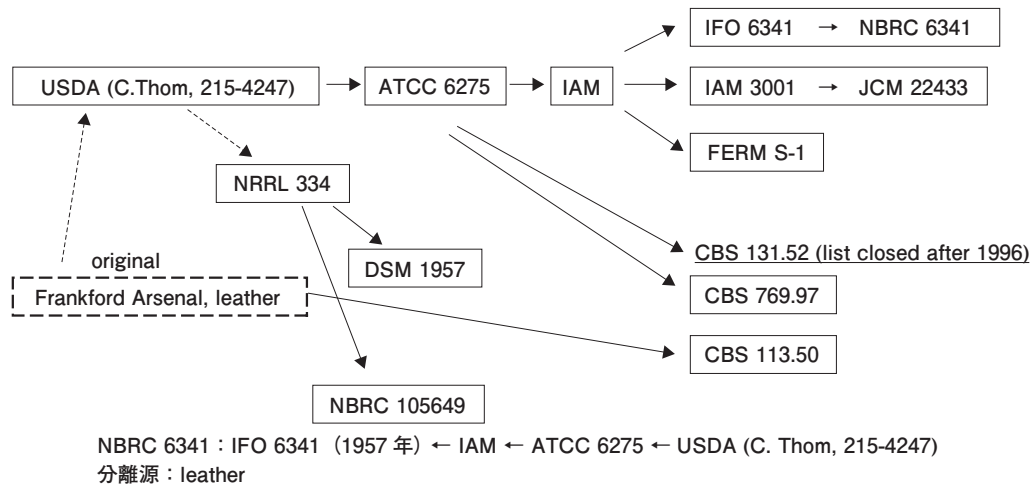


図2 NBRC 6341 の菌株来歴と同一由来株の系譜. 破線は推定される経路.

ATCC, NRRL, CBS に保管されている株 (図1 の分岐図ではグループ A) と日本国内の保存機関である NBRC, JCM (=IAM), FERM (産総研) で保管されている株 (グループ B) とが食い違っている. このことと図2 の菌株の系譜から, ATCC から IAM へ続く経路のどこかで菌の入れ替わりが起こった可能性

が高い. 一方, NBRC 6342 では, 図3 に示すように, NBRC 6341 と同様に ATCC から IAM を通じて国内の保存機関に菌株が流れたが, やはりこの過程のどこかで菌株の入れ替わりが生じたと考えられる. IAM ではその後さらに菌株の入れ替わりが発生し, IAM 3001 と IAM 3002 とが同一の株 (グループ B) になっ

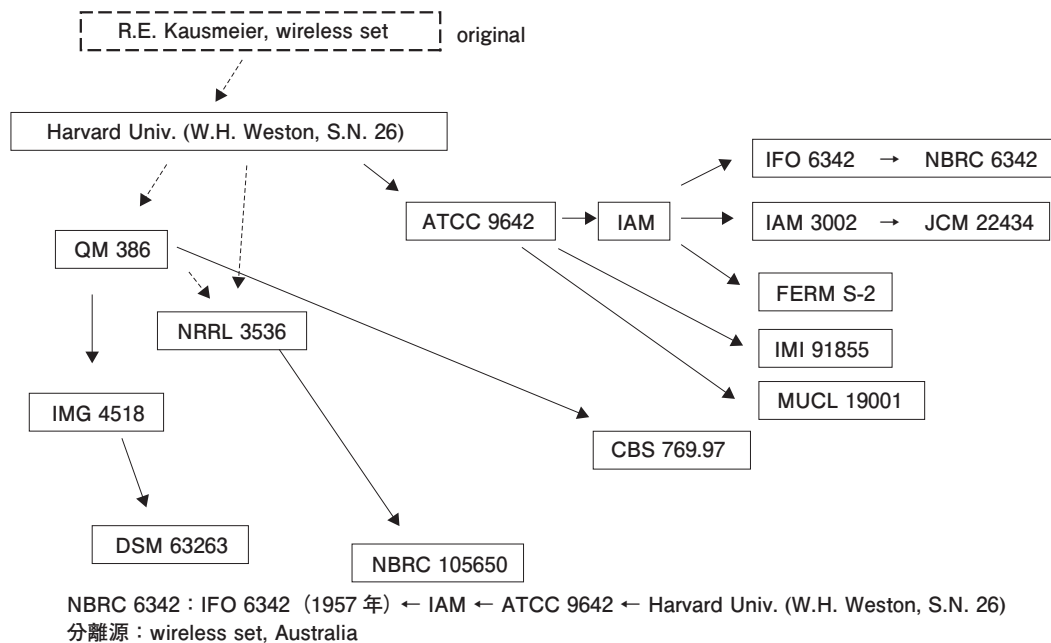


図3 NBRC 6342の菌株来歴と同一由来株の系譜。破線は推定される経路。

たものと推察できる。

なお、発見の発端となったNBRC 9455は、正しく*A. brasiliensis*の配列を示しており、菌株の入れ違いはNBRC 6341とNBRC 6342でのみ起こっていることが明らかになった。

3) 入れ替わり事実の公表

このようにNBRC 6341とNBRC 6342が入れ違っていることが確定したことから、この事実を早期に公表するべく準備を開始した。経済産業省のJIS規格担当部局と協議をしつつ、過去にこれらの菌株をユーザーに分譲していた他の保存機関（JCM, FERM, IFO, IAM）へ連絡し、協調してこの事実を公表することとした。JIS Z 2911は、1957年に制定されてから1980年までは試験菌株の*A. niger*は第1群 a) 菌株としてATCC 6275を、第1群 b) 菌株としてATCC 9642を指定していた。1981年の規格改正でそれぞれFERM S-1株、FERM S-2株が指定され、旧工業技術院微生物工業技術研究所および旧工業技術院生命工学工業技術研究所から分譲されていた。さらに2006年には、NBRC 6341, NBRC 6342株が指定され、NBRCから分譲されている。これまでに、これら指定株の同等株としてIAM株（現在はJCMに引き継がれ、JCM株として）、IFO株が分譲され、日本国内のユーザーに広く利用されていた。

菌株の入れ替わりを公表した際に、ユーザーにとって気がかりなのは、これまでの試験結果の有効性がどうなるかはもちろんであるが、今後どの菌株を使ってもかび抵抗性試験を行うべきか？という点である。これに対応するために、今後のJIS Z 2911かび抵抗性試験において使用すべき菌株（代替株）の準備を進めた。その際、菌株のオリジナルにより近いと考えられ、しかも我々によるシーケンス解析により株の正しさ（同一由来であるATCC株やCBS株との同一性）が確認されたNRRL (USDA)より入手した2株を代替株とした（図2, 3参照）。つまり、JIS Z 2911の指定株、第1群 a) 菌株としてはNBRC 105649 (=NRRL 334)を、一方、第1群 b) 菌株としてはNBRC 105650 (=NRRL 3536)をNBRCに登録して、分譲用標品の作製を急いだ。

公表に際しては、経済産業省からプレス発表を行うとともに、NBRC, 産総研, (財)発酵研究所, JCMのホームページ上でもアナウンスされ、周知を図った。また、これまでの分譲先ユーザーに対しては個別に通知することとし、NBRCでは問題の2株を2002年のNBRC設立以降に分譲した先の299名のユーザーに文書を送った。文書の概要は、1) NBRC 6341とNBRC 6342の菌株入れ替わりが判明したこと、2) 菌株入れ替わりの影響を明らかにするために、産総研と合同で調査委員会を設置して専門家による評価を行うこと、

3) 2株それぞれの分譲先の希望者には、無償で代替え株を再分譲すること、である。

公表により、NBRCには多数のユーザーの方々から問い合わせと代替え株の再分譲依頼があり、最終的に87件99株の代替え株の再分譲を行った。

3. 菌株入れ替わりの影響を明らかにするための対策

1) 調査委員会の設置

上述のように、JIS規格で指定された菌株に間違いがあり、日本国内ではそれが50年以上もかび抵抗性試験に使われてきたことが明らかになった。この菌株の入れ違いの影響、特に、かび抵抗性試験の判定結果への影響がどの程度あるのかを明らかにする必要があるため、これらの菌株を分譲してきたNITEと産総研が合同で「かび抵抗性試験用菌株調査委員会」を設置し、検討を開始した。委員会の構成メンバーは次のとおり（敬称略）。

委員長	高鳥浩介	NPO 法人カビ相談センター 理事長
	森山康司	TOTO 株式会社総合研究所分析技術部 微生物担当部長
	大島 明	財団法人建材試験センター中央試験所材料グループ 上席主幹
	三石 安	独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター 次長
	中桐 昭	NITE バイオテクノロジー本部 NBRC 調査官

調査委員会は、下記のとおり都合3回開催された。

第1回委員会	2009年3月17日	状況把握、検討計画の策定
第2回委員会	2009年3月31日	菌株比較試験項目の決定
第3回委員会	2009年5月25日	試験結果の評価と報告書とりまとめ

2) 菌株比較試験の実施

比較すべき菌株として、当該菌株のNBRC 6341およびNBRC 6342に加え、代替え株として提供する菌株NBRC 105649およびNBRC 105650の2株を加え、合計4株を対象とすることにした。4菌株を用いて比較する性状としては、JIS Z 2911のかび抵抗性試験結果だけでなく、かびとしての一般性状も含めて広く調査することとし、次の4つのカテゴリーにまとめられる項目（合計24項目）について比較することとした。すなわち、①形態も含めた基本性状（6項目）、②生

育特性（9項目）、③製品劣化等への影響（2項目）、④製品を用いたかび抵抗性試験（7項目）、である。具体的な調査項目を、以下に示す。

A. niger 4菌株の比較試験項目と試験法

- ・試験項目：1. DNA塩基配列比較試験
- ・試験項目：2. コロニー性状試験
- ・試験項目：3. 顕微鏡による形態比較試験
- ・試験項目：4. 生育温度特性試験
- ・試験項目：5. 継代培養試験
- ・試験項目：6. 胞子分散性試験
- ・試験項目：7. 熱抵抗性試験
- ・試験項目：8. UV抵抗性試験
- ・試験項目：9. 胞子懸濁液の安定性試験
- ・試験項目：10. アルコール耐性試験
- ・試験項目：11. 塩素不活化試験
- ・試験項目：12. 殺菌剤（塩化ベンザルコニウム）の最小発育阻止濃度（MIC）測定試験
- ・試験項目：13. チアベンダゾール（TBZ）最小発育阻止濃度（MIC）測定試験
- ・試験項目：14. 抗カビ剤に対する感受性試験
- ・試験項目：15. 混合菌液での活性性状試験
- ・試験項目：16. 加水分解酵素の生産性試験
- ・試験項目：17. 有機酸の生産性試験
- ・試験項目：18. 合板のカビ抵抗性試験
- ・試験項目：19. 靴下のカビ抵抗性試験
- ・試験項目：20. ポリエチレン板のカビ抵抗性試験
- ・試験項目：21. 塩ビ板のカビ抵抗性試験
- ・試験項目：22. ウェットシートのカビ抵抗性試験
- ・試験項目：23. 断熱材（発砲ポリエチレン）のカビ抵抗性試験
- ・試験項目：24. JIS試験規格（JIS A 6909, A 6922, A 9523, K 5960）に基づく製品試験

なお、上記の内、試験項目22および23で用いた検体（ウェットシート、断熱材）は、NBRCの菌株ユーザーの方々からご提供いただいた試料であり、多様な試料を用いたかび抵抗性試験を実施することができた。この場を借りてあらためてご協力に感謝申し上げたい。

3) 試験結果

上記24項目の比較試験結果の概要をまとめたものが表2である。上述のように4つのカテゴリーの試験項目ごとに、結果をまとめると次のようになる。

表2 A. niger 4 菌株の比較試験項目、試験法および試験結果

調査分類	試験名	番号	試験項目	試験法	試験結果
カビの基本性状	塩基配列	1	DNA 塩基配列比較	28S rDNA, ITS, β -チユュープリン遺伝子の塩基配列と表現型を比較	A, B 各系統内の塩基配列は完全に一致、両系統間の 28S rDNA 領域の塩基配列と、 β -チユュープリンのアミノ酸配列も完全に一致した。 なお、両系統間の ITS 領域では 5 サイト、 β -チユュープリン遺伝子では イントロン領域を主体とする 88 サイトの塩基置換が認められたが、これらはいずれも発現型に直接は影響を与えない置換であった。
	コロニー性状比較試験	2	コロニー性状試験	3 種類の培地 (MEA, PDA, CYA) 上のコロニーを比較	系統による違いは認められなかった。
	顕微鏡による形態比較試験	3	顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM) により、胞子などの形態を比較	両系統間で分生子柄の幅と胞子の表面形状に僅かな違いが認められたが、その他の形態については、両系統間に違いは認められなかった。	
	生育温度特性試験	4	生育温度に対する菌糸成長を比較	4 株とも培養温度に伴う生育速度の変化傾向に有意な差異はなく、いずれの株も 28°C 付近が最適生育温度であり、45°C では生育しなかった。	
	継代培養試験	5	継代培養試験	5 世代 5 週間の植継後のコロニーの性状を比較	4 株とも 5 世代にわたり継代してもコロニー性状に有意な変化は認められず、胞子形成の度合いにも有意な差異は認められなかった。
カビの生育性	胞子液調製比較試験	6	胞子分散性試験	胞子懸濁液中での胞子の分散性を比較	4 株とも試験に用いる胞子懸濁液は比較的均一に胞子分散しており、しかも胞子は 1 胞子が多く、試験遂行上の差は見られなかった。
	各種物理条件下における不活化比較試験	7	熱抵抗性試験	60°C および 70°C での熱処理による胞子の生残性を比較	4 株とも、同じ熱抵抗性を示した。
		8	紫外線 (UV) 抵抗性試験	紫外線照射時間に対する胞子の生残性を比較	4 株とも、ほぼ同じ UV 抵抗性を示した。
		9	胞子懸濁液の安定性試験	胞子懸濁液調製直後および 18 時間後にチアベンダゾール (TBZ) を処理し、胞子に対する最少発育阻止濃度 (MIC) の違いを調べ、懸濁液中の胞子の生残性を比較	胞子懸濁液調製直後、18 時間放置後、いずれの場合も、4 株ともほぼ同じ MIC 値を示した。
	各種化学的処理による不活化比較試験	10	アルコール耐性試験	50% および 60% エタノールに対する胞子の生残性を比較	4 株とも同じ耐性を示した。
		11	塩素不活化試験	有効塩素濃度 300 ppm への暴露時間と胞子の生残性と関係を比較	4 株とも発育の低下はほぼ同じ傾向であることが確認された。
		12	殺菌剤 (塩化ベンザルコニウム) 最少発育阻止濃度 (MIC) 測定試験	胞子懸濁液に処理した塩化ベンザルコニウムの胞子に対する最少発育阻止濃度を比較	4 株ともほぼ同じ MIC 値を示した。
		13	チアベンダゾール (TBZ) 最少発育阻止濃度 (MIC) 測定試験	胞子懸濁液に処理したチアベンダゾールの胞子に対する最少発育阻止濃度を比較	4 株ともほぼ同じ MIC 値を示した。
		抗カビ剤に対する感受性比較試験	14	抗カビ剤に対する感受性試験	3 種の抗カビ剤 (TBZ (チアベンダゾール), Zpt (ジプロピリチオン), および IPBC (3-Iodo-2-propynylbutyl carbamate)) による成育阻害をペーパーディスク法により比較

表 2 *A. niger* 4 菌株の比較試験項目、試験法および試験結果 (続き)

カビの生育性	混合菌液での活性比較試験	混合菌液での活性試験	<i>A. niger</i> 単独, 3 菌種混合および 5 菌種混合による培養による <i>A. niger</i> の発育優先度を比較	培養初期の孢子形成には系統間の差が見られるものの 72 時間後には同等となった。また, 菌糸の成育状況には差がなかった。JIS かび抵抗性試験では 2~4 週間培養した後の菌糸の成育度で判定することから, 試験に与える影響はほとんどないと判断された。
製品劣化等への影響	加水分解酵素 (アミラーゼ, プロテアーゼ, セルラーゼ, およびリパーゼ) の生産性試験	加水分解酵素 (アミラーゼ, プロテアーゼ, セルラーゼ, およびリパーゼ) の生産性について, 培養プレートを用い, 検出試薬による発色反応により, 生産された各酵素の活性を比較するプレートアッセイ法を用いて評価	加水分解酵素 (アミラーゼ, プロテアーゼ, セルラーゼ, およびリパーゼ) は「+」, リパーゼは「+」と評価された。主要な加水分解酵素については 4 株間で顕著な差異は認められず, 同等であると判断された。	4 株とも, アミラーゼは「+」, プロテアーゼおよびセルラーゼは「+」, リパーゼは「+」と評価された。主要な加水分解酵素については 4 株間で顕著な差異は認められず, 同等であると判断された。
	有機酸生産性比較試験	有機酸生産性試験	しよ糖高濃度培地での培養後, pH 試薬による呈色反応により, 有機酸の生産性を比較	4 株の有機酸の生産性は同等であると判断された。
	JIS Z 2911 加水分解酵素 (アミラーゼ, プロテアーゼ, セルラーゼ) の生産性比較試験	合板のかび抵抗性試験	JIS Z 2911 の一般工業製品試験方法に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	4 株いずれの場合も, 発育度は培養 2 週目: 2, 培養 4 週目: 2 であり, 「試験結果は同等」と判断された。
	JIS Z 2911 繊維製品試験方法 (湿式法) に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	靴下のかび抵抗性試験	JIS Z 2911 の繊維製品試験方法 (湿式法) に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	4 株いずれの場合も, 発育度は培養 2 週目: 2, 培養 4 週目: 2 であり, 「試験結果は同等」と判断された。
	JIS Z 2911 ポリエチレン板のかび抵抗性試験	ポリエチレン板のかび抵抗性試験	JIS Z 2911 のプラスチック製品試験方法 (A 法) に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	4 株いずれの場合も, 発育度は培養 2 週目: 1, 培養 4 週目: 2 であり, 「試験結果は同等」と判断された。
	JIS Z 2911 塩ビ板のかび抵抗性試験	塩ビ板のかび抵抗性試験	JIS Z 2911 のプラスチック製品試験方法 (A 法) に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	4 株いずれの場合も, 発育度は培養 2 週目: 1, 培養 4 週目: 1 であり, 「試験結果は同等」と判断された。
	JIS Z 2911 ウエットシートのかび抵抗性試験	ウエットシートのかび抵抗性試験	JIS Z 2911 の一般工業製品試験方法に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	4 株いずれの場合も, 発育度は培養 2 週目: 2, 培養 4 週目: 2 であり, 「試験結果は同等」と判断された。
	JIS Z 2911 断熱材 (発泡ポリエチレン) のかび抵抗性試験	断熱材 (発泡ポリエチレン) のかび抵抗性試験	JIS Z 2911 の一般工業製品試験方法に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	4 株いずれの場合も, 発育度は培養 2 週目: 1, 培養 4 週目: 2 であり, 「試験結果は同等」と判断された。
製品試験	JISA6909 (建築用仕上塗料)	JISA6909 (建築用仕上塗料)	JISA6909 (建築用仕上塗料) に規定された試験方法に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	塗料 1 種類 (防かび剤添加) について試験を行ったところ, 供試した <i>A. niger</i> 4 株いずれの場合も 4 週目の発育度: 0 であり, 「試験結果は同等」と判断された。
	JISA6922 (壁紙施工および建具用および建具用でんぶん系接着剤)	JISA6922 (壁紙施工および建具用および建具用でんぶん系接着剤)	JISA6922 (壁紙施工および建具用および建具用でんぶん系接着剤) に規定された試験方法に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	2 種類の接着剤 (防かび剤添加) について試験を行ったところ, 供試した <i>A. niger</i> 4 菌株いずれの場合も 4 週目の発育度: 0 であり, それぞれについて「試験結果は同等」と判断された。
その他のかび抵抗性試験	JISA9523 (吹き込み用繊維質断熱材)	JISA9523 (吹き込み用繊維質断熱材)	JISA9523 (吹き込み用繊維質断熱材) に規定された試験方法に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	断熱材 1 種類 (防かび剤添加) について試験を行ったところ, 供試した <i>A. niger</i> 4 菌株いずれの場合も 4 週目の発育度: 0 であり, 「試験結果は同等」と判断された。
	JISK5960 (家庭用屋内壁塗料)	JISK5960 (家庭用屋内壁塗料)	JISK5960 (家庭用屋内壁塗料) に規定された試験方法に基づき, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	2 種類の塗料 (防かび剤添加) について試験を行ったところ, 供試した <i>A. niger</i> 4 菌株いずれの場合も, 一方の製品では 4 週目の発育度: 0, 他方の製品では発育度: 1 であり, それぞれについて「試験結果は同等」と判断された。
	JISK5960 (家庭用屋内壁塗料)	JISK5960 (家庭用屋内壁塗料)	同試験方法に基づき, 防かび剤入り, なしの水性塗料二検体を使って, 4 株について試験を行い, 菌の発育度を比較	供試した <i>A. niger</i> 4 菌株いずれの場合も, 防かび剤入りの場合は 4 週目の発育度: 1, 防かび剤なしの場合は発育度: 2 であり, 防かび剤入りおよび防かび剤なしのそれぞれにおいて発育度は同じであったため「試験結果は同等」と判断された。

①かびの基本性状について

DNA 塩基配列については、NBRC 6342 と NBRC 105649 (A 系統とする) ならびに NBRC 6341 と NBRC 105650 (B 系統とする) はそれぞれ 28S rDNA D1D2 領域、ITS 領域の塩基配列ならびに β -チューブリン遺伝子の塩基配列は完全に一致した。A 系統と B 系統の間では、28S rDNA D1D2 領域では株間の差異はなく、ITS 領域塩基配列においては 5 サイト、 β -チューブリン遺伝子塩基配列においてはイントロン領域を主体とする 88 サイトにおいて塩基置換が認められた。なお、上記 2 系統間の β -チューブリン遺伝子の塩基配列の違いは、多くはイントロン部分であり、エクソン部分においてもコドンの第 3 塩基であり、発現型 (アミノ酸配列) には全く差がないことがわかった。また、形態的には、B 系統株の分生子表面の棘が顕著である点、分生子柄がいくぶん太い点でわずかな違いが見られたが、その他の基本性状について、4 株には有意な差がないことが確認された。

②かびの生育性について

4 株は、かび抵抗性試験に用いられる他のかびと比較した場合、同程度に強い発育力を有しており、かつ、胞子の耐久性や抗カビ剤に対する感受性などにおいて、4 株の間には有意な差は認められなかった。したがって、かび抵抗性試験の結果の判定にもたらす影響はないと評価された。

③製品劣化等への影響について

菌が分泌する各種加水酵素の活性や有機酸の生成能力は、4 株とも同程度の活性を示し、かつ、有意な差は認められなかった。試験結果の判定にもたらす影響はないと評価された。

④製品試験について

実際にこれらの菌株を使用して行ったかび抵抗性試験では、全ての試験において 4 株とも同じ判定結果が得られた。

なお、個々の比較試験の詳細は、NBRC のホームページ (<http://www.bio.nite.go.jp/jisstrainanigerasses.html>) で、「かび抵抗性試験用菌株調査報告書」として公開されているので、参照願いたい。

以上、得られた結果を総合すると、比較した 4 株の間では、形態や遺伝子の塩基配列などにいくらかの差違が認められたが、JIS Z 2911 をはじめとするいくつかのかび抵抗性試験 (JIS A 6909, JIS A 6922, JIS A

9523, JIS K 5960) においては、4 株は同等の結果を示すことが確認された。このことから、菌株の入れ替わりは、JIS Z 2911 などのかび抵抗性試験の判定結果に有意な影響をもたらすものではないと結論された。

4) 試験結果の公表

上記の比較試験結果は、第 3 回調査委員会 (5 月 25 日開催) によって評価・確認され、調査報告書としてとりまとめられた (上記の NBRC ホームページで公開中)。この結果は、5 月 26 日に、経産省産業技術環境局知的基盤課からホームページにて公表され、同時に NITE、産総研、発酵研、JCM のホームページでも公表された。また、該当の NBRC 株を過去に購入していただいたユーザーの方々には、NITE から文書で調査結果報告を連絡した。

4. 事態の收拾

1) JIS Z 2911 試験に用いるべき菌株 : JISC からの公表

さらに、日本工業標準調査会 (JISC) のホームページでは、経産省産業技術環境局産業基盤標準化推進室認証課からの通知として、「かび抵抗性試験菌株調査報告書に基づく JIS Z 2911 (かび抵抗性試験方法) の解釈およびその解釈に伴う JIS マーク表示認証制度に関わる運用について」と題された文書が公表され (<http://www.jisc.go.jp/newsttopics/2009/fungusresistance.pdf>)、JIS Z 2911 の試験にどの菌株を用いるべきかの解釈が示された。それによると、試験菌株として、「NBRC 6341 (FERM S-1) および NBRC 6342 (FERM S-2) をこれまでどおり使用しても差し支えなく、また、代替え株として NBRC より提供されている NBRC 105649 および NBRC 105650 を用いても差し支えない」というものである。

この文書の公表により、これまで FERM S-1, FERM S-2 および NBRC 6341, NBRC 6342 株を使って行われてきたかび抵抗性試験の判定について変更は必要ないことが示されるとともに、今後の試験で有効な菌株が明示された。これにより、NBRC 株のユーザーからの問い合わせに対しても、この経産省認証課の見解を紹介・説明することにより、混乱なく対応でき、事態は収束していった。

2) JIS Z 2911 改訂に向けて

上記の、経産省認証課から公表された文書の中には、「Z 2911 及びこれに関連する JIS について早急に

見直しのための原案作成委員会を設置し、その検討結果を踏まえて速やかに改正等の措置を行います。」という一文が示されている。このことは、今回の4株を用いた比較試験の結果に基づいて、JIS Z 2911の試験用菌株の指定菌株を改訂することを示唆している。現時点（2009年10月1日）では、まだJIS Z 2911の改訂版が公表されていないので詳細は不明だが、試験用指定菌株として、他の保存機関で保有されている菌株（ATCC株、CBS株など）との由来の同一性が確認されているNBRC 105649およびNBRC 105650が指定される可能性が高いものと考えられる。また、今回の比較試験により、4株間で大きな差がなかったことを踏まえると、第1群a)株、第1群b)株として2つの菌株を使い分ける必要があるのか否かも、将来議論されていく可能性があるであろう。いずれにしても、近々公開されるJIS Z 2911改訂版の発行を待ちたい。

ところで、菌名の問題であるが、*A. niger*を分割して設立された*A. brasiliensis*を採用すべきかどうかについては、研究者個々の、また保存株であれば保存機関それぞれの判断の問題であろうが、世界の保存機関の状況を見ると、*A. brasiliensis*を採用しているところと*A. niger*を採用しているところがそれぞれあり、このような種の細分化が必ずしも定着していない状況であることから、NBRCとしては現状のところ*A. niger*として取り扱うことにしている。

5. 事件の総括と菌株保存機関に対する教訓、今後の対策

今回の株入れ替わり事件は、JIS規格で指定された試験菌株であったこともあり、その社会的影響の大きさから、重大な事件としてマスコミ報道もされ、大きな問題となった。結果的に、菌株の入れ替わりによるかび抵抗性試験結果の影響はないと判断され、幸いにも社会に大きな混乱を引き起こす事態には至らなかったが、菌株保存機関としては、正確に品質管理された微生物資源をユーザーに提供するという使命を達成できていなかったことを反省し、重大な教訓としなければならない。我が国の保存機関で保存されていた菌株がすべて入れ違っていたことに50年以上も誰も気がつかなかったのは、2株が同一種、*A. niger*（広義）であり、形態や培養性状では区別できなかったことが大きな原因であろう。菌株の入れ替わりを今回発見できたのは、近年菌株の品質管理に導入されてきたDNA塩基配列による菌株チェックによるといえるだろう。

1) 株レベルの同一性の保証

しかし、実はこれにも落とし穴がある。NBRCでは、数年前から保存菌株の再同定と標品作製時の菌株入れ替わりやコンタミチェックのために、保存株すべてのDNA塩基配列のチェックを進めており、例えば糸状菌株ではITS1～ITS2領域および28S rDNA D1D2領域の塩基配列を調べてBLAST検索を行って菌名の確認を行うとともに、以前のロットの塩基配列データと比較することによってロットの入れ替わりやコンタミのチェックを行っている。その過程の中で、実は今回問題となったNBRC 6341とNBRC 6342についても、数年前にすでにITS1～ITS2領域およびLSU rDNA D1D2領域の塩基配列の調査を行い、菌名はそれぞれ*A. niger*で間違いないことを確認していた。当時は、*A. brasiliensis*も提案されておらず、BLAST検索の結果からこれら2株は正しく同定されている菌株として認識されていたのである。また、上記領域のシーケンスではその違いはわずかで（2株間の違いは、D1D2領域では0、ITS領域では5塩基のみ）、せいぜい同種内の株間の違いとして認識する程度であった。2007年のVarga *et al.*の論文が発表され、 β -チューブリンの塩基配列によって判別できること（88塩基の違い）、そして、NBRC株と同一由来の菌株が論文中で使われていたことなどがあり、今回の菌株入れ違いの発見につながった。今回のケースでは、 β -チューブリンの塩基配列が2つの株の判別に有効であることが論文から読みとれたが、他の菌種の場合では、どの遺伝子を解析すれば株の判別ができるかは未知である。株レベルの同一性を判定する手法としては、AFLPやマイクロサテライトマーカーによる方法などが適用可能かも知れないが、対象生物ごとに実験上のカスタマイズが必要とされ、多種多様な菌種、菌株からなる保存菌株全般を扱うには現実的ではないであろう。

また、菌株の入れ替わりを確定するためには、今回NBRCで行ったように、同一由来であるはずの菌株を他の保存機関から複数入手し、それらと比較した上で、判断する必要がある。

このように、菌株の入れ替わりを暴くこと、菌株の同一性を判定することは、一律の方法では対応できず、しかも多数の対象株との比較が必要となり、労力やコストの面でも非常に困難を伴うものである。実現に近づけるには、まずは株レベルの特異性を明瞭に検出できる簡便で汎用性のある手法や機器の開発が要求されるであろう。

菌株保存機関の使命は、寄託者から預かった菌株(菌

種ではなく)を正確に安全に保存し、何時でも誰でもが利用可能な状態で保持し続け、それを提供することである。その意味で、株レベルの同一性の保証は寄託者の、そして利用者の要求するもっとも基本的な要件であるはずである。しかし、上述のように、これを実現するにはハードルは高い。恐らく、このことを厳密に実施できている保存機関は、世界でも現状では皆無であろうと思う。

2) 現実的な対策

それでは、このような菌株の同一性の確保・保証という、保存機関にとってもっとも基本的な要求事項の達成に近づくにはどうすべきなのだろうか？ 例えば、保存標品の補充のために新ロットを作製する場合を考えてみる。複数の菌株について標品の新ロットを作製する場合には、同種の菌株を同時に扱わないということが必要であろう。すべて異なる種の標品(L-乾燥アンプルなど)を作製したならば、万が一菌株の入れ替わりが起こったとしても、作製した標品の塩基配列チェック(種レベルの判別ができる領域)さえ行えば、事故の発生を検知することができる。もし同一

種の標品を同時に作製していたら、菌株入れ替わりは検知できなくなってしまう。「同種の菌株の標品を同時につくらない」、日常業務のこのような簡単な注意で、新ロット作製時の菌株の入れ違いは防ぐこと(暴くこと)ができるのであるから、保存標品作製時には、心がけるべきことだと思う。

6. おわりに

上述のように、菌株の同一性の確保に対してはある程度の対策は可能であるが、例えば、寄託されてきた菌株と寄託者の手元にある元株との同一性、他機関に保存されている同一由来株との同一性などをすべての菌株について検証することは困難で、実際、現実的ではない。

しかしながら、今回の菌株入れ替わり事件を教訓とするならば、まずは(少なくとも)公的規格試験の検定株に指定されている菌株については、他機関の同一由来株(規格の上で、同等株として指定されている菌株)との同一性を確認することが求められるのかも知れない。菌株保存機関として、そのための労力とコストとを勘案しつつ対応を検討すべき問題であろう。