

試験項目：1 . DNA 塩基配列比較試験

目的： *Aspergillus niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649、NBRC 105650 の4株に DNA 塩基配列において差異があるかを検証する。

方法： PDA にて 28 ℃ で7日間培養した菌株より DNA を抽出し、核 rDNA 遺伝子（28S rDNA D1D2 領域および ITS 領域）ならびに α -チューブリン遺伝子塩基配列を解読後、分子系統学的な比較を行った。

結果：NBRC 6342 と NBRC 105649（A 系統）ならびに NBRC 6341 と NBRC 105650（B 系統）はそれぞれ 28S rDNA D1D2 領域、ITS 領域の塩基配列ならびに α -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、ITS 領域塩基配列においては 5 サイト（図 1）、 α -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（図 2）。なお、28S rDNA D1D2 領域では株間の差異はなかった。

所見（総合判定と考察）： ITS 領域塩基配列ならびに α -チューブリン遺伝子塩基配列の比較により、NBRC 6342 と NBRC 105649（A 系統）、および NBRC 6341 と NBRC 105650（B 系統）は識別が可能であると判断された。しかしながら、これらはいずれも発現型（ α -チューブリンのアミノ酸配列は一致）に直接は影響を与えない領域である。

```

NBRC_6341.nuc 121 SGGGGCGCCTCTGCCCGCCGGGCGCGTGCCTGGCCGGAGACCCCAACACGAACTCTGTCTGA 180
NRRL_3536.nuc 121 SGGGGCGCCTCTGCCCGCCGGGCGCGTGCCTGGCCGGAGACCCCAACACGAACTCTGTCTGA 180
NBRC_6342.nuc 121 SGGGGCGCCTCTGCCCGCCGGGCGCGTGCCTGGCCGGAGACCCCAACACGAACTCTGTCTGA 180
NRRL_334.nuc 121 SGGGGCGCCTCTGCCCGCCGGGCGCGTGCCTGGCCGGAGACCCCAACACGAACTCTGTCTGA 180

NBRC_6341.nuc 181 AAGCGTGCAGTCTGAGTCTGATTGTTGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAAATGGATCTCTT 240
NRRL_3536.nuc 181 AAGCGTGCAGTCTGAGTCTGATTGTTGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAAATGGATCTCTT 240
NBRC_6342.nuc 181 AAGCGTGCAGTCTGAGTCTGATTGTTGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAAATGGATCTCTT 240
NRRL_334.nuc 181 AAGCGTGCAGTCTGAGTCTGATTGTTGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAAATGGATCTCTT 240

NBRC_6341.nuc 241 SGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTC 300
NRRL_3536.nuc 241 SGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTC 300
NBRC_6342.nuc 241 SGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTC 300
NRRL_334.nuc 241 SGTTCGGGCATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTC 300

NBRC_6341.nuc 301 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT 360
NRRL_3536.nuc 301 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT 360
NBRC_6342.nuc 301 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT 360
NRRL_334.nuc 301 AGTGAATCATCGAGTCTTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT 360

NBRC_6341.nuc 361 STCCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCCCGGGCTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCT 420
NRRL_3536.nuc 361 STCCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCCCGGGCTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCT 420
NBRC_6342.nuc 361 STCCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCCCGGGCTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCT 419
NRRL_334.nuc 361 STCCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCCCGGGCTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCT 419

```

図1 ITS領域のアライメント (抜粋)

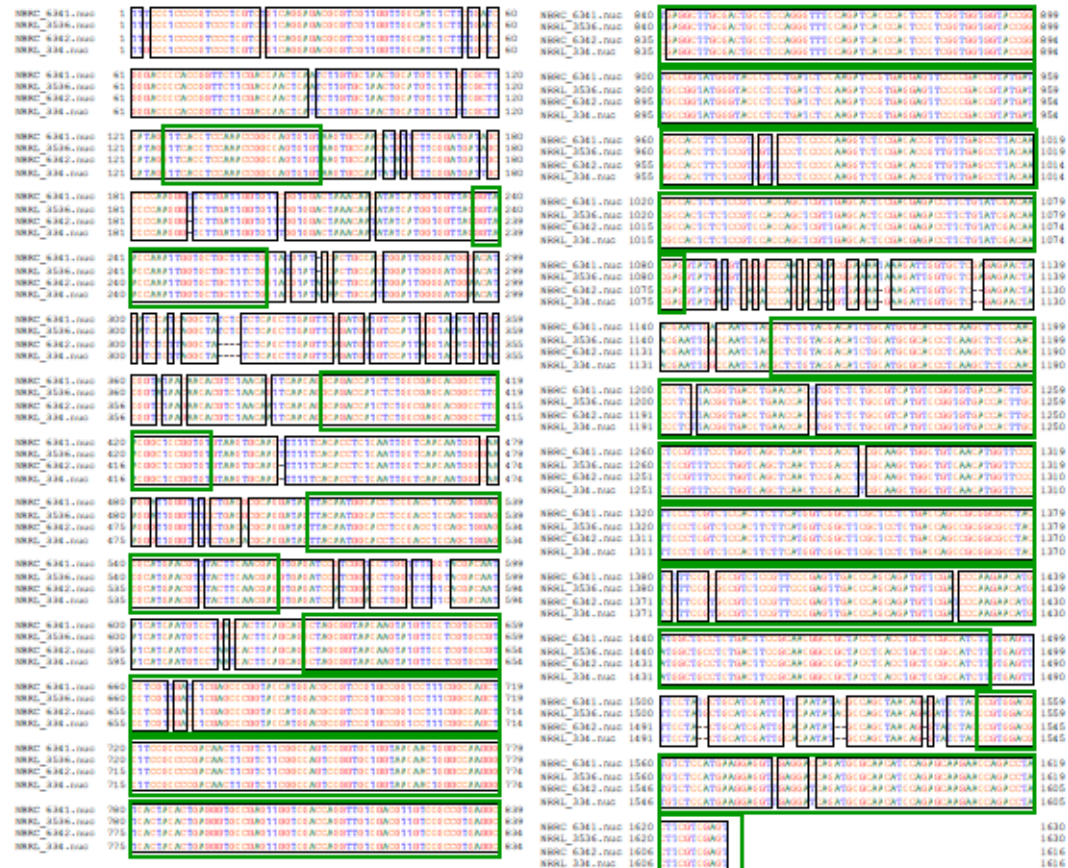


図2 β -チューブリン領域のアライメント

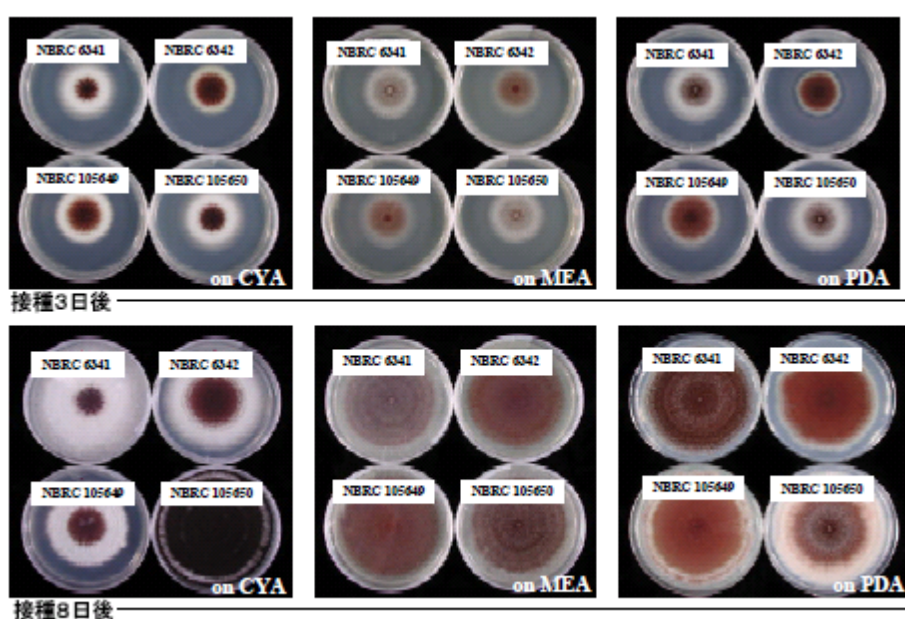
試験項目：2 . コロニー性状試験

目的： *Aspergillus niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649、NBRC 105650 の4株について培養コロニー性状に差異があるかを検証する。

方法：各菌株の孢子懸濁液を 0.2 μl 接種した CYA、MEA、PDA 平板培地を（直径 90mm シャーレ；各 3 枚）を 28℃ に設定した恒温培養器で培養し、コロニー外観を観察して比較検討した。

結果：いずれの培地上でも、培養初期においては同一系統である NBRC 6342 と NBRC 105649（A 系統）ならびに NBRC 6341 と NBRC 105650（B 系統）はそれぞれ類似していたが、およそ 1 週間後には A 系統および B 系統内でも培養シャーレによっては孢子形成の度合いで差異が認められた。しかし、さらに時間が経過するにつれてその違いは不鮮明となり、同一培地上の同一株の間でもコロニー外観や孢子形成量に差がみられるなどバラツキがあった。（下図参照）

所見（総合判定と考察）：培養初期には同一系統内でコロニー性状が類似し、異なる系統間で差異が認められたが、培養が進むにつれ同一菌株内でもバラツキが目立つようになり、菌株間、系統間での判別が付かなくなり、4 菌株のコロニーは同様になった。JIS Z2911 で使用される PDA 上でもコロニー外観は一定とはならず、コロニーによる 4 菌株の判別は困難であった。



コロニー性状(上段:接種3日後、下段:接種8日後; 写真左よりCYA、MEA、PDA上)

試験項目：3．顕微鏡による形態比較試験

目的：*Aspergillus niger* NBRC 6341、6342、105649、105650 の4株に形態的な差異があるかを検証する。

方法：PDA 上にて 28 ℃ で 10 日間培養したコロニーから試料を作製し、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡による形態観察を行った。

結果：NBRC 6342 と NBRC 105649 (A 系統) の孢子表面には光学顕微鏡でも認識できる程度の瘤状突起が観察された。一方、NBRC 6341 と NBRC 105650 (B 系統) の孢子表面上には刺状の構造が観察された。また、分生子柄の幅において A 系統が B 系統に比べ狭い傾向があった。孢子および頂囊の大きさは類似していた。その他の形態においては両菌系統間に違いは認められなかった。

所見 (総合判定と考察)：孢子の表面構造において、NBRC 6342 と NBRC 105649 (A 系統) は瘤状、NBRC 6341 と NBRC 105650 (B 系統) は刺状であり、A 系統と B 系統の間での識別は可能であると判断された。その他の形態では違いは認められなかった。

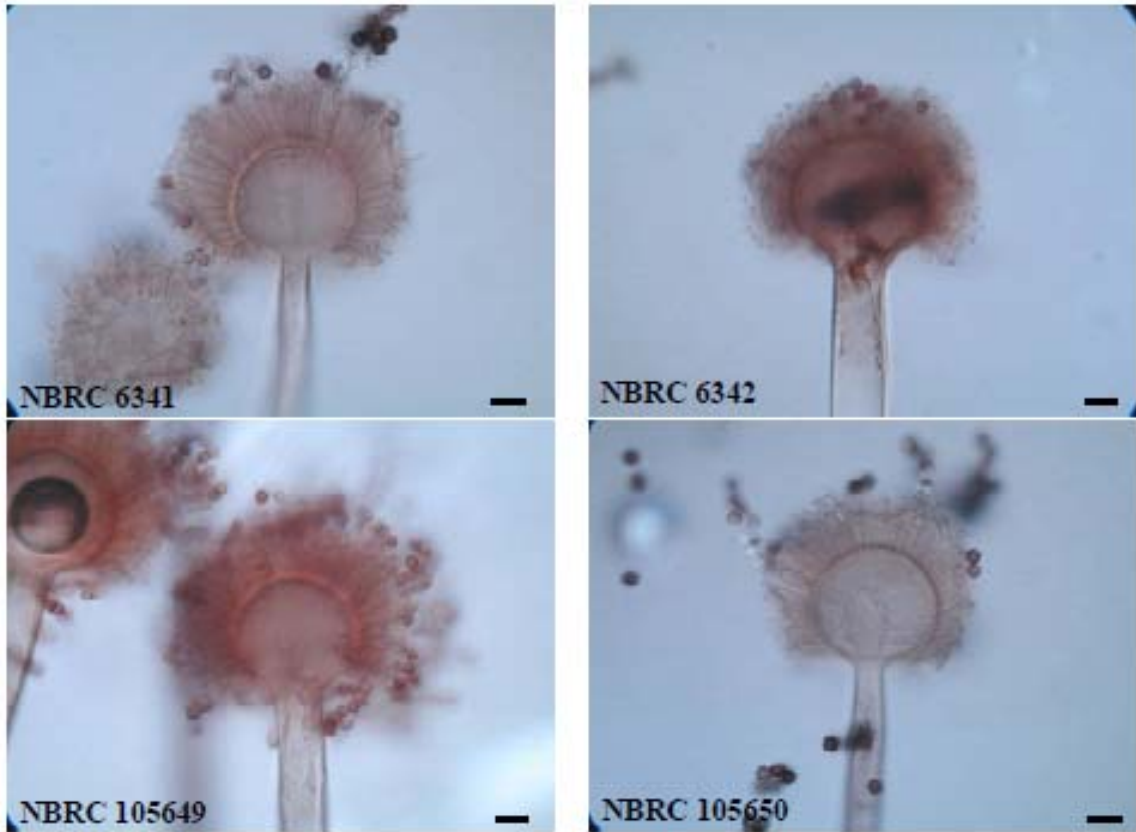


図1. 光学顕微鏡による形態観察(X1000; Bar:10 μ m)

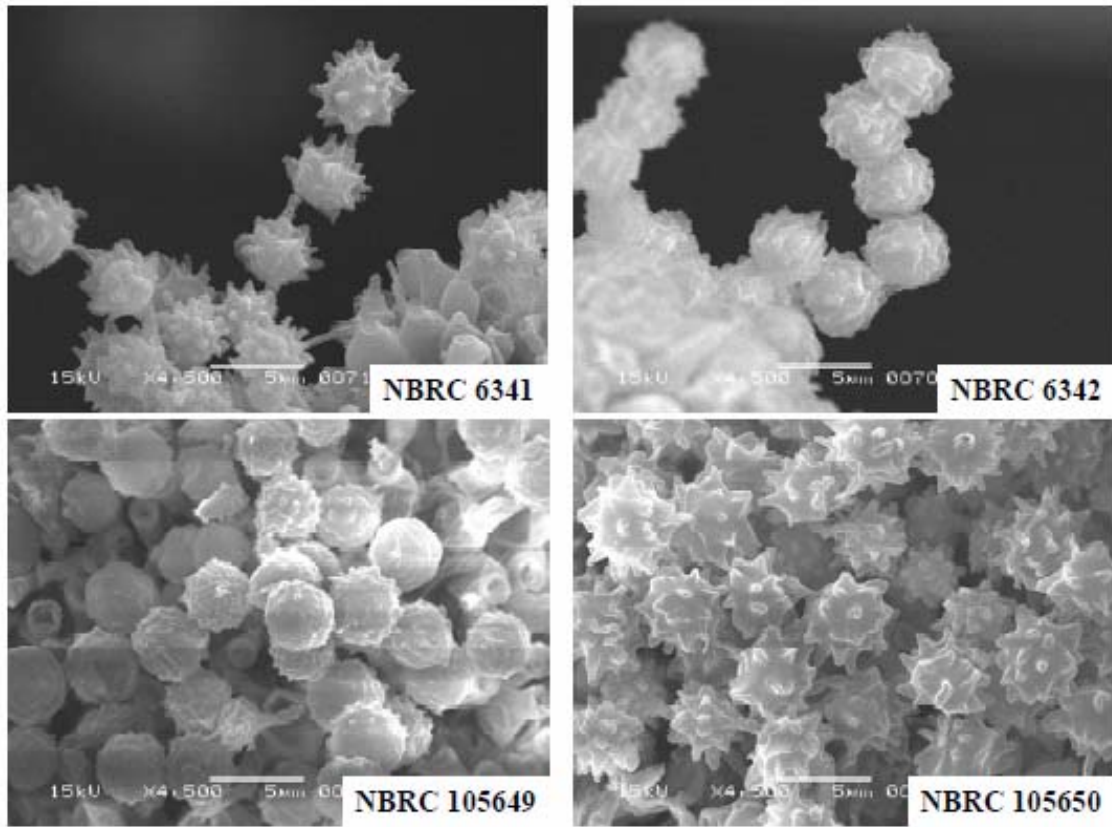


図2. SEMによる形態観察(X4500; Bar:5 μm)

試験項目：4．生育温度特性試験

目的:異なる培養温度における *Aspergillus niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649、NBRC 105650 の4株の菌糸成長を3種類の培地で調査し、株間での生育温度特性の違いを検証する。また同時に、4株の生育速度に差異があるかを検証する。

方法:15、20、28、37、45 に設定した恒温培養器で、各菌株の孢子懸濁液を0.2 µl 接種した PDA 平板培地（直径90mm シャーレ、各3枚）を7日間培養し、日毎にコロニー直径を計測することで検討した。生育差は7日後のコロニー直径を比較することで判定した。

一方、28 に設定した恒温培養器で、各菌株の孢子懸濁液を0.2 µl 接種した CYA、MEA、PDA 平板培地を7日間培養し、日毎にコロニー直径を計測することで検討した。生育速度はコロニー直径の変化を比較することで判定した。

結果:4菌株とも最適生育温度は28 であった。ただし、NBRC 6342 は28 でのコロニー直径が他の菌株よりも小さくかつ同菌株の37 培養時と差異がなかった。全ての菌株とも、37、20、15 の順で生育速度が遅くなり、45 では生育は認められなかった（図1）。

28 での生育速度については、CYA 平板培地において NBRC 6341 と NBRC 105650（B 系統）の生育が、NBRC 6342 と NBRC 105649（A 系統）よりもわずかに早かった一方で（図2）、MEA および PDA 平板培地上では株間に大きな差異は認められなかった（図3-4）。

所見（総合判定と考察）:いずれの株も28 付近が最適生育温度であり、また45 では生育しない点で同様であり、生育温度特性に有意な差異はないと判断された。生育速度については、培地によってはA系統とB系統とでわずかに違いが見られたが、4株ともほぼ同様な生育速度を示した。

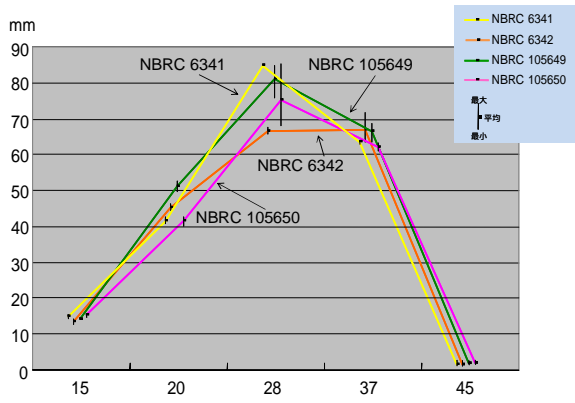


図1. 異なる温度下での生育比較 (培養7日後, PDA上)

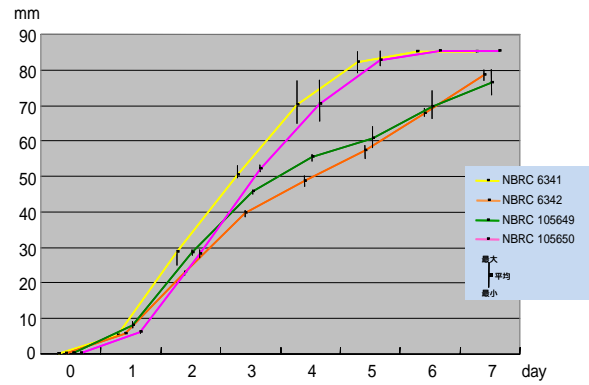


図2. CYA上での生育速度の比較 (7日間培養)

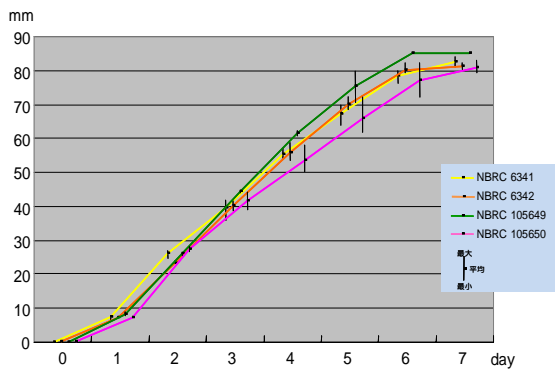


図3. MEA上での生育速度の比較 (7日間培養)

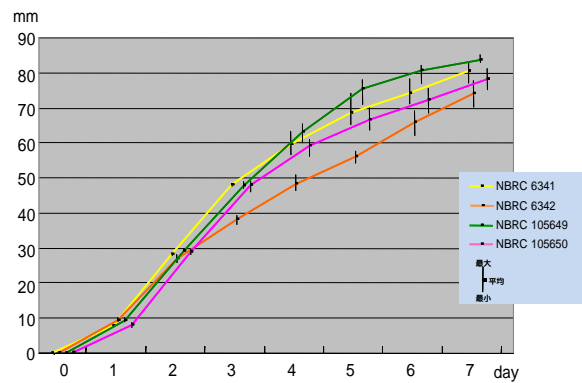


図4. PDA上での生育速度の比較 (7日間培養)

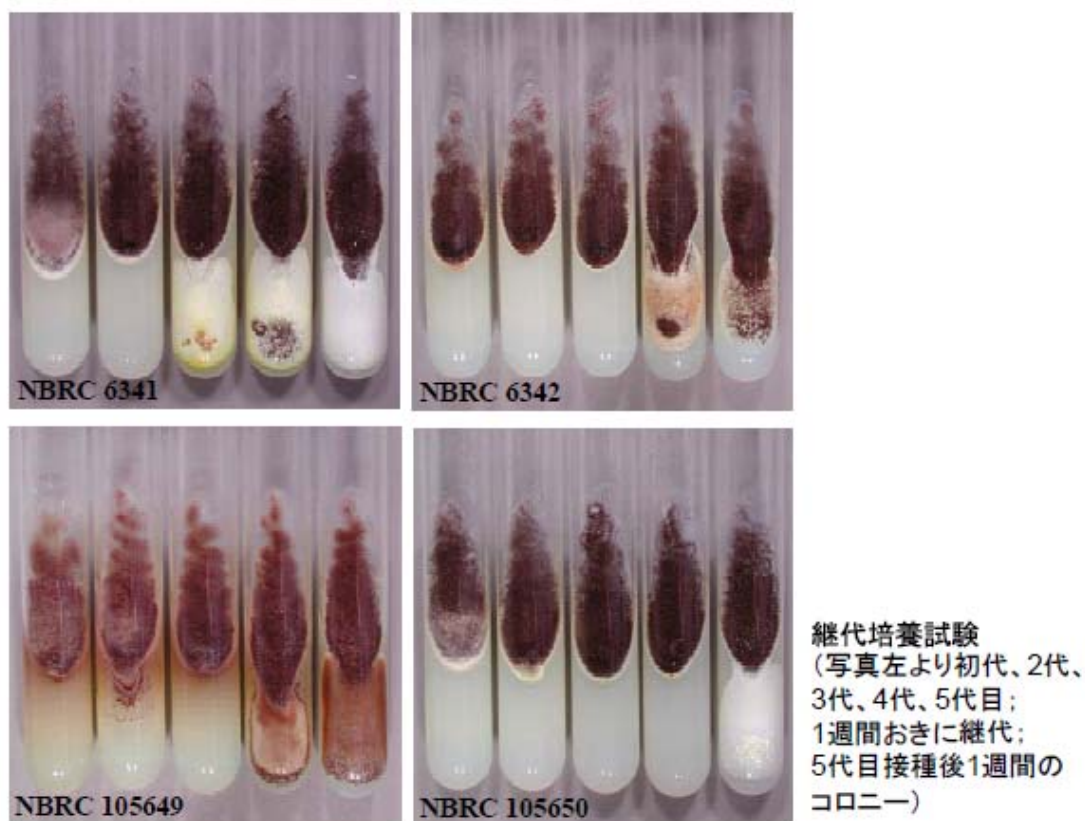
試験項目：5 . 継代培養試験

目的： *Aspergillus niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649、NBRC 105650 の4株を継代した際に培養性状に差異が生じるかを検証する。

方法：各菌株を PSA 斜面培地にて 28℃ で培養し、1 週間毎に新たな培地に継代移植し、5 世代間でのコロニー性状および胞子形成の度合いを観察することで検討した。

結果：5 世代目の株が継代培養されて 1 週間後にコロニー性状を比較したが、各菌株の生育活性および胞子形成量に有意な差異は認められなかった。

所見（総合判定と考察）：各菌株ともに 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生じないと判断された。



試験項目：6．孢子分散性試験

目的： *Aspergillus niger* 4 菌株を用いて、試験時のカビ孢子液調製による孢子分散性を比較する。

方法：

- 1．4 株をポテト・デキストロース寒天斜面培地で 25℃、1 週間前培養した。
- 2．50ppm スルホコハク酸ジオクチルナトリウム湿潤剤で孢子懸濁液を作製した。
- 3．孢子懸濁液をピペットで 200 回操作した。
- 4．ヘモサイトメーターで 1mm² あたり 100-200 孢子になるよう調整した。
- 5．孢子の分散性（1 孢子、2 孢子、3 孢子以上）を比較した。
- 6．2 回試みた。

結果：

- 1．孢子液調製後に顕微鏡観察したところ、ほとんど孢子であった。
- 2．菌糸確認は鏡検視野では見られなかった。
- 3．4 株の孢子分散性を観察したところ、いずれも 1 孢子に分散していた。

所見（総合判定と考察）：

試験に用いる孢子懸濁液は、4 株とも比較的均一に孢子分散しており、しかも孢子は 1 孢子が多く、試験遂行上の差が見られず、かび抵抗性試験の結果に影響を与えるものでないと考えられる。

A. niger 孢子懸濁液のヘモサイトメーターによる計数（1回目）

	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
孢子数（ /1mm ² ）	182	157	123	156
< 内訳 >				
1 孢子数（ /1mm ² ）	171	148	119	148
2 孢子数（ /1mm ² ）	4	3	2	4
3 孢子以上（ /1mm ² ）	1	1	0	0

A. niger 孢子懸濁液のヘモサイトメーターによる計数（2回目）

	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
孢子数（ /1mm ² ）	163	161	175	195
< 内訳 >				
1 孢子数（ /1mm ² ）	149	149	164	181
2 孢子数（ /1mm ² ）	4	3	4	4
3 孢子以上（ /1mm ² ）	2	2	1	2

試験項目：7．熱抵抗性試験

目的： *Aspergillus niger* 4 菌株について 60 および 70 における熱抵抗性を比較した。

方法：

- 1．4 株をポテト・デキストロース (PD) 寒天斜面培地で 25、1 週間前培養した。
- 2．50ppm スルホコハク酸ジオクチルナトリウム湿潤剤で孢子懸濁液を作製した。
- 3．ヘモサイトメーターで 1mm² あたり 100-200 孢子になるよう調整した。
- 4．設定温度 (60、および 70) とした槽に試験管に 2ml 水をいれ、所定温度に維持した。
- 5．孢子懸濁液 0.1ml を注ぎ、一定時間ごとに 0.1ml 取り出し、生残率を求めるために後培養した。
- 6．後培養は、PD 寒天培地で 25、1 週間行った。

結果：

60 熱抵抗性

- 1．2 分でいずれも生残率 0.13 - 0.44% に低下した。
- 2．5 分で 0.02 - 0.07% となった。
- 3．10 分以上で生残率は 0.01% 以下であった。
- 4．4 株とも同じ熱抵抗性であった。

70 熱抵抗性

- 1．2 分でいずれも生残率 0.01% 以下となった。
- 2．4 株とも同じ熱抵抗性を示した。

所見 (総合判定と考察)：

4 株の熱抵抗性 (60 および 70 熱処理による孢子の生残性) を検討したところ、いずれも同じ熱抵抗性を示した。

A. niger 熱抵抗性試験 (60)

60 での 加温時間 (分)	生存率 (%) *			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0	100	100	100	100
2	0.16	0.16	0.44	0.13
5	0.02	0.07	0.02	0.05
10	0.01 以下	0.02	0.01 以下	0.03
15	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下
20	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下
30	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下

* 加温後に培養し発育してきたコロニー数計測

A. niger 熱抵抗性試験 (70)

70 での 加温時間 (分)	生存率 (%) *			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0	100	100	100	100
2	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下
5	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下
10	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下
20	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下
30	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下	0.01 以下

* 加温後に培養し発育してきたコロニー数計測

試験項目：8 . UV 抵抗性試験

目的： *Aspergillus niger* 4 菌株について紫外線照射における抵抗性を比較する。

方法：

- 1 . 4 株をポテト・デキストロース寒天斜面培地で 25℃、1 週間前培養した。
- 2 . 50ppm スルホコハク酸ジオクチルナトリウム湿潤剤で孢子液を作製した。
- 3 . ヘモサイトメーターで 1mm² あたり 100-200 孢子になるよう調整した。
- 4 . 孢子懸濁液をさらに希釈して、最終的には 1 平板あたり約 1000 個の孢子をとまつした。
- 5 . 孢子懸濁液のとまつ平板を紫外線波長 254nm で照射した。照射照度は、平均 5.5uW/cm² であった。所定時間照射した平板を 25℃、1 週間 後培養した。
- 6 . 培養 1 週間後に生残孢子数を測定し、紫外線照射による抵抗性を判定した。

結果：

- 1 . 紫外線照射により、15 分後には 4 株とも著しい生菌数減少を示した。
- 2 . 照射 30 分後にはさらに減少した。
- 3 . 照射 30 から 45 分後では生残率がほぼ 0.1% になった。
- 4 . 紫外線照射による 4 株に対する影響はほぼ同じ傾向を示した。

所見（総合判定と考察）：

4 株の紫外線照射による抵抗性（孢子生残性）を検討したところ、いずれもほぼ同じ結果が得られた。

***A. niger* UV 照射試験**

照射時間 (分)	UV照射後に培養し発育してきたコロニー数 (CFU/plate)			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³
15	49	15	8	54
30	15	3	5	16
45	5	0	2	6
60	0	0	0	0
90	0	0	0	0
120	0	0	0	0

照度 5.5 μ W/cm²

試験項目：9 . 孢子懸濁液の安定性試験

目的： *Aspergillus niger* 4 菌株孢子の安定性を調べる目的で孢子懸濁液調整直後と 18 時間放置後の孢子を用いてチアベンダゾール (TBZ) に対する MIC 値を比較する。

方法：

- 1 . 4 株をポテト・デキストロース寒天斜面培地で 25℃、1 週間前培養した。
- 2 . 50ppm スルホコハク酸ジオクチルナトリウム湿潤剤で孢子懸濁液を作製した。
- 3 . ヘモサイトメーターで 1mm² あたり 100-200 孢子になるよう調整した。
- 4 . チアベンダゾールを 200 μg/ml (ppm) になるよう DMSO で溶解し、以後 PD 液体培地で最高濃度として 50ppm に調整した。試験は 2 倍段階希釈として、その 2ml を試験管に分注した。
- 5 . 孢子懸濁液を調製直後および室温下で 18 時間放置したのちに以下の試験を実施した。
- 6 . 各 TBZ 濃度液 2ml に孢子液 0.1ml を注ぎ、25℃、1 週間培養した。
- 7 . 培養 1 週間後に各濃度での発育性の有無を持って MIC 値を判定した。

結果：

孢子懸濁液調製直後及び調整後 18 時間放置した孢子の TBZ に対する MIC 値を測定した。

- 1 . 調製直後では 4 株のチアベンダゾール (TBZ) に対する MIC 値は 12.5 - 25ppm であった。
- 2 . 4 株は、1.6 - 3.2ppm で発育性がやや低下した。
- 3 . 調製後 18 時間経過した 4 株のチアベンダゾール (TBZ) に対する MIC 値は 6.3 - 12.5ppm であった。
- 4 . 4 株は、0.8 - 1.6ppm で発育性がやや低下した。
- 5 . 調整直後と 18 時間経過後の孢子による MIC 値は多少変化したが、4 株間での差異は認めなかった。

所見 (総合判定と考察)：

孢子の安定性を検討するために孢子懸濁液調整後と 18 時間放置後での 4 株孢子のチアベンダゾール (TBZ) に対する MIC 値を検討したところ、いずれもほぼ同じ MIC 値を示した。

TBZ の MIC 測定試験 胞子懸濁液調製直後

TBZ (チアベンダゾール) の 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	TBZ処理後の発育状況			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0 (Control)	++	++	++	++
0.4	++	++	++	++
0.8	++	++	++	++
1.6	+	+	++	++
3.2	+	+	+	+
6.3	+	+	+	+
12.5	-	+	-	+
25	-	-	-	-
50	-	-	-	-
M I C 値	1 2 . 5	2 5	1 2 . 5	2 5

TBZ の MIC 測定試験 胞子懸濁液調製 1 8 時間後

TBZ (チアベンダゾール) の 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	TBZ処理後の発育状況			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0 (Control)	++	++	++	++
0.4	++	++	++	++
0.8	++	+	++	++
1.6	+	+	+	+
3.2	+	+	+	+
6.3	+	+	-	+
12.5	-	-	-	-
25	-	-	-	-
50	-	-	-	-
M I C 値	1 2 . 5	1 2 . 5	6 . 3	1 2 . 5

試験項目：10．アルコール耐性試験

目的： *Aspergillus niger* 4 菌株について 50%および 70%エタノールにおける耐性を比較する。

方法：

- 1．4 株をポテト・デキストロース (PD) 寒天斜面培地で 25℃、1 週間前培養した。
- 2．50ppm スルホコハク酸ジオクチルナトリウム湿潤剤で孢子懸濁液を作製した。
- 3．ヘモサイトメーターで 1mm² あたり 100-200 孢子になるよう調整した。
- 4．エタノール濃度 (50%および 70%) の 2ml を試験管に維持した。
- 5．孢子懸濁液 0.1ml を注ぎ、一定時間ごとに 0.1ml 取り出し、PD 液体培地 2ml に後培養した。
- 6．後培養は、25℃、1 週間行い、生残性を持って判定した。

結果：

50%エタノール耐性

- 1．180 秒から 240 秒でいずれも発育しなかった。
- 2．60 秒でいずれも発育低下した。

70%エタノール耐性

- 1．30 秒でいずれも発育しなかった。

所見 (総合判定と考察)：

4 株のエタノール (50%および 70%) 耐性を検討したところ、いずれも同じ耐性を示した。

50%エタノール耐性試験

50%エタノール	50%エタノール処理後の発育状況			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0 (Control)	++	++	++	++
30秒	++	++	++	++
60	+	+	+	++
90	+	+	+	+
120	+	+	+	+
180	+	+	-	-
240	-	-	-	-
300	-	-	-	-

70%エタノール耐性試験

70%エタノール	70%エタノール処理後の発育状況			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0 (Control)	++	++	++	++
30秒	-	-	-	-
60	-	-	-	-
90	-	-	-	-
120	-	-	-	-

試験項目：11．塩素不活化試験

目的： *Aspergillus niger* 4 菌株について塩素による不活性化を比較する。

方法：

- 1．4 株をポテト・デキストロース (PD) 寒天斜面培地で 25℃、1 週間前培養した。
- 2．50ppm スルホコハク酸ジオクチルナトリウム湿潤剤で孢子懸濁液を作製した。
- 3．ヘモサイトメーターで 1mm² あたり 100-200 孢子になるよう調整した。
- 4．有効塩素濃度 300ppm の 2ml を試験管に維持した。
- 5．孢子懸濁液 0.1ml を注ぎ、一定時間ごとに 0.1ml 取り出し、PD 液体培地 2ml に後培養した。
- 6．後培養は、25℃、1 週間行い、生残性を持って判定した。

結果：

- 1．塩素処理 120 秒から 180 秒後にほとんど発育が低下した。
- 2．いずれも発育は 180 秒から 300 秒で確認できなかった。

所見（総合判定と考察）：

4 株の塩素処理による孢子の不活化を検討したところ、発育の低下はほぼ同じ傾向であり、ほぼ同様な結果が確認された。

塩素処理による不活性化試験

有効塩素濃度 300ppm	塩素処理後の発育状況*			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0 (Control)	++	++	++	++
30秒	++	++	++	++
60	++	++	++	++
90	++	++	++	++
120	++	+	+	++
180	+	-	+	+
240	-	-	-	+
300	-	-	-	-

* 塩素処理後に PD 液体培地にて培養

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

目的： *Aspergillus niger* 4 菌株について塩化ベンザルコニウムにおける MIC 値を比較する

方法：

1. 4 株をポテト・デキストロース寒天斜面培地で 25℃、1 週間前培養した。
2. 50ppm スルホコハク酸ジオクチルナトリウム湿潤剤で孢子懸濁液を作製した。
3. ヘモサイトメーターで 1mm²あたり 100-200 孢子になるよう調整した。
4. 塩化ベンザルコニウムを 300 μg/ml (ppm)水溶解し、以後 PD 液体培地で 2 倍段階希釈した。その 2ml を試験管に分注した。
5. 各濃度の塩化ベンザルコニウム液に孢子懸濁液 0.1ml を注ぎ、25℃、1 週間培養した。
6. 培養 1 週間後に各濃度での発育性の有無を持って MIC 値を判定した。

結果：

1. 4 株の塩化ベンザルコニウムに対する MIC 値は 100 - 150ppm であった。
2. 4 株とも 12.5 - 25ppm で発育性がやや低下した。

所見（総合判定と考察）：

4 株の塩化ベンザルコニウムに対する MIC 値を検討したところ、いずれもほぼ同じ MIC 値を示した。

塩化ベンザルコニウム最小発育阻止濃度 (MIC) 測定試験

塩化ベンザルコニウム の濃度 (ppm)	塩化ベンザルコニウム処理後の発育状況			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0 (Control)	++	++	++	++
6.3	++	++	++	++
12.5	++	+	+	++
25	+	+	+	+
50	+	+	+	+
75	+	+	+	+
100	+	-	-	+
150	-	-	-	-
M I C 値	150	100	100	150

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

目的： *Aspergillus niger* 4 菌株についてチアベンダゾール (TBZ) における MIC 値を比較する。

方法：

- 1．4 株をポテト・デキストロース (PD) 寒天斜面培地で 25℃、1 週間前培養した。
- 2．50ppm スルホコハク酸ジオクチルナトリウム湿潤剤で孢子懸濁液を作製した。
- 3．ヘモサイトメーターで 1mm² あたり 100-200 孢子になるよう調整した。
- 4．チアベンダゾールを 200 μg/ml (ppm) になるよう DMSO で溶解し、以後 PD 液体培地で試験最高濃度 50ppm に調整した。試験は以下の 2 倍段階希釈として、その 2ml を試験管に分注した。
- 5．各 TBZ 濃度液 2ml に孢子懸濁液 0.1ml を注ぎ、25℃、1 週間培養した。
- 6．培養 1 週間後に各濃度での発育性の有無を持って MIC 値を判定した。

結果：

- 1．4 株のチアベンダゾール (TBZ) に対する MIC 値は 12.5 - 25ppm であった。
- 2．4 株は、1.6 - 3.2ppm で発育性がやや低下した。

所見 (総合判定と考察)：

4 株のチアベンダゾール (TBZ) に対する MIC 値を検討したところ、いずれもほぼ同じ MIC 値を示した。

TBZ の MIC 測定試験

TBZ (チアベンダゾール) の 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	TBZ処理後の発育状況			
	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
0 (Control)	++	++	++	++
0.4	++	++	++	++
0.8	++	++	++	++
1.6	+	+	++	++
3.2	+	+	+	+
6.3	+	+	+	+
12.5	-	+	-	+
25	-	-	-	-
50	-	-	-	-
M I C 値	1 2 . 5	2 5	1 2 . 5	2 5

試験項目：14．抗カビ剤に対する感受性試験

目的： *Aspergillus niger* に属する NBRC の 4 菌株につき、各種生理学的試験を行いこれら 4 菌株の同等性を検証する。本報では 4 株の 3 種抗カビ剤に対する感受性につき報告する。

方法：ペーパーディスク法

Aspergillus niger の菌株として、NBRC 6341、6342、105649、105650 の 4 株を供試した。抗カビ剤として種々の抗カビ仕様製品に汎用されている TBZ (チアベンダゾール)、Zpt (ジソクピリチオン) 及び IPBC (3-Iodo-2-propynylbuthyl carbamate) の 3 種を用いた。TBZ、IPBC についてはエタノールで溶解させ、Zpt については PEG 200 (ポリエチレングリコール) に懸濁 (エマルジョン化) させて使用した。これらの 0.1%、0.05% 濃度の溶液を調製し、それぞれ 20 μ l を円形ろ紙 (12.7 mm) に染み込ませて乾燥させた。抗カビ剤を含まないそれぞれの溶媒を染み込ませたる紙を Blank (ブランク) とした。上記 4 株の孢子懸濁液 (約 10^6 spores/ml) を調製し、チャベック寒天プレートにそれぞれの孢子懸濁液 100 μ l を注ぎ十分に培地表面に広げた。植菌後の培地表面の中心に上記円形ろ紙を載せ (n=3)、27℃ で 4 日間培養した。培養後、ろ紙周辺に形成されたハロー (生育阻止円) の直径を計測してそれぞれの抗カビ剤に対する感受性を評価した (図 1 参照)。

結果:それぞれの抗カビ剤によって生成した培養 4 日後のハローの大きさの平均を算出し、効果 (=感受性) の範囲 (- ~ +++) として、表 1 に示した。また、その時のハローの状況を図 1 に示した。

表 1 から同濃度の抗カビ剤に対してハローの大きさに若干のバラツキは認められるものの、当該 4 菌株はほぼ同等の感受性を示した。また、各抗カビ剤の効果を比較すると効果の強い順で IPBC > Zpt > TBZ となり、この傾向も 4 菌株間で共通であった。

表 1 . *A. niger* 4 株に対する抗カビ剤の効果

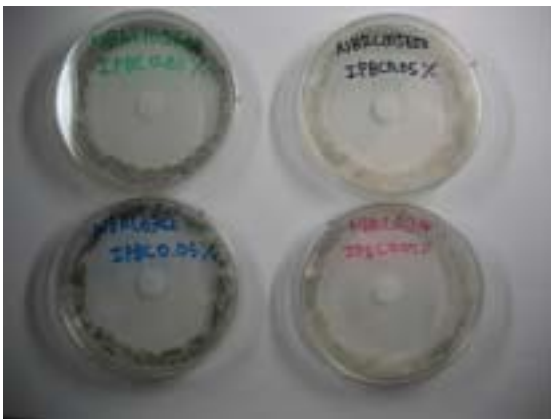
NBRC Strains	TBZ (%)		Zpt (%)		IPBC (%)	
	0.1	0.05	0.1	0.05	0.1	0.05
6341	+	+	++	+	+++	++
6342	+	+	+	+	+++	+++
105649	+	+	+	+	+++	++
105650	+	+	++	++	+++	++

- : ハローなし、± : ろ紙上には生育なし、+ : ハロー直径 () 13 ~ 30 mm、
++ : 31 ~ 60 mm、+++ : > 60 mm



TBZ

Zpt



IPBC

図1 . 各抗カビ剤のペーパーディスク法

所見（総合判定と考察）

汎用されている3種の抗カビ剤に対し、ペーパーディスク法により当該4菌株の感受性を検討した。その結果、4菌株は各抗カビ剤に対してほぼ同程度の感受性を示し、さらに各抗カビ剤に対する感受性の傾向も全く同一であった。したがって、代表的な抗カビ剤に対する4菌株の感受性は同等であると判断された。

試験項目：15．混合菌液での活性性状試験

目的：混合孢子懸濁における菌の活性及び発育優先度を調べる事を目的とする。

方法：JIS Z 2911 に準じて調整した混合孢子懸濁液を P D A 平板培地に噴霧し、温度 28±1 で培養し、発芽及び孢子形成の時間を観察した。

なお、懸濁液中の孢子数は 10⁵ 個 / ml とした。試験に供した菌の種類、菌の組み合わせ及び試験個数を以下に示す。

A n ; *Aspergillus niger* (NBRC 6341、6342、105649、105650)

P c ; *Penicillium citrinum* (NBRC 6352)

C c ; *Cladosporium cladosporioides* (NBRC 6348)

A u p ; *Aureobasidium pullulans* (NBRC 6353)

G v ; *Gliocladium virens* (NBRC 6355)

混合内容	菌の組み合わせ；菌の記号	試験個数
単独	A n (4種類)	各3
3種混合	A n (4種類)、P c、C c	各3
5種混合	A n (4種類)、P c、C c、A u p、G v	各3

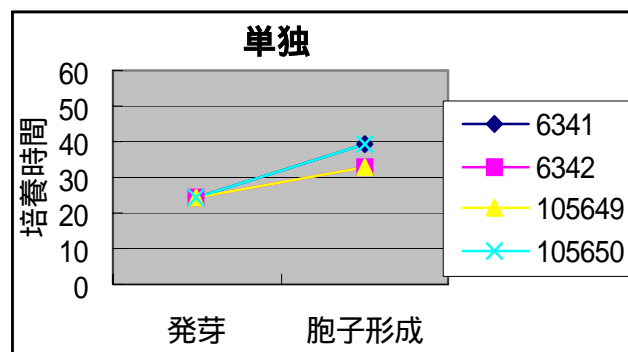
結果：

- (1) *Aspergillus niger* が優先的に発生した。(以下 *Aspergillus niger* について述べる。添付図参照)
- (2) NBRC 6341 と NBRC 105650 は 2 株とも孢子形成が遅い傾向が見られた。また NBRC 6342 と NBRC 105649 は上記に比較して 2 株とも孢子形成が早かった。
- (3) NBRC 6341 と NBRC 6342 の孢子形成時間の差は単独孢子液で 6 時間、3 種混合孢子液で 15 ~ 21 時間、5 種混合孢子液で 21 時間の差があった。また、NBRC 105650 と NBRC 105649 も同様の傾向であった。
- (4) 培養 7 2 時間目にはいずれのサンプルにも *Aspergillus niger* の孢子が一様に形成された。(写真参照)

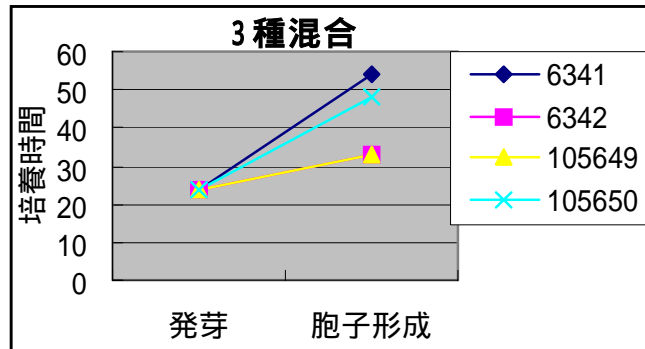
観察対象 かびの種類	単独孢子液		3種混合孢子液		5種混合孢子液	
	発芽時間	孢子形成時間	発芽時間	孢子形成時間	発芽時間	孢子形成時間
NBRC 6341	2 4	3 9	2 4	5 4	2 4	5 4
NBRC 6342	2 4	3 3	2 4	3 3	2 4	3 3
NBRC 105649	2 4	3 3	2 4	3 3	2 4	3 3
NBRC 105650	2 4	3 9	2 4	4 8	2 4	5 4

所見（総合判定と考察）:

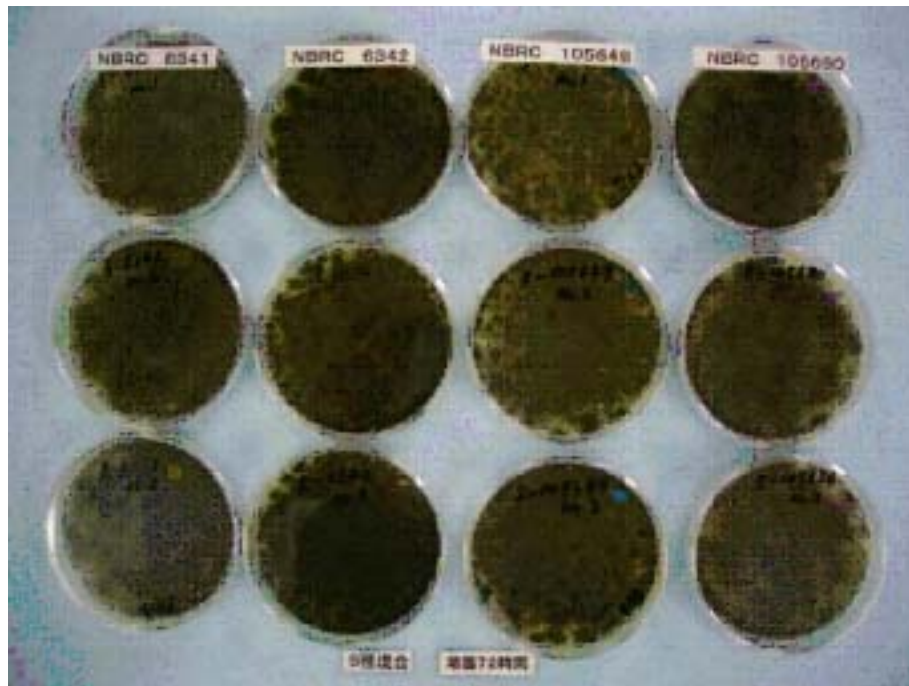
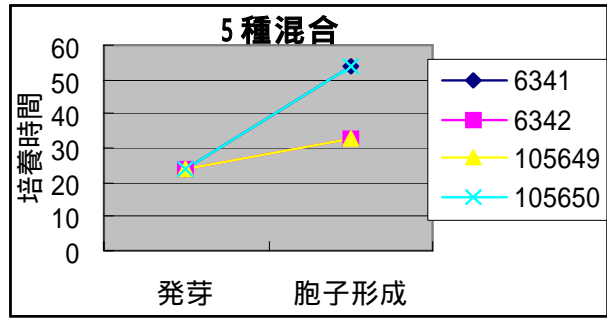
「NBRC 6341 と NBRC 105650」(B 系統) は「NBRC 6342 と NBRC 105649」(A 系統) に比べると、孢子形成時間が遅く、他の孢子を混合するとこの傾向はより顕著になった。ただし、培養 72 時間後には十分な孢子が形成され両者の違いは見られなかった。このことから、孢子形成に至る時間は菌株によって違いが見られるものの、菌系の生育状況には違いがないこと、培養 72 時間後には孢子形成も同等となることがわかった。JIS かび抵抗性試験においては、その評価は菌系の生育度で判定すること、また、試験のための培養期間も 2 週間、4 週間またはそれ以上と長期に設定されていることなどから、試験に与える影響はほとんどないと思われる。



A. niger 单独、72 時間培養後



3種混合 72時間後



5種混合 7.2時間培養後

試験項目：16．加水分解酵素の生産性試験

目的

Aspergillus niger に属する NBRC の 4 菌株につき、各種生理学的試験を行いこれら 4 菌株の同等性を検証する。本報では、JIS Z 2911 試験に供される基材の劣化に関与すると思われる主要な加水分解酵素アミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、及びリパーゼの生産性につき報告する。

方法：プレートアッセイ法

Aspergillus niger の菌株として、NBRC 6341、6342、105649、105650 の 4 株を供試した。加水分解酵素として、JIS Z 2911 に規定する各種基材（基質）に作用すると思われるアミラーゼ（基質になるもの：デンプン糊、加工デンプン等）、プロテアーゼ（タンパク質、皮革、エステル類等）、セルラーゼ（木工、竹製品、コットン等）及びリパーゼ（プラスチック可塑剤、油脂ワックス、エステル類等）の 4 種を選択した。また、それぞれの基質としてアミラーゼ：Soluble Starch、プロテアーゼ：Casein（ハンマステン氏法）、セルラーゼ：CMC（Carboxymethyl-Cellulose）、リパーゼ：Tween20（Polyoxyethylene(20)sorbitan monolaurate + 0.01 % CaCl₂ · 2H₂O）を唯一の炭素源とするプレートアッセイ法によりそれぞれの活性を評価した。すなわち、チャペック培地の糖を抜いたものを NS 基礎培地とし、これに上記各炭素源を 1 % 添加した寒天プレートを各酵素の誘導培地とした。各菌株の孢子懸濁液をプレート中央部に点接種し、27℃ でアミラーゼ、リパーゼについては 7 日間、プロテアーゼ及びセルラーゼについては 10 日間培養して活性を評価した。

各活性の可視化は以下のように行った。すなわち、アミラーゼ（Amy）プレートではルゴール液（0.01% I₂ / 0.1% KI）を注入してヨウ素・デンプン反応を行い、アミラーゼによる分解ゾーンを観察した。プロテアーゼ（Pro）プレートに 1 % TCA（Trichloro-acetate）を注ぎ、未分解のカゼインを凝集させてコロニー周辺の透明ゾーンを観察した。同様にセルラーゼ（Cel）プレートに 1% Congo Red 水溶液を注入して一旦プレート全域を染色し、1% NaCl 水溶液で CMC の分解ゾーンを脱色させ観察した。リパーゼ（Lip）プレートでは Ca 塩が予め添加されており、Tween20 の分解に伴い遊離したラウリル酸と不溶性の塩を生成する。この塩の粒子あるいは結晶の析出ゾーンを観察して活性を評価した。

結果：

アミラーゼ

アミラーゼ・アッセイの結果を表 1、2 及び図 1 に示した。図 1 から、供試した 4 株のアミラーゼはいずれも菌体結合型（Cell-binding）もしくは菌糸結合型（Hyphae-binding）とも言うべきものであり、コロニー直下のみに透明ゾーンが認められた。表 1 では透明ゾーン直径の平均値を示し、表 2 ではコロニーの大きさの差を考慮し、活性を反定量化した

記号で示した。

表 1 . アミラーゼ活性 (その 1)

Strains	(cm) Av.	Total Av.
6341	3.4	
6342	3.2	
105649	4.0	3.5
105650	3.4	

表 2 . アミラーゼ活性 (その 2)

Strains	Activities	Total Av.
6341	+	
6342	+	
105649	+	+
105650	+	

- : 透明域無し、± : コロニー中心部のみ、+ : コロニーと同じ、++ : 透明域直径はコロニーから 2 cm 未満、+++ : 透明域直径はコロニーから 2 cm 以上

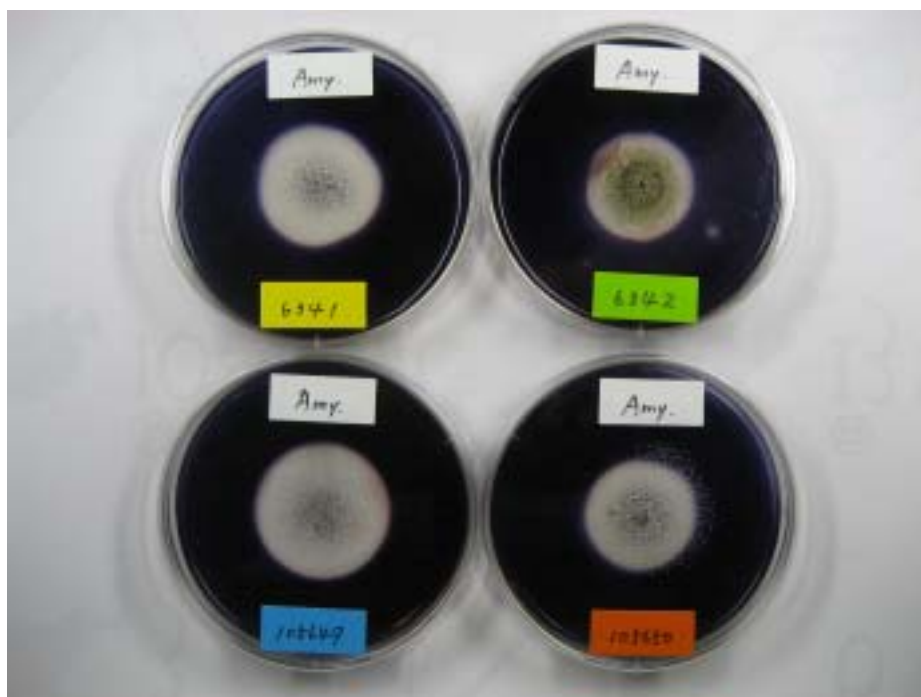


図 1 . アミラーゼ・アッセイ

アミラーゼ活性については、他の3株に比べ105649が生育も良好であり透明ゾーンも若干大きかったが、図1で示すように菌体結合型であり著しい差異は認められなかった。透明ゾーンの全平均は3.5 cmであり、各菌株の平均値からの最大差は5 mmであった。また、活性の判定量的評価ではいずれの菌株も「+」であった。

プロテアーゼ

プロテアーゼ・アッセイの結果を表3に示した。4菌株いずれのプレートも明瞭な透明ゾーンが認められなかった。しかし、生育してコロニーは形成したので微弱な活性を発現しているものと認め「±(w)」と判定した。

セルラーゼ

セルラーゼ・アッセイの結果を表4に示した。プロテアーゼと同様にいずれのプレートも明瞭なCongo Redの脱色ゾーンが認められなかった。しかしながら、4菌株共に生育してコロニーを形成したので微弱な活性を発現しているものと認めて「±(w)」と判定した。

表3．プロテアーゼ活性

Strains	Activities	Total Av.
6341	±(w)	
6342	±(w)	
105649	±(w)	±(w)
105650	±(w)	

(w): weak activity

表4．セルラーゼ活性

Strains	Activities	Total Av.
6341	±(w)	
6342	±(w)	
105649	±(w)	±(w)
105650	±(w)	

表5．リパーゼ活性

Strains	Activities	Total Av.
6341	+	
6342	+	
105649	+	+
105650	+	

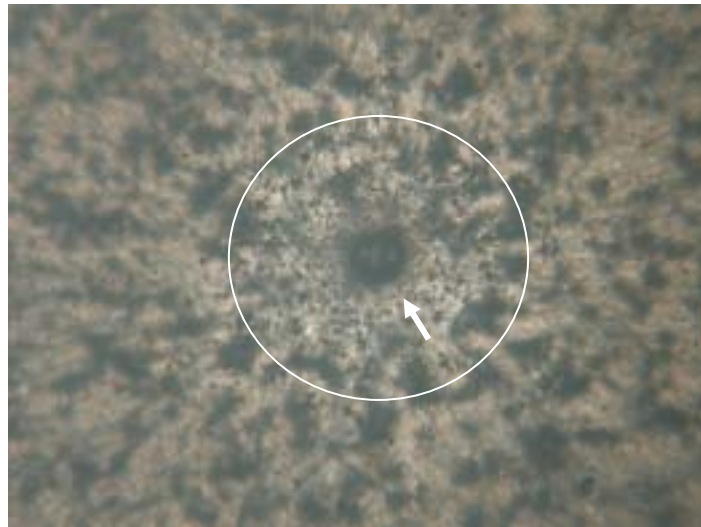


図2．リパーゼによる脂肪酸 Ca 塩の凝集粒子
不明瞭な黒い陰は *Aspergillus* の頂のうと分生子塊

リパーゼ

リパーゼ・アッセイの結果を表5に示した。活性発現に伴う脂肪酸 Ca 塩の粒子あるいは結晶は4株共にコロニー直下のみで認められた。ただし、菌糸の存在しない部位でも凝集が認められるため菌体結合型とすることは出来なかった。コロニー直下のため粒子に分散直径を求めることが出来なかったが、明瞭な粒子の凝集を認めたので「+」と判定した。また、凝集した粒子の実体顕微鏡像（プレート裏面より検鏡）を図2に示した。

4. 所見（総合判定と考察）:

当該4菌株について、JIS Z 2911 試験に供される基材の劣化に関与すると思われる主要な加水分解酵素アミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、及びリパーゼの生産性を簡便なプレートアッセイ法を用いて評価した。その結果、アミラーゼは4菌株共に「+」、プロテアーゼ及びセルラーゼは「±」、リパーゼは「+」と評価された。したがって、主要な加水分解酵素の生産性については当該4菌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。

試験項目：17．有機酸の生産性試験

目的：*Aspergillus niger* に属する NBRC の 4 菌株につき、各種生理学的試験を行いこれら 4 菌株の同等性を検証する。一般に *A. niger* は高濃度の糖が存在するとグルコン酸、くえん酸等の有機酸を生成することが知られている。有機酸は金属やプラスチック類等の腐食や劣化に関与しているものと思われる。そこで、プレート上で簡便に有機酸の生成を検証出来る新規な試験方法を開発し、当該 4 株の総有機酸生産性につき比較試験を実施した。本報では有機酸の生産性について報告する。

方法：*Aspergillus niger* の菌株として、NBRC 6341、6342、105649、105650 の 4 株を供試した。また、プレート上で有機酸生成を評価可能な新規試験方法を開発した。すなわち、試験培地として、チャベック培地のグルコースの代わりに 15% しょ糖を添加した加糖チャベック寒天培地 (pH 5.5) を調製した。この培地に各菌株を点接種してコロニーを形成させ (27℃、5 日間) 0.05% の Congo Red を注いで発色させた。Congo Red は pH 4 付近で赤から青に変色するため、有機酸の生成を青色の変色域で判定出来る。

結果：培地に糖が十分含まれているため 4 菌株共に生育は良好であった。また、変色域は各株共にコロニーと重複していた。すなわち、変色域の直径 (cm) コロニーの直径であった。表 1 に変色域の平均直径 (n=3) を示し、図 1 に染色した各菌株のプレートを示した。

表 1．有機酸の生産性

Strains	(cm) Av.	Total Av.
6341	6.6	
6342	6.0	
105649	6.4	6.5
105650	6.8	

各菌株の変色域の直径は 6.0 ~ 6.8 cm であり、全体の総平均は 6.5 cm であった。総平均からの最大の差異は 5 mm であった。

所見 (総合判定と考察):

一般に、*A. niger* は高濃度の糖の存在下で著量の各種有機酸を生産することが知られており、数種の有機酸は *A. niger* を用いて工業的に発酵生産されている。また、生産される有機酸は複数の種類で構成される。表 1 及び図 1 の結果から、有機酸生成を示す変色域の直

径は4菌株間でほぼ同じであった。したがって、4菌株の有機酸の生産性は同等であると判断された。

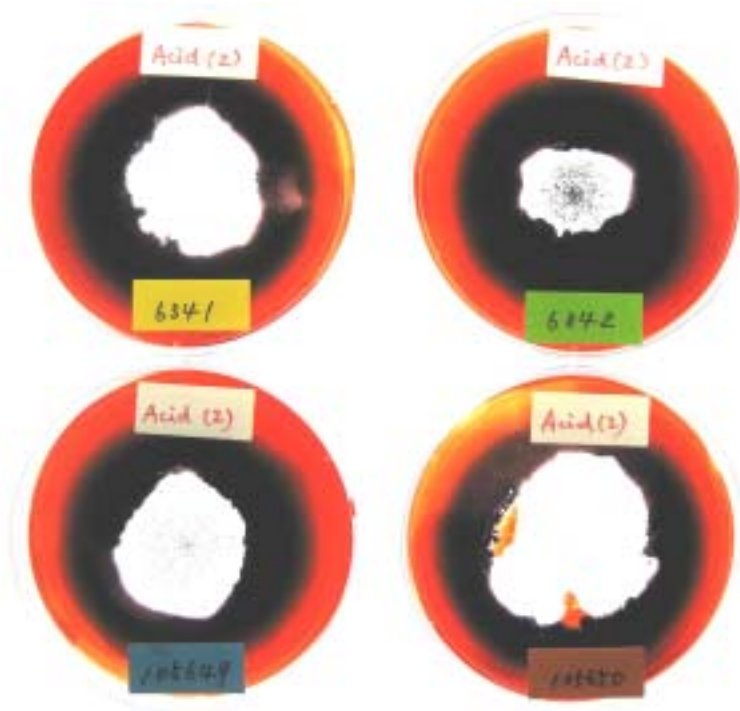


図1 . 有機酸の生成状況

注：コロニー中心部は Congo Red の染み込みがなく透明となっている。青色部の広がりはコロニーとほぼ重なっている。

試験項目：18．合板のカビ抵抗性試験

目的：合板のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて行い、これら菌株の差による試験結果への影響を調べる。

方法：

JIS Z 2911 の一般工業製品法で試験を行った。すなわち、一般工業製品の試験カビである *P. citrinum* NBRC 6352、*R. oryzae* NBRC 31005、*C. cladosporioides* NBRC 6348 および *Ch. globosum* NBRC 6347 に *A. niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649 または、NBRC 105650 をそれぞれ混合したものを試験孢子液とした。これらを合板にそれぞれ噴霧接種し、培養後の発育度を肉眼にて観察した。

結果：

異なる4菌株の *A. niger* を用いて合板のカビ抵抗性試験を行った結果を表1に示した。

表1．合板のカビ抵抗性試験成績

試験菌株*	発育度**	
	培養2週目	培養4週目
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6341	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6342	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105649	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105650	2	2

* 試験菌株は、一般工業製品の試験カビである *Penicillium citrinum* NBRC 6352、*Rhizopus oryzae* NBRC 31005、*Cladosporium cladosporioides* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 と混合した *A. niger* 菌株を示した。

** 菌糸の発育度 0：試料または試験片の接触した部分に菌糸の発育が認められない；
1：菌糸の発育部分の面積は全面積の 1/3 を超えない； 2：菌糸の発育面積は全面積の 1/3 を超える。

所見（総合判定と考察）：

合板のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて、JIS Z 2911 の一般工業製品法で試験を行った結果、供試した *Aspergillus niger* 4 菌株の発育度は同じであった。

よって、これら *Aspergillus niger* の菌株によるカビ抵抗性試験の結果への影響はないと判断された。

試験項目：19．靴下のカビ抵抗性試験

目的：靴下のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて行い、これら菌株の差による試験結果への影響を調べる。

方法：

JIS Z 2911 の繊維製品法で試験を行った。すなわち、繊維製品の試験カビである *Penicillium citrinum* NBRC 6352、*Chaetomium globosum* NBRC 6347 および *Myrothecium verrucaria* NBRC 6113 に *A. niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649 または、NBRC 105650 をそれぞれ混合したものを試験胞子液とした。これらを靴下にそれぞれ噴霧接種し、培養後の発育度を肉眼にて観察した。

結果：

異なる4菌株の *A. niger* を用いて靴下のカビ抵抗性試験を行った結果を表1に示した。

表1．靴下のカビ抵抗性試験成績

試験菌株*	発育度**	
	培養2週目	培養4週目
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6341	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6342	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105649	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105650	2	2

* 試験菌株は、繊維製品の試験カビである *Penicillium citrinum* NBRC 6352、*Chaetomium globosum* NBRC 6347 および *Myrothecium verrucaria* NBRC 6113 と混合した *A. niger* 菌株を示した。

** 菌糸の発育度 0：試料または試験片の接触した部分に菌糸の発育が認められない；
1：菌糸の発育部分の面積は全面積の 1/3 を超えない； 2：菌糸の発育面積は全面積の 1/3 を超える。

所見（総合判定と考察）：

靴下のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて、JIS Z 2911 の繊維製品法で試験を行った結果、供試した *Aspergillus niger* 4 菌株の発育度は同じであった。

よって、これら *Aspergillus niger* の菌株によるカビ抵抗性試験の結果への影響はないと判断された。

試験項目：20．ポリエチレン板のカビ抵抗性試験

目的：ポリエチレン板のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて行い、これら菌株の差による試験結果への影響を調べる。

方法：

JIS Z 2911 のプラスチック製品法で試験を行った。すなわち、プラスチック製品法の試験カビである *Penicillium pinophilum* NBRC 6345、*Paecilomyces variotii* NBRC 33284、*Gliocladium virens* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 に *A. niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649 または、NBRC 105650 をそれぞれ混合したものを試験孢子液とした。これらをポリエチレン板にそれぞれ噴霧接種し、培養後の発育度を肉眼および顕微鏡にて観察した。

結果：

異なる4菌株の *A. niger* を用いてポリエチレン板のカビ抵抗性試験を行った結果を表1に示した。

表1．ポリエチレン板のカビ抵抗性試験成績

試験菌株*	発育度**	
	培養2週目	培養4週目
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6341	1	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6342	1	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105649	1	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105650	1	2

* 試験菌株は、プラスチック製品法の試験カビである *Penicillium pinophilum* NBRC 6345、*Paecilomyces variotii* NBRC 33284、*Gliocladium virens* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 と混合した *A. niger* 菌株を示した。

** 菌糸の発育度 0：試料または試験片の接触した部分に菌糸の発育が認められない；
1：菌糸の発育部分の面積は全面積の 1/3 を超えない； 2：菌糸の発育面積は全面積の 1/3 を超える。

所見（総合判定と考察）：

ポリエチレン板のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて、JIS Z 2911 のプラスチック製品法で試験を行った結果、供試した *Aspergillus niger* 4 菌株の発育

度は同じであった。

よって、これら *Aspergillus niger* の菌株によるカビ抵抗性試験の結果への影響はないと判断された。

試験項目：2 1 . 塩ビ板のカビ抵抗性試験

目的：塩ビ板のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて行い、これら菌株の差による試験結果への影響を調べる。

方法：

JIS Z 2911 のプラスチック製品法で試験を行った。すなわち、プラスチック製品法の試験カビである *Penicillium pinophilum* NBRC 6345、*Paecilomyces variotii* NBRC 33284、*Gliocladium virens* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 に *A. niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649 または、NBRC 105650 をそれぞれ混合したものを試験胞子液とした。これらを塩ビ板にそれぞれ噴霧接種し、培養後の発育度を肉眼および顕微鏡にて観察した。

結果：

異なる4菌株の *A. niger* を用いて塩ビ板のカビ抵抗性試験を行った結果を表1に示した。

表1 . 塩ビ板のカビ抵抗性試験成績

試験菌株*	発育度**	
	培養2週目	培養4週目
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6341	1	1
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6342	1	1
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105649	1	1
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105650	1	1

* 試験菌株は、プラスチック製品法の試験カビである *Penicillium pinophilum* NBRC 6345、*Paecilomyces variotii* NBRC 33284、*Gliocladium virens* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 と混合した *A. niger* 菌株を示した。

** 菌糸の発育度 0：試料または試験片の接触した部分に菌糸の発育が認められない；
1：菌糸の発育部分の面積は全面積の1/3を超えない； 2：菌糸の発育面積は全面積の1/3を超える。

所見（総合判定と考察）：

塩ビ板のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて、JIS Z 2911 のプラスチック製品法で試験を行った結果、供試した *Aspergillus niger* 4菌株の発育度は同

じであった。

よって、これら *Aspergillus niger* の菌株によるカビ抵抗性試験の結果への影響はないと判断された。

試験項目：22．ウェットシートのカビ抵抗性試験

目的：ウェットシートのカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて行い、これら菌株の差による試験結果への影響を調べる。

方法：

JIS Z 2911 の一般工業製品法で試験を行った。すなわち、一般工業製品の試験カビである *Penicillium citrinum* NBRC 6352、*Rhizopus oryzae* NBRC 31005、*Cladosporium cladosporioides* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 に *A. niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649 または、NBRC 105650 をそれぞれ混合したものを試験胞子液とした。これらをウェットシートにそれぞれ噴霧接種し、培養後の発育度を肉眼にて観察した。

結果：

異なる4菌株の *A. niger* を用いてウェットシートのカビ抵抗性試験を行った結果を表1に示した。

表1．ウェットシートのカビ抵抗性試験成績

試験菌株*	発育度**	
	培養2週目	培養4週目
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6341	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6342	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105649	2	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105650	2	2

* 試験菌株は、一般工業製品の試験カビである *Penicillium citrinum* NBRC 6352、*Rhizopus oryzae* NBRC 31005、*Cladosporium cladosporioides* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 と混合した *A. niger* 菌株を示した。

** 菌糸の発育度 0：試料または試験片の接触した部分に菌糸の発育が認められない；
1：菌糸の発育部分の面積は全面積の1/3を超えない； 2：菌糸の発育面積は全面積の1/3を超える。

所見（総合判定と考察）：

ウェットシートのカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて、JIS Z 2911 の一般工業製品法で試験を行った結果、供試した *Aspergillus niger* 4菌株の発育度は同じであった。

よって、これら *Aspergillus niger* の菌株によるカビ抵抗性試験の結果への影響はないと判断された。

試験項目：23．断熱材（発砲ポリエチレン）のカビ抵抗性試験

目的：断熱材（発砲ポリエチレン）のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて行い、これら菌株の差による試験結果への影響を調べる。

方法：

JIS Z 2911 の一般工業製品法で試験を行った。すなわち、一般工業製品の試験カビである *Penicillium citrinum* NBRC 6352、*Rhizopus oryzae* NBRC 31005、*Cladosporium cladosporioides* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 に *A. niger* NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649 または、NBRC 105650 をそれぞれ混合したものを試験胞子液とした。これらをウェットシートにそれぞれ噴霧接種し、培養後の発育度を肉眼にて観察した。

結果：

異なる4菌株の *A. niger* を用いて断熱材（発砲ポリエチレン）のカビ抵抗性試験を行った結果を表1に示した。

表1．断熱材（発砲ポリエチレン）のカビ抵抗性試験成績

試験菌株*	発育度**	
	培養2週目	培養4週目
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6341	1	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 6342	1	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105649	1	2
<i>Aspergillus niger</i> NBRC 105650	1	2

* 試験菌株は、一般工業製品の試験カビである *Penicillium citrinum* NBRC 6352、*Rhizopus oryzae* NBRC 31005、*Cladosporium cladosporioides* NBRC 6348 および *Chaetomium globosum* NBRC 6347 と混合した *A. niger* 菌株を示した。

** 菌糸の発育度 0：試料または試験片の接触した部分に菌糸の発育が認められない；
1：菌糸の発育部分の面積は全面積の1/3を超えない； 2：菌糸の発育面積は全面積の1/3を超える。

所見（総合判定と考察）：

断熱材（発砲ポリエチレン）のカビ抵抗性試験を、異なる4菌株の *Aspergillus niger* を用いて、JIS Z 2911 の一般工業製品法で試験を行った結果、供試した *Aspergillus niger* 4菌株の発育度は同じであった。

よって、これら *Aspergillus niger* の菌株によるカビ抵抗性試験の結果への影響はないと判断された。

**試験項目：24 . JIS 試験規格(JIS A 6909, A 6922, A 9523, K 5960, Z 2911)
に基づく製品試験**

目的：J I S 試験に規定されている代表的な製品を用いて試験を行い、*Aspergillus niger* 4 菌株について、試験結果の差異を調べる事を目的とする。

方法：以下に示す試験に適用される製品についてかび抵抗性を行った。
試験に供した製品、菌株及び試験方法概要を下記に示す。

1 . 試験規格及び製品

試験規格	製品記号 (* ; 防かび剤添加)
(1) JIS A 6909 (建築用仕上塗材)	S (*)
(2) JIS A 6922 (壁紙施工用でん粉系接着剤)	A (*) , B (*)
(3) JIS A 9523 (吹込み用繊維質断熱材)	D (*)
(4) JIS K 5960 (家庭用屋内壁塗料)	E (*) , F (*)
(5) JIS Z 2911 (かび抵抗性試験方法) 塗料	T 1、 T 2 (*)

2 . 菌株 *Aspergillus niger* は NBRC 6341、NBRC 6342、NBRC 105649、NBRC 105650 の 4 種類、その他の菌株は JIS Z 2911 に規定されているものを使用した。

3 . 試験方法概要

(1) JIS A 6909 (建築用仕上塗材)

- a) 試験片 ; ろ紙に試料を塗布し、30 × 30 mm に切断したもの。
- b) 混合孢子懸濁液の散布量 ; 1 ml
- c) 培養温度、湿度及び期間 ; 28 ± 2 °C、湿度95%以上、14日間
- d) 培地の組成 ; 水1000 ml、硝酸アンモニウム3.0 g、りん酸二水素カリウム1.0 g、硫酸マグネシウム七水和物0.5 g、塩化カリウム0.25 g、硫酸鉄(Ⅱ)七水和物0.002 g、寒天2.5 g
- e) 試験用かび
 - ・ *Aspergillus niger*
 - ・ *Penicillium citrinum*

(2) JIS A 6922 (壁紙施工用でん粉系接着剤)

- a) 試験片 ; ろ紙に試料を塗布し、直径30 mm に切断したもの。
- b) 混合孢子懸濁液の散布量 ; 培地に0.1 ml、試験片の中央に0.05 ml
- c) 培養温度、湿度及び期間 ; 28 ± 2 °C、湿度95%以上、14日間
- d) 培地の組成 ; 水1000 ml、硝酸アンモニウム3.0 g、りん酸一カリウム1.0 g、硫酸マグネシウム0.5 g、塩化カリウム0.25 g、硫酸第一

鉄0.002 g、寒天25 g

e) 試験用かび

- *Aspergillus niger*
- *Penicillium citrinum*
- *Cladosporium cladosporioides*

(3) JIS A 9523 (吹込み用繊維質断熱材)

- a) 試験片；厚さ5 mm、50 × 50 mmのマット状に成型したもの。
- b) 流水処理；流量500 ~ 1000 ml/minで24時間水処理したのち、精製水で洗浄し、水を切った。
- c) 混合孢子懸濁液の散布量；1 ml
- d) 培養温度及び期間；28 ± 2、14日間
- e) 培地の組成；水1000 ml、硝酸アンモニウム3.0 g、りん酸二水素カリウム1.0 g、硫酸マグネシウム七水和物0.5 g、塩化カリウム0.25 g、硫酸鉄()七水和物0.002 g、寒天25 g
- f) 試験用かび

- *Aspergillus niger*
- *Penicillium citrinum*
- *Chaetomium globosum*
- *Myrothecium verrucaria*

(4) JIS K 5960 (家庭用屋内壁塗料)

- a) 試験片；ろ紙に試料を塗布し、48時間乾燥し、直径30 mmに切断したもの。
- b) 水浸せき処理；精製水に18時間浸せきした。
- c) 乾燥処理；標準状態で2時間乾燥し、温度80 ~ 85 で2時間乾燥した。
- d) 混合孢子懸濁液の散布量；1 ml
- e) 培養温度及び期間；28 ± 2、7日間
- f) 培地の組成；水1000 ml、グルコース40 g、ペプトン10 g、寒天25 g
- g) 試験用かび

- *Aspergillus niger*
- *Penicillium pinophilum*
- *Cladosporium cladosporioides*
- *Aureobasidium pullulans*
- *Gliocladium virens*

(5) JIS Z 2911 (かび抵抗性試験方法) 8.塗料

上記の(4) JIS K 5960 (家庭用屋内壁塗料)と同様の方法である。

結果： 菌糸の発育度を JIS 試験法に規定された表示方法により下表に示す。
 （菌糸の発育度 0：試料または試験片の接触した部分に菌糸の発育が認められない；
 1：菌糸の発育部分の面積は全面積の 1/3 を超えない； 2：菌糸の発育面積は全面積の 1/3 を超える）

試験規格	製品記号	NBRC 6341	NBRC 6342	NBRC 105649	NBRC 105650
JIS A 6909	S (＊)	0	0	0	0
JIS A 6922	A (＊)	0	0	0	0
	B (＊)	0	0	0	0
JIS A 9523	D (＊)	0	0	0	0
JIS K 5960	E (＊)	0	0	0	0
	F (＊)	1	1	1	1
JIS Z 2911	T 1	2	2	2	2
	T 2 (＊)	1	1	1	1

＊：防かび剤添加

所見（総合判定と考察）：

同一の試験片を用いた試験において、阻止円の大きさについては菌株間で若干のばらつきが見られたものの、いずれの試験においても 4 菌株の間に判定結果に差はなかった。これらの結果から、上記 J I S に規定する試験においては 4 菌株に違いはないと判断した。