説 統

コウジ菌の分類

村上英也*

Classification of Koji Molds

Hideya MURAKAMI

(Research Institute of Brewing: 2-6, Takinokawa, Kita-ku, Tokyo)

カビの食品衛生

食品であろうとなかろうとカビが生えるという現象は日常生活にとって決して好ましいことではないが、だからといってアジアにおける多くの国々はこのカビを利用して固有の著名な酒を造り、いろいろな食品を造っていることから見れば、われわれにとってあながちカビがすべて好ましくないとはいえない。それはあたかもカビと同系統の菌類であるキノコの中にもおいしいものもあれば有毒なものもあるのに似ている。

欧米におけるカビの研究を見れば、ほとんど家畜類やまれに人に対する病害菌として注目されていて、その利用などは思いもよらないところである。日本にはコウジ菌を培養していわゆる種麹(別名・もやし)を造り販売している専門業者が50場ほどあるが、その従業員の中に特殊の病気にかかる者がいるのではないかとという問合わせや調査が欧米諸学者によってなされたこともしばしばであった。しかしわれわれは一度でもそのような症例を見たことがない。こういうわけではいわゆるカビ毒については主として諸外国の研究が圧倒的に多かったのであるが、1960年のイギリスにおけるアフラトキシン事件の発生により、世界のどんな地域でもこの問題について重大な関心をはらわざるを得ないことになった。

カビが食品衛生学的に大きくとり上げられるようになったことは、長い間カビを利用して生活してきたアジア諸国民にとって極めてショッキングなことであり、ひとしく国民保健に関心をもつわれわれも当然大きい関心をもって受けとめた。これらカビ毒についてはすでに多くの研究が発表され、調査も行なわれているのでここに記する必要はないし、わが国のコウジ菌については各方面の精力的な研究によりアフラトキシンを生産しないことが証明されるに至っている。ただ毒性という重要な問題の研究にたずさわる者として、これらの研究が誤った学

問的基礎の上になされることがあるとしたら不幸なことである。以下はこの基礎問題にアプローチする一つの方法としてのコウジ菌の植物学的分類法について、最近の研究の概要を紹介したい。

コウジ菌という和名

自然界には無数の種類のカビが存在するが、酒の醸造に利用されるカビはとくに加無太知または加牟多知と称していたことがすでに奈良朝時代の記録にあり、このもろもろのカビ達が今日のようにコウジ菌といわれるようになったのは明治以後のことである。これを最初に研究した Herman Ahlburg¹⁾ は東大医学部の前身東京医学学校の御雇教師で博物学を講義していた人であるが、研究の途中日光に植物採集に出かけて赤痢にかかり、東京で客死した。そしてその研究業績は同じく化学の御雇教師 Korschelt²⁾ への寄書の形として初めて発表されるに至ったもので、この研究の重要性にかんがみて共同研究者である松原³⁾ はこれを和訳して東京医事新誌に発表した。このカビの和名については適当な用語が見当らなかったためかカビタネと記している。後に Atkinson (東大理学部御雇教師) もその著書⁴⁾ において、本郷湯島のコウジ製造場の例を用いて Koji fungus または Tané (種) と記載しているに過ぎない。このカビがコウジ菌と呼ばれるようになった経緯は、少なくとも文献に現われた限りにおいては高橋 (東大農学部教授)⁵⁾ が最初であると思われる。その後坂口⁶⁾ は1933年にコウジから分離されるもろもろのカビという意味でコウジ菌と区別してコウジのカビと称したことがあり、大谷⁶⁾ が1937年に日本コウジ菌と称したことがあるが、それ以後の学術報告ではコウジ菌と称している。

コウジ菌という和名について、現在でも自家用にみそ、しょう油や甘酒を製造しているところが少なくないので、各地方を筆者が調査したところ、ほとんどコウジ菌あるいは単に菌と称しており、まれにカビタネあるい

* 国税庁醸造試験所: 東京都北区滝の川 2-6

はタネと称する人もあるていどであった。また今日の小、中学校等の教科書を見ても、しかるべき辞書類を見ても、すべてコウジ菌と記載しており、コウジカビと括弧書きをしている場合もある。

近年科学の進歩に伴い、コウジ菌も植物分類学的にはすべて *Aspergillus* 属に入るカビであることから拡大して、若干の研究報告の中には *Aspergillus* 属に入るいろいろなカビをすべてコウジ菌と記載しているものがあるのは、明らかに誤りである。すなわち日本のコウジを造るカビのみがコウジ菌なのであって、その学名については後にふれたい。すべて物を分類、区別するに際し、和名であれ洋名であれ用語を明確にしておくことは極めて初歩的であるが、また根本的に重要でもある。

Aspergillus oryzae の発見

日本のコウジ菌の学名は Ahlburg により *Eurotium oryzae* Ahlburg と与えられたのであるが、後にこのカビが有性生殖をしないことから、Cohn⁷⁾ が *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn と改名し今日に至っている。Ahlburg の勤務する当時の東京医学校は現在の神田錦町学士会館のある所にあり、すぐ近くの神田鎌倉河岸では福田が相当の規模でコウジ製造業を営んでいたので、Ahlburg が用いた分離試料が福田のコウジであったことはほぼ間違いのないことである。その後福田の事業は日本醸造工業株式会社(東京・文京区)にひきつがれ、1918年に福田のコウジ菌が同社より丸福雪印菌として大蔵省醸造試験所に寄托され現在 RIB 430 株として保管されている。Ahlburg 以前にコウジから菌を分離した者はないので RIB 430 は正しくコウジ菌 *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn の原株である。

ところが 1909 年に Thom は、オランダ国パールン市の現在でも著名なカビの保存機関である Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS と略記) の Dr. Westerdijk より、Wehmer⁸⁾ が非常に詳しく記載した日本産のコウジ菌 (Wehmer の株) をもらい受け、Thom No. 113 と名づけて発表⁹⁾ したため、この株があたかもコウジ菌の原株であるように考えられるようになった。そこでこの Wehmer の株の出所を追求したところ、これは Ahlburg の後に東京大学農学部御雇教師となった Kellner が日本のコウジを Wehmer に送り、氏が大変に苦心してコウジ菌を分離したものであり、これを同時代のカビの研究者として著名な Dr. Went が 1907 年に CBS に寄托したことが明らかになった。この株は現在 CBS にも No. 102.07 株として保存されている。

そこで Kellner が送ったコウジが日本のどこで製造されたものであるかが問題として残る。同じ東京大学教師の立場として、かつ当時有力なコウジ製造家としての福田と Ahlburg の居住の関係よりして、これが福田のコウジであったと容易に推定されるのであるが、確証はな

いし、関係者はすべて故人でありこれ以上の追求は不可能となった。それゆえ今日 Thom の後を継いで研究をしているウィスコンシン大学の Raper 教授から Thom No. 113 をもらい受けて、われわれの保管している RIB 430 と実験的に比較研究することとした。その結果この 2 株は形態的にも生理的にもほとんど同株であることを認め、RIB 430 を Raper に送りその見解を求めたところ、同門であり The Genus *Aspergillus*¹⁰⁾ の共同著者である Miss Fennell より、RIB 430 の方がより floccose であり、より胞子着生が少ないようではあるが、形態的にも培養の諸特徴からもまったくよく似ているとのことであった。

これにより RIB 430 も Thom No. 113 (WB=NRRL 447) もともに *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn の原株であると認める。これらの特徴は、菌草が淡黄白色、長毛であり、胞子 (conidia) は直径 5~6 μ で少しく 4 μ もあり、梗子 (sterigmata) の配列は大部分単列 (uniseriate) であるがなお 20% ていどに復列 (biseriate) を混有し、Ballg. 6~8 の米コウジ汁に培養してコウジ酸を生産せず、米コウジを造って水浸漬した後、水を切って 1~2 日間空气中に置くとかわる。初めに Thom No. 113 の梗子配列について Wehmer が単列 (einfach) と記載したために、多くの研究者は今日でもコウジ菌の梗子は単列であると考えているが、Wehmer は単列の中に復列も混じていたのかどうか記載していないので、今後は上記の原株の観察の結果により多少の復列も混有すると認識されるべきである。

変種の発見

1870 年台に始まったコウジ菌の研究はドイツを中心に続けられ、数名の著名な研究を挙げることができるが、これらの研究者が一樣に *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn の研究と称しているにもかかわらず各部器官の形や大きさなどの記載はまちまちである。他面、今日数種類のコウジ菌を混合して種コウジやコウジを造っている現況から見れば、上記ドイツの諸学者が日本のコウジを試料として、各々ただ 1 種類のコウジ菌しか分離しなかったことも不思議に思われるのであるが、当時の種コウジやコウジの製造状況が不明なのであるいは単一菌種のみが用いられていたのかもしれない。それにしても記載のまちまちなのは不思議なことであり、最初にこれに気づいていろいろの種コウジからコウジ菌を分離して比較研究したのは高橋⁴⁾であり、氏はこれらの菌株に A, B, C, ... などの符号をつけて発表し、初めて *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn に変種 (variety) の存在することを唱えた。

高橋の変種の設定は、しかしながら、確固たる植物分類学上の根拠に基づいたものではなく、いずれかといえば日本のコウジの菌であるという一事に基づいているように思われる。もっとも現在においても糸状菌における種 (species) と変種と品種 (form) などの関係につい

て詳論したものはないし、コウジ菌自体、コウジ菌科 *Aspergillales* の中でもあまりにも多変性を示すことから、不完全世代として人為的に設けられたコウジカビ属 *Form-genus Aspergillus* に編入されているのであるから、当時として変種の確固たる概念を得ることができなかったのも無理はない。

いずれにしてもドイツの諸学者も高橋も、自ら研究したコウジ菌を Ahlburg が分離し Cohn が命名した原株と比較してから種名を決定したという証拠は見られないようである。この点を深く考慮しながら研究したのは Thom⁹⁾ であるが、残念ながら氏はつぎに記すように大きい誤りをおかすことになった。

A. flavus と *A. oryzae*

高橋からいろいろなコウジ菌の送付を受けた Thom は、これらを自己の保存する標準菌株と比較検討した結果、高橋のカビはその形態や培養諸特徴が互いに非常によく類似しているが、とくに高橋の F 株は自己のもつ Thom No. 113 と区別し難く、また C 株は Thom No. 108 (*A. flavus* Link WB=NRRL 482) と区別し難いので、高橋の諸株は種々の中間形を示しながら *A. oryzae* と *A. flavus* の間に分布する多様のカビの系列 (series) であると見なし、コウジ菌を *A. flavus-oryzae* series としてまとめ⁹⁾、その後多種類の *Aspergillus* 属と比較した際にこれを *A. flavus-oryzae* group としてまとめた¹¹⁾。

しかしながら Thom No. 108 は Brefeld-Wehmer が分離記載した *A. flavus* Link であって1809年に Link が分離命名した株 (*A. flavus* Link の原株) でないことは Thom の著書によっても明白である。Link の原株は植物遺体から分離し、その菌草が黄色 (flavo) を呈することによって特徴づけられているので、1900年代になってから Thom をはじめ多くの研究者が植物遺体から多くのカビを分離し、Link の原株を探したけれども、多くは *A. glaucus*, *A. repens*, *A. amstelodami* などであったし、今は筆者の探した限りにおいては世界のいづこの菌株保存機関にもこの原株は保管されていない。

A. flavus Link の形態的特徴は分類学記載の長い歴史を通して *A. oryzae* に比べ、菌草が緑色、短毛、梗子配列は復列で胞子は圧倒的に小さいと記載されているので、筆者は Thom No. 108 を Raper 教授より譲り受けて調査した。その結果この株は菌草が淡黄色、長毛、梗子は20%程度の復列梗子を混有し胞子も比較的に大きく、形態や培養特徴により Thom No. 113 と区別できないことが明らかとなり、この2株をあえて区別するとすれば、若干の生理的性質の差—Thom No. 108 は米コウジ汁に培養した際コウジ酸を多量生産し、米コウジはかっ変せず、Thom No. 113 はこれに正反する—による以外に方法のないことを知ることができた。

このように菌の現物を観察することによって諸報告に

おける記載に矛盾のあることがわかった以上は、文献を離れ、かつ研究者の主観を脱して客観的方法によって分類の key character を求めなければならない。そこで国内外の研究機関から数十株の *A. flavus* と称されている株の分譲を受けて、これにコウジ菌を加え電子計算機による多変量解析 (multivariate statistical analysis) の一法である成分々析 (component analysis) を行なうこととした。この概要は後説することにするが、その結果は Thom No. 108 と Thom No. 113 とは互いにほとんど区別できないことを知った。この成績に対する批判を Fennell に伝えたところ筆者同様の見解であって、Thom No. 108 は今後 *A. oryzae* NRRL 482 とするとのことであった (1970. 11. 10)。

以上により今から半世紀前に Thom がいろいろなコウジ菌を集団としてまとめるのに用いた *A. flavus-oryzae* series (あるいは group) という呼称は不合理であることがわかる。

コウジ菌分類の歴史

A. flavus Link の標準株として長い間世界な学界に君臨してきた Thom No. 108 が *A. oryzae* であることがわかった今日から見て、過去におけるコウジ菌の分類法について詳細に論述しても意味の少ないことである。

ただこれまで多くの研究者が成し遂げてきた研究の歴史はそれぞれに重要なものがあり、1933年坂口⁵⁾、1937年大谷⁶⁾、1944年坂口・山田¹²⁾、1945年 Thom, Raper¹³⁾、1952年小原¹⁴⁾、1957年根平¹⁵⁾、および1965年 Raper, Fennell¹⁰⁾ の諸研究は著名である。

これらの研究を通して見られる傾向はほぼつぎの通りである。まず根本的にはコウジ菌は自然に1000年以上の歴史により淘汰されて醸造に利用されてきたものであるから、一般の野生のカビとは必ず違おうであろうという見方と、利用不利用は人為によることであるから、自然の生物としては違わないという見方とがあること；諸外国の研究者の多くは菌草が緑色を呈するか否かおよび梗子配列の状態を重要視し胞子表面の性質を軽視するのに対し、日本の多くはこの反対であることなどである。

なお *A. flavus* と *A. oryzae* との区別が難かしいということについては、すでに1929年 Blochwitz 氏¹⁶⁾ の記載するところであり、斎藤¹⁷⁾ もまた *A. oryzae* は *A. flavus* が永年の間小麦などの穀類に培養されている間に自然に変化してできた培養変種であると考えたし、根平はさらにこれらの酵素組成を比較した結果により、*A. oryzae* は *A. flavus* と同様であるから、後に分離命名された *A. oryzae* は植物分類学の規程に従って *A. flavus* の変種とすべきであると、*A. flavus* Link var. *oryzae* (Ahlb.) Cohn と称し、同様の意味において坂口・山田の *A. sojae* も *A. parasiticus* Speare f. *sojae* と称している。最近那須野氏¹⁸⁾ もアルカリプロティナーゼの電気泳動的性質は species-specific であるが、とくに

胞子表面の粗滑と高度の相関性を示しており、コウジ菌では *A. oryzae* 型と *A. sojae* 型に分けられ、それぞれ *A. flavus* と *A. parasiticus* の型と区別できないと報告している。

培養変種という考え方も理のあるところであるが、実験的証明なしに徒らにこれを拡大解釈することは分類学の意味を失なわせることにもなりかねない。*Aspergillus* 属の諸性質は互いに高度に連続しているが、コウジ菌についてその紫外線照射変異株と親株とを比較¹⁹⁾すれば、復列梗子の親株からは必ず復列梗子の変異株が生まれるし、単列梗子の親株からはまれに少数の復列梗子の変異株が生まれることがあっても累代培養中に不安定なため、元の単列梗子に戻るものであり、胞子表面については井口²⁰⁾によっても直径や形は変異によって変化するが小突起があるか否かは変化せず安定であるとされている。またさきに記したように Thom No. 108 と Thom No. 113 の区別を辛うじて可能にしたコウジ酸の生産性と米コウジのかっ変性、また酵素組成のような生理的諸性質が多数の菌株を分類する上に有意の key character となり得るか否かは、全菌株の総合において判断されなければならないことである。

The Genus *Aspergillus* (Raper et Fennell):

1965年に Raper および Fennell によって発表された本書は、1926年の *The Aspergilli*, 1945年の *Manual of the Aspergilli* に引き続いて、Thom, Church, Raper, Fennell らの諸業績を継承し多くの日本における研究成績をとり入れながら糸状菌の分類を大成した最新の好著として世界各地の研究者の受け入れるところとなっている。

この中では日本のコウジ菌を *A. flavus* group の中の一部としてまとめ、*A. flavus* Link, *A. flavus* var. *columnaris* Raper et Fennell, *A. parasiticus* Speare, *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn, *A. oryzae* var. *effusus* (Tiraboschi) Ohara, *A. zonatus* Kwon et Fennell, *A. clavato-flavus* Raper et Fennell, *A. tamaraii* Kita, *A. flavofurcatis* Batista et Maia, *A. subolivaceus* Raper et Fennell および *A. avenaceus* Smith の11株を group の代表株として掲げている。筆者はこれらの全株を Raper 教授より分譲してもらい形態生理にわたって調査した結果、日本のコウジ菌に類似するものは *A. flavus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. oryzae* var. *effusus* および *A. tamaraii* (*A. flavofurcatis* もほとんど *A. tamaraii* に同じ) の6株であって、他の5株はまったくコウジ菌中には見られないものであった。

A. flavus については既記のように *A. oryzae* との違いに疑問のあること；*A. flavus* var. *columnaris* はその分生胞子頭が円柱状を呈することをもって特徴としているが胞子頭の形は推計学的²¹⁾に他の諸性質との間

に有意の相関もなく、分類の key として疑問があり、かつこの代表株 NRRL 4818²²⁾ は梗子が単列、頂囊は小さくスプーン状、胞子の直径4.5~6 μ 、コウジ酸を生産せず、多くの性質がコウジ菌と一致していること；彼らは胞子表面の性質については *A. flavus* に関して conspicuously echinulate, *A. parasiticus* に関して coarsely echinulate と記しており基本的にこの重要な性質を軽視しているので、その他の記載の性質を見てもこれら2種の区別が難しいこと；*A. oryzae* var. *effusus* については分生胞子柄が気菌糸から生ずる点で培地上から生ずる *A. oryzae* と異なるとしているが、いわゆる長毛のコウジ菌にもまれに見出される性質であって、これが変種とするほどに基本的に重要であるか否かについてはなお検討を要すること；などの問題点があり、また本分類法はその key character の記載に広く解釈できる要素を多く含んでいてわかりにくい。

その他従来の *A. flavus-oryzae* series にも group にも入らない新種が加えられているが、これらの生理的諸性質（アニス酸培地における生育の難易²³⁾、アルカリプロティナーゼの性質¹⁸⁾など）はまったく従来の諸菌株と異なっているので、果して *A. flavus* group に入れることが妥当であるかについても疑問が残る。

形態学的諸性質

コウジ菌の一般的形態は Fig. 1 により、その巨大集落の特徴は Fig. 2, 各部器官の形態は Figs. 3, 4, 5, 6, 7 に示される。

菌核はコウジ菌ではまれに少産することがあるが不安定であり、これに対し *A. flavus* では通常多産し、しばしば集落全面をおおうこともあって比較的安定である。胞子頭の形は概して菌株固有であるが同一株でも種々の形を混有することも少なくなく、とくに globose, radiate, broom 同士、また broom, columnar 同士は共存することが多い。loosely radiate は胞子の echinulate~tuberculate の株に限られている。胞子頭の形態と他の

Fig. 1. コウジ菌の一般的形態

Fig. 2. 巨大集落の特徴

Fig. 3. 種々の形の胞子頭

Fig. 4. 種々の形の頂囊

Fig. 5. 梗子の配列

Fig. 6. 胞子柄表面の性質

Fig. 7. 胞子表面の性質

各部器官の形態および各種の生理的性質との相関々係はほとんど存在しない²¹⁾。検鏡するとき検体の採取位置によって種々異なる形を示すことが多いので、ある特定の株の代表形を定める場合はとくに慎重を要する。頂囊の形や大きさは変異によって変り易く¹⁹⁾、とくに直径10~20 μ 以下の小頂囊のみをもつ株以外はその代表値の測定に際し研究者の主観の入る余地が多い性質である。

梗子の配列は同一株の同一頂囊上でも単列のみのものもあれば多少の復列を混有するものやほとんど全部復列のものもあり、株が異なるにしたがってこれらの混有率は種々に変化する。そして復列梗子は同一株の頂囊でもその大きいものに多く存在するので、検鏡に際してはできるだけ大型の頂囊を多数採取する必要がある。同一頂囊上単復梗子の混有ていどにかかわりなく、少しでも復列梗子をもつ頂囊が全部の頂囊の数に対して数%以下しか存在しない場合は、まったく単列梗子のみの株をも含めて単列梗子株とし、これが数%以上存在する場合は100%の株をも含めて復列梗子株とする。コウジ菌では0~30%ていど、*A. flavus* その他の株では40~100%ていどを示す。なお梗子の配列状態は胞子頭が立体的に多数の胞子を着生して大変見にくいものであるから、あらかじめプレートガラス上に lactophenol (石炭酸 20 g, 乳酸 20 g, グリセリン 40 g, 水 20 ml の混液) の1滴を滴下してにおいて検体を静かにのせてからカバーガラスをかけて検鏡しなければならない。これにより胞子は梗子から離れて見易くなる。

胞子の表面の性質は位相差顕微鏡によりそのままの状態(なんらの液体を加えることをしない)で観察する。すべての胞子とその表面に小突起(鋭角的)をもつものを小突起胞子株とし、茶かっ色々素をもって凹凸状(鈍角的)を呈するものを tuberculate な株とする。同一株の

胞子でも大部分粗 rough でありながら少数の小突起胞子を混有するものがまれにあるが、このような株は小突起胞子株と見なさない。小突起の生成までに長期間を要する株があるので、これらの検体は少なくとも3~4週間培養したものをを用いなければならないし、この性質ははなはだデリケートなので倍率は1000倍よりも600倍位の方が見分け易い場合もある。

さてコウジ菌は古い歴史をもって外見黄緑色を呈することから黄コウジ菌と称されており、欧米諸学者にも菌草が緑色でさえあればその形態にかかわらず *A. flavus* と称する者の多いことに注意しなければならない。多くのコウジ菌はその生育の過程において菌草の色(実際には胞子頭の色を指す)が微黄→黄緑→緑→オリーブ→茶→褐などに変化するが、培養が1か月以上の長期間にわたっても緑のものもあれば、初めから古くなるまで白、褐のものもまれにある。古い時の色の変化は速く不安定なので、老培養菌草の色を比較することによりコウジ菌には緑色味を保つ株(茶緑、緑茶などを含む)とまったく緑色味を失なって茶~かっ色に変化する株(白色株を含む)の2系統のあることがわかる。これらの色は人工変異によって容易に変化するものであるが、坂口ら²⁴⁾が焼酎・泡盛用の黒コウジ菌と上記の黄コウジ菌について親株と変異株の色を系統的に比較研究した結果によれば、たとえ変異株は種々の色を呈しても黄コウジ菌からは黒色変異株は生まれず、黒コウジ菌からは緑色変異株は生まれず、白コウジ菌からは白色変異株以外のものが生れず、したがってこれらコウジ菌の色は本質的に緑、黒および白の3種に分けられるということである。したがって黒コウジ菌を研究の対象から除外した著者の研究においては、供試菌株が緑色を保つか否かはもっとも基本的な形態学的性質の一つということになる。またこの

Fig. 8. 主なる性質間の相関々係 (84菌株)

性質と他の諸性質との間の相関関係を検した²¹⁾ところ Fig. 8 に示すようにもっとも高度にもっとも多くの他の性質に相関することが明らかになった。図は99%の有意相関を示す性質のみを記したもので実線は正相関、波線は逆相関を示している。このように重要な性質が種 species を決定するほどに有意であるか否かは後に検討する。

生理学的諸性質

コウジ菌の分類に生理的性質を導入したものは大谷の酵素力と色素生産力、小原のコウジ酸生産性など極めて少数である。しかし一般にコウジ菌を Czapek agar に培養すると繁殖の極めて不良な株 (硝酸塩難酸化性株) がしばしば見られるし、集落 (colony) の表面に種々のフェノール溶液を散布すると数時間で着色するものとならないものがあり、また集落の小片をメチレン青溶液に投入すると速やかに還元脱色するものとならないものがあり²⁵⁾、 H_2O_2 溶液に投入するとその分解力は菌種により種々あり²³⁾、その他酵素力の強弱はもちろんのこと、特有の物質であるコウジ酸²³⁾、ヘリクローム類^{26,27)}、強い光性物質^{28,29)}の生産性や色素の生産性においても、また米コウジのかわり変性³⁰⁾においても菌種により種々あって、形態的および培養的諸特徴とともに明らかに菌の個別認識上有力な性質と見なされるものがある。

なかんずく黒沢³¹⁾が香料成分の *Aspergillus* 属胞子の色に対する影響の研究を行なった際に見出したアニス酸による分類の試案は興味深い。すなわちアニス酸 (*p*-methoxy benzoic acid) を 0.05% 含む Czapek agar に培養すると *A. oryzae* は胞子がピンクに変色するのに対し *A. flavus* は変色しないというものである。変色した胞子も培養が永びくにしたがって次第に色がうすれてついには正常の Czapek agar に培養したときの胞子の色に戻るものであるが、変色する場合は培地中に *p*-methoxy phenol が生成され、変色しない場合は *p*-hydroxy benzoic acid が生成される。筆者らはさらに

アニスアルコール、アニスアルデヒド、*p*-methoxy-phenol²³⁾ の他にバニリン、イソバニリンその他³²⁾を培地に添加して胞子のピンク変色性や生産物を検したところ菌種によりはなはだしく多様であることを認めた。また従来の分類法により *A. oryzae* およびその変種と記載されている361株の中5%、同じく *A. flavus* と記載されている65株の中54%の株がアニス酸培地でピンクに変色しないこと³³⁾、胞子表面に小突起をもつコウジ菌はすべてアニスアルデヒド培地 (アニスアルデヒド0.05% を Czapek agar に溶解したもの) でピンクに変色しないこと²³⁾、Raper, Fennell の *A. flavus* group に掲げられている株の中 *A. zonatus* と *A. clavatoflavus* の2株は上記培地にはなはだしく生育困難²³⁾であって筆者の用いたすべての菌が良く生育するのと極めて対照的であり、これらの培地上の生育の可否は他のいろいろな *Aspergillus* 属のカビの区別に役立つこと、などの事実が明らかになった。

多変量解析

コウジ菌は形態生理を少しずつ連続的に変化する無数の菌株の大集団であり、同時に1つの菌株でもその培養条件を変えることによって形態生理ともに容易に他の菌株のように変化する性質をもっている。それゆえどんなに多数の性質を測定してもそれが安定でなければ分類上の key character とはなし得ないし、安定な性質であってもそれがこの大集団の中で全体としてどのような意味 (位置) をもっているかが明らかでなければ key とはなし難い。換言すればここに2つの株 (strain) があり、これらを画然と区別する性質が見出されたとしてもこれがただちに第3の株から区別する性質として用い得るかは不明である。区別可能と分類可能ということは必ずしも同じではない。

従来の分類法はこれらの性質を各々研究者が識別できる限りの限度で適当に区切って key character として用いて行なわれて来たので、研究者によってそれぞれ違

った分類表が提供されている。コウジ菌は非常に多様なため1株1株を切り離してみれば1つ1つに違った分類名を与えなければならないほどであり、このような分類表も提供されたことがあるが、だからといってそれらが同一種 (species) であるのか種の中の異なる変種であるのかあるいは品種に相当するものなのかほとんど根拠がない。

コウジ菌の分類に対して個々の菌株の些少の性質の差に捕らわれることなく、全体の集団として見て分類を行なうべきであることを唱えたの坂口は⁵⁾である。しかし当時このような考えを具体的に推進する科学的方法のなかったことはいうまでもなくコンピュータの発達した今日ようやくこれが可能になったといえるであろう。コンピュータによる微生物の分類学的研究の発展は近年のことであるが、その多くはあらゆる2菌株の組合わせについて相互の類似性 (S-value) を計算して類似性行列 (similarity matrix) を作り、まず確実な標準株をおき、これと類似性の高いものから順序に並べて類似性% (phenon) によって、菌株相互間、それらと標準株間の近縁性を比較する方法である。しかしこの方法を用いるためには統計学上各々菌株について最少40~50の単位性質を必要とするし確実な標準株—筆者の場合 *A. flavus* Link の原株—を必要とするので、筆者の場合この方法の採用は困難である。

それゆえに筆者^{34,35)}は406の *Aspergillus* 属の株 (内コウジ菌 361 株、コウジ菌以外45株) を用い、主要な各々20の性質を各々3つの階程に分けて、5個の成分毎に (すなわち違った5個の方角から眺めて)、全菌株における各性質の方向量 vector を計算し、個々の菌株の方向量を計算して、5次元空間に plot しそれらの距離によって親近性を比較することとし、この方法を成分々析と呼ぶ。5成分の累積寄与率は53.8%に過ぎず、供試菌株の46.2%は互いに区別できないほどに相互に類似していることを示す。すなわち菌全体をその有力な key によっていくつかの菌集団 (集落 cluster) に分けても各 cluster は相互にかみ合い重なり合うものとなる。

5次元空間にばらまかれた諸菌株の相互位置を図上で比較するために、5個の成分のうちもっとも寄与率の高い成分1および2の固有ベクトルをそれぞれX、Y両軸上に plot して考察する。5個の成分を組合わせれば10個の平面図を得るが、これらの中で2個以上の平面図において一致するものが統計学的に有意である。諸性質の固有ベクトルの図面からこれらの菌株を分類する上に有意であるとしてつぎの諸性質が選ばれる。

分類上有意の性質 (重要さの順に)

- (1) 菌核を形成するか否か (コウジ菌ではほとんど形成するものがなくかつ不安定である)。
- (2) 梗子の配列が単列か復列か。
- (3) 胞子表面に小突起があるかないか。
- (4) 老培養菌草の色が緑味を保つか保たないか。
- (5) 胞子の直径が4~5 μ 以下か5~6 μ 以上か (とくに復列梗子株における分類に重要)。
- (6) 胞子がアニスアルデヒド培地でピンクに変色するか否か (とくに小突起胞子株における分類に重要)。
- (7) その他、集落裏面にヒダ (wrinkles) があるか否か、コウジ酸を生産するか否かなどであるが、これらの性質はやや不安定である。

各菌株の平面分布図

Fig. 9 は成分1 (寄与率19.5%) をX軸に、成分2 (寄与率10.6%) をY軸に plot した406株について、上の分類上有意な性質を示す株別に線で囲んだものである。点線の囲いは硝酸塩難質性株やアニス酸培地で胞子がピンクに変色しない株などの分布図で、これらの生理的性質が分類の key となし得ないことがわかる。同様にコウジ酸の生産性などで囲んでもこれがさらに老培養菌草の色の違いにより2つの囲いに分れるので key としての意味をなさず、分類の key character としては生理よりも形態の方が重要であることが明らかである。Thom No. 113 (*A. oryzae*) と Thom No. 108 (*A. flavus*) は至近距離にあって区別できない。

本図により供試菌株はF群 (復列梗子、胞子5~6 μ 以上)、BB群 (小突起胞子株)、E群 (単列梗子、緑色株) およびEE群 (単列梗子、茶かっ~白色株) の諸集落を含む大集落と、これとほとんど独立するFF群 (復列梗子、胞子4~5 μ 以下) の集落より成ることが明白である。このFF群は成分1をX軸に、成分3 (寄与率10.4%) をY軸に plot した図においては一層独立し、明らかに他の集落群と種名 (species name) を異にする株の一群であって *A. flavus* Link (あるいはその variety も含む) より成っている。それでこの中心に位する菌株 RIB 1406 を *A. flavus* Link の標準株に設定し、Miss Fennell D. I. に提供したところ *A. flavus* NRRL 1957 とほとんど同株であり完全に *A. flavus* Link を代表する株であるとの返答を得た。この群のすべてがアフラトキシンを生産するものではないが、胞子に小突起のない生産菌は悉くこの群に入る。

BB群は小突起胞子株であるが、コウジ菌において小突起胞子とアニスアルデヒド培地でピンクに変色しないという2つの性質はどの図面でも高度に関連するので、もしこのような胞子でピンクに変色する株があるとすれば当然コウジ菌には入らない。

FF群、BB群以外の諸集落群はすべて *A. oryzae* より成るが、これらはコウジ菌にとってもっとも基本的であり、他の諸性質との相関高く、かつもっとも見分けやすい性質すなわち老培養菌草の色によって2つの変種に分ける。いずれにしてもコウジ菌をまとめる名称として *A. flavus-oryzae* group も *A. flavus* group もともに不合理なことはすでに明らかであって、コウジ菌は *As-*

Fig. 9. 全菌株の分布図 (Case I)

- E: 老培養菌草は緑色味あり F: 梗子は復列, 胞子は $5\sim 6\mu$ 以上
 EE: " " なし FF: " 胞子は $4\sim 5\mu$ 以下 (・印はアフラトキシン生産菌)
 BB: 胞子に小突起あり
- ① *A. oryzae* の代表的株の集落 (430, 1031; *A. oryzae* Ahlburg Cohn).
 ② アニス酸培地で胞子がピンク変色しない株の集落 ⊕ 硝酸塩難酸化性株の集落
 1046, *A. sojae* Sakaguchi et Yamada. 128, *A. oryzae* var. *viride*, var. nov. 1172, *A. oryzae* var. *brunneus*, var. nov. 1033, *A. zonatus*. 1034, *A. clavato-flavus*. 1035, *A. subolivaceus*. 1036, *A. avenaceus*. 1406, *A. flavus* Link. 1032, WB 482 (Thom No. 108)

pergillus oryzae group としてまとめられるべきである。

コウジ菌 *Aspergillus oryzae* group の分類表^{36,37)}

- A. 胞子はすべて表面に小突起あり, アニスアルデヒド培地上にピンクに変色せず; 梗子は単列; 胞子柄壁はしばしば平滑
 A. sojae Sakaguchi et Yamada
- AA. 胞子は表面にほとんど小突起がない
 B. 胞子の表面はかっ色色素ありコブ状 (凹凸) を呈する *A. tamarii* Kita
 (以上 *A. sojae* series)
- BB. 胞子の表面はコブ状 (凹凸) を呈しない
 C. 復列梗子を含む胞子頭がない (単列梗子株)
 D. ツァベック寒天斜面培養の菌草は古くなっても緑色味を保つ

- *A. oryzae* var. *viride* Murakami
 DD. ツァベック寒天斜面培養の菌草は古くなるとまったく茶かっ色となり, しばしば白色のこともある
 A. oryzae var. *brunneus* Murakami
 CC. 復列梗子を含む胞子頭がある (復列梗子株); 胞子は大きく直径 $5\sim 6\mu$ 以上
 A. oryzae (Ahlburg) Cohn
 (以上 *A. oryzae* series)

野生カビ

コウジ菌の集落 cluster に入らない諸株の分類は種々の方法が考えられるが, Raper, Fennell の *A. flavus* group の菌株に限定するとつぎようになる。

野生カビ *A. flavus* group^{35,36)}

- A. 胞子はすべて表面に小突起あり
 B. 復列梗子を含む胞子頭がない (単列梗子株); 胞

子はアニスアルデヒド培地上ピンクに変色する
..... *A. parasiticus* Speare

BB. 復列梗子を含む胞子頭がある (復列梗子株)

..... *A. toxicarius* Murakami

AA. 胞子は表面に小突起なく、小さく直径は 4~5 μ
以下; 復列梗子を含む胞子頭がある (復列梗子株)

..... *A. flavus* Link

A. toxicarius sp. nov. は筆者がかつて *A. parasiticus* Speare var. *globosus* var. nov. と命名したものであるが、復列梗子をもち、アニスアルデヒド培地で胞子がピンクに変色しない点で *A. parasiticus* とは異なる新種であることを見出したので訂正する。いずれも多量のアフラトキシンを生産し、ATCC 15517, CMI 89717, NRRL 2999, NRRL 3145, NRRL A-11613, NRRL A-12353 などがこれに属する。

A. flavus Link にはアフラトキシンを生産するものとしなないものとがある。 *A. zonatus*, *A. subolivaceus*, *A. avenaceus* (いずれも非生産) などは今後その分類学的位置についてなお検討すべき余地があるとしても、筆者の分類によれば *A. flavus* group に属することになる。

A. parasiticus Speare は1923年以前にカリフォルニア州において大島³⁹⁾が分離したもので、多量のアフラトキシンを生産する。WB (=NRRL) 465, IFO 4082 および IFO 4301 などがこれに属する。

アフラトキシン生産菌の特性について Hesseltine らは糖類の資化性から検討し³⁹⁾、また4種のアフラトキシンの各々の生産性と分類学的性質の関係⁴⁰⁾について報告しているが、未だ体系化していない。しかしアフラトキシン全体として見れば氏等のすべての菌株は筆者の *A. flavus* group に属するものである。

文 献

- Korschelt, O.: Dingler's Politechnisches Journal **230**, 76 (1876).
- Ahlburg, H., 松原新之助: 東京医事新誌, **24**, 12 (1878).
- Atkinson, R. W.: "The Chemistry of Sake Brewing" (1881) Tokyo Daigaku.
- 高橋偵造: J. Coll. Agr., Tokyo Imp. Univ. **1**, 137 (1909).
- 坂口謹一郎: 醸造論文集 **3**, 247 (1933).
- 大谷義夫: 醸造学雑誌 **15**, 535, 702, 812 (1937); **16**, 43, 123 (1938).
- Cohn, F.: Jahresb. Scheles. Ges. Vaterländ. Cultur (1883), **61**, 226, Breslau (1884).
- Wehmer, C.: Zentralbl. Bakt. II, **1**, 150, 209 (1895).
- Thom, C., Church, M. B.: Am. J. Bot. **8**, 103 (1921).
- Raper, K. B., Fennell, D. I.: "The Genus Aspergillus", p. 357-404 (1965), Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Thom, C., Church, M. B.: "The Aspergilli" p. 198-207 (1926), Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 坂口謹一郎, 山田浩一: 日農化誌, **20**, 65, 141 (1944).
- Thom, C., Raper, K. B.: "Manual of the Aspergilli", p. 259-272 (1945), Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 小原 巖: 日農化誌, **26**, 547 (1952).
- 根平武雄: 醸工, **35**, 50 (1957).
- Blochwitz, A.: Ann. Mycol. **27**, 4 (1929).
- 斎藤賢道: 醸協誌, **38**, 412 (1943).
- 那須野精一: 昭和46年度日本醸酵工学大会講演要旨 p. 131 (1971).
- 村上英也, 荻野有人, 牧野正則, 大脇京子: 醸試報, **139**, 6 (1967).
- 井口信義: 日農化誌, **29**, 67 (1955).
- 村上英也, 高瀬澄夫, 野田幸夫, 石井 徹: 醸試報, **138**, 17 (1966).
- 村上英也, 大場俊輝, 原 昌道, 志水伸一, 牧野正則, 高野文夫, 備前次雄, 原田政隆: 醸試報, **143**, 1 (1971).
- 村上英也, 原 昌道, 高橋利郎, 劉 玉 清, 大場俊輝, 水頭幸太郎, 高野文雄: 醸試報, **142**, 1 (1970).
- Sakaguchi, K., Suzuki, Y., Iizuka, H.: J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), **1**, 164 (1955).
- 村上英也, 大脇京子, 鈴木 与, 長縄真琴: 醸協誌, **59**, 1087 (1964).
- Tadenuma, M., Sato, S.: Agr. Biol. Chem. (Tokyo), **31**, 1482 (1967).
- 村上英也, 牧野正則, 佐藤仁一郎, 藤井正道, 高瀬澄夫: 醸試報, **139**, 1 (1967).
- Murakami, H., Takase, S., Ishii, T.: J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), **13**, 323 (1967).
- Murakami, H., Takase, S., Kuwabara, K.: *ibid.* **14**, 97 (1968).
- 村上英也, 河合美登利: 醸協誌, **51**, 549 (1956).
- 黒沢雄一郎: 日農化誌, **32**, 419 (1957).
- 原 昌道, 村上英也, 大場俊輝: 醸工, **49**, 330, 428 (1971).
- 村上英也: 醸試報, **142**, 15 (1970).
- 村上英也: 同上, **142**, 32 (1970).
- 村上英也: 同上, **143**, 16 (1971).
- Murakami, H.: J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), **17**, 281 (1971).

-
- 37) 村上英也: 醸試報. **143**, 5 (1971).
- 38) Oshima, K., Church, M. B.: *Ind. Eng. Chem.* **15**, 67 (1923).
- 39) Hesseltine, C. W., Sorenson, W. G., Smith, M.: *Mycologia* **LXII**, 123 (1970).
- 40) Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith, M., Ellis, J. J., Vadekraft, E., Shannon, G.: "Production of Various Aflatoxins by Strains of the *Aspergillus flavus* series", First U. S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms.