

分類学的性質の記載要領

明細書に記載する微生物が新種である場合(菌株として表示した場合を含む)は、その分類学的性質を詳細に記載し、必要であれば、顕微鏡写真又は電子顕微鏡写真を添付して、それを新種として認めた理由を明確にすること、すなわち、在来の類似種との異同を明記し、その判定の根拠となった関連文献名を書き添えることが必要である。なお、新種の命名は該当する国際命名規約に従うことが望ましい。

以下、微生物を便宜上、酵母、カビ又はキノコ、細菌、放線菌に大別し、おのおのについて必要な記載事項を示した。これらの記載に当たって、菌株の良好な生育状態において実験観察を行い、培地の種類(又は培地の組成)、培養温度、培養時間などの条件を明記する。さらに、分離源については、菌株を分離した年月、分離源(動植物体の場合、可能な限りその学名をつける)とその採取地を記載することが望ましい。

なお、本記載要領に列挙された記載事項は、微生物を特定するための目安であって、どの事項を記載すれば微生物が十分に特定できるかは、出願に係る微生物ごとに判断されるべきものである。

1. 新種が酵母に属するものである場合には、下記の事項について記載する。

(a) 培養的・形態的性質

麦芽汁又は YM 液体培地

麦芽汁寒天培地又は YM 寒天培地

ポテト又はコーンミール寒天培地によるスライド培養法又はダルモー平板培養法

これらの培地上に生育させたときの、栄養細胞の大きさ、形状、増殖の形式(出芽・分裂の区別、菌糸・偽菌糸の有無)、寒天培地では生育の様相、色、光沢、拡散性色素などを、液体培地では表面発育の有無、培地の混濁状態などを記載する。その他、特にその菌の特徴を顕著に現す培地を用いたときの上記各性質について、なるべく詳しく記載する。

(b) 胞子の形成

有性胞子

(1) ゴロドコワ培地、石膏・酢酸ソーダ培地、麦芽エキス寒天培地、野菜汁寒天培地、ニンジン片などの培地を用いて、子嚢胞子形成の有無を検討し、子嚢胞子の形成を認めた場合は子嚢及び子嚢胞子の形状を記載する。

(2) 麦芽エキス寒天培地、野菜汁寒天培地、コーンミール寒天培地、ポテト・イースト浸出液・グルコース寒天培地などの培地を用いて、二核菌糸、担子器(テリオスポア、前菌糸)及び担子胞子の形成を認めた場合はその形状を記載する。

射出胞子

麦芽汁寒天培地、ポテト寒天培地、コーンミール寒天培地などを用いて、射出胞子の有無を検討し、もし形成がある場合は、その形状を記載する。

(c) 生理学的・化学分類学的性質

最適生育条件(pH、温度)

生育の範囲(pH、温度)

硝酸塩の資化

脂肪の分解

尿素の分解

ジアゾニウムブルー B の呈色反応

ゼラチンの液化

好浸透圧性又は耐浸透圧性がある場合は、シュクロース又は塩化ナトリウムの最適又は最高濃度

カロチノイドの生成

顕著な有機酸の生成

デンプン様物質の生成

ビタミンの要求性

次の各炭素源のうち 15 以上の化合物に対する資化性の有無(少なくとも * 印のついた糖類については、資化性と発酵性の有無を併記することが必要である。)

- (1) D-アラビノース
- (2) L-アラビノース
- (3) D-リボース
- (4) D-キシロース
- (5) * D-グルコース
- (6) D-マンノース
- (7) * D-ガラクトース
- (8) L-ラムノース
- (9) D-フラクトース
- (10) L-ソルボース
- (11) * マルトース
- (12) * シュークロース
- (13) * ラクトース
- (14) * メリビオース
- (15) セロビオース
- (16) トレハロース
- (17) * ラフィノース
- (18) メレジトース
- (19) -メチル-D-グルコシド
- (20) D-グルコサミン
- (21) N-アセチルグルコサミン
- (22) アルブチン又はエスクリン
- (23) デキストリン
- (24) 可溶性デンプン
- (25) イヌリン
- (26) メタノール
- (27) エタノール
- (28) アドニトール
- (29) エリスリトール
- (30) * イノシトール
- (31) D-マンニトール
- (32) D-ソルビトール
- (33) ズルシトール
- (34) D-グルコン酸塩
- (35) グリセリン
- (36) DL-乳酸塩
- (37) コハク酸塩
- (38) クエン酸塩
- (39) ヘキサデカン
- (40) その他、新種の特徴を示すに必要な炭素化合物

DNA の塩基組成 (GC 含量) 及びユビキノン (コエンザイム Q) の型については、記載することが望ましい。

その他、新種の特徴付けのために必要な生理学的・化学分類学的性質があれば記載する。

例えば、次のようなものがある。

- (1) 細胞壁の糖組成(キシロース、ラムノース、フコース、ガラクトースの有無)
- (2) 近縁菌種との DNA-DNA 相同性

(d) 以上の性質のほかに、当該微生物を特徴付ける性質があればこれを記載する。

2. 新種がカビ又はキノコに属するものである場合には、下記の事項について記載する。

(a) 培養的・形態的性質

- 麦芽汁(又は麦芽エキス)寒天培地
- ポテト・グルコース寒天培地
- ツアベック寒天培地
- サブロー寒天培地
- オートミール寒天培地
- 合成ムコール寒天培地
- YpSs 寒天培地
- グルコース・ドライイースト寒天培地(菌根形成菌用)
- コーンミール寒天培地

これらのうち、2 種類以上の培地を選び、各培地上の生育状態についてテレオモルフ(有性時代)及びアナモルフ(無性時代)の形態学的性質、コロニーの表面の形状・色調、コロニーの裏面の色調などを記載する。その他、特にその菌株の特徴を顕著に現す培地を用いたときの上記各性質について、なるべく詳しく記載する。

(b) 生理学的・化学分類学的性質

- 最適生育条件(pH、温度など)
 - 生育の範囲(pH、温度など)
 - フェノールオキシダーゼ反応(木材腐朽菌のみ)
 - その他、新種の特徴付けのために必要な生理学的・化学分類学的性質があれば記載する。
- 例えば、次のようなものがある。

- (1) DNA の塩基組成(GC 含量)
- (2) 酵素及び蛋白質の電気泳動パターン
- (3) 近縁菌種との DNA-DNA 相同性
- (4) ユビキノン(コエンザイムQ)の型

(c) 新種と決定するに当たって上記特徴のみでは不十分な場合、乾燥標本に基づき、テレオモルフ又はアナモルフの形態的性質、基質上での形状、色調などの諸性質について記載する。

[注] なお、基準標本の保管場所とその標本番号を記載することが望ましい。

(d) 以上の性質のほかに、当該微生物を特徴付ける性質があればこれを記載する。

3. 新種が細菌に属するものである場合には、下記の事項について記載する。

(a) 形態的性質

寒天培地及び液体培地に生育した細胞について、次の点を記載する。培地組成は肉汁及び肉汁寒天を基準とするが、これに生育しないものについては適当な別の培地を用いてもよい。

- 細胞の形及び大きさ
- 細胞の多形性の有無、もし多形性がある場合はその詳細
- 運動性の有無、運動性がある場合は鞭毛の着生状態
- 胞子の有無、胞子がある場合は胞子、胞子嚢の形、大きさ及び胞子の部位

(b) 培養的性質

肉汁寒天平板培養
肉汁液体培養
肉汁ゼラチン穿刺培養
リトマス・ミルク

寒天培地では生育の様相、色、光沢、拡散性色素などを、液体培地では表面発育の有無、培地の混濁状態などを、ゼラチン穿刺培養では生育の状態、ゼラチン液化などを、リトマス・ミルクではその反応(アルカリ性が酸性か)、凝固、液化などについて記載する。

なお、上記の培地に生育しないものについては他の生育に適切な培地における生育状態を記載する。

(c) 生理学的性質

グラム染色性
硝酸塩の還元
脱窒反応
MR テスト
VP テスト
インドールの生成
硫化水素の生成
デンプンの加水分解
クエン酸の利用(Koser(又は Simmons)の培地と Christensen の培地を併用すること)
無機窒素源(硝酸塩及びアンモニウム塩)の利用
色素の生成(水溶性かどうかを明記する)
ウレアーゼ
オキシダーゼ
カタラーゼ
生育の範囲(pH、温度など)
酸素に対する態度(好気性、嫌気性の区別など)
O-Fテスト(Hugh Leifson 法による)
下記の糖類から酸及びガスの生成の有無を記載する。

- (1) L-アラビノース
- (2) D-キシロース
- (3) D-グルコース
- (4) D-マンノース
- (5) D-フラクトース
- (6) D-ガラクトース
- (7) マルトース
- (8) シュークロース
- (9) ラクトース
- (10) トレハロース
- (11) D-ソルビトール
- (12) D-マンニトール
- (13) イノシトール
- (14) グリセリン
- (15) デンプン

なお、新種の特徴を示すのに、その他の糖類からの酸及びガスの生成の有無を記載する必要がある場合は、それらについても記載する。

(d) 次の諸性質のうち、新種の特徴を示すに必要なものについては、それを選択して記載する。

糖類の分解生成物
グルコン酸の酸化
アルコールの酸化
ジオキシアセトンの生成
エスクリンの分解
セルロースの分解
馬尿酸の分解
マロン酸の利用
アルギニンの分解 リジンの脱炭酸反応
オルニチンの脱炭酸反応
フェニルアラニンの脱アミノ反応
コアグララーゼ
容 血 性
温度感受性
塩化ナトリウムの耐性
シアン化カリウムの耐性
フォスファターゼ
ペクチナーゼ
リパーゼ
21 レンチナーゼ
22 栄養素要求性
23 抗 酸 性
24 その他、必要と認められる性質

(e) 化学分類学的性質

DNA の塩基組成 (GC 含量) については、記載することが望ましい。

その他、新種の特徴付けのために必要な化学分類学的性質があれば記載する。

例えば、次のようなものがある。

- (1) 細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成
- (2) 細胞壁の加水分解物中の還元糖の種類
- (3) 菌体脂質 (イソプレノイド・キノン、リン脂質、ミコール酸を含む脂肪酸など) の種類
- (4) 近縁菌種との DNA-DNA 相同性

(f) 絶対嫌気性菌、無機栄養細菌、光合成細菌などの記載も、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 又は最近の研究を参考にし、上記に準じて記載する。

(g) 以上の性質のほかに、当該微生物を特徴付ける性質があればこれを記載する。

4. 新種が放線菌に属するものである場合には、下記の事項について記載する。原則として、下記の各項において記載した培地を使用するが、特徴的な性質を示す培地があれば適宜追加して使用する。なお、以下 International Streptomyces Project を ISP と略す。

(a) 形態的性質

イースト・麦芽寒天培地 (ISP 培地 No.2)、オートミール寒天培地 (ISP 培地 No.3)、スターチ・無機塩寒天培地 (ISP 培地 No.4) 又はグリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP 培地 No.5) で生育させたときの観察結果に基づき、当該放線菌が分類上の該当する属、あるいは種であることを特徴付ける菌糸、孢子等の形態的性質を記載する。

例えば、次のようなものがある。

菌糸

気菌糸形成の有無、気菌糸又は基生菌糸の分断の有無及び分断菌糸の運動性

孢子

- (1) 孢子又は孢子嚢形成の有無及びその着生位置(気菌糸上又は基生菌糸上の区別)
- (2) 孢子柄上で連鎖する孢子の数及び多数の孢子が連鎖する場合の形状(直状、曲状、環状、螺旋状、車軸状など)
- (3) 孢子嚢が存在する場合、その形及び大きさ、並びに孢子嚢1個当たりの孢子嚢孢子の数
- (4) 孢子(孢子嚢孢子を含む)の特徴(表面構造、大きさ、運動性、鞭毛の存在など)

その他

厚膜孢子、集束菌糸、菌糸束、疑似孢子嚢又は菌核の形成、菌糸の分裂様式など

(b) 培養的性質

イースト・麦芽寒天培地(ISP 培地 No.2)、オートミール寒天培地(ISP 培地 No.3)、スターチ・無機塩寒天培地(ISP 培地 No.4)及びグリセリン・アスパラギン寒天培地(ISP 培地 No.5)上での生育状態、気菌糸の着生状態とその色調、基生菌糸の色調、培地中への拡散性色素の生成などを記載する。

(c) 生理学的性質

生育温度範囲

メラニン様色素の生成

ペプトン・イースト・鉄寒天培地(ISP 培地 No.6)及びチロシン寒天培地(ISP 培地 No.7)で観察する。

炭素源の利用性

少なくとも、次の炭素源の利用性を記載する。

- (1) L-アラビノース
- (2) D-フラクトース
- (3) D-グルコース
- (4) イノシトール
- (5) D-マンニトール
- (6) ラフィノース
- (7) L-ラムノース
- (8) シュークロース
- (9) D-キシロース

なお、基礎培地には原則としてブリドハム・ゴトリーブ寒天培地(ISP 培地 No.9)を使用し、変更した場合はその培地を明記する。

(d) 化学分類学的性質

菌体にジアミノピメリン酸が存在する場合は、その光学異性体(LL型とmeso型)について記載することが望ましい。

その他、新種の特徴付けのために必要な化学分類学的性質があれば記載する。例えば、次のようなものがある。

- (1) 細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成
- (2) 全菌体あるいは細胞壁の加水分解物中の還元糖の種類
- (3) 菌体脂質(イソプレノイド・キノン、リン脂質、ミコール酸を含む脂肪酸など)の種類
- (4) 近縁菌種とのDNA-DNA相同性
- (5) DNAの塩基組成(GC含量)

(e) 以上の性質のほかに、当該微生物を特徴付ける性質があればこれを記載する。

なお、上記酵母、カビ、キノコ、細菌、放線菌の同定に使用する培地の組成は例示すれば下記のとおりである。各培地は市販品を使用することも可能であるが、その場合には製造会社名及び商品名を明記する。

1. 酵母

(1) YM 培地

ペプトン		5g
イーストエキス		3
	g	
麦芽エキス		3
	g	
D-グルコース		10g
脱イオン水		1000ml

(2) ポテト・グルコース寒天培地

ポテト 100g をすりつぶし、300ml の水に浸漬して冷暗所に数時間放置、布ごしにして 120℃ で 1 時間蒸煮する。冷却後 1l にし、D-グルコース 20g、寒天 20g を加える。

(3) ゴロドコワ寒天培地

ペプトン			%
1			
ブイヨン			%
1			
D-グルコース		0.25%	
NaCl		0.5%	
寒天		2.5%	
(4) 酢酸ソーダ培地			
CH ₃ COONa		0.4%	
寒天			
1	5		%
(ラフィノース		0.04%	

(5) 麦芽エキス寒天培地

粉末麦芽エキス		20g
寒天		12g
脱イオン水		400ml

(6) 野菜汁寒天培地

野菜汁		500ml
パン酵母		10g
寒天		20g
脱イオン水		500ml
pH 7.0		

(7) 石膏培地

焼石膏に等量の水を加えて攪拌、糊状として適当な枠（銅製の円錐台形、あらかじめ内側にワセリンを薄く塗抹しておく）に流し込む。直ちに机上で軽くたたき石膏内部のガスを追い出す。約 30 分間静置し石膏の固化を待ち、枠から取り出し上面を平滑に削ると同時に被検酵母菌体を入れる小穴をつくる。更に十分固化させた後ワセリンを拭き取り、約 30 分間、1～2 回水を替えながら煮沸し、直ちに殺菌ピンセットで取り出し、あらかじめ殺

菌した大型シャーレに入れる。殺菌水を石膏ブロックが半ば露出する程度に加える。被検酵母はあらかじめ 2~3 回、麦芽汁、麹汁、YM、Miller らの培地に前培養し、液体培養の上澄液を流出した残りの新鮮な菌体を白金耳かマイクロスポーンで石膏上の小穴に置き、20~25 で培養する。

(8) コーンミール寒天培地

コーンミール	12.5g
イオン水	300ml
(温浴上 60 で 1 時間保温後、濾過して浸出液を 300ml に復元)	
寒天	3.8g

(9) ポテト・イースト浸出液・グルコース寒天培地

ポテト(皮をむき角切り)	200g
生パン酵母	30g
脱イオン水	1000ml
(30 分煮沸して浸出液をつくる)	
グルコース	20g
寒天	15g

2. カビ又はキノコ

(1) 麦芽エキス寒天培地

麦芽エキス	20g
グルコース	20g
ペプトン	1g
寒天	25g
脱イオン水	1000ml

(2) ポテト・グルコース寒天培地

ポテト(皮をむき角切りとする)	200g
脱イオン水	1000ml
(以上のものを用いて浸出液を作る)	
グルコース	20g
寒天	15g

(3) ツァベック寒天培地

NaNO ₂	3g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
KCl	0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g
シュークロース	30g
寒天	15g
脱イオン水	1000ml

(4) サブロー寒天培地

マルトース又はグルコース	40g
ペプトン	10g
寒天	15g
脱イオン水	1000ml

- | | | | |
|---|-----|---|--------|
| (5) オートミール寒天培地 | | | |
| オートミール | | | 30 g |
| 脱イオン水 | | | 1000ml |
| (以上のものを用いて浸出液を作る) | | | |
| 寒天 | | | 2 0 g |
| (6) 合成ムコール寒天培地 | | | |
| グルコース | | | 40 g |
| アスパラギン | | | 2 g |
| KH ₂ PO ₄ | | | 0.5 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | | | 0.025g |
| サイアミン・クロライド | | | |
| 0 | | 5 | m |
| 寒天 | | | 15 g |
| 脱イオン水 | | | 1000ml |
| (7) YpSs 寒天培地 | | | |
| 可溶性デンプン | | | 15 |
| | | g | |
| イーストエキス | | | 4 g |
| K ₂ HPO ₄ | | | 1 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | | | 0.5 g |
| 寒天 | | | 20g |
| 脱イオン水 | | | 1000ml |
| (8) グルコース・ドライイースト寒天培地(菌根形成菌用) | | | |
| グルコース | | | 10 g |
| ドライイースト | | | 5 g |
| KH ₂ PO ₄ | | | 1 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | | | 0.5 g |
| 寒天 | | | 15 g |
| 脱イオン水 | | | 1000ml |
| pH(1N HCl で調整) | 5.0 | | |
| (9) フェノールオキシダーゼ反応検定用培地 | | | |
| おのおの 0.5%のタンニン酸及び没食子酸を麦芽汁寒天培地あるいはポテト・グルコース寒天培地に加える。 | | | |

3. 細菌

- | | | | |
|------------|--|---|--------|
| (1) 肉汁培地 | | | |
| 肉エキス | | | 10 |
| | | g | |
| ペプトン | | | 10g |
| NaCl | | | 5 g |
| 脱イオン水 | | | 1000ml |
| pH 7.2 | | | |
| (2) 肉汁寒天培地 | | | |
| 肉エキス | | | 10 g |
| ペプトン | | | 10g |
| NaCl | | | 5 g |

寒天	15 ~ 20g
脱イオン水	1000ml
pH 7.2	
(3) 肉汁ゼラチン培地	
肉エキス	10g
ペプトン	10g
NaCl	5 g
ゼラチン	100 ~ 300g
脱イオン水	1000ml
pH 7.2	

- (4) リトマス・ミルク
新鮮な脱脂乳又は脱脂粉乳を原乳の濃さにしたものに適当量のリトマス液を加える。

4. 放線菌

滅菌は特に記さない限り 121、20 分間、高圧滅菌を行う。

(1) イースト・麦芽寒天培地 (ISP 培地 No.2)	
イーストエキス	4g
麦芽エキス	10
	g
グルコース	4g
脱イオン水	1000ml
寒天	15 ~ 20g
pH 7.3	
(2) オートミール寒天培地 (ISP 培地 No.3)	
オートミール	20g
微量塩液	1ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
	g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
脱イオン水	100ml
寒天	18g
pH 7.2	

オートミールを脱イオン水 1000ml 中で 20 分間煮た後、チーズ濾布で濾過し、減量分を脱イオン水で補う。これに微量塩液を加えて pH を調整した後、寒天を加える。

(3) スターチ・無機塩寒天培地 (ISP 培地 No.4)	
液 I: 可溶性デンプン 10g を少量の冷脱イオン水でペースト状とし、さらに薄めて 500ml とする。	
液 II: K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
	g
NaCl	1
	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g

CaCO ₃		2
	g	
脱イオン水		500ml
微量塩液((2)と同じ)		1ml
液Ⅰ及び液Ⅱを混合し、寒天 15~20gを加える。		
(4) グリセリン・アスパラギン寒天培地(ISP 培地 No.5)		
グリセリン		10g
L-アスパラギン		1
	g	
K ₂ HPO ₄		1
	g	
脱イオン水		1000ml
微量塩液((2)と同じ)		1ml
寒天		15~20g
pH 7.0~7.4		
(5) ペプトン・イースト・鉄寒天培地(ISP 培地 No.6)		
1) ペプトン・鉄寒天		36.58g
ペプトン		15g
プロテオース・ペプトン		5
	g	
クエン酸鉄アンモニウム		0.5
	g	
K ₂ HPO ₄		1
	g	
Na ₂ S ₂ O ₃		0.08g
寒天		15g
2) イーストエキス		1
	g	
3) 脱イオン水		1000ml
1), 2), 3)を混和し、pH 7.0~7.2とする。		
(6) チロシン寒天培地(ISP 培地 No.7)		
グリセリン		15g
L-チロシン		0.5g
L-アスパラギン		1
	g	
K ₂ HPO ₄		0.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0	5g
NaCl		0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O		10mg
脱イオン水		1000ml
微量塩液((2)と同じ)		1ml
寒天		15~20g
pH 7.2~7.4		
(7) プリドハム・ゴトリーブ寒天培地(ISP 培地 No.9)		
(NH ₄) ₂ SO ₄		2.64g
KH ₂ PO ₄		2.38g
K ₂ HPO ₄		5.65g

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
脱イオン水	1000ml
ブリドハム・ゴトリーブ微量塩液	1ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.64g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.11g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.79g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15g
脱イオン水	100ml

全内容を溶かした後、pHを6.8～7.0に調整し(必要に応じて1N NaOHあるいは1N HClを使用する)、精製寒天15～20gを加える。その寒天培地を滅菌し、60℃に冷却後、別途滅菌した(濾過滅菌、エーテル滅菌、エチレンオキシド滅菌など)10%各種炭素源を1/10量の割合で加える。

なお、微量塩液は3～5℃に保存し、使用前に室温に戻す。また調製後1ヶ月を経過したものは新たに調製し、保存中に沈殿物を生じたものは使用しない。