

真菌の分類と同定

Classification and identification of fungi

やぐち たかし
矢口 貴志
Takashi YAGUCHI

要 旨

真菌の分類は、形態的には有性器官の形質で分類されている。そのため、有性器官の不明な菌群を分類学上、不完全なものとして位置付け、不完全菌類としている。現在では、分子系統を勘案して真菌は6つの門、ツボカビ門、接合菌門、子囊菌門、担子菌門、グロムス菌門、微孢子虫門に分類されている。不完全菌類は、系統的に門を形成するものとは認められていない。ここでは、われわれが通常目にする接合菌門、子囊菌門、担子菌門に属する真菌を中心に述べる。真菌、とくに糸状菌の同定は形態的観察に基づいている。形態の中でも有性孢子、分生子における形成様式、形態が分類・同定の決め手となることが多い。

一方、酵母においては、形態的には判別が不明瞭なため、さまざまな生理生化学的な性状によって同定される。また、生活環に有性型と無性型を持つ真菌の場合、有性型の学名を優先することが定められている。近年の分子生物学的な手法の発展により、真菌の分類・同定においてもさまざまな手法が用いられるようになった。しかし、従来の形態学的な知見は、分子生物学的な手法においても必要とされる。現状では、形態学的な知見をベースとして、分子生物学的な知見を取り入れ、より正確な真菌の分類・同定を目指すのが理想と考える。

I. はじめに

真菌（もしくは菌類）fungus (-gi) は糸状菌（一般にいうカビ）、酵母、キノコの総称である。真菌の

分類・同定は、基本的に形態学的な知見に基づいて行われている。すなわち巨大集落の観察では、集落の性状、有性孢子・無性孢子の有無など、顕微鏡による観察では、生殖器官の様式、有性孢子の性状、無性孢子の形成様式、無性孢子の性状などである。場合によっては、これらに生育温度、代謝産物などの生理学的性状、生態、交配能などの形質を加えて真菌の分類・同定は行われている。しかし、この方法では、孢子を形成しないなど分類・同定に必要な特徴的な性状を示さないため判定不能となるなど、いくつか問題点があげられている。そこで近年、新しい真菌の分類・同定法として特定の遺伝子の塩基配列を解読する分子生物学的手法が用いられている。ここでは、形態学に基づく真菌の分類・同定に必要な基本的な知識を中心に解説する。

II. 真菌の分類学的位置

真菌の細胞構造は、細菌と異なり膜に覆われた核を有する真核細胞で、動物、植物と同様である。古典的には、光合成をしない植物、下等植物と考えられていたが、分子系統的には植物より動物と近縁関係にあり、独立した系統を形成していると推定されている。

生物の中における真菌の位置付けはいくつの変遷があったが、Whittakerの生物5界説¹⁾に基づいて菌類界という生物群にまとめられている(図1)。原核生物はモネラ界 Monera ひとつからなり、真核生物は栄養摂取や構造的特徴を基に4界に分けられた。すなわち、単細胞の真核生物(原生動物と単細胞藻類)は原生生物界 Protista、多細胞の真核生物は栄養摂取を基に光合成を行う植物界 Plantae、吸

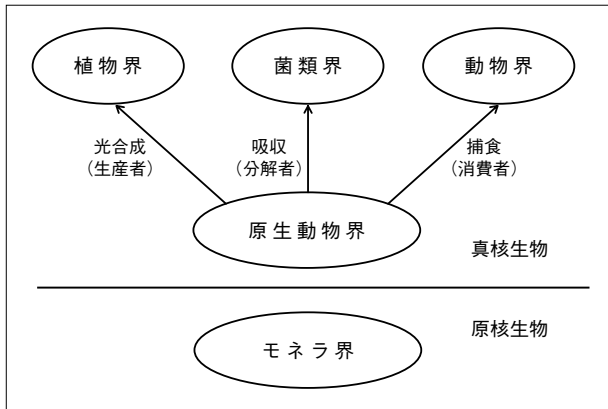


図1 Whittakerの生物5界説

収を行う菌類界 Fungi、消化を行う動物界 Animalia に分けられた。この5界説は長く一般に支持されているが、近年では分子系統、微細形態に基づいて8界説が提唱されている。

Ⅲ. 真菌の分類

真菌の分類においても、かつては菌類界を粘菌門と真菌門に大別し、真菌門を5つの亜門(鞭毛菌亜門 Mastigomycotina、接合菌亜門 Zygomycotina、子囊菌亜門 Ascomycotina、担子菌亜門 Basidiomycotina、不完全菌亜門 Deuteromycotina) に分類していた。真菌の分類は有性器官の形質で分類されている。そのため、有性器官の不明な菌群を分類学上、不完全なものとして位置付け、不完全菌類(亜門)とした。ただし、ケカビなどのように有性器官である接合胞子(後述)が見られない種であっても、類縁性の認められるものはその関連する亜門(この場合、接合菌亜門)に分類されている。8界説が提唱されたのち現在では、真菌門の4つの亜門が格上げされ、ツボカビ門 Chytridiomycota、接合菌門 Zygomycota、子囊菌門 Ascomycota、担子菌門 Basidiomycota となり、かつて菌類界に含まれていた卵菌類はストラミニピラ界 Straminipila に、粘菌類は原生動物界に移されている。不完全菌亜門は、系統的に門を形成するものとは認められず、Mitosporic fungi (まだ適当な訳語がない) もしくは Deuteromycetes (不完全菌類もしくはアナモルフ菌類) としてまとめられている^{2,3)}。

現在は多遺伝子の結合系統樹による進化の検討により、グロムス菌門 Glomeromycota、微胞子虫門

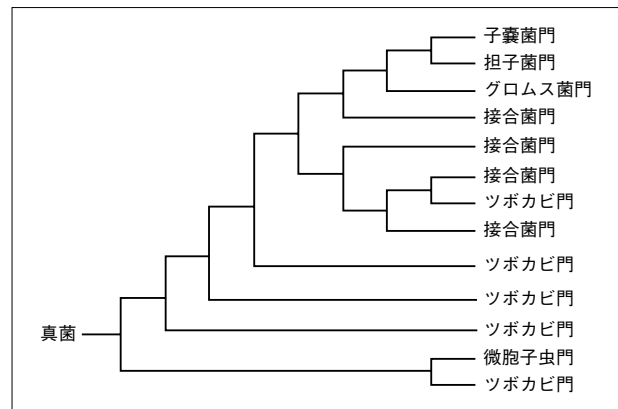


図2 真菌の系統関係 (James et al. (2006) の図を概略化)

Microsporidia を加えた6つの門に分類している^{4,5)}。微胞子虫門は典型的なミトコンドリアを欠いた細胞内寄生虫として、グロムス菌門はほとんどの陸上植物に共生する菌根菌としてまとめられている。このうち微胞子虫門、グロムス菌門、子囊菌門および担子菌門はそれぞれ単系統と認められ、ツボカビ門、接合菌門は多系統であることが示されている(図2)。ここではわれわれが通常、生活環境で目にする接合菌門、子囊菌門、担子菌門に属する真菌を中心に述べる。真菌は形態的には主として有性胞子の特徴により分類されている。

① ツボカビ門 Phylum Chytridiomycota

鞭毛を持った遊走子 zoospore が特徴となる。一般に、生活環境から分離されることは少ない。

② 接合菌門 Phylum Zygomycota

栄養体は菌糸で原則として隔壁を欠く。有性型(雌雄の細胞の結合により有性胞子を形成する生活環)においては接合胞子を、無性型(無性的に無性胞子を形成する生活環)においては胞子嚢胞子を形成する。*Absidia*、*Mucor*、*Rhizomucor*、*Rhizopus* などがあげられる。

③ 子囊菌門 Phylum Ascomycota

栄養体は隔壁を持つ菌糸(有隔菌糸)または単細胞である。有性型は袋状の子嚢が形成され、その内部に通常8個の子嚢胞子が形成される。無性型には種々の形の分生子を形成する。*Acremonium*、*Aspergillus*、*Penicillium*、*Tichoderma* の有性型および無性型などが本菌門に属する。

④ 担子菌門 Phylum Basidiomycota

かすがい連結を持つ菌糸が栄養体で、有性型は担子胞子を形成する。キノコと一部の酵母が本菌門に

属する。

⑤不完全菌類 Deutromycets

有性型がみいだされていない真菌群で繁殖は無性的に産生される分生子による。一般に、生活環境から分離される多くの真菌が本分類群に含まれている。

⑥有性型と無性型の学名

生活環に有性型と無性型を持つ真菌の場合、国際植物命名規約にしたがい、有性型の学名を優先することが定められている^{6,7)}。例えば、*Aspergillus*では *Emericella*、*Eurotium*、*Neosartorya* などの有性型があるが、*Aspergillus nidulans* として知られている真菌において、有性型は *Emericella nidulans* を用い、*A. nidulans* は有性型の確認できない無性型に限定して使用している。近年、特定の遺伝子の塩基配列に基づく真菌の分類・同定が行われるようになってきた。分子系統的な分類では、不完全菌類はいずれかの門に属することになる。有性型の形成の有無にかかわらず塩基配列は同一となるため、有性型の名称で分類・同定されることになる。例えば、分子系統的にはこれまで有性型の確認できず *A. nidulans* として同定された場合であっても *E. nidulans* と同定されることになる。

IV. 真菌の形態と生殖

真菌は細菌と比較して、細胞が大きく、細胞分化がはるかに高度である。細胞は真核細胞であり、明確な細胞壁を有する。単細胞と多細胞形態をとる。

①酵母 yeast

酵母の栄養細胞は、単細胞より構成され、球形、楕円形、卵円形、長円形、円筒形など比較的単純な形状で、大きさは通常、直径3～5 μ mである。増殖は、母細胞 mother cell の一部が突出し、細胞となり後に母細胞と同じ大きさに発育し、独立した細胞、娘細胞 daughter cell となる。ふつう1つの母細胞から複数の娘細胞を生じる。娘細胞は母細胞から遊離もしくは付着したまま母細胞となる。この増殖様式を出芽 budding と呼ぶ。一方、*Schizosaccharomyces* のように細菌と同様に、細胞の二分分裂 cell fission により増殖する菌種も見られる。

菌種によっては、培養条件により出芽した細胞が連結したまま伸長し、菌糸様の構造、仮性菌糸 pseudohypha となることがある。仮性菌糸は、真正

菌糸（仮性菌糸と対比して真正菌糸 true hypha と呼ぶ）と異なり、幅が一定でなく、長くは伸長せず、連鎖状になる。さらに、*Candida albicans* のように特定の培養条件では厚膜胞子を形成することもある（写真1）。

単純な出芽様式により増殖する単細胞で、仮性菌糸、真正菌糸をほとんど形成しない狭義の酵母を真正酵母と呼び、仮性菌糸、真正菌糸をよく形成する酵母を酵母様真菌 yeast-like fungi と呼ぶ。

多くの酵母は、子囊菌門に属しているが、*Cryptococcus* 属（写真2）のように担子菌門に属するものも知られている。また、同種の菌であっても生活史の中で酵母型と菌糸体型の双方の形をとることがある。そのため、分子系統的には酵母と糸状菌は入り混じっていることになる。

②糸状菌 filamentous fungi

糸状菌は菌糸 hypha と孢子 spore により増殖す

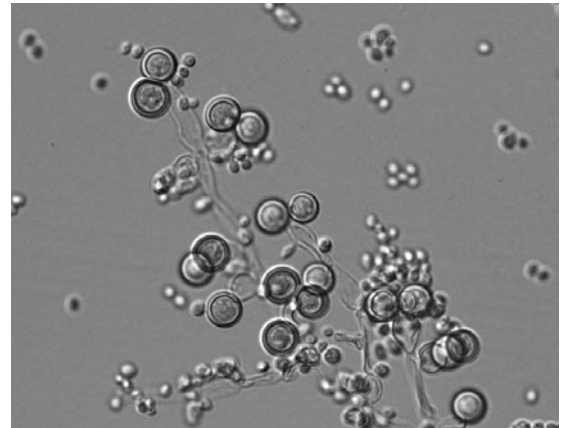


写真1 *Candida albicans* の厚膜胞子、仮性菌糸

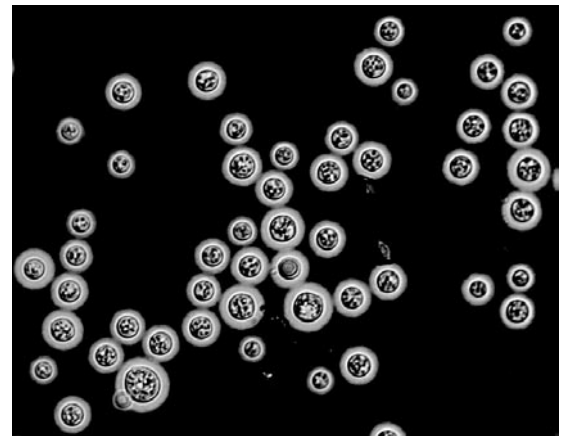


写真2 *Cryptococcus neoformans*（墨汁標本）、厚い莢膜を持つことで乾燥に強い

る。菌糸の幅は通常1～10 μm で、各菌種によりほぼ一定の幅を持って伸びる。菌群により、菌糸中に隔壁 septum を持つものと無隔壁の菌糸がある。前者の各隔壁の中心部には小孔があり、これを介して隣接する細胞間で原形質内物質の流動が行われる。後者は、隔壁で区切られないため菌糸全細胞を通じて原形質流動が見られ多核である。無隔壁菌糸を持つ真菌は、その例として接合菌類があげられ、下等真菌の菌糸形成法と考えられている。通常、菌糸は、無色透明もしくは淡黄色、淡茶色であるが、中には茶褐色～黒色になる菌群がある。多くの場合、菌糸、分生子の両方が黒色を呈し、有性型の知られていない菌群を黒色真菌と呼んでいる。

菌糸は先端部から、枝分かれしながら成長し、網状、樹皮状ないし束状の集合体（菌糸体 mycelium）を形成する。菌糸体は機能面から栄養菌糸 vegetative hypha と生殖菌糸 reproductive hypha に分けられ、前者は培地または寄生組織上やその内部に発育して栄養分を吸収し、後者は多くの場合空気中に発育し胞子を産生する（気中菌糸 aerial hypha）。

③胞子

真菌の増殖の主体となるのは胞子である。胞子には、2種類の細胞の融合と、それに続く核融合の後、減数分裂を経て産生される有性胞子 sexual spore と減数分裂を経ないで産生される無性胞子 asexual spore とがある。両胞子ともさまざまな形成様式をとり、結果としてもたらされる胞子の形態は、真菌分類の基準になっている。

真菌の性にはヘテロタリック（雌雄異性体）heterothallic とホモタリック（雌雄同体性）homothallic がある。ヘテロタリックといっても、交配型の異なる2菌株間に形態的な差があるわけではなく、その交配型はA株とa株もしくは+株と-株として区別し、その間で有性胞子が形成される。ホモタリックの場合、1菌株内で自家交配を行う。

④有性胞子

有性増殖の結果有性胞子が形成される真菌は、有性型 teleomorph と呼ばれる生活環を持つ。以下、有性胞子について概説する。

A. 卵胞子 oospore

ツボカビ門では、有性生殖によって卵胞子を形成する。造精器から精子が遊泳して造卵器内の卵球と受精が行われ、卵胞子が形成される。

B. 接合胞子 zygospor

接合菌門にみられる。近接した菌糸から同形同大あるいは大きさと形態が多少異なった菌糸状の接合枝が伸びて先端が接着し、接着部がふくらみ、核が融合することにより接合胞子が形成される。接合胞子は菌種により特徴があり、*Mucor*、*Rhizopus* などでは、褐色～黒色で棘状あるいは疣状突起を持った厚い細胞壁を有する接合胞子を形成する（写真3）。

C. 子嚢胞子 ascospore

子嚢菌門の有性胞子である。有性生殖によって子嚢 ascus と呼ばれる袋状構造ができ、その中で子嚢胞子が形成される（写真4）。通常、子嚢を取り囲む子嚢果 ascocarp と呼ばれる保護器官が形成される。子嚢果には、不整子嚢菌類にみられる球形の閉子嚢殻 cleistothecium（写真5）、核菌類の垂球形あるいはフラスコ形で開口した子嚢殻 perithecium（写真6）などがある。子嚢胞子（写真7, 8）は大きさ、形、色、表面構造に各菌種の特徴が現れ、分類の基準となる。

D. 担子胞子 basidiospore

担子菌門（キノコと一部の酵母）にみられる。特別の生殖器官を形成せず、単核の菌糸が融合して相対する交配型の2核を有する二次菌糸となる。二次菌糸内の2核はそれぞれ核分裂し4核となり、あとに続く細胞分裂によって1核を含む細胞と3核を含む細胞となる。この両細胞間では、かすがい連結 clamp（写真9）を形成して1核を移動させ、2核ずつを有する細胞となる。最終的に、菌糸先端の2核は融合し、同時に菌糸は肥大して担子器 basidium となる。その内部では減数分裂により4個の単核に

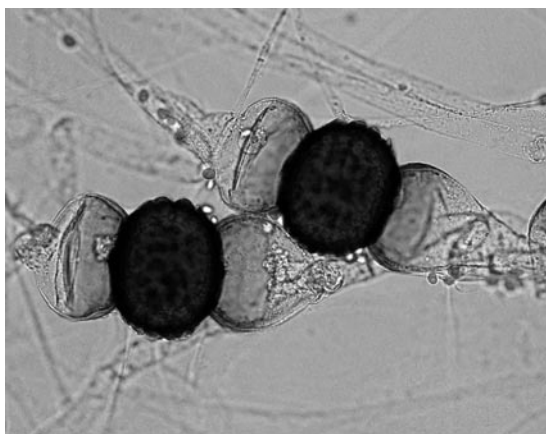


写真3 接合胞子 (*Rhizopus oryzae*)

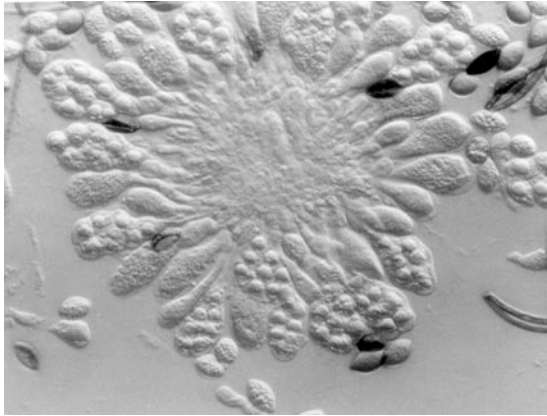


写真4 子囊 (*Chaetomium* sp.)

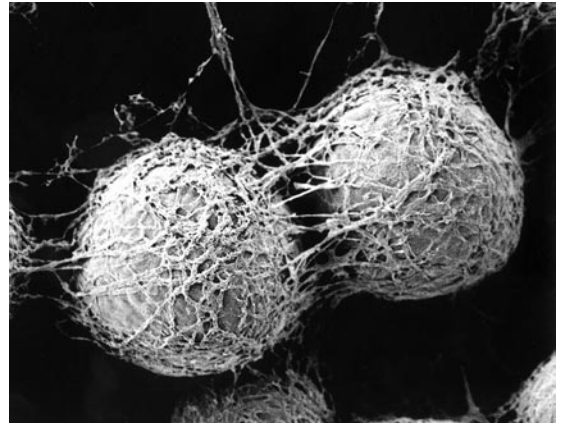


写真5 不整子囊菌類の閉子囊殻 (*Eupenicillium* sp.)

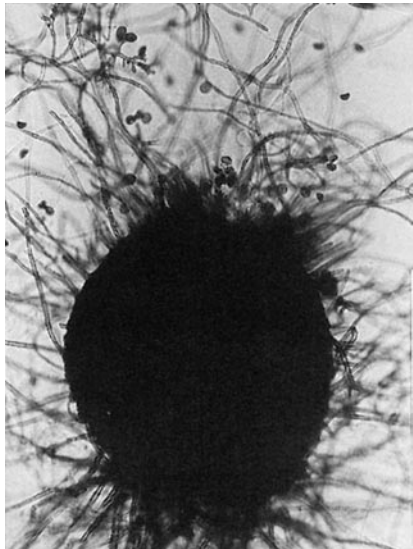


写真6 核菌類の子囊殻 (*Chaetomium* sp.)

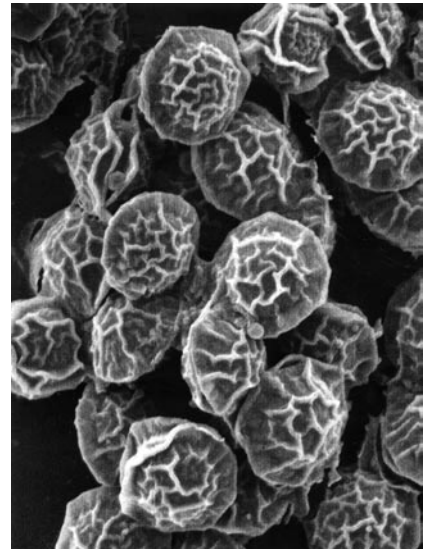


写真7 子囊胞子 (*Neosartorya fischeri*)

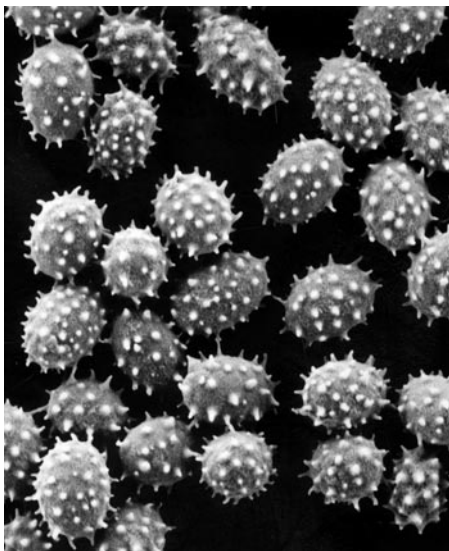


写真8 子囊胞子 (*Talaromyces flavus*)



写真9 かすかい連結

なり担子胞子となる(写真10)。担子胞子形成の際、子実体(キノコに相当)を形成する菌群と、しない菌群がある。

⑤無性胞子

有性生殖を行わず、菌糸および無性胞子のみで増殖する生活環を無性型 anamorph と呼ぶ。その無性胞子の形成様式は多様であり、形成される胞子の形状、大きさ、色、胞子形成細胞の形状などが菌種の同定の基準となる⁸⁾。以下、各種無性胞子について概説する。

A. 遊走子 zoospore

ツボカビに特徴的にみられる無性胞子で、鞭毛をもって水中を泳ぐことができる。宿主の植物や魚の組織内に形成され遊走子嚢 zoosporangium の内部で産生される。

B. 胞子嚢胞子 sporangiospore

接合菌、とくにムーコル目菌にみられる無性胞子である。運動性は無い。栄養菌糸体より胞子嚢柄 sporangiophore が空中に伸び、その先端が球状、垂球状などの菌の種属によって特徴のある形にふくらみ、胞子嚢 sporangium を形成する(写真11)。胞子嚢内では胞子嚢胞子が形成され、成熟すると胞子嚢壁は破れ、胞子が放出される。

C. 分生子 conidium (-dia)

子嚢菌門と一部の担子菌門の無性型(分生子世代)、および不完全菌類において形成される無性の胞子である。分生子には直接菌糸から、菌糸より発達した分生子柄 conidiophore から、あるいは分生子柄上に生じた分生子形成細胞から生じるものと、菌糸自体が変化して分断し胞子として機能するものもある。菌種により単細胞から多細胞にわたっている。同一菌種で大小の分生子が同一様式で形成される時は大きい方を大(型)分生子 macroconidium、小さい方を小(型)分生子 microconidium と呼ぶ(写真12)。分生子の形態、分生子形成様式はさまざままで、不完全菌類の分類の基準となっている。

出芽型分生子 blastoconidium : 菌糸や分生子形成細胞上に小突起が生じ、その先端が大きくなり分生子となり、分生子が次々に出芽して分生子の連鎖する[例 *Cladosporium* (図3A, 写真13)]。

シンポジオ型分生子 symposioconidium : 菌糸、分生子柄あるいは分生子形成細胞に形成された小突起(小歯 denticle) 上に1個ずつジグザグ状に並列

して生じる分生子である(図3B, 写真14)。

アネロ型分生子 annelloconidium : 菌糸、分生子形成細胞の先端から、分生子を生ずるごとに先端部が少しずつ伸び、前の分生子が離れた跡が環状(環紋 annellation)に残る(図3C, 写真15)。

フィアロ型分生子 phialoconidium : フィアライド phialide と呼ばれる分生子形成細胞の先端開口部より産生される分生子である(図3D)。フィアライド開口部に細胞壁の一部がえり状に付着している菌種もあり、この部分をカラレット collarette という。分生子がダンゴ状にかたまる菌種[例 *Phialophora* (写真16)、*Fusarium*、*Acremonium*]と連鎖する菌種[例 *Aspergillus* (写真17)、*Paecilomyces*、*Penicillium*]がある。

ポロ型分生子 poroconidium : 分生子柄あるいは分生子形成細胞の壁に小孔が生じ、その孔から出芽的に生じる分生子で、着色し多細胞性のものが多い(図3E)[例 *Alternaria*、*Curvularia* (写真18)]。

アレウリオ型分生子 aleurioconidium : この分生子は菌糸の先端あるいは側枝が球形、紡錘形に肥大して生ずる。分生子直下の細胞が乾枯して分生子は離断される(図3F)。*Trichophyton* (写真19)、*Chrysosporium* などにみられる。

分節型分生子 arthroconidium : 菌糸に多数の隔壁が生じ、この隔壁のところで分離し、個々の細胞になる(図3G, 写真20)。

厚膜胞子 chlamydospore : 菌糸先端あるいは中



写真10 担子器、担子胞子 (*Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans* の有性型))

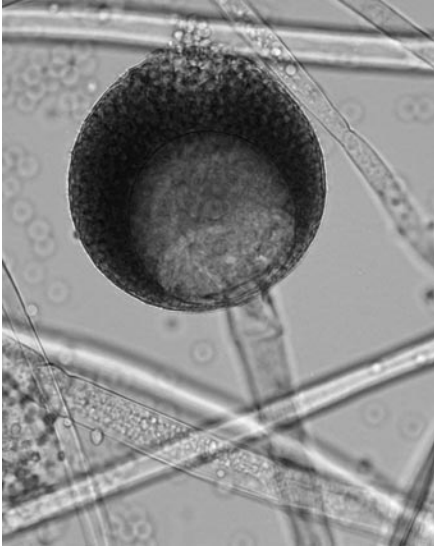


写真11 孢子囊、孢子囊胞子 (*Rhizopus oryzae*)

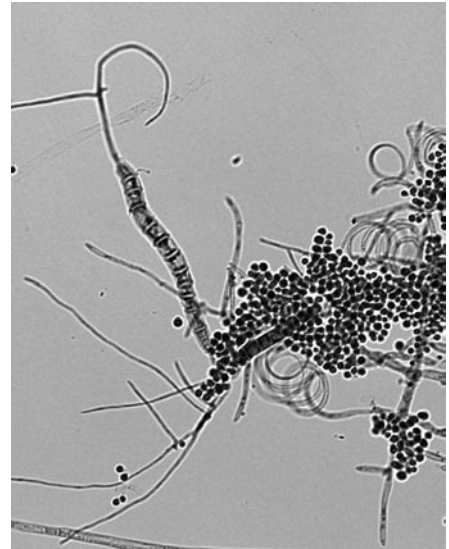


写真12 大分生子、小分生子
(*Trichophyton mentagrophytes*)

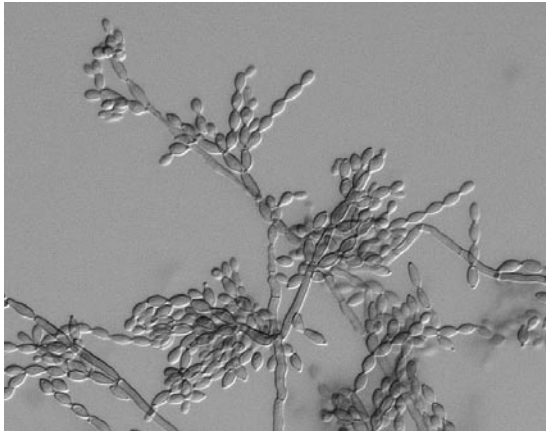


写真13 出芽型分生子 (*Cladosporium* sp.)

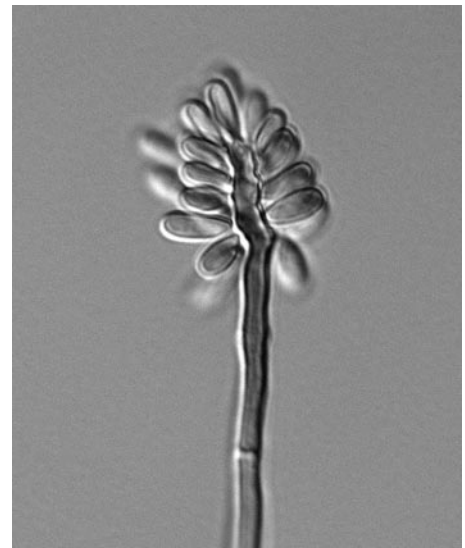


写真14 シンボジオ型分生子

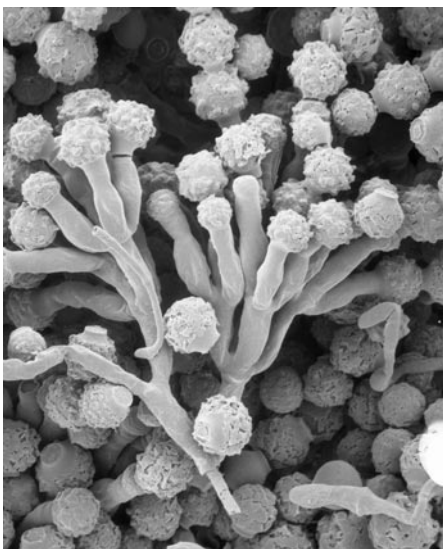


写真15 アネロ型分生子 (*Scopulariopsis* sp.)

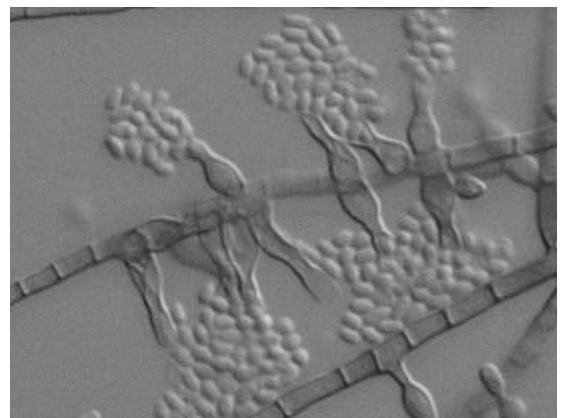


写真16 フィアロ型分生子 (*Phialophora* sp.)



写真17 フィアロ型分生子 (*Aspergillus* sp.)

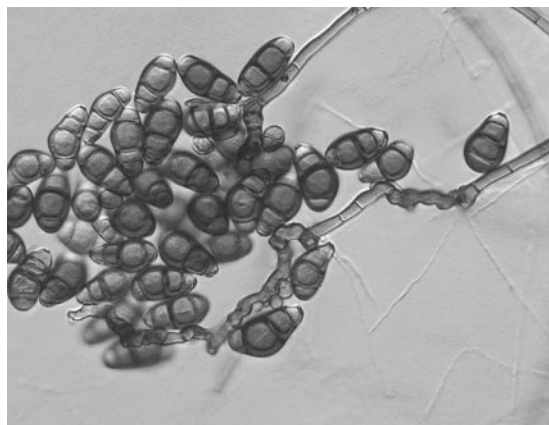


写真18 ポロ型分生子 (*Curvularia* sp.)

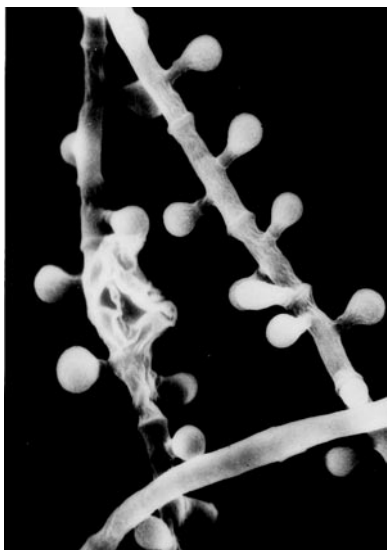


写真19 アレウリオ型分生子 (*Trichophyton* sp.)

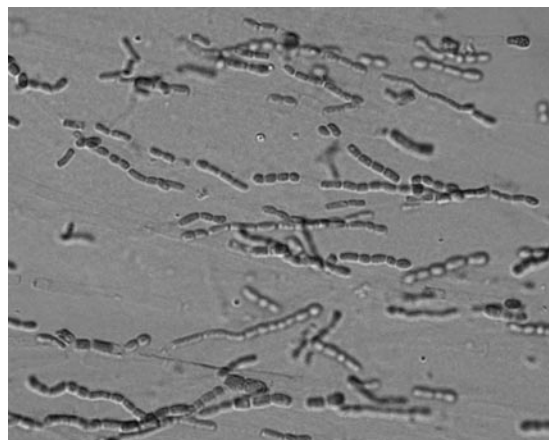


写真20 分節型分生子

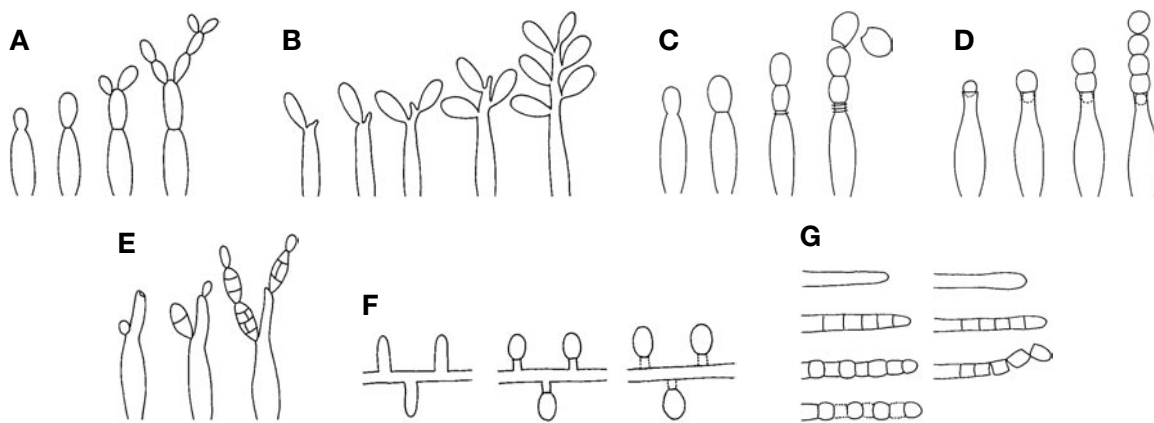


図3 A. 出芽型分生子、B. シンポジオ型分生子、C. アネロ型分生子、D. フィアロ型分生子、E. ポロ型分生子、F. アレウリオ型分生子、G. 分節型分生子

間で細胞質が凝集し、厚い壁で包まれているもので、一種の耐久形である。多くの菌に共通してみられる。

V. 真菌の検査法

①真菌の分離法

検査材料から真菌を分離する方法として、寒天平板混釈法、寒天平板塗抹法、メンブランフィルター法、液体培養希釈法、湿室培養法などがある。

A. 寒天平板混釈法

試料 10g (液状のものは 10ml) を 90ml の滅菌希釈液 (緩衝液、生理食塩水、界面活性剤添加水など) でよく攪拌もしくはホモジナイズする。この溶液を 10 倍、100 倍、1000 倍またはそれ以上に希釈し、シャーレに 1ml 分注する。それに 45℃ 程度にさました寒天培地注入し、よく混合する。培地は、通常 PDA、SDA (略語は表 1 を参照) などに、好乾性の真菌の分離には、MY20A などにクロラムフェニコールを 50～100µg/ml 添加したものをを用いる。生育の早い菌が多く出現する試料には、その生育を抑えるために NaCl (5～10%)、ローズベンガル (20～50µg/ml)、ジクロラン (2µg/ml) などを添加する。各希釈段階、3 枚以上作製する。通常、25℃ で 5～7 日培養するが、目的に応じては 37℃ で行う。出

現したコロニー数をカウントし、試料 1g または 1ml あたりのコロニー数に換算する。また、出現したコロニーの一部分をスラントに移植する。

B. 寒天平板塗抹法

試料の希釈液を作製方法、培養方法、出現菌のカウントは、寒天平板混釈法と同様に行う。あらかじめ作製した寒天培地上に希釈液 0.1～0.2ml を注入し、コンラージ棒で水分が培地に染込むまで塗抹する。

C. メンブランフィルター法

汚染レベルの低い液体試料は、孔径 0.45µm のメンブランフィルターを通し、そのメンブランフィルターを寒天培地上に置き、寒天平板混釈法と同様に培養する。

D. 液体培養希釈法

汚染レベルの低い試料は、液体試料はそのまま、固形試料は粉碎し、液体培地に入れ振とう培養する。培地は、クロラムフェニコールを添加したツァベックドックス溶液、ポテトデキストロース溶液 (表 1 の真菌同定用の培地組成から寒天を除いたもの) などを使用し、培養 2～3 日後、適宜希釈し、前述の寒天培地に塗抹する。

②培地

表 1 に主要な真菌同定用の培地の組成を示す。

表 1 糸状菌の同定用培地

ツァベック・ドックス寒天培地 (CzA)	オートミール寒天培地 (OA)
NaNO ₃ 3g	オートミール 30g
K ₂ HPO ₄ 1g	蒸留水 1000ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g	(以上のものを用いて抽出液を作る)
KCl 0.5g	寒天 20g
FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01g	じゃがいも・ブドウ糖寒天培地 (PDA)
スクロース 20g	じゃがいも (角切り) 200g
寒天 20g	蒸留水 1000ml
蒸留水 1000ml	(以上のものを用いて抽出液を作る)
ツァベック酵母エキス寒天培地 (CYA)	グルコース 20g
上記のCzAに酵母エキスを5g添加	寒天 20g
麦芽エキス寒天培地 (MEA)	サブロー・ブドウ糖寒天培地 (SDA)
麦芽エキス 20g	グルコース 40g
グルコース 20g	(処方により20g)
ペプトン 1g	ペプトン 10g
寒天 20g	寒天 20g
蒸留水 1000ml	蒸留水 1000ml
MY20寒天培地 (MY20A)	
ペプトン 5g	
麦芽エキス 3g	
酵母エキス 3g	
グルコース 200g	
寒天 20g	
蒸留水 1000ml	

VI. 真菌の同定法

真菌、特に糸状菌の同定は形態的観察に基づいている。形態の中でもとりわけ分生子の形成様式、形態が同定のポイントとなる。有性胞子の形成には時間がかかることが多いので、実際には分生子の形態、形成様式が同定の手がかりとなることが多い。

酵母の場合は発育形態が単純なので、生物学的および血清学的検査が行われている。とくに、病原性酵母の検索を目的とした簡易同定用キットが市販されている。その他、種々の酵母（とくに *Candida* 属）において、菌種特異的な生化学的特性を利用した菌種識別用培地が市販されている。各種基質に対する酸化還元能の違いによって、酸化還元色素の発色の色調が酵母によって異なることから、菌種の識別が可能である。

生化学的な検査では各種炭素源やアミノ酸の利用能を用いたキットや酵素活性の有無によるものなどがある。ウレアーゼ活性は、子嚢菌系酵母は陰性で、担子菌系酵母は陽性である。

①肉眼的観察⁹⁾

巨大コロニーは適宜寒天培地を平板に固めたシャーレを裏返しにし、供試菌を1点もしくは3点接種し（図 4A-D）、25℃もしくは37℃、場合によってはそれ以外の温度で、平均的には7日間もしくは14日間、暗室または光照射下、裏返しにして培養し作製する。そこで、コロニーの発育速度、表面と裏面の色調、表面の形態（図 5A-J）、菌糸層の状態、子嚢果、分生子形成、分生子果、菌核などの形成の有無、抽出液、可溶性色素の生成の有無などを観察する。

②顕微鏡による観察¹⁰⁾

まず、実体顕微鏡で菌糸層の状態、子嚢果、分生子形成、分生子果、菌核などの形成の有無を確認する。次に、光学顕微鏡で分生子形成様式、分生子の大きさ、形状、表面構造などを観察する。有性胞子が形成される場合は、その形成様式（種類）、大きさ、形状、表面構造などを観察する。分生子果が形成される場合も同様に行う。

プレパラートの作製は以下のように行う。スライドガラス上の封入液（ラクトフェノール液など）を1滴置き、カギ型白金耳でかきとったコロニーの一

部を封入液中で針でほぐし、カバーガラスをかぶせ、静かに押しつぶす。カバーガラスからはみでた封入液はろ紙で吸い取る。保存する場合は、カバーガラスの周囲を無色のネイルエナメルで封じる。

通常使用する封入液を表 2 に示す。ラクトフェノール液は、菌本来の色調を見るのにすぐれている。またラクトフェノール液にコトンプルーを溶解し染色液は分生子およびその他の形態の観察に適している。

③スライドカルチャー^{10, 11)}

本法は分生子の形成様式を発育状態のまま観察することができる。まずV字型（もしくはU字型）ガラス管、スライドガラス、カバーガラスを乾熱滅菌しておく。所定の培地の平板寒天（厚さ5mm）をメスで約10mm間隔で格子状に切り、その1片をスライドガラス上に置く。被検菌が糸状菌の時は寒天の辺縁中央に、酵母の時は対角に画線接種し、カバーガラスで覆う。最後に少量の滅菌水をシャーレ内に注ぎ、25℃の恒温器で培養する（写真 21）。培養中に時々シャーレを取り出し、ふたを取り、シャーレごと顕微鏡の鏡台にのせ、弱拡大で観察する。分生子の着生状態が丁度よくなったとき、カバーガラスをピンセットではがす。別のスライドガラス上にラクトフェノール（もしくはラクトフェノール・コトンプルー）を滴下し、その上に菌糸が付着している面を下にし、静かに置く。以下は上述と同様に行う。残ったスライドガラスは寒天を除いて封入すればもう1枚標本ができる。

④走査型電子顕微鏡による観察¹²⁾

走査型電子顕微鏡（SEM）の進歩により、分生子や子嚢胞子の表面の微細構造が詳細に観察することが可能となった。それに伴い、これまで光学顕微鏡では正確に区別できなかった構造が、分類の指標として用いられるようになり、微細形態による分類が進展した。*Aspergillus* の有性型の1つである *Neosartorya* においては、これまで変種として扱われていたものが、子嚢胞子の表面の微細構造の違いにより種に格上げされた。SEMのサンプルの作製方法は、分生子の着生している部分を寒天培地ごと切り取り、オスミウム酸で固定、エタノールで段階的に脱水、イソアミルで置換、臨界点乾燥後、白金コーティングする。子嚢胞子など水分が少なく堅い構造のものは、脱水から臨界点乾燥の操作を省くことができる。

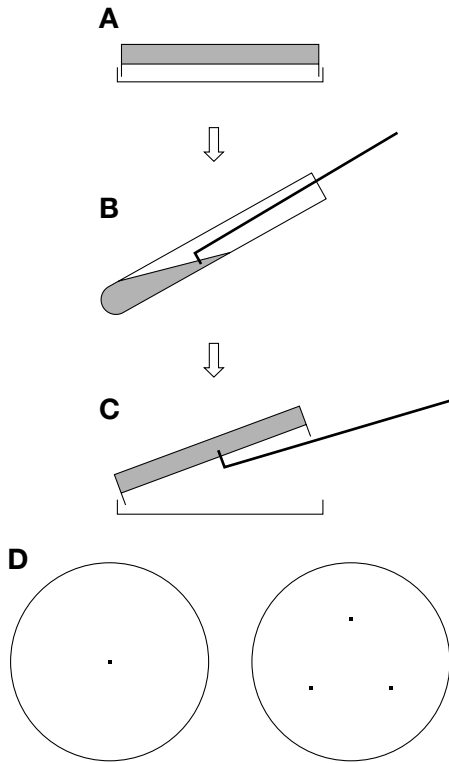


図4 巨大コロニーの作製法

A. シャーレを裏返す B. 白菌耳で菌体を少量かき取る
C, D. 1点もしくは3点植菌する

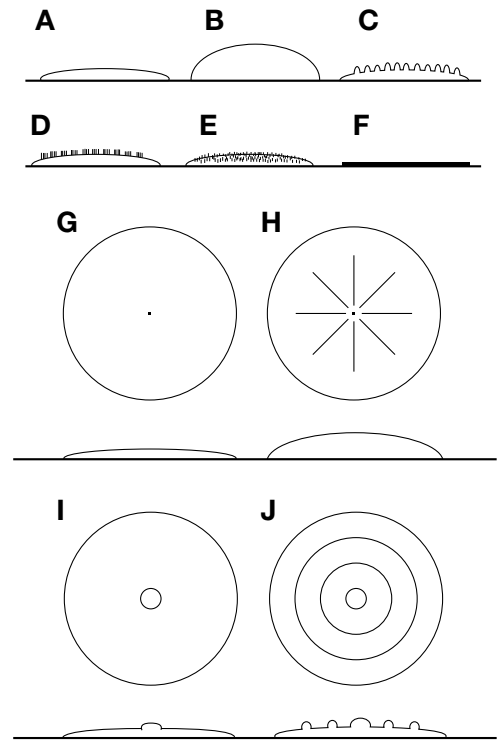


図5 コロニー表面の形態

A. ビロード状、B. 羊毛状、C. 粒状、
D. 束状、E. 粉状、F. 湿性、G. 平坦、
H. 放射状の溝、I. 中央隆起、J. 輪紋状

表2 封入液の組成

ラクトフェノール液	石炭酸10g、乳酸10g、グリセリン20g、蒸留水10g
ラクトフェノール・コットンブルー液	上記ラクトフェノール液50ml、コットンブルー0.025g
メルツァー液	抱水クロラール100g、ヨウ化カリウム5g、ヨード1.5g、蒸留水100ml
シェアー液	酢酸ナトリウム10g、グリセリン200ml、エタノール300ml、蒸留水500ml

VII. 分子生物学的検査¹³⁾

①血清学的検査

血清学的検査法は、真菌症の早期診断を目的として実施される。これまで、カンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコックス症などにおいて、その原因菌の菌種に対する特異的抗体を検出する方法が検討されている。この他、特異的細胞成分の検出も行われている。実際に標的となる物質は、細胞表層多糖 (*Cryptococcus* において莢膜多糖) または細胞質タンパク質 (*Candida* においてマンナン、*Aspergillus* においてガラクトマンナン) が多く用いられている。これらは、血清学的反応を利用すれば、特異抗原として検出できる。検出方法として、ラテックス凝集反応 (LA 法) と酵素免疫抗体法 (ELISA 法) が広く用

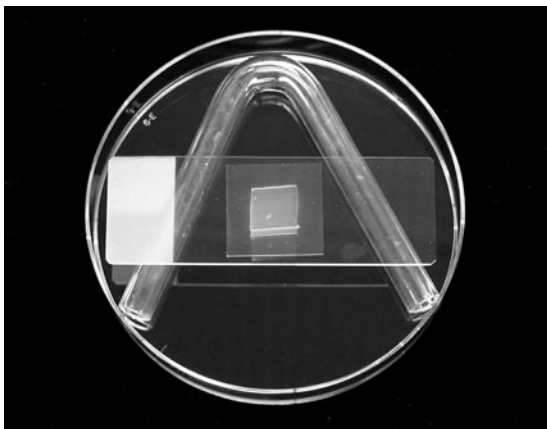


写真21 スライドカルチャー

いられている。これ以外の検出標的として、 β -1,3-グルカンなどの細胞壁成分やD-アラビニトールなどの代謝産物が利用されている。

② 遺伝子解析による方法¹⁴⁾

PCR (polymerase chain reaction method) により菌種特異的な遺伝子の一部の塩基配列の増幅の有無を検査する方法、DNAをランダムに増幅させ、その電気泳動のバンドパターンを解析する方法 (RAPD 法) が試みられている。また、特定の遺伝子をPCRにより増幅させ、制限酵素で切断したものの電気泳動パターンによる多型 (RFLP: restriction fragment length polymorphism) を用いて解析する方法が一部の真菌の検出に利用されている。

また、rDNAのD1/D2領域やITS領域などをはじめとする特定の遺伝子の塩基配列の比較により、近縁な菌種を検索する方法もある。真菌の同定の決め手となる形態的な特徴を示さないような場合であっても、特定の遺伝子の塩基配列によりその真菌がどの菌種に近縁であるか、または塩基配列が同一であることから、菌種の同定が可能となることがある。ただし、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) などのデータベースに登録されている塩基配列データが不十分な菌群やデータ自体が不正確な場合もある。

おわりに

真菌の分類・同定には、近年の分子生物学的な手法の発展により、さまざまな方法が用いられるようになった。これらの方法では、操作が簡便で迅速である、客観性がある、再現性が高いなどの利点がある。しかし、対象とする菌株が純化されているか、目的とする菌株であるかを確認するためには形態観察が必要である。また、分類・同定に使用される遺伝子の塩基配列を用いたBLAST検索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) では、有性型の名称、最新の菌種名でヒットするため、菌学的な知見も必要となる。したがって、従来の形態学的な知見は、分子生物学的な手法による真菌の分類・同定においても必要とされる。現状では、形態学的な知見をベースとして、分子生物学的な手法によって不足している部分を補い、より正確な真菌の分類・同定を目指すのが理想と考える。

文 献

- Whittaker RH: New Concept of Kingdoms of Organisms, *Science*, **163**: 150-159, 1969.
- 杉山純多: 菌類の多様性と分類体系. 岩槻邦男、馬渡峻輔監修、菌類・細菌・ウイルスの多様性と系統. 裳華房、東京、pp. 30-55, 2005.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA: *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi* (9th ed), CAB International, Egham, pp. 198, 2001.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox C, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Mia, dlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold EA, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G-H, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüßler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton J, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin D, Spatafora J, Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822, 2006.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA: *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi* (10th ed), CAB International, Wallingford, p 265, 2008.
- 日本植物分類学会国際植物命名規約邦訳委員会: 多型的生活環をもつ菌類学名 第59条、第17回国際植物学会議、オーストリア、ウィーン、2005年7月で採択された国際植物命名規約(ウィーン規約)日本語版、日本植物分類学会、上越市、pp. 106-109, 2007.
- 宇田川俊一: テレオモルフとアナモルフの学名. 食品のカビ汚染と危害. 幸書房、東京、p 12, 2004.
- 椿啓介: 不完全糸状菌綱. 宇田川俊一、椿啓介他著、菌類図鑑(下). 講談社、東京、pp. 843-848, 1978.
- 矢口貴志: 実験室における菌類の形態観察と記録法: 糸状菌の巨大集落の観察法. *日菌報* **38**: 41-46, 1997.
- 岡田 元: 実験室における菌類の形態観察と記録法: 顕微鏡観察用試料の作製法と観察法の基礎. *日菌報* **38**: 47-58, 1997.
- 宇田川俊一: 同定のための培養法. 宇田川俊一、椿啓介他著、菌類図鑑(下). 講談社、東京、pp. 1220-1224, 1978.
- 幡場良明: 走査顕微鏡試料作製法、(社)日本顕微鏡学会編、電顕入門ガイドブック. 学会出版センター、東京、pp. 99-105, 2004.
- 山口英世: 補助診断法. 病原真菌と真菌症3版. 南山堂、東京、pp. 87-98, 2005.
- 河崎昌子: 遺伝学的同定法. 宮治誠編、病原微生物ハンドブック、医薬ジャーナル社、大阪、pp. 69-73, 2007.