

## カビ相談 Q&A vol.34

[回答] 株式会社テクノスルガ・ラボ 主席研究員 喜友名 朝彦

**Q34-1.** カビの特徴がよくわかるプレパラートを作製するにはコロニーのどの箇所から菌体を採ればよいでしょうか？

### A34-1.

顕微鏡観察でカビを同定する場合、孢子形成構造などの形態的特徴を観察することが非常に重要になります。そのため、孢子形成構造などの分類群の特徴がわかるようなプレパラートを作製できるかがポイントになります。

カビのプレパラートを作製する際、寒天平板培地上のコロニーから菌体を採り出す箇所や観察に適したプレパラートの作りやすさはカビの

種類によって異なります。以下に、一般的なカビの成長過程に伴う孢子形成構造の見え方の違いを説明した後に、いくつか例をあげて観察に適したプレパラートを作製する方法について説明します。

一般的に、カビのコロニーは植菌箇所から外側に向かって放射状に成長します（図 1a）。そのため、コロニーの中央部付近は最も成熟し、

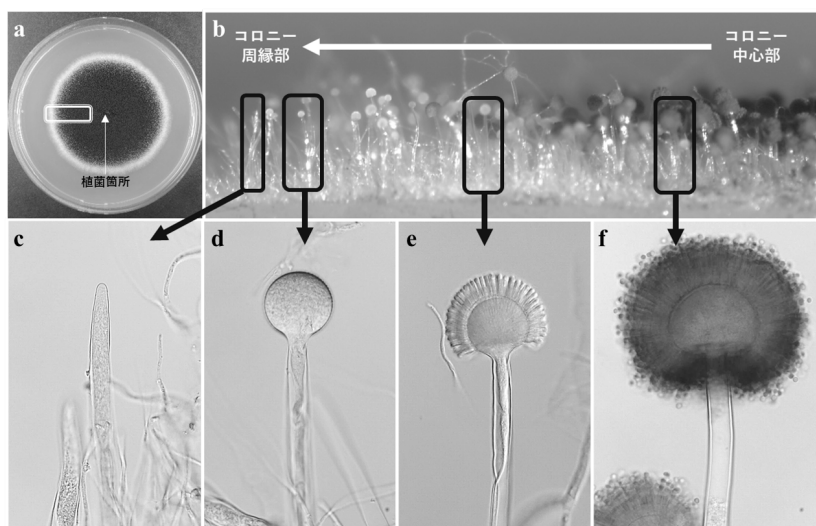


図 1. *Aspergillus niger* のコロニーと顕微鏡観察像

a コロニー像 (PDA 培地、25℃、1 週間培養)、b 実体顕微鏡下におけるコロニー断面像 (a の枠内  
のコロニー縦断面、写真左側がコロニー周縁部の未成熟箇所、右側がコロニー中心部の成熟箇所)、  
c-f アスペルジラムの成長過程 (b の枠内がそれぞれ c-f に該当)

周縁部（外側）にいくほど未成熟な状態となります。たとえば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) のコロニーは中央部から周縁部に向けて、黒色（黒褐色）→明褐色→白色と色調が徐々に薄くなっていきます（図 1b）。黒色は孢子（分生子）の色によるもので、孢子が多量に形成されている場所ほど色が濃くなります。一方で、周縁部の白色は菌糸体が外側に向けて伸長している場所で、孢子はほとんど形成していない、あるいは形成している場合でもごくわずかになります。孢子形成量があまりにも多量の場合、観察が難しくなるため、適切な箇所を選択する必要があります。図 1b の中心から左側部分（図 1c～図 1e）は孢子形成が未成熟なため種の特徴が不明瞭で、プレパラート観察には不適切となります。一方で、図 1b の右側部分（図 1f）が種の特徴を最もはっきり示しており、観察に適しています。

アスペルギルス (*Aspergillus*) 属やペニシリウ

ム (*Penicillium*) 属のように、コロニーの色調が中心から外側に向けて、濃色から薄色になる場合、中心部と周縁部の中間的位置、あるいは着色している部分のやや外側あたりがプレパラート作製に適しています（図 2a）。

トリコデルマ (*Trichoderma*) 属のように、コロニー上に白色～薄緑色～緑色に着色した菌糸塊（房）が環状に形成される場合、この菌糸塊の中でも濃緑色よりも薄緑色の部分が特徴がよくわかるプレパラート作製に適しています（図 2b）。濃緑色の部分は菌体が成熟している箇所のため、孢子形成量が多すぎたり、分生子柄の構造が壊れていることがあるため、観察が難しいことが多いです。

ペスタロチオプシス (*Pestalotiopsis*) 属（図 2c）およびフォーマ (*Phoma*) 属（図 2d）のように菌糸体が集合して組織化した分生子果（分生子層および分生子殻）を形成する、または、ケトミウム (*Chaetomium*) 属（図 2e）のように

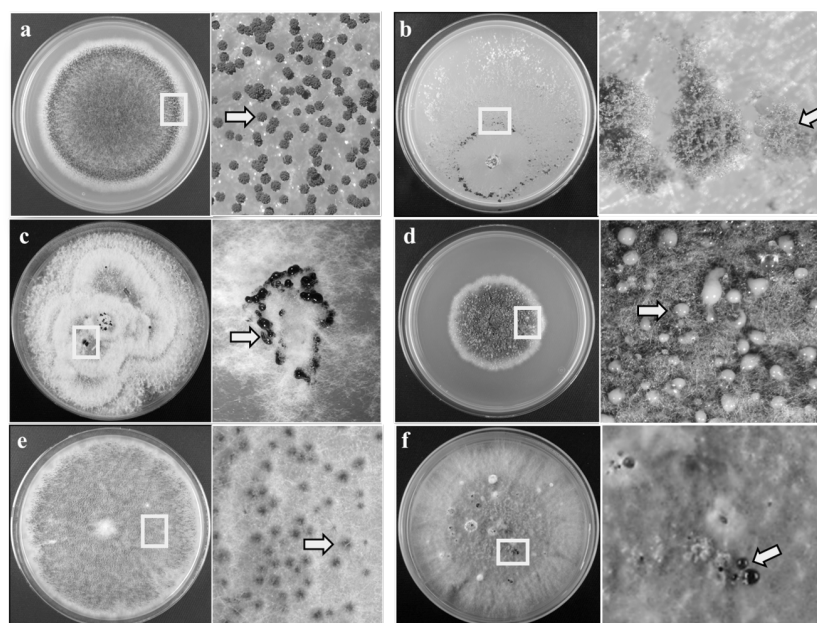


図 2. カビのプレパラートを作製する際の菌体を採る箇所の目安の一例

PDA 培地上のコロニー像（a-f 枠内が菌体採取箇所）とプレパラート作製時の菌体採取箇所の拡大像（矢印で示したような箇所を選択的に切り出します）：a *Aspergillus niger*、b *Trichoderma atroviride*、c *Pestalotiopsis* sp.、d *Phoma saxea*、e *Chaetomium coarcatum*、f *Epicoccum nigrum*

菌糸体が集合して組織化した子嚢果（子嚢殻など）を形成するカビの場合、その分生子果または子嚢果を選択的に数個採り出すことで、特徴がよくわかるプレパラートを作製することができます。また、分生子果や子嚢果を形成するカビはコロニーの成熟に伴い、分生子や子嚢胞子の粘塊が分生子果や子嚢果の上に押し出されることがあります。その場合はこの粘塊とともに分生子果／子嚢果を選択的に採り出します。

また、エピコッカム (*Epicoccum*) 属のように、菌糸体が集合して色調の変化が認められる箇所

で孢子形成が認められることが多いため、そのような箇所を選択的に採り出すことで、分類群の特徴がよくわかるプレパラートを作製することができます（図 2f）。

このように培養株のコロニーからプレパラートを作製する場合、実体顕微鏡観察下で目的の箇所から寒天表面を薄く剥ぎ取るようにして、寒天中の菌糸体とともに菌体を採り出すことで、菌糸体の形態的特徴も観察できるプレパラートを作製することが可能となります。

**Q34-2.** カビのプレパラートを作製しても形態的特徴がよくわからないプレパラートになってしまいます。形態的特徴がよくわかるプレパラート作製方法のコツや注意点を教えてください。

## A34-2.

カビのプレパラート作製方法は、直接コロニーから菌体を採りだして作製する方法、スライド培養法やセロハンテープ法など様々な方法がありますが、本稿では寒天平板のコロニーから直接菌体を採りだして作製する方法について説明します。カビのプレパラート作製については岡田<sup>1)</sup>や松島<sup>2)</sup>などに詳しく解説されていますので、あわせて参考にしてください。

1. スライドガラス上に封入液（マウント液：ラクトフェノール液など）を適量滴下します（約 5μl 程度）。
2. コロニー上の孢子形成が認められる箇所を中心に菌体を採りだして、スライドガラス上のマウント液中に置きます（菌体を採り出す箇所の目安については本稿の Q34-1 を参照ください）。  
→ プレパラートを作製する際、白金鉤を使用することもあります。柄付き針やメスが操作性に優れています（図 3）。柄付き針には様々なタイプがありますが、市販の柄付

き針（図 3a-①）の場合、針先が太くてプレパラート作製時の細かい操作に不向きな場合があります。筆者は柄付き針の金属ホルダー（図 3a-②）や割箸に、自分が操作しやすい太さ・硬さの縫い針（図 3b）を取り付けて自作の柄付き針を使用しています（図 3a-③, ④）。解剖用メス（図 3a-⑤, ⑥）には様々なタイプの替刃（図 3c）がありますが、先端が鋭利な刃が細かい操作に適しています。

3. 両手でメスや柄付き針を持って、菌体の塊を丁寧にほぐします（図 4）。

→ 一時的な顕微鏡観察用の場合、菌体の塊が重ならない程度のほぐしでも大丈夫です。菌体が重なり、厚みのあるプレパラートの場合、気泡が入りやすく顕微鏡観察時に対物レンズの焦点を合わせにくいいため、できるだけ薄いプレパラートを作製することが望ましいです。

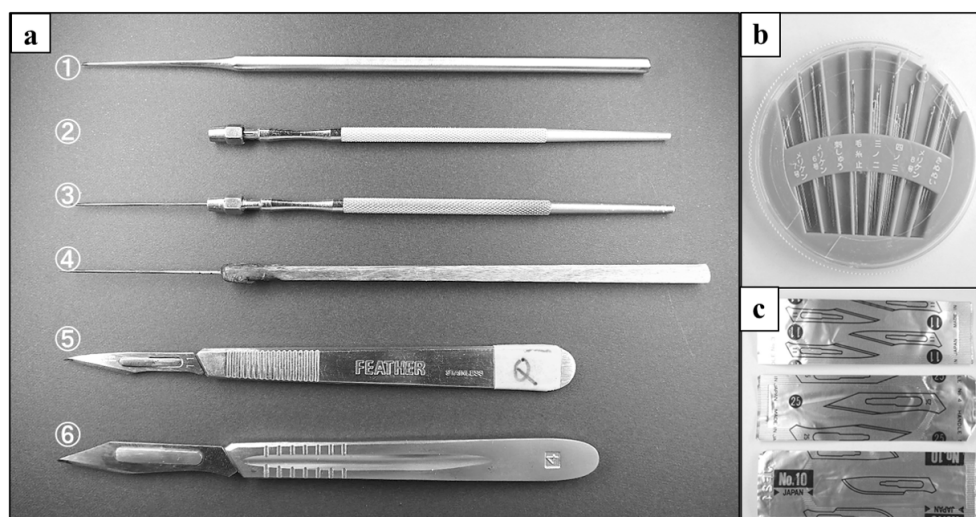


図3. プレパレート作製道具の一例

a 柄付き針と解剖用メス（① 市販の柄付き針、② 柄付き針の金属ホルダー、③ ②のホルダーに縫い針を取り付けた柄付き針、④ 割箸に縫い針を接着剤で取り付けた簡易柄付き針、⑤ フェザー製 No.11 の替刃を取り付けた解剖用メス、⑥ フェザー製 No.25 の替刃を取り付けたメス）、b 縫い針、c 解剖用メス替刃

4. 菌体をある程度ほぐした後に、カバーガラスをかぶせます。

→ カバーガラスをかぶせる際、カバーガラスの一端を指で軽く押さえながら、もう一端をピンセットでつまみ、ゆっくりとかぶせることで気泡が入りにくくなります。

5. カバーガラスを上から軽く押しつけて、余分なマウント液や気泡を取り除きます。カバーガラスの端から出た余分なマウント液はろ紙

で吸い取ります。

→カバーガラスを直接、指で押してしまうとカバーガラスに指紋がついて、顕微鏡観察に支障をきたすことがあるため、カバーガラスの上にろ紙をかぶせるなどして指で直接触れないように注意します。また、指で押しつぶす際、強く押しすぎるとカバーガラスが割れてしまうことがあるため、注意が必要です。

6. 作製したプレパートを光学顕微鏡のステージに載せて、最初は 100 ～ 150 倍の低倍率で観察を行い、観察対象を視野の中心に移動しピントを合わせてから 200 ～ 1500 倍の高倍率で観察を行います。

7. 作製したプレパレートに胞子が多すぎて胞子形成構造の観察が難しい場合は、再度、掻き取った菌体の塊をシャーレ、スライドガラスまたは寒天平板培地上で 70% エタノールなど

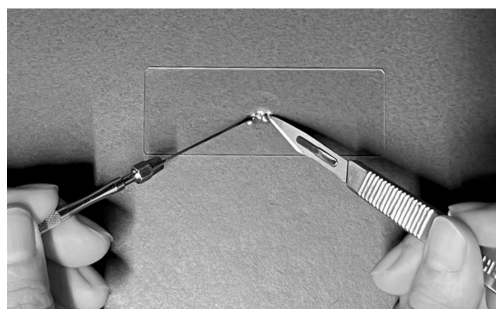


図4. スライドガラス上で菌体をほぐしている様子

で余分な孢子などを洗い流した(除去した)後、上記1～5の方法で顕微鏡観察用プレパラートを作製します(図5、図6)。

カビのプレパラート作製は細菌や酵母と異なり、菌体のほぐしや余分な孢子の洗浄/除去がうまくいかないと、そのカビの特徴が分かりにく

いプレパラートとなるため、注意が必要です(図5)。上記の工程で説明したように、ひと手間かけることで見違えるようなプレパラートを作製することができます。プレパラート作製は1回ではうまくいかないことがよくありますので、何度か作り直して観察を繰り返すことが上達への近道です。

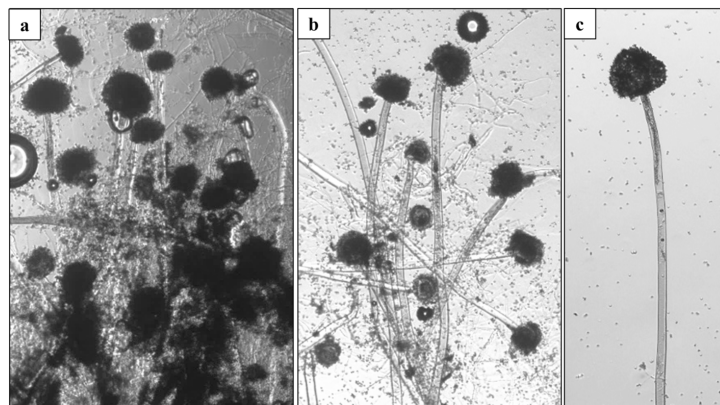


図5. *Aspergillus niger* のプレパラート観察像

a コロニーから掻き取った菌体をそのままマウント液で封入した状態、b aの状態の菌体を70%エタノールで洗浄して余分な孢子を洗い流した状態、c bの状態をさらにメスまたは柄付き針で菌体の塊をほぐした観察像

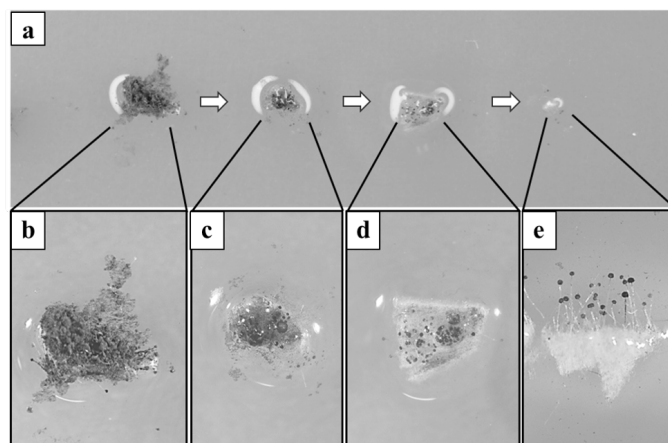


図6. *Aspergillus niger* の菌体を寒天培地上にのせて70%エタノールで洗浄している様子

a 寒天培地上で各洗浄段階を左側から右側に並べた様子、b-e aの各洗浄段階の拡大像(寒天培地上に70%エタノールを3～4滴横並びに滴下して、その滴下した箇所にもス、柄付き針またはピンセットで菌体の塊を浸して、軽く懸濁させて洗浄後、隣のエタノール滴下箇所に菌体を移して洗浄、と段階的に洗浄を繰り返すことで、余分な孢子を除去することができます)

**Q34-3. カビを形態観察によって同定するときに参考になる文献を教えてください。**

**A34-3.**

植物や動物の名前を各種図鑑で調べるように、カビの形態的特徴がわかるような顕微鏡写真が多く掲載されている図鑑が手元にあると、形態観察でカビを同定することが容易になります。形態観察によるカビの同定に慣れないうちは、顕微鏡で観察できる形態と類似しているものが図鑑に掲載されている図版のどれに類似しているか、一つひとつ照合しながら絵合わせをする感覚で、進めていくことをお勧めします。図鑑との照合作業が少しずつ慣れてきたら、図鑑に掲載されているカビの記載文を読みながら、自分が観察しているカビの特徴と合致しているかを考えていくと良いでしょう。

カビに特化した図鑑的な書籍は目的用途に応じて様々ですが、掲載種数が多く、参考にしやすい書籍を以下に紹介します。

<初心者向け>

高鳥浩介 監修 (2002), かび検査マニュアルカラー図譜, テクノシステム, 東京.

代表的なカビ約 100 種のカラー写真が分類・形態および生態分布などの情報とともに掲載されているだけでなく、カビを取扱う各種実験の操作手順が豊富な図解でわかりやすく解説されている点で、カビ取扱い初心者にはわかりやすい構成となっています。

李憲俊・李新一 (2020), カラー写真と実例でわかる カビの分離同定と抗カビ試験, 日刊工業新聞社, 東京.

「かび検査マニュアルカラー図譜」の内容をコンパクトにまとめたわかりやすい内容構成となっています。

Malloch, D. (1981), *Moulds – Their isolation, cultivation, and identification*, University of Toronto Press, Toronto, Canada. 【訳本: Malloch, D. (宇田川俊一・室井哲夫 訳) (1983), *カビの分離・培養と同定*, 医歯薬出版株式会社, 東京.】

ウェブサイト < <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Moulds.html> (アクセス日: 2023 年 10 月 11 日) >

原著・訳本ともに約 40 年前の書籍ですが、基礎的な内容がわかりやすくまとめられており、カビの取り扱いに関する基礎を学べるとともに、代表的なカビについて簡単な解説と図版が掲載されています。原著内容が無料で上記ウェブサイトから閲覧できます。

<中級者～上級者向け>

Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C. and Andersen, B. (2019), *Food and Indoor Fungi Second Edition*, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands.

食品と室内環境のカビ図鑑。食品や室内環境から頻出する代表的なカビの形態、分布・生態やカビ毒産生などの情報がコンパクトにまとめられており、ここ 10 年程の 1 菌種 1 学名によるカビの学名変更を踏まえた学名新旧対応表が便利です。分類群の特徴を捉えたコロニーや顕微鏡写真のカラー図版が特徴で、1 種あたり見開き 2 ページで構成されており、自分が観察しているカビの特徴と比較する際に、手元に置いて絵合わせのしやすい書籍です。

宇田川俊一 (2023), 食品のカビ検索図鑑—自然環境・室内環境調査にも役立つ—, 幸書房／一般財団法人日本食品分析センター, 東京.

食品汚染カビを中心とした72属238種のコロニーや顕微鏡写真のカラー図版を中心に、最新の系統分類情報が反映され、それぞれのカビの形態、分布と生態、発育条件や耐熱性、カビ毒産生などの情報が収載されています。日本語で執筆された最新のカビ図鑑です。

de Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J., Ahmed, S. A., Al-Hatmi, A. M. S., Figueras, M. J. and

Vitale, R. G. (2020), Atlas of Clinical Fungi, The ultimate benchtool for diagnostics, 4th edition, Foundation Atlas of Clinical Fungi, Hilversum.

ウェブサイト < <https://www.atlasclinicalfungi.org/> (アクセス日: 2023年10月11日) >

ヒトや動物に感染して病気を引き起こす医真菌の最新情報が集約されており、約700種以上の医真菌の形態、分布・生態、病原性などの情報とともに豊富なカラー図版で構成されています。

#### 参考文献

- 1) 岡田 元 (1997), 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, 日本菌学会会報, 38, 47-58.
- 2) 松島恵介 (2001), 実験室における菌類の形態観察と記録法: 菌類の写真、線画および画像処理 1, 日本菌学会会報, 42, 112-119.