

原 著

## Fungi-Tape™ および MycoPerm-Blue™ を用いたサブロー・ブドウ糖斜面寒天培地からの病原真菌の同定法の試み

小笠原 弓 恵<sup>1</sup> 比留間 政太郎<sup>2</sup> 武 藤 正 彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山口大学医学部分子感知医科学講座皮膚科

<sup>2</sup>順天堂大学医学部皮膚科学講座

[受付 2 月 19 日, 2003 年. 受理 6 月 17 日, 2003 年]

### 要 旨

病原真菌を同定する簡便な方法として, Scotch-tape™ や frosted tape を用いた報告があるが, 今回われわれは真菌観察用に開発された Fungi-Tape™ と MycoPerm-Blue™ を用いたより簡便な方法について検討した. 皮膚真菌症から分離された 66 株のサブロー・ブドウ糖斜面寒天培地上の集落を Fungi-Tape™ を用いて直接採取し, MycoPerm-Blue™ で染色固定した後, 顕微鏡にて分生子を観察した. この簡便な方法により同定できた菌は 66 株中 47 株 (71.2%) あり, 従来の方法での結果は 66 株中 64 株 (97.0%) でその一致率は 73.4% であった. 表面が顆粒状の集落については一致率は 80.0% で, 表面が絨毛状の集落についてはその一致率は 41.2% であった. 特に *T. rubrum* では培養後長時間経過すると絨毛性変異をきたしやすく, 従来の方法との一致率が著しく低下した. Fungi-Tape™ と MycoPerm-Blue™ を用いた菌の同定法は, 経時的に分生子を観察する場合にも便利であり, 肉眼的な集落の特徴を観察しながら, その部位の顕微鏡的特徴を観察することができ, また長期間保存が可能などの利点がみられた.

**Key words:** Fungi-Tape™, MycoPerm-Blue™, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*

### はじめに

皮膚真菌症の診断では, 皮膚症状をよく観察し, 真菌症を疑い, 真菌検査を行うことが大切である. 病原真菌の同定は, 肉眼による集落の性状の観察 (巨大培養), 顕微鏡による分生子の観察 (スライド培養), 特殊培地による生物学的特徴の観察によりなされ, 最近では分子生物学的手法も用いられるようになった. しかし, これらの検査は手技が煩雑で, 時間がかかるという問題点が残されており, より迅速で簡便な方法が望まれている. 簡便な方法としてセロテープ, Scotch-tape™, frosted tape を用いて真菌を採取する方法<sup>1,2)</sup> や, 薄い培地を用いたスライド培養による分生子の観察<sup>3)</sup> がある.

今回われわれは真菌観察用に開発された Fungi-Tape™ を用いて, サブロー・ブドウ糖斜面寒天培地から分生子を直接採取し, MycoPerm-Blue™ で染色固定し, 顕微鏡観察する方法を試み, 従来の同定方法と比較検討したので報告する.

### 材料と方法

実験に使用した材料は, Fungi-Tape™ (製造元: Scientific

別刷請求先: 小笠原弓恵

〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1

山口大学医学部分子感知医科学講座皮膚科

Device Laboratory, Inc./輸入・販売元: スギヤマゲン(株), 東京), MycoPerm-Blue™ (同上), プレパラート, カバークラスおよび竹串で, 使用した 66 株はいずれも外来分離菌で, サブロー・ブドウ糖斜面寒天培地に培養された真菌である. これら 66 株について①集落の形態観察, ②試験管の管壁を通して検鏡, ③集落の一部を掻き取り検鏡, ④スライド培養, ⑤クリステンセン尿素培地およびオートミール培地上の色素変化観察を用いる従来の真菌同定法および以下に操作手順を記載した Fungi-Tape™ を用いる同定法を行った.

### 操作手順 (Fig. 1)

- ① MycoPerm-Blue™ を 1 滴スライドグラスに滴下する.
- ② Fungi-Tape™ を長さ約 1 cm にはさみで切り竹串の先端に貼りつける. 斜面培地にさしこみ, 集落に押し付け検体を採取し, ①の上に気泡が入らないようにゆっくりとのせる.
- ③ テープに MycoPerm-Blue™ が拡がり, 観察可能となるのに約 5 分を要する.
- ④ 完全に固定された標本を作成するには, スライドグラスの標本を水平に置き室温にて約 30 分静置する.

作成された 66 枚の標本を室温にて最も長いもので 24 カ月間保存し, 染色性の変化を検討した.

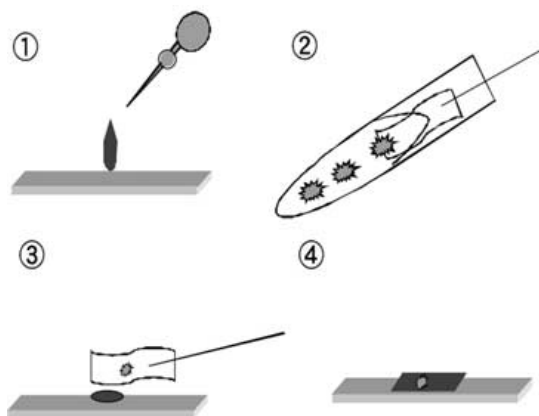


Fig. 1. Simple method using Fungi-Tape™ and MycoPerm-Blue™

- ① Place one small drop of MycoPerm-Blue™ on a slide.
- ② Using scissors, cut a piece of Fungi-Tape™ about 1 cm long. Place a bamboo stick parallel to the length of the tape, then put it into the slant, touch it to a fungal colony, pull it out and place it on ①.
- ③ Slides can be examined five minutes after MycoPerm-Blue™ has been spread over the tape.
- ④ Allow preparation to dry on a flat surface at room temperature for 30 minutes.

## 結 果

従来の方法で菌を同定できた株は66株中64株(97.0%)であった。Fungi-Tape™を用いた菌の同定法により同定できたものは66株中47株(71.2%)であった。*Trichophyton mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Aspergillus*, *Sporothrix schenckii* および *Alternaria* はいずれも一致率は100%であったが、*T. rubrum* が48.6%と低い値であったので、従来の方法と Fungi-Tape™を用いた菌の同定法との一致率は73.4%であった(Table. 1)。菌の集落の表面の形態からの一致率は、*T. rubrum* に特徴的な表面が絨毛状の集落の一致率は41.2%で、*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum* を含む表面が顆粒状の集落については一致率は80.0%であった(Table. 2)。また *T. rubrum* について培養期間との関係を見ると、3カ月以内では65.0%、3カ月以上は33.3%と低下した(Table. 3)。

Fig. 2に同方法で作成した *T. rubrum* (Fig. 2a), *T. mentagrophytes* (Fig. 2a), *M. gypseum* (Fig. 2c), *Sporothrix schenckii* (Fig. 2d) の標本を示した。

Table 1. Results of identification by conventional method and Fungi-Tape™ method and concordance rate between the two

	Identification by conventional method	Identification by Fungi-Tape method	Concordance
<i>T. rubrum</i>	35	18	48.6%
<i>T. mentagrophytes</i>	9	9	100.0%
<i>T. tonsurans</i>	2	2	100.0%
<i>M. canis</i>	5	5	100.0%
<i>M. gypseum</i>	1	1	100.0%
<i>Aspergillus</i>	5	5	100.0%
<i>Sporothrix schenckii</i>	5	5	100.0%
<i>Alternaria</i>	2	2	100.0%
Total	64	47	73.4%

Table 2. Observed morphology colony, identification by Fungi-Tape™, and concordance rate

Observed morphology of colony	Identification by conventional method	Identification by Fungi-Tape	Concordance
Fluffy	17	7	41.2%
<i>T. rubrum</i>	17	7	
Granular	35	28	80.0%
<i>T. rubrum</i>	18	11	61.1%
<i>T. mentagrophytes</i>	9	9	100.0%
<i>T. tonsurans</i>	2	2	100.0%
<i>M. canis</i>	5	5	100.0%
<i>M. gypseum</i>	1	1	100.0%

Table 3. Difference in concordance of *T. rubrum* incubated over 3 months and within 3 months

	Isolated subjects	Identification by conventional method	Identification by Fungi-Tape	Concordance
<i>T. rubrum</i>				
within 3 months	20	20	13	65.0%
over 3 months	17	15	5	33.3%

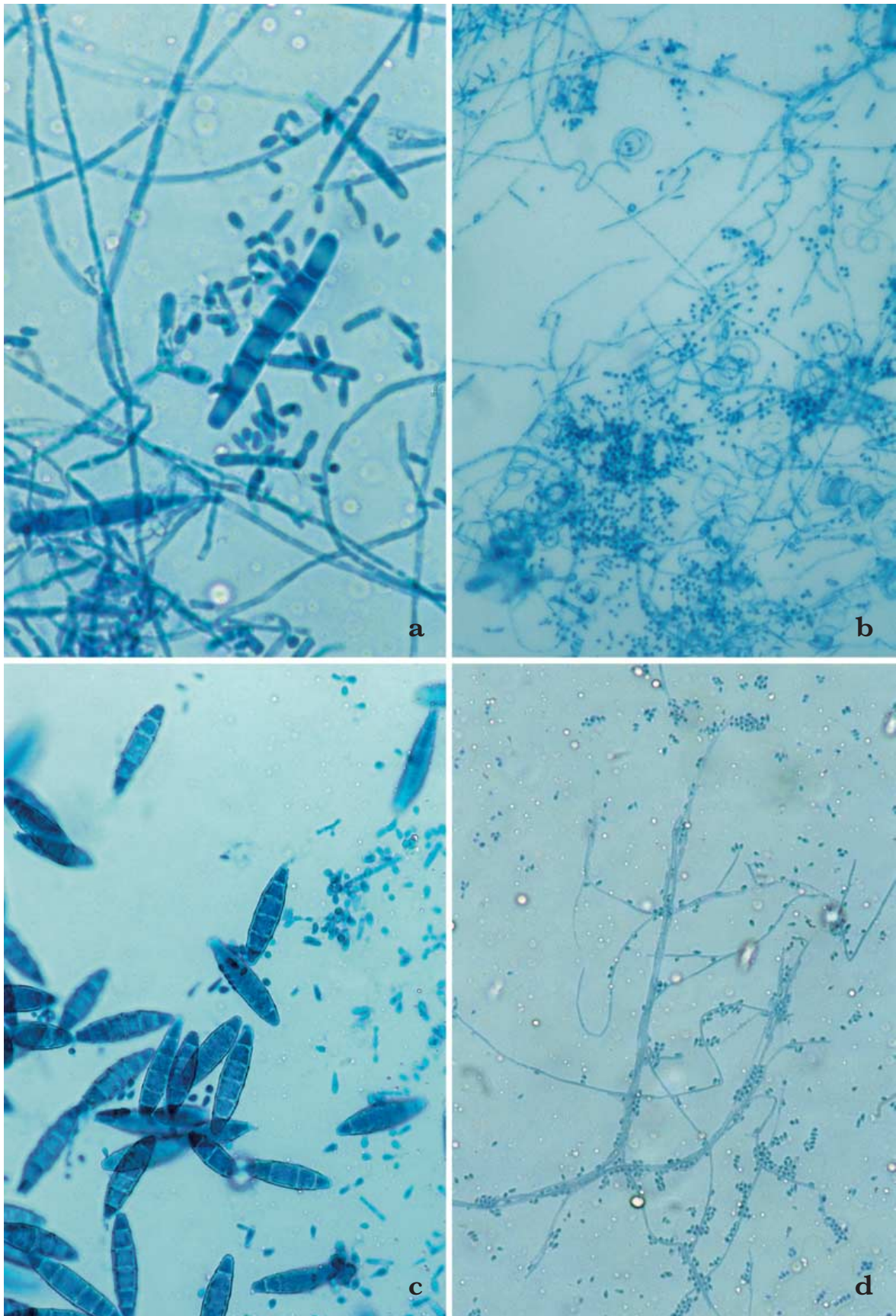


Fig. 2a. *T. rubrum*. Macroconidia and “tear drop” microconidia.  
2b. *T. mentagrophytes*. Globose microconidia in grapelike clusters and spiral hyphae.  
2c. *Microsporum gypseum*. Microconidia and macroconidia up to six cells.  
2d. *Sporothrix schenckii*. Mycelial strands bearing delicate conidiophores and conidia.

## 考 案

病原真菌の同定は、集落の観察、分生子の観察、生物学的特徴、分子生物学的方法などによってなされる。なかでも分生子の観察にはスライド培養を用いるが、これは手技が煩雑で、時間を要するなどの欠点がある。このためより迅速で簡便な方法として Scotch-tape<sup>TM</sup> や frosted tape を用いて、寄生している状態や、斜面培地から直接菌の形態を観察する方法が報告されている<sup>1,2)</sup>。Harris ら<sup>1)</sup>による frosted tape を用いた方法はわれわれの方法に類似しているが、カバーガラスを用いる点でやや手技が煩雑である。また固定方法としては、従来の lactophenol cotton blue を用い封入した標本では、時間をおいて検討する際にずれたり、剥がれたりするという欠点がある。Curtis<sup>3)</sup>、庄司<sup>4)</sup>はこれらを解決するために独自の染色固定法を報告しているが、いずれも手技が煩雑であったり、保存面でやや問題がある。

Fungi-Tape<sup>TM</sup> と MycoPerm-Blue<sup>TM</sup> は、真菌同定用に開発された培地から検体を採取するためのテープおよび染色固定液である。Fungi-Tape<sup>TM</sup> は polyolefin plastic 製、厚さ 5 mil (1 mil=1/1000 inch) のテープで、通常のセロファンテープと比較すると張りがあり、菌を採取しやすいという特徴がある。Fungi-Tape<sup>TM</sup> は、滅菌されていないため、集落の汚染の危険が危惧される。従って、あらかじめ同一検体につき 2 本のサブロー・ブドウ糖斜面寒天培地で培養し、その 1 本について経時的に Fungi-Tape<sup>TM</sup> で観察した。Fungi-Tape<sup>TM</sup> は、使用后ポリ袋などに入れ保存することにより、汚染は最小限に止めることが出来た。また MycoPerm-Blue<sup>TM</sup> は lactophenol cotton blue と polyvinyl alcohol を混合した新しい染色固定液である。臨床分離株の同定に、これらの製品を用いて有用性を検討した報告はないので検討した。

同定結果の平均値は、従来の方法より 73.4% と劣った

が、*T. rubrum* 以外では、100% の一致率が得られた。また、集落の性状が初期から絨毛状であるものや、培養期間が 3 カ月以上経過し絨毛性変異をきたした *T. rubrum* では、今回の簡便な方法での同定は困難であった。

Fungi-Tape<sup>TM</sup> と MycoPerm-Blue<sup>TM</sup> による方法は、①経時的に分生子を観察する場合にも便利であり、②肉眼的な集落の特徴を観察しながら、その部位の顕微鏡的特徴を観察することができる、③lactophenol cotton blue 標本と比較すると、マニキュア処理が不要で簡便である、④一晩乾燥すると、染色性および透明度が若干低下するものの、最長 24 カ月保存した後も、同定にほとんど影響せず長期間保存ができるなどの利点がみられたが、欠点としては①lactophenol cotton blue と比較すると染色性がやや劣り、②冬期、室温の低い状態で標本を作製すると細かい泡が入ることがあり、やや顕微鏡上の解像度が低下した。

病原真菌の同定は手技が煩雑で、時間がかかるという問題点が残されており、より迅速で確実に同定できる製品の出現が望まれていた。Fungi-Tape<sup>TM</sup> と MycoPerm-Blue<sup>TM</sup> を使うことで日常の検査の煩雑な手技を削減できるものと考えた。

## 文 献

- 1) Harris JL: Safe, low-distortion tape touch method for fungal slide mounts. *J Clin Microbiol* **38**: 4683-4684, 2000.
- 2) Urzi C, De Leo F: Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monument surfaces. *J Microbiol Methods* **44**: 1-11, 2001.
- 3) Curtis JW: Preparation of permanent stained slide cultures. *Arch Dermatol* **91**, 1965.
- 4) 庄司昭伸, 鈴木博信, 西野秀夫: 長期保存可能な直接鏡検標本の作成方法. 真菌症-Thinking Forum OSAKA, 2001.

## A Simple Method to Identify Pathogenic Fungi in Sabouraud's Glucose Agar Slant Culture Using Fungi-Tape<sup>TM</sup> and MycoPerm-Blue<sup>TM</sup>

Yumie Ogasawara<sup>1</sup>, Masataro Hiruma<sup>2</sup>, Masahiko Muto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Biomolecular Recognition,  
Yamaguchi University School of Medicine,  
1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi, 755-8505 Japan

<sup>2</sup>Department of Dermatology, Juntendo University School of Medicine,  
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8421 Japan

Pathogenic fungi can be identified by growth in special culture medium, colony appearance based on microscopic examination of conidia and hyphae, and by molecular biological techniques. However, these methods are time-consuming and labor-intensive.

We describe a simple method for identification of pathogenic fungi from Sabouraud's glucose agar slant culture, using Fungi-Tape<sup>TM</sup> and MycoPerm-Blue<sup>TM</sup>. It is rapid and easy, and permits visualization of fungal morphology. Using the Fungi-Tape<sup>TM</sup> and MycoPerm-Blue<sup>TM</sup> technique, we correctly identified 47 of 66 samples, for a 73.4% concordance with conventional identification methods. It is also noteworthy that slides prepared using this method can be stored for long periods without deterioration.