

## [症 例]

癌患者胆汁から培養検出された *Rhizomucor variabilis* の同定と問題点入村健児<sup>1)</sup>・野中修一<sup>1)</sup>・宮副由梨<sup>2)</sup>・西村和子<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 国立病院機構 佐賀病院検査科, <sup>2)</sup> 同内科\*<sup>3)</sup> 獨協医科大学医学部微生物学講座, 株式会社ファーストラボラトリーズ

\* 現在は日本赤十字社長崎原爆諫早病院内科

(平成 23 年 6 月 1 日受付, 平成 23 年 8 月 9 日受理)

黄疸のある浸潤性腎盂癌患者の経皮経肝胆管ドレナージ液を培養した結果, 細菌 2 菌種, *Candida albicans* および接合菌 1 菌種が分離された。この接合菌は生育が早く, 隔壁の少ない太い菌糸からなる灰黄色で綿状の集落を形成し, 菌糸に厚膜胞子を形成した。胞子嚢柄は無色, 少ないが枝分かかれし, 基部に仮根はなかった。胞子嚢は黄褐色, 球形, 胞子嚢下部にアポフィシスはなかった。胞子嚢胞子は形, 大きさが著しく多様であった。これらの形態は *Rhizomucor variabilis* に酷似し, 最高生育温度が 38°C である点も一致した。ITS 領域の配列は *R. variabilis* と 100~99% 一致した。以上から, 本分離株は *R. variabilis* と同定された。胆汁スマア-の HE および PAS 染色標本においてカンジダの仮性菌糸, 出芽胞子と共に太い菌糸と厚膜胞子が認められた。また培養した接合菌の集落から作成したスマア-の HE および PAS 染色でも太い菌糸と厚膜胞子が認められた。すなわち, 本分離菌は混合感染の原因菌種の一部と推定された。われわれの調べた限りでは胆汁から接合菌が分離培養された例はなく, *R. variabilis* の内臓検体からの報告もない。中国において本菌種による皮膚接合菌症が報告されており, 最近本邦でも同症が現れている。今後, 内臓接合菌症の培養検査とスマア-検査を積極的に行う必要がある。

**Key words:** *Rhizomucor variabilis*, 内臓接合菌症, 胆汁スマア-, HE 染色

接合菌症は内臓真菌症の本邦剖検例では 4 番目に多い内臓あるいは全身の日和見真菌感染症である。原因菌種は多岐に渡るが, 本邦では専らム-コル目に属する以下の菌種, *Rhizopus* spp. (主に *R. oryzae*, *R. microsporus* var. *microsporus*), 同率で *Cunninghamella* spp. (主に *C. bertholletiae*), 次いで *Mucor* 属, *Rhizomucor* 属が分離されている<sup>1)</sup>。本邦では *Absidia corymbifera* のヒトからの分離の報告はない。実際には培養検査が実施されなかったか, 培養されても分離菌の菌属菌種が同定されなかった症例は約 93% に及び<sup>1)</sup>, 未報告の症例も多いので, 菌種の内訳, 順位は明確ではない。理由としては, これら菌種の鑑別が困

難な点にある。剖検時に培養検査がなされなかったことにも一因がある。海外では培養検査で属と種が決定された症例は 50%<sup>2)</sup> で, 多い順に *Rhizopus* spp. (特に *R. oryzae*. 次いで *R. rhizopodiformis* (*R. microsporus* var. *rhizopodiformis* の前名)), *Mucor* spp., *C. bertholletiae*, および *Absida* と *Apophysomyces* である。またアメリカ合衆国に限ると, 2009 年時点までに培養検査がなされた 190 症例を対象とした統計では多い順から *R. oryzae*, *R. microsporus*, *Mucor circinelloides*, *A. corymbifera* (*Mycocladius corymbifer* として), *C. bertholletiae*, *Rhizomucor pusillus* が分離されている<sup>3)</sup>。

今回, われわれは腎盂に原発し周囲臓器に浸潤性拡大あるいは転移した末期癌患者が黄疸を発症したので減黄目的で経皮経肝胆管ドレナージ (PTCD) を行い, 得られた胆汁の培養を行った結果, グラム陰性桿菌, 酵母菌および糸状菌を多数得た。われわれが調べた限りでは胆汁からの接合菌の分離例は報告がなかったの

著者連絡先: (〒849-8577) 佐賀市日の出町 1 丁目 20-1  
国立病院機構 佐賀病院検査科  
入村健児  
TEL: 0952-30-7141  
FAX: 0952-30-1866  
E-mail: k-irimura@saga-nh.hosp.go.jp

で、この分離菌の同定検査を進めると同時に、胆汁スメアーに認められた真菌要素と真菌分離菌株の比較検証を行い、分離菌は本邦では極めてまれな接合菌種 *Rhizomucor variabilis* と同定した。本論では菌種同定とスメアー菌要素の判定と、それらの問題点についても報告する。

#### 接合菌が培養された症例の概略

69歳女性。腎盂癌の化学療法を受けるために国立病院機構佐賀病院内科に入院、約2カ月半後に退院した。退院後、免疫療法を受けるも約1カ月後に黄疸が出現、すでに、肝、十二指腸、総胆管、大動脈、右腎動脈、下大静脈に浸潤を認め、再入院した。この時点で、末梢血白血球 11,300/ml、血清総ビリルビン値 11.95 mg/dl、CRP 18.65 mg/dl、肝機能テスト値の悪化、貧血の増強を認めた。再入院第8病日には胆嚢炎の徴候が明らかとなり、全身状態の悪化とともにこれらのデータはさらに悪化していったので、第10病日に減黄目的でPTCDを施行した。この時に得られた胆汁の培養検査とスメアーによる細胞診を行った。患者は第43病日に永眠された。

#### 検査材料と方法

##### 微生物学的検査

一般細菌検査用として、ヒツジ血液寒天培地 (Becton, Dickinson (BD)), 乳糖加寒天培地 (BD), HK 半流動生培地 (極東) および MRSA (特)-CFX 寒天培地 (日研) を常法どおり用い、真菌用としてクロモアガーカンジダ (関東化学) を用いた。クロモアガーカンジダにて 35°C, 2日間培養後、さらに 25°C, 5日間培養を続行し生育してきた淡黄灰色の綿状集落を釣菌して純粋培養株とした。顕微鏡形態の観察を目的にクロモアガーカンジダを用いてスライドカルチャーを施行、25°C, 5日間培養し、ラクトフェノールコットンブルーで包埋した。また別途、この綿状菌株 (FL10-0023) は詳細な形態検査のために (株) フェーストラボラトリーに送られた。同社ではポテトデキストロース寒天 (PDA) (Difco, BD) 平板、25°C, 6日間培養を行い、綿状菌体を2本の柄付き針ですくいあげ、ラクトフェノールにて包埋してかき取り標本作製した。生育温度テストは PDA 斜面培地で 25°C, 35°C, 37°C, 38°C, 39°C で7日間培養し、肉眼で生育を観察した。

##### スメアー標本の作製

胆汁のスメアーを引き、常法どおりにババニコロウ、過ヨウ素酸シッフ反応 (PAS), ヘマトキシリン-エオジン (HE) の各染色を行った。さらに、胆汁スメ

アー標本に観察された菌要素と照合するために、PDA とクロモアガーカンジダの平板培地にて 25°C, 7日間培養された菌体からかき取った菌糸体をスライドガラスに張り付け、胆汁スメアーと同様の方法で、HE, PAS およびグラム染色標本作製した。

##### 分子生物学的解析とプラストサーチ

FL10-0023 を常法に従い、リボソーム RNA 遺伝子の Internal transcribed spacer (ITS) の全領域 (ITS1-5.8S-ITS2), およびその前後の 18S と 28S を含めて、計 634 塩基の配列を解析した。DNA 抽出は Gen とるくん™ (酵母用) High Recovery (TAKARA Cat. No. 9082) を用い、PCR 増幅様プライマーとしては ITS-5 と ITS-4 をセットで用いた。電気泳動により得られたバンドから、DNA 配列を読み取り、国立遺伝学研究所ほか、世界的な DNA データベースが統合されている National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool (NCBI/BLAST), U.S.A. のデータベースに照合した。

#### 結 果

##### 分離培養検査結果

胆汁をクロモアガーカンジダに塗抹接種し、35°C, 48時間培養後、25°C, 5日間培養した結果、淡灰黄色の綿状集落が培地全面を覆うように生育してきた。裏面から見ると培地は黄色を帯びていた。これらの綿状集落の下には白色酵母様集落が約 100 個認められ (図 1), 単離後の呈色反応により *Candida albicans* と同定された。

一般細菌検査においては *Stenotrophomonas maltophilia* および *Pseudomonas fluorescens* がそれぞれ +3 検出され、*C. albicans* と FL10-0023 は集落数としてはそれぞれ +1 であった。

##### 形態学的所見

FL10-0023 は病原真菌の標準的な培地の一つ PDA 平板に1点接種され、25°C 培養すると6日目には培地全面に広がり、僅かに黄色を帯びた灰色、気中菌糸が綿状に生育し菌苔の厚さは 1 cm 以上になった。裏面は淡黄色を帯び中心部は灰褐色を帯びていた。

スライドカルチャーでは種を同定するに至らなかった。かき取り標本で各菌要素の詳細を観察した結果は図 2, 3 に示した。菌糸は太く、幅は約 20 μm まで、菌糸壁は無色、内部に黄色の油滴状顆粒が観察された。隔壁はほとんどないが、わずかに胞子囊柄が立ち上がる部分にのみ認められた。胞子囊柄は無色、わずかに枝分かかれし、胞子囊は淡黄色～淡黄褐色、球形、大き

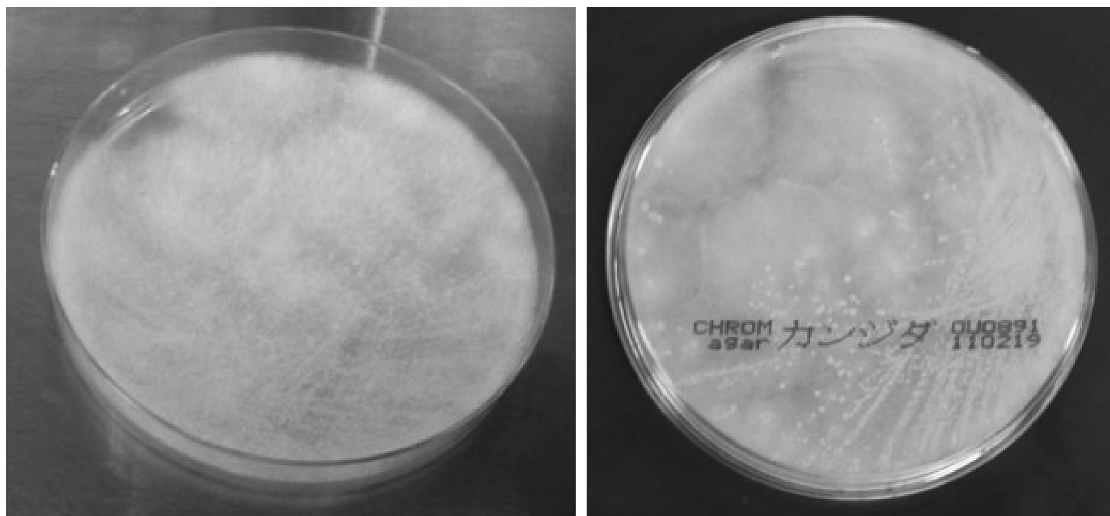


図 1. 胆汁培養結果. クロモアガーカンジダに塗抹し, 35°C, 2日間培養, つづいて 25°C, 5日間培養後の所見。灰黄色, 綿状集落が多数生じ, 融合して培地ほぼ全面を覆っている (左)。培地の裏面には白色クリーム状の酵母集落が透見される。

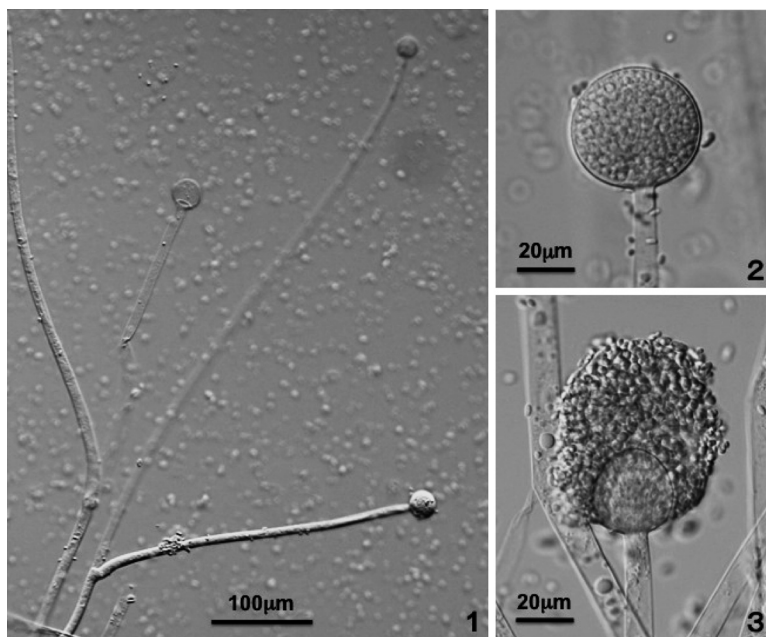


図 2. かき取り標本の顕微鏡所見, PDA, 25°C, 6日間培養, ラクトフェノール包埋。1. 孢子嚢柄, 根本近くで枝分かれている。2. 淡黄褐色の孢子嚢, 直下の柄にはアポフィシスはなく, むしろわずかにくくれている。3. 成熟し, 破れかけている孢子嚢, 孢子嚢膜と孢子嚢胞子の集塊は淡褐色, 柱軸は丸みを帯びたドーム形, 壁は褐色である。

さは約 80  $\mu\text{m}$  まで, 孢子嚢柄が孢子嚢に移行する部分はわずかにくくられ, 柱軸は淡黄褐色, 亜球形, ややドーム形, 孢子嚢膜が付着していた部分には小さいカ

ラーが残っていた。孢子嚢胞子は無色, 大きさ, 形は際立って多様で, 楕円形を中心として亜球形, 長楕円形, ソーセージ形, 腎臓形など不定形, 長径は 13  $\mu\text{m}$

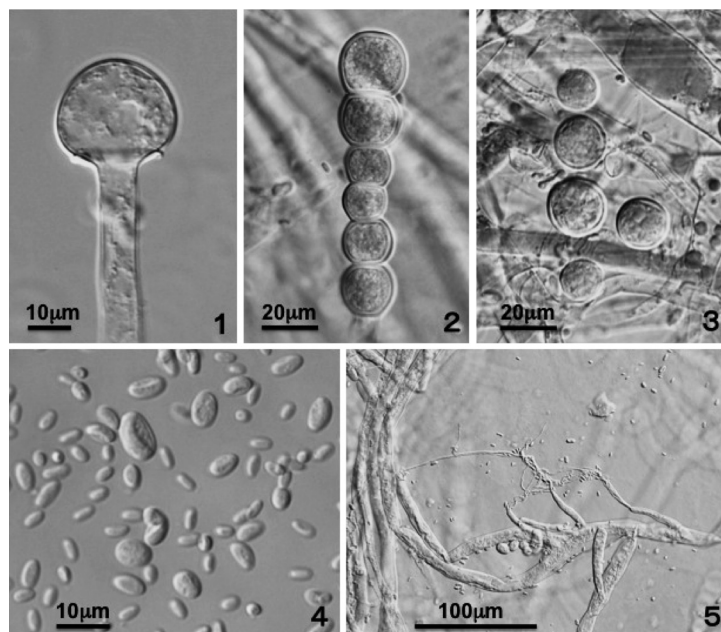


図 3. かき取り標本の顕微鏡所見, PDA, 25°C, 6 日間培養, ラクトフェノール包埋。1. 丸みを帯びたドーム形柱軸, 基端に小さいカラーが残っている。2. 連鎖している厚膜胞子, 細胞内容は淡黄色を帯びる。3. 遊離している厚膜胞子。大小の黄色顆粒あるいは液包様構造を有する菌糸, 細胞質全体が黄色を帯びる菌糸が認められる。4. 胞子嚢胞子, 大きさ形が極めて多様である。遊離した個々の胞子は無色である。5. 菌糸先端或はその側枝先端からごく細い菌糸が生じて束状に集ったり, 小さくとぐろを巻いている。

まで, 短径は  $6\mu\text{m}$  までであった。菌糸様の仮根とその先端からごく細い菌糸が束状, あるいは小さくとぐろを巻いていた。いずれも壁は無色であった。スライドカルチャー標本では観察できなかった厚膜胞子が菌糸に介在性あるいは先端に単生あるいは連鎖していた。菌糸から遊離しているものもあった。厚膜胞子は長短の円筒形, 台形, 楕円形, 球形など種々で, 大径は  $30\mu\text{m}$  に及んでいた。壁は厚く無色, 多くは内部の細胞質が淡黄色であった。以上の所見から, *Rhizomucor variabilis* と *Mucor* 属の複数菌種が候補に挙げられたが, 特に胞子嚢胞子の多様性は *R. variabilis* の記載と最もよく一致し<sup>4,5)</sup>, 記載されている *Mucor* 属菌種とはいずれも一致しなかった<sup>5,6)</sup>。

#### 生育温度

本菌株は 25 から 35°C までは良好に生育, 37°C ではやや抑制され, 38°C が最高生育温度であった。ちなみに *R. variabilis* の最高生育温度は 38°C<sup>4,5)</sup>, *Mucor* 属菌種は *M. indicus* の 42°C を除き, 他の病原菌種は 37°C 以下である<sup>5)</sup>。

#### 胆汁スメアー標本の所見:

施行した 3 染色の中で HE 染色において最も多くの桿菌と真菌要素が認められ, それらはヘマトキシリ

ン好性であった。HE に濃染した仮性菌糸, 仮性菌糸の括れた隔壁部から出芽した分生子および長楕円形細胞からの二次的な出芽, 遊離の類滴形, および楕円形分生子が出芽する像が多数認められ, これらは *Candida* 属と思われた。また, HE にやや濃染あるいは淡染する太く, 壁の薄い菌糸があり, 変形したり, ほぼ直角に分枝するものもあった。その中に HE に濃染した厚膜胞子の連鎖と思われる菌要素, および遊離した大型, 球形, 厚壁の細胞があり, これらは *C. albicans* のコーンミールツイーン 80 培地など特殊培養で観察される厚膜胞子とは大きさが明らかに異なり, 太い菌糸に介在性に形成されていることから, 培養された接合菌 FL00-0023 に由来すると思われた (図 4)。PAS 染色では *Candida* 属と思われる菌要素は PAS 陽性に染まり, ヘマトキシリンに淡染する接合菌由来の太い菌糸と厚膜胞子が少数散在していた。細菌がほとんど染まっていないために観察しやすかった。パバニコロウ染色では共染する生体成分が多過ぎて真菌要素の判別は困難であった。

#### 菌体かき取り標本の所見

FL10-0023 の培養菌体の染色標本では, HE 標本においてはやや濃染した幅の広い, リボン状の菌糸,



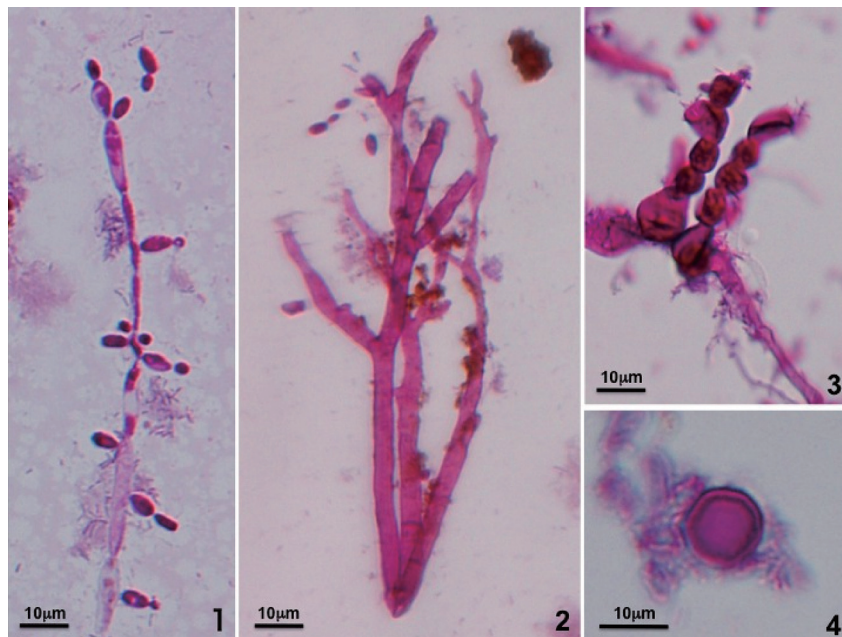


図 4. 胆汁のスマアの菌要素，HE 染色。1. カンジダと思われる仮性菌糸，出芽胞子が認められる。2. 枝分かれます太い菌糸，隔壁様に見える部分の多くは薄い菌糸壁が襞状にたたまれたためで，真の隔壁は少ない。上方左に小数散在する濃紫紅色の楕円形胞子は出芽が認められカンジダと推定される。3. 厚膜胞子，あるいはなりつつある細胞細胞の連鎖。4. 遊離した厚膜胞子，いずれの写真でも菌要素にはヘマトキシリンに染まった桿菌が多数付着している。

および濃染した厚膜胞子が散在していた。PAS 標本ではヘマトキシリンに淡染した太い菌糸，PAS に濃染した厚膜胞子が多数認められた (図 5)。これらの所見は胆汁スマアで接合菌に由来すると推測された菌要素とほぼ一致していた。グラム染色では胞子嚢胞子は染色されず，菌糸も淡青色になっている部分もあったが，傾向としては無染であった。小数濃い赤紫色に染まっている 7 mm 前後の球形細胞があったが，壁の厚さは識別できないので厚膜胞子と断定できなかった。

#### リボソーム RNA 遺伝子，ITS 領域のブラストサーチの結果

100% 一致する配列は *Rhizomucor variabilis* 2 配列 (Accession numbers: EF583637 and HM639968)，いずれも中国の皮膚接合菌症の分離菌由来であった，*Rhizomucor* sp. が 1 配列であった。99% 一致は *R. variabilis* タイプ株 CBS 109.93 (Ac. No.: DQ110006) を含めて 5 配列あり，その中の 3 配列は中国の皮膚接合菌症からの分離株に由来，ほかは非臨床分離株であった。98% 一致は *R. variabilis* 13 配列，多くは中国の皮膚接合菌症からの分離株に由来していた。同じ

くブラストサーチによる樹形図で本菌株は *R. variabilis* のクラスターに位置していることが確認された。

以上の形態学所見，最高生育温度，ITS 領域のブラストサーチから，PTCD で得られた胆汁分離菌 (FL10-0023) は *Rhizomucor variabilis* と同定された。また，同胆汁のスマア標本中の太い菌糸と大型の厚膜胞子は本分離菌株に由来すると判断された。

#### 考 案

日和見感染症として発症する接合菌症は鼻脳型，肺型，胃腸型に大別されるが前 2 型が多く，胃，小腸，大腸の壁とそれらに隣接する組織・臓器が侵されるのは比較的まれで 7%<sup>2)</sup>，小児科領域では 21% と報告されている<sup>7)</sup>。

消化器に関連して肝接合菌症は胃腸型接合菌症から転移性あるいは連続性に発症したり，あるいは播種型接合菌症の一部とされている<sup>8)</sup>。頻度に関する報告は少なく約 5% とされているが<sup>9)</sup>，播種型接合菌症の部分病巣は記載されていない場合があり，実際はもっと多いと推測される。本邦においてもデスフェリオキサ

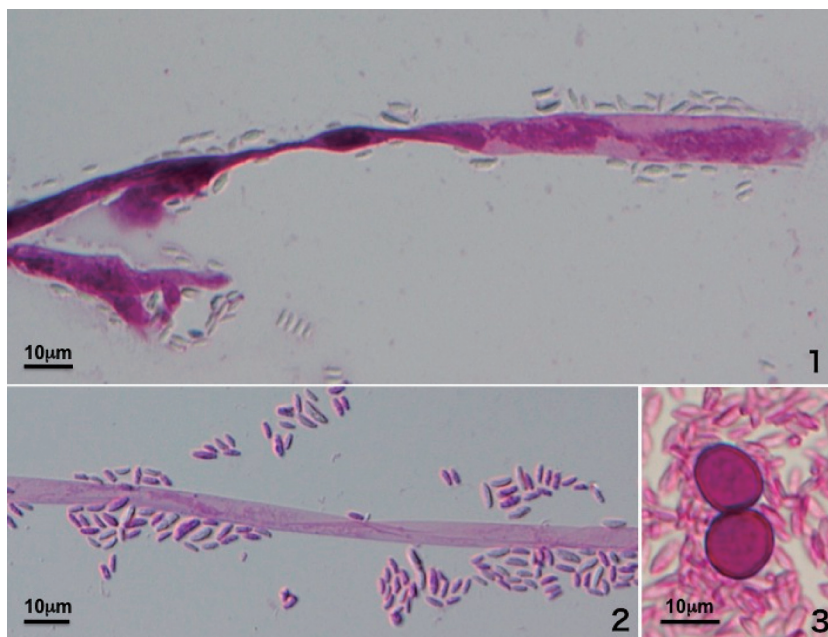


図5. 培養菌体のスマアースペー。1はPDA, 25°C, 7日間培養, HE染色, 2はクロモアガー, 3はPDAにて25°C, 7日間培養, 2, 3共にPAS, 染色。1. 太い菌糸, 振じれている部分がある。胞子嚢胞子は無染である。2. PASに淡染した太い, リボン状の菌糸, 3. PASに濃染した厚膜胞子, 胞子嚢胞子はPAS陽性と陰性がある。PAS陽性の胞子は壁の染色性は不均一で, むしろPAS陽性物質を吸着した可能性がある。

ミン投与中の血液透析患者の剖検例における胃腸型接合菌症<sup>10)</sup>, あるいは急性白血病に発症した播種型接合菌症における胃腸管出血の報告がある<sup>11)</sup>。森らによる2002年までの疫学的統計では胃腸型接合菌症の割合は示されていないが, 同著者らの文献リストから少なくとも10例(約5%)あり<sup>1)</sup>, 本邦でも胃腸型と播種型の一部には肝接合菌症が存在していた可能性がある。

本例においては生前に胆道系感染の徴候は明らかであったが, 胆汁中からは2種の細菌と2種の真菌が培養されたので病原菌を特定することは困難であった。がん末期の抵抗が著しく弱くなった状態における複合感染と見なされた。患者容態が悪いためバイオプシーによる病理組織学検査と培養検査はなされず, 真菌感染の確証はなく, さらに剖検もなされなかったので分離された接合菌が肝内胆管壁, 肝臓実質あるいは浸潤癌組織内, 腹腔内に侵襲性に増殖していたかは不明である。しかしながら, 胆汁中の集落数は+1であっても, バイオマス量としては大きく, スマアースペーでは太い菌糸や厚膜胞子を認め, *Candida albicans*とともに少なくとも肝内胆管内で増殖していた証拠と考えられ, 病原菌の一部と見なされる。

われわれが調べた範囲では胆汁からの接合菌の分離例は世界的にも報告がない。肝接合菌症の報告例にも胆汁の培養検査の試みはなく, 今回の分離例が初めてと思われる。重症の免疫不全患者における *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. 感染では種々の侵入門戸から血液感染や全身播種が発生し, 肝臓, 胃腸管に波及したり, まれであるが胃腸管や肝臓に初発感染を起こすことが知られている。一方, 上述したように接合菌類では, たとえ高頻度とは言えないまでも胃腸管を原発巣とする感染が特徴的であり周囲臓器や腹腔腔への感染波及, さらに肺, 鼻腔, 副鼻腔, 皮膚感染から全身播種の結果として肝臓に感染を惹起することもある。本例においては胆汁スマアースペーで接合菌と *Candida* と思われる菌要素が認められ, 培養結果を裏づける結果が得られている。観血的に採取されたバイオプシーや手術組織ばかりでなく, 非観血的に採取された胃腸液, 胆汁, 糞などの培養やスマアースペー検査においても糸状菌に注意を払うべきである。特に接合菌類は生薬内服に関連した肝接合菌症, デンプン類を基材とする内服薬, 静脈内留置カテーテルの固定用当木として使用された木製舌圧子などを原因とする腸管接合菌感染の院内エンデミーも報告されており, 本邦においても今

後注意が必要である<sup>12, 13)</sup>。

今回、胆汁スメアールの真菌観察に HE 染色が有用であることが示された。組織中の真菌の検出にはグロコット・メセナミン銀硝酸塩 (GMS) と PAS の各染色に定評がある。しかしながら接合菌類の場合は、PAS は弱陽性あるいは陰性であり、ヘマトキシリンに淡染するのでむしろ HE のほうが良いとされている。本例では GMS 染色は施行されなかったため比較できなかったが、接合菌の菌糸と厚膜胞子は HE と PAS 染色で検出できた。胆汁のように液状サンプル中の真菌の染色には接合菌類ばかりでなく、カンジダの染色にも HE を適用できることが示された。

*Candida albicans* はツイン 80 添加コーンミール培地などで厚膜胞子を形成する特徴があるが、感染組織内や採取された体液中で観察された記録はない。一方、Kimura ら<sup>14)</sup> は *Rhizopus* sp. による肺空洞に連結した気管支腔内 colonization および片腎に転移感染巣のある 1 症例において気管支内と腎病巣の両方に典型的な接合菌菌糸と大型厚膜胞子 (chlamydoconium 厚膜分生子として) を報告し、厚膜胞子は菌糸介在性や先端、あるいは遊離していたと述べている。この報告は、PTCD で得られた胆汁スメアール中の厚膜胞子も分離培養された接合菌に由来し生体内で厚膜胞子を形成したというわれわれの結論を支持している。

接合菌類の培養と観察には PDA<sup>6)</sup> あるいは麦芽エキス寒天培地<sup>5)</sup> が推奨されている。*Mucor* および *Rhizopus* の各属菌種はこれら培地上で菌糸介在性あるいは先端に厚膜胞子を形成し、やがては遊離して円筒形、樽形、楕円形、球形の厚膜胞子となる。今回の分離菌も PDA で同様の厚膜胞子を形成している。ただし、一次培養と培養菌スメアール作製に用いたクロモアガーでは厚膜胞子が観察されなかったため、厚膜胞子の観察には PDA を推奨したい。

医真菌学領域では顕微鏡形態を観察するためにスライドカルチャーがしばしば行われている。接合菌類では、カバーガラスを除く前にふたを取ってシャーレごと顕微鏡鏡台に置き、弱拡大で胞子囊柄の枝分かれ状況、胞子囊の形態、色を確認できる。しかしながら、包埋のためにカバーガラスをピンセットで持ち上げると、カバーガラスの下面に成長した菌糸は培地に残ってはがれてしまい、時には成長が余りにも速いためにカバーガラス上面に回った菌糸のみが残るといったことが経験される。また、医真菌学の常法として用いられるラクトフェノールコットンブルーで包埋すると本来の色調がわからなくなる。胞子囊はほとんどが破れ

てしまい胞子囊胞子は集塊としてとどまるので、柱軸、胞子の形態、色、表面構造を見極めにくくなる。PDA 平板培地で培養し、柄付き針 2 本を用いて菌糸体をごく少量すくうようにかき取り、あらかじめスライドガラス上に滴下しておいたラクトフェノール液に浮かべてカバーガラスを被せた標本では形態学的性状を詳細に検討できた。セロテープ法も接合菌類の観察には便利であるが、胞子の詳細な観察には不向きである。かき取り法は一次培養にも適用でき、特別な準備は要らないので、迅速、簡便な方法である。

今回、胆汁から分離培養された接合菌は、形態学的に仮根と対生して成長する非分枝性、褐色の胞子囊柄が観察されないことから、*Rhizopus* 属は否定され、アポフィースがないことから *Absidia* 属でないことは明らかであった。胞子囊柄は少ないながら枝分かれし、発達した仮根がないことから *Mucor* 属あるいは *Rhizomucor* 属菌種が考えられた。*Mucor* 属菌種は多くの場合、菌糸内に黄色の液包あるいは顆粒が認められ、菌体外にも色素が拡散し培地を黄変させる。胞子囊柄は通常無色、菌種によって枝分かれが多かったり少なかったりする。各枝の先端にはアポフィースがなく、むしろわずかにくくられて細まっている。胞子囊は球形、亜球形、黄褐色から褐色、黒褐色、黒色、胞子囊膜が破れると膜付着部 (柱軸移行部へわずかに移行した部分) にカラーが残っている。厚膜胞子を産生する菌種が多い<sup>5, 6)</sup>。最高生育温度は、*M. indicus* は 42°C であるが、主要病原菌種 *M. circinelloides* は 37°C、*M. ramosissimus* は 36°C であり、他のまれに皮膚病巣から分離される菌種は 30~32°C である<sup>5)</sup>。すなわち、今回の分離株は *Mucor* 属を疑わせる形態的特徴があるが、胞子囊胞子が著しく多型で、*Mucor* のいずれの種とも明らかに異なっていた<sup>5, 6)</sup>。

一方、本邦でも臨床から少ないながら分離されている *Rhizomucor* 属の主要病原菌種 *R. pusillus* は、灰褐色のやや扁平な集落を形成、表 1 に示したように胞子囊柄が褐色、胞子囊胞子の形態は比較的均一で本菌株より小さく、最高生育温度は高く、FL09-0023 とは明らかに異なっている。*R. miehei* は胞子囊がやや小さく、接合胞子を形成すること以外は *R. pusillus* とよく似ている<sup>5)</sup>。すなわち、本菌株はこの 2 菌種ではないと判定された。一方、*Rhizomucor variabilis* は黄白色、淡黄褐色、シャーレを満す綿状の集落、裏面は淡黄色、淡黄褐色など黄色味を帯び、胞子囊柄は無色、長ささまざま、枝分かれが少ない、多くはアポフィースがない、胞子囊は球形あるいはやや扁平、灰色、柱軸は多様で球形、卵形、洋梨形、円筒形、

表 1. 胆汁分離株 (FL10-0023) と *Rhizomucor* 属菌種の形態学的性状および最高生育温度の比較

菌種	胞子嚢柄	胞子嚢	柱軸	胞子嚢胞子	厚膜胞子	仮根	最高生育温度
<i>Rhizomucor miehei</i> <sup>5)</sup>	仮軸分枝, 褐色, アポフィースシスなし。	灰色, 球形, 50 (~60) $\mu\text{m}$ まで。	逆卵形, 洋梨形, 28 $\times$ 25 $\mu\text{m}$ まで, カラー小さいかほとんどない。	亜球形, 楕円形, 無色, 平滑, 3~4 $\mu\text{m}$	なし	ストロンから, 細かい菌糸様, あまり発達しない。	58 $^{\circ}\text{C}$
<i>Rhizomucor pusillus</i> <sup>5)</sup>	無分枝, 不規則分枝, 褐色, アポフィースシスなし。	灰色, 球形, (80~100) $\mu\text{m}$ まで。	逆卵形, 洋梨形, 45 $\times$ 38 $\mu\text{m}$ まで, 淡褐色, 灰色, カラー小さいかほとんどない。	亜球形, 長楕円形, 無色, 平滑, 3~4 $\mu\text{m}$	なし	ストロンから, 細かい菌糸様, あまり発達しない。	54~58 $^{\circ}\text{C}$
<i>Rhizomucor variabilis</i> <sup>4,5)</sup>	仮軸分枝, しばしば主軸より長い。無色, 長短著しい, アポフィースシスなし。	灰褐色, 球形, 35~106 $\mu\text{m}$	球形, 卵形, 楕円形, 円筒形, 不整形, 23.5~71 $\times$ 26.0~82.5 $\mu\text{m}$ , 無色から褐色, オレンジ褐色, カラー有りあるいは無し。	楕円形, 卵形, 長楕円形, 時にカーブ, 不定形, 2.5~11.5 (~16.5) $\times$ 2.0~7.0 $\mu\text{m}$ , 無色, 平滑。	単生, 鎖生, 集塊	細かい枝分かかれする菌糸様あるいはその集塊, 多い, 菌糸・ストロン・胞子嚢柄などから発生。	38 $^{\circ}\text{C}$
本菌株 (FL10-0023)	始め無分枝, 後にわずかに仮軸分枝, 無色, アポフィースシスなし。	淡黄色, 淡黄褐色, 球形, 81 $\mu\text{m}$ まで。	球形, 円錐形, 22~43 $\times$ 23~45 $\mu\text{m}$ , 無色から褐色, カラー小さい。	亜球形, 長楕円形, 時にカーブ, 腎臓形, 不定形, 3.2~12.9 $\times$ 1.6~5.8 $\mu\text{m}$ , 無色, 平滑。	単生, 鎖生, 集塊	ごく細かい枝分かかれする菌糸あるいはその束, 小集塊, 少ない, 菌糸側壁あるいは単生する根様菌糸先端から発生。	38 $^{\circ}\text{C}$

菌種の肩付き番号は引用文献を示す。



円錐形、瘤様に突起がある奇形などさまざま、カラーはあったりなかったりする。孢子嚢胞子も表に示したように極めて多様で、厚膜胞子は豊富、最高生育温度は38°Cである<sup>4,5)</sup>。本菌株は柱軸が比較的に一樣で奇形がないことを除けば、形態学的生理学的に本菌種とよく一致している。Zheng-Chen は菌糸、ストロン、孢子嚢柄などあらゆる部分から多数の仮根が発生、増殖して塊状にとぐろ巻いていると記載しているが<sup>4)</sup>、de Hoog ら<sup>5)</sup> は菌糸、ストロンから発生した、無色の細い根状菌糸を示しており、本菌株の所見と矛盾しない。

病原性接合菌類の遺伝子同定に関する研究として、リボソーム RNA 遺伝子 28S の D1/D2 領域塩基配列からデザインされたプライマーを用いた PCR 法により主要病原菌種間と関連非病原菌種の鑑別は可能となったが<sup>15)</sup>、*Rhizopus microsporus* の3変種間と *Rhizopus oryzae* の鑑別、および *R. variabilis* の同定法は開発されなかった。ITS 領域 (ITS1-5.8S-ITS2) の中で ITS1 の塩基配列によって病原性接合菌類は主要菌種、および *R. variabilis* を含めてまれば菌種が鑑別できるが<sup>16)</sup>、主要病原菌種 *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* は他の3変種と配列が完全に一致し、変種間の鑑別はできない。今回の分離株は一連の18S部分—ITS全領域—28S部分の配列から分子生物学的にも *R. variabilis* であることが確認された。

*R. variabilis* は1991年に中国における皮膚接合菌症からの分離菌に対して新菌種として記載され<sup>4)</sup>、以来、本菌種による皮膚接合菌症がしだいに蓄積され、いずれも免疫能に問題がないと記載されている<sup>17)</sup>。本邦においても2010年に高齢の糖尿病患者の両下肢に発生した皮膚接合菌症が報告されている<sup>18)</sup>。DNAデータベースから、中国、韓国などでは農業環境や水圏環境から本菌種あるいは少なくとも関連菌が分離されている。本邦においては環境分離の記録はないが、今後注意を払う必要がある。著者らが調べた限りでは、今回の本菌種分離は本邦第2例目、皮膚以外の臨床分離株としては世界的にみても第1例目である。抵抗力が著しく損なわれている患者では本菌種が内臓の検体から分離される可能性があるので注意を喚起したい。さらに、本邦では接合菌症は剖検で病理診断されることが多く、生前、剖検時共に培養検査は十分なされていない<sup>1)</sup>。培養検査とスメア検査は診断、病原性判定、遺伝子解析による菌種確定、薬剤感受性テストへとつなげる基本として臨床に不可欠であり、早期の生前診断に向けて積極的に取り組む必要性を強調したい。

## 文 献

- 1) 森 健, 江頭元樹, 川又紀彦, 他. 2003. 接合菌症: 2症例の報告および本邦報告例の統計. 真菌誌 44: 163-170.
- 2) Roden, M. M., T. E. Zaoutis, W. L. Buchanan, T. A. Knudsen, T. A. Sarikisova, R. L. Schaufele, M. Sein, T. Sein, C. C. Chiou, J. H. Chu, D. P. Kontoyiannis, T. J. Walsh. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: A review of 929 reported cases. Clin. Infect. Dis. 41: 634-653.
- 3) Alvarez, E., D. A. Sutton, J. Cano, et al. 2009. Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. J. Clin. Microbiol. 47: 1650-1656.
- 4) Zheng, R. Y. & G. Q. Chen. 1991. A non-thermophilic *Rhizomucor* causing human primary cutaneous mucormycosis. Mycosystema 4: 45-57.
- 5) De Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gene et al. 2000. Zygomycota, Mucorales and Mortierellales. p. 60-114. In: Atlas of Medical Fungi, 2nd ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures, the Netherland and Universitat Rovila i Virgili, Spain.
- 6) 三川 隆. 1991. 講座/真菌の分離と分類・同定 ⑦ *Mucor* 属. 防菌防黴誌 19: 193-202.
- 7) Zaoutis, T. E., E. Roilides, C. C. Chiou, W. L. Buchanan, T. A. Knudsen, T. A. Sarkisova, R. L. Schaufele, M. Sein, T. Sein, P. A. Prasad, J. H. Chu, T. J. Walsh. 2007. Zygomycosis in children: A systematic review and analysis of reported cases. Ped. Infect. Dis. J. 26: 723-727.
- 8) Padmanabhan, S., M. Battiwalla, T. Hahn, D. Ball, P. Paplha, K. Brown, B. H. Segal, P. McCarthy, J., N. G. Almyroudis. 2007. Two cases of hepatic zygomycosis in allogeneic stem cell transplant recipients and review of literature. Transplant Infect. Dis. 9: 148-152.
- 9) Ambrosioni, J., K. Bouchuiguir-Wafa, J. Garbino. 2010. Emerging invasive zygomycosis on a tertiary care center: epidemiology and associated risk factors. Int. J. Infect. Dis. 14S: e100-e103.
- 10) Kaneko, T, F. Abe, M. Lto, M. Hotchi, K. Yamada, Y. Okada. 1991. Intestinal mucormycosis in a hemodialysis patient treated with desferrioxamine. Acta Pathol. Jpn. 41: 561-566.
- 11) Suzuki, K., Y. Sugawara, T. Sekine, K. Nakase, N. Katayama. 2009. Breakthrough disseminated zygomycosis induced massive gastrointestinal bleeding in a patient with acute meloid leukemia receiving micafungin. J. Infect. Chemother. 15: 42-45.
- 12) Cheng, V. C. C., J. F. W. Chan, A. H. Y. Ngan, et

- al. 2009. Outbreak of intestinal infection due to *Rhizopus microsporus*. J. Clin. Microbiol. 47: 2834–2843.
- 13) Oliver, M. R., C. V. V. Wesley, M. Boeckh, et al. 1996. Hepatic mucormycosis in a bone marrow transplant recipient who ingested naturopathic medicine. Clin. Infect. Dis. 22: 521–524.
- 14) Kimura, M., V. I. Schadig, M. R. McGinnis. 1998. Chlamydoconidia formation in zygomycosis due to *Rhizopus* species. Arch. Pathol. Lab. Med. 122: 1120–1122.
- 15) Voight, K., E. Cigelnik, K. O'Donnell. 1999. Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. J. Clin. Microbiol. 37: 3957–3964.
- 16) Schwarz, P., S. Bretagne, J. C. Gantier, et al. 2006. Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. J. Clin. Microbiol. 44: 340–349.
- 17) Lu, X.-L., Z.-H. Liu, Y.-N. et al. 2009. Primary cutaneous zygomycosis caused by *Rhizomucor variabilis*: A new endemic zygomycosis? A case report and review of 6 cases reported from China. Clin. Infect. Dis. 49: e39–e43.
- 18) Tomita, H., E. Muroi, M. Takenaka, et al. 2010. *Rhizomucor variabilis* infection in human mucormycosis. Clin. Exp. Dermatol. 36: 312–314.

### Identification of *Rhizomucor variabilis* Isolated from a Bile Sample of a Cancer Patient

Kenji Irimura,<sup>1)</sup> Shuichi Nonaka,<sup>1)</sup> Yuka Miyazoe,<sup>2)</sup> Kazuko Nishimura<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Clinical Laboratory and <sup>2)</sup> Division of Internal Medicine, National Hospital Organization, Saga Hospital

<sup>3)</sup> Department of Microbiology, Dokkyo Medical University School of Medicine and First Laboratories Co., Ltd.

\* Present affiliation: Japanese Red Cross Nagasaki Genbaku Isahaya Hospital

A bile sample taken from an icteric patient with renal cancer by percutaneous transhepatic cholangio-drainage was cultured using several isolation media. A mucoralean zygomycete and *Candida albicans* were cultured together with two bacterial species. The zygomycete produced diverse sporangiospores in shapes and sizes, and large chlamydospores. Maximum growth temperature was 38°C. These findings coincided with *Rhizomucor variabilis* and the sequence on the ITS region was 100–99% identical with the species. The bile smear showed broad hyphae and large chlamydospores on HE and PAS preparations with pseudohyphae and budding spores of *Candida* sp. Although *R. variabilis* is mainly isolated from cutaneous zygomycosis in China, to our knowledge, this is the first isolation from internal organ samples throughout the world.