

【はじめに】

真菌症の原因となる真菌は多種にわたり、近年ヒトと同様に獣医療においても重要性が高まっている [1, 2]。今回、*Rhizopus* 属真菌による牛の第四胃潰瘍事例に遭遇したため、その概要を報告する。また、県内の真菌症の発生状況を把握するため、回顧調査を実施したのであわせて報告する。

【*Rhizopus* 属真菌による牛の第四胃潰瘍事例】

1 材料及び方法

令和3年2月3日に子牛が下痢を呈し、輸液及び抗生剤による治療でも回復せず、鑑定殺された。主要臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従いパラフィン包埋、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して鏡検した。第四胃に関しては、PAS染色、Grocott染色、ファンギフローラ染色の3種類の特殊染色を実施した。また、マウス抗*Rhizomucor*抗体 (Dako, U. S. A.)、ウサギ抗*Candida albicans*抗体 (Biogenesis, U. K.)、マウス抗*Aspergillus sp.*抗体 (Dako, U. S. A.) の3種類の抗真菌抗体を用いた免疫組織化学的染色(免疫染色)を、農研機構動物衛生研究部門に依頼した。

さらに分子生物学的検査として、病変部のパラフィン組織切片 (FFPE) から抽出したDNAを用い、rRNA遺伝子のITS (Internal transcribed apcer) 1領域及びD1/D2領域遺伝子の塩基配列の解析を行った。解析には、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を利用しBLASTによる相同性検索 (BLAST解析) を実施した。

病原検索では、糞便及び血清を用いて、下痢症状関連ウイルスである、牛ウイルス性下痢ウイルス、牛コロナウイルス、牛トロウイルス、A~C群牛ロタウイルスの遺伝子検査を病性鑑定マニュアルに沿って実施した [3]。また主要臓器及び糞便を用いた細菌分離を実施した。

2 結果及び考察

(1) 剖検所見

外貌は削瘦し、緑灰色下痢便の付着が認められた (図 1)。第四胃粘膜面に直径約 5cm、黒色、境界明瞭な茸状潰瘍があり、腹壁と癒着していた (図 2)。肺の中葉に暗赤色病変が認められた。第一胃の内容物は黄灰色で繊維片やおが粉を混じ、腐敗臭があった。胸腺は

ほとんど認められなかった。

(2) 病理組織学的検査

第四胃潰瘍では粘膜上皮は認められず筋層は壊死していた。第四胃と腹壁は癒着しており、その境界は不明瞭であった (図3)。癒着部では膠原線維増生、出血、水腫、真菌菌糸を伴う好中球主体の炎症像が認められた (図4)。腹壁側では、菌糸を伴う血管中心性の病巣が多数認められた (図5)。菌糸は太く内部が中空状で、分岐は少なく、明瞭な隔壁を持たず、PAS 染色及び Grocott 染色に陽性を呈し、ファンギフローラ染色で明瞭な蛍光は確認されなかった。免疫染色では、菌糸はマウス抗 *Rhizomucor* 抗体に陽性を示した (図6)。

(3) 分子生物学的検査

ITS1 領域遺伝子の BLAST 解析の結果、既知の *Rhizopus azygosporus*、*Rhizopus microsporus*、*Rhizopus sexualis* と 100%一致した。D1/D2 領域遺伝子は、*Rhizopus azygosporus* と 100%一致、*Rhizopus microsporus* と 99.4%の一致率であった。以上の結果から、本事例の原因真菌は *Rhizopus azygosporus* あるいは *Rhizopus microsporus* の可能性が高いと考えられる。両者は近縁であることが報告されており [4, 5]、BLAST 解析の相同性からは判別が難しく、種の同定には至らなかった。

(4) 病原検索

下痢関連ウイルスの遺伝子検査は陰性であった。細菌分離で有意菌は分離されなかった。



図1 外貌写真



図2 第四胃の肉眼写真

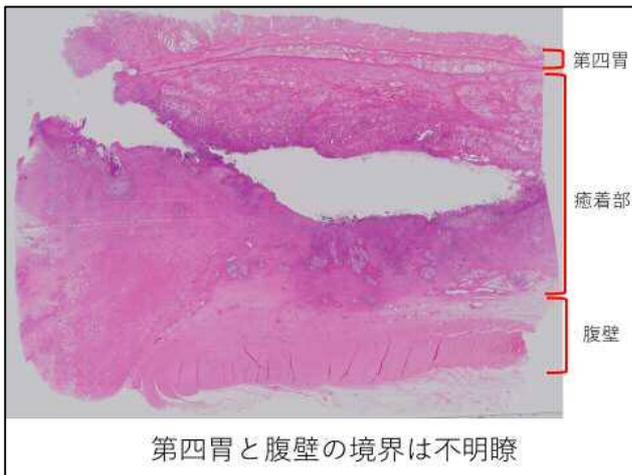


図3 第四胃潰瘍のルーペ像

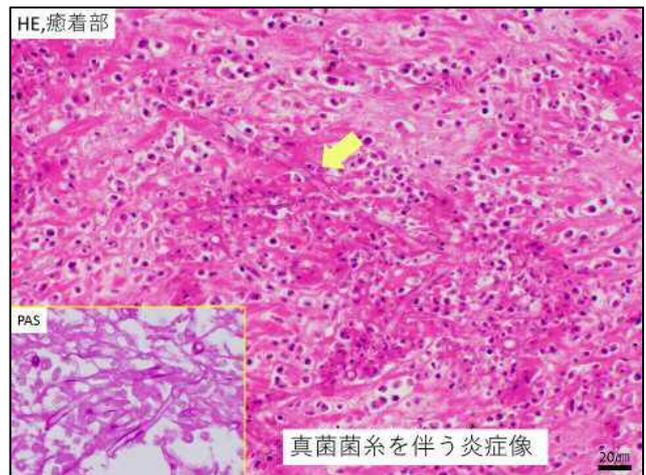


図4 第四胃潰瘍癒着部
菌糸（矢印）を伴う炎症像

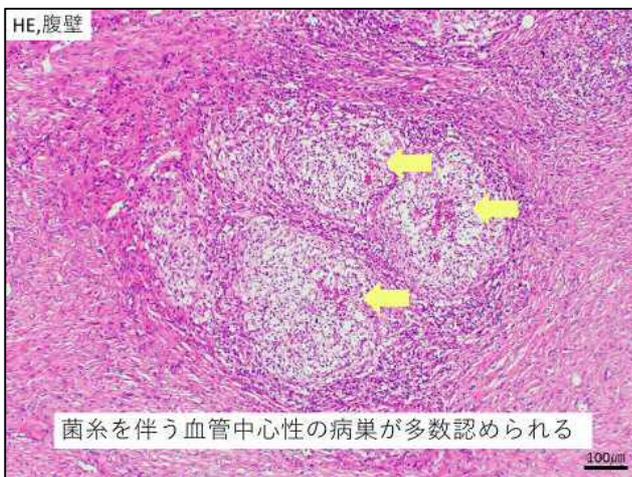


図5 第四胃潰瘍腹壁側
菌糸（矢印）を伴う血管中心性の病巣

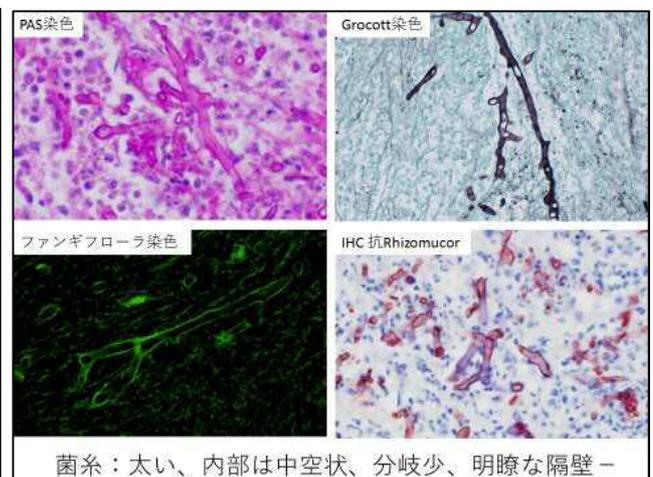


図6 特殊染色及び免疫染色結果

以上の結果から、本事例は *Rhizopus* 属真菌による第四胃潰瘍と診断された。*Rhizopus azygosporus* 及び *Rhizopus microsporus* が牛の病変部から検出された報告例は *Rhizopus microsporus* の2例[6, 7]のみであり、稀な事例である。潰瘍では器質化が認められ、真菌感染による傷害と修復を繰り返し、腹壁と癒着するに至ったと推察した。また、血管中心性の病巣が多数認められたことから、本真菌には既報や他の接合菌と同様に血管侵襲性があり[6, 7, 8, 9]、このことが重度の潰瘍を形成する一因となったと考えられた。

【真菌症回顧調査】

1 材料及び方法

平成29年度から令和3年度までの病性鑑定事例のうち、真菌が確認された17例(牛2例、豚13例、鶏2例)を対象とした。各病変部について前述の *Rhizopus* 属真菌による牛

の第四胃潰瘍事例と同様の手法により菌糸の形態観察及び同定を試みた。

2 結果及び考察

畜種ごとに下表に示す。

牛では *Aspergillus* と *Rhizopus* 属の事例が認められた (表 1, 図 7)。

鶏では *Aspergillus* と *Lichtheimia brasiliensis* の事例が認められた (表 2, 図 8)。

Lichtheimia 属はムコール科に属し、鳥類の呼吸器への *Lichtheimia* 属感染例は報告されているものの[10]、*Lichtheimia brasiliensis* の報告例はなかった。

表 1 回顧調査結果 (牛)

	発生部位	病理検査結果から考えられる真菌	BLAST	BLAST解析結果から考えられる真菌
牛 1	消化器 呼吸器	<i>Aspergillus</i>	○	<i>Aspergillus</i> 属
牛 2	消化器	ムコール	○	<i>Rhizopus</i> 属

表 2 回顧調査結果 (鶏)

	発生部位	病理検査結果から考えられる真菌	BLAST	BLAST解析結果から考えられる真菌
鶏 1	消化器 呼吸器	<i>Aspergillus</i>	ND	—
鶏 2	消化器	ムコール	○	<i>Lichtheimia brasiliensis</i>

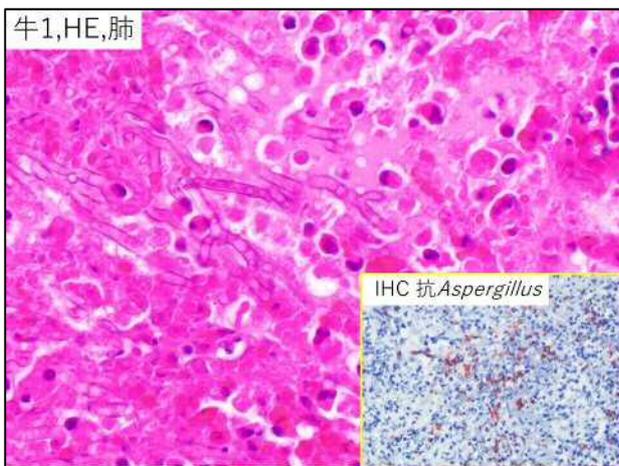


図 7 牛 1 *Aspergillus* 事例

Y 字状に分岐する真菌の重度の感染が認められた。

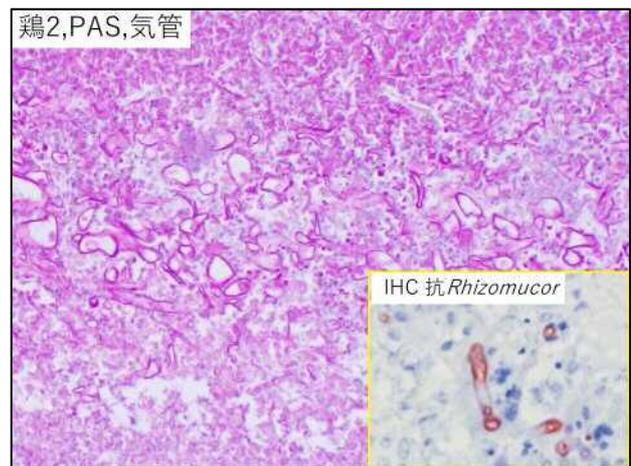


図 8 鶏 2 *Lichtheimia* 事例

太く内部が中空状の菌糸が多数認められた。

豚では、2例で扁桃への真菌感染があり、両者とも扁桃陰窩に酵母様細胞が密に充満する所見が認められた（表3, 図9）。形態からは真菌の鑑別に至らなかったが、その内1例はBLAST解析で病原性が不明な *Aureobasidium* 属と判明した[11]。また、消化管における *Candida* 感染が11例と最も多く（表3, 図10）、その内10例が胃潰瘍事例であった。さらにBLAST解析では、3例が *C. tropicalis* と同定された。豚の消化管 *Candida* 症の主な原因は、*C. albicans* とされてきたが、ヒトや牛で増えてきている [12, 13] *C. tropicalis* の割合が、豚においても高まっている可能性が考えられた。

表3 回顧調査結果（豚）

	発生部位	病理検査結果から考えられる真菌	BLAST	BLAST解析結果から考えられる真菌
豚1	扁桃	不明	ND	—
豚2		不明	○	<i>Aureobasidium</i>
豚3	消化器	<i>Candida</i>	○	<i>C. africana</i> <i>C. albicans</i>
豚4			ND	—
豚5			○	<i>C. tropicalis</i>
豚6			○	<i>C. tropicalis</i>
豚7			○	<i>C. tropicalis</i>
豚8			ND	—
豚9			ND	—
豚10			ND	—
豚11			ND	—
豚12			ND	—
豚13			ND	—

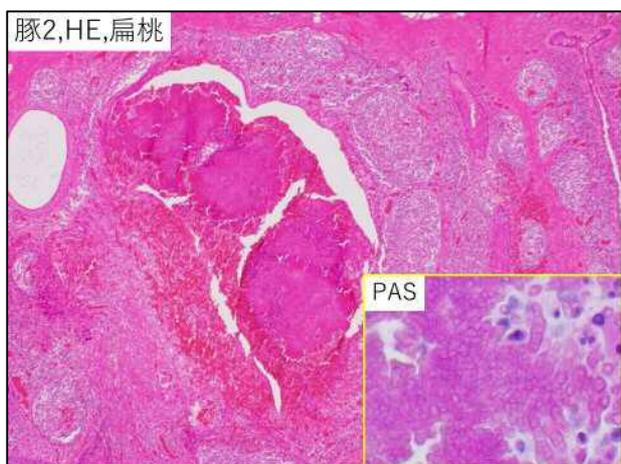


図9 豚2 *Aureobasidium* 事例

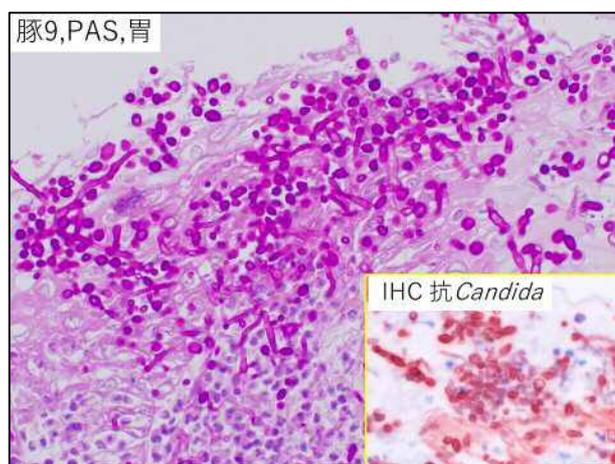


図10 豚9 *Candida* 事例

今回家畜における真菌症の発生傾向を掴むことができた。牛と鶏に関しては事例数を増やして更なる検討が必要と考えられる。

【今後の展望】

従来、真菌の検索は鏡検による形態観察が中心であったが、生材料がなく真菌培養検査が実施できない場合、今回取り入れた FFPE を用いた BLAST 解析は非常に有用であった。今後この結果を生かし、真菌分野の診断の発展につなげたい。

最後に、本研究にあたり多大なるご指導及びご助言をいただいた農研機構動物衛生研究部門 芝原友幸先生に深謝する。

【参考文献】

- [1] 中村遊香. 動物に見られる真菌症の現状. *Jpn J Med Mycol.* 2003, 44, 235-238.
- [2] Seyedmojtaba Seyedmousavi, Sandra de M G Bosco, Sybren de Hoog, Frank Ebel, Daniel Elad, Renata R Gomes, Ilse D Jacobsen, Henrik E Jensen, An Martel, Bernard Mignon, Frank Pasmans, Elena Piecková, Anderson Messias Rodrigues, Karuna Singh, Vania A Vicente, Gudrun Wibbelt, Nathan P Wiederhold, Jacques Guillot. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Medical Mycology.* 2018, Volume 56, Issue 8, Page e4.
- [3] 全国家畜衛生職員会. 病性鑑定マニュアル第4版. 2016.
- [4] Ayumi ABE, Yuji ODA, Kozo ASANO, Teruo SONE. The Molecular Phylogeny of the Genus *Rhizopus* Based on rDNA Sequences. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2006, Volume 70, Issue 10, 2387-2393.
- [5] Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Apr;13(2):236-301.
- [6] 細川久美子, 河村美登里, 伊藤直美. 子牛の深在性真菌症事例. 平成30年度第56回広島県畜産関係業績発表会集録.
- [7] Monica Slaviero, Thaina Piccolo Vargas, Matheus Viezzer Bianchi, Luiza Presser Ehlers, Andreia Spanamberg, Laerte Ferreira, Ricardo Araujo, Saulo Petinatti Pavarini. *Rhizopus microsporus* segmental enteritis in a cow. *Medical Mycology Case Reports* 28. 2020, 20-22.
- [8] 中村耕太郎, 岡田綾子. 黒毛和種去勢牛における播種性接合菌症の一症例. 平成28年度鳥取県畜産技術業績発表会集録.
- [9] 朴天鎬, 吉田英二, 佐野文子, 木村久美子, 安藤貴朗, 渡辺大作, 大塚浩通, 小山田敏文. 黒毛和種牛における *Absidia corymbifera* と *Candida tropicalis* の重感染症. *日本産業動物獣医学会会誌.* 2007, 60, 497-500.

- [10] 山本佑. 家禽の真菌症の病理. 鶏病研究会報. 2019, 54 卷 4 号, 166-172.
- [11] 宮脇香織, 寺尾啓吾, 山北真一, 高橋佐知, 池上裕倫, 藤井昇, 尾仲隆, 村松久司, 永田信治. *Aureobasidium pullulans* における機能性 β -グルカン生産と細胞形態の関係. 生物工学会誌. 2010, 第 88 卷第 12 号, 634-641.
- [12] Zhai, L., Zhou, Y., Wu, Y. *et al.* Isolation and identification of *Candida tropicalis* in sows with fatal infection: a case report. *BMC Vet Res.* 2021, 17, 108.
- [13] Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Front Microbiol.* 2017, 8: 1927.