

呼吸器疾患患者로부터分離한
Scophulariopsis brevicaulis에 관한 研究

廉 鎰 *劉承兆 *印相煥 **李長勳

단국대학교 미생물학과
* 성균관 대학교 약학과
* * 호서대학 환경 공학과

**Studies on the Scophulariopsis brevicaulis Isolated
from the Respiratory Disease Patients**

K. Ryeom · S. J. Yu · S. H. In · J. H. Lee

Dept. of Micro., Dan Kook University
** Dept. of Pharm., Sung Kyun Kwan University*
*** Dept. of Environ. Engin., Hoseo College*

Abstract

It has been reported that the pulmonary mycosis generally results from saprophytic colonization of pre-existing lung cavities usually due to pulmonary tuberculosis etc.

Culture of homogenized tissues yield pure colony of slightly brown on the Sabouraud dextrose medium. The fungus was identified as the *Scophulariopsis brevicaulis* which had been rarely reported in pulmonary fungal infection.

Histopathological examination of excised tissues revealed a chronic granulomatous inflammation and many branched hyphal mass.

Susceptibility tests were tested with ketoconazole, griseofulvin, nystatin, and amphotericin B. Of these antifungal agents, ketoconazole and griseofulvin proved to be most effective and minimum inhibitory concentration was 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

I. 緒 論

自然界에는 5만여종 이상의 많은 眞菌類가 분포하고 있으며 環境 要因에 따른 적응 범위가 매우 다양하므로 生活 環境에서 흔히 발견된다.

이러한 眞菌類의 포자는 대기중에 많이 산재되어 있으며 呼吸에 의해 인체에 침투될 가능성이 높을 것이라 사료되나 이중 인간에 病原性을 발휘하는 것은 100여종 정도이며 이는 呼吸器뿐만 아니라 各種 장기까지 침범하여 여러 형태의 眞菌症을 유발한다.

(1,2,3,4)

眞菌의 종류에 따라서는 宿主에 대하여 特異的인 病原性을 발휘하나 宿主의 상태에 따라서는 非特異性을 나타내므로 감염의 위험성은 항상 존재하고 있다.⁽⁵⁾

특히 오랜 疾患 장기간의 免疫抑制劑 복용 등에 의하여 생체 방어 기능이 극도로 低下된 宿主에는 더욱 용이하게 機會性 眞菌症을 일으키는 것을 알 수 있다.^(6,7)

呼吸器系는 各種 微生物의 침입이 용이한 부위이며 各種 血液疾患 간장疾患 結核 腫瘍 疾患에서 眞菌의 2차적 感染에 의한 肺眞菌症의 발생빈도가 높은 것으로 보고되고 있다.⁽⁸⁾

특히 肺結核으로 形成된 肺空洞 확장된 기관지에 眞菌 脆子が 흡착 증식되어 眞菌腫을 形成하며 肺結核患者의 사망율을 높이는 한 原因으로 간주되고 있다.^(8,9,10)

최근에는 非病原性이며 지구상에 널리 분포하고 있는 Scophulariopsis 속, Petridium 속, Pseudallescheria 속에 의한 眞菌症의 보고가 되어 졌으나 특히 Scophulariopsis 속에 의한 眞菌症의 보고는

극이 드물며 肺眞菌症의 예는 세계적으로 희귀함은 물론 菌學의 特性 또한 완전히 규명되어 있지 않았다.^(11,12,13,14)

이와같은 機會性感染眞菌類에 대한 진단법의 부정확과 무독성항진 균제의 선택에 대한 보고가 불충분한 상태로 지속되어 왔다.^(13,14,15)

이에 著者등은 重症肺結核患者中 機會性眞菌症 발병 확률이 높은 환자에 肺組織을 試料로 하여 Scophulariopsis brevicaulis에 의한 機會性眞菌症을 發見하였고 菌學의 特性과 抗眞菌劑에 대한 感受性 實驗을 하여 약간의 차이점을 얻을수 있어 報告하고자 한다.

II. 實驗材料 및 方法

[試 料]

國立 公州 病院에 입원한 환자중 2차적 眞菌 감염 확률이 높은 환자로 부터 무균적으로 절제한 肺組織中 肺空洞 部位만을 取하여 Streptomycin(100 mg/ml)으로 시간 동안 처리한 후 試料로 使用하였다.

[培 地]

분리용 培地는 Chloramphenicol(0.05 mg/ml)과 Cycloheximide(0.5mg/ml)를 첨가한 Sabouraud dextrose agar, Sabouraud dextrose broth(Difco co. Ltd.)를 使用하였고 抗眞菌劑 感受性 試驗에는 Tryptone Soya broth(Oxoid Co. Ltd)를 使用하였다.

[抗眞菌劑 및 試藥]

Ketoconazole, Griseofulvin, Nystatin, Amphotericin B, Chlorampheni-

col, Cycloheximide 등 모든 시약은 특급 試藥을 사용하였다.

[眞菌의 分離]

Streptomycin(100 mg/ml) 용액으로 처리한 組織片을 各各 분쇄 均質化한 후 분리용 배지에 접종한 후 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 2주간 培養하여 生成된 monocolony를 무균적으로 取하여 순수 배양하였다.^(14,15,16)

[眞菌의 同定]

SDA 培地上에 순수배양된 眞菌株를 육안으로 관찰하여 집락의 형태, 표면 구조 및 上下面의 色狀등을 확인하고, 發育속도 등을 확인하였으며 Slide Culture를 실시하여 Hyphae의 形態, 넓이, Septum의 有無, Conidiophore의 구조, Sterigmata의 형태, Spore의 크기 및 배열 상태등을 Scanning electron microscope로 관찰하여 同定하였다.^(17,18,19)

[病理組織學的 檢査]

肺空洞部位를 切除하여 3~4 mm의 박편으로 자른후 일반적인 病理組織學的 檢査를 실시하였다.^(10,20,21)

[抗眞菌劑 感受性 試驗]

Shadomy 등⁽²²⁾의 방법으로 포자 接種액을 조제하였고 4종의 抗眞菌劑를 two fold dilution method로 感受性 정도를 측정하였으며 최종적으로 Minimum inhibitory concentration를 측정하였다.

일반적인 糸狀菌의 시험법에 따라서 25°C 에서 7일간 배양하였고 Tryptone Soya broth medium을 시험용 배지로 사용하였으며 對照菌株는 Aspergillus flavus ATCC 15517을 使用하였다.^(23,24,25)

III. 實驗 結果

[眞菌의 分離 및 同定]

10日間の 배양에서 최초에는 白色의 fluffy 한 形態였으나 배양시간이 지남에 따라 중앙부분에서 부터 엷은 갈색의 granule을 형성함을 알 수 있었다.

또한 표준 상태에서 중앙부분이 부풀고 표면이 folding 되어 있었으며 중앙부에 granule이 형성되었으며 배지 상하면은 모두 엷은 갈색으로 나고 오랜 배양에서도 흑색의 Colony를 形成하지 않는 것으로 보아 Hyaline fungi의 한 種으로 추정되며 발육속도가 6~10일의 중간형 증식 속도를 갖는 것으로 확인되어 Scophulariopsis 속으로 추정할 수 있었다.(Table I, fig 1)

Table I. Characteristics of the isolated fungi from the specimen of respiratory disease

Factor	Characteristics
Texture	Center;granular, outside;fluffy
Topography	folded, raised
Pigmentation	surface;slightly brown, reverse;dark yellow
Growth rate	intermediate(6-10day)
Hyphae	diameter;Ca.2.5-3.5 μm septum, multi-nuclei, cotton wool-like color;colorless-slightly yellow
Conidiophore	generally branched (penicillus) diameter;Ca2-4 μm , length; Ca.12-20 μm
Sterigmata	2-4 branched(penicillus) tapered annelophore diameter;Ca.3-5 μm , length;Ca.20-25 μm
Spore	diameter;Ca.4-8 μm number;5-10 arrangement;unbranched chain

base; truncate
 surface; rough, echinulate
 color; slightly yellow
 structure; lemon, oval-form

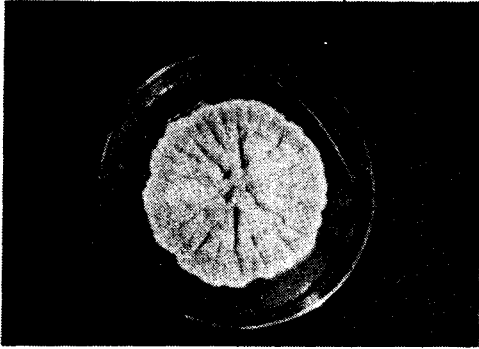


Fig. 1 Sabouraud dextrose agar plate 7 day culture

현미경 관찰에서 무색투명 또는 옅은 황색의 Hyphae가 관찰되었고, Septum이 존재하며 不均質한 표면구조, 多核, 많은 分枝가 있음이 확인되었다. Hyphae의 넓이는 $2.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 이었고, Conidiophore는 주로 2~3개의 分枝를 형성하며, Penicillium 속과 유사한 형태를 나타내었다. Sterigmata는 2~4개의 分지가 형성되어 penicillus形이었고, 중앙부가 부풀어 항아리形이었으며, spore 形成部位가 多數의 環이 存在함이 관찰되었으나, Penicillium 속의 특징적 구조인 metulae는 확인되지 않았다. spore는 無色 또는 옅은 황색을 나타내었고, $4 \sim 8 \mu\text{m}$ 의 크기이며, 5개 이상 10여개까지의 배열을 관찰할 수 있었다. 장기간의 배양에서는 표면이 불규칙하고 가시 돌친 형태를 나타내었다.(Fig.2,3)

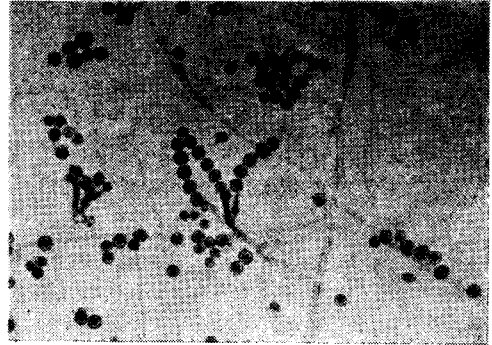


Fig. 2 Agar block slide culture (lactophenol aniline blue, x 400)

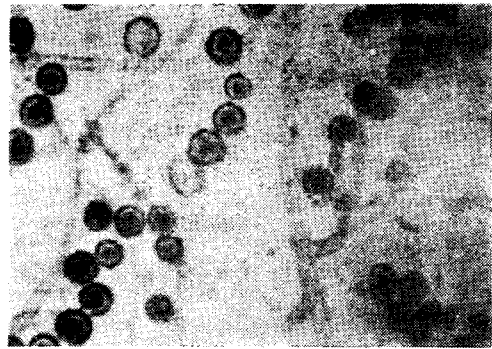


Fig. 3 Agar block slide culture (lactophenol aniline blue, x 400)

전자현미경 관찰에서 원추형의 spore base와 두터운 spore wall이 확인되었고 가시 돌친 형태를 더욱 뚜렷이 관찰할 수 있었다.(Fig.4)

以上の 實驗結果로 분리된 眞菌株를 Scophulariopsis brevicaulis 로 同定할 수 있었다.

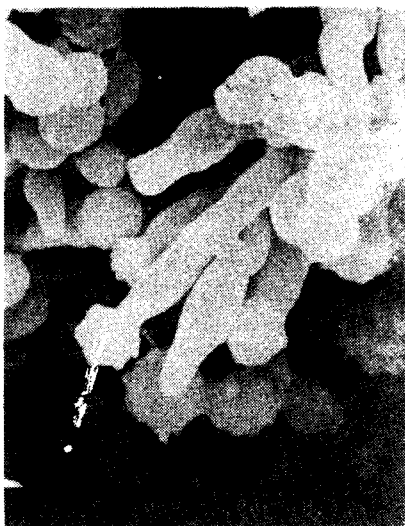


Fig. 4 Scanning electron microscopy (x 3,000)

[病理組織學的 檢査]

全體 組織은 重症 肺結核으로 Langhans 거대세포를 포함하는 많은 결핵병원을 볼 수 있었으며, 공동벽은 만성염증세포들의 침윤이 관찰되었다.

空洞내에서는 Hyphae들의 intermingled mass 를 볼 수 있었으며, 또한 mass 주위에서 만성염증 세포의 침윤을 볼 수 있었다. 육안적 소견은 비후된 희백색의 피막으로 싸인 공동을 볼 수 있었으며, 부서지기 쉬운 종괴형태 였다.

이상의 소견으로 보아 Scophulariopsis brevicalis에 의한 기회성 진균증이 발생되었음이 확인되었다.

[抗真菌劑 感受性 試驗]

4 種의 抗真菌劑에 대한 感受性 試驗 結果 Ketoconazole 이 가장 우수하였으며, MIC는 10µm/ml 이었고, Griseofulvin

는 50µg/ml 이었다. 그러나 Nystatin 과 Amphotericin B에 대한 MIC는 각각 > 150µm/ml, >200µg/ml로 다른 真菌類에

Table II. Susceptibility test of the isolated fungi to the ketoconazole

Tube No.	conc. of KTZ(µg/ml)	Result
1	100	-
2	50	-
3	25	-
4	12.5	-
5	6.25	+
6	3.13	+
7	1.56	+
Medium Control	0	+
Inoculum control	0	+
DMSO control	0	+

KTZ; Ketoconazole, +; growth, -; no growth

Table III. Susceptibility test of the isolated fungi to the griseofulvin

Tube No.	conc. of GSF(µg/ml)	Result
1	500	-
2	250	-
3	125	-
4	62.5	+
5	31.3	+
6	15.6	+
7	7.8	+
Medium control	0	+
Inoculum control	0	+
DMFA control	0	+

GSF; griseofulvin, +; growth, -; no growth

대한 MIC보다 훨씬 높았다. 따라서 Ketoconazole과 Griseofulvin이 가장 유효한 것으로 사료된다.(Table 2,3,4)

Table IV. MIC of a various antifungal agents to the isolated fungi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Antifungal agent	S, brevicaulis	A. flavus
Ketoconazole	10	10
Griseofulvin	50	30
Nystatin	> 150	5
Amphotericin B	> 200	25

IV. 考 察

호흡기 질환 환자에서 眞菌의 2차적 감염에 의한 肺眞菌症 사례는 Renon의 최초 보고 이후 계속적인 연구가 진행되어 왔으며 특히 肺結核 患者의 사망율을 높이는 원인으로 보고되어 왔다.(3,9,23)

Scophulariopsis 속 眞菌類에 의한 진균증은 Rippon²⁶⁾ 등이 보고한 Onychomycosis가 표피세포에 발생이 되고 Udagawa²⁷⁾ 등은 Scophulariopsis cinerea가 인체의 발톱등에 각피증을 유발시킨다는 보고를 하였다.

Markley¹⁹⁾ 등은 inguinal resion의 ulcerating granulomata에서 처음으로 Scophulariopsis brevicaulis에 의한 deep Scophulariopsosis를 보고했으나 肺眞菌症의 사례는 극히 드물었다.

Sekhon¹³⁾ 등은 肺結核患者의 空洞部位에서 Scophulariopsis brevicaulis를 분리 보고하였고 실험적으로 흰쥐에서의 全身

性 眞菌症의 유발을 보고하였다.

또한 Griebler¹⁴⁾은 Scophulariopsis brumptii에 의한 肺眞菌症이 유발됨을 확인하였으며 實驗的인 진단용항원도 개발하였다.

본 실험에서는 肺結核患者에서 분리한 肺空洞部位에서 Scophulariopsis brevicaulis에 의한 肺眞菌症을 확인할 수 있었으며 2차적인 혼합 감염으로 추정하였는데 이러한 진균증에 의한 肺眞菌症의 사례는 드물고 국내에서의 보고가 없었던 점이 매우 흥미로운 사실이며 이에 대한 연구가 계속되어 저야 되리라 사료된다.

분리 동정된 Scophulariopsis brevicaulis의 菌學的 特性은 Rapper²⁸⁾, Barron¹⁸⁾, Morton¹⁹⁾ 등의 보고와 동일하였으며 37°C의 배양에서 활발히 증식하는 것으로 보아 인체내 기생 증식이 가능함을 확인할 수 있었다.⁹⁾

病理組織學的 검사에서는, Chandler 등의 보고와 같이²⁹⁾ 섬유세포, 다핵성거대세포와 만성염증세포의 침윤, 결집된 hyphal mass 등 일반적인 眞菌症의 소견의 관찰 되었으며, hyphae의 공동벽 침범은 관찰되지 않았다. 따라서 계속적인 咯血의 原因은 菌體에 의한 혈관벽 파괴가 아니라³⁰⁾ Campbell¹³¹⁾ 등의 보고와 같이 trypsin 등과 같은 단백질용해효소의 작용에 의한 것으로 사료된다.

4種의 抗眞菌劑에 대한 感受性 試驗에서는 Ketoconazole이 가장 유효하였으며, MIC는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 Cutsem의 보고와 일치하였다.²³⁾ Griseofulvin, Nystatin, Ketoconazole 등은 Sekhon¹³⁾ 등의 보고와 유사하였으나 Korzybski³²⁾, Yu³³⁾ 등의 보고와 같이 Griseofulvin은 각피층에만 유

효한 특이성이 있으므로 본 사례와 같은 深部性肺眞菌症 등에는 임상적응용이 어려울 것으로 사료된다. 또한 가장 널리 쓰이는 全身性抗眞菌劑인 Amphotericin B의 MIC가 $> 200 \mu\text{g/ml}$ 인 것은 고농도의 장기간 투여에 따른 부작용을 고려할때 深部性眞菌症에 는 적합하지 않은 것으로 사료된다.^{25) 34)}

따라서 진단방법의 어려움, 無毒性抗眞菌劑의 불충분, 결핵과의 감별 진단의 난점등을 고려할 때 Scophulariopsis brevicaulis에 의해 야기되는 肺眞菌症의 연구에 관심을 가져야 할 것이며 단시간에 분리 확인할 수 있는 진단용 혈청등의 개발을 위한 연구가 계속되어야 되리라 사료된다.

V. 結 論

重症肺結核患者의 절제한 肺組織을 試料로 機會性眞菌症의 原因眞菌에 대한 실험결과는 다음과 같다.

1) 분리된 眞菌株는 Scophulariopsis brevicaulis로 동정하였다.

2) 肺結核에 속발한 機會性眞菌症이 확인 되었으며, 공동벽의 침범은 확인되지 않았다.

3) 抗眞菌劑 感受性 시험 결과 Ketocozazole (MIC : $10 \mu\text{g/ml}$) 과 Griseofulvin (MIC : $50 \mu\text{g/ml}$) 이 가장 유효하였다.

4) Scophulariopsis brevicaulis에 대한 Nystatin, Amphotericin B의 증식억제 효과는 기대할 수 없었다.

參 考 文 獻

1. Emmons, C. W., Binford, C. H. and Uz, J. P.: Medical Mycology(1971)
2. Finegold, S. M. and Baron, E. J.: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 7th ed.(1986)
3. British Tuberculosis Association: Tubercle, 51, 227(1970)
4. Franser, R. G. and Pare, J. A. P.: Diagnosis of Disease of the Chest. 2nd ed.(1978)
5. Burton, J. R., zachery, J. B. and Bessin, R.: Ann. Int. Med., 77, 383(1972)
6. Finegold, S. M., Will, D. and Murray, T. F.: Am. J. Med., 27, 463(1959)
7. Montes, L. F., Ceballos, R. and Copper, M. D.: J. A. M. A., 22, 1619(1972)
8. Bakerspigel, A., Wood, T. and Burke, S.: Am. J. Clin. Pathol., 68, 299(1977)
9. Kim, S. J.: Tubercul. Resp. Dis., 31, 126(1984)
10. Reddy, P. A., Christianson, C. S., Brasher, C. A., Larsh, H. and Sutaria, M.: Am. Rev. Resp. Dis., 101, 928(1970)
11. Lee, S. K. and Kim, S. J.: Tubercule. Resp. Dis., 34, 57(1987)
12. Kim, S. J., Hong, Y. K., Kim, S. O. and Yun, Y. J.: J. Kor. Microbiol., 18, 99(1983)

13. Sekhon, A. S., Willans, D. J. and Harvey, J. H.: *J. Clin. Pathol.*, 27, 837(1974)
14. Griebble, H. G., Rippon, J. W., Maliwan, N. and Daun, V.: *Ann. Int. Med.*, 83, 326(1975)
15. Larsh, H. W.: Recent advances in medical and veterinary mycology. (1977)
16. Koneman, E. W. and Roberts, G. D.: *Practical laboratory mycology*. 2nd(1978)
17. Suh, S. B.: *J. Kor. Med. Assoc.*, 18, 948(1975)
18. Barron, G. L.: The genera of hyphomycetes from the soil (1968)
19. Morton, F. T. and Smith, G.: *Mycol. Papers.*, 86, 1(1963)
20. Morishita, Y., Wakabayashi, T. and Kuroda, Y.: *Rinsho Byori*, 31, 97(1983)
21. Salfelder, K. and Schwarz, J.: *Color atlas of deep mycoses in man*(1984)
22. Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J. and Shadomy, H. J.: *Manual of clinical microbiology*.
23. Cutsen, J. V.: *Am. J. Med*, 74, 9(1983)
24. Stamm, A. M. and Dismukes, W. E.: *Chest*, 83, 911(1983)
25. Lorian, V.: *Antibiotics in laboratory medicine*. 2nd ed. (1986)
26. Rippon, T. W.: *Medical mycology*(1974)
27. Udagawa, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 8, 39(1962)
28. Rapper, K. B., Thom, C. and Fennell, D. I.: *A manual of penicillia*(1949)
29. Chandler, F. W., Kaplan, W. and Ajello, L.: *Histopathology of mycotic disease*(1980)
30. Villar, T. G., Pimental, C. and Costa, M. N.: *Thorax*, 17, 22 (1962)
31. Campbell, M. J. and Clayton, Y. M.: *Am. Rev. Reap. Dis.*, 89, 186 (1964)
32. Korzybski, T., Kowszyk-gindifer z. and Kurylowicz: *Antibiotics* (1967)
33. Yu, R. J. and Blank, F.: *Sabouraudia*, 11, 274(1973)
34. Moore, G. S. and Jaciow, D. M. : *Mycology for the clinical laboratory*(1979)