

氏名 (本籍)	いげ だ てる お (神奈川県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第264号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	Prototheca 属の藻類学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 田 淵 清 (副査) 教授 清 水 武 彦 教授 板 垣 博

論 文 内 容 の 要 旨

Prototheca 属は、1894年に Krüger が樹液から色素を持たない単細胞の菌として分離したのが最初の記載であり、この *Prototheca* 属は培養性状が酵母様真菌に類似していたことから酵母として分類され、2藻種すなわち *P. zopfii* および *P. moriformis* に分類・同定された。その後、単一細胞内に娘細胞を形成し増殖する *Chlorella* 属と類似する増殖態度を有することから藻類 Algae に再分類され現在に至っている。その間、*Chlorella* 属と *Prototheca* 属の形態および生理生化学的性状の研究が行なわれ、*Prototheca* 属は *Chlorella* 属から変異・分化したものであると理解されるに至った。

Prototheca 属は、一般に土壌・樹液・淡水・糞便などの自然界から容易に分離されること、また、本属は人あるいは動物のプロトテカ症の原因となることがよく知られている。これら自然界あるいは病巣から分離された *Prototheca* 属の分類に関する研究は、培養性状・生化学的性状・形態学的観察・血清学的性状などにより行われ、1972年までには、*P. zopfii*, *P. moriformis*, *P. portoricensis*, *P. ciferii*, *P. wickerhamii*, *P. segbwema*, *P. stagnora* の7種の藻種が認められていたが、その後、*P. filamenta*, *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. moriformis*, *P. stagnora* の5藻種、*P. filamenta*, *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora* の4藻種、*P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora* の3藻種に再分類されるという経過を辿ってきた。しかしながら、最近、形態および生化学的性状から再び *Prototheca* 属を *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. moriformis*, *P. stagnora* の4藻種に分類することが報告されている。以上のように、*Prototheca* 属の藻種の分類に関しては、統一的な見解が得られていないのが現状である。その原因として、形態学的・生化学的あるいは血清学的性状につき、それぞれ別の見地から分類しているために混乱が生じていると思われる。

そこで著者は、供試藻株の培養性状・形態・生理生化学的性状について精査するとともに、血清学的手法を用いて供試藻株間の比較を行なうことにより総合的に藻種の関連を解明することを試みた。

一方、プロトテカ症は多くの真菌症と同様に日和見感染症（自発性感染症）のカテゴリーに分類されるが、その病型は多様で、しかも人のみならず、犬・猫・鹿・魚類などにも自然発生が認められている。特に、米国・欧州・カナダでの牛乳房炎や、ほとんどのものが重篤な深在性プロトテカ症の病型をとる犬の報告は多く、獣医学領域では重要な感染症の1つとなってきた。しかしながら、このように *Prototheca* 属の症例は数多く報告されているが、本症の病因論的検討はほとんどなされていない。また、本症の治療に関する報告

も単一薬剤の検討がほとんどであり、基本的な薬剤の比較試験の報告がないのが現状である。そこでマウスを用いた感染実験により感染成立要因を、またマウス腹腔由来の食細胞を用いた *in vitro* の実験系で感染防御要因を明らかにすることを試みた。さらに、数種類の抗菌剤に対する感受性試験を実施して、*Prototheca* 属に有効な薬剤について比較検討した。

本研究では *Prototheca* 属の培養性状・形態・生理化学的性状・血清学的性状による藻種の分類・病原性およびそれに対する防御因子について検討し、さらに抗プロトテカ剤についても検討した。本研究成績の概要は以下のとおりである。

1. *Prototheca* 属の自然界における分布

Prototheca 属は環境中に容易に見い出されることは既に多くの成書に記載されているが、その詳細な報告はなされていない。また、*Prototheca* 属が原因となるプロトテカ症も近年増加の傾向にあるが、本邦での生態に関しては殆ど不明のままである。この原因として本属は酵母様真菌と集落形態が類似するため酵母様真菌として処理されたことが考えられる。

そこで著者は、Sabouraud デキストロース寒天培地 (SDA) ・PIM 培地および感受性試験から *Prototheca* 属への感受性がないことが証明されているペニシリンを加えた変法 PIM 培地を用いて *Prototheca* 属の分離を試みた。

その結果、環境中からの *Prototheca* 属の分離は SDA に比べ、PIM 培地および変法 PIM 培地が優れていた。すなわち、各培地でそれぞれ *Prototheca* 属は池水 (n=50) ; 10, 30 および 40%, 樹液 (n=50) ; 2, 10 および 14%, 河川 (n=50) ; 16, 42 および 50%, および土壌 (n=50) ; 0, 4 および 8% に分離されたが、牛 372 頭の乳汁の合計 572 検体からは 1 株も *Prototheca* 属を分離できなかった。

2. *Prototheca* 属の藻類学的性状

Prototheca 属の特徴としては、*Chlorella* 属に類似した生活環が挙げられる。その生活環は Autospore formation (オートスポア形式) と呼ばれ、単一細胞から発育が始まりやがて内部分裂により細胞内に娘細胞が形成されるというものである。そこで、*Prototheca* 属の藻種間での生活環とその形態を光学顕微鏡・走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて比較・検討した。

光顕的観察の比較では、母細胞は *P. zopfii* の病巣由来 7918-1, 8008-1, B-1270 株では楕円形であったのに対して、環境由来の B-1266 株では球状に近い楕円形であった。また、娘細胞の形態は、*P. zopfii* の病巣由来 7918-1, 8008-1, B-1270 株では楕円形であったが、環境由来の B-1266 株を含む *P. wickerhamii* および *P. stagnora* では球形であった。母細胞に含まれる娘細胞の数の比較では、藻種により大きさおよび数の違いが特徴的であった。各藻種の細胞の大きさについては、おおそ藻種および藻株の由来によりその大きさは若干異なり、特に *P. stagnora* が他の藻種に比べ大きい特徴が示された。

走査型電子顕微鏡を用いた観察結果は、いずれの *Prototheca* 属の藻種も表面が滑らかな球形～楕円形を示し、成熟した母細胞壁は破れ易くなっている像が観察された。各藻種の比較では、*P. zopfii* は楕円形、*P. wickerhamii* は小形球状、*P. stagnora* は大形球状を示し、明らかに藻種間での相違を認めた。一方、同一藻種とされている *P. zopfii* において由来による形態の相違が認められた。すなわち、牛乳房炎由来の 7918-1 株、8008-1 株、B-1270 株が大形の楕円形であったのに対して、環境由来の B-1266 株はやや小形の球状に近い楕円形であった。

透過型電子顕微鏡による観察結果では、いずれの *Prototheca* 属も形は異なるものの、細胞内には核・電子密度の高い小体・ミトコンドリアが観察され、また細胞壁は2層構造であることが特徴であった。

供試藻8株の培養および形態学的性状は、いずれの藻種においてもクロロフィルを保有せず、Autospore formation (オートスポア形成) による増殖、ビタミン B_{12} による発育促進およびシクロヘキサミドによる発育抑制は共通したものであった。集落形態はいずれの藻株もSDAでよく発育し、集落は白色酵母様であったが、*P. zopfii*は培養が古くなるに従い、黄褐色を呈するようになるのが特徴であった。また、環境由来の *P. wickerhamii* B-1421株は病巣由来のB-1280株と異なりやや顆粒状の集落を形成した。

供試藻株の培養温度の違いによる発育態度は、*P. zopfii*の7918-1, 8008-1, B-1270株は $15^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$ で発育可能であったが、同じ藻種であるB-1266株は 36°C ですでに発育が阻害された。また、*P. wickerhamii*のB-1280株は $15^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$ で発育可能であったが、B-1421株の 15 および 36°C での発育は不良であった。*P. stagnora*のB-1277株は $15^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$ で発育可能であった。

各藻種の19種類の炭素源同化能をAPI 20Cを用いて調べた結果、藻種別に比較すると、*P. zopfii*はグルコース、グリセリンを、*P. wickerhamii*はグルコース、グリセリン、ガラクトース、トレハロースを、*P. stagnora*はグルコース、ガラクトースを同化し、明らかに藻種による相違が認められた。

供試藻株の細胞酵素活性についてはAPI ZYMキットを用いて調べた19種類の酵素の結果、供試藻株を比較すると、7918-1, 8008-1およびB-1270株が同一の細胞酵素活性を示す以外は、それぞれの藻株により細胞酵素活性は異なっていた。すなわち、7918-1, 8008-1およびB-1270株はエステラーゼ(C4)、エステラーゼリパーゼ(C8)、ロイシンアリルアミダーゼ、酸性ホスファターゼ、ホスホアミダーゼ活性を、さらにアルカリホスファターゼ、リパーゼ(C14)にも弱い活性を持ち、B-1266株はエステラーゼ(C4)、エステラーゼリパーゼ(C8)、リパーゼ(C14)、ロイシンアリルアミダーゼ活性と弱いアルカリホスファターゼ、バリンアリルアミダーゼ、酸性ホスファターゼ、ホスホアミダーゼ活性、B-1421株はアルカリホスファターゼ、エステラーゼ(C4)、エステラーゼリパーゼ(C8)、ロイシンアリルアミダーゼ、酸性ホスファターゼ、ホスホアミダーゼ活性と弱いトリプシン活性を、B-1280株はエステラーゼ(C4)、エステラーゼリパーゼ(C8)、酸性ホスファターゼ、ホスホアミダーゼと弱いアルカリホスファターゼ、ロイシンアリルアミダーゼ、トリプシン活性を、B-1277株はエステラーゼ(C4)、酸性ホスファターゼ、ホスホアミダーゼ活性と弱いアルカリホスファターゼ、エステラーゼリパーゼ(C8)、トリプシン活性を保有していた。しかしながら、シスチンアリルアミダーゼ、キモトリプシン、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、N-アセチル β -グルコサミニダーゼ、 α -マンノシダーゼおよび α -フコシダーゼ活性はいずれの藻株にも認められなかった。これらの結果は培養および細胞形態で得られた藻種および藻株間での相違とよく一致し、藻種間の鑑別に酵素活性を利用することは困難であるが、*Prototheca*属を鑑別するためには利用できると推測された。

供試藻株の細胞糖および蛋白含有量は、B-1421およびB-1270株の蛋白量を除き各藻株間に差は認められなかった。すなわち、糖含有量は約 $45\sim 80\text{mg}/\text{dl}$ 、蛋白含有量は約 $0.2\sim 0.4\text{mg}/\text{dl}$ であった。

各藻株の構成糖を比較するためシリカゲルGによる薄層クロマトグラフィーを行なった結果、ナフトレゾール硫酸を用いた構成糖の比較では、*P. zopfii*の7918-1, 8008-1, B-1270株および*P. stagnora*のB-1277株に同一Rf値の3スポットが検出され、一方、*P. zopfii*のB-1266株および*P. wickerhamii*の

B-1421, B-1280株では同一 Rf 値の 2 スポットが検出された。各藻株に共通するスポットは Rf 値 0.68 と 0.46 であった。また、過ヨウ素酸を用いた構成糖の比較では、*P. zopfii* の 7918-1, 8008-1, B-1270 株および *P. stagnora* の B-1277 株に同一 Rf 値の 5 スポットが検出され、一方、*P. zopfii* の B-1266 株は 4 スポット、*P. wickerhamii* の B-1421, B-1280 株では同一 Rf 値の 2 スポットが検出された。各藻株に共通するスポットは Rf 値 0.68 と 0.42 であった。

各藻株のアミノ類の比較をするためシリカゲル G による薄層クロマトグラフィーを行なったところ、各藻株間の比較では、*P. zopfii* の 7918-1, 8008-1, B-1270 株に同一 Rf 値の 9 スポットが検出され、*P. zopfii* の B-1266 株に 5 スポット、*P. wickerhamii* の B-1421 株に 4 スポット、B-1280 株に 8 スポット、*P. stagnora* の B-1277 株に 9 スポットが検出された。各藻株に共通するスポットは Rf 値 0.65, 0.10, 0.07 と 0.05 であった。

各藻株の脂質の比較をするためシリカゲル G による薄層クロマトグラフィーを行なった。展開後、脂質の検出は紫外線ランプにより行ったため得られた結果はキノン系脂質である。各藻株間の比較では、*P. zopfii* の 7918-1, 8008-1, B-1270 株および *P. stagnora* に同一 Rf 値の 2 スポットが検出され、一方、*P. zopfii* の B-1266 株および *P. wickerhamii* の B-1421, B-1280 株では同一 Rf 値の 1 スポットが検出された。各藻株に共通するスポットは Rf 値 0.64 であった。

供試藻株の抗原関係および診断価値のある血清診断法を調べる目的で行った実験の成績を以下に示す。各藻株の培養濾液抗原をウサギに免疫して得られた抗血清およびプロトテカ症牛から得られた血清と供試藻株のホモおよびヘテロ培養濾液抗原を用いて寒天ゲル内沈降反応を行った。その結果、プロトテカ症牛から得られた血清を用いた成績では、血清はホモである 7918-1 および 8008-1 株との間に沈降線を認めただけ、同一藻種であり同じ牛乳房炎由来である B-1270 株の培養濾液抗原とも反応した。一方、各藻株の培養濾液抗原に対する抗血清を用いた成績では、いずれの抗血清もホモの抗原に対して反応するが、このうちホモとのみ反応するのは *P. zopfii* の B-1266 株、*P. wickerhamii* の B-1421 株、*P. stagnora* の B-1277 株であった。しかし、残りの *P. zopfii* の 7918-1, 8008-1, B-1270 株の抗血清は 7918-1, 8008-1, B-1270 株の抗原と交差反応し、また *P. wickerhamii* の B-1280 株の抗血清は 7918-1, 8008-1, B-1270 株の抗原と交差反応を示した。*P. zopfii* の 7918-1, 8008-1, B-1270 株間の反応はプロトテカ症牛から得られた血清を用いた成績と一致していた。このことから、供試した 3 藻種は寒天ゲル内沈降反応により 5 つに型別することができ、培養濾液は血清型抗原として優れていることが明かとなった。

各藻株のホルマリン処理抗原をウサギに免疫して得られた抗血清およびプロトテカ症牛から得られた血清と供試藻株のホモおよびヘテロ抗原を用いて蛍光抗体法を行った。その結果、プロトテカ症牛から得られた感染血清は *P. zopfii* の 7918-1, 8008-1, B-1270, B-1266 株および *P. wickerhamii* の B-1421 株と反応したが、*P. wickerhamii* の B-1280 株および *P. stagnora* の B-1277 株とは反応しなかった。一方、各藻株のホルマリン処理抗原に対する抗血清を用いた成績は、いずれの抗血清もホモばかりでなく、ヘテロにも反応した。すなわち、*P. zopfii* の 7918-1, 8008-1, B-1270 株および *P. wickerhamii* の B-1421 株の抗血清はすべての藻株と、*P. zopfii* の B-1266 株、*P. wickerhamii* の B-1280 株および *P. stagnora* の B-1277 株の抗血清は、*P. zopfii* の 7918-1, 8008-1, B-1270 株を除く他の藻株と反応した。これらの結果は蛍光抗体法の感度が高いために交差反応が広く起こることを示しているものと判断した。そこで、

各抗血清をヘテロの抗原で吸収して蛍光抗体法を試みた。その結果、*P. zopfii* B-1266株、*P. wickerhamii* B-1421、B-1280株および*P. stagnora* B-1277株の抗血清に含まれる交差反応性は吸収されてホモの抗原とのみ反応したが、*P. zopfii* の7918-1、8008-1、B-1270株はホモの抗原との反応も吸収された。そこで、これら藻株間が同一の抗原を有していることを考慮し、*P. zopfii* B-1266株、*P. wickerhamii* B-1421、B-1280株および*P. stagnora* B-1277株の抗原で吸収したところ、*P. zopfii* の7918-1、8008-1、B-1270株に対する特異抗体が得られた。

3. *Prototheca* 属の病原性

Prototheca 属の病原性を知る目的で、ICR系のSPFマウスに対するLD₅₀を検討した。使用した藻株は7株で、*P. zopfii* 7918-1、8008-1、B-1270株および*P. wickerhamii* B-1280株は病巣由来であり、*P. zopfii* B-1266株、*P. wickerhamii* B-1421株および*P. stagnora* B-1277株は非病巣由来株である。その結果、*Prototheca* 属は正常マウスでは10¹⁰ cells/mlの静脈内(0.5 ml)、腹腔内(1.0 ml)、精巣内(0.1 ml)接種のいずれにおいても致死するものは認められなかった。すなわち、病巣由来株、非病巣由来株とも生体が正常な状態においては大量の藻が侵入してもすぐには死の機転をとらないことが明らかになった。そこで真菌感染実験にしばしば用いられてるブレドニン前処理によるLD₅₀の検索を試みた。その結果、マウスLD₅₀は病巣由来株で10^{7.5} cells、非病巣由来株で10^{8.5} cellsと大きく2つに区分された。以上のことから、病巣由来株は非病巣由来株よりもマウスに対する毒力の強いこと、また*Prototheca*を用いた感染実験を行う場合は病巣由来株およびブレドニン前処理マウスを用いる必要があることが明らかになった。

マウス体内における増殖像を検討するためマウスをブレドニン前処置群・ナイトロジェンマスタード前処置群・ブレドニン+ナイトロジェンマスタード前処置群および無処置群の4群に分け、7918-1株の5×10⁷ cells/0.1 mlを尾静脈内接種し、肝臓・腎臓・脾臓・肺・脳における生藻数を求めた。各臓器における*P. zopfii* 7918-1株の生藻数から明らかなように、前処置方法の相違により臓器内の増殖像に明らかな差異が認められた。すなわち、ブレドニン前処置群とブレドニン+ナイトロジェンマスタード前処置群マウスではいずれの臓器においてもナイトロジェンマスタード前処置群および無処置群よりも10²~10⁶オーダー以上の藻増殖が認められた。すなわち、好中球を特異的に抑制するとされるナイトロジェンマスタード前処置群では対照群と同様に藻の発育が抑えられていること、また、ブレドニン前処置群とブレドニン+ナイトロジェンマスタード前処置群が同程度に組織内藻増殖が認められることから本藻感染防御の主体は網内系細胞であることが明らかとなった。一方、臓器別の生藻数で見た場合、ブレドニン前処置群とブレドニン+ナイトロジェンマスタード前処置群マウスではいずれの臓器においても藻の増殖は認められ、10^{4.46}~10^{7.50} cells/gの藻が生存していた。また、ナイトロジェンマスタード前処置群および無処置群においても腎臓に10^{3.46}~10^{5.28} cells/g、脳に10^{0.97}~10^{3.37}、肺に10^{0.60}~10^{0.78} cells/gの藻が生存していた。

以上のことから、本藻が生体内に血流によって侵入した際の標的臓器は*Candida*や*Aspergillus*の実験感染と同様に腎臓および肺であり、また正常マウスにおいても腎臓および脳では本藻が比較的長期に亘って生存することが明らかになった。

P. zopfii 7918-1株感染マウスの病理組織学的所見は上記の*Prototheca*属の生体内増殖像とよく一致した結果であった。すなわち、ブレドニン前処置群とブレドニン+ナイトロジェンマスタード前処置群マウス

では各臓器に PAS 染色でよく染まる藻体が多く認められ、特に腎臓での藻の増殖が特徴であった。一方、ナイトロジェンマスタード前処置群と対照群では腎臓においてマクロファージに取り囲まれた藻体が観察されたがその病変はごく一部に限局されていた。その他の臓器の病理組織像では藻体は観察されなかった。

生体内増殖像と病理組織像の結果から本藻の生体内での感染には食細胞、特にマクロファージが重要な役割を果たしていることがわかった。そこで、このことを証明するために *in vitro* において好中球およびマクロファージをそれぞれ分離し、本藻と混合培養した時の細胞外生藻数・食藻率・細胞内生藻数を比較することにより本藻感染への役割を検討した。

マウス好中球への *P. zopfii* 7918-1 株接種時を 0 時間として細胞外生藻数を調べたところ、漸次減少し 2 時間目で最低値に達し、以後増加した。この時の食藻率は細胞外生藻数とは逆に 2 時間目に最高値を示した。細胞内生藻数の減少は 2 時間目で止まり、以後は細胞内で増殖した。

マウスマクロファージでの細胞外生藻数および食藻率は 2 時間目で好中球と同様であったが、細胞内生藻数は好中球の場合とは異なり漸次減少する傾向を示した。なお、好中球の細胞内生藻数は明らかにマクロファージでの細胞内生藻数より多かった ($P < 0.01$)。以上のような成績から、食細胞による感染防御は好中球ではなくマクロファージによってなされていることが明らかになった。

4. 抗プロトテカ剤

プロトテカ症の病型は表在性のもから深在性に至るまで多彩であるが、それらの治療に関する成功例の報告はほとんどない。その理由の 1 つとして、*Prototheca* 属に対する感受性薬剤の詳細な研究がなされていないことが挙げられる。そこで、*Prototheca* 属の各藻種を用いて代表的な抗細菌剤および抗真菌剤に対する感受性試験を実施し、どの薬剤に対して感受性を有するかを検討した。

7 種の抗細菌剤に対する各藻株の MIC では、ストレプトマイシンおよびカナマイシンがすべての藻株に対して $50 \mu\text{g/ml}$ レベルの抗藻活性を有する以外は、すべての藻株に有効な薬剤はなかった。テトラサイクリンは *P. zopfii* B-1266 株および *P. stagnora* B-1277 株にのみ $50 \mu\text{g/ml}$ の MIC を示した。その他のアンピシリン、クロラムフェニコール、ペニシリン G、エリスロマイシンに対しては、供試藻株は $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。13 種の抗真菌剤に対する各藻株の MIC を検討した結果、すべての供試藻株が $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示すものはグリセオフルビン、トルナフテート、5-フルオロサイトシンの 3 剤で、その他は感受性を示した。供試藻株に抗藻活性を有するものの中でも、アンホテリシン B、ナナオマイシン A が $0.8 \sim 3.2 \mu\text{g/ml}$ と最も高く、続いてナイスタチン： $1.6 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ 、ミコナゾール： $6.25 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ 、バトラフェン： $6.25 \sim 25.0 \mu\text{g/ml}$ 、CN-146： $12.5 \sim 25.0 \mu\text{g/ml}$ 、ケトコナゾール： $6.25 \sim 50.0 \mu\text{g/ml}$ の順であった。また、クロトリマゾールの MIC は *P. zopfii* の 7918-1、8008-1、B-1270 には $100 \mu\text{g/ml}$ 以上であったが、その他の藻株に対しては $3.2 \sim 6.25 \mu\text{g/ml}$ という独特な抗藻活性を示した。一方、同一薬剤に対する藻株間での感受性という側面からこの成績を見た場合、クロトリマゾールほどではないが、いずれの抗藻活性を有する薬剤も *P. zopfii* の 7918-1、8008-1、B-1270 株は他の藻株よりも 2~4 倍の耐性があることがわかった。

上述の研究成績から本藻類の自然界における生態が明らかとなった。また、分類に関しては形態学および生理生化学的性状からは *Prototheca* 属が多様性を示すことから、最も簡単な同化能試験により *P. zopfii*、*P. wickerhamii*、*P. stagnora* の 3 藻種に分類することが妥当であるとの成績であった。一方、発育

温度・細胞酵素活性・藻株の由来・細胞構成物質などに認められる同種藻株間での明らかな相違は、その異なる性状に一致してゲル内沈降反応および蛍光抗体法のいずれにおいても免疫学的に属内を5つに型別できた。したがって、*Prototheca*属が3藻種、5血清型に再分類できることを明らかにした。さらに、プロトテカ症の病因論的検討を *in vitro* における食細胞を用いて明らかにするとともに、本症の治療に対する基礎的データとなる薬剤の比較試験をも検討し、明らかにした。

論文審査の結果の要旨

*Prototheca*属は1894年 Krügerにより最初に報告されて以来、光合成色素(クロロフィル)非保有・細胞内オートスポア形成による増殖環の存在などが明らかにされ、現在では藻類として緑藻植物亜門 Chlorophytina のクロレラ目 Chlorococcalesに分類され、自然界に広く分布し生活しているものと理解されている。近年、この *Prototheca*属に起因する感染症(プロトテカ症)が易感染性宿主の増加及び抗菌剤の多用にとまなう(菌)交代症として多発傾向にあり、獣医学領域では重要な感染症の一つに数えられるに至った。

一方、*Prototheca*属内の種 species に関しては、形態学的・生理生化学的・血清学的研究の側面から2~7種に分類されているが、必ずしも総合的に整理・分類されているとはいえない現状である。このようなことから、著者は *Prototheca*属の藻種に関して形態学的・生理生化学的・血清学的性状を総合的に検討するとともに、本属の自然界分布、病原性及び抗プロトテカ剤についても併せ検討した。本研究論文の概要は次のとおりである。

1. *Prototheca*属の自然界における分布

自然界からの *Prototheca*属分離成績ではPC加PIM培地がSabouraud DA及びpore PIM培地より優れており、その検出率は池水;40%(20/50)、河川水;50%(25/50)、土壌;8%(4/50)、樹液;14%(7/50)であったが、臨床的健康牛372頭の乳汁572検体からは全く *Prototheca*を検出していない。

2. *Prototheca*属の藻類学的性状

*P. zopfii*の病巣由来3株と環境由来1株、*P. wickerhamii*の病巣由来1株と環境由来1株及び *P. stagnora*の環境由来1株、合計7株を中心にして、これらの形態と生活環、培養性状、炭素源と窒素源の同化能、細胞酵素活性、細胞糖含有量と構成糖、細胞蛋白含有量とアミノ類、細胞脂質、血清学的性状等について比較検討した結果、藻種鑑別上で有用な主要表現型は、1)細胞形態、2)発育・増殖温度域、3)4種炭素源の同化能、及び4)血清学的性状であった。

細胞形態とサイズに関しては、*P. zopfii*の母細胞は大形・楕円形(10.0~15.6×15.6~21.0 μm)であり、1母細胞当りのオートスポア数は8個以下であった。しかし、母細胞の形態に関して環境由来株は病巣由来株に比較し、やや球状に近い外形を示した。*P. wickerhamii*の母細胞は小形・球状(9.1~9.5 μm)であって、内臓するオートスポア数は15個以下であり、*P. stagnora*の母細胞は大形・球状(23 μm)でオートスポア数は8個以下であった。

発育・増殖温度域については、*P. zopfii*及び *P. wickerhamii*の病巣由来株並びに *P. stagnora*(環境由来株)が15~42℃の温度域で良好な増殖を示したのに反して、*P. zopfii*の環境由来株は36℃で発育が阻害され、一方、*P. wickerhamii*の環境由来株は15℃並びに36℃での発育は極めて不良であった。なお、この株由来・藻種区分による発育・増殖温度域と細胞酵素活性・細胞構成蛋白—多糖体—脂質との間にはある

一定の関連性を認めた。

4種炭素源同化能については、*P. zopfii*がグルコース・グリセリンの2種のみを利用するのに対して、*P. wickerhamii*はグルコース・グリセリン・ガラクトース・トレハロースの4種炭素源を全て同化し、*P. stagnora*はグルコース・グリセリン・ガラクトースの3種を同化した。

各藻株の培養濾液抗原によるウサギ免疫血清及びプロトテカ症罹患牛血清を用いて寒天ゲル内沈降反応を試みたところ、*P. zopfii*と*P. wickerhamii*は病巣由来株群と環境由来株群の各2型に分類され、*P. stagnora*（環境由来株）は単一型を示した。ただし、*P. wickerhamii*の病巣由来株血清は*P. zopfii*病巣由来株抗原と交差反応を示した。一方、各藻株のホルマリン処理抗原に対するウサギ免疫血清を用いた蛍光抗体法による成績では複数の交差反応性を示したが、吸収処理によって特異抗体が得られ、寒天ゲル内沈降反応と同様に、*P. zopfii*と*P. wickerhamii*はそれぞれ病巣由来株群と環境由来株群の2型に区分されたが、*P. stagnora*（環境由来株）は単一型を示した。

これらの成績から、著者は現在のところ、*Prototheca*属を3種；5血清型に分類・整理することが妥当であるとしている。

3. *Prototheca*属の病原性

*P. zopfii*並びに*P. wickerhamii*の病巣由来株と*P. zopfii*、*P. wickerhamii*及び*P. stagnora*の環境由来株、合計7株の病原性を比較・検討した結果、ICR系の正常（無処理）マウスではそれぞれ $10^9 \sim 10^{10}$ 個レベルの精巣内・静脈内・腹腔内接種でいずれも致死例を認めなかったが、プレドニン前処理（0.1 mg/g）マウスでの病巣由来株のLD₅₀は $10^{7.2} \sim 10^{7.5}$ であったのに対して、環境由来株のLD₅₀は $10^{8.5}$ レベルであった。

マウス生体内での*Prototheca*増殖態度を検討する目的で、*P. zopfii*病巣由来株の 5×10^7 個を1)プレドニン処理群、2)ナイトロジェンマスタード処理群、3)プレドニン+ナイトロジェンマスタード処理群、及び4)無処理対照群マウスにそれぞれ尾静脈内接種し、肝臓・腎臓・脾臓・肺・脳における生藻数を測定した。その結果、無処理対照群及びナイトロジェンマスタード処理群での生藻数は腎臓； $10^{3.5} \sim 10^{5.2}$ 個/g、脳； $10^{1.0} \sim 10^{3.4}$ 個/g、肺； $10^{0.6} \sim 10^{0.7}$ 個/gであり、腎臓及び脳では生藻細胞が比較的長期（4週間）にわたり残存していた。一方、プレドニン処理群並びにプレドニン+ナイトロジェンマスタード処理群ではいずれの臓器においても前記2群より $10^2 \sim 10^6$ オーダー以上多い生藻数を認めた。

このような成績から、*Prototheca*に対するマウスの感染防御における好中球の役割は比較的軽微であり、その主体は網内系細胞であると推定され、この点は病理組織像からも肯定された。そこで、この点を証明するべく、*in vitro*好中球及びマクロファージ感染実験を試み、食藻率と宿主細胞外及び細胞内生藻数の動態を検討した。その結果、好中球では*P. zopfii*病巣由来株接種後、2時間目で最高食藻率となり、細胞外生藻数は最低値を示し、以後は細胞内で生藻数が増加した。一方、*P. zopfii*病巣由来株接種マクロファージの2時間目の食藻率及び細胞外生藻数は好中球の場合と同様の傾向にあったが、それ以後の細胞内生藻数は明らかに漸次減少した。

4. 抗プロトテカ剤

抗プロトテカ剤として利用可能な薬剤を知る目的で、供試*Prototheca*7株を用い、代表的な抗細菌剤7種と抗真菌剤13種について検討した。その結果、抗細菌剤ではStreptomycinとKanamycinのMICは全

供試株で50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、他の Penicillin G, Cefatrexyl, Chloramphenicol, Tetracycline, Erythromycin の MIC は $> 100 \text{ U} \cdot \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。一方、抗真菌剤では Amphotericin B と Nanaomycin の MIC は 0.8 ~ 3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で最も抗薬活性が強く、次いで、Nystatin (1.6 ~ 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Miconazole (6.25 ~ 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Batrafen (6.25 ~ 25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CN-146 (12.5 ~ 25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Ketokonazole (6.25 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Tioconazole (12.5 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) であり、Clotrimazole の MIC は *P. zoppii* 病巣由来株に対して $> 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ であったが、その他の株に対する MIC は 3.2 ~ 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ レベルであった。その他の Griseofulvin, Haloprogin, Tolnaftate, 5-fluorocytocine の MIC は $> 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の例が多かった。

前述の研究結果から、著者は *Prototheca* 属の分類体系として 3 藻種 species ; 5 血清型とすることを明らかにするとともに、本属藻類の病原性並びに宿主側感染防御要因を解析し、さらにプロトテカ症の感染源としての自然界における本属藻類の分布及び抗プロトテカ剤として利用可能な薬剤を特定した。本研究は *Prototheca* 属に関する新知見であって、獣医微生物学ならびに臨床獣医学上寄与するところ大であり、獣医学博士の学位を授与するにふさわしい業績として評価する。