

学位申請論文

Prototheca 属の藻類学的研究

〔要 旨〕

池 田 輝 雄

1 9 8 7

Prototheca 属は、1894年にKruger 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牛・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、おおよ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 B₁ 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℃～42℃ で発育可能であったが、同じ

藻種である B-1266 株は 36℃ ですでに発育が阻害された。また、*P. wickerhamii* の B-1280 株は 15℃ ~ 42℃ で発育可能であったが、B-1421 株の 15 および 36℃ での発育は不良であった。*P. stagnora* の B-1277 株は 15℃ ~ 42℃ 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, パ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，システインアシルアミダーゼ，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45~80 mg/dl，蛋白含有量は約0.2~0.4 mg/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を行なった結果，ナフトレゾシ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ほか、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らかとなった。

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斃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プ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^{6.5} 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プ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プレドニン前処置群・ナイトロジェンマスタード前処置群・プレドニン+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 5×10^7 cells/0.5 mlを尾静脈内接種し、肝臓・腎臓・脾臓・肺・脳における生菌数を求めた。各臓器における *P. zopfii* 7918-1株の生菌数から明らかのように、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、プレドニン前処置群とプレドニン+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 $10^2 \sim 10^6$ オーダー以上の菌増殖が認められた。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菌の発育が抑えられていること、また、プレドニン前処置群とプレドニン+ナイトロジェンマスタード前処置群が同程度に組織内菌増殖が認められることから本菌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、臓器別の生菌数で見た場合、プレドニン前処置群とプレドニン+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菌の増殖は認められ、 $10^{4.6} \sim 10^{7.50}$ cells/gの菌が生存していた。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 $10^{3.46} \sim 10^{5.28}$ cells/g、脳に $10^{0.97} \sim 10^{3.37}$ 、肺に $10^{0.69} \sim 10^{0.78}$ cells/gの菌が生存していた。

以上のことから、本菌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菌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、プレドニン前処置群とプレドニン+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、ナイトロジエ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の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

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 µg/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 µg/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 µg/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 µg/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0.8～3.2 µg/mlと最も高く、続いてナイスタチン：1.6～6.25 µg/ml、ミコナゾール：6.25～12.5 µg/ml、バトラフェン：6.25～25.0 µg/ml、CN-146：12.5～25.0 µg/ml、ケトコナゾール：6.25～50.0 µg/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 µg/ml以上であったが、その他の藻株に対しては3.2～6.25 µg/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。