

牛プロトテカ乳房炎の分子疫学および防除に関する研究

日本大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻
博士課程

曾布川 英人

2014

目 次

第 1 章	緒 論	4
第 2 章	<i>Prototheca zopfii</i> の分子疫学調査による 感染源および伝播経路の推定	12
2.1.	序 論	13
2.2.	材料及び方法	15
2.3.	結 果	19
2.3.1.	供試検体毎の分離率	19
2.3.2.	分離藻株の形態観察および炭素原資化性試験結果	19
2.3.3.	遺伝子型同定	19
2.4.	考 察	21
第 3 章	<i>Prototheca zopfii</i> genotype 1, 2 両遺伝子型の 遺伝的および表現形質の相違について	31
3.1.	序 論	32
第 1 項	Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域および β -tubulin 遺伝子による <i>Prototheca zopfii</i> 両遺伝子型系統解析	34
1.1.	序 論	35
1.2.	材料及び方法	37
1.3.	結 果	41

1.4.	考 察	42
第 2 項	<i>Prototheca zopfii</i> 両遺伝子型の超微細構造解析について	52
2.1.	序 論	53
2.2.	材料及び方法	55
2.3.	結 果	59
2.3.1.	Ultra-High Resolution Low-Voltage Scanning Electron Microscopy (UHR-LVSEM)による <i>P. zopfii</i> 両遺伝子型細胞外観の比較	59
2.3.2.	Transmission Electron Microscopy (TEM) による <i>P. zopfii</i> 両遺伝子型細胞器官の比較および評価	60
2.3.3.	Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)による 細胞壁消化およびクロロプラストの評価	61
2.4.	考 察	62
第 3 項	<i>Prototheca zopfii</i> 両遺伝子型における 薬剤および消毒薬感受性の比較	73
3.1.	序 論	74
3.2.	材料及び方法	75
3.3.	結 果	77
3.3.1.	E-test による <i>P. zopfii</i> 両遺伝子型の薬剤感受性	77
3.3.2.	Broth Microdilution による <i>P. zopfii</i> 両遺伝子型の消毒薬感受性	77
3.4.	考 察	79

第4章	試作プロトテカワクチン接種時の	
	抗体価測定および安全性の検討	84
4.1.	序 論	85
4.2.	材料及び方法	87
4.3.	結 果	90
4.3.1.	作製 ELISA plate の精度分析評価	90
4.3.2.	臨床血清の抗体価測定およびカットオフ値の設定	90
4.3.3.	不活化ワクチン接種時の安全性および免疫原性の評価	90
4.4.	考 察	92
第5章	総 括	104
	謝 辞	111
	参考文献	112

第 1 章

緒 論

昨今、景気の変動、自然災害、海外製品との競争などの様々な要因から穀物、飼料等生産費や乳製品が高騰し、この 10 年間で経営戸数は 35%、飼養頭数は 17.4%減少しており、本邦の酪農経営は非常に逼迫している状況である [農林水産省、畜産統計 2004-2014]。減少する生乳生産量や利益の確保対策として、経営規模の拡大、戸数あたりの頭数の増加、品質改良、コスト削減などが行われている。このような状況下において、酪農家に対する最も深刻な被害は、乳房炎の集団発生による長期出荷停止および乳質の低下であり、離農するケースも少なくない。一方、国外からの比較的安価な輸入製品においても、有害物質や異物の混入事件の報道により危険性の認識が浸透したため、消費者に対する安全な国内製品の供給が望まれている。以上から、乳房炎の制御は酪農家の保護、さらには国民への安全な乳製品の供給のための不可欠な課題である。

乳房炎の原因は複数存在するが、プロトテカ乳房炎は、感染時顕著な全身症状が認められないため、検出の遅延により牛舎内の感染拡大に発展する。本症は主に乳房限局性の慢性疾患であり、乳房の腫脹、硬結および熱感により乳量の減少および白色の凝固物を含んだ希薄な乳汁の分泌を引き起こす (Fig. 1-1)。剖検時、乳腺は肉芽腫性炎を呈し、病理組織学的所見上では乳腺腔を取り囲むように、類上皮細胞、線維芽細胞、リンパ球などの増生が認められ、内部に Periodic Acid-Schiff (PAS)あるいは Grocott 陽性のプロトテカが多数検出される。また、乳管においても絨毛状突起が高度かつ不規則に肥厚し、重層に化生した上皮細胞には多数のプロトテカが認められる (Fig. 1-2; Fig. 1-3)。そのため、バルク乳中の体細胞数の増加および誤計測を引き起こし、ペナルティ対象乳となるため、その全てが出荷停止となってしまう。さらに、感染牛の一般状態は良

好であるため、通常の飼養を継続しなければならず、また現状効果的な治療法がなく、結果として淘汰の必要性を求められる。本症は1頭の感染により生産、飼養の両方面における採算に打撃を与える非常に危惧される疾患の一つである。

原因となる *Prototheca* 属 (緑藻植物門、トレボキシア藻綱) は、1894年 Wilhelm Krüger により確立された葉緑素不含あるいは退縮した藻類 [Krüger, 1894] であり、植物、樹液、水、土壌、肥料さらには海水や温泉など自然界の至る所において腐生性分布している [Pore and Shahan 1988; Anderson and Walker, 1988; Enders and Weber, 1993; da Costa *et al.*, 1997; Ueno *et al.*, 2002]。本藻類は、酵母様形態を成していたことから酵母菌属 (*Saccharomyces* 属) に分類 [Ciferri *et al.*, 1957] あるいは *Sarcinosporon* 属といった新たな属を提唱されていた [King and Jong, 1975] が、その増殖生活環、形態学的特徴、生理学のおよび遺伝子系統解析により *Chlorella* 属と近縁であることが報告されている [Chodat, 1913; El-Ani, 1967; Sudman and Kaplan, 1973; Pore *et al.*, 1977]。現在、*Prototheca* 属は 7 藻種 (*Prototheca moriformis*, *P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. cutis*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae* および *P. zopfii*) から構成されており、*P. blaschkeae*, *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. cutis* が ヒト及び動物のプロトテカ症から分離、同定されている。また興味深いことに、プロトテカ症のその臨床症状、治療に対する反応性および予後は、宿主および感染藻種により異なることが知られている [Lass-Flörl and Mayr, 2007; Stenner *et al.*, 2007; Endo *et al.*, 2010]。前述の牛の症状と異なり、ヒトでは免疫不全下における感染により全身に播種し、死に至る場合 [Lass-Flörl *et al.*, 2004; Takano *et al.*, 2014] と皮膚局所感染のみで投薬、外科的切除により治癒する場合 [Chao *et al.*, 2002; Piyophiprpong *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004; Satoh *et al.*,

2010] とが存在する。犬では、一般に全身に播種する 경우가多く、治癒報告は未だに存在しない [Hosaka and Hosaka, 2004; Tsuji *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009]。一方、猫では皮膚局所感染のみとなっている [Kaplan *et al.*, 1976; Finnie and Coloe, 1981; Coloe and Allison, 1982; Dillberger *et al.*, 1988; Endo *et al.*, 2010]。いずれの宿主においても、発生数は比較的稀少であるものの増加傾向に有り、本藻類の人獣共通感染能が提言されている [Lass-Flörl and Mayr, 2007] ことから、医学領域および獣医学領域において周知されるべき感染症である。

現在、*Prototheca* 属の感染により最も被害の大きい乳牛の難治性乳房炎は、*P. blaschkeae* および *P. zopfii* の 2 藻種が原因とされているが、*P. zopfii* が最も多く検出されている。*P. zopfii* は、生化学的、血清学的および遺伝学的解析により少なくとも 2 つの genotype に分類され [Roesler *et al.*, 2003; Roesler *et al.*, 2006]、そのうち genotype 2 が牛プロトテカ乳房炎の主要原因であることが国内外において報告されている [Möller *et al.*, 2007; Osumi *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009; Jagielski *et al.*, 2011; Pieper *et al.*, 2012]。ドイツやアメリカにおいては、*P. zopfii* 感染が牛の乳房炎の 20-70%に上ると報告されており [Anderson and Walker, 1988; Enders and Weber, 1993]、本邦においても同様にプロトテカ感染牛の増加が確認されている [Ikeda and Ghoma, 2001]。

以上の背景から、牛プロトテカ乳房炎の制御は重要な課題となっているが、現在までに両遺伝子型に基づいた分子疫学調査による感染経路の調査や治療および防除の検討は進んでいないのが現状である。

本研究では、牛プロトテカ乳房炎の感染源解明および防疫を目的に検討を行った。第 1 章では、*P. zopfii* の分子疫学調査により、感染源および伝播経路を推

定した。次いで、第 2 章では両遺伝子型の相違追求のために、分子生物学的解析、*P. zopfi* 超微細構造の観察および抗菌剤、消毒薬感受性試験の 3 項について検討した。最後に第 3 章では、有効な治療法を欠く本症の新たな防除法確立を目途に、プロトテカワクチンを試作し有効性、安全性を評価した。

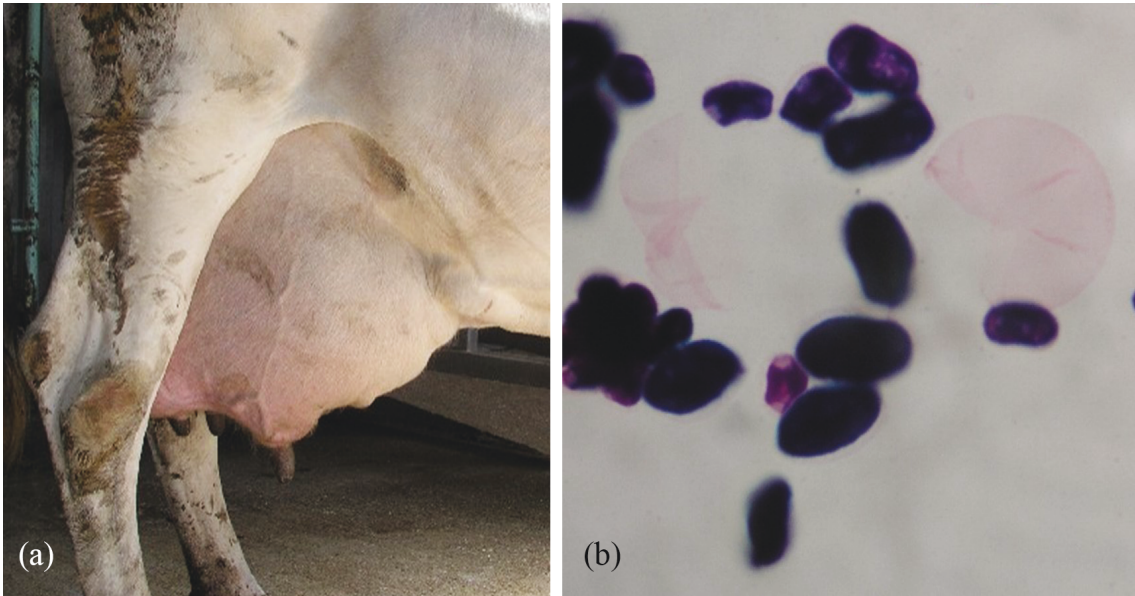


Fig. 1-1. The Clinical findings of protothecal mastitis. Erythema and swelling were observed at right front and back udders (a). Yeast like characteristics of *Prototheca zopfii* in protothecal mastitis milk (Gram stain) (b).

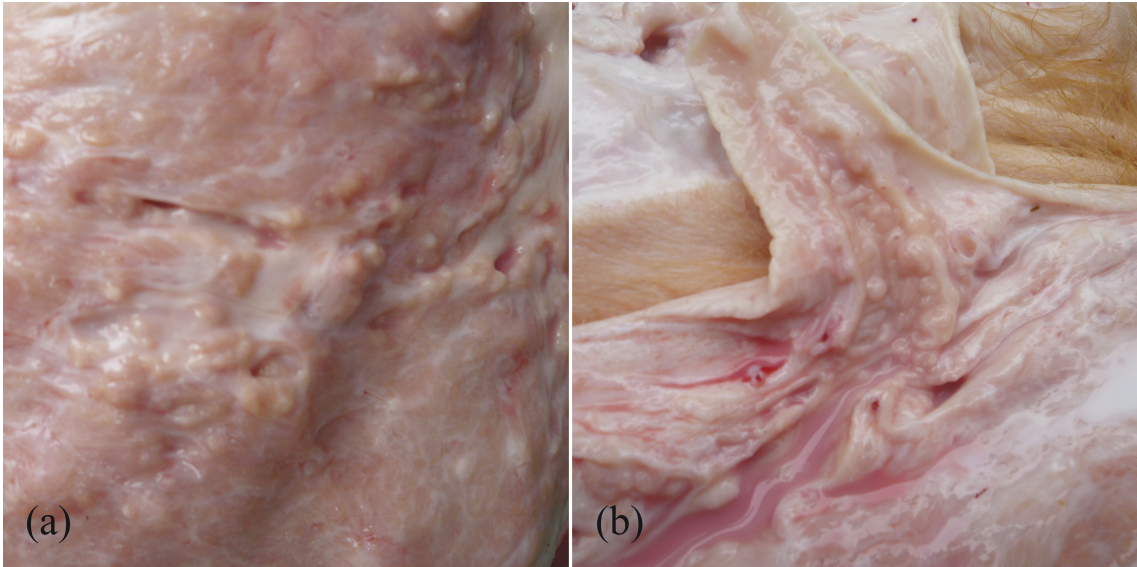


Fig. 1-2. The gross pathological findings of protothecal mastitis. Nodules with granulomas were observed in mammary glands (a) and ducts (b).

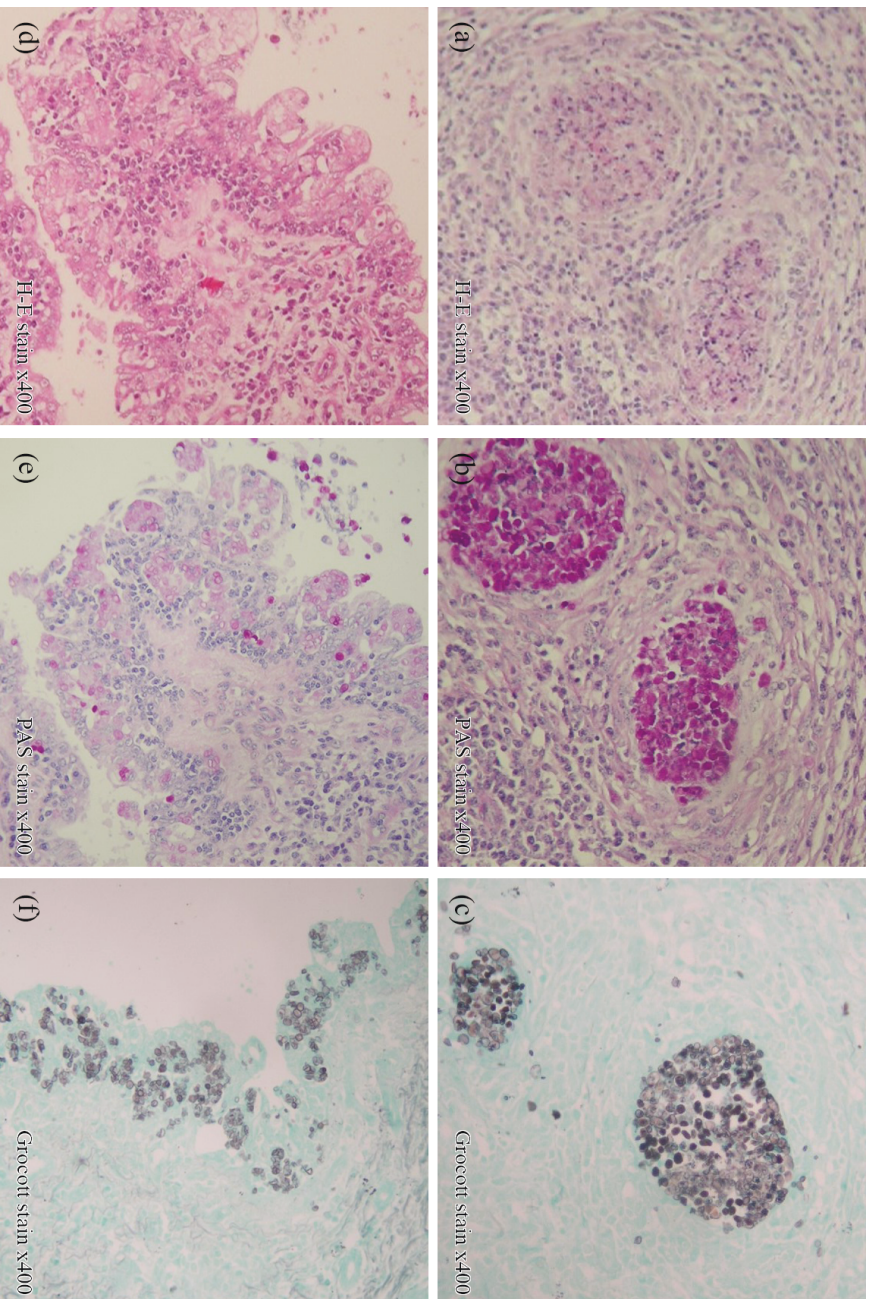


Fig. 1-3. *Prototheca* organisms were visible in the cavities of mammary gland (a)-(c) and epitheliums of breast ducts (d)-(f). Granulomatous inflammation with hyperplasia of the epithelioid cells, fibroblasts and lymphocyte were observed around the eosin positive *Prototheca* organisms (a). *Prototheca* organisms were observed in atrophied glandular cavities and interstitial tissues (b), (c). Highly and irregularly thickened villus of the breast ducts were observed (d) and *Prototheca* organisms were present along by the metamorphosed epithelium cells (e), (f). (a), (d) Hematoxylin-Eosin stain; (b), (e) Periodic acid-Schiff stain; (c), (f) Grocott stain.

第 2 章

Prototheca zopfii の分子疫学調査による

感染源および伝播経路の推定

2.1 序 論

藻類の一属である *Prototheca* 属の最初の感染症例は 1952 年、ドイツにおいて牛の乳房炎で報告されている [Lerche *et al.*, 1952]。それ以来、*Prototheca* 属による感染は、牛などの生産動物に限らず、犬や猫などの愛玩動物、食果コウモリなどの野生動物、魚およびヒトにおいて報告されている [Davies *et al.*, 1964; Metteler, 1975; Gentles *et al.*, 1977; Ginel *et al.*, 1997; de Vargas *et al.*, 1998; Endo *et al.*, 2010; Todd *et al.*, 2012]。*Prototheca* 属は特に湿潤な有機質が多い環境に腐生性分布しており [Anderson *et al.*, 1988; Leimann *et al.*, 2004; Scaccabarozzi *et al.*, 2008]、それ故にプロトテカ症は世界各地で報告されている [Lass-Flörl and Mayr, 2007]。近年、プロトテカ症は増加傾向にあるが、未だヒトや小動物での感染は稀である [Lass-Flörl and Mayr, 2007; Stenner *et al.*, 2007]。一方、牛のプロトテカ症は最も報告数が多い。その臨床症状は、主に乳房の発赤、腫脹、硬結であり、一般的に全身症状は認められない。感染により体細胞数の急激な上昇を引き起こし、希薄な水様乳汁および凝固物を分泌するため、生乳生産量の減少につながりやすい非常に危惧される疾患である [Bueno *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2011; Lassa *et al.*, 2011]。

牛のプロトテカ症の原因のほとんどが *Prototheca zopfii* による乳房炎である。*P. zopfii* は 2003 年、血清学的小および生化学的相違により 3 つの Biotype に分類された [Roesler *et al.*, 2003]。さらに 2006 年、18S ribosomal DNA 塩基配列解析に基づき、Biotype 1 および 2 は、genotype 1 および 2 に再分類され、Biotype 3 は新たに *Prototheca blaschkeae* とされた [Roesler *et al.*, 2006]。そのうち、*P. zopfii*

genotype 2 が牛プロトテカ乳房炎の主要病原性株とされ、本邦 [Osumi *et al.*, 2008] を含め、ドイツ [Roesler *et al.*, 2006; Möller *et al.*, 2007]、イタリア [Ricchi *et al.*, 2010]、ポルトガル [Marques *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009]、ポーランド [Jagielski *et al.*, 2011]、デンマーク [Jensen *et al.*, 1998]、アメリカ合衆国 [Pore *et al.*, 1987; Anderson and Walker, 1988]、カナダ [Pieper *et al.*, 2012]、ブラジル [Bueno *et al.*, 2006] など多数の国々において同様である。また近年では、乳房炎乳汁および牛舎環境試料から *P. blaskcheae* の検出も報告されている [Aouay *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009; Ahrholdt *et al.*, 2011; Jagielski *et al.*, 2011; Ricchi *et al.*, 2013]。一方、*P. zopfii* genotype 1 は乳汁などの臨床検体からではなく、ほとんどが環境中試料から検出されている [Möller *et al.*, 2007; Osumi *et al.*, 2008]。現在まで、上記に示した各国の分子疫学調査により、牛プロトテカ乳房炎の原因藻種、遺伝子型の同定ならびに感染源および伝播経路の推定が行われてきた。しかしながら、複数のプロトテカ乳房炎発生農家において、明確な感染源は認められない場合 [Spalton *et al.*, 1985; Costa *et al.*, 1997; Osumi *et al.*, 2008] や、対照的にプロトテカ乳房炎未発生農家の環境中から頻繁に本藻を検出する例があること [Anderson and Walker, 1988] から、未だ感染源および伝播経路の特定には至っていない。このことは、*P. zopfii* 両遺伝子型を基にした長期間あるいは大規模な分子疫学調査が進んでいないことも、特定に至らない要因の1つとなっている。

そこで本研究では、乳汁、バルク乳、糞便、飲料水、体液（ルーメンジュース、血液、尿）および牛舎環境試料（牛床、飼料、敷料等）から本藻を分離後、藻種および遺伝子型を同定し、感染源ならびに伝播経路の検索を実施した。

2.2 材料及び方法

2.2.1 供試検体

プロトテカ感染乳汁 160 検体 (89 頭/44 戸)、バルク乳 285 検体 (260 戸) 腸管内糞便 821 検体 (プロトテカ感染牛 67 頭、非感染牛 745 頭、子牛 9 頭/18 戸)、飲料水 478 検体 (10 戸)、他動物 (ネコ、ネズミ) 糞便 4 検体、体液 (ルーメンジュース、全血、尿) 12 検体 (プロトテカ感染牛 3 頭、非感染牛 3 頭)、ミルカー一拭い液 7 検体 (2 戸) および環境由来試料 (牛床、飼料) 79 検体の計 1849 検体を *Prototheca* 属藻類分離用試料として採材した。

2.2.2 標準株

使用した各 *Prototheca* 属藻種の標準株を Table 2-1 に示した。全ての標準株は、Yeast and Mould (YM) agar (関東化学) 上、室温下にて維持し、実験使用 3 日前に *Prototheca* isolation medium (PIM ; 1% Potassium hydrogen phthalate、0.09% Sodium hydroxide、0.01% Magnesium sulphate、0.02% Potassium phosphate monobasic、0.03% Ammonium chloride、0.0001% Thiamine hydrochloride、2% purified agar、1% glucose) [Pore, 1973] 上で前培養を行った。

2.2.3 採材期間および採材地域

採材期間は 2004 年 10 月から 2014 年 6 月までの 10 年間とし、愛知・愛媛・静岡・千葉・富山・奈良・三重・北海道の計 8 地域の各農家から採材を実施した。

2.2.4 *Prototheca* 属藻類の分離培養法

プロトテカ感染分房より採取した乳汁およびバルク乳は、PIM 平板培地上に 100 μ L 接種し、画線塗抹後 37 °C 条件下にて、48 時間好気培養を行い、藻株を得た。

腸管内糞便および飼料は、採材後直ちに滅菌生理食塩水に懸濁した。飲料水および牛床試料は遠心 (1,500 x g、5 分) 後、上清を除去し、沈渣を得た。得られた上記試料および体液試料を Broth PIM に 100 μ L 接種し、37 °C、48 時間振盪培養を行った。培養後、増菌が確認された検体を PIM 平板培地上に接種し、さらに同条件下にて好気培養を行った。コロニー形成後、光学顕微鏡を用いて *Prototheca* 属を探索し、純培養した (Fig. 2-1)。

2.2.5 藻種同定

<形態観察>

前述の分離培養により得られた藻株は、全てラクトフェノールコットンブルー染色を施し、光学顕微鏡下にて Sporangiospore の形状、直径および莢膜の有無を判定した (Fig. 2-2)。

<炭素原資化性試験>

Glucose、Galactose、Fluctose、Sucrose、Trehalose、Glycerol、1-Propanol および Ethanol の各種炭素原をそれぞれ 1% (w/v) の濃度に添加した Broth PIM に、 1.0×10^5 cells/mL に調整した藻株懸濁液を接種し、25 °C 条件下で振盪培養後、

増殖の有無により資化能の判定を行った。

各藻種の形態および各種炭素原資化能の判定基準は、The Yeast 5th edition [Pore, 2011] より参照した (Table 2-2)。

2.2.6 遺伝子型解析

<DNA 抽出>

全ての被検藻株は、PIM 平板培地にて 37°C、48 時間前培養を行い、得られたコロニーを回収し、Lysis buffer [1 mg/mL zymolyase 100T (ナカライテスク)、0.1 mM EDTA、1% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)、10 mM Tris hydrochloride、0.3% 2-mercaptoethanol、1 mg/mL Ribonuclease A from Bovine Pancreas (Sigma-Aldrich)] に懸濁した。さらに懸濁液にガラスビーズ (Sigma-Aldrich) を加え、ボルテックスにより細胞の破碎を行った後、37 °C、14 時間維持した。インキュベート後、フェノールおよびクロロホルムにより脱タンパク処理を行い、エタノール沈殿後、風乾したペレットを 50 µL の MQ に溶解し、ゲノム DNA 抽出液とした。吸光度計を用いて、DNA 量および 260 nm/280nm 比率を測定した。

<Genotype specific PCR>

得られたゲノム DNA (< 200 ng) および既報の *P. zopfii* 遺伝子型分類用 18S ribosomal DNA 3'末端領域増幅用プライマーセットおよび遺伝子型特異的 reverse プライマー (Table 2-3) [Roesler *et al.*, 2006] を用いて、Recombinant *Taq*

DNA Polymerase (TaKaRa)にて PCR を実施した。反応液は説明書に従い調整し、最初に 95 °C で 2 分の反応を行った後、95 °C で 30 秒、58 °C で 1 分、72 °C で 1 分の反応を 35 サイクル行った。反応後、2% (w/v) アガロースゲルおよび 1 x Tris-acetate-EDTA buffer を用いて電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色を施し、UV laser 下にて目的 DNA 断片の増幅を確認した (Fig. 2-3)。

<DNA 精製、シーケンス>

増幅 DNA 断片に ExoSAP-IT PCR Product Clean-Up (Affymetrix) を加え、37 °C で 15 分、80 °C で 15 分間の反応を行い、DNA を精製した。精製 DNA および BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、サイクルシーケンスを行った。その後、Agencourt® CleanSEQ® (BECKMAN COULTER) によりサイクルシーケンス後の残留した Dye を除去し、Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により DNA シーケンスを行い、塩基配列を解析した。得られた塩基配列は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) により相同性検索を行い、藻種および *P. zopfii* 遺伝子型を同定した。

2.3 結果

2.3.1 各試料群における分離率

各試料群における分離率は Table 2-4 に示した。すなわち、プロトテカ感染乳：100% (160/160)、バルク乳：11.2% (32/285)、腸管内糞便：16.1% [132/821；プロトテカ感染牛：26.9% (18/67)、非感染牛：14.4% (107/745)、子牛：77.8% (7/9)]、飲料水：5.9% (28/478)、牛床、牛舎周辺：13.7% (10/73)、他動物（ネズミ）糞便：25% (1/4) であった。

飼料、体液検体からは、*Prototheca* 属の検出は認められなかった (Table 2-4)。

2.3.2 分離藻株の形態観察および炭素原資化能による藻種同定

分離藻株の Sporangiospore は、全て 6.5 μm 以上、円あるいは楕円形を呈し、莢膜の形成は認められなかった (Fig. 2-2)。炭素原資化性試験では、分離した 363 株のうち、362 株は *P. zopfii* と同様の資化能を有していた。一方、腸管内糞便（プロトテカ感染牛）由来の 1 株は、*P. blaschkeae* と同様の資化能を示した (Table 2-2)。

以上から、362 株を *P. zopfii*、腸管内糞便由来 1 株を *P. blaschkeae* と同定した。

2.3.3 遺伝子型同定

P. zopfii 遺伝子型特異的 PCR により、450 bp の内部遺伝子以外に 160 bp の各遺伝子型の標的遺伝子が増幅された。一方、*P. blaschkeae* の 1 株では標的遺伝子の増幅は確認されなかった (Fig. 2-3)。以上の遺伝子型特異的 PCR および塩基

配列解析から同定した分離藻株の遺伝子型比率は、プロトテカ感染乳, genotype 1 : 2 = 0.6% (1 株) : 99.4% (159 株)、以下同順、バルク乳, 0 (0) : 100 (32)、腸管内糞便, 68.2 (91) : 31.1 (39) : 0.7 (1) (*P. blaschkeae*) [プロトテカ感染牛, 50.0 (9) : 44.4 (8) : 0.8 (1)、非感染牛, 71.9 (82) : 28.1 (32)]、飲料水, 71.4 (20) : 28.6 (8)、牛床、牛舎周囲, 40.0 (4) : 60.0 (6)、他動物糞便, 100 (1) : 0 (0) であった (Table 2-4)。また、既存の各藻種および遺伝子型配列と分離藻株塩基配列との相同性はそれぞれ 100%であった。

2.4 考 察

プロトテカ感染乳およびバルク乳由来株では1株を除き、全て genotype 2 と同定されたことから、既報の疫学調査と同様に genotype 2 が牛に対して病原性を有していることを再確認した。環境由来各試料では、プロトテカ感染牛腸管内糞便から最も高い分離率を示し、糞便検体全体においても比較的高い分離率を示した。また、糞便由来株の遺伝子型比率は、非病原株である genotype 1 が優位であるものの、病原株である genotype 2 も検出された。すなわち、乳房感染の有無に関わらず全ての牛から genotype 2 を検出したことから、糞便が感染源である可能性が強く示唆された。また、生後1ヶ月齢の子牛糞便中からは全て genotype 2 を検出していることから、初乳あるいは母乳による経口感染の可能性も併せて考えられた。一方、飲料水は、腸管内糞便と同様の遺伝子型比率を示したものの、分離率は低く、採材位置とプロトテカ感染牛との間に位置的関連性を認められなかった。そのため、飲料水由来株は感染乳汁の落下および糞便飛沫の汚染に基づくと推察された。また、牛床および牛舎周囲由来株は genotype 2 を検出しているものの、全体の検体数および分離数がともに少数であることから、感染乳汁および糞便による汚染の可能性が高いと推察された。牛舎環境に生息する他動物では、ネズミの腸管内糞便から1検体分離し、genotype 1 と同定した。非病原株の genotype 1 であり、また検出数も低いことから、牛舎環境に出入りする他動物からの伝播の可能性は低いと考えられた。その他の未検出の検体について、ミルカーは消毒後の採材であったため検出されなかったと推察された。飼料においては、プロトテカ以外の細菌または真菌が優位であ

ったために検出されなかったことが考えられた。しかしながら、Adhikari らの報告では、飼料を培地成分として *P. zopfi* 両遺伝子型を接種した場合、培養されることが確認されている [Adhikari *et al.*, 2013] ため、今後も飼料および敷料についての検討は行う必要があると考えられた。また、プロトテカ感染牛および非感染牛に関わらず、血液、尿およびルーメンジュースなどの体液検体から検出されなかった。国内外の既報および本研究により、本藻類感染牛は顕著な全身症状を示さない乳房限局性慢性疾患であること、さらに環境試料、特に糞便から本藻類が検出されることが知られている [Bueno *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2011; Lassa *et al.*, 2011]。従って、牛において本藻類は乳房および腸管内に限局するものと考えられた。

これまで国内外において、腸管内糞便を含んだ環境試料からの genotype 2 の検出は報告されておらず、環境試料からはほとんど非病原株の genotype 1 が分布し、乳房炎乳汁から病原株である genotype 2 が検出されていた。故に、感染源および伝播経路は特定されず、消化管からの移行や抗菌剤の乳房内投与による菌交代症が提示されていた [Pieper *et al.*, 2012]。しかしながら、本研究の結果により、本邦の牛プロトテカ乳房炎では、腸管内糞便および乳汁が感染源であることが初めて明らかとなった。上記の感染源により、牛床および飲料水が汚染にされた場合、さらなる伝播の危険性が考えられた。また、不十分な洗浄消毒により、搾乳器具を介した伝播の可能性、殺藻処理を施していない初乳や母乳投与による子牛への伝播が推察された。これらの考えられうる伝播経路への対策として、プロトテカ感染牛の隔離および搾乳順の変更、子牛に対する殺藻後の授乳、糞便の頻回除去および洗浄、飲料水や牛床の洗浄消毒の必要性があ

ると考えられた。

本章では、本邦における *P. zopfi* 感染性乳房炎の感染源および伝播経路を初めて明らかにし、本症発生時の対策においても新たな情報をもたらした。

Table 2-1. Type strains of *Prototheca* spp..

Strains	No.	Isolation	Genotype
<i>Prototheca zopfii</i>	SAG2063 ^T	Bovine feces*, Germany	1
<i>Prototheca zopfii</i>	SAG2021 ^T	Clinical bovine mastitis. Germany	2
<i>Prototheca blaschkeae</i>	SAG2064 ^T	Human onychomycosis, Germany	3
<i>Prototheca moriformis</i>	ATCC50081 ^T	Cheese factory waste water, Costa Rica	–
<i>Prototheca stagnora</i>	JCM9641 ^T	Bottom sludge, USA	–
<i>Prototheca ulmea</i>	JCM9640	ND**, Japan	–
<i>Prototheca wickerhamii</i>	ATCC16529 ^T	Household plumbing, USA	–

SAG, The Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany.

ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

JCM, Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, Wako, Japan.

*, Dairy herd which was apparently free of bovine protothecal mastitis.

**, Not determined or unrecorded

Table 2-2. Oligonucleotide primer sequence used in this chapter.

Primer name	Sequence (5' to 3')	Target
Proto-18-4f	GACATGGCGAGGATTGACAGA	*Internal control for 18S r DNA
Proto-18-4r	AGCACACCCAATCGGTAGGA	*Internal control for 18S r DNA
PZ GT 1/r	GCCAAGGCCCGCGAAG	**Genotype 1-specific PCR
PZ GT 2/r	GTCGGCGGGGCAAAGC	**Genotype 2-specific PCR

*, Dairy herd which was apparently free of bovine protothecal mastitis.

** , Not determined or unrecorded

Table 2-3. Morphology and assimilation of the clinical isolates and recognized species of *Prototheca*.

Strains	Sporangiospore			Carbon resources							
	Diameter	Spherical*	Capsule	Glucose	Galactose	D (-) Fructose	Sucrose	Trehalose	Glycerol	l - Propanole	Ethanol
Clinical isolates (n=362)	L	V	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Clinical isolate (n=1)	L	V	-	+	W	+	-	-	-	+	+
<i>Prototheca zopfii</i>	L	V	-	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Prototheca blaschkeae</i>	L	V	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Prototheca moriformis</i>	L	V	+	+	-	+	-	-	V	+	V
<i>Prototheca stagnora</i>	S	+	+	+	+	+	-	-	+	W	+/W
<i>Prototheca ulmea</i>	S	V	+	+	-	-	-	-	NT	W	NT
<i>Prototheca wickerhamii</i>	S	-	-	+	+	+	-	+	+	-	W

L : > 6.5 µm; S : > 3.0 µm; + : positive; - : negative; W : weakly positive; +/W : positive or weakly positive;

V : valuable; NT : not tested

* : +, All cell stages obviously nearly spherical; V, Spherical or ellipsoidal

Reference data are from Pore edn The yeast 5th edition.

Table 2-4. The results of *Prototheca* isolation from milk and environmental samples, and genotypes of all isolates.

Specimens	Isolates/Inspects (Isolation rate %)	<i>P. zopfii</i>		<i>P. blaschkeae</i>
		Genotype 1		
		Genotype 1	Genotype 2	
Infected milk	160/160 (100)	1 (0.6)	159 (99.4)	–
Bulk	32/285 (11.2)	–	32 (100)	–
Feces (All)	132/821 (16.1)	91 (68.9)	39 (30.3)	1 (0.8)
Feces (Infeted cow)	18/ 67 (26.9)	9 (50.0)	8 (44.4)	1 (5.6)
Feces (Nomal cow)	114/754 (15.0)	82 (71.9)	32 (28.1)	–
Drinking water	28/478 (5.9)	20 (71.4)	8 (28.6)	–
Cow shed	10/ 73 (13.7)	4 (40.0)	6 (60.0)	–
Other animals (Feces)	1/ 4 (25.0)	1 (100)	–	–

* Feed, Milker, Body fluid ... not isolated

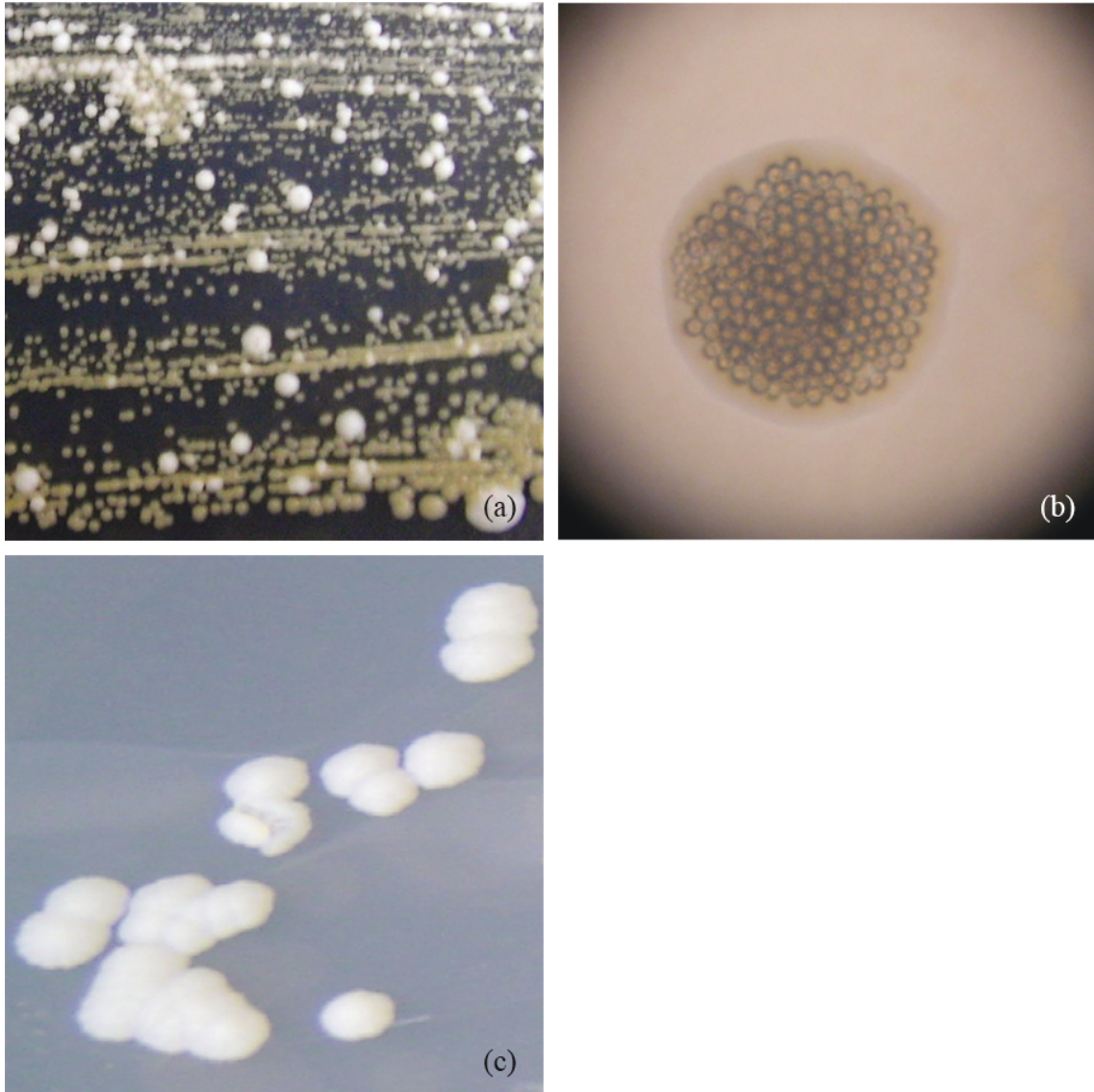


Fig. 2-1. Colonies of *Prototheca spp.* and the other yeasts grew from environmental samples on PIM (a). A low powered microscopic magnification (x 100) of *Prototheca* colony on PIM (b). White and smooth colonies of *prototheca spp.* on PIM (c).

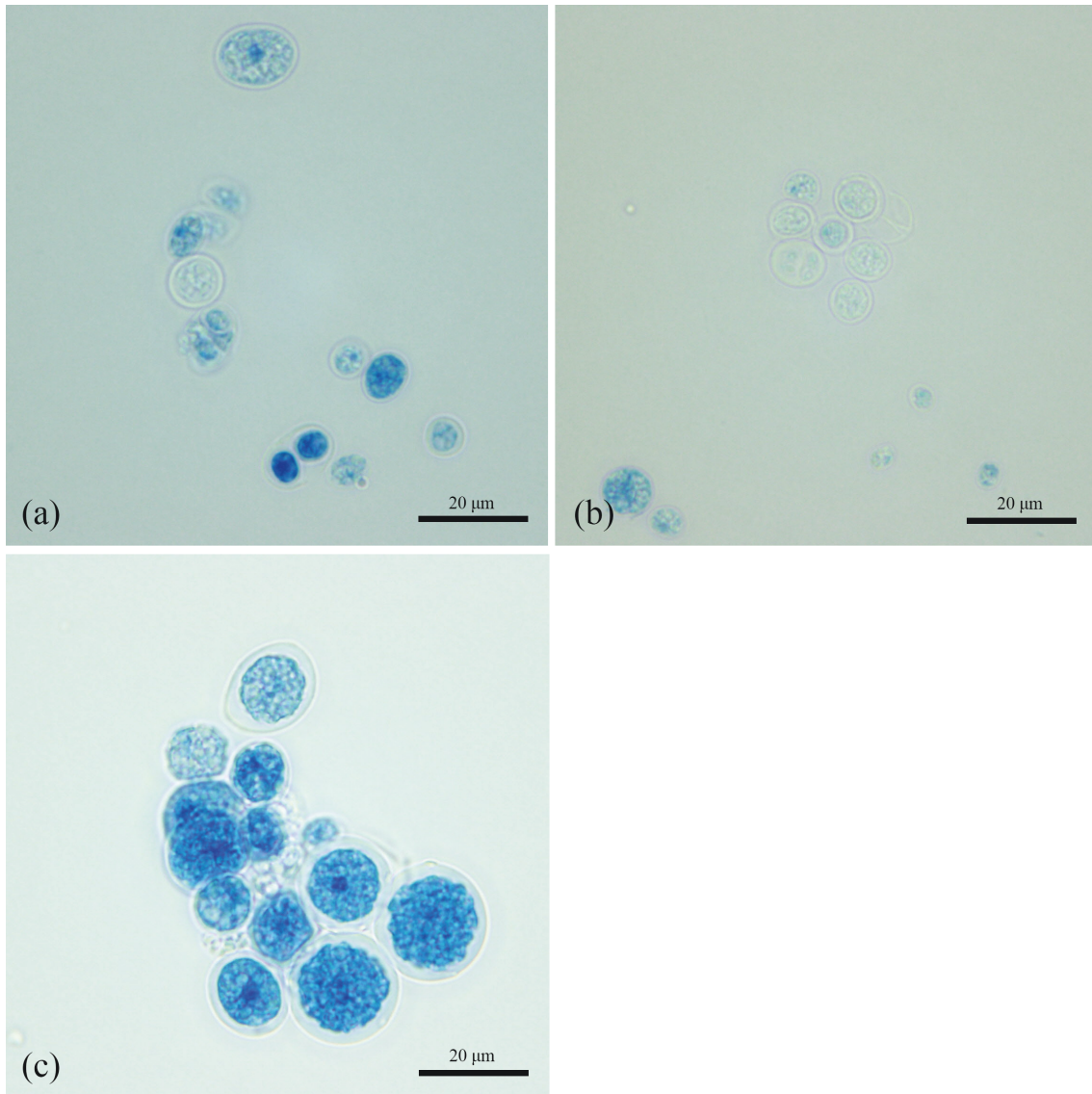


Fig. 2-2. Light microscopic features of *Prototheca zopfii* and *P. blaschkeae* (Lactophenol cotton blue : LCB stain). (a) *Prototheca zopfii* genotype 1. (b) *P. zopfii*. genotype 2. (c) *P. blaschkeae*.

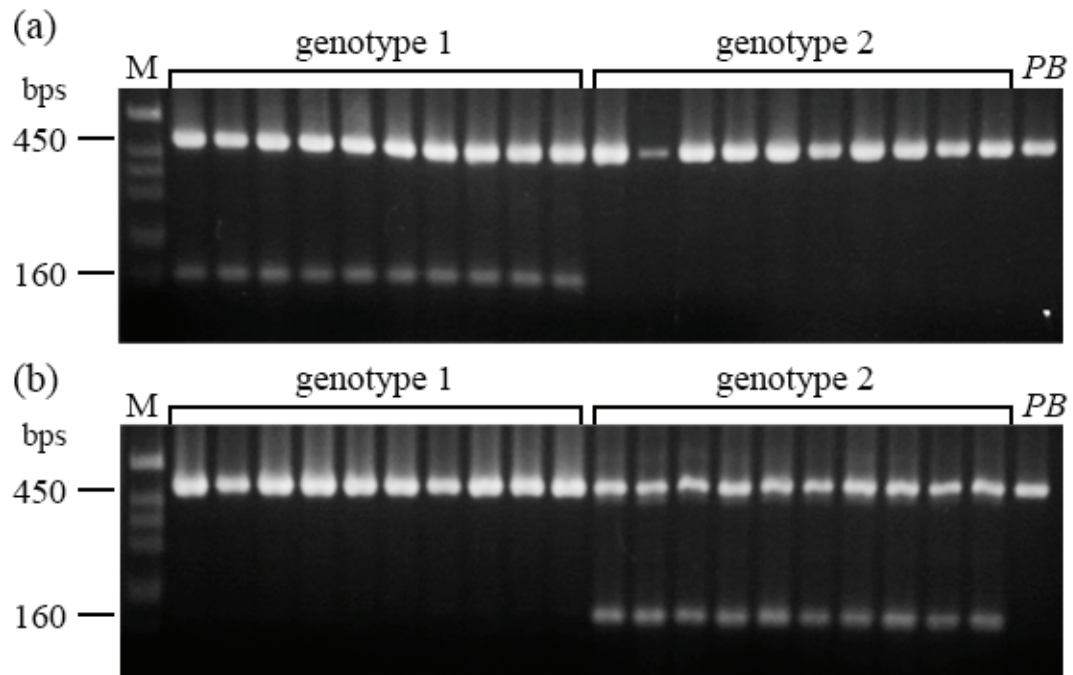


Fig. 2-3. PCR amplification of *Prototheca zopfii* genotype 1 specific primer set (a) and genotype 2 specific primer set (b). Each amplicon of gene specific fragment was 160-bps. M: DNA ladder marker, PB: *P. blaschkeae*.

第3章

Prototheca zopfii genotype 1, 2 両遺伝子型の
遺伝的および表現形質の相違について

3. 序 論

Prototheca 属は 1894 年の Krüger の分離報告以降、その分類は変遷している。当初、Krüger は分離した微生物を光学顕微鏡下における形態から真菌としたものの、酵母あるいは葉緑素を有する藻菌類との関連性を確認できなかった [Krüger, 1894]。その後、胞子の形成増殖様式、化学物質、炭素原の代謝などの発見により随時、酵母あるいは藻類への分類を繰り返していた [Chodat, 1913; Ashforth *et al.*, 1930; Arnord and Ahearn, 1972]。1973 年、電子顕微鏡解析により真菌とは異なる可能性が提示され [Nadakavukaren and McCracken, 1973]、同年および 1977 年、より包括的な形態学および生理学的分類から、*P. stagnora* (Cooke 1968), *P. wickerhamii* (Tsubaki and Soneda 1959), *P. zopfii* (Krüger 1894) を *Prototheca* 属として提言された [Sudman and Kaplan, 1973; Pore *et al.*, 1977]。以降、生化学的性状および遺伝子解析により上記藻種に加え、*P. ulmea*, *P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. moriformis* が *Prototheca* 属と報告された [Pore *et al.*, 1985; Roehler *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 2010]。さらに、*P. zopfii* の遺伝子型分類 [Roesler *et al.*, 2003; Roehler *et al.*, 2006] 後、Real-time PCR による DNA resolution melting method による藻種および *P. zopfii* 遺伝子型の迅速同定 [Ricchi *et al.*, 2011; Onozaki *et al.*, 2013]、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) を用いた質量分析による藻種および *P. zopfii* 遺伝子型分類 [von Bergen *et al.*, 2009; Ahrholdt *et al.*, 2012]、二次元電気泳動による *P. zopfii* 両遺伝子型における含有タンパクの比較 [Murugaiyan *et al.*, 2013] などの解析が進められてきた。しかしながら、未だ本藻類および *P. zopfii* の遺伝子型

に対する各解析は進んでおらず、不明な点が多い。前章の分子疫学調査、既存の疫学調査並びに遺伝子解析報告により、*P. zopfii* の遺伝子型と病原性との間に関連性が認められることが明らかとなった。両遺伝子型の相違は病原性の解明に資するものである。

そこで本研究では以下の 3 項について検討を行った。第 1 項では Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域および β -tubulin 遺伝子による系統解析を実施し、*P. zopfii* 両遺伝子型の多様性について解析した。続いて、第 2 項では *P. zopfii* 両遺伝子型の形態学的特徴の相違について検索するため、超微細構造の観察を実施した。最後に、第 3 項では *P. zopfii* 両遺伝子型の薬剤および消毒薬感受性を比較するとともに、牛プロトテカ乳房炎に対する防除法の検討を行った。

第 1 項

Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域および β -tubulin 遺伝子
による *Prototheca zopfii* 両遺伝子型系統解析

1.1 序 論

2006年、18S rDNA 領域遺伝子解析により *Prototheca zopfii* は genotype 1 および 2 に分類された [Roesler *et al.*, 2003; Roehler *et al.*, 2006]。その後、同様の遺伝子型解析、世界各地の疫学調査および本研究第 2 章の結果より genotype 2 が牛プロトテカ乳房炎の起因藻種であることが示唆された。現在まで、*Prototheca* 属の系統学的分類は 18S rDNA [Roesler *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2008] および 26S rDNA Domain 1/2 領域 [Kishimoto *et al.*, 2010] により行われてきた。しかしながら、両領域ともに安定リボソーム領域であり、*P. zopfii* の遺伝子型鑑別までは可能であるものの、分離環境、地域および宿主における株間の種内変異までは検出不可能である。また、同領域系統解析において別種とされる *P. moriformis* は *P. zopfii* 両遺伝子型株と同一のクラスターに属し、さらに生化学的性状も類似しているため、*P. moriformis* の種としての位置付けは、現在議論されている [Ueno *et al.*, 2005; Roesler *et al.*, 2006]。加えて 2011 年、Pore は *P. zopfii* を新たに 5 つの variety として分類した [Pore, 2011]。同分類では var. *zopfii* (*P. zopfii* genotype 1 および 2)、var. 1 (*P. blaschkeae*)、var. 3 (*P. moriformis*) および var. *portoricensis* (*P. portoricensis*) とされている。しかしながら、両遺伝子型が同一 variety に属することは、病原性と遺伝学的特徴が反映されていない。

以上から、既知のリボソーム領域のみにおける本藻の分類は困難であるため、近年、同属の *P. wickerhamii* において Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域の遺伝子配列が解析され、同種の更なる分類の可能性が提言された [Hirose *et al.*, 2013]。さらに、*P. zopfii* の β -tubulin 遺伝子配列が一部クローニングされた

[Mancera *et al.*, 2012]。

以上の背景から本研究では、*P. zopfi* 両遺伝子型株の ITS 領域、 β -tubulin 遺伝子のクローニングおよび遺伝子系統解析により、さらなる分類の可能性について検討した。

1.2 材料及び方法

1.2.1 被検株及び標準株

ITS 領域系統解析用 (Table 1-1)、 β -tubulin 遺伝子系統解析用被検株 (Table 1-2) はそれぞれ Table に示した。各 *Prototheca* 属藻種の標準株は前章の Table に記載した。全ての藻株は前章と同様の方法で培養し、実験に供試した。

1.2.2 PCR プライマー

18S rDNA 全領域および 26S rDNA Domain1/2 領域、ITS 領域および β -tubulin 遺伝子増幅用プライマーを Table 1-3 に示した。18S rDNA 全領域 [Medlin *et al.*, 1988; Huss and Sogin, 1990] および 26S rDNA Domain1/2 [O'Donnell, 1993; Kurtzman and Robnett, 1997] に対するプライマーは、既報のものを使用した。サイクルシーケンス用プライマーは、既存の塩基配列情報を基に設計した。ITS 領域増幅用プライマーは、得られた 18S rDNA 領域 3'末端および 26S rDNA Domain1/2 領域 5'末端の塩基配列の情報を基に設計した。ITS 領域サイクルシーケンス用プライマーは、近縁の *Chlorella* 属、*Trebouxia* 属の 5.8S rDNA 領域の塩基配列から、共通配列を選択し設計した。 β -tubulin 遺伝子増幅用プライマーは、既存の塩基配列情報 [Mancera *et al.*, 2012] を基に設計した。

1.2.3 遺伝子解析

<DNA 抽出>

前章と同様の細胞破砕、脱タンパクおよびエタノール沈殿を用いて、各被検株および標準株の DNA 抽出を行った。

<PCR>

得られたゲノム DNA (< 200 ng) および各リボソーム領域、ITS 領域増幅用プライマーを用いて、PrimeSTAR[®] Max DNA polymerase (TaKaRa) にて PCR を実施した。反応液は説明書に従い調整し、98 °C で 10 秒、58 °C で 15 秒、72 °C で 20 秒の反応を 35 サイクル行った。一方、 β -tubulin 遺伝子は前章と同様に Recombinant *Taq* DNA Polymerase (TaKaRa) にて PCR を実施した。反応液は説明書に従い調整し、最初に 95 °C で 2 分の反応を行った後、95 °C で 1 分、50 °C で 1 分、72 °C で 2 分の反応を 35 サイクル行った。反応後、2% (w/v) アガロースゲルおよび 1 x Tris-acetate-EDTA buffer を用いて電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイド染色を施し、UV laser 下にて目的 DNA 断片の増幅を確認した。

<クローニング>

目的産物を Mighty Cloning Reagent set (Blunt End) (TaKaRa) により精製し、pUC 118 *Hinc* II/BAP ベクターを用いて 16°C、1 時間ライゲーションを行った。その後、100 μ g/mL Ampicilin 添加 Luria-Bertani (LB) 培地上にて *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (TaKaRa) に形質転換を行った。得られたコロニーを EmeraldAmp[®] PCR Master Mix を用いて、インサートチェック PCR として 98 °C で 10 秒、58 °C で 30 秒、72 °C で 4 分の反応を 30 サイクル行った。インサート

の確認されたコロニーを Broth LB にて増菌し、Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD) によりプラスミドを回収した。回収後のプラスミド量を吸光度計により測定し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および設計したサイクルシーケンス用プライマーを用いて、サイクルシーケンスを行った。その後、Agencourt[®] CleanSEQ[®] (BECKMAN COULTER) によりサイクルシーケンス後の Dye を除去し、Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により DNA シーケンスを行い、塩基配列を得た。18S rDNA 全領域および 26S rDNA Domain1/2 領域の遺伝子配列は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) により相同性検索を行い、藻種および *P. zopfii* 遺伝子型を同定した。各藻種および *P. zopfii* 各遺伝子型の ITS 領域遺伝子配列は、ATCG Ver. 7.5.1 シーケンスアセンブリソフトウェア (GENETYX CORPORATION)、GENETYX Ver.12 (GENETYX CORPORATION) により、18S rDNA 領域 3'末端および 26S rDNA Domain1/2 領域 5'末端の塩基配列とアセンブルを行った。また、近縁の *Chlorella* 属、*Trebouxia* 属の 5.8S rDNA 領域の塩基配列と比較を行い、本藻類の ITS 領域遺伝子配列を決定した。

<DNA 精製、シーケンス>

β -tubulin 遺伝子の増幅 DNA 断片は、前章と同様の方法を用いて精製した。続いて、精製 DNA を用いて BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により DNA シーケンスを行い、塩基配列を得た。 β -tubulin 遺伝子配列は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) により相同性検索を行い、

藻種および *P. zopfii* 遺伝子型を同定した。

< 遺伝子系統解析 >

得られた各リボソーム領域、ITS 領域および β -tubulin 遺伝子の塩基配列は、GenBank 登録株を含め、MEGA ver. 6.0 ソフトウェア [Tamura *et al.*, 2013] 内の CLUSTAL W program [Thompson *et al.*, 1994] を用いてアライメントを行い、5' および 3' 末端の塩基配列をトリミングした。系統樹は neighbor-joining method [Saitou and Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2004] を用いて構築した。進化距離の評価は Maximum Composite Likelihood method [Tamura *et al.*, 2004] に従った。系統樹の分岐の確率は、Bootstrap test [Felsenstein *et al.*, 1985] を 1000 回試行し評価した。各系統樹のアウターグループは、Genbank に登録されている既存の近縁藻類 (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Helicosporidium sp.*, *Trebouxia impressa*) の塩基配列を使用した。

1.3 結果

1.3.1. ITS 領域遺伝子系統解析

Prototheca 属の ITS 領域塩基配列は、各藻種により 716-2539 bp の異なる長さを有していた。一方、18S rDNA 全領域および 26S rDNA Domain1/2 領域では、*P. wickerhamii* を除いて藻種間で異なる長さの配列は認められなかった (Fig. 1-1)。系統解析では、genotype 1 は被検株間において、さらに 4 つのクラスターに分岐した。しかしながら、株間の分離環境、地域および宿主と各クラスターに関連性は認められなかった。一方、genotype 2 は使用全株において、同一のクラスターに属し、塩基配列の相違は認められなかった。さらに、各リボソーム領域では *P. zopfii* 両遺伝子型と同一クラスターに属していた *P. moriformis* が、*P. zopfii* とは別のクラスターへ分岐した (Fig. 1-2, 1-3)。

1.3.2. β -tubulin 遺伝子系統解析

β -tubulin 遺伝子系統解析において、genotype 2 は ITS 領域系統樹と同様に、使用全株で同一のクラスターに属した。また、*P. moriformis* は ITS 領域系統樹と同様に *P. zopfii* 両遺伝子型とは別のクラスターへ分岐した。一方、genotype 1 は株間で 2 つのクラスターに分岐した (Fig. 1-3, 1-4)。しかしながら、ITS 領域と同様に株間の分離環境、地域および宿主と各クラスターに関連性は認められなかった。また、両遺伝子型のシーケンス波形を比較した結果、genotype 1 において使用全株で遺伝子アレルが散見された。一方、genotype 2 ではアレルは確認されなかった (Fig. 1-5)。

1.4 考 察

Prototheca 属の ITS 領域 PCR 産物は、藻種間で異なる塩基配列の長さを有しており、過去の報告と一致していた [Hirose *et al.*, 2013]。これまで各リボソーム領域の藻種間の塩基配列の長さは、*P. wickerhamii* を除いて一定であった。*P. wickerhamii* のリボソーム遺伝子群は他の *Prototheca* 藻種と異なり、複雑な組換体であり、*Auxenochlorella* 属あるいは新たな属への分類の必要性が報告されている [Ueno *et al.*, 2003; Ueno *et al.*, 2007]。また、*P. wickerhamii* を除く藻種および遺伝子型の分類は、Genotype specific PCR およびシーケンスにより行われてきた。本結果により、ITS 領域 PCR 産物長の比較による藻種および遺伝子型の分類が可能であることが再確認された。

これまで *P. zopfii* の遺伝子系統学的分類は、18S rDNA [Roesler *et al.*, 2006] あるいは 26S rDNA Domain1/2 領域 [Kishimoto *et al.*, 2009] にて行われていたが、株間レベルにおける分類は認められていなかった。今回構築した系統樹により、genotype 1 が 4 つのクラスターに分岐したことから、さらに複数の genotype に分類可能であることが示唆された。分離環境、地域および宿主間において関連性を認めなかったが、今後さらなるスペーサー領域あるいは遺伝子群を用いた比較および株数を増やして検討する必要性が考えられた。一方、genotype 2 は全て同一のクラスターに属したことから、病原株は分離環境、地域および宿主に関わらず単系統を保持しつつ蔓延している可能性が示唆された。また遺伝子系統および生化学的特徴が *P. zopfii* と酷似していたため、種として認められず、あるいは *P. zopfii* の亜種としての位置付けをされていた *P. moriformis* [Ueno *et al.*,

2005; Roesler *et al.*, 2006] は、*P. zopfii* 両遺伝子型と異なるクラスターに分岐した。本系統解析結果および表現形質の相違から *P. moriformis* は *P. zopfii* とは別の藻種として分類すべきであると考えられた。

β -tubulin 遺伝子系統解析では、ITS 領域系統樹と同様に genotype 2 は全て同一クラスターに属したが、genotype 1 は ITS 領域と比較して、株間で2つのクラスターのみへ分岐した。以上から、本藻類の系統解析は ITS 領域による分類が適していると考えられた。一方、 β -tubulin 遺伝子シーケンス波形から genotype 1 において遺伝子アレルを散見したことから、genotype 1 は倍数体として存在する可能性が考えられた。

本項により、genotype 1 は遺伝的多様性に富み、さらに複数の genotype に分類される一方、genotype 2 は宿主を問わず、単系統を保持しつつ広範囲に分布することが明らかとなった。

Table 1-1. Origin, species and genotypes about clinical isolates of *Prototheca spp.* for ITS region phylogenetic analysis

Strain No.	Origin	Species/Genotype
NUBS 21	Drinking water, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 70	Sewage, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 68	<i>Prototheca</i> infected cow feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 150	Normal cow feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 178	Rat feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 25	Sewage, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 256	Bovine mastitis, Hokkaido	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 321	Drinking water, Nara	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 69	<i>Prototheca</i> infected cow feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 317	Normal cow feces, Nara	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 183	Bovine mastitis, Mie	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 75	<i>Prototheca</i> infected cow feces, Aichi	<i>P. blaschkeae</i> / 3
-	Human blood, hairy cell leukemia, Nigata	<i>P. zopfii</i> / 2
-	Canine feces, Urine, CSF, chronic diarrhea, Kanagawa	<i>P. zopfii</i> / 2
IHEM 25445	Human blood, B cell non-Hodgkin's lymphoma	<i>P. zopfii</i> / 1

NUBS, College of Bioresource Sciences, Nihon University

IHEM, Institute of Hygiene and Epidemiology-Mycolology Laboratory, Brussels, Belgium

Table 1-2. Origin, species and genotypes about clinical isolates of *Prototheca* spp.. for β -tubulin gene phylogenetic analysis

Strain No.	Origin	Species/Genotype
NUBS 19	Bovine mastitis, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 26	Bovine mastitis, Toyama	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 27	Bovine mastitis, Toyama	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 183	Bovine mastitis, Mie	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 236	Bovine mastitis, Chiba	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 257	Bovine mastitis, Hokkaido	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 312	Bovine mastitis, Ehime	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 331	Bovine mastitis, Nara	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 332	Bovine mastitis, Nara	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 69	<i>Prototheca</i> infected cow feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 317	Normal cow feces, Nara	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 321	Drinking water, Nara	<i>P. zopfii</i> / 2
-	Human blood, hairy cell leukemia, Nigata	<i>P. zopfii</i> / 2
-	Canine feces, Urine, CSF, chronic diarrhea, Kanagawa	<i>P. zopfii</i> / 2
NUBS 21	Drinking water, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 25	Sewage, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 68	<i>Prototheca</i> infected cow feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 70	Drinking water, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 73	Sewage, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 138	Normal cow feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 150	Normal cow feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 178	Rat feces, Aichi	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 256	Bovine mastitis, Hokkaido	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 316	Normal cow feces, Nara	<i>P. zopfii</i> / 1
IHEM 25445	Human blood, B cell non-Hodgkin's lymphoma	<i>P. zopfii</i> / 1
NUBS 75	<i>Prototheca</i> infected cow feces, Aichi	<i>P. blaschkeae</i> / 3

NUBS, College of Bioresource Sciences, Nihon University

IHEM, Institute of Hygiene and Epidemiology-Mycology Laboratory, Brussels, Belgium

Table 1-3. Oligonucleotide primer sequences used in this section.

Primer name	Sequence (5' to 3')	Target
Primer-F	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Amplification for 18S-rDNA
Primer-R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCC	Amplification for 18S-rDNA
F63	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Amplification for D1/D2 of 26S rDNA
LR3	GGTCCGTGTTTCAAGACG	Amplification for D1/D2 of 26S rDNA
Proto-ITS5	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	Amplification for ITS region
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Amplification for ITS region
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	Cycle sequence for ITS 1 region
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Cycle sequence for ITS 2 region
5.8S-F	CGATACGTAGTGTGAATTGCAG	Cycle sequence for ITS 2 region
5.8S-R	CTGCAATTCACACTACGTATCG	Cycle sequence for ITS 1 region
Pw-ITS-Label-F	GAGAGGTTAGGCTAGGGGTAG	* Cycle sequence for ITS 2 region
Pw-ITS-Label-F1	CTCCCGCTCTGTCTGCTCC	* Cycle sequence for ITS 2 region
Pw-ITS-Label-F2	TCTCTGCTCTGTCTGCTGC	* Cycle sequence for ITS 2 region
Pw-ITS-Label-R	CTCACACCTACCAAGCCAG	* Cycle sequence for ITS 1 region
Pw-ITS-Label-R1	CTAACATCTATCCACCCTAACC	* Cycle sequence for ITS 1 region
β -tubulin-F	CATGATGTGCACCTTCTCTG	Amplification for β -tubulin gene
β -tubulin-R	TCCACTCGACGAAATAGGAC	Amplification for β -tubulin gene

*, sequenced for *P. wickerhamii*

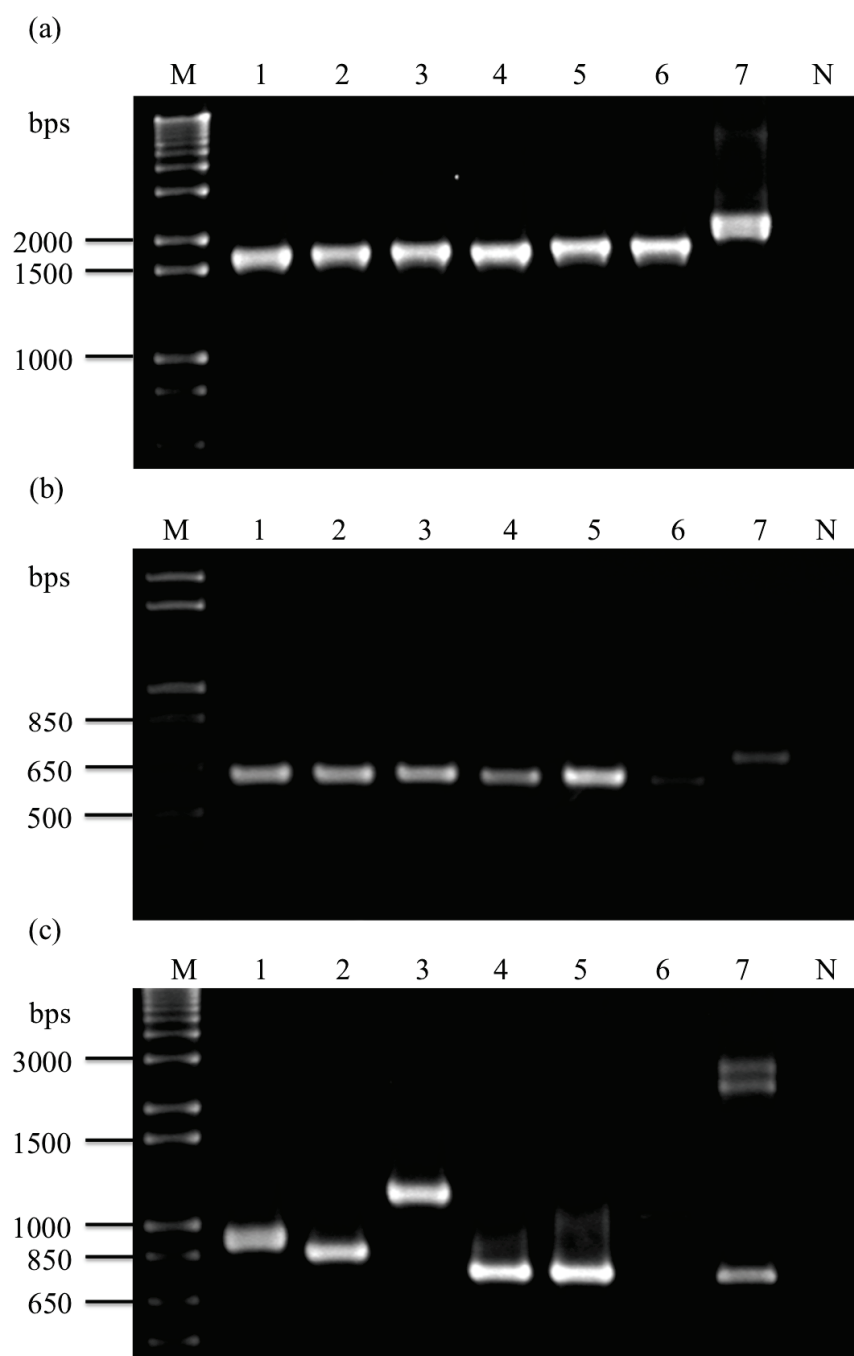


Fig. 1-1. Electrophoretic patterns of the PCR amplicons of 18S rDNA (a), 26S rDNA Domain 1 and 2 (b) and ITS region included ITS 1, 5.8S rDNA and ITS 2(c). M, DNA Ladder marker; 1, *P. zopfii* genotype 1 (SAG2063^T); 2, *P. zopfii* genotype 2 (SAG2021^T); 3; *P. blaschkeae* (SAG2064^T); 4, *P. moriformis* (ATCC50081^T); 5, *P. stagnora* (JCM9641^T); 6, *P. ulmea* (JCM9640); 7, *P. wickerhamii* (ATCC16529^T); N, Negative control (PCR blank).

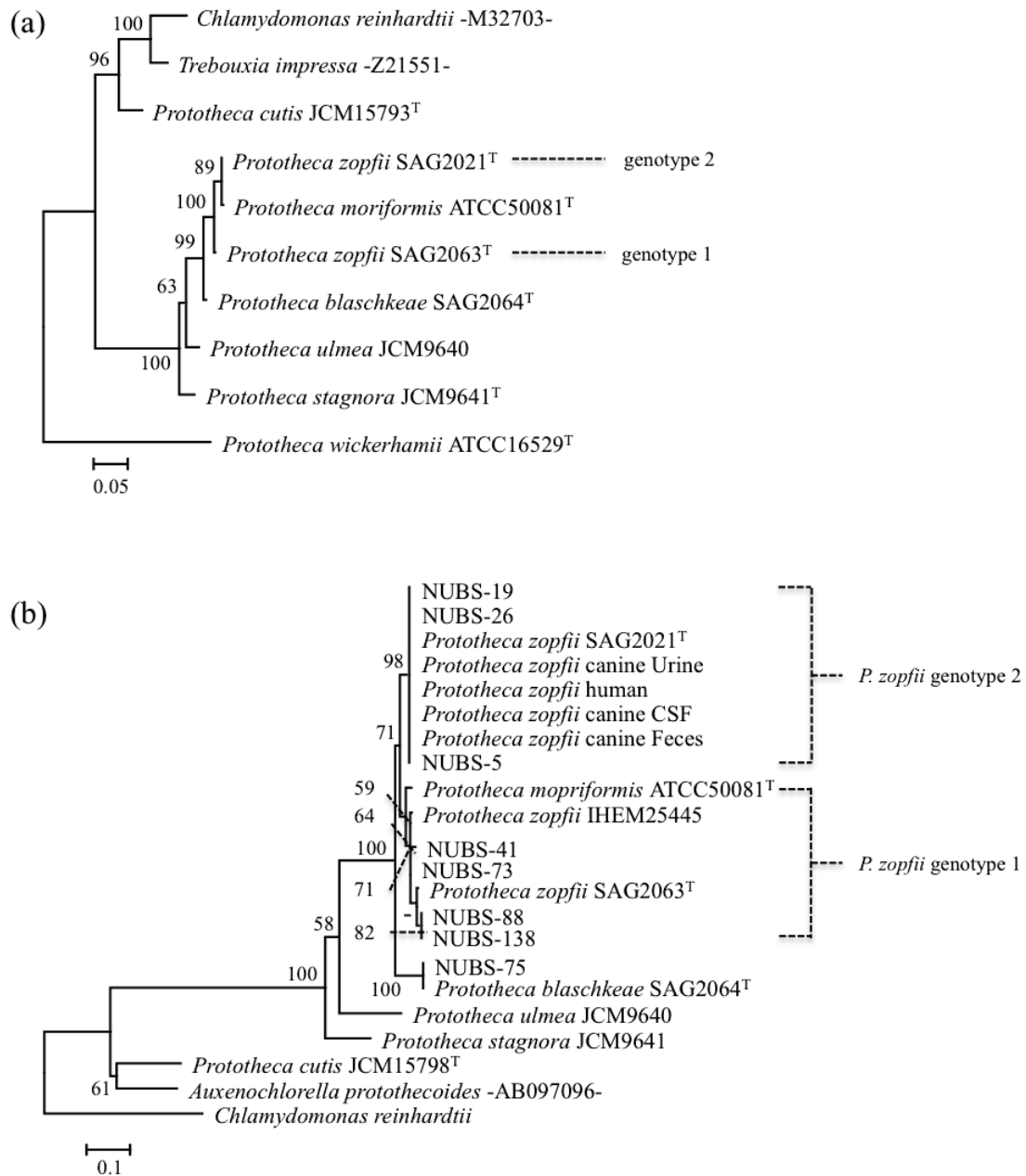


Fig. 1-2. Phylogenetic relationship based on 18S rDNA gene (a) and 26S rDNA gene domain 1/2 (b). Both phylogenetic trees were constructed by using the neighbor-joining method. The evolutionary distances were computed using maximum composite likelihood method. Both trees were rooted by *Chlamydomonas reinhardtii* as an outgroup. Bootstrap values (percentages of 1,000 replications) with greater than 50% confidence are indicated at the tree nodes. Bar, substitution/nucleotide position.

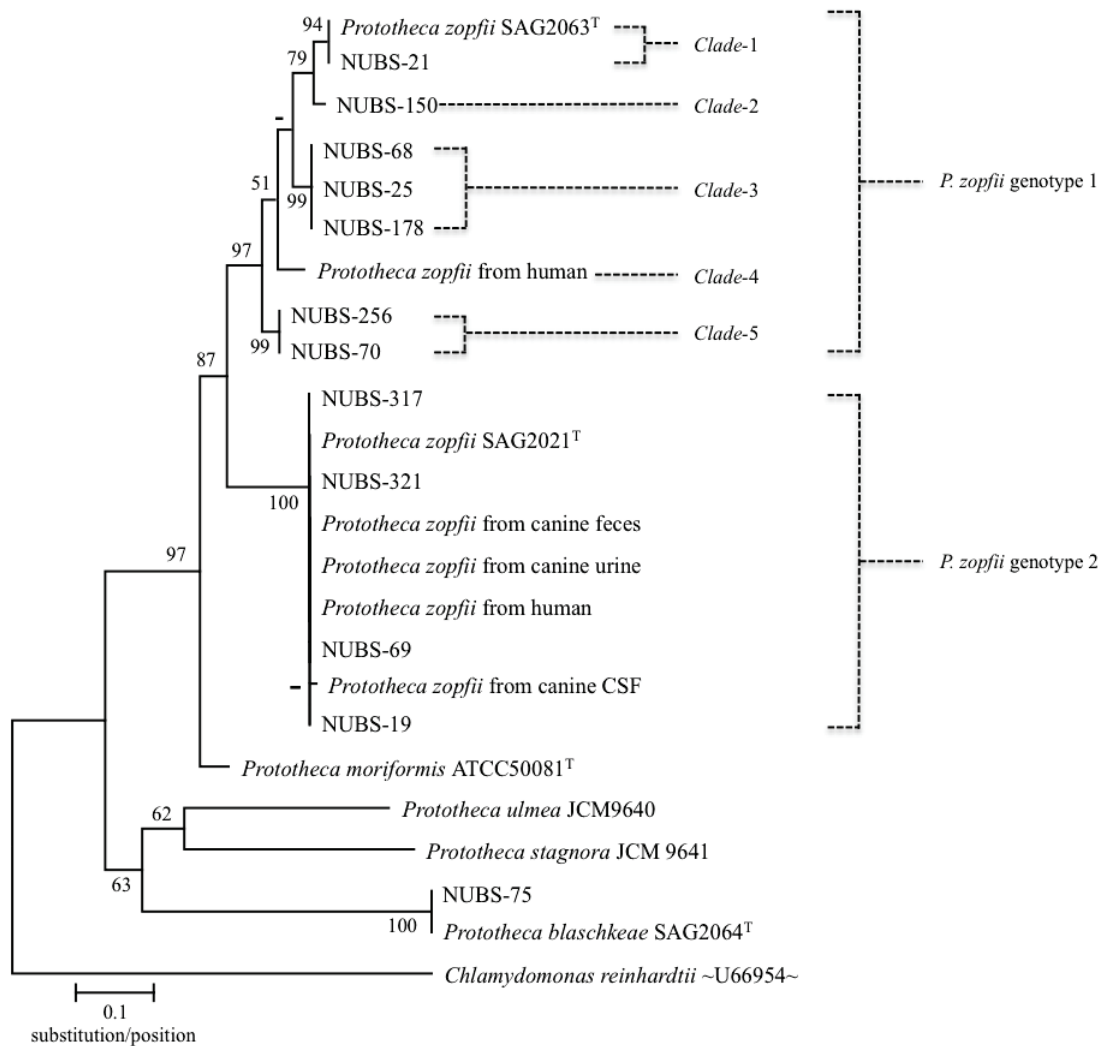


Fig. 1-3. Phylogenetic relationship based on ITS region. The phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining method. The evolutionary distances were computed using maximum composite likelihood method. The trees were rooted by *Chlamydomonas reinhardtii* as outgroup. Bootstrap values (percentages of 1,000 replications) with greater than 50% confidence are indicated at the tree nodes. Bar, substitution/nucleotide position.

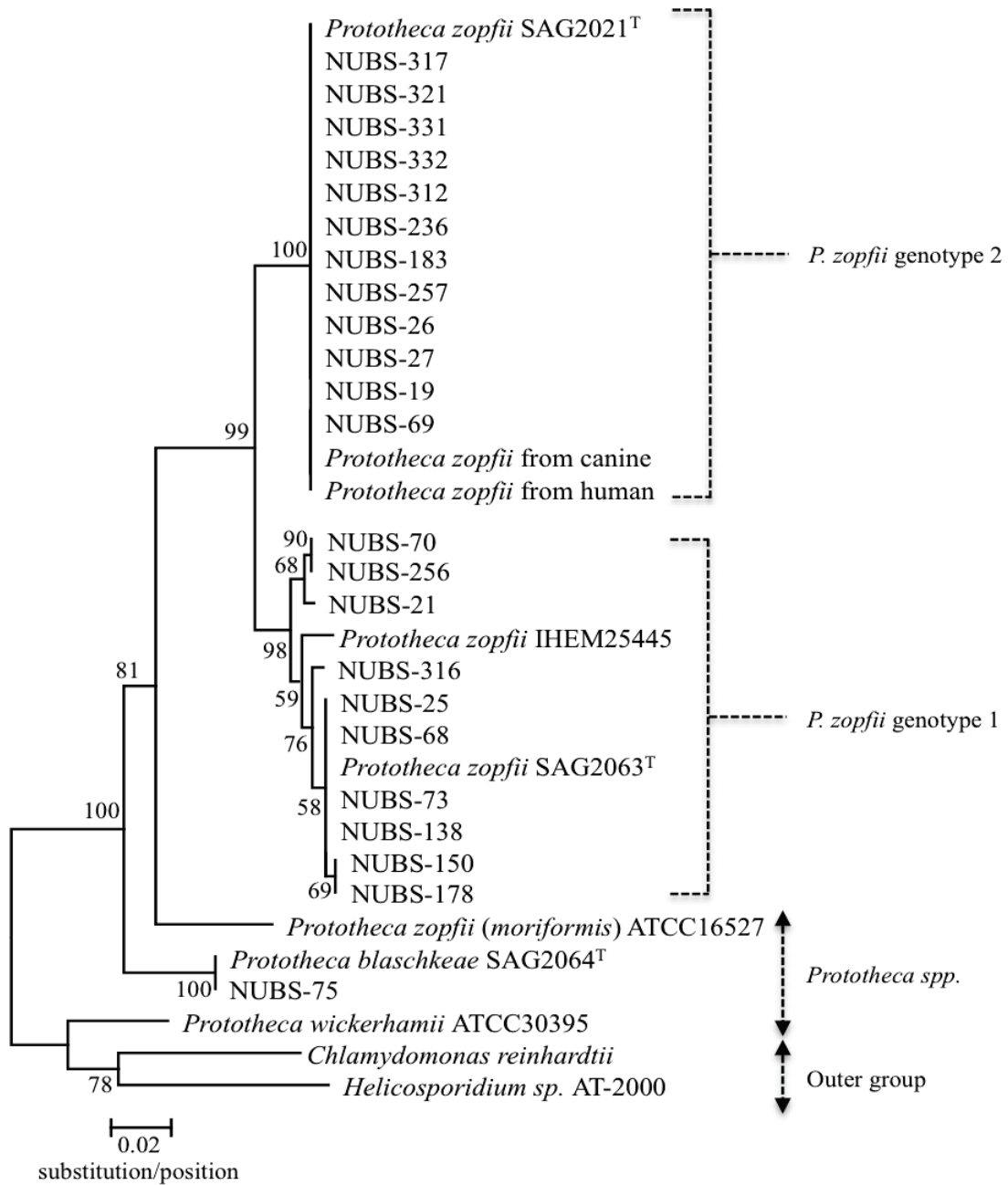
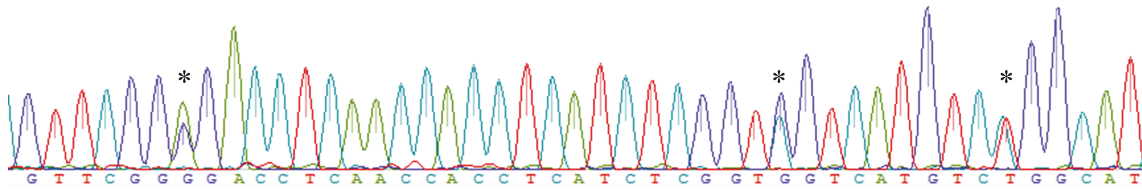


Fig. 1-4. Phylogenetic relationship based on β -tubulin gene fragments. The phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining method. The evolutionary distances were computed using maximum composite likelihood method. The trees were rooted by *Chlamydomonas reinhardtii* and *Helicosporidium* sp. as outgroup. Bootstrap values (percentages of 1,000 replications) with greater than 50% confidence are indicated at the tree nodes. Bar, substitution/nucleotide position.

(a)



(b)

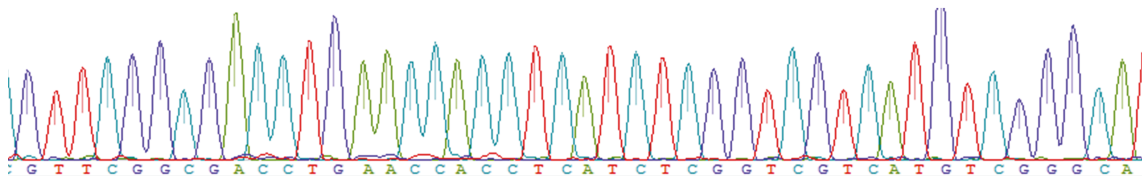


Fig. 1-5. Nucleotide polymorphisms in a portion of β -tubulin gene were aligned for *Prototheca zopfii* genotypes 1 (a) and 2 (b). The asterisks indicated the polymorphic sites.

第 2 項

Prototheca zopfii 両遺伝子型の超微細構造解析について

2.1 序 論

Prototheca 属の電子顕微鏡解析は、1968年 Lloyd らの報告 [Lloyd and Turner, 1968] を筆頭に、主に透過型電子顕微鏡による細胞壁および細胞内の構造調査されてきた。Lloyd and Turner は *P. zopfii* の細胞壁が *Chlorella* 属藻類に類似した構造を有していることを指摘したが、ミクロフィブリルの喪失などの相違や細胞壁の筋状構造などの相違から *Chlorella* 属と異なることを報告した。さらに、グルコサミンやムラミン酸などの真菌あるいは細菌に存在する細胞壁構成成分を有していないとしている [Lloyd and Turner, 1968; Vorisek *et al.*, 1975]。また、*P. zopfii* および *P. wickerhamii* が真核生物にとって基本的な細胞器官を有し、さらに色素体を含有していることを確認している [Panti and Aaronson, 1974; Nadakavukaren and McCracken, 1977]。細胞壁の構成要素については1972年、Atkinson らの電子顕微鏡解析および生化学的手法により、*P. moriformis* および *P. portoricensis* が *Chlorella* 属と同様に細胞壁に耐性カロテノイドであるスポロポレニンを含有していることが明らかとなった [Atkinson *et al.*, 1972]。以上の報告により、*Prototheca* 属は強固な細胞壁を有しており、薬剤親和性の低下に寄与していることが考えられている。

近年では、感染動物およびヒトの組織を用いた電子顕微鏡解析による診断ツールとしても利用されている [Font and Hook, 1984; Costa *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009; Zak *et al.*, 2012]。牛においては、感染分房はマクロファージ主体の慢性感染であり、*P. zopfii* は乳腺上皮に存在し、時折間質および乳腺付属リンパ節で確認されることが報告されている [Cheville *et al.*, 1984; Jensen *et al.*, 1998]。

しかしながら、*P. zopfii* 遺伝子型分類後の比較は行われておらず、また問題点として、本藻類の強固な細胞壁により不明瞭な像が多く、評価し難いことが挙げられる。

本研究では、両遺伝子型分類を基とし、2種類の固定法を用いて *P. zopfii* の超微細構造の観察および比較を行った。さらに細胞壁を消化し、クロロプラストの有無を調査した。

2.2 材料及び方法

2.2.1 被検株及び培養

被検株は、*Prototheca zopfii* SAG2063^T (Genotype 1) および SAG2021^T (Genotype 2) を使用した。それぞれの由来は前章の Table 2-1 に記載した。

両被検株を Sabouraud dextrose broth (1% Polypepton-S, 2% D-(+) Glucose, 0.005% Chloramphenicol (関東化学)) にて 30°C 下、120 rpm の速度で振盪、同調培養し、対数増殖期中期 (18-22 時間) に回収した (Fig. 2-1)。回収後、0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) により 5 回遠心洗浄 (1,500 x g, 15 分) を行い、電子顕微鏡解析および共焦点レーザー顕微鏡解析を実施するまで 4 °C にて保存した。また、それぞれの遺伝子型は、解析前に 18S rDNA 塩基配列解析により確認した。

2.2.2 透過型電子顕微鏡 (SEM) 解析

回収洗浄した藻株を、2%グルタルアルデヒド (0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) により希釈) に浸漬し 4 °C、2 時間で前固定を行った。前固定後、0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) に再懸濁し、グルタルアルデヒドの臭気が沈渣から消失するまで遠心洗浄を行った。続いて、1.25%四酸化オスミウム (OsO₄) (同 buffer により希釈) に浸漬し 4 °C、overnight (17 時間) で後固定を行った [Aaronson *et al.*, 1971]。固定後、同 buffer により洗浄し、OsO₄ を除去した。その後、アルコールによる脱水を行った。アルコールは Distilled water (DW) で希釈し、30%の濃度からはじめ、50、70、80、90、95 および 99.5%の順に徐々にアルコール度数を上昇させた。それぞれのステップは 5-15 分で浸漬処理した。脱水後、各藻株を

酢酸イソアミルで置換し、HCP-II（日立）により臨界点乾燥を 21 °C、80 kg/cm² を 20 分、38 °C、100 kg/cm² を 20 分、の条件で行った。乾燥後、E-1030 ion sputter（日立）により 7 nm の厚さで白金パラジウム（PtPD）を蒸着し、試料帯電の防止を施した。蒸着した藻株を Ultra-High Resolution Low-Voltage Scanning Electron Microscopy（S-900LV; 日立）により 2.0 kV の加速電圧で撮影した [Osumi *et al.*, 1995]。

また、真の細胞表面と蒸着検体の比較のために、無蒸着検体も同時に作製した。後固定処理後、0.05%四酸化ルテニウム（RuO₄）を室温下、7 分、遮光条件で反応させ、導電染色を施した。以降、同様の脱水、置換および臨界点乾燥を行った後、0.8 kV の加速電圧で撮影した。

2.2.3 透過型電子顕微鏡（TEM）解析

回収洗浄した藻株を、2%グルタルアルデヒドにより 4 °C、2 時間で前固定を行った。前固定後、0.1 M phosphate buffer（pH 7.2）にてグルタルアルデヒドの臭気が消失するまで遠心洗浄を行った。続いて、1.25%四酸化オスミウム（OsO₄）により 4 °C、overnight（17 時間）で後固定を行った [Aaronson *et al.*, 1971]。一方、形態保持、細胞壁固定および OsO₄ との比較のために過マンガン酸カリウム（KMnO₄）による後固定の検体も同時に作製した [Osumi, 2012]。洗浄後、1.5%酢酸ウランにより 4 °C、30 分、遮光条件で染色した。その後、アルコールによる脱水を行った。アルコールは DW で希釈し、50%の濃度からはじめ、70、80、90、95、99.5%および無水エタノールの順に徐々にアルコール度数を上昇させた。それぞれのステップは 10-15 分で浸漬処理した。脱水後、各藻株を methyl glycidyl

ether (QY-2; 日新) で置換し、epoxy resin (Plain Resin Kit; 日新) に包埋後、60 °C、48 時間で重合した。重合したブロックをダイヤモンドナイフで薄切し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛により染色した。染色した検体を H-7000 透過型電子顕微鏡 (日立) にて 100 kV の加速電圧で撮影した。

2.2.4 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 解析

回収洗浄した藻株を 3% polysaccharide-degrading enzyme (Macerozyme R-10 from *Rhizopus* sp.; ヤクルト薬品工業) 加 0.85 M NaCl に再懸濁し、35 °C、48 時間、120 rpm の条件で反応させ、細胞壁の消化を行った [Suzuki *et al.*, 1997; Ueno, 2009]。細胞壁消化後 (プロトプラスト化)、70%エタノールにより室温下、混和しながら 3 時間固定した。固定後、0.85 M NaCl にて洗浄し 10 μM TO-PRO[®]-3 iodide (Molecular Probes)、1 μM Bodipy 505/515 (4, 4-difluoro-1, 3, 5, 7-tetramethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene; Molecular Probes)、1 mg/mL Ribonuclease A from Bovine Pancreas (Sigma-Aldrich) および 0.1% dimethyl sulfoxide の終濃度で、室温下、30 分、遮光条件により核酸および細胞内脂質成分の染色を行った [Cooper *et al.*, 2010; Kerstens *et al.*, 2013]。染色した藻株は洗浄後、Cytospin 3 (Thermo Scientific) によりスライドガラスに回収し、ProLong[®] Gold antifade reagent (Molecular Probes) により封入後、LSM 510 (Carl Zeiss) にて撮影した。

TO-PRO[®]-3 iodide (青色、核酸) は Helium-Neon laser (633 nm) にて励起し、642-661 nm の波長で検出した。Bodipy 505/515 (緑色、脂質) は Argon laser (488 nm) にて励起し、505-515 nm の波長で検出した。同時に Bodipy 505/515 の自家

蛍光（赤色、クロロプラスト）を 650-700 nm の波長で検出した。画像は 63 x 油浸レンズを使用し、1024 x 1024 の解像度で撮影した。150-200 の区画に深度調整した Z-stack はそれぞれ、Z 軸に沿って 0.15 μm ずつ撮影した。撮影後、Imaris ver. 7.6 (Bitplane) により 3D 構築した。

2.3 結果

2.3.1 Ultra-High Resolution Low-Voltage Scanning Electron Microscopy (UHR-LVSEM) による *P. zopfii* 両遺伝子型細胞外観の比較

UHR-LVSEM を用いて、両遺伝子型間の細胞外観の比較をした結果、*P. zopfii* の Sporangium は、それぞれ異なった成長ステージを示した (Fig. 2-2, 2-3)。両遺伝子型ともに各細胞は、基本的に円形あるいは楕円形を呈しており類似した細胞外観であったが、一部の細胞は皺や凹みを形成していた (Fig. 2-2, 2-3)。さらに、*P. zopfii* genotype 1 および 2 の代表的な増殖環の一部を示した。娘細胞が成熟細胞へと成長するにつれて、母細胞壁が徐々に裂開し (Fig. 2-2a)、内生孢子 (Sporangiospore) を放出しようとしている像 (Fig. 2-2d, 2-3d)、あるいは崩壊した Sporangium から放出された像を確認した (Fig. 2-3a)。また、複数の Sporangiospore が放出された際、崩壊した Sporangium の細胞壁断片が、時折折付着することが確認された (Fig. 2-2b)。

両遺伝子型間における基本的な細胞外観および増殖環は類似していたが、細胞壁表面像に相違が確認された。両遺伝子型の 1 つの細胞壁を拡大すると、genotype 1 では壁全面に顆粒状隆起を形成していた (Fig. 2-2c, 2-2f)。一方、genotype 2 では顆粒状隆起は形成されず、比較的平滑な表面像を呈し、直径 20 nm 大の小孔を壁全面に形成していた (Fig. 2-3d, 2-3f)。さらに、崩壊した Sporangium を拡大すると、小孔は内腔に達しており、Sporangiospore も同様の小孔を形成していた (Fig. 2-4)。

以上の細胞外観は PtPD 蒸着細胞と無蒸着細胞との間で一致した構造を示した

(Fig. 2-2, 2-3)。

2.3.2 TEMによる *P. zopfii* 両遺伝子型細胞器官の比較および評価

TEM を用いて、両遺伝子型の細胞内器官の評価および比較を行った。また同時に、 KMnO_4 および OsO_4 の 2 種類の固定法についても比較検討した。Fig. 2-5 および Fig. 2-6 では、*P. zopfii* genotype 1 および 2 とともに複数の娘細胞や Sporangium がそれぞれ異なる Sporangiospore を含有する像が認められた。また、両遺伝子型は崩壊した Sporangium を除いて、基本的に円形から楕円形を呈していた。加えて、複数の Sporangiospore を含んだ成熟母細胞のいくつかは放出前の細胞壁の裂開を示すギャップが確認された (Fig. 2-5a, 2-5c, 2-6a, 2-6c)。一方、放出前の Sporangiospore は既に細胞壁構造を形成していた (Fig. 2-5b, 2-5d, 2-6b, 2-6d)。

高倍率において、*P. zopfii* は真核生物に基本的な細胞器官を有し、*Chlorella* 属などの藻類と類似の細胞壁構造を形成していた。また両遺伝子型の 1 つの Sporangium を示した (Fig. 2-5b, 2-5d, 2-6b, 2-6d)。その結果、 KMnO_4 固定像では両遺伝子型ともに核、核脂質二重膜、核小孔、ミトコンドリア、大小不同の液胞、ゴルジ装置、小胞体および膜結合性色素体を識別可能であった。多数のミトコンドリアは細胞膜周囲を取り囲むように配置され、内腔にクリステを伸長する像が確認された。また、核周囲に発達したゴルジ装置が認められ、多数の分泌顆粒を放出が確認された。しかしながら、*Chlorella* 属や *Chlamydomonas* 属藻類に見られるクロロプラスト膜構造は認められなかった。以上の形態学的特徴は両遺伝子型間において同様であったが、液胞の染色性に相違が認められた

(Fig. 2-5b, 2-6b)。また genotype 2 では、genotype 1 に比較して多量の色素体を含有していた。

一方、OsO₄ 固定像においても基本的な細胞器官は KMnO₄ 固定像と同様であった。加えて OsO₄ 固定像では、KMnO₄ 固定像と比較してリボソームおよび発達した粗面、滑面小胞体の識別が可能であった (Fig. 2-5d, 2-6d)。また、genotype 2 では、genotype 1 に比較して巨大な小胞体の発達が認められた。しかしながら、KMnO₄ 固定像において認められた液胞の染色性は認められず、全体的に不明瞭な像として描出された。

細胞壁は藻類類似の 2 層構造を形成し、外層、繊維状の内層および内腔の顆粒状物質により構成されていた (Fig. 2-7)。また、この顆粒状物質が疎になるにつれて Sporangiospore の細胞壁形成像を確認した。しかしながら、固定法および遺伝子型間における相違は認められなかった。

2.3.3 CLSM による細胞壁消化およびクロロプラストの評価

Macerozyme R-10 により消化されなかった両遺伝子型の細胞では、TO-PRO[®]-3 iodide の浸透は認められず、細胞壁表面に蓄積していた (Fig. 2-8c)。一方、細胞壁消化後の細胞では、核酸および脂質含有成分の蛍光は検出され、細胞内に多量の脂質成分あるいは液胞を含有することが明らかとなった (Fig. 2-8b, 2-8d)。しかしながら、クロロプラストの自家蛍光は、両遺伝子型ともにほとんど確認されず、一部の細胞膜表面に少量蛍光を認めた (Fig. 2-8b, 2-8d)。CLSM 解析において、両遺伝子型間に相違は認められなかった。

2.4 考 察

P. zopfii 両遺伝子型の細胞外観は、ともに同様の形態を呈し、過去の SEM 像と一致した [da Costa *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009]。時折観察された皺や凹みは、脱水の不足あるいは、細胞内の顆粒状物質が Sporangiospore の細胞壁形成のために利用され、内部に間隙が形成されていたことが可能性として推察された。細胞外観の相違として、細胞壁表面の表現形質および genotype 2 における小孔の形成が確認された。前章の分子疫学調査および過去の疫学報告から各遺伝子型の環境あるいは乳汁への偏在が確認されている。また、Murugaiyan らは両遺伝子型のタンパク含有量を調査しており、genotype 1 では炭素原代謝能の減少、genotype 2 では DNA 結合性、キナーゼ活性およびシグナル伝達の増強されることを報告した [Murugaiyan *et al.*, 2013]。以上の報告および結果から、genotype 2 は、乳汁成分を小孔から通じて接種するため、代謝能を増強し利用している可能性が考えられた。一方、環境に偏在する genotype 1 では、周囲からの十分量の養分を吸収しないために炭素源の代謝能の減少が発生し、また環境下での生存のために表面に顆粒状隆起を形成している可能性が推察された。両遺伝子型の形態学的相違は、それぞれの環境への適応の可能性が考えられた。

二種類の固定法による透過型電子顕微鏡結果では、 KMnO_4 固定像においてより鮮明な像が得られた。両手法ともに強力な酸化作用を有するが、本藻類に対する固定法は KMnO_4 が適していることが明らかとなった。一方、 OsO_4 は強固な細胞壁により浸透しなかった可能性が推察された。しかしながら、 KMnO_4 ではリボソームを固定できないため、さらなる固定法の改良の必要性が考えられ

た。

両遺伝子型の細胞内構造は、ともに真核生物に基本的な細胞器官および植物に認められる色素体を多数蓄積していた。過去の *Prototheca* の TEM 像と比較すると、同様に色素体を蓄積していたが、クロロプラストおよびチラコイド膜構造は認められなかった [Atkinson *et al.*, 1972; Nadakavukaren and McCracken, 1977]。また、CLSM 解析により、クロロプラストの自家蛍光は少量のみしか検出されなかった。これらの所見から *P. zopfii* は葉緑素不含ではなく、退縮していることが示唆された。一方、細胞器官の相違として genotype 2 では genotype 1 と比較して、多様の色素体の蓄積が認められた。この形態学的特徴は、Murugaiyan らのタンパク含有量の調査と一致した [Murugaiyan *et al.*, 2013]。また、KMnO₄ 固定像において液胞の染色性に相違を認めた。*P. zopfii* は一般的な炭素原に限らず、*n*-hexadecane や *n*-alkanes などの天然油成分も発酵可能であることが報告されている [Walker and Pore, 1978; Koenig and Ward, 1984; Ueno *et al.*, 2002]。これらの形態学的特徴および報告は、両遺伝子型の代謝産物が相互に異なる可能性を示唆するものと考えられた。

細胞壁は藻類類似の 2 層構造の形成を確認し、内部は顆粒状物質が蓄積していた。また、この顆粒状物質が疎になるにつれて Sporangiospore の細胞壁形成像を確認した。同様の機序は *Chlorella* 属藻類においても認められており、同時にディクチオソームの活性化が細胞壁合成の活性化に関与していることが報告されている [Atkinson *et al.*, 1972]。本藻類においては、1 つのゴルジ装置かディクチオソームとして存在しているかどうかの確認は実施していないが、発達したゴルジ装置を確認していることから、*P. zopfii* の顆粒状物質は細胞壁合成成分と

なりえるものであり、他の高等植物と同様に細胞壁合成にはゴルジ装置の活性化が関与していることが示唆された。また、Atkinson らは *P. moriformis* および *P. portoricensis* が *Chlorella* 属と同様に細胞壁にスポロポレニンを含有していることを報告した。スポロポレニンは極端な耐性カロテノイドであり、酸、アルカリおよび酵素耐性を有する。スポロポレニンを有する藻類および *P. zopfii* の細胞壁最外層は、ほとんどの酵素に効果を示さないことが報告されている [Atkinson *et al.*, 1972; Suzuki *et al.*, 1997; Gerken *et al.*, 2013]。以上の結果から、他の藻類と同様に *P. zopfii* もスポロポレニンを含有した厚い細胞壁を形成することが示唆された。また、この強固な細胞壁は、環境に存在する上での防御として形成している可能性が推察された。

本研究では、*P. zopfii* の一般的な形態学的特徴を観察し、また細胞壁表面像および一部の細胞器官における両遺伝子型間の相違を初めて明らかにした。

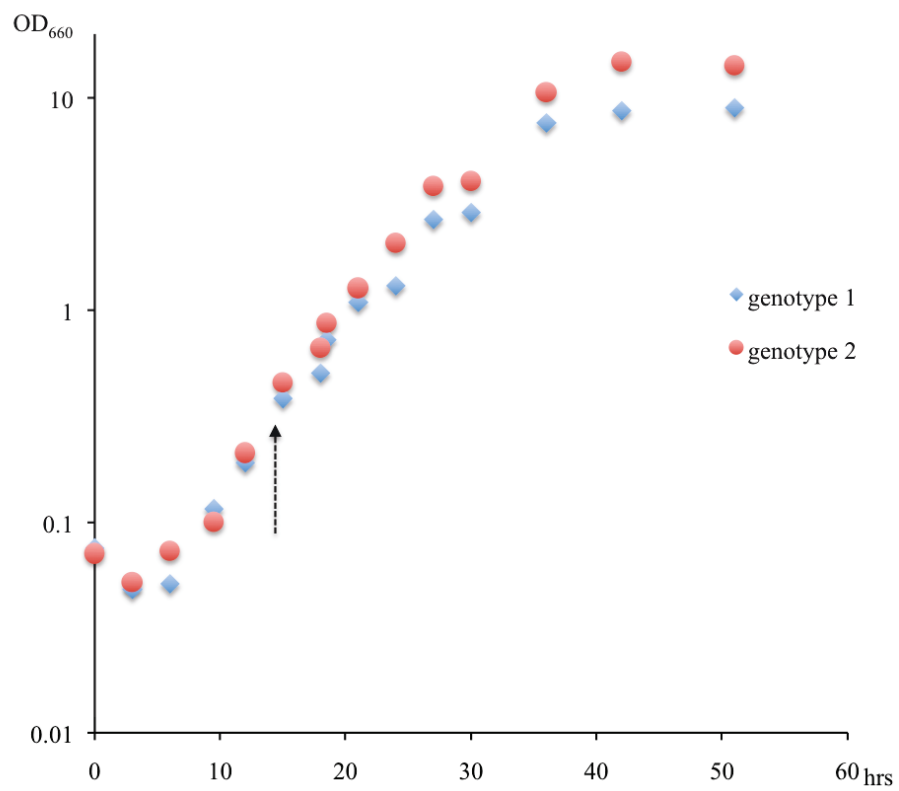


Fig. 2-1. Growth of *P. zopfii* genotypes 1 and 2. The arrow indicated the mid-logarithmic growth phase.

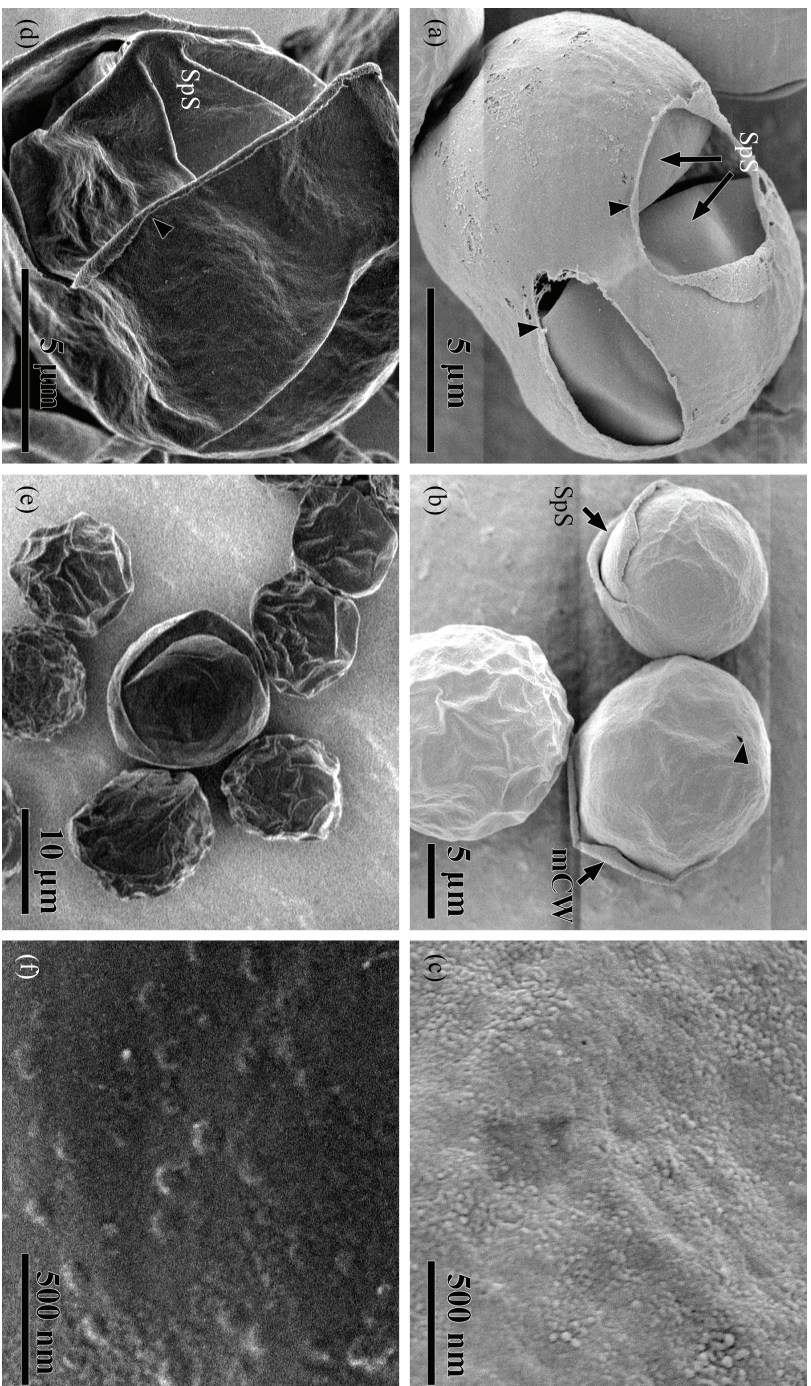


Fig. 2-2. Cell appearance of *P. zopfii* genotype 1 by SEM. (a)-(c), PTPD coated cells. (d)-(f), Non coated cells. (c), (f), High magnification of the cell surface. The arrowheads indicated dehiscent part of the sporangiums. mCW, mother cell wall; Sps, Sporangiospore.

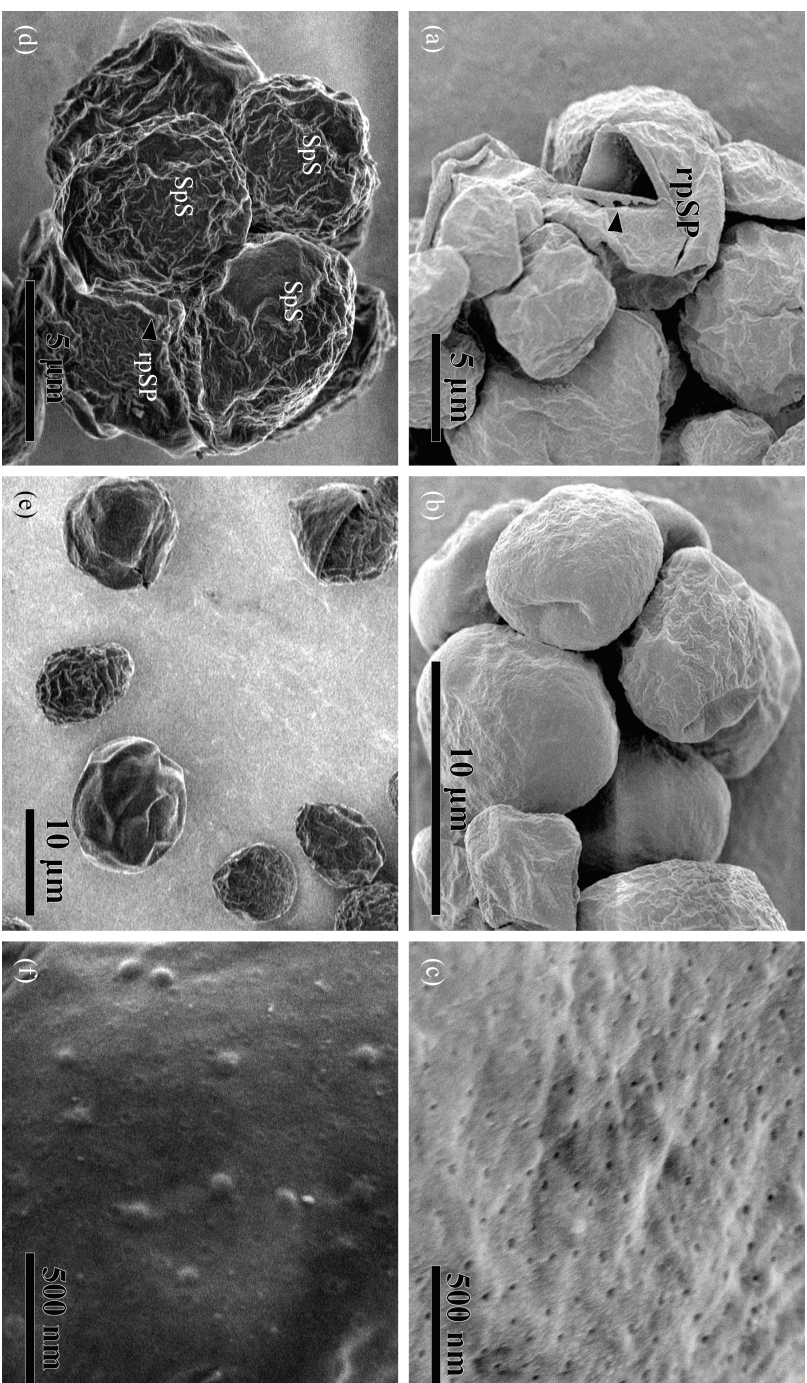


Fig. 2-3. Cell appearance of *P. zopfii* genotype 2 by SEM. (a)-(c), PTPD coated cells. (d)-(f), Non coated cells. (c), (f), High magnification of the cell surface. The arrowheads indicated dehiscent part of the sporangiums. rpSP, ruptured Sporangium; Sps, Sporangiospore.

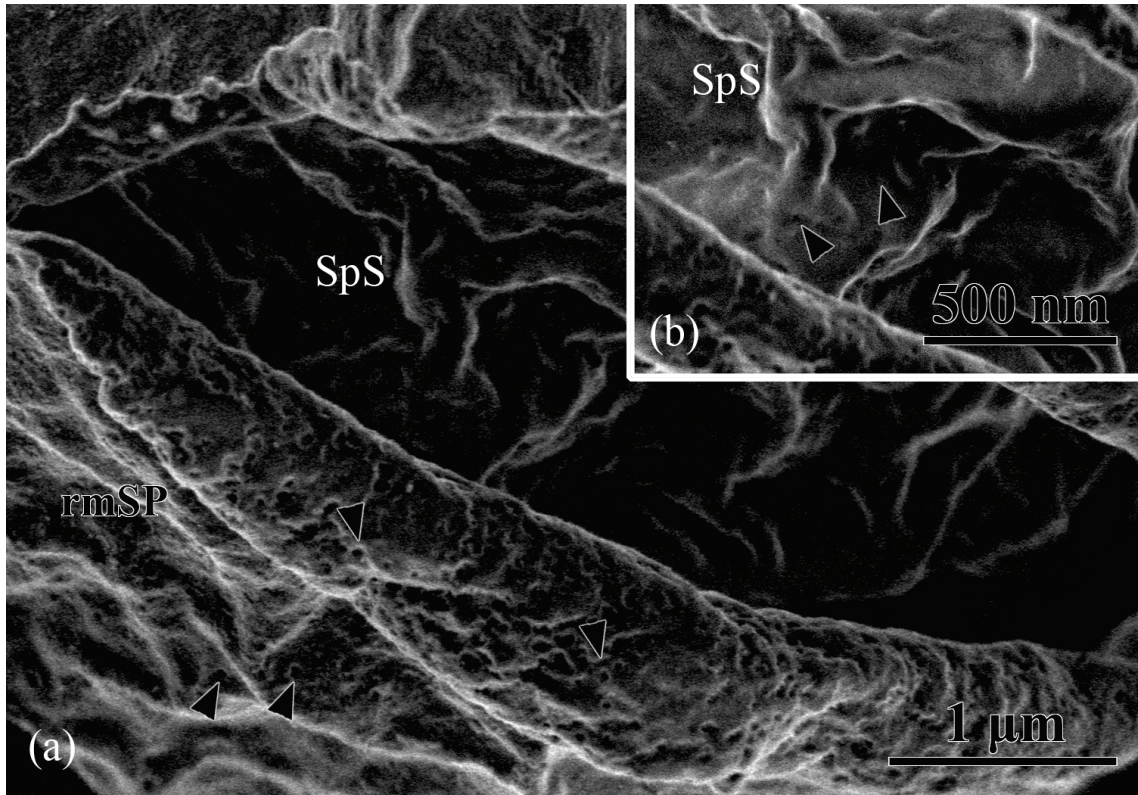


Fig. 2-4. Dihiscent sporangium contained into sporangiospore of *P. zopfii* genotype 2 (non-coated cells). The arrowheads indicated lacunas passed through the lumen (a). high magnification showed sporangiospore had similar lacunas indicated arrowheads (b). rmSP, ruptured mature sporangium; SpS, sporangiospore.

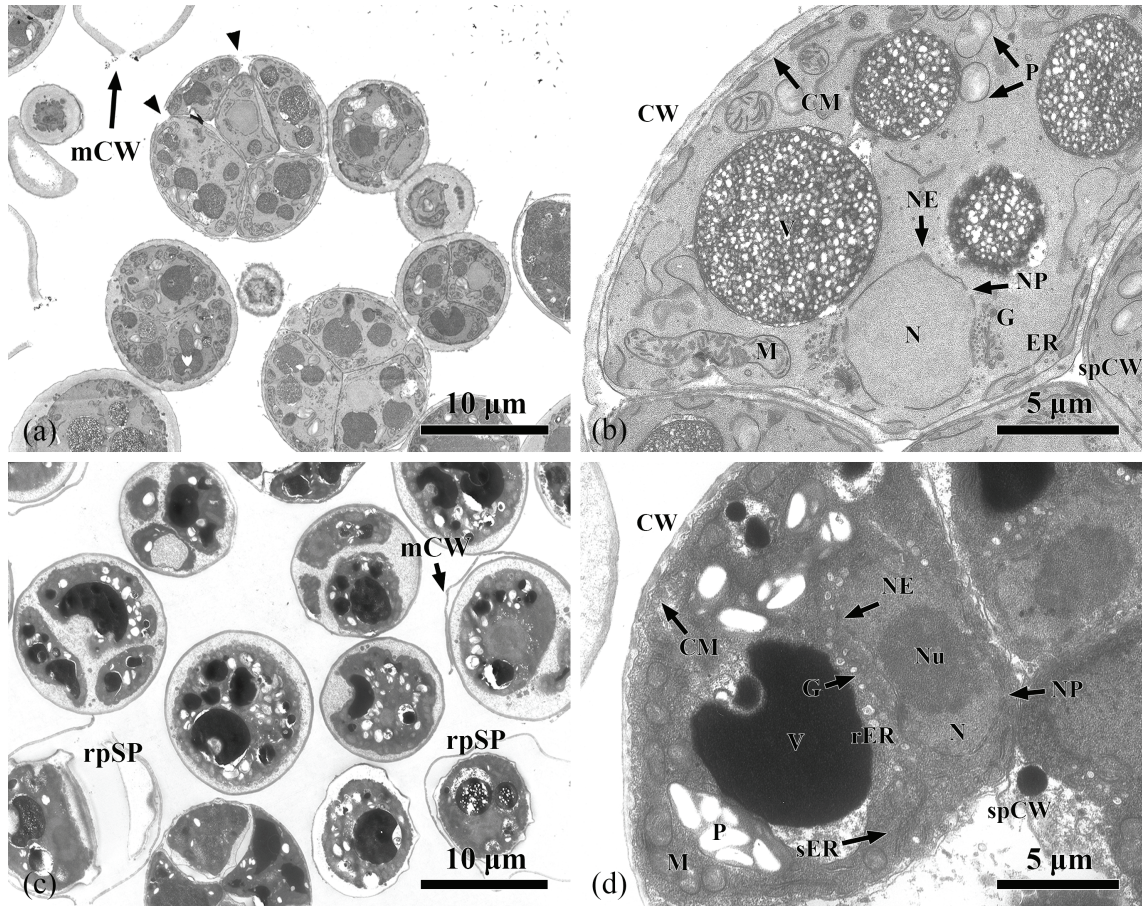


Fig. 2-5. Several development stage of *P. zopfii* genotype 1 by KMnO_4 fixation (a) and OsO_4 fixation (c). High magnification of a single sporangiospore of *P. zopfii* genotype 1 by KMnO_4 fixation (b) and OsO_4 fixation (d). The arrowheads indicated dehiscence part of the sporangium. mCW, mother cell wall; rpSP, ruptured sporangium; CM, cell membrane; CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; rER, rough endoplasmic reticulum; sER, smooth endoplasmic reticulum; G, Golgi apparatus; M, mitochondrion; N, nucleus; NP, nuclear pore; NE, nuclear envelope; P, plastids; spCW, sporangiospore cell wall; V, vacuoles.

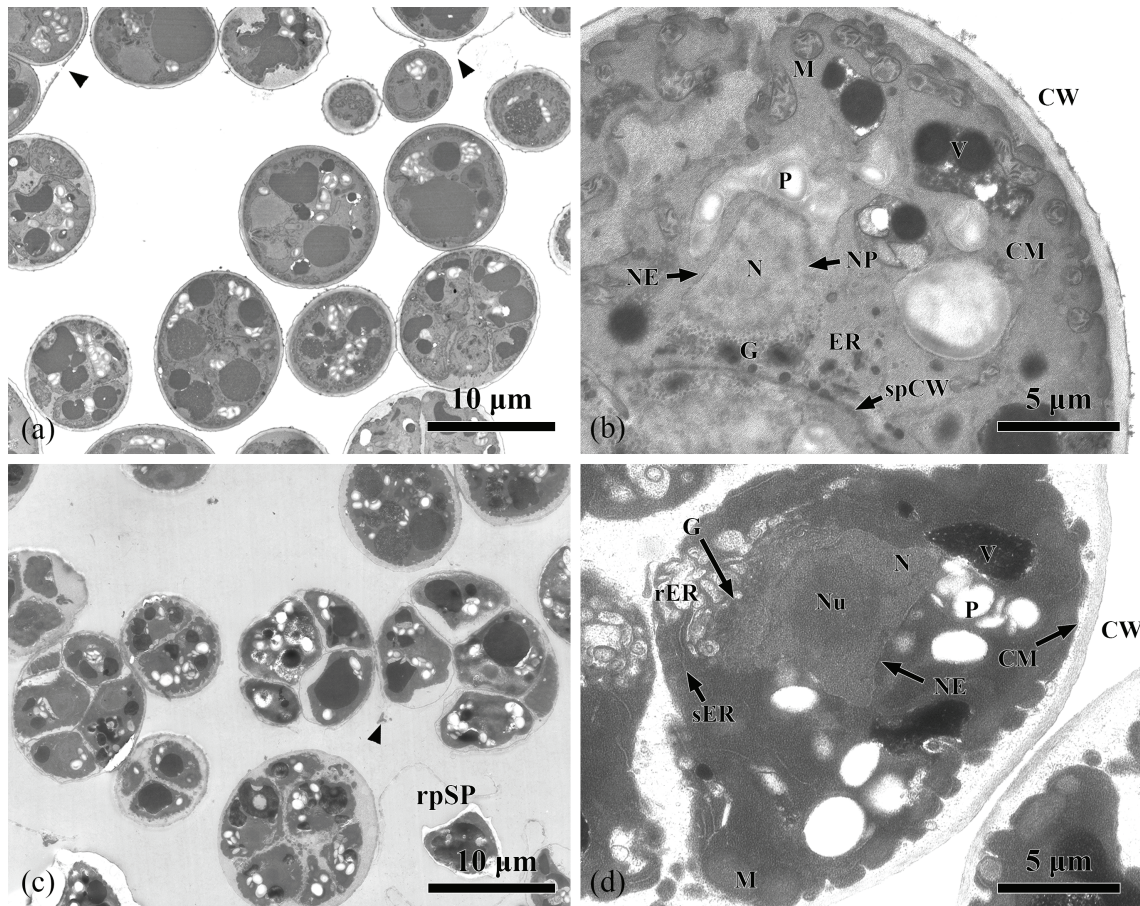


Fig. 2-6. Several development stage of *P. zopfii* genotype 1 by KMnO_4 fixation (a) and OsO_4 fixation (c). High magnification of a single sporangiospore of *P. zopfii* genotype 1 by KMnO_4 fixation (b) and OsO_4 fixation (d). The arrowheads indicated dehiscence part of the sporangium. mCW, mother cell wall; rpSP, ruptured sporangium; CM, cell membrane; CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; rER, rough endoplasmic reticulum; sER, smooth endoplasmic reticulum; G, Golgi apparatus; M, mitochondrion; N, nucleus; NP, nuclear pore; NE, nuclear envelope; P, plastids; spCW, sporangiospore cell wall; V, vacuoles.

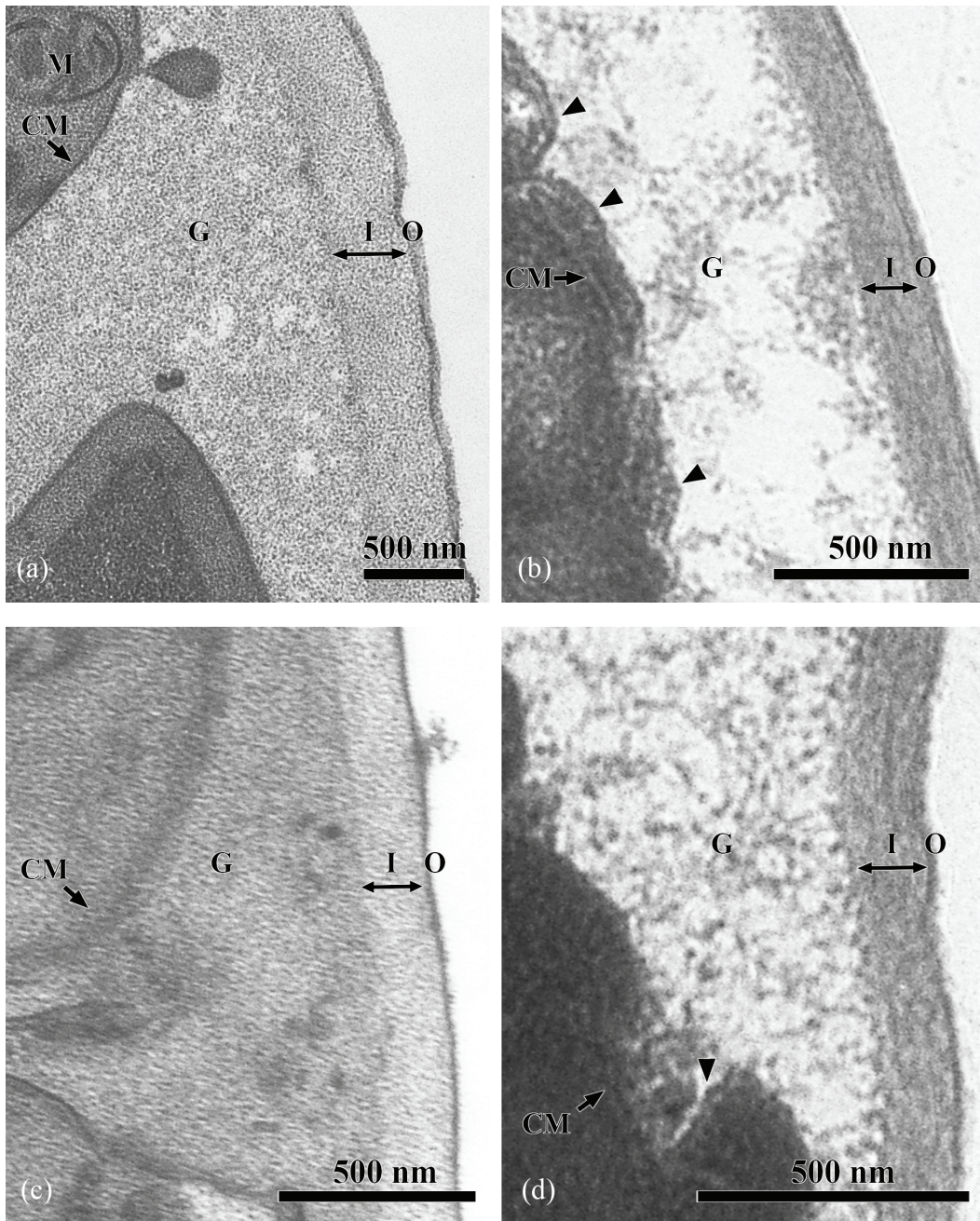


Fig. 2-7. Mature cell wall section images of *P. zopfii* genotypes 1 and 2. Genotype 1 images took by KMnO_4 fixation (a) and OsO_4 fixation (b). Genotype 2 images took by KMnO_4 fixation (c) and OsO_4 fixation (d). The arrowheads of OsO_4 fixation images showed cell wall components of sporangiospores were formed. C, cytoplasm; CM, cell membrane; G, granular materials; I, inner microfibrillar layer; M, mitochondrion; O, outer layer.

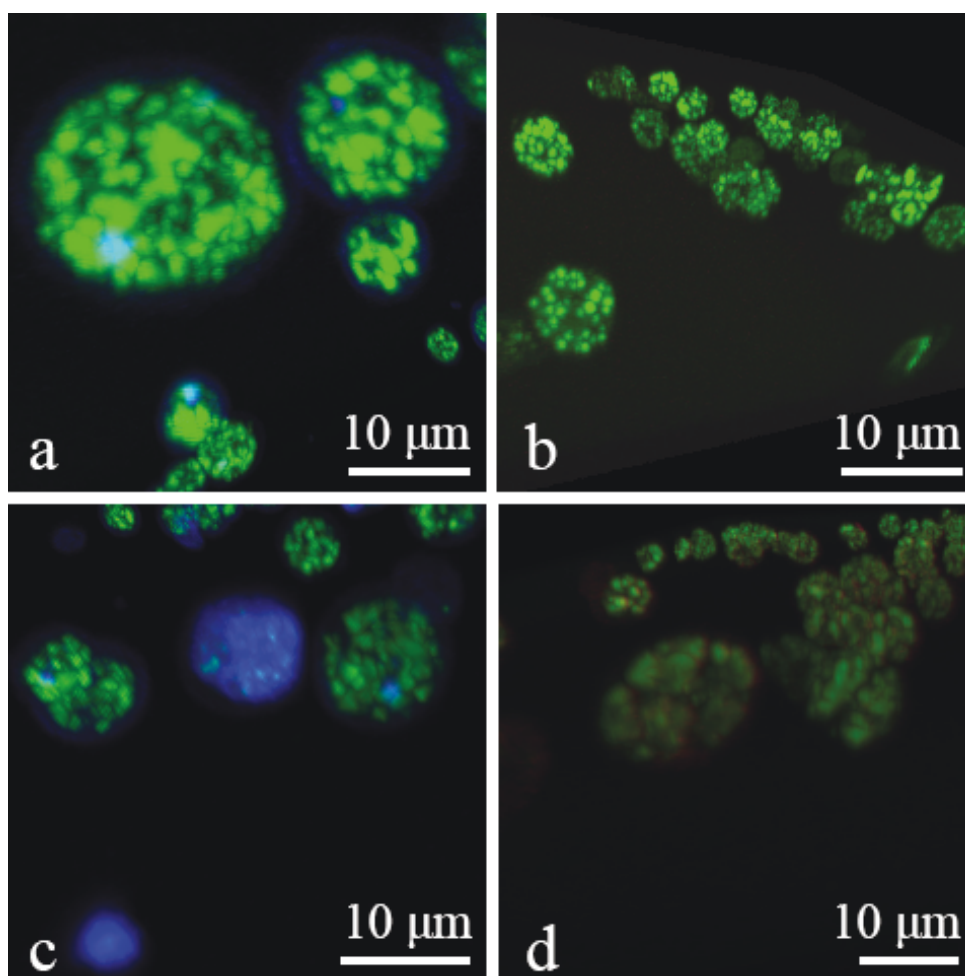


Fig. 2-8. Representative confocal laser scanning micrographs of *P. zopfii* genotype 1 and 2. Accumulation of TO-PRO®-3 iodide (Blue) around the cell wall were shown in intact cells of genotype 1 (a) and 2 (c). Fluorescent nucleus and oil-containing components (Green) was detected in Macerozyme R-10 digested cell of genotype 1 (a) and 2 (b). Chloroplast autofluorescence (Red) was detected in genotype 1 (b) and 2 (d).

第3項

Prototheca zopfii 両遺伝子型における

薬剤及び消毒薬感受性の比較

3.1 序 論

プロトテカ症の報告は、1900年代後半から牛を始めとしてヒトおよび小動物においても増加傾向にある。それ故に、本藻類に対する薬剤感受性試験報告は複数存在する [Segal *et al.*, 1976; Casal and Gutierrez, 1981; Casal *et al.*, 1983; Shahan and Pore, 1991]。しかしながら、いずれの報告も *Prototheca zopfii* の遺伝子型分類以前、あるいは藻種同定の行われていないものであった。ヒトの医療現場による治療報告は、感染藻種により反応が異なることに加え、同種による感染においても治療結果が異なることが知られている [Kim *et al.*, 1996; Mohabeer *et al.*, 1997; Okuyama *et al.*, 2001;]。一方、獣医学領域ではこれまで犬における治癒の報告は存在しない [Hosaka and Hosaka, 2004; Tsuji *et al.*, 2006; Stenner *et al.*, 2007; Roesler *et al.*, 2009]。また、牛においても治療が不可能であることが知られており、感染拡大および経済的問題により摘発淘汰されているのが現状である。以上から、病原株に対する薬剤感受性の再検討が必要である。

また、治療効果の確認されていない本藻類は、特に消毒薬を用いた防除法が求められている。本藻類においても、特定の消毒薬に対して感受性を示した報告が存在する [Melville *et al.*, 2002; Salerno *et al.*, 2010] が、*P. zopfii* 両遺伝子型に対して実施されていない。

そこで本研究では牛舎環境由来の genotype 1、乳房炎由来の genotype 2 に対して、感受性既報の抗菌剤さらに農場および医療現場で通常使用される各種消毒薬に対して、感受性試験を実施し、比較検討を行った。

3.2 材料及び方法

3.2.1 被検株

牛舎環境由来 *Prototheca zopfii* genotype 1、プロトテカ乳房炎乳汁由来 *Prototheca zopfii* genotype 2 をそれぞれ 10 株ずつ供試した。藻株毎の由来は Table 3-1 に示した。加えて標準株として、*Prototheca zopfii* SAG2063^T (Genotype 1) および SAG2021^T (Genotype 2) を使用した。全被検株の遺伝子型は、試験前に 18S rDNA 塩基配列解析により確認した。また、薬剤感受性試験精度管理株として *Candida parapsilosis* ATCC22019^T を使用した。

3.2.2 E-test (薬剤感受性試験：ディスク拡散法)

前章と同様に、前培養した被検株を Broth PIM あるいは 0.85% NaCl に懸濁し、Mcfarland # 0.5 (OD₆₀₀=0.132)、約 1.0×10^6 CFU/mL に調整した。調整藻液を炭酸水素ナトリウム無添加、2% Glucose、0.165 M MOPS 加 Roswell Park Memorial Institute Medium pH 7.0 (RPMI; Hyclone) 上に 100 μ L 接種し、画線塗抹した。乾燥後薬剤ストリップを静置し、35 °C、48 時間で好気培養した。培養後、薬剤ストリップと阻止円の交差した位置を Minimum inhibitory concentration (MIC) とした。

薬剤ストリップは、過去に感受性報告が有る抗菌剤を選択した (Table 3-2)。

以上の手法は、E-test technical guide (biomérieux) および Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2 法に基づき実施した [Wayne, 2002]。

3.2.3 微量消毒薬希釈法

E-test と同様に前培養した被検株を Broth PIM あるいは 0.85% NaCl に懸濁し、Mcfarland # 0.5 ($OD_{600}=0.132$)、約 1.0×10^6 CFU/mL に調整した。その後、RPMI 液体培地に各種消毒薬を目的の濃度に調整し、藻液を接種、35°C、48 時間で好気培養した。陰性対象として藻液未接種を、陽性対象として消毒薬無添加をそれぞれ用意した。培養後、目視にて判定し、90%発育阻止を認めた消毒薬濃度を Minimum algacide concentration 90 (MAC₉₀) とした。

消毒薬は一般に牛舎環境あるいは搾乳時に使用され得るものを選択した (Table 3-2)。

以上の手法は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2 法を参照して実施した [Wayne, 2002]。

薬剤および消毒薬感受性試験はともに、被検株 1 株あたり 3 回試行し、再現性を得た。

3.2.4 統計解析

各薬剤および消毒薬感受性試験結果は、Paired *t*-test により両遺伝子型間の有意差を検定した。

3.3 結果

3.3.1 E-test による *P. zopfii* 両遺伝子型の薬剤感受性

薬剤感受性試験の結果、genotype 1 における各抗菌剤 MIC は、Amphotericin-B で 0.235 µg/mL (range, 0.064-0.5 µg/mL)、Gentamycin で 2.21 µg/mL (range, 1.5-3.0 µg/mL)、Kanamycin で 18.5 µg/mL (range, 10-32 µg/mL)、Itraconazole で >8.89 µg/mL (range, 2->32 µg/mL) であった。一方、genotype 2 における各抗菌剤 MIC は、Amphotericin-B で 1.316 µg/mL (range, 0.25-4 µg/mL)、Gentamycin で 10.43 µg/mL (range, 5.6-16 µg/mL)、Kanamycin で 106.4 µg/mL (range, 32-256 µg/mL)、Itraconazole で >32 µg/mL であった。各種抗菌剤の両遺伝子型間感受性結果を比較したところ、genotype 2 では genotype 1 に比して有意に低感受性であった (Fig. 3-1, $p < 0.0001$)。

3.3.2 Broth Microdilution による *P. zopfii* 両遺伝子型の消毒薬感受性

消毒薬感受性試験の結果、genotype 1 における各消毒薬 MAC₉₀ は、Alkyldiaminoethylglycine hydrochloride で 3.13×10^{-3} µg/mL (range, 5.0×10^{-4} - 5.0×10^{-3})、Chlorhexidine で 3.13×10^{-3} µg/mL (range, 2.5×10^{-4} - 2.5×10^{-3})、Dioxide chlorine で 60 µg/mL (range, 30-120 µg/mL)、Povidone iodide で 1.17 µg/mL (range, 0.78-3.13 µg/mL)、Sodium hypochlorous acid で 0.069 µg/mL (range, 3.0×10^{-3} -0.3 µg/mL) であった。一方、genotype 2 における各消毒薬 MAC₉₀ は、Alkyldiaminoethylglycine hydrochloride で 1.65×10^{-3} µg/mL (range, 5.0×10^{-4} - 5.0×10^{-3})、Chlorhexidine で 1.72×10^{-3} µg/mL (range, 2.5×10^{-5} - 2.5×10^{-2})、Dioxide

chlorine で 51.5 µg/mL (range, 15-120 µg/mL)、Povidone iodide で 1.63 µg/mL (range, 0.39-3.13 µg/mL)、Sodium hypochlorous acid で 0.12 µg/mL (range, 3.0×10^{-3} -0.3 µg/mL) であった。各種消毒薬の両遺伝子型間感受性結果を比較したところ、両遺伝子型間で有意差は認められなかった (Fig. 3-2)。

3.4 考 察

抗菌剤感受性試験の結果、環境由来非病原株である *P. zopfii* genotype 1 は、乳房炎由来病原株である genotype 2 に比較して Amphotericin-B、Gentamycin および Kanamycin に対してより有意に高い感受性を示した。そのため、遺伝子型分類以前の感受性報告は genotype 1 も含まれている可能性が考えられた。McDonald らは 48 株の乳房炎由来の *P. zopfii* に対して感受性試験を行い、内 30 株が Gentamycin ($> 10 \mu\text{g}/\text{mL}$) および Kanamycin ($> 30 \mu\text{g}/\text{mL}$) に対して感受性を示さなかったことを報告した [McDonald *et al.*, 1984]。本研究結果においても、genotype 2 では同様に感受性を示さなかったことから両抗生剤による治療は困難である可能性が高いことが示唆された。過去の臨床治療報告および今回の感受性試験結果から、Amphotericin-B は *P. zopfii* 両遺伝子型に対して最も抗藻活性の高い抗菌薬であることが明らかとなった ($< 4 \mu\text{g}/\text{mL}$)。しかしながら、本邦における同薬剤の牛乳房内投与は認可されておらず、その副作用、残留性および経済的問題から治療は困難であることが考えられた。また、genotype 2 全株および genotype 1 の 7 株においては Itraconazole に感受性を示さなかった ($> 10 \mu\text{g}/\text{mL}$)。故に、*P. zopfii* は Itraconazole に対して耐性を有する可能性が考えられた。Genotype 1 においては、Itraconazole に対する感受性範囲が大きく、同抗菌薬感受性は多様である可能性が考えられた。

一方、消毒薬感受性試験の結果、使用全消毒薬は *P. zopfii* 両遺伝子型に対して感受性を示した。また、両遺伝子型間において、感受性の有意差は認められなかった。本邦において Sodium hypochlorous acid はフロアや機材などの消毒、

Povidone iodine は乳頭のディッピングに幅広く使用されている。本研究結果では Sodium hypochlorous acid は 0.03% ($> 0.3 \mu\text{g/mL}$) 以上で、Povidone iodine は 0.313% (0.39-3.13 $\mu\text{g/mL}$) 以上で感受性を示した。同様に、Salerno らは、両消毒薬の低濃度における感受性を報告していることから、農場における消毒薬として有用であることが示唆された [Salerno *et al.*, 2010]。一方、Chlorhexidine (0.0025%, $> 2.5 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$) は上記消毒薬に比較して、より低濃度での使用が可能であると考えられた。Alkyldiaminoethylglycine hydrochloride は、一般に農場での使用はないものの 0.0005% ($> 5.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$) で感受性を示した。本消毒薬は、ヒトおよび小動物獣医学領域において広く使用されているため、予防としての効果の可能性が考えられた。

本項により、薬剤による牛プロトテカ乳房炎の治療は改めて困難であることが明らかとなった。一方、環境に対する消毒措置の有用性が明らかとなった。

Table 3-1. Origin and genotypes about clinical isolates of *Prototheca zopfii*.

Strain #	Origin	Genotype	Strain #	Origin	Genotype
NUBS 5	Bovine mastitis	2	NUBS 68	Bovine feces	1
NUBS 19	Bovine mastitis	2	NUBS 88	Bovine feces	1
NUBS 26	Bovine mastitis	2	NUBS 133	Bovine feces	1
NUBS 44	Bovine mastitis	2	NUBS 150	Bovine feces	1
NUBS 50	Bovine mastitis	2	NUBS 163	Bovine feces	1
NUBS 51	Bovine mastitis	2	NUBS 21	Drinking water	1
NUBS 89	Bovine mastitis	2	NUBS 41	Drinking water	1
NUBS 101	Bovine mastitis	2	NUBS 70	Drinking water	1
NUBS 114	Bovine mastitis	2	NUBS 73	Sewage	1
NUBS 184	Bovine mastitis	2	NUBS 178	Rat feces	1

NUBS, College of Bioresource Science, Nihon University

Table 3-2. Drugs and disinfectants used in this study

Drugs/Disinfectants	System	Range ($\mu\text{g/mL}$)
Itraconazole	Azole	0.002 - 32.0
Amphotericin-B	Polyen	0.002 - 32.0
Kanamycin	Aminoglycoside	0.016 - 256.0
Gentamycin	Aminoglycoside	0.016 - 256.0
Alkyldiaminoethylglycine hydrochloride	Amphoteric surfactant	5.0×10^9 - 5.0
Chlorhexidine	Biguanide	5.0×10^9 - 5.0
Dioxide chlorine	Chlorinate	0.094 - 48.0
Povidone iodine	Iodine	0.012 - 10.0
Sodium hypochlorous	Chlorinate	6.0×10^9 - 6.0

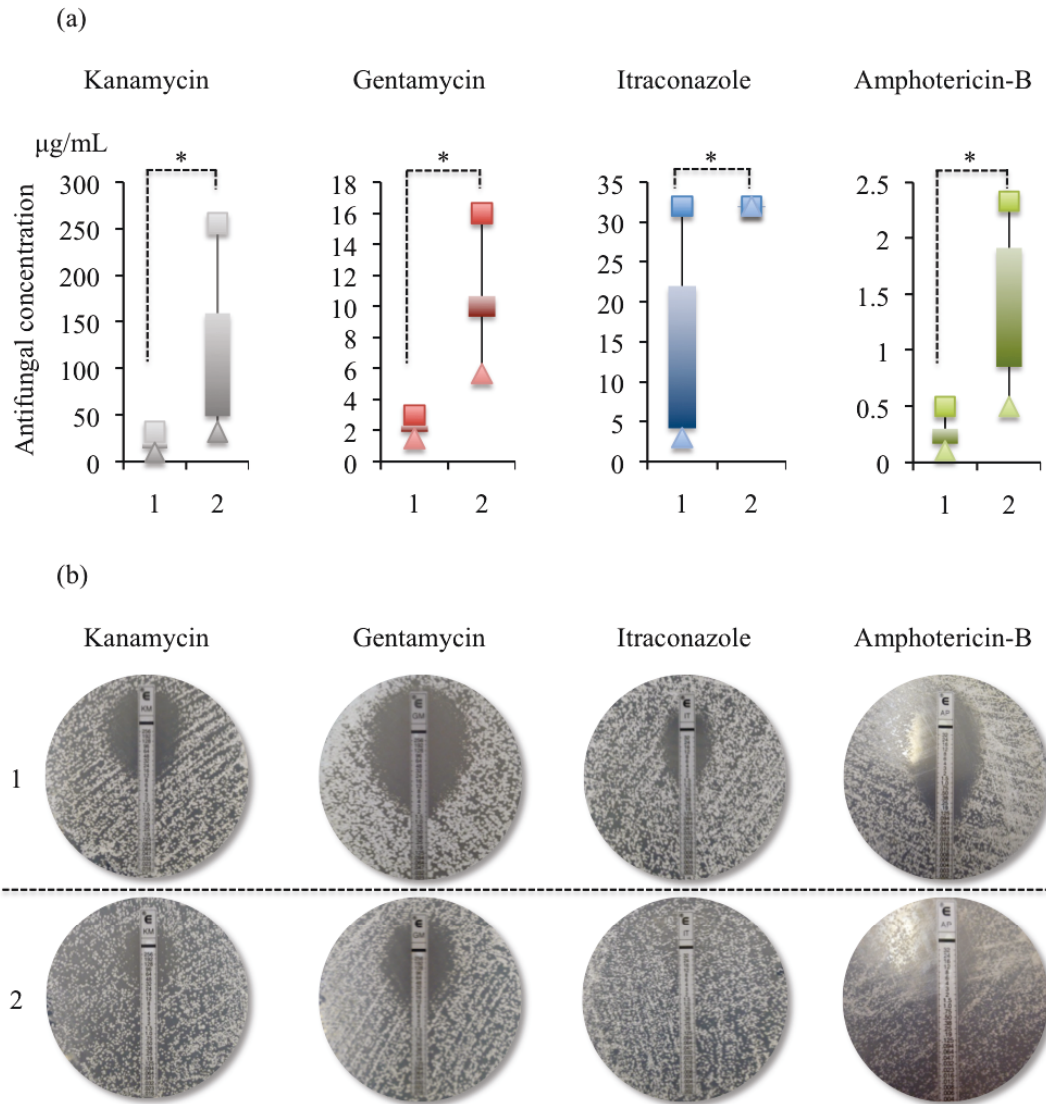


Fig. 3-1. Antifungal susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2 (a), and Inhibition ellipse of each drug and genotype (b). Statistical significance was determined by paired t test. The asterisks indicated p value ($p < 0.0001$). 1, genotype 1; 2, genotype 2.

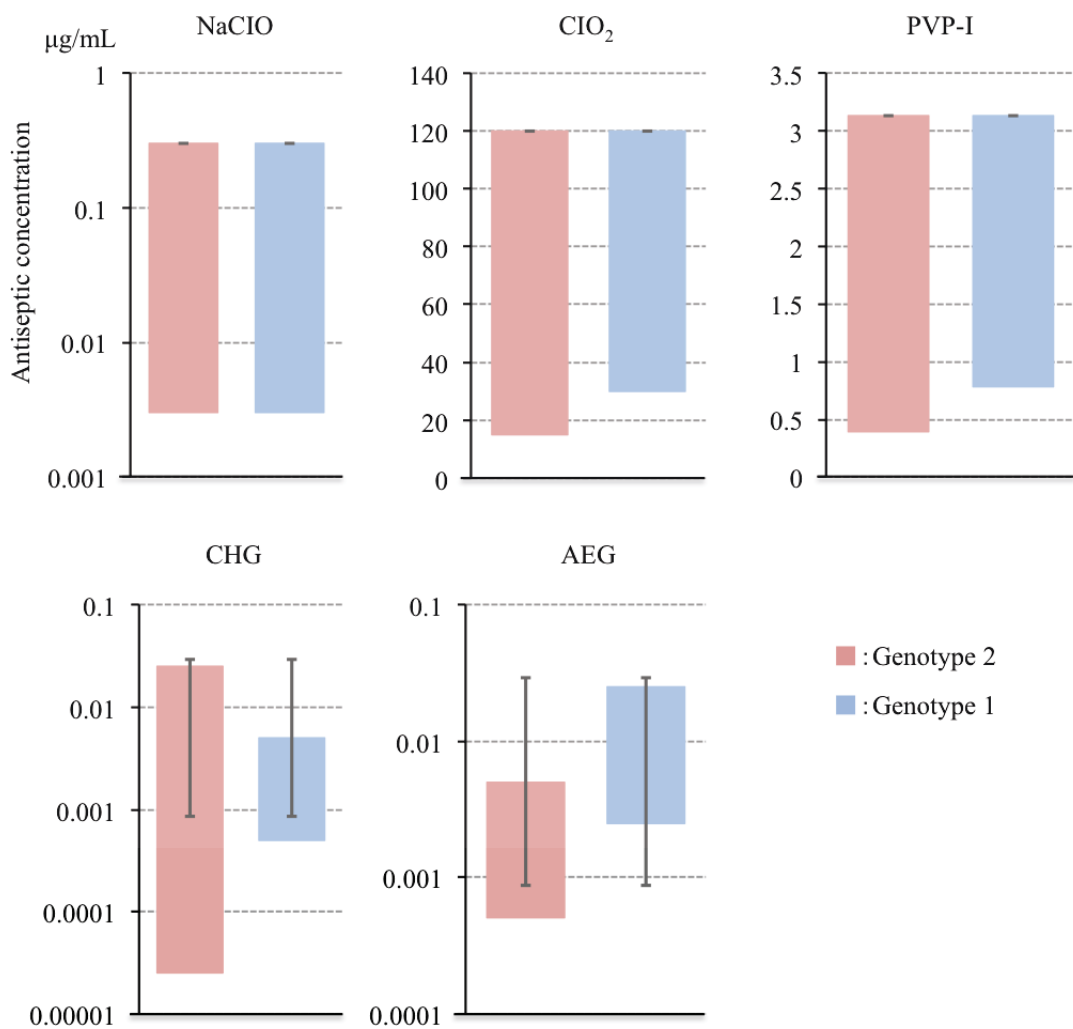


Fig. 3-2. Antiseptic susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. NaClO, Sodium hypochlorous; ClO₂, Dioxide chlorine; PVP-I, Povidone iodine; CHG, Chlorhexidine; AEG, Alkyldiaminoethylglycine hydrochloride.

第4章

試作プロトテカワクチン接種時の抗体価測定および

安全性の検討

4.1 序 言

第2章の分子疫学調査により、*Prototheca zopfii* の感染源は糞便および乳汁であり、これらからの汚染により伝播する可能性が示唆された。感染拡大の防止のため、消毒およびプロトテカ乳房炎罹患牛の隔離などの対策法を提示したが、増加傾向のある本症の治療法は必要視されている。しかしながら、第3章、第3項の抗菌薬感受性試験により、本症の抗菌剤治療が困難であることが改めて確認された。結果、経済的損害の高い摘発淘汰のみを選択せざるを得ないのが現状である。

近年、医学領域において、*in vitro* 条件下、特異的 IgG 抗体および熱安定性血清オプソニン存在下で Polymorphonuclear neutrophils (PMNS) により同種の *P. wickerhamii* を殺菌可能であることが報告された [Phair *et al.*, 1990]。しかし、一方では好中球単独での *P. wickerhamii* の殺菌は不可能であることも示されている [Carey *et al.*, 1997]。また、後天性免疫不全症候群 (AIDS) やその他の免疫低下を引き起こす疾病に罹患した場合、プロトテカ症への感受性を増大させることが報告されており、同様にプロトテカ感染においてナチュラルキラー細胞活性が関連することが提言されている。これらのことから、本菌は細胞性免疫のみでは殺菌できず、また正常な細胞性および液性免疫反応の必要性が示唆されている。

一方、獣医学領域では、宿主免疫応答に対する調査は少ないのが現状であるが、犬の *P. wickerhamii* 感染による皮膚プロトテカ症に対する免疫組織化学解析では、同菌種により病変部への炎症細胞の遊走が抑制されることが報告されて

いる [Pérez *et al.*, 1997]。一方、牛ではプロトテカ感染乳房炎の病理学的解析、電子顕微鏡解析により、炎症細胞の遊走および本藻の貪食が確認されている [Cheville *et al.*, 1984; Jensen *et al.*, 1998]。しかしながら、牛乳汁中の好中球における *P. zopfi* に対する効果について検討されているが、*P. zopfi* の Colony Forming Unit は減少せず、効果のないことが確認されており、ヒトと同様に細胞性免疫のみの殺菌が困難である可能性が示唆された [Cunha *et al.*, 2006]。

現在、液性免疫における防除の報告は存在しないが、乳汁中に抗体分泌細胞が存在し、血清および乳清中の抗体価が上昇することが報告されている [Roesler *et al.*, 2001; Roesler and Hensel, 2003]。加えて、第 2 章の分子疫学調査および過去の疫学調査 [Enders and Weber, 1993; Osumi *et al.*, 2008] から、乳牛は消化管内に日和見的に本藻類を保有していることが示唆され、強力な免疫賦活化を行わずして発症防止の可能性が考えられる。

そこで本研究では、適切な防除法の確立を目的として、不活化プロトテカワクチンを試作し、子牛および成牛に対する接種安全性を確認した。また抗牛プロトテカ抗体価測定用 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 系を作製し、抗体価測定ならびに診断応用への有用性を検討した。

4.2 材料及び方法

4.2.1. 不活化抗原の作製

標準株である *Prototheca zopfii* SAG2021^T 株 (genotype 2) を 37°C 下、48 時間振盪培養した後、PBS にて 5 回遠心洗浄 (1,500 x g、5 分) を行い、培地成分を除去した。その後、0.05%ホルムアミド加 PBS に再懸濁し、室温下で 2 時間不活化を行った [Kano *et al.*, 2014]。

4.2.2. 抗 *Prototheca* 抗体検出用 ELISA plate の作製

不活化 *P. zopfii* genotype 2 を超音波処理 (amplitude 100, pulse 1, 1 分) し、 1.0×10^7 cells/mL に調整し、0.05 M Carbonate buffer pH 9.6 (0.04 M Sodium hydrogen Carbonate, 0.007 M Sodium Carbonate) に浮遊させた。その後、Maxisorp Nunc-Immuno 96-well Plate (Nunc) に 100 μ L (粗タンパク量: 1 μ g/well) を加え、37°C 下、30 分間で固相化した [Roesler *et al.*, 2001]。固相化後、Phosphate-buffered saline-Tween (PBS-T) にて 5 回洗浄し、5%スキムミルクにより 37°C、1 時間でブロッキングを行った。ブロッキング処理後、PBS-T にて洗浄し、抗体価測定まで -80°C 下で保存した。

4.2.3. 抗体価測定

各被検牛血清を PBS-T にて 2⁹ 倍に希釈し、50 μ L/well で固相化プレートに加え、37°C、1 時間で反応させた。一次血清反応後、PBS-T にて 5 回洗浄を行い、800 倍希釈した Rabbit anti-Bovine IgG conjugated to HRP (biorbyt) を 50 μ L/well

加え、同条件にて反応させた。二次抗体反応後に同様の洗浄を行い、反応基質液 (0.03% ABTS; 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) (WAKO) , 0.1M Citric acid, 0.2M Disodium Hydrogenphosphate, 0.01% Hydrogen Peroxide (30%)) を 200 μ L/well 加え、遮光条件下にて 30 分間発光処理を施した。発色後、基質反応停止液 (SDS/DMF; 0.55 M Sodium Dodecyl Sulfate, 5.5 M *N-N* dimethyl formamide) を 50 μ L/well 加え、Multiskan GO microplate photometer (Thermo Fisher Scientific) にて 405 nm の波長で吸光度を測定した。また、プロトテカ感染牛 5 検体分の血清を加えたプール血清を毎回同時測定し、その測定値を 100 ELISA-unit (EU) と設定し、各検体の EU を補正した。

4.2.3. 作製 ELISA plate の精度分析評価

無作為に抽出したプロトテカ感染牛、非感染牛血清を用いて ELISA の精度分析を行った。血清使用牛のプロトテカ分離状況は Table 4-1. に示した。

始めに、使用全血清を 2^8 - 2^{13} の 6 段階に段階希釈し、それぞれの検体の希釈直線性を確認した。全ての検体は、3 回測定を行い、再現性を得た。

アッセイ内再現性試験では、各被検血清を PBS-T にて 2^9 倍に希釈し、同プレート内でそれぞれ 5 重測定した。

アッセイ間再現性試験では、各被検血清を PBS-T にて 2^9 倍に希釈し、隔日で 5 回測定した。

アッセイ内およびアッセイ間再現性結果は、それぞれ変動係数 (CVs; Coefficients of variation) にて示した。

4.2.5. 臨床血清の抗体価測定およびカットオフ値の設定

プロトテカ感染牛 15 例、非感染牛 16 例、酵母感染牛 4 例の各血清について、抗体価の測定を行った。全ての被検血清は 4.2.4 の手法により測定した。測定後、各群の有意差の有無を一元配置分散分析 (One-way ANOVA (Analysis of Variance)) により検定し、Turkey's test による多重比較検定により対照群を比較した。また、プロトテカ感染牛およびプロトテカ未検出牛 (非感染牛および酵母感染牛) の 2 群の測定値を用いて、Receiver Operating Characteristic analysis (ROC) 解析により、抗体価上昇のカットオフ値を設定した。

4.2.6. 不活化ワクチン接種および接種牛抗体価測定

不活化ワクチン接種トライアルは全部で 3 回行った。

第 1 回目では子牛 3 例および成牛 3 例に対して、前述の不活化抗原液 1.0×10^7 cells/mL と Freund's Incomplete Adjuvant (Cappel) を混和し、ミセル化したものを右側頸部に皮下接種した。血清回収は接種前、接種 2 および 4 週後に行い、抗体価測定および抗体価上昇の確認を行った。

第 2 回目では成牛 7 例に対して、第 1 回と同量を右側頸部に筋肉内接種した。血清回収は、接種前、接種 1 日、2、4、8 週後に行い、同様に抗体価上昇の確認を行った。

第 3 回では、接種濃度を増加 (1.0×10^8 cells/mL) し、同アジュバントと混和後、大腿半腱様筋に接種した。さらに接種 4 週後に 1 回目と同量のワクチン接種を実施し、ブースト効果を得た。血清回収は接種前、接種後 2、4、6、8 週後

に行い、同様に抗体価上昇の確認を行った。

抗体価測定は 4.2.4.の手法で行った。また、接種牛の各データを Table 4-2, 4-3, 4-4 に示した。

4.3 結果

4.3.1. 作製 ELISA plate の精度分析評価

希釈直線性試験の結果、プロトテカ感染牛血清の 4 例では希釈倍数に応じた良好な希釈直線性を得た ($R^2=0.97$)。一方、非感染牛血清では、希釈倍数に関わらず、抗体価の上昇は認められなかった ($R^2=0.46$) (Fig. 4-1)。またアッセイ内変動係数は 3.3-9.1%、アッセイ間変動係数 9.9-19.8%と概ね良好な再現性を得た (Table 4-5, 4-6)。

4.3.2. 臨床血清の抗体価測定およびカットオフ値の設定

プロトテカ感染牛、非感染牛および酵母感染牛血清を用いて臨床血清の各抗体価を測定した結果、プロトテカ感染牛血清 (Mean, 60.94 EU; range, 41.3-85.3; $p < 0.001$) では、非感染牛 (Mean, 4.05 EU; range, 1.5-28.9) および酵母感染牛 (Mean, 8.65 EU; range, 4.9-13.3) 血清と比較して、有意な抗体価の上昇を確認した (Fig. 4-2)。

得られた抗体価に基づいて、プロトテカ感染牛および非感染牛に対する ROC 解析を行った結果、抗体価上昇のカットオフ値を 43.4 EU と設定した (sensitivity, 0.94; specificity, 1) (Fig. 4-3)。

4.3.3. 不活化ワクチン接種時の安全性および免疫原性の評価

不活化ワクチン接種による抗体価測定の結果、子牛の 3 例において接種 4 週後まで抗体価上昇は確認されなかった (4 週後抗体価上昇倍数, 0.96) (Fig. 4-4a,

Table 4-7)。一方、成牛においては、第1回の3例および第2回の7例ともに少数カットオフ値を超える抗体価の上昇が認められたものの、接種牛のほとんどはカットオフ値を超えない抗体価の軽度上昇にとどまり、また維持は認められなかった（第1回成牛, 4週後抗体価上昇倍数, 4.95; 第2回成牛, 4週後抗体価上昇倍数, 4.06, 8週後抗体価上昇倍数, 2.22）（Fig. 4-4a, 4b, Table 4-7）。一方、投与濃度を増加させた第3回目成牛では、接種4週後においてカットオフ値を超える良好な抗体価上昇が認められた（4週後抗体価上昇倍数, 20.1）。また、第二次接種によるブーストにより、8週後までカットオフ値を超える抗体価の上昇および維持が認められた（8週後抗体価上昇倍数, 42.30）（Fig. 4-5, Table 4-5）。

また、不活化ワクチン接種後における一般身体検査および血液検査所見では異常が認められなかった。

4.4 考 察

作製した ELISA plate の分析精度を評価した結果、良好な希釈直線性および安定したアッセイ間、アッセイ内再現性が得られた。続いて、プロトテカ感染牛、非感染牛および酵母感染牛血清の各抗体価をそれぞれ測定した結果、プロトテカ感染牛血清に有意な高値を確認した。Jensen らは、非感染牛においても抗体価の上昇が認められる症例の存在を報告している [Jensen *et al.*, 1998] が、本研究で使用した非感染牛血清中の抗体価の上昇は確認されず、また糞便のみからプロトテカを検出している症例においても、抗体価の上昇は認められなかった。一方、乳汁中にプロトテカを検出している症例は、全て抗体価の上昇を認め、過去の報告と一致した [Roesler *et al.*, 2001; 2003]。以上の結果より、本研究で作製した ELISA は、プロトテカ感染牛および非感染牛の抗体価検出に有用であることが示唆された。また、糞便中からプロトテカを検出している症例では、消化管内に腐生あるいは共生しているために抗体価上昇が誘導されなかったことが考えられた。

設定カットオフ値を基に、不活化ワクチン接種牛の抗体価上昇を検出した結果、子牛では接種 4 週間まで抗体価の上昇は認められず、移行抗体の影響が考えられた。一方、同ワクチン一回接種の成牛では、少数で抗体価の軽度な上昇が認められたが、ほとんどの接種牛ではカットオフ値以上への抗体価上昇および継続的な維持を得られず、接種回数あるいは接種濃度の不足が考えられた。接種濃度を増加させ、初回接種 4 週後に第二次接種を行って測定した結果、初回接種 4 週後のほとんどの接種牛では、カットオフ値を上回る抗体価の上昇が

認められ、また第二次接種により抗体価は 8 週後まで維持された。以上の結果から、ワクチン接種濃度は 1.0×10^8 cells/mL が適量であり、ブースター効果を得ることによりカットオフ値を上回る抗体価が維持されることが明らかとなった。

今後、本不活化ワクチン接種牛に対する感染試験およびプロトテカの排除の評価を行う必要性が考えられた。

本章により、不活化プロトテカワクチンの免疫原性、安全性および接種牛の一般状態および血液検査所見の健全性を確認し、本不活化ワクチンの牛プロトテカ乳房炎防除への可能性が示唆された。

Table 4-1. *Prototheca* isolation body site and specimen from protothecal mastitis cow and normal cow using evaluation of the precision for manufactured ELISA plate.

Cow #	<i>P. zopfii</i> isolated mammary glands				Feces
	Left front	Left back	Right front	Right back	
1	●/2	–	–	●/2	–
2	–	–	–	●/2	–
3	–	–	–	–	●/1
4	●/2	–	●/2	●/2	–
5	●/2	●/2	●/2	●/2	–

●, *Prototheca* positive; –, *Prototheca* negative; 1 or 2, *P. zopfii* genotypes

Table 4-2. The information of the cows in the 1st vaccination trial.

Cow #	Breed	Gender	Day-old on vaccination	Condition
1	Holstein (calf)	♀	14	Healthy
2	Holstein (calf)	♀	33	Healthy
3	Holstein (calf)	♀	26	Healthy
4	Holstein	♀	264	Healthy
5	Holstein	♀	278	Healthy
6	Holstein (Breeding)	♂	129	Healthy

Table 4-3. The information of the cows in the 2nd vaccination trial.

Cow #	Breed	Gender	Month-old on vaccination	Condition
1	Holstein	♀	61	Healthy
2	Holstein	♀	46	Healthy
3	Holstein	♀	58	Emaciation
4	Holstein	♀	75	Healthy
5	Holstein	♀	59	Healthy
6	Holstein	♀	87	Healthy
7	Holstein	♀	60	Healthy

Table 4-4. The information of the cows in the 3rd vaccination trial.

Cow #	Breed	Gender	Month-old on vaccination	Condition
1	Holstein	♀	97	Healthy
2	Holstein	♀	92	Healthy
3	Holstein	♀	6	Falot's tetralogy
4	Holstein	♀	15	Falot's tetralogy
5	Holstein	♂	9	Healthy
6	Holstein	♀	77	Healthy
7	Holstein	♀	74	Healthy
8	Holstein (Breeding)	♀	5	Healthy
9	Holstein	♀	142	Healthy
10	Jersey	♀	61	Healthy

Table 4-5. Results of intra-assay reproducibility using manufactured ELISA plates for measurement of anti-*Prototheca* IgG antibody titer.

Items	Cow #				
	#1	#2	#3	#4	#5
Mean (EU)	98.6	73.2	5.3	153.6	88.4
SD	8.7	2.7	0.5	6.9	5.8
CV (%)	8.8	3.7	9.1	4.5	6.5

EU, ELISA unit; SD, Standard deviation; CV, Coefficient of variation

Table 4-6. Results of inter-assay reproducibility using manufactured ELISA plates for measurement of anti-*Prototheca* IgG antibody titer.

Items	Cow #				
	#1	#2	#3	#4	#5
Mean (EU)	82.1	67.9	5.2	179.7	84.1
SD	15.1	13.5	0.5	24.9	11.0
CV (%)	18.4	19.8	9.9	13.8	13.1

EU, ELISA unit; SD, Standard deviation; CV, Coefficient of variation

Table 4-7. *Prototheca* antibody responses to the inactivated *Prototheca* vaccine

Categories	<i>N</i>	Geometric mean antibody titer				
		Pre vac	Post vac (4 wk)	Post vac (8 wk)	Fold rise (4 wk)	Fold rise (8 wk)
Calves	3	1.37	1.32	–	0.96	–
Bovines (1 st vac)	3	4.40	21.79	–	4.95	–
Bovines (2 nd vac)	7	3.24	13.14	7.18	4.06	2.22
Bovines (3 rd vac)	10	2.86	58.56	120.77	20.51	42.30

N, Number of subjects; vac, vaccination.

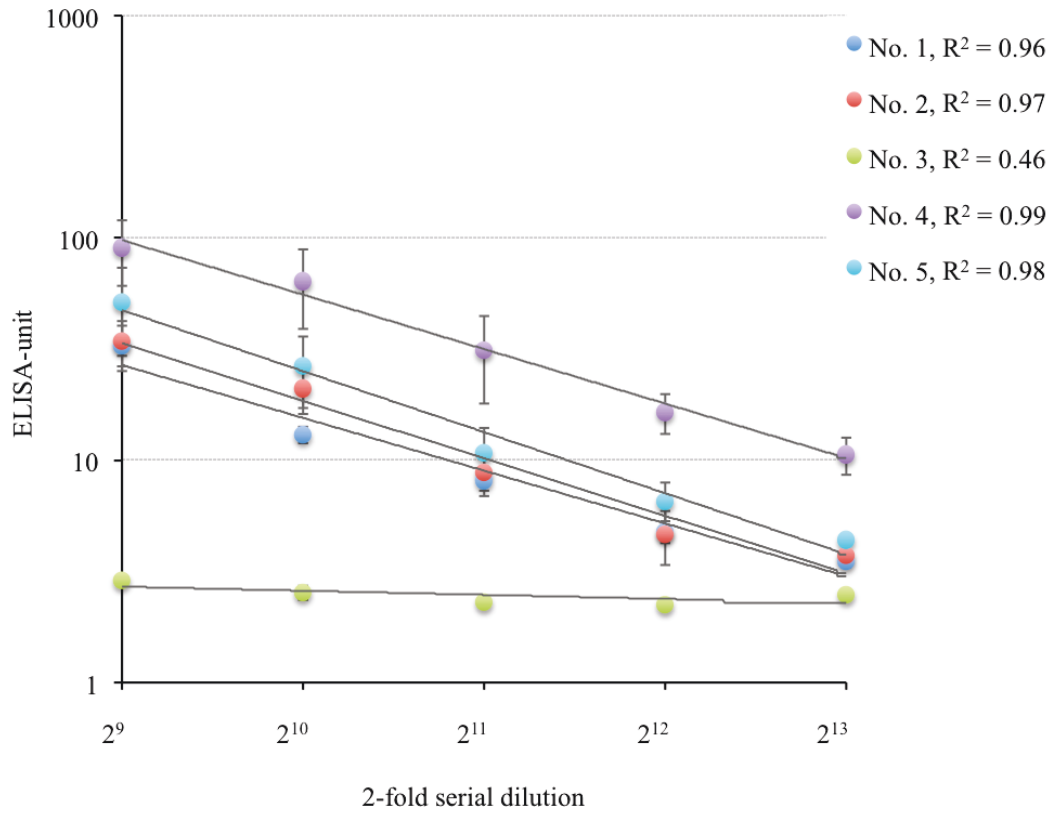


Fig. 4-1. Dilution linality assay of anti-*Prototheca* IgG antibodies in bovine serum in between *Prototheca* infected cows and normal cow. All bovine serums were serially diluted with PBS-T. This assay was assayed in triplicate. No. 1, 2, 4, 5, *Prototheca* infected cow serum; No. 3, Normal cow serum. R^2 , correlation coefficient.

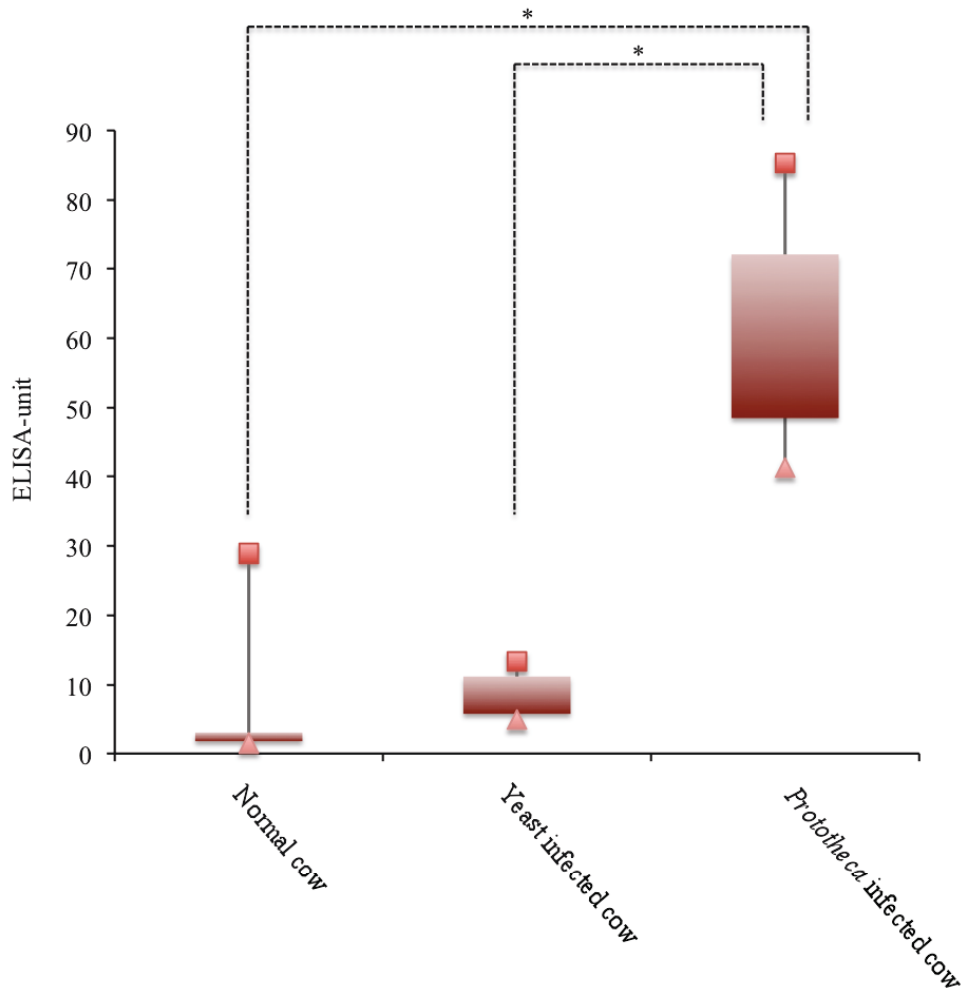
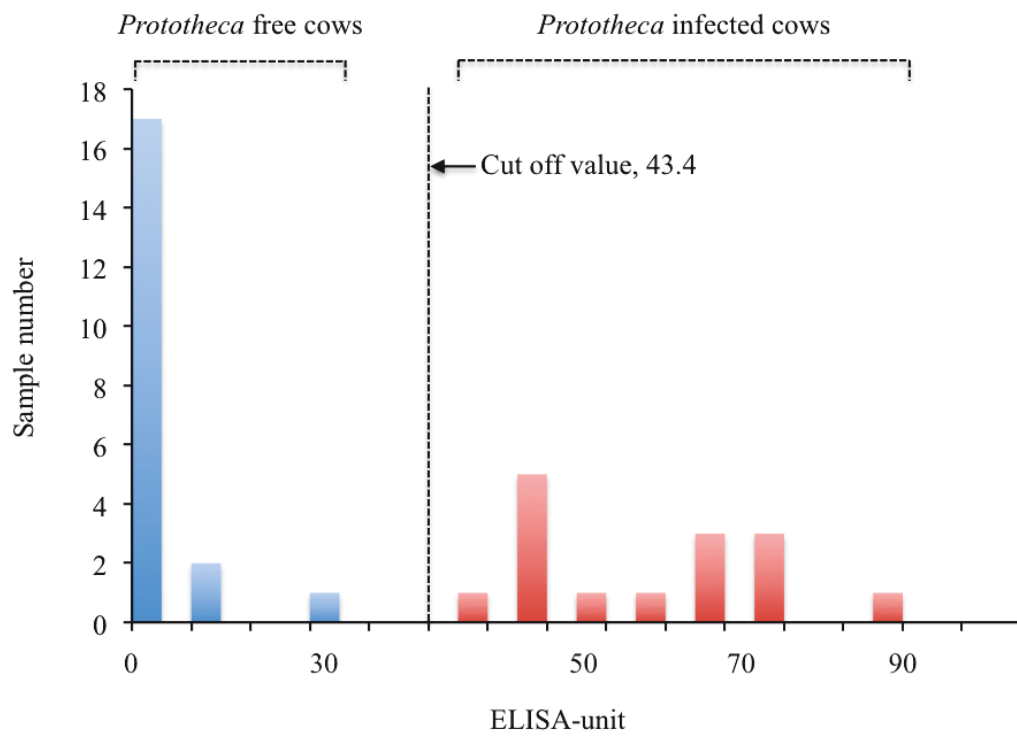


Fig. 4-2. Comparison of anti-*Prototheca* IgG antibody titer among 16 normal cows, 4 yeast infected cows and 15 *Prototheca* infected cows. Statistical significance was determined by one-way ANOVA, followed by Turkey's test. The asterisks indicated p value ($p < 0.001$).



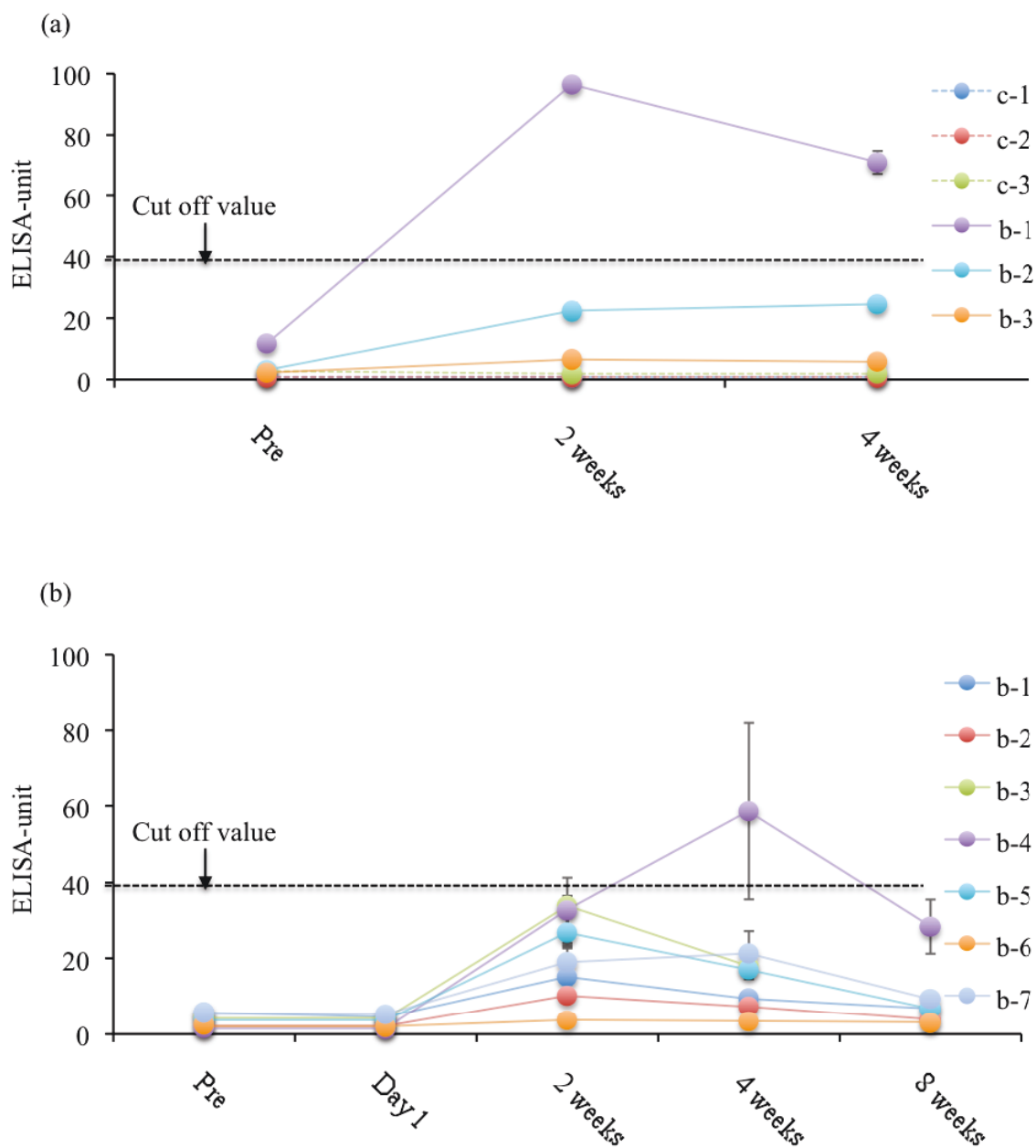


Fig. 4-4. Serial changes of *Prototheca* antibody to the inactivated *Prototheca* vaccine. All cows were inoculated 1.0×10^7 cells/mL mixed with Freund's incomplete adjuvant. *Prototheca* antibody titer in each serum was measured at pre, post 2 and 4 weeks in the 1st vaccination trial (a) and was measured at pre, Day 1, post 2, 4 and 8 weeks in the 2nd vaccination trial (b). No. b-3 of the 2nd inoculation trial was measured until 4 weeks. The dotted horizontal bars indicated cut off value (43.4 EU). c, calf; b, bovine.

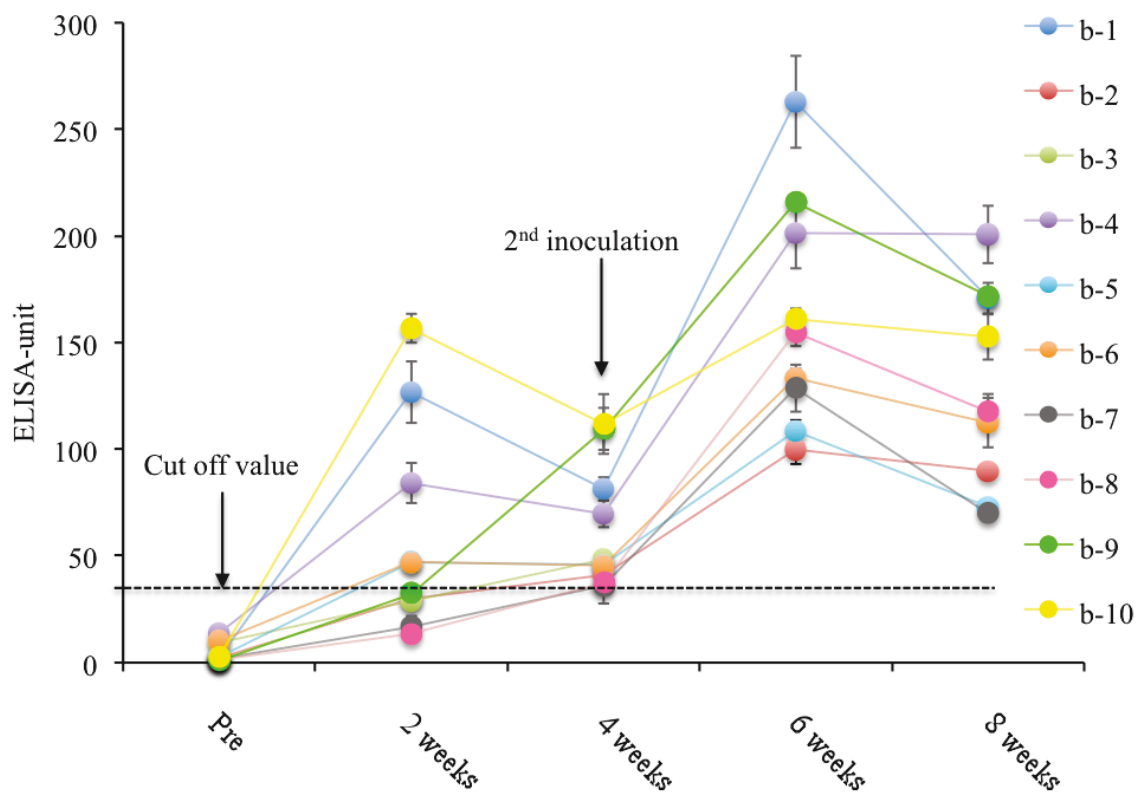


Fig. 4-5. Serial changes of *Prototheca* antibody to the inactivated *Prototheca* vaccine. All cows were inoculated 1.0×10^8 cells/mL mixed with Freund's incomplete adjuvant. *Prototheca* antibody titer in each serum was measured at pre, post 2, 4, 6 and 8 weeks in the 3rd vaccination trial. At 4 weeks after initial inoculation, equivalent vaccine was inoculated for all bovines (secondary inoculation). No. b-3 was measured until 4 weeks. The dotted horizontal bars indicated cut off value (43.4 EU). b, bovine.

第 5 章

総 括

牛乳房炎の原因は複数存在するが、藻類である *Prototheca zopfii* (以下 PZ) 感染性牛乳房炎 (牛プロトテカ乳房炎) は、顕著な症状を示さず、検出の遅延による感染拡大に発展し易く、治療法を欠き、摘発淘汰を唯一の対策とする点で酪農に打撃の大きい疾病である。

本症の発生は現在、国内外共に増加傾向にあり、伝播には複数の経路が推測されるも、詳細は不明に経過している。故に、本藻類の疫学調査は、感染源および伝播経路の解明および防疫上の観点から重要な意義を有している。

近年 PZ は、分子生物学的解析に基づき二遺伝子型 (genotype 1, 2) に分類され、genotype 1 が牛舎環境から分離される非病原性株、genotype 2 が乳汁由来の病原性株に、それぞれ比定された。本邦では、両遺伝子型解析を基にした分子疫学調査および防除の検討は未だ行われていない。

本研究では、牛プロトテカ乳房炎の感染源解明および防疫を目的に検討を行った。第 1 章では、PZ の分子疫学調査により、感染源および感染経路を推定した。第 2 章では両遺伝子型の相違追求のための分子生物学的解析、PZ 超微細構造観察および抗菌剤/消毒薬感受性試験を実施した。第 3 章では有効な治療法を欠く本症の新たな防除法確立を目途に、プロトテカワクチンを試作し有効性、安全性を評価した。

1. *Prototheca zopfii* の分子疫学調査による感染源および伝播経路の推定

Prototheca zopfii による難治性乳房炎に関する国内外の疫学的知見は感染源、伝播経路の特定に至っていない。そこで乳汁、バルク乳、糞便、飲料水、体液（第一胃液、血液、尿）および牛舎環境試料（牛床、飼糧、敷料等）から本藻を分離後、遺伝子型を特定し、感染源、伝播経路について検討した。

採材期間は2004年10月から2014年6月の10年間とし、愛知・愛媛・静岡・千葉・富山・奈良・三重・北海道内各農家における感染乳160検体（89頭/44戸）、バルク285（260戸）、糞便821検体（18戸）飲料水478検体（10戸）体液および環境由来各試料105検体から *Prototheca spp.* の分離を試みた。分離株毎に、18S rDNA 領域遺伝子の塩基配列の相同性検索により、種および遺伝子型を特定した。

供試検体毎の分離率および遺伝子型比率は、感染乳：100%（genotype 1：2＝0.6%：99.4% 以下同順）、バルク：11.2%（0：100）、糞便：16.1%（68.2：31.1：0.7（*P. blaschkeae*））、飲料水：5.9%（71.4：28.6）、牛床、牛舎周辺：13.7%（40：60）、他動物糞便：25%（100：0）であった。飼料、体液サンプルでは、*Prototheca spp.* を認めなかった。

感染乳およびバルク由来株では1株を除き、全て genotype 2 と同定し、同遺伝子型の牛病原性を確認した。糞便および飲料水由来株では、何れも genotype 1 が優位に存在し、genotype 2 も確認した。糞便は、環境試料中最も高い分離率を示した。すなわち、感染の有無に関わらず全ての牛より genotype 2 を検出し、感染源としての糞便の可能性が強く示唆された。また生後1ヶ月齢の仔牛糞便中から genotype 2 を検出し、初乳および母乳による経口感染の可能性も併せて考えられた。一方、飲料水からの分離率は低く、採材位置と感染牛との間に位

置的関連性も認め得ず、飲料水分離株は、感染乳汁の落下および糞便飛沫の汚染に基づくと推察された。また、牛床も汚染源としての可能性を認めた。他動物種由来では、ネズミー検体からの genotype 1 検出に留まり、出入り動物からの伝播可能性は低いと考えられた。

以上より、本邦の牛プロトテカ乳房炎では糞便および乳汁が、感染源あるいは伝播経路として機能する可能性が明らかとなった。

2. *Prototheca zopfii* genotype 1, 2 両遺伝子型の遺伝的および表現形質の相違について

前章の分子疫学調査により、本邦における *Prototheca zopfii* の遺伝子型と病原性との関連を確認した。両遺伝子型の相違は病原性の解明に資するが、遺伝子の他の相違は不明である。そこで、他藻類でクローニングされているリボソームの Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域および β -tubulin 遺伝子の分子系統解析を行うと共に、表現型解析として本藻類の超微細構造を調べ抗菌剤、消毒薬に対する感受性を調査した。

1) ITS 領域および β -tubulin 遺伝子による *Prototheca zopfii* 両遺伝子型系統解析

従来、*Prototheca zopfii* の遺伝子型分類はリボソーム領域(18S rDNA, D1/D2 26S rDNA) を用い行われてきたが、他遺伝子領域での検討は未だなされていない。そこで乳汁、各環境試料、ヒトおよびイヌ由来の両遺伝子型株を用い、ITS 領域および β -tubulin 領域に関し系統分類を行った。

ITS 領域系統解析の結果、genotype 1 はさらに 4 つの独立したクラスターを形

成したが、分離環境、宿主および地域における関連性は認められなかった。一方、genotype 2 は全て同一のクラスターに属し、牛プロトテカ乳房炎の単系統株に基づく可能性が示唆された。 β -tubulin 遺伝子では異クラスター形成を認めず、両型で共通性を示した。また、genotype 1 では遺伝子アレルを散見し、倍数体の存在が考えられた。

以上より、genotype 1 は、遺伝的多様性に富み複数の genotype に分類される一方、genotype 2 は宿主を問わず、単系統を保持し広範囲に分布する現状が明らかとなった。

2) *Prototheca zopfii* 両遺伝子型の超微細構造解析について

Prototheca zopfii genotype 1, 2 両遺伝子型の詳細な形態学的情報は不足している。そこで、走査、透過型電子顕微鏡による両型の外観および細胞内構造評価を行った。

細胞外観は、両型共に円あるいは楕円形を呈し、母細胞内に内生胞子を形成、成熟後放出する生活環を示した。細胞内構造は、真核生物に基本的な細胞器官および色素体を有し、藻類類似の細胞壁二層構造を形成していた。両型間の相違として細胞壁表面像において、genotype 1 は顆粒状隆起に覆われていたのに対し、genotype 2 では無隆起で、内腔に達する直径約 20 nm 大の小孔を壁全面に観察した。細胞内構造では、両型間で液胞の染色性に相違を認め、蓄積する代謝物質が相互に異なる可能性を示した。また genotype 2 では、多量の色素体蓄積および発達した小胞体を認めた。これらの細胞器官の相違は、両型間のタンパク含有量の相違報告と一致した。

以上より、*P. zopfii* の超微細構造における両型間の相違を初めて明らかとした。

3) *Prototheca zopfii* 両遺伝子型における薬剤および消毒薬感受性の比較

Prototheca zopfii の遺伝子型と薬剤/消毒薬感受性の相違は検討されていない。そこで、牛舎環境由来の genotype 1、乳房炎罹患牛由来の genotype 2 各 10 株および両遺伝子型標準株について、感受性既報の抗菌剤さらに農場で通常使用の各種消毒薬に対し、CLSI 法および E-test 法により感受性試験を実施した。

その結果、使用全薬剤は、genotype 1 に比較し genotype 2 に有意に低感受性を示した ($p < 0.01$)。一方、両型共、全消毒薬の通常の使用濃度域に感受性を示した。

以上より、薬剤による本症治療の困難な一方、環境に対する消毒措置の有用性が明らかとなった。

3. 試作プロトテカワクチン投与時の抗体価測定および安全性の検討

第 2 章より、*Prototheca zopfii* genotype 2 の化学療法不応性が判明した。適切な防除法の確立を目的に、ホルムアミド不活化プロトテカワクチンを試作し、仔牛および成牛に対する接種安全性を確認した。また抗牛プロトテカ抗体価測定用 ELISA 系を作製し、抗体価測定応用および診断応用への有用性を検討した。

無作為に抽出した感染牛および非感染牛血清を用いて、genotype 2 破砕物を固相化抗原 (1 $\mu\text{g}/\text{well}$) とした ELISA の分析精度を比較し、良好な希釈直線性、再現性を得た (アッセイ内変動係数: 3.7~9.1%、アッセイ間変動係数: 9.9~19.8%)。

プロトテカ感染牛、非感染牛および酵母感染牛血清の各抗体価をそれぞれ測

定し、プロトテカ感染牛血清に有意な高値を確認した ($p < 0.01$)。設定カットオフ値を基に、試作不活化ワクチン投与牛 (1.0×10^7 cells/mL およびアジュバント) の抗体価上昇を検出した結果仔牛では、投与4週後まで抗体価の上昇を認めず、移行抗体の影響が考えられた。一方、同ワクチン一回接種の成牛では、抗体価の軽度な上昇を認めたが、カットオフ値以上への抗体価上昇および維持を得られず、一回接種法は不適と考えられた。そこで、投与濃度を増加 (1.0×10^8 cells/mL) させ、初回接種4週後に第二次接種を行って測定した結果、8週後まで維持されるカットオフ値を超えた抗体価を認めた。

以上から、試作不活化ワクチンの免疫原性、安全性、接種牛の一般状態および血液検査所見の健全性を確認し、本不活化ワクチンの牛プロトテカ乳房炎防除への可能性が示唆された。

本研究は、本邦における *Prototheca zopfii* 感染性乳房炎の感染源および伝播経路を明らかにし、本症発生時の対策に途を拓いた。また両遺伝子型での複数遺伝子および表現形質の相違、抗菌剤に対する感染株非感受性、環境株感受性の傾向、遺伝子型と難治原因の関係性を示唆し、不活化ワクチンによる予防の可能性を示した。

本藻の感染源や伝播経路、両遺伝子型間の性状解析および新たな予防法の提示は、今後の国内外における牛プロトテカ乳房炎の防除対策に大きく寄与すると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に関して、終始御指導、御鞭撻を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科の鎌田寛 教授に深く感謝の念を申し上げます。また多忙の中、本論文をご精読および厳密なる構成を賜りました同学部 津曲茂久 教授、渋谷久 教授並びに加納壘 准教授に謹んで深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、御協力ならびに御助言をいただいた日本大学生物資源科学部獣医学科の丸山治彦 助教、酪農学園大学獣医学群獣医学類生産動物医療分野の鈴木一由 教授、帝京大学医真菌研究センターの長谷川篤彦 客員教授、帝京大学大学院宇宙環境医学研究室の槇村浩一 教授に心より感謝の意を表します。また、サンプルおよび試薬の提供をしていただいた NOSAI 愛知県西部家畜診療所の伊藤隆晶 獣医師、関東化学株式会社の小野崎正修 課長に感謝致します。

本研究の様々な時点で御助言頂きました日本大学生物資源科学部獣医学科の佐藤真伍 助手、動物医科学研究センターの柴崎康宏 博士に感謝致します。また、獣医臨床病理学研究室卒業生の渡辺光弘 獣医師、茨木雅人 獣医師、山口修平 獣医師、大越みちる 獣医師、加藤真樹 獣医師、同研究室の金田泰弥氏、佐藤裕子氏をはじめ、同研究室の諸氏には本研究にご協力頂き、大変お世話になりました。

最後に、大学院への進学を応援し、研究の機会を与えて頂いた家族に心から感謝致します。

参考文献

Aaronson, S., Behrens, U., Orner, R., Haines, T.H. 1971. Ultrastructure of Intracellular and Extracellular Vesicles, Membranes, and Myelin Figures Produced by *Ochromonas danica*. *Journal of Ultrastructure Research* 35, 418-430.

Adhikari, N., Bonaiuto, H.E., Lichtenwalner, A.B. 2013. Short communication: Dairy bedding type affects survival of *Prototheca* in vitro. *Journal of Dairy Science* 96, 7739-7742.

Ahrholdt, J., and Roesler, U. 2011. Genotypical differentiation of *Prototheca* isolates of milk samples from mastitis affected cattle in Germany. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 124, 108-113 (in German).

Ahrholdt, J., Murugaiyan, J., Straubinger, R.K., Jagielski, T., Roesler, U. 2012. Epidemiological analysis of worldwide bovine, canine and human clinical *Prototheca* isolates by PCR genotyping and MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping. *Medical Mycology* 50, 234-243.

Anderson, K.L., and Walker, R.L. 1988. Sources of *Prototheca* spp. in a daily herd environment. *Journal of American Veterinary Medical Association* 193, 553-556.

Aouay, A., Coppée, F., Cloet, S., Cuvelier, P., Belayew, A., Lagneau, P.-E., Mullender, C. 2008. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis. *Journal of Mycology Medical* 18, 224-227.

Arnold, P., and Ahearn, D.G. 1972. The Systematics of the Genus *Prototheca* with a Description of a New Species *P. filamenta*. *Mycopathologia* 64, 265-275.

Ashford, B.K., Ciferri, R., Dalmau, L.M. 1930. A new species of *Prototheca* and a variety of the same isolated from human intestine. *Arch. Protistk* 70, 619-638.

Atkinson, A.W. Jr., Gunning, B.E., John, P.C. 1972. Sporopollenin in the Cell Wall of *Chlorella* and Other Algae: Ultrastructure, Chemistry, and Incorporation of ¹⁴C-Acetate, Studied in Synchronous Cultures. *Planta* 107, 1-32.

Bueno, V.F., de Mesquita, A.J., Neves, R.B., de Souza, M.A., Ribeiro, A.R., Nicolau, E.S., de Oliveira A.N. 2006. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia* 161, 141-145.

Carey, W.P., Kaykova, Y., Bandres, J.C., Sidhu, G.S., Bräu, N. 1997. Cutaneous Protothecosis in a Patient with AIDS and a Severe Functional Neutrophil Defect: Successful Therapy with Amphotericin B. *Clinical Infectious Diseases* 25, 1265-1266.

Casal, M., and Gutierrez, J. 1981. Preliminary investigation of the in vitro inhibitory effect of antibiotics on algae of the genus *Prototheca*. *Mycopathologia* 75, 45-49 (in Spanish).

Casal, M., and Gutierrez, J. 1983. Simple new test for rapid differentiation of *Prototheca wickerhamii* from *Prototheca zopfii*. *Journal of Clinical Microbiology* 18, 992-993.

Chao, S.C., Hsu, M.M., Lee, J.Y. 2002. Cutaneous protothecosis: report of five cases. *British Journal of Dermatology* 146, 688-693.

Cheville, N.F., McDonald, J., Richard, J. 1984. Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in Bovine Granulomatous Mastitis. *Veterinary Pathology* 21, 341-348.

Chodat, R. 1913. Monographies d'algues en culture pure. *Materiaux pour la flore cryptogamique Suisse* 4, 234-241 (in French).

Ciferri, R., Montemartini, A., Ciferri, O. 1957. Morphological and assimilative characteristics and speciology of Protothecae. *Nuovi Annali D'igiene e Microbiologia* 8, 554-563 (in Italian).

Coloe, P.J., and Allison, J.F. 1982. Protothecosis in a cat. *Journal of American Veterinary Medical Association* 180, 78-79.

Cooper, M.C., Hardin, W.R., Petersen, T.W., Cattoloco, R.A. 2010. Visualizing “green oil” in live algal cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109, 198-201.

Cunha, L.T., Pugine, S.P., Valle, C.R., Ribeiro, A.R., Costa, E.J., de Melo, M.P. 2006. Effect of *Prototheca zopfii* on neutrophil function from bovine milk. *Mycopathologia* 162, 421-426.

da Costa, E.O., Melville, P.A., Ribeiro, A.R., Watanabe, E.T., Parolari, M.C. 1997. Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia* 137, 33-36.

da Costa, E.O., Ribeiro, M.G., Ribeiro, A.R., Rocha, N.S., de Nardi Júnior, G. 2004. Diagnosis of clinical bovine mastitis by fine needle aspiration followed by staining and scanning electron microscopy in a *Prototheca zopfii* outbreak. *Mycopathologia* 158, 81-85.

Davies, R.R., Spencer, H., Wakelin, P.O. 1964. A case of human protothecosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 58, 448-451.

de Vargas, A.C., Lazzari, A., Santurio, J.M., Alves, S.H., Ferreira, G., Kreutz, L.C. 1998. Isolation of *Prototheca zopfii* from a case of bovine mastitis in Brazil. *Mycopathologia* 142, 135-137.

Dillberger, J.E., Homer, B., Daubert, D., Altman, N.H. 1988. Protothecosis in two cats. *Journal of American Veterinary Medical Association* 192, 1557-1559.

El-Ani, A.S. 1967. Life cycle and variation of *Prototheca wickerhamii*. *Science* 156, 1501-1503.

Enders, F., and Weber, A. 1993. The occurrence of *Prototheca* in fecal samples of cattle. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 106, 165-169 (in German).

Endo, S., Sekiguchi, M., Kishimoto, Y., Kano, R., Aoki, S., Sichinohe, T., Hasegawa, A. 2010. The First Case of Feline *Prototheca wickerhamii* Infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 72, 1351-1353.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Finnie, J.W., and Coloe, P.J. 1981. Cutaneous protothecosis in a cat. *Australian*

Veterinary Journal 57, 307-308.

Font, R.L., and Hook, S.R. 1984. Metastatic protothecal retinitis in a dog. Electron microscopic observations. *Veterinary Pathology* 21, 61-66.

Ginel, P.J., Perez, J., Molleda, J.M., Lucena, R., Mozos, E. 1997. Cutaneous protothecosis in a dog. *Veterinary Record* 140, 651-653.

Gentles, J.C., and Bond, P.M. 1977. Protothecosis of Atlantic salmon. *Sabouraudia* 15, 133-139.

Gerken, H.G., Donohoe, B., Knoshaug, E.P. 2013. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta* 237, 239-253.

Hirose, N., Nishimura, K., Inoue-Sakamoto, M., Masuda, M. 2013. Ribosomal Internal Transcribed Spacer of *Prototheca wickerhamii* Has Characteristic Structure Useful for Identification and Genotyping. *PLOS ONE* 8, e81223.

Hosaka, S., and Hosaka, M. 2004. A case report of canine protothecosis. *Journal of Veterinary Medical Science* 66, 593-597.

Huss, V.A.R., and Sogin, M.L. 1990. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* 31, 432-442.

Iacoviello, V.R., DeGirolami, P.C., Lucarini, J., Williams, M.E., Wanke, C.A. 1992. Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation: case report and literature review. *Clinical Infectious Disease* 15, 959-967.

Ikeda, T., and Ghoma, M. 2001. Protothecosis in animals. *The Japanese Journal of Veterinary Dermatology* 8, 23-32 (in Japanese).

Ito, T., Kano, R., Sobukawa, H., Ogawa, J., Honda, Y., Hosoi, Y., Shibuya, H., Sato, T., Hasegawa, A., Kamata, H. 2011. Experimental Infection of Bovine Mammary Gland with *Prototheca zopfii* Genotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 73, 117-119.

Jagielski, T., Lassa, H., Ahrholdt, J., Malinowski, E., Roesler, U. 2011. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Veterinary Microbiology* 149, 283-287.

Jensen, H.E., Aalbaek, B., Bloch, B., Huda, A. 1998. Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca zopfii*. *Medical Mycology* 36, 89-95.

Kano, R., Sobukawa, H., Suzuki, M., Hiruma, M., Shibuya, K., Hasegawa, A., Kamata, H. 2014. Immunohistopathology of *Prototheca wickerhamii* in cutaneous lesions of protothecosis. *Medical Mycology Journal* 55, E29-E32.

Kaplan, W., Chandler, F.W., Holzinger, E.A., Plue, R.E., Dickinson, R.O. 3rd. 1976. Protothecosis in a cat: first recorded case. *Sabouraudia* 14, 281-286.

Kerstens, M., Boulet, G., Pintelon, I., Hellings, M., Voeten, L., Delputte, P., Maes, L., Cos, P. 2013. Quantification of *Candida albicans* by flow cytometry using TO-PRO[®]-3 iodide as a single-stain viability dye. *Journal of Microbiological Methods* 92, 189-191.

Kim, S.T., Suh, K.S., Chae, Y.S., Kim, Y.J. 1996. Successful treatment with fluconazole of protothecosis developing at the site of an intralesional corticosteroid injection. *The British Journal of Dermatology* 135, 803-806.

King, D.S., and Jong, S.C. 1975. *Sarcinosporon*: a new genus to accommodate *Trichosporon inkin* and *Prototheca filamentosa*. *Mycotaxon* 3, 84-94.

Kishimoto, Y., Kano, R., Maruyama, H., Onozaki, M., Makimura, K., Ito, T., Matsubara, K., Hasegawa, A., Kamata, H. 2010. 26S rDNA-based phylogenetic investigation of Japanese cattle-associated *Prototheca zopfii* isolates. *Journal of*

Veterinary Medical Science 72, 123-126.

Koenig, D.W., and Ward, H.B. 1984. Growth of *Prototheca zopfii* Krüger on crude-oil as a function of pH, temperature, and salinity. Systematic and Applied Microbiology 5, 119-123.

Krüger, W. 1894. Kurze Charakteristik einiger niedriger Organismen im Saftfluss der Laubbäume. Hedwigia 33, 241-266 (in German).

Kurtzman, C.P., and Robnett, C.J. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. Journal of Clinical Microbiology 35, 1216-1223.

Lassa, H., Jagielski, T., Malinowski, E. 2011. Effect of different heat treatments and disinfectants on the survival of *Prototheca zopfii*. Mycopathologia 171, 177-182.

Lass-Flörl, C., Fille, M., Gunsilius, E., Gastl, G., Nachbaur, D. 2004. Disseminated Infection with *Prototheca zopfii* after Unrelated Stem Cell Transplantation for Leukemia. Journal of Clinical Microbiology 42, 4907-4908.

Lass-Flörl, C., and Mayr, A. 2007. Human protothecosis. Clinical Microbiology Review 20, 230-242.

Leimann, B.C., Monterio, P.C., Lazéra, M., Candanoza, E.R., Wanke, B. 2004. Protothecosis. *Medical Mycolgy* 42, 106.

Lerche, M. Mastitis in a cow caused by an algae (*Prototheca*). 1952. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 4, 64-69 (in German).

Lloyd, D., and Turner, G. 1968. The Cell Wall of *Prototheca zopfii*. *Journal of General Microbiology* 50, 421-427.

Mancera, N., Douma, L.G. James, S., Liu, S., Van, A., Boucias, D.G. Tartar, A. 2012. Detection of *Helicosporidium* spp. in metagenomic DNA. *Journal of Invertebrate Pathology* 111, 13-19.

Marques, S., Silva, E., Kraft, C., Carvalheira, J., Videira, A., Huss, V.A.R., Thompson, G. 2008. Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1941-1945.

McDonald, J.S., Richard, J.L., Anderson, A.J. 1984. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. *American Journal of Veterinary Research* 45, 1079-1080.

Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71, 491-499.

Melville, P.A., Benites, N.R., Sinhorini, I.L., da Costa, E.O. 2002. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to cooper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. *Mycopathologia* 156, 1-7.

Mettler, F. 1975. Generalized protothecosis in a fruit bat (*Pteropus lylei*). *Veterinary Pathology* 12, 118-124 (in German).

Mohabeer, A.J., Kaplan, P.J., Southern, P.M. Jr., Gander, R.M. 1997. Algaemia Due to *Prototheca wickerhamii* in Patient with Myasthenia Gravis. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 3305-3307.

Möller, A., Truyen, U., Roesler, U. 2007. *Prototheca zopfii* genotype 2-The causative agent of bovine protothecal mastitis? *Veterinary Microbiology* 120, 370-374.

Murugaiyan, J., Weise, C., von Bergen, M., Roesler, U. 2013. Two-dimensional proteome reference map of *Prototheca zopfii* revealed reduced metabolism and enhanced signal transduction as adaptation to an infectious life style. *Proteomics* 13, 2664-2669.

Nadakavukaren, M.J., and McCracken, D.A. 1973. *Prototheca*: an alga or fungus? *Journal of Phycology* 9, 113-116.

Nadakavukaren, M.J., and McCracken, D.A. 1977. An ultrastructural survey of the genus *Prototheca* with special reference to plastids. *Mycopathologia* 61, 117-119.

O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. (Eds.). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. CAB International, Wallingford, pp. 225-233.

Okuyama, Y., Hamaguchi, T., Teramoto, T., Takiuchi, I. 2001. A Human Case of Protothecosis Successfully Treated with Itraconazole. *Japanese Journal of Medical Mycology* 42, 143-147.

Onozaki, M., Makimura, K., Satoh, K., Hasegawa, A. 2013. Detection and Identification of Genotypes of *Prototheca zopfii* in Clinical Samples by Quantitative PCR Analysis. *Japanese Journal of Infectious Disease* 66, 383-390.

Osumi, M., Yamada, N., Yaguchi, H., Kobori, H., Nagatani, T., Sato, M. 1995. Ultrahigh-resolution low-voltage SEM reveals ultrastructure of the glucan network formation fission yeast protoplast. *Journal of Electron Microscopy* 44, 198-206.

Osumi, M. 2012. Visualization of yeast cells by electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 61, 343-365.

Osumi, T., Kishimoto, Y., Kano, R., Maruyama, H., Onozaki, M., Makimura, K., Ito, T., Matsubara, K., Hasegawa, A. 2008. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Veterinary Microbiology* 131, 419-423.

Panti, N.J., and Aaronson, S. 1974. The Nutrition, Resistance to Antibiotics and Ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. *Journal of General Microbiology* 83, 179-182.

Pérez, J., Ginel, P.J., Lucena, R., Hervás, J., Mozos, E. 1997. Canine cutaneous protothecosis: an immunohistochemical analysis of the inflammatory cellular infiltrate. *Journal of Comparative Pathology* 117, 83-89.

Phair, J.P., Williams, J.E., Bassaris, H.P., Zeiss, C.R., Moriock, B.A. 1981. Phagocytosis and Algicidal Activity of Human Polymorphonuclear Neutrophils Against *Prototheca wickerhamii*. *The Journal of Infectious Diseases* 144, 72-76.

Pieper, L., Godkin, A., Roesler, U., Polleichtner, A., Slavic, D., Leslie, K.E., Kelton,

D.F. 2012. Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. *Journal of Dairy Science* 95, 5635-5644.

Piyopirapong, S., Linpiyawan, R., Mahaisavariya, P., Muanprasat, C., Chaiprasert, A., Suthipinittharm, P. 2002. Cutaneous protothecosis in an AIDS patient. *British Journal of Dermatology* 146, 713-715.

Pore, R.S. 1973. Selective Medium for the Isolation of *Prototheca*. *Applied Microbiology* 26, 648-649.

Pore, R.S., D'Amato R.F., Ajello, L. 1977. *Fissuricella* gen. nov. : a new taxon for *Prototheca filamenta*. *Sabouraudia* 15, 69-78.

Pore, R.S. 1985. *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia* 90, 129-139.

Pore, R.S., Shahan, T.A., Pore, M.D., Blauwiekel, R. 1987. Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. *Veterinary Microbiology* 15, 315-323.

Pore, R.S., and Shahan, T.A. 1988. *Prototheca zopfii*: natural, transient, occurrence in pigs and rats. *Mycopathologia* 101, 85-88.

Pore, R.S. 2011. *Prototheca* Krüger (1894). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T.

(Eds.). *The Yeast, A Taxonomic Study*, 5th edition, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 2071-2080.

Ricchi, M., Goretti, M., Branda, E., Cammi, G., Garbarino, C.A., Turchetti, B., Moroni, P., Arrigoni, N., Buzzini, P. 2010. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. *Journal of Dairy Science* 93, 4625-4631.

Ricchi, M., Cammi, G., Garbarino, C.A., Buzzini, P., Belletti, G.L., Arrigoni, N. 2011. A rapid real-time PCR/DNA resolution melting method to identify *Prototheca* species. *Journal of Applied Microbiology* 110, 27-34.

Ricchi, M., De Cicco, C., Buzzini, P., Cammi, G., Arrigoni, N., Cammi, M., Garbarino, C. 2013. First outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca blaschkeae*. *Veterinary Microbiology* 162, 997-999.

Ribeiro, M.G., Rodrigues de Farias, M., Roesler, U., Roth, K., Rodigheri, S.M., Ostrowsky, M.A., Salerno, T., Siqueira, A.K., Fernandes, M.C. 2009. Phenotypic and genotypic characterization of *Prototheca zopfii* in a dog with enteric signs. *Research in Veterinary Science* 87, 479-481.

Roesler, U., Scholz, H., Hensel, A. 2001. Immunodiagnostic Identification of Dairy Cows Infected *Prototheca zopfii* at Various Clinical Stages and Discrimination between

Infected and Uninfected Cows. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 539-543.

Roesler, U., and Hensel, A. 2003. Longitudinal Analysis of *Prototheca zopfii*-Specific Immune Responses: Correlation with Disease Progression and Carriage in Dairy Cows. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1181-1186.

Roesler, U., Scholz, H., Hensel, A. 2003. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 53, 1195-1199.

Roesler, U., Möller, A., Hensel, A., Baumann, D., Truyen, U. 2006. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blashkeae* sp. nov. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 56, 1419-1425.

Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.

Salerno, T., Ribeiro, M.G., Langoni, H., Siqueira, A.K., da Costa, E.O., Melville, P.A., Bueno, V.F.F., Yamamura, A.A.M., Roesler, U., da Silva, A.V. 2010. In vitro algacide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. *Research in Veterinary Science* 88, 211-213.

Satoh, K., Ooe, K., Nagayama, H., Makimura, K. 2010. *Prototheca cutis* sp. Nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology 60, 1236-1240.

Scaccabarozzi, L., Turchetti, B, Buzzini, P., Pisoni, G., Bertocchi, L., Arrigoni, N., Boettcher, P., Bronzo, V., Moroni, P. 2008. Short communication: isolation of *Prototheca* species strains from environmental sources in dairy herds. Journal of Dairy Science 91, 3474-3477.

Segal, E., Padhye, A.A., Ajello, L. 1976. Susceptibility of *Prototheca* species to Antifungal Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 10, 75-79.

Shahan, T.A., and Pore, R.S. 1991. *In vitro* susceptibility of *Prototheca* spp. to gentamicin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 35, 2434-2435.

Spalton, D.E. 1985. Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: a case study. Veterinary Record 116, 347-349.

Stenner, V.J., Mackay, B., King, T., Barrs, V.R., Irwin, P., Abraham, L., Swift, N., Langer, N., Bernays, M., Hampson, E., Martin, P., Krockenberger, M.B., Bosward, K., Malik, R. 2007. Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine

literature. *Medical Mycology* 45, 65-71.

Sudman, M.S., and Kaplan, W. 1973. Identification of the *Prototheca* species by immunofluorescence. *Applied Microbiology* 25, 981-990.

Suzuki, T., Yamaguchi, T., Ishida, M. 1997. Short communication: Effects of some factors on protoplast formation of a microalgae, *Prototheca zopfii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13, 355-356.

Takano, M., Hoshi, S., Nagai, K., Ishidaira, H., Onozaki, M., Satoh, K., Makimura, K. 2014. The first case of human protothecosis caused by *Prototheca zopfii* in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20, 647-649.

Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Science* 101, 11030-11035.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.

Thompson, G., Silva, E., Marques, S., Müller, A., Carvalheira, J. 2009. Algaemia in a daily cow by *Prototheca blaschkeae*. *Medical Mycology* 47, 527-531.

Todd, J.R., King, J.W., Oberle, A., Matsumoto, T., Odaka, Y., Fowler, M., Pore, R.S., Shahan, T.A., Yin, L., Sanusi, I.D. 2012. Protothecosis: report of a case with follow-up, and review of previously published cases. *Medical Mycology* 50, 673-689.

Tsuji, H., Kano, R., Hirai, A., Makimura, K., Yanai, T., Namihira, Y., Chiba, J., Hasegawa, A. 2006. An isolate of *Prototheca wickerhamii* from systemic canine protothecosis. *Veterinary Microbiology* 118, 305-311.

Ueno, R., Urano, N., Wada, S., Kimura, S. 2002. Optimization of Heterotrophic Culture Condition for *n*-Alkane Utilization and Phylogenetic Position Based on 18S rDNA Sequence of a Thermotolerant *Prototheca zopfii* Strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94, 160-165.

Ueno, R., Urano, N., Suzuki, M., Kimura, S. 2002. Isolation, characterization, and

fermentative pattern of a novel thermotolerant *Prototheca zopfii* var. *hydrocarbonea* strain producing ethanol and CO₂ from glucose at 40 °C. Archives of Microbiology 177, 244-250.

Ueno, R., Urano, N., Suzuki, M. 2003. Phylogeny of the non-photosynthetic green micro-algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and related taxa inferred from SSU and LSU ribosomal DNA partial sequence data. FEMS Microbiology Letters 223, 275-280.

Ueno, R., Hanagata, N., Urano, N., Suzuki, M. 2005. Molecular phylogeny and phenotypic variation in the heterotrophic green algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). Journal of Phycology 41, 1268-1280.

Ueno, R., Huss, V.A.R., Urano, N., Watabe, S. 2007. Direct evidence for redundant segmental replacement between multiple 18S rRNA genes in a single *Prototheca* strain. Microbiology 153, 3879-3893.

Ueno, R. 2009. Visualization of sporopollenin-containing pathogenic green micro-alga *Prototheca wickerhamii* by fluorescent in situ hybridization (FISH). Canadian Journal of Microbiology 55, 465-472.

von Bergen, M., Eidner, A., Schmidt, F., Murugaiyan, J., Wirth, H., Binder, Hans., Maier, Thomas., Roesler, U. 2009. Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS. *Proteomics Clinical Applications* 3, 774-784.

Vorisek, K., and Kocková-Kratochvillová, A. 1975. Ultrastructural distribution of polysaccharides in *Prototheca hydrocarbonica*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 15, 203-209. (in German).

Walker, J.D., and Pore, R.S. 1978. Growth of *Prototheca* isolates on *n*-hexadecane and mixed-hydrocarbon substrate. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 694-697.

Wayne, P.A. 2002. NCCLS; National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, National Committee for Clinical and Laboratory Standards.

Zak, I., Jagielski, T., Kwiatkowski, S., Bielecki, J. 2012. *Prototheca wickerhamii* as a cause of neuroinfection in a child with congenital hydrocephalus. First case of human protothecosis in Poland. *Diagnosis Microbiology and Infectious Disease* 74, 186-189.

Zhao, J., Liu, W., Lv, G., Shen, Y., Wu, S. 2004. Protothecosis successfully treated with amikacin combined with tetracyclines. *Mycoses* 47, 156-158.