

[症例報告]

Prototheca wickerhamii による菌血症の1例

西村恵子¹⁾・大楠清文²⁾

¹⁾ NHO 岡山医療センター臨床検査科

²⁾ 東京医科大学微生物学講座

(令和元年6月4日受付, 令和元年10月2日受理)

プロトテカ (*Prototheca*) はクロレラ科の1属であるが, 例外的に葉緑素を持たない微細藻類で世界中の土壌や汚水中に広く分布し, 時に動物に感染して人獣共通感染症であるプロトテカ症を引き起こす。プロトテカ症を引き起こす病原体として *P. wickerhamii* や *P. zopfi* 等が知られているが, ヒトへの感染は稀であると言われている。今回, *Prototheca wickerhamii* による菌血症の症例を経験した。症例は, 70歳代の女性。慢性関節リウマチにて加療中に全身状態の悪化を認め, 当院に救急搬送, 入院となった。入院32日目に提出された血液培養が培養7日目に陽性となり, グラム染色でグラム陽性の大小不同, 球形の酵母に類似した胞子嚢を認めた。羊血液寒天培地, 真菌用培地ではカンジダ様のコロニーを形成し, 菌株は VITEK (YBC カード) にて *Prototheca wickerhamii* と同定された。また, 16SrDNA 塩基配列による解析でも同様の結果であった。

Key words: *Prototheca wickerhamii*, 緑藻, 人獣共通感染症

序 文

Prototheca 属は, *Chlorophyta* (緑色植物門), *Trebouxiophyceae* (トレボウキシア藻綱), *Chlorellaceae* (クロレラ科) の1属で, *P. zopfi*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. miyajii*¹⁾等7種以上が認められている。1894年にニレ樹液からの分離株に基づいて創設された属で, *P. zopfi* がタイプ種である²⁾。*P. wickerhamii* は, アメリカのイリノイ州でトイレ排水から分離された酵母様株に由来し, 1959年に椿啓介と曾根田正己により新種として記載された³⁾。生息域はニレ, 菩提樹などの樹液, 湖沼水, 河川水, 下水, 土壌, 畜産環境などで, 時に動物に感染して人獣共通感染症であるプロトテカ症を引き起こす⁴⁾。今回, 血液培養より *P. wickerhamii* を分離した症例を経験したので報告する。

症 例

患者は70歳代, 女性。慢性関節リウマチにて加療中, 呼吸困難のため近医に入院となるが, 心不全, 意識レベルの低下, 肺水腫などの増悪を認め当院に救急搬送された。入院時の体温36.7℃, SpO₂ 88%, 血圧76/28 mmHg, 呼吸数14回/分, 血液検査所見を Table 1 に示した。心不全に対する治療が開始され, 慢性関節リウマチに対しては継続してプレドニ

ン10 mg/day が退院時まで使用された。また, 手背から前腕に潰瘍, 下腿に蜂窩織炎を認め, これに対し治療を行った。入院8日目に38.3℃の発熱があり, *Escherichia coli* による尿路感染症, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) による菌血症を引き起こしており, Ceftazidime (CAZ) 2 g/day, Vancomycin (VCM) 1 g/day による治療が開始された (Figure 1)。その後, 改善傾向を認めていたが, 入院32日目, 再び38.3℃の発熱を認め, 血液培養, 喀痰培養, 画像検査が施行された。喀痰培養では *C. albicans* が少量検出されたのみであるが, 血液培養が培養7日目に陽性となり, 鏡検したところ酵母様のグラム染色像であった。また, 肺のCT画像所見では両肺多発空洞陰影が認められ (Figure 2), 血清クリプトコッカス・ネオフォルマンズ抗原陰性, β-D グルカン 8.4 pg/mL で, 血清アスペルギルス抗原は1.3 (基準値: 0.5 未満 陰性) ではあるが, *Aspergillus* 属が多発空洞陰影を呈する可能性は低く, *Aspergillus* 属や *Cryptococcus* 属以外の真菌感染が疑われ, Micafungin (MCFG) 75 mg/day を9日間投与された。しかし, 血液培養から分離された *P. wickerhamii* の薬剤感受性検査の結果が判明してからは, Liposomal Amphotericin-B (L-AMB) 100 mg/day に変更し, 10日間投与された。血液検査ではサイトメガロウイルス抗原が陽性となり, 抗ウイルス薬 Ganciclovir が投与された。その後, 抗真菌薬・抗ウイルス薬を中止した後も感染の悪化はなく, 全身状態の改善を認めたため, 入院104日目, 近医に転院された。

微生物学的検査

入院32日目に血液培養1セットが提出され, 培養7日目, 血液培養ボトル BacT/ALERT 3D (バイオメリュウ) の好気

著者連絡先: (〒701-1192) 岡山県岡山市北区田益 1711-1
NHO 岡山医療センター臨床検査科
西村恵子
TEL: 086-294-9911
FAX: 086-294-9255
E-mail: nishimura.keiko.mv@mail.hosp.go.jp

Table 1. 入院時検査所見

血液		生化学			
WBC	5600 / μ L	AST	22 U/L	BUN	22 mg/dL
RBC	450×10^4 / μ L	ALT	20 U/L	CRE	0.78 mg/dL
Hb	13.5 g/dL	ALP	410 U/L	UA	15.3 mg/dL
Ht	39.9 %	LDH	372 U/L	TP	4.9 g/dL
PLT	9.5×10^4 / μ L	LAP	101 U/L	ALB	3.1 g/dL
		γ -GTP	343 U/L	Na	131 mmol/L
		CK	56 U/L	K	4.0 mmol/L
		CK-MB	20 U/L	CL	90 mmol/L
		Mb	186 ng/mL	Ca	8.6 mg/dL
		Fe	44 μ g/dL	IP	3.3 mg/dL
		CRP	0.35 mg/dL	Mg	1.7 mg/dL

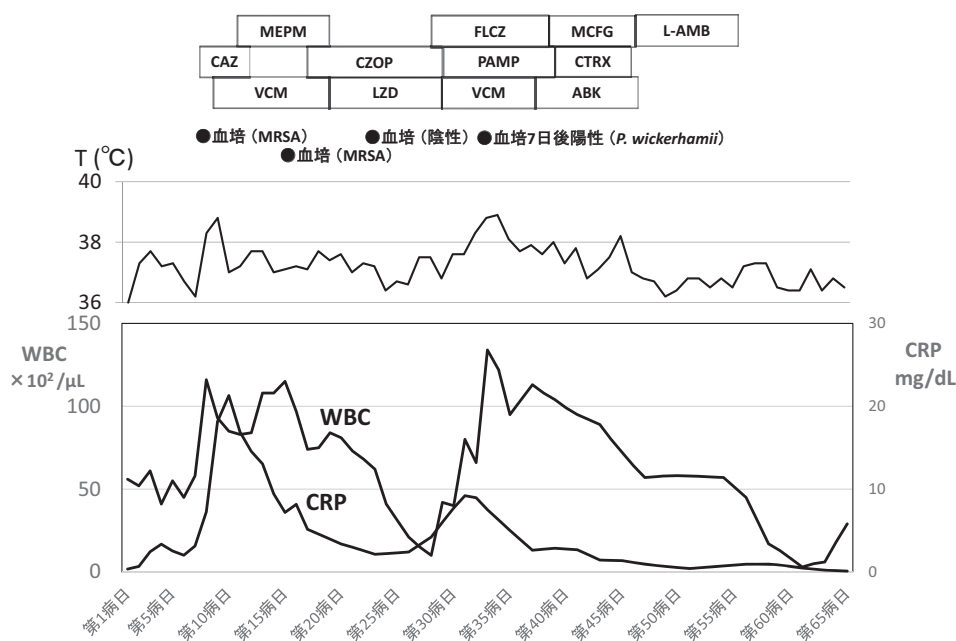


Figure 1. 臨床経過

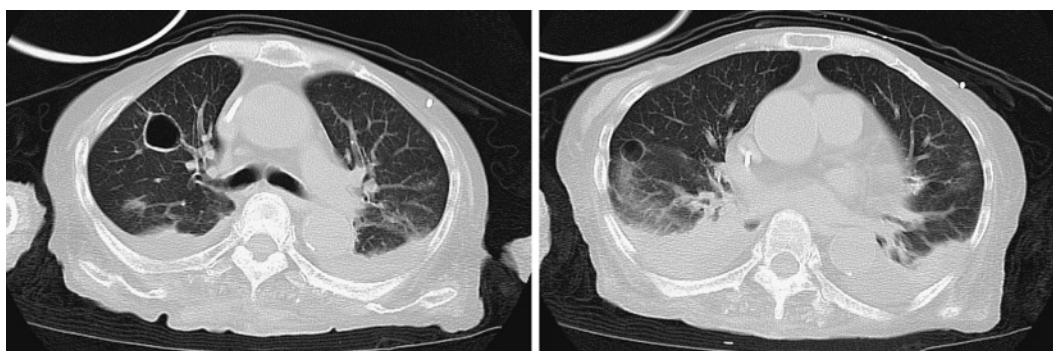


Figure 2. 入院32日目の胸部画像所見

ボトルのみ陽性となった。

塗抹検査：培養液のグラム染色所見 (Figure 3) では、グラム陽性、大小不同の球形であり、酵母に類似した胞子嚢を認めた。酵母様ではあるが、経験したことのない形状で酵母

ではない可能性もあることを医師に伝えた。

培養・同定検査：トリプチケースソイ 5% ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン), クロモアガーカンジダ寒天培地 (関東化学), サブローデキストロース寒天培

地(日本ベクトン・ディッキンソン)に培養液を接種し、30℃と35℃、好気培養したところ、どちらの温度でも培養1日目に発育は認められず、培養2日目に微小なコロニーを形成し(Figure 4)、培養3日目に白色のカンジダ様のコロニーを形成した(Figure 5)。また、サブローデキストロース寒天培地よりもクロモアガーカンジダ寒天培地の方が発育良好であり、培養4日目、クロモアガーカンジダ寒天培地上のコ

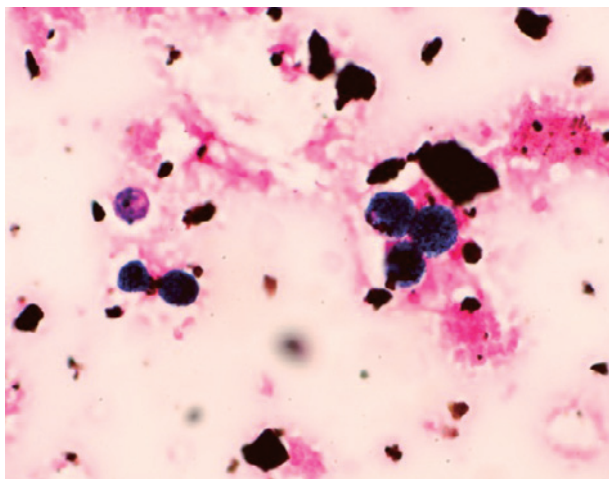


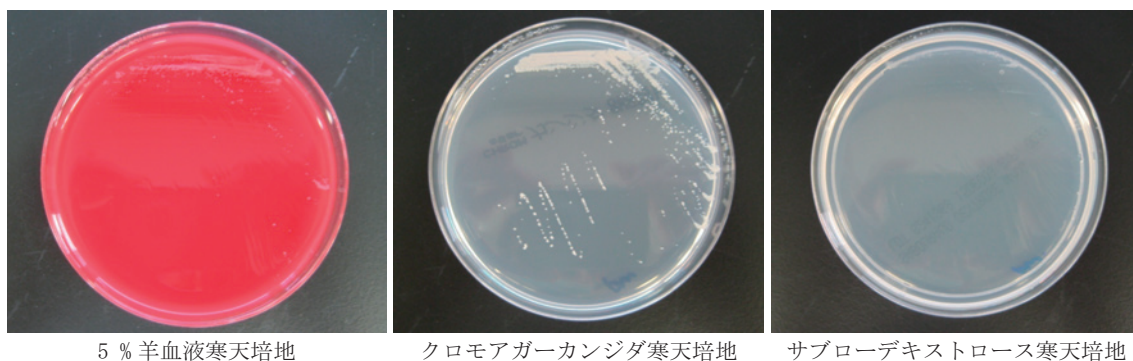
Figure 3. 血液培養のグラム染色所見

ロニーは薄ピンク～薄紫色を帯びていた(Figure 6)。菌株は、VITEK YBCカード(ビオメリュー)にて *P. wickerhamii* と同定された。また、遺伝子解析においても、色素体(plastid: chloroplast)の16SrDNAの塩基配列の相同性が99.8%一致していた。コロニーからのグラム染色(Figure 7)を確認後、ラクトフェノールコットンブルー染色(Figure 8)を観察すると、胞子嚢内部で胞子嚢胞子がひな菊状に配列しているのを確認することができた。

薬剤感受性検査: 薬剤感受性検査はASTY(極東製薬)により行った。Amphotericin-B (AMPH-B), Itraconazole (ITCZ), Voriconazole (VRCZ) に低いMIC値を示したが、Fluconazole (FLCZ), MCFG, 5-Fluorocytosine (5-FC) には高いMIC値を示した(Table 2)。

考 察

Prototheca 属はクロレラと同様の増殖形式(Figure 9)で、光合成をしないこと以外、生活環は同じである。菌種により細胞や胞子嚢の大きさ・形などに違いはある⁵⁾⁶⁾が、*P. wickerhamii* の細胞は球形、直径7-13 μm⁵⁾である。単一細胞が袋状に膨らみ胞子嚢になり、内部で2分裂、4分裂、8分裂と分裂を繰り返し細胞(胞子嚢胞子)が増殖し、内部の細胞はロゼット状、或いはひな菊の花弁状に配列、桑の実状になる。やがて胞子嚢胞子には固有の壁が生じ、胞子嚢は破れて胞子嚢胞子は遊離し、同じサイクルを繰り返す⁵⁾。血液培養のグ

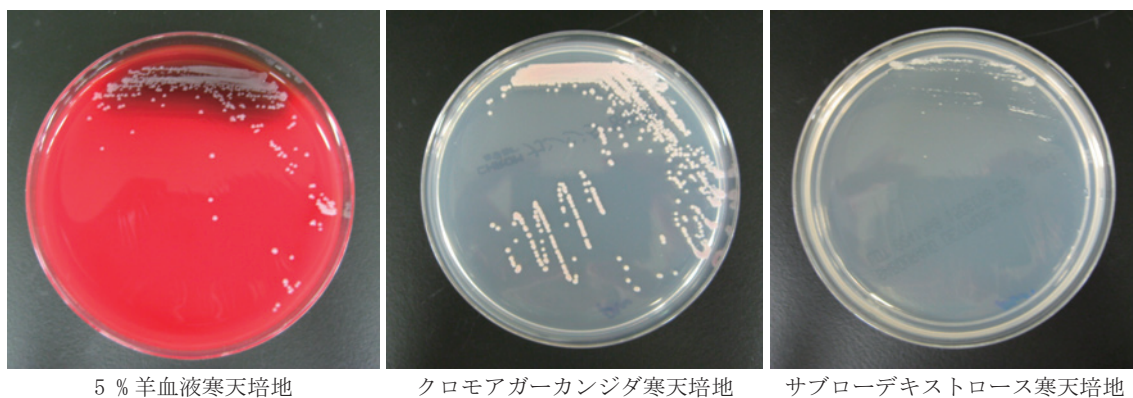


5% 羊血液寒天培地

クロモアガーカンジダ寒天培地

サブローデキストロース寒天培地

Figure 4. 30℃培養2日目のコロニー所見



5% 羊血液寒天培地

クロモアガーカンジダ寒天培地

サブローデキストロース寒天培地

Figure 5. 30℃培養3日目のコロニー所見



5 % 羊血液寒天培地

クロモアガーカンジダ寒天培地

サブローデキストロース寒天培地

Figure 6. 30℃培養4日目のコロニー所見

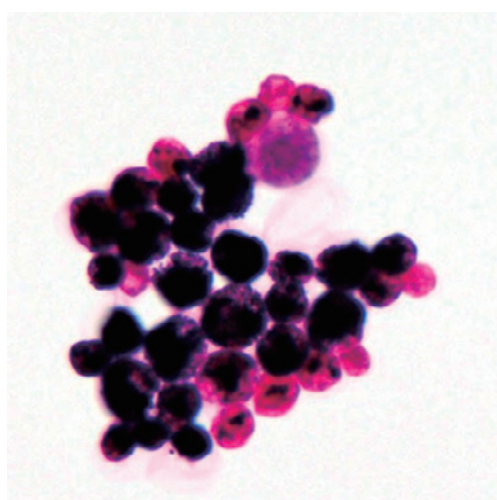


Figure 7. コロニーのグラム染色所見

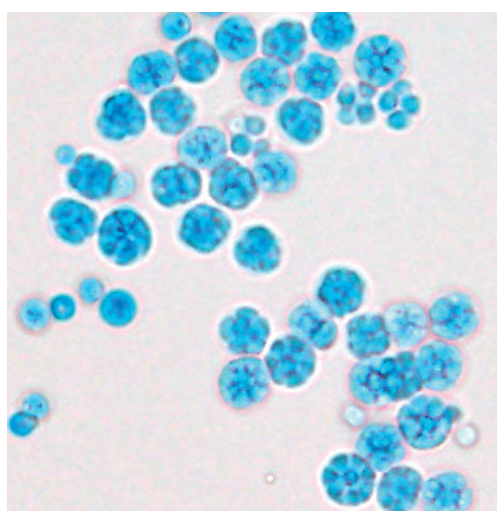


Figure 8. ラクトフェノールコットンブルー染色所見

ラム染色所見が大小不同の球形であったのは、胞子嚢胞子と胞子嚢が観察されていたためであると思われる。また、よく観察するとグラム染色でも内部の配列を確認することができ

Table 2. *P. wickerhamii* の薬剤感受性結果

抗真菌薬	MIC (μg/mL)
Amphotericin-B (AMPH-B)	0.25
5-Fluorocytosine (5-FC)	>64
Fluconazole (FLCZ)	>64
Itraconazole (ITCZ)	1
Miconazole (MCZ)	4
Micafungin (MCFG)	>16
Voriconazole (VRCZ)	0.5

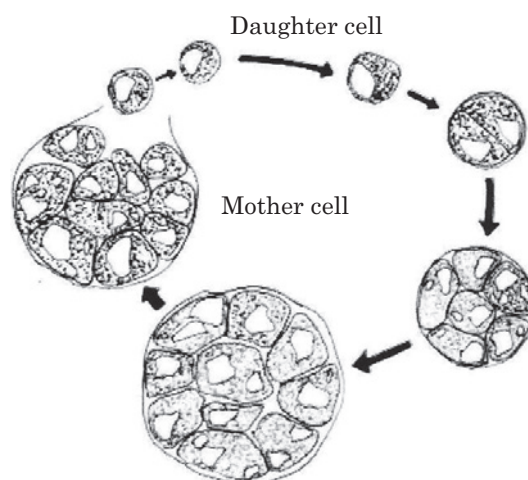


Figure 9. プロトテカの生活環

(池田輝雄, 郷間雅之. 2002. 動物のプロトテカ症. 獣医臨床皮膚科 8 : 23-32 より引用改変)

たが、コロニーをラクトフェノールコットンブルー染色液で染色すると胞子嚢内の胞子嚢胞子の配列が分かりやすくなり、同定の一助となると思われた。

培養検査においては *Prototheca* 属の代表的な7菌種は血液寒天培地や真菌用の培地で発育すると言われている^{5)~7)}。今回使用したトリプチケースソイ5%ヒツジ血液寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン)、サブローデキストロース寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン)、クロモアガーカンジダ寒天培地(関東化学)では、何れの培地にも30℃及

Table 3. Key for *Prototheca* differentiation
Clin Microbiol Rev. 2007 Apr; 20 (2): 230-242 より引用一部改変

	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. zopffii</i>	<i>P. blaschkeae</i>	<i>P. stagnora</i>
Colony morphology	Hemispheric, with smooth margin	Flat, rough, central button, corrugated margin	Flat, smooth, central button, corrugated margin	Flat, with smooth margin
Diameter of cells (μm)	3-10	7-30		7-14
Glycerol assimilation	+	+	-	+
Trehalose	+	-	-	-
n-Propanol	-	+	-	-
Arginine	+	+	-	+
Growth at 37°C	+	+	+	-
Capsule	-	-	-	+

Table 4. Reported case of protothecosis (septicemia) in Japan as of February 2017
Journal of Dermatology 2018; 45: 67-71 より引用 (一部改変)

No.	First author, year	Geographic location	Age/sex	Species	Underlying disease	Treatment	Outcome
1	Matsuda T., 1991	Fukuoka	13/M	<i>P. wickerhamii</i>	Anemia	AMPH-B	Death
2	Miura K., 2005	Hiroshima	65/M	<i>P. miyajii</i>	Nephrotic syndrome	ITCZ → FLCZ	Death
3	Nishimura K., 2008	Okayama	70/F	<i>P. wickerhamii</i>	Rheumatoid arthritis	AMPH-B	Cure
4	Takano M., 2014	Niigata	62/F	<i>P. zopffii</i>	Hairl cell leukemia	ITCZ	Death
5	Murata M., 2015	Fukuoka	65/F	<i>P. wickerhamii</i>	SLE	AMPH-B	Cure

び 35°C, 好気培養で良好に発育したが, サブローデキストロース寒天培地よりもクロモアガーカンジダ寒天培地の方が発育は良好であった。また, クロモアガーカンジダ寒天培地で薄ピンクから薄紫色のカンジダ様のコロニーを形成し, コロニー所見のみでは *Candida* 属と誤判定される可能性もある。グラム染色所見を確認し, *Prototheca* 属を想定して同定を進めていくことが必要であると思われた。本症例では, VITEK YBC カード (バイオメリュウ) で同定可能であったが, *P. wickerhamii* は, VITEK2 YST カード (バイオメリュウ), ID32C アピ (バイオメリュウ)⁶⁾, Rap ID Yeast Plus SYSTEM (アムコ), BD フェニックス Yeast ID (日本ベクトン・ディッキンソン), マイクロスキャン RYID パネル (ベックマン・コールター) で同定可能な菌種として記載されている。VITEK YBC カード, VITEK2 YST カード, ID32C アピ, Rap ID Yeast Plus SYSTEM, BD フェニックス Yeast ID は *P. zopffii* が同定可能な菌種として記載されている。今回は今までに経験したことのない菌種であり, 遺伝子解析を依頼した。近年では, 質量分析による同定も試みられており^{8)~10)}, 顕微鏡学的検査所見, コロニー所見, 生化学的性状や発育温度などの性状を追加すること⁵⁾⁶⁾により同定可能な菌種もある (Table 3) が, 新種の報告¹⁾もあるため, 遺伝子による解析^{11)~15)}も必要であると思われる。薬剤感受性検査に関しては, 本症例の株は AMPH-B, ITCZ, VRCZ に低い MIC 値を示したが, FLCZ, MCFG, 5-FC には高い MIC 値を示した。患者には FLCZ, MCFG が使用されていたが, 薬剤感受性検査の結果が判明してからは L-AMB に変更された。プロトテカ症における治療では様々な方法が報告されている⁶⁾¹⁶⁾¹⁷⁾が, AMPH-B, ITCZ, FLCZ が多く使用されている。本症例は, L-AMB 変更後より症状が改善し, その後転院した。ヒトのプロトテカ症は皮膚・皮下型, 関節囊炎, 内臓及び全身型の

三つに分けられる⁶⁾。皮膚・皮下型は紅色丘疹・結節の形成, 水疱・潰瘍を伴う場合や, 蜂窩織炎様となる事もある。関節囊炎は肘関節囊炎や膝関節囊炎が報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。内臓及び全身型は, 単一臓器の場合もあるが, 皮膚・呼吸器・消化器を侵入門戸として血流感染, 更に多臓器に播種し, 死亡例もある。*Prototheca* 属の病原性は弱く, プロトテカ症の多くは血液疾患・悪性腫瘍・糖尿病・自己免疫疾患など免疫抑制下にある患者がほとんどである。本症例は基礎疾患に慢性関節リウマチがあり, ステロイドの使用もあった。免疫抑制下にある患者で, 真菌症が考えられる場合, プロトテカ症も鑑別疾患にあげる必要があると考えられた。また, 当院に入院する以前から手背や前腕に潰瘍, 下腿に蜂窩織炎があり, 皮膚が侵入門戸であった可能性も考えられるが, 入院以前の水や植物, 動物との曝露歴は聴取できていない。入院後 32 日目の発症で, 血管内カテーテルなどのデバイス類も使用されていることから, カテーテル関連の感染も考えられるが, *Prototheca* 属の生息場所は湖沼水, 河川水, 下水, 畜産環境, 土壌などであり, 病院の環境に存在する可能性は低く, 当院でこの症例以外現在までに検出されたことはない。また, 肺の画像所見では両肺多発空洞陰影が認められ, 真菌感染症が疑われたが起病菌は不明であり, *Prototheca* 属が原因であった可能性も否定できないと思われる。プロトテカ症で報告されている症例の多くは皮膚・皮下型である¹⁷⁾。本症例は血流感染であり, 症例数も少なく (Table 4) 救命しえた貴重な症例と考えられ報告した。

本症例の要旨は第 20 回日本臨床微生物学会総会・学術集会において発表した。

利益相反: なし

文 献

- 1) Matsuda, M., N. Hirose., T. Ishikawa., et al. 2016. *Prototheca miyaji* sp.nov., isolated from a patient with systemic protothecosis. Int J Syst Evol Microbiol 66: 1510-1520.
- 2) Krüger., W. 1894. Kurze Charakteristik einiger niederer Organismen im Safflusse der Laubbäume. Hedwigia 33: 241-266.
- 3) Tsubaki, K., M. Soneda. 1959. Cultural and taxonomic studies on *Prototheca*. Mycolog J Nagao Institute 6: 25-34.
- 4) 池田輝雄, 郷間雅之. 2002. 動物のプロトテカ症. 獣医臨床皮膚科 8: 23-32.
- 5) 西村和子. 2014. プロトテカ属とプロトテカ症. p. 7-26, 千葉大学ベンチャーファーストラボラトリーズ 9年間の研究および活動の軌跡.
- 6) Lass-Flörl, C., A. Mary. 2007. Human protothecosis. Clin Microbiol Rev 20: 230-242.
- 7) Casal, M., MJ Linares., F. Solis., et al. 1997. Appearance of colonies of *Prototheca* on CHROMagar Candida medium. Mycopathologia 56: 9-13.
- 8) Von Bergen., M., A. Eidner., F. Schmidt., et al. 2009. Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS. Proteomics Clin Appl 3: 774-784.
- 9) Murugaiyan., J., J. Ahrholdt., V. Kowbel., et al. 2012. Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. Clin Microbiol Infect 18: 461-467.
- 10) Wirth., H., M. von Bergen., J. Murugaiyan., et al. 2012. MALDI-typing of infectious algae of the genus *Prototheca* using SOM portraits. J Microbiol Meth 88: 83-97.
- 11) Ueno., R., N. Urano., M. Suzuki. 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 Microbiol Let 223: 275-280.
- 12) Tsuji., H., R. Kano., A. Hirai., et al. 2006. An isolate of *Prototheca wickerhamii* from systemic canine protothecosis. Vet Microbiol 118: 305-311.
- 13) Ueno., R., VAR. Huss., N. Urano., et al. Direct evidence for redundant segmental replacement between multiple 18 SrRNA genes in a single *Prototheca* strain. Microbiology 153: 3879-3893.
- 14) Satoh., K., K. Ooe., H. Nagayama., et al. 2010. *Prototheca cutis* sp.nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. Intnl J Syst Evol Microbiol 60: 1236-1240.
- 15) Hirose., N., K. Nishimura., M. Inoue-Sakamoto., et al. 2013. Ribosomal Internal Transcribed Spacer of *Prototheca wickerhamii* has Characteristic Structure Useful for Identification and Genotyping. Plos One 8 (11): e81223.
- 16) Todd., JR., JW. King., A. Oberle., et al. 2012. Protothecosis report of a case with 20-year follow-up, and review of previously cases. Med Mycol 50: 673-689.
- 17) Inoue., M., A. Miyashita., H. Noguchi., et al. 2018. Case report of cutaneous protothecosis caused by *Prototheca wickerhamii* designated as genotype 2 and current status of human protothecosis in Japan. Journal of Dermatology 45: 67-71.
- 18) de Montclos., M., G. Chatte., M. Perrin-Fayolle., et al. 1995. Olecranon bursitis due to *Prototheca wickerhamii*, an algal opportunistic pathogen. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14: 561-562.
- 19) Van den Bossche., D., R. de Haan., J. Van der Werff ten Bosch., et al. 2012. Case report: Infrapatellar bursitis caused by *Prototheca wickerhamii*. Med Mycol Case Reports 1: 13-16.

A case of bacteremia caused by *Prototheca wickerhamii*Keiko Nishimura¹⁾, Kiyofumi Ohkusu²⁾¹⁾Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Okayama Medical Center²⁾Department of Microbiology, Tokyo Medical University

Prototheca species are achlorophyllous algae with phylogenetic affinities to the genus *Chlorella* and are ubiquitous in nature. *Prototheca* species can be isolated from soil, sewage, and so on. Protothecosis is a zoonotic infection. *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfi* are etiological agents of human protothecosis. Human infections due to *Prototheca* species are rare. We encountered a case of bacteremia caused by *P. wickerhamii*. A 70 years old female was admitted to our hospital with worsening systemic condition. She's a chronic rheumatism, it was being treated. The blood culture has been submitted to a laboratory for the 32nd day of admission turned out to be positive in cultivation for the 7th day. Gram stain of isolates from positive blood culture showed gram-positive, big and small, irregular globular shape like a yeast. A colony like a *Candida* species were observed on sheep blood agar medium and culture medium for the fungus. A strain was identified with *Prototheca wickerhamii* in VITEK (YBC card). Even an analysis by 16SrDNA base sequence was the same result.