我国の土壤から分離したケラチン分解糸状菌

第 II 報 *Histoplasma pilicola* gen. et sp. nov. について

小 南 ミ ヨ 子

日本大学医学部皮膚科教室 (主任 三浦修教授)

私は先に日本に於て始めて *Keratinomyces ajelloi* の分離培養に成功し、これを第 I 報^{*)}として発表した。同一材料から分離し得た数種のケラチン分解菌に関して順次報告する予定であるが、今回は aleuriospore (又は tuberculate chlamydospore) を生ずる keratin 分解菌に就いて報告する。

実 験

材料の採集と菌の分離。第 I 報記載の方法に従つて上野動物園舎の表土を檢したところ、約 1 カ月後、きじ禽舎の土を入れたペトリ皿の毛髪の上に淡褐色粉状の菌塊が点々と附着し、その部で毛髪の侵蝕を肉眼的に見出したので、これを分離し、以下の検索を行つたが、培養温度は特に記する場合のほかはすべて 25°C に一定した。又色の名称はすべて Ridway⁹⁾ の Color Standard and Color Nomenclature による。

I Keratin 分解性の検定

1) 第 I 報記載の方法に従つてスライドグラスに巻きつけた毛髪に菌を接種した。2, 3 日後には肉眼で菌塊の増大が見られ、1 週間目には毛髪は切断された。(Fig. 1)

2) Page に従つて horn-agar 培地に接種すると、透明帯が形成せられ、その直径は 4 日後 13mm, 5 日後 15mm, 7 日後 22mm に達した。

II 分離培養の肉眼的所見

1) Sabouraud's glucose agar 成長は 8 日目 colony の直径は 5mm, 4 日目 8mm, 5 日目 12mm, 6 日目 18

Table 1. Acid Production of *Histoplasma pilicola* n. sp.

Substratum	Days						
	1	2	3	5	7	14	
Xylose	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	—	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	—	—	—	+	+	+	+
Glucose	—	—	—	—	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	—	—	—	+	+	+	+
Mannose	—	—	+	+	+	+	+
Saccharose	—	—	—	—	—	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	—	—	—	—	—	+	+
Trehalose	—	—	—	—	+	+	+
Raffinose	—	—	—	—	—	+	+
Dextrin	—	—	—	—	+	+	+
Starch	—	—	—	—	+	+	+
Inulin	—	—	—	—	+	+	+
Glycogen	—	—	—	—	+	+	+
Glycerin	—	—	—	+	+	+	+
Adonitol	—	—	—	+	+	+	+
Dulcitol	—	—	—	+	+	+	+
Mannitol	—	—	—	+	+	+	+
Sorbitol	—	—	—	—	+	+	+
Inositol	—	—	—	—	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+

Miyoko Kominami: A Survey on Keratinolytic or Keratinophilic Molds from Soil in Japan, Report II. The Identification of *Histoplasma pilicola* gen. and sp. nov., Dept. of Dermatology, Nihon University Medical School, Tokyo, Japan. J. Med. Mycol. 2, 1961.

* 1) 本報告は Bull. Torrey Botanical club, Vol. 88 (1961) 掲載予定。

2) 文献は第 IV 報に一括する。

mm, 7 日目 23mm, 14 日目 44mm であつた。其の表面は最初 velvety で concentric ring (zone) を以て成長する。後 powdery となる (Fig. 2)。colony の色は初めはないが、6 日目頃から cartridge buff 色が現れて漸次周縁に及び時が経つと deep olive buff に近くなる。裏面も又初めは白いが 6 日目頃から着色して来、其の色調は稍々淡い。色は寒天の中に滲み込まない。約 1 カ月後に Colony の中央部に数個の小さな白い aerial hyphae

を生ずる。1カ月1回の移植で約6カ月継代培養すると、colonyの表面は velvety から cottony に変化して来る。

2) malt extract agar 発育の速さは Sabouraud's glucose agar に及ばないが、colonyの表面状態はよく似ている。裏面の中心の色は lemon chrome である。此の培地上では数回移植しても色調に著しい変化を起さない。Sabouraud's glucose agar に於て変化したものを malt extract agar に移植すると原相に戻る。

3) blood agar の場合 colonyの色は Sabouraud's glucose agar 及び malt extract agar の場合よりも稍々淡色である。約2週間後には血液の色は少し緑色がかつて来る。37°C培養では、殆ど其の発育は認められない。又 paraffin で綿栓を封じた上37°Cに培養した場合も殆ど其の発育は認められず、yeast like form も見る事は出来なかつた。

4) Czapek-Dox agar 発育は頗る悪い。

5) potato extract agar 比較的発育は良いが、malt extract agar のそれに及ばない。表面が velvety である事や colonyの形並に色は Sabouraud's glucose agar 及び malt extract agar の上に培養したものによく似ている。

III 分離菌株の顕微鏡的所見

malt extract agar 25°C培養を検するに、colonyの白色のうち巾凡そ2~3 μ の菌絲よりなり隔壁を有するも其の区劃の長さは不定である。colonyが着色するに従つて菌絲は分岐し其の先端に tuberculate chlamydospore (又は aleuriospore) を着生し (Fig. 3), 後には殆ど孢子のみとなる。この孢子は成熟すると略々直徑10~12 μ の球状となつて表面は金米糖状をなし、時に凡そ10 $\times$ 12 μ の楕円体をなす事もある。初めは被膜も薄く、無色で突起も小さいが、成長につれて突起は小瘤状となり、膜も厚くなつて黄褐色を帯びて来る (Fig. 4)。この chlamydospore は単独で生ずる事もあるが、概ね2個づつ縦に連つており、成熟すると其の先端から菌絲を離れる場合が多い。稀に珠数状に4~5個連る事もある。又如何なる孢子を形成するかを知るために次のように各種の培地を用い温度を変えて観察した。Sabouraud's glucose agar, malt extract agar, blood agar, horn agar, potato agar Czapek-Dox agar 等の培地で25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 室温に夫々4週間培養してみたがいづれの場合に於ても aleuriospore のみしか見出されなかつた。

IV 動物接種試験

1) 体重約200gの若いモルモット5匹の背部の毛を可及的短く剪取り、皮膚を亂切刀で傷付けた上略々1ccの生理的食塩水に1白金耳の malt extract agar 10日培養の菌を研磨混和した浮游液を擦入した。この後試獣の全身状態良好、体重も次第に増し、数日後には皮膚創も治癒したが、所々脱毛を残した。其の部の鱗屑の苛性加里標本を檢鏡するに孢子はかなり多数見出された。其の後全身状態異常なく発毛し、3カ月後屠殺解剖をしたが肉眼的には内臓に何等の異常も認められず、且又肺臓、肝臓より逆培養したが陰性であつた。

2) 7~8gの若いマウス5匹の腹腔内に malt extract agar 培養10日目の菌2白金耳を約10ccの生理的食塩水に研磨混和して作つた懸濁液0.1ccを注射した。試獣の全身状態は良好で、体重も次第に増し20日目には14~15gになつていた。そのうち1匹を屠殺の上解剖したが、肉眼的には何等の異常も認められなかつた。腎、肺、心、肝、脾臓をフオルマリン固定、paraffin に封じて組織標本をつくり、Gram, P.A.S., Haematoxylin Eosin で染色して檢鏡したが菌要素は認められなかつた。

V 糖分解試験

B.T.B.を指原薬として入れた pepton水に、xylose, arabinose, rhamnose, glucose, fructose, galactose, mannose, saccharose, maltose, lactose, trehalose, raffinose, dextrin, starch, inulin, glycogen, glycerin, adonitol, dulcitol, mannitol, sorbitol, inositol, salicin を、各々0.5%の割合に加え小試験管に分注、ダルハム氏管を入れて間歇殺菌し、malt extract agar 上10日間培養の菌を接種これを25°Cに置いて2週間檢した。其の成績を第1表に於て示したが色の变化の認められないものを(一)、不確実を(±)、明らかなものを(十)を以て記して酸生成の有無を示した。尚瓦斯はどの糖にも其の発生を見る事は出来なかつた。

VI 本菌株の同定

有棘厚膜の tuberculate chlamydospore を生ずる本菌は genus *Sepedonium* 及び *Histoplasma* に類似するが、日本に於て入手出来た *Sepedonium* の菌株は *Sep. chrysospermum*, *Sep. ampullosporum*, *Sep. niveum* 及び *Sepedonium* sp. であり *Histoplasma* は *H. capsulatum* であつたのでこれ等の菌株と本菌株の比較観察を試みたが、*Sepedonium* の中では申にも *S. chrysospermum* が chlamydospore の形、大きさ及び colony

が velvety である点で最も本菌に似ているので、特にこの菌を重視して実験した。

Histoplasma は yeast-like form をつくるが *Sepedonium* はそれをつくらない。又 *Sepedonium* は無棘薄膜の microconidia をつくるが *Histoplasma* はこれをつくらない。本菌は tuberculate chlamydospore のみを生じ、yeast-like form も microconidia もつくらない。本菌は顕著な keratin 分解性を示すが他の2つは少しも其の性質を示さない。以上主な異点であるが同じ条件下で3種を培養した場合肉眼的にも顕微鏡的にも諸種の異なる点を見出す。

1) 培地に依る菌の性状の比較

a) 肉眼的性状所見. Sabouraud's glucose agar 及び malt extract agar 培養の場合本菌と *Sepedonium chrysospermum* は発育状況略と同様であるが *Histoplasma capsulatum* は非常に遅い。又 *Sep. chrysospermum* の colony は velvety で orange rufous の色であるが、*Histoplasma capsulatum* は寒天様の鈍い光沢の不透明な菌塊を呈し、concentric ring (zone) 状に白色の弱い aerial hyphae を生ずる。本菌の colony は velvety で deep olive buff の色を呈し concentric ring を畫いて成長する。Czapek-Dox 培地の場合、*Sep. chrysospermum* は発育良好、velvety, orange chrome で其の色素は寒天の中に溶け出る。又斜面培地の上方に著しい aerial hyphae を生ずる。*Hist. capsulatum* の発育は比較的良好で白色の cottony の colony をつくる。本菌は非常に発育が悪く肉眼的には其の痕跡を認める程度である。

potato extract agar 培養の場合は *Sep. chrysospermum*、*Hist. capsulatum* 並に本菌共に発育良好で、*Sep. chrysospermum* は velvety, cadmium yellow を呈するも色素は寒天に溶け出さぬ。*Hist. capsulatum* は白色 cottony の colony である。本菌は Sabouraud's glucose agar 並に malt extract agar 上と余り変らぬ所見である。

b) 顕微鏡的所見 3株を顕微鏡下に検する時、*Sep. chrysospermum* は Sabouraud's glucose agar, malt extract agar に於て $12\sim 15\mu$ の黄色の aleuriospore をつくり、その他によく光る顆粒を含む不定形の薄膜の胞子を含む。菌絲は巾凡そ 5μ 、膜厚く隔壁を有す。分岐した菌絲の先端に胞子を着生する。*Hist. capsulatum* は $6\sim 9\mu$ の余り棘の目立たぬ無色の aleuriospore で菌絲も $4.5\sim 2\mu$ の太細の差あり、胞子の数も Czapek-Dox

培地上よりも多少多いが *Sep. chrysospermum* 及び本菌に比べ頗る少い。本菌は $10\sim 12\mu$ 黄色の *Sep. chrysospermum* の aleuriospore によく似た胞子を着生する。菌絲の巾は凡そ 3μ で隔壁あり、膜は薄い。発生の仕方は *Sep. chrysospermum* も *Hist. capsulatum* も単独であるが本菌は2つつ、縦に連つている場合が多く上方より熟して菌絲を離れてゆく。Czapek-Dox 培地に培養の場合、*Sep. chrysospermum* は胞子の形稍々大きく $15\sim 18\mu$ 、菌絲の巾は 4.5μ 位で菌絲の中の顆粒がよく目立つて見える。*Hist. capsulatum* は $12\sim 15\mu$ の無色でとげの余りはつきりしない胞子が極くまばらに着く。菌絲は巾 3μ 、位で隔壁あり。本菌は連鎖状に4-5個連る胞子の発生も所々見得る。胞子の大きさは $10\sim 12\mu$ で淡黄色である。菌絲に細い太いがあり細いところは 2μ 、太いところは 6μ もある。所謂 racket mycelium が目立つ。potato 培地にあつては *Sep. chrysospermum* は $12\sim 15\mu$ の淡黄色の胞子、 3μ 位の菌絲の巾である。*Hist. capsulatum* は $6\sim 9\mu$ の棘の目立たぬ黒色の胞子で数は余り多くない。Sabouraud's glucose agar, malt extract agar 上に培養したのと顕微鏡下にあつては略々似たような所見である。本菌も亦他の培地上のと余り変らぬ瘤のある $10\sim 12\mu$ の胞子で菌絲の巾も 3μ 位である。

c) 胞子形成の比較. Conant¹¹⁾に従つて blood agar に接種して其の線栓を paraffin で封じ、 37°C において場合4週間観察したが yeast-like form は本菌も *Sepedonium* もつくられなかつた。microconidia 形成の有無を知るために各種の培地を用いて温度も夫々変えて4週間培養観察したが *Sepedonium* にのみ見られ、本菌にも *Histoplasma* にも遂に見ることが出来なかつた。

2) keratin 分解性 horn agar 25°C に於て本菌はこれを透明にし且つ毛に接種すればその部分を切断するが他の2種は同様の実験に於て何等の変化も示さなかつた。

3) 動物接種. *Histoplasma* は動物に病原性を有すると記されているが、本菌はモルモットの亂切した皮膚に菌をすりこんでも、菌体の乳剤をマウスの腹腔内に入れても動物体に何等の異常も惹起しなかつた。

以上の諸点より考按して本菌は tuberculate chlamydospore を有するが *Sepedonium* 屬とも *Histoplasma* 屬とも異り新屬の設定を必要と認められるので次の如く命名し、尚その特徴を下記した。

新菌の記載

Histoplasmaella pilicola gen. nov. sp. nov.

Hsstop'asmella pi'icola gen. et sp. nov.

Fig. 1 ×100 菌に侵蝕され切断された毛髪

Fig. 2 ×1.5 malt extract agar 14日

本菌は aleuriospore (tuberculate chlamydospore) を作る点で *Hsstop'asma* 又は *Sepedonium* 属に似ているが、前者のような培養上 yeast-like form を作ることはなく又病原性も無いし、後者に見るような microconidia を作らないので其のいずれの属とも区別することが出来るので *Hsstop'asma* なる新属をつくつた。

Sabouraud's glucose agar 25°C 2週間で colony は直径44mm, 表面 velvety, 後多少 powdery, 最初色なく次第に cartridge buff から deep olive buff となる。裏面は表面より稍々淡色。色素は寒天に溶け出ない。又 Sabouraud's glucose agar 上に連続6ヵ月連続培養で velvety な colony は cottony になつて来る。菌絲は分岐隔壁あり、巾2~3μで無色。

tuberculate chlamydospore: 黄褐色, 直径10-12μの球状, 菌絲の先端に着生。時に10×12μの楕円体, 多

Fig. 3 ×400 Sabouraud's glucose agar (drop culture)

a. 1日目 b. 2日目 c, e. 7日目
d. 毛の上で7日目 f. 角未培地7日目

Fig. 4 ×1500 malt extract agar 10日目

くは2個連つて生じる。単独もある。稀に4~5個の連りもある。厚膜を有し verruculose, tuberculate, warted の突起を生ず。

malt extract agar, blood agar, potato agar 培養で "racket hyphae" を生ず。適温は25~30°C。37°Cでは痕跡程度の發育。糖の醗酵を起さず。モルモット、マウスに病原性を示さず。

keratin 分解性顕著

上野動物園さじ禽舎の土より1955年3月27日分離。

結 論

1) 上野動物園内きじ禽舎の土壌から分離した毛髪分解菌を新属新種と認め *Histoplasma pilicolla* n. gen., n. sp. と命名した.

モルモットの皮膚並びにマウスの腹腔内に接種したが病原性を示さなかつた.

3) 毛及び角粉の keratin 分解性を有する.

4) aleuriospore 1 名 tuberculate chlamydospore は *Histoplasma* 属及び *Sepedonium* 属のものに似ているが yeast-like form を作らず又 microconidia を作らぬ点で両属と区別すべきものと信ず.

本菌の同定に関しては長尾研究所々長小南氏の御指示に基くものである。こゝに記して深謝する(主任 三浦修)