

[総 説]

ヒトにおける感染症起因菌としての *Lactococcus garvieae*

岡本 陽・荒川宜親

名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学

(平成24年1月16日受付)

*Lactococcus garvieae*は、ウシの乳腺炎や岸養殖漁場において魚のレンサ球菌症の原因菌として知られている。まれに心内膜炎などの起因菌としてヒトの血液培養から分離されるものの、健常者の糞便などからも分離されることがあることから、ヒトに対する病原性は低いと考えられてきた。しかしながら *L. garvieae*は同様の疾患の原因菌となりうるレンサ球菌である *Enterococcus* 属や *Streptococcus* 属と形態学的、および生化学的性状がよく類似しており、これらの性状に基づく鑑別は難しいと考えられる。PCR法を基礎とするような分子生物学的手法により *L. garvieae*の検出、鑑別は可能であると考えられるが、病原菌としての認知度が低いこともあって、一般的な病院検査室では *Enterococcus* 属や *Streptococcus* 属の種分類不能菌と誤判定され、見逃されている可能性もある。これまでの症例報告によると、*L. garvieae*感染症に対する大きなリスク要因は次の2点である；(i) サシミの喫食や漁場での勤務など、魚介類との濃厚接触、および(ii) 循環器系、あるいは消化器系に基礎疾患を持つ。今後、高齢化社会を迎えリスク要因となりうる基礎疾患を持つ年齢層の割合も高くなる本邦では、*L. garvieae*に対する関心をこれまで以上に高める必要がある。

Key words: *Lactococcus garvieae*

はじめに

*Lactococcus garvieae*はいわゆる乳酸菌の一種でありながら、本邦では沿岸養殖漁場でしばしば養殖魚に流行性の感染症であるレンサ球菌症 (streptococciosis) を起こすことで、水産/漁業関係者にはよく知られている菌種である。近年、特に台湾など魚介類を非加熱で喫食(生食)する習慣のある地域において、まれに *L. garvieae*がヒトにおいて心内膜炎や血行性の全身性感染症を起こすことが報告されるようになり、これらの症例の多くが魚介類の生食などに関連している可能性が推測されている。本邦での *L. garvieae*による感染事例では魚介類の喫食は指摘されていないものの¹⁾、魚介類の生食を好む習慣があることから、*L. garvieae*に接触する機会は高いと考えられる。しかし、*L. garvieae*はヒトに対する病原性細菌としての認知度が低いことに加え、形態学的、生化学的性状にお

いて *Enterococcus* 属や *Streptococcus* 属菌との鑑別が困難であることから、*L. garvieae*は微生物のルーチン検査では *Enterococcus* 属や *Streptococcus* 属に属する判定不能菌株として処理され、見逃されている可能性がある。本稿では *L. garvieae*に対する認識を高めるため、本菌の性状と分類学的な位置づけ、臨床症状と治療、これまでに知られている分子生物学的な病原因子、および鑑別法などについて解説する。

1. 一般性状と分類学上の位置づけ

*L. garvieae*は *Lactococcus* 属に属するグラム陽性の球菌で、単球菌、双球菌、あるいは短鎖連鎖状からクラスター状の空間的配置をとる(図1)。莢膜を形成する場合があり、養殖魚に対する病原性に関与しているとされる^{2,3)}。*Streptococcus* 属、*Enterococcus* 属、および *Lactococcus* 属と *L. garvieae*の表現形の特徴を表1に示す。*Streptococcus* 属、*Enterococcus* 属の菌種と同様に、*L. garvieae*を含む *Lactococcus* 属菌はカタラーゼ陰性を示し、嫌氣的にホモ乳酸発酵を行い増殖する。*Streptococcus* 属とは異なり、*Enterococcus* 属と *Lactococcus* 属菌には6.5%のNaClを含む培地でも増殖する株

著者連絡先：(〒466-8550) 名古屋市昭和区鶴舞町65
名古屋大学大学院医学系研究科
分子病原細菌学
岡本 陽

表1. *L. garvieae*と関連菌属の性状比較

Bacteria		バンコマイシン 感受性	PYR	LAP	NaCl (6.5%)	Bile-escrin reaction	Growth at		α -Hemolysis
							10°C	45°C	
<i>Streptococcus</i> spp.	Viridans	100	0	98	0	20	1	19	70
	<i>S. bovis</i>	100	0	100	0	100	0	100	80
<i>Enterococcus</i> spp.	Vancomycin susceptible	100	90	90	100	10	96	96	80
	Vancomycin resistant	0	100	100	100	100	100	100	80
<i>Lactococcus</i> spp.		0	83	95	70	98	90	43	40

Facklamらの文献（文献4）より引用，改変した。PYR, L-pyrrolidonylarylamidase試験；LAP, leucine- β -naphthylamide試験；NaCl, 6.5% NaCl Heart infusion 培地での増殖（35°C，最大14日間まで）；Bile-escrin reaction, esculin分解能試験；Growth at 10 and 45°C, heart infusion 培地での増殖； α -Hemolysis, ヒツジ血液寒天培地上での α 溶血の有無。

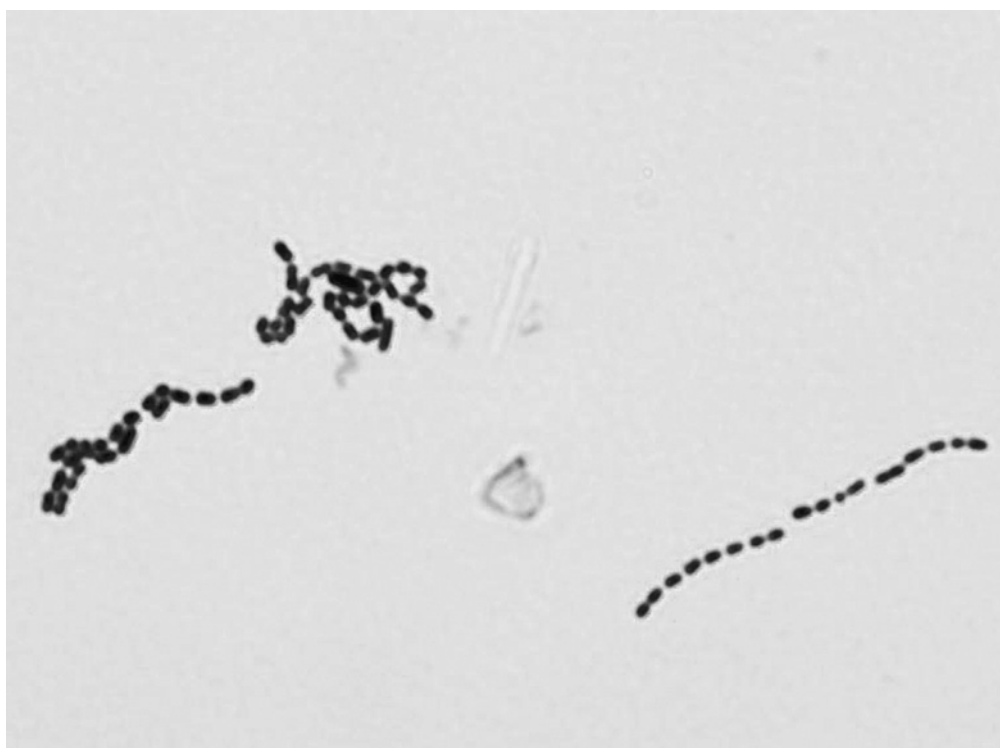


図1. *Lactococcus garvieae* ATCC43921株のグラム染色像。Brain-heart infusion 培地中で24時間，30°Cで培養した菌液を観察した（ $\times 1,000$ 倍）。短鎖からクラスター状のグラム陽性球菌が観察される。

もある⁴⁾。*Lactococcus*属と*Enterococcus*属は，pyrrolidonylarylamidase (PYR) 試験と45°Cでの増殖（*Lactococcus*属菌は遅発育）によって判別が可能とされている。しかしながら，PYR試験は*Enterococcus*属菌の99～100%で陽性となるのに対し*Lactococcus*属は83%が陽性となり，かつ45°Cでの培養においても*Lacto-*

*coccus*属のうち43%が培養陽性（*Enterococcus*属菌は96～100%培養陽性）となっている。したがって，以上の生化学性状試験だけで*Lactococcus*属菌を正確に同定することは困難であると考えられる。しかし，実際の臨床現場では，血液培養のような検体から分離され，顕鏡，あるいは血液寒天培地上でのコロニー形成

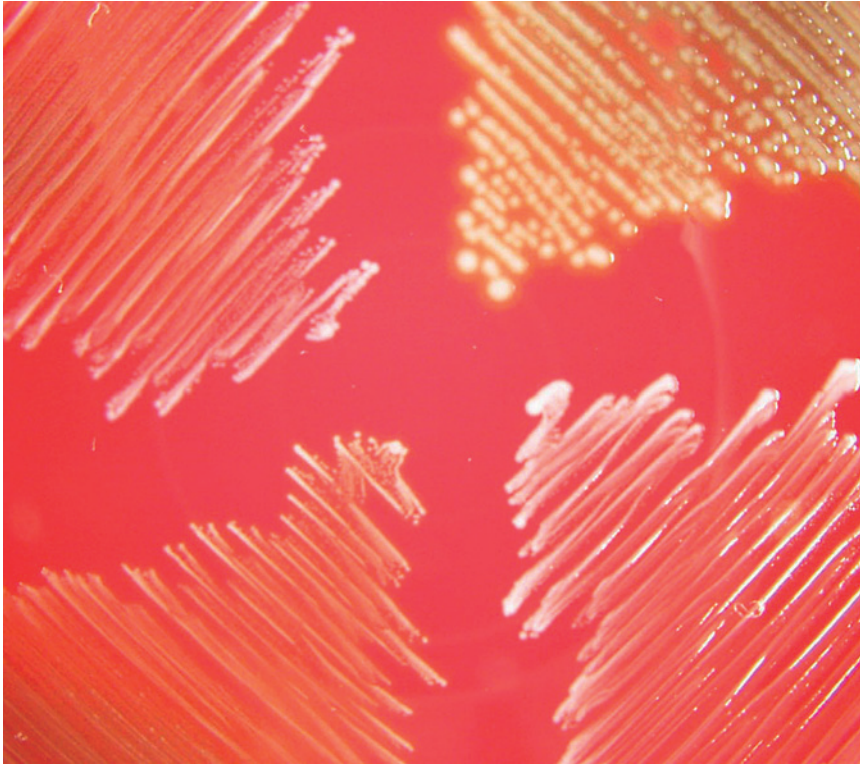


図2. 血液寒天培地に形成する集落の比較. 左上から時計回りに *L. garvieae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*. ヒツジ血液寒天培地に接種し 37°C, 5% CO₂, 16時間培養した。

などの形態がよく似ている *E. faecalis* や *E. faecium* などの判別が問題になることが予測される (図2) が, 数種類の炭素源の基質利用能試験 (マンニトール, ソルビトール, アラビノース) と生化学性状試験 (0.04% 亜テルル酸抵抗性試験, ピルビン酸産生試験) を組み合わせることで判別は可能であるとされている。腸球菌属の選択的分離, 鑑別に用いる EF 培地 (ニッスイなど) 上では, *L. garvieae* の増殖は弱いものの, *E. faecalis* に似た集落を形成するので判定に迷うかもしれない (図3)。

分類学的に, *L. garvieae* は何度か変遷を遂げている。当初, 1981年に Garvieらによってウシの乳腺炎から分離され⁵⁾, 1983年に DNA ハイブリダイゼーションに基づき *Streptococcus* 属の新種として *Streptococcus garvieae* と命名された⁶⁾。その後 1985年に *Streptococcus* 属からの *Lactococcus* 属の分離⁷⁾ とともに *L. garvieae* へと属名が変更された。一方で 1991年に, 日本の養殖魚のブリ (*Seriola quinqueradiata*) からレンサ球菌症の原因菌が分離され, DNA ハイブリダイ

ゼーションの評価から *Enterococcus seriolicida* という種名が与えられた⁸⁾。が, このときは *Streptococcus* 属や *Lactococcus* 属との比較は行われていなかった。最終的に, 1993年に先のウシ乳腺炎原因菌である *L. garvieae* と, 魚病菌である *E. seriolicida* が DNA ハイブリダイゼーションの結果から同一菌種であることが明らかになり, *E. seriolicida* は下位分類 (junior synonym) として *L. garvieae* に統合された⁹⁾。

16S リボソーム遺伝子による分子系統解析では, *Lactococcus* 属, *Enterococcus* 属, および *Streptococcus* 属の代表的な菌種はそれぞれクラスターを形成し, 明確に区別ができる (図4)。*L. garvieae* のゲノム構造については 2010年に, *L. lactis* と *S. pneumoniae* に対するプローブを配置した DNA マイクロアレイを用いた網羅的な比較ゲノム解析が行われている¹⁰⁾。この研究の結果から, *L. lactis* と *S. pneumoniae* の少なくともどちらか一方と相同性を持つ *L. garvieae* の 258 のタンパク質をコードする遺伝子が報告されており, この内訳はリボソームサブユニット, 糖代謝系, エネルギー合

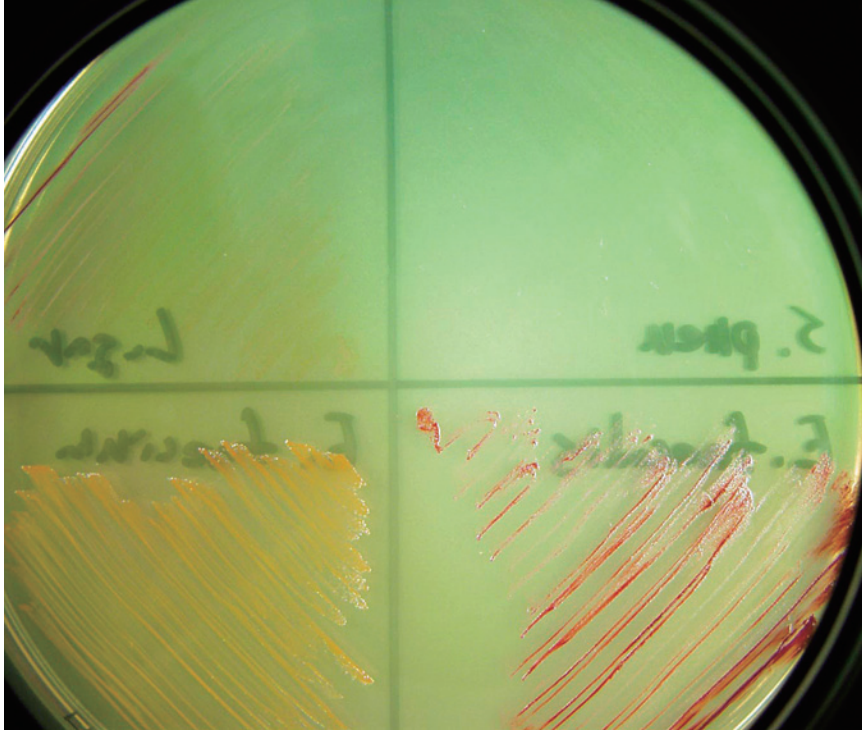


図3. EF寒天培地に形成する集落の比較. 左上から時計回りに*L. garvieae*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium*を塗布し, 37°C, 5% CO₂, 24時間培養した. EF寒天培地はEnterococcus属の分離選択培養, および*E. faecalis* (えび茶色の集落を形成)と*E. faecium* (黄色の集落を形成)の鑑別に用いられる. *L. garvieae*はほとんど増殖しないが, 菌の濃度の高い場所では*E. faecalis*様の茶色の集落を形成している. *S. pneumoniae*は全く発育しなかった. 60時間まで培養したが, 外観はほとんど変化しなかった.

成系などを中心としている。またヒトの血液から分離された*L. garvieae* 21,881株を含め¹¹⁾, 魚病由来のATCC49156株とLg 2株¹²⁾, およびUNIUD074株¹³⁾, 8,831株¹⁴⁾の計5株のゲノム配列が2011年に公開された。この解析により*L. garvieae*は約2 Mbp (GC含量38~39%)の染色体DNAを持ち, 約2,000個の遺伝子の存在が想定されている。今後, これらのゲノム比較情報を基に, ヒト臨床由来株と環境由来株(魚病, ウシ乳腺炎由来株を含む)との比較による, 病原性を含む表現形に関する研究が発展することが期待される。

2. 臨床症状と治療

*L. garvieae*はレンサ球菌症として魚類に対する病原性が知られており, 養殖漁場で流行性に発症することから漁業経営的に問題となっている⁸⁾。また他のStreptococcus属, Enterococcus属, およびLactococcus属細菌とともに, ウシ乳腺炎の原因菌としても知られている¹⁵⁾。

ヒトに対して病原性を持つLactococcus属としては*L. lactis*と*L. garvieae*の2菌種が知られ, 血液培養などの臨床材料から分離されており¹⁶⁾, Elliotらは1991年に14の臨床材料由来*L. garvieae*株(blood由来10株, urine由来3株, skin由来1株)を用いて鑑別法の研究を行っている。このことから, 以前からしばしば感染症に関連してLactococcus属菌がヒトから分離されていた。1995年のFacklamらの文献によると⁴⁾, 米国Centers for Disease Control and Prevention (CDC)に寄せられたヒト臨床材料由来のLactococcus属細菌(種名までは記載されていない)は39株であり, その分離材料の内訳は血液培養由来25株, 尿由来4株, 創傷由来2株, その他(胸膜液, 脳膿瘍, 胆汁液, 眼, および皮膚)の由来がそれぞれ1株ずつとなっている。また同報告によるとそれぞれ診断がついたものに関しては敗血症13件, 肺炎3件, 心内膜炎3件, その他(膀胱炎, 乳幼児突然死症候群(SIDS), 虫垂破裂, 切断創傷, 脳膿瘍)が1件ずつとなっている。

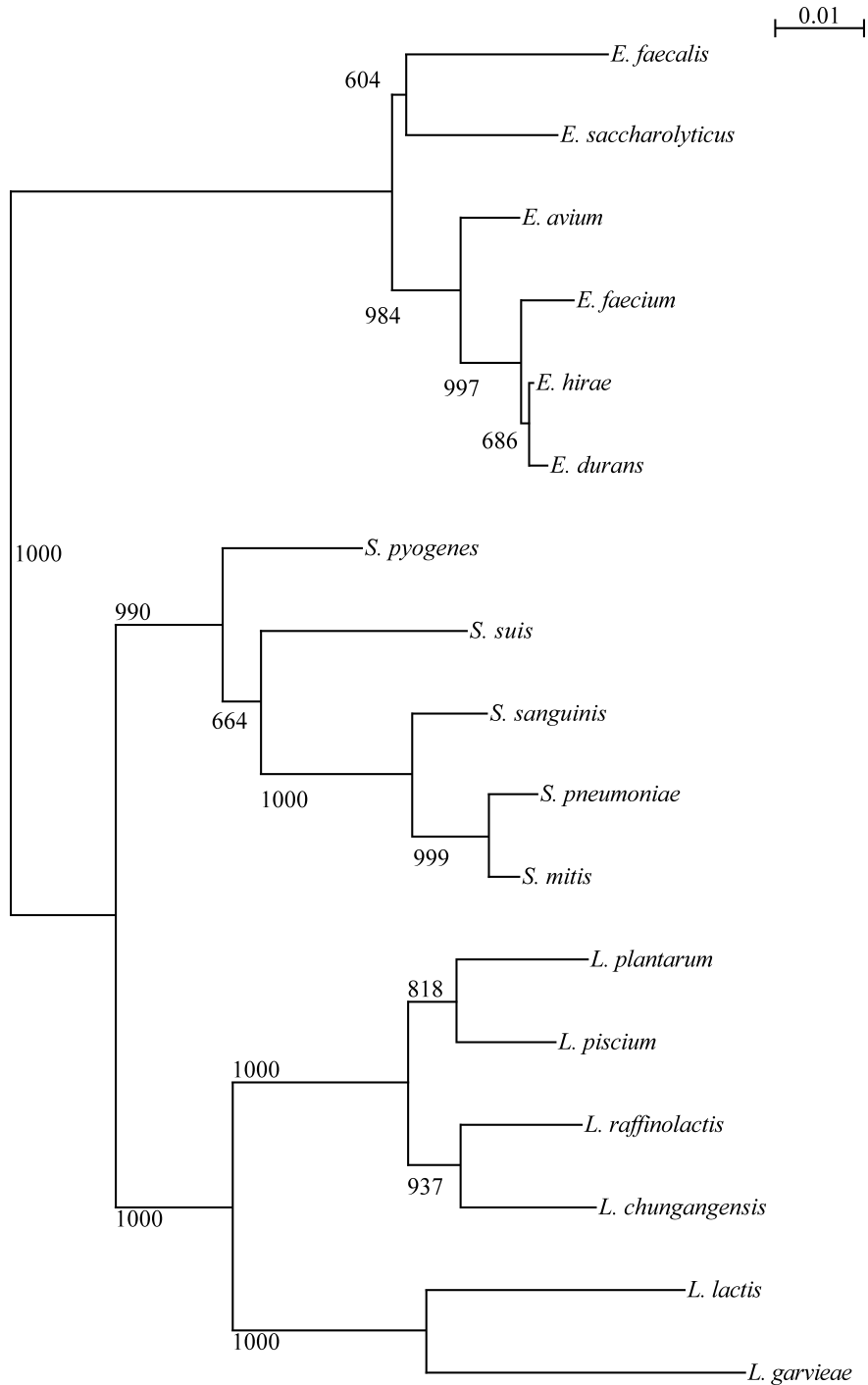


図4. *Enterococcus*属, *Streptococcus*属, および *Lactococcus*属の主要菌種の16Sリボソーム遺伝子配列に基づく分子系統樹. 遺伝子配列はRIBOSOMAL DATABASE PROJECT (<http://rdp.cme.msu.edu/>) より1,200 bp長以上のものをダウンロードし, ClustalXを用いてアライメントを行い, bootstrap法により系統樹を作成した. 各分枝に示した数値はbootstrap値を示す.

表2. *L. garvieae*に関する症例報告

患者 (性別/年齢)	循環器系要因	消化器系要因	その他要因	臨床症状	分離菌 (材料, 菌種判定法)	治療	予後	引用文献番号, 著者 (発表年, 国)
女性/84	肥大性心筋症	甲状腺機能亢進症 免疫性血小板減少 性紫斑病	甲状腺機能亢進症 免疫性血小板減少 性紫斑病	自然心内膜炎	<i>L. garvieae</i> (血液, 生化学 性試験)	僧帽弁置換術, 術後1週間から ceftriaxone, 経静脈	脳出血から1カ月 後に死亡	文献17, Fefer, J. J. et al. (1998, USA)
女性/56	大動脈弁置換術 (12年前)		化膿性脊椎炎 9週間の下部痛, 5週 間発熱	化膿性脊椎炎 9週間の下部痛, 5週 間発熱	<i>L. garvieae</i> (血液, 寄生検, 生化学性試験)	テイコプラニン, 経静脈, 1カ月 (感受性試験ののち, パンコマイ シンから切り替え)	治療終了後, 退院 (2000, UK)	文献18, James, P. R. et al. (2000, UK)
女性/68		胆管がん (2カ月前, 人工胆管留置)	肝臓瘍 (胆道出血による消化管出 血, 肝臓瘍に伴う人工胆管 閉塞)	肝臓瘍 (胆道出血による消化管出 血, 肝臓瘍に伴う人工胆管 閉塞)	<i>L. garvieae</i> (血液, 生化学 性試験)	閉塞人工胆管の除去, アモキシ シリン, ネチルマイシン, メト ロニダゾール, 経静脈	消化管からの大量 出血により12日 後に死亡	文献19, Mofredj, A. et al. (2000, France)
女性/86	大動脈弁置換術 (6年前)	小腸閉塞, ヘル ニア (8年前) 十二指腸潰瘍 (1年前より)	人工心内膜炎	人工心内膜炎	<i>L. garvieae</i> (血液, 16S rRNA・sodA 遺伝子配 列)	アモキシシリン, ゲンタマイシ ン, 経静脈, 4週間アモキシシリ ン, 経口, 3週間	治療終了後, 退院 (2005, France)	文献20, Fihman, V. et al., (2005, France)
男性/80	虚血性心疾患 高コレステロー ル血症	悪性の大腸ポ リープ切除	自然心内膜炎	自然心内膜炎	<i>L. garvieae</i> (血液, 16S rRNA 遺伝子配列)	僧房弁置換術およびその3週間 前, 6週間後までアンピシリン, 経静脈	治療終了後, 退院 (2006, Canada)	文献22, Vinh, D. C. et al. (2006, Canada)
男性/67	僧房弁逆流 心房細動	魚介市場へ頻繁に 訪問	自然心内膜炎	自然心内膜炎	<i>L. garvieae</i> (血液, 生化学 性状)	アンピシリン, 経静脈, 6週間 2カ月後に僧帽弁置換術	治療終了後, 退院 (2007, Hong Kong, China)	文献21, Yiu, K. H. et al. (2007, Hong Kong, China)
男性/72	僧房弁逸脱	胃潰瘍	自然心内膜炎	自然心内膜炎	<i>L. garvieae</i> (血液, 16S rRNA 遺伝子配列)	ペニシリン, 4週間 ゲンタマイシン, 2週間, 経静脈	治療終了後, 退院 (2007, Taiwan)	文献23, Wang, C. Y. C. et al. (2007, Taiwan)
男性/10		反復性の食道 拡張症	播種性血管内凝固症候群 (DIC)	播種性血管内凝固症候群 (DIC)	<i>L. garvieae</i> (血液, 16S rRNA 遺伝子配列) および <i>Klebsiella pneumoniae</i>	補助的治療	搬送から10時間後 に死亡	
女性/56	高血圧	慢性肺病 甲状腺機能障害 ぜんそく	小肺菌症	小肺菌症	<i>L. garvieae</i> (血液, 16S rRNA 遺伝子配列)	セファゾリン, ゲンタマイシン, 経静脈, 2日 ST合剤, 経口5日	治療終了後, 退院	
男性/47		交通事故による小 腸穿孔 事故の2時間前に サシミの喫食	腹膜炎	腹膜炎	<i>L. garvieae</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> (腹水, 16S rRNA 遺伝子配列)	腸縫合術, ペペラシリンおよび アミカシン, 経静脈, 1週間	治療終了後, 退院	

表2. つづき

男性/41	生鮮魚介類を扱う調理従事者	自然弁心内膜炎 感染性塞栓性脳梗塞	<i>L. garvieae</i> (血液, 生化学 性状自動検出装置)	ペニシリン, ゲンタマイシン, 経静脈, 30日間 (退院後に個室弁置換術)	治療終了後, 退院 (2008, Taiwan)	文献24, Li, W. K. et al.
男性/55	関節炎 養殖漁場業者 (5年前)	進行性呼吸困難	<i>L. garvieae</i> (血液)	(ST合剤) ゲンタマイシン, バンコマイシン, リファンピリン, 経静脈, 1週間 人工弁交換 レボフロキサシン, アモキシシリ ン/クララプラーン酸, 経口, 8週間	治療終了後, 退院 (2011, German)	文献25, Wilbring, M. et al.
男性/70	慢性胃炎 H2ブロッカー 訪問 サシミの喫食	魚介市場へ頻繁に 感染性脊椎炎	<i>L. garvieae</i> (骨生検, 16S rRNA 遺伝子配列)	アンピシリン, 経静脈, 6週間	治療終了後, 退院 (2011 Hong Kong, China)	文献27, Chan, J. F. W. et al.
女性/71	ヘモクロマトー シス 虚血性疾患 動脈性高血圧	大腿骨頭の骨壊死 右臀部痛 に伴う人工装具の 置換術 (7年前) 肥満 2型糖尿病 アルコール依存症	<i>L. garvieae</i> (血液, 生化学 性状自動検出装置)	セフトリアクソン, レボフロキ サシン, 経静脈, 3カ月	治療終了後, 退院 (2011, France)	文献26, Aubin G. G. et al.
女性/55		自然弁心内膜炎	<i>L. garvieae</i> (血液, 生化学 性状試験 16S rRNA 遺伝子 配列)	ペニシリン, ゲンタマイシン, その後セフトリアクソンの週間	治療終了後, 退院 (2011, Japan)	文献1, Watanabe, Y. et al.

Chanらの報告(文献27)を基に, Wilbringら(文献25), Aubinら(文献26), およびWatanabeら(文献1)の報告を加え変更した。

2000年前後からヒトに対する *L. garvieae* の詳細な感染症例報告が世界各地からされるようになり、少なくとも12報、15症例の報告が見られる^{1, 17-27)}(表2)。これまでの15症例中12例(80.0%)で *L. garvieae* による菌血症がかかわっており、多くの症例で初期に血液培養から短鎖のグラム陽性球菌が認められている。症例としては心内膜炎が7例と最も多く、そのうち5例が循環器系の基礎的な素因(僧房弁置換の術歴、大動脈弁置換の術歴、虚血性心疾患、僧房弁逆流、僧房弁逸脱が各1例)を持っていた。他の症例には化膿性脊椎炎、肝膿瘍、播種性血管内凝固症候群、小腸憩室症、腹膜炎、進行性呼吸困難、感染性脊椎炎、および人工埋入物に伴う関節炎が1件ずつとなっている。循環器系以外の主な素因としては、消化器系の素因(胆管がん、小腸閉塞症および十二指腸潰瘍、胃潰瘍、食道拡張症、慢性胃炎)が挙げられる。また日常的な魚介類の生食や、養殖漁業従事者など、生鮮魚介類と接触があった症例は全15症例中7例であった。これまでの症例のうち、3例がそれぞれ脳出血¹⁷⁾、消化管出血¹⁹⁾、そして搬送後治療開始前の多臓器不全²³⁾による死亡の転帰をとっている。

死亡の転帰をとった3例以外では、抗菌薬投与が著効している。 β -ラクタム系(ペニシリン、アンピシリン、ピペラシリン、アモキシシリン、セファゾリン、セフォタキシム、セフトリアキソン)やテイコプラニン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、レボフロキサシンが用いられており、これらに耐性を示す臨床分離菌株はいまのところ認められていない。

3. 病原因子

ヒトへの感染症における病原因子はこれまであまり調べられていないが、ニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)に対する魚病菌としての病原因子が探索されており、現在までに莢膜、タイコ酸のD-アラニル化修飾酵素、そしてシデロフォア存在が示唆されている。

光学顕微鏡(墨汁染色など)では確認されていないが、透過型電子顕微鏡による観察で *L. garvieae* が莢膜形成能を持つことが示唆されている²⁾。ニジマスに対する病原性の評価では、莢膜産生性株がニジマスに対して高い病原性を発揮しており、莢膜非産生株では著しく病原性が低下する²⁾。この原因として、莢膜産生株では *L. garvieae* の細胞表層タンパク質を標的とする特異的抗体による凝集能が低下しており、また実際に食食に対する抵抗性が低下していることから、莢膜を形成することでオプソニン食菌に対して抵抗性を得て

いる可能性が示唆されている。一般的に莢膜形成能は、特に血行性の全身感染症において、マクロファージなどによるオプソニン食食に対する抵抗性を病原菌に付与し、宿主免疫機構による病原菌の排除を難しくすることから、莢膜が *L. garvieae* における病原因子の一つとして挙げられることは妥当であると考えられる。なお、*L. lactis* も細胞表層に Pellicle と呼ばれる多糖体(exopolysaccharide)を形成し、その合成にかかわる遺伝子の一部は、莢膜が重要な病原因子として挙げられる *S. pneumoniae* と共通性を持っていることも明らかになっている²⁸⁻³⁰⁾。*L. lactis* もごくまれに全身感染症を起こすことが報告されているが、こちらヒトへの病原性において、莢膜などの病原因子の関連は明らかになっていない。

また同じ菌体表層成分に関して、タイコ酸のD-アラニル化修飾酵素を欠損することで、ニジマスに対する病原性が著しく低下することが報告されている³¹⁾。*L. garvieae* におけるタイコ酸のD-アラニル化修飾酵素は四つの遺伝子からなるオペロンを形成しており、このうちのひとつである *dtA* を欠損した変異株では、試験管内での増殖などに影響は与えなかったものの、ニジマスに対する半数致死菌量(LD₅₀)が著しく上昇し、またニジマスが死亡した後もより長期間にわたり菌が生残していたことが報告されている。タイコ酸のD-アラニル化が *L. garvieae* の宿主(ニジマス)内での長期生存、あるいは病原性にどのように寄与しているのかなどについてはいまだ不明な点が多く残されている。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* や *S. agalactiae* では、同様にタイコ酸のD-アラニル化を阻害することで好中球やマクロファージなどによる食食への抵抗性が低下し、宿主内における病原菌の生存に影響を与えていることが示唆されていることから^{32, 33)}、*L. garvieae* でも同様の機構が関与していることが推測されている。

さらに、ある一定の条件下で *L. garvieae* がシデロフォアを産生する可能性が示唆されており、シデロフォアの産生は宿主血液中での増殖にとって有利に働いていると考えられている³⁴⁾。分子構造などの詳細は明らかになっていないが、鉄イオンが枯渇した培養条件下において *L. garvieae* はシデロフォア活性を発揮し、鉄イオンを獲得していることが報告されている。シデロフォア合成酵素をコードする遺伝子については現時点では不明であるが、近い将来、ゲノム解析の結果から明らかになることが期待される。

以上のように、莢膜をはじめとして、タイコ酸のD-アラニル化などによって宿主免疫による排除機構が

ら回避するような細胞表面構造を持っている可能性があることに加え、シデロフォアの産生による鉄の獲得など、血液中での増殖を有利にするような病原因子を持っている可能性が示唆されている。今後はさらにバイオフィーム形成能など生体内での定着や増殖に有利な特徴があるかどうか、また近縁種である *Enterococcus* 属などからプラスミドやトランスポゾンのような可動因子にコードされた薬剤耐性遺伝子を伝播される可能性があるか否かなど、さらなる病原因子の探索が待たれる。

4. 鑑別法

注意深い生化学性状試験により、*Streptococcus* 属や *Enterococcus* 属との鑑別は不可能ではないが、さらに *Lactococcus* 属内における *L. lactis* subsp. *lactis* と *L. garvieae* との鑑別などは困難である。そこで以前から生化学性状試験以外の鑑別法が考案されており、特に PCR に基づく数種類の検出法は、*L. garvieae* の検出、および *Lactococcus* 属内の種分類において、現段階では最も効果を発揮すると考えられる。

DNA 塩基配列に基づいた分類として、16S リボソーム RNA 遺伝子および superoxide dismutase (*sodA*) 遺伝子の配列比較³⁵⁾により、表現形がよく似ている *Enterococcus* 属を含めた *L. garvieae* の鑑別が可能となっている。さらに 16S リボソーム RNA 遺伝子の配列を基に開発されたリアルタイム RT-PCR を用いて、*Enterococcus* 属、*Streptococcus* 属、および *Lactococcus* 属を含むヒトの臨床材料由来のグラム陽性球菌を分類する方法が開発されている³⁶⁾。本方法は迅速性に優れ、また定量的な評価が可能となっている。さらに近年、1ステップの multiplex PCR による *Lactococcus* 属の分類法も開発されている³⁷⁾。これも 16S リボソーム RNA 遺伝子の配列比較に基づく方法であるが、1ステップで *Lactococcus* 属内の種分類が可能であるため、最も簡便かつ効果的であると考えられる。

1991年に Elliottらにより、細胞内タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動による泳動パターンに基づいた *L. lactis* と *L. garvieae* の鑑別の試みがなされている¹⁶⁾。検査室などにおけるルーチン検査とするには煩雑すぎるが、この方法はそれぞれの菌種が持つタンパク質の分子量の差異をフィンガープリントとして用いた鑑別法であり、文献内では良好な再現性が報告されている。直接的な関連はないものの、このようなタンパク質の分子量の差異に基づいた分類法として、その後 MALDI-TOF MS を用いた菌種分類法の *Lactococcus* 属への適用も報告されている³⁸⁾。MALDI-TOF MS

による菌種の分類検出法は、一般的に数種から数百種類の細菌由来成分（これらの多くはリボソームサブユニットなどの主要な細胞内タンパク質であると考えられる）の質量電荷比を比較するフィンガープリント法であり、迅速な細菌の検出法として一部では成果を上げているものの、同一菌株であっても培養条件や発育段階によってスペクトルパターンが異なること、またスペクトルとして得られたすべての主要なイオンがそれぞれタンパク質を含む細胞由来の生体高分子に帰属するわけではないこと（どの菌体成分がイオン化しているのか不明なままである）など、現段階では分類学的解析手法として用いるためには多くの改善点を残している。

5. まとめ

本邦はサシミをはじめとして魚介類の生食を好む傾向が強いため、*L. garvieae* に接触する機会は十分にありと予測される。実際に日本の健康人135名を由来とする糞便検体に対して RT-PCR、およびリアルタイム PCR を用いた *L. garvieae* の検出を試みたところ、47名 (36.3%) の検体が陽性となっている³⁹⁾。したがって、1) 健康人の腸内では *L. garvieae* は無症状で一過性を通過しているか、あるいは一部は常在菌として定着している可能性があるが、細菌感染防御機能の低下、特に食道や腸管などから血流中やリンパ流中へ菌が直接アクセスすることを可能とするような粘膜表面での感染バリアの破壊など解剖学的基礎疾患を背景に持つ易感染患者を除いて、基本的に病原性は低い。2) *L. garvieae* は一般の健康者に対しては非病原性と考えられるが、多くの株の中には魚病、ウシ乳腺炎、あるいはヒトの血流感染などを引き起しやすい高病原性株が存在している、以上の2通りの仮説が考えられる。今後は比較ゲノム解析などの情報を基礎として、*L. garvieae* が基本的に低病原性であり日和見感染的な側面を持つのか、あるいは種の中に高病原性株が存在する可能性があるのか否かなどが明らかにされるであろう。治療の点で、これまでの症例報告では β -ラクタム系抗生物質が奏功している。しかしながら染色体性の PBP の変化とともに細菌学的に近縁の関係にある腸球菌や肺炎球菌などから、アミノ配糖体系、マクロライド/リンコサマイド系、グリコペプチド系などに対する耐性遺伝子を獲得することで将来的に耐性菌が出現する可能性、さらに、そのような薬剤耐性遺伝子の環境中でのリザーバーとなる危険性も考慮する必要がある。

繰り返しになるが、*L. garvieae* を含む *Lactococcus* 属

菌は病原性細菌としての認知度が低く、ヒトの臨床検査ではあまり重要視されていないことから、実際に血流感染を起こしていたとしても、よほど注意していない限り検査室における日常のルーチン検査では生化学性状などの点で他の *Streptococcus* 属や *Enterococcus* 属に属する種分類不能菌株として処理されている可能性が考えられる。*Lactococcus* 属菌を検出する方法として、現時点では本稿で紹介したマルチプレックス PCR を利用した方法³⁷⁾が最も効率的であると考えられる。血液培養などにより分離されたものの種判定不能とされた菌株に遭遇した際には、分子遺伝学的な手法を追加して実施し、詳細な同定を行うことが必要と考えられる。

文 献

- 1) Watanabe, Y., T. Naito, K. Kikuchi, Y. Amari, Y. Uehara, H. Isonuma, T. Hisaoka, T. Yoshida, K. Yaginuma, N. Takaya, H. Daida, K. Hiramatsu. 2011. Infective endocarditis with *Lactococcus garvieae* in Japan: A case report. *J. Med. Case Reports* 5: 356.
- 2) Yoshida, T., M. Endo, M. Sakai. 1997. Inglis V. A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 233–23
- 3) Barnes, A. C., C. Guyot, B. G. Hanse, K. Mackenzie, M. T. Horn, A. E. Ellis. 2002. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsule and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 12: 155–168.
- 4) Facklam, R., J. A. Elliott. 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 479–495.
- 5) Garvie, E. I., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips. 1981. A taxonomic study of some strains of streptococci which grow at 10°C but not at 45°C including *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (I. Abteilung, Originale C)* 2: 151–165
- 6) Collins, M. D., J. A. Farrow, B. A. Phillips, O. Kandler. 1983 *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3427–3431.
- 7) Schleifer, K. H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Baelz, M. D. Collins, W. Fischer. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 183–195
- 8) Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C. R. Banner, J. L. Fryer. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 406–409.
- 9) Eldar, A., C. Ghittino, L. Asanta, E. Bozzetta, M. Goria, M. Prearo, H. Bercovier. 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoenphalitis in fish. *Curr. Microbiol.* 32: 85–88.
- 10) Aguado-Urda, M., G. H. López-Campos, J. F. Fernández-Garayzábal, F. Martín-Sánchez, A. Gibello, L. Domínguez, M. M. Blanco. 2010. Analysis of the genome content of *Lactococcus garvieae* by genomic interspecies microarray hybridization. *BMC Microbiol.* 10: 79.
- 11) Aguado-Urda, M., G. H. López-Campos, M. M. Blanco, J. F. Fernández-Garayzábal, M. T. Cutuli, C. Aspiroz, V. López-Alonso, A. Gibello. 2011. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 21881, isolated from a case of human septicaemia. *J. Bacteriol.* 193: 4033–4034.
- 12) Morita, H., H. Toh, K. Oshima, M. Yoshizaki, M. Kawanishi, K. Nakaya, T. Suzuki, E. Miyauchi, Y. Ishii, S. Tanabe, M. Murakami, M. Hattori. 2011. Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae*. *PloS One* 6: e23184.
- 13) Reimundo, P., M. Pignatelli, L. D. Alcaraz, G. D'Auria, A. Moya, J. A. Guijarro. 2011. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* UNIUD074, isolated in Italy from a lactococcosis outbreak. *J. Bacteriol.* 193: 3684–3685.
- 14) Aguado-Urda, M., G. H. López-Campos, A. Gibello, M. T. Cutuli, V. López-Alonso, J. F. Fernández-Garayzábal, M. M. Blanco. 2011. Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 8831, isolated from rainbow trout lactococcosis outbreaks in Spain. *J. Bacteriol.* 193: 4263–4264.
- 15) Wyder, A. B., R. Boss, J. Naskova, T. Kaufmann, A. Steiner, H. U. Graber. 2011. *Streptococcus* spp. and related bacteria: Their identification and their patho-

- genic potential for chronic mastitis—A molecular approach. *Res. Vet. Sci.* 3: 349–357.
- 16) Elliott, J. A., M. D. Collins, N. E. Pigott, R. R. Facklam. 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2731–2734.
 - 17) Fefer, J. J., K. R. Ratzan, S. E. Sharp, E. Saiz. 1998. *Lactococcus garvieae* endocarditis: Report of a case and review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 32: 127–130.
 - 18) James, P. R., S. M. Hardman, D. L. Patterson. 2000. Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: A first case report. *Postgrad. Med. J.* 76: 301–303.
 - 19) Mofredj, A., D. Baraka, G. Kloeti, J. L. Dumont. 2000. *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immunosuppressed patient. *Am. J. Med.* 109: 513–514.
 - 20) Fihman, V., L. Raskine, Z. Barrou, C. Kiffel, J. Riahi, B. Berçot, M. J. Sanson-Le Pors. 2006. *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16S rRNA and *sodA* sequence analysis. *J. Infect.* 52: e3–e6.
 - 21) Yiu, K. H., C. W. Siu, K. K. To, M. H. Jim, K. L. Lee, C. P. Lau, H. F. Tse. 2007. A rare cause of infective endocarditis; *Lactococcus garvieae*. *Int. J. Cardiol.* 114: 286–287.
 - 22) Vinh D. C., K. A. Nichol, F. Rand, J. M. Embil. 2006. Native-valve bacterial endocarditis caused by *Lactococcus garvieae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56: 91–94.
 - 23) Wang, C. Y., H. S. Shie, S. C. Chen, J. P. Huang, I. C. Hsieh, M. S. Wen, F. C. Lin, D. Wu. 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *Int. J. Clin. Pract.* 61: 68–73.
 - 24) Li, W. K., Y. S. Chen, S. R. Wann, Y. C. Liu, H. C. Tsai. 2008. *Lactococcus garvieae* endocarditis with initial presentation of acute cerebral infarction in a healthy immunocompetent man. *Intern. Med.* 47: 1143–1146.
 - 25) Wilbring, M., K. Alexiou, H. Reichenspurner, K. Matschke, S. M. Tugtekin. 2011. *Lactococcus garvieae* causing zoonotic prosthetic valve endocarditis. *Clin. Res. Cardiol.* 100: 545–546.
 - 26) Aubin, G. G., P. Bémer, A. Guillouzuic, L. Crémet, S. Touchais, N. Fraquet, D. Boutoille, A. Reynaud, D. Lepelletier, S. Corvec. 2011. First report of a hip prosthetic and joint infection caused by *Lactococcus garvieae* in a woman fishmonger. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2074–2076.
 - 27) Chan, J. F., P. C. Woo, J. L. Teng, S. K. Lau, S. S. Leung, F. C. Tam, K. Y. Yuen. 2011. Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. *Infection* 39: 259–64.
 - 28) Chapot-Chartier, M. P., E. Vinogradov, I. Sadovskaya, G. Andre, M. Y. Mistou, P. Trieu-Cuot, S. Furlan, E. Bidnenko, P. Courtin, C. Péchoux, P. Hols, Y. F. Dufrêne, S. Kulakauskas. 2010. Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *J. Biol. Chem.* 285: 10464–10471.
 - 29) van Kranenburg, R., H. R. Vos, I. I. van Swam, M. Kleerebezem, W. M. de Vos. 1999. Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *J. Bacteriol.* 181: 6347–6353.
 - 30) van Kranenburg, R., J. D. Marugg, I. I. van Swam, N. J. Willem, W. M. de Vos. 1997. Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 24: 387–397.
 - 31) Reimundo, P, A. Menéndez, J. Méndez, D. Pérez-Pascual, R. Navais, E. Gómez, A. F. Braña, J. A. Guijarro. 2010. *dltA* gene mutation in the teichoic acids alanylation system of *Lactococcus garvieae* results in diminished proliferation in its natural host. *Vet. Microbiol.* 143: 434–439.
 - 32) Collins, L. V., S. A. Kristian, C. Weidenmaier, M. Faigle, K. P. Van Kessel, J. A. Van Strijp, F. Götz, B. Neumeister, Peschel A. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* 186: 214–219.
 - 33) Poyart, C., E. Pellegrini, M. Marceau, M. Baptista, F. Jaubert, M. C. Lamy, P. Trieu-Cuot. 2003. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol. Microbiol.* 49: 1615–1625.

- 34) Schmidtke, L. M., J. Carson. 0000. Antigen recognition by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of whole cell proteins expressed by *Lactococcus garvieae* when obtained directly from fish and under iron limited culture conditions. *Vet. Microbiol.* 93: 63–71.
- 35) Poyart, C., G. Quesnes, P. Trieu-Cuot. 2000. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38: 415–8.
- 36) Kubota, H., H. Tsuji, K. Matsuda, T. Kurakawa, T. Asahara, K. Nomoto. 2010. Detection of human intestinal catalase-negative, Gram-positive cocci by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5440–5451.
- 37) Odamaki, T., S. Yonezawa, M. Kitahara, Y. Sugahara, J. Z. Xiao, T. Yaeshima, K. Iwatsuki, M. Ohkuma. 2011. Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species. *Let. Appl. Microbiol.* 52: 491–6.
- 38) Tanigawa, K., H. Kawabata, K. Watanabe. 2010. Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 4055–4062.
- 39) 内山成人, 木村弘之, 上野友美, 鈴木淑水, 只野健太郎, 石見佳子. 2007. *Lactococcus garvieae* の食品中からの検出およびヒト腸内常在性. *腸内細菌学雑誌* 21: 221–225.

Lactococcus garvieae, a Causative Agent in Human Diseases

Akira Okamoto, Yoshichika Arakawa

Molecular Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Lactococcus garvieae is known to be a causative agent of bovine mastitis, and streptococcosis in farmed fish. Although *L. garvieae* is rarely isolated in blood culture as a causative agent of systemic infection, such as endocarditis, it is considered to be of low virulence in humans, because it is often isolated from feces from healthy individuals. However, it seems difficult to differentiate this pathogen from other pathogenic cocci such as *Enterococcus* spp. or *Streptococcus* spp., due to the resemblance of their microscopic and phenotypic characteristics. Although it might be diagnosed with PCR-based molecular techniques in a limited number of core laboratories, it is possibly misdiagnosed as an unknown strain that belongs to the genera *Enterococcus* or *Streptococcus*. Several case reports have suggested that the risk factors for *L. garvieae* are: (i) close contact with raw seafood, including eating raw fish or working on a fish farm; or (ii) a medical history of circulatory or gastrointestinal symptoms. More attention should be paid to *L. garvieae* infection in Japan, where there is a well-established culture for eating raw seafood, and the section of the population that possesses risk factors has increased with the aging society.