

[症 例]

血液培養から *Granulicatella elegans* が分離された感染性心内膜炎の一例野々宮百合子¹⁾・三浦明子¹⁾・山田友紀¹⁾・黒田牧子¹⁾・辻村正雪¹⁾・小畑律子¹⁾山端久美子¹⁾・小笠原理恵²⁾・諏訪部 章²⁾・林 将大³⁾・河村好章⁴⁾¹⁾ 岩手医科大学附属病院中央臨床検査部²⁾ 同臨床検査医学講座³⁾ 岐阜大学大学院医学研究科再生分子統御学講座病原体制御学分野⁴⁾ 愛知学院大学薬学部医療薬学科微生物学講座

(平成 17 年 4 月 21 日受付, 平成 18 年 3 月 27 日受理)

症例は, 53 歳の女性。歯科治療後に咳, 微熱が出現し, 近くの総合病院で, 感染性心内膜炎による僧帽弁閉鎖不全・大動脈弁閉鎖不全と診断され, 当院に手術目的で入院。入院直後に行った血液培養検体から本邦で極めてまれな nutritionally variant streptococci (NVS) の一種である *Granulicatella elegans* を分離同定した。本症例の血液培養の分離培地として, NVS が発育できるブルセラ HK (hemin, vitamin K1) 培地や羊血液寒天培地 M58 を使用したこと, 簡易同定のほかに遺伝子検査を行ったことが *G. elegans* と同定できた理由と考えられた。

Key words: 血液培養, *Granulicatella elegans*, nutritionally variant streptococci

はじめに

Nutritionally variant streptococci (NVS) は, 1961 年に Frenkel らによって感染性心内膜炎の血液培養から, 同時に発育した他の菌に衛星現象を示す菌として最初に報告された¹⁾。Viridans streptococci に属するとされた *Streptococcus adjacens* と *Streptococcus defectivus* の 2 菌種は, L-cysteine または pyridoxal (vitamin B₆) 要求性の NVS であり, 1995 年, Kawamura らにより, 16S rRNA を解析することによって *Abiotrophia adiacens* と *A. defectiva* として *Abiotrophia* 属に転属させることが提唱された²⁾。*Abiotrophia elegans* は急性心内膜炎の患者から分離され, 衛星現象を示すものの, それまでの *Abiotrophia* 属の 2 菌種の範疇にあてはまらないことから, 新菌種として 1999 年に記載された菌種である³⁾。2000 年に詳細な 16S rRNA 解析の結果, *A. elegans* は *A. adiacens* とともに新属 *Granulicatella* 属に移籍

され, *G. elegans*, *G. adiacens* として分類された⁴⁾。

G. elegans, *G. adiacens*, *A. defectiva* などの NVS は, 口腔内常在菌の一つであり, 特に感染性心内膜炎の起炎菌として重要とされている^{5), 6)}。当大学歯学部口腔微生物教室でも健康成人ブランクから, *A. defectiva* や *G. adiacens* が, 10⁴~10⁵ 個の常在菌の中に数個は認められるとの報告がある⁷⁾。また, 血液, 腫瘍, 口腔内潰瘍, 尿道などの臨床材料からの検出も報告されている⁸⁾。欧米においては, 感染性心内膜炎から分離された viridans group streptococci の 5~10% が NVS との報告^{9), 10)}があるが, 本邦では, 1982 年の藤田らの報告¹¹⁾, 1993 年に菊池らの報告¹²⁾があり, 欧米に比べると, いまだに極めて報告が少ない。今回われわれは, *G. elegans* を分離できた感染性心内膜炎の症例を経験したので報告する。

症 例

患 者: 53 歳の女性, 縫製会社勤務。

既往歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 平成 13 年 11 月から平成 14 年 3 月まで歯科治療を行っていた。平成 14 年 6 月 10 日頃より咳, 微熱などの感冒様症状が出現し, 6 月 25 日近医を受診した。胸部レントゲン写真で心陰影の拡大を認めたため, 慢性心不全の診断で, 総合病院を紹介受診し,

著者連絡先: (〒020-8505) 岩手県盛岡市内丸 19-1
岩手医科大学附属病院中央臨床検査部
山端久美子
TEL: 019-651-5111
FAX: 019-653-6640
E-mail: Kumiko.Yamahata@j.iwate-med.ac.jp

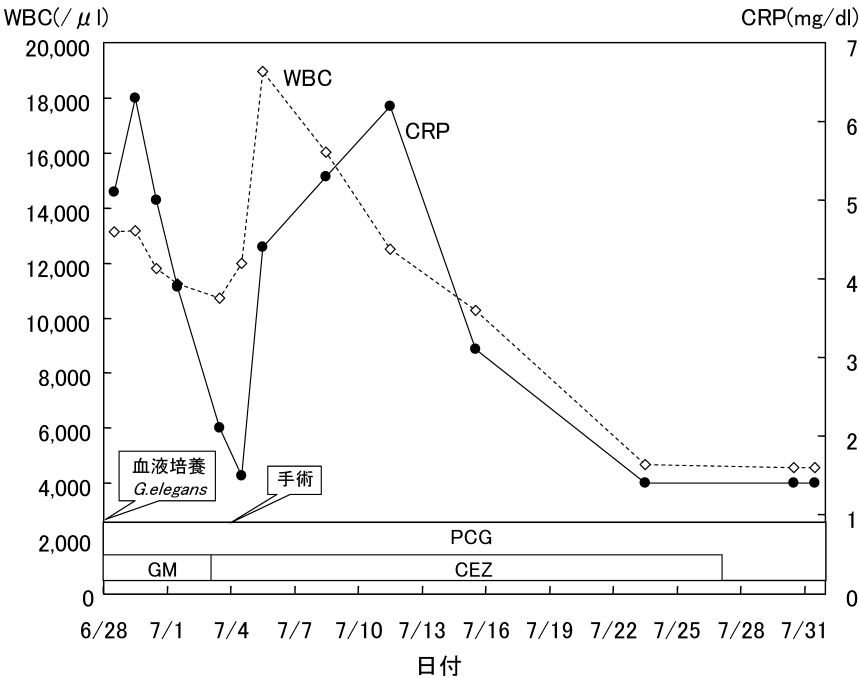


図 1 臨床経過

表 1-1 初診時検査所見

生化学検査			(基準範囲)			生化学検査			(基準範囲)		
TP (g/dl)	6.3		6.5	~	8.2	γ GT (IU/L)	67		5	~	55
ALB (g/dl)	2.9		4.3	~	5.4	CHE (IU/L)	204		207	~	452
Na (mEq/L)	141		135	~	148	ALP (IU/L)	317		99	~	340
K (mEq/L)	3.7		3.5	~	5.0	LAP (IU/L)	50		34	~	69
CL (mEq/L)	109		96	~	111	T-BiL (mg/dl)	0.9		0.2	~	1.2
UN (mg/dl)	8.5		9	~	20	D-BiL (mg/dl)	0.3		0	~	0.6
CRE (mg/dl)	0.6		0.4	~	1.1	I-BiL (mg/dl)	0.6		0	~	0.6
UA (mg/dl)	3.3		2	~	7	GLU (mg/dl)	143		60	~	100
AST (IU/L)	17		10	~	32	CRP (mg/dl)	5.1		0.3	以下	
ALT (IU/L)	25		7	~	27	CK (IU/L)	34		43	~	170
LDH (IU/L)	323		118	~	257	CK-MB (IU/L)	5		8	~	21

表 1-2 初診時検査所見

血液検査		(基準範囲)	
WBC (μl)	13,120	3,210	~9,680
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	3.79	3.84	~4.92
Hb (g/dl)	10.3	11.7	~15.1
Ht (%)	32.4	35.5	~45.0
MCV (fl)	85.5	85.0	~101.1
MCH (pg)	27.2	28.5	~33.8
MCHC (g/dl)	31.9	32.3	~34.8
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	149	150	~360

心エコー検査で大動脈弁および僧帽弁に疣贅と弁破壊を認め、感染性心内膜炎と診断された。感染性心内膜炎が原因による僧帽弁閉鎖不全・大動脈弁閉鎖不全と診断され、6月28日当院循環器センターに手術目的で入院となった。入院時検査では、白血球数 13,120 μl , CRP 5.1 mg/dl と炎症所見を認めた。臨床経過と入院時検査所見の主な成績を図 1 と表 1 に示す。

細菌検査では、入院直後の動脈血培養と静脈血培養のいずれからでも *G. elegans* が分離された。他検体材料の細菌検査では、咽頭材料からは α -streptococci と

Neisseria sp. の常在菌のみが検出され、鼻腔、尿などからは陰性であった。その後 *G. elegans* は検出されなかった (表 2)。

循環器センター入院後、心不全の治療および benzylpenicillin (PCG) を 1,200 万単位/日, gentamicin (GM) 60 mg/日の抗菌薬投与を行い、7 月 4 日巨大疣贅除去のため、準緊急で手術を行った。分離された菌は、PCG, GM ともに感受性を示し、第一選択薬剤で治療に効を奏したと思われるその後発熱はなかった。

術後経過は良好で、白血球数 4,580 μ l, CRP 1.4 mg/dl となり、炎症の鎮静化を認めたため 7 月 31 日に退院となった。

細菌学的所見

1) 血液培養検査

血液培養検査は、レズン入り好気ボトルと嫌気ボトルの 2 本をセットとして使用し、自動血液培養装置 BACTEC9120 (ベクトン・ディッキンソン) で行った。

分離培養は羊血液寒天培地 M58 (栄研化学, 以下

M58), プルセラ HK (hemin, vitamin K1) 培地 (RS) (極東製薬), チョコレート寒天培地 (栄研化学) を使用した。プルセラ HK 培地は嫌気培養を行い、チョコレート寒天培地は炭酸ガス培養を行った。

本症例の検体が BACTEC9120 で菌陽性であることを検知後、グラム染色と分離培養を行った。グラム染色で、グラム陽性の球桿菌が認められ、一部連鎖しているものもあった (図 2)。分離培養では、1 日目に、嫌気培養のプルセラ HK 培地に菌の発育を認めた。S (smooth) 型 α 溶血様のごく小さいコロニーが観察された。偏性嫌気性菌を疑い、好気性、嫌気性の確認をした。この時点では、M58 にもチョコレート寒天培地

表 2 培養検査結果

6 月 28 日	動脈血培養より <i>G. elegans</i> 静脈血培養より <i>G. elegans</i>
7 月 1 日	咽頭粘液 α -Streptococci (2+) <i>Neisseria</i> sp. (3+)
	鼻腔・鼻汁 (—)
	カテーテル尿 (—)
7 月 4 日	大動脈弁疣贅 (—)
	僧房弁疣贅 (—)
7 月 9 日	カテーテルチューブ (シース先端) (—)

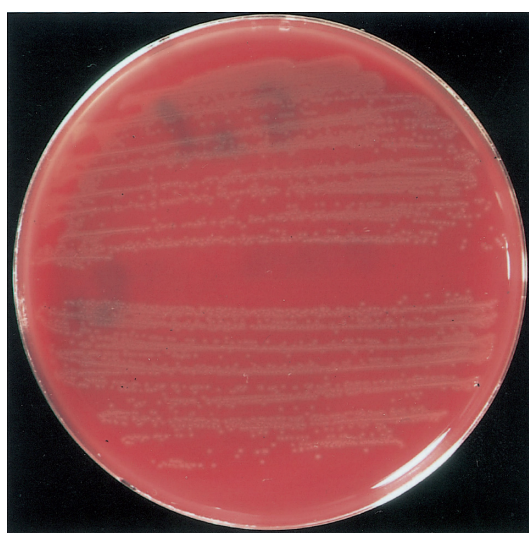


図 3 羊血液寒天培地 M58 に発育した *G. elegans* 48 時間後のコロニー

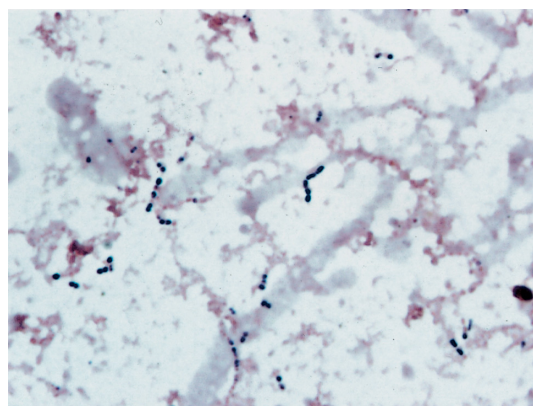


図 2 血液培養分離直後の染色像
球桿菌と球菌の混在した染色像

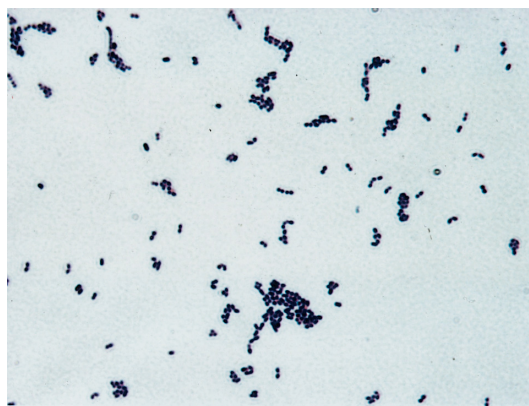


図 4 コロニーの染色像
連鎖した球菌の染色像

にも発育は認められなかった。(後日 M58 に再培養したところ、微小ながらコロニーが認められた。) 2 日目には、M58 とチョコレート寒天培地にも α 溶血を示す微小コロニーが観察された (図 3)。プルセラ HK 培地に発育した菌は、耐気性試験により、嫌気性菌は否定された。M58 やプルセラ HK 培地などに発育したコロニーの染色像は、グラム陽性の連鎖した球菌であった (図 4)。

2) 同定検査および結果

M58 とプルセラ HK 培地に発育したコロニーのグラム染色所見から、分離当初は球桿菌であったが、継

代することで連鎖球菌の染色像から、多形性を示すグラム陽性の球菌と考えられた。嫌気培養のプルセラ HK 培養で良好な発育を示したが、耐気性試験により、嫌気性菌は否定された。M58 とチョコレート寒天培地に 48 時間培養後、微小な α 溶血のコロニーが観察された。以上から NVS を疑い、当大学歯学部口腔微生物教室に同定を依頼した。

微生物教室では *Staphylococcus aureus* の近傍に認められる衛星現象 (図 5) を確認した。簡易同定の一つであるレンサ球菌同定キットーバクトストレプトグラム (和光純薬) による生化学的性状検査を行った。しかし、この方法では、*S. adjacens* と *S. defectivus* の二つの NVS しか菌名が同定できない。他の検査として、*Micrococcus luteus* の溶菌性と、 β -glucuronidase (−), maltose (+), arginine (+) などの生化学的性状を検討した (表 3)。最終的に、16S rRNA の塩基配列 (1,399 bp) を決定し、系統解析を行ったところ、*G. elegans* 基準株および参考株 (DDBJ accession number AF016390, Y15413, AB22026, Y15408) と 99% の塩基配列一致率があった。系統樹解析においても本分離株は *G. elegans* と同一のクラスターを形成していた (図 6)。以上のことから本分離株は *G. elegans* であると同定した。

考 察

近年、血液培養からのグラム陽性球菌が検出される頻度が増してきている。当検査室での集計でも、2003 年に血液培養で陽性となった検体のうち、真菌を含めない統計では、グラム陽性菌の検出率は約 60% と高率で、次にグラム陰性桿菌が多い。グラム陽性菌の中



図 5 *Staphylococcus aureus* 発育帯周囲の衛星現象

表 3 *Abiotrophia* and *Granulicatella* species の生化学的性状の相違点

Phenotypic Characteristic	Results for species			
	<i>A. defectiva</i>	<i>G. adiacens</i>	<i>G. elegans</i>	分離菌
Production of:				
α -Galactosidase	+	−	−	−
β -Galactosidase	+	−	−	−
β -Glucuronidase	−	+	−	−
PYR	+	+	+	+
Hydrolysis of:				
Hippurate	−	−	+	+
Arginine	−	−	+	+
Acid production from:				
Trehalose	+	−	−	−
Sucrose	+	+	+	+
Lactose	+	−	−	−
Inulin	−	−	−	−

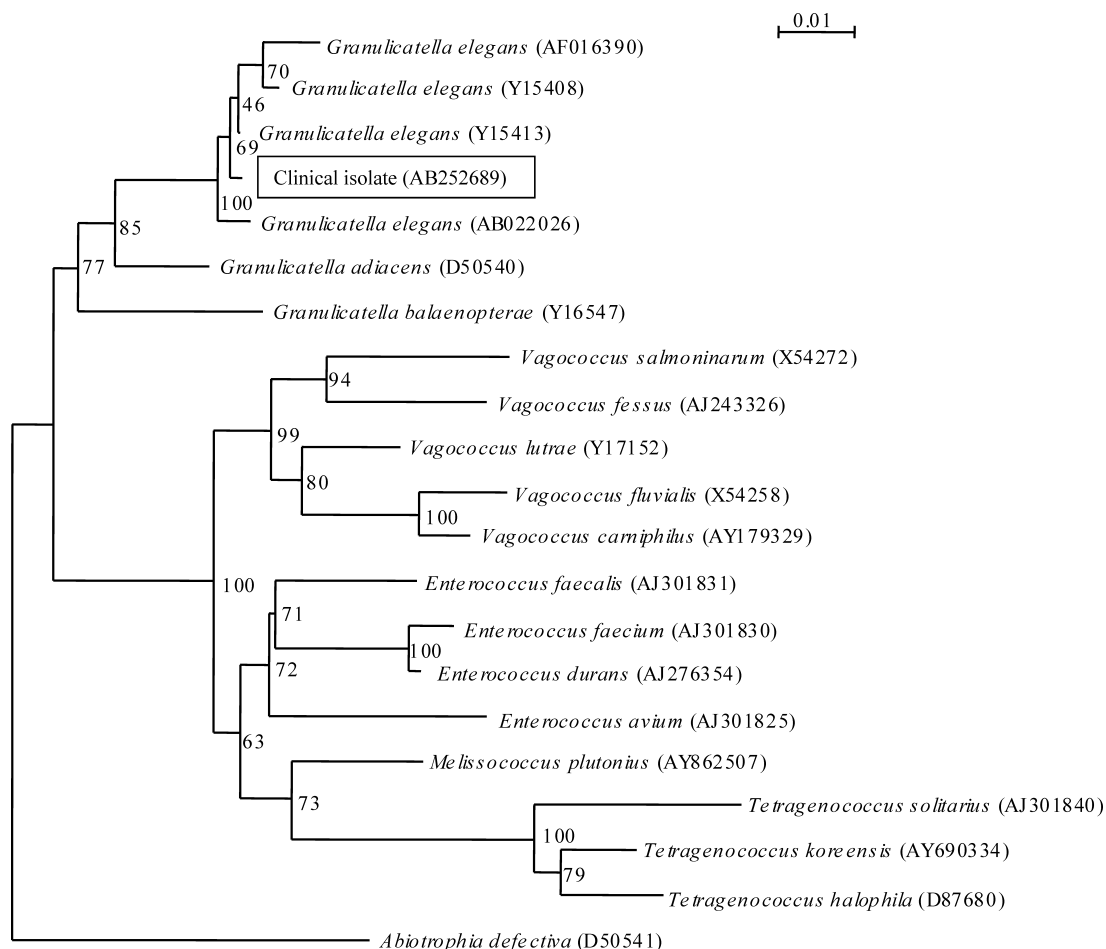


図6 系統樹解析

では *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp. が最も多く、感染性心内膜炎の原因菌として知られる *Streptococcus* spp. は 1.5% 前後の検出率を示す。欧米では、viridans group streptococci の 5~10% が NVS であった^{9), 10)}と報告があるが当院では極めて件数は少ない。

抜歯後に生じる一過性菌血症の大部分が口腔内細菌によることが多く、基礎疾患を有する患者の心内膜炎の起炎菌として重要であり、菌検索は敗血症と同様に血液培養を用いて検査する。しかし、グラム染色で菌が確認できても、発育できないかまたは遅発育となり、検出できないことや同定不能とされることが多い。

今回検出された *G. elegans* は NVS であり、通常の培地では発育しないので分離培養の段階でどのような培地を使用するかは重要な要素である。藤田らは、コ

ロンビア寒天やブルセラ寒天を基礎培地とした羊血液寒天培地には発育するが、トリブチケース寒天やハートインフュージョン寒天を基礎とした血液寒天培地には発育を認めないと報告している¹¹⁾。また、江成らは、ブルセラ HK 培地が NVS の分離に適していると報告¹³⁾している。小栗らは、M58 に NVS が安定して発育することを報告している¹⁴⁾。当検査室では NVS が発育できる M58 やブルセラ HK 培地を日常の血液培養の分離培地として使用していたことが *G. elegans* を分離できた要因と考えられる。

また、当初は本菌がグラム陽性菌であったので、Vitek-GPI (バイオメリュール) にて同定を行ったところ *Gemella* spp. と判定された。菊池らは、発育が遅く、反応をほとんど示さない菌は誤同定されることが多く、DNA-DNA hybridization などで確認すると、*Gemella* spp. と同定されることはほとんどなく、キッ

トで判定した *Gemella* spp. に関しては信頼に乏しいことを指摘している¹⁵⁾。また、嫌気培養で発育が良好なため、48時間の好気培養では発育が弱かったり、発育を認めなかったりするので、嫌気性菌や *Streptococcus* spp. と同定される可能性もあると示唆している。一方、ストレプトグラムなどの簡易キットでの同定方法であれば、NVS は *A. defectivus* か *G. adiacens* と同定されてしまい、当検査室でも *G. adiacens* と同定するところであったが、当大学歯学部口腔微生物教室の協力で *G. elegans* と同定することができた。さらに、同定を確定するため 16S rRNA 塩基配列解析 (1,399 bp) と系統樹解析を岐阜大学大学院医学研究科病原体制御学分野に依頼した。

また、患者は3カ月前から歯科治療を受けており、抜歯後に発熱があったこと、口腔微生物教室で同患者のプラークからも *G. elegans* が検出されていることなどを考慮すると侵入門戸は歯科治療中の口腔内と推察された。

NVS は口腔内や腸管内などの常在菌でもあるが、特にコンプロマイズドホストの場合は、本菌も起炎菌として、常に念頭において、見逃しのない分離培養や誤同定の少ない方法で検査を進めていかなければいけないと痛感した。現在では遺伝子検査などによる同定法が開発されてきており、ますます有用になると思われる。また、今回のように歯科治療後などの患者情報や検体提出状況は、培地の選択や培養条件等を考えるうえで有用な情報となり、染色段階で NVS を疑って検査を進めていったことが結果に大きく影響したと考える。その意味で、臨床とコミュニケーションを図りながら検査を進めていくことが必要であり、迅速かつ正確な結果を得る努力をしていくことが大切と考える。

謝 辞 臨床分離株を同定するにあたりご協力いただいた岩手医科大学歯学部口腔微生物教室に深謝いたします。

引用文献

- 1) Frenkel, A., W. Hirsch. 1961. Spontaneous development of L forms of streptococci requiring secretions of other bacteria or sulphhydryl compounds for normal growth. *Nature (London)* 191: 728-730.
- 2) Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, et al. 1995. Transfer of *Streptococcus adiacens* and *Streptococcus defectivus* to *Abiotrophia* gen. nov. as *Abiotrophia adiacens* comb. nov. and *Abiotrophia defectiva* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 798-803.
- 3) Roggenkamp, A., M. Abel-Horn, K.-H., Trebesch, et al. 1998. *Abiotrophia elegans* sp. nov., a possible pathogen in patients with culture-negative endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 100-104.
- 4) Collins, M. D., P. A. Lawson. 2000. The genus *Abiotrophia* (Kawamura, et al.) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adiacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 50: 365-369.
- 5) Casalta, J. P., G. Habib, B. La Scola, et al. 2002. Molecular diagnosis of *Granulicatella elegans* on the cardiac valve of a patient with culture-negative endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1845-1847.
- 6) Christensen, J. J., R. R. Facklam. 2001. *Granulicatella* and *Abiotrophia* species from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3520-3523.
- 7) Ohara-Nemoto, Y., S. Tajika, M. Sasaki, et al. 1997. Identification of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva* by 16S rRNA gene PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2458-2463.
- 8) Ruoff, K. L. 1991. Nutritionally variant streptococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 184-190.
- 9) Peterson, C. E., J. L. Cook, J. P. Burke. 1981. Media-dependent subculture of nutritionally variant streptococci. *Am. J. Clin. Pathol.* 4: 634-636.
- 10) Wilson, W. R., J. E. Geraci. 1985. Treatment of streptococcal infective endocarditis. *Am. J. Med.* 78: 128-137.
- 11) 藤田信一, 松原藤雄, 野田八嗣. 1982. Nutritionally variant streptococcus による感染性心内膜炎の1例. *感染症学雑誌* 56: 705-709.
- 12) 菊地 賢, 江成唯子, 柴田雄介, 他 1993. Nutritionally variant streptococcus による感染性心内膜炎について. *日臨微誌* 1: 71-72.
- 13) 江成 博, 島田園子. 1995. 検査材料から *Streptococcus adiacens* を分離するための培地の検討. *日臨微誌* 5: 30-36.
- 14) 小栗豊子. 2000. 検査材料別検査法と検出菌. *臨床微生物検査ハンドブック* 第2版: 60
- 15) Kikuchi, K., T. Enari, K. Totsuka, et al. 1995. Comparison of phenotypic characteristics, DNA-DNA hybridization results, and results with a commercial rapid biochemical and enzymatic reaction system for identification of viridans group streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1215-1222.

A Case of Infectious Endocarditis Caused by *Granulicatella elegans*

Yuriko Nonomiya,¹⁾ Akiko Miura,¹⁾ Yuki Yamada,¹⁾ Makiko Kurota,¹⁾ Masayuki Tsujimura,¹⁾
Ritsuko Obata,¹⁾ Kumiko Yamahata,¹⁾ Rie Ogasawara,²⁾ Akira Suwabe,²⁾
Masahiro Hayashi,³⁾ Yoshiaki Kawamura⁴⁾

¹⁾ Central Clinical Laboratory, Iwate Medical University Hospital

²⁾ The Department of Laboratory Medicine, School of Medicine
Iwate Medical University

³⁾ Department of Microbiology Regeneration and Advanced Medical Science, Gifu University Graduate School of Medicine

⁴⁾ Department of Microbiology Aichigakuin University, School of Pharmacy

We report the case of a 53-year-old woman who suffered from cough and slight fever after dental therapy. She was taken to the nearest general hospital and diagnosed with mitral and aortic valve regurgitation due to infectious endocarditis, then to our Iwate Medical University Memorial Heart Center for surgery. *Granulicatella elegans*, which is one of the nutritionally variant streptococci (NVS) and is rarely reported in Japan, was isolated from consecutive arterial and venous blood cultures. We were able to identify this rare bacterium because the medium we routinely use to isolate blood cultures, Brucella HK medium (hemin, vitamin K1) and sheep blood agar M58, was suitable for NVS, and because we performed a genetic analysis in addition to using a simple identification kit.