

[症 例]

真珠腫性中耳炎患者から分離された非溶血性 *Streptococcus pyogenes* の 1 症例

高橋美紀・四方田幸恵・村上正巳
群馬大学医学部附属病院・検査部

(平成 21 年 12 月 28 日受付, 平成 22 年 12 月 22 日受理)

症例は 11 歳, 男性。左耳難聴, 耳漏を主訴に近医を受診し真珠腫性中耳炎と診断され, 当院耳鼻科を紹介された。外来受診時の外耳分泌物培養から *Streptococcus pyogenes* および Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) が検出された。*S. pyogenes* のコロニーは典型的な β 溶血を示していた。19 日後の入院時の中耳分泌物培養から *S. pyogenes*, MRSA に加え非溶血性 *S. pyogenes* が検出された。コロニー所見は血液寒天培地ではムコイド状白色の大きな *Enterococcus* 様コロニーで, チョコレート寒天培地ではムコイド状の *Streptococcus pneumoniae* 様のコロニーであった。今回, 検体が無菌材料の中耳分泌物であったため検出できたが, 検査材料や分離培地の種類によっては常在菌との判別が難しく, 日常の検査を行ううえで注意が必要と思われる。

Key words: *Streptococcus pyogenes*, nonhemolytic, otitis media

はじめに

Streptococcus pyogenes は A 群 β 溶血性連鎖球菌 (溶連菌) と呼ばれ, 化膿性炎症を引き起こす代表的な菌種であり, 咽頭炎, 猩紅熱などを起こし, また劇症型溶血連鎖球菌感染症の起炎菌としても知られている。*Streptococcus* 属は主に血清学的分類 (Lancefield の分類¹⁾), 溶血性による分類²⁾, 小林の分類³⁾ などで分類され, なかでも溶血性は臨床材料から起炎菌を探すうえで重要な判別基準となる。

S. pyogenes は一般的に 5% ヒツジ血液寒天培地で培養すると透明・明瞭な β 溶血性を示すが, 今回, 当検査部において非溶血性の *S. pyogenes* を初めて検出したので報告する。

I. 症 例

患者: 11 歳, 男性。

既往歴: 幼少より急性中耳炎を繰り返していた。3 歳で喘息を指摘されたが治療せず (発作なし)。花粉アレルギーあり。

主 訴: 左耳難聴, 耳漏。

現病歴: 主訴を自覚し近医を受診。滲出性中耳炎から移行した真珠腫性中耳炎と診断され, 当院耳鼻科を紹介され 2006 年 8 月 3 日受診した。

臨床経過: 外来初診時の外耳分泌物培養から *S. pyogenes* および Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) が検出された。この時点でのコロニーはすべて典型的な β 溶血を呈していた。

8 月 11 日から 8 月 22 日まで点耳薬として ofloxacin (OFLX) を使用した。8 月 22 日に手術予定のため入院。入院時, 鼓膜の周りに発赤が見られ, 中耳分泌物培養からは *S. pyogenes*, MRSA に加え非溶血性 *S. pyogenes* が検出された。8 月 29 日に手術を行い, 術後の 9 月 6 日に採取された中耳分泌物培養からは非溶血性 *S. pyogenes* と coagulase negative staphylococci が検出された。その後 9 月 15 日の中耳分泌物培養からは菌は認められず, 経過良好のため 9 月 20 日退院となった (Table 1)。

II. 細菌学的検査

検体はいずれもスワブにて提出され, 分泌物の色調, 臭気は特になかった。検体のグラム染色については依頼がなく行っていない。

1. コロニー所見

培養にはポアメディアヒツジ血液寒天培地 (栄研化

著者連絡先: (〒371-8511) 前橋市昭和町3-39-15
群馬大学医学部附属病院・検査部
高橋美紀
TEL: 027-220-8561
FAX: 027-220-8574

Table 1. Clinical course

	8/3	8/11	8/22	8/29	8/31	9/1	9/5	9/6	9/15	9/20
	Hospitalization								Discharge	
	Effusion (External ear)				Effusion (Middle ear)		Effusion (Middle ear)		Effusion (Middle ear)	
<i>S. pyogenes</i>	(+)		(+)				(-)		(-)	
MRSA	(+)		(+)							
Non-hemolytic <i>S. pyogenes</i>			(+)					(+)		
CNS								(+)		
	←→		ABK (for 10 days): DI				←→			
	OFLX (for 12 days): ear drop		←→				←→		MINO (for 5 days): P. O.	

OFLX: ofloxacin, ABK: arbekacin, MINO: minocycline

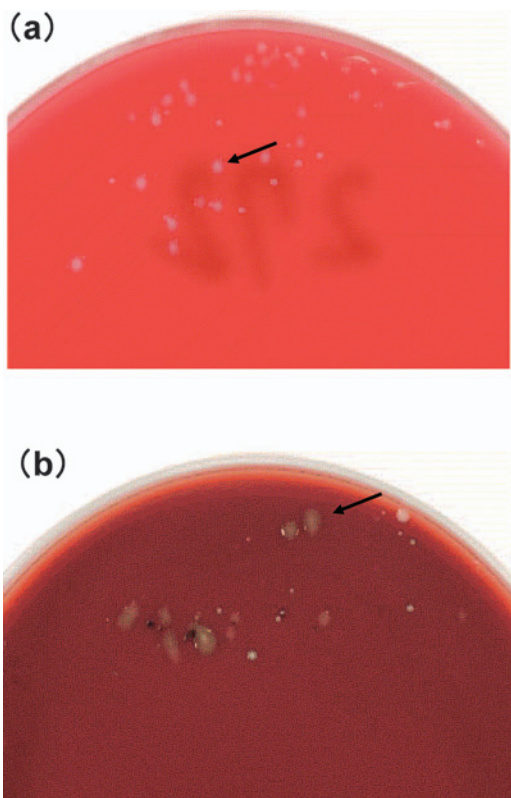


Fig. 1. The arrows indicate non-hemolytic *S. pyogenes*
 (a) Growth of non-hemolytic *S. pyogenes* on sheep blood agar for 18 h at 35°C.
 (b) Growth of non-hemolytic *S. pyogenes* on chocolate agar for 18 h at 35°C.

学) と BY チョコレート寒天培地 (ベクトン・デッキンソン) を使用し炭酸ガス培養にて 35°C 18 時間培養を行った。

術後に提出された検体より分離した *S. pyogenes* のコロニー所見を Fig. 1 に示す。血液寒天培地において、ムコイド状で白色、大きな *Enterococcus* 様コロニーであった。チョコレート寒天培地においてはムコイド状の *Streptococcus pneumoniae* 様のコロニーであった。これらの穿刺培養、嫌気性培養を行ったがいずれも β 溶血を示さなかった。

2. 同定

当検査室では通常 *S. pyogenes* が疑われた場合、ストレプト LA (デンカ生研) を用いてスライドラテックス凝集反応により群別を行い、その結果を報告している。しかし今回検出された非溶血性 *S. pyogenes* はコロニー所見から *Enterococcus* spp. または *S. pneumoniae* を疑い、グラム染色、カタラーゼテスト、オプトヒン検査とともに API 20 STREP (シスメックス・ピオメリュー) を用いて菌種同定を行った。

グラム染色の結果はグラム陽性の連鎖球菌で、カタラーゼテスト陰性、オプトヒン耐性であった。API 20 STREP では Table 2 の性状を呈し 99.9% の確率で *S. pyogenes* と同定された。確認のためラテックス凝集試験を行ったところ A 群に群別された。

3. 薬剤感受性

Clinical and Laboratory Standards Institute に従い微量液体希釈法にて MIC を測定した。マイクロファスト 3J (SIEMENS) パネルを用い、液体培地には

Table 2. Result of API 20 STREP

Test code	Result
Voges-Proskauer test	(-)
Hippurate	(-)
Esculine	(-)
Pyrrolidonyl arylamidase	(+)
α -Galactosidase	(-)
β -Glucuronidase	(-)
β -Galactosidase	(-)
Alkaline phosphatase	(+)
Leucine arylamidase	(+)
Arginine dihydrolase	(+)
Ribose	(-)
Arabinose	(-)
Mannitol	(-)
Sorbitol	(-)
Lactose	(+)
Trehalose	(+)
Inulin	(-)
Raffinose	(-)
Amidon	(+)
Glycogen	(+)
β -Hemolysis	(-)

Biotype: O161413

3% ウマ溶血血加ミューラーヒントン培地 (SIEMENS) を使用した。35°C 好気下で 20 時間培養後に判定した。

薬剤感受性の結果を Table 3 に示す。マクロライド系薬が耐性 (R) となった以外は測定した薬剤すべて感受性 (S) で β 溶血株と非溶血性 *S. pyogenes* に差はなかった。

4. コロニーの溶血性比較

本症例より分離した溶血株と非溶血株を意図的に生理食塩水に混合し、当検査部で使用している培地のほかに市販されている 4 社の血液寒天培地に分離し、炭酸ガス培養にて 35°C 18 時間培養を行った。いずれも溶血株は明瞭な β 溶血を示すが、非溶血株は β 溶血を示さないことが確認された。なかにはコロニーが小さく明瞭な α 溶血が認められ、*Streptococcus viridans* グループ様のコロニー性状を示す培地もあった (Fig. 2)。

III. 考 察

今回、当検査部において非溶血性の *S. pyogenes* を初めて検出した。*S. pyogenes* の代謝産物には酸素に不安定で抗原性が強い Streptolysin O と酸素に安定

Table 3. Antibiotic susceptibilities of *S. pyogenes*

	β -Hemolytic strain		Non-hemolytic strain	
	MIC (μ g/ml)		MIC (μ g/ml)	
Benzylpenicillin	<=0.03	S	<=0.03	S
Ampicillin	<=0.06	S	<=0.06	S
Sulbactam/Ampicillin	<=0.25	S	<=0.25	S
Clavulanic acid/Amoxicillin	<=1	(N/A)	<=1	(N/A)
Cefotaxime	<=0.06	S	<=0.06	S
Cefotiam	<=0.5	(N/A)	<=0.5	(N/A)
Cefozopran	<=0.06	S	<=0.06	S
Cefepime	<=0.5	S	<=0.5	S
Cefditoren	<=0.06	(N/A)	<=0.06	(N/A)
Cefixime	<=0.12	(N/A)	0.25	(N/A)
Meropenem	<=0.12	(N/A)	<=0.12	(N/A)
Erythromycin	>2	R	>2	R
Clarithromycin	>2	R	>2	R
Clindamycin	<=0.12	S	<=0.12	S
Levofloxacin	0.5	S	1	S
Tetracycline	<=0.5	S	<=0.5	S
Chloramphenicol	<=4	S	<=4	S
Rifampicin	<=1	(N/A)	<=1	(N/A)
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	<=0.5	(N/A)	4	(N/A)
Vancomycin	0.5	S	1	S

S: susceptible, R: resistant, N/A: not applicable

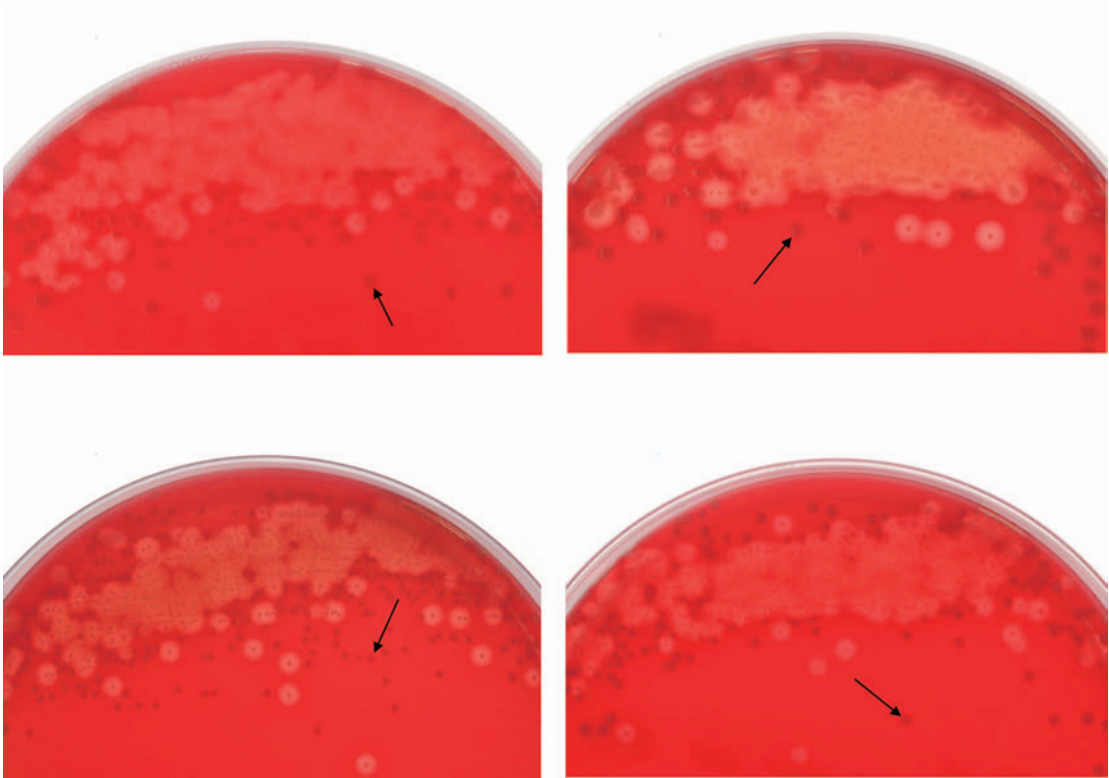


Fig. 2. Comparison of colonies properties on sheep blood agar for 18 h at 35°C

で抗原性は弱い Streptolysin S があり、溶血性に関与するのは後者である。ほとんどの株が両者を産生する。*S. pyogenes* の変異株に関しては、1942 年にイギリスの病院で Streptolysin O は産生しているが、Streptolysin S をもっていない *S. pyogenes* のアウトブレイク例⁴⁾が、ニュージーランドでも Streptolysin S を発現しておらず Streptolysin O もほとんどわずしかか産生していない *S. pyogenes* の報告⁵⁾がある。また、近年では 2002 年に非溶血株により引き起こされた肺炎による死亡例⁶⁾が報告されている。このように外国ではいくつかの変異株についての報告例があるが、国内においては筆者らの知る限り設楽ら⁷⁾生方ら⁸⁾の報告のみで、本例はまれな例と考えられる。抗菌薬投与前に分離された *S. pyogenes* はすべて β 溶血のコロニーであったが OFLX を使い始めて 12 日後に非溶血株も分離された。本菌が分離された要因の追跡は臨床症状と抗菌薬以外詳細な臨床データが得られなかったため明らかにすることはできなかった。

今回、入手可能な 5 社の血液寒天培地を用いコロニー性状を比較したところ、溶血株は明瞭な β 溶血を示したが、非溶血株は培地の種類により多彩な形態性

状を呈していた。

日常検査において連鎖球菌を分離し、同定する際に、溶血性状が大きな指標となる。*S. pyogenes* は一般的に明瞭な β 溶血を示すことから、臨床検査材料からの分離は比較的容易であるが、非溶血株においては検査材料や、分離培地の種類によっては常在菌との判別が難しく、見逃されやすいので注意が必要と思われる。今回の株についても材料が中耳分泌物でムコイド株であったため検出できたが、Glossy 型コロニーの場合、常在菌が混在する部位では α または γ 溶血連鎖球菌として見逃されていた可能性は否定できない。非典型的コロニーを分離した場合、臨床とのコンタクトをとって分離された菌をさまざまな方法で同定を試みるべきである。抗菌薬の使用状況によってはこのような変異株も存在することを念頭において検査を行う必要があると思われる。

文 献

- 1) Lancefield, R. C. 1993. A serological differentiation of human and other group of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57: 571-595.

- 2) Brown, J. H. 1919. The use of blood agar for the study of streptococci. Monograph, No. 9, 122, Rockefeller Institute for Medical Research, New York.
- 3) 小林六造. 1940. 溶血連鎖球菌の病原性. 日本医事新報 905: 217.
- 4) Colebrook, L., S. D. Elliott, W. R. Maxted, C. W. Morley, M. Mortell. 1942. Non-haemolytic group-A streptococci. Lancet ii: 30-31.
- 5) Dierksen, K. P., J. R. Tagg. 2000. Hemolysin-deficient variants of *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* may be overlooked aetiological agents of pharyngitis. J. Med. Microbiol. 49: 811-816.
- 6) Taylor, M. B., T. Barkham. 2002. Fatal case of *Pneumonia* caused by a nonhemolytic strain of *Streptococcus pyogenes*. J. Clin. Microbiol. 40: 2311-2312.
- 7) 設楽政次, 設楽正登, 吉元加代子, 他. 1987. 中葉症候群の症例の喀痰から検出した非溶血A群レンサ球菌について. 臨床検査 31(9): 1007-1010.
- 8) Miho Y., Somay Y. M., Katsuhiko S., et al. 2010. Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* isolates that lack large regions of the *sag* operon mediating streptolysin S production. J. Clin. Microbiol. 48(2): 635-638.

A Case of Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* Isolated from a Patient with Cholesteatoma

Miki Takahashi, Sachie Yomoda, Masami Murakami

Department of Clinical Laboratory Center, Gunma University Hospital,
3-39-15 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan

The case is an eleven year old Japanese boy. He visited a doctor for the hearing disturbance and the effusion of the left ear. He was diagnosed to have a chronic otitis media with the cholesteatoma and referred to the department of otolaryngology of Gunma University Hospital. *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were isolated from the effusion of the ear. The colony of *S. pyogenes* showed beta hemolysis as the typical findings of the bacteria. At the hospitalization, non-hemolytic *S. pyogenes* was isolated from the effusion of the tympanum as well as the bacteria that belong to the same strains isolated before. A colony of nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* appeared white, and looked like a big *Enterococcus*-like colony in a mucoid state in the blood agar. Autolysis was evident and looked like a *Streptococcus pneumoniae* colony in a mucoid state in the chocolate agar. In this case, we could identify nonhemolytic *S. pyogenes* from aseptic part of middle ear. It is necessary to pay attention to the possibility of nonhemolytic *S. pyogenes* in performing routine laboratory examinations.