

[総 説]

栄養要求性レンサ球菌の検出と同定に関する問題点

江成 博

岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野

(平成 26 年 11 月 4 日受付)

栄養要求性レンサ球菌 (nutritionally variant streptococci : NVS) は、栄養要求性が通常の viridans streptococci とは異なる菌群として、従来から nutritionally variant streptococci (NVS), nutritionally deficient streptococci (NDS), nutritionally variant streptococci (NVS), satellite streptococci, thiol dependent streptococci などと総称されていた。Bouvet らにより、これらの菌群は *Streptococcus defectivus*, *Streptococcus adjacens* と命名された。その後、*Streptococcus* から Genus *Abiotrophia* への転属と 2 菌種の追加、さらに *A. defectiva* 以外の 3 菌種の Genus *Granulicatella* への転属を経て現在に至っている。NVS のなかでミンククジラ (*Balaenoptera acutorostrata*) から分離された *Granulicatella balaenopterae* 以外の *Abiotrophia defectiva*, *Ganulicatella adiacens*, *Granulicatella elegans* はすべてヒト常在菌叢に存在し、臨床材料からも分離される。とりわけ感染性心内膜炎 (Infective endocarditis : IE) の起炎菌として penicillin tolerance 株が存在する点で重要である。NVS の菌種レベルでの同定は困難とされてきたが、遺伝子解析、質量分析法 (MALDI-TOF-MS) により容易に同定可能となった。しかしながら NVS による IE の存在は 50 年以前から知られていたにも関わらず、今もって治療が困難な疾患の一つである。本稿では菌種レベルの同定以前に NVS の確実な検出と類縁菌との鑑別法に焦点を絞って review を進めることとする。

**Key words:** nutritionally variant streptococci, satellitism test, "Autosatellitism", pyrrolidonyl arylamidase, penicillin-tolerant

栄養要求性レンサ球菌は、従来から nutritionally variant streptococci (NVS), nutritionally deficient streptococci (NDS), nutritionally variant streptococci (NVS), satellite streptococci, thiol dependent streptococci など、種々の呼称がなされていた菌群に対し Bouvet ら<sup>1)</sup>は *Streptococcus defectivus*, *Streptococcus adjacens* を提唱した。その後、*Streptococcus* から Genus *Abiotrophia* への転属、2 菌種の追加、*A. defectiva* 以外の 3 菌種の Genus *Granulicatella* への転属を経て 2 属 4 菌種に分類されている (Table 1)。

なお、NVS は 4 菌種の何れもが Genus *Streptococcus* にも、Family *Streptococcaceae* にも属さないが、

現在も nutritionally variant streptococci (NVS)、あるいは nutritionally deficient streptococci (NDS) とされる。これは他に適当な総称が見当たらないためと考えられる。したがって、本稿でも略称は、従来通り、nutritionally variant streptococci (NVS) とする。

**NVS の培養、鑑別、感受性試験に関わるこれまでの報告の概観**

George ら<sup>2)</sup>は pyridoxine 添加血液寒天で NVS が増殖するとし、Carey ら<sup>3)</sup>, Roberts ら<sup>4)</sup>は NVS の増殖には pyridoxal または pyridoxamine が有効であり、pyridoxine は有効でないとした。さらに Sherman ら<sup>5)</sup>は pyridoxine は NVS の増殖を阻害するとした。

これらの報告の間の明らかな矛盾について Ruoff<sup>6)</sup>は pyridoxine の調製に際して混入する pyridoxine 以外の vitamin B<sub>6</sub>類縁体の存在、あるいは vitamin B<sub>6</sub>化合物の命名法の混乱により引き起こされたとしてい

著者連絡先：岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野  
江成 博  
E-mail: hiroenari@gmail.com

Table 1. Validated bacterial names of "Nutritionally variant streptococci"

Species	Family	Origin
<i>Abiotrophia defectiva</i>	Aerococcaceae	Human
<i>Granulicatella adiacens</i>	Carnobacteriaceae	Human
<i>Granulicatella elegans</i>	Carnobacteriaceae	Human
<i>Granulicatella balaenopterae</i> *	Carnobacteriaceae	Whale

\*Type strain was isolated from *Balaenoptera acutorostrata* (; Minke whale).

る。Ruoff は現在、一般的に 0.001% の pyridoxal, あるいは 0.01% の L-cysteine の添加が典型的な NVS の発育を支持することで合意していると結論付けた。

NVS は 微好気性, catalase 陰性, pyrrolydonyl arylamidase (PYR) 陽性, leucine aminopeptidase (LAP) 陽性のグラム陽性球菌であり, NVS が関与する感染症として臨床的にもっとも問題になるのは感染性心内膜炎 (Infective endocarditis : IE) である。本菌群は heart infusion agar (HIA) や soybean casein digest agar (いわゆる TSA) に血液のみを添加した培地には発育しないが pyridoxal あるいは L-cysteine の添加により発育する。また HIA 血液寒天や TSA 血液寒天上でも *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* など, 種々の細菌集落の近傍に発育する (staellitism) ことが知られている。*Staphylococcus* sp. を画線 (staphylococcal streak) することにより, その近傍に NVS が発育することを利用して  $\alpha$ -hemolytic streptococci と鑑別する satellitism test が広く用いられて来た。

藤田ら<sup>7)</sup>は心雑音が指摘され心内膜炎が疑われたものの, 3 回の血液培養が陰性で入院 1 ヶ月におよんでいた患者の転院をうけ, 入院第 6 病日の患者の血液培養で培地の混濁を認め, subculture は血液寒天, チョコレート寒天で好気および炭酸ガス培養, 嫌気培養に GAM 寒天を用いた。培養 2 日目に GAM 寒天 (日本製薬) に集落形成を認めた。一方, 血液寒天では 5 日目に平板に混入していた *Staphylococcus* の周囲に  $\alpha$ -hemolysis を伴う *Streptococcus* の発育を認めた。GAM 寒天に発育した菌株は種々の細菌の周囲にも発育を示した。これらの結果から NVS による IE と診断されたという。藤田らは分離した NVS について Todd-Hewitt broth を基礎培地として種々の添加物による発育支持能を検討し, pyridoxal, L-cysteine を添加した培地での発育が優れ, yeast extract の添加によっても, ある程度の発育がみられたとしている。

また寒天培地として 5% に羊脱線維血を添加した nutrient agar 血液寒天, HIA 血液寒天, TSA 血液寒天に発育しないことを併せて報告している。Barrios ら<sup>8)</sup>の NVS による新生児結膜炎の報告においては分泌物の Gram 染色で一部の白血球にはグラム陽性球菌の貪食像が観察された。材料を接種した血液寒天, チョコレート寒天を 5% 炭酸ガス下, 35℃ で一夜培養した。血液寒天上に発育した 2 集落の  $\alpha$ -streptococci の周囲には多数のピンポイント状集落が出現し, Gram 不定の球桿菌であった。チョコレート寒天上には集落を認めなかった。Barrios は pyridoxal が *Streptococcus pyogenes* を阻害することを理由に staphylococcal streak による鑑別を推奨している。

Pompei ら<sup>9)</sup>は *Micrococcus luteus* AH-47 の過熱死菌を混積, 重層した二層平板を用い, 発育した NVS の集落周囲が *M. luteus* 菌体の溶菌により透明化することを指標として口腔内の NVS の検出をおこなった。

Ruoff は tryptic soy broth (Soybean casein digest broth) にはヒト血液だけでなく pyridoxal を添加しないと全ての NVS 株を発育させることは出来ないとした。また, 血液培養ボトルでの長期間培養は NVS の回収能が下るので 48 時間以内に subculture を実施すべきであるとした。

Holloway ら<sup>10)</sup>は NVS の PCG に対する MIC 測定とともに pyridoxal, L-cysteine, penicillinase (PC' ase) の添加や PC' ase 産生性 *S. aureus* の streak (staphylococcal streak) などを組み合わせた 6 通りの血液寒天により, 11 株の NVS について PCG に対する MBC を測定した。その結果は以下のとおりであった。

1. Pyridoxal, L-cysteine 添加血液寒天では供試 11 株全てに penicillin tolerance はみられなかった。
2. Pyridoxal, L-cysteine 添加血液寒天に PC' ase を添加すると 5 株が penicillin tolerant となった。
3. Pyridoxal, L-cysteine 添加血液寒天に PC' ase 産生 *S. aureus* を streak すると 9 株が penicillin toler-

ant となった。

4. Pyridoxal, L-cysteine を添加しない血液寒天に PC' ase 産生 *S. aureus* を streak すると 7 株が penicillin tolerant となった。

5. PC' ase 添加血液寒天に PC' ase 産生 *S. aureus* を streak すると 10 株が penicillin tolerant となった。

6. Pyridoxal, L-cysteine, PC' ase 添加血液寒天に PC' ase 産生性 *S. aureus* を streak すると 11 株全てが penicillin tolerant となった。

Holloway らの結果から以下の点が考えられる。

1. 上記の 1. と 2. から MBC 測定培地への subculture に伴って持ち込まれる PCG の不活化には PC' ase の存在が必要である。

2. 上記の 2. と 3. から *S. aureus* が産生する PC' ase によっても PCG は不活化される。

3. 上記の 3. と 4. の結果は pyridoxal 添加と *S. aureus* の streak による発育支持効果が同等ではないことを示している。

4. 上記の 4. と 5. の結果は MBC 測定培地には培養開始時から PC' ase が存在するほうが不活化に効果的である。

上記の 3., 4., 5., 6. を勘案すると *S. aureus* の streak には PC' ase と pyridoxal, L-cysteine の代替物質の供給源としての機能以外に別の機能が関与している可能性がある。一般的に gram-positive cocci の MIC 測定時、PCG に接触した菌体細胞壁は障害を受け spheroplast, あるいは L-form 化すると考えられる。このような状態にある菌を培養により回収する場合、培地浸透圧を上げるために sucrose の添加などが行われる。一方、浸透圧とは別の問題として catalase を産生しない streptococci や NVS の培養に際して  $H_2O_2$  は抑制的に作用する。とりわけ spheroplast, あるいは L-form 化している場合、intact cell に対するよりも高度に障害されるため、増殖が阻止されやすいと考えられる。この場合、血液に由来する catalase により、 $H_2O_2$  からの保護作用が期待される。Holloway らが使用した何れの培地にも血液が添加されているが staphylococcal streak の有無により tolerance を示す株数の多寡が左右されることから *S. aureus* 由来 catalase と血液由来 catalase が相加的に菌体の保護作用に関与すると考えるが、これは著者の仮説に過ぎないため、staphylococcal streak に代え、培地への catalase 添加などによる検証が必要である。

菊池ら<sup>11)</sup>は IE 患者から *S. adjacens* 2 株、*S. defectivus* 2 株を分離し、PCG, ABPC, GM の 4 剤につい

て MIC, MBC を測定した。分離された 4 株はすべて penicillin tolerant であったという。なお、菊池らの施設の常用血液寒天は不良ながら、NVS の発育を支持するため、staphylococcal streak の近傍で「増殖が改善される」ことをもって satellitism 陽性としている。

江成ら<sup>12)</sup>は検査材料から *Streptococcus adjacens* を分離するための培地についての検討をおこなった。NVS の発育はプルセラ HK 寒天 (RS) を嫌気培養したものが優れていた。NVS の分離には適さない血液寒天のなかには satellitism test をおこなうと staphylococcal streak にかかわらず、培地全面に微小集落を形成してしまうものがみられた。竹内ら<sup>13)</sup>は IE 症例で分離された株は分離当初、Gram 不定の球菌様であったことから NVS を疑い、API Strep 20 (ビオメリュー社) で *Streptococcus adjacens* と同定された。Roggenkamp ら<sup>14)</sup>が IE 患者から分離した菌株は catalase test, staphylococcal streak による satellitism test の結果から Genus *Abiotrophia* に属するが、生化学的性状、発育温度域、全菌体を構成する peptide の profile, 栄養要求性などの点において既知の *A. adiacens* や *A. defectiva* とは異なっていた。*A. adiacens*, *A. defectiva* の type strain が Todd-Hewitt, casein-soy peptone broth に pyridoxal や L-cysteine を添加することにより発育するのに対し、pyridoxal の添加では発育せず、L-cysteine の添加を必要とした。16S rRNA gene の sequence 解析から Genus *Abiotrophia* に属することが明らかになった。*A. adiacens* との相同性は 96.9% であり、当該株は *A. elegans* と命名された。Roggenkamp の *A. elegans* は pyridoxal のみ添加の血液培養ボトルでは発育しないという特異な栄養要求性を有することから本菌種が関与する IE では菌株の検出ができない可能性があるかと述べている。Lawson ら<sup>15)</sup>はミンク鯨 (*Balaenoptera acutorostrata*) から分離した NVS を *Abiotrophia balaenopterae* と命名した。本菌種は生化学的性状、全菌体蛋白の電気泳動分析により、既知の NVS との鑑別は可能であるとした。現在のところ、本菌によるヒトの症例報告はみられていない。

Collins ら<sup>16)</sup>は 16S rRNA gene の sequence 解析から Genus *Abiotrophia* は単系統ではないとして基準種の *A. defectiva* 以外は Family *Carnobacteriaceae* においた Genus *Granulicatella* に含めた。

Leung ら<sup>17)</sup>が人工関節部位穿刺材料と感染部位の外科検体から分離したグラム陽性球菌は血液寒天の 35°C, 24 時間培養では僅かな発育しか示さず、チョコレート寒天では顕著な発育を示した。分離株は cata-



Fig. 1. Satellitism of *A. defectiva* on TSA blood agar  
\*Non-satellitetic growth is seen at the beginning of the *Abiotrophia defectiva* streaks.

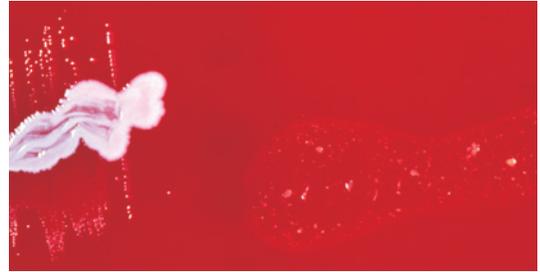


Fig. 2. Satellitism and "Autosatellitism" of *G. adiacens* 4096-P  
\*Left; Satellitism by *S. epidermidis* ATCC 12228  
\*Right; "Autosatellitism" by heat-killed *G. adiacens* 4096-P (Centrifuged precipitate)

lase 陰性で PYR, LAP はともに陽性, bile esculin, 6.5% NaCl 耐性はともに陰性であった。これらの結果から staphylococcal streak を実施したところ, 培養 1 日で satellitism 陽性の所見を示した。しかし, 培養を 2 日まで延長すると staphylococcal streak の遠位にも発育することから, satellitism ではなく, "Pseudosatellitism" であるとした。すなわち staphylococcal streak に「依存した発育」ではなく, 単に何らかの物質により発育が「促進された」に過ぎないとした。当該株は gene sequencing により, *Gemella sanguinis* と同定された。

同様な現象は, 著者が口腔内 flora から NVS を釣菌する際にみられた。*M. luteus* 過熱死菌の溶菌を指標として釣菌した 7 株のうちの 1 株は 2 夜培養では, staphylococcal streak の遠位にも発育した。この株は API Strep 20 により, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* と同定された。

Koh ら<sup>18)</sup>が血液培養から分離した菌株は *G. adiacens* と同定された。この株を ASAN 社製と MACROMEDIA 社製の血液寒天で satellitism test を実施したところ, ASAN 社製の血液寒天では satellitism 陰性, MACROMEDIA 社製の血液寒天では陽性となった。別の患者は腹部膨満と発熱があり, 腹膜炎と進行性胃腸と診断された。腹水から分離された菌株は *G. adiacens* と同定された。この株も ASAN 社製の血液寒天では satellitism 陰性, MACROMEDIA 社製の血液寒天で陽性を示した。彼らは ASAN 社製の血液寒天に *G. adiacens* の発育に必要な thioketone が含まれていることを見いだした。Koh らは thioketone 添加血液寒天では L-cysteine または pyridoxal 添加なしで *G. adiacens* が良好に発育したことから, satellitism が起こらないとしている。さらに Koh らは検査に従事す

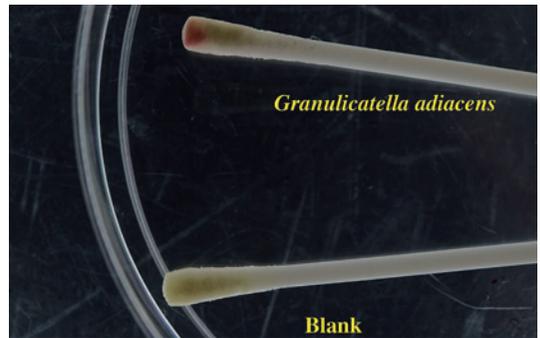


Fig. 3. PYR test of *Granulicatella adiacens* 4096-P  
\*PYR swab was inoculated *G. adiacens* 4096-P growing by satellitism test. (Strongly greenening colonies makes it difficult to confirm the positive reaction.)  
\*False negative reaction may occur by excess moisture of swab or disk.

る人々は *Granulicatella* spp. 用の培地に含まれるすべての栄養素を認識しておくべきであるとしている。

著者は satellitism test において多量に接種した NVS の画線・接種の開始部分では staphylococcal streak から遠位の部分でも, 微弱ながら発育を認める経験をしている (Fig. 1)。また TSA 血液寒天に staphylococcal streak なしで NVS を濃厚に接種・画線して培養した場合にも, 画線・接種の開始部分で同様な微弱発育が認められることがある。

そこで前培養した *G. adiacens* 4096-P を常法通り, TSA 血液寒天に画線し, *S. epidermidis* ATCC 12228 による通常の satellitism test をおこなうとともに, 前培養平板上の NVS を 5 μL の定量白金耳の 1 白金耳量ほどの菌苔を 13.5 mL の saline に懸濁, 菌液とし,

121°C, 15 min 滅菌し, 加熱死菌液を調製した。この菌液を 3000 rpm 10 分間遠心後, 沈渣部分から pasteur pipette で 0.05 mL を採取し, *G. adiacens* 4096-P を画線接種した同一の TSA 血液寒天の片側に staphylococcal streak の代わりに接種した。その結果, staphylococcal streak の近傍には satellitism が認められた。一方, 過熱死菌沈渣液を接種した区画では, 沈渣液滴下部分にのみ, *G. adiacens* 4096-P の集落が形成された (Fig. 2)。

この結果から下記の 5 項が示唆された。

1. 前培養に用いたブルセ HK 寒 (RS) から釣菌した菌苔に含まれる平板培地に由来する NVS の発育を支持する成分の一つとして L-cysteine が該当するがブルセ HK 寒 (RS) の液体成分溶液 5  $\mu$ L (菌体の占める容積は無視) の中に存在する L-cysteine の量は 0.0015 mg に過ぎない。さらに 13.5 mL の saline で希釈されていることから, NVS 過熱死菌体沈渣とともに持ち込まれる L-cysteine の量は最大でも, 0.00006 mg にも満たない。

2. さらに staphylococcal streak 近傍での NVS の発育像と異なり, NVS の発育が認められたのは 50  $\mu$ L の沈渣液が接種された範囲内に局限していることから, 沈渣液そのもの, あるいは加熱死菌体から自然拡散される発育支持成分により NVS が発育したとは考えられない。

3. NVS の発育を支持しないとされる TSA 血液寒天であっても NVS を濃厚接種すると画線開始部分に, 微弱な発育がみられることを経験しているのみならず, Fig. 1 に示した satellitism test の写真でも NVS の接種開始部位では, staphylococcal streak から遠位の部分にも微弱発育が見られる事実がある。著者が検討に用いた NVS 死菌体は加熱によるが, 生菌として接種された NVS であっても, 当然ながら, 多数の個体の中に増殖能を持たない個体が存在し, 増殖能を有する個体の増殖に寄与する可能性を示唆していると考える。

4. したがって NVS 加熱死菌体からの発育支持成分が自然拡散したのではないとすれば, NVS が産生する bacteriolytic activity の関与が考えられる。本稿執筆時点では確認が取れていないものの, NVS が *M. luteus* 過熱死菌体を溶菌する bacteriolytic activity が NVS の過熱死菌体にも作用し, その際に放出されるであろう「何らかの物質」が生菌である NVS の栄養要求を満たすことにより, TSA 血液寒天上に集落を形成したと考える。さらに検討を重ねる必要があるが, 著者はこの現象を“Autosatellitism”と記すことと

した。

NVS はヒト常在菌叢に存在する菌種であり, 施設規模に拘わらず, 各臨床微生物検査では *A. defecativa*, *G. adiacens*, *G. elegans* に遭遇する機会がある。本菌の血流感染は歯科治療を契機とする報告が多くみられる。現在, 臨床微生物検査で実施される検査法は多様である。すなわち同定キットによる同定, 自動機器による同定・感受性試験, 質量分析による同定など, 施設ごとの方法論が異なっている。NVS による感染症では IE が重要であるが, 本邦では, さほど [Negative blood culture] という言葉が大きく取り上げられることは多くなかった。そのような背景もあってか, NVS 症例の報告は, 欧米に比して多いとはいえない実態がある。

IE の患者から分離される NVS は菌種により検出頻度は異なるものの, NVS の菌種により clinical course が異なるか否かについては定かではない。一方, Christensen ら<sup>19)</sup>は NVS による IE 30 症例の review から enterococci や viridans streptococci による症例に比して, より重篤であり, 適切な抗生物質の投与にもかかわらず, 41% の再発率で治療が困難であったとしている。この「NVS による IE の治療の困難さ」に penicillin tolerance が関わるであろうことは容易に推測される。NVS は penicillin tolerance をしめす株が多いことから Species レベルでの同定以前に,  $\alpha$ -hemolytic streptococci とは峻別されねばならないし, 化学療法で難渋する場合, MIC のみならず, MBC 測定も視野に入れることが望ましい。前出の Holloway らの結果を再見, 整理すると, 以下の 6 項が示唆される。

「MBC 測定のための subculture で持ち込まれる PCG の不活化に PC' ase の存在が必要。」「*S. aureus* が産生する PC' ase でも PCG は不活化される。」「Pyridoxal, L-cysteine の添加による発育支持能と *S. aureus* の streak による発育支持能は同等ではない。」「MBC 測定のための subculture 開始時から PC' se が存在していることが生残菌回収に効果的。」「Pyridoxal, L-cysteine, PC' se の添加と PC' ase 産生性 *S. aureus* の併用が tolerance 検出に最も高い効果を示した。」「6. PC' ase 産生 *S. aureus* は PC' ase と pyridoxal/L-cysteine 代替物質の供給以外の機能を果たした可能性がある。」

一般的に gram-positive cocci の MIC 測定時, PCG に接触した菌体細胞壁は障害を受け spheroplast, あるいは L-form 化すると考えられる。Catalase を産生しない streptococci や NVS に対して  $H_2O_2$  は抑制的に作用する。とりわけ PCG の MIC 測定では殺菌されな

かった菌体も spheroplast, あるいは L-form 化し, MBC 測定のための培養時に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により, intact cell よりも高度に障害される結果, 増殖阻害が起こると考えられる。この場合, 血液由来 catalase の役割の一つには, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> からの保護作用にある。

Hollway らが使用した培地にはすべて血液が添加されているが staphylococcal streak の有無が tolerance を示す株数の多寡を左右している。したがって *S. aureus* 由来 catalase は血液由来 catalase に相対的に作用すると著者は考えるが, 仮説に過ぎないため, staphylococcal streak に代え, 培地への catalase 添加などによる検証が必要である。

古垣内ら<sup>20)</sup>は複数菌敗血症例で PCG に高度耐性 (MIC 16 µg/mL, MBC > 512 µg/mL) の *G. adiacens* 分離例を報告している。現在, microdilution 法による MIC 測定を実施する施設も多く, microdilution 法に用いる *Streptococcus* spp. 用培地 (CAMHB w/ LHB; 陽イオン調整ウマ溶血液加 MHB) が市販されている。しかしながら, NVS の MIC 測定を実施する場合には, CLSI M45-A2 の記載のごとく, pyridoxal を添加する必要がある。

市販培地に pyridoxal が添加, あるいは添付されていない理由として NVS の検出頻度が高くないことにあるのか, あるいは Barrios らが NVS の確認時に, 一部の *S. pyogenes* に阻害作用を示すことを理由に pyridoxal ではなく, *S. aureus* による satellitism test を推奨していることに関連しているのかは不明である。

Christensen の NVS による IE 30 例の review から再燃, 治療に難渋する可能性の指摘, Holloway らの penicillin tolerance 株に関する報告もあることから NVS による IE と  $\alpha$ -hemolytic streptococci (Viridans streptococci) や enterococci を起炎菌とする IE とは峻別されるべきである。すなわち極力の早期分離と viridans streptococci などとの鑑別を確実にこなうことが要求される。

著者の NVS 分離用培地に関する検討で L-cysteine, yeast extract などが添加された代表的な嫌気性菌用血液寒天が優れた発育支持能を示した。嫌気性菌用血液寒天での培養環境別の発育速度の検討では, 嫌気培養 > 炭酸ガス培養 > 好気培養の順であった。これまでの諸氏の NVS 分離例でも嫌気性菌用血液寒天での聚落形成が早い傾向がみられることから早期の分離には嫌気性菌用血液寒天が適するといえる。チョコレート寒天は血液寒天よりも NVS が発育しやすい傾向がある。この理由としては L-cysteine を含

む chemically defined supplement がチョコレート寒天に添加されていることが考えられる。

本学会の嫌気性菌検査ガイドライン 2012 には, 嫌気培養にのみ発育した菌株の耐気性試験は炭酸ガス培養にも嫌気性菌用血液寒天を用いることとされている。嫌気性菌を疑う場合, これに従うが, NVS の可能性も考慮する場合には別途, TSA 血液寒天に接種, staphylococcal streak を施し, 炭酸ガス培養し, satellitism の確認を行う。この場合, satellitism test を実施しないと嫌気性菌が否定されるだけの結果に終わる。

一方, 耐気性試験の炭酸ガス培養に NVS の発育を支持しない TSA 血液寒天を, 嫌気培養に嫌気性菌用血液寒天を使用すると, 嫌気性グラム陽性球 (桿) 菌と誤認する可能性がある。NVS の生物活性は低く, 嫌気性菌との誤認により, 嫌気性菌用キットが使用された例において *Anaerococcus* (*Peptostreptococcus*) *prevotii* と同定された例もある。

次に NVS の確認に必要な satellitism test にかかわる問題について以下に挙げる。

Satellitism test に関する一つ目の問題点としては著者の *L. lactis* subsp. *cremoris* や Leung の *G. sanguinis* のように 1 夜培養では satellitism 陽性と判断され, 2 夜培養後に “Pseudosatellitism” と気付くことがある。この “Pseudosatellitism” の原因は専ら, 菌側の特性によるものである。もう一つの問題は NVS でありながら, staphylococcal streak の遠位, あるいは平板全面に NVS が発育してしまい satellitism 陰性と判定される場合で, これは偏に使用する培地の特性によるものであり, 現時点では “Pseudosatellitism” よりも, この現象に遭遇する頻度のほうが高いと考えられる。“Pseudosatellitism” は 2 夜培養により誤判定の回避は可能であり, 後者については satellitism test に用いる平板種類を換えるしかないが, とりあえず PYR test は行っておくべきである (NVS は PYR 陽性, viridans streptococci であれば PYR 陰性)。

Koh らは thioketone の添加により, staphylococcal streak と関わりなく NVS が発育する血液寒天でも, 16S rRNA の解析などを前提にすれば問題ないとしている。筆者は当該培地を試用していないが, thioketone が添加していることは供給元から開示されていたのであろうか。日常検査に使用される培地の多くは天然物を主要成分としており, いわゆる chemically defined medium とは異なり, 供給元により特性が異なる場合がある。

40 年近い歳月, 著者はこの分野に携わってきたが,

Table 2. Characteristics useful in differentiating NVS from related Gram-positive cocci

Organism	Satellitism	PYR <sup>a)</sup>	LAP <sup>b)</sup>	6.5% NaCl
<i>Abiotrophia defectiva</i> , <i>Granulicatella</i> spp.	+	+	+	NG <sup>c)</sup>
<i>Enterococcus</i> spp.	-	+	+	G <sup>d)</sup>
<i>Gemella sanguinis</i>	- <sup>e)</sup>	+	+	NG
<i>Globicatella sanguinis</i>	-	+	-	G
<i>Ignavigranum ruoffiae</i>	V	+	+	G

<sup>a)</sup> Pyrrolidonyl arylamidase

<sup>b)</sup> Leucine aminopeptidase

<sup>c)</sup> Non-growth

<sup>d)</sup> Growth

<sup>e)</sup> *Gemella sanguinis* strain isolated by Leung showed "Pseudosatellitism" phenomenon.

多用される一般的な培地については供給元が開示する培地組成の大きな変更を伴う製品は国産、輸入ともに、少なかった。

供給元によっては組成表示の冒頭に Approximate Formula\* Per Liter とし、各成分含量を記載しているものの、下部に注釈として \*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria. とするものがあり、この注釈の [criteria] がどのようなものかは明らかではない。前述の Koh らの「培地に含まれるすべての栄養素を認識しておくべき」は理解できるものの、供給側に長く身をおいた著者としては、かなり無理な相談と考える。

なお、NVS は PYR test 陽性を特徴とするが Christensen ら<sup>19)</sup>は NVS は PYR test の反応が弱いとしている。ピオメリュー社が開示している API STREP 20 ならびにある Rapid ID 32 STREP で得られる PYR test の陽性率は *A. defectiva* では 99~75%, *G. adiacens* では 80~70% 程度である。したがって NVS であることの推定や PYR の確認のために同定キットを使用するのは適当ではない。むしろ NVS であることの推定や PYR の確認には satellitism test とともに Christensen ら<sup>19)</sup>の単一基質試験 (Tablet, disk, swab など) による性状確認法の記載を参考とすることが奨められる。

Inoue ら、Chagla らは pyrrolidonyl naphthylamide を含浸させた paper strip の検討を報告している。Inoue らは使用前に 1/15 M phosphate buffer (pH 7.2) で湿らせた後に菌苔を塗布し、Chagla らは使用時に復水することなく菌苔を塗布している。これは過剰な水分による基質濃度の低下を避けるためである。かつて著者が NVS の鑑別目的で検討した PYR swab は *G. adiacens* 4096-P で陽性結果が得られなかった。最近、著者がこの PYR swab を検討した際、ブルセラ HK

寒天培地 (RS) で前培養した *G. adiacens* の菌苔は旺盛な発育に伴う  $\alpha$ -hemolysis に由来する緑褐色化が強く、PYR 弱陽性の淡赤色の所見は得られなかった。そこで添付文書に buffer の滴下量が明記されていないことから、復水に用いる buffer の量を swab が湿る程度に留め、 $\alpha$ -hemolysis が著しいブルセラ HK 寒天培地 RS 上の菌苔ではなく、緑変が進んでいない satellitism による菌苔を swab に塗布した結果、PYR test 陽性が確認できた (Fig. 3)。

PYR test は数分で結果が得られ、適切に使用すれば有用である。詳細は添付文書を参考とするが、まずは swab, disk に過剰の水分を含まないように注意すべきである。

また、発育が旺盛な嫌気性菌用血液寒天で長時間培養した菌苔は  $\alpha$ -hemolysis が強く、NVS がしめす弱陽性 (弱赤色) をマスクしてしまい、PYR 陽性の判定が困難となるが、1 夜培養の satellitism 菌苔は  $\alpha$ -hemolysis が強過ぎないので適している。

なお、馬尿酸塩 (Hippurate : HIP) 加水分解試験は液体培地による方法よりも、供試菌株の濃厚菌液を作製、2 本の小試験管に分け、一方に HIP disk, 他方には blank disk を投入、所定時間経過後に両方の試験管にニンヒドリンを滴下する。Blank disk よりも HIP disk を投入した菌液の発色が濃い場合に陽性と判定することで誤判定が回避できる。

NVS による感染症は患者自身の常在菌叢を起源とするものであり、医療機関の規模などに関わりなく遭遇する可能性がある。これまでのところ、筆者は寡聞にして、NVS の菌種別の検出頻度は異なるものの、菌種により clinical course が異なるという報告をみていない。むしろ、Holloway ら<sup>10)</sup>、菊池ら<sup>11)</sup>が示した penicillin tolerance 株の多さや、IE においては viridans streptococci や enterococci によるものに比して治療

困難な症例が多いという点から、菌種同定以前に NVS を的確に検出することが重要であると考えた。したがって、これまでの NVS の培養に関わる諸家の報告についての概観に、著者の preliminary study からの speculation を交えるという、やや変則的なものとなった。諸家の報告について、概ね年代順としたため、記載内容の不統一、あるいはやむを得ない重複を来したことも否定できない。そこで、いずれの検査室でも実施可能、かつ最低限の方法論と、その背景について整理・再掲しておくたい。

1. 分離には嫌気性菌用血液寒天を用いる。；これは釣菌可能な集落形成が早いことによる。

2. NVS を疑う菌株を TSA 血液寒天に画線接種し、*S. epidermidis* あるいは *S. aureus* を直線状に接種 (staphylococcal streak) し、炭酸ガス培養を行う。1 夜培養後、staphylococcal streak 近傍に増殖 (satellitism) がみられることを確認する\*<sup>1)</sup>、\*<sup>2)</sup>。

\*<sup>1)</sup>：他の菌群による“Pseudosatellitism”との誤認回避のため、2 日目まで観察する。

\*<sup>2)</sup>：著者の“Autosatellitism”による微弱発育は画線開始部に限られる (Fig. 1)。

3. Satellitism を確認した段階で PYR swab などで PYR 陽性\*<sup>3)</sup>を確認する。なお、偽陰性を避けるため、PYR swab に過剰な水分を含まないように注意する。

\*<sup>3)</sup>： $\alpha$ -hemolysis が著しい NVS 菌苔は、PYR の発色をマスクするので satellitism で得られる菌苔の使用が適する。

以上を満たす Gram 不定の球桿菌は NVS とし、以降の菌種鑑別は Christensen ら<sup>19)</sup>の方法にしたがうか、同定キット、質量分析、16S rRNA gene の解析によるかなどは各施設の環境により選択すれば良いと考える。また MIC 測定自体、どの施設でも実施できるかという問題があるものの、治療に難渋する症例においては MBC 測定も視野にいれる必要もあるが、その方法論はさらに検討されるべきであると考ええる。

## 文 献

- 1) Bouvet, A., F. Grimont, P.A.D. Grimont. 1989. *Streptococcus defectives* sp. nov. and *Streptococcus adjacens* sp. nov., nutritionally variant streptococci from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 290-294.
- 2) George, R.H. 1974. The isolation of symbiotic streptococci. *J. Med. Microbiol.* 7: 77-83.
- 3) Carey, R. B., K. C. Gross, R. B. Roberts. 1975. Vitamin

- B6-dependent *Streptococcus mitior* (*mitis*) isolated from patients with systemic infections. *J. Infect. Dis.* 131: 722-726.
- 4) Roberts, R. B., A. G. Krieger, N. L. Schilier, et al. 1979. Viridans streptococcal endocarditis: the role of various species, including pyridoxal-dependent streptococci. *Rev. Infect. Dis.* 1: 955-965.
- 5) Sherman, S. P., J. A. Washington II. 1978. Pyridoxine inhibition of a symbiotic streptococcus. *Am. J. Clin. Pathol.* 70: 689-690.
- 6) Ruoff, K. 1991. Nutritionally variant streptococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 184-190.
- 7) 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.
- 8) Barrios, H., C. M. Bump. 1986. Conjunctivitis caused by a nutritionally variant streptococcus. *J. Clin. Microbiol.* 23: 379-380.
- 9) Pompei, R., E. Caredda, V. Piras, et al. 1990. Production of bacteriolytic activity in the oral cavity by nutritionally variant streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1623-1627.
- 10) Holloway, Y., Dankert J.. 1982. Penicillin tolerance in nutritionally variant streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22: 1073-1075.
- 11) 菊池 賢, 戸塚恭一, 清水喜八郎, 他. 1994. Nutritionally variant streptococci による感染性心内膜炎の細菌学のおよび臨床的検討. *感染症学雑誌* 68: 830-836.
- 12) 江成 博, 島田園子. 1995. 検査材料から *Streptococcus adjacens* を分離するための培地についての検討. *日臨微誌* 5: 30-36.
- 13) 竹内弘明, 村上康弘, 中村正夫. 1996. *Streptococcus adjacens* による感染性心内膜炎の 1 例. *日臨微誌* 6: 46-50.
- 14) Roggenkamp, A., M. Abele-Horn, K.-H. Trebesius, et al. 1998. *Abiotrophia elegans* sp. nov., a possible pathogen in patients with culture-negative endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 100-104.
- 15) Lawson, P. A., G. Foster, E. Falsen, et al. 1999. *Abiotrophia balaenopterae* sp. nov., isolated from the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 503-506.
- 16) Collins, M. D., P. A. Lawson. 2000. The genus *Abiotrophia* (Kawamura et al.) is not monophyletic: proposal of *Granulicatella* gen. nov., *Granulicatella adjacens* comb. nov., *Granulicatella elegans* comb. nov. and *Granulicatella balaenopterae* comb. nov. *Int. J. Syst.*

- Evol. Microbiol. 50: 365-369.
- 17) Leung, D. T., E. M. Davis, Q. Qian, et al. 2011. First Report of Prosthetic Joint Infection by *Gemella sanguinis* and Associated "Pseudosatelliting" Phenomenon on Culture. J. Clin. Microbiol. 49: 3395-3397.
- 18) Koh, Y. R., J. Yi, H. H. Kim, et al. 2014. Discrepant Satellitism for Identification of *Granulicatella adiacens* Isolates. Ann Lab Med. 34: 174-176.
- 19) Christensen, J. J., R. R. Facklam. 2001. *Granulicatella* and *Abiotrophia* Species from Human Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol. 39: 3520-3523.
- 20) 古垣内美智子, 江成 博, 吉田 敦, 他. 2014. Penicillin G に高度耐性かつ多剤耐性を示した *Granulicatella adiacens* が分離された複数菌敗血症性ショックの一例. 日臨微誌 24: 138-145.

## Problems in the detection and identification of nutritionally variant streptococci

Hiroshi Enari

Division of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University

The present review introduces the 20 studies on NVS, and will describe the isolation method and the differentiation methods from similar bacteria related infective endocarditis. Although it has been considered difficult to identify nutritionally variant streptococci, now the application of genetic methods and/or MALDI-TOF-MS can be readily identified. However, infective endocarditis caused by nutritionally variant streptococci, despite being known for more than 50 years, is difficult to treat. The first important, not the identification at species level of nutritionally variant streptococci, it is to distinguish from other pathogens that are similar to nutritionally variant streptococci.