

## Lancefield の A 群抗原を保有する *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

<sup>1</sup>大阪府立公衆衛生研究所微生物課, <sup>2</sup>淀川キリスト教病院小児科  
(レンサ球菌感染症研究会: 会長 保科 清)

勝川 千尋<sup>1)</sup> 田丸 亜貴<sup>1)</sup> 森川 嘉郎<sup>2)</sup>

(平成 13 年 10 月 9 日受付)

(平成 13 年 11 月 9 日受理)

Key words : *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, Lancefield 's group A antigen

### 要 旨

今回われわれは大阪市内で患者から Lancefield の A 群抗原を保有する *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* を分離した。ヒトの病巣から分離され血液寒天培地上で β 溶血を示し、グラム陽性球菌、カタラーゼ陰性で Lancefield の A 群抗原を保有するレンサ球菌を *Streptococcus pyogenes* とするのは最も標準的な同定法であるが、分離菌はこの同定法では *S. pyogenes* と判別が不可能であった。また *S. pyogenes* 感染症の迅速診断法も検査材料中の A 群多糖体抗原を検出する方法が用いられていることから両者の判別はできなかった。近年わが国では、G 群抗原を保有する *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による劇症型溶血性レンサ球菌感染症が多数報告されるようになり、今後 A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* が重症の感染症を引き起こす可能性も否定できない。このため *S. pyogenes* との鑑別は非常に重要であり、レンサ球菌の検査を実施する場合には、A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の存在を念頭に置き、群別試験結果はその菌の性状の一つとして考え、PYR 試験等の生化学的性状を確認して同定を行う必要があると考える。

[ 感染症誌 76 : 155 ~ 160, 2002 ]

### 序 文

レンサ球菌の分類は Lancefield<sup>1)</sup> によって始められた細胞壁多糖体抗原の免疫学的差異に基づく血清学的分類が現在も行われており、アルファベットで A 群から順に群名が名付けられている。この群別分類は必ずしも 1 つの群が分類上の 1 菌種であるとは限らないが、A 群多糖体抗原を保有

するレンサ球菌に関してはヒトの病巣から分離されるのは大部分が *Streptococcus pyogenes* であることから、ヒト由来の材料から分離されたレンサ球菌が血液寒天培地上で β 溶血を示す大きな集落を作り、A 群多糖体抗原を保有しておればその菌を *S. pyogenes* と同定しても問題は生じなかった<sup>2)</sup>。ところが、1997 年に Bert ら<sup>3)</sup> が A 群抗原を保有する *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による菌血症の 1 症例を初めて報告。ついで Brandt ら<sup>4)</sup> も 1999 年に同菌による菌血症の 2 症

別刷請求先 : ( 〒537 0025 大阪市東成区中道 1 3 69

大阪府立公衆衛生研究所微生物課

勝川 千尋

平成14年3月20日

例を報告した。今回われわれは大阪市内で患者から A 群 抗原 を 保 有 す る *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* を 分 離 し た の で 報 告 す る。

### 材料と方法

#### 1. 菌の由来

患者は 74 歳、男性で 7 年前に糖尿病の診断を受けたが当初は治療を受けず放置していた。その後、4 年前から大阪市内の病院で通院治療を続けていたが、左足背の糖尿病性壊疽が進行し、植皮術が必要な状態になった。本菌は植皮術前の壊疽部の培養検査で分離された。植皮術後、抗菌薬としてセフォチアム (CTM) を使用、特に感染症の合併はなく順調に回復した。

#### 2. 菌の同定

トリプチケースソイヒツジ血液寒天培地上で β 溶血を示し、グラム陽性球菌、カタラーゼ陰性であることを確認後、アピストレップ 20 (日本ピオメリュー) を用いて同定を行った。バシトラシン感受性はバシトラシンディスク (栄研 (栄研化学) を用い、ピロリドニルアリルアミダーゼ活性試験 (以下 PYR 試験) は O.B.I.S.PYR (オクソイド) を用いて実施した。群別試験は以下の 3 キットを用いて行った。セロアイデンストレプトキット (栄研 (栄研化学)、ストレプト LA (生研 (デンカ生研)、ストレプトコッカス群別キット (ユニブルー) (オクソイド)。

また 16S リボソーム RNA 遺伝子 (*rrs* 遺伝子) のシーケンスにより同定を行った。*rrs* 遺伝子の 5' 末端および 3' 末端に近い保存領域にプライマーを設定し、PCR で増幅、その増幅産物の両端の塩基配列を決定し、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のデータベースを利用して菌種の同定を行った。プライマーの配列は以下の通りである。

*rrs*-F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

*rrs*-R: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG AC-3'

#### 3. A 群 β 溶連菌抗原検出キットの検出感度の測定

ストレップ A テストパック・プラス (ダイナボット) を使用して、今回の分離菌の検出感度を測定した。綿棒に 10 倍段階希釈した培養菌液 50

μl を し み こ ま せ た も の を 検 体 と し て、検出限界菌数を測定した。測定は 3 回実施した。

#### 4. *emm* 型別

M 蛋白または M 蛋白様蛋白 (M-like protein) をコードする遺伝子 (*emm* または *emml*) について、Beall ら<sup>5)</sup>の方法に準じて PCR による遺伝子の増幅を行い、増幅産物の 5' 末端の塩基配列を調べ、Centers for Disease Control and Prevention (CDC) のデータベース (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/streptindex.html>) を利用して型別を行った。

### 成 績

分離された菌株の性状を Table 1 に示した。トリプチケースソイヒツジ血液寒天培地上で若干大さめの β 溶血を示し、グラム陽性、球菌、カタラーゼ陰性、バシトラシン感受性であったが、PYR 試験は陰性であった。

群別キットの成績はいずれのキットを用いても明確に A 群と判定され、類属反応は認められなかった。

アピストレップ 20 を用いた同定成績は 4 時間培養でプロファイル: 0463005、同定結果: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* % id = 98.9、24 時間培養でプロファイル: 0463015、同定結果: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* % id = 98.6 であった。*rrs* 遺伝子のシーケンスによる同定結果も *Streptococcus dysgalactiae* subsp.

Table 1 Characteristics of the isolate

cell morphology	cocci
gram stain	positive
β-hemolysis	+
catalase	-
Voges-Proskauer	-
bacitracin	sensitive
PYR	-
acid from	
trehalose	+
sorbitol	-
Lancefield's serological group	
Seroiden strepto kit	A
Strept LA	A
Streptococcal grouping kit	A
<i>emm</i> typing	stg485

Table 2 Sensitivity of the Strep A Testpack using artificial swabs containing different numbers of the isolate

	Number of cells/swab (CFU)								
	$1.1 \times 10^5$	$3.5 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$3.5 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$	$3.5 \times 10^2$	$2.3 \times 10^2$
Strep A (test 1)			+			-			-
Strep A (test 2)		+			-			-	
Strep A (test 3)	+			+			-		

*equisimilis* であった。

ストレプト A テストパック・プラスの測定結果をまとめて Table 2 に示した。今回の分離菌を  $1.1 \times 10^4$  CFU 以上含む綿棒検体ですべて陽性と判定された。

*emm* 型別の結果は *stg485* であった。

### 考 察

レンサ球菌属の分類は、1903 年に Schottmüller<sup>6)</sup>によって、赤血球に対する溶血性の違いから hemolytic streptococci(溶血レンサ球菌), viridans streptococci(緑色レンサ球菌), nonhemolytic streptococci(非溶血レンサ球菌)に分けられた。ついで 1919 年 Brown<sup>7)</sup>によって  $\alpha$  型:メトヘモグロビンを生じ緑色の溶血環を示すもの,  $\alpha$  型 ( $\alpha$ -prime 型):不完全な溶血で溶血環内に赤血球の一部が残存するもの,  $\beta$  型:完全な溶血環を生じるもの,  $\gamma$  型:溶血しないものの分類が発表された。その後, Lancefield<sup>8)</sup>によって細胞壁多糖体抗原の免疫学的差異により分類が行われる様になり, 現在では A 群~W 群までに分類されている (I 群および J 群はない)。

この溶血性による分類や血清学的分類はレンサ球菌の種名を表しているものではなく, これらの結果だけでは正確な菌種の同定は行えない<sup>2)</sup>。人から分離される頻度の高い A 群, B 群, C 群, G 群抗原を保有するレンサ球菌 (以下, A 群菌, B 群菌, C 群菌, G 群菌) に関しても, A 群抗原は *S. pyogenes* 以外にも Anginosus group (“*Streptococcus milleri*” group) の一部の菌が保有している<sup>9)</sup>。B 群抗原を保有するのは *Streptococcus agalactiae* 1 菌種であるが, C 群に関しては  $\beta$  溶血を示す C 群菌をトレハロース, ソルビットの分解性

により, トレハロース, ソルビットともに陰性の *Streptococcus equi*, トレハロース陰性, ソルビット陽性の *Streptococcus zooepidemicus*, トレハロース陽性, ソルビット陰性の *Streptococcus equisimilis* の 3 菌種に区別し,  $\alpha$  溶血を示す *Streptococcus dysgalactiae* を含めて 4 菌種に分類されてきた<sup>9)</sup>。また G 群菌は長年種名を与えられずに放置されてきた<sup>9)</sup>。

しかし, これらの群別分類は臨床的にも疫学的にも便宜であり長年広く一般に使用されてきた。すなわち, A 群抗原を保有するレンサ球菌は 1 菌種ではないが, 実際に人由来の材料から分離された  $\beta$  溶血レンサ球菌の同定を行う場合, Anginosus group の一部の菌 (group に含まれる *Streptococcus anginosus* の一部の菌) は血液寒天培地上で  $\beta$  溶血を示すが, 好気培養での集落は *S. pyogenes* に比べてはるかに小さく容易に判別が可能である。また Anginosus group は上気道の感染を起こすこともなく, まれに菌血症, 膿瘍などの検査材料から分離されるだけであり<sup>10)</sup>, 人に感染症を引き起こす頻度は *S. pyogenes* に比べてはるかに低い。そのため血液寒天培地上で  $\beta$  溶血を示し, カタラーゼ陰性, グラム陽性の球菌が A 群抗原を保有しておれば *S. pyogenes* と同定しても問題は生じなかった。また, C 群菌および G 群菌が *S. pyogenes* に類似した上気道感染, 皮膚感染, 敗血症, 心内膜炎, 髄膜炎, 敗血性関節炎などを引き起こしたり, C 群菌が咽頭炎に引き続き糸球体腎炎を引き起こしたという報告<sup>11)</sup>もあるが, *S. pyogenes* に比べて発生頻度も低いため菌種の同定はそれほど重要視されなかった。そのため  $\beta$  溶血レンサ球菌では, 他の細菌で見られるような生化学的性状

Table 3 Differentiation of large-colony-forming  $\beta$ -hemolytic streptococci possessing Lancefield's group A, C, G or L antigen

Species	Lancefield antigen(s)	Hosts	PYR	VP	BGUR
<i>S. pyogenes</i>	A	Humans	+	-	( - )
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	A, C, G	Humans	-	-	+
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	C, L	Animals *	-	-	+
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	Animals *	-	-	+
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	Animals *	-	-	+
<i>S. canis</i>	G	Animals *	-	-	( - )

+ : 90% or more of strains are positive, ( - ) : 11 20% of strains are positive, - : 90% or more of strains are negative.

\* Strains are normally isolated from animals and occasionally reported as agents of human infection.

の確認を基礎とした同定方法は普及しなかった。

近年、生化学的性状に加えて遺伝子解析、細胞壁の分析等の成果を受けて菌種がかなり整理されてきた。C 群菌、G 群菌、L 群抗原を保有する  $\beta$  溶血レンサ球菌（以下、L 群菌）に関して、1984 年に Farrow ら<sup>12)</sup>は菌の GC%、DNA-DNA hybridization、生化学的性状を検査することにより、*S. dysgalactiae*、*S. equisimilis*、人から分離され血液寒天培地上で大きな集落を作る G 群菌および L 群菌を 1 つの種 *S. dysgalactiae* とすること、また *S. zooepidemicus* を *S. equi* の subspecies とすることを提案した。続いて Vandamme<sup>13)</sup>らは *S. dysgalactiae* を 2 つの subspecies に分け、人から分離され  $\beta$  溶血を示す大きな集落を作り C 群または G 群抗原を保有する *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* と、動物から分離され  $\beta$ 、 $\alpha$  溶血または非溶血を示す大きな集落を作り C 群または L 群抗原を保有する *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* に分類した。また、Devriese ら<sup>14)</sup>は主に動物から分離され  $\beta$  溶血を示す大きな集落を作り G 群抗原を保有するレンサ球菌を *Streptococcus canis* とした。以上をまとめて、各菌の PYR 試験、Voges-Proskauer 試験（VP 試験）、 $\beta$ -D-グルクロニダーゼ活性試験（BGUR 試験）の性状<sup>3)</sup>とともに Table 3 に示した。

今回分離された菌は生化学的性状および *rrs* 遺伝子のシークエンス結果から *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* と同定され、血清学的群別の結果が A 群であったことから、明らかに A 群抗原を保有する *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (A 群 *S.*

*dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) である。これは標準的な *S. pyogenes* の同定法、すなわち血液寒天培地上で  $\beta$  溶血を示し、グラム陽性球菌、カタラーゼ陰性であることを確認後、血清学的群別を行う同定方法では *S. pyogenes* と A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* が全く判別できないことを示している。血清 T 型別を実施した場合でも *S. pyogenes* は型別不能菌が多いため<sup>15)</sup>、気づかれずに *S. pyogenes* T 型別不能菌として同定されてしまう危険性が高い。また *S. pyogenes* 感染症の迅速診断法も検査材料中の A 群多糖体抗原を検出する方法が用いられていることから両者の判別は不可能である。ストレプト A テストパック・プラスを用いた迅速診断法の検出感度も今回分離された A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* では菌数が  $1.1 \times 10^4$  CFU 以上で陽性であり、保科<sup>16)</sup>が報告している同迅速診断キットの *S. pyogenes* の検出感度  $10^4$  CFU と同レベルであった。

*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* は従来 *S. pyogenes* に比べて病原性は低いとされてきた。今回の事例も感染症の徴候を示さず除菌された。しかし近年わが国では、G 群抗原を保有する *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* による劇症型溶血性レンサ球菌感染症および重症 G 群溶血性レンサ球菌感染症が多数報告されるようになり<sup>17)</sup>、今後 A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* が重症の感染症を引き起こす可能性も否定できない。また感染症法の 4 類感染症（劇症型溶血性レンサ球菌感染症および A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎）の届け出とも

関連して *S. pyogenes* と A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の鑑別は非常に重要であると考えられる。

菌の由来に関しては不明であるが, *emm* 型別の結果が *stg485* であり, これは G 群菌が保有するとされる *emm* 遺伝子であることから<sup>18)</sup>, G 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の細胞壁多糖体をつくる遺伝子に変異が起こり A 群抗原を保有するようになった可能性も考えられる。

わが国における A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の浸淫度は现阶段では推測するしかないが, 和田ら<sup>19)</sup>が 2000 年に東京都内で分離した A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の 16S リボソーム RNA 遺伝子の 5' 末端に近い領域の部分シーケンスを Gene Bank に登録していることから, かなり広い範囲に広がっている可能性もある。

今後, レンサ球菌の検査を実施する場合には, A 群 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の存在を念頭に置き, 群別試験の結果はその菌の性状の一つとして考え, PYR 試験等の生化学的性状を確認して同定を行う必要があると考える。

#### 文 献

- 1) Lancefield RC : A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J Exp Med 1933 ; 57 : 571 - 95.
- 2) 中島邦夫 : A 群溶血レンサ球菌の群別と型別 . 臨床と微生物 1988 ; 15 : 22 - 7.
- 3) Bert F, Lambert-Zechovsky N : Analysis of a case of recurrent bacteraemia due to group A *Streptococcus equisimilis* by pulsed-field gel electrophoresis. Infection 1997 ; 25 : 250 - 1.
- 4) Brandt CM, Haase G, Schnitzler N, Zbinden R, Lütticken R : Characterization of blood culture isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield 's group A antigen. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 4194 - 7.
- 5) Beall B, Facklam R, Thompson T : Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 953 - 8.
- 6) Schottmüller H : Die Artumterscheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar. Munch Med Wochenschr 1903 ; 50 : 849.
- 7) Brown JH : The use of blood agar for the study of streptococci. Monog, No. 9, The Rockefeller Inst Med Res, New York, 1919 ; p. 122.
- 8) Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D : *Streptococcus*. In : Manual of Clinical Microbiology 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, 1999 ; p. 283 - 96.
- 9) Parker MT : *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In : Topley and Wilson 's principles of bacteriology, virology and immunity 7th ed. Volume 2 Systematic bacteriology, Edward Arnold, London, 1983 ; p. 173 - 217.
- 10) Bert F, Bariou-Lancelin M, Lambert-Zechovsky N : Clinical significance of bacteremia involving the " *Streptococcus milleri* " group : 51 cases and review. Clin Infect Dis 1998 ; 27 : 385 - 7.
- 11) Duca E, Teodorovici G, Radu C, Vita A, Talasman-Niculescu P, Bernescu E, et al. : A new nephritogenic *Streptococcus*. J Hyg ( Lond ) 1969 ; 67 : 691 - 8.
- 12) Farrow JAE, Collins MD : Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G and L and possibly related taxa. System Appl Microbiol 1984 ; 5 : 483 - 93.
- 13) Vandamme P, Pot B, Falsen E, Kersters K, Devriese LA : Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G, and L ( *Streptococcus dysgalactiae* ) and proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol 1996 ; 46 : 774 - 81.
- 14) Devriese LA, Hommez J, Kilpper-Bälz R, Schleifer K-H : *Streptococcus canis* sp. nov. : a species of group G streptococci from animals. Int J Syst Bacteriol 1986 ; 36 : 422 - 5.
- 15) 勝川千尋, 原田七寛, 中曾根智恵 : 1967 年から 1987 年の 21 年間に大阪府下で分離された A 群溶血レンサ球菌について 第 1 編流行菌型の推移 . 感染症誌 1989 ; 63 : 1257 - 64.
- 16) 保科 清 : A 群溶連菌抗原検出法 . 臨床と微生物 1995 ; 22 : 683 - 6.
- 17) 溶血レンサ球菌レファレンスセンター . 2001 第 22 回衛生微生物協議会溶血レンサ球菌レファレンスセンター報告書 .
- 18) Centers for Disease Control and Prevention : *Streptococcus pyogenes* database. <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/streindex.html>.
- 19) Wada A, Nakajo M, Inagawa H, Nukui Y, Hara S, Matsushita H : *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield 's group A antigen. Gene Bank accession No. AF239716.

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Possessing Lancefield 's Group A AntigenChihiro KATSUKAWA<sup>1)</sup>, Aki TAMARU<sup>1)</sup> & Yoshiro MORIKAWA<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Microbiology, Osaka Prefectural Institute of Public Health<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Yodogawa Christian Hospital

We isolated *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* with Lancefield 's group A antigen from a patient in Osaka City. This clinical isolate formed  $\beta$ -hemolytic large colonies on sheep blood agar, and was catalase-negative gram-positive cocci carrying Lancefield 's group A antigen. Therefore, *Streptococcus pyogenes* and this clinical isolate could not be classified by the conventional method on the basis of Lancefield 's group antigen. In addition, the rapid detection system of group A streptococci based on group A antigen detection techniques could not divide into two species. Recently, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* with Lancefield 's group G antigen has been isolated from severe invasive streptococcal infection in an increasing frequency in Japan. A possibility that group A *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* cause a serious infection from now on cannot be denied. Thus the discrimination of *S. pyogenes* from group A *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* is very important. To identify  $\beta$ -hemolytic streptococci, it is necessary to consider a serogrouping test as one of characteristics of streptococci, and to identify by checking biochemical tests like the PYR test.