

*Helcococcus kunzii* が分離された牛流産事例三角和華子<sup>1)†</sup> 岡田大輔<sup>1)</sup> 平島宜昌<sup>1)</sup> 藤園昭一郎<sup>1)</sup> 楠本正博<sup>2)</sup>

1) 鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678)

2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門九州研究拠点  
(〒 891-0105 鹿児島市中山町 2702)

(2019年1月20日受付・2019年6月18日受理)

## 要 約

2017年5月、流産胎子の肺からグラム陽性球菌が分離され、16S rRNA 遺伝子解析により *Helcococcus kunzii* と同定された。病理組織学的検査では化膿性気管支肺炎が認められ、分離菌と交差反応を確認した抗 *H. ovis* 抗体を用いた免疫染色で陽性反応が認められたことから、*H. kunzii* が流産に関与していた可能性が示唆された。牛の流産胎子から *H. kunzii* が分離された事例は、今までに報告がないため、今後さらなる症例の蓄積や検討により *H. kunzii* の牛への病原性を解明する必要がある。——キーワード：流産、牛、*H. kunzii*。

-----日獣会誌 72, 686~690 (2019)

*Helcococcus* 属菌はカタラーゼ陰性のグラム陽性球菌であり、これまでに5菌種 (*H. kunzii*, *H. ovis*, *H. sueciensis*, *H. seattlensis*, *H. pyogenes*) が報告されている。*Helcococcus* 属菌は、人の創傷部 [1, 2] や人工関節移植者 [3, 4]、尿路敗血症患者からの分離事例 [5] が報告されているが、生化学的性状が他菌種と類似しており、簡易同定キットでは *H. kunzii* が *Aerococcus viridans* [6] に、*H. ovis* が *Granulicatella adiacens* [7]、*Gemella morbillorum* [8] に誤同定されるなど同定が困難であり、正確な同定には、16S rRNA 遺伝子解析等が必要となる。

家畜疾病における *Helcococcus* 属菌の関与についての報告は少ないが、*H. ovis* による牛や豚の心内膜炎の報告がある [9, 10]。また、*H. kunzii* については豚の化膿性膀胱炎症例 [11] や、牛の産褥性子宮炎症例 [6] における分離事例が報告されている。一方、家畜の死流産における *H. kunzii* の関与は、これまで報告されていない。

今回、鹿児島県内で発生した牛流産事例の病性鑑定の結果、*H. kunzii* の関与が示唆されたので、その概要を報告する。

## 材 料 及 び 方 法

細菌学的検査：無菌的に採取した流産胎子の脳、脊

髄、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節の新鮮断面を、5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天培地、チョコレート寒天培地、5% 綿羊血液加 GAM 寒天培地及び DHL 寒天培地にスタンプした。その後、DHL 寒天培地は 37℃ で 24 時間好気培養、5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天培地及びチョコレート寒天培地は 37℃ で 48 時間 5% CO<sub>2</sub> 培養、5% 綿羊血液加 GAM 寒天培地は 37℃ で 48 時間嫌気培養を行った。

分離された菌株は、グラム染色、カタラーゼ試験及びオキシダーゼ試験を実施後、市販の簡易同定キット (API20 STREP, ビオメリュージャパン(株), 東京) を用いた性状検査並びに 16S rRNA 遺伝子解析 [12] に供した。また、分離菌の薬剤感受性試験として、アンピシリン (ナカライテスク(株), 京都)、テトラサイクリン (和光純薬(株), 大阪)、バンコマイシン (和光純薬(株), 大阪) 及びセフトロフル (シグマアルドリッチジャパン(株), 東京) の4薬剤について、寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

分離菌は、5% 綿羊血液加ミューラーヒントン寒天培地での発育が悪かったため、5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天培地を用いて薬剤感受性試験を実施し、5% CO<sub>2</sub> 下で 48 時間培養後に判定した。軽微な発育は無視し、菌の発育の抑制が認められた濃度を MIC として、3 回繰り返して試験を実施した。さらに、上記の4薬剤のう

† 連絡責任者：三角和華子 (鹿児島中央家畜保健衛生所)

〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678

☎ 099-274-7555 FAX 099-274-7556

E-mail : wakako-misumi@pref.kagoshima.lg.jp

ち薬剤感受性ディスク（センシディスク，日本ベクトン・ディッキンソン株，東京）が市販されている3薬剤（アンピシリン，テトラサイクリン，バンコマイシン）について，一濃度ディスク法による薬剤感受性試験をそれぞれ3回実施した。

**病理組織学的検査及び免疫組織化学的検査：**上述の流産胎子の心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，舌，第一胃，第二胃，第三胃，第四胃，腸，胸腺，大脳，小脳，脳幹，脊髄を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後，パラフィン包埋切片を作製し，常法に従いヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施し鏡検した。また，肺の組織切片，肺分離菌の塗抹標本及びパラフィン包埋切片についてグラム染色を施すとともに，一次抗体に抗*H. ovis*家兔免疫血清，二次抗体に市販試薬（ヒストファインシンプルステイン MAX-PO，株）ニチレイバイオサイエンス，東京）をそれぞれ用いた免疫組織化学的検査を実施した。

**透過型電子顕微鏡（TEM）検査：**ホルマリン固定後の肺組織を2%オスミウム酸緩衝液で後固定し，市販試薬（EM ステイナー，日新 EM 株，東京）でブロック染色を実施後，エポキシ樹脂（Quetol 651，日新 EM 株，東京）に包埋した。その後超薄切片を作製し，上述の市販試薬（EM ステイナー）及び佐藤の鉛染色液で染色し，透過型電子顕微鏡（JEM-1210，日本電子株，東京）にて観察した。

## 成 績

**発生状況，外貌及び剖検所見：**2017年5月29日，鹿児島県内で黒毛和種繁殖雌牛180頭を飼養する農場において，繁殖雌牛1頭が胎齢220日で流産した。流産胎子の左右眼球は白濁しており，剖検では血様の胸水及び腹水貯留が認められ，胸腔及び腹腔内の主要臓器は赤色化がみられ水腫性に軽度腫脹し，やや脆弱であった。剖検時，肺の腫大や硬化は認められず，皮下織の膠様浸潤や肝臓の黄褐色病変も認められなかった。

**細菌学的検査：**5%綿羊血液加トリプトソイ寒天培地，チョコレート寒天培地，5%綿羊血液加 GAM 寒天培地において，肺の断面のスタンプ部位から純培養状に灰白色のコロニーの発育が認められた。グラム染色を実施した結果，大きさにばらつきのあるグラム陽性球菌が認められた（図1-A）。また，その他臓器からは菌の発育は認められなかった。

肺からの分離菌の生化学的性状は，カタラーゼ及びオキシダーゼ陰性であり，簡易同定キットにおいて，エスクリン，ピロリドニルアルリアミダーゼ，乳糖及びD-トレハロースの項目が陽性となり，*A. viridans* 99.5%（プロファイル：4100410）と判定された。しかしながら，肺からの分離菌は $\alpha$ 溶血を呈する*A. viridans*とは異なっていることや，グラム染色においても*A.*

表1 薬剤感受性試験結果

	寒天平板希釈法 (MIC: $\mu\text{g/ml}$ )			一濃度ディスク法 (阻止円の大きさ: mm)		
	1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目
アンピシリン	2	1	2	34	33	34
テトラサイクリン	0.5	0.25	0.25	48	47	47
バンコマイシン	0.5	0.5	0.25	38	38	41
セフトオフル	8	8	16	NT*	NT	NT

\*NT: not tested

*viridans* のグラム染色像とは明らかに異なることから，16S rRNA 遺伝子解析を実施したところ，*H. kunzii* CIP103932 株（GenBank アクセッション番号：KM403387）と99.8%（1342/1345塩基）一致したことから，分離菌を*H. kunzii*と同定した。

また，薬剤感受性試験において，各薬剤のMICは，アンピシリンが1~2 $\mu\text{g/ml}$ ，テトラサイクリンが0.25~0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，バンコマイシンが0.25~0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，セフトオフルが8~16 $\mu\text{g/ml}$ であり，ディスク法による阻止円の大きさは，アンピシリンが33~34mm，テトラサイクリンが47~48mm，バンコマイシンが38~41mmであった（表1）。

**病理組織学的検査，免疫組織化学的検査及びTEM検査：**肺胞は拡張しておらず，肺胞や細気管支に好中球及びマクロファージが広く浸潤しており（図1-B），肺胞中隔は，染色性がやや低下していた。また，肺胞及び細気管支腔内には，脱落した肺胞上皮細胞や粘膜上皮細胞等を含む退廃物とともに，直径約1.8 $\mu\text{m}$ 以下の大きさにはばらつきのあるグラム陽性球菌が多数認められ，マクロファージによる貪食像が確認された（図1-B）。さらに，細気管支周囲にはリンパ球の集簇巣が散在して認められた。また，抗*H. ovis*家兔血清を用いた免疫組織化学的検査では，分離菌株の塗抹標本及びパラフィン包埋切片，並びに肺の組織切片のいずれも，菌体に一致して陽性反応が認められた（図1-C）。TEMによる観察では，菌体には平滑な細胞壁とその周囲に綿屑状の莢膜様物質が確認された（図1-D）。なお，肺以外の臓器に著変は認められなかった。

## 考 察

細菌学的検査の結果，流産胎子の肺から大きさにばらつきのあるグラム陽性球菌が純培養状に分離され，16S rRNA 遺伝子解析の結果，*H. kunzii*と同定された。病理組織学的検査では，グラム陽性球菌を伴う化膿性気管支肺炎が認められ，TEMによる観察では，菌体は類円形で平滑な細胞壁を有し，グラム陽性球菌の構造を示していた。また，抗*H. ovis*家兔血清を用いた免疫組織化学的検査において交差反応が確認された。

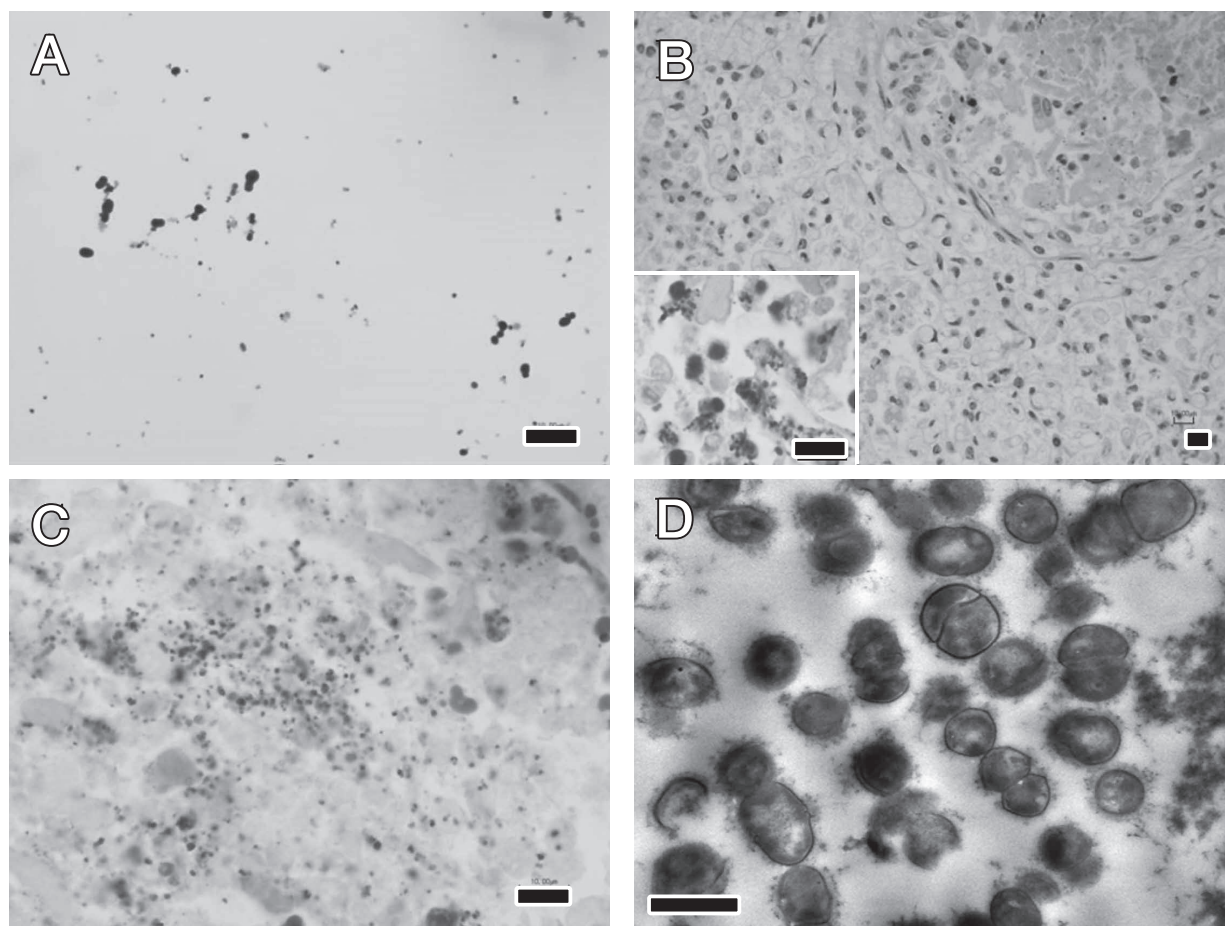


図1 分離菌のグラム染色像及び肺の病理組織学的検査結果

- A: 肺から分離された *H. kunzii* のグラム染色像. 異なる大きさのグラム陽性球菌が認められた (Bar=10 $\mu$ m).
- B: 肺の組織像. 肺では細気管支に細胞退廃物が貯留し, 肺胞では好中球やマクロファージが広く浸潤していた. マクロファージに貪食されるグラム陽性球菌も確認された (HE 染色 Bar=10 $\mu$ m).
- C: 肺の免疫組織化学的検査結果. 細気管支内に抗 *H. ovis* 免疫家兎血清による交差反応が認められた (ポリマー法 1,000 倍希釈 Bar=10 $\mu$ m).
- D: 肺の TEM 像. 細気管支内に分裂増殖等を示す菌体が多数確認された. 菌体には平滑な細胞壁とその周囲に綿屑状の莢膜様物質が確認された (Bar=1 $\mu$ m).

本症例で使用した抗 *H. ovis* 抗血清は, 分離した *H. kunzii* の直接塗抹標本やパラフィン包埋切片でも良好な反応を示したものの, *A. viridans* の一部に交差反応が確認された. しかしながら, 細菌学的検査において *H. kunzii* が分離されており, 病理組織学所見においても, 大きさにばらつきのあるグラム陽性球菌が確認されたことから, 本症例を *H. kunzii* による化膿性気管支肺炎と診断した.

今回の事例では, 剖検時にブルセラ病の流産胎子に特徴的な肺の腫大や硬化は認められず, カンピロバクター症の胎子にみられる皮下織の膠様浸潤や肝臓の黄褐色病変等の所見も認められなかった. 病理組織学的検査では, 肺にのみ病変が認められたことから, 胎子に認められた化膿性気管支肺炎が流産の原因となったことが示唆された.

過去の細菌性流産事例においても, 肺からの細菌分

離と化膿性気管支肺炎が特徴であるという報告 [13, 14] があることから, 化膿性気管支肺炎は細菌性流産を診断する上で重要な所見であると考えられる.

*H. kunzii* は, *A. viridans* とエスクリン分解能, ピロリドニルアルリアミダーゼ活性, トレハロース及び乳糖分解能の生化学性状が類似しており [15-17], バンコマイシン感受性の *H. kunzii* が, 簡易同定キットにおいて *A. viridans* に誤同定された報告がある [6, 17]. 本事例の分離株も, それらの特徴が一致していることから, 過去の分離菌と類似した性状の *H. kunzii* が今回の流産に関与した可能性が考えられた (表2).

*A. viridans* は, *Helcococcus* 属菌と同様に牛の子宮内細菌としても知られており [18], 死流産胎子の臓器等から分離された際に原因菌として誤って判断される恐れがあるため, 正確な菌種同定が非常に重要である. *H. kunzii* は, グラム染色像で多形性を示すことが知られ



表2 分離菌の性状

検査項目	分離株	Collinsら [17]
アセトイン産生 (VP)	-	-
馬尿酸ナトリウム加水分解	-	-
エスクリン	+	+
ピロリドニルアリアルミダーゼ	+	+
α-ガラクトシダーゼ	-	-
β-グルクロニダーゼ	-	-
β-ガラクトシダーゼ	-	-
アルカリフォスファターゼ	-	-
ロイシンアリアルミダーゼ	-	-
アルギニンジヒドロラーゼ	-	-
D-リボース	-	-
L-アラビノース	-	-
D-マンニトール	-	-
D-ソルビトール	-	-
乳糖	+	+
D-トレハロース	+	+
イヌリン	-	-
D-ラフィノース	-	-
でんぷん	-	v <sup>1)</sup>
グリコーゲン	-	v <sup>2)</sup>
β溶血性	-	-

1) 試薬によって異なる

2) 株によって異なる

[17, 19], その同定には塩基配列解析や質量分析が必要になる [19] など, 迅速な同定が難しい菌種であることから, 特異性の高い新たな菌種同定手法の開発が望まれる.

また, 過去の報告において, *Helcococcus* 属菌は牛の膣内の正常細菌叢であり, 子宮内感染症を引き起こす可能性が示唆されている [20]. さらに, 産褥性子宮炎の牛から *H. kunzii* が分離された報告 [6] があることから, 本事例では母牛の膣内または子宮内に存在していた *H. kunzii* が羊水中に侵入後増殖し, 胎子の肺へ到達したことが考えられた.

今回の病性鑑定の結果から, *H. kunzii* が流産に関与した可能性が示唆された. 本症例は, 世界で初めて牛の流産胎子から *H. kunzii* が分離された, *H. kunzii* の病原性の解明につながる非常に貴重な事例である. 現段階では, 国内の飼養牛における *H. kunzii* の保菌状況や, *H. kunzii* が流産に関与する機序は明らかになっていない. 今後, 広域な調査により, 牛における *H. kunzii* の保菌状況を明らかにするとともに, さらなる症例の蓄積や検討により *H. kunzii* の牛への病原性を解明する必要がある.

稿を終えるにあたり, 抗血清を分与していただいた広島県西部畜産事務所・家畜保健衛生所の方々に深謝する.

### 引用文献

[1] Stanger KM, Albert F, Kneser U, Bogdan C, Horch

RE : Management of chronic osteomyelitis of the tibia with life-threatening complications under negative pressure wound therapy and isolation of *Helcococcus kunzii*, Int Wound J, 12, 443-446 (2015)

[2] Collins MD, Falsen E, Brownlee K, Lawson PA : *Helcococcus sueciensis* sp. nov., isolated from a human wound, Int J Syst Evol Micr, 54, 1557-1560 (2004)

[3] Pérez-Jorge C, Cordero J, Marin M, Esteban J : Prosthetic Joint Infection Caused by *Helcococcus kunzii*, J Clin Microbiol, 50, 528-530 (2012)

[4] Panackal AA, Houze YB, Prentice J, Leopold SS, Cookson BT, Liles WC, Limaye AP : Prosthetic joint infection due to "*Helcococcus pyogenes*", J Clin Microbiol, 42, 2872-2874 (2004)

[5] Chow SK, Clarridge JE 3rd : Identification and clinical significance of *Helcococcus* species, with description of *Helcococcus seattlensis* sp. nov. from a patient with urosepsis, J Clin Microbiol, 52, 854-858 (2014)

[6] Locatelli C, Scaccabarozzi L, Pisoni G, Bronzo V, Casula A, Testa F, Allodi S, Pollera C, Toni F, Moroni P : *Helcococcus kunzii* and *Helcococcus ovis* isolated in dairy cows with puerperal metritis, J Gen Appl Microbiol, 59, 371-374 (2013)

[7] Rothschild CM, Oaks JL, Schaupp JK, Rurangirwa FR, Sellon DC, Hines MT : *Helcococcus ovis* isolated from a pulmonary abscess in a horse, J Clin Microbiol, 42, 2224-2226 (2004)

[8] 相川勝弘, 小沢由美, 久島昌平, 沢谷広志, 阿部矩久, 平田 清 : 牛の疣状心内膜炎7例から分離されたビタミン B6 依存性レンサ球菌, 食品衛生研究, 43, 47-54 (1993)

[9] 森本和秀, 久保田泰徳, 藤田敦子, 川本千代実, 茨木義弘 : *Helcococcus ovis* が分離された牛の疣贅性心内膜炎の1症例, 日獣会誌, 59, 325-328 (2006)

[10] 吉田桂子, 古川一郎, 相川勝弘, 荒木美緒, 横田宏一郎, 廣井恵津子, 佐多 辰, 松阪龍雄 : 牛及び豚の疣贅性心内膜炎から分離された *Helcococcus ovis* の性状及び迅速・特異的同定法としての PCR 法の開発, 日獣会誌, 68, 523-529 (2015)

[11] Grattarola C, Bellino C, Tursi M, Maggi E, D'Angelo A, Gianella P, Dondo A, Cagnasso A : *Helcococcus kunzii* isolated from a sow with purulent urocystitis, J Clin Microbiol, 48, 3019-3020 (2010)

[12] Tanaka D, Isobe J, Watahiki M, Nagai Y, Katsukawa C, Kawahara R, Endoh M, Okuno R, Kumagai N, Matsumoto M, Morikawa Y, Ikebe T, Watanabe H : Genetic features of clinical isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen, J Clin Microbiol, 46, 1526-1529 (2008)

[13] 平島 淳, 村上覚史, 小川明宏, 原 普, 島田 純 : 千葉県における過去 12 年間の *Arcanobacterium pyogenes* による牛流産の発生状況, 日獣会誌, 55, 137-141 (2002)

[14] 藤本彩子 : 家畜衛生研修会 (病性鑑定病理部門, 2013) における事例記録 (I) 牛流産胎子のカンピロバクターによる化膿性気管支肺炎, 日獣会誌, 67, 495-498 (2014)

[15] Facklam R, Lovgren M, Shewmaker PL, Tyrrell G :

- Phenotypic description and antimicrobial susceptibilities of *Aerococcus sanguinicola* isolates from human clinical samples, *J Clin Microbiol*, 41, 2587-2592 (2003)
- [16] Williams REO, Hirsch A, Cowan ST : *Aerococcus*, a new bacterial genus, *J Gen Microbiol*, 8, 475-480 (1953)
- [17] Collins MD, Facklam RR, Rodrigues UM, Ruoff KL : Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from clinical sources: description of *Helcococcus kunzii*. gen. nov., sp. nov., *Int J Syst Bacteriol*, 43, 425-429 (1993)
- [18] Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H : Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle, *Reproduction*, 123, 837-845 (2002)
- [19] Vergne A, Guérin F, Lienhard R, Le Coustumier A, Daurel C, Isnard C, Marty N, Poyart C, Cattoir V : Identification and clinical significance of *Helcococcus kunzii* in human samples, *J Clin Microbiol*, 53, 2703-2705 (2015)
- [20] Gonzalez Moreno C, Fontana C, Cocconcelli PS, Callegari ML, Otero MC : Vaginal microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders, *J Appl Microbiol*, 121, 1232-1241 (2016)

---

*Helcococcus kunzii* Isolated from an Aborted Bovine Fetus

Wakako MISUMI<sup>1)†</sup>, Daisuke OKADA<sup>1)</sup>, Yoshimasa HIRASHIMA<sup>1)</sup>,  
Shoichiro FUJISONO<sup>1)</sup> and Masahiro KUSUMOTO<sup>2)</sup>

1) *Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan*

2) *Kyushu Research Station, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 2702 Chuzan, Kagoshima, 891-0105, Japan*

**SUMMARY**

In May 2017, we isolated gram-positive cocci from the lungs of an aborted bovine fetus. The bacterium was identified as *Helcococcus kunzii* using 16S rRNA gene sequencing. Histopathological examination indicated suppurative bronchopneumonia. Immunohistochemical examination using an antiserum prepared from *Helcococcus ovis* that reacts to *H. kunzii* revealed a diffuse, positive reaction with gram-positive cocci. These results suggest that *H. kunzii* was the cause of abortion. To the best of our knowledge, this is the first reported case in which *H. kunzii* was isolated from an aborted bovine fetus. Further studies are needed to clarify the pathogenesis of *H. kunzii* infection in cattle. — Key words : abortion, cattle, *H. kunzii*.

† Correspondence to : Wakako MISUMI (*Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center*)

*1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan*

*TEL 099-274-7555 FAX 099-274-7556 E-mail : wakako-misumi@pref.kagoshima.lg.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 686 ~ 690 (2019)*