

原 著

BCG 接種後に起こった結核性淋巴節炎の2症例と  
その淋巴節分離菌の性状—BCG 株を他の *Mycobacterium bovis* 株から区別する方法—

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

東海林 黎 吉・松 田 啓 子

市立室蘭総合病院

受付 昭和 58 年 10 月 19 日

CHARACTERISTICS OF ACID-FAST ORGANISMS ISOLATED  
FROM TUBERCULOUS LYMPHADENITIS-LESION  
OF TWO CHILDREN WHO HAD BEEN BCG-VACCINATED—Differentiation of BCG from Other Strains of *Mycobacterium bovis*—

Michio TSUKAMURA\*, Reikichi SHOJI and Keiko MATSUDA

(Received for publication Oct. 19, 1983)

Acid-fast organisms isolated from tuberculous lymphadenitis-leison of two children vaccinated with BCG were identified as BCG. The following characteristics of the BCG strain were considered as useful for differentiating BCG from other strains of *M. bovis*: 1) weakly positive reaction of the niacin test; 2) weakly positive reaction of the nitrate reduction; 3) growth on a synthetic medium containing glucose as the sole source of carbon in the presence of ammoniacal nitrogen; 4) growth on a synthetic medium containing nitrate as the sole source of nitrogen in the presence of glycerol-carbon; 5) growth on a modified Sauton agar medium (glutamate was substituted for asparagine); 6) considerable growth on the Sauton agar medium containing 0.1% picric acid (pH 7.0); 7) growth on Ogawa egg medium containing thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 8) formation of rough eugonic colonies on Ogawa egg medium.

In addition, the following two may be shown: (a) growth on Ogawa egg medium containing sodium salicylate, 0.5  $\text{mg}/\text{ml}$ ; (b) growth on Ogawa egg medium containing  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , 0.125  $\text{mg}/\text{ml}$ .

Other *M. bovis* strains do not show the above characteristics.

**Keywords:** BCG, Characteristics of BCG, キーワーズ: BCG, BCG の特徴, BCG の区別 (他  
Differentiation of BCG (from other *M. bovis* の牛型結核菌との)  
strains)

\* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

## 緒 言

BCG (Bacille de Calmette et Guérin) は弱毒化した *Mycobacterium bovis* であり、稀に感染を起こすことが知られている。感染には最も軽い腋窩リンパ節炎から最も重い全身感染まで種々の段階がある<sup>1)~23)</sup>。Mande et al<sup>8)</sup> によれば、最も普通にみられる軽い感染症であるリンパ節炎の頻度は0.3%であるという。この数値をみると、日本でもBCG接種後のリンパ節炎がかなりの頻度であってよさそうであるが、日本でのBCG接種後のリンパ節炎の報告は比較的少ない。我々が興味を持つのは、このように感染を起こしたBCGの性状が原株のままであるのか、それとも多少変異を起こした突然変異菌であるのかということである。これに関して、森岡<sup>9)</sup>、佐藤など<sup>10)</sup> は、BCG接種後にリンパ節から分離した抗酸菌 (BCG) 各々1株の性状を調べて、原株と特に変わった点はなかったと述べている。

我々は今回2例の小児のリンパ節から分離したBCG株の性状を原株と比較してみた。また、BCG株の性状を他の *M. bovis* のそれと比較し、BCGの特徴をより明らかにしたので報告する。

## 研究 方法

## リンパ節からの抗酸菌 (BCG) の分離方法

摘出したリンパ節を半分に切断し、半塊を病理組織検査に使用し、他の半塊に滅菌蒸留水約1mlを加えて滅菌乳針中で磨砕して乳剤とした。これに約2倍量の1% NaOH液を加えて混和し、10分後に、1%小川培地斜面に滅菌ピペットで0.1mlずつ接種した。接種した培地の1本は28°Cに、他の1本は37°Cに4週間培養したが、菌の発育は37°C培養の場合だけに起こった。分離された抗酸菌株は国療中部病院に送られ、他の標準株とともに検査された。抗酸菌の検査法は既報<sup>24)</sup> によった。

## 対照として検査した抗酸菌数

次の菌株を比較のために検査した。菌株は国療中部病院保存株である。*M. tuberculosis* H37R<sub>v</sub> (05001) 他9株、*M. bovis* Ravenel (06001) 他10株、*M. bovis* BCG (06003, 1947年に名古屋大学阿多実茂博士から分与された株)、*M. bovis* BCG (日本BCG製造株式会社、東京、経皮用乾燥BCGワクチン、製造番号K 598 M、溶解液 (生理食塩水) S-34, 1983年8月購入)。

本報に述べる患児に使用されたBCGは、日本BCG製造株式会社製、経皮用乾燥BCGワクチン、製造番号K 1400 M、溶解液L-118であった。

一部の菌株を研究室で凍結乾燥したが、凍結乾燥は凍結真空乾燥器 (共和真空技術KK, RL-7MB, 東京) を使用した。トラップの温度は-30°C。

## 研究 成績

症例1。■■■■ 男児、1982年2月3日生。1982年6月22日 (生後4ヵ月20日) の時に、ツベルクリン反応 (ツ反応) を施行し、陰性と判定された。6月24日左腕にBCG接種。接種後1ヵ月後に感冒症状で受診し、その時、左頸部および左腋窩のリンパ節が大豆大に腫脹しているのに気づき、8月12日に左腋窩のリンパ節を摘出した。この日のツ反応は5×5/14×16mmで硬結および発赤があった。リンパ節の病理診断は結核性リンパ節炎であった。リンパ節を処理して小川培地に接種した結果、32集落の抗酸菌を分離できた。

症例2。■■■■ 男児、1982年4月30日生。1983年2月14日、生後10ヵ月の時にツ反応陰性。2月16日BCGを左腕に接種。3月16日にBCG接種部位が腫脹し、38.6°Cの発熱を来したため来診。左腋窩リンパ節の大豆大の腫脹を認めた。3月17日のツ反応は6×7/21×22mmで硬結および発赤を認めた。3月30日に左腋窩リンパ節を摘出。リンパ節の病理診断は結核性リンパ節炎。リンパ節から分離した集落数は168個。

以上の2症例の患児は2名とも胸部X線所見に異常はなく、INHを投与しつつ経過観察中であるが、現在までのところ、特に異常を認めない。

## 分離された抗酸菌の同定——BCG株の特徴

分離された抗酸菌は2症例ともZiehl-Neelsen染色で抗酸性に染まる2~4μmの長さの桿菌で、菌の配列はバラバラでclumpingを示さない。小川培地に非光発色性の白色のR型集落を形成する。1白金耳 (湿菌量0.1mg) の接種で小川培地に10~12日で発育する。p-nitrobenzoic acid, 0.5 mg/ml, を含有する小川培地 (PNB培地) に発育しない。NH<sub>2</sub>OH·HCl, 0.25 mg/ml, 含有小川培地に発育しない。以上の所見は被検菌が *M. tuberculosis* series<sup>25)</sup> に属することを示す。

次に分離された株を、前に研究した *M. tuberculosis* および *M. bovis* の性状と比較してみることにする。前報<sup>26)</sup> では次の性状が両者の区別に役立つとわかった。(1) Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH), 10 μg/ml, に対する耐性 (1%小川培地), (2) Niacin 反応, (3) 硝酸還元反応 (24時間), (4) Nicotinamidase, (5) Pyrazinamidase。 *M. tuberculosis* は上記5反応とも通常陽性、 *M. bovis* は通常陰性である。(注。この他に、前は、 *M. bovis* は arylsulfatase 反応 (14日) が陽性で *M. tuberculosis* は陰性であると考えていたが、最近の *M. tuberculosis* 患者分離株には arylsulfatase 反応陽性のものが多くなったので、この反応は除外した。)

リンパ節から分離された抗酸菌はNiacin反応弱陽性、硝酸還元反応弱陽性であったが、TCH耐性、NicotinamidaseおよびPyrazinamidaseは陰性であった。即ち、2反応では *M. tuberculosis* に近く、3反応

では *M. bovis* に近かった。この性状は対照とした BCG 株と一致した。したがって、リン巴節分離株は BCG 菌と同定された (表 1)。

検査した120性状の中で、被検株の間に相違点があった性状を表 1 に示す。他の性状については差がなかった。

### 考 察

2 例の患児のリン巴節から分離された抗酸菌はいずれも BCG 株と同定された。BCG によって結核性リン巴節炎が惹起されたこと自体は特に稀な現象ではない。問題は、これらのリン巴節分離株が原株と異なっているかどうかであるが、我々は患者に接種されたと同じ lot の BCG

は入手できなかったが、同じ会社の他の lot の BCG を入手して比較したところ、両者の間に特に差があるとは思われなかった (表 1)。しかしながら、この研究の成果として BCG の特徴を明らかにすることができた。BCG が弱い Niacin 反応を呈することは前から知られているが<sup>10)</sup>、次の点で他の *M. bovis* と異なっていることが、今回明らかになった。

我々は1947年に名古屋大学阿多実茂博士から分与された BCG 株を今日まで研究室に保存しているが、この株の性状と、今回、検査した市販の「乾燥 BCG ワクチン」とは若干性状の差があったが、表 1 の 1-10 に示す性状については差はなかった。BCG 株が *M. bovis* の他の株と異なっている点として、次の性状をあげること

Table 1. Comparison of Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, BCG and Lymph-Node-Isolates

Character	<i>M. tuberculosis</i> <sup>a</sup>	<i>M. tuberculosis</i> H 37 Rv	<i>M. bovis</i> <sup>b</sup>	<i>M. bovis</i> Ravenel	<i>M. bovis</i> BCG <sup>c</sup>	<i>M. bovis</i> BCG (lyophilized vaccine)	E 10654 (Patient K. F.)	E 10857 (Patient Y. O.)
1. Resistance to thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, 10 µg/ml (Ogawa egg medium)	100	+	0	-	-	-	-	-
2. Niacin production	100	+	8	-	+	+	+	+
3. Reduction of nitrate to nitrite (24 hours)	100	+	0	-	+	+	+	+
4. Nicotinamidase	100	+	0	-	-	-	-	-
5. Pyrazinamidase	100	+	0	-	-	-	-	-
6. Growth on Sauton agar medium	0	-	0	-	+	+	+	+
7. Glucose as C source (glutamate-N)	0	-	36	+	+	+	+	+
8. Glucose as C source (NH <sub>3</sub> -N)	0	-	0	-	+	+	+	+
9. Nitrate as N source (glycerol-C)	0	-	0	-	+	+	+	+
10. Growth on Sauton agar medium containing 0.1% picric acid (pH 7.0)	0	-	0	-	+	+	+	+
11. Growth on Ogawa egg medium containing sodium salicylate, 0.5 mg/ml	0	-	0	-	+	+	+	-
12. Growth on Ogawa egg medium containing NH <sub>2</sub> OH. HCl, 125 µg/ml	0	-	0	-	-	+	+	-
13. Resistance to thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, 1 µg/ml (Ogawa egg medium)	100	+	0	-	-	+	+	+

a *M. tuberculosis*, 9 strains. In table, the percentage of strains which have shown the positive reaction in each character are shown.

b *M. bovis*, 11 strains. In table, the percentage of strains, which have shown the positive reaction in each character, are shown. The BCG strain was not included to these 11 strains.

c Received from Dr. S. Ata, Nagoya University, in 1947, and maintained in this laboratory.

+\* The reaction was weakly positive.

ができる(表1)。

1) TCH 10  $\mu\text{g/ml}$  に感受性である点では他の *M. bovis* の株と同じであるが、他の株が TCH 1  $\mu\text{g/ml}$  感性であるのに、BCG はこれに耐性である。

2) *M. bovis* は通常 Niacin 反応陰性であるが、BCG は弱陽性である。なお、*M. bovis* 三輪株は Niacin 反応陽性である。東村ほか<sup>25)</sup> は *M. africanum* を “niacin-positive *M. bovis*” と考えているが、この考えによると Niacin 反応陽性は *M. bovis* で特に珍しいことではなくなる。

3) BCG は硝酸還元反応が弱陽性である。一方、他の *M. bovis* 株は陰性である。硝酸還元反応が他の *M. bovis* より強いことは、BCG の一つの特徴である。

4) *M. bovis* は Sauton 寒天培地(原法の asparagine を sodium glutamate で代えた変法培地、C 源が glycerol の合成寒天培地)に発育しないが、BCG はよく発育する。

5) *M. bovis* は一般に glucose を C 源とし、硫酸安門を N 源とした合成寒天培地に発育しないが、BCG はこれに発育する。

他の *M. bovis* 株でも、glutamate を N 源とすると glucose を C 源として発育することがあるが、 $\text{NH}_3$  を N 源としては発育しない。

6) 他の *M. bovis* 株は、glycerol を C 源とした場合、 $\text{NaNO}_3$  を N 源として発育しないが、BCG はこれが可能である。

7) 他の *M. bovis* 株は 0.1% picric acid 含有 Sauton 寒天培地に全く発育しないが、BCG はこの培地に若干発育することが可能である。

8) *M. bovis* は一般に S 型に近い集落を形成するが、BCG は R 型で eugonic growth を示す。但し、Ravenel 株のように継代された株も同じような集落形態を示す。

BCG 株に必ずみられる性状とはいえないが、乾燥 BCG ワクチン株とリン節分離の 1 株は次の性状を示した。(a) sodium salicylate, 0.5 mg/ml, 含有 1% 小川培地に発育する。(b)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 含有 1% 小川培地に発育する。この 2 つの性状は、通常、他の *M. bovis* 株ではみることができない。

以上の特徴は、病巣から分離された抗酸菌が BCG かどうか決定するのに役立つと思われる。BCG の他の *M. bovis* 株に対する特徴としては、古くから R 型で eugonic growth を示すことがわかっており、また niacin 弱陽性であることも広く知られている。その他、Boisvert<sup>27)</sup> は BCG は他の *M. bovis* 株と比べて cycloserine 耐性が強いといい、Damsker et al.<sup>15)</sup> は glycerol により発育が阻止されないといい、Yates et al.<sup>28)</sup> は phage typing で区別できると述べている。今回、我々が示した BCG の特徴は、これらの文献に示すよりも、より明確に BCG を同定するのに役立つと信じる。

BCG は凍結乾燥ワクチンとして使用されるので、凍結乾燥によって性状が変化を受けるかどうか検討した。リン節分離株 2 株を 1% 小川培地に 37°C 2 週ごとに 3 代継代した後の性状と、これを凍結乾燥して発育させた時の性状とを、最初の受領時の性状と比較したが、いずれもほぼ同一の成績が得られた。当研究室保存の BCG (06003 株) を凍結乾燥後、発育させた場合も、凍結乾燥前と同じ成績が得られた。

なお、以上の BCG 株に関する特徴は、BCG 日本株を用いての実験結果であることを付記しておく。

## 結 論

BCG を接種された 2 名の小児の結核性リン節炎病巣から分離された抗酸菌を BCG と同定した。次の性状が BCG を *M. bovis* の他の株から区別するのに有用であると考えられた。1) Niacin 反応弱陽性；2) 硝酸還元反応微弱陽性；3)  $\text{NH}_3\text{-N}$  の存在で Glucose を単一 C 源とする合成培地で発育する；4) Glycerol-C 源の存在で  $\text{NaNO}_3$  を単一 N 源とする合成培地で発育する；5) Sauton 寒天培地 (asparagine の代わりに sodium glutamate を使用) に良く発育する；6) 0.1% picric acid 含有 Sauton 寒天培地に若干の発育を示す；7) thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) 1  $\mu\text{g/ml}$  に耐性(他の *M. bovis* 株はこれに感性)；8) R 型の eugonic growth を 1% 小川培地で示す。

この他に、BCG は次の性状も示すことがある。(a) sodium salicylate 0.5 mg/ml に耐性；(b)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  125  $\mu\text{g/ml}$  に耐性。

## 文 献

- 1) Imerslund, O. and Jonsen, T. : Lupus vulgaris and multiple bone lesions caused by BCG, Acta Tuberc Scand, 30 : 116-123, 1954.
- 2) Davies, D. : Lupus vulgaris after vaccination with BCG, Tubercle, 36 : 179-181, 1955.
- 3) Guld, J. et al. : Suppurative lymphadenitis following intradermal BCG vaccination of the newborn (a preliminary report), Brit Med J, 4947 : 1048-1054, 1955.
- 4) 松本勉・松永文江 : BCG 接種後発症した結核性髄膜炎の 1 例とその剖検所見, 小児科臨床, 8 : 845-848, 1955.
- 5) Jørgensen, B.B. and Horwitz, O. : Dermatological complications of BCG vaccination. Acta Tuberc Scand, 32 : 179-194, 1956.
- 6) Ustredt, H.J. : Usual and unusual reactions to BCG inoculation in children, Am Rev Tuberc, 74 : 32-42, 1956.
- 7) Van Deinse, F. : Quelques réflexions au sujet de

- quatre décès du apparemment à la vaccination BCG Rev Tuberc, 20 : 44-50, 1956.
- 8) Mande, R., Fillastre, C. and Herrault, A. : Les adénites suppurées du BCG (étude sur 30,000 sujets vaccinées), Rev Tuberc, 22 : 165-173, 1958.
- 9) 森岡達治 : BCG 接種後発生した骨結核病巣より分離した抗酸菌について, 結核, 35 : 331-337, 1960.
- 10) 佐藤正弘・藤原愛子・高橋邦文 : BCG 接種後に発生した狼瘡性結核 (BCG 狼瘡) について, (第2報), 分離菌の性状, 結核, 37 : 73-79, 1962.
- 11) Blattner, R.J. : Generalized BCG infection, J Pediatrics, 65 : 311-314, 1964.
- 12) Carlgren, L.E., Hansson, C.G., Henricsson, L. et al. : Fatal BCG infection in an infant with congenital, lymphocytopenic a gammaglobulinemia. Acta Paediat Scand, 55 : 636-644, 1966.
- 13) Watanabe, T., Tanaka, K. and Hagiwara, Y. : Generalized tuberculosis after BCG vaccination. Report of an autopsy case, Acta Pathol Jap, 19 : 395-407, 1969.
- 14) Erikson, U. and Hjelmstedt, A. : Roentgenologic aspects of BCG - osteomyelitis, Radiology, 101 : 575-578, 1971.
- 15) Damsker, B., Bottone, E.J. and Schneierson, S. S. : Human infections with *Mycobacterium bovis*, Am Rev Respir Dis, 110 : 446-449, 1974.
- 16) Marks, J. et al. : Pulmonary tuberculosis due to BCG, Brit Med J, 1971(3) : 229-230, 1971.
- 17) Watkins, S.M. : Unusual complication of BCG vaccination, Brit Med J, 5746 : 442, 1971.
- 18) Dolečková, V., Viklický, J., Sula, L. and Kubecová, D. : Fatal generalized BCG histiocytosis, Tubercle, 58 : 13-18, 1977.
- 19) Pedersen, F.K., Engbaek, H.C. and Hertz, H. : Fatal BCG infection in an immunocompetent girl, Acta Paediat Scand, 67 : 519-533, 1978.
- 20) Ritch, P. S., McCredie, K.B., Gutterman, J. V. et al. : Disseminated BCG disease associated with immunotherapy by sacrifice in acute leukemia, Cancer, 42 : 167-170, 1978.
- 21) Torriani, R., Zimmermann, A. and Morell, A. : Die BCG-Sepsis als letale Komplikation der BCG-Impfung, Schweiz Med Wschr, 109 : 708-714, 1979.
- 22) Perelman, R., Danis, F., Nathanson, M. et al. : A propos d'un cas de "becégite" généralisée mortelle sans déficit immunitaire apparent, Sem Hôp, 56 : 480-483, 1980.
- 23) Mande, R. : Becégites généralisées mortelles, Sem Hôp, 56 : 470-472, 1980.
- 24) Tsukamura, M. : Identification of mycobacteria, p. 1-75, The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan, 1975.
- 25) Tsukamura, M. : Numerical classification of 280 strains of slowly growing mycobacteria. Proposal of *Mycobacterium tuberculosis* series, *Mycobacterium avium* series, and *Mycobacterium nonchromogenicum* series, Microbiol Immunol, 27 : 315-334, 1983.
- 26) 東村道雄・水野松司・村田浩 : *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* および *M. microti* の関係についての計数分類学的解析, 結核, 54 : 491-498, 1979.
- 27) Boisvert, H. : Identification de *Mycobacterium bovis*, BCG et *Mycobacterium microti*, Ann Inst Pasteur, 111 : 180-192, 1966.
- 28) Yates, M.D., Collins, C.H. and Grange, J.M. : Differentiation of BCG from other variants of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from clinical material, Tubercle, 59 : 143-146, 1978.