

[原 著]

当院で検出された結核菌群 52 株の菌種同定に関する検討

諸熊由子・内田勇二郎・辛島貴人・藤瀬雅子

今村正一・栢森裕三・康 東天

九州大学病院検査部

(平成 19 年 11 月 6 日受付, 平成 20 年 5 月 1 日受理)

Mycobacterium tuberculosis は結核の主な原因菌であるが、その亜種とされる数種の菌との鑑別が困難であるため、これらを一括して、*M. tuberculosis* complex (結核菌群) として報告されている。わが国で見られる結核菌群感染症には *M. tuberculosis* によるもののほかに、他の結核菌群 *Mycobacterium bovis* BCG による感染症例が報告されている。今回われわれは、当院で 3 年間に検出された結核菌群 52 株を対象として本菌群所属菌の同定を試み、その分離状況を調査した。硝酸塩還元試験では菌種同定は不可能であった。TCH 発育試験、結核菌群鑑別用 PCR 法では結核菌群から *M. bovis* BCG を鑑別することができ、50 株 (96.2%) が *M. tuberculosis* (うち 1 株が *mpb64* gene 欠損株)、2 株 (3.8%) が *M. bovis* BCG と同定された。特に、結核菌群鑑別用 PCR 法は結果の判定が容易で迅速性にも優れていた。まれではあるが、BCG 膀胱注入療法や BCG 予防接種による *M. bovis* BCG 感染症が報告されており、今回の 2 症例も病歴より同様の原因と考えられた。免疫不全患者の多い大学病院などではこのような症例に遭遇することもあり、治療方針の決定や疫学調査、感染管理において、結核菌群の詳細な同定が必要になる場合もある。

Key words: 結核菌群, BCG, RD, PCR, TCH

序 文

Mycobacterium tuberculosis (ヒト型結核菌) は、結核の主な原因菌であり、genus *Mycobacterium* の *M. tuberculosis* complex (結核菌群) に分類される。結核菌群には *M. tuberculosis* のほかに、*M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* が含まれるが、これらの菌種を鑑別するのは困難で、遺伝学的にも類似しているため、16S rRNA による同定や DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による同定でも鑑別はできないとされている。しかし、近年の研究¹⁾の結果、*M. tuberculosis* H37Rv には存在するが *M. bovis* BCG では欠落している部分、つまり RD (regions of difference) と呼ばれる部位の存在が明らかとなり、これを利用した結核菌群の鑑別方法が複数報告されている^{2)~4)}。

現在わが国では、依然として蔓延が懸念される結核とともに、膀胱癌の治療薬であるイムノブラダー膀胱用 (株式会社日本ビーシーサプライ) の副作用としての BCG 感染の出現も注目されている⁵⁾。そのような状況のなか、検査室には迅速かつ正確な結核菌群の検出と、さらには必要に応じてその結核菌群内の菌種の鑑別が求められつつある。今回われわれは、当院で検出された結核菌群 52 株を使用し、既存の結核菌群同定方法と、新たな結核菌群鑑別法の有用性を検討したので報告する。

材料と方法

1. 対象

2004 年 1 月から 2006 年 12 月までの 3 年間に九州大学病院で検出され、コバスタンプリコア (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) で結核菌群 DNA 陽性であった 52 株について検討を行った。由来材料の内訳は、喀痰 27 件、気管支洗浄液 6 件、肺組織 1 件、胸水 2 件、頸部リンパ節組織 9 件、血液 1 件、胃液 1 件、尿 1 件、腹膜組織 1 件、大腸組織 1 件、

著者連絡先: (〒812-8582) 福岡市東区馬出 3-1-1

九州大学病院検査部

諸熊由子

TEL: 092-642-5757

FAX: 092-642-5763

足関節組織 1 件, 膝関節組織 1 件であった。なお, 対照株として, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Tokyo 株を使用した。

2. 結核菌群の鑑別

2% 小川 PS 培地 (日水製薬株式会社) 上で 37°C, 3~4 週間培養した菌を各種試験に用いた ($n=52$)。

キャピリア TB (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社): 1 白金耳 (内径 1 mm) 量の菌体を抽出用緩衝液 0.2 ml で懸濁したもの, または液体培養発育菌液 0.1 ml を用いて, Mycobacterial protein fraction from BCG of Rm 0.64 in electrophoresis (MPB 64) 産生の有無を判定した ($n=47$)。液体培養は, 前処理検体を MP 抗酸菌培養ボトル (日本ビオメリュー株式会社) に接種し, バクテアラート 3D (日本ビオメリュー株式会社) で培養を行った。

硝酸塩還元試験 (極東製薬工業株式会社 抗酸菌鑑別セット): 1/2 白金耳 (内径 3 mm) 量の菌体を硝酸塩還元試液に投入後, 37°C で 1 晩培養し, 硝酸還元発色液を加えて 5 分後の色調を観察した。薄い黄色から濃い黄色を陽性, 無色のままのものを陰性とし, 判定した ($n=42$)。

チオフェン-2-カルボン酸ヒドラジド (TCH) 発育試験 (極東製薬工業株式会社): 1 白金耳 (内径 3 mm) 量の菌体を滅菌蒸留水 2.5 ml に懸濁し, その 0.1 ml を TCH 1 mg/L および, TCH 10 mg/L 各含有小川培地, ならびに対照用小川培地に接種し, 37°C 2 週間後における発育の有無を観察した。2 週間後, 対照培地に発育が見られなかった場合には, さらに 1~2 週間の継続培養を行った。TCH 10 mg/L 含有小川培地に発育したものを *M. tuberculosis*, 発育しなかったものを *M. bovis* または *M. bovis* BCG と判定した ($n=42$)。

結核菌群鑑別用 PCR 法 (Huard らの方法²⁾): 本検討では, *IS1561'* と 4 種類の RD 領域の有無により菌種を同定する方法を試みた。各遺伝子領域を検出するための primer を Table 1 に, 各菌種の *IS1561'* と RD 領域の保有状況をまとめた判定表を Table 2 に示す。核酸の抽出には, アンプリコアマイコバクテリウム検体前処理試薬セット II (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いた。反応条件は initial denaturation step を 94°C 5 分, その後 94°C 1 分, 56°C 1 分, 72°C 1 分を 25 サイクル, final elonga-

Table 1. Primers of PCR amplification for differentiation from *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Primer type and target locus	Forward/Reverse	Nucleotide sequence (5'-3')
<i>IS1561'</i> (Rv3349c)	Forward	GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT
	Reverse	AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCA TTG ACT
Rv1510 (RD4)	Forward	GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC
	Reverse	TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C
Rv1970 (RD7)	Forward	GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC
	Reverse	CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG
Rv3877/8 (RD1)	Forward	CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC
	Reverse	CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C
Rv3120 (RD12)	Forward	GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT
	Reverse	GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T

Table 2. An algorithm to identify individual *Mycobacterium tuberculosis* complex subspecies.

Organism	<i>IS1561'</i> (Rv3349c)	Rv1510 (RD4)	Rv1970 (RD7)	Rv3877/8 (RD1)	Rv3120 (RD12)
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	+	+
<i>M. africanum</i> subtype II	+	+	+	+	+
<i>M. canettii</i>	+	+	+	+	-
<i>M. africanum</i> subtype I	+	+	-	+	+
<i>M. caprae</i>	+	+	-	+	-
<i>M. bovis</i>	+	-	-	+	-
<i>M. bovis</i> BCG	+	-	-	-	-
<i>M. microti</i>	-	+	-	+	+
Nontuberculosis mycobacteria	-	-	-	-	-

tion step を 72°C 10 分とし、1.5% アガロースゲルで電気泳動後、前述の表 (Table 2) に従い判定した ($n=52$)。今回使用した方法では、*M. tuberculosis*, *M. africanum* subtype II とともに同じ泳動パターンとなるが、日本での *M. africanum* の分離例がない⁶⁾こと、病歴などから総合的に判断して結果はすべて *M. tuberculosis* とした。

3. その他の遺伝子型の試験

1) RD1: 前述の PCR で *M. bovis* BCG の泳動パターンとなったものについては、別法の PCR 法 (Talbot らの方法⁴⁾) で RD1 の欠損を確認した。核酸の抽出には、アンプリコアマイコバクテリウム検体前処理試薬セット II を用いた。反応条件は initial dena-

turation step を 94°C 5 分、その後 94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル、final elongation step を 72°C 10 分とし、1.5% アガロースゲルで電気泳動後、判定を行った。

2) RD9, RD10, *hsp65* gene シークエンス: 前述の PCR で *M. canettii* の泳動パターンとなったものについては、PCR で RD9, RD10 の有無と、シークエンスで *hsp65* gene の 631 番目の塩基の確認を行った^{2),3)}。方法は Huard らの PCR 法と同様に行った。*hsp65* gene シークエンスには、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), DNASIS Pro (日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社) で解析を行った。

Table 3. Results of conventional methods and PCR amplification for 50 strains of *M. tuberculosis*.

Strain	No. of isolates	Capilia TB	Nitrate reduction	Growth on TCH		PCR results				
				1 mg/L	10 mg/L	<i>IS1561'</i>	Rv1510 (RD4)	Rv1970 (RD7)	Rv3877/8 (RD1)	Rv3120 (RD12)
1, 4-8, 11, 13, 15-20, 22-27, 29, 30, 33, 35-41, 43-46, 48-52	39	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10, 14, 21, 31, 34	5	+	NT	NT	NT	+	+	+	+	+
2, 3, 9, 12	4	NT	NT	NT	NT	+	+	+	+	+
42	1	-	+	+	+	+	+	+	+	+
32	1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Positive		45	41	41	41	50	50	50	50	49
Negative		1	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	50	46	41	41	41	50	50	50	50	50

NT: not tested

Table 4. Results of conventional methods and PCR amplification for 2 strains of *M. bovis* BCG.

Strain	No. of isolates	Capilia TB	Nitrate reduction	Growth on TCH		PCR results				
				1 mg/L	10 mg/L	<i>IS1561'</i>	Rv1510 (RD4)	Rv1970 (RD7)	Rv3877/8 (RD1)	Rv3120 (RD12)
28	1	NT	NT	NT	NT	+	-	-	-	-
47	1	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Positive		1	1	0	0	2	0	0	0	0
Negative		0	0	1	1	0	2	2	2	2
Total	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2

NT: not tested

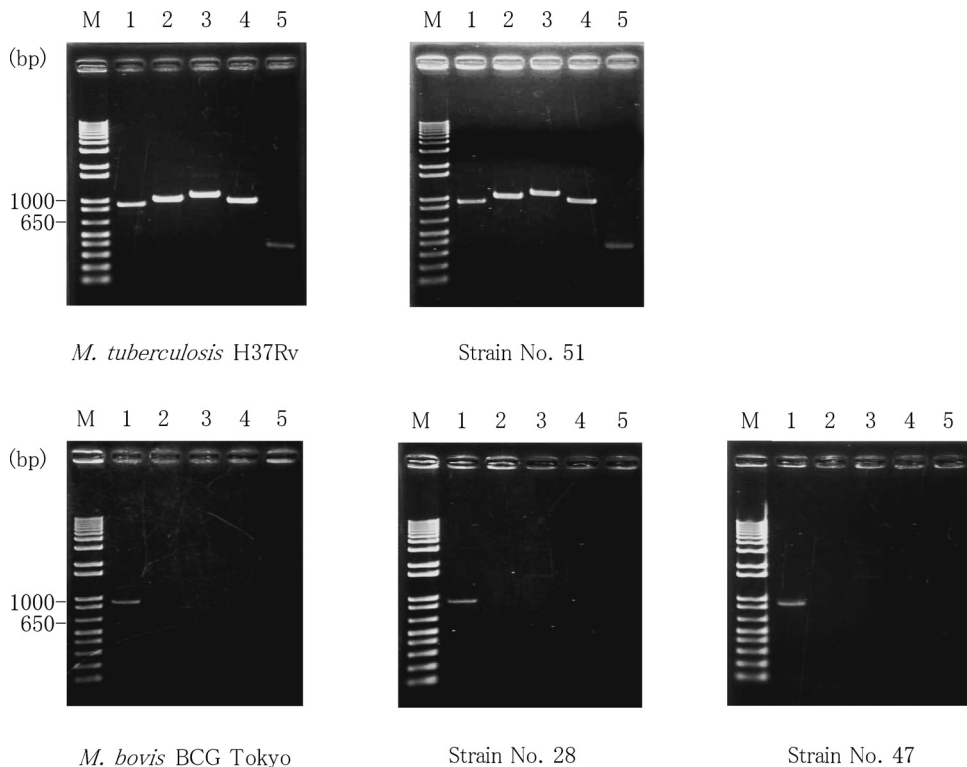


Fig. 1. PCR results using primers for differentiation from *Mycobacterium tuberculosis* complex. Lane M, 1 kb DNA size marker; 1, IS1561'; 2, RD4; 3, RD7; 4, RD1; 5, RD12

3) *mpb64* gene シークエンス: *mpb64* gene の変異が疑われた株については, *hsp65* gene の解析と同じ方法で *mpb64* gene のシークエンス解析を行った^{7), 8)}。

結 果

結核菌群の鑑別試験の結果を Table 3, 4 に, PCR法の電気泳動結果を Fig. 1, 2 に示す。

供試 52 株中 No. 42, 32, 28, 47 以外の 48 株のうち, 39 株 (No. 1, 4~8, 11, 13, 15~20, 22~27, 29, 30, 33, 35~41, 43~46, 48~52) が, キャピリア TB 陽性, 硝酸塩還元試験陽性, TCH 1 および 10 mg/L 耐性, PCR で IS1561', RD4, RD7, RD1, および RD12 それぞれ陽性で *M. tuberculosis* の性状と一致した。9 株は継代培養できず, 5 株 (No. 10, 14, 21, 31, 34) がキャピリア TB と PCR のみ, 4 株 (No. 2, 3, 9, 12) が PCR のみ実施した結果, *M. tuberculosis* と同定された (Table 3)。

No. 42 株は, キャピリア TB のみ陰性で, 定型的 *M. tuberculosis* のパターンと異なったが, *mpb64*

gene シークエンス解析の結果, 63-bp 欠損 (欠損箇所 196~258) の *M. tuberculosis* であることがわかった。

No. 32 株は, PCR で IS1561', RD4, RD7, RD1 が陽性, RD12 陰性で *M. canettii* のパターンとなった。追加試験として, RD9 陽性, RD10 陽性, *hsp65* gene の 631 番目の塩基が C であることを確認した。結核菌群のうち RD9, 10 がともに陽性となるのは *M. tuberculosis* と *M. canettii* のみ⁹⁾で, さらに *hsp65* gene の 631 番目の塩基が C ではなく T であるのは結核菌群のうち *M. canetti* のみ²⁾である。また *M. canettii* は S 型集落を示す⁶⁾が, No. 32 株は R 型集落であった。これらの結果より, No. 32 株は *M. tuberculosis* と考えられた。

No. 28 株は PCR で IS1561' 陽性, RD4, RD7, RD1 および RD12 陰性, No. 47 株は, キャピリア TB 陽性, 硝酸塩還元試験陽性, TCH 1 および 10 mg/L 感受性, PCR で IS1561' 陽性, RD4, RD7, RD1 および RD12 陰性であった (Table 4, Fig. 1)。さらに両株ともに追加試験として RD1 の欠損を確認

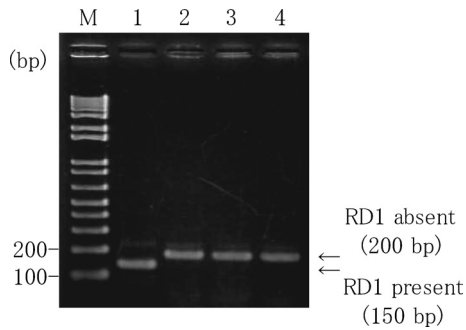


Fig. 2. PCR results using RD1 primers. Lane M, 1 kb DNA size marker; 1, *M. tuberculosis* H37Rv; 2, *M. bovis* BCG Tokyo; 3, Strain No. 28; 4, Strain No. 47

した結果, *M. bovis* BCG と同定された (Fig. 2)。これら 2 株の *M. bovis* BCG による感染症例は以下のようである (Table 5 参照)。

症例 1: 77 歳, 女性。両側腎盂癌であったため, 腎盂からイムノブラダーを週 1 回, 計 6 回投与予定で開始された。投与開始時より発熱, 炎症所見の上昇を認めるも 3 日程度で改善したため, そのまま治療が継続されていた。約 1 カ月後の 4 回目の投与翌日, ショック状態となった。ショック時に血液から分離された菌株の精査より, BCG 敗血症が証明された (分離株: No. 28)。

症例 2: 25 歳, 男性。BCG ワクチンの定期接種を生後 4 カ月時に受けた。乳児期より口内炎・中耳炎・皮膚炎を繰り返していた。4 歳時に入院精査したところ, 慢性肉芽腫症 X-CGD gp91-phox 欠損と診断された。25 歳時, 頸部リンパ節腫脹が認められたため抗

酸菌培養を実施したところ, 結核菌群 (分離株: No. 47) が分離された。しかし, ツベルクリン反応は強陽性であったが, クオソティフェロン TB-2 G (株式会社日本ビーシーサプライ) は陰性であった。*M. tuberculosis* 以外の結核菌群も考え精査したところ, *M. bovis* BCG と同定され, これによる感染症であることが判明した。

考 察

コバスアンプリコアで結核菌群 DNA 陽性であった 52 株のうち 50 株が *M. tuberculosis* (うち 1 株が *mpb64* gene 変異株), 2 株が *M. bovis* BCG であった。

キャピリア TB は *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* とともに陽性となるため結核菌群菌種間の鑑別は不可能である。今回の検討でも, 本試験実施可能であった結核菌群 47 株のうち 46 株が陽性 (感度 97.9%) であり, 結核菌群同定上, 極めて有用であり, 検査所要時間は 15 分であること, 液体培地からの検査が可能であることから, 迅速性と簡便性の点からも優れた検査と言えるが, 結核菌群菌種間の鑑別は不可能である。また, No. 42 株のように, *mpb64* gene の欠損や変異, 挿入によって, 結核菌群であっても陰性を示す菌株が 0.8% 存在することが報告されている⁸⁾。さらに, 非結核性抗酸菌 *M. marinum* による偽陽性の報告もあり¹⁰⁾, キャピリア TB 単独での使用には注意が必要であると考えられた。

次に, 硝酸塩還元試験は *M. tuberculosis* と *M. bovis* BCG の鑑別をすることはできなかった。成書では *M. bovis*, *M. bovis* BCG とともに硝酸塩還元陰性と記

Table 5. Two cases of patients infected with *M. bovis* BCG.

Case	Age/Sex	Underlying disease	Periods of isolation after BCG immunotherapy	Specimen	Strain No.
1	77/F	Renal pelvic cancer	1 day-1 month	Blood	28
2	25/M	Chronic granulomatous disease	25 years	Lymph node	47

Table 6. Difference of clinical management between *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG.

	Treatment	Pyrazinamide	Isolation	Law*
<i>M. tuberculosis</i>	Necessary	Effect	Necessary	Category II
<i>M. bovis</i> BCG	Not necessary	Ineffect	Unnecessary	Not reported

* The Law Concerning the Prevention of Infectious Disease and Medical Care for Patients of Infections Category II: to be hospitalized depending upon conditions and reported.

載されているが、なかでも *M. bovis* BCG Tokyo 株は本テスト弱陽性となることが知られており^{5), 11)}、わが国では *M. tuberculosis* と *M. bovis* BCG の鑑別には一考を要する検査と考えられた。

TCH 試験は、TCH 耐性の *M. tuberculosis* と、感受性の *M. bovis* (*M. bovis* BCG を含む) の鑑別上有用とされており、今回の検討にあたっては、*M. tuberculosis* 41 株、*M. bovis* BCG 1 株を鑑別することができた。特別な設備など必要なく簡便な方法であるが、迅速性に欠け(最短 4 週間)、また保険適用外である、などの問題点が挙げられる。また、*M. tuberculosis* の中でも TCH 感受性菌が 11% 存在するとの報告もあり³⁾、このことも留意すべきである。

Huard らの結核菌群鑑別用 PCR 法は、迅速性に優れ、また試液の色調で判定する硝酸塩還元試験や菌の発育状況で判定する TCH 試験のような従来法と比べて、結果の判定も簡便であった。今回の検討では、本法により *M. tuberculosis* 49 株、*M. bovis* BCG 2 株を同定することができた。諸外国では *M. bovis* や *M. africanum* が検出されることもあり^{12), 13)}、そのような症例の菌種同定にも有用と考えられる。No. 32 株は追加試験等の結果より *M. tuberculosis* と同定されたが、RD12 が検出できず、PCR の反応条件の改良が必要と考えられた。

また、Talbot らの PCR 法では RD1 の欠損を確認し *M. bovis* BCG 2 株とも同定することができた。しかし、RD1 陽性の場合、*M. bovis* BCG 以外のどの菌種か判別することはできず、BCG 感染が強く疑われる場合にのみ有用である。PCR 法は、迅速かつ正確な検査法であるが、菌種の同定にあたっては、集落形態や培養・生化学的性状検査の結果と併せて、総合判断の一手段として用いられるべきであると考えられた。

今回の検討では、*M. bovis* BCG 感染症 2 例が確認された。*M. tuberculosis* 以外の結核菌群による感染症例は非常に少なく(本検討では 3.8%)、ルーチン業務として積極的には鑑別試験を行う必要はないと考えられた。しかし、本症例を経験し、既存の検査法では結核菌群の鑑別は困難であること、TCH 試験や PCR 法のような鑑別可能な検査法があること、*M. tuberculosis* と *M. bovis* BCG 感染症では感染管理や治療に違いがあること (Table 6) など、検査室で対処法を知っておかなければならないと改めて実感させられた。また、結核菌群陽性の場合 *M. tuberculosis* のほか、*M. bovis* BCG などによる感染症の可能性もあることを臨床医へ伝えなければならず、イムノブラ

ダー投与やワクチン接種の既往、患者の免疫状態を確認することが重要な判断材料となる。No. 47 株の症例では、結核菌群 DNA 陽性、ツベルクリン反応強陽性であるにもかかわらず、クオンティフェロン TB-2G は陰性であった。クオンティフェロン TB-2G に利用されている特異タンパク質抗原 (ESAT-6, CFP-10) は結核菌群では *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* で分泌され、*M. bovis* BCG では分泌されない。クオンティフェロン TB-2G は活動性、または潜在性結核の診断補助を目的とした検査であるが、*M. bovis* BCG 感染症を疑うきっかけともなりえると考えられた。

日本においては、BCG 膀胱注入療法のほか、新生児のワクチン接種が BCG 感染の原因となっている例がある。3 カ月未満の新生児では、接種局所の膿瘍化や所属リンパ節の化膿性リンパ節炎の発生頻度が高く、また、先天性免疫異常をもつ子供が免疫異常の診断を受けないうちに BCG 接種を受ける事例があるためである。1951~2006 年末までに国内で発生した BCG 接種による重大な副反応の症例は 39 症例と報告されており、そのうち 19 例で慢性肉芽腫症、重症複合型免疫不全、Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease などの先天性免疫異常を含め、何らかの細胞性免疫異常が認められている¹⁴⁾。当院で経験した No. 47 株の症例についても、やはり慢性肉芽腫症と診断される前に受けたワクチン接種が BCG 感染の原因と考えられた。現在、公費による BCG 接種の期限は生後 6 カ月に達するまでとされており、今後も新生児の BCG 感染の発生が懸念されている。さらに、諸外国では、HIV 感染者 (小児) の BCG 感染も複数報告されており¹⁵⁾、また *M. bovis* や *M. africanum* の報告例もあるため、国際化や HIV の増加とともに結核菌群鑑別の必要性が増す可能性がある。こうした国内外の背景や、当院での BCG 感染症例の経験も踏まえ、治療方針の決定や疫学調査、感染管理において、結核菌群の詳細な同定は重要であると考えられた。

文 献

- 1) Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, et al. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284: 1520-1523.
- 2) Huard, R. C., L. C. de Oliveira Lazzarini, W. R. Butler, et al. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1637-1650.

- 3) Parsons, L. M., R. Brosch, S. T. Cole, et al. 2002. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2339–2345.
- 4) Talbot, E. A., D. L. Williams, R. Frothingham, et al. 1997. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.* 35: 566–569.
- 5) 後藤令子, 村谷哲郎, 小林とも子, 他. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* と *Mycobacterium bovis* BCG 株の鑑別が必要であった4株に関する検討. *日本臨床微生物学雑誌* 15: 120–125.
- 6) 斎藤 肇. 2007. 抗酸菌の同定. *結核菌検査指針* 2007, p. 51–80 (日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編), 財団法人結核予防会, 東京.
- 7) Li, H., J. C. Ulstrup, T. O. Jonassen, et al. 1993. Evidence for absence of the MPB 64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 61: 1730–1734.
- 8) Hirano, K., A. Aono, M. Takahashi, et al. 2004. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB 64 protein of Capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 390–392.
- 9) Cole, S. T. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology.* 148: 2919–2928.
- 10) 児玉朱実, 斎藤 肇. 2007. キャピリア TB の結核菌群同定上の評価—特に培地の種類について—. *日本臨床微生物学雑誌* 17: 109–117.
- 11) 束村道雄, 東海林黎吉, 松田啓子. 1984. 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—. *結核* 59: 289–293.
- 12) Niobe-Eyangoh, S. N., C. Kuaban, P. Sorlin, et al. 2003. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2547–2553.
- 13) Bauer, J., A. B. Andersen, K. Kremer, et al. 1999. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2602–2606.
- 14) 戸井田一郎, 中田志津子. 2007. 日本におけるBCG接種による重大な有害事象. *結核* 82: 809–824.
- 15) Kidane, D., J. O. Olobo, A. Habte, et al. 2002. Identification of the causative organism of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4230–4234.

Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains in Kyushu University Hospital

Yuiko Morokuma, Yujiro Uchida, Takahito Karashima, Masako Fujise,
Shoichi Imamura, Yuzo Kayamori, Dongchon Kang
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

Mycobacterium tuberculosis complex (MtbC) includes some subspecies such as *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* (along with the attenuated *M. bovis* bacillus Calmette–Guér in [BCG]). Most cases of MtbC infection are caused by *M. tuberculosis*, but some cases of *M. bovis* BCG are reported in Japan. We identified 52 strains of MtbC isolated in Kyushu University Hospital between 2004 and 2006. They could not be identified fully by a nitrate reduction test which was one of the conventional methods. Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) test and the PCR-based methods, however, could distinguish *M. bovis* BCG strains from *M. tuberculosis*. Fifty strains (96.2%), including one of a deletion in *mpb64* gene, were *M. tuberculosis* and two (3.8%) were *M. bovis* BCG. Especially, the PCR-based methods were rapid and useful tool rather than TCH test. Some cases of *M. bovis* BCG infection due to an intravesical BCG therapy and BCG vaccination are reported. In our study, 2 cases were infected with *M. bovis* BCG, which were a renal pelvic cancer with intravesical BCG therapy and a chronic granulomatous disease 25 years after BCG vaccination. This study indicates the PCR-based methods are essential to distinguish subspecies from MtbC and necessary for clinical laboratories to report appropriate information for the purpose of clinical therapies, infection controls and epidemiology.