

[原 著]

Mycobacterium tuberculosis と *Mycobacterium bovis* BCG 株の鑑別が必要であった 4 株に関する検討後藤令子^{1,2)}・村谷哲郎^{1,3)}・小林とも子^{1,2)}・池浦智恵子²⁾李(花村)静香^{1,3)}・小田原ゆう子¹⁾・松本哲朗³⁾¹⁾ ひびき臨床微生物研究会²⁾ 株式会社キューリン³⁾ 産業医科大学医学部泌尿器科

(平成 17 年 4 月 13 日受付, 平成 17 年 8 月 17 日受理)

イムノブラダー(日本 BCG(株))は *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株の生菌であり、副作用として尿路結核症をはじめとする各種感染症を引き起こすことがある。筆者らは、尿路および生殖器検体より、結核菌群を分離し、*Mycobacterium tuberculosis* と *M. bovis* BCG 株との鑑別が必要であった症例を 4 例経験した。4 例より分離された株はいずれも Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* (ロシュ・ダイアグノスティックス(株))による PCR は陽性、抗酸菌鑑別セット(極東製薬工業(株))による生化学性状では結核菌群と同定された。*M. tuberculosis* と *M. bovis* BCG 株の鑑別のために thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) 10 µg/ml 含有培地での発育を確認したところ、臨床分離 MYC 1 および MYC 2 株は発育を認めず、ナイアシン陽性株であることより、*M. bovis* BCG 株であると考えられ、臨床分離株 MYC3 と MYC5 株は発育を認め、*M. tuberculosis* であると考えられた。山崎らの結核菌群鑑別用 primer を用いた PCR では、臨床分離株 MYC1 および MYC2 株は、*M. bovis* BCG Tokyo 株と、MYC3 および MYC5 株は、*M. tuberculosis* と同様のパターンを示し、生化学性状試験と同様の結果となった。表在性膀胱癌に対する BCG 膀胱注入療法の増加に伴い、今後 BCG による各種結核症が増加し、鑑別試験が要求される場面が増えると考えられることより、TCH 10 µg/ml 含有培地が市販されることが望まれる。

Key words: *Mycobacterium*, BCG, TCH, 尿路結核

序 文

Mycobacterium tuberculosis は、肺結核だけでなく、胸膜炎、脊椎カリエス、関節結核、尿路結核などを引き起こすため、喀痰だけでなく各種臨床材料から分離される。一方、表在性膀胱腫瘍に対する BCG 膀胱注入療法はイムノブラダー膀胱注用(日本 BCG 製造(株))が 1997 年に販売開始されてから、一般的な治療法となっている。イムノブラダーは *Mycobacterium*

bovis BCG Tokyo 株の生菌であるため、副作用として、肺結核、前立腺炎、精巣上体炎など播種性 BCG 感染が報告されている^{1,2)}。現在では、BCG 膀胱注入療法はクリニックにおいても実施されている一般的な治療法となっており、使用頻度の増加に伴い、BCG による尿路結核症に関する報告もなされている³⁾。(株)キューリンでは、2001 年 9 月に肺結核の既往歴および BCG 膀胱注入歴を有する患者の生殖器由来検体より、結核菌群を分離した。最終的には、分離菌は、*M. bovis* BCG 株と同定したが、*M. tuberculosis* との鑑別に難渋した⁴⁾。その後抗酸菌検査の依頼のあった 3 例の尿検体より、結核菌群を分離する機会を得たので、*M. tuberculosis* と *M. bovis* BCG 株の鑑別を種々の方法にて検討した。

著者連絡先: (〒806-0046) 北九州市八幡西区森下町 27-25
株式会社キューリン
後藤令子
TEL: 093-642-3911 (224)
FAX: 093-642-3967
E-mail: microbio@kyurin.co.jp

材料と方法

1. 使用菌株

使用した臨床分離株を Table 1 に示す。2003 年 7 月～2004 年 7 月までの間に異なった 3 名の患者の尿検体より分離された結核菌群 3 株 (MYC2, MYC3, MYC5) および 2001 年に陰囊由来 1 株 (MYC1) を使用した。MYC1 株は、石津らにより症例報告⁴⁾がなされており、BCG 株であることが報告されているが、基礎的検討は石津らの報告でも共著者であり、今回も共著者である村谷、小林が実施した。さらに石津らの報告では、細菌学的検討結果については、詳細に記載されておらず、また、一部新たな primer を用いた PCR の結果も追加したため、併せて報告する。また、対照株として、*M. tuberculosis* H37Ra 株、*M. tuberculosis* H37Rv 株、*M. bovis* BCG Pasteur 株 (産業医科大学医学部微生物学教室 谷口初美教授より分与)、*M. bovis* BCG Tokyo 株 (乾燥 BCG ワクチン、協和薬品工業(株)製を小川培地で培養した株)、を使用した。

2. 結核菌群の分離培養

検体の沈渣へ等量の 4% NaOH を加えて混合し、20 分静置後、その 0.1 ml を 2% 小川 PS 培地へ接種し、35°C で培養した。発育したコロニーを再度 1% 小川培地で純培養し、各種試験に用いた。

3. 生化学性状試験

極東抗酸菌鑑別セット (極東製薬工業(株)) を用いて以下の試験を実施した。1% 小川培地で 35°C 約 4 週間純培養した菌体を用いて、硝酸還元試験 (0.2% 硝酸ナトリウム液)、ナイアシン検出試験 (クロラミン T、チオンアン酸カリウム、*p*-アミノ安息香酸ナトリウム液)、Tween 80 水解試験 (0.5% Tween 80、ニュートラルレッド 20 µg/ml 溶液) を実施した。純培養した菌体を菌体懸濁用ガラスビーズを入れた Middle-

brook 7H9 broth で McFarland No. 1 に相当するまで培養し (7 日間)、その菌液を下記の培地へ 0.1 ml 接種し、35°C で培養した。1% 小川培地で、発育速度 (3 日目判定)、Sodium *p*-aminosalicylate 2 mg/ml 含有 1% 小川培地 (PAS 培地、7 日目判定)、0.2% ピクリン酸、リン酸二水素カリウム 0.5 mg/ml 含有変法 Sauton 寒天培地 (ピクリン酸培地、14 日目判定)、集落性状 (コロニー発育後) を実施した。以下の培地は、1% 小川培地の全面に菌の発育が見られたときに判定を行った。暗発色試験および光発色試験、*p*-nitrobenzoic acid 500 µg/ml 含有 1% 小川培地 (PNB 培地)、ethambutol 5 µg/ml 含有 1% 小川培地 (EB 培地)、塩酸 hydroxylamine 500 µg/ml 含有 1% 小川培地 (HA 培地) での発育の有無を判定した。

4. Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) に対する感受性試験

M. tuberculosis と *M. bovis* の TCH に対する感受性の違いを利用して鑑別するために、TCH 1 µg/ml および 10 µg/ml 含有 1% 小川培地 (極東製薬工業(株)より供与) での発育試験を実施した。菌接種は、抗酸菌鑑別セットと同様に調整した菌液を用い、35°C にて 14 日間培養した。

5. PCR による同定

臨床検体の沈渣を直接および小川培地に発育したコロニーを用いて、Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* (Amplicor, ロシュ・ダイアグノスティックス(株)) を用いて PCR を実施した。また、純培養したコロニーを滅菌水に懸濁後、100°C 15 min 処理した上清を用いて、山崎らの報告した結核菌群鑑別用 Primer (Table 2) 5 セットによる PCR を実施した⁵⁾。94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 60 s を 35 cycle 実施後、1.8% Agarose gel で電気泳動し、判定した。

Table 1. Background of clinical isolates

Strain name	Time of isolation (mo./yr.)	Source	Hospital (No. of beds)	Age	Gender	Area	Gaffky	Anamnesis of tuberculosis	BCG treatment
MYC1	9/2001	Pus from scrotum	A (220)	76	Male	Yamaguchi	2	yes	yes
MYC2	7/2003	Midstream urine	A (220)	84	Male	Yamaguchi	5	no	yes
MYC3	2/2004	Midstream urine	B (0)	54	Female	Yamaguchi	1	yes	no
MYC5	7/2004	Midstream urine	C (0)	57	Male	Yamaguchi	0	yes	no

Table 2. Oligonucleotides used for PCR amplification and DNA sequencing

Primer name forward/reverse	Forward	Reverse	Target gene
MT-1/MT-2	accaccgagcggttcgctga	gatctgcggtctgccagtg	<i>pab</i>
MPB64-T2/MPB64-T6	tccgctgccagtcgtcttcc	gtcctcgcgagcttaggcca	<i>MPB64</i>
PT-1/PT-2	caacgcgccgtcggtgg	ccccccacggcaccgc	<i>mtp40</i>
pncA-7/pncA-10	tccgctgccagtcgtcttcc	ggtgtgccggagaagtg	<i>pncA</i> ^{a)}
pncA-7/pncA11C	tccgctgccagtcgtcttcc	cggtgtgccggagaagcc	<i>pncA</i> ^{b)}
C5/C3	gcgcgagagcccgaactgc	gcgcgagaaacgtcagc	<i>senX3-regX3 IR</i>

These primers were based on ref. 5.

^{a)} For *M. tuberculosis*, *M. africanum*, and *M. microti*

^{b)} For *M. bovis* (including BCG strains)

Table 3. Comparison of characteristics of mycobacteria isolated from urine and scrotum

Test	MYC1	MYC2	MYC3	MYC5	Pas ^{a)}	Tok ^{b)}	Ra ^{c)}	Rv ^{d)}
Growth rate (3 days)	—	—	—	—	—	—	—	—
Colony morphology	Rough	Rough	Rough	Rough	Rough	Rough	Rough	Rough
Niacin detection	+	+	+	+	±	+	+	+
<i>p</i> -Nitrobenzoic acid	—	—	—	—	—	—	—	—
Pigmentation	—	—	—	—	—	—	—	—
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80 hydrolysis	—	—	—	—	—	—	—	—
Resistance to ethambutol (5 µg/ml)	—	—	—	—	—	—	—	—
Resistance to picric acid (1 mg/ml)	—	—	—	—	—	—	—	—
Resistance to PAS ^{e)} (2 mg/ml)	—	—	—	—	—	—	—	—
Resistance to HA ^{f)} (500 µg/ml)	—	—	—	—	—	—	—	—
Resistance to TCH ^{g)} (1 µg/ml)	—	—	+	+	—	—	+	+
Resistance to TCH (10 µg/ml)	—	—	+	+	—	—	+	+

MYC1, MYC2, MYC3, and MYC5 are clinical isolates.

^{a)} *M. bovis* BCG Pasteur, ^{b)} *M. bovis* BCG Tokyo, ^{c)} *M. tuberculosis* H37Ra, ^{d)} *M. tuberculosis* H37Rv

^{e)} *p*-aminosarcosine, ^{f)} hydroxylamine, ^{g)} thiophene-2-carboxylic acid hydrazide

結 果

Ziehl-Neelsen 染色による塗抹検査の結果 (Table 1), MYC1 株分離症例はガフキー 2 号, MYC2 株分離症例はガフキー 5 号, MYC3 株分離症例はガフキー 1 号であったが, MYC5 株分離症例は, 塗抹検査陰性であった。また, MYC1, MYC2, および MYC3 株分離症例では, 臨床材料より直接 Amplicor を用いて, PCR を実施し, いずれも陽性であった。MYC5 株分離症例では尿検体から直接の PCR は実施しなかった。生化学性状試験の結果を Table 3 に示す。検討した 4 株は, いずれも硝酸塩還元テスト陽性, ナイアシンテスト陽性であったが, 暗発色試験および光発色試験は陰性, PNB 培地, EB 培地, ピクリン酸培地, PAS 培地, および HA 培地には発育せず, 結核菌群であると判定された。Table 4 に PCR の結果を示す。Amplicor で

は 4 株とも陽性を示した。抗酸菌鑑別セットを用いた生化学性状試験および Amplicor では結核菌群と判定することはできるが, *M. tuberculosis* と *M. bovis* BCG 株の鑑別ができない。*M. tuberculosis* は TCH に耐性を示し, BCG 株を含む *M. bovis* は感受性を示すと報告されている⁶⁾ので鑑別のために, TCH 感受性テストを実施した。MYC1, MYC2 株, および *M. bovis* BCG Tokyo および Pasteur 株は, TCH 1 µg/ml, 10 µg/ml 両方の培地に発育しなかったが, MYC3, MYC5 株および *M. tuberculosis* Ra, *M. tuberculosis* Rv 株は 1 µg/ml, 10 µg/ml 両方の培地に発育した。このことより, MYC1 および MYC2 は, *M. bovis*, MYC3 および MYC5 株は, *M. tuberculosis* であると考えられた。ナイアシンテストはいずれも陽性であることより, MYC1 および MYC2 株は, *M. bovis* であ

Table 4. PCR results using various primers

Target gene	MYC1	MYC2	MYC3	MYC5	Pas ^{a)}	Tok ^{b)}	Ra ^{c)}	Rv ^{d)}
Amplicor ^{e)}	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>pab</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>MPB64</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>mtp40</i>	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>pncA</i>	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>pncA</i> (<i>M. bovis</i>)	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>senX3-regX3 IR</i>	353 ^{f)}	353	329	329	276	353	353	353

MYC1, MYC2, MYC3, and MYC5 are clinical isolates.

^{a)} *M. bovis* BCG Pasteur, ^{b)} *M. bovis* BCG Tokyo, ^{c)} *M. tuberculosis* H37Ra, ^{d)} *M. tuberculosis* H37Rv

^{e)} Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis*[®]

^{f)} DNA size of PCR product

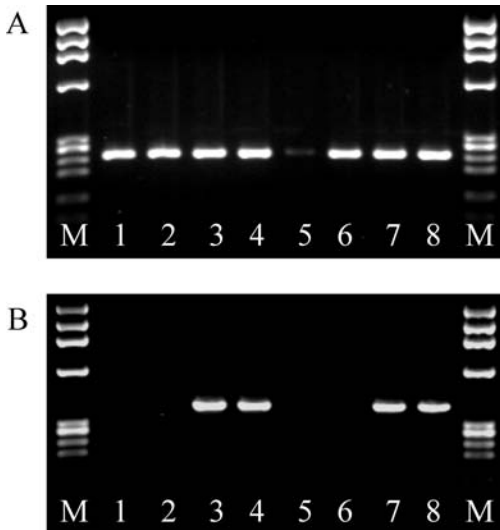


Fig. 1. PCR results using *Mycobacterium* specific primers.

See Table 2 about used primers. A: *MPB64*, B: *mtp40*

Lane M, DNA size marker (ϕ X174/*Hae*III); lane 1, MYC1; lane 2, MYC2; lane 3, MYC3; lane 4, MYC5; lane 5, *M. bovis* BCG Pasteur; lane 6, *M. bovis* BCG Tokyo; lane 7, *M. tuberculosis* H37Ra; lane 8, *M. tuberculosis* H37Rv

ることは否定されるので、*M. bovis* BCG 株であると
考えられた。

山崎らの各種結核菌群鑑別用 primer を用いた
PCR の結果を Fig. 1 および Table 4 に示す。*pab*,
mtp40, *MPB64*, *pncA* の結果より、MYC3 および
MYC5 株は、*M. tuberculosis* であり、MYC1 および
MYC2 株は、*M. tuberculosis* および *M. bovis* BCG



Fig. 2. PCR results using C5/C3 primers.

See Table 2 about used primers.

Lane M, DNA size marker (ϕ X174/*Hae*III); lane 1, MYC1; lane 2, MYC2; lane 3, MYC3; lane 4, MYC5; lane 5, *M. bovis* BCG Pasteur; lane 6, *M. bovis* BCG Tokyo; lane 7, *M. tuberculosis* H37Ra; lane 8, *M. tuberculosis* H37Rv

Pasteur 株であることは否定され、*M. bovis* または
M. bovis BCG Tokyo 株であると考えられた。*senX3-*
regX3 IR 領域の DNA size より (Table 4 および Fig.
2), 通常の *M. bovis* ではなく、*M. bovis* BCG 株であ
り、両患者とも免疫ブレンダー投与の既往があること
から、この 2 株は、*M. bovis* BCG Tokyo 株であると
考えられた。

考 察

現在抗酸菌の同定には、抗酸菌鑑別セット (生化学
性状試験), DDH (DNA-DNA hybridization 法, 極
東製薬工業(株)), アキュプロープ (DNA-RNA hy-
bridization 法, 極東製薬工業(株)), Amplicor (PCR
法) があり、いずれも結核菌群とそれ以外に分けるこ

とができる。抗酸菌鑑別セット以外の検査法では、*M. tuberculosis* と *M. bovis* を鑑別することはできない。*M. tuberculosis* は、ナイアシン検出試験と硝酸塩還元試験は陽性であるのに対して、*M. bovis* は両試験とも陰性であり、これらの試験により、両菌種を鑑別可能であるが、*M. bovis* BCG Tokyo 株は例外であり、両試験ともに、*M. tuberculosis* と同様に陽性となるため、鑑別することはできない。成書⁷⁾では、*M. bovis* BCG 株は、ナイアシン試験陰性、硝酸塩還元試験陰性と記載されているが、BCG 日本株がナイアシン試験陽性を示すとの記載は、1979年発行の結核菌検査指針⁸⁾にあり、その他にも複数の報告^{9,10)}が認められる。

MYC1 株分離患者は、30年前に肺結核の既往があり、52カ月前に膀胱癌に対する BCG 膀胱注入療法が行われていた。Gaffky 陽性となった時点で、Amplicor PCR を実施し、陽性となり、結核菌群陽性を報告した。*M. bovis* BCG 株が起炎菌である可能性が高いが、BCG 最終投与からも長期間経過しており、また肺結核の既往もあり、*M. tuberculosis* の可能性も否定できないので、両菌種の鑑別の実施を依頼された。鑑別のために TCH 感受性試験を実施するとともに、山崎らの報告した結核菌群鑑別用 PCR primer を用いて PCR を実施した。TCH 10 µg/ml に発育する株は、*M. tuberculosis* であり、発育しない場合は、BCG 株を含む *M. bovis* であることが報告されており⁶⁾、さらに BCG 株は、TCH 1 µg/ml 含有培地に発育する場合としない場合があるが、その他の *M. bovis* は発育しないことが報告されている¹⁰⁾。今回検討した株は、2株が TCH 1 および 10 µg/ml に発育し、2株が発育しなかったことおよびいずれもナイアシンテスト陽性であったことより、MYC1 および MYC2 株は、*M. bovis* BCG 株、MYC3 および MYC5 株は、*M. tuberculosis* と考えられた。さらに5セットの primer を用いた PCR により、MYC1 および MYC2 株は、*M. bovis* BCG Tokyo 株であると考えられた。

TCH 10 µg/ml 含有培地による試験は、*M. tuberculosis* と *M. bovis* を鑑別するためには有用であったが、TCH 1 µg/ml 含有培地により *M. bovis* と BCG 株を鑑別することは困難であった。BCG 膀胱注入療法の既往など患者背景より、BCG によるものであるかどうかは、容易に推定可能であることより、TCH 10 µg/ml による試験は有用であると考えられる。また、山崎らの結核菌群鑑別 PCR は簡便、迅速であり、確認のためにはたいへん有用であった。TCH 試験および結核菌群鑑別 PCR は有用であり、実際、MYC2, MYC3, MYC5 株が分離された際に TCH および結核

菌群鑑別 PCR を実施し、早期に *M. tuberculosis* と BCG 株の鑑別報告が可能であった。BCG 膀胱注入療法を、MYC1 および MYC2 株が分離された患者は受けていたが、MYC3 および MYC5 株が分離された患者は、受けておらず、臨床背景とも一致した。結核の既往については、MYC1, MYC3, および MYC5 株分離患者が有していた。

当検査室では、これらの症例を経験するまで、BCG 膀胱注入療法の存在を知らなかったため、最初の症例の際には、混乱した。今後細菌検査に携わる技師として、BCG 膀胱注入療法という生菌を使用した治療法があるということ、抗酸菌検査の際、特に尿検体の場合には、BCG 膀胱注入療法および結核の既往の有無を確認すること、*M. tuberculosis* と BCG の鑑別法を知っておくことが必要であるという認識をさせられた経験であった。結核菌群鑑別 PCR は迅速かつ有用であるが、どこの検査室でもできるわけではない。一方、TCH は、体外診断薬としての認可がおりておらず、市販されていないが、検査室でも簡便に *M. tuberculosis* と BCG 株を鑑別できる方法である。しかし、*M. tuberculosis* の中に TCH 感受性株が存在することも報告¹¹⁾されており、最終決定には、結核菌群鑑別 PCR が必要である。今回は山崎らの primer を使用したが、RD1 領域の有無で BCG 株を同定する方法も報告¹¹⁾されており、今回の株は、この primer によっても *M. tuberculosis* と *M. bovis* BCG 株と同定された（データは示さず）。また、今回実施していないが、PZA 25 µg/ml は、*M. tuberculosis* の発育を阻止するが、BCG 株を含む *M. bovis* の発育を阻害しないことが報告されており⁷⁾、TCH 10 µg/ml の結果と組み合わせることにより、同定確率は高くなると考えられる。

表在性膀胱癌に対する BCG 膀胱注入療法の増加に伴い、今後 BCG による各種結核症が増加すると考えられることより、検査室でも簡便に実施可能な TCH 10 µg/ml 含有培地が市販されることが望まれる。

謝 辞 本検討にあたり、TCH 培地の提供および数多くのご助言をいただきました極東製薬工業(株)ならびに江成博氏に感謝いたします。また、標準菌株の使用ならびに P3 実験施設を使用させていただきました産業医科大学医学部微生物学教室の谷口初美教授ならびに小川みどり先生に感謝いたします。

引用文献

- 1) Lamm, D. L., P. M. van der Meijden, A. Morales, et al. 1992. Incidence and treatment of compli-

- cations of bacillus Calmette–Guerin intravesical bladder cancer. J. Urol. 147: 596–600.
- 2) Steg, A., C. Leleu B. Debre, et al.: 1989. Systemic bacillus Calmette–Guerin “BCGitis”, in patients treated by intravesical bacillus Calmette–Guerin therapy for bladder cancer. Eur. Urol. 16: 161–164.
 - 3) 皆木靖紀, 木村高博, 中嶋孝, 他. 2003. BACILLUS CALMETTE–GUERIN (BCG) 膀胱内注入療法後に発症した腎結核の1例. 西日本泌尿器科 65: 22–25.
 - 4) 石津和彦, 平田寛, 矢野誠司, 他. 2003. BCG 膀胱内注入療法による結核性精巣上体炎の例, 泌尿紀要 49: 539–542.
 - 5) 山崎利夫, 芳賀伸治, 赤川清子, 他. 2001. 結核菌とBCGの鑑別法の確立. 国立感染症研究所ハンセン病研究センター年報 45: 59–62.
 - 6) Wilbur, D., J. R. Jones. 1974. Differentiation of known strains of BCG from isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* by using Mycobacteriophage 33D. J. Clin. Microb. 1: 391–392.
 - 7) Isenberg, H. D., editor in chief, 1994. Niacin Accumulation, In Clinical Microbiology Procedures Handbook 3.12.11, ASM, Washington, D. C.
 - 8) 室橋豊穂, 編. ナイアシン試験. 結核菌検査指針 1979, p. 40.
 - 9) 杉本クミ子, 鹿川 前, 那須美行. 1995. BCG 療法中の抗酸菌検査. 八戸市立市民病院医誌 16: 171–176.
 - 10) 束村道夫, 東海林黎吉, 松田啓子. 1983. BCG 接種後に起こった結核性淋節炎の2症例とその淋節分離菌の性状—BCG 株を他の *Mycobacterium bovis* 株から区別する方法. Kekkaku 59: 289–293.
 - 11) Parson, 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. Microb. 40: 23–39.

Study of 4 Isolates Being Required to Differentiate *Mycobacterium tuberculosis* from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerine (BCG)

Ryoko Goto,^{1, 2)} Tetsuro Muratani,^{1, 3)} Tomoko Kobayashi,^{1, 2)} Chieko Ikeura,²⁾
Shizuka Lee H.,^{1, 3)} Yuko Odahara¹⁾, Tetsuro Matsumoto³⁾

¹⁾ Hibiki Research Group for Clinical Microbiology,

²⁾ Kyurin Corporation

³⁾ Department of Urology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

We experienced 4 cases being required to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerine (BCG). All isolates (MYC1, MYC2, MYC3, and MYC5) from 4 cases showed PCR-positive results when using Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis*. The results of “Differentiation medium set for Mycobacteria” (Kyokuto Pharmaceuticals) against 4 isolates were tubercle bacillus. *Mycobacterium bovis* could be denied because these 4 strains showed the results of niacin production-positive and nitrate reductase-positive. We used 10 µg/ml of thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) to differentiate *M. tuberculosis* from BCG. MYC1 and MYC2 strains were not growth on Ogawa medium containing TCH, but MYC3 and MYC5 strains grew on the same medium. These biochemical results showed that MYC1 and MYC2 strains are BCG and MYC3 and MYC5 strains are *M. tuberculosis*. Furthermore we underwent PCR used PCR primer reported by Yamazaki et al. to differentiate *M. tuberculosis* from BCG. The result of the PCR against MYC1 and MYC2 strains were the same as it against *M. bovis* BCG Tokyo, it against MYC3 and MYC5 strains was the same as it against *M. tuberculosis*.

The intravesical BCG instillation in the treatment of superficial bladder cancer has become general treatment. The various tubercle as adverse drug reaction caused by BCG-treatment has been reported. As BCG-treatment is increasing; we will experience more cases of tubercle caused by BCG after this. We hope the Ogawa medium containing 10 µg of TCH will be obtainable at market to differentiate *M. tuberculosis* from BCG.