

BCG 菌とヒト型結核菌の迅速鑑別に PCR 法が有用であった

胸部皮下膿瘍・肋骨骨髓炎の 1 小児例

¹⁾ 千葉大学大学院医学研究院小児病態学, ²⁾ 千葉大学医学部附属病院検査部, ³⁾ 岐阜大学医学部医学研究科病原体制御学

石和田稔彦¹⁾ 菱木はるか¹⁾ 渡邊 正治²⁾

大楠 清文³⁾ 河野 陽一¹⁾

(平成 19 年 6 月 29 日受付)

(平成 19 年 9 月 14 日受理)

Key words: BCG strain, PCR, osteomyelitis

序 文

現在広く使用されている結核菌群 PCR 検査では *Mycobacterium bovis* BCG (BCG 菌) と *Mycobacterium tuberculosis* (ヒト型結核菌) の鑑別は出来ない¹⁾。そのため、最終診断するためには培養結果を待たねばならず 1 カ月以上の時間を要する。今回、胸部皮下膿瘍・肋骨骨髓炎の小児例から得られた膿から、PCR 法にて BCG 菌 DNA の存在を短時間で証明し、診断・治療に有用であった症例を経験したので報告する。

症 例

症例：4 歳女児。

主訴：左胸部腫瘍。

家族歴：結核・免疫不全症なし。

既往歴：生来健康，易感染性なし，BCG は生後 4 カ月時に接種。接種後特に異常は認めていなかった。

現病歴：平成 18 年 8 月下旬より，抱き上げようとすると左の脇のあたりを痛がるようになった。9 月 8 日入浴時に左胸部の腫脹に気づき，11 日近医受診，CT 検査にて皮下腫瘍・肋骨融解像 (Fig. 1) 認めたため，当院小児外科紹介受診となった。外来で腫瘍部 (40 mm×41mm) を穿刺したところ，膿汁あり，結核菌検査提出後，当科紹介となった。初診時，血液検査上異常所見は認めなかった。膿の塗抹検査にてガフキー 1 号，結核菌群 PCR も陽性のため，9 月 13 日，岐阜大学に膿汁を送付し詳細な PCR 法による遺伝子解析を行うこととした。

Fig. 1 Chest computed tomography

Chest computed tomography indicating a chest-wall tumor with osteolytic changes in the left rib (white arrow).



膿汁からの病原体遺伝子解析

膿汁から DNA を抽出した後，PCR 法を用いて結核菌群が共通に有する *gyrB* の遺伝子領域を増幅したところ，420bp と 450bp のバンドサイズに特異的な DNA の増幅を認めた (Fig. 2)。ヒト型結核菌か *M. bovis* 由来かを鑑別するために，この増幅された DNA の塩基配列を決定して，データベース (BLAST) 検索した結果，*M. bovis* と 100% 一致していた。つぎに得られた *M. bovis* が BCG 菌かウシ型結核菌かの鑑別をするため RD1 領域について解析²⁾した結果，患児の膿汁からはウシ型結核菌と異なり PCR 産物は認められなかった。このことより，BCG 菌であることが判明した。さらに，この BCG 菌が日本で使用されている BCG 株であるかの検討も行った。日本で使用され

別刷請求先：(〒260-8670) 千葉市中央区亥鼻 1-8-1
千葉大学大学院医学研究院小児病態学

石和田稔彦

Fig. 2 Conventional PCR for Mycobacterial Species (*gyrB* gene)

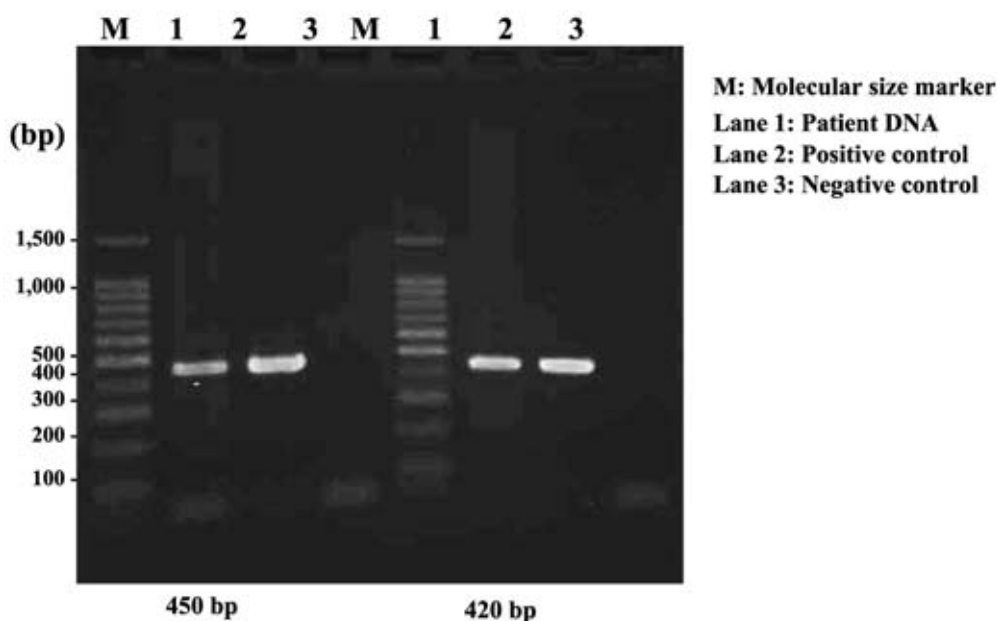
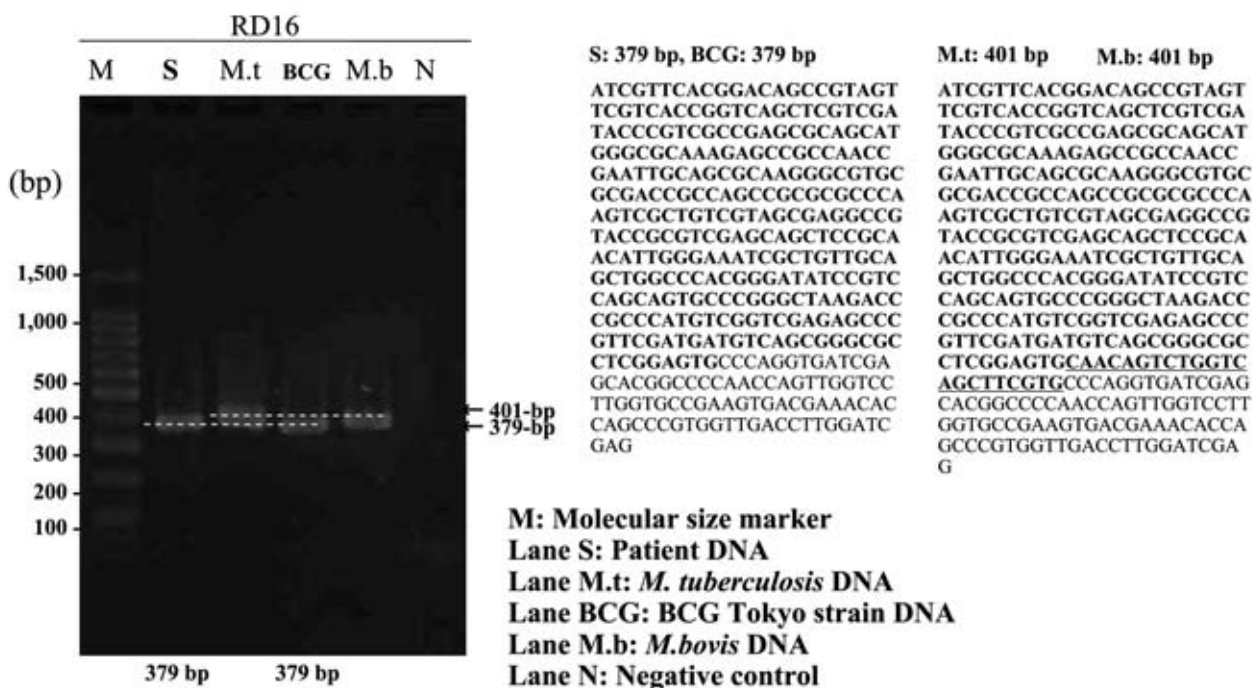


Fig. 3 Conventional PCR for Identifying of *M. bovis* BCG (RD16 region)



ている BCG 東京 172 株は、他国で用いられている BCG 株やウシ型結核菌と異なり RD16 領域中の 22 塩基分が欠失している³⁾。そこで、この領域について、実際の患児膿汁由来の DNA から増幅された産物をシーケンス解析して確認したところ、患児の膿汁から得られた産物では BCG 東京 172 株と同じく 22 塩基分が欠失していた (Fig. 3)。以上の解析結果によって、今回患児より採取された膿汁から *M. bovis* BCG 東京

172 株の DNA が検出されたという結論に至った。

臨床経過

2006 年 9 月 15 日、PCR 解析が終了し結果が判明したため、BCG 菌による皮下膿瘍、骨髄炎と診断確定し、9月16日より Isoniazid (INH)、Refampicin (RFP)、Pirazinamide (PZA) の 3 剤による内服治療を開始した。11 月 1 日、患部が自壊してきたため、切開排膿し、以後 RFP 軟膏⁴⁾塗布を併用した。PZA の投与は

2カ月中止し、以後はINHとRFPの2剤併用とした。膿は少しずつ減少したが、傷口の自然閉鎖が見込めなかったため、2007年1月10日デブリドマンと創閉鎖術を施行。以後経過良好で、INHとRFPの投与は、3月14日まで6カ月間行い終了した。肋骨は一部欠損しているものの傷口の状態は良好であった。なお、好中球機能、IFN- γ 、IL-12受容体異常症⁵⁾⁶⁾などの検索を行ったが、明らかな異常は認められなかった。

考 察

現在、病院や検査施設で一般に使用されている結核菌群遺伝子検出キットは数種類あるが、いずれもBCG菌かヒト型結核菌かの鑑別は不可能である¹⁾。小児で結核性骨髄炎が疑われた場合、ヒト型結核菌であれば、全身性に播種している可能性が高く入院し、RFP+INH+PZAにStreptomycin(SM)あるいは、Ethanbtol(EB)を加えた治療法を選択する必要がある⁷⁾。一方、BCG骨髄炎はBCG接種後数カ月から数年後に発症する稀な副反応であるが、最近本邦においても報告が増えている^{8)~12)}。確立された治療法はないが、文献的には重症結核に準じた治療が推奨されている¹³⁾。しかし、BCG菌による骨髄炎はその多くが予後良好であり¹⁴⁾、EBの副作用や、連日SM筋注治療などの小児への負担を考慮し、RFP+INH(+PZA)による経口薬のみで治療を開始し、経過良好であった症例も報告されている¹⁰⁾¹²⁾。このように、治療方針や予後が異なるため、早期に、BCG菌かヒト型結核菌かを明確にすることは、患児本人・家族への負担を軽減できると同時に、院内感染対策や患者家族への説明上、医療従事者の負担軽減にもつながる。我々は過去に、BCG胸骨骨髄炎症例を経験したが、抗酸菌感染を疑うまでに1カ月、最終診断まで2カ月を要し、入院のうえINH+RFP+PZAの内服とSM筋注による治療を行い、途中入院を継続するため2回の転院を要した¹⁵⁾。今回その経験を教訓として、臨床検体からのPCR法によるBCG菌とヒト型結核菌の鑑別法を確立していたため、早期診断、早期治療を行うことが出来た。検体採取から最終結果判明までの期間は5日間、実際の解析期間は2日間であった。臨床検体からの直接の遺伝子解析は、培養結果を待つことなく短時間でBCG菌かヒト型結核菌かの判別が可能であり、臨床上極めて有用であった。治療に関しては、今回の症例では、INH+RFP+PZAの3剤で治療し、途中RFP軟膏の併用⁴⁾、デブリドマンなどの外科的処置は要したものの、順調に回復した。なお、BCG菌を含む*M. bovis*の薬剤感受性は、INH、RFPには良好であるが、PZAに関しては耐性を示すとされる¹⁰⁾。今回そのことを理解していなかったため3剤併用投与を行ったが、BCG菌による感染症であればPZAの投与は必要ないと思われる。

なお、BCG菌による重症感染症を診た場合、慢性肉芽腫症やIFN- γ 、IL-12受容体異常症⁵⁾⁶⁾などの基礎疾患の検索が必要となるが、今回は明らかな異常は認めなかった。

胸部皮下膿瘍・肋骨骨髄炎の小児例から得られた膿から、PCR法にてBCG菌DNAの存在を短時間で証明し得た症例を経験した。BCG菌による膿瘍や骨髄炎は稀な感染症ではあるが、ヒト型結核菌との迅速な鑑別は臨床上有用であり、本PCR法が広く普及することが望まれる。

謝辞：IFN- γ 、IL-12受容体異常症などの遺伝子解析を行っていただいた、九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野、保科隆之先生に深謝いたします。本論文の要旨は、第81回日本感染症学会総会(2007年4月 京都)において発表した。

文 献

- 1) 長沢光章：細菌感染症の遺伝子検査 抗酸菌/結核菌を中心に。医学検査 2005；54：1053—60。
- 2) Talbot EA, Williams DL, Frothingham R：PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol 1997；35：566—9。
- 3) Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA：Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. Vaccine 2001；19：2146—51。
- 4) 日本病院薬剤師会：リファンピシン軟膏。病院薬局製剤第5版。薬事日報社、東京、2003；p. 196。
- 5) Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al.：A mutation in the interferon- γ receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. New Engl J Med 1996；335：1941—9。
- 6) Sakai T, Matsuoka M, Aoki M, Nosaka K, Mitsuya H：Missense mutation of the interleukin-12 receptor β 1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against *Mycobacterium avium complex* infection. Blood 2001；97：2688—94。
- 7) American academy of pediatrics committee on infectious diseases：chemotherapy for tuberculosis in infants and children. Pediatrics 1992；89：161—5。
- 8) Kato Y, Horikawa Y, Nishimura Y, Shimoda H, Shigeto E, Ueda K：Sternal tuberculosis in a 9-month-old infant after BCG vaccination. Acta Paediatr 2000；89：1495—9。
- 9) 田坂善彦, 松元信輔, 三尾母英幸, 岩松陽一郎, 藤井敏男, 高村和幸, 他：幼児に発症した結核性膝関節炎(骨髄炎)2例。整形外科と災害外科 2001；50：516—20。
- 10) 山下倫徳, 木寺健一, 井上博文, 柴田直子, 宮田倫明, 山田健治, 他：ウシ型結核菌(BCG)による骨結核の1例。整形外科と災害外科 2002；51：653—8。

- 11) 岡田 文, 中島康晴, 志田純一, 坂本昭夫, 岩本幸英, 窪田秀明: 小児距骨 BCG 骨髄炎の経験. 日小整会誌 2004; 13: 159—62.
- 12) 大歳憲一, 菊地臣一, 紺野慎一, 宍戸裕章: ウシ型結核菌 (BCG) が原因と考えられた幼児の上腕骨骨結核性骨髄炎の1例. 臨整外 2005; 40: 717—21.
- 13) Kroger L, Korppi M, Brander E, Kroger H, Wasz-Hockert O, Backman A, *et al.*: Osteitis caused by bacillie Calmette-Guerin vaccination: a retrospective analysis of 222 cases. J Infect Dis 1995; 172: 574—6.
- 14) 松島正視: BCG 骨炎 BCG 接種の副作用. 小児科 1981; 22: 217—26.
- 15) 稲井郁子, 森本 克, 石和田稔彦, 仙田昌義, 細谷亮太, 佐々木由佳, 他: BCG 菌による胸骨骨髄炎を呈した明らかな免疫不全を伴わない女児例. 日見誌 2007; 111 (9): 1177—80.

Usefulness of PCR in Rapidly Diagnosing Subcutaneous Abscess and Costal Osteomyelitis Caused by *Mycobacterium bovis* BCG

Naruhiko ISHIWADA¹⁾, Haruka HISHIKI¹⁾, Masaharu WATANABE²⁾, Kiyofumi OHKUSU³⁾ & Yoichi KOHNO¹⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine,

²⁾Division of Clinical laboratory, Chiba University Hospital,

³⁾Department of Microbiology Regeneration and Advanced Medical Science, Gifu University Graduate School of Medicine

Conventional polymerase chain reaction (PCR) used to identify mycobacterial species does not distinguish between *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG, and several weeks or months may be needed to identify individual slow-growing Mycobacterial species. We report a 4-year-old girl who had subcutaneous abscess and sternal osteomyelitis after BCG vaccination at 4 month of age. We directly identified *M. bovis* BCG genome in the punctured abscess within a few days using PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. Such PCR is useful for rapidly diagnosing and managing of appropriate therapy in patients with infection due to *M. bovis* BCG.

[J.J.A. Inf. D. 82 : 30~33, 2008]