



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	BCG接種に続発した病巣より分離された抗酸菌の細菌学的生物学的研究：特にヌードマウス接種について
Author(s)	山本, 健一; YAMAMOTO, Ken-ichi; 加藤, 一之 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 39, 24-28
Issue Date	1979-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26520
Type	departmental bulletin paper
File Information	39_P24-28.pdf



BCG 接種に続発した病巣より分離された 抗酸菌の細菌学的生物学的研究

特にヌードマウス接種について

山本 健一* 加藤 一之* 酒井 一郎*

奥山 春枝** 有馬 純*

(北海道大学免疫科学研究所 細菌感染部*・病理部**)

今野 直樹

(市立江別総合病院小児科)

(昭和 53 年 10 月 31 日受付)

はじめに

乳幼児の BCG 接種に続発した接種部位以外の病巣部から BCG が分離され、これが原因菌とされる報告^{1~16)}が国内外で最近しばしばみられる。

われわれも BCG 接種に続発した幼児の右足関節部に生じた病巣より抗酸菌を分離し、その細菌学的生物学的性状について検査した。その結果、この抗酸菌が BCG の諸性状と一致していることが明らかにされた。

実験材料と方法

1) **被検抗酸菌**：1977 年 11 月江別市立総合病院整形外科にて受診次いで小児科に入院した 2 歳の女兒の右脛骨下端部位に生じた膿瘍状病巣を材料として小川培地にて分離された。(以下佐賀株と仮称する)。この患児は BCG 接種後 7 カ月で上記の部位に腫脹を生じ整形外科で受診したのである。その際、病変部位切開の膿から抗酸菌がガフキー 2 号程度検出された。

2) **小川培地上の性状**：22°C, 30°C, 37°C および 42°C のそれぞれにおける増殖および発育の遅速、また集落の色調および型 (S または R) について観察した。

3) **生化学的検査**：日本結核病学会非定型抗酸菌分類委員会の基準¹⁷⁾に基づき、ナイアシン試験、耐熱カタラーゼ、ベルオキシダーゼ、硝酸還元、Tween 80 水解、アリスルファターゼの諸反応をしらべた。

4) **薬剤感受性**：小川培地に含有させたチオフェンカルボン酸ヒドドラチッド (TCH)、サイクロセリン (CS)、イソニコチン酸ヒドドラチッド (INH)、ストレプトマイシン (SM)、パラアミノサルチル酸塩 (PAS)、カナマイシン (KM)、エチオナミド (TH)、エタンプトール (Eb)、チオアセタゾーン (TbI)、リファンピシン (RMP) およ

びツペラクチノマイシン (TUM) に対する感受性をしらべた。

5) **動物接種実験**：i) モルモット；体重約 400 g の Hartley の雌 3 匹に小川培地に継代培養 1 カ月目の佐賀株 2 mg を右下腹部皮下に接種した。接種生菌単位は 4×10^6 であった。接種後 4 週目に PPD 10 μ g によるツペルクリン皮膚反応を行い 24 時間目に判定後、直ちに剖検、リンパ節内臓の肉眼的変化を観察した。また、肺と脾の定量還元培養を行い、これらの臓器内生菌数を求めた。

ii) マウス：CF#1 マウスとヌードマウスに接種した。体重 30 g 前後の CF#1 雌マウス 5 匹にモルモットに接種したのと同じ菌 1 mg を尾静脈に注射した。接種 4 週後に剖検、肺脾の重量を測定し、これを体重で割り、100 倍して肺および脾 Index を算出した。また両臓器の還元培養を小川培地で行い、臓器内生菌数を求めた。一方、ヌードマウスは日生研より購入した Balb/c background の 5 週齢の雌 nu/nu とその littermate の nu/+ を用いた。1 群 6 乃至 8 匹として、nu/nu と nu/+ マウスに佐賀株と、対照としてわれわれの研究室でグリセリン・馬鈴薯培地で継代の BCG 日本株をそれぞれ小川培地の培養 10 日目もの 1 mg を静注した。接種生菌単位は佐賀株、BCG 日本株それぞれ 13.5×10^6 , 18×10^6 であった。静注後 1 週および 3 週目に半数ずつ剖検、肺および脾内生菌数を還元培養によってしらべた。また一部の動物の肺および脾の病理組織学的所見について検査した。なお、nu/nu, nu/+ 共に実験中はビニール isoal-ter で飼育し滅菌飲料水、固型飼料を与えた。

実験結果

1) 佐賀株の細菌学的一般性状

i) 小川培地上の性状：表-1 に示す如く、小川培地上

表-1 佐賀株の細菌学的一般性状

	集 落	色 調 型		やや黄を帯びた白色 R 型
		発 育 速 度	増 殖 発 育 温 度 域	
小川培地上の性状		発 育 速 度		緩
		増 殖 発 育 温 度 域	22°C	—
			33°C	—
			37°C	+
		42°C	—	
生化学的試験	70°C カタラーゼ			—
	ペルオキシダーゼ			+
	硝酸還元			+
	ナイヤシン			—
	Tween 80 水解			—
	アリルスルファターゼ			—
薬剤感受性	TCH			sensitive
	CS			resistant
	INH, SM, PAS, KM, TH, Eb, TbI, RMP, TUM			sensitive

の増殖は37°C培養においてのみみられ、可視集落の出現は2乃至3週であった。集落はR型で、光照射による着色はなかった。

ii) 生化学的性状：表-1にみられるように、ペルオキシダーゼ反応と硝酸還元が陽性の他はすべて陰性であった。

iii) 薬剤に対する感受性：表-1にまとめたが、TCHにBCGと同様に感受性を示した。抗結核剤に対してはCSに抵抗性を示した他は他の薬剤によって発育は阻止された。

2) 動物接種

i) モルモット：表-2に示すように佐賀株2mg皮下接種4週後のツベルクリン反応は直径20mm以上の発赤硬結を示した。淋巴節は膝壁、鼠蹊および後腹膜のそれらが腫脹していた他は正常で、肺、肝および脾にも肉眼的に結節を見出すことは出来なかった。接種菌の還元培養の結果は脾10mg当り僅かに1乃至2個の集落がみられたにすぎなかった。そして、肺では集落を認めることは出来なかった。

ii) マウス：CF#1マウスに佐賀株1mg静注4週後剖検の結果は表-3の如く、肺Indexは正常値の範囲に

表-2 佐賀株モルモット皮下接種実験成績

動物番号	ツベルクリン反応 PPD 10 μg	接種局所	膝リンパ節		鼠蹊リンパ節		腋窩リンパ節		後リンパ膜節	肝リンパ門節	気管支リンパ節		肝	肺	脾	脾重量 (g)	還元培養菌数	
			右	左	右	左	右	左			右	左					肺	脾
			1	+	痂皮+	+	—	+			—	—					—	+
2	+	痂皮+	+	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	0.78	0×10 ²	2×10 ²
3	+	治癒	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.75	0×10 ²	1×10 ²

ツベルクリン反応：菌接種4週目に行う。リンパ節：+～+は肉眼的腫脹度。還元培養菌数は臓器10mg当りを示す。

表-3 佐賀株マウス (CF#1) 静注接種実験成績

動物番号	体 重 (g)	肺		脾		還元培養菌数	
		重 量 (mg)	Index	重 量 (mg)	Index	肺	脾
1	30.0	210	0.70	490	1.63	84×10 ²	23×10 ³
2	28.7	210	0.73	270	0.94	92×10 ²	86×10 ³
3	31.5	220	0.69	250	0.79	78×10 ²	39×10 ³
4	26.2	190	0.72	260	0.99	77×10 ²	14×10 ³
5	32.0	220	0.68	320	1.00	103×10 ²	66×10 ³

還元培養菌数は臓器10mg当りの数を示す。

表-4 佐賀株と BCG 日本株のヌードマウス静注接種後の肺および脾内全生菌数

菌 株	マウス	接種後	肺	脾
佐 賀	nu/nu	1 週	$(49.4 \pm 5.7) \times 10^4$	$(56.4 \pm 15.6) \times 10^5$
		3	$(35.5 \pm 4.8) \times 10^5$	$(83.7 \pm 18.9) \times 10^5$
	nu/+	1	$(97 \pm 13.5) \times 10^4$	$(98.4 \pm 24.8) \times 10^5$
		3	$(19.7 \pm 5.4) \times 10^5$	$(11.8 \pm 2.0) \times 10^6$
BCG 日 本	nu/nu	1	$(80.6 \pm 9.3) \times 10^4$	$(30.0 \pm 9.3) \times 10^6$
		3	$(35.5 \pm 6.5) \times 10^5$	$(18.1 \pm 1.6) \times 10^6$
	nu/+	1	$(13.9 \pm 6.2) \times 10^5$	$(98.2 \pm 50.5) \times 10^5$
		3	$(36.8 \pm 6.0) \times 10^5$	$(85.3 \pm 56.5) \times 10^5$

あり、脾のそれは正常値の2乃至3倍を示した。肺および脾の還元培養の結果は臓器 10 mg 当りそれぞれ平均 87, 710 であった。

次にヌードマウスにおける佐賀株の増殖を BCG 日本株と比較した成績は表-4 に示した。肺においては佐賀株は nu/nu および nu/+ マウスで接種後1週から3週の間それぞれ約7倍、2倍に増殖し、BCG 日本株のそれらは4.4 および2.6倍であった。また、脾においては佐賀株および BCG 日本株共に nu/nu および nu/+ マウスの何れでもこの観察期間に殆んど増殖がみられなかった。なお、これら動物の肺および脾の病理組織所見をみると、前者では接種1週および3週後の全例に中心部の軽度の胞隔肥厚があり、単核細胞の増加が認められるが、明らかに肉芽腫形成を示すものは BCG 日本株接種3週後の nu/+ マウスのみで、それも類上皮細胞肉芽腫がごく少くみられたにすぎない。また、脾では nu/nu マウスの濾胞の動脈周囲リンパ球鞘の発達が悪く、nu/nu マウスの BCG 日本株接種1週および佐賀株接種3週の動脈周囲リンパ球鞘に類上皮細胞に似た細胞および核破片がみられるが、結核結節といえるかどうかわからない。nu/+ マウスの佐賀株および BCG 日本株接種3週後では濾胞周囲および赤髄に小さな類上皮細胞結節の散在がみられ、佐賀株接種の細胞の成熟はやや悪く、融合している形が多い傾向があり、また結節も BCG 日本株のそれより小さかった。

総括と考察

われわれは BCG 接種の幼児に続発した下肢の病巣より抗酸菌を分離し、この菌の生物学的諸性状を検討した結果、この抗酸菌が BCG の諸性質と極めて一致したものをもっていることを確かめた。

この菌は小川培地上の発育温度、集落の性状、発育速度からも、また、種々の生化学的反応でペルオキシダーゼと硝酸還元が陽性であった他はナイアシン試験をはじめ試みた反応はすべて陰性であったし、さらに薬剤感受性でサイクロセリン抵抗性でチオフェンカルボン酸ヒドラチッドに感受性を示した点を併せると BCG と性質を同じくするものである。

また、動物接種の成績をみると、モルモットに 2 mg 皮下接種4週後のツベルクリン反応の大きさは BCG 日本株で試みた丸谷の成績¹⁸⁾ とほぼ等しい陽転度を推定させるものと言える。そして、その時期における肺および脾内生菌数は前者で全く検出出来ず、後者で10乃至100であったのもわれわれが以前に行った BCG のモルモット接種の結果¹⁹⁾ と大差のないものである。

次に CF #1 マウスに 1 mg 静注4週後の肺および脾の接種菌生菌単位をながめると、上田ら²⁰⁾ の Balb/c マウスに接種した BCG の増殖の傾向とよく似た成績である。

BCG の nu/nu マウス接種後の増殖については Sherら²¹⁾ および上田ら²⁰⁾ の報告がある。両者には使用したマウス、BCG 株の毒力の差によると考えられる差違がみられるが、大筋で一致した成績であると言えよう。上田ら²⁰⁾ によると Balb/c を背景とする nu/nu および nu/+ マウスに BCG 2.2×10^6 静注後3日から2週までは肺および脾の両者共に増減なくほぼ等しい水準を維持し、その後 nu/nu マウスでは両臓器共に BCG の増殖がみられるのに対し、nu/+ マウスでは減少の一途をたどった。そして実験終了の175日目では nu/nu マウスで特に肺における BCG の圧倒的な増殖がみられた。一方、Sherら²¹⁾ の実験期間は5週であるが、nu/nu マウスでは3週で、すでに肺における BCG の著しい増殖が

みられたことは上田ら、またわれわれの成績とは対照的といえる。われわれの実験ではビニール isolator での長期間の飼育の困難な事情から観察期間は僅か3週とした。しかし3週では期待した Sher らのような結果はみられなかったが、われわれの用いた両菌株の nu/nu と nu/+ マウスにおける増殖の様子は上田ら²⁰⁾の BCG のそれと少なくとも3週までは似ていることから、以後の増殖様式も上田らの成績に似た形をとるものと推定して誤りではないと思われる。

肺と脾の病理組織像は nu/nu, nu/+ マウスの何れでも佐賀株と BCG 日本株のそれとの間に著差はなかったが、Sher²¹⁾らの成績に比べると、nu/nu と nu/+ との明らかな差、また病変のピークの時期といった点でかなりの違いがみられた。とにかく、佐賀株は病理組織像から BCG と同様な極めて弱い組織反応をみせる菌株と言えよう。

ところで、乳幼児の BCG 接種後に引き続きこの接種菌により全身あるいは遠隔部位に病巣を惹起することは特に先天性免疫不全の場合²²⁾によくみられていた。また、最近、癌患者の化学療法と BCG の免疫療法の併用時の BCG による発症も報告されている²³⁾しかし、本報の症例では免疫不全の症候は全くなかった。従って今後このような BCG 接種続発症の誘因をあきらかにすると共に、当面消極的ながら BCG 接種前後の対象者の健康状態の観察に一層留意する必要がある。

む す び

われわれは BCG 接種に続発した病巣部位より抗酸菌を分離し、細菌学的ならびに生化学的諸検査、さらにモルモット、マウス特にヌードマウス接種の成績から、この菌株が BCG の諸性状を示す mycobacteria の1株であることを明らかにすることが出来た。

稿を終えるに当り本実験のヌードマウス飼育に御助力いただいた本研究所免疫動物実験施設石原智明助手、また実験に御援助下さった栗山静恵、立花キヨ、大里光子

技官の皆様に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Backman, A. and Wallgren, E. I.: Acta Paediatrica, **43**, 252, 1954.
- 2) 森岡達治: 結核, **35**, 331, 1960.
- 3) 佐藤正弘, 他: 結核, **37**, 36, 1962.
- 4) 佐藤正弘, 他: 結核, **37**, 72, 1962.
- 5) Felländer, M.: Acta Orthop. Scandinavia, **33**, 116, 1963.
- 6) Gerdborg, O. et al.: Acta Paediatrica **52**, 293, 1963.
- 7) Carlgren, L. E. et al.: Acta Paediatrica Scandinavia, **55**, 636, 1966.
- 8) 松田健一郎, 他: 小児科臨床, **22**, 318, 1969.
- 9) Estarly, J. R. et al.: Paediatrics, **48**, 141, 1971.
- 10) Foucard, T. and Hjelmstedt, A.: Acta Orthop. Scandinavia, **42**, 142, 1971.
- 11) Marks, J. et al.: Brit. Med. J., **3**, 229, 1971.
- 12) 島尾忠男: 結核, **50**, 338, 1975.
- 13) Passwell, J. et al.: Am. J. Dis. Child, **130**, 433, 1976.
- 14) Pauker, M. et al.: Archiv. Dis. Child., **52**, 330, 1977.
- 15) 斎藤 徹, 他: 小児科診療, **41**, 324, 1978.
- 16) 水谷宣美, 他: 結核, **53**, 236, 1978.
- 17) 日本結核病学会抗酸菌分類委員会: 結核, **51**, 247, 1976.
- 18) 丸谷竜司: 結核の研究, **27**, **28** 集, 19, 1966-67.
- 19) 有馬 純, 他: 結核の研究, **4** 集, 32, 1955.
- 20) Ueda, K., Yamazaki, S. and Someya, S.: J. Reticuloendothel. Soc., **19**, 77, 1976.
- 21) Sher, N. A. et al.: J. Natl. Cancer Inst., **54**, 1419, 1975.
- 22) Bouton, J., Mainwaring, D., Smithells RW.: Br. Med. J. **5344**, 1515, 1963.
- 23) Bast RC Jr. et al.: N. Engl. J. Med., **290**, 1458, 1974.

Bacteriological and Biological Study on Acid-fast Bacilli
Isolated from a Disseminated Lesion Induced Shortly
after BCG Vaccination with Special Reference to
the Growth in Congenitally Athymic Mice

Ken-ichi YAMAMOTO, Kazuyuki KATO, Ichiro SAKAI
Harue OKUYAMA, Naoki KONNO
and Jun ARIMA

Acid-fast bacilli were isolated from a lesion in an infant of lower extremity which had been produced shortly after BCG vaccination.

Bacteriological and biochemical examination including the observations of colony and the multiplication of this strain on Ogawa's egg media and various enzymatic reactions, revealed that this strain is identical with BCG.

The growth of this strain in organs of both Hartley guinea pigs and of CF#1 mice was comparable to that of BCG.

Compared with BCG, this strain was examined for the growth in Nude mice. The growth of both strains was gradual in the spleen but relatively rapid in the lung until termination of the experiment at 3 weeks.

From these experimental results, we concluded that this strain is a mycobacterium one markedly similar to BCG.