

原著

BCG ワクチン接種後乳児における
核酸増幅法検査のピットフォール越智史博^{1,2)} 田内久道¹⁾ 石井榮一¹⁾

要旨 【背景】乳児では *Mycobacterium tuberculosis* に対する排菌を評価するため胃液を用いた核酸増幅法検査 (NAAT) が施行されることが多い。今回われわれは、コッホ現象を疑った3か月男児で、ツベルクリン反応陰性であったにもかかわらず、胃液を用いたNAATが陽性を示した症例を経験した。この原因を明らかにするため、BCG接種後に施行されるNAATが*M. tuberculosis*感染以外で陽性となる可能性について検討した。

【対象と方法】 BCGを接種した乳児7名(男2名,女5名)を対象とした。BCG接種後0, 2, 4, 6日目に口腔粘膜ぬぐい液を採取し、NAATを施行した。

【結果】 7名中3名(男1名,女2名)で結核菌群DNAを検出した。2名が0日目、1名が2日目に陽性となったが、いずれも4, 6日目には陰性化した。

【考察】 BCG接種部に残存したBCG液が手指を介して口腔に付着し胃内に嚥下され、胃液のNAATが陽性となる可能性が示唆された。コッホ現象を疑いNAATを施行する際には病歴や他の検査結果と併せて検査結果を総合的に判断する必要がある。

緒言

Mycobacterium tuberculosis に対して免疫を獲得した乳児に Bacille Calmette-Guérin (BCG) ワクチンを接種した場合、接種後10日以内(多くは3日以内)に接種局所に発赤、腫脹、膿疱形成といったコッホ現象と称される強い反応が出現する。この局所症状は、2~3週間程度で治癒傾向となり、その後は通常接種とほぼ同様の経過で消退する^{1,2)}。

今回、われわれはコッホ現象を疑った生後3か月男児で、ツベルクリン反応陰性であったにもかかわらず、胃液を用いた核酸増幅法検査 (nucleic acid amplification test : NAAT) が陽性を示した

症例を経験した。児はBCG接種3日後から接種部位の発赤と小膿疱(Grade 4)が出現し、コッホ現象を疑われツベルクリン反応と胃液を用いたNAATが施行された。ツベルクリン反応は陰性であったが、胃液を用いたNAATは陽性、抗原特異的インターフェロン- γ 遊離検査(interferon-gamma release assay : IGRA)は陰性、培養検査は陰性であった。周産期歴や発育、発達には異常はなく、家族内に結核患者や呼吸器症状を示す者はいなかった。画像検査は異常なく、BCG接種7日後に再検したNAATは陰性であった。BCG接種部の局所所見は徐々に改善し、BCG接種後14日頃から再度出現、2か月後にすべて痂皮化した。

Key words : 乳児, 核酸増幅法検査, 結核, BCG ワクチン, *Mycobacterium bovis*

1) 愛媛大学大学院医学系研究科小児科学 2) 市立八幡浜総合病院小児科

連絡先: 越智史博 〒791-0295 東温市志津川 愛媛大学大学院医学系研究科小児科学

表1 BCG接種後の健康乳児の口腔粘膜におけるNAATによる結核菌群DNA検出結果

| No. | 月齢 | 性別 | 体重 (kg) | 基礎疾患 | 結核接触歴 | 栄養 | day 0 | day 2 | day 4 | day 6 |
|-----|---------|----|---------|------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 5m 20d | F | 6.7 | — | — | 母乳 | + | — | — | — |
| 2 | 7m 23d | F | 8.0 | — | — | 母乳 + 離乳食 | — | — | — | — |
| 3 | 6m 2d | F | 7.4 | — | — | 人工ミルク + 離乳食 | — | — | — | — |
| 4 | 6m 23d | M | 8.0 | — | — | 母乳 | — | + | — | — |
| 5 | 5m 15d | F | 7.0 | — | — | 母乳 | — | — | — | — |
| 6 | 11m 9d | F | 7.5 | — | — | 母乳 + 離乳食 | + | — | — | — |
| 7 | 11m 27d | M | 9.0 | — | — | 母乳 + 離乳食 | — | — | — | — |

M: 男児, F: 女児, m: 月, d: 日, NAAT: nucleic acid amplification tests (核酸増幅法検査)

この症例を経験したことから、BCG接種後にコッホ現象が疑われた場合、検査の一つとして施行される胃液を用いたNAATが*M. tuberculosis*感染以外で陽性となる可能性について検討した。

I. 対象と方法

1. 対象

2014年4月1日から2014年10月1日までに市立八幡浜総合病院小児科で乾燥BCGワクチン(日本ビーシージー製造株式会社)の定期接種を受けた健康な乳児を対象とした。

2. 方法

本研究では、乳児への検体採取時の侵襲性を考慮し、胃液ではなく口腔粘膜ぬぐい液でも代替可能と考え、口腔粘膜ぬぐい液を解析した。

乾燥BCGワクチンを添付文書に記載されている方法に従い、上腕外側中央部に接種し、30分間程度で接種部位を自然乾燥させた。接種後は保護者に接種部位を触らないように指導するとともに児にも触らせないように指導した。

乾燥BCGワクチンを接種後、0, 2, 4, 6日目(起床時)に口腔粘膜をプレンスワブ®(イワキ社)を用いて擦過し、口腔粘膜ぬぐい液を採取した。BCG接種後0日目の検体に関しては、接種後6~8時間後に検体を採取した。

採取した検体中の結核菌群DNAをコバスTaq-Man® MTB(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を用い、real-time PCR法で検出した。また、対象とした乳児の体重、栄養方法、基礎疾患の有無、結核患者との接触歴に関しても評価した。採

取した検体はすべて塗抹鏡検(抗酸菌染色)、培養検査を行い評価した。

本研究は愛媛大学医学部付属病院の倫理委員会の承認(1702020号)を得て施行した。対象児の保護者に対して、BCGワクチン定期接種後に本研究に関するインフォームド・コンセントを行い、文書で同意を得て施行した。

II. 結果

対象とした症例は7例で男児2例、女児5例であった。

月齢は中央値6か月23日(5か月15日~11か月27日)、体重は中央値7.5kg(6.7~9.0kg)であり、体重増加不良の乳児はいなかった。完全母乳栄養が3名、母乳と離乳食併用が3名、人工ミルクと離乳食併用が1名であった。また、全例で基礎疾患、生後より感染症に罹患した既往歴、結核患者との接触歴はなかった。

測定結果について表1に示す。7例中3例(男児1例、女児2例)で口腔粘膜ぬぐい液中に結核菌群DNAを検出した。増幅産物が検出されNAAT陽性と判断されるまでに要したReal-time PCRのサイクル数(critical threshold value: Ct)は症例1が42.5、症例4が45.2、症例6が43.5であった。陽性となった3例のうち2例が0日目のみ、1例が2日目のみ陽性を示し、3例とも4, 6日目には陰性化した。陽性症例はすべて塗抹鏡検(抗酸菌染色)陰性、培養陰性であった。

表2 結核菌の同定検査に用いられるキット

| 製品名* | メーカー | 原理 | 対象菌 | 検体 | 最小検出感度** |
|----------------------------------|-----------|---------------|---|-----------------------|----------------------------|
| DNA プローブ「FR」-MTB | Gen-Probe | TMA & HPA | <i>M. tuberculosis complex</i> | 体液, 組織, 気管支洗浄液, 培養液 | 1.2 CFU |
| コバス TaqMan [®] MTB | ロシュ | Real-time PCR | <i>M. tuberculosis complex</i> | 体液, 組織, 気管支洗浄液 | 約5コピー |
| TRC Rapid M.TB | 東ソー | TRC | <i>M. tuberculosis complex</i> | 体液, 気管支洗浄液, 分離菌株, 培養液 | 300コピー |
| ジーンキューブ [®] MTB | TOYOBO | PCR | <i>M. tuberculosis complex</i> | 臨床検体 (NALC-NaOH 処理) | 10コピー |
| Loopamp [®] 結核菌群検出試薬キット | 栄研化学 | LAMP | <i>M. tuberculosis complex</i> | 喀痰 | 0.38 ゲノム相当 |
| アキュプローブ結核菌群同定 | Gen-Probe | HPA | <i>M. tuberculosis complex</i> | 分離菌株 | 1.0×10 ⁶ CFU |
| DDH マイコバクテリア | 極東製薬工業 | DDH | <i>M. tuberculosis complex, M. kansasii, M. marium, M. simiae, M. scrofulaceum, M. gordonae, M. szulgai, M. avium, M. intracellulare, M. gastri, M. xenopi, M. nonchromogenicum, M. terrae, M. triviale, M. fortuitum, M. chelonae, M. abscessus, M. peregrinum</i> | 分離菌株 | NA |
| キャピリア TB-Neo | タウンズ | TLC | <i>M. tuberculosis complex</i> | 分離菌株, 培養液 | 1.2×10 ⁶ CFU/mL |
| BD ミジット TBcID | 日本 BD | TLC | <i>M. tuberculosis complex</i> | 分離菌株, 培養液 | 1.0×10 ⁶ CFU/mL |

TMA: transcription mediated amplification, HPA: hybridization protection assay, TRC: transcription-reverse transcription concerted reaction, PCR: polymerase chain reaction, LAMP: loop-mediated isothermal amplification, NALC-NaOH:

N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide, DDH: DNA-DNA hybridization, TLC: thin-layer immunochromatography, NA: not available

* 2017年7月12日現在, 市販中 ** 製品添付文書より抜粋

III. 考 察

自験例のような NAAT 陽性, 塗抹鏡陰性, 培養陰性の症例は, 「死菌」または「菌量少数」または「コンタミネーション」と解釈され^{3,4)}, 3つのうちどれが真の結果なのか判断することは容易ではない. その検査結果の乖離をもたらす要因として, 検査原理に関する要因と人的要因が考えられる.

抗酸菌は *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M.*

pinipedii で構成される結核菌群と, それ以外の非結核菌群に大別され, 臨床的に分離される結核菌群の大多数が *M. tuberculosis* である⁵⁾. 現在, *M. tuberculosis* の同定のために用いられている検査キットを表2にまとめた. その中で, 日本国内で保険適用を受けている結核菌群 DNA の検出を目的とした NAAT は, コバス TaqMan[®]MTB, DNA プローブ「FR」-MTB, TRC Rapid M.TB, ジーンキューブ[®]MTB, Loopamp[®]結核菌群検出試薬キットの5つである⁶⁾. これらの *M. tubercu-*

losis DNAを検出する全てのNAATでは、結核菌群に共通する塩基配列がプライマーとして設定されており、各NAATで*M. tuberculosis* か*M. bovis*かを鑑別することはできない。つまり、BCGワクチン液中に含まれる*M. bovis*はNAATで陽性になってしまう^{7,8)}。

また、人的要因として、BCG接種部から乳児や保護者の手指を介し伝播された*M. bovis* (BCGワクチン株)によって、胃液のNAATが陽性となった可能性も考えられる。一般的に、BCGワクチン接種後は接種部を乾燥させ、母児ともに触らないように指導されるが、完全に接種部に接触しないように管理することは困難である。無意識に触ったり掻いたりした後、その手指を口に入れることによって、口腔粘膜から胃内に*M. bovis*が混入したと推察される。三宅らによるBCG接種部が化膿したことを主訴に受診した乳児7例の検討では、57% (4/7名)で接種局所から結核菌群DNAが検出され、BCGワクチン接種後も接種部位に*M. bovis*が残存していることが示された⁹⁾。特にコッホ現象が疑われ、NAATを施行される児であれば、接種部位に癢痒感、発赤、腫脹といった免疫応答に伴う局所症状を伴っていることが想定され、児が掻爬している可能性が高いと考えられる。本研究においても、43% (3/7例)で口腔粘膜ぬぐい液から結核菌群DNAが検出されており、この仮説を裏付ける結果となった。また、興味深いことに結核菌群DNAが持続して検出された症例はなく、喀痰と同様に胃液も反復採取しNAATを行いコンタミネーションかどうか確認することが重要と考えられる。本検討でNAAT陽性となるまでに要したreal-time PCRのCt値は42.5~45.2と高かった。コバスTaqMan[®] MTBの内部コントロール (DNA約20コピー/PCR)のCt値は38前後の値を得ることから、採取した際のDNA量が非常に低濃度であったことが示唆される¹⁰⁾。その結果から、*M. bovis*は死菌または菌量が少量であったため、培養検査では生育しなかったと考えられる。

以上の理由から、BCG定期接種後の乳児ではBCGワクチン株が混入する可能性があり、既存のNAAT単独では*M. tuberculosis*と*M. bovis*を鑑

別できない。したがって、結核接触歴を含めた病歴、ツベルクリン反応、培養検査、免疫学的検査、画像検査と併せて総合的に判断し、*M. tuberculosis*による真の感染、発病かどうか見極める必要がある。

PubMed、医学中央雑誌で年限を設けず文献検索すると、胃液から*M. bovis*が検出された症例報告は3例あった。1例目は外胚葉形成不全免疫不全症候群 (NEMO異常症)の2歳児における全身性播種性BCG感染症¹¹⁾、2例目はMHCクラスII欠損症 (Bare Lymphocyte Syndrome type II)の1歳11か月児におけるBCGリンパ節炎¹²⁾、3例目はHIV感染症の6か月児におけるBCGリンパ節炎¹³⁾であった。いずれも基礎疾患として免疫不全症を有する児での報告であり、本検討のような健常児に関する報告や口腔粘膜ぬぐい液および唾液からの*M. bovis*検出例の報告はなかった。

本研究の限界として、BCGワクチン接種後に検出された結核菌群について特異的PCRで菌種を特定していない点、症例数が少ない点があげられる。

結 語

コッホ現象陽性で乳児期結核を疑う場合の検査として、胃液のNAATは*M. bovis*の混入によって陽性となる場合があるため、結果の解釈を慎重に行う必要がある。

謝辞：本研究にあたり、NAATを含めた細菌学的検査を施行していただいた愛媛大学附属病院検査部宮本仁志先生、村上忍先生に深謝いたします。

本研究に関しては、第48回日本小児感染症学会 (岡山)で発表した。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Rook GA, et al : Cytokines and the Koch phenomenon. *Tubercle* 72 : 13-20, 1991
- 2) Bothamley GH, et al : The Koch phenomenon and delayed hypersensitivity: 1891-1991. *Tubercle* 72: 7-11, 1991

- 3) 日本結核病学会予防・治療合同委員会: 核酸増幅法による結核菌検査の臨床での使用について. 結核 70 : 711-712, 1995
- 4) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会(編): 第6章 遺伝子検査. 結核菌検査指針 2007, 81-94, 財団法人結核予防会, 東京, 2007
- 5) 御手洗 聡: 医学検査のあゆみ-21 結核群遺伝子の臨床検査の進歩. モダンメディア 59 : 12-17, 2013
- 6) 日本結核病学会(編): 結核診療ガイドライン改訂第3版. 41-59, 南江堂, 東京, 2015
- 7) 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 54 : 1053-1060, 2005
- 8) 石和田稔彦, 他: 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. 感染症学雑誌 82 : 30-33, 2008
- 9) 三宅千代美, 他: BCG 接種部位の化膿病変における細菌培養と PCR による結核菌検出の試み. 小児科臨床 54 : 397-400, 2001
- 10) 米丸 亮, 他: リアルタイム PCR を用いた抗酸菌群検査キット (コバス TaqMan[®]) の精度評価. 日本呼吸器学会誌 47 : 1070-1076, 2009
- 11) 遠海重裕, 他: クローン病を治療中に発病した全身性播種性 BCG 感染症の 1 例. 結核 84 : 597-603, 2009
- 12) Abu-Arja RF, et al: Disseminated Bacillus Calmette-Guérin (BCG) infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplant in a patient with Bare Lymphocyte Syndrome type II. Transpl Infect Dis 16 : 830-837, 2014
- 13) Hesseling AC, et al: Resistant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin disease: implications for management of Bacillus Calmette-Guérin Disease in human immunodeficiency virus-infected children. Pediatr Infect Dis J 23 : 476-479, 2004

A pitfall of the nucleic acid amplification test in infants after Bacille Calmette-Guérin vaccination

Fumihiko OCHI^{1,2)}, Hisamichi TAUCH¹⁾, Eiichi ISHII¹⁾

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

2) Department of Pediatrics, Yawatahama City General Hospital

[Introduction] The nucleic acid amplification test (NAAT) is used to confirm the infection of *Mycobacterium tuberculosis* in infants. A 3-month-old infant had redness and small pustules at the inoculation site of a BCG vaccination at day 3. Tuberculin reaction was negative, whereas NAAT using gastric aspirates proved positive. This study aimed to examine whether NAAT of gastric or oral aspirates could become positive in infants after Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination.

[Materials and method] NAAT was performed by using the oral mucosa wiping fluid of seven infants after BCG vaccination.

[Results] The oral aspirates of three infants showed positive NAAT at day 0 or 2 but became negative thereafter.

[Discussion] It is possible that the NAAT on gastric or oral aspirates could become positive in infants after BCG vaccination, because *M. bovis* in BCG solutions could be transferred to the oral cavity via the hands of the mother or infant. Careful interpretation of positive NAAT results using gastric aspirates of infants with the Koch phenomenon is required.

Key words: infants, nucleic acid amplification test, tuberculosis, Bacille Calmette-Guérin vaccination, *Mycobacterium bovis*

(受付: 2017 年 5 月 25 日, 受理: 2017 年 8 月 4 日)