

原 著

ガスクロマトグラフィー／質量分析装置を用いたツベルクロステアリン酸
検出による肺結核症の迅速診断

村 西 寿 一 ・ 中 島 道 夫
恒 松 英 明 ・ 重 松 信 昭

九州大学医学部胸部疾患研究施設

磯 部 隆 一

九州大学薬学部

受付 昭和 62 年 5 月 28 日

RAPID DIAGNOSIS OF PULMONARY TUBERCULOSIS BY DETECTION OF
TUBERCULOSTEARIC ACID WITH GAS CHROMATOGRAPHY /
MASS SPECTROMETRY

Hisakazu MURANISHI *, Michio NAKASHIMA, Hideaki TSUNEMATSU,
Nobuaki SHIGEMATSU, and Ryuichi ISOBE

(Received for publication May 28, 1987)

Mass chromatogram of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) was used to detect 10-methyloctadecanoic acid (tuberculostearic acid, denoted TSA hereafter) which is known as characteristic fatty acid of acid-fast bacteria of order Actinomycetales. The analysis was performed on 5~7-day-old cultures of sputum specimens from 18 patients with pulmonary tuberculosis (TB) and non TB. Fatty acids extracted from cultures were converted to methyl ester then purified by thin-layer chromatography prior to subjecting to the GC/MS analysis. The average turn over time was 10 day, and this is much shorter than ordinary culture method of 4~8 weeks. TSA was detected in three of four specimens from TB patients and in all four from atypical mycobacteriosis patients, already diagnosed, but neither in six from non TB patients nor in four from obsolete pulmonary TB patients. The relative sensitivity and specificity were 87.5% and 100%, respectively. Since only two of above TSA positive specimens were culture (8 wks) positive, the high intrinsic sensitivity of this method is emphasized.

Key words : Pulmonary tuberculosis, Rapid diagnosis, Tuberculostearic acid, Gas chromatography/Mass spectrometry (GC/MS)

キーワード : 肺結核症, 迅速診断, ツベルクロステアリン酸, ガスクロマトグラフィー／質量分析法 (GC/MS)

* From the Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashiku, Fukuoka 812 Japan.

緒 言

肺結核症はその治療法の進歩に比し、診断面では種々の試みはあるにせよ、なお殆どが従前よりの検査法に依存する状態であると考えられる。しかし、日常臨床においては胸部 X-線写真上 1 cm 以下の径の病巣でも鑑別診断の対象となるので、より感度の高い検査法が必要である。一方、呼吸器疾患の変貌に伴い、副腎皮質ホルモン剤や免疫抑制剤使用中の肺結核ないし粟粒結核の合併発症も増加しており、迅速診断の必要性は高まっている。更には、近年その発症頻度を増している高齢者結核の場合、その免疫学的特徴から、胸部 X-線写真、ツベルクリン反応、培養検査のいずれもが典型像を示さない場合も多く¹⁾、従来より感度の高い診断法の確立が強く望まれている。ちなみに昭和 60 年度総会シンポジウムにおいても示されたように、肺癌の診断率が 90% を超えるのにたいして、肺結核症のそれは、喀痰の塗抹・培養検査のみでは 15.8%、気管支鏡検査を加えても 35.3% と、その診断率の低さが目だっている²⁾。この事実は、日常臨床において現在もお治療の診断に頼らざるを得ない症例が少なくないことをよく反映しており、より感度の高い迅速診断法の確立が強く望まれる。

1929 年 Anderson らは結核菌体成分のアセトン可溶分画中より、10-methyloctadecanoic acid を抽出し、tuberculostearic acid (TSA) と命名した³⁾。TSA は 10 位にメチル基を持つ、分子量 298 の C₁₉ 側鎖飽和脂肪酸で、ガスクロマトグラフィーでは C₁₈ 直鎖飽和脂肪酸のステアリン酸の隣に位置し、結核菌体成分中にみられる他の側鎖飽和脂肪酸に比しその分量も多い⁴⁾。TSA は生物活性は乏しいが^{3,5)} その後の研究で結核菌、非定型抗酸菌及びノカルディアに特有な脂肪酸であることが判明している⁶⁾⁻⁸⁾。この点に注目した Larsson

らは 1979 年、肺結核症患者の喀痰の 5 日間短期培養検体中よりこの TSA を検出することがその迅速診断に有用であることを提唱した⁹⁾⁻¹³⁾。今回我々は彼らの方法に準じ、喀痰の短期培養検体より TSA の検出を試みたので報告する。

目 的

喀痰の短期培養検体中より TSA を検出することにより、肺結核症における迅速診断法としての有用性を検討する。

対 象

喀痰の塗抹・培養検査あるいは経気管支肺生検などにより既に確定診断のついている活動性の肺結核症患者 4 例、非定型抗酸菌症患者 4 例と、非結核性呼吸器疾患患者 6 例、並びに臨床的に陳旧性肺結核症と判断された患者 4 例を対象として喀痰を採取した。

方 法

検出手順の概要は Fig.1 に示したように、まず、患者より採取した喀痰約 2 ml を 3 分し、一部は、Ziehl-Neelsen 染色による塗抹検査を、一部は培養検査用として、4% NaOH で処理後 0.1 ml を 3% 小川培地に植え、8 週間まで培養した。残りは TSA 検出用検体として 4% NaOH で処理後、0.1 ml を 3% 小川培地に植え 5~7 日間、同様に培養した。培地に 0.9% NaCl 水溶液 5 ml を加え、洗出回収した検体をオートクレーブにかけ、加熱滅菌 (120°C, 60 分間) 後、凍結乾燥した。

次に検体中の脂質抽出のため、chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 5 ml を加え、振とう (10 秒間) 後一夜室温で静置したのち遠心分離 (4000 rpm 20 min) により固形物を分離し溶液を移し取り溶媒を N₂ ガス流で

Sample (sputa, pleural effusion, etc)

Homogenization with the same volume of 4% NaOH
Inoculation onto slants of Ogawa medium
Incubation at 37°C for 5~7 days
Washing out with 0.9% (Wt/Wt) aqueous NaCl solution
Sterilization with autoclave (120°C, 60 min)
Lyophilization
Extraction of lipids overnight
With 5 ml of chloroform : methanol (2 : 1 Vol/Vol) at room temperature
Centrifugation for 20 min at 4000 rpm
Drying the supernate under a stream of nitrogen

Methanolysis with 1 ml of 3% HCl methanol solution at 80°C for 12 hours
Centrifugation for 20 min at 4000 rpm
Drying the supernate under a stream of nitrogen
Thin-layer chromatography with a solution of n-hexane and diethylether (9 : 1 Vol/Vol)
Scrapping off the band of methylester
Extraction with ethyl acetate
Evaporation
Dissolved with n-hexane
Gas chromatography/mass spectrometry
Tuberculostearic acid

Fig. 1. Procedure of the Present Method

Table 1. Conditions of GC/MS*

GC	Column: glass i. d. 3mm, length 3m chromosorb WAW DMCS with 3.7% OV-17 Injection port temperature: 260 °C Column temperature : 230 °C Separator temperature : 230 °C
MS	Ion current : 300 μ A Ionizing V : 30 eV Ion S. accelerating V : 3 kV

* Instruments: JEOL JMS-DX300 with JMA-3500 DATA SYSTEM

飛ばして乾固させた。残渣に3%塩酸メタノール1 mlを加え、片方を封じたガラス管に移し替えた上でガラス管を熔融密封し、80°C恒温槽で一晩加熱し、脂質のメチルエステル化を行った。室温まで冷却後ガラス管上部を切断し遠心分離(4000 rpm 20 min)して上澄を試験管に取りN₂ガス流で乾固した。管壁に付着したメチルエステル化物をn-hexane 200 μ lに溶解し、シリカゲル薄層(メルク社製, 0.25mm 層10×20cm)上に線状に塗布しn-hexane: diethylether (9:1 v/v)を展開相

として、薄層クロマトグラフィー(TLC)により脂質成分の分離を行った。標品との対応で相当部分を掻き取り、酢酸エチルで抽出後、N₂ガス流で再び乾燥し、n-hexane (50 μ l)溶液としたものをGas-chromatography/Mass spectrometry (GC/MS)の検体とした。

本研究で使用したGC/MSは日本電子製DX300で、使用条件はTable 1に示した。TSAのメチルエステル化物を検出することになるので分子イオンM/z = 312

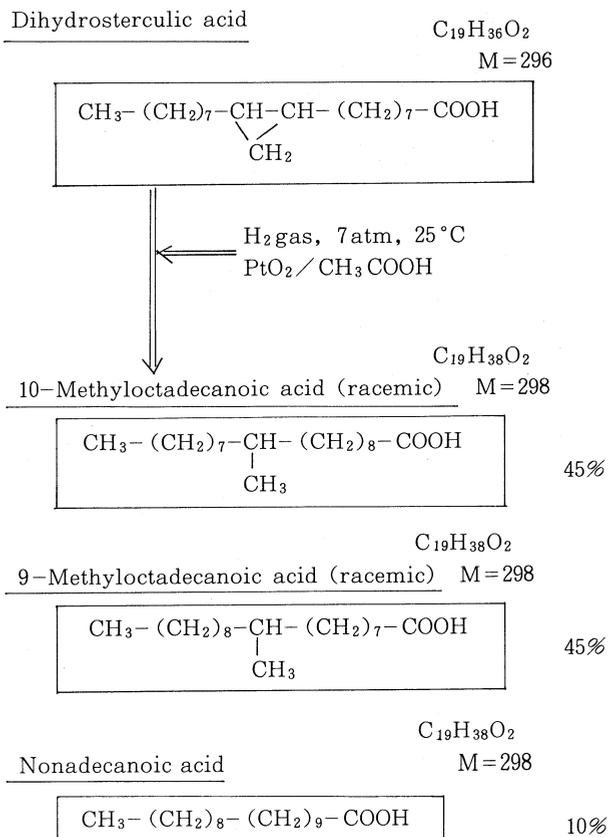


Fig. 2. Synthesis of Standard Compound

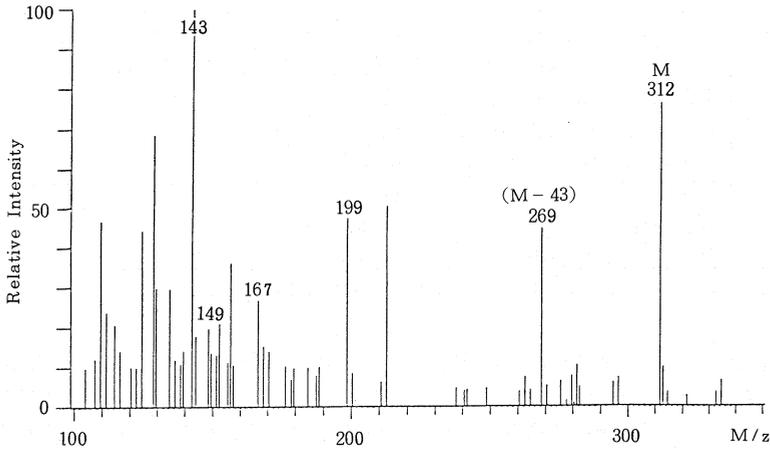


Fig. 3. Mass Spectrum of Standard Compound (TSA methylester). Character M and the number 312 in the figure show the mass number of the molecular ion, and other numbers correspond to those of fragment ions of synthetic TSA methylester shown in the literature.

Table 2. Results of TSA Detection and Other Tests

Patient	Diagnosis*	Smear	Culture		Culture days	TSA
			4 w	8 w		
1	TB	—	—	—	5	+
2	AM	—	—	—	5	+
3	TB	—	—	—	7	+
4	TB	—	—	—	7	+
5	AM	—	—	—	6	+
6	AM	—	++	++	7	+
7	AM	—	+++	+++	7	+
8	TB	+	++	++	5	—

9	CB	—	—	—	5	—
10	BA	—	—	—	5	—
11	BE	—	—	—	5	—
12	CB	—	—	—	5	—
13	PC	—	—	—	5	—
14	BC	—	—	—	5	—

15	OTB	—	—	—	5	—
16	OTB	—	—	—	5	—
17	OTB	—	—	—	5	—
18	OTB	—	—	—	5	—

* TB: Pulmonary tuberculosis, AM: Atypical mycobacteriosis
 CB: Chronic bronchitis, BA: Bronchial asthma,
 BE: Bronchiectasis, PC: Pulmonary cryptococcosis,
 BC: Bronchogenic carcinoma, OTB: old TB.

のマスクロマトグラムを記録し、標品の保持時間との比較から TSA によるピークを同定した。ピークの S/N 比が 2 以下の場合には再度測定を行い、偶発性の大きなノイズによるピークではないことを確認した。標品は国立予防衛生研究所より御提供頂いた dihydrosterculic acid から合成したものをを用いた。標品の合成の概略は Fig.2 に示す。合成された標品は 10-methyloctadecanoic acid¹⁵⁾, 9-methyloctadecanoic acid, nonadecanoic acid (45 : 45 : 10) の混合物であるが、前 2 者は GC/MS でも分離不能であり、そのマススペクトルのパターンから、TSA と同一物が含まれていることを確認している (Fig.3 参照)。

成 績

対象患者の概要並びに TSA 検出結果を Table 2 に示す。活動性群においては肺結核症患者 4 例中 3 例、非定型抗酸菌症患者 4 例中 4 例で TSA を検出した。一方、非結核症群の非結核性呼吸器疾患患者 6 例では全例 TSA は検出されなかった。ちなみに陈旧性肺結核症と臨床的に判定された 4 例についても TSA は全例陰性であった。活動性結核群の TSA 陽性の 7 例はそのすべてが塗抹検査陰性で、うち 5 例は培養検査も陰性であった (感度 87.5%, 特異度 100%)。Fig.4-B には TSA 陽性のクロマトグラムの実例を示すが、分子イオン M/z = 312 をターゲットとしたマスクロマトグラムのピーク

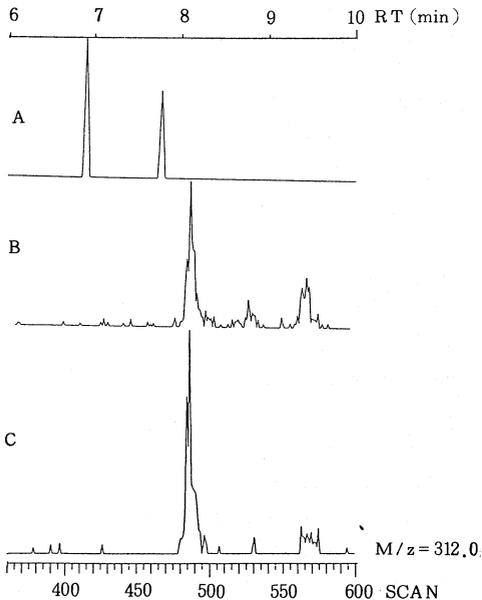


Fig. 4. Mass Chromatogram at M/z=312
A : non-TB, B : TB, C : standard

の中に標品 (Fig.4-C) と同じ保持時間 (8 分 06 秒) で出現しているものが確認される。一方, Fig.4-A に示される TSA 陰性の検体では同時にピークを認めない。以上の本法では、喀痰提出から TSA 確認までの全操作で 10 日を要したのみである。

考 案

TSA は結核菌菌体成分の一つであり、それ自体を検出しようとする本法は、その特異性において意義が大きい。即ち TSA を検出することは結核菌自体を検出することに匹敵する意味を持つ。しかも TSA は単純な構造の側鎖脂肪酸であり、生物活性も乏しいため³⁾⁵⁾, 化学的にも安定な物質で検体処理過程での影響も受けにくく、検体の保存も容易である。これらの特徴を鑑み、本法の有用性に注目して我々はまず Larsson らの方法に準じ、予め多量 (約 $10^5 \sim 10^6$ 個) の結核菌 (H37Rv) を混じた喀痰について TSA のピークがマスクロマトグラム上に明らかに認められることを確かめ、逆に菌を混じないときには TSA が検出されないことを確認した。従来より言われているように、大まかではあるが塗抹検査では $10^4 / \text{ml}$ 以上の菌数が、また培養検査の場合は $10^2 / \text{ml}$ 以上の菌数が必要と思われるが、この菌数と TSA 検出感度との関係について検討してみた。希釈単個菌液培養により生じたコロニー数から濃度を決定した菌分散原液 ($3 \times 10^7 / \text{ml}$) を 10^2 倍, 10^4 倍, 10^6 倍に希釈したもの、及び非結核症患者の喀痰に同様の濃度となるように菌分散液を加えたもの、それぞれ 2 ml について TSA 検査を行った。その結果、菌分散液の場合 2×10^3 喀痰に混入した場合 2×10^3 の菌数でも、S/N 比 4 以上でピークが観測されることを確認した。以上の検討を基に実際の臨床例に応用してみた。

Larsson らが検出を試みた症例がすべて塗抹検査陽性例であったのに対し、我々の症例では、TSA 陽性の 7 例全例が塗抹陰性、更にそのうちの 5 例は培養検査でも陰性であった。この事実は、本法の感度が塗抹、さらには培養検査レベルのそれをも上回っていることを示唆している。なお、本研究中でも塗抹・培養ともに陽性でありながら 5 日間培養では TSA を検出しなかった一例を経験している (更に 2 回 5 日間培養で TSA 検査を繰り返したがすべて陰性、ただし、14 日間培養したものについては TSA を検出した)。この点に関しては前処理、抽出過程の操作の不手際、あるいは採取された喀痰の性状、治療と菌の成長速度との関係などが考慮されるが、症例を重ねて検討する必要がある。

TSA が培養陰性の喀痰短期培養検体からも検出されたという事実は、本法の感度レベルの問題もさることながら、結核菌が 5 ~ 7 日間の短期培養では現実的にはそれほど増菌効果が期待できない点などを考慮すると、

TSA が単に結核菌体に存在するのみでなく、積極的にしろ、消極的にしろ、菌体外へ分泌されている可能性を示唆している。事実、TSA の代謝に関しては、TSA がオレイン酸より積極的に産生されているという報告もあるが¹⁴⁾、その詳細並びに TSA 自体の意味付けについては不明である。ちなみに本法の中で標品合成に使用した dihydrosterculic acid の三員環構造は、結核菌体を形作る特徴的脂肪酸であるミコール酸の構造に類似する点、極めて示唆的で興味深い。

Larsson らが、結核菌体成分中に数種ある側鎖脂肪酸のうち、この TSA (10-methylstearic acid) に注目したのは、その含量が菌体成分の 3% と言われるように¹²⁾、比較的多量に含まれている点と、生物界に普遍的に存在する stearic acid のすぐ隣に位置するピークとして検出されるという分かりやすさにあるのであろう⁴⁾。しかし、TSA に比し、はるかに多量に含まれる stearic acid と隣り合わせの位置関係で存在するという事実は、TLC における両者の分離を困難にし、更に GC-MS における TSA の分離に大きな影響を与えているのも事実であり、臨床検体中の TSA が微量である以上、両者の分離を改善させることは本法における今後の大きな課題でもある。

TSA は Actinomycetales 目の抗酸菌に特有な脂肪酸であって、結核菌のみに特有な脂肪酸ではない。その中で現在臨床問題となり得るのは、結核菌、非定型抗酸菌と *Nocardia* の 3 種であるが、これらはすべて TSA を有しており、本法の選択性については問題をのこす。一方、本研究中で示したように、陳旧性肺結核症 4 例の喀痰中からは全例 TSA を検出し得ていない事実も考え合わせると、活動性の指標としても TSA 検出が有用である可能性を示唆している。

本法は TLC, GC / MS などを使用する点、その検出手順に多少の煩雑さを伴うが、前処理後検出までには 1 ~ 2 日程度しか要しないので、日常臨床において肺結核症が疑われながら既存の検査法では診断確定に至らないような症例に絞って、中枢施設で検出を行うようにすれば、日常臨床レベルでの応用も十分可能と思われる。我々は胸水検体から短期培養を経ず直接検出を試みた結果、検出が可能であったことに力を得、現在喀痰についても検体からの直接検出を検討中であり、これにより更に迅速化が期待される。

ま と め

1. 呼吸器疾患患者 18 例より得た喀痰について、Larsson らの方法に準じ、喀痰の 5 ~ 7 日間短期培養検体から GC/MS によって TSA の検出を試みた。
2. 既に診断の確定している肺結核症患者 4 例中 3 例、

非定型抗酸菌症患者 4 例中 4 例で TSA を検出し、非結核性呼吸器疾患患者 6 例では全例において TSA を検出しなかった。また、臨床的に陳旧性肺結核症と判定された 4 例については全例 TSA を検出しなかった。

3. TSA 陽性 7 例は全例塗抹検査陰性で、そのうちの 5 例は培養検査も陰性であった。
4. 以上より本法は活動性の肺結核症並びに非定型抗酸菌症の診断に極めて有用であり、培養検査よりも感度が優れていると思わせる結果であった。

最後に、ご指導いただいた大阪市立大学医学部の矢野郁也先生及び標品の原料を御提供頂いた国立予防衛生研究所の赤松穰先生に感謝いたします。

文 献

- 1) 宮崎信義他：老人結核の臨床病理学的並びに臨床免疫学的検討，結核，58：427，1983。
- 2) 荒井太郎他：肺野孤立陰影の鑑別診断—主として肺結核診断の立場から—，結核，61：28，1986。
- 3) Anderson, R. J. et al. : The chemistry of the lipids of tubercle bacilli. VI. Concerning tuberculostearic acid and phthioic acid from the acetone-soluble fat, J Biol Chem, 85 : 77, 1929.
- 4) Tisdall, P. A. et al. : Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography alone, J Clin Microbiol, 10 : 506, 1979.
- 5) Spielman, M. A. : The chemistry of the lipids of tubercle bacilli. XXXIX. The constitution of tuberculostearic acid, J Biol Chem, 106 : 87, 1934.
- 6) Farshtchi, D. et al. : Effect of substrate on fatty acid production in *Nocardia asteroides*, Can J Microbiol, 16 : 213, 1970.
- 7) Thoen, C. O. et al. : Fatty acids of *Mycobacterium kansasii*, Appl Microbiol, 21 : 628, 1971.
- 8) Thoen, C. O. et al. : Comparison by gas-liquid chromatography of the fatty acids of *Mycobacterium avium* and some other non-photochromogenic mycobacteria, Appl Microbiol, 22 : 560, 1971.
- 9) Odham, G. et al. : Demonstration of tuberculostearic acid in sputum from patients with pulmonary tuberculosis by selected ion monitoring, J Clin Invest, 63 : 813, 1979.

- 10) Larsson, L. et al. : Detection of tuberculostearic acid in mycobacteria and nocardia by gas chromatography and mass spectrometry using selected ion monitoring, *J Chromatogr*, 163 : 221, 1979.
- 11) Larsson, L. et al. : Detection of tuberculostearic acid in biological specimens by means of glass capillary gas chromatography electron and chemical ionization mass spectrometry, utilizing selected ion monitoring, *J Chromatogr*, 182 : 402, 1980.
- 12) Larsson, L. et al. : Use of selected ion monitoring for detection of tuberculostearic acid and C₃₂ mycocerosic acid in mycobacteria and in five-day-old cultures of sputum specimens from patients with pulmonary tuberculosis, *Acta Path Microbiol Scand Sect B*, 89 : 245, 1981.
- 13) Mardh, P. A. et al. : Tuberculostearic acid as a diagnostic marker in tuberculous meningitis, *Lancet*, February 12, 367, 1983.
- 14) Lennarz, W. J. et al. : The biosynthesis of oleic and 10-methylstearic acids in *Mycobacterium phlei*, *J Biol Chem*, 237 : 664, 1962.
- 15) Prout, F. S. et al. : Branched-chain fatty acids. V. The synthesis of optically active 10-methyloctadecanoic acids, *J Am Chem Soc*, 70 : 298, 1948.