《原 著》

慢性肝障害における尿中酸性ムコ多糖体異常に関する研究*

椋 田 知 行**

第1章 結 論

酸性ムコ多糖体 (AMPS) は結合組織の構成成分で結合組織の変化をきたす疾患では病変局所の AMPS に異常が認められ¹⁻³⁾, 同時に血中⁴⁻⁶⁾および尿中 AMPS の異常をきたすことも明らかにされた⁷⁻⁹⁾. 慢性肝障害による AMPS 異常に関しては, まず Balasubramanyan¹⁰⁾ は実験的肝硬変動物の肝臓における AMPS の質的变化を組織化学的方法により指摘して以来多くの研究が行われ, 肝障害に伴う肝臓 AMPS の変化については多くの知見がえられている. 一方, 肝臓 AMPS の異常と同時に尿中 AMPS の著増することが, 和田¹¹⁾ および満谷¹²⁾, Caster¹³⁾ らにより明らかにされ, かような AMPS の変化は単に増加するのみではなく質的变化をも伴うことが認められた. このような結合組織病変に伴う尿中 AMPS 異常は病変局所 AMPS 異常に基因すると推測されてきたが, 尿中 AMPS 異常と病変局所 AMPS 異常との関連についての検討は, まだまったく行われておらず, また結合組織病変に伴う尿中 AMPS の質的異常についてもさらに詳細な検索が必要と思われる. そこで私は肝硬変の尿中 AMPS 異常の詳細を明らかにするとともに, 肝障害における病変局所 AMPS と尿中 AMPS 異常との関連を明らかにするため検討した.

第2章 実験材料ならびに実験方法

1) 実験に供した健常人および肝疾患患者の大部分は40~50才代の男子より選び, 肝疾患患者は当科入院患者で, 臨床症状, 肝機能検査ならびに腹腔鏡検査および肝生検により診断を確定した. なお腎疾患あるいは糖尿病を伴う患者は実験対象より除外した.

2) 実験動物には体重200g前後の市販 Wistar 系雄性ラットを使用, 市販固型食により飼育し, 四塩化炭素

慢性肝障害には Morrione 法¹⁴⁾ に従い四塩化炭素1回10分, 2回連続吸入を週2回ずつ3ヵ月行った.

3) 患者24時間尿は少量のトルエンを添加した着色瓶に蓄尿せしめ, その一部または全部を実験に用いた. ラッテは4匹を1群として尿採取用飼育籠中で24時間尿を少量のトルエンを加えた褐色瓶中に採取した.

4-i) 尿中総 AMPS 測定は DiFerrante 法¹⁵⁾ に準じて24時間尿の一部40mlをpH5.0に調整後2.5% cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CETAB) を2ml加え, 2°Cで24時間放置後遠沈, 沈渣をNaCl飽和95%エタノールで3回洗浄後一定量の蒸留水に溶解し Carbazol 法¹⁶⁾ でグルクロン酸量を測定し, その値を総 AMPS 量として示した.

ii) 尿中遊離型およびタンパク結合型 AMPS の分含量は Stidworthy 法¹⁷⁾ に準じて行った. すなわち24時間尿の一定量 (通常は1000ml) をpH7.0に調整し2時間2°Cに放置後遠沈し, 上清をpH5.0に調整し, その1,000mlに6gの割合にCETABを加え攪拌後2°Cで4~6日間放置し, 遠沈後沈渣をNaCl飽和95%エタノールで数回洗浄後少量の蒸留水に溶解, エタノールを66%となるように加え4°C24時間放置し, 絮状沈殿物を遠沈し, 上清はさらにエタノールを84%となるよう加え4°C24時間放置して絮状沈殿物を作り遠沈, 66%および84%エタノール沈殿物を乾燥後一定量の蒸留水に溶解し, グルクロン酸量を測定¹²⁾し, それぞれ遊離型およびタンパク結合型 AMPS 量とした.

iii) 尿中 AMPS の分別定量は Schiller 法¹⁸⁾ に従い nonsulfated および sulfated AMPS に分別定量した. すなわち24時間尿の一部40mlをvisking cellophane tubing を用い, 24時間流水中で透析し, さらに48時間蒸留水中で透析後, 非透析性物質を遠沈管にとり0.4M NaClを含む1% cethyl-pyridinium chloride (CPC) 溶液を1/10容加え攪拌しつつ37°Cで1時間 incubate し, heavy celite 約200mgを加えて攪拌後2,700rpmで30分間遠沈, 沈渣は0.03M NaClを含む0.1% CPC 溶液約10mlで洗浄後遠沈し, 上清を捨て遠沈管を

* 要旨は第52回日本消化器病学会総会 (東京), 第11回東京生化学会シンポジウム, 第3回日本肝臓病学会総会 (京都) にて発表.

** T. Mukuda: 大阪大学第1内科 (指導: 阿部裕教授).

15 分間倒立した後、0.4 M NaCl を含む 0.1 % CPC 溶液の 10 ml を加え室温でときどき攪拌しながら 30 分間放置後 2,700 rpm で 30 分間遠沈、その上清分画を non-sulfated AMPS とし、沈渣に 0.4 M NaCl を含む 0.1 % CPC 溶液の約 10 ml を加え洗滌遠沈後上清を捨て遠沈管を約 15 分間倒立後 2.1 M NaCl を 10 ml 加えときどき攪拌しながら室温で 30 分間放置し、2700 rpm で 30 分間遠沈、上清分画を sulfated AMPS とし、各分画の一定量を取り、グルクロン酸量を測定¹⁶⁾し、その値をそれぞれ non-sulfated および sulfated AMPS 量とした。

iv) 尿中遊離型 AMPS およびタンパク結合型 AMPS の各分画についてさらに Schiller 法¹⁸⁾に従って non-sulfated および sulfated AMPS に分画定量した。

5) 尿中 AMPS の精製は DiFerrante 法¹⁹⁾に準じて行った。すなわち尿 1 l を用い pH 5.0 に調整後 10 % CETAB 10 ml を加え 2°C で 2 日間放置し、遠沈、沈渣を NaCl 飽和 95 % エタノールで 5~6 回洗滌後蒸留水に溶解透析し粗製 AMPS をえた。さらにこれを 0.1 N NaOH で弱アルカリ性として 24 時間 4°C に放置後 pH 8.0 に調整し pronase 約 10 mg を加え、37°C 24 時間 incubate してタンパクを分解し、100 % (w/v) トリクロール酢酸 1/10 容を加え、一晚 4°C で放置後遠沈除タンパクし、さらに透析し非透析性成分を乾燥し精製 AMPS をえた。

6) 精製 AMPS のカラムクロマトグラフィーは Schmitt 法²⁰⁾に準じ、DEAE-Sephadex を用いて行った。すなわち直径 2 cm、長さ 30 cm のクロマト管に Sephadex A-25 を 20 cm つめ、使用前 0.5 M HCl、脱イオン水、0.5 M NaOH、脱イオン水の順で数回繰返し洗滌後 0.5 M HCl で中和しさらに脱イオン水で洗滌後脱イオン水に溶解した精製 AMPS をクロマト管に加え、その後 0.1 M NaCl に遊離した AMPS を NaCl の濃度に従って stepwise elution により抽出した。すなわち、0.5 M NaCl、1.25 M NaCl 加 0.01 M HCl 1.5 M NaCl 加 0.01 M HCl および 2 M NaCl 加 0.01 M HCl と、stepwise に NaCl 濃度を増加し、各 5 ml ずつを用いて抽出し、各抽出液のグルクロン酸量を測定¹⁶⁾しその値を各分画の AMPS 量とした。

7) ヘキサミン定量はカラムクロマトグラフィーにより分画した各分画の一定量を流水透析し、次いで脱イオン水で 48 時間透析後、2 N HCl 中で 100°C 5 時間加水分解を行い、乾燥後、0.2 M citrate buffer (pH

2.2) 1.2 ml に溶解し、その 1.0 ml をとりアミノ酸自動分析装置 (Yanagimoto LC-2 type) で glucosamine および galactosamine 量を測定した。

8) ヒアルロニダーゼ分解はクロマトグラフィーにより分離した各分画より一定量を取り、流水中で一晚、次いで脱イオン水で 48 時間透析後、Mathews 法²¹⁾に準じて bovine testicular hyaluronidase (360 USP 単位/mg, シグマ社) を用いて 16 時間 37°C で incubate 後非分解 AMPS 量のグルクロン酸量を測定¹⁶⁾した。

9) 肉芽腫は 1/15 M phosphate buffer (pH 7.4) に japanese agar を 3 % の割合に湯煎中で加温溶解し、37°C に冷却後、健常および四塩化炭素障害ラットの背部皮下に約 2 ml を注射することにより作った。

10) 肝および肉芽腫結合組織成分の測定は摘出した全肝臓あるいは全肉芽腫約 3 g にアセトン 30 ml を加え、ワーリングブレンダーでホモジナイズし 4°C で 24 時間放置後遠沈、沈渣にエチルエーテル 30 ml を加えホモジナイズし 24 時間放置後遠沈上清除去し、乾燥させ脱脂乾燥肉芽腫および肝臓末を作製し、これを用いて次の測定を行った。

i) 総ハイドロオキシプロリン：肝臓末 20 mg、肉芽腫末 10 mg に 6 N HCl 2 ml を加え、105°C で 24 時間加水分解し、試料全量を目盛つき試験管にとり、フェノールフタレインを指示薬として 6 N NaOH で中和後、脱イオン水を加え全量を 10 ml になるよう希釈し、次いでノイリット A を加えて塩基性アミノ酸を除去後 Stegmann 法²²⁾により測定した。

ii) 肉芽腫および肝臓性ムコ多糖体：AMPS 量の測定は Schiller 法¹⁸⁾に準じて行った。脱脂乾燥末 100 mg に 0.1 N NaOH 10 ml を加え、24 時間 4°C に放置後、0.1 N HCl で pH 8.0~8.2 に調整し、pronase 10 mg を加え、37°C 24 時間 (肉芽腫の場合は 48 時間) incubate した。次いで 100 % (w/v) トリクロール酢酸 1/10 容を加え、4°C で一晚放置し遠沈除タンパクし、Schiller 法¹⁸⁾に従って non-sulfated および sulfated AMPS に分画し、carbazol 法¹⁶⁾により各分画のグルクロン酸量を測定し AMPS 量とした。

第3章 実験成績

第1節 慢性肝障害における尿中 AMPS

1) 健常人および諸種肝疾患患者の尿中 AMPS 排泄量

対照として選んだ健常人 14 例の 24 時間尿中 AMPS

排泄量は 6.1 ± 1.8 mg であった。肝疾患患者では慢性肝炎 15 例平均 9.7 ± 2.2 mg, 肝硬変症 10 例平均 10.5 ± 3.3 mg, 末期肝硬変症 8 例平均 5.8 ± 2.2 mg であった。すなわち慢性肝炎では活動性の症例で著増したものが多く、肝硬変症では一般に増加したが、とくに急速に増悪した症例では著増し、末期肝硬変症例では正常値に近づく傾向を示した (表 1)。

表 1. AMPS in urine

	Number of cases	Mean value $\pm$ SD*	P-Value
Healthy	14	6.1 ± 1.8	
Chronic hepatitis	15	9.7 ± 2.2	$P < 0.01$
Cirrhosis	10	10.5 ± 3.3	$P < 0.01$
Terminal cirrhosis	8	5.8 ± 2.2	

* mg of uronic acid per day

2) 健常人および諸種肝疾患患者の尿中遊離型およびタンパク結合型 AMPS 排泄量

尿中遊離型および結合型 AMPS 排泄量は表 2 に示したように諸種肝疾患患者では遊離型 AMPS は増加し、タンパク結合型 AMPS 排泄量は明らかな変化を示さな

表 2. Free & protein-bound AMPS in urine

	Number of cases	Free AMPS Amount* P-value	Protein-bound* AMPS
Healthy	22	2.1 ± 0.7	1.0 ± 0.3
Chronic Hepatitis	4	5.7 ± 0.8 $P < 0.01$	1.8 ± 0.9
Cirrhosis	9	5.5 ± 0.9 $P < 0.01$	1.3 ± 0.5
Terminal cirrhosis	5	3.5 ± 0.1	1.4 ± 0.6

* mg of uronic acid per day

かった。健常人 22 例の遊離型 AMPS の総 AMPS に対する百分率をみると平均 59.9 %で、慢性肝炎 4 例平均 71.1 %, 肝硬変症 9 例平均 77.5 %, 末期肝硬変症 5 例平均 68.7 %で末期肝硬変症をのぞき慢性肝障害患

表 3. Per cent of free AMPS in urine

	Number of cases	Mean Value*
Healthy	22	59.5
Chronic hepatitis	4	71.1
Cirrhosis	9	77.5
Terminal cirrhosis	5	68.7

* amount of free AMPS/amount of total AMPS $\times$ 100

者ではこの比は著明に増加した (表 3)。さらに各分画を non-sulfated および sulfated AMPS に分画定量すると、健常人 5 例の遊離型 AMPS 分画の non-sulfated AMPS の占める割合は 17.7 %で、肝疾患患者では慢性肝炎 3 例 41.9 %, 肝硬変症 5 例 35.1 %, 末期肝硬変症 4 例 17.6 %を示しこの比率は慢性肝炎および肝硬変症では著増し、末期肝硬変では健常値に近くなった。これに反しタンパク結合型 AMPS 分画の non-sulfated および sulfated AMPS の占める割合は健常人と肝疾患群とのあいだに明らかな差異を認めなかった (表 4)。

3) 健常人および諸種肝疾患患者の尿中 non-sulfated および sulfated AMPS 排泄量

健常人 14 例の 24 時間尿中 non-sulfated AMPS 排泄量は平均 1.4 ± 0.5 mg, sulfated AMPS 量は平均 4.7 ± 1.3 mg であった。肝疾患患者では non-sulfated AMPS 量は慢性肝炎 15 例平均 2.2 ± 0.3 mg, 肝硬変症 10 例平均 2.9 ± 1.1 mg, 末期肝硬変症 8 例平均 1.3 ± 0.6 mg で、尿中 sulfated AMPS 量は慢性肝炎 15 例平均 7.5 ± 1.8 mg, 肝硬変症 10 例平均 7.6 ± 2.2 mg, 末期肝硬変症 8 例平均 4.5 ± 1.6 mg で non-sulfated および sulfated AMPS とともに肝硬変症で増加し、とくに non-sulfated AMPS の増加が著明であった。また non-sulfated AMPS/sulfated AMPS 比は肝硬変症では健常人に比してやや高値で慢性肝炎では不変であった (表 5)。

表 4. Composition of free & protein-bound AMPS in urine

	Free AMPS				Protein-bound AMPS			
	Non-sulfated		Sulfated		Non-sulfated		Sulfated	
	amount*	%	amount*	%	amount*	%	amount*	%
Healthy	0.54 ± 0.04	17.7	2.56 ± 0.41	82.3	0.37 ± 0.09	31.6	0.78 ± 0.12	68.4
Chronic hepatitis	2.23 ± 0.17	41.9	3.05 ± 0.98	58.2	0.89 ± 0.08	39.9	1.29 ± 0.12	60.1
Cirrhosis	2.18 ± 0.47	35.1	4.05 ± 0.58	64.9	0.06 ± 0.09	35.8	1.17 ± 0.60	64.2
Terminal cirrhosis	0.63 ± 0.13	17.6	2.91 ± 0.31	82.4	0.59 ± 0.07	27.5	1.77 ± 0.39	72.5

* mg of uronic acid per day

表 5. Sulfated & non-sulfated AMPS in urine

	Number of cases	Total *	Non-sulfated *	sulfated *	N/S ratio**
Healthy	14	6.1±1.8	1.4±0.5	4.7±1.3	0.30
Chronic hepatitis	15	9.7±2.2	2.2±0.3	7.5±1.8	0.29
Cirrhosis	10	10.5±3.3	2.9±1.1	7.6±2.2	0.38
Terminal cirrhosis	8	5.8±2.2	1.3±0.6	4.5±1.6	0.28

* mg of uronic acid per day

** ratio of non-sulfated AMPS to sulfated AMPS

4) 実験的肝障害ラットの尿中 AMPS 排泄量

健常ラットの24時間尿中 AMPS 排泄量は平均 44.5 ± 6.9 μ g で、そのうち non-sulfated AMPS 量は 26.3 ± 8.7 μ g, sulfated AMPS 量は 18.2 ± 5.2 μ g であったが、四塩化炭素による慢性障害ラットでは総排泄量は 71.3 ± 2.6 μ g で、non-sulfated AMPS 量は 47.3 ± 1.9 μ g, sulfated AMPS 量は 24.0 ± 3.3 μ g で障害群ではともに増加したが、前者の増加が著明で、したがって non-sulfated AMPS/sulfated AMPS 比も肝障害群では上昇した(表6)。

5) 健常人および肝硬変症患者より分離した尿中精製 AMPS の検討

i) カラムクロマトグラフィー: 精製した尿中 AMPS を DEAE-Sephadex column クロマトグラフィーにより分離すれば、肝硬変症では健常人に比して第1分画の著増を認め、他の分画では明らかな差は認めなかった

(表7)。

ii) 尿中精製 AMPS 構成成分: カラムクロマトグラフィーによりえた各分画 AMPS につき、グルクロン酸およびヘキサミン量を測定、さらにヘキサミンをグルコサミンおよびガラクトサミンに分別し、またヒアルロニダーゼ感受性を測定、健常人および肝疾患患者について比較検討した。

a) グルコサミン/ガラクトサミン比: 各分画のヘキサミン中のグルコサミン/ガラクトサミン比は、健常人では第1分画 7.34 ± 0.68, 第2分画 0.44 ± 0.01, 第3分画 0.10 ± 0.01, 第4分画 13.85 ± 1.19 で、肝硬変症では第1分画 7.45 ± 0.69, 第2分画 0.44 ± 0.01, 第3分画 0.08 ± 0.01, 第4分画 23.39 ± 1.94 となり健常人と肝硬変症との間に明らかな差は認めなかった。

b) ヒアルロニダーゼ感受性: 各分画のヒアルロニダーゼ感受性は、健常人では第1分画 88.8 ± 0.4 %, 第2分画 67.3 ± 3.3 %, 第3分画 38.4 ± 0.6 %, 第4分画 13.2 ± 5.1 % で肝硬変症では第1分画 89.2 ± 0.1 %, 第2分画 69.1 ± 0.1 %, 第3分画 38.3 ± 0.1 %, 第4分画 9.6 ± 0.1 % となり健常例の成績と明らかな差異を認めなかった(表8)。

第2節 尿中 AMPS と病変局所 AMPS 異常との関連

1) 実験的肝障害ラットの肝 AMPS 量

健常ラット肝臓総 AMPS 量は平均 174 ± 20 μ g/g dry defatted liver で、四塩化炭素肝障害ラットでは、障害3ヵ月目で 370 ± 69 μ g/g dry defatted liver と著増し

表 6. Acid mucopolysaccharide in urine of healthy & CCl₄ damaged rat

	Number of animals	Total**	Non-sulfated**	Sulfated**	N/S ratio***
Healthy	12	44.5 ± 6.9	26.3 ± 8.7	18.2 ± 5.2	1.45
CCl ₄ damage*	7	71.3 ± 2.6	47.3 ± 1.9	24.0 ± 3.3	1.97

* chronic hepatic damage was induced by serial inhalation of CCl₄ for 10 weeks** μ g of uronic acid per day

*** ratio of non-sulfated AMPS to sulfated AMPS

表 7. Fraction of mucopolysaccharide in urine on DEAE-Sephadex column chromatography

	I		II		III		IV	
	Amount*	%**	Amount*	%**	Amount*	%**	Amount*	%**
Healthy	1.27 ± 0.08	18.9 ± 0.09	3.02 ± 0.25	43.1 ± 2.7	1.67 ± 0.24	28.6 ± 4.6	0.79 ± 0.19	14.4 ± 5.6
Cirrhosis	2.69 ± 0.41	23.4 ± 0.52	4.99 ± 0.68	41.5 ± 0.8	2.71 ± 0.47	22.9 ± 0.9	1.41 ± 0.29	14.1 ± 0.3

* mg of uronic acid per day

** per cent amount of each fraction to total amount of AMPS

表 8. Composition of hexosamine in acid mucopolysaccharides and sensitivity to testicular hyaluronidase in chromatographic fraction of urine

Chromatographic fraction	Glucosamine		Galactosamine		Glu/Gala	Hyaluronidase sensitive AMPS	
	Amount	%	Amount	%		Amount	%
I Healthy	1.12±0.05	88.0	0.15±0.02	12.0	7.34	1.13±0.08	88.8
	2.36±0.32	87.6	0.33±0.02	12.4	7.45	2.39±0.31	89.2
II Healthy	0.98±0.14	30.9	2.09±0.39	69.1	0.44	2.04±0.48	67.3
	1.52±0.19	30.5	3.47±0.47	69.5	0.44	3.44±0.44	69.1
III Healthy	0.16±0.03	9.6	1.52±0.22	90.4	0.10	0.64±0.09	38.4
	0.22±0.03	7.9	2.45±0.43	92.1	0.08	1.06±0.21	38.3
IV Healthy	0.74±0.18	93.2	0.06±0.01	6.8	13.85	0.11±0.04	13.2
	1.36±0.27	96.0	0.05±0.01	4.0	23.39	0.13±0.03	9.6

表 9. Acid mucopolysaccharide and hydroxyproline in rat liver with CCl₄ damage

	Number of animals	Total*	Non-sulfated*	Sulfated*	N/S ratio**	Hydroxyproline***
Healthy	11	174±20	94±13	80±12	1.18	0.92±0.03
CCl ₄ damage****	7	370±69	77±30	293±54	0.29	1.21±0.05

* μ g of uronic acid per g of dry defatted liver

** ratio of nonsulfated acid mucopolysaccharides to sulfated acid mucopolysaccharides

*** μ g of hydroxyproline per mg of dry defatted liver**** chronic hepatic damage was caused by serial inhalation of CCl₄ for 10 weeks

た。これを non-sulfated および sulfated AMPS に分別定量すると障害肝では non-sulfated AMPS は明らかな変化を認めず、sulfated AMPS は著増し、したがって non-sulfated AMPS/sulfated AMPS 比は障害肝では著減した (表 9)。

先述のように肝障害ラットでは尿中総 AMPS 量は著増し、また分画測定の結果 non-sulfated AMPS が著増し、sulfated AMPS 量の変化は著明でなかった。かように肝 AMPS と尿中 AMPS 異常とのあいだには質的な一致がみられなかった (表 6)。

2) 健常および実験的肝障害ラットの肉芽腫 AMPS 量

健常ラットの実験的寒天肉芽腫組織中の総 AMPS 量

は 7 日目 147.9±12.8 μ g, 14 日目 195.0±20.2 μ g, 21 日目 189.7±15.8 μ g であった。また四塩化炭素肝障害ラットの肉芽腫でも総 AMPS 量は 7 日目 129.0±9.8 μ g, 14 日目 147.0±6.3 μ g と漸増し、21 日目 135.5±6.1 μ g で、肝障害ラット肉芽腫の総 AMPS 量の増加の程度は健常ラット肉芽腫に比し軽度であった。次に non-sulfated および sulfated AMPS に分別定量すると non-sulfated AMPS の増加は明らかでなく sulfated AMPS は著増し、かような成績は健常および肝障害ラットともに同様の傾向であった (表 10, 11)。

3) 実験的寒天肉芽腫ラットの尿中 AMPS 排泄量
健常肉芽腫ラットの尿中総 AMPS 量は肉芽腫の増大に伴って次第に増加し、ことに肉芽腫増生の盛んな時

表 10. Acid mucopolysaccharides in granuloma (healthy rat)

Days after implantation	Number of animals	Total*	Non-sulfated*	Sulfated*	N/S ratio**
7	4	147.9±12.8	63.2±4.8	84.7±8.9	0.74
14	4	195.0±20.2	68.8±6.1	126.2±15.2	0.55
21	4	189.7±15.8	69.1±3.3	120.6±14.7	0.58

* g of uronic acid per 100 mg of dry defatted tissue

** ratio of non-sulfated AMPS to sulfated AMPS

表 11. Acid mucopolysaccharides in granuloma (CCl₄ damaged rat)

Days after implantation	Number of animals	Total*	Non-sulfated*	Sulfated*	N/S ratio**
7	4	129.0±9.8	54.2±2.7	74.9±7.5	0.73
14	4	147.0±6.3	48.0±6.2	99.0±0.3	0.49
21	4	135.5±6.1	48.9±4.9	86.6±2.7	0.57

* μg of uronic acid per 100mg of dry defatted tissue

** ratio of non-sulfated AMPS to sulfated AMPS

期に著増した。これを各分画についてみると両分画ともに増加したが、ことに sulfated AMPS 量の増加は軽度で non-sulfated AMPS は著増した。肝障害ラッテ肉芽腫を移植すると尿中 AMPS は総 AMPS 量、non-sulfated および sulfated AMPS 量ともに肉芽腫による影響は明らかではなかった。これを増加率で示すと、図 1, 2 のごとくである。

図 1. Increasing ratio of AMPS in urine (healthy with granuloma)

図 2. Increasing ratio of AMPS in urine (chronic hepatic damage granuloma)

第4章 総括ならびに考案

人の尿中に AMPS が存在することは Mörner²³⁾ が初めて明かし、これはコンドロイチン硫酸であるとのべ、その後 Astrup²⁴⁾ は塩酸トリジン法により尿中から AMPS を分離し、Kerby²⁵⁾ はペーパークロマトグラ

フィー法により尿中 AMPS はコンドロイチン硫酸であろうとのべ、さらに DiFerrante¹⁹⁾ は cetyl-trimethyl-ammonium bromide を用い尿中 AMPS を分離し、これがコンドロイチン硫酸様物質であることを明らかにした。また DiFerrante¹⁹⁾ および Rich²⁶⁾ は精製 AMPS を赤外線分光分析および率丸ヒアルロニダーゼに対する感受性によりコンドロイチン硫酸 A か C であるとした。Kerby²⁵⁾ も尿中より AMPS を分離しペーパークロマトグラフィー法および率丸ヒアルロニダーゼに対する感受性より分離しコンドロイチン硫酸 B と考えた。

一般に結合組織病変、たとえば組織損傷¹⁾、動脈硬化症²⁷⁻²⁹⁾ および膠原病^{30,31)} 等ではいずれも病変局所の結合組織質 AMPS の変化がみられる。また慢性肝障害では肝臓の間質結合組織が増殖しこれに伴って肝臓の AMPS が増加することもすでに指摘されている。すなわち Balasubramanyan¹⁰⁾、Lupu³²⁾、Singer^{33,34)} および高橋³⁵⁾ らは組織化学的方法により AMPS の増加ならびに質的異常を、また Galambos³⁶⁾ は肝硬変患者の肝 AMPS を生化学的および組織化学的方法によりまた志水³⁷⁾ および平山³⁸⁾ は四塩化炭素あるいはチオアセトアミドによる肝線維化過程で肝臓のハイドロキシプロリン量の増加に先行してヘキサミンが増加し、これは主としてガラクトサミンであるとし、さらに鹿谷³⁹⁾ および Popper^{33,34)} も実験的肝硬変および肝癌において同様の成績を示した。一方尿中 AMPS の異常については和田¹¹⁾ は肝疾患とくに活動性慢性肝炎および初期肝硬変患者尿 AMPS 排泄量は健康人に比して増加し、末期肝硬変症患者では減少するものが多いとし、満谷¹²⁾ も慢性肝炎および肝硬変患者ならびに四塩化炭素およびチオアセトアミドによる実験的肝障害ラッテ尿中 AMPS 量を測定し同様の成績をえ、また肝疾患患者では尿中 AMPS の透析性成分が増加することを明らかにした。

尿中 AMPS の分画法については最近 Stidworthy¹⁷⁾ は CETAB を用い健康人尿中より AMPS を分離し、66% アルコール不溶性分画と 66% アルコール溶解性

で 84 %, アルコール不溶解性分画に分離し, 第 1 分画は 90 % 以上が AMPS でウロン酸とヘキサミンがほぼ同じ割合に含まれた遊離型 AMPS で, 第 2 分画は AMPS とタンパクとの結合体で約 87 % のタンパクが含まれ, 第 2 分画を proteolytic enzyme により消化すると, 約 26 % のタンパクを含む非透析性 AMPS となることを明らかにした。私は肝疾患患者では尿中遊離型 AMPS の全 AMPS に対する比率が増加し, ことに慢性肝炎および肝硬変症の活動期では, その増加が著明で, 末期肝硬変症では総 AMPS 排泄量は健常人とほとんど差はなく, 遊離型 AMPS のみ著増することを明らかにした。

諸疾患時の尿中 AMPS の質的異常については, Hurler 症候群^{9,40-42}, Morquio-Ullrich 症候群⁴³⁻⁴⁶, heritable multiple exostoses⁴⁵, hereditary osteoarthritis-onychodysplasia⁴⁷, chronic polyarthritis⁴⁸ および悪性腫瘍患者⁴⁹ 尿中 AMPS の質的異常についての研究がある。また肝疾患患者においては, 満谷¹²が健常人および肝硬変患者の尿中 AMPS を分離精製しペーパークロマトグラフィーおよび赤外線分光分析によりコンドロイチン硫酸 A および C に類似する物質をえ, 赤外線分光分析で健常人および肝硬変症患者尿中 AMPS とのあいだに差異を認め, また精製 AMPS について構成成分であるグルクロン酸, ヘキサミンおよび S の分子比を検討し, 慢性肝障害患者尿中 AMPS のグルクロン酸/ヘキサミン分子比には差のあることを報告した。私はさらに詳細に質的異常について検討し, 健常人および肝硬変症患者尿中 AMPS を non-sulfated および sulfated AMPS に分離し, 肝疾患患者では尿中 non-sulfated および sulfated AMPS ともに増加するが, 初期肝硬変症患者では non-sulfated AMPS の増加が著明で, 遊離型 AMPS 中の non-sulfated AMPS は増加するが, タンパク結合型 AMPS 中の non-sulfated AMPS は増加しないことを明らかにした。したがって肝硬変症患者尿中では遊離型で, しかも non-sulfated AMPS の増加が著しいと考えられる。さらに DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーにより尿中精製 AMPS を 4 分画し, 各分画をさらに AMPS の構成成分であるグルクロン酸, ヘキサミン, グルコサミンの測定およびガラクトサミン分別定量を行い, またヒアルロニダーゼ感受性により分析したところ, 肝硬変症患者尿ではヒアルロン酸の分画の著増を認め, これはヒアルロニダーゼにより 89 % 分解されたのでヒアルロン酸と考えられる。また第 2, 3 分画

も軽度が増加したが, 人の尿中にはヘパリン硫酸はほとんど含まれていないことが知られているので⁴⁹, これはコンドロイチン硫酸 A, B および C と考えられる。なお本法による各分画についてヘキサミンの分別ならびにヒアルロニダーゼによる感受性により検討したが, 健常人および慢性肝障害患者尿の各分画は同様の成績を示した。

尿中 AMPS 異常は病変局所 AMPS 異常に基因すると思われるがいまだ両者の関連をみた報告はない。私のえた成績でもみられるように肝線維化に伴ない肝臓の AMPS 量が増加し, 同時に尿中 AMPS 量も増加したが肝臓と尿中 AMPS は質的には一致しなかった。さらに寒天肉芽腫を用い肉芽腫 AMPS と尿中 AMPS の関連をみた。肉芽腫 AMPS については Curran⁵⁰, Bollet⁵¹ および Lovell⁵² により実験的肉芽腫の AMPS 変化について検討が行われたが, これらの研究では肉芽腫 AMPS の総量の増加とともに Lovell⁵² は肉芽腫の増殖初期はヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸 A がその後コンドロイチン硫酸 C および B が増加し, 次第にコンドロイチン硫酸 B の占める割合が増加することを認めたが, 尿中 AMPS との関連についてまったく検討されていない。四塩化炭素肝障害ラットの肉芽腫形成過程では肉芽腫 AMPS は初期 non-sulfated AMPS が増し, 次いで sulfated AMPS が増加し, 尿中では肉芽形成の盛んな時期に non-sulfated AMPS が増加したが, これは慢性肝障害にみられる肝 AMPS と尿中 AMPS の関係とよく一致している。また肝障害ラットに肉芽腫を作った場合, 正常ラットに肉芽腫を作った場合に比し肉芽腫 AMPS 量の増加が軽度で, 尿中 AMPS 量の増加は正常ラットに肉芽腫を作ったときと肝障害のみのときとはほぼ同様であったが, 肝障害ラットに肉芽腫を作ったときは肝障害のみのときの尿中 AMPS 量の増加と明らかな差異を認めなかった。この成績は肉芽腫による尿中 AMPS の変化が肝障害により影響されたと考えられる。

以上の成績から, 肝線維化時には肝臓の AMPS 量の増加と同時に尿中 AMPS 量も増加するが, 肝臓と尿中 AMPS 増加はまったく異なった AMPS の増加によることが明らかで, また肉芽腫 AMPS と尿中 AMPS 異常とのあいだにも同様の関係がみられた。したがって尿中 AMPS の質的異常は病変局所の結合組織 AMPS 異常を直接反映するものでないと考えられる。また慢性肝障害が存在すれば他臓器における結合組織増殖による尿中

AMPS の変化は健常時とは異なることを明らかにした。

第5章 結 論

1) 肝疾患患者の尿中総 AMPS 排泄量は慢性肝炎および肝硬変症初期に著増し、このうち遊離型 AMPS はタンパク結合型 AMPS に比し増加が著明であった。

2) 肝疾患患者の尿中 non-sulfated AMPS 排泄量は増加し、ことに肝硬変症初期で著増したが、sulfated AMPS は健常人に比し明らかな差異がなかった。

3) 四塩化炭素による実験的肝障害ラットでは尿中総 AMPS 量は肝線維化進行時に著増し、尿中 AMPS の non-sulfated AMPS は著増し、sulfated AMPS の増加は明らかでなかった。

4) 健常人および肝硬変患者の尿中 AMPS を column chromatography により分離し、慢性肝障害患者尿では健常人に比しヒアルロン酸分画が増加することを認めた。

5) 肝線維化時では、肝臓の AMPS 量および尿中 AMPS 量ともに増加したが、肝臓と尿の AMPS 増加は異なった AMPS の増加によることが明らかになった。また肉芽腫 AMPS と尿中 AMPS 異常とのあいだにも同様の関係のあることを認めた。

以上の成績より肝線維化進行にさいして尿中 AMPS は量的のみならず質的にも異常をきたすが、尿中 AMPS は病変局所の結合織 AMPS 異常を直接反映するものでないと考えられる。また慢性肝障害があれば他臓器の結合織増殖による尿中 AMPS の変化は健常時と異なると思われる。

稿を終るに臨みご懇篤なるご指導、ご校閲を賜った恩師阿部裕教授に厚く御礼申し上げます。また終始貴重なご助言、ご鞭撻下さった小泉講師に深謝するとともに常に実験にご協力くださった教室員諸氏に深謝致します。

文 献 1) Dunphy, J. E. & Udupa, K. N. : *New Eng. J. Med.* **253** : 847, 1955. 2) Bollet, A. J., Simpson, W. F., Goodwin, J. F. & Anderson, D. V. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **99** : 418, 1958. 3) Shetler, M. R., Lacetield, E. G., White, B. N. & Schilling, J. A. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **100** : 501, 1959. 4) Badin, J., Schubert, M. & Vouas, M. : *J. Clin. Invest.* **36** : 1317, 1955. 5) Kerby, G. P. : *J. Clin. Invest.* **37** : 962, 1958.

6) Bacchus, H. : *Cancer*. **18** : 1285, 1965. 7) DiFerrante, N. : *J. Clin. Invest.* **36** : 1516, 1957. 8) Rich, C. & Myers, W. P. L. : *J. Lab. Clin. Med.* **54** : 223, 1959. 9) Linker, A. & Terry, K. D. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **113** : 743, 1963. 10) Balasubrahmanyam, M. : *J. Path. Bact.* **65** : 123, 1953. 11) 和田竜七 : 阪大医誌 **11**, 8 : 2177, 1959. 12) 満谷夏樹 : 阪大医誌 **16**(7~9) : 281, 1964. 13) George, R., Thompson, C. & William, C. : *J. Lab. Clin. Med.* **68** : 617, 1966. 14) Morrione, T. G. : *Amer. J. Path.* **25** : 273, 1949. 15) DiFerrante, N. & Rich, C. : *J. Lab. Clin. Med.* **48** : 491, 1956. 16) Bitter, T. & Muir, H. M. : *Anal. Biochem.* **4** : 330, 1962. 17) Stidworthy, G. H., Ellis, P. J. & Gottschalk, R. G. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **112**, 4, 861, 1963. 18) Schiller, S., Slover, G. A. & Dorfman, J. : *J. Biol. Chem.* **236** : 983, 1961. 19) DiFerrante, N., & Rich, C. : *Clin. Chim. Acta* **1** : 519, 1956. 20) Schmidt, M. : *Biochim. Biophys. Acta* **63** : 346, 1962. 21) Mathews, M. B. & Inouye, M. : *Biochem. Biophys. Acta* **53** : 509, 1961. 22) Stegemann, H. : *Z. Physiol. Chem.* **311** : 41, 1958. 23) Mörner, K. A. H. : *Skand. Arch. Physiol.* **6** : 332, 1895. 24) Astrup, P. : *Acta Pharmacol. (Kobenhavn)* **3** : 165, 1947. 25) Kerby, G. P. : *J. Clin. Invest.* **33** : 1168, 1954. 26) Rich, C., DiFerrante, N. & Archibald, R. M. : *J. Lab. Clin. Med.* **50** : 686, 1957. 27) Willens, S. L. : *Amer. J. Path.* **27** : 825, 1951. 28) Taylor, H. E. : *Amer. J. Path.* **29** : 871, 1953. 29) Grishman, E. : *Cancer* **5** : 700, 1952. 30) Bien, E. J., Ziff, M. & Bunim, J. J. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **76** : 649, 1951. 31) DiFerrente, N., Robbin, W. C. & Rich, C. : *J. Lab. Clin. Med.* **50** : 897, 1957. 32) Lupu, N. G. H. : *Acta Histochem.* **14** : 1, 1962. 33) Singer, E. J., Hutterer, F., Kent, G., Zak, F. G. & Popper, H. : *AMA, Arch. Path.* **68** : 103, 1960. 34) Hutterer, F., Robin, E., Singer, E. J. & Popper, H. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **102** : 534, 1959. 35) 高橋忠雄ほか : 肝臓 **2** : 206, 1960. 36) Galambos, J. T. : *Gastroenterology* **44** : 4, 1960.

- 37) Shimizu, Y., Koizumi, T., & Kawata, H.: Japan. J. Gastroenterology 54 : 485, 1957. 38) Hirayama, C. & Hattman.: Acta Hepatosplen. 8 : 102, 1961. 39) 鹿谷文朗 : 阪大医誌 16(7~9) : 1964. 40) Teller, W. M., Burke, E. C., Rosevear, J. W. & McKenzie, B. F. : J. Lab. Clin. Med. 59: 95, 1962. 41) Meyer, K., Grumbach, M. M., Linker, A. & Hoffman, P. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97 : 275, 1958. 42) Muir, H., Mittwoch, U. & Bitter, T. : Arch. Dis. Child. 38 : 358, 1963. 43) Zellweger, H. Ponseti, I. V., Pedrini, V. & Stamler, F. S. : J. Pediat. 59 : 549 1961. 44) Pedirni, V., Lenuzzi, L. & Ambrotti, V. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110 : 847, 1962. 45) Kaplan, D., McKusick, V., Trebach, S. & Lazarus, R. : J. Lab. Clin. Med. 71 : 38, 1968. 46) Terry, K. & Linker, A. : Fed. Proc. 22 : 414, 1963. 47) Lorincz, A. E. : Ann. N. Y. Acad. Sci. 91 : 414, 1963. 48) Loewi, G. & Consden, R. : Nature. 195 : 148, 1962. 49) Varadi, D. P., Cifonelli, J. A. & Dorfman, A. : Biochim. biophys. Acta 141 : 103 1961. 50) Curran, R. C. & Agar, J. A. M. : Nature. 193 : 494, 1962. 51) Bollet, A. J., Simpson, W. F., Goodwin, J. F. & Andreson, D. V. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99 : 418, 1958. 52) Lovell, D., Schoran, C. J. & Curran, R. C. : Brit. J. Exp. Path. 47 : 228, 1966.

*

*

*

*

*

*

*

*

*