肺胞蛋白症の生化学的研究

—気管支肺胞洗浄液の複合糖質について—

東北大学抗酸菌病研究所内科

伊藤 正幸◇ 荒井 秀夫 佐藤 研

佐藤 博 本宮 雅吉 今野 淳

岩手県立中央病院呼吸器科

吉田 司 矢追 博美

A BIOCHEMICAL STUDY ON PULMONARY ALVEOLAR PROTEINOSIS —GLYCOSAMINOGLYCANS AND GLYCOPROTEINS IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID—

Masayuki ITO, MD, Hideo ARAI, MD, Ken SATOH, MD,

Hiroshi SATO, MD, Masakichi MOTOMIYA, MD

and Kiyoshi KONNO, MD

Department of Internal Medicine, The Research Institute for Tuberculosis
and Cancer, Tohoku University, Sendai

Tsukasa YOSHIDA, MD and Hiromi YAOI, MD

Department of pulmonology, The central hospital of Iwate prefecture, Morioka

概要 経過の全く異なる肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中のグリコサミノグリカン (GAG) 及び糖蛋白の分離, 定性, 定量を行なった。BALを繰返し行なつても, 胸部X線所見の改善がみられず, 経過が遷延し今なお, BALを必要とする症例では, BAL液中に, 糖蛋白のほぼ半量のGAGが検出された。これに反し, BALによつて速やかに肺陰影が消失したきわめて経過の良好な症例では, BAL液中に, GAGはほとんど検出されず, 糖蛋白のみが検出された。従つて, BAL液中のGAGの存在は, 肺の障害の程度を反映するものと推測される。

肺胞蛋白症は, まだ病因が明らかでないまれな疾患で, 発熱が初発症状となり, 進行性の呼吸困難, 咳嗽, 喀痰, 発熱, 胸痛, などが特徴である。本邦の第1例は, 昭和35年, 岡らによつて報告された¹⁾。本症の診断には肺胞中の好エオジン性で, しかもperiodic acid/schiff (PAS) 反応陽性物質の証明がきめてとされており, 気管支肺胞洗浄 (BAL) 法が応用されるようになってから²⁾, この中に含まれる物質の化学組成 (特に脂質) や生物学的活性についての研究も行なわれるようになってきた。今回我々は, 全く経過の異なる肺胞蛋白症患者, それぞれ1例についてBALを行ない, グ

リコサミノグリカン (GAG) および糖蛋白画分について検討した。この結果, BALがきわめて有効であつた症例では, BAL液中に糖蛋白のみが検出され, これに反しBALが殆ど無効であつた症例では, 糖蛋白画分とGAGが検出された。

実験方法

症例1. 36才, 男, 主訴は息切れ。18年間, 中華料理店のコックとして勤務。22才の時から次第に呼吸困難増強。岩手県立中央病院外来受診時, 胸部X線写真で, 肺門から下方にひろがるbutterfly陰影を指摘され (図1), 昭和54年9月には, 開胸生検により, 肺胞蛋白症と診断された。その後, 生理的食塩水を用いBALを毎月, 2~3回行なつている。BAL直後は, 肺野の陰影も消失し, 呼吸

[昭和58年4月28日受稿]

図1. 症例1 (SH) の初回入院時胸部X線写真。両側肺門から下野にかけて、いわゆるbutterfly陰影がみられる。

図2. 症例2 (AI). 肺門から両側下野にかけての境界不鮮明な陰影、開胸生検直前の胸部X線写真。

困難も消失したが、約1カ月後には、陰影は、再び出現し、現在もBALを定期的に繰返している。初回入院時の検査では、LDHの上昇、IgGの増加が認められた。

症例2. 47才、女。昭和56年3月から息切れ、咳嗽を訴えていた。同年10月、開胸生検の結果、肺胞蛋白症と診断された(図2—56年10月の胸部X線写真)。BALは3回施行し、その後再燃はみられない。この症例では、入院時の生化学検査で異

図3. 肺生検標本。(症例1 (SH)), HE染色, ($\times 100$). 肺胞腔は好酸性物質でみたされ、肺胞壁の軽度肥厚がみられる。好酸性物質はPAS陽性。

図4. 肺生検標本。(症例2 (AI)), HE染色($\times 100$). 肺胞腔は、好酸性物質でみたされ一部に泡沫細胞もみられる。抗酸性物質はPAS陽性。

常値は認められなかつた。(注 症例の臨床経過については別報で発表の予定(吉田司他))

肺生検組織所見

症例1(図3). 肺胞腔内は好酸性を示す蛋白様物質でみたされ泡沫細胞もみられ、又肺胞上皮の肥大、リンパ球、マクロファージの浸潤がみられる。肺胞蛋白症の所見のみられない周囲の部分では、間質内に軽度のリンパ球、形質細胞の浸潤がみられる。細胞内をみたす物質は、PAS反応陽性であつた。

症例2(図4). 肺胞腔の多くが貯留した好酸性物質でみたされ、一部に泡沫細胞もみられる。他方、肺胞上皮細胞の増殖と軽度の線維化像がみら

れる。好酸性物質は、PAS陽性、アルシアンブルー陰性であった。

気管支肺胞洗浄 (BAL) : BALは、生理食塩水を用いて行なつた。BAL液、約1000mlは、ガーゼを用いて濾過し、1000回転、10分遠心し、分離した上清を蒸留水に対して透析濃縮、凍結乾燥し、クロロフォルム：メタノール (2 : 1) 混液で脱脂し、以下の実験に使用した。

酸性多糖画分の調製³⁾

脱脂画分をプロナーゼPで37℃、48時間消化した。プロナーゼ消化は、反応混液の一部をとり、ninhydrin陽性物質が検出されなくなるまで繰り返した。ついで除蛋白の目的で、冷三塩化酢酸を添加し(7%)、遠心後の上清は、蒸留水に対して透析し、減圧濃縮(乾固せず)後、4倍量の食塩飽和エタノールを添加した。生じた沈殿は、0.01M食塩水に溶解し、小過剰の4%塩化セチピリジニウム液(CPC液)を添加し、一晚、37℃に放置した。CPC沈殿は、2.1M食塩溶液に溶解し、4倍量のエタノール液を加え、この結果生じた沈殿を酸性多糖画分として使用した。

イオン交換クロマトグラフィー⁴⁾

酸性多糖画分をDowex-1カラムにかけ、まず、水で溶出した後、食塩濃度を原則として0.25M間隔で段階的に2.0Mまであげて溶出した。各食塩濃度での溶出液は別々に集め、蒸留水に対して透析し、凍結乾燥後、実験に用いた。

電気泳動⁵⁾

セルローズアセテート膜(セバラックス、常光産業)を用い、蟻酸-ピリジン緩衝液(pH=3.0)で1mA/cm、20分間通電の条件で行なつた。泳動図の染色には、70%エタノール0.05%トルイジンブルー、又は0.05%アルシアンブルーを用いた。又糖蛋白画分の検出のためPAS染色を行なつた。

GAG分解酵素を用いた消化試験

ヒアルロニダーゼ“アマノ”は、0.15MNaCl含有0.02M酢酸緩衝液中⁵⁾で、又コンドロイチナーゼAC、コンドロイチナーゼABCは、Tris-塩酸緩衝液中で一晩反応させた⁵⁾。ヘパリナーゼによる分解は、Linkerの記載に従つて行なつた⁶⁾。

GAGサブタイプの同定

GAGサブタイプは、(1) Dowex-1カラムクロマトグラフィーの結果、(2) 電気泳動度、および、(3) 特異的GAG分解酵素による消化試験の結果を参照し、既に報告した方法により、同定した³⁾。

GAGサブタイプ比⁷⁾

酸性多糖画分の等量を含む5サンプルを作り、それぞれ、ヒアルロニダーゼ“アマノ”コンドロイチナーゼA (C)、コンドロイチナーゼABC、ヘパリナーゼ、および緩衝液のみと、37℃、48時間incubationを行ない、児島、中村等の方法に準じて、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸の比を求め、又総GAG量の測定も行なつた。

化学的定量法

総蛋白は、Lowry法により測定した。ヘキソース量は、フェノール硫酸法⁸⁾、ガラクトースは、システィン硫酸法(secondary reaction)により測定した⁸⁾。ヘキソサミンの測定には先ず試料を4N塩酸・100℃、4時間水解した後、蒸発乾固した材料を用い、Elson-Morgan法により測定した⁹⁾。シアル酸の測定は、極果シアル酸テストキットを用いて行なつた¹⁰⁾。

結 果

症例1では、5回行なつたBAL液のおのおのについて分析した。その結果、5回の洗浄液で、ほぼ同様の結果が得られた。症例1の脱脂画分重量は、症例2のほぼ10倍で、症例1では脱脂画分を多量に含んだ濃い洗浄液が得られることがわかつた(症例1、 $2.24 \pm 0.9 \text{ mg/ml}$ 、症例2、 0.23 mg/ml)。

CPC沈殿画分として回収した症例1の酸性多糖画分は、電気泳動図上、粗ヘパリナーゼで完全に消化されるGAGのバンドと粗ヘパリナーゼで消化されない画分とに分かれ、後者はPAS染色陽性であつたので糖蛋白画分と同定した。症例2の酸性糖画分には粗ヘパリナーゼで消化されるGAG画分は検出されずPAS陽性の糖蛋白と思われるバンドだけが同定された。

ついで症例1の酸性多糖画分中に含まれる個々

表1. Dowex-1カラムクロマトグラフィーで粗多糖画分中に同定されたグリコサミノグリカン (GAG) 糖蛋白画分

溶出食塩濃度	収量	同定された物質
0.3M	4.5 mg	糖 蛋 白
0.5	4.7	糖蛋白+ヒアルロン酸
0.75	5.2	糖 蛋 白
1.0	2.9	糖蛋白+デルマタン硫酸+ヘパラン硫酸
1.25	4.3	糖蛋白+コンドロイチン硫酸A(C)
1.5	3.0	糖蛋白+コンドロイチン硫酸A(C)

のGAGサブタイプを定量した結果、ヒアルロン酸は $41.9 \pm 6.4\%$ 、コンドロイチン硫酸A (C) は、 $37.6 \pm 10.9\%$ 、デルマタン硫酸は $1.2 \pm 2.2\%$ 、ヘパラン硫酸は、 $19.3 \pm 11.4\%$ の値を示した。

症例1の酸性多糖画分のDowex-1カラムクロマトグラフィーの結果では表1のように0.5M食塩溶出画分には、ヒアルロン酸が1.0M食塩溶出画分には、デルマタン硫酸とヘパラン硫酸が1.25M, 1.5M食塩溶出画分にはコンドロイチン硫酸A (C) が検出された。0.3M~1.5M食塩溶出のすべての画分に糖蛋白が検出された。1.75Mおよびこれより濃い濃度で溶出される画分には、糖蛋白もGAGも検出されなかつた。症例2の酸性多糖画分のDowex-1カラムクロマトグラフィーの結果では、各濃度の食塩溶出画分のいずれにもGAGは検出できず、糖蛋白(ヘパリナーゼで全く消化されず、PAS反応陽性)のみが検出された。

この結果症例1の酸性多糖画分はGAGと糖蛋白のおよそ1:2の混合物(重量)であり、症例2では、糖蛋白のみからなることが分かつた。Dowex 1などを使用した陰イオン交換クロマトグラフィーでは、物質は主として荷電の差によって分離されるので、濃度の異なる食塩水で溶出されても、糖などの構成要素には大きな差はないものと考え、症例1では、粗GAG画分を粗ヘパリナーゼで徹底的に消化した残渣を、症例2では酸性多糖画分全体を糖組成の定量に用いた。上記の方法で調製した糖蛋白画分の化学的組成を表2に

表2. BAL糖蛋白画分の分析値

	症 例 1	症 例 2
総ヘキソース量 ^a	55% ^c (脱脂画分)	2.1 ^d
ガラクトース ^b	36.6	1.4
ヘキソサミン	21.6	0.8
フコース	8.2	0.3
シアル酸	22.6	0.5 ^e
硫酸基	3.3	0.6
蛋 白	8.8	6.0

a. フェノール-硫酸法

b. シスチン-硫酸法 (Secondary reaction)

c. g/100g 脱脂画分

d. mol比

e. N-アセチルノイラミン酸として計算

示す。中性糖は症例1では、36.6%、症例2では、20.4%、ヘキソサミンは症例1で21.6%、症例2では、28.8%、フコースは症例1で8.2%、症例2では6.4%で両者の間に若干の差がみられた。シアル酸、硫酸基は百分率で示した場合、症例1の方がかなり高い値を示した。

考 案

BALがあまり有効でなかつた症例1では脱脂画分量が2.2mg/dl、症例2では0.2mg/dlで、症例1では、症例2より、はるかに濃いBAL液が得られた。この事は、また肉眼的にも症例1でのBAL液の乳濁度が強い事で確認された。又両症例でのBAL液の回収総量はほぼ同じであつたから、BALに用いた生食水で回収された固型成分の総量も、肺野の陰影が残存した症例1では、陰影が速やかに消失した症例2よりも、はるかに多いと考えられる。症例1で、糖蛋白画分量のほぼ半量のGAGが検出されたことは、特に注目に値する。これに反し、3回のBALで肺胞陰影の完全消失をみた症例2では、GAGは殆ど検出されなかつた。Sahuは、ヒアルロン酸のみが肺胞蛋白症患者の気管支内分泌物中に検出される唯一のGAGであると報告し、気管支内分泌物中のヒアルロン酸の存在は肺の障害の程度を反映するとのべている¹¹⁾。Sahuの実験では、BAL液のCPC沈殿画分をbio-gel 200のカラムにかけ、得られたピーク画分のセルローズアセテート膜上での電気泳動を行ない、ヒアルロ

ン酸を同定している。しかし、この条件で、溶出をさらに継続すれば、ヒアルロン酸以外の画分も引き続き溶出されてきた可能性も否定できない。我々の実験では、Dowex-1カラムクロマトグラフィーを行ない、それぞれの食塩濃度で溶出される画分のひとつについて、電気泳動を行ない、特異的GAG分解酵素による消化試験の結果を参照してGAGサブタイプを同定した。この結果、ヒアルロン酸のみならず、コンドロイチン硫酸A (C)、ヘパラン硫酸、デルマトン硫酸が検出された。一方、予後の良好であった症例2では、GAGは、ほとんど検出されなかつた。このことからヒアルロン酸を含めたGAG分子種が、BAL内に存在することは、肺の障害を反映するものと考えられ、この点では、Sahuの学説と基本的には一致する¹²⁾¹³⁾。

BAL液中のGAGの由来は不明である。線維芽細胞¹⁴⁾や内皮細胞の培養液中には、GAGが証明されている¹⁵⁾。一方、糖蛋白は気管支粘液腺由来とされており、BAL液中のGAGは肺胞構造の変化および肺胞内へのGAGの移行貯留によるものと考えられる。しかし、肺胞蛋白症自体が原因なのか、又は続発性感染が肺胞の障害を誘起するのかは不明である。Bhattacharyyaら¹⁶⁾は、BAL液中に分子量および、構造の異なつた二種類の糖蛋白を認めている。我々の実験の症例1と症例2を比較すると、糖蛋白画分は、やや不均一であるためか、中性糖、ヘキソサミン、フコースの百分率では若干の、又シアル酸、硫酸基の百分率では、かなりの差がみられた。一方、我々の症例1の糖蛋白画分のヘキソサミン、ガラクトース、フコース比は、慢性閉塞性肺疾患症例の喀痰中の糖蛋白組成とは、やや異なつた組成比を示した¹⁷⁾。このような組成比の差の意義を明らかにするためには、できるだけ均一な画分についての分析結果を基にして考察をすすめる必要があろう。

シアル酸は、炎症時にC-reactive proteinと同じような変動を示すことが知られており肺炎、肺癌などで血清中シアル酸の増量が報告されているが¹⁸⁾、気管支分泌物中のシアル酸の意義は、現在で

も不明な点が多い。

肺胞蛋白症の基本的な異常は、surfactant産生が多すぎることで、肺胞マクロファージによるsurfactantの排除機構の欠陥にあるとされている¹⁹⁾。Strattonは、BAL液のリンパ球、単球の機能におよぼす影響について検討し、肺胞蛋白症患者のBAL液は、mitogenに対する単核細胞の反応を抑制すると報告している²⁰⁾。

したがって、本報でのべたような、予後の全く異なる患者からBAL液由来の固型成分の細胞機能に対する作用の解析は、今後のきわめて興味あるテーマと考えられる。

結 論

経過の異なる肺胞蛋白症、2症例の気管支肺胞洗浄液の組成について、生化学的検索を行なつた。気管支肺胞洗浄を繰り返して行なつても改善のみられない症例では、洗浄液中に糖蛋白画分の約半量のグリコサミノグリカン (GAG) が検出された。これに反し、経過の良好な症例では、糖蛋白画分のみが検出されGAGは検出されなかつた。以上の実験結果から、洗浄液中のGAGの存在は、肺の障害の程度を反映するものと考えた。

文 献

- 1) 岡 捨己, 他: 肺胞蛋白症 (pulmonary alveolar proteinosis) の症例と考察, 日本胸部臨床 19: 391, 1960.
- 2) Ramirez RJ, et al: Bronchopulmonary lavage in man. Ann Intern Med 63: 819, 1965.
- 3) Arai H, et al: On acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) in pleural effusion. Am Rev Resp Dis 111: 37, 1975.
- 4) 阿部喜美子, 長谷川栄一: ムコ多糖実験法 1. 南江堂, 東京, 1972, p41.
- 5) 鈴木 旺: 分解酵素を用いるムコ多糖構造の研究法. 蛋白質・核酸・酵素 14: 55, 1969.
- 6) Linker A and Hovingh P: The enzymatic degradation of heparin and heparitin sulfate. J Biol Chem 240: 3724, 1965.
- 7) Kojima J, et al: The glycosaminoglycans in human hepatic cancer. Cancer Res 35: 542, 1975.
- 8) 阿武喜美子, 瀬野信子: 生化学実験法XI. 一般定量法, 核酸・蛋白質・酵素 共立出版株式会社 1968, p13.

- 9) Antonopoulos CA: A modification for determination of sulphate in mucopolysaccharides by the benzidine methods. *Acta Chem Scand* 16: 1521, 1962.
 - 10) 谷内孝次: 酵素法によるシアル酸測定とその臨床応用. *臨床化学* 7: 403, 1979.
 - 11) Sahu S and Lynn WS: Hyaluronic acid in the pulmonary secretions of patients with alveolar proteinosis. *Inflammation* 3: 149, 1978.
 - 12) Sahu S and Lynn WS: Hyaluronic acid in the pulmonary secretions of patients with asthma. *Biochem J* 173: 565, 1978.
 - 13) Sahu S: Hyaluronic acid, and indicator of pathological conditions of human lungs? *Inflammation* 4: 107, 1980.
 - 14) Richards RJ and Morris TG: Collagen and mucopolysaccharides production in growing lung fibroblasts exposed to chrysotile asbestos. *Lif Sci* 12: 441, 1973.
 - 15) Sampson P, et al: Glycosaminoglycans produced in tissue culture of rat lung cells. *Connect Tissues Res* 4: 41, 1975.
 - 16) Bhattacharyya SN, et al: Structural studies on a glycoprotein isolated from alveoli of patients with alveolar proteinosis. *Biochim Biophys Acta* 427: 91, 1976.
 - 17) 笠間清士: 慢性閉塞性疾患における喀痰の酸性ムコ多糖に関する研究. *日胸疾会誌* 12: 310, 1974.
 - 18) Krolkowski FJ, et al: Serum sialic acid levels in lung cancer patients. *Pharmacology* 14: 47, 1976.
 - 19) Akino T, et al: Alveolar phospholipids in alveolar proteinosis. *Tohoku J Exp Med* 126: 51, 1978.
 - 20) Stratton JA, et al: The immunoinhibitory activities of the lung lavage materials and sera from patients with pulmonary alveolar proteinosis (PAP). *J Clin Lab Immuno* 5: 81, 1981.
-