

## 新生児呼吸窮迫症候群の気道吸引液中のサーファクタント 蛋白, Stable microbubble 並びに飽和レシチンの動態

(分担研究: 新生児の呼吸管理に関する研究)

千田 勝一,\* 藤原 哲郎\*

### 要 約

当施設においてサーファクタント補充療法を受けた新生児呼吸窮迫症候群 (RDS) 児の気道吸引液中サーファクタントの動態を調べる目的で、サーファクタントのマーカである 5 kDa プロテオリピッド (SP-B, C) と 35 kDa アポ蛋白 (SP-A), stable microbubble (SM) 並びに飽和レシチン (DSPC) を測定した。本邦で開発されたサーファクタント TA は SP-B, C のみを含有している。サーファクタント蛋白の測定には酵素免疫法を開発し、SM は Pattle らの方法に従った。サーファクタント補充群 (n=45) ではサーファクタント非補充 RDS 対照群 (n=17) に比べ治療後 SP-B, C プールサイズと SM 陽性率の高値が認められた。一方、対照群では臨床的改善がみられる生後約 72 時間頃に一致してこれらの上昇が認められた。SP-A は両群に差がみられなかった。検体不足のため対象の一部で調べた % DSPC (DSPC / 総磷脂質比) はサーファクタント補充後、対照群との間に有意差がみられた。これらの測定結果から、サーファクタント補充群の SP-B, C, SM 陽性率、% DSPC の高値は外因性サーファクタントに由来し、また外因性サーファクタントは内因性サーファクタントの産生分泌を阻害していないと考えられた。

見出し語: SP-B, C, SP-A, stable microbubble, % DSPC

### 研 究 目 的

本邦で開発され RDS の画的治療法であることが実証されたサーファクタント製剤 (サーファクタント TA) は牛肺から精製され成分調整されたものであるが、種々の動物の天然肺サーファクタントに存在する 35 kDa アポ蛋白 (SP-A) を含まず、低分子量できわめて疎水性の 5 kDa プロテオリピッド (SP-B, C) を約 1% 含有している<sup>1)</sup> (SP-A, B, C の命名, 2)。この SP-B, C は肺サーファクタント活性に必須成分であることが当教室において判明した<sup>3)</sup>。

このため本研究では SP-A に加え SP-B, C を

微量の検体で測定できる酵素免疫法 (ELISA) を新たに開発し、サーファクタントを補充した RDS 児から吸引採取した気道液を材料としてこれらのサーファクタント蛋白を測定した。また同一検体を用いて Pattle らが開発した stable microbubble (SM) の測定<sup>4)</sup>を行った。本法は肺サーファクタントの存在下では攪拌によって生じた泡が平衡に達する最小の表面張力 (<15  $\mu$ m) まで減少し安定した状態にあるという発見に基づき、羊水を用いて RDS の出生前予測に有用であると報告された方法である。更に今年度は同一気道液中の DSPC を測定し、次の点を解明することを研究目的とし

\* 岩手医科大学小児科

た。

1. 補充した外因性サーファクタントの動態
2. 内因性サーファクタントの分泌時期
3. 外因性サーファクタントが内因性サーファクタント産生分泌に及ぼす影響

#### 研究方法および対象

ELISAの標準蛋白およびpolyclonal抗体作成用抗原蛋白として、SP-Aは肺胞蛋白症肺洗浄液抽出物を、SP-B、CはサーファクタントTAを用いた。これら2種類の抗血清を家兎に作成し、その反応性はWestern blot, ELISAで検索した。牛肺由来のサーファクタントTA(外因性)に対する抗血清はヒトのSP-B、C(内因性)との間に定性的、定量的に外因性SP-B、Cと同等の反応性を示した。ELISAはEngvallのcompetitive法<sup>5)</sup>に従い100 $\mu$ lの検体量を使用した。

SM測定はPattleらの原法に従い、サーファクタント蛋白を測定した同一検体を用いて30 $\mu$ lの検体量で施行した。対象はサーファクタント補充RDS群45例、サーファクタント非補充RDS 対照群17例で両群間に種々の臨床的因子について有意差を認めない(表)。気道液は気管チューブを介した吸引により得られ、生後6時間以内(補充群では治療前にあたる)、その後は12時間毎ブルーシ-80 $^{\circ}$ Cに保存した。蛋白の測定は牛血清アルブミンを標準としたLowry法で行った。DSPCは、上記測定後に検体が残っていた補充群25例、対照群6例について脂質抽出後二次元薄層クロマトグラフィ<sup>6)</sup>でかきとったレシチンより分離測定した。燐脂質の測定はBartlett変法<sup>6)</sup>で行った。

#### 研究結果

1. サーファクタント補充の臨床的効果(図1)

人工換気療法の重症度を表すventilatory index (VI) ( $\text{FiO}_2 \times \text{MAP} / \text{PaO}_2$ )はサーファクタント補充前、両群間に差を認めなかった。治療後VIはサーファクタント補充群において対照群に比べ有意に低値を示し、かつその値は一回の投与で持続した。一方、対照群のVIは生後72時間

すぎに初期VIに比べ有意に低下しはじめた。

2. サーファクタント蛋白の測定結果(図2)

SP-B、C量はサーファクタント補充群において治療後生後72時間まで対照群に比べ有意差を示した。対照群では、生後72時間すぎにこの値の上昇がみられた。SP-A量は両群間に有意差を認めなかった。SP-B、C/SP-A比は対照群においては内因性サーファクタント蛋白の比を意味するが、この比は比較的一定で約0.03であった。一方、サーファクタント補充群では、SP-B、C量と同様、対照群に比べこの比が生後約72時間まで有意に高値を示した。

3. SMの測定結果(図3)

気道液中のSM数が、羊水におけるサーファクタントの存在を示す判定基準、medium (10-20/cmm)以上の場合、サーファクタントが存在する(陽性)と仮定し両群の児の陽性率を比較した。サーファクタント補充群では生後84時間まで対照群との間に有意差を示した。また、両群の平均SM値の差はサーファクタント補充後より生後72時間まで有意であり、補充群で高値であった。

4. DSPCの測定結果(図4)

対照群の12時間毎の測定検体が12-60時間において各2-3例と少ないため、この間の値はそれぞれ24時間分を集計して表した。DSPCは総燐脂質(TPL)を内部標準として% DSPC (DSPC/TPL)で示した。% DSPCはサーファクタント補充後、対照群に比し有意差がみられた。一方、DSPC量は補充群においてSP-B、Cと同様の推移を示したが、生後60時間まで対照群との間に有意差を認めず、72時間でのみ補充群で有意な高値を示した。

#### 考案・結論

1. サーファクタント補充群におけるSP-B、C、SM陽性率、% DSPCの高値は、対照群における内因性SP-B、C、SM陽性率、% DSPCの動態、および両群における内因性SP-Aの動態から、外因性であると考えられた。

2. 対照群のVIは生後72時間に初期VIから有意に低下し、この時期が臨床的改善に必要な内因性サーファクタントの出現時期と推定されるが、気道液中ではSP-B, C, SM陽性率の上昇がこの時期に一致してみられた。

3. サーファクタント補充群の内因性SP-Aの動態と臨床的効果の持続から外因性サーファクタントは少なくとも内因性サーファクタントの産生分泌を阻害していないと考えられた。

#### 文 献

- 1) Fujiwara T. Pulmonary Surfactant. Elsevier Publishers 1984; 479-503.
- 2) Possmayer F. Am Rev Respir Dis 1988 ; 138: 990-998.
- 3) Takahashi A, Fujiwara T. Biochem Biophys Res Comm 1986; 135: 527-532.
- 4) Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, Currie JO, Parsons JH, Sutherland PD. British J Obstet Gynecol 1979; 86: 615-622.
- 5) Engvall E. Meth Enzymol 1980; 70: 419-439.
- 6) Itoh YH, Itoh T, Kaneko H. Analytical Biochemistry 1986; 154: 200-204.

表1.

#### 対象の臨床像

	Surfactant TA 補充 RDS群 (n=45)	対照 RDS群 (n=17)
在胎(wk)	29 ± 3.2	30 ± 2.8
体重(gm)	1293 ± 470	1518 ± 412
男/女	29/16	10/ 7
院内/院外	22/23	7/10
Apgar 1 min	3.8 ± 2.6	4.7 ± 2.8
人工換気条件 (<6 hr)		
FiO <sub>2</sub>	0.63 ± 0.20	0.60 ± 0.20
MAP	10.55 ± 2.09	10.34 ± 3.20

平均 ± S.D., 期間 '83年8月~'86年5月

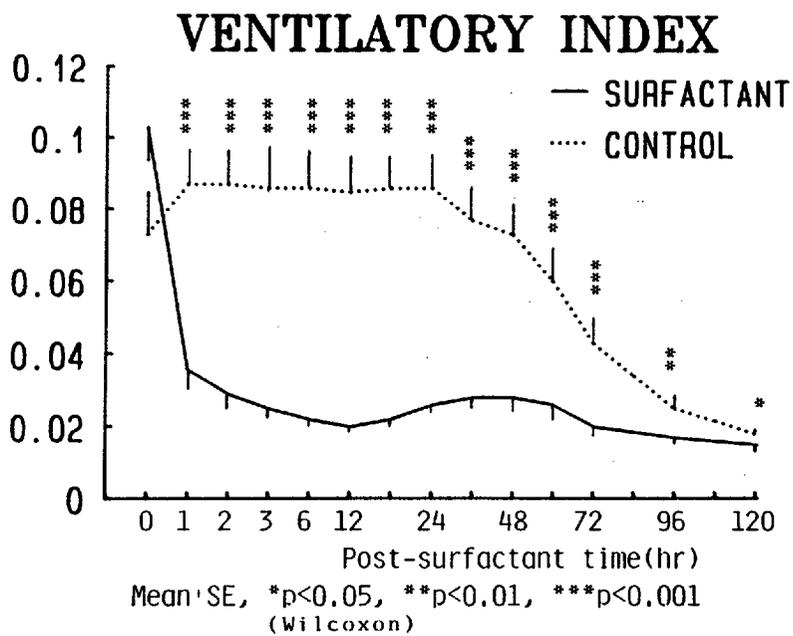


图 1.

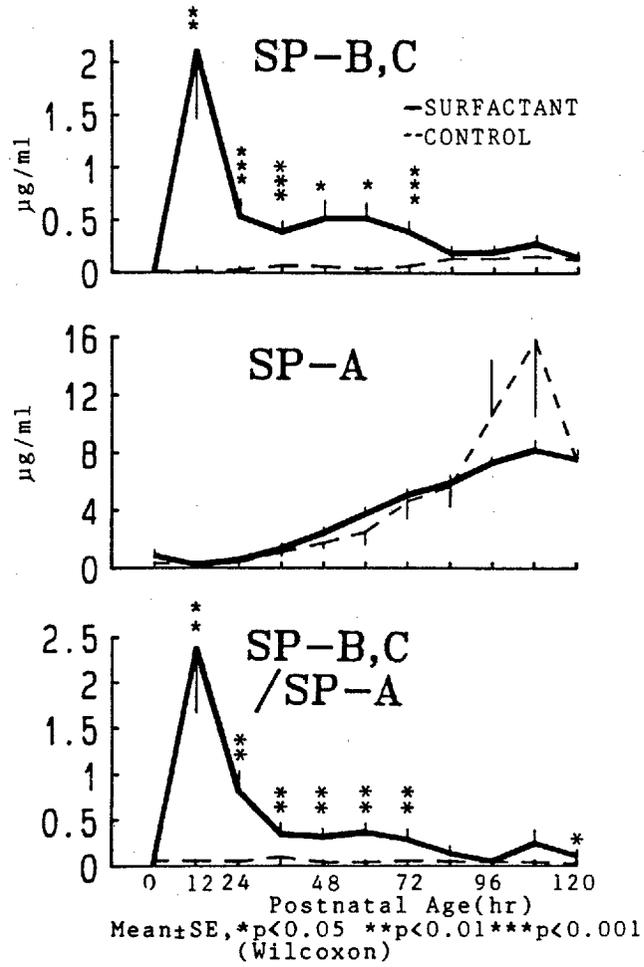
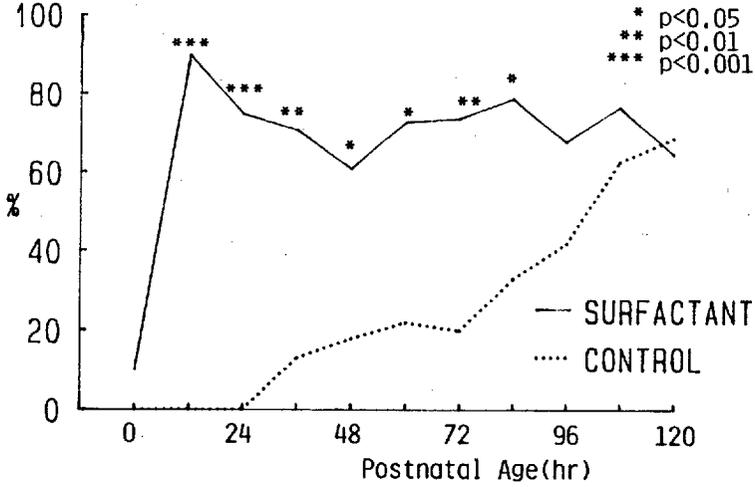


图 2.

## STABLE MICROBUBBLE

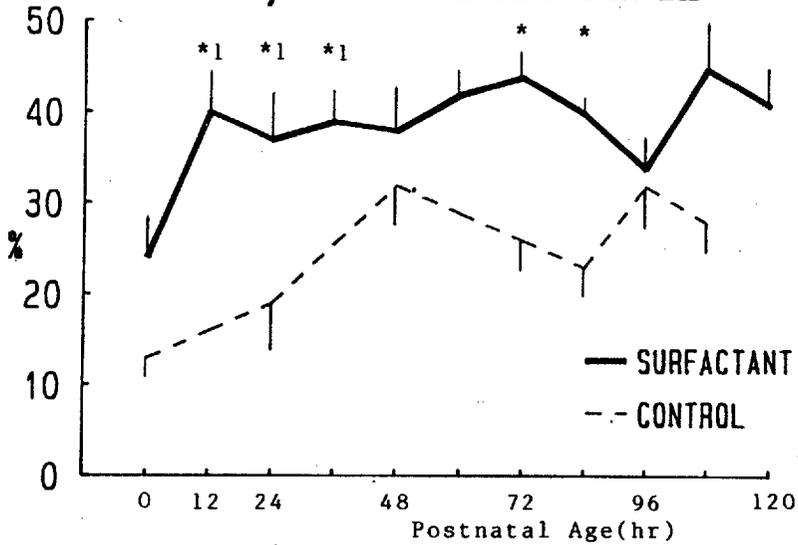


Proportion of infants (% of total) that the number of stable microbubbles was more than 10/cmm was depicted.

Fisher exact test (two-tail)

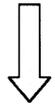
图 3.

## DSPC/PHOSPHOLIPID



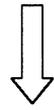
Mean ± SE \*1 vs control 12-36hr  
p < 0.05 (Wilcoxon)

图 4.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 要約

当施設においてサーファクタント補充療法を受けた新生児呼吸窮迫症候群(RDS)児の気道吸引液中サーファクタントの動態を調べる目的で、サーファクタントのマーカである5kDa プロテオリピッド(SP-B,C)と35kDa アポ蛋白(SP-A), stable microbubble(SM)並びに飽和レシチン(DSPC)を測定した。本邦で開発されたサーファクタントTAはSP-B,Cのみを含有している。サーファクタント蛋白の測定には酵素免疫法を開発し, SMはPattleらの方法に従った。サーファクタント補充群(n=45)ではサーファクタント非補充 RDS 対照群(n=17)に比べ治療後SP-B,C プールサイズとSM陽性率の高値が認められた。一方, 対照群では臨床的改善がみられる生後約72時間頃に一致してこれらの上昇が認められた。SP-Aは両群に差がみられなかった。検体不足のため対象の一部で調べた%.DSPC(DSPC/総燐脂質比)はサーファクタント補充後, 対照群との間に有意差がみられた。これらの測定結果から, サーファクタント補充群のSP-B,C, SM陽性率, %.DSPCの高値は外因性サーファクタントに由来し, また外因性サーファクタントは内因性サーファクタントの産生分泌を阻害していないと考えられた。