

サーファクタントアポタンパクによるRDS の診断に関する研究

名古屋市立大学医学部小児科

小川 雄之亮, 横井 吉和
牧 紀衛, 加藤 泰治

研究目的

胎児肺の成熟度の判定, もしくは呼吸窮迫症候群(RDS)の出生前診断は羊水中の胎児肺由来のサーファクタントを定量することにより可能であり, 今日臨床の実際に用いられている。同様に新生児の気道吸引液中の肺サーファクタントを定量し得れば, 出生後にRDSの診断確定が可能となり, また病勢の進行の予測も可能となるものと思われる。

肺サーファクタントのマーカーとして, 一般には disaturated phosphatidylcholine(DSPC)を始めとするリン脂質が多く用いられているが, リン脂質をマーカーとした場合には微量検体で測定することはきわめて困難である。またリン脂質が必ずしも肺サーファクタント由来のものとは診断し得ず, その特異性が問題となることも多い。

我々は肺サーファクタントが脂質蛋白複合体であり, しかもその蛋白部分には肺サーファクタントに特異的な蛋白のあることに注目し, この特異蛋白が肺サーファクタントのマーカーになり得ると考えた。

そこで本研究においては, RDS診断のための肺サーファクタントの微量定量法を開発する目的で, 抗ヒト肺サーファクタントアポ蛋白抗体を用いた enzyme immunoassay 法について基礎的検討を行った。

研究方法

ヒト肺サーファクタントは肺胞蛋白症の患者に治療のために行った肺洗浄液から, 蔗糖密度勾配超速心分画法を用いて抽出精製した。

抗ヒト肺サーファクタント抗体は家兔を上記の精製ヒト肺サーファクタントで免疫して得た。家兔の粗抗血清は56°Cで補体を非働化した後, ヒト血清蛋白に対する抗体を混合法による沈降反応を用いて吸収し精製した。

Enzyme immunoassay はKatoらの方法に準じ, N-N'-O-phenylene dimaleimideおよび β -galactosidase 法を利用したサンドウィッチ型の enzyme immunoassay 法を行った。図1に示す如く, 5mlの抗ヒト肺サーファクタント家兔血清を40%および33%の硫酸で塩析して, γ -globulin 分画を精製し, Tris-saline buffer で透析後, 酵素・基質比1:100で37°C16時間 pepsin 消化を行った。Pepsin 消化物を sephadex G 150 に添加し, column chromatography により非特異的吸着性を示すFc fragment を除いて2価抗体(Fab')₂を得た。こうして得られた(Fab')₂の約半量は固相用に, 残りは酵素標識用に用いた。固相はアセトン及び7Xで洗浄し活性化した直径3mm, 長さ4mmの円柱状シリコンを(Fab')₂溶液中に24時間浸透し固定化した。

残りの(Fab')₂はSH還元剤である0.1Mの mercaptoethylamine を用い, 37°C30分間, heavy chain間のS-S結合を還元した。これをBiogel P-10 column chromatographyにて精製し, SH架橋剤であるN-N'-O-phenylene dimaleimide を用い, β -galactosidase の分子内S-Hを架橋した。得られた β -galactosidase 結合Fab'は1価抗体で, 1分子のFab'に1分子の β -galactosidase が結合している。

Enzyme immunoassayは図2に示す如く, 抗

原を固相化2価抗体に加え37℃4時間一次反応を行い、次いでシリコンを0.1% bovine serum albumin含有0.1M phosphate bufferで洗浄後、新しい試験管に移し、 β -galactosidase標識1価抗体を加えて4℃16時間二次反応を行った。翌日シリコンを洗浄後 assay用試験管に移し、0.1 μ g/mlの4-methyl umbelliferyl- β -D-galactosideを100 μ l加えて30℃20分間反応させ、次いでpH 10.3の0.1 M glycine bufferを加えて反応停止後、360nmで励起したときの450nmの蛍光を測定した。蛍光標準物質には4-methyl umbelliferoneを用いた。

研究成績

図3はヒト肺サーファクタントアポ蛋白のenzyme immunoassay系での検量曲線を示したものである。縦軸は蛍光強度を、横軸は抗原濃度をlog scaleで目盛った。この抗原濃度はヒト肺サーファクタントをcold ethanol/etherで脱脂して得られた精製アポ蛋白の、スラブゲル電気泳動における分子量36,000分画の含有比から計算した36,000蛋白相当量の蛋白濃度とした。このenzyme immunoassay法の測定感度は0.01 μ g/mlすなわち10 ng/mlであった。

臨床の実際においては肺サーファクタント測定時に血液や胎便などの検体への混入がしばしば問題となるので、清明な羊水検体に種々の濃度の血液もしくは胎便を添加し、assayへの影響を検討した。血液混入が1%および1.5%の少量では測定値への影響は少ないが、2%を越えると原羊水の値の1/5以下と大きく抑制された。

一方、胎便添加の検体においては、すでに2.5%の少量においても明らかに抑制が認められた。

考 察

RDSはsteroid hormoneの母体投与による発症予防が行われ、また出生後においては人工サーファクタントの経気道補充療法が試みられる時代となった。従って今日においては、出生前の羊水分析による正確な診断の方法と、生後の気道吸引液を用いての診断法の確立が急務となっている。

しかも測定法は微量の検体で行い得るものが望まれている。

今回われわれが開発検討した β -galactosidaseを応用したenzyme immunoassayは、その測定限界が分子量36,000分画の蛋白量換算値として10 ng/mlときわめて高感度であり、従って、きわめて微量の検体で測定可能である。人工サーファクタント補充療法に際してはendogenousのサーファクタントへの影響が問題であるが、人工サーファクタント投与例においては経時的な気道吸引液中の本法による内因性サーファクタントの動態が検討でき得るものと期待される。

また、肺サーファクタントに特異的なアポ蛋白をマーカーとする方法であるだけに、本法の特異性は極めて高いものと思われ、従来のリン脂質をマーカーとする方法で問題となったfalse positiveの危険は無いものと思われる。

ただ本法は現在のところ測定にかなりの時間を要するので、測定時間の短縮に向けての検討が今後の課題であろう。

ま と め

RDSの診断確定や内因性肺サーファクタントの動態の研究のためのヒト肺サーファクタント微量測定法を確立する目的でenzyme immunoassayを検討し以下の結果を得た。

i) ヒト肺サーファクタントに対する抗体を家兎抗血清として得、2価抗体と β -galactosidase標識1価抗体を用いたサンドウィッチ型enzyme immunoassayの系を確立した。

ii) 本法の測定限界は分子量36,000分画蛋白量として10 ng/mlときわめて高感度であった。

iii) 血液や胎便混入検体では他法で問題となる測定値の偽増は認められず、かえって抑制される結果が示された。

iv) 本法の欠点として測定にかなりの長時間を要するので、測定時間の短縮の検討が必要と思われる。

Preparation of EIA system

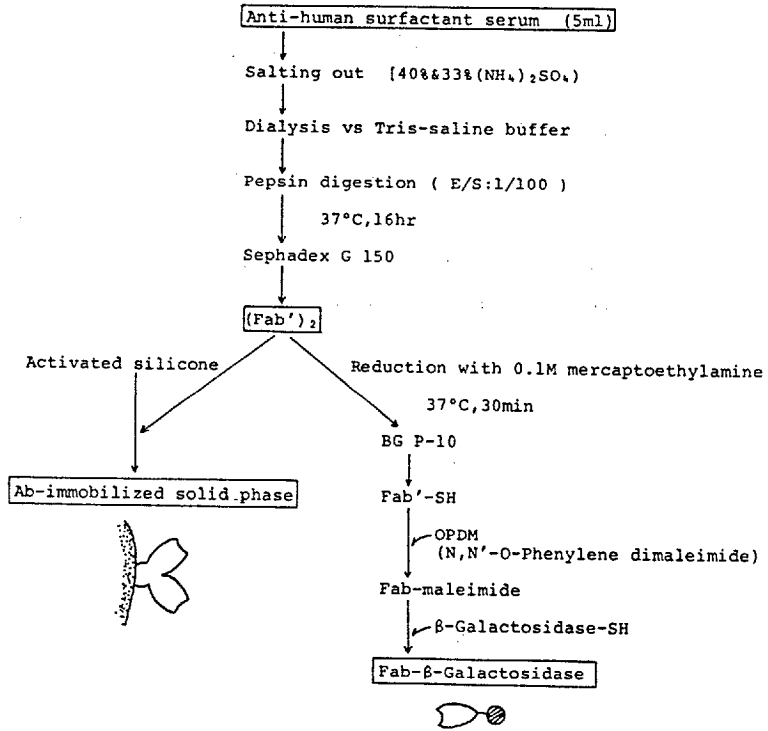
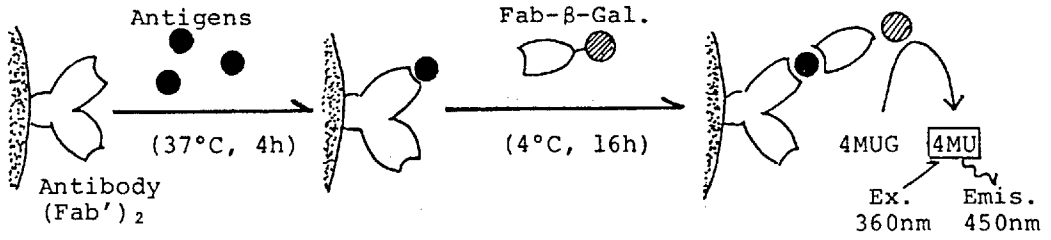


図1 ヒト肺サーファクタントのenzyme immunoassay
の system (1)

Enzyme immunoassay system



4MUG : 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside

4MU : 4-methylumbelliferone

図2 β -galactosidase を応用した enzyme immunoassay の system (2)

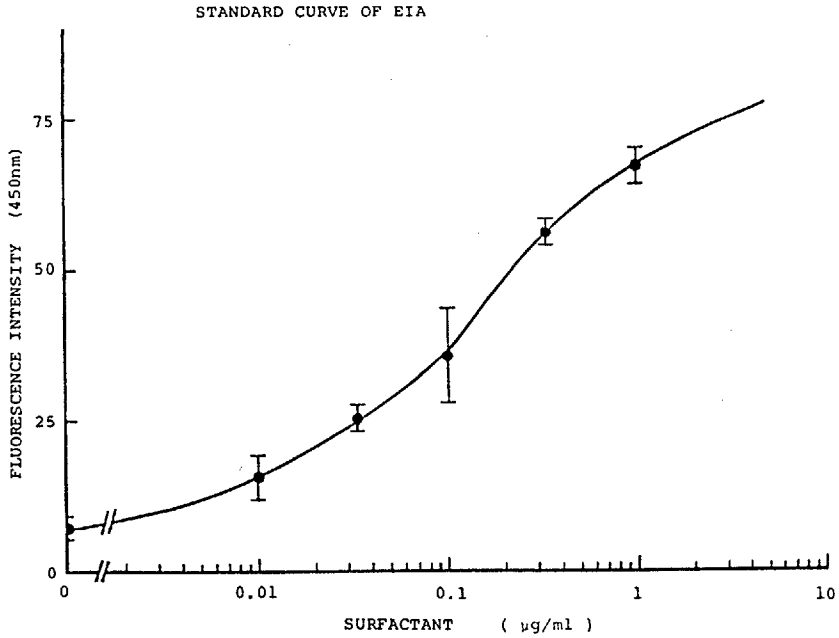
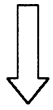


図3 ヒト肺サーファクタント enzyme immunoassay の検量曲線



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



研究目的

胎児肺の成熟度の判定,もしくは呼吸窮迫症候群(RDS)の出生前診断は羊水中の胎児肺由来のサーファクタントを定量することにより可能であり,今日臨床の実際に用いられている。同様に新生児の気道吸引液中の肺サーファクタントを定量し得れば,出生後にRDSの診断確定が可能となり,また病勢の進行の予測も可能となるものと思われる。

肺サーファクタントのマーカースとして,一般には disaturated phosphatidylcholine(DSPC)を始めとするリン脂質が多く用いられているが,リン脂質をマーカースとした場合には微量検体で測定することはきわめて困難である。またリン脂質が必ずしも肺サーファクタント由来のものとは診断し得ず,その特異性が問題となることも多い。

我々は肺サーファクタントが脂質蛋白複合体であり,しかもその蛋白部分には肺サーファクタントに特異的な蛋白のあるごとに注目し,この特異蛋白が肺サーファクタントのマーカースになり得ると考えた。

そこで本研究においては,RDS 診断のための肺サーファクタントの微量定量法を開発する目的で,抗ヒト肺サーファクタントアポ蛋白抗体を用いた enzyme immunoassay 法について基礎的検討を行った。