

新生児呼吸窮迫症候群の気道内 サーファクタント蛋白の動態

岩手医科大学小児科 千 田 勝 一

研究目的

肺 surfactant の欠乏は新生児呼吸窮迫症候群 (RDS) の病因と考えられている。この肺 surfactant は胎児肺より経気道的に羊水中に移行することから、肺 surfactant の主成分である脂質の測定が胎児肺成熟の指標として臨床的に用いられている。一方、肺 surfactant には肺に特異的な蛋白が存在することが認められており、最近 Shelley らや Katyal らは enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した surfactant 蛋白が RDS 出生前予知に有用であることを報告した。

現在、藤原らにより開発された人工 surfactant が RDS の治療法として臨床治験されており効果が認められている。この Surfactant TA (Tokyo-Akita) は牛肺から精製されたものであるが、種々の動物に最も多く認められる分子量 35 kDa の surfactant 蛋白を含まず、それよりもはるかに低分子量の興味ある蛋白を含有している。

このため我々は ELISA 法により Surfactant TA 補充を受けた RDS 児の気道液中の内因性並びに外因性 surfactant 蛋白の測定を企画し、その第一段階として Surfactant TA 補充を受けない RDS 児の気道液中の内因性 surfactant 蛋白の測定を本研究の目的とした。

研究方法及び対象

ELISA 法の標準蛋白及び抗血清作成の抗原蛋白として肺胞蛋白症の肺洗浄液を蛋白源とした。肺胞蛋白症肺洗浄液から抽出した分子量 35 kDa の surfactant 蛋白は健常肺洗浄液由来のそれと同一であり、蛋白量は約 100 倍多い。この surfactant 蛋白を得るため肺洗浄液を 100,000 g で遠心し、pellet 分画を 0.1 M リン酸緩衝液に懸濁後更に遠心を 2 度くり返した。これを家兎に免疫して作成した抗血清から硫酸アンモニウムにより IgG 分画を沈殿させ、更にヒト血漿吸着 affinity chromatography により抗ヒト血清抗体を除去した。polyclonal 抗体の specificity は Laurell 免疫電気泳動法、Western blot 法、ELISA により検査された。ELISA 法は Engvall の記載に従って competitive 法で行なった。2 次抗体として horseradish peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を使用し、発色には o-phenylenediamine と過酸化水素を用いた。検体は 50 μ l 使用し測定結果を得るまでは 3 時間半を要した。対象は生後 6 時間以内に動脈血 gas を正常に保つために吸入酸素濃度 40% 以上での人工換気を要した出生体重 1000 g から 1500 g (平均 \pm 1 SD, 1400 g \pm 60) の RDS 児 24 例である。気道液は生食 1 ml を気管チューブ内に注入し胸壁を軽く tapping 後吸引して採取し、最初は 6 時間分、以後 24 時間分を pool した。RDS 児の surfactant 蛋白量の対照として RDS 以外の疾患で 24 時間以内の挿管を必要とした生後 1-3 日の早期産児 (n=5) と満期産児 (n=5)、及び生後 1-4 カ月の乳児 (n=5) の気道液と健常人 volunteer の気管支肺洗浄液について同様に surfactant 蛋白を測定した。生食による検体の稀釈度を見る目的でその指標の一つとして同一検体について同様の ELISA によりアルブミン量の測定も行なった。

研究結果

肺胞蛋白症肺洗浄液を超遠心して得られた pellet と上清を用いた 2 次元電気泳動にて、pellet 分画に等電点が 5、分子量が主に 35 kDa と 60 kDa の surfactant 蛋白が銀染色で明瞭に認められ、ほとんどの血清蛋白は上清に除去されていた。精製 polyclonal 抗体と血清蛋白との反応は認められなかった。標準蛋白には抗ヒト血清抗体を用いた ELISA で 4% の血清蛋白が存在するため 96% を surfactant 蛋白とした。Surfactant 蛋白の検量曲線は 10-100 ng/ml で片対数グラフ上直線を示した。Surfactant 蛋白測定に対する影響をみる目的で、血清蛋白 0-75 mg/ml、リン脂質 0-10,000

$\mu\text{g}/\text{ml}$, 胎便0-30%の種々の濃度を検体に加え surfactant 蛋白を測定したが, 測定値は高濃度の溶液を加えたときに何も加えない検体の5%以内の減少を示しただけでほとんど影響を受けなかった。

気道液の測定結果を図に示す。平均 surfactant 蛋白量は RDS 児で生後日数と共に増加し, 生後6-7日に1-5日の値に比し有意の増加を示した ($p < 0.05$, 分散分析)。これは non-RDS のそれよりも有意に高値であった ($p < 0.05$)。アルブミン量には各グループ間で差を認めなかった。surfactant 蛋白/アルブミン比は RDS 児で平均 surfactant 蛋白量と同様日齢と共に増加し生後5日と6-7日に1-3日の値に比べ有意に増加した ($p < 0.05$)。乳児の値は RDS 児の日齢3日までの値より有意に高く ($p < 0.05$)。健常成人の気管支肺洗浄液の値は RDS, non-RDS のそれより有意に高値を示した ($p < 0.01$)。Surfactant 蛋白量及び surfactant 蛋白/アルブミン比と動脈血肺胞酸素分圧較差 (a/APO_2) との相関関係は認められなかった。

考 察

本法で用いた ELISA は微量の検体でかつ血清, 脂質, 胎便混入の影響もほとんど受けずに測定できるため気道液中の surfactant 蛋白の動態を研究する上で有用であると思われた。RDS 児の回復期に surfactant 蛋白量の増加を認めたが, これは surfactant 蛋白の RDS 肺における十分量の産生を示している可能性もある。しかし RDS 児と non-RDS 児との平均 surfactant 蛋白量との間に差を認めず, 気道吸引液は肺胞レベルでの surfactant 量を十分に反映していない可能性が考えられる。RDS 児において surfactant 蛋白/アルブミン比は surfactant 蛋白と同様に日齢と共に増加し, 本質的でないまでも検体の稀釈度を見る一つの指標になり得ると思われた。以上, 肺胞から遠く離れた気道液中の surfactant 蛋白を測定しているという限定条件はあるが, 今後 Surfactant TA 補充を受けた RDS 児の気道液中の内因性及び外因性 surfactant 蛋白の動態の研究に本 ELISA は有用であると思われる。

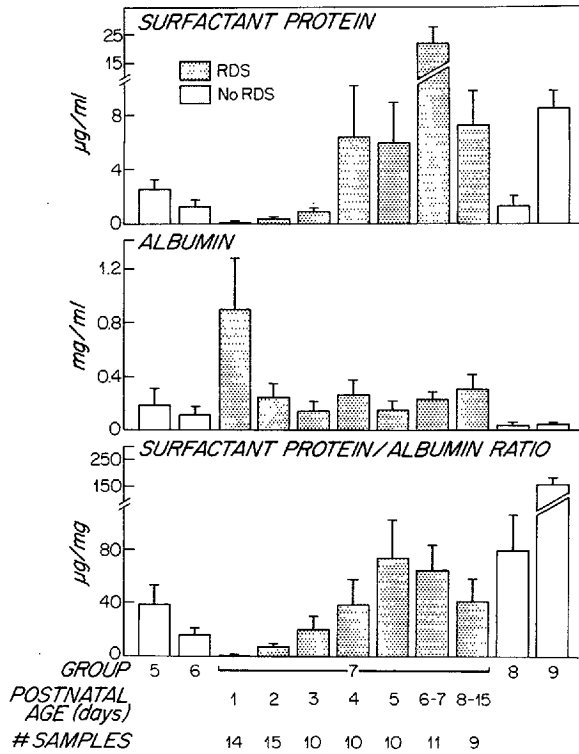
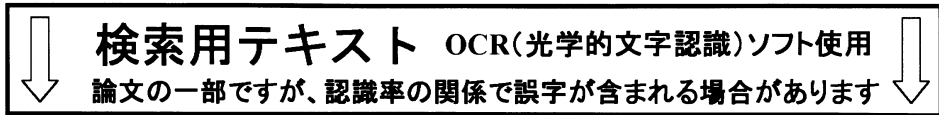


図. 気道液中の surfactant 蛋白, アルブミンの測定値及び surfactant 蛋白/アルブミン比。

Group 5 ; 早期産児, group 6 ; 満期産児, group 7 ; RDS 児, group 8 ; 乳児, group 9 ; 健常成人 volunteer



研究目的

肺 surfactant の欠乏は新生児呼吸窮迫症候群(RDS)の病因と考えられている。この肺 surfactant は胎児肺より経気道的に羊水中に移行することから、肺 surfactant の主成分である脂質の測定が胎児肺成熟の指標として臨床的に用いられている。一方、肺 surfactant には肺に特異的な蛋白が存在することが認められており、最近 Shelley らや Katyal らは enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)で測定した surfactant 蛋白が RDS 出生前予知に有用であることを報告した。

現在、藤原らにより開発された人工 surfactant が RDS の治療法として臨床治験されており効果が認められている。この Surfactant TA(Tokyo-Akita)は牛肺から精製されたものであるが、種々の動物に最も多く認められる分子量 35kDa の surfactant 蛋白を含まず、それよりもはるかに低分子量の興味ある蛋白を含有している。

このため我々は ELISA 法により Surfactant TA 補充を受けた RDS 児の気道液中の内因性並びに外因性 surfactant 蛋白の測定を企画し、その第一段階として Surfactant TA 補充を受けない RDS 児の気道液中の内因性 surfactant 蛋白の測定を本研究の目的とした。