

新生児呼吸窮迫症候群の気道吸引液中の 5 kDa, 35kDa アポ蛋白並びに stable microbubble 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,* 高 橋 肇, 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ーである 5 kDa と 35 kDa アポ蛋白 (5k, 35k) 並びに stable microbubble (SM) を測定した。本邦で開発されたサーファクタント TA は 5k のみを含有している。サーファクタントアポ蛋白の測定には酵素免疫法を開発し、SM は Pattle らの原法に従った。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) に比べ治療後生後約 72 時間まで 5k pool size 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 60 時間ごろにこれらの上昇が認められた。35k は両群に差がみられなかった。これらの結果から、サーファクタント補充群の 5k と SM 陽性率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： 5 kDa アポ蛋白, 35 kDa アポ蛋白, stable microbubble

研 究 目 的

新生児呼吸窮迫症候群 (RDS) は肺の発達の未熟性による肺サーファクタント欠乏を主因とし、罹患率・死亡率の高い未熟児の代表的疾患である。この肺サーファクタントは胎児肺から経気道的に羊水中に移行することから肺サーファクタントの脂質成分の測定が胎児肺成熟の指標として臨床上用いられている。また、肺サーファクタントは脂質、蛋白、糖の複合体であり、蛋白成分には肺に特異的な分子量 35k と 5k のアポ蛋白の存在が知られている。最近、羊水中の 35k の測定が脂質量や RDS 発症の有無と相関したとする報告がなさ

れた (1, 2)。

本邦で開発され RDS の画期的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、種々の動物の肺サーファクタントに存在する 35k を含まず、低分子量できわめて疎水性の 5k を約 1% 含有している (3)。この 5k 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 (4)。

このため本研究では 35k に加え 5k 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

* 岩手医科大学小児科

吸引採取した気道液を材料としてこれらのアポ蛋白を測定した。また同一検体を用いて Pattleらが開発した stable microbubble (SM) の測定(5)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 μm) 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 の出生前予知に有用であると報告された方法である。これらの測定から次の点を解明することを研究目的とした。

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、35k は肺胞蛋白症肺洗浄液抽出物を、5k 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 5k (内因性) との間に定性的、定量的に外因性 5k と同等の反応性を示した。ELISA は Engvall の competitive 法(6) に従い 100 μl の検体量を使用した。

SM 測定は Pattle らの原法に従い、サーファクタントアポ蛋白を測定した同一検体を用いて 30 μl 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 時間毎プールし -80 $^{\circ}\text{C}$ 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。

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 1 回の投与で持続した。一方、対照群の VI は生後 60 時間すぎに低下しはじめた。

2. サーファクタント蛋白の測定結果(図 2)

5k 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、VI が低下しはじめる生後 60 時間ごろに一致してこの値の上昇がみられた。35k 量は両群間に有意差を認めなかった。5k/35k 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、5k 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。

考案・結論

1. サーファクタント補充群における 5k, SM 陽性率の高値は、対照群における内因性 5k と SM 陽性率の動態、および両群における内因性 35k の動態から、外因性であると考えられた。
2. 対照群の VI の低下時期から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は生後 60 時間ごろと推定され、これは気道液中の 5k と SM 陽性率の上昇時期と一致した。
3. サーファクタント補充群の内因性 35k 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) Shelley SA, Balis JU, Paciga JE, Knupplel RA, Ruffolo EH, Bouis PJ. Surfactant "apoproteins" in human amniotic fluid: An enzyme-linked immunosorbent assay for the prenatal assessment of lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1982; **144**: 224-228.
- 2) Katyal SL, Amenta JS, Singh G, Silverman JA. Deficient lung surfactant apoproteins in amniotic fluid with mature phospholipid profile from diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1984; **148**: 48-53.
- 3) Fujiwara T. Surfactant replacement in neonatal RDS. In Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ (eds); *Pulmonary Surfactant*. Amsterdam: Elsevier Publishers 1984; 479-503.
- 4) Takahashi A, Fujiwara T. Proteolipid in bovine surfactant: Its role in surfactant function. *Biochem Biophys Res Comm* 1986; **135**: 527-532.
- 5) Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, Currie JO, Parsons JH, Sutherland PD. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *British J Obstet Gynecol* 1979; **86**: 615-622.
- 6) Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Meth Enzymol* 1980; **70**: 419-439.

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 ₂	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

VENTILATORY INDEX

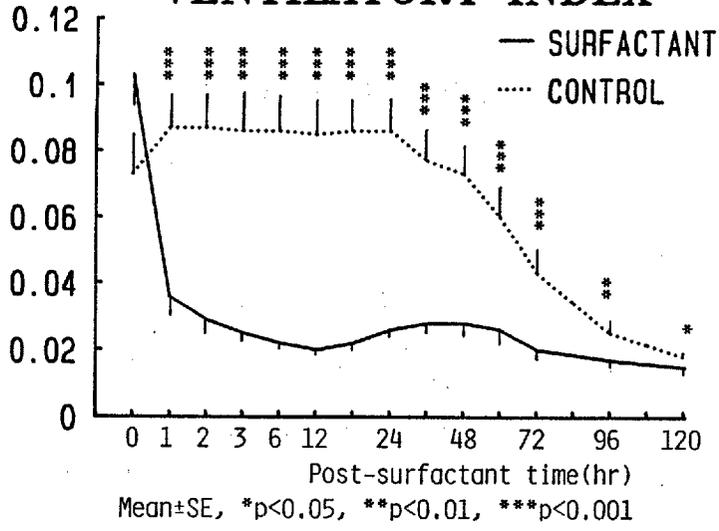


图 1.

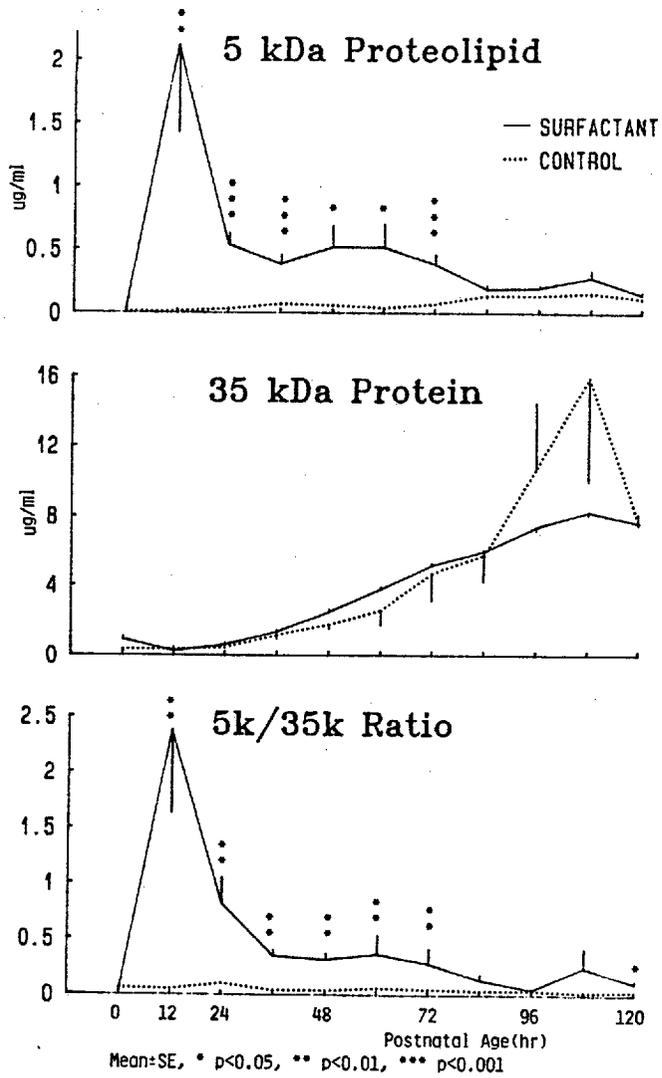
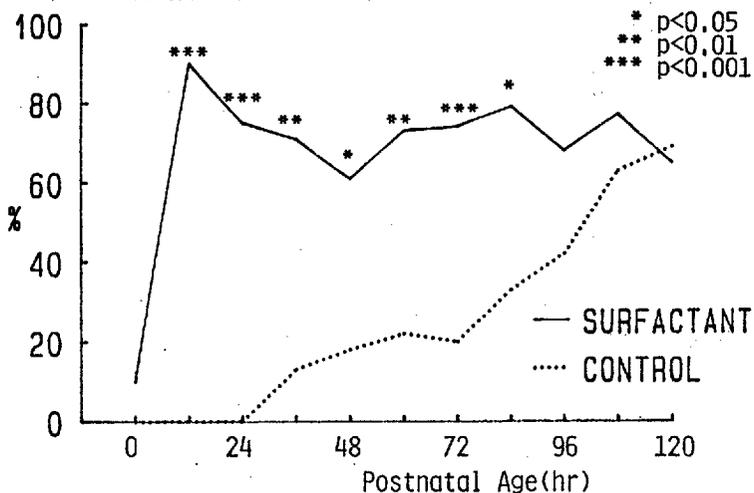


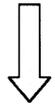
图 2.

STABLE MICROBUBBLE



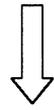
Proportion of infants (% of total) that the number of stable microbubbles was more than 10/cmm was depicted.

图 3.



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と35kDaアポ蛋白(5k,35k)並びにstable microbubble(SM)を測定した。本邦で開発されたサーファクタントTAは5kのみを含有している。サーファクタントアポ蛋白の測定には酵素免疫法を開発し、SMはPattleらの原法に従った。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)に比べ治療後生後約72時間まで5k pool size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60時間ごろにこれらの上昇が認められた。35kは両群に差がみられなかった。これらの結果から、サーファクタント補充群の5kとSM陽性率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。