

課題番号 : 27指1404
研究課題名 : ヒト肺サーファクタント中のリン脂質測定による肺機能評価に関する研究
主任研究者名 : 五石圭司
分担研究者名 : 進藤英雄
キーワード : 肺サーファクタント、呼吸窮迫症候群、リン脂質
研究成果 :

新生児集中治療室(NICU: Neonatal Intensive Care Unit)での治療が必要となるような周産期の病的新生児は母子感染・母体合併症、呼吸循環器障害、黄疸などの様々な病態・疾病に遭遇し、生命予後が左右される。特に呼吸窮迫症候群(RDS; Respiratory Distress Syndrome)は在胎32週未満の早産児に多く発症し、早産児の生命予後を左右する重篤な呼吸障害である。RDSの病態は、肺胞中の界面活性物質である肺サーファクタント欠乏が原因であると特定されており、治療法も人工肺サーファクタント気管内補充療法として臨床で広く行われている。しかしその診断方法は、胸部単純レントゲンの所見とマイクロバブルテスト(図1)という定性的な検査をもとに臨床的に判断しているのが実情であり、RDS、あるいは肺胞内の肺サーファクタント欠乏状態を定量的に診断する方法は現在に至るまで確立されていない。そのため、実臨床の現場では呼吸障害を呈する早産児にはとらずに人工肺サーファクタント補充療法を行った後で、その効果判定からRDSかどうかを判定する、「診断的治療」という手法がしばしば用いられている。しかし人工肺サーファクタント補充療法は高価な治療法であり、またそれに伴う有害事象の報告もあり、医療経済面でも児への侵襲の面でも治療の要否を正確に診断したうえで治療を行うこと望ましい。一方、我々のグループは、肺サーファクタント中のリン脂質の合成酵素を発見し、動物実験で肺内のリン脂質を測定して証明した。しかし、ヒトにおける研究は未知である。そこで我々はヒトの肺サーファクタント中のリン脂質あるいはリン脂質合成酵素の解析を行い、新生児のRDSの定量的診断方法を確立することを目的としている。

今年度の研究は前年度までの課題であった「(1)羊水や新生児の胃液中の肺サーファクタント中リン脂質の測定方法の確立」、および「(2)リン脂質測定と従来の定性法(マイクロバブルテスト)との比較検討」、「(3)周産期情報で、リン脂質産生に影響を及ぼす因子の解明」、「(4)リン脂質の在胎週数別の発現時期の解明」を検討するための臨床試験で得られた臨床データと児の羊水あるいは胃液中に含まれる肺サーファクタント中のリン脂質成分の定量測定を行い、そのデータを元に臨床データ、特にRDS発症の有無、あるいは重症度と各種リン脂質成分との間の関係について解析を行った。

出生前、あるいは出生直後にご両親に研究の説明をした被験者162組を対象とした。なお、母子を1組として算定し、双胎は2組とした。なお、双胎の羊水はたとえ羊水腔が別々であるDD双胎(二羊膜二絨毛膜双胎)であっても、双胎間の区別が困難であるため、対象からは外した。そのうち25組からは羊水・胃液ともに採取ができなかった。検体が採取できた対象のご両親から改めて同意書を頂き、臨床像と羊水、あるいは胃液中に含まれる肺サーファクタント中リン脂質成分の測定を行った。

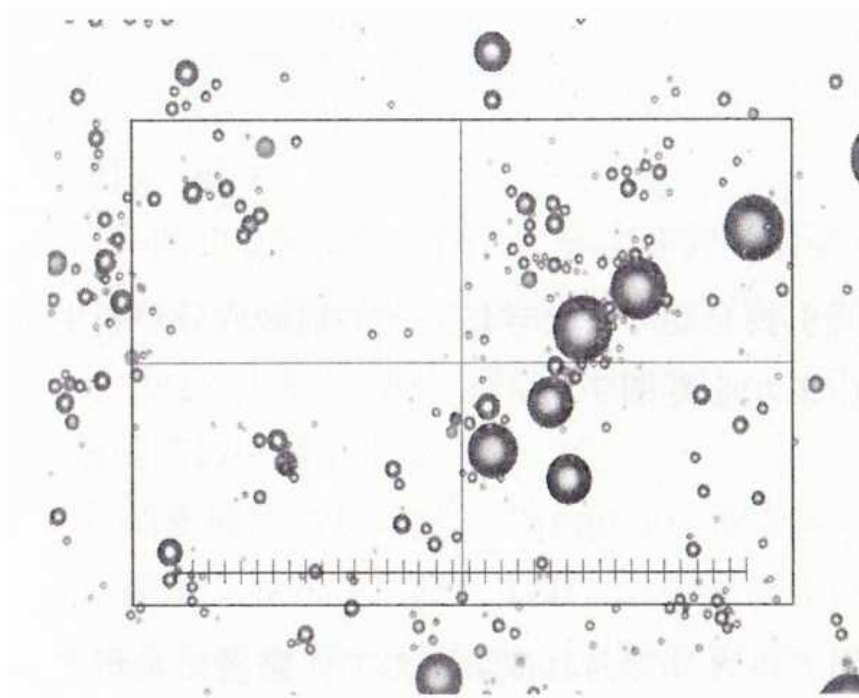
対象の在胎週数は26週から40週、出生体重は935gから3,593gと広範囲にわたっていた。対象のマイクロバブルテスト(SMT: Stable Microbubble Test)の結果を図2に示す。RDS

の診断は、この SMT と胸部単純 Xp の結果をもとに行い、両者の結果が乖離する場合は SMT を優先した上で臨床症状も加味して総合的に判断した。

その結果、現時点では RDS 発症の診断基準となり得るリン脂質成分を定量的に同定するには至らなかった。ただし、各種リン脂質成分の間での相関関係はいくつか明らかになってきており、今後、臨床像を含めて解析を継続していくこととしている。

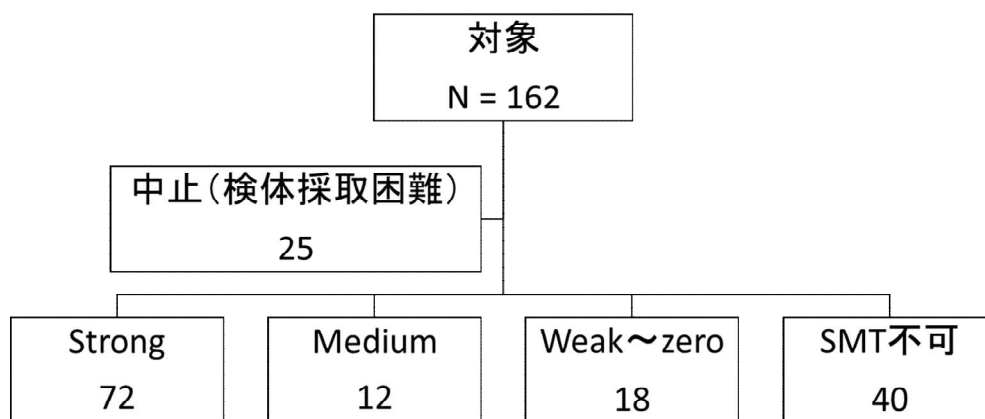
一方、もう一つの課題である「(5) リン脂質の簡易測定キットの開発」に関しては、簡易測定法として、(1)簡易質量分析計測定法と(2)ELISA 法が候補として挙げられている。それぞれメリットデメリットはあるが、検査機器メーカーとも相談して測定方法開発の可能性を探っている。こちらも最終的には RDS 発症頻度と羊水、あるいは胃液中の各種リン脂質成分との関連の解析結果で相関のあるデータが得られることが待たれる。

図1 マイクロバブルテスト (SMT : Stable Microbubble Test)



羊水あるいは胃液を泡立たせ、直径 $15\mu\text{m}$ (図のスケールの1目盛り) 以下の安定した小泡 (マイクロバブル) の数を計測して RDS 発症の危険性を判定する。図は小泡が1視野中に20個以上認められ、RDSの発症は少ないと考えられる。

図2 対象 (単位は組) の内訳と SMT の結果



Subject No. : 27 指 1404

Title : The study of the method of evaluate lung function of newborn by measured of phospholipid in lung surfactant of the newborn

Researchers : K. Goishi, H. Shindou

Key word : lung surfactant, respiratory distress syndrome, phospholipid

Abstract :

The prognosis of a sick newborn need to care in neonatal intensive care unit (NICU) depends on various disorders or complications such as vertically transmitted infections from mother, respiratory disorders, circulatory disorders, and jaundice. Respiratory distress syndrome (RDS) is a serious respiratory disorder in association with the prematurity of the newborn especially preterm infant born before 32 weeks of gestation. The pathogenesis of RDS has been researched since 1970's and the cause of RDS was identified as deficiencies of lung surfactant in the alveoli. Intratracheal replacement therapy by artificial lung surfactant is clinically established specifically to RDS. In that case, neonatologist make a diagnosis of RDS based on chest X-ray and stable microbubble test. Both examinations are qualitative approaches and we have no methods in a quantitative way for the diagnosis of RDS nor the degree of deficiencies of surfactant in the alveoli. Thus we neonatologist often use “diagnostic treatment” that means first to administer the intratracheal surfactant replacement therapy and next to diagnose RDS or not from the effect of therapy. But the artificial lung surfactant product is expensive and the replacement therapy has some serious adverse events. The therapy is required to be administered after accurate diagnosis of RDS because of medical economics and less invasive of premature infant.

Our group identified phospholipid synthesis enzyme of pulmonary surfactant and measured phospholipids in animal lung. But the methods of measuring phospholipids in human lung were not established. Our purposes of this study are to establish method of analysis to measure phospholipid or phospholipid synthesis enzyme and to establish method of quantitative diagnosis of RDS.

Since 2015 we have studied the task “(1) establish the method of measure phospholipid in amniotic fluid or gastric aspirates of newborn”, “(2) study to compare diagnostic capability between the measurement of phospholipid and conventional test (ie. stable microbubble test)”, “(3) study of factors affecting the production of phospholipid in the newborn lung”, and “(4) study of gestational age that the degree of phospholipid production”. We have conducted the clinical study to reveal those tasks. In this study, we collect clinical data and measured various fraction of phospholipid in lung surfactant which is obtained from amniotic and/or gastric fluid of newborns. And we analyzed the correlation between clinical data ie. severity of RDS and the amount of every fraction of phospholipid.

Researchers には、分担研究者を記載する。

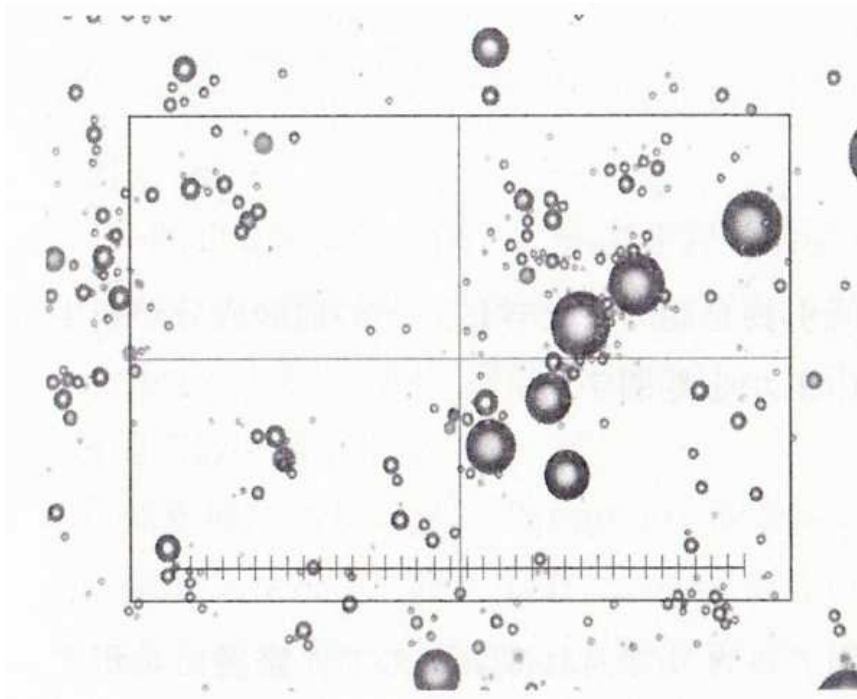
We enrolled 162 pairs of mother and infant as subjects gained informed consents of parents perinatally. We considered twins as 2 pairs, and amniotic fluids of twins are excluded because it is difficult to distinguish between twins' fluids even they are dichorionic diamniotic twins and have two amniotic cavities. From 25 pairs we couldn't obtain neither amniotic nor gastric fluid and excluded them.

The gestational age of enrolled subjects varies between 26 to 40 weeks and birth weight between 935g to 3,593g. The figure 2 shows the results of stable microbubbles tests. We diagnosed RDS based on this result of stable microbubble test and chest X-ray. If there is some discrepancy between the result of stable microbubble tests and chest X-ray, we regard the microbubble test as more important and diagnosed RDS in a comprehensive manner.

We enrolled and measured phospholipid of specimens of 137 case. We presume that value of dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC), a type of phospholipid, in gastric fluid or amniotic fluid of newborn may be correlated with the severity of RDS. Hence we have to consider these data including other clinical data.

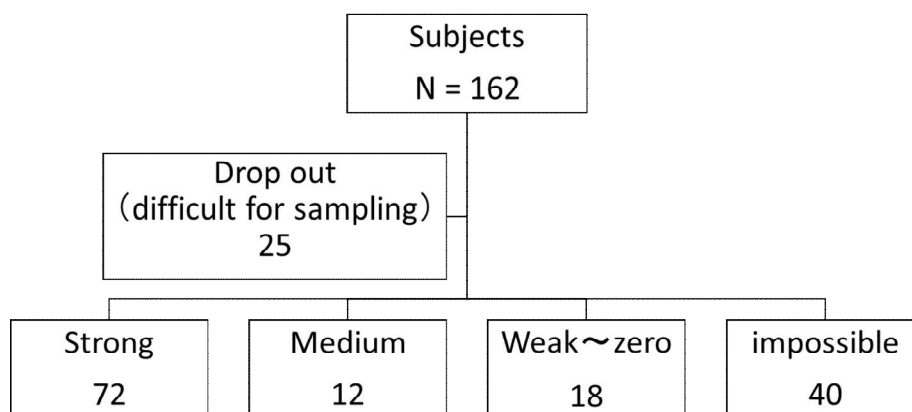
On the other hand, we make another task. The task is that "(5) create bedside test kit of phospholipid". We have two choices of mechanism measures DPPC easily. One is simplified mass spectrometer and the other is enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We start to consult medical testing device maker to explore the possibility of device measures DPPC. Finally, it is expected the data of relation between the affected rate of RDS and the concentration of some phospholipids in amniotic or gastric fluid.

Fig 1 SMT : stable microbubble test



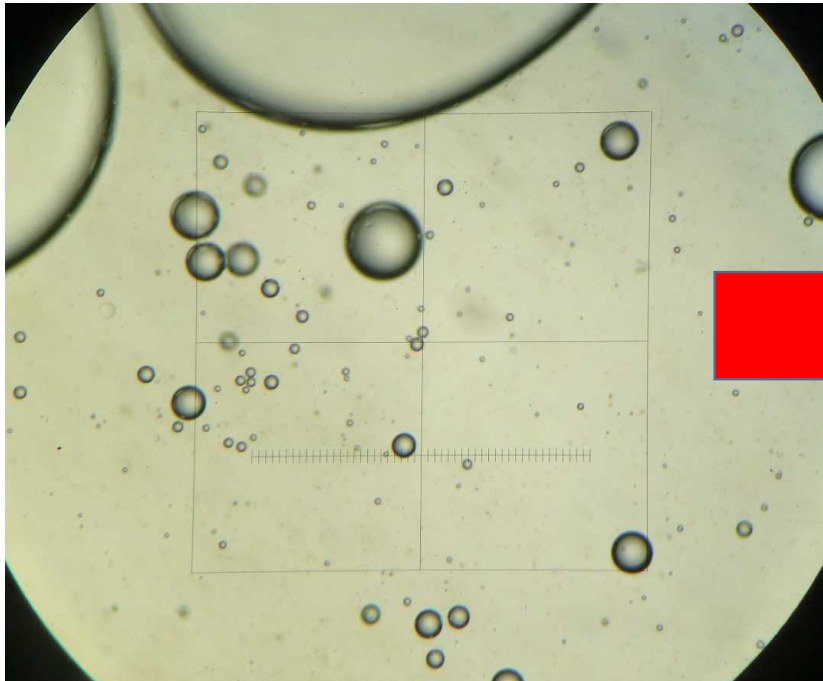
Whip amnion or gastric fluid by micropipette, count microbubbles of less than $15\mu\text{m}$ of diameter, and determine the risk of RDS. This figure shows over 20 microbubbles in this field and is determined the risk of RDS is low

Fig 2 The state of subjects and result of SMT in these subjects



新生児の呼吸窮迫症候群(RDS) 定性的検査から定量的検査へ

マイクロバブルテスト

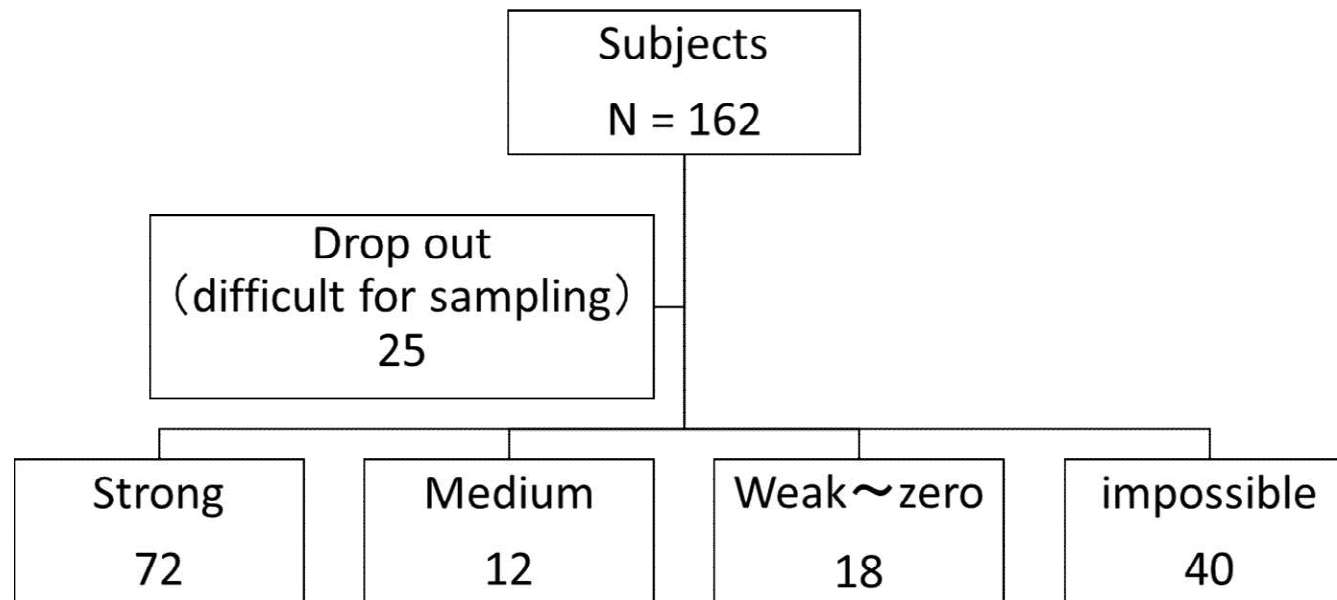


顕微鏡で泡の数を数える...

肺サーファクタント中のリン脂質測定



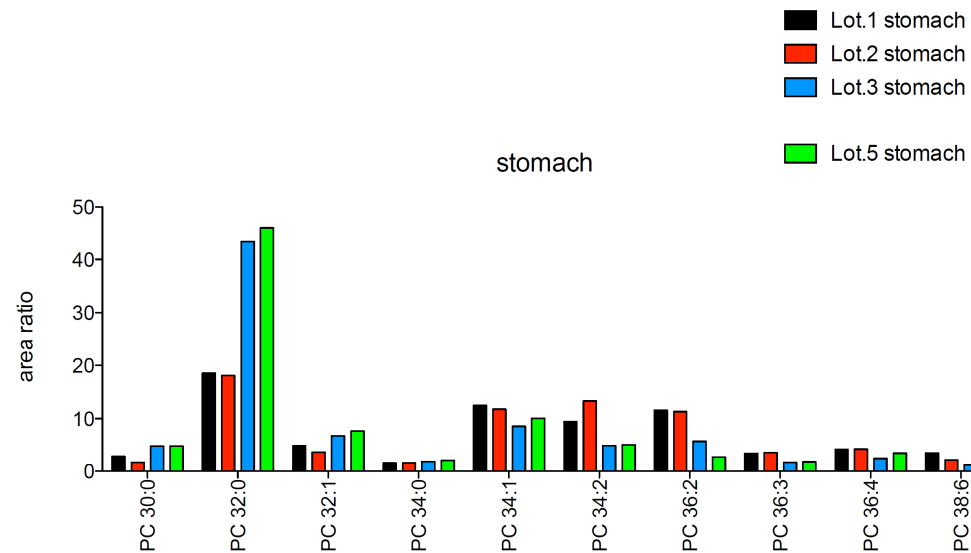
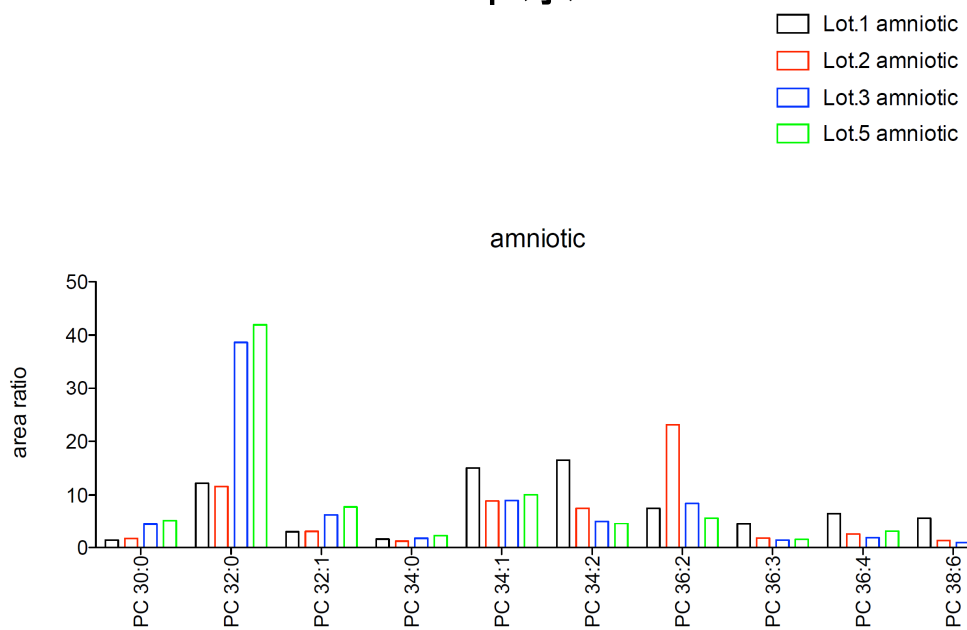
臨床試験の対象者の内訳と SMT(stable microbubble test)の結果



各種リン脂質定量測定結果

羊水

胃液



研究の進捗状況

	平成27年度	平成28年度	平成29年度
事業総括・倫理委員会提出	済		
リン脂質の検査方法の確立		済	
羊水・胃液を検体調整		羊水・胃液(正期産)の パイロット 済	
		羊水・胃液(正期産、早産)の 測定と解析 済	
			呼吸窮迫症候群の診断基 準の検討 済
簡易検査キット開発の検討			
事業のまとめ			

羊水・胃液中グリセロリン脂質解析方法の確立

羊水、胃液回収



遠心400 x g, 5 min



上清保管



リン脂質抽出：Bligh-Dyer法



質量分析計 Shimadzu LCMS8050

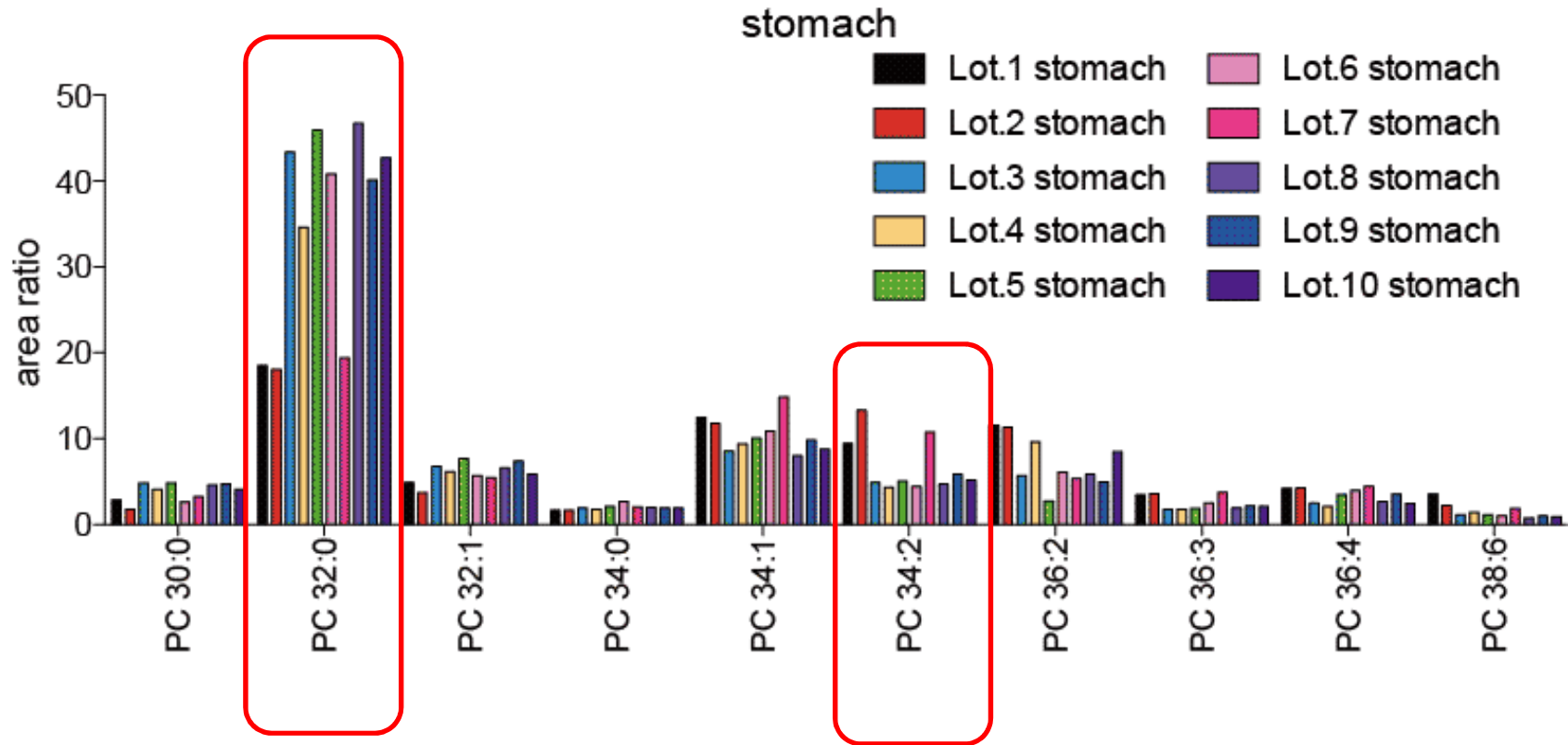


解析



島津Web site <https://www.an.shimadzu.co.jp/lcms/lcms8050/index.htm>より

胃液由来リン脂質（PC）組成の例



肺サーファクタンと主成分であるPC32:0の増減とPC34:2が逆相関していた

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 27指1404
 研究課題名： ヒト肺サーファクタント中のリン脂質測定による肺機能評価に関する研究
 主任研究者名： 五石 圭司

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当なし				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。