

胎児肺成熟度評価法としての羊水中磷脂質

Phospholipids in Amniotic Fluid as Clinical Evaluation of
Fetal Lung Maturity

岡山大学医学部産婦人科学教室(主任: 関場 香教授)

江口 勝人 Katsuto EGUCHI 吉岡 保 Tamotsu YOSHIOKA
小川 達博 Tatsuhiko OGAWA 関場 香 Kaoru SEKIBA**概要** 羊水 953例の tap から Lecithin, L/S ratio を測定し臨床的に比較検討した。

① 羊水中 Lecithin は妊娠35週までは低値であったが、妊娠36週から急激に増加し、以後妊娠40週までは直線的に増加した。妊娠40週を過ぎると増加の程度は減少するが、なお増加しつづけた。

② L/S ratio は従来の報告通り、胎令とともに漸次増加した。

③ 合併症のない妊婦について連続的に羊水穿刺をして、Lecithin と L/S ratio を同時測定した結果、Lecithin は5例とも胎令とともに増加傾向を示したが、L/S ratio は1例を除いて他の4例は増減の変動が大きかった。

④ Lecithin と R.D.S. の関係では28例の R.D.S. のうち1例を除いて27例は各週における Lecithin の平均値よりも低値であったが、L/S ratio と R.D.S. の間には Lecithin と R.D.S. にみられたような良好な相関は得られなかった。

⑤ R.D.S. の発症する critical level は Lecithin が 0.1mg% Lecithin Phosphorus と考えられ、しかも妊娠36週以前の早産例では R.D.S. 発症の危険性が高いことを認めた。

以上から、羊水中磷脂質によつて胎児の肺成熟度を評価する方法としては、L/S ratio よりも Lecithin の方がより信頼性が高いといえる。

緒 言

従来、胎児の情報を得るにあたっては、母体尿、あるいは血液中より経母体的にある種のホルモン及び酵素を測定することによつて推定していたが、最近のMEの進歩とともに、羊水の生化学的分析により直接的な胎児情報を得ることが可能となつた。

特に羊水中の Surfactant と胎児の肺成熟の関係が注目されて以来、この方面での研究は急速に進歩し、今や胎児診断学のひとつとして、すでに臨床に応用されるようになった。そして新生児呼吸障害のうちで最も頻度の高い Respiratory Distress Syndrome (R.D.S.) の主なる原因は肺 Surfactant の欠乏であることも周知の事実となつた。従つて、臨床的に分娩の時期を決定するに際して、羊

水分析により出生前に胎児の肺成熟度を正確に評価し、R.D.S. の発症を予知することができれば利用価値はまことに大きいのである。

羊水中 Surfactant の主成分は磷脂質であり、特に Lecithin, なかでも Dipalmitoyl Lecithin (D.P.L.) である。しかし現在のところ検査室レベルで routine に D.P.L. を測定することは困難であるので、多くの検査室においては羊水中 Lecithin, あるいは Lecithin と Sphingomyelin の比 (L/S ratio) によつて評価する方法がとられているが、このいずれがより正確に肺成熟度を反映しているかについては異論の多いところである。そこで今回これらの方法を測定して臨床的に比較検討したので報告する。

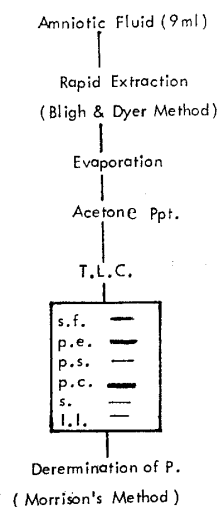
研究対象および方法

対象羊水はアメリカ合衆国の Georgia 州, Medical College of Georgiaの産科 (Nelson G.H. 教授), および岡山大学医学部附属病院産科で得られたものであり, 合計 931人から 953回の tap を採取して研究対象とした. このうち 689例は経腹壁的に, 164例は分娩時に経腔的に穿刺して羊水を採取した. なお血液, Meconium および腔粘液の混入した tap は対象から除外した. また羊水穿刺に際して, これが原因で胎児に重篤な合併症を起した症例は認めなかった.

得られた tap は可及的速やかに1500rpm にて10分間遠沈し, 上清を燐脂質の測定に供した.

9ml の羊水から Bligh & Dyer (1959) の方法により脂質を急速抽出したのち乾固した. その後 Gluck (1967) の方法により cold Acetone を加え30分間冷凍庫に放置し, 3000rpm で15分間冷凍遠沈して, その沈殿を窒素ガスで完全に乾固したのち, 1ml の Chloroform にとかして薄層クロマトグラフィーに spotting してタンク (Chloroform: MeOH: Acetic acid: H₂O = 400 : 200 : 48 : 16) の中で展開分離した. これにMolybdenum blue の spray を噴霧して, 青色を呈した Lecithin および Sphingomyelin の分画をかきとり, 濃硫酸を加えて digest し, Morrison (1964) の方法により遊離の燐として, Spectronic Colorimeter (B&L 社) で 822m μ の波長で吸光度を測定した. 従つて単位はすべてmg% Lecithin Phosphorus (以下

図1 procedure of experiment



mg%と省略) であらわした. この測定法では全過程を2時間30分から3時間で終えることができる (図1). また L/S ratio はそれぞれに含まれる燐の比であらわした.

R.D.S. は羊水採取後72時間以内に分娩したもので28例にみられ, R.D.S. の診断は小児科医が臨床的所見および胸部X線写真によつてくださったものである. また R.D.S. で死亡したもの10例は全例剖検を施行し, すべて肺硝子膜症 (Hyaline Membrane Disease) と診断された (表1).

研究成績

1. 妊娠週数との関係

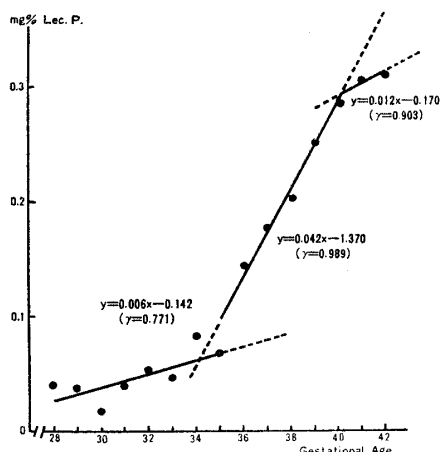
i) 羊水中 Lecithin: 羊水中 Lecithin は妊娠

表1 cases of R.D.S.

Gestation (weeks)	Body weight (g)	Lecithin (mg% Lec. p.)	L/S
28†	995	0.072	2.7
29†	865	0.004	0.5
30†	1,296	0.020	5.0
31†	1,220	0.031	2.1
32	1,268	0.013	1.9
32	1,680	0.012	2.0
32	1,694	0.025	4.2
32	1,300	0.020	0.8
33†	1,750	0.034	0.9
33†	2,350	0.023	1.1
34	1,568	0.062	2.8
34	2,640	0.009	3.5
34	2,078	0.006	0.6
35†	1,900	0.006	1.5
35	2,315	0.049	3.1
35	1,411	0.073	2.3
35	2,760	0.015	1.5
36	1,580	0.010	1.0
36	2,970	0.020	2.9
36†	2,512	0.011	1.4
36†	3,605	0.106	21.2
36	2,236	0.066	3.1
36	3,292	0.058	3.6
36	3,160	0.025	2.5
36†	4,058	0.063	12.6
37	3,632	0.057	7.3
38	2,864	0.087	6.4
39	3,270	0.154	9.7

†: died of R.D.S. (Hyaline Membrane Disease)

図2 Lecithin during Gestation



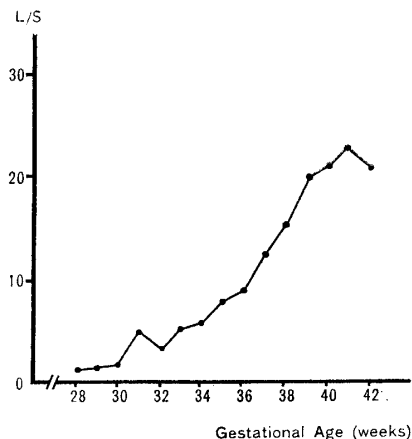
35週までは 0.081mg%以下と低値であるが、妊娠36週では 0.141mg%と急激に増加し、妊娠40週では0.287mg%であり、この間の関係は $Y = 0.042 \times -1.370$ ($r = 0.989$) の式であらわされる。妊娠40週を過ぎるとその増加の程度はやや減少し、妊娠42週では 0.310mg%であり、この間は $Y = 0.012 \times -0.170$ ($r = 0.903$) であらわされる。従つて、この成績から羊水中の Lecithin は妊娠35週から36週にかけて急激な surge が起ることを認めた。そして妊娠40週を過ぎてもやはり、わずかな上昇傾向がみられた(表2, 図2)。

表2 Lecithin & L/S ratio in Amniotic Fluid

Gestation (Weeks)	n	Lecithin Conc. M±S.D.	L/S ratio M±S.D.
28	9	0.040 ± 0.035	1.5 ± 0.6
29	8	0.038 ± 0.039	1.4 ± 0.5
30	10	0.019 ± 0.009	1.9 ± 1.0
31	16	0.040 ± 0.040	3.0 ± 0.9
32	20	0.053 ± 0.068	5.4 ± 9.1
33	37	0.047 ± 0.048	6.4 ± 4.6
34	46	0.081 ± 0.062	6.9 ± 7.9
35	111	0.068 ± 0.073	7.6 ± 6.6
36	109	0.141 ± 0.137	8.9 ± 10.3
37	149	0.178 ± 0.145	13.0 ± 9.9
38	121	0.205 ± 0.140	15.2 ± 12.6
39	130	0.252 ± 0.159	20.3 ± 17.7
40	159	0.287 ± 0.171	21.1 ± 24.2
41	19	0.308 ± 0.156	23.8 ± 15.9
42	9	0.310 ± 0.116	21.5 ± 18.5

Lecithin: mg% Lec. P.

図3 L/S ratio during Gestation



ii) L/S ratio: L/S ratio は胎令とともに増加する傾向がみられたが、Lecithin のごとく妊娠35週から36週にかけて明らかな surge は認められず、妊娠週数の増加につれて妊娠40週までゆるやかに上昇した(表2, 図3)。

iii) 同一症例における連続的な比較検討: そこで Lecithin と L/S ratio のいずれがより臨床症状と一致するかをみるために次の検討を行なった。即ち、何ら合併症を有しない正常妊娠5例について連続的に経腹壁羊水穿刺を施行し、Lecithin と L/S ratio について同時測定して比較検討した。

図4 Serial Analysis of Lecithin & L/S ratio

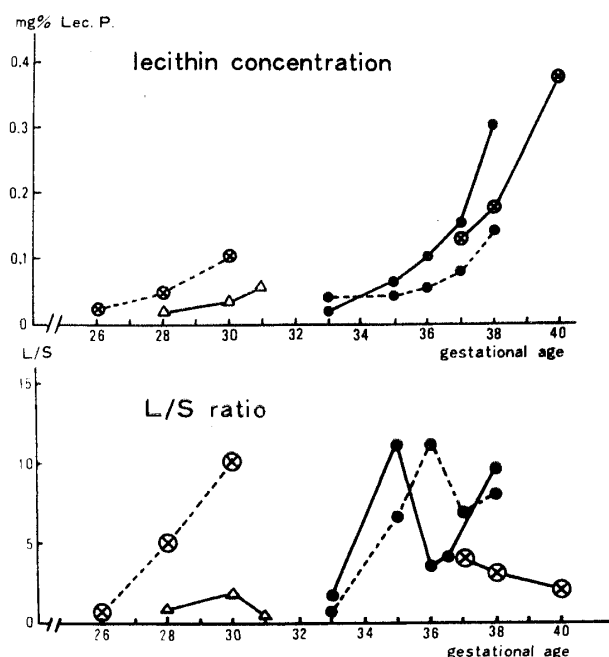


表 3 Risk of R.D.S.

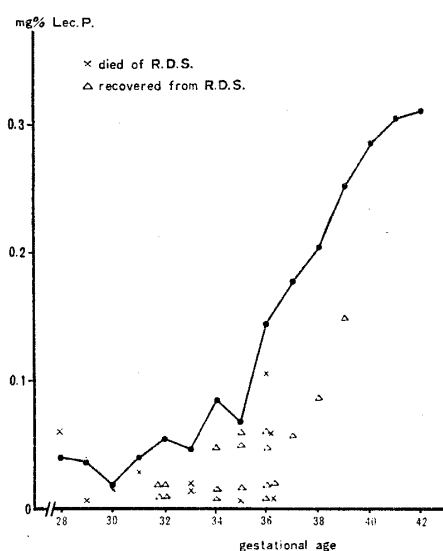
Gestation (weeks)	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Risk of R.D.S. (%)	16.7	20.0	9.1	18.8	7.4	10.3	9.8	9.5	1.5	1.0	1.3	0

Lecithin は胎令とともに確実に増加したが、L/S ratio については、1例は胎令とともに増加傾向を示したが、1例は逆に減少し、また他の3例は胎令が進むにもかかわらず増減の変動がはげしかった。(図4)。この間胎児の成長を示すと考えられる子宮底長、腹囲あるいは超音波断層法による児頭のBiparietal Diameterは順調に大きくなっていた。

2. R.D.S. との関係

各妊娠週数における Lecithin と R.D.S. 児の Lecithin の検討では、28例の R.D.S. のうち妊娠28週の1例を除いて、他の27例はすべて各週数の羊水中 Lecithin の平均値よりも低値であつたのが非常に特徴的であつた(図5)。

図 5 Lecithin Vs R.D.S.

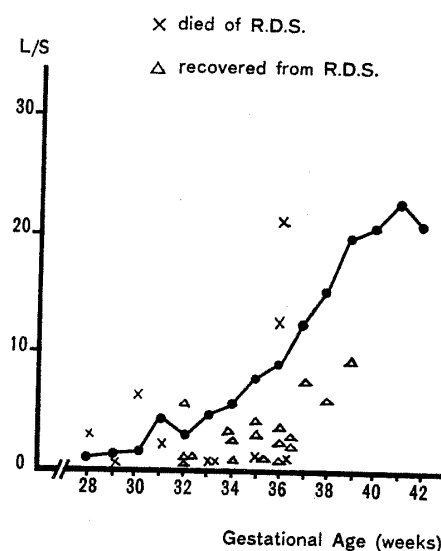


そこで妊娠各週の Lecithin が平均値以下になつた場合の R.D.S. の発症頻度については、妊娠32週までは例数が少ないこともあり、その割合も9.1%から20.0%とばらつくけれども非常に高率であつた。妊娠33週以後36週では7.4%から10.3%とまだ高い値を示しているが、妊娠37週で1.5%、38週で1.0%、39週で1.3%、40週以後は0

%と激減した(表3)。

また L/S ratio と R.D.S. の関係をみると R.D.S. が発症した28例のうちには L/S ratio が平均値以上で、しかもかなり高い値のものもみられ Lecithin と R.D.S. の関係にみられたような特徴あるパターンはみられなかつた。即ち、L/S ratio が平均値よりも高くても28例中5例の18.6%が R.D.S. になつており、L/S ratio では R.D.S. が発症すると思われる限界値の設定は困難であつた(図6)。

図 6 L/S ratio Vs R.D.S.



考 案

肺 Surfactant は胎児の肺成熟とともに肺胞腔に分泌され、その一部が羊水に移行するのである(Fujiwara 1968)。このことは形態学的に電顕により、あるいは生化学的にも証明されており広く認められている。このような肺 Surfactant は肺胞内面に lining layer を形成し、肺胞の surface tension を下げ、肺胞が collapse に陥るのを防いでいるのであり、肺硝子膜症で死亡した児の肺では、Surfactant が著しく低いといわれている。

著者ら(1975)はラットを用いた動物実験で胎

仔肺組織と羊水中の *Lecithin* を同時に測定した結果、胎児肺組織中の *Lecithin* は妊娠第19日目（ラットの妊娠期間は21日）より急激に増加し、妊娠第21日目には妊娠第18日目の約2倍に増加することを認めた。一方、羊水中の *Lecithin* は妊娠第20日目より急激に増加し、妊娠第21日目には妊娠第18日目の約4倍の増加を認め、肺組織と羊水では明らかな *time lag* がみられるが、胎児の肺成熟が羊水中の *Lecithin* 増加と密接に関係していることを報告した。Kikkawa et al. (1968) も兎を用いて胎児の肺組織中の *Lecithin* は妊娠第27日目（兎の妊娠期間は31日）頃から急激に増加すると発表しており、このような胎児肺組織での *Lecithin* 合成の増成は胎児肺上皮の発育にともなう細胞の成熟、すなわち肺成熟との関連が強く示唆されるのである。

しかし羊水中 *Surfactant* の測定法にも多くの問題を含んでおり異論の多いところである。現在、*Surfactant* の主成分が *Lecithin* であるところから、臨床的にみた場合 *total Lecithin* を測定するだけで充分肺成熟度を推定できるとする意見もあるが、一方 Gluck (1968) が提唱して以来 *cold Acetone* で処理したときに沈殿する *Lecithin* が *Surface Active Lecithin* であるとしてこの方法も一部の研究者で実施されている。彼はこの *Acetone* 処理した沈殿を実際に *Wilhelmy balance* で *surface tension* を測定した結果、*Acetone* 処理をしない場合に比べて、明らかに *surface tension* が低下することを証明している。しかしながらその沈殿 *Lecithin* が *Surfactant* 物質である *D.P.L.* であるかどうかについては、現在でも議論のわかれるところである。この *Acetone* 処理の方法は簡便であるけれども、特に水が混入した場合には測定値が非常に不安定になるという欠点がある。Nelson (1973) はこの方法を用いて *Acetone Precipitable Lecithin* を測定した結果、再現性は良好で4%以内であつたと報告している。しかしいずれにしても、このような検査法の是非を論ずるにあたつては、これが臨床的に意義があり、しかも *routine work* として迅速に臨床に応用でき

ることも重要である。

ヒト羊水中の *Lecithin* は、今回のわれわれの成績では妊娠34週までは妊娠週数につれてほぼ平行状態で低値であるが、妊娠35週から36週にかけて急激な *surge* が起り以後直線的に増加しつづけた。妊娠40週を過ぎるとその増加の割合は減少するが、なお増加をつづけた。Gluck et al. (1971) は羊水中の *Lecithin* は妊娠末期、特に妊娠38週頃から減少すると報告しており、この点はわれわれの成績と大いに異なるのである。一般に、妊娠末期には羊水量もやや減少することを考えると、この場合羊水中 *Lecithin* は濃縮される可能性もある。従つて、妊娠38週以後羊水中 *Lecithin* は減少するものか、あるいは増加しつづけるものかということは重要な問題であるが、さらにくわしい検討が必要であると思われる。

羊水中 *Lecithin* は羊水量における濃度で表現するために、羊水過多、あるいは羊水過少の場合において常に羊水量との問題が残るのである。Gluck (1971) は胎令につれて余り変動せず、比較的安定した値をとる羊水中 *Sphingomyelin* を分母にとり、いわゆる *L/S ratio* により定性的に測定することを提唱して以来、幾多の追試者および論文がみられる。Spellacy (1971) も *L/S ratio* によつて肺成熟度の評価を試みているが、この場合の利点は、その手技が簡単であり、しかも短時間に検査室レベルで *routine* に測定できることであると述べている。ただ彼らは *L/S ratio* を測定するのに *Densitometer* を使用しておりこの点がわれわれの方法とは異なっている。

しかし彼等の方法によつても、*L/S ratio* は胎令とよく相関すると報告している。われわれの成績でも *L/S ratio* は胎令とともに増加し、一見よく相関しているようにみえるが、個々の症例を連続的に測定すると、*Lecithin* は5例とも胎令とともに増加する傾向を示したが、*L/S ratio* は1例を除いて、他の4例は増減の変動が大きく、臨床的に胎児の発育を評価する場合、*L/S ratio* は信頼性のある検査法であるとは考え難い。

Biggs et al. (1973) は破水をした妊娠末期の

妊婦の子宮内にポリエチレンのカテーテルを装着し、1時間毎に合計27時間にわたって連続的に羊水を採取して、Urea N, Cl, 総磷脂質, Lecithin および L/S ratio を同時測定した。一般に胎児肺胞液から羊水中に移行するといわれているClは、Urea N とは全く相関がみられず、Cl と総磷脂質 および Lecithin はいずれも同じパターンで変動したが、Lecithin と L/S ratio については良好な相関がえられなかつたとしている。これらの結果より、彼は羊水中の Lecithin と Sphingomyelin はその origin が異なるのではないかと推論している。Nelson (1972) も L/S ratio を測定し、この2つの磷脂質の level の変化は互いにindependent なものであると報告している。そして、Biezenski (1971) は L/S ratio として Sphingomyelin を分母にもつてくることは奇異に感じるとさえ述べており、L/S ratio よりも Lecithin を測定することをすすめている。

ベッドサイドで行なえる簡易検査としては、Clements et al. (1972) の報告した Shake Test が最近注目されている。この検査法は非常に簡便であり、しかも極めて短時間で測定することができ、岡本、小川ら (1974) も本法を追試した結果、Surfactant Titer と Total Lecithin は良い相関を示し、特に Lecithin が極めて低値であつた R.D.S. 発症例の3例は全例 Shake Test 陰性であつたと報告している。

しかし著者ら (1975) も本法を試みたけれども false positive, false negative の症例がかなりあり、必ずしも Lecithin とは相関しないことを認めている。藤原ら (1975) も同様の現象をみており、この原因としては使用する試験管の大きさ、shake する場合のその方法、あるいは室温などが foam の形成に影響を与えるのではないかと考えられる。従つて、Shake Test は検査法としては最も簡易ではあるが、臨床応用する場合にはなお問題を残しているといえよう。

R.D.S. 発症の要因として最も重要な因子は肺 Surfactant の欠乏であるけれども、これ以外に肺組織自身の病理学のおよび物理化学的成熟、たと

えば肺組織の血管、リンパ管系の成熟が関与しており、さらには分娩時における低酸素症の有無、あるいは最近いわれている形態学的な Neuroepithelial Bodies の成熟等が考えられている。

しかしいづれにしても、胎令と R.D.S. 発症の risk からみれば妊娠36週までに圧倒的に多く発症しており、妊娠37週以後は激減していることから、いわゆる prematurity (未熟性) が R.D.S. 発症に重要な因子であると考えられる。妊娠38週、39週にそれぞれ1例ずつ R.D.S. が発症しているが、これらはいずれも糖尿病合併妊娠 Class C の児であることから、糖尿病合併妊娠の場合には胎令はすすんでいても R.D.S. になり易い何らかの要因があるものと思われる。

今日われわれにとつて最もものぞまれることは臨床的に R.D.S. の早期診断、さらには一步すすんで出生前診断により R.D.S. 発症を正確に予知できる方法が確立され、その critical level が設定されることである。そこでとかく論議の多い羊水中 Lecithin と L/S ratio を R.D.S. との関連について臨床的に検討したところでは、R.D.S. は28例のうち1例を除いてすべて各週における Lecithin の平均値以下で発症しているが、同一症例を L/S ratio でみた場合にはこの値が平均値よりも高くても5例が R.D.S. になつており、L/S ratio と R.D.S. の間に一定の傾向を見出すことはできなかった。

臨床的に R.D.S. が発症する Lecithin の critical level はほぼ 0.1mg% であろうと推測される。すなわち、羊水中 Lecithin が 0.1mg% 以下であり、しかも胎令が妊娠36週以前の早産例であれば R.D.S. 発症の危険性は非常に高いといえよう。この点について Nelson (1975) は R.D.S. 発症の Lecithin の critical level は 0.01mg% であると述べ、推計学上 Lecithin が 0.1mg% 以下であれば 100% の確率で R.D.S. が発症すると発表しているが、実際臨床的には必ずしもそうではなく、羊水中 Lecithin のみならず胎令が重要な意義を有しているのである。

Bhagwanani et al. (1972) は各胎令における羊

水中の Lecithin の 171例を解析し、13例の R.D.S. のうち 1 例を除き他の 12例はすべて Lecithin が 3.5mg/100ml 以下であつたところから、R.D.S. 発症の critical level を 3.5mg/100ml としている。特に Lecithin が 2.5mg/100ml 以下の場合には R.D.S. は非常に起り易いと報告している。

われわれの測定法における Lecithin の critical level と考えられる 0.1mg% は、Lecithin 量に換算すると 2.5mg/100ml となり、Bhagwanani の成績と非常によく一致している。

このように出生前に R.D.S. 発症を予知することは可能となつてきており、また最近ではさらに R.D.S. 発症を積極的に予防する研究が行なわれて、一部ではすでに臨床応用されているようである。すなわち、羊水中 Surfactant の低い妊婦に Glucocorticoid を投与して、胎児の肺成熟促進化が試みられている。

著者ら (1975) もすでにラットを用いて母体に Dexamethasone を投与し、胎仔の肺組織および羊水中の Lecithin は対照群に比べて約 2 倍に増加し、また Glucocorticoid の代謝阻害剤である Metopirone を投与して、逆に Lecithin が減少することを実験的に証明した。Glucocorticoid の他にも Thyroxine が肺成熟促進化の作用があるという報告がみられる。

しかしこれらの予防治療についてはいまだ研究段階であり、これらの薬剤の使用にあたっては慎重であるべきと考えている。将来、このような検査法ならびに予防治療の方法が確立されて、R.D.S. の児が激減することを期待するものである。

稿を終るにのぞみ御指導御協力いただいた Nelson G.H. 教授に深謝します。

なお本論文の一部は第 11 回日本新生児学会総会 (1975, 於札幌) で発表した。

文 献

- 江口勝人, 吉岡 保, 関場 香 (1975): 第 27 回日本産科婦人科学会総会抄録集, p. 87.
 岡本樹身, 小川雄之介, 小川次郎 (1974): 医学と界面活性, 5, 18.
 藤原哲郎 (1975): Personal communication
 Bhagwanani, S.G., Fahmy, D. and Turnbull, A.C. (1972): Lancet, 1, 7743.
 Biezenski, J.J. (1971): Trans. Sixth Roch. Tropho. Conf., p. 204.
 Biggs, J.S.G. and Graffney, T.J. (1973): J. Obstet. Gynecol. Br. Commonw., 80, 125.
 Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959): Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 911.
 Clements, J.A., Platzker, A.C.G., Tierney, D.F., Hobel, C.J. and Creasy, R.K. (1972): New Engl. J. Med., 286, 1077.
 Fujiwara, T., Adams, F.H., Sipos, S. and El-Salawy, A. (1968): Amer. J. Physiol., 215, 375.
 Gluck, L., Motoyama, E.K., Smits, H.L. and Kulovich, M.V. (1967): Pediat. Res., 1, 237.
 Gluck, L., Kulovich, M.V., Borer, R.H., Brenner, P.H., Anderson, G.G. and Spellacy, W.N. (1971): Amer. J. Obstet. Gynecol., 109, 440.
 Kikkawa, Y., Motoyama, E.K. and Gluck, L. (1968): Amer. J. Path., 52, 177.
 Morrison, W.R. (1964): Anal. Biochem., 7, 218.
 Nelson, G.H. and Lawson, S.W. (1973): Amer. J. Obstet. Gynecol., 115, 933.
 Nelson, G.H. (1975): Amer. J. Obstet. Gynecol., 121, 753.
 Spellacy, W.N. (1971): Trans. Sixth Roch. Troph. Conf., p. 177.

(No. 2981 昭 50・10・14 受付)