

# 高速液体クロマトグラフィーを用いた羊水中 Lecithin/Sphingomyelin ratio (L/S 比) 測定とその臨床応用

国立循環器病センター周産期治療科

榊 原 繁 樹

## Determination and Clinical Application of the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid by High Performance Liquid Chromatography

Shigeki SAKAKIBARA

*Department of Perinatology, National Cardio Vascular Center, Osaka*

**概要** 胎児の肺成熟度予測法として、高速液体クロマトグラフィーを羊水中の Lecithin/Sphingomyelin ratio (L/S 比) 測定に適用し、この測定系の有用性を検討した。

1) L/S 比が1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0に精製された市販の標準液について、これらを各5回ずつ測定した結果、L/S 比=1.0のものが $1.21 \pm 0.047$  (Mean $\pm$ S.D.) CV=3.84%, L/S=2.0が $2.12 \pm 0.012$  CV=5.59%, L/S=3.0が $3.64 \pm 0.34$  CV=9.40%, L/S=4.0が $4.41 \pm 0.32$  CV=7.35%, L/S=5.0が $6.16 \pm 0.41$  CV=6.75% (CVは変動係数)、と測定された。回帰式は、 $Y=0.8X+0.17$  (Y: 標準液のL/S値, X: HPLC値)  $r=0.984$ と非常に良好な相関と再現性が得られた。Lecithinの回収率は88.9%, Sphingomyelinの回収率は81.4%であった。

2) 界面活性がないとされている不飽和レシチンを除去する方法として、アセトン沈澱法が提唱されているが、同一検体30例を用いてアセトン沈澱法と、これを用いない方法とでクロマトグラフィーの値の相関を検討した結果、 $Y=3.25X-2.14$  (Y: アセトン沈澱法を用いないで得られたL/S値, X: アセトン沈澱法によるL/S値),  $r=0.987$ と極めて高い相関があり、アセトン沈澱法を省略できる事が示唆された。

3) 64例の臨床症例の内、L/S比測定後72時間以内に分娩したもの、41例を対象とした。この内9例にrespiratory distress syndrome (RDS)が発症した。L/S=4.20をRDS群と正常群との判別を行う限界値とした場合、RDSの正診率は、88.9%であった。また胸水貯留による肺拡張不全症例が3例見られたが、この限界値を適用し、全例に呼吸不全の予知が可能であった。

以上の結果より、HPLCによる羊水中のL/S比測定は胎児肺機能を予測する上で、TLC法に比し簡便でかつ、迅速、正確な方法であり、日常の臨床検査法として十分に利用できると考えられた。

**Synopsis** The lecithin/sphingomyelin (L/S) ratios in standard solution and amniotic fluid of 64 pregnant women were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The procedure is highly accurate, and the correlation coefficient between the HPLC value and standard solution was 0.984. The regression line was:  $Y=0.8X+0.17$  (Y: standard solution X: HPLC values).

In 64 pregnant women, 41 cases were delivered within 72 hrs of the amniotic fluid collection.

The prediction of respiratory distress syndrome (RDS) was performed with variables of the L/S ratio < 4.20.

8 of 9 babies (88.9% of sensitivity) who developed RDS and 3 of 3 (100% of sensitivity) other types of respiratory failure due to hydrothorax were predicted by this method.

In conclusion, this method is simple, rapid and sensitive for the prediction of respiratory distress syndrome and other respiratory failure.

**Key words:** Amniotic fluid • High performance liquid chromatography • Lecithin/Sphingomyelin ratio • Respiratory distress syndrome

### 緒 言

周産期医学の進歩により、極小未熟児の救命率

が向上して来ているが、肺が未熟なために、肺の界面活性物質であるサーファクタントを十分に産

生ずる事ができないことに起因する新生児呼吸窮迫症候群 (respiratory distress syndrome, RDS) は、新生児罹病、新生児死亡の主因となつている<sup>1)</sup>。

Gluck et al.<sup>13)</sup>が、1971年に薄層クロマトグラフィー (Thin Layer Chromatography, TLC) を用いて羊水中の L/S 比を測定し、この値が胎児の肺成熟度を反映しているとの報告を行つて以来、L/S 比測定は出生前胎児肺成熟の予測法として、広く一般化されており、またその変法も数多く発表されている<sup>4)11)14)24)</sup>。

しかしこの TLC 法は測定手技が煩雑で、測定に長時間を要する為、分析結果が遅延してしまう事も多い。一方高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) は TLC に比し、精度、感度、再現性に優れているばかりでなく、分析に要する時間も少なく、検体の展開に特殊技術もいらないという利点をもつている。

本研究において、羊水中の L/S 比測定に適したカラム及び展開液を選定し、HPLC 法による羊水分分析を行い、RDS の予知法として、有効な臨床結果を簡便かつ短時間で得られる方法を見出したのでここに報告する。

#### 研究方法

試薬類：米国 Sigma 社より市販されている L/S 比の標準液 LS-10, LS-20, LS-30, LS-40, LS-50 (これらは Lecithin と Sphingomyelin がそれぞれ重量比で 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 に調製されている) 及び、Lecithin (Sigma No P5763), Sphingomyelin (Sigma No S7004) を control として測定系の精度の確認に供した。

羊水：破水のない症例においては、経腹的に羊水穿刺を行い、前期破水の例でも羊水腔がある程度認められるものについては羊水穿刺を行い<sup>10)</sup>、羊水腔がほとんど消失している例については、腔鏡下に洗浄を行つた後、経時的に羊水を採取した。最近の報告によると頸管粘液やその他の腔分泌液は L/S 比やサーファクタントレベルに影響を与えないとの理由から<sup>5)8)15)20)</sup>、これらの羊水も検体に加えた。肉眼的に血液混入の見られるものや、

胎便の混入した検体は除外した<sup>25)</sup>。採取した羊水は、直ちに 1,300×g で10分間遠心分離し、上清を L/S 比測定に用い一部を -20°C で凍結保存した<sup>22)</sup>。60名の母体より延べ86回の検体を採取したが、このうち72時間以内に分娩を完了した例が41例であり、この41例について検討を加えた。

リン脂質の抽出：遠沈した羊水 0.8ml にメタノール 2.0ml を加え、Vortex Mixer にて攪拌後 20分間室温にて放置し、除蛋白を十分に行つた。これに 1ml のクロロフォルムを加え再度攪拌、更に 1ml のクロロフォルムと蒸留水 1ml を加え、十分に攪拌の上 1,300×g で10分間遠心分離を行つた。二層に分離された羊水の内、下層にあるクロロフォルム層を分離し、60°C の温浴内で N<sub>2</sub> ガス下に蒸発乾固させた。

高速液体クロマトグラフィー：使用したカラムは米国 Rainin 社の Microsorb column (Catalog No 80-125) である。本カラムは 5μm の球形シリカを充填したもので、長さ 25cm 直径 4.6mm である。インジェクションシステムは (仏) Gilson 社のポンプ、liquid delivery module Model 302 を使用した。ポンプヘッドは 5S 型を用いた。分離された検体の検出に用いる紫外線分光検出器はエスエム機器社より市販されている Variactor-311型を使用し、203nm の波長で検出を行つた。本装置の感度は 0.0005OD である。Variactor により検出されたリン脂質の紫外線吸光度は電気信号に変換されペンレコーダ (米国 Linear 社 Model 1201) によりチャート上に記録した。展開液はアセトニトリル：メタノール：H<sub>2</sub>O = 75 : 15 : 13 の組成とし、十分に超音波による脱気を行つた後、5S 型ポンプヘッドにより、1.0ml/分の流速にてカラムに展開させた。

測定系の精度：前述した Sigma 社の標準液をそれぞれ 1 種類ずつ 5 日間に亘り測定し、それらの平均値及び標準偏差より、変動係数 (Between-day CV) を求めた。

回収率：Lecithin 及び Sphingomyelin の回収率はそれぞれの標準品を同一の溶媒に一定量溶解したものの測定値と、羊水単独で測定したものと、この羊水に上記の標準品を加えたものを測定した

値の差から求めた。

検体の測定：前述の方法で乾燥固定したリン脂質分画にクロロフォルム：メタノール＝1：2の溶液40 $\mu$ lを加え十分に溶解させた後、20 $\mu$ lを高速液体クロマトグラフィーに展開した。検出されたリン脂質のチャート上の記録をデジタイザー（Graphtec社 Mitablet-2）とマイクロコンピュータ NEC-9801との組み合わせにより作成した自動面積計算装置により計算し、L/S比を面積比により求めた。

アセトン沈澱法との比較：アセトン沈澱法の必要性を検討する為、冷凍保存した30例の検体を2群に分け、先述の方法で、リン脂質分画を蒸発乾燥させた後、第1群には1mlの cold acetoneを加え、氷冷下に20分間放置した後、アセトン可溶分画を吸引除去し、試験管内に不溶分画を残し、再度窒素ガスにて蒸発乾燥させた。第2群はアセトンを加えず、直ちに HPLC に展開した。

RDSの診断：出生後24時間以内に気管内挿管及びO<sub>2</sub>投与による陽圧呼吸管理を必要とし、胸部X線上で Bomsell の3型以上の所見を呈し、呼吸管理を24時間以上必要とした症例を RDS とした。

またその他の肺拡張不全による呼吸障害例とは、妊娠中より胎内で胸水の貯留(Hydrothorax)が確認され、出生後気管内挿管による加圧呼吸によつても肺における酸素化ができなかつた症例とした。

## 結 果

標準液の測定結果及び典型的な肺成熟の症例、未熟肺の症例のチャートを図1、2、3に示した(図1、2、3)。

標準液の測定結果及び変動係数は表1の如くCVは3.8～9.4%であり、標準液のL/S比とHPLC値間での回帰式は、 $Y=0.80X+0.17$ (Y：標準液のL/S比, X：HPLC値),  $r=0.984$ と非常に高い相関と良好な変動係数が得られた(表1)。また Lecithin の回収率は88.9%, Sphingomyelin の回収率は81.4%であった。

同一検体30例について、アセトン沈澱法を用いた第1群と、アセトン沈澱法を用いなかつた第2

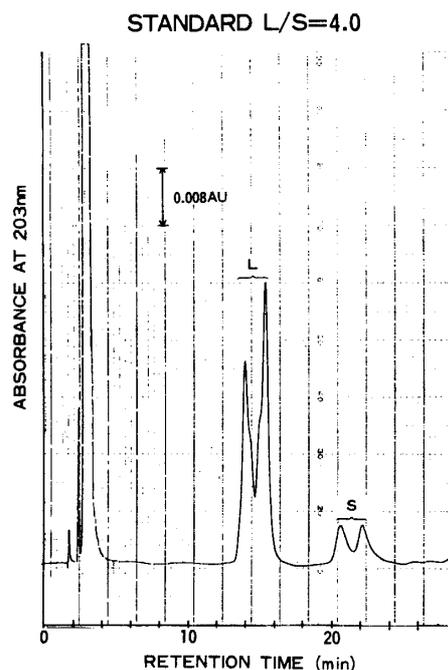


図1 Typical chromatogram obtained with the standard solution of L/S=4.0 using the HPLC method. L: lecithin; S: sphingomyelin

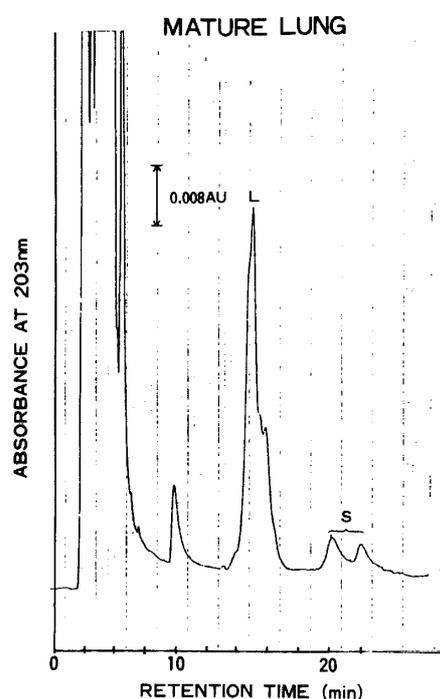


図2 HPLC chromatogram of a separation of lecithin (L) and sphingomyelin (S) from an amniotic fluid at 38 weeks of gestation.

群とのL/S値の測定結果を図4に示した。第1群と第2群間での回帰式は $Y=3.25X-2.14$ ,  $r=0.987$ (Y：アセトン沈澱を行わないL/S値, X：

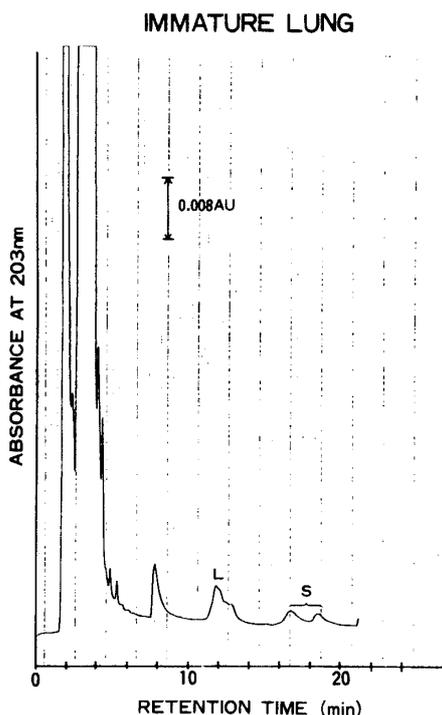


図3 HPLC chromatogram of a separation of lecithin (L) and sphingomyelin (S) from an amniotic fluid at 24 weeks of gestation.

表1 Precision of standard L/S solution determination

standard L/S	HPLC (between day)	
	$\bar{X}$	%CV
1.0	1.21	3.84
2.0	2.12	5.59
3.0	3.64	9.40
4.0	4.41	7.35
5.0	6.16	6.75

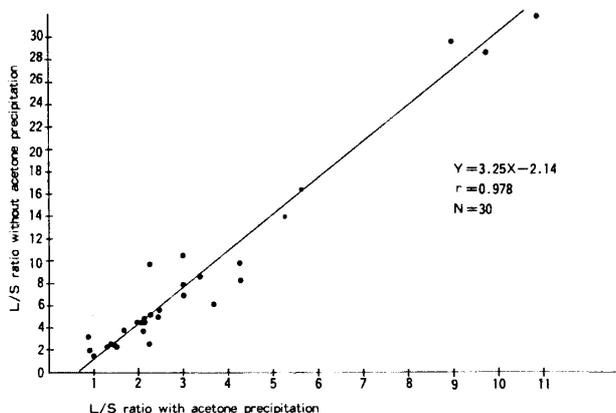


図4 Comparison of the L/S value with and without acetone precipitation to the same specimen.

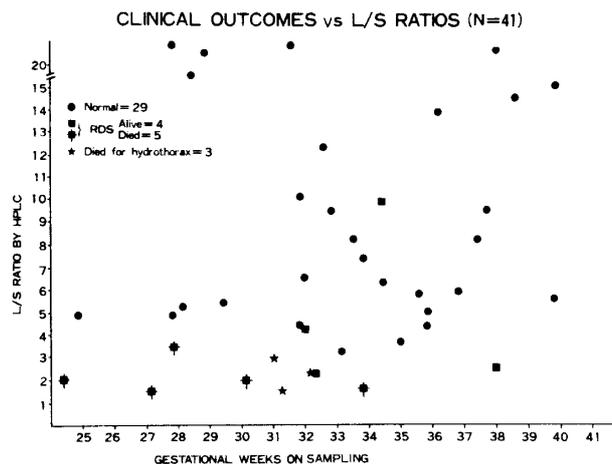


図5 L/S ratios obtained from the last sample within 72 hours prior to delivery in 41 pregnancies.

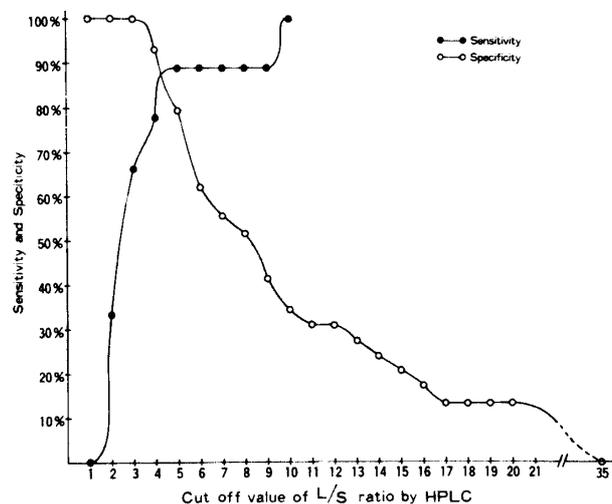


図6 Diagnostic threshold on sensitivity and specificity

アセトン沈澱を用いたときの L/S 値) と非常に高い相関を示した (図4)。

羊水採取より72時間以内に分娩が完了した41例の羊水中 L/S 比と妊娠週数の関係は図5に示す如くである (図5)。

臨床結果は41例中29例が正常群, 9例がRDS発症群, 3例がその他の呼吸不全群であった。これらの異常症例群の L/S 比, 出生時の妊娠週数, 出生体重, RDSの予測, 臨床診断とその転帰を表2に示した (表2)。

L/S 値: RDSの診断に対する sensitivity (ある設定値未満の L/S 値の群 ÷ RDS 発症群) と specificity (ある設定値以上の L/S 値の群 ÷ 正常

表2 Cases who developed RDS and other respiratory failure

Subject	L/S ratio	G.W.	B.W.(gr)	Prediction of RDS	Clin. Findings	Outcome
1. K. K.	1.57	33w+6d	1,201	positive	RDS	died
2. T. Y.	1.51	27w+1d	1,096	positive	RDS	died
3. J. O.	2.30	32w+2d	2,314	positive	RDS	alive
4. M. H.	2.60	38w+0d	3,126	positive	RDS	alive
5. S. N.	4.19	32w+0d	1,734	positive	RDS	alive
6. K. M.	2.02	24w+3d	627	positive	RDS	died
7. C. N.	9.85	34w+3d	2,434	negative	RDS	alive
8. M. M.	1.94	30w+1d	790	positive	RDS	died
9. Y. Y.	3.23	27w+4d	682	positive	RDS	died
10. R. Y.	2.32	32w+1d	2,404	positive	other	died
11. H. I.	1.50	31w+2d	2,774	positive	other	died
12. M. M.	2.88	31w+0d	2,348	positive	other	died

表3 L/S ratio analysis in the prediction of respiratory distress syndrome (RDS)

No of cases	Sensitivity <sup>(1)</sup>		Specificity <sup>(2)</sup>		Predictive value <sup>(3)</sup> of abnormal tests		Predictive value <sup>(4)</sup> of normal tests		Efficiency <sup>(5)</sup>	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
38	8/9	88.9	27/29	93.1	8/10	80.0	27/28	96.4	35/38	92.1

(1) Number of L/S ratios  $< 4.20 \div$  number of infants with RDS.

(2) Number of L/S ratios  $\geq 4.20 \div$  number of normal infants.

(3) Number of infants with RDS  $\div$  number of infants with an L/S ratio  $< 4.20$ .

(4) Number of normal infants  $\div$  number of infants with an L/S ratio  $\geq 4.20$ .

(5) (Number of true positive tests + the number of true negative test)  $\div$  total number of tests.

呼吸群)が共に高くなるようなL/S値を求めたのが図6である。これは横軸にL/S値、縦軸にsensitivity(closed circle)とspecificity(open circle)をとりL/S値の変化に応じてRDS児と正常新生児の占める割合(累積寄与率)が変化していく事を示した図である(図6)。

これによるとL/S=4.20を肺成熟の限界値として設定する事が臨床上有用である事が判る。この方法により判別した場合RDSの正診率は8/9=88.9%、一方正常群に対しては27/29=93.1%を正診できた(表3)。

その他の呼吸不全群: 3症例に胸水貯留による肺拡張不全が見られ、全例呼吸不全により24時間以内に新生児死亡に至ったが、本症例群も総てこの限界値で正診可能であった。

測定に要した時間は、90分であった。

### 考 案

Gluck et al.がTLCを用い、羊水中のL/S比を

測定することにより、胎児肺の成熟予知が可能であるとの発表を行って以来<sup>13)</sup>、数多くの報告があり、L/S比の測定法としては、TLCが標準モデルとされている<sup>4)11)13)14)24)</sup>。ところが原法では、抽出物の展開に多少の熟練を要し、また展開後の発色操作にも手間がかかるため、HPLC法に比べ、検査に長時間を要する。さらに原法では、抽出の段階でアセトン沈澱法を用いる。これは界面活性のないレシチンを取除く為の手法であるとされている<sup>13)14)</sup>。このために、TLCを原法に忠実に行おうとすれば、約半日を要し、また専門の測定施設と検査技師が必要となることもある。このような理由でshake testのような簡易法が用いられるが<sup>7)23)</sup>本法は、精度が高いとはいいがたく簡便法の域を脱し得ないのが現状である。またサーファクタントの主成分であるDS-PC(disaturated phosphatidylcholine)を酵素によつて直接測定する方法や<sup>3)</sup>、電気泳動法によつて肺のアポ蛋白を測定

する方法等も発表されているが<sup>2)</sup>、これらは確かに精度が高く、特に血液や胎便の混入した羊水でも、精度に影響を受けないというすぐれた面を持っているが時間がかかるという欠点がある。従って羊水中のL/S比測定を行うには、如何に迅速かつ精度の高い方法により、臨床現場に貢献できるかが、最大の問題点となる。

Jungalwala et al.をはじめとして<sup>18)</sup>、最近HPLCのL/S比測定への応用が発表されており、その臨床応用例も報告されているが<sup>6)12)17)21)</sup>、彼らの方法もアセトン沈澱法を用いgradientをかけたHPLCを行っているので、高速液体クロマトグラフィーの持つ、時間的有利さを相殺している。

Hobson et al.<sup>16)</sup>は同一検体181例を用いて、TLC法を用いたL/S比測定において、アセトン沈澱法の必要性の有無を検討した結果、肺成熟度の判定の予知に差異はない、との報告を行っている。

本研究において著者は、Hobson et al.の追試として同一検体30例について、アセトン沈澱法の必要性の有無をHPLC法について行つたが、 $r=0.978$ と非常に高い相関が得られたので、HPLCにも採用可能と考えた。

即ち、抽出段階では、Hobson et al.の提唱するアセトン沈澱法を用いない方法を採用し、また分離段階ではisocratic HPLCを用い、さらに計測段階では、ディジタイザーとマイクロコンピュータを採用した。これによりTLC法に比し、2時間以上の時間短縮が可能となり、全所要時間は90分間となつた。

L/S比の測定結果より、RDSの予測を行うには従来TLCでは $L/S < 2.0$ が一般化されており、これにより正診率は概ね88%であるがHPLCによるL/S比でのCritical Pointは報告者によつてそれぞれ異なっており、Ng et al.<sup>19)</sup>は $L/S < 3.0$ をRDS発症の限界点としている。またD'Costa et al.<sup>9)</sup>は我々とほぼ同様の方法を用いL/S比が7.0未満で9名中7名にRDSが発症し、 $L/S \geq 7.0$ ではRDSの発症がなかつたと報告している。しかしD'Costa et al.はアセトン沈澱法を省略できる

か否かについての検討を行っていない。

以上のように、HPLCを用いた場合、各研究者により、Critical Pointの設定値が様々であり、TLCの場合のように一様に $L/S \geq 2.0$ で肺成熟を判定するというまでには、一般化されていない。

著者はRDS発症に対するL/S値の限界値はsensitivityとspecificityが共に高値となる値を累積寄与率から求めた。

この方法によればRDSに対するsensitivityは88.9%となり、複雑な手技や多大の時間を要するTLCにとつて代わられる方法として、臨床に貢献する事が可能となつた。

またRDSとは診断されないが、胎児水腫の一症状としてみられる胸水貯留の症例が3例あり、これらの群は、全例出生後の呼吸不全にて死亡したが、本法による診断基準で予測可能であつた。

以上の結果から本研究により得られた方法を利用すれば、RDSばかりでなく胸水貯留による呼吸不全群も短時間で正確に予測する事が可能となつた。

稿を終えるに臨み多大なる御指導、御校閲を賜つた恩師、大阪大学医学部産科婦人科学教室谷沢修教授に深甚なる謝意を表するとともに、研究に御協力戴いた国立循環器病センター周産期治療科の諸兄姉に感謝致します。

#### 文 献

1. 藤井とし, 宇賀直樹, 布施養善, 沢田 健, 清水光政: 極小未熟児の死亡と長期予後. 周産期医学, 14: 1339, 1984.
2. 平野秀人: 羊水中胎児肺サーファクタントアポ蛋白による胎児肺成熟診断. 日産婦誌, 34: 889, 1982.
3. 宗重 彰, 岡崎武志, 岡村 均, 松浦俊平, 佐伯行一, 野崎光洋: ヒト羊水中肺活性物質の新しい測定法—dipalmitoylphosphatidylcholineの酵素的定量ならびにその臨床応用—. 日産婦誌, 34: 845, 1982.
4. Borer, R.C. Jr., Gluck, L. and Freeman, R.K.: Prenatal prediction of the respiratory distress syndrome (RDS). *Pediatr. Res.*, 5: 655, 1971.
5. Brame, R.G. and MacKenna, J.: Vaginal pool phospholipids in the management of premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145: 992, 1983.
6. Briand, R.L., Harold, S. and Blass, K.G.:

- High performance liquid chromatographic determination of the lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid. *J. Chromatogr.*, 223 : 227, 1981.
7. *Clements, J.A., Platzker, C.G., Tierney, D.F., Hobel, C.J., Creasy, R.K., Margolis, A.J., Thinbeault, D.W., Tooley, W.H. and Oh, W.* : Assessment of the risk of respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *New Engl. J. Med.*, 286 : 1077, 1972.
  8. *Cotton, D.B., Hill, L.M., Strassner, H.T., Platt, L.D. and Ledger, W.J.* : Use of amniocentesis in preterm gestation with ruptured membranes. *Obstet. Gynecol.*, 63 : 38, 1984.
  9. *D'Costa, M., Dassin, R., Bryan, H. and Joutsis, P.* : Validation of a simple rapid high performance liquid chromatographic method for amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratios. *Clin. Biochem.*, 18 : 27, 1985.
  10. *Feinstein, S.J., Vintzileos, A.M., Lodeiro, J.G., Campbell, W.A., Weinbaum, P.J. and Nochimson, D.J.* : Amniocentesis with premature rupture of membranes. *Obstet. Gynecol.*, 68 : 147, 1986.
  11. *Fewster, M.E., Burns, B.J. and Mead, J.F.* : Quantitative densitometric thin layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. *J. Chromatogr.*, 43 : 120, 1969.
  12. *Gebhardt, D.O.E., Soederhuizen, W. and Feyen, J.H.M.* : The fluorimetric determination of the lecithin to sphingomyelin ratio of amniotic fluid after high performance liquid chromatography. *Ann. Clin. Biochem.*, 22 : 321, 1985.
  13. *Gluck, L., Kulovich, M.V., Borer, R.C. Jr., Anderson, G.G. and Spellacy, W.N.* : Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 109 : 440, 1971.
  14. *Gluck, L. and Kulovich, M.V.* : Lecithin/sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 115 : 539, 1973.
  15. *Goldstein, A.S., Mangurten, H.H., Libretti, J.V. and Berman, A.M.* : Lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid obtained vaginally. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 138 : 222, 1980.
  16. *Hobson, D.W., Spillman, T. and Cotton, D.B.* : Effect of acetone precipitation on the clinical prediction of respiratory distress syndrome when utilizing amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratios. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154 : 1023, 1986.
  17. *Hsieh, J.Y.K., Turcotte, J.G., Waraska, J., Warburton, D. and Oh, W.* : High pressure liquid chromatography of standard and amniotic fluid phospholipids. *J. High. Res. Chrom. Chromat. Communic.*, 3 : 400, 1980.
  18. *Jungalwala, F.B., Evans, J.E. and McCluer, R. H.* : High performance liquid chromatography of phosphatidylcholine and sphingomyelin with detection in the region of 200 nm. *Biochem. J.*, 155 : 55, 1976.
  19. *Ng, H.T., Chen, C.Y. and Wei, R.D.* : High performance liquid chromatography to measure lecithin/sphingomyelin ratio. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 18 : 455, 1980.
  20. *Phillippe, M., Acker, D., Torday, J., Schiff, I. and Frigoletto, F.D.* : The effects of vaginal contamination on two pulmonary phospholipid assays. *J. Reprod. Med.*, 27 : 283, 1982.
  21. *Sax, S.M., Moore, J.J., Oley, A., Amenta, J.S. and Silverman, J.A.* : Liquid-chromatographic estimation of saturated phospholipid palmitate in amniotic fluid compared with a thin-layer chromatographic method for acetone-precipitated lecithin. *Clin. Chem.*, 28 : 2264, 1982.
  22. *Schwartz, D.B., Engle, M.J., Brown, D.J. and Farrell, P.M.* : The stability of phospholipids in amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141 : 294, 1981.
  23. *Sher, G., Statland, B.E. and Freer, D.E.* : Clinical evaluation of the quantitative foam stability index test. *Obstet. Gynecol.*, 55 : 617, 1980.
  24. *Touchstone, J.C., Chen, J.C. and Beaver, K.M.* : Improved separation of phospholipids in thin layer chromatography. *Lipids.*, 15 : 61, 1980.
  25. *Yambao, T.J., Tawwater, B., Chuachingco, J., Carrillo, A. and Schwartz, D.* : Effect of meconium on the detection of phosphatidylglycerol. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 150 : 426, 1984.

(No. 6251 昭62・9・16受付)