

羊水における肺サーファクタント・リン脂質マーカーの 酵素的定量に関する研究

佐藤秀紀 水本雅彦* 清水 浩**

札幌医科大学学生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

Studies on Enzymatic Assays of Phospholipid Markers for Pulmonary Surfactant in Amniotic Fluid

Hideki SATO, Masahiko MIZUMOTO and Hiroshi SHIMIZU

Department of Biochemistry (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief. Prof. T. AKINO)

Abstract The lecithin/sphingomyelin (L/S) ratio, disaturated phosphatidylcholine (DSPC), phosphatidylglycerol (PG) and surfactant protein A (SP-A) in amniotic fluid have been demonstrated to be specific surfactant markers. It is important for their clinical use that the determination of these markers be simple, rapid and sensitive. In the present study, we improved the enzymatic assays of DSPC, L/S ratio and PG in order to make the determination of these phospholipid markers more sensitive. An enzymatic assay method using phosphatidylinositol (PI) was developed for the first time in this study. Using these assay methods, the phospholipid markers of amniotic fluid at various gestational ages were determined.

In the enzymatic assays of DSPC, PC, sphingomyelin and PG, 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzene sulfonate (HDCBS) was used as a coupling agent with 4-aminoantipyrine and with hydroperoxide produced from either choline or glycerophosphate and their oxidases. The use of HDCBS was much more sensitive than phenol. For more specific and accurate determination of DSPC, we used phospholipase C from *Bacillus cereus* instead of bacterial or cabbage phospholipase D. PI was treated by phospholipase D to release myo-inositol, which was then determined enzymatically. The L/S and PG/PI ratios in amniotic fluid determined by the enzymatic methods correlated well with those obtained by the thin-layer chromatographic method.

The DSPC concentration in amniotic fluid increased gradually from 30 weeks gestation, and the development profiles of DSPC and the L/S ratio were well correlated. The increase of PG concen-

現所属

* 北海道大学医学部附属病院分娩部 (主任 藤本征一郎教授)

** Department of Medicine, National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, Denver, U. S. A. (Chief. Prof. R. J. Mason)

Abbreviations:

RDS,	respiratory distress syndrome	SP-A,	surfactant protein A
PC,	phosphatidylcholine	HDCBS,	2-hydroxy-3,5-dichlorobenzene sulfonate
DSPC,	disaturated phosphatidylcholine	MIDH,	myo-inositol dehydrogenase
DPPC,	dipalmitoyl phosphatidylcholine	MDH,	malic dehydrogenase
PG,	phosphatidylglycerol	TLC,	thin-layer chromatography
PI,	phosphatidylinositol	MeOH,	methanol
SPH,	sphingomyelin	AMP,	2-amino-2-methyl-1-propanol
L/S,	lecithin/sphingomyelin		

tration in amniotic fluid appeared from 35 weeks gestation, but PI concentration increased until 35 weeks gestation, and then decreased. The PG/PI ratio, therefore, increased dramatically from 35 weeks gestation. The development profile of SP-A in amniotic fluid correlated with that of DSPC, L/S ratio, PG and PG/PI ratio.

In conclusion, the enzymatic assay methods improved or developed here were useful for the microdetermination of surfactant phospholipid markers in amniotic fluid.

(Received October 30, 1990 and accepted November 13, 1990)

Key words: Pulmonary surfactant, Amniotic fluid, Enzymatic method, Respiratory distress syndrome, Fetal development

1 緒 言

新生児 RDS (neonatal respiratory distress syndrome, 新生児呼吸窮迫症候群)の出生前予知とその予防を可能にする目的で、羊水中の肺サーファクタントが測定されている^{1,2)}。これにより、出生前に胎児肺の生化学的成熟度を予知できるので、羊水肺サーファクタントの測定は周産期医学において、特に high-risk 妊娠を管理する上で重要な検査の一つとなっている。現在、臨床的には shake test³⁾あるいは lecithin/sphingomyelin(L/S) 比^{4,5)}などによって羊水中のサーファクタントを分析する方法が一般に行われており、その有用性が確立されている。しかし肺サーファクタントの生化学的研究が進展するとともに、個々の肺サーファクタント構成成分の代謝がそれぞれに調節されていることが示唆され⁶⁾、そのため羊水における個々のサーファクタント成分測定の必要性が生じてきた。一方、臨床的にも各サーファクタント・マーカーの組合せによる診断精度の向上が検討されている⁷⁻⁹⁾。

羊水中の肺サーファクタント特異的な生化学的マーカーとして、飽和ホスファチジルコリン (saturated phosphatidylcholine, DSPC)¹⁰⁻¹²⁾、L/S 比^{4,5)}、ホスファチジルグリセロール (phosphatidylglycerol, PG)^{11,13)}、ホスファチジリンシトール (phosphatidylinositol, PI)^{7,13)}及び肺サーファクタントアポ蛋白質 A (surfactant protein A, SP-A)⁸⁾の測定が特に重要である。従来、リン脂質マーカーは羊水 6 ml 以上を用いて TLC 法で分析されてきた^{14,15)}。最近 DSPC^{11,12)}、L/S 比^{16,17)}及び PG^{11,18)}の酵素法による微量定量が報告されたが、感度及び精度に若干の問題があると思われた。また PI の酵素法による定量については報告がない。これに対し、羊水 SP-A の二単クローン抗体による免疫定量法は Kuroki *et al.*^{19,20)}によって確立され、現在簡易測定キットが作製されている²¹⁾。

本研究は、羊水の肺サーファクタント・リン脂質マーカーである DSPC、L/S 比及び PG の酵素法による微量定量を高感度かつ高精度に改良し、また PI の酵素的定量法を確立することにより、微量の羊水で簡便、迅速にリン脂質マーカーを測定することを目的とした。ついでこれらの酵素法を用いて、各妊娠週期における羊水中のサーファクタント・マーカーを測定、肺成熟度診断の有用性を検討した。

2 実験方法

2.1 実験材料

羊水は北海道大学医学部附属病院分娩部、天使病院産婦人科、釧路労災病院産婦人科における妊婦から、胎児の肺成熟度の診断の目的で採取された。本研究には母体合併症を伴った妊婦からの羊水は除外し、残りの羊水計 235 検体を用いた。母体より採取した羊水を直ちに 4℃ で 10 分間、500×g で遠心し、細胞成分を除去したのち上清部分を -20℃ にて保存した。使用時にこれを室温に戻したが、この際不溶物が生じた場合は 37℃ に加温後覚伴する操作を反復し、透明になった試料を用いた。血液や胎便の混入した羊水は測定対象から除外した。

ホスホリパーゼ C (87 units/mg, *Bacillus cereus* 由来)、ホスホリパーゼ D (68 units/mg, *Streptomyces chromofuscus* 由来)、スフィンゴミエリナーゼ (26 units/mg, Microorganism 由来)、コリンオキシダーゼ (10.5 units/mg, *Arthrobacter globiformis* 由来)、グリセロキナーゼ (47 units/mg, *Streptomyces canus* 由来)、L- α -グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ (71 units/mg, *Aerococcus viridans* 由来)は東洋醸造社製を用いた。アルカリホスファターゼ (23.1 units/mg, calf intestine 由来)は、Biozyme 社から購入した。ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ (MIDH) (20 units/mg, *Enterobacter aerogenes* 由来)、リンゴ酸

脱水素酵素 (MDH) (200 units/mg, bovine heart 由来), グルタミン酸-オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) (200 units/mg, type I porcine heart 由来), ペルオキシダーゼ (99 units/mg, type I horseradish 由来), ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC), ホスファチジルグリセロール (PG), ホスファチジルイノシトール (PI), スフィンゴミエリン (SPH) は Sigma 社から購入した. 2-ハイドロキシ-3, 5-ジクロロベンゼンスルフォナート (HDCBS) は, Aldrich chemical 社から購入した. 特に断わらない限り, 試薬は市販の特級試薬を用いた.

2.2 DSPC の酵素的測定

DSPC の酵素法による定量は Muneshige *et al.*¹¹⁾ の方法を改良して行った.

2.2.1 DSPC 分画の精製

羊水 0.5 ml をクロロホルム-メタノール (CHCl₃/MeOH) (1:4, v/v) 1 ml と Vortex ミキサーを用いて混和した後, CHCl₃/MeOH (4:1, v/v) 2 ml を加えて再び混和し, 500×g で 10 分間遠心した. 下層の CHCl₃ 層を回収, N₂ 気流下に蒸発乾固した. この脂質抽出画分の残渣 (以下, 羊水の脂質抽出画分とはこの残渣を指す) に 0.5 ml の四塩化炭素に溶解した 3.1 mg のオスミウム酸²²⁾ を速やかに加えて 15 分間室温に放置した後, 再び N₂ 気流下に蒸発乾固した. これを少量の CHCl₃/MeOH (20:1, v/v) に溶解後, 0.8 g の中性アルミナ (Woel Pharma 社製) を充填したカラム (0.5×3 cm) に添加し, CHCl₃/MeOH (20:1, v/v) 10 ml で洗浄後, CHCl₃/MeOH/7 N アンモニア水 (NH₄OH) (70:30:2, v/v) 10 ml を用いて DSPC 画分を溶出した.

2.2.2 DSPC の酵素的定量

Chromogen 試薬 I は, コリンオキシダーゼ 3 U, ペルオキシダーゼ 10 U, 4-アミノアンチピリン 4 μmol, HDCBS 5 μmol を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 1 ml に溶解して調製した. 2.2.1 で得られた DSPC 画分を N₂ 気流下に乾固, 1% TritonX-100 0.2 ml を加えて 50°C, 3 分間保温後, 透明な液が得られるまで激しく覚拌した. これに borate buffer (pH 8.0) 0.35 ml, ホスホリパーゼ C 2 U (0.05 ml の borate buffer, pH 8.0 に溶解) を加えて混和し, 37°C でインキュベートした. 10 分後にアルカリホスファターゼ 1.5 U (0.05 ml の 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 に溶解) と 0.5 ml の Chromogen 試薬 I を加えて, さらに 20 分間インキュベートし, 510 nm で測定した. すなわち, DSPC のホスホリパーゼ C 処理で生じ

たホスホリルコリンは, アルカリホスファターゼによってコリンを遊離し, このコリンからコリンオキシダーゼによって 2 mol の過酸化水素が産生する. この過酸化水素は, ペルオキシダーゼ存在下に 4-アミノアンチピリンと HDCBS を red chromogen へと定量的に変換する. これを 510 nm で比色定量した.

標準試料として用いた DPPC は CHCl₃/MeOH (2:1, v/v) に溶解後, 脂質-P 定量で濃度を決定し蒸発乾固した. DPPC 1 μmol に対して 1 ml の 1% TritonX-100 を加え, 激しく覚拌して透明液とし標準試料とした.

2.3 L/S 比の酵素的定量

2.3.1 全 PC の酵素的定量

羊水 0.25 ml に, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.7 ml と スフィンゴミエリナーゼ 0.5 U (0.05 ml の 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 に溶解) を加えて 37°C, 10 分間インキュベートし, 脂質抽出前に SPH を酵素処理した. 次に脂質を抽出し, 脂質抽出画分に 1% TritonX-100 0.2 ml と borate buffer (pH 8.0) 0.35 ml を加えて混和し, ホスホリパーゼ C 2 U を加えて 37°C, 10 分間インキュベートした. ついで 2.2.2 で述べたのと同様にアルカリホスファターゼと Chromogen 試薬 I を加えてインキュベート後 510 nm で測定した.

2.3.2 スフィンゴミエリンの酵素的定量

羊水 0.5 ml を脂質抽出後, 脂質抽出画分に 1% TritonX-100 0.2 ml と 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.35 ml を加えて混和, ついでスフィンゴミエリナーゼ 0.5 U (0.05 ml の 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 に溶解) を加えて 37°C, 10 分間インキュベートした. 次にアルカリホスファターゼ 0.5 U, Chromogen 試薬 I 0.5 ml を加えて 37°C, 20 分間インキュベート後 510 nm で測定した.

SPH の酵素的定量の原理は, 以下に示す通りである. SPH はスフィンゴミエリナーゼによってホスホリルコリンとセラミドに分解する. ホスホリルコリンからアルカリホスファターゼによりコリンが遊離する. このコリンから 2.2.2 で述べた原理と同様にして red chromogen を生成し, これを比色定量する. 2.3.1 で求めた全 PC と 2.3.2 で測定した SPH から L/S 比を計算した.

2.4 PG の酵素的定量

PG の酵素法による定量は, Muneshige *et al.*¹¹⁾ の方法を改良して行った. 羊水 1 ml に 0.2 ml の 0.5 M CaCl₂/50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を混和した後, 脂質を抽出した. 脂質抽出画分を少量の CHCl₃ に溶解し, ケイ酸 (Wakogel C-200, 100-200 mesh,

和光純薬) カラム (0.3 g) に添加, 10 ml の $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (19:1, v/v) で洗浄後, 10 ml の $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) で PG 画分を溶出した。

PG 画分を, N_2 気流下に乾固後, 1% TritonX-100 0.2 ml を加え 50°C, 3 分間保温し, 激しく覚拌した。これに 25 mM $\text{CaCl}_2/50$ mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.5 ml とホスホリパーゼ D 3 U (0.05 ml) の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)/0.05% 牛血清アルブミン/0.1% TritonX-100 に溶解を加えて 37°C, 10 分間インキュベートした。次に 0.5 ml の Chromogen 試薬 II (グリセロキナーゼ 0.5 U, グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ 5 U, ペルオキシダーゼ 10 U, 4-アミノアンチピリン 1 μmol , HDCBS 1.5 μmol , ATP 750 nmol, MgCl_2 5 μmol を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 1 ml に溶解) を加えて 20 分間インキュベート後 510 nm で測定した。PG の酵素的定量の原理は, 以下に示す通りである。PG はホスホリパーゼ D の作用によりグリセロールを遊離する。この遊離グリセロールは, ATP とグリセロキナーゼによってグリセロール-3-リン酸へと変換され, 次にグリセロール-3-リン酸オキシダーゼにより過酸化水素を産生する。過酸化水素は上記した発色反応により red chromogen を生成する。

2.5 PI の酵素的定量

PI からホスホリパーゼ D によってミオイノシトールを遊離し, このミオイノシトールを MacGregor and Matschinsky²³⁾ の方法に従って酵素法により定量した。羊水 1.0 ml を脂質抽出後, 脂質抽出画分にエーテル 0.5 ml, 2.5 mM $\text{CaCl}_2/50$ mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.5 ml, ホスホリパーゼ D 3 U (0.05 ml) の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)/0.05% 牛血清アルブミン/0.1% TritonX-100 に溶解) を加えて 30 分間室温で激しく覚拌した。このエーテル層を取り除き, 下層をエーテルで 2 回洗浄した後乾固した。この下層画分に 0.1 N NaOH 10 μl を加えて 75°C, 20 分間加熱した後, 0.16 N HCl 10 μl を加えて 25°C, 10 分間放置後, 次に 0.3 M Tris-HCl buffer (pH 9.0) 0.1 ml を加えた後, MIDH 0.15 U (10 μl の 0.3 M Tris-HCl buffer, pH 9.0 に溶解), MDH 0.04 U (10 μl の 0.3 M Tris-HCl buffer, pH 9.0 に溶解), MI 試薬 (20 μl) (1.2% 牛血清アルブミン, 3 mM NAD^+ , 60 mM オキサロ酢酸, 0.3 M Tris-HCl buffer, pH 9.0) を加えて 25°C, 40 分間インキュベートした。ついで 0.03% 過酸化水素水 10 μl を加えて 75°C, 10 分間加熱した。その後 MDH 6.5 U (10 μl の 50 mM 2-AMP-HCl, pH 9.9 に溶解), GOT 0.84 U (10 μl の 50

mM 2-AMP-HCl, pH 9.9 に溶解), リンゴ酸指示試薬 0.4 ml (0.6 mM NAD^+ , 30 mM グルタミン酸, 50 mM 2-AMP-HCl, pH 9.9) を加えて 25°C, 40 分間インキュベート後, 6 N リン酸 0.5 ml を加えて 60°C, 15 分間処理した。以上の反応液の 1/5 量に 2 ml のアルカリ試薬 (9 mM イミダゾール/0.01% 過酸化水素/7 N NaOH) を加えて 60°C, 15 分間処理した後, 室温に放置し, 蛍光光度計により Ex 365 nm, Em 460 nm で蛍光強度を測定した。

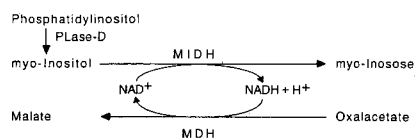
PI の酵素法による測定原理を Fig. 1 に示す。PI はホスホリパーゼ D によりミオイノシトールを遊離する。このミオイノシトールは NAD 存在下に MIDH の作用でミオイノソースとなり NAD は NADH になる。しかし, NADH が蓄積するに伴いこの反応は抑制される²⁴⁾。この反応を押し進めるために, 生成した NADH をオキサロ酢酸を基質とする MDH の作用で再酸化して NAD を生成するが²⁵⁾, この時オキサロ酢酸からリンゴ酸が生成される。すなわちこの 2 つの反応を組み合わせると, ミオイノシトールから等モルのリンゴ酸が生成されることになる。このリンゴ酸は再び MDH の作用で NAD と反応し NADH を生成する²⁵⁾。すなわちこのリンゴ酸の指示反応で生成した NADH をアルカリ処理²⁶⁾ することによって, より強い蛍光物質に変化させた後蛍光分析する。以上の原理により PI から遊離したミオイノシトールを酵素的に定量した。

2.6 SP-A の免疫学的定量

SP-A の測定には羊水 0.1 ml を用いて, Shimizu *et al.*²¹⁾ の方法により開発された SP-A のアッセイキット (帝人株式会社生物医学研究所製) で測定した。

2.7 薄層クロマトグラフィー (TLC) による PC, SPH, PG, PI の定量

I step:



II step (Malate indicator reaction):

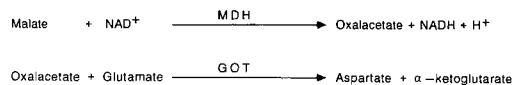


Fig. 1 Enzymatic reactions used for the determination of phosphatidylinositol. PLase-D, phospholipase D; MIDH, myo-inositol dehydrogenase; MDH, malic dehydrogenase; GOT, glutamate oxaloacetate transaminase

PC, SPH の定量には, 羊水の脂質を Bligh and Dyer 法²⁷⁾で抽出後, シリカゲル G (Merck 社)/0.4 M ホウ酸 (25 g/50 ml) を用いて作製した厚さ 0.2 mm の薄層板にスポットし, 1 次元方向へ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{conc NH}_3$ (70:30:3:2, v/v), 2 次元方向へ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (70:30:5, v/v) の溶媒系²⁸⁾で展開した. 展開後ヨウ素蒸気で PC, SPH を検出, 各スポット部分のゲルをかきだし, これに 70% 過塩素酸を加えて酸化後 Bartlett 法²⁹⁾で脂質-P を測定した.

PG, PI の定量には, シリカゲル 60 TLC プレート (Merck, 20×20 cm) を用い 1 次元方向へ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{ジイソブチルケトン}/\text{酢酸}/0.4 \text{ M}$ ホウ酸水 (45:15:30:10:4, v/v), 2 次元方向へ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{ジイソブチルケトン}/\text{ピリジン}/\text{水}$ (30:25:25:35:8, v/v) の溶媒系³⁰⁾で展開後, 1 次元方向にアセトンで 2 回展開し, ヨウ素蒸気により PG, PI を検出, PC, SPH と同様の方法で脂質-P を測定した.

3 成 績

3.1 DSPC の酵素的定量の改良に関する検討

Muneshige *et al.*¹¹⁾ によって報告された DSPC の酵素的定量法の感度と精度を高めるために改良を試みた. Muneshige *et al.*¹¹⁾ の方法では, 羊水脂質のオスミウム酸処理後に行うアルミナカラムクロマトグラフィーで得られる DSPC 画分には, SPH の混在はさけられないと思われた. *Streptomyces chromofuscus* 由来のホスホリパーゼ D は SPH にも作用するので, SPH の一部をも定量することになり実際の DSPC 値より高値を示す可能性があり改良が必要と考えられた. 0.8 g のアルミナカラムに種々の量の DPPC と SPH をそれぞれ単独に添加し, 10 ml の溶媒で溶出した時, DSPC 画分に DPPC は 90% 以上回収されたが, SPH の回収率は 5 nmol 添加で 15%, それ以上の量では 20% 以上であった (データは示さない). すなわち, この方法では SPH により DSPC が実際量よりも見かけ上多く測定されることはさけられないと結論されたので, 本研究では第 1 の改良としてホスホリパーゼ D の代わりに PC 特異的ホスホリパーゼ C を用いて精度を高めようとした. 改良の第 2 は, 4-アミノアンチピリンと結合する芳香族化合物に一般に使用されているフェノール^{11,16)}の代わりに HDCBS¹⁸⁾を用い感度を高めようとした.

Fig. 2-A に 2.2.2 で述べた方法によって得られた DPPC の標準曲線を示す. HDCBS を用いるとフェノールよりも高感度に測定できた. この標準曲線は 2-40

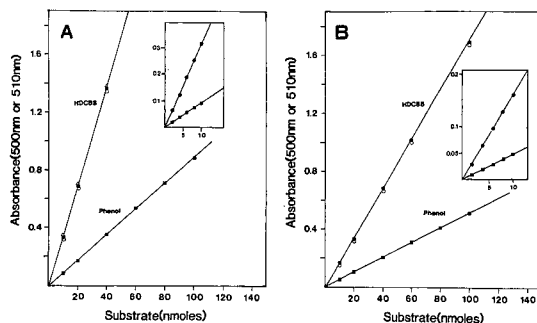


Fig. 2

A: Standard curve for the enzymatic assay of phosphatidylcholine (●), choline phosphate (Δ) and choline (○). Inset is for the enzymatic assay of phosphatidylcholine at low concentrations.

B: Standard curve for the enzymatic assay of phosphatidylglycerol (●) and glycerol (○). Inset is for the enzymatic assay of phosphatidylglycerol at low concentrations.

nmol の範囲で直線性があり, 2 nmol まで測定可能であった. 以下の PI 以外のリン脂質酵素法の発色反応には全て HDCBS が用いられた. また反応中間体であるホスホリコリン, コリンを基質として同条件で定量すると, DPPC と重なる標準曲線が得られた. この結果から, PC は本実験条件によってホスホリパーゼ C, アルカリホスファターゼによりほぼ完全に分解されていることが示された. この方法による DPPC の回収率は 87-92%, CV 値は 4-7% であった. なお PC 特異的ホスホリパーゼ C は, SPH の約 5% 及びリゾホスファチジルコリン (LPC) の約 10% を分解することが判明した (Fig. 3-A). SPH はアルミナカラムで DSPC 画分へ約 10-20% 溶出し, その約 5% が測定されることになるが, これ程度の誤差は実際上支障ないと考えられた. また羊水中 LPC 濃度は痕跡程度なので無視し得ると考えられた.

3.2 L/S 比の酵素法による測定の基礎的検討

全 PC の測定には PC 特異的ホスホリパーゼ C を用いた. 前述のようにこのホスホリパーゼ C は SPH を約 5% 分解するので, より正確な PC 値を得るために, スフィンゴミエリナーゼ処理で羊水中の SPH を分解した後, PC を測定する方法を用いた. この方法による羊水からの PC の回収率は 94.3-98.6%, CV 値は 4.4-7.0% であった.

スフィンゴミエリナーゼは SPH を特異的に分解し, PC 及び LPC の分解率は 1% 以下であった (Fig. 3-B). 2.3.2 で述べた SPH の酵素的定量による標準曲線は 2-40 nmol の範囲で直線性が得られた (データ

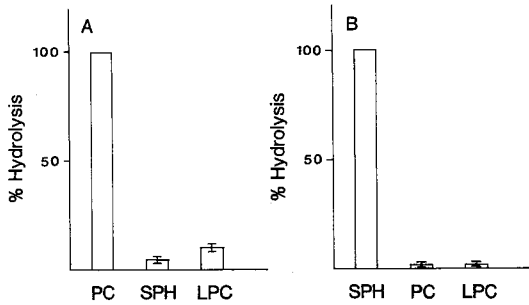


Fig. 3

- A : Specificity of phospholipase C from *Bacillus cereus* for choline containing phospholipids
 B : Specificity of sphingomyelinase from *Microorganism* for choline containing phospholipids

は示さない)。特に 10 nmol 以下の低濃度でも正確な値を得ることができた。SPH 測定の実験中間体であるホスホリルコリン、コリンを基質として同条件で定量した時、SPH の標準曲線とほぼ重なる標準曲線が得られたので、SPH はほぼ完全にコリンに分解され、red chromogen へ転換されていることが示された。この酵素法による PG の回収率は 92-96%、CV 値は 4.2-8.6%であった。

この酵素法で得た L/S 比と TLC 法で得られた L/S 比との値を羊水 14 例で比較検討した (Table 1)。それ

ぞれの羊水において酵素法で得た値は、TLC 法で得た値に非常に一致しており、相関係数 $\gamma=0.948$ の良い相関が見られた。

3.3 PG の酵素的定量法の基礎的検討

羊水を Ca^{2+} を含む buffer で処理、酸性リン脂質を Ca 塩へ変換後脂質抽出した。羊水中のカルジオリピン量は微量で通常は無視し得るが、この脂質はホスホリパーゼ D 処理でグリセロールを遊離するので、厳密な意味では可及的にこれを除去すべきであろう。Ca 処理後の羊水脂質をケイ酸カラムに添加すると、カルジオリピン Ca 塩は $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (19:1, v/v) で溶出するので³¹⁾、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) に溶出する PG からは明らかに除去し得る。2.4 に述べた改良法によって得られた PG の標準曲線は、2-60 nmol の範囲で直線性が得られた (Fig. 2-B)。HDCBS を用いた場合は、Muneshige *et al.*¹¹⁾ が用いたフェノールよりも勾配の急な曲線が得られ、感度よく測定できた。PG 測定の反応中間体のグリセロールを基質として同一条件で定量すると、PG に重なる標準曲線が得られた。この酵素法による PG の回収率は 92-96%、CV 値は 5-6%であった。

3.4 PI の酵素的定量法の基礎的検討

PI をホスホリパーゼ D で処理し、遊離したミオイノシトールを酵素的に定量した²³⁾。2.5 で述べた方法に

Table 1 L/S ratio of amniotic fluid as determined by the proposed enzymatic method and by thin-layer chromatography

amniotic fluid No.	Enzymatic assay		TLC-assay	
	Phosphatidylcholine (L)	Sphingomyelin (S)	L/S	L/S
	nmol/ml			
1	69.6	13.2	5.3	5.4
2	12.8	4.4	2.9	4.5
3	34.0	5.4	6.3	3.6
4	123.2	7.0	17.6	10.7
5	186.4	10.0	18.6	18.6
6	359.2	13.6	26.4	34.9
7	30.0	7.0	4.3	5.3
8	221.6	8.8	25.2	32.6
9	13.6	11.2	1.2	0.6
10	98.8	5.6	17.6	17.8
11	84.0	9.6	8.8	8.1
12	44.8	18.8	2.4	1.9
13	91.2	9.4	9.7	6.8
14	94.4	10.8	8.7	9.8

よって測定した PI の標準曲線は 2-20 nmol の範囲で直線性があつた (Fig. 4). ミオイノシトール, リンゴ酸を PI と同一の条件で測定すると, PI の標準曲線とはほぼ同一の標準曲線が得られた. この結果から, ホスホリパーゼ D により PI は完全に分解されてミオイノシトールを遊離し, このミオイノシトールから等モルのリンゴ酸が生成されることが示された. この酵素法による PI の回収率は 91.3-94.6%, CV 値は 7.2-10.0% であつた (Table 2).

酵素法で得られた PI 及び PG 値による PG/PI 比と TLC 法で得られた PG/PI 比を羊水 14 例を用いて比較検討した (Table 3). PG/PI 比は両法でほぼ同じであつた例と酵素法で高値を示した例があつた. 酵素法による PI 値が TLC 法で得られた値より低値を示したために PG/PI 比が高値を示したと思われた. 両方法間における相関係数は, $\gamma=0.779$ であつた.

3.5 妊娠週数の進行に伴う DSPC, L/S 比, PG, PI の変化

Fig. 5 に羊水 140 検体について酵素法で測定した DSPC 濃度と妊娠週数との関係を示す. 平均値の推移から, 羊水 DSPC 濃度は妊娠週数の進行に伴い 30 週から徐々に増加するが, 特に妊娠 33 週前後からは急激に

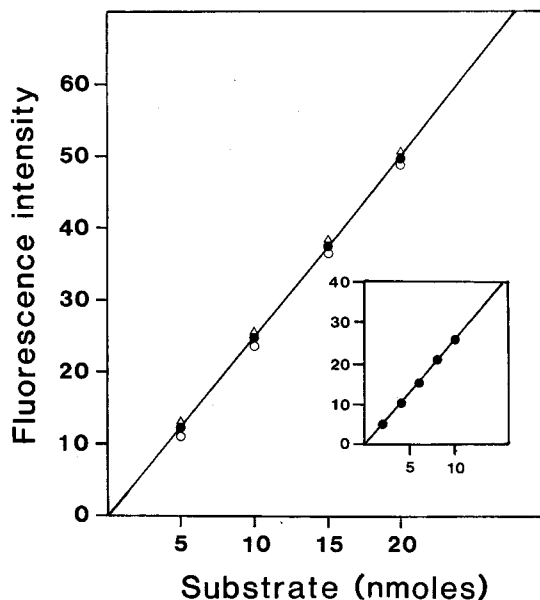


Fig. 4 Standard curve for the enzymatic assay of phosphatidylinositol (●), myo-inositol (△) and malic acid (○). Inset is for the enzymatic assay of phosphatidylinositol at low concentrations.

Table 2 Recovery and reproducibility of phosphatidylinositol by the enzymatic assay

Analytical recovery study				
PI added nmol	Estimated as PI nmol	Recovery		n
		nmol	%	
0		6.1	—	
5	11.1	10.5	94.6	
10	16.1	14.7	91.3	
15	21.1	19.6	92.9	

Reproducibility study				
amniotic fluid sample	Mean			n
	(nmol)	S. D. (nmol)	C. V. (%)	
1	15.3	1.11	7.2	6
2	3.8	0.38	10.0	5

増加した. DSPC 濃度の胎児肺成熟度の基準値として, Torday *et al.*¹⁰⁾ は 0.5 mg/dl, 宗重ら¹²⁾ は 1.0 mg/dl を提唱している. DPPC の分子量 752 から計算すると, この値は 6.6-13.3 nmol/ml に相当するので, Fig. 5 ではこの中間値の 10 nmol/ml を基準値として示した. 羊水検体中, 生後児に RDS が発症したのは 5 例であつたが, 全例で DSPC 濃度は 10 nmol/ml 以下であつた.

Fig. 6-A に羊水 64 検体について酵素法により測定した L/S 比と妊娠週数の関係を示す. 妊娠 34 週から 36 週にかけて L/S 比の上昇がみられた. L/S 比の肺成熟度の基準値は, Gluck *et al.*⁴⁾ が提唱して以来 2.0 が広く用いられている. 検体中, 生後 RDS を発症したのは 2 例であつたが, L/S 比はともに 2.0 以下であつた.

DSPC 濃度と L/S 比を同時に測定し得た 24 例の羊水検体について両者の相関を見た (Fig. 6-B). 両測定の間には良好な相関がみられ ($\gamma=0.885$), 両方法ともに未熟値 (面積“a”)あるいは成熟値 (面積“b”)を示したものは計 21 例で, 両者の診断合致率は 87.5% の高率であつた.

羊水検体 113 例及び 62 例について, 酵素法で測定した PG 及び PI 濃度と妊娠週数との関係を Fig. 7-A 及び Fig. 7-B に示す. 両者を同時に測定し得た 61 例における PG/PI 比と妊娠週数の関係を Fig. 7-C に示す. PG 濃度は, DSPC より遅れて上昇した. すなわち, 35 週前後から徐々に上昇し, 38-39 週でピークに達した. PG 濃度の肺成熟の基準値は, 宗重ら³²⁾ が 0.36 $\mu\text{mol/dl}$ と報告しているので, Fig. 7-C に 3.6 nmol/ml を基準値として示した. 検体中 2 例が生後 RDS を発症したが, 2 例ともに 0.2 nmol/ml の低値であつた.

Table 3 PG/PI ratio of amniotic fluid as determined by the proposed enzymatic method and by thin-layer chromatography

amniotic fluid No.	Enzymatic assay			TLC-assay
	PG	PI	PG/PI	PG/PI
	nmol/ml			
1	8.8	14.3	0.62	0.53
2	13.4	7.8	1.72	1.70
3	21.4	19.0	1.13	1.40
4	12.6	4.0	3.15	1.24
5	9.6	10.4	0.92	0.98
6	22.5	7.0	3.21	1.24
7	12.3	7.0	1.76	1.22
8	38.7	16.4	2.36	1.16
9	7.9	5.4	1.46	1.55
10	22.5	7.2	3.13	1.24
11	3.4	5.4	0.63	0.42
12	48.7	8.4	5.80	3.10
13	30.0	8.2	3.66	1.33
14	10.8	3.4	3.18	1.85

Phosphatidylglycerol: PG, Phosphatidylinositol: PI

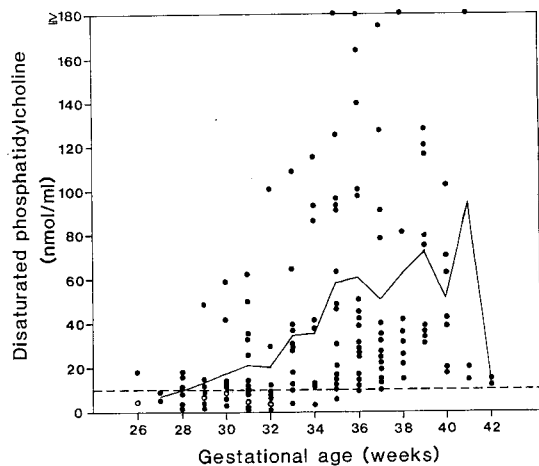


Fig. 5 The concentration of disaturated phosphatidylcholine in human amniotic fluid as a function of gestational age (weeks) (total samples=140). The solid line represents the mean concentration of disaturated phosphatidylcholine in amniotic fluid. closed circles, cases of normal pregnancy; open circles, cases of respiratory distress syndrome.

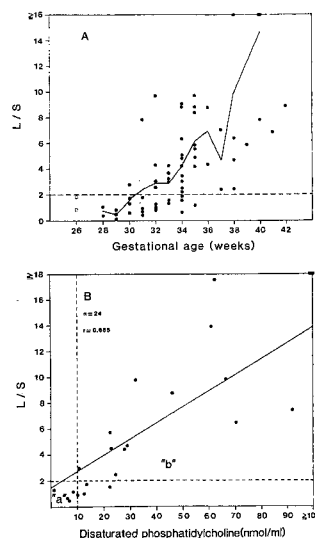


Fig. 6

- A: The L/S ratio determined by the enzymatic assays of phosphatidylcholine (L) and sphingomyelin (S) in human amniotic fluid as a function of gestational age (total samples=65). The solid line represents the mean L/S ratio in amniotic fluid.
- B: Relationship between L/S ratio and disaturated phosphatidylcholine concentration in amniotic fluid (total samples=24). As the critical values, 2.0 for L/S ratio and 10 nmoles/ml for disaturated phosphatidylcholine were taken. The area "a" and "b" represent immature and mature areas, respectively.

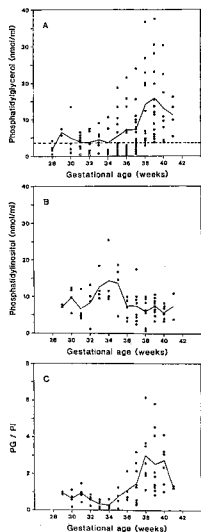


Fig. 7

- A: The concentration of phosphatidylglycerol (PG) in human amniotic fluid as a function of gestational age (weeks) (total samples=114).
3.6 nmoles/ml of phosphatidylglycerol concentration was taken as the critical value.
- B: The concentration of phosphatidylinositol (PI) in human amniotic fluid as a function of gestational age (weeks) (total samples=63).
- C: The PG/PI ratio in human amniotic fluid as a function of gestational age (total samples=61)
- The solid lines represent mean values in amniotic fluid.
closed circles, cases of normal pregnancy;
open circles, cases of respiratory distress syndrome.

これに対し羊水 PI 濃度は妊娠 35 週まで上昇するが、それ以後は低下した (Fig. 7-B). PG/PI 比は 35 週までは 1.0 前後であるが、36 週から急激に上昇し、38 週では 3.0 に達した (Fig. 7-C).

3・6 リン脂質マーカーと SP-A との相関

SP-A と DSPC, L/S 比, PG あるいは PG/PI 比を同時に測定し得た羊水検体について、これらリン脂質マーカーと SP-A との相関を検討した (Fig. 8). SP-A と DSPC (Fig. 8-A) は羊水 53 例で相関係数 $\gamma=0.860$, SP-A と L/S 比 (Fig. 8-B) は羊水 51 例で相関係数 $\gamma=0.838$, SP-A と PG (Fig. 8-C) は羊水 56 例で相関係数 $\gamma=0.796$, SP-A と PG/PI 比 (Fig. 8-D) は羊水 31 例で相関係数 $\gamma=0.764$ の相関が得られた。DSPC 及び L/S 比と SP-A との相関が特に高かった。

Hallman *et al.*⁸⁾ は、本研究で用いたのと同じ SP-A

アッセイキットを使用し 469 例の羊水検体を分析した結果から、羊水 SP-A の未熟値を $0.6 \mu\text{g/ml}$, 成熟値を $3.0 \mu\text{g/ml}$ とすることを提唱した。SP-A の基準値を $0.6 \mu\text{g/ml}$ として比較すると、SP-A と DSPC がともに基準値以下 (未成熟値) あるいは基準値以上 (成熟値) を示す例は、53 例中 43 例で 81.1%, SP-A と L/S 比では 51 例中 38 例で 74.5%, SP-A と PG では 56 例中 48 例で 85.7% の診断合致率であった。

4 考 察

4・1 羊水リン脂質マーカーの酵素的定量法の検討

リン脂質の酵素的定量法の精度と感度に最も影響する因子は、酵素の基質特異性、試料の調製そして検出法である。本研究では、PC, DSPC, SPH 及び PG 酵素的定量の検出法 (発色反応) として、HDCBS を含む試薬を共通に使用した。4-アミノアンチピリンと結合する芳香族化合物として、フェノール^{11,16)} が一般に用いられるが、本研究では McGowan *et al.*¹⁷⁾ が報告した HDCBS を使用し、これらのリン脂質を高感度に測定し得た。

PC, DSPC の酵素的法に用いる酵素については、キャベツ由来のホスホリパーゼ D が PC 特異的なので従来使用されてきた¹⁶⁾。しかしこの酵素の活性は低く、酵素的定量試薬としては適当でない。Streptomyces chromofuscus 由来のホスホリパーゼ D³³⁾ はきわめて活性は高いが、広い基質特異性をもつ。SPH を分解しコリンを遊離するので PC 特異的定量法とはならない。本研究では Bacillus cereus 由来の PC 特異的ホスホリパーゼ C³⁴⁾ を用い、PC より生じたホスホリルコリンをアルカリホスファターゼで分解してコリンを遊離する方法を用いた。両酵素ともきわめて高活性で PC を酵素的に分解した。しかし、このホスホリパーゼ C は僅かながら (約 5%) SPH を分解することが判明した。試料中の SPH 量が比較的少量の場合は無視し得るが、L/S 比の基準値となる全 PC 定量の場合は無視し得ない。特に L/S 比が低値の場合、正確な PC 量の測定が必要となる。本研究では羊水をスフィンゴミエリナーゼで処理し、SPH を分解せしめた後に脂質抽出し、PC 特異的ホスホリパーゼ C を用いて PC 量を測定した。

PI の酵素的定量の報告は本研究が最初である。MacGregor and Matschinsky²³⁾ によるミオイノシトールの酵素的定量に基づき、PI から遊離したミオイノシトールを測定した。この方法は二酵素カップリング法を用いており、ミオイノシトールは pmol レベルで測定されるが、PI 定量の際はホスホリパーゼ D の影響で測定感

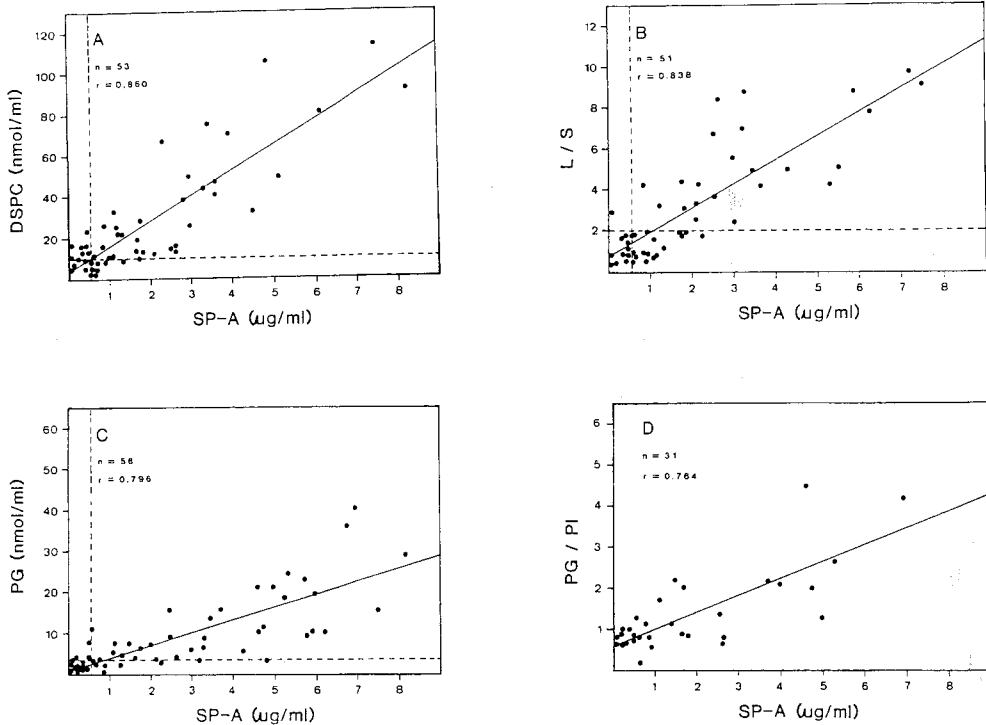


Fig. 8 Relationships between SP-A concentration and disaturated phosphatidylcholine concentration (A) (total samples=53), L/S ratio (B) (total samples=51), phosphatidylglycerol concentration (C) (total samples=56), and PG/PI ratio (D) (total samples=31). $0.6\mu\text{g/ml}$ was taken as the critical value of SP-A concentration in amniotic fluid. 10nmol/ml of disaturated phosphatidylcholine. 2.0 of L/S ratio and 3.6 nmol/ml of phosphatidylglycerol were taken as the critical value.

度は nmol レベルとなった。PI の高感度定量法の確立は今後の課題である。

従来の TLC 法で得られた羊水リン脂質の成熟度パターンと比較し、酵素法で得られた今回の結果はよく一致したが、PG については若干の違いが認められた。Hallman *et al.*¹³⁾ によると羊水 10 ml を用いた TLC 法で PG は 35 週までは殆んど検出されずそれ以降に検出されるという。臨床的には現在 TLC 法^{14,15)} 及び抗 PG 抗体を用いた AmnioStat-FLM³⁵⁾ によって検出される PG の有無が診断基準として用いられる。しかし高感度の酵素法を用いたとき、35 週以前にも 5 nmol/ml 前後の PG が測定されており、宗重ら³²⁾ が指摘したように今後は羊水 PG 量を定量的に追跡せねばならないと思われる。

以上の酵素法によるリン脂質の測定に要する羊水量は、全 PC は 0.25 ml 、DSPC と SPH は各 0.5 ml 、PG と PI は各 1 ml であった。TLC 法は通常 6 ml 以上を必要とする。従来の TLC 法に比べ酵素法は少量の羊水中で十分であり、測定は簡便かつ比較的短時間で終

了するので、今後酵素法が TLC 法に代わって羊水リン脂質の測定に用いられることになる。

4.2 羊水リン脂質マーカーの測定による胎児肺成熟度診断の意義

妊娠後半における羊水の構成成分は、主として臍帯、胎児尿及び呼吸器に由来する。胎生期の肺胞は、肺胞及び気管で生成された液体 (lung fluid) で満たされており、胎児の呼吸運動などにより lung fluid は肺から羊水へ移行する³⁶⁾。従って羊水中の肺サーファクタント特異成分の分析から胎児肺の成熟度に関する情報が得られる。現在は、羊水中サーファクタント特異マーカーの濃度は、胎児肺の成熟度を忠実に反映するものと結論されている¹⁻²⁾。胎児肺成熟度を診断する基準値は、臨床的に RDS 発症率から設定されてきた。すなわち、ある値を基準値として設定した時、それ以下の未熟値を示した場合の RDS 発症の予知率およびそれ以上の成熟値であった時の RDS 非発症の予知率がともに高率である値が基準値とされている。

羊水 DSPC の肺成熟度の基準値は報告によって異な

る。羊水 DSPC による RDS 診断基準を最初に報告した Torday *et al.*¹⁰⁾ は、基準値を 0.5 mg/dl に設定した時の RDS 発症の予知率は 83% と報告した。樋口ら³⁷⁾ は基準値を 0.5 mg/dl に設定すると RDS 発症の予知率は高いが、sensitivity は低下し、RDS 発症の正診率は大幅に低下することになるので、宗重ら¹²⁾ の提唱している 1.0 mg/dl が基準値として適当であろうとしている。本研究では 0.5-1.0 mg/dl の中間値である 10 nmol/ml を基準値とした。

羊水 L/S 比の基準値を 2.0 とすることは広く認められている。Gluck *et al.*⁴⁾ によると、L/S 比と RDS 発症の相関はきわめて高く、L/S 比 2.0 以下の 42 例中 40 例 (95%) が RDS となり、L/S 比が 2.0 を超えると 92 例全例に RDS の発症はなかったという。本研究で DSPC 10 nmol/ml、L/S 比 2.0 と設定した時の両者の相関はきわめて高かった。

羊水 PG 量の酵素法による基準値は、宗重ら³²⁾ が示した値 (0.36 μ mol/dl) が報告されているのみである。L/S 比が成熟値を示しているにもかかわらず RDS を発症する false positive 例で、羊水 PG が TLC 法で検出されない例がしばしば経験された^{13,38)}。特に糖尿病妊娠では、L/S 比は正常であるにも拘らず PG の出現が著しく遅延し、出生後児に高頻度に RDS が発症することが指摘されている³⁸⁻⁴⁰⁾。Kulovich *et al.*⁷⁾ は、L/S 比とともに PG と PI を同時に測定し、“lung profile” を決定することで、出生前に正確な肺成熟度の予測が可能であるとしている。成熟動物肺サーファクタントでは、PG は総リン脂質の約 10% を占め主たる酸性リン脂質であるが⁴¹⁾、胎生期肺の PG 含量はきわめて低く、代わって PI が主たる酸性リン脂質となっている^{42,43)}。つまり胎生末期の肺で DPPC が著明に増量する時期の主たる酸性リン脂質は PI である。出生直前に PI が急激に減少するに伴って PG 量の増加が起こる^{42,43)}。この間に PG、PI 合計の組成は変わらないので、PI 合成から PG 合成への変換が起こると考えられている。すなわち、胎生末期に DPPC 合成を促進する機構と PI から PG への合成の変換を促す機構は異なると考えられる。病的妊娠時に、羊水 L/S 比と PG 出現の不一致がしばしばみられる^{13,38-40)} ことはこれを支持するとおもわれる。

羊水中に PG が存在する時は、胎児肺の成熟を意味しよう。しかし、PG が存在しない時の RDS の予知率は L/S 比、DSPC による予知率に比べ劣っていると報告されている^{44,45)}。TLC 法による PG 存在の有無ではなく、PG の酵素的定量法による再検討が必要である。この意味で PG/PI 比の検討が重要と思われる。足立ら⁴⁶⁾、

Honda *et al.*^{47,48)} は胎生期のみならず肺胞表面が障害される病態時にも、肺サーファクタントで PG と PI の変化が起こることを見出し、PG/PI 比が最も敏感に肺サーファクタントの変化を反映することを報告した⁴⁶⁾。羊水における PG/PI 比についての臨床例を用いた詳細な検討はないが、本研究で確立した両リン脂質の酵素法による定量により、羊水 PG/PI 比の臨床的検討が広く行われることを期待したい。

4.3 羊水 SP-A とリン脂質マーカーの相関

SP-A は肺サーファクタント特異蛋白質であり、リン脂質マーカーに比べ肺サーファクタント測定精度は高い。本研究で用いた SP-A アッセイキットは羊水 0.1 ml で測定可能できわめて高感度であり、今後羊水サーファクタントの測定には SP-A 濃度の測定が第一に行われるべき方法となろう。Hallman *et al.*⁸⁾ は SP-A が 0.6 μ g/ml 以下の時 RDS の発症は 91% であり、3 μ g/ml 以上では全例に RDS の発症はなかったと報告した。この中間値の時の RDS 発症率は 53.9% であったが、L/S 比及び PG の有無と合わせて判断すると約 95% の精度で RDS の発症を予知するという。本研究において羊水 SP-A 濃度の基準値を Hallman *et al.*⁸⁾ に従って 0.6 μ g/ml と設定すると、DSPC 濃度及び L/S 比との相関はきわめて高かった。ラット胎仔肺における SP-A と DSPC の出現、増量パターンはよく一致することが報告されており⁴⁹⁾、SP-A と DSPC の合成はすくなくとも胎生期においては同じ機構で調節されていると考えられる。この SP-A 濃度基準値に対する DSPC、L/S 比及び PG、それぞれの基準値との肺未成熟度と成熟度における診断合致率は、DSPC 81.7%、L/S 比 74.5%、PG 85.7% の高率であり、Hallman *et al.*⁸⁾ が指摘した基準値 0.6 μ g/ml は妥当であると思われた。

5 結 論

羊水中の肺サーファクタント・リン脂質マーカーを微量定量するために、DSPC、PC、SPH 及び PG の酵素的定量法を改良、また PI の酵素法を確立した。これらの方法を用いて各妊娠週数における羊水検体中のリン脂質マーカーを測定した。

DSPC、PC、SPH 及び PG の酵素定量法における発色反応で、4-アミノアンチピリンと反応する芳香族化合物に HDCBS を用い高感度の測定を可能にした。DSPC の酵素法は従来方法を改良し、PC 特異的ホスホリパーゼ C を用いたこと及び全 PC はスフィンゴミエリナーゼ前処理後 PC 特異的ホスホリパーゼ C を用いることで精度を高めた改良法を確立した。PI の測定

はホスホリパーゼ D 処理で生成したミオイノシトールを酵素的に定量する方法を確立した。酵素法で得た L/S 比及び PG/PI 比は、TLC 法で得られた値と良く相関した。全 PC は 0.25 ml, DSPC と SPH は各 0.5 ml, PG と PI は各 1 ml の羊水で酵素法により測定可能であった。

羊水の DSPC 濃度は、妊娠 30 週頃より徐々に増加し、妊娠週数の進行に伴う羊水 DSPC 濃度と L/S 比はきわめてよく相関した。羊水 PG 濃度は、DSPC の増加曲線より遅れて出現し 35 週から増加したが、PI 濃度は 35 週まで増加し、以後は急激に低下した。PG/PI 比は 35 週より急激な増加曲線を示した。

羊水における SP-A 濃度と DSPC 濃度、L/S 比、PG 濃度及び PG/PI 比はよく相関した。特に DSPC と L/S 比は高い相関を示した。SP-A 濃度に対するそれぞれの未熟値及び成熟値による肺成熟度診断合致率は、きわめて高率であった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり御指導いただいた札幌医科大学生化学第 1 講座秋野豊明教授に御礼申し上げます。また羊水検体を御授与いただいた北海道大学医学部分娩部藤本征一郎教授、旭川医科大学産婦人科佐々木公則博士に感謝申し上げます。御助言、御協力いただいた札幌医科大学生化学第 1 講座の諸先生に御礼申し上げます。

文 献

1. Tsao, F. H. C. and Zachman, R. D.: Prenatal assessment of fetal lung maturation: A critical review of amniotic fluid phospholipid tests. In: Farrell, P. H.: Lung development: Biological and clinical perspectives, vol 2, Neonatal respiratory distress. Academic Press, New York, London, 167-203 (1982).
2. Batenburg, J. J. and Hallman, M.: Developmental biochemistry of alveoli. In: Scarpelli, E. M.: Pulmonary Physiology: Fetus, Newborn, Child and Adolescent, 2nd Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, p. 106-139 (1990).
3. Clements, J. A., Platzker, C. G., Tierney, D. F., Hobel, C. J., Creasy, R. K., Margolis, A. J., Thibeault, D. W., Tooley, W. H. and Oh, W.: Assessment of the risk of the respiratory-distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *New Engl. J. Med.* **286**, 1077-1081 (1972).
4. 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**, 440-445 (1971).
5. Gluck, L., Kulovich, M. V., Borer, R. C., Jr. and Keidel, W. N.: The interpretation of the significance of the lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **120**, 142-154 (1974).
6. Akino, T. and Ohno, K.: Phospholipids of the lung in normal, toxic and diseased states: *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* **9**, 201-274 (1981).
7. Kulovich, M. V., Hallman, M. and Gluck, L.: The lung profile. I. Normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **135**, 57-63 (1979).
8. Hallman, M., Arjoma, P., Mizumoto, M. and Akino, T.: Surfactant proteins in the diagnosis of fetal lung maturity. I. Predictive accuracy of the 35kD protein, the lecithin/sphingomyelin ratio and phosphatidylglycerol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158**, 531-535 (1988).
9. Hallman, M., Arjoma, P., Hoppu, K., Teramo, K. and Akino, T.: Surfactant proteins in the diagnosis of fetal lung maturity. II. The 35kD protein and phospholipids in complicated pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **161**, 965-969 (1989).
10. Torday, J., Carson, L. and Lowson, E. E.: Saturated phosphatidylcholine in amniotic fluid and prediction of the respiratory-distress syndrome. *New Engl. J. Med.* **301**, 1013-1018 (1979).
11. Muneshige, A., Okazaki, T., Quirk, J. G., MacDonald, P. C., Nozaki, M. and Johnston, J. M.: A rapid and specific enzymatic method for the quantification of phosphatidylcholine, disaturated phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **145**, 474-480 (1983).
12. 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**, 845-853 (1982).
13. Hallman, M., Kulovich, M., Kirkpatrick, E., Sugarman, R. and Gluck, L.: Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniotic fluid: Indices of lung maturity.: *Am. J. Obstet. Gynecol.* **125**, 613-617 (1976).
14. Whittle, M. J., Wilson, A. I., Whitfield, C. R., Paton, R. D. and Logan, R. W.: Amniotic fluid

- phospholipid profile determined by two-dimensional thin-layer chromatography as index of fetal lung maturation. **Br. Med. J.** **282**, 428-430 (1981).
15. Hallman, M. and Teramo, K.: Measurement of the lecithin/sphingomyelin ratio and phosphatidylglycerol in amniotic fluid: an accurate method for assessment of fetal lung maturity. **Br. J. Obstet. Gynaecol.** **88**, 806-812 (1981).
 16. Anaokar, S., Garry, P. J. and Staderfer, J. C.: Enzymatic assay for lecithin in amniotic fluid. **Clin. Chem.** **25**, 103-107 (1978).
 17. McGowan, M. W., Artiss, J. D. and Zak, B.: Enzymatic colorimetry of lecithin and sphingomyelin in aqueous solution. **Clin. Chem.** **29**, 1513-1517 (1983).
 18. Artiss, J. D., McGowan, M. W., Strandbergh, D. R., Epstein, E. and Zak, B.: Enzymic colorimetric determination of phosphatidylglycerol in amniotic fluid. **Clin. Chem.** **30**, 534-537 (1984).
 19. Kuroki, Y., Fukada, Y., Takahashi, H. and Akino, T.: Monoclonal antibodies against human pulmonary surfactant apoproteins: specificity and application in immunoassay. **Biochim. Biophys. Acta** **836**, 201-209 (1985).
 20. Kuroki, Y., Takahashi, H., Fukada, Y., Mikawa, M., Inagawa, A., Fujimoto, S. and Akino, T.: Two-site 'simultaneous' immunoassay with monoclonal antibodies for the determination of surfactant apoproteins in human amniotic fluid. **Pediat. Res.** **19**, 1017-1020 (1985).
 21. Shimizu, H., Honda, K., Mizumoto, M., Kuroki, Y., Sato, H., Kataoka, K., Hagiwara, M., Fujimoto, S. and Akino, T.: Improved immunoassay for the determination of surfactant protein A (SP-A) in human amniotic fluid. **Tohoku J. Exp. Med.** **157**, 269-278 (1989).
 22. Mason, R. J., Nellenbogen, J. and Clements, J. A.: Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide. **J. Lipid Res.** **17**, 281-284 (1976).
 23. MacGregor, L. C. and Matschinsky, F. M.: An enzymatic fluorimetric assay for myo-inositol. **Anal. Biochem.** **141**, 382-389 (1984).
 24. Goldstone, J. M. and Magasanik, B.: Inositol dehydrogenase and ketoinositol dehydrase from inositol-adapted aerobacter aerogenase. **Fed. Proc.** **13**, 218 (1954).
 25. Kato, T., Berger, S. J., Carter, J. A. and Lowry, O. H.: An enzymatic cycling method for nicotinamide-adenine dinucleotide with malic and alcohol dehydrogenases. **Anal. Biochem.** **53**, 86-97 (1973).
 26. Matschinsky, F. M., Passonneau, J. V. and Lowry, O. H.: Quantitative histochemical analysis of glycolytic intermediates and cofactors with an oil well technique. **J. Histochem. Cytochem.** **16**, 29-39 (1968).
 27. Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** **37**, 911-917 (1959).
 28. Poorthuis, B. J. H., Yazaki, P. J. and Hostetler, K.: An improved two dimensional thin layer chromatography system for the separation of phosphatidylglycerol and its derivatives. **J. Lipid Res.** **17**, 433-437 (1976).
 29. Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. **J. Biol. Chem.** **234**, 466-468 (1959).
 30. 長尾正人: 関節軟骨の脂質代謝に関する研究: 第1報 関節軟骨の脂質組成. **札幌医誌** **55**, 239-249 (1986).
 31. Shimojo, T., Kanoh, H. and Ohno, K.: The elution behaviors of acidic phospholipids on column chromatography. **J. Biochem.** **69**, 255-263 (1971).
 32. 宗重彰, 岡崎武志, 佐川典正, 森崇英: ヒト羊水中 phosphatidylglycerol の特異的定量法ならびに出生前診断法としての意義. **日産婦会誌** **37**, 341-348 (1985).
 33. Imamura, S. and Horiuti, Y.: Purification of *Streptomyces chromofuscus* phospholipase D by hydrophobic affinity chromatography on palmitoyl cellulose. **J. Biochem.** **85**, 79-95 (1979).
 34. Imamura, S. and Horiuti, Y.: Purification of phospholipase C from *Bacillus cereus* by hydrophobic chromatography on palmitoyl cellulose. **J. Lipid Res.** **20**, 519-524 (1979).
 35. Delk, A. S.: A rapid sensitive immunologic agglutination test for phosphatidylglycerol (PG) in amniotic fluid. **Int. Clin. Product. Rev., Nov./Dec.**, 34-39 (1984).
 36. Adams, F. H., Fujiwara, T. and Rowshan, G.: The nature and origin of the fluid in the fetal lamb lung. **J. Pediat.** **63**, 881-888 (1963).
 37. 樋口誠一, 平野秀人, 後藤薫, 村上直樹, 池ノ上克: 羊水レシチン/スフィンゴミエリン比, 飽和レシチンおよびフォスファチジルグリセロールの同時定量による胎児肺成熟度出生前検査法の診断信頼性の比較. **日本界面誌** **18**, 34-42 (1987).
 38. Hallman, M. and Teramo, K.: Amniotic fluid phospholipid profile as a predictor of fetal matu-

- rity in diabetic pregnancies. **Obstet. Gynecol.** **54**, 703-707 (1979).
39. Cunningham, M. D., Desai, N. S., Thomson, S. A. and Greene, J. M.: Amniotic fluid phosphatidylglycerol in diabetic pregnancies. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **131**, 719-724 (1978).
40. Kulovich, M. V. and Gluck, L.: The lung profile. II. Complicated pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **135**, 64-70 (1979).
41. Sato, T. and Akino, T.: Source of lung surfactant phospholipids: comparison of palmitate and acetate as precursors. **Lipids** **17**, 884-892 (1982).
42. Hallman, M. and Gluck, L.: Formation of acidic phospholipids in rabbit lung perinatal development. **Pediatr. Res.** **14**, 250-259 (1980).
43. 林秀紀: 家兎肺サーファクタントにおける酸性リン脂質の分子種. **札幌医誌** **56**, 717-729 (1987).
44. Yambao, T. J., Clark, D., Smith, C. and Aubry, R. H.: Amniotic fluid phosphatidylglycerol in stressed pregnancies. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **141**, 191-194 (1981).
45. Plauche, W. C., Faro, S. and Letellier, R.: Phosphatidylglycerol and fetal lung maturity. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **144**, 167-172 (1982).
46. 足立英明, 林秀紀: 気道内 silica 投与ラットにおける肺サーファクタントの変動に関する研究 第1報サーファクタント・リン脂質代謝の変動. **札幌医誌** **57**, 123-135 (1988).
47. Honda, Y., Tsunematu, K., Suzuki, A. and Akino, T.: Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. **Lung** **166**, 293-301 (1980).
48. Honda, Y., Kataoka, K., Hayashi, H., Takahasi, H., Suzuki, A. and Akino, T.: Alterations of acidic phospholipids in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis. **Clin. Chim. Acta** **181**, 11-18 (1989).
49. Schellhase, D. E., Emrie, P. A., Fisher, J. H. and Shannon, J. M.: Ontogeny of surfactant apoproteins in the rat. **Pediatr. Res.** **26**, 167-174 (1989).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学大学生化学第1講座 佐藤秀紀