

学 位 論 文 題 名

Ethanol resistive microbubble test: A modification
of the stable microbubble test used to predict
respiratory distress syndrome

(エタノール抵抗性小泡試験：呼吸窮迫症候群
発症予知に用いられる安定小泡試験の変法)

学位論文内容の要旨

I. 緒言

出生時に得られた羊水および胃液に対して行った安定小泡試験 (Stable Microbubble test, SM test) の結果から、新生児における呼吸窮迫症候群 (respiratory distress syndrome, RDS) の発症予知が可能である。SM test は肺サーファクタントの活性を反映する直径 $15\mu\text{m}$ 以下の泡の数を対象とするため、同時に観察される直径が $15\mu\text{m}$ より大きい泡は不要であり、安定小泡の計数に影響する可能性もある。本研究の目的は、エタノールを消泡剤として用いることにより、安定小泡の数に影響することなく、大きな泡を選択的に破壊できるか否か、さらにエタノール抵抗性小泡試験 (Ethanol Resistive Microbubble test, ERM test) が SM test の変法と成りうるかを評価することである。

II. 対象と方法

-20℃で保存した羊水を室温で解凍して検体とした。SM test は従来の方法に従った。混和した検体 $40\mu\text{l}$ をカバー・ガラス上に滴下し、パスツール・ピペットで 6 秒間に 20 回の速度で泡立てた。ただちにカバー・ガラスをホール・ガラス上に反転し、カバー・ガラスから検体が吊り下がった状態にした。4 分間静置した後、倍率 10×10 の顕微鏡で観察し、安定小泡の数 ($/1\text{mm}^2$) を 5 視野で観察し、その平均値を測定結果とした。

エタノールの効果を評価するため、濃度 0 (蒸留水), 11.9, 23.8, 47.5, 63.3 および 95.0% のエタノール 0, 5, 10, 15, 20, 25, $30\mu\text{l}$ を、検体を泡立てた直後に添加した。カバー・ガラスを反転し、4 分間静置の後に安定小泡と、直径が $15\mu\text{m}$ より大きい泡の数を別々に計数し、5 視野での平均値をそれぞれの測定結果とした。同一の測定を 5 回行った。エタノールの効果は、SM test の結果が、 $20/\text{mm}^2$ 未満, $20 - 100/\text{mm}^2$, $100/\text{mm}^2$ 以上である 3 種類の検体についてそれぞれ検討した。全ての測定はエタノールの濃度を伏せて行った。エタノールを添加しない場合の泡の数を 100% として、各濃度と量のエタノールを添加した場合の泡の数を % に変換した。変換した泡の数を Dunnett の補正を加えた分散分析により比較した。また、エタノール添加前後の顕微鏡視野を写真に撮影し、NIH - image software を用いて画像解析を行った。

妊娠 35 週未満で出生した新生児の、出生時に採取した胃液 43 検体について、臨床的に診断された RDS の有無を伏せて SM - test および ERM test を行い、RDS 発症予知における有用性を検討した。SM test と ERM test の結果の比較には paired t - test を用いた。

III. 結果

5 - 30 μ l の水の添加では安定小泡の数も大きな泡の数も希釈による影響を受けなかった。11.9%および23.8%エタノール添加では、泡の数は大きな影響を受けなかった。47.5%エタノールでは、10 - 25 μ l 添加した場合に、小泡の数に影響することなく大きな泡をほぼ完全に破壊することができた。63.3%エタノール10 μ l 添加でも同様であった。47.5%および63.3%エタノールを5 μ l 添加した場合には、安定小泡の数が50-75%増加した。47.5%エタノール30 μ l あるいは63.3%エタノール15 μ l 以上の添加では、大きな泡とともに、小泡の数も減少した。95.0%エタノール添加では、小泡も大きな泡も完全に破壊された。以上の結果から、47.5%エタノール10 μ l 添加を選択し、標準の方法 (ERM test) とした。47.5%エタノール10 μ l の添加により、安定小泡の数に影響することなく、不要な大きな泡を破壊できることが示された。

画像解析により、47.5%エタノール10 μ l 添加前後の泡の直径の分布を検討した。エタノール添加前には直径15 μ mをはさんで、直径の小さい側と大きい側に分布のピークが認められたが、添加後には大きい側のピークが消失した。

胃液を検体とした場合も、羊水を検体とした場合と同様に47.5%エタノール10 μ l 添加が有効であった。43 例の新生児のうち 14 例がRDS、29 例が非RDSと臨床的に診断された。RDS 例においても、非RDS 例においてもSM test とERM test の安定小泡の数に差を認めなかった。ERM test において、RDS児14例のうち11例で安定小泡の数が10/mm² 未満であった。一方、非RDS児29例全例で安定小泡の数が10/mm² 以上であった。胃液を検体とした場合のERM test によるRDS発症予知のカット・オフ値は、SM testと同様に10/mm² と考えられ、RDS 発症の陽性予測値は100%であった。

IV. 考案

本研究において、羊水を泡立てて得られた泡の塊にエタノール水溶液を添加することにより、安定小泡に影響することなく直径が15 μ mより大きい泡を破壊できることが示された。有効なエタノールの濃度と量の組合せとして、47.5%エタノール10 μ l を選択し、このエタノール添加を導入したSM test の変法をERM test とした。

消泡の機序は泡の形成を抑制する抑泡と、形成された泡を破壊する破泡に分けられる。エタノールは、抑泡と破泡の両方の活性を持つ消泡剤である。Clements らによる羊水を用いたシェイク・テストは、エタノールの抑泡作用を用いて胎児の肺成熟を判定する方法である。この方法では、羊水を等量の95%エタノールと混合し、15秒間激しく振盪した後に15分間静置し、表面に浮いた安定小泡を肉眼的に観察する。羊水中には肺サーファクタント以外に蛋白、胆汁酸、遊離脂肪酸などの泡を形成する物質が存在するが、95%エタノールが2倍に希釈された47.5%エタノールは、これらの物質が泡を形成することを抑制する。表面張力に関する比較では、肺サーファクタントの主成分である飽和 phosphatidylcholine のみが47.5%エタノールの表面張力29mN/mを凌駕することが報告されている。

ERM test がシェイク・テストと異なる点は第一に、エタノールを泡立ての後に加えることで、エタノールを抑泡剤ではなく、破泡剤として使用していることである。第二に、ERM test では直径15 μ m以下の泡を対象とするのに対し、シェイク・テストで観察される泡は直径50から500 μ mである。さらに、シェイク・テストは肺が成熟していることを判定するのに有用な検査で、RDS の発症予知に関しては偽陽性が多いのに対し、SM test は肺サーファクタントの未熟性の判定に有用である。今回の結果では、ERM test によるRDS 発症の陽性予測値は100%であったが、RDS 児3例が非RDSと判定された。

破泡の機序は侵入、伸展および破膜によると考えられている。表面活性は高いが膜安定性の低い物質が、より表面活性の低い物質を押しつけて泡表面に侵入し、そこで伸展し、薄くなった膜に穴が開くことで泡が破壊されると考えられる。エタノールは高い表面活性を持つが安定膜を形成しないため、強い破泡剤として作用する。肺サーファクタントが表面に吸着してできる安定小泡は、その表面張力が0.0085mN/m と非常に低く、固体に近い状態で存在すると考えられてい

る。そのため、エタノールは安定小泡に影響せずに大きな泡を破泡すると考えられる。高い濃度のエタノールにより安定小泡が破壊される機序としては、エタノールが溶媒として作用することが考えられる。

羊水や胃液を泡立てて得られる泡に様々な大きさがみられるのは、肺サーファクタント以外の泡を形成する物質や、活性の低いサーファクタント、あるいはサーファクタントの活性を阻害する物質が含まれているためと考えられる。金子らは画像解析を用いて、SM test でつくられる泡の経時変化について報告している。羊水と胃液で、直径 $15\mu\text{m}$ 以下の泡は観察期間の30分の間、大きさも数も変化しなかったが、直径が $15\mu\text{m}$ より大きい泡は不安定で、8 - 12 分で大部分が消失し、残った泡の大きさは縮小していた。佐々木は、サーファクタントの濃度と安定小泡の数が直線関係にあり、直線の傾きはサーファクタントの種類に依存していると報告している。

今回報告したERM test では、大きくて不安定な泡が選択的に破泡される。エタノールによる破泡に抵抗する泡の数は検体中のサーファクタントの質と量を反映すると考えられるため、泡の大きさに関係なく泡の数を計数するのみでサーファクタントの活性を評価できる可能性がある。これは、RDS の発症予知に用いられているSM test の機械による自動化の可能性を示唆すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Ethanol resistive microbubble test:A modification of the stable microbubble test used to predict respiratory distress syndrome

(エタノール抵抗性小泡試験：呼吸窮迫症候群
発症予知に用いられる安定小泡試験の変法)

出生時に得られた羊水および胃液を用いた安定小泡試験(Stable Microbubble test : SM test) は、新生児における呼吸窮迫症候群(RDS)の発症予知に有用である。SM test は肺サーファクタントの活性を反映する直径 $15\mu\text{m}$ 以下の泡の数を計測するため、同時に観察される直径が $15\mu\text{m}$ より大きい泡は不要であり、安定小泡の計数に影響する。本研究は、エタノールを消泡剤として用いることにより、安定小泡の数に影響することなく、大きな泡を選択的に破壊できるか否か、またこのエタノールを用いたエタノール抵抗性小泡試験(Ethanol Resistive Microbubble test : ERM test)がSM test の変法と成りうるかを評価することである。

[対象と方法] -20°C で保存した羊水を検体とした。SM testは従来の方法に従った。即ち、混和した検体 $40\mu\text{l}$ をカバー・ガラス上に滴下し、パスツール・ピペットで6秒間に20回の速度で泡立て、直にカバー・ガラスをホール・ガラス上に反転し、カバー・ガラスから検体が吊り下がった状態にし、4分間静置した後、倍率 10×10 の顕微鏡で観察し、安定小泡の数($/1\text{mm}^2$)を5視野で観察し、その平均値を測定した。

エタノール濃度は0, 11.9, 23.8, 47.5, 63.3 および95.0%に調整し、 $0\sim 30\mu\text{l}$ を、検体を泡立てた直後に添加した。SM testで $15\mu\text{m}$ 以下の泡の数が $20/\text{mm}^2$ 未満、 $20\sim 100/\text{mm}^2$ 、 $100/\text{mm}^2$ 以上である3種類の検体について、エタノールを添加しない場合の泡の数を100%として、エタノールを添加した場合の泡の数を%に変換した。変換した泡の数をDunnett の補正を加えた分散分析により比較した。また、エタノール添加前後の顕微鏡視野の写真をNIH-image software を用いて画像解析を行った。

妊娠35週未満で出生した新生児の、出生時に採取した胃液43検体について、SM test およびERM test を行い、RDS 発症予知における有用性を検討した。SM test と

ERM test の結果の比較にはpaired t-test を用いた。

〔結果〕水の添加では安定小泡の数も大きな泡の数も希釈による影響を受けなかった。11.9%と23.8%エタノール添加では、泡の数は大きな影響を受けなかった。47.5%エタノール10-25 μ l 添加は、小泡の数に影響なく大きな泡をほぼ完全に破壊した。47.5%エタノール30 μ l または63.3%エタノール15 μ l 以上の添加は、大きな泡も小さな泡も減少し、95.0%エタノール添加では、全ての泡は破壊された。画像解析で、47.5%エタノール10 μ l 添加前後の泡の直径の分布を見ると、エタノール添加前には直径15 μ mをはさんで、直径の小さい側と大きい側に2のピークを認めたが、添加後には大きい側のピークが消失した。以上の結果から、47.5%エタノール10 μ l の添加が安定小泡の数に影響することなく不要な大きな泡を破壊できることから、これをERM testの標準法とした。この標準法は胃液を検体とした場合も有効であった。胃液を用いたSM testとERM testの安定小泡の数に差を認めなかった。

RDS児14例のうち11例でERM test での安定小泡の数が10/mm² 未満であった。一方、非RDS児29例全例で安定小泡の数が10/mm² 以上であった。胃液を検体とした場合のERM test によるRDS発症予知のカット・オフ値は、SM test と同様に10/mm² と考えられ、RDS 発症の陽性予測値は100%であった。

〔考案〕羊水を泡立てて得られる泡の塊に47.5%エタノール10 μ l を添加することで、直径が15 μ m以下の安定小泡数に影響を与えずに不要な大きい泡を破壊できることが示された。エタノールは高い表面活性を持つが安定膜を形成しないため、強い破泡剤として作用する。肺サーファクタントが表面に吸着してできる安定小泡は、その表面張力が0.0085mN/m と非常に低く、固体に近い状態で存在すると考えられている。そのため、この程度のエタノール濃度は安定小泡に影響を与えることなく、それ以外の物質に起因する大きな泡を破泡すると考えられる。より高い濃度のエタノールで安定小泡が破壊される機序は、エタノールが溶媒として作用するものと考えられる。

羊水や胃液を泡立てて得られる泡に様々な大きさが生ずるのは、肺サーファクタント以外の泡を形成する蛋白質、胆汁酸、遊離脂肪酸や活性の低いサーファクタント、またはサーファクタント活性を阻害する物質が含まれているためである。SM testで得られる泡の経時変化の報告によると、直径15 μ m以下の泡は観察時間30分の間、大きさも数も変化しないが、それより大きい泡は不安定で8-12 分で大部分が消失し、残った泡の大きさも変化したという。一方、サーファクタントの濃度と安定小泡の数は直線関係にあり、直線の傾きはサーファクタントの種類に依存すると報告されている。このことから、ERM testで得られたエタノール抵抗性の泡数は検体中のサーファクタントの質と量を反映すると考えられる。従って、泡の数のみを計数することでサーファクタントの活性を評価できる可能性がある。これは、ERM testにおける泡の数の自動計測器開発の可能性を示唆し、検査の迅速化と精度の向上が期待される。

公開発表に際し、副査の藤本教授から泡の大小における組成の差、胃液内の夾雑物や量の影響、Cut-off値の設定根拠、RDSでの擬陽性の原因等、副査の石橋教授から泡の大きさの設定の理由、RDS発症と小さな泡の関係、泡を作る操作によるデータの変化、

ERMの利点について等、主査の小林教授から、小さな泡がエタノールで増える理由、サーファクタントの構成成分、測定精度等の質問があったが、申請者はほぼ妥当な回答をした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。