

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591223  
 研究課題名（和文） 合成ペプチドを用いた合成サーファクタントの開発：生理活性の評価  
 研究課題名（英文） Development of Synthetic Surfactant Containing Surfactant Protein Analog Polypeptide: Physiological Properties  
 研究代表者  
 千田 勝一 (CHIDA SHOICHI)  
 岩手医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：30108930

研究成果の概要：新生児呼吸窮迫症候群の治療薬として、動物肺由来の人工サーファクタント製剤が使用されている。これに含まれ、表面活性に不可欠なサーファクタント蛋白の合成ペプチドが最近開発された。本研究ではこのペプチドと脂質とを混合した合成サーファクタントを調製し、その活性の測定と形態の観察とを行った。その結果、サーファクタント蛋白-Cのアナログを含む合成サーファクタントは、わが国で使用されているウシ肺由来製剤とほぼ同等の活性をもち、類似した形態であることが判明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：人工サーファクタント、合成サーファクタント、サーファクタント蛋白、SP-Bアナログ、SP-Cアナログ、呼吸窮迫症候群

## 1. 研究開始当初の背景

呼吸窮迫症候群 (respiratory distress syndrome: RDS) は 1903 年に初めて記載されたが、その病因として様々な説が現れては消え、研究者と RDS の関係は "the blind men and the elephant" とたとえられる時代が長く続いた。1980 年、Fujiwara らの開発し

たウシ肺由来人工サーファクタント (1987 年から Surfacten®として実用化) が重症 RDS に画期的な効果を示したことで、当時消えていた RDS のサーファクタント欠乏説が復活し、種々の人工サーファクタント製剤が次々と開発された。世界では現在、主に 5 種類の動物肺由来製剤が RDS の治療薬として用いられ

ている。

一方、動物肺由来製剤に含まれるサーファクタント蛋白 (surfactant protein: SP) -B や SP-C が表面張力低下作用に不可欠な成分であることがわかると、1990年代にこれらのアミノ酸配列に類似させたペプチドが合成され、SP-BアナログまたはSP-Cアナログと、脂質の必須成分とを混合した合成サーファクタントがいくつか開発された。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれらの SP-B アナログまたは SP-C アナログと脂質からなる合成サーファクタントを調製し、その活性と形態について、良好な活性を有するウシ肺由来製剤の Surfacten と比較した。

## 3. 研究の方法

SP-B アナログは KLLLLKLLLLKLLLL KLLLLK、SP-C アナログは CPVHLKR LLLLLLLLLLLLLLLL のアミノ酸配列からなるポリペプチドで、田辺三菱製薬から提供を受けた。脂質は dipalmitoyl phosphatidyl- choline (DPPC)、palmitoyl oleoyl phosphatidylglycerol (POPG)、egg-phosphatidyl- glycerol (PG)、palmitic acid (PA) を使用し、重量比で DPPC: POPG: PA: SP-B アナログ=75: 25: 15: 3 の混合物 (SP-B・脂質) と、DPPC: PG: PA: SP-C アナログ=75: 25: 10: 3 の混合物 (SP-C・脂質) を作製した。

### (1) 表面活性の測定

Wilhelmy 型表面張力計 (アコマ医科工業) を用いて、サーファクタントを生理食塩液が入った水槽底に注入したときの表面吸着と、水槽表面に静置したときの表面拡散を評価した。また、動的表面張力-面積曲線から最小・最大表面張力と、表面圧縮時に表面張力が 10 milli-newton/meter (mN/m) に低下す

る面積を求めた。

### (2) 生理活性の測定

妊娠期間が既知の日本白色種ウサギ (北山ラベス) を妊娠 27 日 ± 2 時間に帝王切開し、胎子を脱血死させたのち無作為に未熟対照群とサーファクタント群に割り付けた。後者にはサーファクタントのリン脂質として 50 mg/kg または 100 mg/kg を気管内へ注入した。妊娠 30 日 ± 2 時間に帝王切開したものを成熟対照群とした。これらの肺胸郭圧量曲線から肺気量を測定した。実験は本学動物実験委員会の承認を受けて行った。

### (3) 肺組織標本の評価

前記の胎子を 3 時間人工換気したのち、肺に 10 cmH<sub>2</sub>O の圧を加えた状態で気管を結紮した。これを胸郭ごと 10%ホルマリンで固定して肺組織標本を作製し、肺胞面積比と肺胞拡張の均一性について評価した。

肺胞面積比は画像解析システム (KS-400、Carl Zeiss) を用いて、ディスプレイ上 (21.4 mm<sup>2</sup>) で肺面積に対する肺胞面積の比を測定した。肺胞の均一性はこれと同じ画像を観察し、均一に拡張した肺胞が占める割合によって、0 (0%)、1 (25%未満)、2 (25%~50%)、3 (50%~75%)、4 (75%以上)、5 (100%) とスコア化して評価した。これらは左右肺の上・中・下 6 カ所で行い、その平均値で表した。

### (4) 電子顕微鏡による形態観察

サーファクタントの固定・染色は Notter らの方法に従い、透過電子顕微鏡 (H-7650、H-7100、日立製作所) で観察した。

### (5) 統計解析

計量データの 2 群間比較は *t* 検定、多重比較は分散分析で行い、測定値は平均 ± SD で表した。有意水準は *p* < 0.05 (両側検定) とした。

## 4. 研究成果

### (1) 表面活性 (図 1)

表面吸着および表面拡散は Surfacten と SP-C・脂質が SP-B・脂質よりも有意に優っていた ( $p < 0.001$ )。動的表面張力-面積曲線において、最小表面張力は SP-C・脂質が Surfacten と SP-B・脂質よりも有意に低かったが ( $p < 0.001$ )、最大表面張力は Surfacten と SP-C・脂質が SP-B・脂質よりも有意に低かった ( $p < 0.001$ )。表面圧縮時に 10 mN/m に低下した面積は Surfacten と SP-C・脂質が SP-B・脂質よりも有意に大きかった ( $p < 0.001$ )。

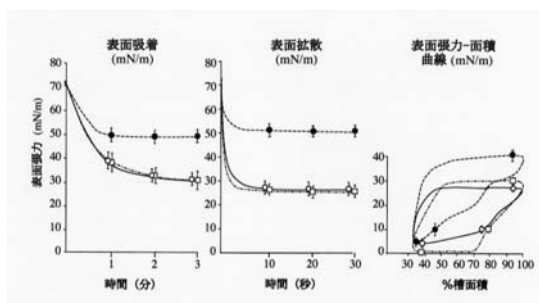


図 1 合成サーファクタントの表面活性  
○ : Surfacten、● : SP-B・脂質、□ : SP-C・脂質. mean±SD (n=10).

(2) 生理活性 (図 2)

50 mg/kg 投与群と 100 mg/kg 投与群の肺気量はすべての圧で Surfacten と SP-C・脂質および成熟対照群との間で有意差を認めなかったが、SP-B・脂質では未熟対照群と有意差がなかった。SP-C・脂質の肺気量は両投与群とも 5 cmH<sub>2</sub>O 圧で Surfacten よりも有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。

(3) 肺組織像 (図 3)

肺胞面積比と肺胞の均一性スコアは、50 mg/kg 投与群で SP-B・脂質が他の群よりも有意に低値であった ( $p < 0.01 \sim 0.001$ )。また、肺胞の均一性スコアは 100 mg/kg 投与群で SP-B・脂質が成熟対照群よりも有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。

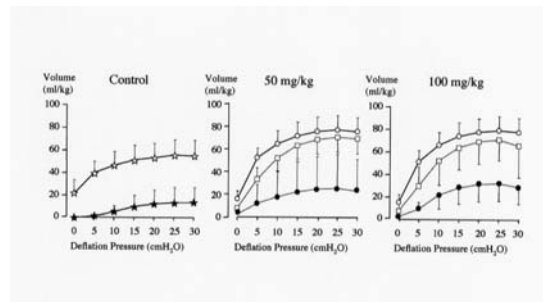


図 2 合成サーファクタントの肺気量  
☆ : 成熟対照、★ : 未熟対照、○ : Surfacten、● : SP-B・脂質、□ : SP-C・脂質. mean±SD (n=7~13).

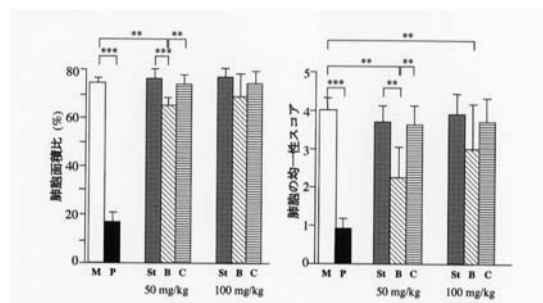


図 3 合成サーファクタントの肺胞拡張度と肺胞の均一性スコア  
M : 成熟対照、P : 未熟対照、St : Surfacten、B : SP-B・脂質、C : SP-C・脂質. mean±SD (n=4~8). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

(4) 電子顕微鏡形態 (図 4)

Surfacten と SP-B・脂質、および SP-C・脂質の全体像は層板膜状構造であり、これらの高倍率断面像では周期間距離が約 50 Å の多層構造を示した。

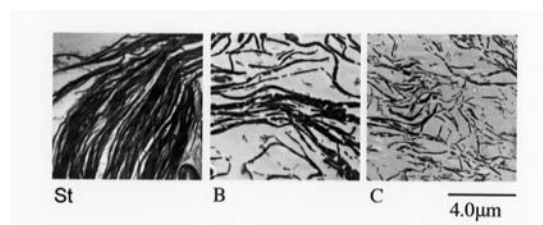


図 4 合成サーファクタントの電子顕微鏡形態  
St : Surfacten、B : SP-B・脂質、C : SP-C・脂質 (×8,000).

(5) 考 察

良好な表面活性を有するサーファクタントの基準として、次のものが挙げられている。

- ①表面吸着が速やかである
- ②表面拡散が速やかである
- ③最小表面張力が 10 mN/m 未満になる
- ④表面圧縮時に表面張力が 10 mN/m に達する面積が大きい
- ⑤表面圧縮率が 0.09 m/mN 未満である

これらの基準は、RDS の気道内に注入した人工サーファクタントが肺胞で速やかに吸着・拡散して弾性膜を形成し、呼気開始のわずかな肺胞の収縮で表面張力を十分にかつ急速に低下させうることを表している。Surfacten はこれらの基準をすべて満たすことが示されており、さらに、生理活性として未熟動物胎仔肺を成熟レベルへ変換し、その組織像で肺胞拡張が均一であり、臨床効果において人工換気条件を非 RDS と同等のレベルまで改善可能なことが既に報告されている。本研究ではこれらのうち、臨床効果以外の内容について、Surfacten を標準として SP-B・脂質と SP-C・脂質とを同一条件で比較した。その結果、SP-C・脂質の表面活性、生理活性、肺組織像は良好な表面活性を有するサーファクタントの基準を満たしており、Surfacten の測定値にほぼ匹敵した。

天然由来製剤は動物肺を原材料にしているため、これに含まれる異種の SP-B と SP-C による免疫反応や、病原体伝搬を懸念して、SP-B や SP-C の合成が考えられるようになった。しかし、これらは合成するには構造が大きく複雑で、純粋なものは不安定である。そのため、合成や遺伝子工学でアナログを作るようになった。

ヒト SP-B はアミノ酸 79 残基からなる

FPILPYCWLCRALIKRIQAMIPKGALAVAVAQVCRVVP  
LVAGGICQCLAERYSVILL

DTLLGRMLPQLVCRLVLRCSMで、親水性（下線）と疎水性のアミノ酸が周期的に配列する両親媒性の  $\alpha$ ヘリックス構造をとり、膜探索ペプチドと考えられている。Cochraneらはこの特徴を単純化したリジン(K)とロイシン(L)からなるSP-Bアナログを合成し、これと脂質を混合した合成サーファクタント(Surfaxin<sup>®</sup>)を作製した。この表面拡散はWilhelmy型表面張力計による測定で速やかであったと報告されているが、測定には 27.8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  という多量の検体を使用しており(本研究では 1.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )、しかも 10 秒後の表面張力は 40 mN/m と高い。一方、この最小表面張力は pulsating bubble surfactometer により 2.5~10 mg/ml の検体濃度で 2.0~3.2 mN/m になり、低値であることを示す報告がある(本研究では検体濃度に換算すると 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。しかし、pulsating bubble surfactometer は泡の収縮につれて表面吸着しやすいことが指摘されており、高濃度の検体を使用して測定するこの方法は、最小表面張力が低くできる可能性がある。Surfacten は天然の SP-B と SP-C とを含み、この成分再構成実験で天然の SP-B と SP-C は脂質の必須成分に 1% 添加しただけで良好な表面活性を示すことが示されている。したがって、今回用いた SP-B アナログは、天然 SP-B の機能を代用するまでに至っていないと推測された。

一方、ヒト SP-C はアミノ酸 35 残基からなる FGIPCCPVHLKRLLIVVVVVVLIVVV IVGALLMGL で、きわめて疎水性が強いアミノ酸からなる  $\alpha$ ヘリックス構造をとり、膜貫通ペプチドと考えられている。Takeiらはこのアミノ酸配列を参考にして各種の SP-C アナログを合成し、DPPC : PG : PA : SP-C アナログ = 75 : 25 : 10 : 3 に調製したときの表面活性を測定した

