

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710106

研究課題名（和文） 新規ナノメディスンとしてのフッ素導入人工調製肺サーファクタントの開発と応用展開

研究課題名（英文） Investigation on Newly Synthetic Pulmonary Surfactant Incorporated by Fluorinated Amphiphiles

研究代表者

中原 広道 (NAKAHARA HIROMICHI)

長崎国際大学・薬学部薬学科・講師

研究者番号：00513235

研究成果の概要（和文）：私達が考案した人工調製型肺サーファクタント(LS)におけるモデルペプチドでは、肺胞運動を模倣した圧縮・拡張に関わらず優位に α -ヘリックス構造をとります。しかしながら、LS主成分 DPPC と混合すると、圧縮過程において α -ヘリックスから β シート構造へ変化します。LS微量成分 PG は完全な陰イオンであり、陽イオンであるモデルペプチドとの間に静電的相互作用が生じています。本研究においてこの相互作用がモデルペプチドの二次構造変化を抑制することを突き止めました。

研究成果の概要（英文）：The model peptide in our pulmonary surfactant preparations changes its secondary structure from α -helix to β -sheet upon lateral compression. However, in the presence of anionic lipids such as phosphatidylglycerol and palmitic acid, the conversion of the structure is found to be prevented from the spectroscopic aspect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：界面科学、膜化学、物理化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ・ ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：表面・界面物性、複合材料、肺サーファクタント、ナノ医薬、超薄膜

1. 研究開始当初の背景

肺サーファクタント(LS)は肺胞表面を覆い、肺胞拡張時の負担(仕事)軽減、肺胞収縮時の虚脱防止、外来性ウイルス等に対する一次免疫に関与しています。肺胞 II 型細胞で合成・分泌された LS はラメラ構造、管状ミエリン構造へと形態を変え、肺胞表面の気/液界面に吸着し単分子膜を形成します。呼吸運動に伴って LS 単分子膜が巧みに表面活性作用を制御することにより、肺機能の恒常性が保たれています。この LS が欠乏すると先天性呼吸

窮迫症候群(NRDS)や後天性呼吸窮迫症候群(ARDS)を発症します。現在、この治療薬としては動物由来のものが主流ですがアレルギーを引き起こす可能性、牛海綿状脳症(BSE)等の問題からその使用が懸念されています。またこの動物由来型薬物は抽出・精製過程に莫大な労力を伴うため、11万円/vial(120mg)と非常に高価で、医療費問題の一端を担っており、また NRDS 以外は保険診療適用外の現状です。そこで私達は一連の疎水性・親水性バランスを持つアミノ酸 18 残

基からなるモデルペプチドを新規に合成し、これらペプチドと生体膜との相互作用について研究を行ってきました。本研究の推進は、単に新規 RDS 治療薬の開発に留まらず、医療費負担の軽減、BSE 対策といった社会的問題、さらには広範な呼吸器疾患（喘息、SARS、COPD 等）への適用拡大へ大きく貢献できると考え、研究に着手しました。

2. 研究の目的

呼吸窮迫症候群(RDS)は、肺サーファクタント(LS)の欠如や機能不全が原因で発症する疾病です。RDSは致死率が非常に高い疾病であるが、牛肺から抽出したLSにより劇的に改善されます。しかし、動物肺由来のLSは非常に高価でありアレルギーや感染症(BSE)の原因となる可能性及び新生児 RDS 以外に保険診療ができない等の制限があります。そこで申請者等は動物由来型 LS に替わる安全・安価で且つ効果的な人工調製型 LS の開発に着手しました。本研究では①呼吸運動に伴う膜分子の排除メカニズムの解明、②既存薬(動物由来型)に替わる革新的な人工調製型 LS の開発、③部分フッ素化合物を導入したフッ素・ハイブリッド型人工調製 LS への展開を目的とします。

3. 研究の方法

(1)人工調製LSは呼吸運動による肺胞内表面積の圧縮・拡張の負担を和らげる作用を有します。その負担の軽減はLSの表面張力低下作用に基づくため、LSの研究(in vitro)は一般的に Modified Wilhelmy-Balance 手法が頻用されています。この手法は呼吸における肺胞内表面積の連続的変化を自由に行うことができ、また同時にその面積における表面張力及び膜配向に感度の良い表面電位変化を捉えることができます。

(2)PM-IRRAS法を利用した気/液界面の直接測定は、LSの圧縮・拡張時の動的なペプチド二次構造変化を捉えることが出来る最も鋭敏な光学計測装置である。本装置により、LS成分の排除現象に伴うタンパク質の二次構造変化を解明します。

(3)先ず成熟 Wistar ラットに肺洗浄を行い、LS 欠乏モデルを作製します。その欠乏モデルに対し、人工換気下で、LS 調製物を気管内投与し、連続的に気道内圧 P (cmH₂O)、一回換気量 V (mL/kg)を微小呼吸量測定システムにより測定します。

4. 研究成果

人工調製型肺サーファクタント(LS)脂質の基本成分は DPPC(ジパルミトイルホスファチジルコリン)、PG(ホスファチジルグリセロール)、PA(パルミチン酸)等があります。PAは動物由来型、人工合成型双方のLS調製物の

有効な添加剤として頻用されています。現在までにPAは、LS主成分DPPCの機能を助け、LS単分子膜の分子配向・パッキングを高めると考えられてきました。しかしながら、生体条件ではPAのカルボキシル基はほぼイオン型であり、LSタンパク質(カチオン)との間に静電的な相互作用が存在しているはずであると考えられます。本年度は、この特異的な相互作用(静電的相互作用)がモデルペプチドの二次構造の制御にどのように関わっているのか精査しました。モデルペプチド単独では、肺胞運動を模倣した圧縮・拡張に関わらず優位に α -ヘリックス構造をとります。しかしながら、LS主成分DPPCと混合すると、圧縮過程において α -ヘリックスから β シート構造へ変化します。PGは完全な陰イオンであり、陽イオンであるモデルペプチドとの間に静電的相互作用が生じています。本研究においてこの相互作用がモデルペプチドの二次構造変化を抑制することを突き止めました。また、PAは部分的に陰イオン体として存在していることから、PGと同様の抑制効果を発揮することが分かりました。このPAに関する知見はこれまでの常識を覆すものです。LS系で添加物として頻用されているPAの役割が明らかになったことから、本研究成果は人工調製肺サーファクタントの開発研究に大きく貢献できると考えられます。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

- ① 坂元政一, 中原広道, 宇都拓洋, 正山征洋, 柴田 攻, Investigation of interfacial behavior of glycyrrhizin with a lipid raft model via a Langmuir monolayer study, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 1271-1283, 査読有, DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.01.006
- ② 中原広道, 李 相男, 柴田 攻, Surface pressure induced structural transitions of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant systems by an in situ PM-IRRAS study, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 1205-1213, 査読有, DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.01.003
- ③ 中原広道, 中村承平, 岡橋慶紀, 北口大介, 川畑紀健, 坂元政一, 柴田 攻, Examination of fluorination effect on physical properties of saturated long-chain alcohols by DSC and Langmuir monolayer, *Colloids Surf. B* 102 (2013) 472-478, 査読有, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.08.031

- 日
- ⑮ 坂元政一, 脂質ラフトモデルにおけるグリチルレチン酸の界面科学的挙動の解析~Langmuir単分子膜, 物理化学インターカレッジ(兼油化学界面科学部会九州地区講演会), 福岡, 2012年11月24日
- ⑯ 中原広道, 肺サーファクタントモデルにおけるペプチドの二次構造解析, 物理化学インターカレッジ(兼油化学界面科学部会九州地区講演会), 福岡, 2012年11月24日
- ⑰ 中原広道, 人工調製型肺サーファクタントに関する界面化学的研究, 日本肺サーファクタント・界面医学会第48回学術研究会, 福岡, 2012年10月27日
- ⑱ 坂元政一, Efficient Silkworm expression of a fluorescent single domain antibody against plumbagin using Bombyx Mori Nucleopolyhedrovirus Bacmid DNA System, 世界オレオ会議, 佐世保, 2009年10月1日
- ⑲ 中原広道, Interfacial phenomena of pulmonary surfactant model systems incorporated with fluorinated amphiphile, 世界オレオ会議, 佐世保, 2009年10月1日
- ⑳ 中原広道, Effect of added salt concentrations on surface adsorption of typical surfactants, 世界オレオ会議, 佐世保, 2009年10月2日
- ㉑ 平野千佳代, Surface property of a partially fluorinated amphiphile ($F8HnOH$): Binary miscibility with dipalmitoylphosphatidylcholine, 世界オレオ会議, 佐世保, 2009年10月2日
- ㉒ 柴田 攻, Surface property and miscibility of a partially fluorinated amphiphile ($F4H10H$) with dipalmitoylphosphatidylcholine, 世界オレオ会議, 佐世保, 2009年10月2日
- ㉓ 柴田 攻, Langmuir monolayer behavior of partially fluorinated alcohols ($F8HnOH$) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), 第26回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Malmö, Sweden, 2012年9月4日
- ㉔ 中原広道, Change in secondary structure of model peptide in pulmonary surfactant systems at the air-water interface, 第26回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Malmö, Sweden, 2012年9月4日
- ㉕ 中原広道, Langmuir monolayer properties of a series of partially fluorinated alcohols, 第26回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Malmö, Sweden, 2012年9月4日
- ㉖ 坂元政一, Interaction of glycyrrhizin with lipid rafts model by Langmuir monolayer study, 第26回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Malmö, Sweden, 2012年9月4日
- ㉗ 中原広道, Polarization modulation-infrared reflection absorption spectra of pulmonary surfactant model systems at the air-water interface, 第14回国際組織化膜会議, Paris, France, 2012年7月11日
- ㉘ 中原広道, Palmitic acid controls molecular packing at the air-water interface in pulmonary surfactant model systems, 第14回国際組織化膜会議, Paris, France, 2012年7月12日
- ㉙ 中原広道, Synthesis, characterization, and surface property of partially fluorinated long-chain alcohols ($FnHnOH$), 第14回国際組織化膜会議, Paris, France, 2012年7月12日
- ㉚ 坂元政一, Interfacial behavior of glycyrrhizin interacted with lipid rafts model by Langmuir monolayer study, 第14回国際組織化膜会議, Paris, France, 2012年7月12日
- ㉛ 柴田 攻, Binary miscibility of partially fluorinated long-chain alcohols ($F8HnOH$) with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) at the air-water interface, 第14回国際組織化膜会議, Paris, France, 2012年7月12日
- ㉜ 坂元政一, Interfacial behavior of glycyrrhizin interacted with lipid rafts model by Langmuir monolayer study, コロイド及び界面化学国際会議, 仙台, 2012年5月14日
- ㉝ 中原広道, Transformation of peptide secondary structure in pulmonary surfactant model systems at the air-water interface, コロイド及び界面化学国際会議, 仙台, 2012年5月17日
- ㉞ 柴田 攻, Langmuir monolayer interactions of perfluorooctylated fatty alcohols ($F8HnOH$) with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), コロイド及び界面化学国際会議, 仙台, 2012年5月17日

- ③⑤ 柴田 攻, Surface adsorption behavior of surfactant solutions from the aspects of Gibbs and Langmuir monolayers, コロイド及び界面化学国際会議, 仙台, 2012年5月16日
- ③⑥ 中原 広道, *In situ* polarization-modulation infrared reflection-absorption spectroscopy of pulmonary surfactant model peptide in the DPPC/DPPG systems, コロイド及び界面化学国際会議, 仙台, 2012年5月16日
- ③⑦ 中原 広道, Palmitic acid controls monolayer ordering and squeezing out at the air-water interface in the pulmonary surfactant systems, コロイド及び界面化学国際会議, 仙台, 2012年5月16日
- ③⑧ 中原 広道, 肺サーファクタント系におけるモデルペプチドとパルミチン酸の特異的相互作用, 日本薬学会第132年会, 札幌, 2012年3月29日
- ③⑨ 柴田 攻, 新規部分フッ素化両親媒性物質(F4M10H)と生体膜モデルであるDPPC単分子膜との混和挙動, 日本薬学会第132年会, 札幌, 2012年3月29日
- ④① 中原 広道, 肺サーファクタントにおける添加物パルミチン酸の特異的機能, 第28回日本薬学会九州支部大会, 福岡, 2011年12月10日
- ④② 中原 広道, 新規人工調製肺サーファクタントの研究と高機能性特化への応用展開, 第28回日本薬学会九州支部大会, 福岡, 2011年12月10日
- ④③ 中原 広道, Fluorocarbon-hybrid pulmonary surfactants towards the replacement therapy: A Langmuir monolayer study, 第4回コロイド及び界面化学アジア会議, Tainan, Taiwan, 2011年11月25日
- ④④ 柴田 攻, Specific effects of palmitic acid in pulmonary surfactant model system, 第4回コロイド及び界面化学アジア会議, Tainan, Taiwan, 2011年11月25日
- ④⑤ 中原 広道, Examination of surface adsorption of typical cationic and anionic surfactant solutions, 第4回コロイド及び界面化学アジア会議, Tainan, Taiwan, 2011年11月24日
- ④⑥ 中原 広道, Interaction of a partially fluorinated alcohol with dipalmitoylphosphatidylcholine at the air-water interface, 第4回コロイド及び界面化学アジア会議, Tainan, Taiwan, 2011年11月24日
- ④⑦ 中原 広道, 肺サーファクタントモデルにおけるパルミチン酸の役割: 膜配向と排出現象, 物理化学インターカレッジ(兼油化学界面科学部会九州地区講演会), 福岡, 2011年11月19日
- ④⑧ 中原 広道, 新規長鎖部分フッ素化アルコール(FnHmOH)の合成とその物性評価, 第63回コロイドおよび界面化学討論会, 京都, 2011年9月8日
- ④⑨ 中原 広道, 界面活性剤の空気/溶液界面吸着における添加塩の効果: Langmuir及びGibbs膜双方の観点から, 第63回コロイドおよび界面化学討論会, 京都, 2011年9月8日
- ④⑩ 中原 広道, 人工調製肺サーファクタントにおけるパルミチン酸の特異的分子挙動, 第63回コロイドおよび界面化学討論会, 京都, 2011年9月8日
- ⑤① 中原 広道, 新規部分フッ素化両親媒性物質(F4M10H)とDPPCとの2成分単分子膜挙動, 第63回コロイドおよび界面化学討論会, 京都, 2011年9月8日
- ⑤② 中原 広道, Effects of palmitic acid on pulmonary surfactant model systems: A Langmuir monolayer study, 第25回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Berlin, Germany, 2011年9月5日
- ⑤③ 中原 広道, Effect of added salt concentrations on surface adsorption of typical surfactants, 第25回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Berlin, Germany, 2011年9月5日
- ⑤④ 柴田 攻, Surface property and miscibility of a partially fluorinated amphiphile (F4M10H) with dipalmitoylphosphatidylcholine, 第25回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Berlin, Germany, 2011年9月5日
- ⑤⑤ 柴田 攻, 部分フッ素化物と生体関連脂質の二成分単分子膜挙動, 日本薬学会第131年会, 静岡, 2011年3月29日
- ⑤⑥ 中原 広道, 部分フッ素化物を含んだ人工肺サーファクタント調製物の界面科学的評価, 日本薬学会第131年会, 静岡, 2011年3月29日
- ⑤⑦ 中原 広道, 新規人工調製肺サーファクタントに関するペプチド二次構造の解析, 第4回薬学研究フォーラム in 東京~九州からの情報発信~, 東京, 2011年1月7日
- ⑤⑧ 中原 広道, 鎖長の異なるフッ素化アルコールの人工肺サーファクタント系への添加効果, 第27回日本薬学会九州支部大会, 長崎, 2010年12月12日
- ⑤⑨ 柴田 攻, 部分フッ素化両親媒性物質と生体膜構成脂質の二次元相互作用, 第27回日本薬学会九州支部大会, 長崎, 2010年12月12日

- ⑤⑨ 中原広道, 人工肺サーファクタント系における部分フッ素化アルコールの添加効果, 物理化学インターカレッジ(兼油化学界面科学部会九州地区講演会), 福岡, 2010年11月27日
- ⑥⑩ 柴田 攻, 部分フッ素化両親媒性物質 *F8H10H* と生体膜構成脂質の二成分単分子膜挙動, 物理化学インターカレッジ(兼油化学界面科学部会九州地区講演会), 福岡, 2010年11月27日
- ⑥⑪ 中原広道, Mode of surfactant adsorption of soluble surfactants at the air-solution interface, ナノコロイド界面国際会議, 千葉, 2010年9月21日
- ⑥⑫ 中原広道, Role of fluorocarbon-hybrid pulmonary surfactant preparations in the RDS treatment, ナノコロイド界面国際会議, 千葉, 2010年9月21日
- ⑥⑬ 柴田 攻, Monolayer miscibility of a single-chain partially fluorinated amphiphile (*F8H10H*) with biomembrane components, ナノコロイド界面国際会議, 千葉, 2010年9月21日
- ⑥⑭ 中原広道, 長鎖部分フッ素化アルコールを含有した人工肺サーファクタントのLangmuir膜挙動, 第49回日本油化学会年会, 函館, 2010年9月17日
- ⑥⑮ 中原広道, 界面活性剤溶液の空気/溶液界面吸着に関する再検討—添加塩効果の結果から, 第49回日本油化学会年会, 函館, 2010年9月17日
- ⑥⑯ 柴田 攻, 部分フッ素化両親媒性物質と各種生体膜構成成分との二成分単分子膜挙動, 第49回日本油化学会年会, 函館, 2010年9月17日
- ⑥⑰ 中原広道, Interfacial phenomena of surfactant adsorption induced by additive salt concentrations, 第24回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Prague, Czech Republic, 2010年9月7日
- ⑥⑱ 中原広道, Interfacial behavior of synthetic pulmonary surfactant preparations with partially fluorinated amphiphiles, 第24回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Prague, Czech Republic, 2010年9月7日
- ⑥⑲ 柴田 攻, Two-component miscibility of a single-chain partially fluorinated amphiphile (*F8H10H*) with DPPC, DPPG, and cholesterol, 第24回ヨーロッパ・コロイド及び界面化学会議, Prague, Czech Republic, 2010年9月7日
- ⑦⑰ 中原広道, An irreversible transformation of peptide secondary

structure in pulmonary surfactant model systems at the air-water interface, 第13回国際組織化膜会議, Quebec, Canada, 2010年6月20日

- ⑦⑱ 中原広道, Salt concentration effect on surfactant adsorption of soluble surfactants at the air-solution interface, 第13回国際組織化膜会議, Quebec, Canada, 2010年6月20日
- ⑦⑲ 中原広道, Potential use of fluorocarbon-hybrid pulmonary surfactant preparations for the surfactant replacement therapy, 第13回国際組織化膜会議, Quebec, Canada, 2010年6月20日
- ⑦⑳ 柴田 攻, Mode of head groups in phospholipids on miscibility with partially fluorinated amphiphiles at the air-water interface, 第13回国際組織化膜会議, Quebec, Canada, 2010年6月20日
- ⑦㉑ 柴田 攻, Monolayer miscibility of a single-chain partially fluorinated amphiphile (*F8H10H*) with biomembrane components, 第13回国際組織化膜会議, Quebec, Canada, 2010年6月20日

[図書] (計1件)

- ① 柴田 攻, 中原広道, 李 相男, CRC Press, Colloids in Biotechnology: Surfactant Science Series 152, 2010, pp521

[その他]

- ① 長崎国際大学
<http://www.niu.ac.jp/>
- ② 長崎国際大学薬学部 薬品物理化学研究室
<http://www.niu.ac.jp/~pharm1/lab/physicschem/index.html>
- ③ ResearchGate
<https://www.researchgate.net/home.Home.html?ref=home>
- ④ Read & Researchmap
<http://researchmap.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 広道 (NAKAHARA HIROMICHI)
長崎国際大学・薬学部薬学科・講師
研究者番号: 00513235

(2) 連携研究者

柴田 攻 (SHIBATA OSAMU)
長崎国際大学・薬学部薬学科・教授
研究者番号: 10117129