肺サーファクタントの界面化学的性質

上野 實

東京理科大学理学部応用化学科 〒162-8601 東京都新宿区神楽坂1-3

Colloidal and Interfacial Properties of Lung Surfactants

Minoru Ueno

Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Science University of Tokyo, 1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8601, JAPAN

Lung surfactant plays an important role of normal respiration to reduce the surface tension at the air-liquid interface of the alveoli and prevents collapse of the lung. The deficiency of lung surfactants causes respiratory distress syndrome(RDS) in premature infants. Thus, many synthetic lung surfactants for RDS treatment have so far been studied and developed by many researchers. The aerosol delivery of dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) as a principal ingredient of lung surfactant was attempted for RDS treatment, but it had no effect³⁾. On the other hand the effective synthetic lung surfactant for RDS including surfactant proteins extracted from bovine lung, named TA, has been developed by Fujiwara et al..

The characteristics of synthetic lung surfactants with or without the surfactant proteins, SP-B, SP-C and SP-BC, were evaluated on the basis of surface modulus and viscosity obtained by applying the Maxwell model to the relaxation of the surface pressure produced by an area strain of 10% on a monolayer on the surface of a buffer solution and were compared with those of the synthetic lung surfactant TA developed earlier. The surface shear modulus and viscosity characteristic of the surface rheology for synthetic lung surfactant TA containing a trace of SP-BC showed a constant value for area strain of 10% under all equilibrium surface pressures and coincided with values of the mixed monolayers obtained by adding SP-BC and SP-B + C to the other components of lung surfactant (except surfactant proteins), but these moduli and viscosities for the systems without surfactant proteins increased with increase in equilibrium surface pressures. These results suggest that the existence of a trace of SP-BC in the synthetic lung surfactant TA improves its effectiveness and may serve as a 'cushion' among dipalmitoyl lecithin molecules in the monolayers during surface compression and expansion of these monolayers.

Key words : surfactant protein / hysteresis loop / surface elastic modulus / surface viscosity / maxwell model

1. はじめに

我々の体内の各器管が生理学的にも、また物理的にも十分にその機能を発揮するためには、その

器管に付随した内外分泌腺から分泌される分泌液が、その役目を担っている場合が多い。それらの成分中には界面活性物質あるいは界面活性剤としての機能を持つものが多く存在し、それが生体内

Fig.1 Structure of lung and alveolar¹⁾

のいたるところで多種多様のコロイドおよび界面現象を引き起こすことによって、器管を円滑に機能させる重要な役目を果たしている。呼吸機能の重要な役目を担っている肺はそれ自身では膨張収縮できず、それを取り巻く肋間筋と横隔膜の収縮運動によって、小気管支の末端にブドウの実の房のように無数に付いている肺胞内に空気が送られ、そこで呼吸に合わせて肺胞表面上の毛細血管の血流中に酸素が取り込まれる。その際、肺胞内の表面を覆っている粘液性の薄層液膜中に存在する肺表面活性剤（Lung Surfactant, LS）は液膜表面で呼吸に合わせて吸脱着することによって表面張力の変化を引き起こし、肺胞の膨張収縮に対して無くてはならない役を演じている。肺胞は、肋間筋と横隔膜の収縮運動だけでは膨張収縮は起こらず、この表面張力の変化による協調作用があって初めて可能となる。このLSが不足すると、呼吸窮迫症候群（Respiratory Distress Syndrome, RDS）という病気になる。この治療のために、牛の肺から抽出された肺表面活性剤の組成に倣って人工肺表面活性剤が開発されている。これらは、まさに生体内の気/液界面現象の典型的な例である。以下、このような観点からLSに関する我々の研究の一端をご紹介したいと思う。

2. 肺サーファクタント（LS）の役割

肺の小気管支の末端には約5億個の半球状の肺胞があり、空気との接触面積を50～70m²にまで増

Table 1 Components in human lung ^{2),3)}

大させている。Fig.1に肺胞の断面を示す¹⁾。前述のようにして、それが肺胞内の気/液界面層に放出されて吸着膜が形成される。肺胞内壁の上皮細胞表面の液膜には、二型細胞によって生合成されたLSがラメラ封入体を形成する。Table 1^{2,3)}に示したようにLSの主成分はジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）であるが、その他に中性脂質、糖質、プロテオリピド等が含まれLSとしての役割をそれぞれ持っている。肺胞が膨張収縮する際の吸着膜と動的表面張力の変化の状態をモデル的にFig.2に示した²⁻⁴⁾。この表面張力の変化によって描かれるヒステリシスループがつぶれていないほうが有効であるといわれている。

実際にLSとして有効なものは、必ず大きなループを描く。LSの有効性をin vitroで評価するのに、Fig.3に示すような改良型Wilhelmy balance が用いられている⁴⁾。この方法は、水面上の吸着膜を圧縮膨張させる際に波を生じるため、実際の呼吸の速さの数分の一の反復速度で測定を行っている。そのため、このin vitroの方法で大きなヒステリシスループが得られ、LSが有効であると推論されてはいるが、in vivoでは必ずしも有効ではなかった。したがって、LSの評価法としては十分とはいえない。

実際の系に近い測定法として気泡を膨張収縮さ

Fig.2 States of LS molecules on alveolar layer by a cycle^{2)~4)}

せる気泡型動的表面張力計 (Pulsating Bubble Method)⁵⁾があるが、再現性が良くないために決め手になる評価の方法ではなかった。

3. 人工肺サーファクタント (人工LS)

肺の発達が未熟でLSが十分に出来ないうちに早産した新生児にはLSが不足して呼吸窮迫症候群 (Respiratory Distress Syndrome, RDS)になることが多い⁶⁾。

この治療薬として、牛の肺から抽出された肺表面活性剤の組成に倣って人工肺表面活性剤が藤原等によって開発され、経気道補充療法として使用されている。人工LSは有効成分として、パルミチン酸 (PA) 9.1%, エッグホスファチジルグリセロール (EggPG) 22.1%, DPPC68.0%, 子牛の肺から抽出したSP-BC, 0.9%をそれぞれ含み、LS-TAの名前で使用されている⁷⁾。LSの主成分はDPPCであるが、DPPC単独成分だけでは呼吸に応じて肺泡を膨張収縮させる効果はなく、子牛の肺から取った微量のSurfactant Protein (SP-B, SP-Cあるいは、SP-BCの混合物)の添加によって人工LSとして有効になることが確認されている。

しかし、この微量のSP-BおよびSP-Cあるいは

Fig.3 Modified Wilhelmy balance⁴⁾

SP-BCが添加されることによって、なぜ有効に作用するのかについては、いままでの測定法では評価することは出来なかった。

4. サーファクタントプロテイン (SP-A,B,C) の性質

微量のSPを添加することによってLSとしての薬効が現われることから、SPには何か特別な機能が備わっていることが予想されるが、実際に研究が進むにつれて、それぞれある役割分担があることが判った。

a) SP-A: 分子量約36000の水溶性糖蛋白質で、二型細胞で生合成されたDPPCと水に不溶性の複合体を形成し、吸着膜上への運搬役になってはいるが、それほど有効成分ではない⁸⁾。

b) SP-B: 子牛のLSの脂質抽出液から分離された分子量6000~8000の疎水性蛋白質で鎖中に多くのシステイン基を含んでいるため、分子間で架橋して容易に多量体を形成する傾向がある。きわめて疎水性が高く、液膜の気/液界面上に吸着し、脂質の吸着膜と2次元状態で複合体 (proteolipid)を形成していると考えられている。このSP-BはLSとして必須の有効成分である⁹⁾。

c) SP-C: 分子量5000~8000で長い疎水基の末端にカルボキシル基を持ち、他端のアミノ基の近くに2個のシステイン基が隣り合って結合しているので分子間よりも分子内SS結合を形成しやすい。したがって、多量体は形成しない。長い疎水

Fig.5 Wilhelmy balance

Fig.4 Models of adsorption of SP's⁹⁾

性を持っているため気/液界面上に吸着してDPPC分子と複合体を形成して、表面張力に大きく影響を与え、LSとして無くてはならない必須成分である⁹⁾。

d) pSP-BC：子牛の脂質抽出液から得られたSP-BとCの混合物である。この混合物も単一物同様に有効である⁹⁾。これらSP-BとCは肺胞内の液膜上に吸着し、吸着脂質分子間に存在して、肺胞が収縮するとき脂質分子どうしが凝縮して拡がらなくなるのを防いでいるものと思われる。Fig.4に配向の予想状態を示す⁹⁾。肺胞内の液膜の気/液界面で、このような混合吸着膜が形成された場合、表面張

力の変化ばかりでなく、その表面の粘弾性が肺胞の膨張収縮作用に重要な役割を果たしていることが予想された。

そこで我々はLSの各々の成分を単分子膜状に水面上に拡げ、一定面積比で圧縮させることによって生じる表面圧力の減衰曲線に一般 Maxwellを適用して、表面粘弾性を得ることを試みたところ、LSとして有効な治療薬の成分には、それに特有な表面レオロジー特性を有するのを見出した。以下その詳細を述べる。

5. LS中の成分でLS以外の成分およびLSを含めた単分子膜の平衡表面圧-面積曲線

Fig.5で示したWilhelmy balanceを用いて平衡表面圧-面積曲線を測定した。Fig.6は各成分の、Fig.7 (a) はSP-BCと各成分との混合系、Fig.7 (b) はSP-BC, SP-B, SP-C, SP-B+Cの単独系の曲線を示す。

6. LS中の成分の単分子膜の表面粘弾性

a) 人工LSの成分

天然LS中の有効な成分は、パルミチン酸 (PA)

Fig.6 Surface pressure-area isotherms for PA (○), DPL (△), EggPG (□), MIX (▲) and TA (●) monolayers on saline water.

Table 2 Limiting area and collapse pressure for a monolayer of each sample on saline water

Sample	Limiting area (nm ² molecule ⁻¹) ^a	Collapse pressure (10 ⁻² N m ⁻¹) ^b
PA	0.23	1.1
EggPG	0.66	2.9
DPL	0.58	4.4
MIX	0.62	1.4
TA(SLS)	1.32	1.7
(SP-BC)-PA	0.29	1.4
(SP-BC)-EggPG	0.92	3.2
(SP-BC)-DPL	0.62	2.8
(SP-BC)-MIX	0.73	3.1

^a ± 0.005.

^b ± 0.05 (within experimental error).

9.0%, エッグホスファチジルグリセロール (EggPG) 22.1%, DPPC68.0%であり, これに子牛の肺から抽出したSP-BC, 0.9%をそれぞれ加えたものが人工LSであり, LS-TAの名前で使用されていることは前に述べた. そこで我々は, Table 3のようにSPとこれら個々の成分との組み合わせを作り, SPの添加による効果を表面粘弾性の測定により評価した¹⁰⁾.

b) 表面粘弾性の測定

Fig.5に示したWilhelmy balanceを表面張力の測定に使用した. 可動式仕切り板で仕切られた一定面積Aを, 一定速度で微小面積ΔAだけ圧縮した

Fig.7 (a) Surface pressure-area isotherms for (SP-BC) system monolayers on saline water. (○), (SP-BC)-PA; (□), (SP-BC)-EggPG; (△), (SP-BC)-DPL; (▲), (SP-BC)-MIX. (b) Surface pressure-area isotherms for surfactant proteins on saline water. (○), SP-BC; (●), SP-B; (□), SP-C; (△), SP-B+C.

ときに生じた表面張力の平衡表面圧までの差 $\Delta\pi$ の減衰経時変化(t)曲線を求めた. $\Delta\pi$ -t曲線を解析するために一つのスプリングと一つのダッシュ・ポットからなる一般Maxwell-Modelを適用して, 歪($\Delta A/A$)一定の条件で, 次の式(1)から表面弾性率 ϵ と表面粘性率 η を求めた¹⁰⁾.

$$(de/dt) = (1/\epsilon)(dP/dt) + (P/\eta) \quad (1)$$

但し, e:歪, t:時間, ϵ :弾性率, P:応力, η :粘性率. 初期条件 $t=0$ のときの初期応力 $P=P_0$, $P=P_0/e$ のときの緩和時間を $t=\tau$ とすると,

Table 3 The components of each sample

Sample	Component (wt.%)							
	PA	EggPG	DPL	Surfactant protein	SP-BC ^a	SP-B ^b	SP-C ^b	SP-B + C ^c
TA(SLS)	9.0	22.1	68.0	0.9	—	—	—	—
MIX	9.0	23.1	68.0	—	—	—	—	—
(SP-BC)-PA	99.1	—	—	0.9	—	—	—	—
(SP-BC)-EggPG	—	99.1	—	0.9	—	—	—	—
(SP-BC)-DPL	—	—	99.1	0.9	—	—	—	—
(SP-BC)-MIX	9.0	22.1	68.0	0.9	—	—	—	—
(SP-B)-MIX	9.0	22.1	68.0	—	—	0.9	—	—
(SP-C)-MIX	9.0	22.1	68.0	—	—	—	0.9	—
(SP-B + C)-MIX	9.0	22.1	68.0	—	—	—	—	0.9

^aSP-BC, surfactant protein separated from the lung surfactant by using a column with chloroform/methanol (2:1 v/v) as a developing solvent.

^bSP-B, SP-C, surfactant proteins separated from SP-BC by using a column with chloroform/methanol (1:1 v/v) solvent including 0.1 mol l⁻¹ hydrochloric acid (5% v/v).

^cSP-B + C, surfactant protein remixed from SP-B and SP-C (at ratio of 65:35 w/w for SP-B:SP-C).

Fig.8 Application of Maxwell model

$e = (\Delta A/A) = \text{一定の場合}$ は、 $(de/dt) = 0$ となるので (1) 式は積分できて、

$$\ln P = \ln P_0 - t/\tau \quad (2)$$

を得る。但し、 $\tau = \eta/\epsilon$ 。

一般にこの式は、緩和時間 t に対して分布があることを考慮して Rausch-Williams Watts¹¹⁾ の parameter β を含む式が使われる。

Fig.9 (a) Surface elastic moduli against ESP for PA, DPL, EggPG, MIX and TA monolayers on saline water at 25°C.
(b) Surface viscosities against ESP for PA, DPL, EggPG, MIX and TA monolayers on saline water at 25°C.

Fig.10 (a) Surface elastic moduli against ESP for (SP-BC) systems with SP-BC and TA monolayers on saline water at 25°C.
(b) Surface viscosities against ESP for (SP-BC) systems with SP-BC and TA monolayers on saline water at 25°C.

Fig.11 (a) Surface elastic moduli against ESP for surfactant protein monolayers on saline water at 25°C.
(b) Surface viscosities against ESP for surfactant protein monolayers on saline water at 25°C.

$$P_t = P_0 \exp \left\{ - (t/\tau)^\beta \right\} \quad (3)$$

この系では、緩和時間 t に対して分布がないので $\beta=1$ とおける。

この式 (2) を 2 次元の表面圧力の変化に適用し、Fig.8¹⁰⁾ に示した対応を考えると、前もって測定された各成分の平衡表面圧 (π_e) - 面積曲線から得られた $\Delta \pi_t$, $\Delta \pi_0$ は、 P_t , P_0 と式 (4), (5) の関係にあるので、式 (2) に代入して式 (6) を得る。

$$P_t = \Delta \pi_t = \pi_t - \pi_e \quad (4)$$

$$P_0 = \Delta \pi_0 = \pi_0 - \pi_e \quad (5)$$

$$\ln \Delta \pi_t = \ln \Delta \pi_0 - t/\tau \quad (6)$$

$\ln \Delta \pi_t - t$ プロットによって得られた直線の切片 $\ln \Delta \pi_0$ と傾き ($-1/\tau$) から、 $\Delta \pi_0$ と τ を得る。一方、Hook の法則から次の式 (7), (8) を得る。

$$\varepsilon = -\Delta \pi_0 / (\Delta A/A) \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \eta &= -\tau * \varepsilon \\ &= -(\Delta \pi_0) * \tau / (\Delta A/A) \end{aligned} \quad (8)$$

Table 3 の各成分の組み合わせについて得られた平衡表面圧に対する表面粘弾性の結果を Fig.9~12¹²⁾ に示した。人工LS-TA は、平衡表面圧変化に対しても殆ど変化せず、ある一定の粘弾性を示し、SP を含まない他の成分に対する結果とは明らかに

Fig.12 (a) Surface elastic moduli against ESP for SP-MIX monolayers with various surfactant proteins on saline water at 25°C.
(b) Surface viscosities against ESP for SP-MIX monolayers with various surfactant proteins on saline water at 25°C.

っきりとした差が見られた。更に、TAと殆ど同じ成分を持つ、(SP-B)-Mix, (SP-C)-MIXと(SP-B+C)-MIXの粘弾性の平衡表面圧に対する傾向は、殆どTAと同じであった。このことから、我々はSPの存在がLSの有効性にとって不可欠の条件であると結論した。なぜ、微量のLSの添加で有効になるのか、表面層に吸着しているSPの挙動に関する詳細は不明であるが、粘弾性の結果から次のことが結論できる。

肺胞の膨張に際して、SP分子はDPPCやその他の吸着分子と複合体を形成し、肺胞内表面上に拡がる役目をし、肺胞の収縮に際しては、DPPCのように凝集しないように吸着分子に対してクッションのように作用することによって、絶えず表面粘弾性を一定に保持し、呼吸のサイクル運動を助

Fig.13 Molecular formula of DPPC, Cho-Linoleate, StOH and Ole-Ac.

Fig.14 Equilibrium surface pressure-area isotherms for each single system of A, B and C.

Fig.15 Surface elastic moduli and viscosities against equilibrium surface pressure for each single system of A, B and C.

けていると結論される。このように、SPはLSに対して重要な役目を担う機能性を持った高分子であることが確認された。動物の肺から微量しか採取出来ないSPに代わる、よりLSとしての機能性を持ち、肺胞に適合したSPの代替分子を開発することが、これからの課題と考えている。

7. LSの替わりにリノール酸コレステロールを加えた系の粘弾性

Table 4¹³⁾にその成分を、分子式をFig.13に示す。Table 4に示すように、DPPC、ステアリルアルコール (StOH)、オレイン酸(ole-Ac)の三成分にリノール酸コレステロール(Cho-Linoleate)を微量混合した系(F-I, II, IIIとIV)について、有用な結果を得た。Fig.14に単独成分に対する平衡表面圧-面積曲線を示し、Fig.15にその粘弾性を示した。Fig.16

Fig.16 Equilibrium surface pressure-area isotherms for binary mixed systems for D-I and D-II.

Fig.17 Equilibrium surface pressure-area isotherms for ternary mixed system E and for quaternary mixed systems F-I, F-II, F-III and F-IV.

とFig.17にTable 4中の混合系(D~F)の平衡表面圧-面積曲線を示した。Fig.18に示した動的表面張力-面積(%)ループ曲線では、F-IIの曲線が大きなループを描き、有効性を暗示した。その中で

Table 4 Mixed molar ratios of systems examined in this work

System		DPPC	:	Cho-Linoleate	:	StOH	:	Ole-Ac
Single system	A	1						
	B					1		
	C							1
Binary mixed system	D-I	11	:	1				
	D-II	13	:	1				
Ternary mixed systems	E	11	:	1	:	7		
Quaternary mixed systems	F-I	11	:	1	:	7	:	0.5
	F-II	11	:	1	:	7	:	1.0
	F-III	11	:	1	:	7	:	1.5
	F-IV	11	:	1	:	7	:	2.0

* Values, molar ratio.

Fig.18 Dynamic surface tension-area loops during compression and expansion of surface area for quaternary mixed systems for F-I, F-II, F-III and F-IV.

Fig.19¹³⁾に示したようにF-IIの弾性率と粘性率は平衡表面圧の変化に影響されず、一定値を示した。この結果は、LSを加えた効果と同一の効果を付与したことを意味している。微量のリノール酸コレステロールの添加により、これがクッションのように作用して、単分子膜中でDPPC分子どうしの凝集を防いでいると推論した¹³⁾。

Fig.19 Surface elastic moduli and viscosities against equilibrium surface pressure for quaternary mixed systems for F-I, F-II, F-III and F-IV.

文 献

- 1) Watanabe I, Tokari S: Igaku no ayumi, **148** 447 (1989)
- 2) Takahashi K, Nakamura H: Shinkoukoueki Eds.Comp., p.165 (1990)
- 3) King RJ, Klass DJ, Gikas EG, et al.: *Am. J. Physiol.*, **224** 788 (1973)
- 4) Kobayashi T: Shinkoukoueki Eds.Comp., p.9 (1990)
- 5) ibid, p.8 (1990)
- 6) Berry D, Ikegami M, Jobe A: *J.Appl.Physiol.*, **61** 1741 (1986)
- 7) Tanaka Y: Shinkoukoueki Eds. Comp., p.195 (1990)
- 8) (a) Weaver T and Whitsett JA: *J.273* 249-264 (1991)
(b) Hawgood S: *Annu. Rev. physiol.*, **53** 375-394 (1991)
(c) Hawgood S: *Am.J.Physiol.*, **257** L13-L22 (1989)
(d) Whitsett JA and Baat JE, eds Robertson B., Van Golde LMG, Baterburg JJ, Elsevier Amsterdam..pp 55-76 (1992)
- 9) Fujiwara T, Takahashi A, Waring AJ, Tausch H W : *J.Jnp.med.Soc.Biol.Interface*, **24** 70-74 (1993)
- 10) (a) Nakamura M, Takeuchi S: *Bull.Chem. Soc.Japan*, **51** 2776 (1978)
(b) Ueno M, Fukuda K, Masuda H, Takeo N, Nakamura M: *J.Jnp.med.Soc.Biol.Interface*, **18** 43 (1987)
(c) Ueno M, Fukuda K, Masuda H, Takeo N, Tanaka Y, Fujiwara T: *J.Jnp.med.Soc.Biol. Interface*, **19** 36 (1988)
(d) Ueno M, Takeo N, Samura K, Tanaka Y, Fujiwara T : *J.Jnp.med.Soc.Biol.Interface* **20** 14 (1989)
- 11) Williams G, Watts DC: *Trans. Faraday Soc.*, **66** 80 (1970)
- 12) (a) Ueno M, Samura K, Tanaka Y, Kasai H, Fujiwara T: *J.Jnp.med.Soc.Biol.Interface*, **21** 87-96 (1990)
(b) Ueno M, Samura K, Fukuda N, Takeo T, Takei A, Takahashi T, Fujiwara H, *AsanoBiointerfaces*, **1**, 221-232 (1993)
- 13) Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces* **17**, 167 174 (2000)
(受付 2002年8月17日 掲載決定 8月21日)