

希釈された肺サーファクタントの機能に対する水溶性非イオン性高分子の効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4544

希釈された肺サーファクタントの機能に対する 水溶性非イオン性高分子の効果

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能回復学

(旧講座名：麻酔・蘇生学)

(主任：小林 勉教授)

紺 崎 友 晴

急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) における呼吸不全の成因には、肺水腫液による肺サーファクタントの希釈が関与している。近年、水溶性非イオン性高分子は、血漿蛋白によるサーファクタントの活性低下を阻止することが判明した。著者は、希釈されたサーファクタントの機能がデキストランおよびポリエチレングリコール (水溶性非イオン性高分子) を添加することにより増強するかどうかを検討した。気泡拍動型表面張力計による測定では、1 mg/mlの濃度に希釈したサーファクタントの最小表面張力は15 mN/m前後であった。しかし、18.1~71 kDaのデキストラン、または6~70 kDaのポリエチレングリコールを10 mg/mlの濃度で添加すると最小表面張力は7 mN/m以下に低下した。またサーファクタントが欠損しているウサギ未熟胎仔に、3 mg/mlの濃度のサーファクタントを投与しても肺-胸郭コンプライアンスは0.05 ml/kg/cmH₂O以下に過ぎなかった。しかし、上記の水溶性非イオン性高分子が添加されたサーファクタントはコンプライアンスを有意に増加させ、とくに40 kDaのデキストランと20 kDaのポリエチレングリコールを加えた際の値は0.6 ml/kg/cmH₂O以上に達した。以上の結果から、デキストランやポリエチレングリコールは希釈されたサーファクタントの界面活性および生理学的機能を増強すると結論された。また、この現象には分子量が関係していると結論された。機序については今後の検討を必要とするが、本研究の結果からARDSの呼吸不全対策として、水溶性非イオン性高分子を応用するという全く新しい治療法の可能性が示唆された。

Key words dextran, lung-thorax compliance, polyethylene glycol, surface tension, surfactant

肺サーファクタントは、リン脂質と数種のサーファクタント蛋白 (surfactant protein, SP) を主成分とし、肺胞の気液界面に吸着膜を形成することで界面活性作用を発揮し、肺コンプライアンスを正常に保っている物質である¹⁾。したがって、肺サーファクタントが障害されると換気量や機能的残気量が減少し、呼吸不全が生ずる。急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) では肺毛細血管の透過性が亢進するため水腫液が肺胞腔に出現し、サーファクタントが希釈されて界面活性が弱まる^{2)~4)}。さらに、肺水腫液中に含まれる血液由来の蛋白質は、肺サーファクタントの界面活性作用を阻害する^{5)~10)}。このような理由からサーファクタントの活性を高め、希釈や阻害物質に拮抗できるようにする対策の開発はARDSの治療法を進歩させるうえで重要な研究課題になっている。

近年、デキストランやポリエチレングリコールなどの水溶性非イオン性高分子をサーファクタントに添加すると、種々の阻害物質に拮抗できることが見出されている^{11)~15)}。この知見は、ARDSの新しい治療法に繋がるものとして注目されているが、

希釈による界面活性の減弱に対する効果を検討した報告は見当たらない。今回著者は、加工天然サーファクタント (modified natural surfactant, MNS) の動的表面張力とウサギ未熟胎仔の肺-胸郭コンプライアンスを指標として、希釈されたサーファクタントの界面活性に対するデキストランとポリエチレングリコールの影響を検討し、それぞれの至適分子量を調査した。また、高分子とサーファクタント分子の相互作用について若干の考察を追加した。

対象および方法

I. 試料の調製と試薬

1. MNSの作製

MNSは、ブタの肺胞洗浄液から抽出した。新鮮なブタの摘出肺を生理食塩水で洗浄し、回収した肺胞洗浄液中の細胞成分を遠心 (150 × g, 10分間) で除去した後、上清を再び遠心 (2,000 × g, 1時間, 4℃) して沈渣 (白濁層) を得た。白濁層にクロロホルムとメタノール (体積比 2:1) の混合液を加えて

平成14年1月4日受付, 平成14年1月22日受理

Abbreviations : ARDS, acute respiratory distress syndrome; MNS, modified natural surfactant; PEEP, positive end-expiratory pressure; PIP, peak inspiratory pressure; SP, surfactant protein; γ max, maximum surface tension; γ min, minimum surface tension

脂質成分を抽出したうえ、0.5%塩化ナトリウム溶液を用いた洗浄により抽出物中の親水性蛋白を除去した。さらに、アセトン沈殿法により中性脂肪やコレステロールを除去した後、凍結乾燥したものをMNSとした。なお、MNSは、98%のリン脂質、1%の中性脂肪と脂肪酸、および1%の疎水性SP (SP-BとSP-C)から成り立っており、親水性のSP (SP-AとSP-D)を含んでいないものである¹⁶⁾。今回の実験では、最初にMNSを3 mg/mlの濃度で生理食塩水に分散させたS-only試験液を作成した。

2. デキストランを添加したMNSの調製

デキストランには、乾燥粉末状で平均分子量が9.5 kDa (D-9260, Sigma Chemical, St. Louis, USA), 18.1 kDa (D-4626, Sigma Chemical), 40 kDa (D-1662, Sigma Chemical), および71 kDa (D-1537, Sigma Chemical)の4種類のものを用意した。これらを用いて、S-only試験液中に上記のデキストランが30 mg/mlの濃度で含まれた9.5-DS, 18-DS, 40-DSおよび71-DSの各試験液を用意した。

3. ポリエチレングリコールを添加したMNSの調製

ポリエチレングリコールには、平均分子量が0.6 kDa (162-09115, 和光純薬, 東京), 6 kDa (169-09125, 和光純薬), 20 kDa (168-11285, 和光純薬), および70 kDa (168-16861, 和光純薬)の4種類を準備した。S-only試験液に上記のポリエチレングリコールを30 mg/mlで加えた0.6-PS, 6-PS, 20-PSおよび70-PSの各試験液を作成した。

II. 動的表面張力の測定法

動的表面張力(γ)の測定には、気泡拍動型表面張力計(PBS, Electronics, Buffalo, USA)を使用した。試験液を表面張力計の測定室(容量 = 25 μ l)に入れ37℃に加熱した。次いで試験液中に半径0.40 mmの大きさの気泡を作成した後、毎分40回の速度で気泡の半径を0.40 ~ 0.55 mmの間で拍動させた。拍動開始5分後の気泡の半径が最小および最大の時の γ 、すなわち最小表面張力(minimum surface tension, γ min)および最大表面張力(maximum surface tension, γ max)を気泡内外の圧差(ΔP)と気泡の半径(R)からLaplaceの式($\gamma = \Delta P \cdot R/2$)を用いて計算した¹⁷⁾。

III. ウサギ未熟胎仔を用いた動的肺-胸郭コンプライアンスの測定

交配後26日の妊娠ウサギ(日本白色種, 満期妊娠日数31日)をペントバルビタール30 mg/kgの静注で麻酔した後、帝王切開で胎仔を娩出した。胎仔に対しても即座にペントバルビタール0.5 mgを腹腔内投与して麻酔した後、気管に18ゲージの金属カニューレを挿入した。次いで、同腹の胎仔(3~10羽)を無作為に対照群と試験液群に分けた。対照群には生理食塩水を、試験液群には試験液を100 μ lずつ気管内に投与した。その後、胎仔を図1に示すように37℃に加熱した並列式プレシモグラフ装置¹⁶⁾¹⁸⁾に收容した。なお、先に收容された胎仔は全ての胎仔が準備できるまで、100%酸素による5 cmH₂Oの持続性気道陽圧下で待機させた。

全ての胎仔が準備できたところで、胎仔の腹腔内に臭化バンクロニウムを0.02 mg投与して筋弛緩を得た後、100%酸素による従圧式の換気を行った。人工呼吸器にはServo 900B (Siemens-Elma, Solna, Sweden)を用い、最大吸気圧(peak inspiratory pressure, PIP)を22.5 cmH₂O, 終末呼気陽圧(positive end-expiratory pressure, PEEP)を2.5 cmH₂O, 呼吸回数を40回

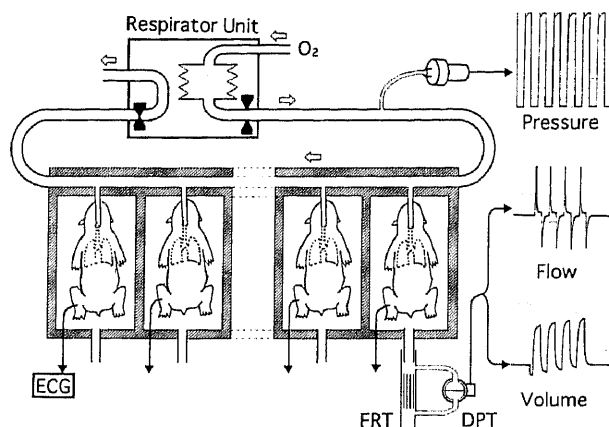


Fig. 1. Schema of tidal volume measurement system for immature newborn rabbits. O₂, oxygen; FRT, flow resistant tube; DPT, differential pressure transducer; ECG, electrocardiogram. Open arrows show direction of oxygen flow.

/分, 吸気と呼気の時間比を1:1に設定した。換気開始から20分間, 5分毎に一回換気量を測定し, この値(ml)を体重(kg)と換気圧差(PIP - PEEP, cmH₂O)で除して動的肺-胸郭コンプライアンス(ml/kg/cmH₂O)を求めた。なお, 一回換気量は個々のプレシモグラフ装置に気流抵抗管を接続し, 差圧検出器(TP-602T, 日本光電, 東京), 呼吸用アンプ(AR-601G, 日本光電), および換気量ユニット(AQ-601G, 日本光電)を介して求めた¹⁶⁾¹⁹⁾。

実験終了後, 心電図を記録し心拍数が120/分以上(ウサギ未熟胎仔の正常心拍数は240~320/分)のものを生存動物と判定した。その後, 過量のペントバルビタールを腹腔内投与して屠殺し開腹して経横隔膜的に胸腔の状態を観察し, 気胸が確認されたものは統計処理から除外した。

IV. 統計解析

ウサギ未熟胎仔の生存率の有意差判定にはYates補正を加えた χ^2 乗検定を用いた。その他の測定結果については平均値±標準誤差($\bar{x} \pm$ SEM)で表し, 一元配置または二元配置分散分析を行ったうえで, Sheffeの多重比較検定で有意差を判定した。いずれも, 危険率(P)が0.05以下を有意とした。

成 績

I. デキストランの動的表面張力への影響

動的表面張力に対してデキストランがどのように影響を与えるかについて, 分子量の異なる4種のデキストランを添加したMNS溶液(9.5-DS, 18-DS, 40-DS, 71-DS)をそれぞれ生理食塩水で3倍に希釈して, これらを試験液として用いて調べた。デキストランを加えないS-onlyも生理食塩水で3倍に希釈して対照液とし, デキストランを添加したMNSの γ minおよび γ maxを図2に示した。なお, 記載された値は各検体について5回の測定を行った結果を示している。

γ minは図2のAに示すように, S-onlyで15.0 \pm 0.9 mN/mであった。9.5-DSでは11.1 \pm 2.7 mN/mで, S-onlyに比べ有意差を認めなかった。一方, 18-DS, 40-DSおよび71-DSの γ minはそれぞれ4.4 \pm 0.7, 6.9 \pm 1.7および6.7 \pm 1.5 mN/mであり, S-onlyに比べて有意に低い値を示した。

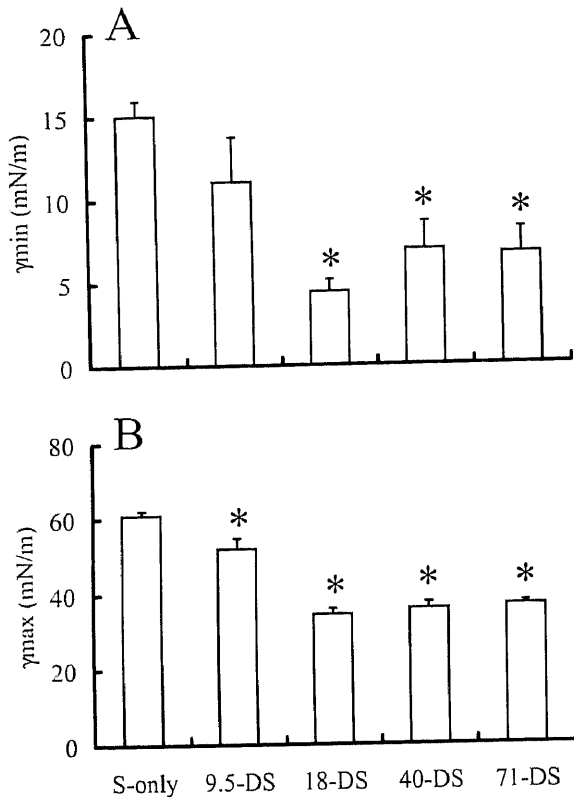


Fig. 2. Dynamic surface tensions of diluted test liquids that contain modified natural surfactant (MNS) at 1 mg/ml and various molecular weights of dextran at 10 mg/ml. (A) minimum surface tension (γ_{\min}). (B) maximum surface tension (γ_{\max}). Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of 5 measurements. * $P < 0.05$ vs. S-only (1 mg/ml MNS only in saline).

γ_{\max} は、図2のBに示すようにS-onlyで60.9 ± 1.1 mN/mであった。9.5-DSでは51.9 ± 2.7 mN/mとS-onlyと比べて有意に低下した。18-DS、40-DSおよび71-DSの γ_{\max} は平均値で38 mN/m以下で、9.5-DSと比べても有意に低い値を示した。

II. ポリエチレングリコールの動的表面張力への影響

動的表面張力に対してポリエチレングリコールがどのように影響を与えるかについて、分子量の異なる4種のポリエチレングリコールを添加したMNS溶液(0.6-PS, 6-PS, 20-PS, 70-PS)をそれぞれ生理食塩水で3倍に希釈して、これらを試験液として用いて調べた。ポリエチレングリコールを加えないS-onlyも生理食塩水で3倍に希釈して対照液とし、ポリエチレングリコールを添加したMNSの γ_{\min} および γ_{\max} 図3に示した。なお、記載値はデキストランの実験と同じく5回の測定結果である。

S-onlyの γ_{\min} (14.8 ± 1.1 mN/m)および γ_{\max} (58.9 ± 2.2 mN/m)はデキストランの実験と同等であった。その他の各試験液の γ_{\min} は、図3のAに示すように0.6-PSの値は16.9 ± 2.1 mN/mでありS-onlyに比べて有意差を認めなかった。6-PS、20-PSおよび70-PSの γ_{\min} は、それぞれ0.8 ± 0.4、3.5 ± 0.6および4.2 ± 1.3 mN/mでありS-onlyに比べて有意な低値を示した。これら3群間では有意差を認めなかったが、6-PSが最も低い値を示した。

γ_{\max} は、図3のBに示すように0.6-PSで59.4 ± 2.4 mN/m

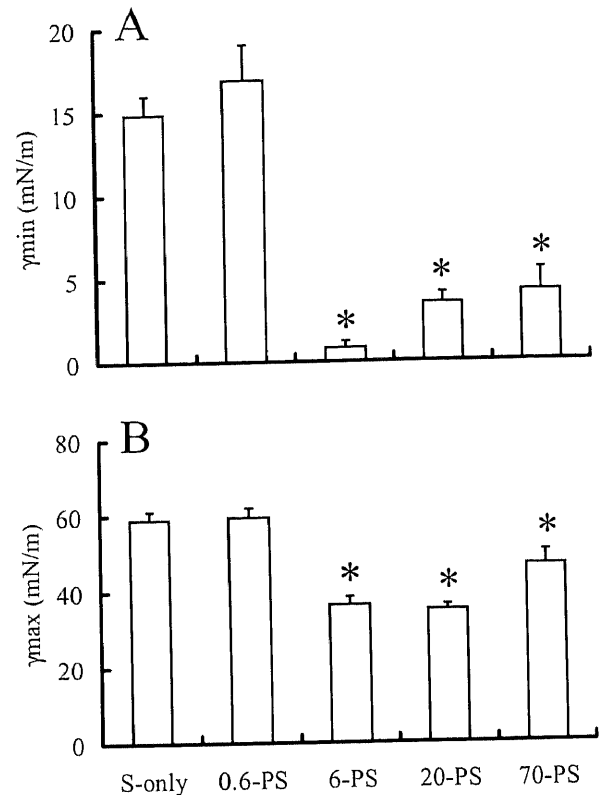


Fig. 3. Dynamic surface tensions of diluted test liquids that contain modified natural surfactant (MNS) at 1 mg/ml and various molecular weights of polyethylene glycol at 10 mg/ml. (A) minimum surface tension (γ_{\min}). (B) maximum surface tension (γ_{\max}). Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of 5 measurements. * $P < 0.05$ vs. S-only (1 mg/ml MNS only in saline).

であり、S-onlyに比べて有意差を認めなかった。6-PS、20-PSおよび70-PSの値はそれぞれ36.3 ± 2.1、35.0 ± 1.3および46.5 ± 3.6 mN/mであり、S-onlyに比べて有意な低値を示した。これら3群間では有意差を認めなかったが、70-PSが他の2群よりも高い傾向を示した。

III. ウサギ未熟胎仔の動的肺-胸郭コンプライアンスへのデキストランの効果

デキストランがウサギ未熟胎仔の動的肺-胸郭コンプライアンスに対してどのように影響を与えるかについて、4種のデキストランを添加したMNS溶液(9.5-DS, 18-DS, 40-DS, 71-DS)を試験液として用いて調べた。

デキストランが添加されたMNSを投与したウサギ未熟胎仔の体重および生存率を表1に示す。各群の胎仔の体重に有意差を認めなかった。18-DS、40-DSおよび71-DS群の生存率が他より高い傾向を示したが、統計学的有意差は認めなかった。なお、気胸を認めた動物はいなかった。

図4に動的肺-胸郭コンプライアンスの推移を示す。対照群のコンプライアンスの平均値は、20分間の観察期間を通じて0.05 ml/kg/cmH₂O未満で推移した。S-only群の値は20分間通じて0.05 ml/kg/cmH₂O未満にとどまり、対照群と比べて有意差を認めなかった。9.5-DS群と71-DS群では経過と共に上昇し、換気20分後ではそれぞれ0.22 ± 0.09と0.34 ± 0.12 ml/kg/cmH₂O

Table 1. Content of test liquids, number of animals, body weight and survival rate in experiment of the effect of dextran on dynamic lung-thorax compliance of newborn rabbits

Test liquid	MNS (mg/ml)	Dextran		No. of rabbits	Body weight (g)	Survival rate
		(kDa)	(mg/ml)			
Control	-	-	-	8	23.3±1.4	2/8
S-only	3	-	-	9	23.3±1.8	3/9
9.5-DS	3	9.5	30	7	27.8±3.1	3/7
18-DS	3	18.1	30	7	22.9±3.0	4/7
40-DS	3	40	30	8	24.4±1.7	6/8
71-DS	3	71	30	7	26.0±1.8	5/7

MNS, modified natural surfactant. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

Table 2. Content of test liquids, number of animals, body weight and survival rate in experiment of the effect of polyethylene glycol on dynamic lung-thorax compliance of newborn rabbits

Test liquid	MNS (mg/ml)	Polyethylene glycol		No. of rabbits	Body weight (g)	Survival rate
		(kDa)	(mg/ml)			
Control	-	-	-	8	23.8±1.3	2/8
S-only	3	-	-	9	26.1±1.4	1/9
0.6-PS	3	0.6	30	9	26.0±0.9	5/9
6-PS	3	6	30	10	25.4±0.8	9/10
20-PS	3	20	30	10	25.6±1.9	5/7 †
70-PS	3	70	30	10	25.9±1.0	4/10

MNS, modified natural surfactant. †, three animals were excluded because of pneumothorax. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

を示し、対照群とS-only群に比べて有意差を認めた。18-DS群と40-DS群では20分後で 0.47 ± 0.18 と 0.61 ± 0.17 ml/kg/cmH₂Oにまで上昇し、9.5-DS群と71-DS群と比べても有意に大きい値を示した。18-DS群と40-DS群とでは有意差を認めなかったが、20分後の値では40-DS群の方が高い傾向を示した。

IV. ウサギ未熟胎仔の動的肺-胸郭コンプライアンスへのポリエチレングリコールの効果

ポリエチレングリコールがウサギ未熟胎仔の動的肺-胸郭コンプライアンスに対してどのように影響を与えるかについて、4種のポリエチレングリコールを添加したMNS溶液(0.6-PS, 6-PS, 20-PS, 70-PS)を試験液として用いて調べた。

ポリエチレングリコールが添加されたMNSを投与したウサギ未熟胎仔の体重および生存率を表2に示す。20-PS群では10例中3例に気胸が確認されたため対象から除外したが、他の群では気胸を認めなかった。各群の胎仔の体重に有意差を認めなかった。6-PSおよび20-PS群の生存率が他群より高い傾向を示したが、統計学的有意差は認められなかった。

図5に動的肺-胸郭コンプライアンスの推移を示す。対照群とS-only群のコンプライアンスは観察期間を通じて0.05 ml/kg/cmH₂O未満であり、デキストランの実験と同程度であった。0.6-PS群の値は換気開始20分後でも 0.09 ± 0.02 ml/kg/cmH₂Oにすぎなかった。6-PS群では20分後の値が 0.60 ± 0.10 ml/kg/cmH₂Oにまで上昇し、対照群やS-only群はもとより0.6-PS群および70-PS群に対しても有意に高値を示した。20-PS群では、20分後の値が 0.61 ± 0.17 ml/kg/cmH₂Oに

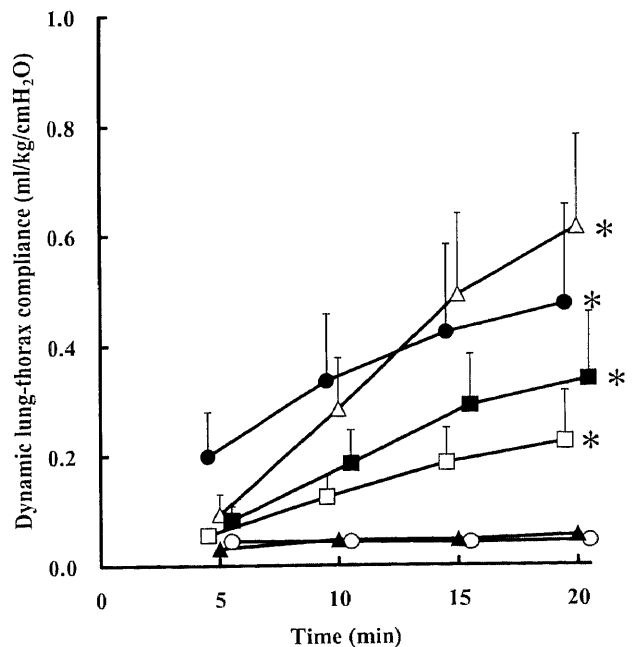


Fig. 4. Dynamic lung-thorax compliance of newborn rabbits receiving various test liquids in experiment of the influence of dextran on dynamic lung-thorax compliance of newborn rabbits. ○, normal saline as control (n=8); ▲, S-only (n=9); □, 9.5-DS (n=7); ●, 18-DS (n=7); △, 40-DS (n=8); ■, 71-DS (n=7). Time, minutes after the start of ventilation. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs. Control.

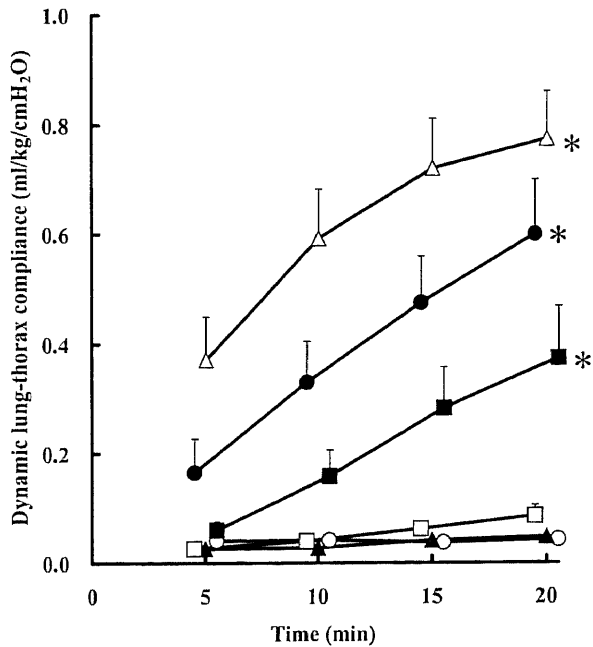


Fig. 5. Dynamic lung-thorax compliance of newborn rabbits receiving various test liquids in experiment of the influence of polyethylene glycol on dynamic lung-thorax compliance of newborn rabbits. ○, normal saline as control (n=8); ▲, S-only (n=9); □, 0.6-PS (n=9); ●, 6-PS (n=10); △, 20-PS (n=7); ■, 70-PS (n=10). Time, minutes after the start of ventilation. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$ vs. Control.

差し、観察期間を通じて他の全ての群よりも有意に高値を示した。70-PS群では20分後に $0.37 \pm 0.09 \text{ ml/kg/cmH}_2\text{O}$ にまで上昇し、対照群やS-only群および0.6-PS群に比べて高値を示した。

考 察

今回の実験の結果、1 mg/mlのMNSは $\gamma \text{ min}$ を15 mN/m後にまでしか低下させず、3 mg/mlのMNSにはウサギ未熟胎仔の肺-胸郭コンプライアンスを好転させる能力がないと判定された。しかし、水溶性非イオン性高分子であるデキストランおよびポリエチレングリコールのなかにはMNSの $\gamma \text{ min}$ を5 mN/m以下に低下させ、コンプライアンスを増加させるものがあることが判明した。なお、この高分子の作用には、分子量の大きさが関係していた。

$\gamma \text{ min}$ は肺胞が収縮した際(呼気時)の肺胞の表面張力に相当し、この値が5 mN/m以上の場合は無気肺が発生すると考えられている²⁰⁾。今回の実験で使用したMNSは、濃度が10 mg/mlの場合、5 mN/m以下の $\gamma \text{ min}$ を示すことが確認されている⁸⁾²¹⁾。正常な肺胞被覆層におけるサーファクタントの濃度は、120 mg/ml程度と見積もられている²²⁾。しかし、高濃度酸素の暴露やエンドトキシン投与でARDSを発症させた動物では、肺水腫液中に含まれるサーファクタントの濃度が1 mg/ml以下であると報告されている¹⁰⁾²³⁾。ARDSでは、この肺水腫液が肺胞被覆層を形成していると見なされる。今回はARDSにおける肺胞被覆層を念頭におき、MNSの濃度を1 mg/mlに希釈した。その結果、MNSのみの場合の $\gamma \text{ min}$ は肺機能が保持できないと見

なされる値に上昇した。したがって、この $\gamma \text{ min}$ の所見からでもARDSにおける呼吸不全の原因にサーファクタントの希釈が関与していると推定できる。

在胎26日未満のウサギ未熟胎仔は、自己の肺サーファクタントが欠如しており、そのままでは人工呼吸によっても換気量を発現しないと言われている¹⁶⁾²¹⁾。事実、今回の実験における対照群のコンプライアンスは、0.05 ml/kg/cmH₂O前後の低値であった。しかし、このウサギ胎仔の肺-胸郭コンプライアンスは、外部から投与されたサーファクタントの活性に見合っ好転することが知られており²⁴⁾、30 mg/mlのMNSを投与すると1 ml/kg/cmH₂O前後の値を示すようになることが確認されている²¹⁾。

今回の実験では、ウサギ未熟胎仔に投与するMNSの濃度をサーファクタント補充療法で一般に使用されている濃度の1/10以下である3 mg/mlに設定した。出生直後の肺胞は肺水で満たされている。ウサギ未熟胎仔における肺水の量を200 μl 前後と見積もると²⁵⁾、肺内に投与された100 μl の試験液は、さらに1/3に希釈されることになり、肺胞におけるMNSの濃度は1 mg/ml前後になると計算される。すなわち、今回のウサギ未熟胎仔に投与したMNSの濃度もARDSにおける肺胞被覆層のサーファクタントの濃度を念頭に設定したものである。以上の考察から、今回のウサギ未熟胎仔のコンプライアンス所見もARDSの呼吸不全にサーファクタントの希釈が関与していることを示していると考えられる。

今回の実験結果から、希釈されたMNSでもデキストラン(9.5~71 kDa)またはポリエチレングリコール(6~70 kDa)を添加すると、界面活性や生理的な機能を発揮すると判定された。デキストランおよびポリエチレングリコール自体は、ほとんど界面活性を示さない¹¹⁾¹²⁾。しかし、前述したように、Kobayashiら¹¹⁾やTaeuschら¹²⁾は、血清蛋白質や胎便などのサーファクタント阻害物質によって障害されたサーファクタントの機能が、非イオン性高分子により回復することを見出している。この機序にはサーファクタント、阻害物質、および非イオン性高分子の3者の相互作用が関与していると考えられているが、今回の実験結果は非イオン性高分子がサーファクタントに直接に作用することを示唆している。

アルブミンやフィブリノーゲンなどの荷電を有する高分子は、一般にサーファクタントの活性を阻害する⁵⁾⁶⁾²⁶⁾。一方、デキストランやポリエチレングリコールなどの非イオン性高分子は、サーファクタントの活性を充進する。この違いは極性基が関与している可能性がある。また水中におけるサーファクタントは、高濃度では多くの分子が集合したミセルと呼ばれる形態をとり、低濃度では個々の分子が単独で存在する形態をとりやすい²⁷⁾。これらの特性から、水溶性非イオン性高分子が希釈されたサーファクタントの活性を強める機序については、下記のような推定が可能であろう。すなわち、極性基が多い非イオン性高分子はサーファクタントの濃度が薄い場合でも、分子相互に橋渡しを形成してサーファクタント分子同士を凝集させると言われている²⁸⁾²⁹⁾。さらにデキストランやポリエチレングリコールは、水の分子を引き付けリン脂質間を脱水することでリン脂質分子を癒合させることが知られている^{30)~32)}。

肺サーファクタントを大きな凝集の分画(large-aggregate)と小さな凝集の分画(small-aggregate)に分けた場合、前者は強い界面活性を示すが、後者の活性は弱いことが知られている^{33)~35)}。

サーファクタントは、気液界面に吸着して界面活性を示す²⁰⁾。その際、大きな凝集の分画は気液界面に広い吸着膜を形成できるため、界面活性が強まると想定される。同様に、高分子によって凝集したリン脂質でも界面活性が強まる可能性がある。このような点から、界面現象に関わる非イオン性高分子の作用には脂質分子間の橋渡しおよび脱水が関与している可能性を否定できないと考える。

高分子がリン脂質分子の間の橋渡しを形成するには、ある程度の大きさの分子量が必要である²⁸⁾。今回の実験で、9.5 kDaのデキストランや0.6 kDaのポリエチレングリコールを添加してもMNSの活性が高まらなかった。この現象は、上記の分子量では橋渡しに必要な長さが不足しており、サーファクタント分子を凝集させなかったのが原因であったと考えられる。一方、分子量が大きすぎる非イオン性高分子は脂質分子の表面を覆ってしまい、脂質分子相互の接近を妨げて凝集を生じさせない²⁸⁾。今回の実験で、71 kDaのデキストランや70 kDaのポリエチレングリコールを添加してもコンプライアンスが十分に好転しなかった理由には、上記のような機序が関与していると想定される。しかし、サーファクタント分子の凝集と界面活性を直接に結び付けることには問題があり、作用機序については今後の検討が必要である。

前述したように、ARDSでは肺毛細血管の透過性が亢進して水腫液が肺胞に出現し、サーファクタントを希釈する。さらに、水腫液中に存在する血液由来の蛋白質がサーファクタントの活性を阻害する^{5) (6) (26)}。これらに対処する方法として、経気道的にサーファクタントを投与する補充療法が検討されている^{36)~40)}。しかし、投与されたサーファクタントが肺水腫液によって希釈や活性阻害を受けるために効果が長続きせず⁵⁾、ARDSに対するサーファクタント補充療法は、未だ一般化していない。本研究の結果から、血液中に非イオン性高分子が存在すれば水腫液と同時に高分子も肺胞に出現し、サーファクタントの活性を保持する可能性がある。すなわち、非イオン性高分子の静注によって呼吸不全を予防するという全く新しい治療法が考えられる。

今回の研究で用いたMNSはSP-AやSP-Dを含んでいない。これらを含む完全な肺サーファクタントと水溶性非イオン性高分子の関係を検討する必要がある。また、ウサギ胎仔のコンプライアンスが経時的に増加した機序、PEEPの影響、さらには高分子を生体に投与した際の安全性など検討を要する課題は多い。しかし、現時点でもARDSの死亡率は50%を超えている⁴¹⁾。希釈された肺サーファクタントの活性に対する水溶性非イオン性高分子の作用は、ARDSの治療法を進歩させるうえで、今後さらに検討すべき課題であると考えられる。

結 論

希釈されたサーファクタントの機能に対する水溶性非イオン性高分子の作用を検討するため、MNSにデキストランおよびポリエチレングリコールを添加して、界面活性と生理学的作用の変化を調査し、以下の結論を得た。

1. ARDS動物の肺胞被覆層におけるサーファクタントと同程度の濃度に希釈したMNS (1 mg/ml) は、界面活性を示さない。
2. 分子量が18.1 ~ 71 kDaのデキストランは、希釈されたMNSの界面活性を発現させる。
3. 分子量が6 ~ 70 kDaのポリエチレングリコールは、希釈さ

れたMNSの界面活性を発現させる。

4. MNSをARDS動物の肺胞被覆層におけるサーファクタントと同程度の濃度になるように希釈し、ウサギ未熟胎仔の肺胞内に注入しても、肺-胸郭コンプライアンスは好転しない。

5. 分子量が9.5 ~ 71 kDaのデキストランが存在すると、肺胞内のMNSが希釈されていても肺-胸郭コンプライアンスは有意に好転する。なお、この作用は40 kDaのものが最も強い。

6. 6 ~ 70 kDaのポリエチレングリコールが存在すると、肺胞内のMNSが希釈されていても肺-胸郭コンプライアンスは有意に好転する。なお、この作用は20 kDaのものが最も強い。

以上の所見から、ARDSにおける呼吸不全の原因には肺サーファクタントの希釈が関与していることを再確認した。またデキストランやポリエチレングリコールなどの水溶性非イオン性高分子は、希釈されたサーファクタントでも機能を発揮させると結論され、これらの高分子を用いたARDSに対する全く新しい治療法の可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導御高閲賜りました恩師金沢大学大学院医学研究科がん医科学専攻機能回復学小林勉教授に深甚なる謝意を表します。また、終止直接の懇切なる御指導御助言を戴きました同講座の田代勝己講師に心から感謝致します。さらに、本研究を遂行するにあたり、御協力を戴きましたハルビン大学の徐咏梅、崔晓光両先生に感謝致します。

なお、本研究の一部は第36回日本界面医学会 (2000年、金沢)、第37回日本界面医学会 (2001年、札幌)において発表した。

文 献

- 1) Notter RH, Finkelstein JN. Pulmonary surfactant: an interdisciplinary approach. *J Appl Physiol* 57: 1613-1624, 1955
- 2) Jefferies AL, Coates G, O'Brodovich H. Pulmonary epithelial permeability in hyaline-membrane disease. *N Engl J Med* 311: 1075-1080, 1984
- 3) Holm B, Matalon S. Role of pulmonary surfactant in the development and treatment of adult respiratory distress syndrome. *Anesth Analg* 69: 805-818, 1989
- 4) Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA 3rd, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 88: 1976-1981, 1991
- 5) Holm BA, Notter RH, Finkelstein JN. Surface property changes from interaction of albumin with natural lung surfactant and extracted lung lipids. *Chem Phys Lipids* 38: 287-298, 1985
- 6) Fuchimukai T, Fujiwara T, Takahashi A, Enhorning G. Artificial pulmonary surfactant inhibited by proteins. *J Appl Physiol* 62: 429-437, 1987
- 7) Holm BA, Enhorning G, Notter RH. A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity. *Chem Phys Lipids* 49: 49-55, 1988
- 8) Kobayashi T, Nitta K, Ganzuka M, Inui S, Grossmann G, Robertson B. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatr Res* 29: 353-356, 1991
- 9) Seeger W, Gunther A, Walmrath HD, Gimlinger F, Lasch HG. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome: pathogenic role and therapeutic prospects. *Clin Investig* 71: 177-190, 1993

- 10) Nitta K, Kobayashi T. Impairment of surfactant activity and ventilation by protein in lung edema fluid. *Respir Physiol* 95: 43-51, 1994
- 11) Kobayashi T, Ohta K, Tashiro K, Nishizuka K, Chen WM, Ohmura S, Yamamoto K. Dextran restores albumin inhibited surface activity of pulmonary surfactant extract. *J Appl Physiol* 86: 1778-1784, 1999
- 12) Taeusch HW, Lu KW, Goerke J, Clements JA. Nonionic polymers reverse inactivation of surfactant by meconium and other substances. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1391-1395, 1999
- 13) Tashiro K, Kobayashi T, Robertson B. Dextran reduces surfactant inhibition by meconium. *Acta Paediatr* 89: 1439-1445, 2000
- 14) 紺崎友晴, 徐 咏梅, 太田圭亮, 加畑千春, 陳 衛民, 田代勝己, 小林 勉. 血清によって阻害されたサーファクタントの活性に対するデキストランの効果: 気泡拍動法と肺洗浄ラットによる評価. *日界面医誌* 31: 49-56, 2000
- 15) Lu KW, Taeusch HW, Robertson B, Goerke J, Clements JA. Polymer-surfactant treatment of meconium-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 623-628, 2000
- 16) Kobayashi T, Tashiro K, Yamamoto K, Nitta S, Ohmura S, Suzuki Y. Effect of surfactant proteins SP-B and SP-C on dynamic and static mechanics of immature lungs. *J Appl Physiol* 83: 1849-1856, 1997
- 17) Enhorning G. Pulsating bubble technique for pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 43: 198-203, 1977
- 18) Lachmann B, Grossmann G, Freyse J, Robertson B. Lung-thorax compliance in the artificially ventilated premature rabbit neonate in relation to variation in inspiration:expiration ratio. *Pediatr Res* 15: 833-838, 1981
- 19) Lachmann B, Grossmann G, Nilsson R, Robertson B. Lung mechanics during spontaneous ventilation in premature and fullterm rabbit neonates. *Respir Physiol* 38: 283-302, 1979
- 20) Van Golde LM, Batenburg JJ, Robertson B. The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev* 68: 374-455, 1988
- 21) Kobayashi T, Shido A, Nitta K, Inui S, Ganzuka M, Robertson B. The critical concentration of surfactant in fetal lung liquid at birth. *Respir Physiol* 80: 181-192, 1990
- 22) Kobayashi T, Robertson B. Surface adsorption of pulmonary surfactant in relation to bulk-phase concentration and presence of CaCl_2 . *Respiration* 44: 66-70, 1983
- 23) 西塚一男. 肺水腫液中の蛋白質により不活化され難い再構築サーファクタントの開発. *十全医会誌* 107: 285-292, 1998
- 24) Nilsson R. The artificially ventilated preterm rabbit neonate as experimental model of hyaline membrane disease. *Acta Anaesthesiol Scand* 26: 89-103, 1982
- 25) 小林 勉. 肺表面活性物質の現在. (吉田清一編), 第1版, 10-12頁, 真興交易, 東京, 1990
- 26) Seeger W, Stohr G, Wolf HR, Neuhof H. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol* 58: 326-338, 1985
- 27) 越沼征勝. 両親媒性物質の溶存状態と溶液の性質. (安田寛基, 相原 薫, 上田眞太郎, 野崎正彦編), 51-69頁, サイエンスフォーラム社, 東京, 1990
- 28) 北原文雄. 化学の話シリーズ8. コロイドの話. (大木道則編), 第1版, 98-101頁, 培風館, 東京, 1984
- 29) Packwood L, Taylor E, Storey TM, Evans-Gowing R, Baillie-Johnson H, Warn RM. Large vesicle formation within cells induced by treatment with a mixed surfactant. *Micron* 27: 95-105, 1996
- 30) MacDonald RI. Membrane fusion due to dehydration by polyethylene glycol, dextran, or sucrose. *Biochemistry* 24: 4058-4066, 1985
- 31) Meyuhas D, Nir S, Lichtenberg D. Aggregation of phospholipid vesicles by water-soluble polymers. *Biophys J* 71: 2602-2612, 1996
- 32) Meyuhas D, Lichtenberg D. Effect of water-soluble polymers on the state of aggregation, vesicle size, and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and sodium cholate. *Biophys J* 71: 2613-2622, 1996
- 33) Veldhuizen RA, Hearn SA, Lewis JF, Possmayer F. Surface-area cycling of different surfactant preparations: SP-A and SP-B are essential for large-aggregate integrity. *Biochem J* 300: 519-524, 1994
- 34) Veldhuizen RA, McCaig LA, Akino T, Lewis JF. Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1867-1871, 1995
- 35) Veldhuizen RA, Yao LJ, Hearn SA, Possmayer F, Lewis JF. Surfactant-associated protein A is important for maintaining surfactant large-aggregate forms during surface-area cycling. *Biochem J* 313: 835-840, 1996
- 36) Walmrath D, Gunther A, Ghofrani HA, Schermuly R, Schneider T, Grimminger F, Seeger W. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 57-62, 1996
- 37) Willson DF, Jiao JH, Bauman LA, Zaritsky A, Craft H, Dockery K, Conrad D, Dalton H. Calif' s lung surfactant extract in acute hypoxic respiratory failure in children. *Crit Care Med* 24: 1316-1322, 1996
- 38) Gregory TJ, Steinberg KP, Spragg R, Gadek JE, Hyers TM, Longmore WJ, Moxley MA, Cai GZ, Hite RD, Smith RM, Hudson LD, Crim C, Newton P, Mitchell BR, Gold AJ. Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1309-1315, 1997
- 39) Tashiro K, Yamada K, Konzaki T, Yamamoto K, Ohmura S, Kobayashi T, Suzuki Y. Aerosolized surfactant therapy for endotoxin-induced experimental acute respiratory distress syndrome in rats. *Br J Anaesth* 87: 266-271, 2001
- 40) Kobayashi T, Tashiro K, Cui X, Konzaki T, Xu Y, Kabata C, Yamamoto K. Experimental models of acute respiratory distress syndrome: clinical relevance and response to surfactant therapy. *Biol Neonate* 80 (suppl 1): 26-28, 2001
- 41) Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993. *JAMA* 273: 306-309, 1995

Effect of Water-soluble and Non-ionic Polymers on the Function of Diluted Pulmonary Surfactant Tomoharu Konzaki, Department of Organ Function Restoratology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **111**, 74 – 81 (2002)

Key Words dextran, lung-thorax compliance, polyethylene glycol, surface tension, surfactant

Abstract

Pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS) is related to dilution of the pulmonary surfactant with edema fluid leaking into the alveoli. Recently, it has been reported that water-soluble and non-ionic polymers reverse the serum protein-inhibited surfactant function. The present study was designed to determine whether dextrans and polyethylene glycols (water-soluble and non-ionic polymers) could strengthen the function of diluted surfactant. In measurement with the pulsating bubble technique, surfactant at a concentration of 1 mg/ml showed above 15 mN/m of minimum surface tension. The value, however, decreased to below 7 mN/m when 18.1~71 kDa dextrans or 6~70 kDa polyethylene glycols were added at a concentration of 10 mg/ml. In surfactant-deficient newborn rabbits, 3 mg/ml of plane surfactant suspension exhibited a lung-thorax compliance than 0.05 ml/kg/cmH₂O. mixed with the above polymers to the surfactant suspension significantly increased the compliance. In particular, the suspensions with 40 kDa dextran and with 20 kDa polyethylene glycol showed increases in compliance to larger than 0.6 ml/kg/cmH₂O. It was therefore indicated that water-soluble and non-ionic polymers, such as dextran and polyethylene glycol, can strengthen the surface activity and physiological function of diluted pulmonary surfactant, with the effect of each polymers being dependent on its molecular weight. Although further studies are needed for analysis of the underlying mechanism, the results of the present study suggest a possibility that water-soluble and non-ionic polymers might be usefully applied as a new therapeutic method of ARDS.