

換気量増加に必要なサーファクタント関連蛋白の種類および量

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/2297/9135

換気量増加に必要なサーファクタント関連蛋白の種類および量

金沢大学医学部麻酔・蘇生学講座 (主任: 小林 勉教授)

早稲田 祐子

人工肺サーファクタントを開発するための基礎的知見を得る目的で、サーファクタント関連A蛋白、B蛋白およびC蛋白 (surfactant-associated protein A, B and C, SP-A, SP-B および SP-C) が、サーファクタントの活性にどのように関与しているかを検索した。まず、ブタの肺から天然サーファクタント (natural surfactant, N-S) を抽出し、それより SP-A を除去したA蛋白除去サーファクタント (surfactant without SP-A, A(-)-S) と、全ての蛋白質を除去したサーファクタント脂質分画 (lipid fraction of surfactant, L-F) を調整した。次いで、A(-)-S より分離した SP-B および SP-C 分画を、種々の比率で L-F に混合した再構築サーファクタントを作成した。これらの試料を、自己の肺サーファクタントが欠如している在胎26日目のウサギ未熟胎仔 (満期妊娠日数=31日) の肺内に投与したうえ、従圧式の人工換気下での換気量を測定した。何も投与しなかった対照群では、最大吸気圧 (peak inspiratory pressure, PIP) が 25cmH₂O でも 3ml/kg 以下の換気量しか得られなかった。また、L-F を投与した動物でも、対照群と同程度の換気量しか得られなかった。これに対し、N-S を投与した動物 (N-S 群) は、PIP が 25cmH₂O で 33ml/kg 前後の換気量を示した (対照群に対し P<0.05)。A(-)-S 群も、N-S 群と同程度の換気量を示した。一方、SP-C が 1.40% (A(-)-S の2倍量) と十分に存在しても SP-B が欠如した再構築サーファクタントは、25cmH₂O の PIP で 6ml/kg 前後の換気量しかみられなかった (対照群に対し NS)。しかし、1.40% の SP-C に加え SP-B が 0.18% 以上存在すると、SP-B の濃度依存性に換気量が増加した。同様に、SP-B が 0.70% (A(-)-S の2倍量) と十分量存在しても SP-C が欠如した再構築サーファクタントでは、十分な換気量が得られなかった (対照群に対し NS)。しかし、0.70% の SP-B に加え SP-C を添加すると、換気量はほぼ SP-C の濃度に依存して増加した。また、SP-B と SP-C の比を 1:2 とし、その合計の濃度が 0.53% の場合は、PIP が 25cmH₂O でも 4.6±1.0ml/kg (\bar{x} ±SEM) の換気量しか得られなかった (対照群に対し NS)。しかし、合計の蛋白質濃度を 2.10% に増すと、換気量は 25.0±2.3ml/kg に増加した (対照群に対し P<0.05)。以上より、サーファクタントの換気量増加作用に SP-A はあまり関与していないと結論された。一方、SP-B と SP-C の両者は換気量増加に必要な因子であると結論された。

Key words surfactant-associated protein, pulmonary surfactant, reconstituted surfactant, immature newborn rabbit, tidal volume

肺サーファクタントは、数種類の蛋白質 (サーファクタント関連蛋白) と脂質 (サーファクタント脂質) から成り立っており、肺胞の表面張力を減少させて、換気量や機能的残気量を保つために不可欠な物質である¹⁾。サーファクタント補充療法は、新生児呼吸窮迫症候群に対して著効を示し²⁻⁴⁾、成人呼吸窮迫症候群の治療にも応用できると考えられている⁵⁻⁸⁾。しかし、現在用いられているサーファクタントは、動物の肺から抽出したものである。異種蛋白質による副作用のない人工品を開発するためには、成分の一つであるサーファクタント関連蛋白の種類や量と生理活性の関係を知る必要がある。

サーファクタント関連蛋白には、少なくとも3種類のものが知られており、親水性のA蛋白 (surfactant-associated protein A, SP-A) (26~38kDa) および疎水性の強いB蛋白 (surfactant-associated protein B, SP-B) (5~18kDa) とC蛋白 (surfactant-associated protein C, SP-C) (3~6kDa) に分類されている⁹⁾。現

在、それぞれの蛋白質が、表面張力を減少させる作用にどのように関与しているかは、表面張力計や静的肺圧量曲線などにより検討され始めている。しかし、臨床で最も重要視される換気量と、これらの蛋白質の関係を系統的に検討した報告は見当たらない。今回著者は、ブタの肺サーファクタントから SP-A を除去したもの、全ての蛋白質を除去したサーファクタント脂質、およびその脂質に SP-B や SP-C を種々の比率で混合した再構築品などをウサギ未熟胎仔に投与し、各蛋白質と人工呼吸下における換気量の関係を検討した。

材料および方法

I. サーファクタントの調整と組成の分析

1. 天然サーファクタント (natural surfactant, N-S) の調整
まず、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) して除去し

平成7年2月15日受付, 平成7年4月4日受理

Abbreviations: CPAP, continuous positive airway pressure; IPPV, intermittent positive pressure ventilation; L-F, lipid fraction of surfactant; N-S, natural surfactant; PIP, peak inspiratory pressure; RS, reconstituted surfactant; SP-A, surfactant-associated protein A; SP-B, surfactant-associated protein B; SP-C, surfactant-associated protein C; A(-)-S, surfactant without surfactant-associated protein A

た。次いで、上清を遠心 ($2000 \times g$, 1時間, 4°C) し, 得られた白濁層を蒸留水に分散し同様に再度遠心した。得られた白濁層は, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) と 1mM EDTA を含む生理食塩水に分散し, 0.25M および 0.68M 蔗糖液の上に重ねて密度勾配遠心 ($75000 \times g$, 1時間, 4°C) を行なった。二つの蔗糖液の層にはさまれた層を採取し, 蒸留水に対して36時間透析したうえ凍結乾燥したものを N-S とした¹⁰⁾。

2. SP-A 除去サーファクタント (surfactant without SP-A, A(-)S) の調整

N-S から, クロロホルムとメタノール (2:1, v: v) の混合液による抽出と¹¹⁾, 0.5% 食塩水を用いた Folch 洗浄¹²⁾ により親水性蛋白質 (主として SP-A) を除去した。その後, アセトン沈澱法により中性脂肪やコレステロールを除去し, 凍結乾燥したものを A(-)S とした。

3. 脂質分画と蛋白質分画の分離

凍結乾燥した A(-)S を, 大きさが $2.5 \times 80\text{cm}$ のセファデックス LH-60 カラム (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Uppsala, Sweden) により 5ml ずつ64本の試験管に分割抽出した¹³⁾。移動相は, クロロホルム-メタノール (1:1, v: v) に 5% の割合で 0.1N 塩酸を加えた溶液を流速 40ml/hr で抽出した。A(-)S は, 抽出に用いる溶液に溶解して 4ml としカラムに供した。試料は, 分光光度計 U-2000 (日立, 東京) により紫外線 (280nm) 吸光度を測定し, 一部について Swank らの方法¹⁴⁾ により SDS-PAGE を行なった。その結果から, 分割抽出

された試料を SP-B 分画, SP-C 分画および脂質分画に大別した。すなわち, 試験管番号17~21番内の試料を SP-B 分画, 27~33番内の試料を SP-C 分画とした。また, 38~56番内の脂質分画 (lipid fraction of surfactant, L-F) は, サーファクタント脂質とみなして一括した。それぞれの試料は, 一部を組成分析に使用し, 残りを上記の溶媒に溶解したまま, 換気量測定実験 (後述) に使用するまで -20°C で保存した。なお, 試験管番号1~16番, 22~26番, 34~37番および57~64番の内容は, ほとんど抽出物が存在していないか, または純粋なものではないとみなして廃棄した。

4. 各試料の組成分析

脂質分画は, 組成を薄層およびガスクロマトグラフィー GC-9A (島津, 東京) で分析したうえ, それらの量を Bartlett の方法¹⁵⁾ で測定した。蛋白質の量は, ミクロ-Kjeldahl 法¹⁶⁾ で測定した。

II. 換気量測定実験

1. SP-A の有無に関する検討

交配後25日16~23時間の妊娠ウサギ (日本白色種, 満期妊娠日数=31日) を, 塩酸ケタミン 30mg/kg の筋注およびペントバルビタール 20mg/kg の静注により麻酔し, 帝王切開により胎仔を娩出した。直ちに, これらの胎仔の体重を測定し, 腹腔内にペントバルビタール 0.5mg を投与したうえ, 気管に18ゲージの金属カニューレを挿入した。その後, 同腹の胎仔 (3~10羽) に対し, 無作為に N-S, A(-)S および L-F の分散液を

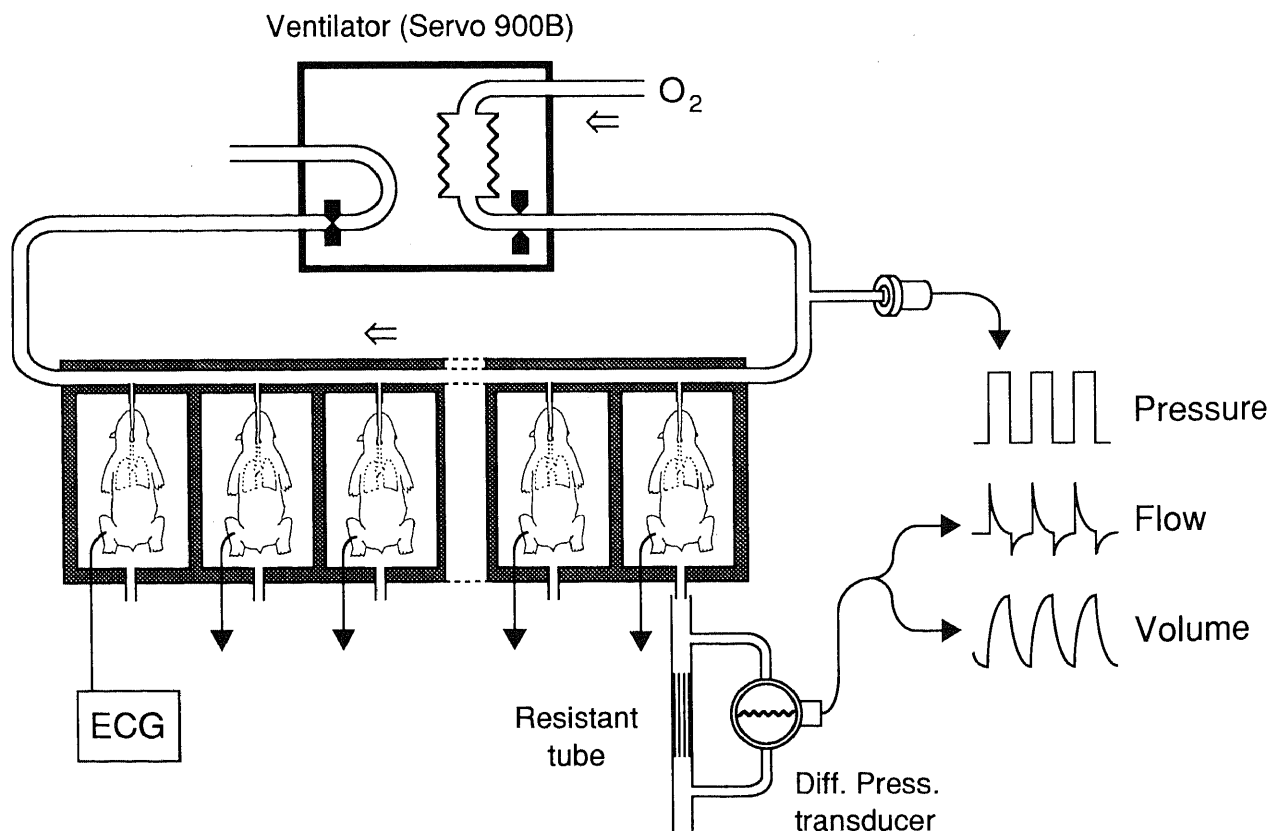


Fig. 1. System for the recording of tidal volumes in immature newborn rabbits. The animals were tracheotomized and treated with various surfactants or not treated (controls), and kept in air tight chambers (ten plethysmographs). They were connected in parallel to the respirator which is set at pressure-controlled ventilation. The tidal volume was calculated by integration of pressure difference across the resistant tube attached to the plethysmograph. Diff. Press., differential pressure; O_2 , 100% oxygen; ECG, electrocardiograph.

0.1ml あて気管カニューレを介して肺内に注入し、それぞれ N-S 群, A(-)-S 群, L-F 群とした。なお、比較のため何も試料を投与しない対照群も設定した。上記の操作が終了した胎仔は、順次37℃に保ったプレサモグラフ装置¹⁷⁾の気密室に収容した(図1)。先に収容された胎仔は、同腹の全胎仔の準備が完了するまで、5cmH₂O の持続的気道内陽圧 (continuous positive airway pressure, CPAP) 下に待機させた。

全胎仔の準備が完了した後、臭化パングロニウム 0.02mg を腹腔内に投与して胎仔を非動化し、従圧式の間歇的陽圧換気 (intermittent positive pressure ventilation, IPPV) を開始した。人工呼吸器には、Servo 900B (Siemens-Elcoma, Solna, Sweden) を用い、最大吸気圧 (peak inspiratory pressure, PIP) は作動圧を変えることによって調整した。呼吸回数を1分間40回、吸気時間と呼気時間の比を1:1とし、圧波形が矩形波となるように換気条件を設定した。吸気ガスには純酸素を用い、人工呼吸器のガス駆出量の上限を同時に測定する全被験動物の予測換気量の10倍以上 (7l/min) に設定した。実験中は、人工呼吸器の回路内圧を常時監視し、設定した換気条件が保たれていることを確認した。また、各胎仔の換気量は、各気密室に接続した気流抵抗管前後の圧差を差圧検出器 TP-602T (日本光電, 東京) で検出し、その出力を積分器 AR-601G (日本光電) に導いて求めた¹⁸⁾。

IPPV 開始後最初の1分間は、気管内に投与した試料が肺胞にまで到達するように、PIP を 35cmH₂O に設定した。その後の15分間は PIP を 25cmH₂O に、次いで5分おきに 20, 15cmH₂O と低下させ、最後に再び 25cmH₂O に上昇させ、各 PIP での換気量を5分おきに測定した。

換気量の測定が終了した直後、針電極を用いて各胎仔の心電図を記録し、心拍数が120/分以上のものを生存動物と判定した (ウサギ未熟胎仔の心拍数の正常値は240~320/分)。実験終了後、過量のペントバルビタールを腹腔内に投与して胎仔を屠殺

し、経横隔膜的に気胸の有無を調査した。

2. SP-B の濃度に関する検討

まず、L-F に対し SP-C 分画のみを 1.40% あて添加したものを用意し、再構築サーファクタント-a (reconstituted surfactant-a, RS-a) とした。次いで、この混合液に SP-B 分画を 0.09%, 0.18%, 0.35% および 0.70% あて添加したものを作成し、それぞれ再構築サーファクタント-b, -c, -d および -e (RS-b, RS-c, RS-d および RS-e) とした。この再構築操作にあたっては、各分画をカラムクロマトグラフィーの溶媒とともに混合し、窒素ガスにより乾固したうえ凍結乾燥した。なお、実験に使用する際には、凍結乾燥品を生理食塩水に分散し、脂質濃度を 50mg/ml に調整した。

SP-A の有無に関する検討と同様の方法で準備したウサギ未熟胎仔の肺内に、それぞれの再構築サーファクタントの分散液を 0.1ml あて注入し、RS-a, RS-b, RS-c, RS-d および RS-e 群とした。これら各群の換気量は、前述と同様の方法で測定した。なお、比較のため何も試料を投与しない対照群も設定した。

3. SP-C の濃度に関する検討

まず、L-F に SP-B 分画のみを 0.70% 加えたものを用意し、再構築サーファクタント-f (RS-f) とした。RS-f に SP-C 分画を 0.18%, 0.35% および 0.70% あて添加したものを作成し、それぞれ再構築サーファクタント-g, -h および -i (RS-g, RS-h および RS-i) とした。なお、RS-i より SP-C 分画の濃度を一段階増したもの (SP-B 分画, 0.70%; SP-C 分画, 1.40%) として、SP-B の濃度に関する検討の RS-e を本検討に加えた。これらの再構築法および生理食塩水への分散は、SP-B の濃度に関する検討と同様の方法を用いた。

前述と同様の方法により、ウサギ未熟胎仔の肺内にそれぞれの再構築サーファクタントを投与して RS-f, RS-g, RS-h, RS-i および RS-e 群とし、何も試料を投与しない動物を対照群とし

Table 1. Constituents of surfactant

Constituents	Ratio of each constituent in weight (%)	
	N-S	A(-)-S
Phospholipids		
Phosphatidylcholine	47.8	66.2
Phosphatidylglycerol	11.4	7.7
Phosphatidylethanolamine	7.2	6.2
Sphingomyelin	4.7	7.4
Phosphatidylinositol	4.2	4.7
Phosphatidylserine	1.7	4.1
Other phospholipids	0.9	1.8
Other lipids		
Cholesterol	6.4	0.4
Glyceride	4.3	0.1
Free fatty acids	2.4	0.4
Proteins		
SP-A (26~38 kDa, hydrophilic)	7.9	—
SP-B (5~18 kDa, hydrophobic)	0.4	0.35
SP-C (3~6 kDa, extremely hydrophobic)	0.7	0.70

SP-A, SP-B and SP-C indicate surfactant-associated protein A, B and C, respectively. N-S, natural surfactant; A(-)-S, surfactant without SP-A.

て各胎仔の換気量を測定した。

4. 蛋白質濃度に関する検討 (SP-B と SP-C の比を 1:2 に固定した場合)

まず, A(-)S よりいったん分離した SP-B 分画および SP-C 分画を 1:2 の割合で再度混合した。次いで, この再混合した蛋白質の濃度が 0.26%, 0.53% および 1.05% となるように L-F を加え, それぞれを再構築サーファクタント-j, -k および -l (RS-j, RS-k および RS-l) とした。また, RS-l より疎水性蛋白質の濃度を一段階増したものと, SP-B の濃度に関する検討の RS-e を本検討に加えた。これらの再構築法および生理食塩水への分散は, SP-B の濃度に関する検討と同様の方法を用いた。

蛋白質と換気量の関係は, 本検討においてもウサギ未熟胎仔を使用し, 前述と同様の方法で測定した。その際, それぞれの再構築サーファクタントが投与された動物を RS-j, RS-k, RS-l および RS-e 群とした。なお, 本検討では, A(-)S の生理食塩水分散液 (脂質濃度=50mg/ml) を 0.1ml あて同様に肺内に注入した A(-)S 群, および何も試料を投与しない対照群も設定した。

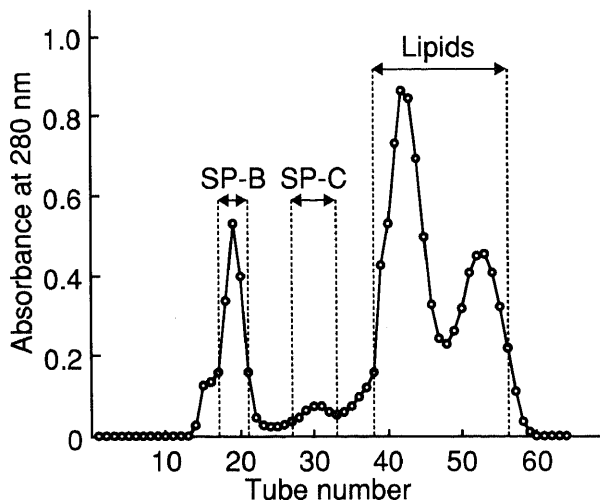


Fig. 2. Elution pattern of surfactant-associated proteins B and C (SP-B and SP-C) and lipids from surfactant without surfactant-associated protein A (A(-)S) on a column of Sephadex LH-60 (column size, 2.5×80 cm) in chloroform/methanol 1:1 (v/v), containing 5% 0.1 N HCl. A flow rate was 4 ml/hr. Each fraction volume was 5 ml.

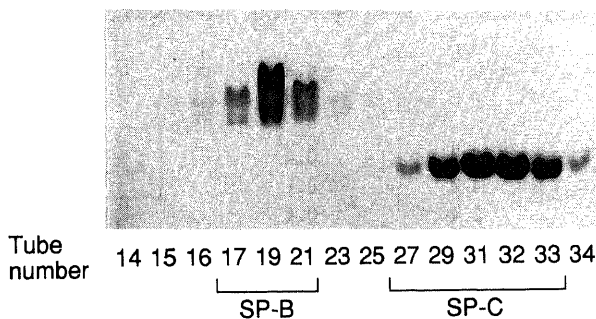


Fig. 3. SDS-PAGE of surfactant-associated protein B and C (SP-B and SP-C) fractions from the Sephadex LH-60 column.

A(-)S 群, RS-e 群および対照群の 3 群については, 換気量測定に引続き, 静的肺圧量曲線を新多の方法¹⁰⁾により測定した。すなわち, 胎仔を屠殺して気胸の有無を確認した後, 肺を虚脱させるため 37°C で約 30 分間放置した。その後, 各胎仔の気管カニューレに長さ 50cm, 内径 1.62mm のポリエチレンチューブを接続し, 各チューブを水平に保持し, チューブの他端を指示液の入った容器に接続した。指示液の液面を 1 分間隔で 5cm ずつ高くすることにより, 0 から 30cmH₂O まで段階的に加圧した後, 同様に 0cmH₂O まで減圧した。その際の指示液の移動距離から, 肺気量の変化を測定した。なお, 装置内の空気の圧縮は測定後に補正した。

III. 統計処理

剖検により気胸を認めた胎仔は, 統計処理より除外した。ウサギ未熟胎仔に関する測定結果は, 平均値±標準誤差で表した。体重, 換気量および肺圧量曲線の群間の有意差は, 分散分析を行なったうえ, Scheffé の多重比較テストで判定した。生存率の有意差判定には, Fisher の直接確率計算を用いた。いずれも, 危険率 (P) が 0.05 以下を有意とした。

成 績

I. サーファクタントの組成

N-S は, 約 78% のリン脂質, 約 13% の中性脂質と脂肪酸, および約 9% の蛋白質 (SP-A, 7.9%; SP-B, 0.4%; SP-C, 0.7%) より成り立っていた。一方, A(-)S は, 約 98% のリン脂質, 約 1% の中性脂質と脂肪酸, および疎水性蛋白質 1.05% (SP-B, 0.35%; SP-C, 0.70%) より成り立っており, 親水性蛋白質である SP-A は含まれていなかった。また, N-S に比べて中性脂質や脂肪酸の含有量は減少していた (表 1)。

カラムクロマトグラフィーにより抽出されたそれぞれの試験管内の試料の吸光度 (紫外線 280nm) を図 2 に示した。A(-)S は, 主に 4 つのピークに分けられ, 最初のピークには SP-B, 次の小さなピークには SP-C, 最後の 2 つのピークには脂質が含まれていた。SDS-PAGE では, 試験管番号 17~21 番に SP-B が, 27~33 番に SP-C が存在していた (図 3)。

II. 各種サーファクタント由来物質による換気量

1. SP-A の有無に関する検討

対照群のウサギ未熟胎仔は, 7 羽中 4 羽が実験中に死亡した。一方, N-S 群, A(-)S 群および L-F 群では, 実験終了時まで全例が生生存し, 対照群に比べ有意に良好な生存率を示し

Table 2. Characteristics of immature newborn rabbits in study for SP-A

Group	Number of rabbits examined	Number of survival rabbits	Body weight ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, g)
Control	7	3	20.9±1.4
L-F	7	7*	24.2±2.0
A(-)S	7	7*	19.7±0.8
N-S	7	7*	26.1±1.3

N-S, natural surfactant; A(-)S, surfactant without surfactant-associated protein A; L-F, lipid fraction of surfactant. * P<0.05 vs control group. Animals of the L-F, A(-)S and N-S groups were instilled L-F, A(-)S and N-S, respectively. Animals of the control group received no material.

た. なお, 本検討における4群の胎仔の体重の平均値は19.7~26.1gであり, 群間に有意差は認められなかった(表2).

図4に各群の換気量を示した. 何も投与しなかった対照群では, いずれのPIPでも3ml/kg以下の換気量しか得られなかった. また, L-F群では, 対照群と同じくほとんど換気量が得られなかった. これに対し, N-S群の換気量は, PIPを25cmH₂Oに設定した最初の15分間の場合で32.4~33.3ml/kg, 20cmH₂Oの場合で21.8±2.0ml/kg, 15cmH₂Oの場合で10.0±1.2ml/kgを示し, 最後にPIPを25cmH₂Oに再上昇させた場合にも最初とほぼ同じで35.7±2.7ml/kgを示した. A(-)S群では, N-S群と同程度の換気量が得られた.

2. SP-Bの濃度に関する検討

対照群のウサギ未熟胎仔は, 7羽中3羽が実験中に死亡した. 一方, 再構築サーファクタントを投与したRS-a, RS-b,

RS-c, RS-dおよびRS-e群では, 実験終了時まで全例が生存し, 対照群に比べ有意に良好な生存率を示した. なお, 本検討における6群の胎仔の体重の平均値は21.5~24.5gであり, 群間に有意差は認められなかった(表3).

本検討における各PIPでの換気量を図5に示した. SP-Cが1.40%含まれていても, SP-Bが0%のRS-a群では, 25cmH₂OのPIPでも6.0±0.8ml/kgの換気量しか得られなかった. 一方, PIPが25cmH₂Oの場合, SP-Bの濃度が0.18%のRS-c群の換気量は9.0±1.6ml/kg, SP-Bが0.35%のRS-d群では16.7±1.1ml/kg, 0.70%のRS-e群では25.0±2.3ml/kgと, 換気量はほぼSP-Bの濃度依存性に増加した. し

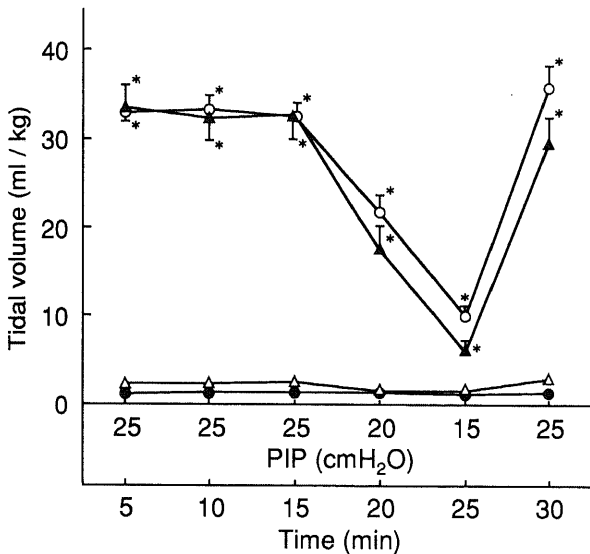


Fig. 4. Tidal volumes at various peak inspiratory pressures in animals receiving natural surfactant (N-S), surfactant without surfactant-associated protein A (A(-)S), lipid fraction of surfactant (L-F) and in control group. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ○, N-S group (n=7); ▲, A(-)S group (n=7); △, L-F group (n=7); ●, control group (n=7). PIP, peak inspiratory pressure. *P<0.05 vs control group.

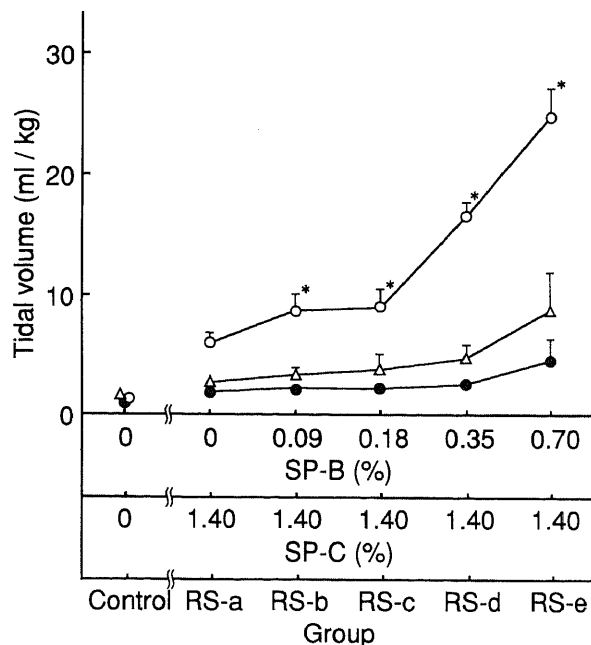


Fig. 5. Tidal volumes at 25, 20 and 15 cmH₂O peak inspiratory pressure (PIP) in animals receiving various reconstituted surfactants and in control group. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ○, 25 cmH₂O PIP; △, 20 cmH₂O PIP; ●, 15 cmH₂O PIP. *P<0.05 vs control group. SP-B and SP-C indicate surfactant-associated protein B and C, respectively. RS, reconstituted surfactant.

Table 3. Administered material and characteristics of immature newborn rabbits in study for concentration of SP-B

Group	Composition of administered material			Number of rabbits examined	Number of survival rabbits	Body weight ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, g)
	L-F (mg)	SP-B (%)	SP-C (%)			
Control	0	0	0	7	4	21.5±1.2
RS-a	5	0	1.40	7	7*	23.2±1.2
RS-b	5	0.09	1.40	7	7*	21.8±1.1
RS-c	5	0.18	1.40	7	7*	23.0±0.7
RS-d	5	0.35	1.40	7	7*	23.2±1.3
RS-e	5	0.70	1.40	7	7*	24.5±1.7

L-F, lipid fraction of surfactant. SP-B and SP-C indicate surfactant-associated protein B and C, respectively. RS-a, RS-b, RS-c, RS-d and RS-e indicate reconstituted surfactant-a, -b, -c, -d and -e, respectively. *P<0.05 vs control group. Animals of the RS-a, -b, -c, -d and -e groups were instilled RS-a, -b, -c, -d and -e, respectively. Animals of the control group received no material.

かし、PIP が 20cmH₂O および 15cmH₂O での換気量は、各群間に有意差を認めなかった。

3. SP-C の濃度に関する検討

対照群のウサギ未熟胎仔は、7羽中3羽が実験中に死亡した。一方、再構築サーファクタントを投与した RS-f, RS-g, RS-h, RS-i および RS-e 群では、実験終了時まで全例が生存し、対照群に比べ有意に良好な生存率を示した。なお、本検討における6群の胎仔の体重の平均値は 20.5~25.8g であり、群間に有意差は認められなかった(表4)。

各群の換気量を図6に示した。SP-B を 0.70% 含んでいるが、SP-C を全く含まない RS-f 群の換気量は、PIP を

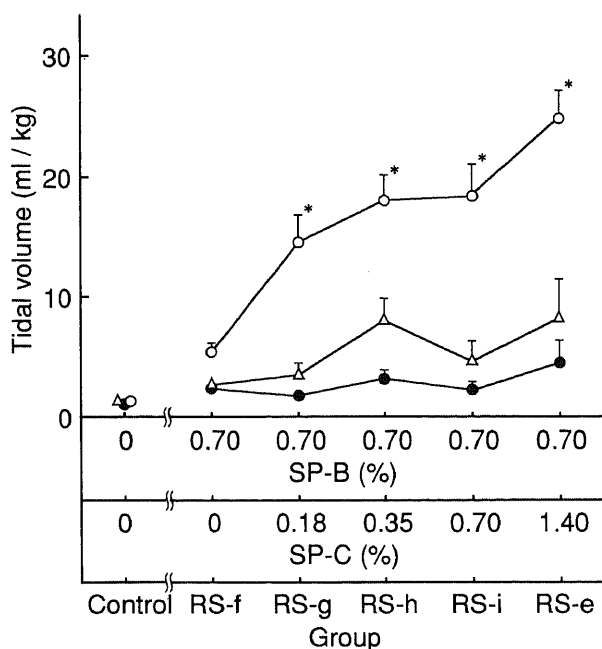


Fig. 6. Tidal volumes at 25, 20 and 15 cmH₂O peak inspiratory pressure (PIP) in animals receiving various reconstituted surfactants and in control group. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. \circ , 25 cmH₂O PIP; \triangle , 20 cmH₂O PIP; \bullet , 15 cmH₂O PIP. * $P < 0.05$ vs control group. SP-B and SP-C indicate surfactant-associated protein B and C, respectively. RS, reconstituted surfactant.

25cmH₂O にしても $5.5 \pm 0.9 \text{ ml/kg}$ しか得られなかった。SP-C の濃度を 0.18% (RS-g 群), 0.35% (RS-h 群), 0.70% (RS-i 群) および 1.40% (RS-e 群) と増加していくと、PIP が 25cmH₂O での換気量は、それぞれ $14.7 \pm 2.3 \text{ ml/kg}$, $18.2 \pm 2.2 \text{ ml/kg}$, $18.6 \pm 2.6 \text{ ml/kg}$ および $25.0 \pm 2.3 \text{ ml/kg}$ とほぼ SP-C の濃度に依存して増加した。しかし、PIP が 20cmH₂O および 15cmH₂O での換気量は、各群間に有意差を認めなかった。

4. 蛋白質濃度に関する検討 (SP-B と SP-C の比を 1:2 に固定した場合)

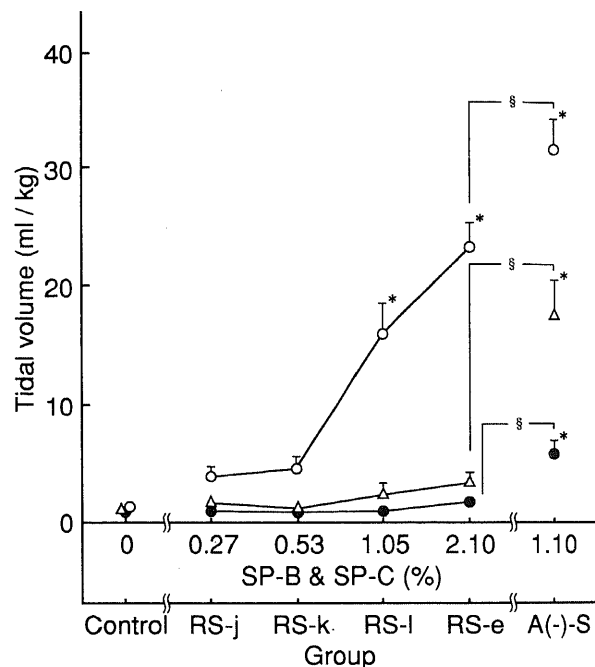


Fig. 7. Tidal volumes at 25, 20 and 15 cmH₂O peak inspiratory pressure (PIP) in animals receiving various reconstituted surfactants, surfactant without surfactant-associated protein A (A(-)S) and in control group. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. \circ , 25 cmH₂O PIP; \triangle , 20 cmH₂O PIP; \bullet , 15 cmH₂O PIP. * $P < 0.05$ vs control group, $^{\#}P < 0.05$ between RS-e and A(-)S group. SP-B and SP-C indicate surfactant-associated protein B and C, respectively. RS, reconstituted surfactant.

Table 4. Administered material and characteristics of immature newborn rabbits in study for concentration of SP-C

Group	Composition of administered material			Number of rabbits examined	Number of survival rabbits	Body weight ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, g)
	L-F (mg)	SP-B (%)	SP-C (%)			
Control	0	0	0	7	4	21.2 \pm 2.2
RS-f	5	0.70	0	7	7*	21.4 \pm 1.5
RS-g	5	0.70	0.18	7	7*	24.1 \pm 1.4
RS-h	5	0.70	0.35	7	7*	24.7 \pm 1.5
RS-i	5	0.70	0.70	7	7*	25.8 \pm 1.8
RS-e	5	0.70	1.40	7	7*	20.5 \pm 1.0

L-F, lipid fraction of surfactant. SP-B and SP-C indicate surfactant-associated protein B and C, respectively. RS-f, RS-g, RS-h, RS-i and RS-e indicate reconstituted surfactant-f, -g, -h, -i and -e, respectively. * $P < 0.05$ vs control group. Animals of the RS-f, -g, -h, -i and -e groups were instilled RS-f, -g, -h, -i and -e, respectively. Animals of the control group received no material.

対照群のウサギ未熟胎仔は、7羽中4羽が実験中に死亡した。一方、再構築サーファクタントを投与したRS-j, RS-k, RS-lおよびRS-e群では、実験終了時まで全例が生出し、対照群に比べ有意に良好な生存率を示した。なお、本検討における6群の胎仔の体重の平均値は20.3~24.1gであり、群間に有意差は認められなかった(表5)。

図7に本検討の各PIPでの換気量を示した。疎水性蛋白質(SP-BとSP-Cの比が1:2のもの)を0.53%を含むRS-k群では、PIPが25cmH₂Oでも4.6±1.0ml/kgの換気量しか得られなかった。一方、PIPが25cmH₂Oの場合、疎水性蛋白質を1.05%含むRS-l群の換気量は16.0±2.5ml/kgと対照群に比べて有意に増加し、2.10%含むRS-e群では25.0±2.3ml/kgとさらに増加した。しかし、RS-e群の換気量は、全てのPIPで

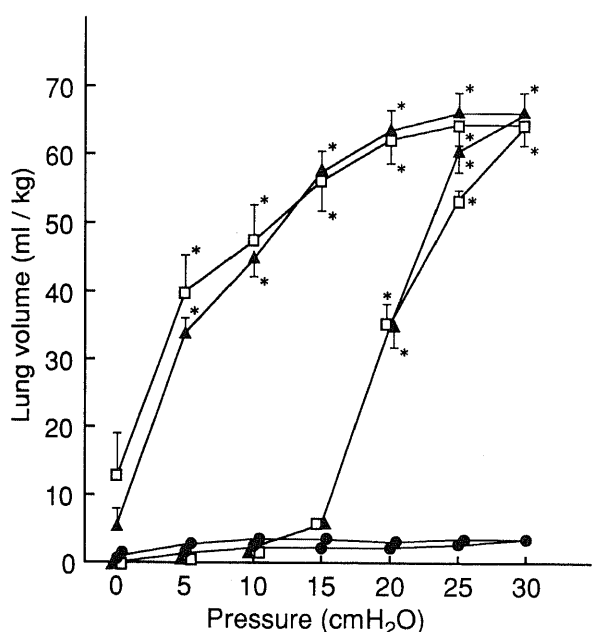


Fig. 8. Static pressure-volume recordings of the lung-thorax system in animals receiving surfactant without surfactant-associated protein A (A(-)-S), reconstituted surfactant-associated (RS-e) and in control group. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$. \square , A(-)-S group (n=7); \triangle , RS-e group (n=7); \bullet , control group (n=7). *P<0.05 vs control group.

A(-)-S群より有意に少なかった。

図8に、本検討のA(-)-S群、RS-e群および対照群について調査した静的肺圧量曲線を示した。何も投与しなかった対照群では、最大に加圧した場合(30cmH₂O)でも3.4±0.4ml/kgの肺気量しか得られなかった。これに対し、A(-)-S群の肺気量は、30cmH₂Oに加圧した場合で66.2±3.0ml/kgを示し、5cmH₂Oに減圧しても33.9±2.4ml/kgを示した。RS-e群でもA(-)-S群と同程度の肺気量が得られ、この両群間にはすべての圧で有意差が認められなかった。

考 察

在胎26日未満のウサギ未熟胎仔(満期妊娠日数=31日)は、自己の肺サーファクタントが欠如しており、人工呼吸を施行しても5ml/kg以上の換気量は得られないが、外部よりサーファクタントを補充すると、その活性に見合った換気量が得られると報告されている^{20~23}。今回の実験でも、全ての検討の対照群でわずかの換気量しか得られず、実験中の生存率も57%以下であった。一方、N-Sを投与した胎仔(SP-Aの有無に関する検討)の換気量は、PIPを25cmH₂Oにした場合に30ml/kg前後、15cmH₂Oにしても10ml/kg前後出現し、生存率も100%であった。したがって、今回使用した動物と方法は、各種検体の換気量増加作用を検索するものとして適当と判断される。また同時に、N-Sは十分な換気量増加作用を持つものと言うことができる。

サーファクタントの主成分はリン脂質である²⁴。今回用いたN-Sの組成は、Fisherら²⁵やKingら²⁶が天然の肺サーファクタントの組成として報告しているものとほぼ一致し、その78%がリン脂質で占められていた。サーファクタントがその作用を発揮するためには、リン脂質の分子が気液界面に吸着し、模様構造(吸着膜)を形成する必要があると考えられている²⁷。しかし、リン脂質のみでは吸着膜を形成することができず、蛋白質の必要なことが物理化学的検索により示唆されている^{27~31}。本研究のSP-Aの有無に関する検討で、蛋白質を除去したL-Fを投与した動物の換気量が、対照群とほぼ等しく3ml/kg以下であったことは、上記の物理化学的検索による示唆を生理的に確認したものと言えるだろう。

サーファクタント関連蛋白のうち、SP-Aには脂質の表面吸

Table 5. Administered material and characteristics of immature newborn rabbits in study for concentration of protein

Group	Composition of administered material		Number of rabbits examined	Number of survival rabbits	Body weight ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, g)
	L-F (mg)	SP-B & SP-C (%)			
Control	0	0	7	3	24.1±1.5
RS-j	5	0.26	7	7*	20.3±1.3
RS-k	5	0.53	7	7*	20.7±1.3
RS-l	5	1.05	7	7*	22.3±1.0
RS-e	5	2.10	7	7*	20.6±1.4
A(-)-S	5	1.10	7	7*	22.0±1.7

L-F, lipid fraction of surfactant. A(-)-S, surfactant without surfactant-associated protein A. SP-B and SP-C indicate surfactant-associated protein B and C, respectively. RS-j, RS-k, RS-l and RS-e indicate reconstituted surfactant-j, -k, -l, and -e, respectively. *P<0.05 vs control group. Animals of the RS-j, -k, -l, -e and A(-)-S groups were instilled RS-j, -k, -l, -e and A(-)-S, respectively. Animals of the control group received no material.

着を促進させる働きのあることが知られている³²⁻³⁴。しかし、この SP-A の働きは物理的測定法を用い、しかも脂質濃度を 1.0mg/ml 以下に調整した場合に見いだされたものである。正常な肺胞被覆層のサーファクタント脂質濃度は 120mg/ml 前後と見積もられており³⁵、その濃度が 1.5mg/ml 以下では、いかなるサーファクタントも換気量を増加させる効果はないと言われている³⁶。したがって、上記の物理的測定で見いだされた SP-A の働きを、すぐさま換気量増加作用に関連づけて論ずることはできないと考える。事実、今回の SP-A の有無に関する検討では、N-S 群と A(-)S 群の換気量がほぼ等しいという所見を得た。すなわち、生理的な脂質濃度に近い条件で行なった今回の実験結果からは、SP-A が存在していなくても、十分な換気量を得ることができると結論される。

SP-B にも、サーファクタント脂質や合成脂質の表面吸着を促進させる作用のあることが知られている³⁷。しかし、SP-B と SP-C が協同して換気量を発現させる作用に関与しているような場合には、SP-B を単独でサーファクタント脂質に添加しても、正当な働きを見出せないおそれがある。SP-C が 1.40% 存在するという条件下で SP-B の濃度を変えた今回の SP-B の濃度に関する検討では、SP-B が全く存在しない場合、PIP が 25cmH₂O でも換気量は 6ml/kg 前後しか得られなかった。また、SP-B の濃度が 0~0.70% の範囲では、ほぼ濃度依存性に換気量が増加した。この結果は、SP-B が換気量増加作用に不可欠な蛋白質であることを示すものであろう。また、モノクローナル抗体を使用した実験で、換気量増加に対する SP-B の重要性を指摘した Kobayashi ら³⁷ の見解を裏付けるものであろう。

物理的測定では、SP-C にもサーファクタント脂質の表面吸着を促進させる作用のあることが知られている³⁸。しかし、SP-B の濃度に関する検討の RS-a 群で示されたように、L-F に SP-C 分画を 1.40% 添加したものの換気量は、対照群より若干大きい、十分量であるとは言いがたかった。したがって、換気量増加作用に対する SP-C の働きを見た SP-C の濃度に関する検討でも、SP-B を 0.70% 加えたうえで、SP-C の濃度を変化させるという方法を用いた。その結果、SP-C の濃度が 0~1.40% の間では、ほぼ SP-C の濃度依存性に換気量が増加した。このことから、SP-C も換気量増加作用に不可欠な蛋白質であると考えられる。

N-S および A(-)S 中の SP-B と SP-C の重量比は、ほぼ 1:2 であったことから、蛋白質濃度に関する検討では、SP-B と SP-C の比を 1:2 に固定し、脂質に対するこの 2 種の蛋白質の濃度を変化させた。この場合、蛋白質濃度が 0.53% 以下ではほとんど換気量が得られなかったが、1.05% を越えると換気量が増加し、ほぼ蛋白質の濃度依存性に換気量が増加した。このことから、換気量を増加させる脂質の臨界濃度がある³⁹ のと同様に、蛋白質にも臨界濃度が存在し、その濃度は、今回の再構築サーファクタントでは 0.53~1.05% の間にあると推測された。

A(-)S 中に含まれる SP-B と SP-C の合計の濃度は 1.05% であった。しかし、再構築サーファクタントでは、その濃度を 2 倍の 2.10% にしても、全ての PIP で A(-)S より有意に小さい換気量しか得られなかった。このような問題が生じた原因として、カラムクロマトグラフィーによる分離操作で蛋白質が変性した可能性や、必要な分画を廃棄してしまった可能性、さらには、脂質と蛋白質がいったん分離されてしまうと元

のように再結合しない可能性などが考えられる。これらの可能性を判別するためには、脂質と蛋白質の分離法および再構築法を改めて検討する必要がある。また、今回の実験では、SP-B と SP-C の濃度を A(-)S の 2 倍 (2.10%) までしか増加させなかったが、さらに濃度を増加していけば、再構築サーファクタントでも A(-)S に匹敵する換気量が得られる可能性も考えられる。この可能性についても、新たに検討する必要があると言えよう。

以上のように、今回の実験では若干の問題が未解決のまま残された。しかし、いったん分離した蛋白質と脂質からなる再構築サーファクタントの活性が、元のサーファクタントより劣っているという問題は、換気量を測定した今回の実験で初めて明らかになったものである。通常、肺サーファクタントの活性は、静的肺圧量曲線^{30,38} や物理的測定^{39,40} により評価されており、それらでは今回のような問題が見出されていない。事実、蛋白質濃度に関する検討で、A(-)S と RS-e について静的肺圧量曲線の評価を行なったところ、両者に差は認められなかった。表面吸着速度の遅いサーファクタントでは、静的な肺圧量曲線を改善できても、動きの早い呼吸運動にはついていけず、十分な換気量が得られないと考えられる。したがって、今回の実験で用いた分離・再構築操作は、サーファクタントの表面吸着速度に関する因子に何らかの変化をもたらしたものと考えられる。また、視点を変えれば、今回の実験結果は、生体におけるサーファクタントの活性を、静的な状態で評価することには注意が必要なことを示すものであろう。

今回の実験結果と考察により、サーファクタントの換気量増加作用に SP-A はあまり関係がないが、SP-B と SP-C の両者は必要な因子であり、両者が協同して換気量を増加させていると結論された。しかし、SP-B と SP-C がどのように協同して換気量を増加させるかについては、今回の実験から詳細なことは判明せず、今後の検討を要すると考えられた。また、いったん分離してから再構築したサーファクタントの換気量増加作用は、元のサーファクタントには及ばず、分離法や再構築法を改めて検討することも必要であると考えられた。

結 論

ブタ肺サーファクタントから SP-A を除去したものの、全ての蛋白質を除去した脂質分画、およびこの脂質分画に SP-B や SP-C を種々の比率で混合した再構築サーファクタントをウサギ未熟胎仔の肺内に注入したうえで、換気量と静的肺圧量曲線を測定し、以下の結論を得た。

1. SP-A は、サーファクタントの換気量増加作用にあまり効果がない蛋白質である。
2. SP-B と SP-C は、換気量増加作用に不可欠な蛋白質であり、両者が協同して作用を発揮する。
3. SP-C が 1.40% 存在する場合、SP-B の濃度が 0~0.70% の範囲では、ほぼ濃度依存性に換気量が増加する。
4. SP-B が 0.70% 存在する場合、SP-C の濃度が 0~1.40% の範囲では、ほぼ濃度依存性に換気量が増加する。
5. SP-B と SP-C の比が 1:2 の場合、両者の合計濃度が 0.53% 以下では十分な換気量が得られない。一方、1.05% 以上になると換気量が増加する。すなわち、SP-B と SP-C の両者が存在していても、換気量を増加させるための臨界濃度が存在する。

6. SP-B を 0.70%, SP-C を 1.40% (天然サーファクタントの2倍)含有した再構築サーファクタントは、天然サーファクタントとほぼ同程度にまで静的肺圧量曲線を改善した。しかし、その換気量増加作用は天然のものに及ばなかった。このことから、サーファクタントの活性は、換気量増加作用によって判定すべきであると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲をいただきました小林 勉教授に深く感謝いたします。また、本研究遂行にあたり御協力をいただきました鈴木康弘教授(京都大学胸部疾患研究所)はじめ麻酔・蘇生学教室の諸先生に対し、厚く御礼申し上げます。

なお、本研究は、文部省科学研究補助金(一般C, 課題番号05671254)および米沢研究基金の援助を受けた。

文 献

- 1) Notter, R. H. & Jacob, N. F.: Pulmonary surfactant: an interdisciplinary approach. *J. Appl. Physiol.*, **57**, 1613-1624 (1984).
- 2) Fujiwara, T., Maeta, H., Chida, S., Morita, T., Watabe, Y. & Abe, T.: Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet*, **1**, 55-59 (1980).
- 3) 小林 勉, 片岡久範, 村上誠一, 春木伸一: 試作サーファクタント (Surfactant CK) による新生児呼吸窮迫症候群の治療経験. *日界面医学会誌*, **12**, 1-6 (1981).
- 4) Enhorning, G., Shennan, A., Possmayer, F., Dunn, M., Chen, C. P. & Milligan, J.: Prevention of neonatal respiratory distress syndrome by tracheal instillation of surfactant: a randomized clinical trial. *Pediatrics*, **76**, 145-153 (1985).
- 5) Holm, B. A. & Matalon, S.: Role of pulmonary surfactant in the development and treatment of adult respiratory distress syndrome. *Anesth. Analg.*, **69**, 805-818 (1989).
- 6) 上田真太郎, 河村宏一, 大嶋 康, 蜂須賀久喜, 遠藤ますみ, 斉藤 潤, 菊池寿隆, 細川芳文, 岡安大仁, 桜井 勇, 菅根美夫: 肺炎後の低酸素血症持続例(成人)への人工・肺表面活性物質 (Surfactant-TA) の臨床応用. *日界面医学会誌*, **19**, 60-77 (1988).
- 7) Lachmann, B.: The role of pulmonary surfactant in the pathogenesis and therapy of ARDS. *In* J. L. Vincent (ed.), *Update in Intensive Care and Emergency Medicine*, 1st ed., p123-134, Springer, Berlin, 1987.
- 8) Richman, P. S., Spragg, R. G., Robertson, B., Merritt, T. A. & Curstedt, T.: The adult respiratory distress syndrome: first trials with surfactant replacement. *Eur. Respir. J.*, **2**, 109-111 (1989).
- 9) Possmayer, F.: A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **138**, 990-998 (1988).
- 10) Frosolono, M. F., Charms, B. L., Pawlowski, R. & Slivka, S.: Isolation, characterization, and surface chemistry of a surface-active fraction from dog lung. *J. Lipid Res.*, **11**, 439-457 (1970).
- 11) Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 12) Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A. & LeBaron, F. N.: Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.*, **191**, 833-841 (1951).
- 13) Curstedt, T., Jörnvall, H., Robertson, B., Bergman, T. & Berggren, P.: Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant. Characterization and biophysical activity. *Eur. J. Biochem.*, **168**, 255-262 (1987).
- 14) Swank, R. T. & Munkres, K. D.: Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.*, **39**, 462-477 (1971).
- 15) Bartlett, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468 (1959).
- 16) Thompson, J. F. & Morrison, G. R.: Determination of organic nitrogen. Control of variables in the use of Nessler's reagent. *Anal. Chem.*, **23**, 1153-1157 (1951).
- 17) Lachmann, B., Grossmann, G., Freyse, J. & Robertson, B.: Lung-thorax compliance in the artificially ventilated premature rabbit neonate in relation to variations in inspiration: expiration ratio. *Pediatr. Res.*, **15**, 833-838 (1981).
- 18) 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).
- 19) 新多恵子: 肺水腫がサーファクタント活性を介して換気能におよぼす影響. ウサギ未熟胎仔による検討. *十全医学会誌*, **100**, 1070-1084 (1991).
- 20) Robertson, B. & Lachmann, B.: Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Exp. Lung Res.*, **14**, 279-310 (1988).
- 21) Robertson, B., Curstedt, T., Grossmann, G., Kobayashi, T., Kokubo, M. & Suzuki, Y.: Prolonged ventilation of the premature newborn rabbit after treatment with natural or apoprotein-based artificial surfactant. *Eur. J. Pediatr.*, **147**, 168-173 (1988).
- 22) Kobayashi, T., Grossmann, G., Robertson, B. & Ueda, T.: Effects of artificial and natural surfactant supplementation in immature newborn rabbits. *日界面医学会誌*, **15**, 53-59 (1984).
- 23) 小林 勉, 泉 恵子, 元塚雅也, 村上誠一, 小久保雅之: 人工肺サーファクタントの界面特性と生理学的機能との相関. *日界面医学会誌*, **16**, 51-57 (1985).
- 24) Notter, R. H., Tabak, S. A. & Mavis, R. D.: Surface properties of binary mixtures of some pulmonary surfactant components. *J. Lipid Res.*, **21**, 10-22 (1980).
- 25) Fisher, A. B. & Chander, A.: Introduction: lung surfactant - phospholipids and apoproteins. *Exp. Lung Res.*, **6**, 171-174 (1984).
- 26) King, R. J. & Clements, J. A.: Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological

- correlations. *Am. J. Physiol.*, **223**, 715-726 (1972).
- 27) Yu, S. H. & Possmayer, F.: Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem. J.*, **236**, 85-89 (1986).
- 28) Takahashi, A. & Fujiwara, T.: Proteolipid in bovine lung surfactant: its role in surfactant function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 527-532 (1986).
- 29) Hall, S. B., Venkitaraman, A. R., Whitsett, J. A., Holm, B. A. & Notter, R. H.: Importance of hydrophobic apoproteins as constituents of clinical exogenous surfactants. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **145**, 24-30 (1992).
- 30) Rider, E. D., Ikegami, M., Whitsett, J. A., Hull, W., Absolom, D. & Jobe, A. H.: Treatment responses to surfactants containing natural surfactant proteins in preterm rabbits. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**, 669-676 (1993).
- 31) Suzuki, Y., Curstedt, T., Grossmann, G., Kabayashi, T., Nilsson, R., Nohara, K. & Robertson, B.: The role of the low-molecular weight (≤ 15000 daltons) apoproteins of pulmonary surfactant. *Eur. J. Respir. Dis.*, **69**, 336-345 (1986).
- 32) Hawgood, S., Benson, B. J. & Hamilton, R. L.: Effects of a surfactant-associated protein and calcium ions on the structure and surface activity of lung surfactant lipids. *Biochemistry*, **24**, 184-190 (1985).
- 33) King, R. J., Carmichael, M. C. & Horowitz, P. M.: Reassembly of lipid-protein complexes of pulmonary surfactant. *J. Biol. Chem.*, **258**, 10672-10680 (1983).
- 34) King, R. J. & Macbeth, M. C.: Physicochemical properties of dipalmitoyl phosphatidylcholine after interaction with an apolipoprotein of pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta*, **557**, 86-101 (1979).
- 35) Kobayashi, T. & Robertson, B.: Surface adsorption of pulmonary surfactant in relation to bulk-phase concentration and presence of CaCl_2 . *Respiration*, **44**, 63-70 (1983).
- 36) 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).
- 37) Kobayashi, T., Nitta, K., Takahashi, R., Kurashima, K., Robertson, B. & Suzuki, Y.: Activity of pulmonary surfactant after blocking the associated proteins SP-A and SP-B. *J. Appl. Physiol.*, **71**, 530-536 (1991).
- 38) Yu, S. H., Wallace, D., Bhavnani, B., Enhorning, G., Harding, P. G. R. & Possmayer, F.: Effect of reconstituted pulmonary surfactant containing the 6000-dalton hydrophobic protein on lung compliance of prematurely delivered rabbit fetuses. *Pediatr. Res.*, **23**, 23-30 (1988).
- 39) Cockshutt, A. M., Weitz, J. & Possmayer, F.: Pulmonary surfactant-associated protein a enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry*, **29**, 8424-8429 (1990).
- 40) Yu, S. H. & Possmayer, F.: Adsorption, compression and stability of surface films from natural, lipid extract and reconstituted pulmonary surfactants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1167**, 264-271 (1993).

Components and Amount of Surfactant-associated Protein Necessary to Increase Tidal Volume Yuko Waseda, Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med Soc.*, **104**, 311-321 (1995)

Key words surfactant-associated protein, pulmonary surfactant, reconstituted surfactant, immature newborn rabbit, tidal volume

Abstract

The functions of surfactant-associated protein A, B and C (SP-A, B and C) on the activity of pulmonary surfactant were investigated to obtain basic data for development of an artificial surfactant. Natural surfactant (N-S) was extracted from porcine lung, and then the surfactant that did not contain SP-A (A(-)-S) and the lipid fraction (L-F) were isolated. In addition, several reconstituted surfactants were prepared by adding various amounts of SP-B and/or SP-C fractions into L-F. These samples were instilled to surfactant-deficient immature rabbits through the trachea, and their tidal volumes were measured. The animals receiving no material (control group) showed less than 3 ml/kg of tidal volume at peak inspiratory pressure (PIP) of 25 cmH₂O. The tidal volumes of animals receiving L-F alone were as low as the control group. In contrast, the animals receiving N-S (N-S group) exhibited around 33 ml/kg of tidal volume under the same artificial ventilation ($P < 0.05$ vs control group). There was no difference in the tidal volumes between the animals receiving A(-)-S and N-S. In the animals receiving reconstituted surfactant, in which the amount of SP-C was 1.40% and that of SP-B was 0%, the tidal volumes were about 6 ml/kg at PIP of 25 cmH₂O (NS vs control group). But the tidal volumes increased in proportion to the amount of SP-B when the amount of SP-B was more than 0.18% with 1.40% of SP-C. Similarly, when the amount of SP-B was 0.70% and that of SP-C was 0%, the tidal volumes were low (NS vs control group), but the tidal volume increased in

proportion to the amount of SP-C. The tidal volume was 4.6 ± 1.0 ml/kg ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) at PIP of 25 cmH₂O (NS vs control group) when the total amount of SP-B and SP-C was 0.53% (SP-B: SP-C, 1: 2), but the volumes increased to 25.0 ± 2.3 ml/kg when the amount of the proteins was increased to 2.10% ($P < 0.05$ vs control group). It was concluded from these results that SP-A was not important for surfactant activity but both SP-B and SP-C were necessary.