肺サーファクタントの濃度とその生理的および物理的活性

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 紫藤, 明美 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8266

肺サーファクタントの濃度とその生理的および物理的活性

金沢大学医学部麻酔・蘇生学講座（主任：村上誠一教授）
紫藤明美

（平成3年2月20日受付）

肺サーファクタントの活性と濃度の関係を明らかにする目的で，種々の濃度に調整したブタ肺由来のサーファクタント (Surfactant CK, S-CK) の生理的活性および物理的活性を測定した．まず，生理的活性は，自己の肺サーファクタントが欠如している在胎27日目のウサギ未熟胎仔 (満期妊娠日数＝31日) に，50, 25, 12, 6mg/ml の濃度の S-CK を 0.1ml あて経気道的に投与し，人工換気下での換気量と生存率および屠殺後の肺組織所見から判定した．なお判定に際しては，生理食塩水のみを投与した群 (0mg/ml 群)，および何も投与しなかった群 (対照群) と比較した．投与した S-CK の濃度が 6mg/ml 以下の群および対照群では，最大吸気圧が 25cmH_2O でも，3ml/kg 以下の換気量しか得られなかった．これに対し，50, 25 および 12mg/ml 投与群の換気量は，それぞれ 24.5±2.8ml/kg (平均値±標準誤差)，25.5±1.7ml/kg および 17.7±3.7ml/kg と有意に大きかった ($p<0.05$)．生存率も，12mg/ml 以上の投与群では50%以上であり，6mg/ml 以下の投与群や対照群 (14% 以下) に比べ，有意に高かった ($p<0.05$)．また，50および 25mg/ml 投与群の組織標本で計測した肺胞容量密度は，それぞれ0.63±0.03および0.64±0.03と，対照群 (0.38±0.03) に比べて有意に大きく ($p<0.05$)，肺胞の十分な拡張が認められた．この結果から，S-CK の生理的活性は，投与時の濃度が 12mg/ml 前後で大きく変化すると判定された．しかし，投与されたサーファクタントは，ウサギ未熟胎仔の肺内に存在する肺内液 (lung liquid) により約1/9に希釈される．したがって，肺内 (肺胞被覆層) においては，1.3mg/ml 前後が生理的活性を発揮する境界濃度になるものと計算された．つぎに，サーファクタントの物理的活性は，液面吸引法による表面吸着時間，および気泡型表面張力計による最小表面張力 (γ min) と最大表面張力 (γ max) から判定した．表面吸着時間は，S-CK 濃度が 1mg/ml から 2mg/ml の間で，20秒から1秒前後へと急激に短縮した．γ min は，S-CK の濃度が 1～2mg/ml の間で 20mN/m から 5mN/m へと急激にかつ非直線的に変化した．また，γ max も 1～2mg/ml の濃度範囲で急激に変化した．生理的活性および物理的活性が，いずれもほぼ同じ濃度で急激に変化するという上記の結果から，サーファクタントが作用を発揮するには，境界濃度 (生理的最小必要濃度) が存在すると結論された．新生児や成人型呼吸窮迫症候群などのように肺サーファクタントが障害された症例の病態を論ずる場合には，この生理的最小必要濃度を考慮すべきものと考えられる．

Key words alveolar lining layer, immature newborn rabbit, surfactant, surfactant replacement, surface tension

肺サーファクタントはリン脂質を主成分とし，肺胞の表面張力を低下させる物質である[1][2]．肺胞表面を被っている液体の層 (肺胞被覆層) における肺サーファクタントの濃度は，換気力学や肺のコンプライアンスを左右する．新生児呼吸窮迫症候群 (infantile respiratory distress syndrome, IRDS) では肺サーファクタントの濃度が低いため，重篤な呼吸不全がもたらされる[3][4]．また，肺水腫での呼吸不全には，サー

Abbreviations: ARDS, adult respiratory distress syndrome; CV (Vv), coefficient of variation for alveolar volume density; IPPV, intermittent positive pressure ventilation; IRDS, infantile respiratory distress syndrome; PIP, peak inspiratory pressure; γ max,

ファクタントの希釈の影響が加わっているものと予想されている[5]．さらに，肺胞蛋白症などに対して治療目的で行われる肺洗浄でも，サーファクタントの濃度が低下し，呼吸機能が障害される[6]．しかし，サーファクタントの濃度を変化させずに肺胞被覆層を抽出することが困難なため，サーファクタントの濃度と換気力学の関係を定量的に検索した報告は多くない．

在胎27日未満のウサギ未熟胎仔（満期妊娠日数＝31日）の肺胞被覆層には，サーファクタントの欠如していることが知られており[7][8]，IRDS を研究するための優れた実験モデルであるといわれている[9][10]．今回著者は，種々の濃度に調整したサーファクタントの分散液を，外部からウサギ未熟胎仔の肺内に注入することにより新たな肺胞被覆層を形成させ，サーファクタントの濃度と換気力学および肺組織像との関係について，定量的な検索を行った．また，サーファクタントの濃度の変化と，物理的な活性（表面吸着時間および動的表面張力）との関係についても検討し，ウサギ未熟胎仔で得られた生理的活性と比較した．

材料および方法

Ⅰ．サーファクタントの調整

実験には，ブタの肺胞洗浄液から抽出したサーファクタント（Surfactant CK[11]，S-CK）を使用した．すなわち，屠殺直後のブタの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，150g，10分間の遠心で除去した．さらに，上清を 2000g，1時間，4°C で遠心した沈渣から，クロロホルムとメタノール（2：1）の混合液により脂質分画を抽出した[12]．つぎに，0.5%の食塩水を用いた Folch 洗浄[13]を行ったのち，アセトン可溶性物質（中性脂質およびコレステロール）を除去した分画，すなわちリン脂質を主成分とする分画を凍結乾燥し，S-CK とした．表1に S-CK の組成を示す．S-CK は，使用に際して生理食塩水に分散させ，種々の濃度に調整した．

Ⅱ．サーファクタントの濃度と生理的活性－ウサギ未熟胎仔の反応－

1．換気量の測定

交配後26日19時間から27日 0 時間の妊娠ウサギ（日本白色種，満期妊娠日数＝31日）をペントバルビタール 200mg の腹腔内投与により麻酔し，帝王切開により胎仔を娩出させた．これらの胎仔のうち，体重が15～35g のものを実験の対象とし，ペントバルビタール（20mg/kg）を腹腔内に投与した．気管に18ゲージの金属カニューレを挿入したのち，同一母ウサギから得た胎仔を無作為に6群に分けた．すなわち，50, 25, 12, 6mg/ml の濃度のS-CK 分散液を 0.1ml あて気道内に注入した4群と，生理食塩水0.1ml を気道内に注入した群（0mg/ml 投与群），および何も投与しなかった対照群の合計6群である．気管内挿管と気道内注入操作が終了したのち，胎仔を37°Cに保ったプレチスモグラフ装置の気密室内[14]に収容した．先に収容された胎仔は，全胎仔の準備が完了するまで，5cmH_2O の持続的気道内陽圧呼吸（continuous positive airway pressure）下に待機させた．

全胎仔の準備が完了したのち，臭化パンクロニウム 0.02mg を腹腔内に投与して胎仔を非動化し，従圧式の間欠的陽圧換気（intermittent positive pressure ventilation, IPPV）を開始した．人工呼吸器には，Servo 900B (Siemens-Elema, 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節した．呼吸回数は1分間40回，吸気と呼気の比を 1：1 とし，圧波形は矩形波となるように設定した．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は，同時に測定する全被験胎仔の予測換気量の10倍以上（7l/min）に設定した．

Table 1. Composition of the pulmonary surfactant extract (Surfactant CK)

Composition	Weight (%)
Phosphatidylcholine	66.2
Phosphatidylglycerol	7.7
Sphingomyeline	7.4
Phosphatidylethanolamine	6.2
Phosphatidylinositol	4.6
Phosphatidylserine	4.1
Other phospholipids	1.8
Fatty acid	0.4
Cholesterol	0.2
Cholesterol ester	0.2
Triglyceride	0.1
Proteins (<16,000 daltons)	1.1

The lipid composition was assayed by thin-layer chromatography. Molecular weights and dose of proteins were determind by sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and amino acid analysis.

maximal surface tension; γ min, minimum surface tension; S-CK, Surfactant CK; Vv, alveolar volume density

実験中は常時，人工呼吸器の回路内圧を監視し，設定した条件が正確に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[15]の前後の圧差を検出し（TP-602T，日本光電，東京），それを電気的に積分（AR-601G，日本光電，東京）して求めた（図1）．

なお，IPPV 開始後最初の1分間は，投与した各試料が肺胞に十分に到達するように PIP を 35cmH_2O に設定した．続いて PIP を 25, 20, 15, 10cmH_2O と10分ごとに変化させ，各 PIP での換気量を測定した．

2．生存時間

最大吸気圧を変化させながら，41～43分間の人工換気を行ったのち，針電極を用いて，各ウサギ未熟胎仔の心電図を記録した．心電図上，QRS 波の頻度が1分間100個以上のものを生存動物と判定した（ウサギ胎仔の正常心拍数は 300/min 前後）．

3．気胸の有無判定と肺の組織学的評価

実験終了後，大量のペントバルビタールを腹腔内に注射してウサギ胎仔を屠殺し，剖検（開腹して経横隔膜的に観察）により気胸の有無を確認した．その後，開胸して肺動脈にカニューレを挿入し，組織固定液を灌流できるように準備した．次いで，肺を拡張させるために気道内圧を 30cmH_2O で5分間保ち，その後，気道内圧を 10cmH_2O に下降させた状態で肺動脈に4％ホルムアルデヒドを灌流し，肺を固定した[16]．この肺固定操作は，室温下（20～23°C）で行った．固定後の肺標本は，ヘマトキシリン－エオジンで染色し，鏡検に供した．

肺組織所見の評価は，肺胞腔の開存度に主眼をおいた．すなわち，Weibel の方法[17]に準じ，光学顕微鏡で100倍に拡大した視野中に，無作為に25個の点を設け，その点が肺胞腔内にあるか肺胞組織上にあるかを判定

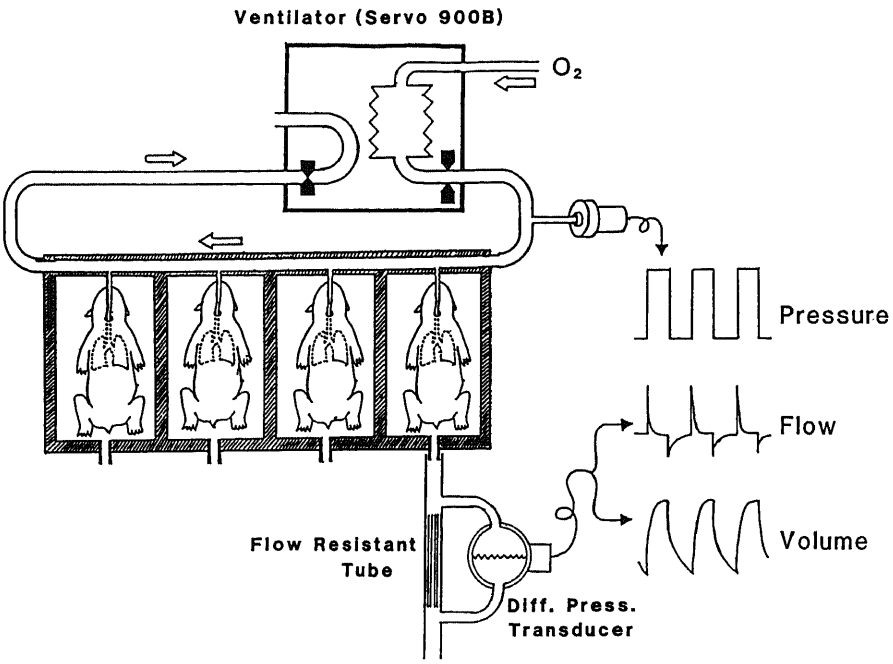

Fig. 1. Experimantal setup. Immature newborn rabbits delivered at a gestational age of 26 days and 17～24 hours were tracheotomized. Animals of the 50mg/ml, 25mg/ml, 12mg/ml and 6mg/ml groups were given 0.1ml of Surfactant CK of which concentration was adjusted to 50mg/ml, 25mg/ml, 12mg/ml and 6mg/ml, respectively. Animals of the 0mg/ml group were given 0.1ml of normal saline solution alone, and those of the control group received no material via the tracheal cannula. All animals were connected to a system of multiple body plethysmographs kept at 37°C. Tidal volumes of animals during artificial ventilation were measured with a specially designed flow resistant tube connected to a differential pressure transducer, an integrator unit and a recorder.

し，肺胞腔内に存在する点の比率を肺胞容量密度 (alveolar volume density, Vv) とした．また，肺胞拡張の不均等性を判定するため，視野ごとの Vv の標準偏差を平均値で除した値 (coefficient of variation for alveolar volume density, CV (Vv)) を求めた[9)18)19)]．なお，この測定は，全ウサギ未熟胎仔の右肺の矢状断面について行い，1羽あたりでは，標本全体をほぼカバーする20視野について行った．

Ⅲ．サーファクタントの濃度と物理的活性

1．表面吸着時間 (Surface adsorption time)

サーファクタントの分子が気液界面に吸着する速度を示すパラメーター，すなわち表面吸着時間は，King ら[20)]の方法に従い，液面吸引法によって測定した．37°Cに保った種々の濃度の S-CK 分散液 50ml をテフロン製ビーカー (直径6.2cm) に入れ，振動器 (EV210N，ナショナル，東京) を用いて攪拌 (2000 cpm) した．攪拌中止後，張力計 (Modified Wilhelmy balance，アコマ，東京) に接続された白金板を，被験液にわずかに浸るように垂直に懸垂し，表面張力が測定できるようにした．攪拌を中止して10秒後，被験液の表面 1～2mm 程度の厚さを，直径1.5mm のカテーテルで急速に吸引した．この際，被験液の気液界面に存在するサーファクタント分子の層 (吸着膜) が除去されるため表面張力は急激に上昇するが，一定時間の後に新たな吸着膜が形成されると，表面張力は再び元に戻り平衡値に達する．今回は，吸引終了直後から表面張力が平衡値より 2mN/m 高い値に低下するまでの時間を表面吸着時間とした[21)]．

2．動的表面張力

動的表面張力の測定には，Enhorning[22)]によって考案された気泡型表面張力計を用いた．種々の濃度の S-CK 分散液を，気泡型表面張力計 (Surfactometer Model ASC, Surfactometer International, Toronto, Canada) の37°Cに加温された測定室 (容量＝23μl) に入れ，気泡を作成した．次いで，気泡を半径 0.40～0.55mm の間で 40cpm の速度により拍動させた．10分間拍動させた後，気泡の大きさが最小の時と最大の時の表面張力 (γ min および γ max) を，気泡の収縮力 (ΔP) と半径 (R) から Laplace の式($\Delta P = 2\gamma/R$) を用いて算出した．

Ⅳ．統計処理

剖検により気胸を認めた胎仔の所見は，統計処理より除外した．測定結果は，とくに断ってない限り全て平均値±標準誤差で表した．表面吸着時間には対数値を用い，最小二乗法で回帰直線を求めた．生存率の群間の有意差判定にはカイ二乗検定を行った．その他のデータの群間の有意差判定には，分散分析を行ったう

Table 2. Body weights of immature newborn rabbits

Group	n	Body weight (g)
50 mg/ml	17	28.4±1.0
25 mg/ml	23	25.5±1.0
12 mg/ml	18	29.3±0.3
6 mg/ml	14	29.4±1.2
0 mg/ml	12	25.7±1.0
Control	21	27.5±0.9

Values are means±SEM. No significant differences in body weight were seen between groups. Animals of the 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12 mg/ml and 6 mg/ml groups were given 0.1 ml of Surfactant CK of which concentration was adjusted to 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12 mg/ml and 6 mg/ml, respectively. Animals of 0 mg/ml group were given 0.1 ml of normal saline solution alone, and those of the control group were given no material via the tracheal cannula.

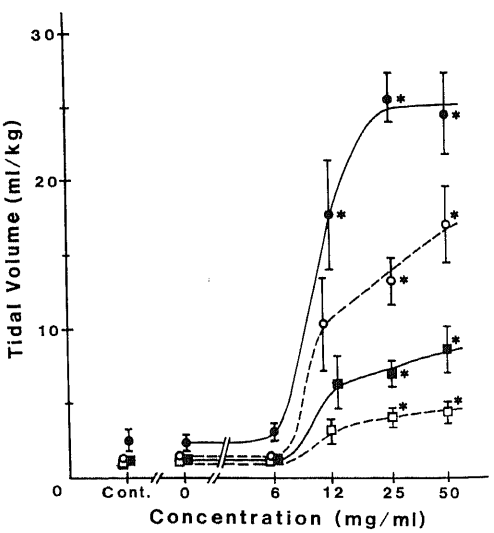

Fig. 2. Concentration of surfactant (log scale) and tidal volumes of immature newborn rabbits treated with surfactant of various concentrations and mechanically ventilated with peak inspiratory pressure at 25 (—●—), 20 (···○···), 15 (—■—) or 10 (···□···) cmH_2O. Cont., control immature newborn rabbits with no treatment. Values are means±SEM. *$p<0.05$ vs controls.

えで Scheffé 法による多重比較テストを行った．危険率 (p) が，0.05以下の場合を有意差とした．

成　　績

Ⅰ．サーファクタントの濃度と生体の反応

1．ウサギ未熟胎仔における換気量

各群のウサギ未熟胎仔の例数と体重を表2に示す．体重が 15g 以下および 35g 以上の胎仔を除外した結果，胎仔の体重には，群間に有意差を認めなかった．

図2は，ウサギ未熟胎仔に投与した S-CK の濃度と胎仔の換気量の関係を示したものである．対照群，0mg/ml 投与群および 6mg/ml 投与群では，全ての PIP において 3ml/kg 以下の換気量しか認められなかった．これに対し，50mg/ml 投与群と 25mg/ml 投与群の換気量は対照群より有意に大きく，25mg/ml 投与群の値でみた場合，PIP が 25, 20 および 15cmH_2O で，それぞれ25.5±1.7ml/kg，13.4±1.6 ml/kg および7.0±1.1ml/kg であった．12mg/ml 投与群の換気量は，25mg/ml 投与群および 50mg/ml 投与群に比べると少ない傾向を示し，PIP が 25cmH_2O では対照群に比べて有意に大きな換気量 (17.7±3.7 ml/kg) を示すものの，20cmH_2O 以下では有意差のある換気量を示さなかった．

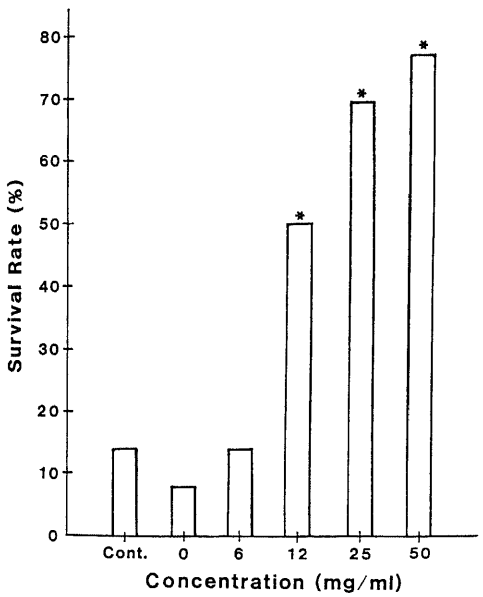

Fig. 3. Survival rate of immature newborn rabbits treated with surfactant of various concentrations. Cont., control immature newborn rabbits with no treatment. *$p<0.05$ vs controls.

2．生存率

各群の生存率を図3に示す．対照群の生存率が14.3%であったのに対し，50, 25 および 12mg/ml 投与群では，それぞれ，76.5，69.6および50.0%と有意に高い生存率を認めた．しかし，6mg/ml 投与群および 0mg/ml 投与群では，対照群との間で生存率に有意差を認めなかった．

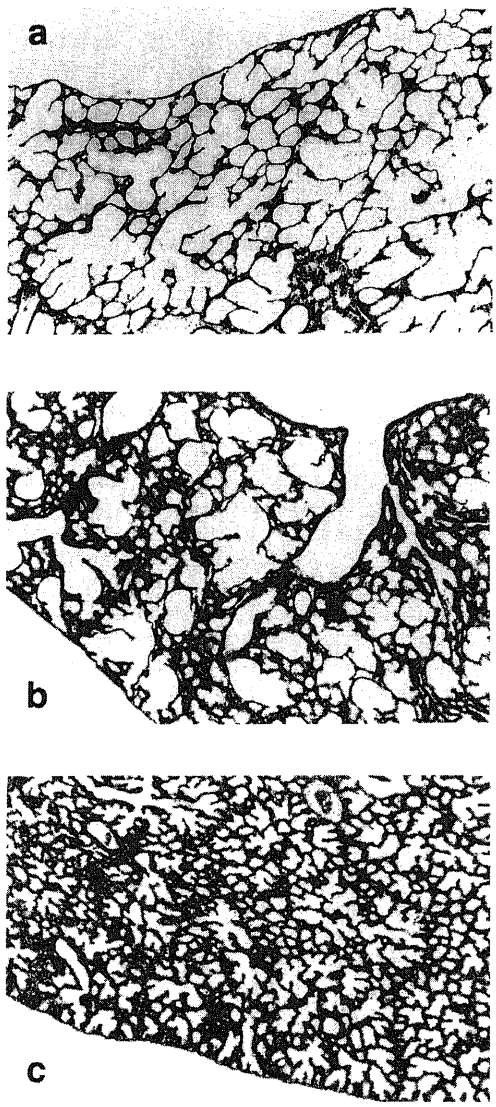

Fig. 4. Histological findings of lungs of immature newborn rabbits treated with surfactant at a concentration of 50 mg/ml (a), 12 mg/ml (b) and 0 mg/ml (c). Hematoxylin and eosine stain. ×40.

3．組織所見

図4にS-CK 50mg/ml投与群，12mg/ml投与群および0mg/ml投与群の肺組織所見を示す．0mg/ml投与群では，ほとんど含気がないのに対し，50mg/ml投与群の肺胞は十分に拡張し，正常に近い像を呈している．12mg/ml投与群では，かなりの換気量を認めたにもかかわらず，肺胞の拡張は不十分であった．

S-CKの濃度とVvおよびCV(Vv)との関係を図5と図6に示す．50mg/ml投与群および25mg/ml投与群のVvは，0.63±0.03および0.64±0.03と，対照群(0.38±0.03)に比べて有意に大きかった．また，CV(Vv)についてみると，50mg/ml投与群および25mg/ml投与群での値は，対照群に比べて有意に小さく，均一に肺胞が拡張していることを示していた．

II．サーファクタントの濃度と物理的活性

1．表面吸着時間

種々の濃度のS-CK分散液について，表面吸着時間を測定した際の記録を図7に示す．S-CK分散液の濃度が1.5mg/ml以下では，被験液表面の吸引によって表面張力は65mN/m以上に上昇したが，その後は低下して平衡値に達した．2.1mg/ml以上の濃度では，

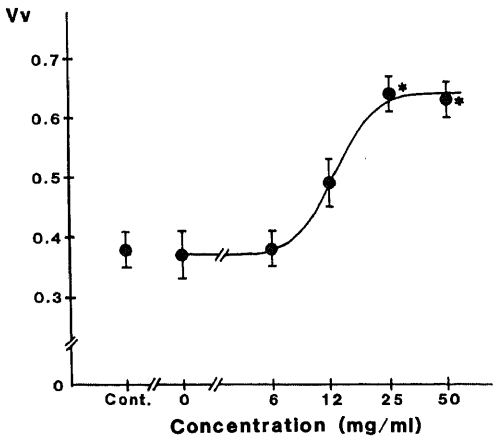

Fig. 5. Concentration of surfactant (log scale) and alveolar volume density (Vv) determined in histologic sections from immature newborn rabbits treated with surfactant of various concentrations and from the control animals. Cont., control immature newborn rabbits with no treatment. Values are means±SEM. *p<0.05 vs control group.

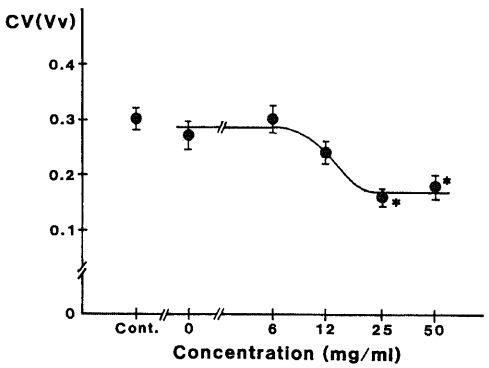

Fig. 6. Concentration of surfactant (log scale) and coefficient of variation alveolar volume density (CV(Vv)) determined in histologic sections from immature newborn rabbits treated with surfactant of various concentrations and from the control animals. Cont., control immature newborn rabbits with no treatment. Values are means±SEM. *p<0.05 vs control group.

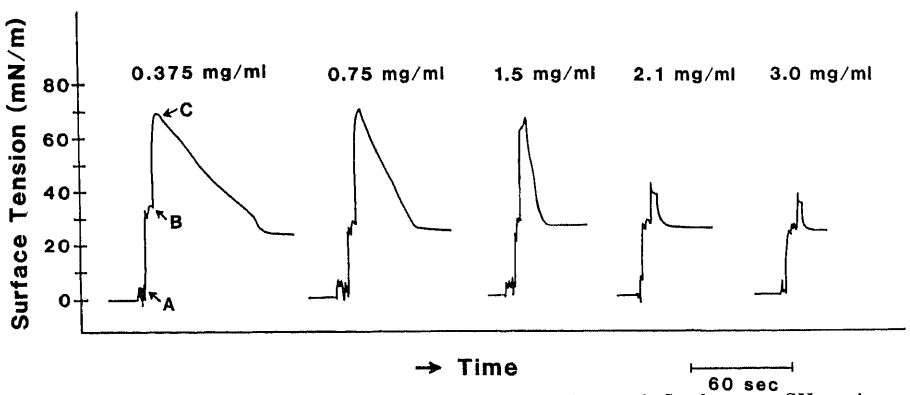

Fig. 7. Surface adsorption of various concentrations of Surfactant CK. A, dipping of platinum plate; B, start of surface aspiration; C, end of surface aspiration.

吸引によって表面張力は急激に上昇はするものの45mN/m 以上には達せず，その後の低下も速やかで，平衡値に達するまでの時間は1.7秒以内であった．平衡値は，今回測定した範囲では，濃度にかかわらず全てほぼ同じ値であった (24.6±0.2mN/m)．濃度と吸着時間との関係を図 8 に示す．S-CK の濃度が 0.047～1.1mg/ml の間では，対数値でプロットした濃度 (x) と吸着時間 (y) の間に有意な負の相関が認められた ($y=-1.001x+1.35$, $r=-0.997$, $p<0.001$)．この相関関係は濃度が 1.5mg/ml 以上になると認められなくなり，2.1～12.0mg/ml の濃度では吸着時間はほぼ一定の値を示した (0.8～1.7秒)．

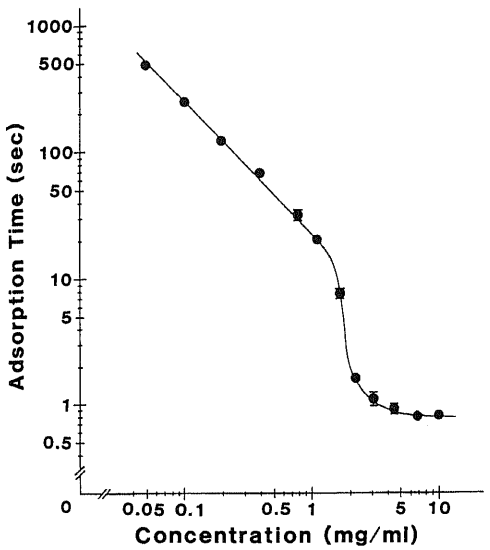

Fig. 8. Concentration of surfactant (log scale) versus surface adsorption time (log scale). Values are means±SEM of 4 measurements.

2．動的表面張力

図 9 に気泡型表面張力計により測定した S-CK の種々の濃度における γmin と γmax を示す．γmin は濃度が 0.4～1.0mg/ml の間では，21mN/m 前後の値を示した．しかし，濃度が 1.0mg/ml 以上になると，γmin は急激に低下し始め，5.0～18.0mg/ml では 2mN/m 以下の値を示した．また，γmax に関しても，γmin と類似した推移を認めた．すなわち，S-CK の濃度が 0.4～1.0mg/ml の間では，50mN/m 前後の値を示し，濃度が 3.0mg/ml 以上になると，32mN/m 前後の一定した値を示した．

考　　察

出生直後の動物 (ヒトを含む) の肺は，肺内液 (lung liquid) で満たされており，最初の呼吸で空気が肺胞に入ると，この液体が肺胞被覆層を形成するものと考え

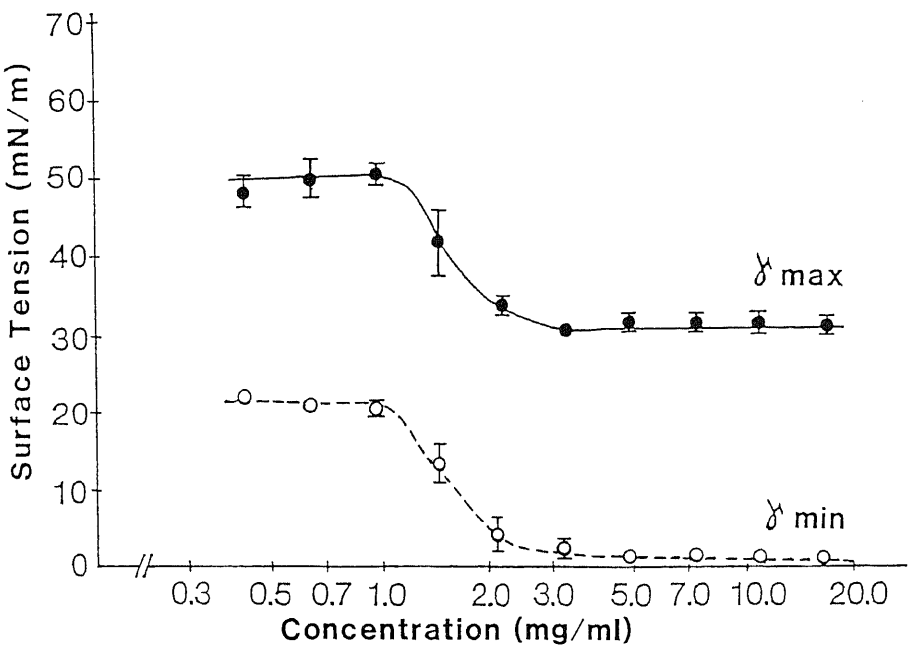

Fig. 9. Concentration of surfactant (log scale) versus surface tension measured by the pulsating bubble technique. γ min, minumum surface tension; γ max, maximum surface tension. Values are means±SEM of 6 measurements.

られている[23]．在胎27日未満のウサギ未熟胎仔の肺内液中にはサーファクタント成分がほとんど認められず，人工呼吸を施行しても，肺に空気を送り込むことが出来ないといわれている[24]．とくに，体重が 35g 以下の胎仔の場合は，例外なく上記の所見が認められることを著者らも確認している[25]．

今回の実験でも，何も気道内に投与しない対照群および生理食塩水のみを投与した群 (0mg/ml 投与群) の胎仔は，25cmH_2O の PIP を用いた人工呼吸によっても，3ml/kg 以下の換気量しか得ることが出来ず，組織所見でも肺胞に空気が入った所見を認めることが出来なかった．

一方，正常な肺胞被覆層におけるサーファクタントの濃度は，リン脂質濃度でみた場合，おおよそ 120mg/ml と見積もられている[21]．この濃度は，肺機能を保持するために必要な濃度よりかなり高く，生体はサーファクタントの濃度に関して十分な予備を持っているものと考えられる．しかし，前述したように，サーファクタントの濃度を変えずに肺胞被覆層を抽出することが困難なため，サーファクタントの濃度低下がどの程度までならば肺機能を保持できるかという境界の濃度は，現時点でも明確になっていない．サーファクタントの生産や分泌が減少する疾患，または消費が増加する病態，さらには肺水腫液によってサーファクタントが希釈される場合などに際し，生理的機能を保持できる境界濃度が判明しなければ，肺機能障害の十分な解析は不可能であろう．

今回のウサギ未熟胎仔を用いた実験では，投与したサーファクタントの濃度が 12mg/ml を境にして，換気量，肺組織所見および生存率が大きく異なった．しかし，この濃度を，すぐさま肺胞被覆層におけるサーファクタントの濃度とすることはできない．帝王切開で娩出させた直後のウサギ胎仔の肺内に存在する肺内液の量は，胎外生活時の機能的残気量に相当し，約 30ml/kg であるといわれている[23]．これから計算すると，今回実験に用いた平均体重が 28g のウサギ未熟胎仔には，娩出時に約 0.8ml の肺内液が存在していたことになる．従って，投与されたサーファクタントの分散液 (0.1ml) は，動物の肺内で約 1/9 (0.1/(0.8＋0.1)) に希釈される計算になる．すなわち，今回のウサギ未熟胎仔を用いた実験からは，生理的機能を保持できるサーファクタントの境界濃度は，ほぼ 1.3mg/ml (12mg/ml×1/9) ということになろう．

サーファクタントの濃度と物理的特性を測定した実験でも，ウサギ胎仔の実験から計算された値と類似した結果を得た．すなわち，サーファクタントの表面吸着時間が，20秒から 1 秒以内へと急激に変化する濃度が 1.1mg/ml から 2.0mg/ml の間にあるということをあげることが出来る．サーファクタントがその機能を発揮するには，気液界面で分子が膜状に配列した吸着膜を形成する必要がある[26]．表面吸着時間は，この吸着膜を形成する時間を反映している[20]．呼吸運動や咳嗽などによって，肺胞の気液界面に存在する吸着膜は，たえず破壊と再形成を繰り返していると考えられる．したがって，吸着膜の再形成に要する時間が，吸気時間 (今回のウサギ未熟胎仔の場合は 0.75秒) より長ければ，サーファクタントとしての機能が発現しない．以上，表面吸着時間の測定結果とこのような考察とは生理的な機能を示すサーファクタントの濃度の境界が，1.1mg/ml 以上 2.0mg/ml 以下であることを示唆し，ウサギ未熟胎仔の実験で求められた生理的作用を保持出来る境界濃度ともほぼ一致する．

このことに関しては，ウサギ未熟胎仔で求められた生理的機能を保持出来る境界濃度と，気泡型表面張力計で求められた最小表面張力の変化する濃度の一致をあげる事も出来よう．すなわち，気泡型表面張力計で得られた所見は，肺胞にみたてた気泡を，ウサギ未熟胎仔の換気回数と同じ40回/分の速度で拍動させながら測定されたものである．したがって，最小表面張力は，肺胞が縮小した時点 (呼気終末時) における肺胞被覆層の表面張力に相当する．なお，最小表面張力の正常値は 2mN/m 以下であり，10mN/m を超えると肺胞の安定性が悪くなり無気肺が発生するといわれている[20][26]．今回の測定では，サーファクタントの濃度 1mg/ml から 2mg/ml の間で，最小表面張力は，20mN/m 前後から 5mN/m 以下へと急激に変化した．

最大表面張力は，肺胞伸展時 (吸気終末時) の表面張力に相当する．この値についても，ウサギ未熟胎仔で求められた生理的作用を保持出来る境界濃度近辺で急激に変化するという所見が認められた．

今回の実験でウサギ未熟胎仔の肺胞被覆層におけるサーファクタントの濃度の計算には，若干の仮定が含まれている．従って，その精度に関しては，問題がないわけではない．しかし，ウサギ未熟胎仔の生理的機能が保持出来る境界濃度と，表面吸着時間や動的表面張力が急激に変化する濃度がほぼ一致するという今回の実験結果は，サーファクタントが機能を発揮するためには，生理的最小必要濃度と呼び得る濃度が存在することを示唆している．

肺から抽出した種々の物質について，表面吸着時間や動的表面張力などの物理的特性を測定した報告は多

い．しかし，今回の実験のように，サーファクタントの濃度について系統的に調査した報告は少なく，生理的最小必要濃度という概念に言及した報告は見あたらない．また，成人型呼吸窮迫症候群 (adult respiratory distress syndrome, ARDS) では，サーファクタント阻害物質の出現による肺機能障害が論じられているが[27)~30)]，この問題についてはサーファクタントの濃度がどの程度に低下し，生理的最小必要濃度との関係がどのようになっているかを明らかにしたうえでないと，その解析が不十分であることを示している．

今回は，ブタの肺胞洗浄液から抽出したリン脂質分画すなわち S-CK を実験に供した．この分画はサーファクタントの主成分であると見なされているが[1)2)]，抽出法が異なれば，違った結果が得られる可能性も否定出来ない．今後，種々の方法で抽出したサーファクタント成分について検討を重ねる必要はあるが，肺サーファクタントの作用を検討する際には，この生理的最小必要濃度を踏まえたうえで，データーを解析する必要があると結論された．

結　論

肺サーファクタントの活性に及ぼす濃度の影響を明らかにする目的で，種々の濃度に調整したブタ肺由来のサーファクタント (S-CK) をウサギ未熟胎仔の肺内に投与し，生理的活性を測定した．また，物理的活性(表面吸着時間および動的表面張力) についても測定し，以下の結果を得た．

1．12mg/ml 以上の濃度の S-CK を投与したウサギ未熟胎仔の換気量および生存率は，対照群に比べて著明に良好であった．一方，6mg/ml 以下の濃度の S-CK を投与した群では対照群とほぼ同様の結果しか得られなかった．ウサギ胎仔の肺内に存在する肺内液により，投与されたサーファクタントが約 1／9 に希釈されると考えると，S-CK は，肺内 (肺胞被覆層) の濃度にして1.3mg/ml 前後で生理的活性が大きく変化するものと考えられた．

2．表面吸着時間および動的表面張力 (最小および最大表面張力) は，S-CK 濃度が 1～2mg/ml の間で著明に変化した．

サーファクタントの生理的活性および物理的活性が，いずれもほぼ同じ濃度で大きく変化するという上記の結果は，サーファクタントがその表面活性を発揮するための生理的最小必要濃度が存在することを示唆している．IRDS や ARDS などの肺サーファクタントが障害される病態を論ずる際には，この生理的最小必要濃度を考慮すべきであると結論された．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました恩師村上誠一教授に深甚なる謝意を表するとともに，終始，直接の御指導，御助言を賜りました小林勉助教授に深く感謝致します．また，本研究遂行に際して御助言，御協力を戴きました片岡久範博士 (富山労災病院麻酔科医長) はじめ肺サーファクタント研究グループの各位に深く御礼申し上げます．最後に，本研究が，文部省科学研究費 (一般研究 B，課題番号 02454352) の援助を受けたことを附記し，謝意を表します．

文　献

1) **King, R. J.:** Pulmonary surfactant. J. Appl. Physiol., **53,** 1-8 (1982).

2) **秋野豊明，水本正彦：**肺サーファクタント．呼吸，**5,** 1070-1084 (1986).

3) **Farrell, P. M. & Avery, M. E.:** Hyaline membrane disease. Am. Rev. Respir. Dis., **111,** 657-688 (1975).

4) **Avery, M. E. & Mead, J.:** Surface properties in relation to atelectasis and hyaline menbrane disease. Am. J. Dis. Child., **97,** 517-523 (1959).

5) **Kobayashi, T., Ganzuka, M., Taniguchi, J., Nitta, K. & Murakami, S.:** Lung lavage and surfactant replacement for hydrochlolic acid aspiration in rabbits. Acta Anaesthesiol. Scand., **34,** 216-221 (1990).

6) **元塚雅也，小林　勉，片岡久範，村上誠一，南真司：**肺洗浄と人工サーファクタント補充療法：ウサギでの実験ならびに肺胞蛋白症患者での治験．麻酔，**38,** 632-639 (1989).

7) **Gluck, L., Motoyama, E. K., Smits, H. L. & Kulovich, M. V.:** The biochemical development of surface activity in mammalian lung. Pediatr. Res., **1,** 237-246 (1967).

8) **Gluck, L., Sribney, M. & Kulovich, M. V.:** The biochemical development of surface activity in mammalian lung. Pediatr. Res., **1,** 247-265 (1967).

9) **Robertson, B. & Lachmann, B.:** Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. Exp. Lung Res., **14,** 279-310 (1988).

10) **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).

11) 高田善則，小林 勉，片岡久範，村上誠一，小久保雅之：肺サーファクタント由来物質の表面活性に対する温度と湿度の影響．日界面医誌，**13,** 128-134 (1982).

12) **Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S.:** A simple methods for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem., **226,** 497-519 (1957).

13) **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).

14) **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).

15) **Lachmann, B., Grossmann, G., Nilsson, R. & Robertson, B.:** Lung mechanics during spontaneous ventilation in premature and full term rabbit neonates. Respir. Physiol., **38,** 283-302 (1979).

16) **Nilsson, R., Grossmann, G. & Robertson, B.:** Lung surfactant and pathogenesis of neonatal bronchiolar lesions induced by artificial ventilation. Pediatr. Res., **12,** 249-255 (1978).

17) **Weibel, E. R.:** Principles and methods of morphometry. *In* E. R. Weibel, A. F. Cournand & D. W. Richards (eds.), Morphometry of Human Lung, p9-39, 1st ed., Academic Press, New York, 1963.

18) **Nohara, K., Berggren, P., Curstedt, T., Grossmann, G., Nilsson, R. & Robertson, B.:** Correlations between physical and physiological properties of various preparations of lung surfactant. Eur. J. Respir. Dis., **69,** 321-335 (1986).

19) **Halliday, H., Robertson, B., Nilsson, R., Rigaut, J-P. & Grossmann, G.:** Automated image analysis of alveolar exspansion patterns in immature newborn rabbits treated with natural or artificial surfactant. Br. J. Exp. Pathol., **68,** 727-732 (1987).

20) **King, R. J. & Clements, J. A.:** Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological correlations. Am. J. Physiol., **223,** 715-726 (1972).

21) **Kobayashi, T. & Robertson, B.:** Surface adsorption of pulmonary surfactant in relation to bulkphase concentration and presense of $CaCl_2$. Respiration, **44,** 63-70 (1983).

22) **Enhorning, G.:** Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. J. Appl. Physiol., **43,** 198-203 (1977).

23) **Scarpelli, E. M., Condorelli, S. & Cosmi, E. V.:** Lamb fetal pulmonary fluid. I. Varidation and significance of method for determination of volume and volume change. Pediatr. Res., **9,** 190-195 (1975).

24) **Robertson, B.:** Surfactant substitution; experimental models and clinical applications. Lung, **158,** 57-68 (1980).

25) 紫藤明美，小林 勉，片岡久範，谷口淳朗，元塚雅也，村上誠一：補充療法用サーファクタントの濃度と生理学的効果．日界面医誌，**19,** 52-59 (1988).

26) **Notter, R. H. & Finkelstein, J. N.:** Pulmonary surfactant: an interdisciplinary approach. J. Appl. Physiol., **57,** 1613-1624 (1984).

27) 池上眞知子，**Berry, D.,** 金田正興，野崎正彦：Adult respiratory distress syndrome における surfactant inhibition. 日界面医誌，**16,** 43-50 (1985).

28) **Seeger, W., Stohr, G., Wolf, H. R. D. & Neuhof, H.:** Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. J. Appl. Physiol., **58,** 326-338 (1985).

29) **Ennema, J. J., Kobayashi, T., Robertson, B. & Curstedt, T.:** Inactivation of exogenous surfactant in experimental respiratory failure induced by hyperoxia. Acta Anaesthesiol. Scand., **32,** 665-671 (1988).

30) 谷口淳朗，小林 勉，元塚雅也，紫藤明美，片岡久範，村上誠一：酸素中毒における呼吸不全の発生機序とサーファクタント補充療法の効果．日界面医誌，**20,** 8-13 (1989).

Physiological and Physical Activity of Pulmonary Surfactant in Relation to its Concentration Akemi Shido, Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **100**, 341－351 (1991)

Key words alveolar lining layer, immature newborn rabbit, surfactant, surfactant replacement, surface tension

Abstract

The physiological and physical activity of surfactant was investigated in relation to its concentration. Pulmonary surfactant extract (phospholipid fraction extracted from pig's lung lavage fluid, Surfactant CK) was suspended in normal saline solution at various concentrations from 6 to 50 mg/ml. The suspensions were instilled into the airways of surfactant deficient immature newborn rabbits, which were delivered at a gestational age of 27 days (term, 31 days), and the animals were divided into 6, 12, 25 and 50 mg/ml groups according to the concentration of surfactant they received. The animals receiving normal saline solution alone (0 mg/ml group) and those not receiving anything (control group) were also prepared. During artificial ventilation with peak inspiratory pressure of 25 cmH_2O, tidal volumes of the 0 and 6 mg/ml groups were no more than 3 ml/kg which was similar to that of the control group. On the other hand, in the 12, 25 and 50 mg/ml groups, the tidal volumes were significantly larger than that of the control group ($p<0.05$) showing 17.7 ± 3.7 ml/kg (mean$\pm$SEM), 25.5 ± 1.7 ml/kg and 24.5 ± 2.8 ml/kg, respectively. The survival rates of the 12, 25 and 50 mg/ml groups (>50%) were also significantly better than that of the control group (14.3%, $p<0.05$). On histological examination, the alveolar volume densities, which indicate the grade of alveolar expansion, were significantly larger in the 25 and 50 mg/ml groups (0.64 ± 0.03 and 0.63 ± 0.03, respectively) than in the control group (0.38 ± 0.03). It could be stated from these results, that Surfactant CK showed its physiological activity, when it was applied to the airways of immature newborn rabbits, at concentrations over 12 mg/ml. The exogenously administered surfactant, however, is likely to be diluted to one-nineth with the lung liquid of animals. It was calculated, therefore, that 1.3 mg/ml was the critical concentration of Surfactant CK for showing its physiological activity at the alveolar surface. The physical activity of the surfactant changed also at a similar concentration. When it was increased from 1 to 2 mg/ml, the surface adsorption time sharply decreased from 20 to 1 second, and the minimum surface tension, determined by the pulsating bubble technique, changed sharply and non-linearly from 20 to 5 mN/m. The maximum surface tension also changed sharply with the same increments in concentration. It was concluded from these results, that surfactant might have a critical concentration for its activities, i. e., "minimum physiological concentration". When discussing abnormal states of pulmonary surfactant, such as in infantile or adult respiratory distress syndrome, the "minimum physiological concentration" should be considered.