

病態肺におけるサーファクタントの変動に関する研究
第1報 N-nitroso-N-methylurethane 投与により
惹起される急性肺傷害

— ARDS 類似モデル —

渡辺智之 黒木由夫 菊地尚子
札幌医科大学医学部生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

Studies on Changes in Pulmonary Surfactant in Pathological States of the Lung.

1. Acute Lung Injury Induced by N-nitroso-N-methylurethane: ARDS Like Model

Tomoyuki WATANABE, Yoshio KUROKI and Hisako KIKUCHI
First Department of Biochemistry, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief: Prof. T. AKINO)

ABSTRACT The levels of surfactant protein (SP)-A, SP-B and SP-D were studied in bronchoalveolar lavage (BAL)-subfractions and lamellar body (LB) subfractions of rats with acute lung injury due to subcutaneous injection of N-nitroso-N-methylurethane (NMU, 4.0 mg/kg of body weight). NMU-injected or saline-injected rats were sacrificed on day 2, day 4 and day 7, and BAL and LB were obtained. The BAL was divided into two subfractions by two different methods, i. e., alv 1 and alv 2 fractions as defined by Nicholas *et al.*, and LA (large aggregates) and SA (small aggregates) fractions according to Jobe *et al.* The LB was divided into two subfractions, lbA and lbB fractions according to Nicholas *et al.* These BAL-subfractions and LB subfractions were analyzed for total protein, total phospholipid and surfactant proteins such as SP-A, SP-B and SP-D. The results obtained are summarised as follows:

1) The levels of total protein and phospholipid in alv 2 and SA fractions increased in NMU-injected rats through day 7, indicating that pool sizes of small aggregate-formed surfactant (SA-Sf), which almost completely represented the phospholipid content, had increased in the alveolar space in the acute lung injury. This result suggests that a conversion of large aggregate-formed surfactant (LA-Sf) to SA-Sf might be induced in the alveoli by the acute lung injury.

2) In NMU-injected rats, SP-A, SP-B and SP-D levels in BAL-subfractions were altered differently. SP-A and SP-B levels in LA fraction of NMU-injected rats were markedly lower than normal on day 2 (88.3 $\mu\text{g}/\text{rat}$ on day 0 to 14.9 $\mu\text{g}/\text{rat}$ on day 2 for SP-A, and 12.6 $\mu\text{g}/\text{rat}$ to 1.5 $\mu\text{g}/$

Abbreviations:

| | | | |
|------|-----------------------------------|----------|--|
| NMU | : N-nitroso-N-methylurethane | PG | : phosphatidylglycerol |
| Sf | : surfactant | PI | : phosphatidylinositol |
| LB | : lamellar body | SP | : surfactant protein |
| TM | : tubular myelin | BAL | : bronchoalveolar lavage |
| LA | : large aggregate | ELISA | : enzyme-linked immunosorbent assay |
| SA | : small aggregate | SDS-PAGE | : sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| DPPC | : dipalmitoyl phosphatidylcholine | | |
| PC | : phosphatidylcholine | | |

rat for SP-B, respectively). Then, the SP-A levels in alv 1 and LA fractions returned gradually to about 50-60% of the first levels through day 7, while the SP-B levels in both fractions remained at almost the same diminished levels. SP-D levels in alv 2 and SA fractions of NMU-injected rats were markedly higher than controls on day 4. SP-A and SP-B levels in SA fraction and SP-D levels in LA fraction of NMU-injected rats were not altered significantly during the experimental periods.

3) The ^3H -LA fraction was isolated from culture media of rat alveolar type II cells labeled with ^3H -choline for 20 hrs, followed by treatment with TPA and incubation for 18 hrs with BAL fluid obtained NMU-injected rats. About 95% of the ^3H -LA converted to SA fraction, indicating that a factor capable of converting LA-Sf to SA-Sf may be contained in the BAL.

(Received September 9, 1994 and accepted October 11, 1994)

Key words: Surfactant protein A, Surfactant protein B, Surfactant protein D,
N-nitroso-N-methylurethane (NMU), Acute lung injury.

1 緒 言

肺サーファクタント (Sf) は、肺胞 II 型細胞で合成され、細胞内でラメラ封入体 (LB) へ蓄積後、肺胞腔に分泌される脂質-蛋白質複合体である¹⁾。正常肺胞に存在する分泌直後の Sf は、格子様構造物 tubular myelin (TM) に富む。TM-rich であることが、肺胞表面で Sf が表面張力低下作用を出現するために必須と考えられている²⁾。その後、Sf は、呼吸運動に伴ない表面張力低下作用を持たない小ベジクル様構造物に変換し、次いでその殆んどが再び肺胞 II 型細胞へ取り込まれ再利用されるという Sf 代謝サイクルを形成している³⁾。

肺 Sf の約 90% は脂質で、特にジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) が大部分であり¹⁾、またホスファチジルグリセロール (PG) が全リン脂質の約 5-10% 存在するのが特徴である¹⁾。一方、肺 Sf には、その化学組成で約 8% の特異アポ蛋白質が存在する^{1,4,5)}。現在まで SP-A, SP-B, SP-C, SP-D の 4 種類が知られている。前三者の大部分はリン脂質と共にラメラ封入体を介して細胞外へ分泌されるが、SP-D と SP-A の一部は、ラメラ封入体を介さない経路で肺胞へ出ると考えられている^{3,6)}。

この中で SP-A^{7,8)} と SP-D⁹⁻¹¹⁾ は構造上共にコレクチンファミリーに属する親水性糖蛋白質である。つまり、N 末端側にコラーゲン様構造、C 末端側に C 型レクチン構造を併せもっている。SP-A と SP-D は気液界面におけるリン脂質膜の表面活性発現には直接関与せず¹⁾、Sf 蛋白質でありながら、表面活性発現の促進以外の機能をもつ。すなわち SP-A は、肺胞 II 型細胞からの Sf リン脂質分泌の抑制¹²⁻¹⁴⁾ と肺胞 II 型細胞へのリ

ポソーム取り込みの促進^{15,16)} により Sf リン脂質代謝動態を調節している。また SP-A と SP-D は細菌あるいはウイルスに結合してオプソニン化し、肺胞マクロファージによる貪食作用を促進することにより、肺胞表面での感染防御に寄与することが示唆されている¹⁷⁻²⁰⁾。一方、小分子量の疎水性蛋白質である SP-B と SP-C は、気液界面におけるリン脂質リポソームの表面張力低下作用を強く促進し²¹⁾、SP-A, SP-D とは異なる機能をもつ。

肺胞腔における Sf の TM 様構造が、表面活性発現に必須の構造であることが、呼吸窮迫症候群 (RDS) で死亡した新生児肺の電顕学的及び免疫組織学的検討で明らかにされてきた^{22,23)}。一方、再構成実験でこの TM 構造の形成、維持には、リン脂質、 Ca^{2+} と共に Sf アポ蛋白質 SP-A, SP-B の共存が必要であることが示されている²⁴⁻²⁸⁾。最近、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の TM 様構造に富む large aggregate (LA) 画分と小ベジクル構造に富む small aggregate (SA) 画分の簡易分離法が確立し²⁹⁾、運動時³⁰⁾ 及び急性肺傷害時³¹⁻³³⁾ における LA 型 Sf と SA 型 Sf の代謝についての検討が行われるようになった。すなわち、飽和 PC を指標とした場合、急性肺傷害では LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換が進行していることが報告されている^{31,32)}。しかし、肺傷害時における LA 型 Sf の維持に必須な成分、SP-A, SP-B の in situ での存在に着目した研究はない。

肺 Sf 全体の機能及び代謝が、Sf 蛋白質によって維持、調節されていることは、現在広く受け入れられていると思われる。種々の病的状態によって肺 Sf が変動することは知られているが、Sf 蛋白質の変動に着目した研究は少ない。また、肺胞内 Sf 代謝を LA 型 Sf, SA 型 Sf の観点から、またラメラ封入体をさらに分画

し、Sf蛋白質の動態を追跡した研究も少ない。

以上の観点から、本研究ではラットにN-nitroso-N-methylurethane (NMU) を投与して adult respiratory distress syndrome (ARDS) 類似モデルを作製、この急性肺傷害時におけるBAL液の亜画分、alv 1及びalv 2画分またはLA及びSA画分におけるSf成分、特にSP-A、SP-B、SP-D及びリン脂質に着目してその変動を検討した。なおSP-Cについては、現在その抗体が得られておらず、本研究の検討には含まれていない。

2 実験方法

2.1 NMU皮下投与による急性肺傷害ラットの作製

NMU皮下注による急性肺傷害ラットの作製は、Lewis *et al.*³¹⁾の方法に従って行った。一晚絶食したSprague-Dawley種雄ラット(体重200-250g)に生食100 μ l中NMU(東京化成工業)4.0 mg/kgを皮下投与したNMU処理群と生食100 μ lを皮下投与した対照群を作製した。

2.2 肺洗浄液亜画分の分離

ラットをペントバルビタールNa麻酔後に腹部大動脈切断により脱血屠殺し、気管内にベニューラV1(Top社)を挿入した。肺動脈に0.25 Mシヨ糖液を注入して肺を充分灌流後、肺を摘出し生理食塩水10 mlで5回洗浄、BAL液を得た。このBAL液を150 \times g 5分間遠心して細胞成分を除去後、上清を更にNicholas *et al.*³⁰⁾の方法に従って1,000 \times g 25分間遠心し、沈査と上清に分離、この沈査をalv 1画分、上清をalv 2画分とした。また、別の分離方法として、細胞成分除去後の上清をJobe *et al.*²⁹⁾の方法に従って40,000 \times g 15分間遠心し、沈査と上清に分離、この沈査をLA画分、上清をSA画分とした。

2.3 ラメラ封入体亜画分の分離

Nicholas *et al.*³⁰⁾、Duck-Chong³⁴⁾の方法を一部改変した方法で、ラット肺組織からLB亜画分を分離した。BAL液採取のための肺洗浄後の肺組織を0.25 Mシヨ糖液中で細切後、1.0 Mシヨ糖液でホモジナイズし、1,000 \times g 5分間遠心、その上清を1.0 Mシヨ糖液濃度に調整した。これに0.8 M、0.7 M、0.6 M、0.5 M、0.4 M、0.3 M、0.2 Mのシヨ糖液を重ねし、80,000 \times g 2時間遠心した。0.4 M、0.5 Mシヨ糖液画分を採取しLB画分とした。LB画分の分離には、このLB画分を等量の水で希釈後8,000 \times g 30分遠心、この沈査をlbA画分、更に上清を100,000 \times g 1時間超遠心した沈査をlbB画分とした。

2.4 SP-A、SP-B及びSP-Dの分離、精製

Dethloff *et al.*³⁵⁾の方法でsilica (10 mg/kg体重)を生食食塩水に懸濁し、ラット気道内に投与した。silicaを経気道的に投与後、28日目にHawgood *et al.*²⁴⁾の方法で肺Sfを分離した。

このSf画分からKuroki *et al.*³⁶⁾の方法でSP-Aを分離した。Sf画分に充分量の1-ブタノールを加え、室温で充分混合し脱脂を行った。3,000 \times g 30分間遠心後、得られたブタノール不溶画分を窒素気流下に乾固し、5 mM Tris buffer (pH 7.4)に懸濁、同じ緩衝液に対し48時間透析した。130,000 \times gで1時間遠心し、この上清をmannose-Sepharose 6B (Pharmacia社)アフィニティカラム³⁹⁾にCa²⁺存在下に添加し、5 mM Tris buffer (pH 7.4)、2 mM EDTAで溶出した。このアフィニティカラム溶出画分からBiogel A 5 m (Bio Rad社)によるゲル濾過でSP-Aを分離した。

SP-Bの分離は、上記のブタノール可溶画分を減圧乾固後クロロホルム/メタノール/0.1 M塩酸(1:1:0.05, v/v/v)混合液に溶解、上記混合液で平衡化したSephadex LH-20 (Pharmacia社)ゲル濾過カラム(2.2 \times 86 cm)に添加した。この混合液を用い流速10 ml/hr、5 ml/tubeの条件で溶出した。Sephadex LH-20ゲル濾過で得られた各画分について抗ラットSP-Bウサギ抗血清によるドットプロットと総リン脂質の測定を行った。この操作を反復してSP-B画分をリン脂質画分から分離し³⁷⁾、得られたSP-B画分を窒素気流下に蒸発乾固後、クロロホルム/メタノール(1:1)に溶解し、ELISA法でのSP-B測定の標準として使用した。

SP-Dの分離は、Ogasawara *et al.*³⁸⁾の方法で行った。silica処理ラットのBAL液を33,000 \times gで遠心後、上清をmannose-Sepharose 6BカラムにCa²⁺存在下に添加し、150 mM NaCl、5 mM Tris buffer (pH 7.4)、2 mM EDTAで粗SP-D画分を溶出した。この粗SP-D画分からBiogel A 5 m (Bio Rad社)によるゲル濾過でSP-Dを精製した。微量に混在するSP-A除去の目的で、抗ラットSP-Aモノクローナル抗体(ID6)をリガンドしたアフィニティカラムを通してSP-Aを除去した。

2.5 抗ラットSP-A、SP-B、SP-D抗体の作製

精製ラットSP-AまたはSP-D100 μ gを同容量のFreund's complete adjuvant (Difco社)と混合、emulsionを作製後、New Zealand White種ウサギ大腿部の筋肉内に投与した。14日後に同量をFreund's incomplete adjuvantと共に筋肉内に投与、28日後に同量のSP-AまたはSP-Dを筋肉内に投与した。そ

の8日後に採血し抗血清を得た。各々の抗血清から Protein A-Sepharose CL 4B (Pharmacia 社)カラムを用いて IgG を精製した。抗ラット SP-B 抗体は、DPPC/コレステロール/SP-B (1:1:0.1, molar ratio)を用いて、抗 SP-A または抗 SP-D 抗体の作製スケジュールと同様にして作製した。

2.6 SP-A, SP-B 及び SP-D の定量

SP-A, SP-B の定量は, Shimizu *et al.*³⁷⁾の方法にて, 各々, サンドイッチ ELISA 法, コンペティティブ ELISA 法により行った。SP-D の定量は, Ogasawara *et al.*³⁸⁾によるサンドイッチ ELISA 法にて行った。肺ホモジネートおよび BAL 液の LA 画分の連続希釈による標準曲線は, SP-A, SP-B, SP-D によるそれぞれの標準曲線とよく一致した。

2.7 LA 画分の *in vitro* 変換実験

2.7.1 標識 LA 画分の分離

Sprague-Dawley 種雄ラットから Dobbs and Mason³⁹⁾の方法により, エラスターゼ (Worthington Biochemical 社)による細胞表面の酵素処理及びメトリザマイド (Nycomed 社)を用いた非連続密度勾配遠心法により肺胞 II 型細胞を分離した。分離した肺胞 II 型細胞を 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に浮遊させ, 2.0×10^6 個/dish の細胞に $1.0 \mu\text{Ci/ml}$ の [^3H]-choline (Cho) (New England Nuclear Research 社) を加え, プラスチックディッシュ (直径 3.5 cm, Falcon 社) 中で 20 時間, 37°C (CO_2 5%/air95%) で培養した。1 mg/ml の bovine serum albumin (BSA) を含む DMEM 10 ml で洗浄後, 単層肺胞 II 型細胞を 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol acetate (10^{-7}M) を含む 1.6 ml の DMEM 中で 4 時間培養した。培養液を回収し, 4°C で $150 \times g$ 10 分間遠心, この上清をさらに $40,000 \times g$ 15 分間超遠心し, 沈査を ^3H -LA として用いた。この ^3H -LA の放射活性の 96% は PC に認められた。

2.7.2 標識 LA 画分と BAL 液のインキュベーション

NMU (4.0 mg/kg 体重) 皮下投与後 3 日目のラットを 0.15 M NaCl, 0.01 M Tris, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 buffer (pH 7.4) 10 ml で肺洗浄した。回収した BAL 液の 1/8 と [^3H]-Cho 標識の LA 画分 (^3H -LA) (90,000 cpm) を混合し, バイアル中で 18 時間, 37°C でインキュベーションした。生食 $100 \mu\text{l}$ を皮下投与したラットから得た BAL 液を対照として用いた。その後, この混合液を 4°C で $40,000 \times g$ 15 分間遠心,

沈査 (LA 画分) と上清 (SA 画分) に分離し, 両画分の放射活性を測定した。

2.8 その他の分析法

蛋白質の定量は, BSA (Sigma 社) を標準とし, Lowry *et al.*⁴⁰⁾の方法で行った。BAL 画分の蛋白質は, Laemmli⁴¹⁾の方法による sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) 電気泳動及び Swank and Munkres⁴²⁾の方法による 8 M 尿素 SDS-PAGE により分析した。総リン脂質の定量は, Bligh and Dyer⁴³⁾法で脂質抽出後, Bartlett⁴⁴⁾の方法で行った。BAL 液及び LB のリン脂質組成は, Esko and Raetz⁴⁵⁾による二次元薄層クロマトグラフィーで展開後, 各スポットのリン量を定量して得られた。

3 成 績

3.1 BAL 液及び LB 画分のリン脂質組成の変化

NMU (4.0 mg/kg 体重) 投与後 6 日目までの BAL 液, LB 両画分のリン脂質組成を分析した (Fig. 1)。両画分リン脂質中 PC の割合に変化はなかったが, ホスファチジルグリセロール (PG) の割合は投与後次第に低下し, 代ってホスファチジリンシトール (PI) の割合が上昇した。BAL 液, LB 両方の PG/PI 比は, 投与前各々 3.7, 2.6 であったが投与後 6 日目には 0.61, 0.69 に低下した。肺 Sf 画分における PG% の低下と PI% の増加は, 肺胞 II 型細胞の増殖, 分化を示す指標⁴⁶⁻⁴⁸⁾として注目されており, 本研究で用いた NMU 投与ラットでは, 肺胞表面の傷害に引き続き, 肺胞 II 型細胞の増殖, 再生が進行していることが強く示唆された。

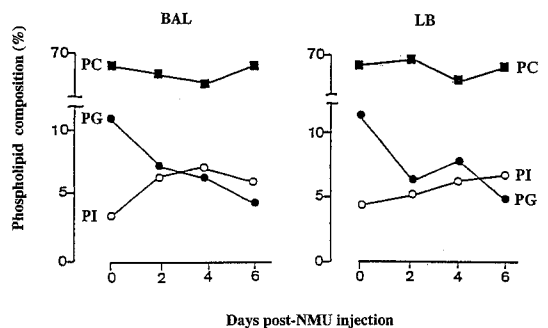


Fig. 1 Changes in phospholipid composition in bronchoalveolar lavage fluid and lamellar body fraction of rat lung by subcutaneous injection of 4.0 mg/kg body wt. of NMU to rats.

PC, Phosphatidylcholine;
PG, Phosphatidylglycerol;
PI, Phosphatidylinositol.

3・2 BAL 亜画分の総蛋白質量及びリン脂質量の変化

NMU 投与後 LA, SA 両画分の蛋白質量は有意に増加し (Fig. 2-A), NMU 投与群は, 生食投与群と比較して 7 日目には LA 画分で 3.2 倍, SA 画分で 5.6 倍に増加した. alv 1, alv 2 画分ともに投与後 7 日目の蛋白質量は著明に増加していた. SDS-PAGE で LA, SA 両画分の主たる蛋白質は血清蛋白質であったので, こ

の BAL 亜画分蛋白質量の増加は NMU 投与により肺毛細血管透過性が亢進した結果と考えられた. 一方, NMU 投与により, 肺組織 lbB 画分リン脂質量の変化は殆んどないが, lbA 画分では約 1/2 に低下していた (Table 1). 肺胞腔へ分泌直後の Sf である LA 画分及び alv 1 画分のリン脂質量は, 生食投与群と比較して低下傾向が認められた (Table 1). しかし SA 画分のリン脂質量は, NMU 投与後次第に増加し (Fig. 2-B), 7 日目では生食投与群と比較し 7 倍に増加し (Table 1), また投与後 7 日目における alv 2 画分のリン脂質量の増加も著明であった (Table 1).

NMU 投与後 7 日目のリン脂質/蛋白質比は, 生食投与群と比較し lbA, lbB 画分ではほぼ同じレベルであるのに対し, LA, alv1 画分では著明に減少, SA, alv 2 画分では僅かの上昇が認められた (Table 1). LA, SA 両画分の PC 量の経時変化を Fig. 3 に示す. SA 画分 PC 量は NMU 投与後著明に増加し (Fig. 3-A), PC 量の LA 画分に対する SA 画分の比 (Fig. 3-B) も上昇した.

これらの結果から, NMU 投与による肺傷害時の Sf 変化は, 肺胞 II 型細胞内で起こるのではなく, 肺胞腔内での Sf の変化, 特に LA 型 Sf の減少と SA 型 Sf の著明な上昇により特徴づけられると考えられる. Lewis *et al.*³¹⁾ は, NMU 皮下注家兎において, SA 画分の飽和型 PC 量は, LA 画分のその約 5 倍に増加していると報告した. 従って, この動物では LA 型 Sf から SA

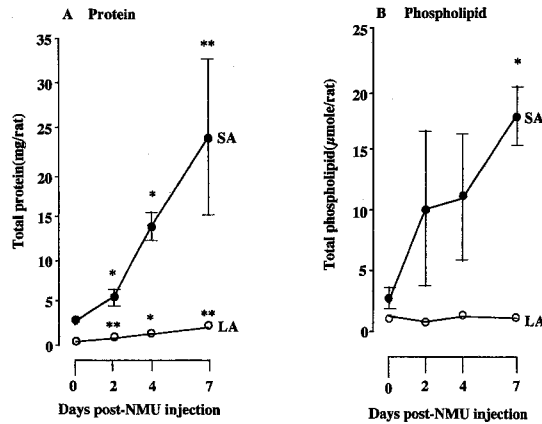


Fig. 2 Changes in protein (A) and phospholipid (B) contents in BAL-subfraction, i. e., large aggregates (LA) and small aggregates (SA), of rat lung after NMU injection. Results are expressed as means \pm S. D. of 3 animal studies. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ when compared with the levels of day 0.

Table 1 Protein and phospholipid contents of BAL-subfractions and lamellar body subfractions of rat lung at 7 days post-NMU (4.0 mg/kg of body wt.) injection.

| | Protein ($\mu\text{g}/\text{rat}$) | | | Phospholipid ($\mu\text{mole}/\text{rat}$) | | | Phospholipid/protein | |
|----------------------------|--------------------------------------|------------------------|------|--|---------------------|------|----------------------|-----------------|
| | Control (A) | NMU-treated (B) | B/A | Control (a) | NMU-treated (b) | b/a | Control a/A | NMU-treated b/B |
| BAL-subfractions | | | | | | | | |
| alv 1 | 292.7 \pm 164.9 | 766.7 \pm 185.1** | 2.62 | 0.558 \pm 0.144 | 0.510 \pm 0.122 | 0.91 | 1.91 | 0.67 |
| alv 2 | 4111.3 \pm 821.4 | 21961.7 \pm 9404.9** | 5.34 | 2.823 \pm 0.339 | 17.467 \pm 2.454* | 6.16 | 0.69 | 0.79 |
| LA | 378.0 \pm 146.4 | 1200.3 \pm 536.4** | 3.17 | 1.512 \pm 0.218 | 1.090 \pm 0.250 | 0.72 | 4.00 | 0.91 |
| SA | 4226.6 \pm 971.6 | 23661.3 \pm 8892.2** | 5.60 | 2.570 \pm 0.862 | 18.009 \pm 2.412* | 7.01 | 0.61 | 0.76 |
| Lamellar body subfractions | | | | | | | | |
| lb A | 140.0 \pm 57.2 | 63.6 \pm 12.0 | 0.45 | 0.612 \pm 0.127 | 0.324 \pm 0.197 | 0.53 | 4.37 | 5.09 |
| lb B | 82.0 \pm 12.1 | 75.0 \pm 11.5 | 0.91 | 0.506 \pm 0.060 | 0.560 \pm 0.187 | 1.11 | 6.17 | 7.47 |

alv 1 and alv 2, and lb A and lb B were separated from bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue of rats, respectively, according to Nicholas *et al.*³⁰⁾

LA (large aggregates) and SA (small aggregates) were separated from bronchoalveolar lavage fluid of rats according to Jobe *et al.*²⁹⁾

Values are means \pm S. D. for different preparations ($n=3$)

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ when compared with the levels in controls

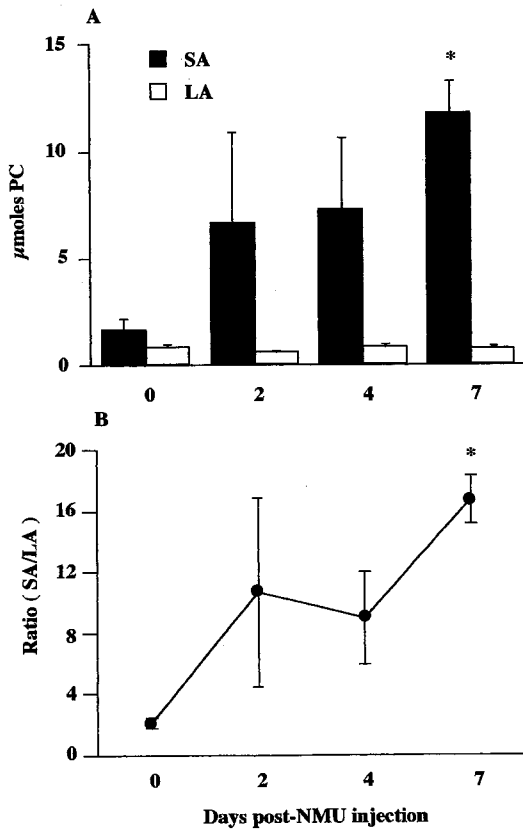


Fig. 3 A: Alveolar phosphatidylcholine (PC) pool sizes of large (LA) (open bars) and small aggregates (SA) (solid bars) of surfactant in rats with NMU-induced lung injury from day 0 to day 7 after NMU injection. B: The ratio of small to large aggregates of alveolar saturated PC pool sizes * $p < 0.05$ when compared with the levels of day 0.

型 Sf への変換が亢進していることを示唆している。

3.3 BAL 亜画分の Sf 蛋白質量の変化

NMU 投与後 2 日目で、LA 画分の SP-A 及び SP-B 量は、投与前のそれぞれ約 1/5 に減少した (Fig. 4-A, B)。以後、LA 画分 SP-A 量は徐々に増加し、投与後 7 日目には投与前値の約 60% まで回復した (Fig. 4-A)。NMU 投与後 7 日目の alv 1 画分の SP-A 量は、生食投与群の約 50% であった (Table 2)。これに対し、LA 画分 SP-B 量は 2 日目以降増加せず低値のままであった (Fig. 4-B)。また、NMU 投与後 7 日目では生食投与群と比較し 17% にとどまったままであり、alv 1 画分 SP-B 量も投与前値の 11% であった (Table 2)。SA 画分 SP-A 量は投与後 4 日迄変化がなかったが、7 日目で僅かに増加 (1.7 倍) した (Fig. 4-A)。NMU、生食投与群 7 日目の alv 2 画分 SP-A 量の変化は認めなかつ

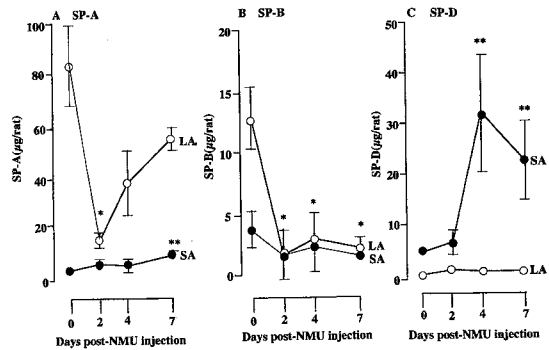


Fig. 4 Changes in SP-A (A), SP-B (B) and SP-D (C) contents in BAL-subfractions, i.e., large aggregates (LA) and small aggregates (SA) of rat lung after NMU injection. Results are expressed as means \pm S.D. ($\mu\text{g}/\text{rat}$) of 3 animal studies. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ when compared with the levels of day 0.

た (Table 2)。SA 画分及び alv 2 画分の SP-B 量は、生食投与群と比較して低下傾向が認められた (Table 2)。NMU 投与後の SA 画分の SDS-PAGE で、SP-A の分解産物と想定される蛋白質バンドが、先端部分に僅かに検出されたが、8 M 尿素 SDS-PAGE の電気泳動で、SP-B の小分子量分解産物は検出されなかった。(データは示していない)。肺組織 lbA 画分の SP-A 及び SP-B 量は、NMU 投与後 7 日目で生食投与群と比較して低下傾向があったが、lbB 画分では NMU、生食投与群で増加傾向があった。

一方、LA 及び SA 画分 SP-D 量の経時変化は SP-A、SP-B とは明らかに異なっていた (Fig. 4-C)。NMU 投与後 4 日目以降に、SA 画分 SP-D 量の著明な増加 (NMU 投与後 7 日目には投与前の約 3 倍) が認められた。alv 2 画分 SP-D 量の増加も著明であり、投与後 7 日目で約 3 倍となった。これに対し、lbA、lbB 両画分の SP-D は極めて少量で、NMU 投与前後の変化はなかった。

以上の結果、NMU 投与ラットの BAL 亜画分における各 Sf 蛋白質は、それぞれ異なる挙動を示すことが明らかとなった。

3.4 標識 LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換率の変化

標識 LA 画分と BAL 液をインキュベート後、 $40,000 \times g$ 15 分間遠心後の沈査 (LA 画分) と上清 (SA 画分) の放射活性を測定することにより、LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換を検討した。LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換率は、生食 $100 \mu\text{l}$ を皮下投与した対照の 44.5% に比較し、NMU 投与ラットでは 94.9% と著明

Table 2 SP-A, SP-B and SP-D contents of BAL-subfractions and lamellar body subfractions of rat lung at 7 days post-NMU (4.0 mg/kg of body wt.) injection.

| | SP-A ($\mu\text{g}/\text{rat}$) | | | SP-B ($\mu\text{g}/\text{rat}$) | | | SP-D ($\mu\text{g}/\text{rat}$) | | |
|----------------------------|-----------------------------------|-----------------|------|-----------------------------------|-----------------|------|-----------------------------------|-------------------|------|
| | Control (A) | NMU-treated (B) | B/A | Control (A) | NMU-treated (B) | B/A | Control (A) | NMU-treated (B) | B/A |
| BAL-subfractions | | | | | | | | | |
| alv 1 | 51.1 \pm 5.5 | 24.3 \pm 4.0* | 0.48 | 5.4 \pm 1.6 | 0.6 \pm 0.3* | 0.11 | 0.32 \pm 0.06 | 0.40 \pm 0.24 | 1.25 |
| alv 2 | 17.1 \pm 7.2 | 18.6 \pm 4.7 | 1.09 | 7.4 \pm 0.5 | 4.1 \pm 0.9* | 0.55 | 8.96 \pm 0.54 | 25.89 \pm 5.83* | 2.89 |
| LA | 88.3 \pm 22.0 | 53.9 \pm 6.1 | 0.61 | 12.0 \pm 1.8 | 2.0 \pm 0.7* | 0.17 | 1.10 \pm 0.21 | 1.45 \pm 0.56 | 1.32 |
| SA | 5.4 \pm 2.4 | 9.3 \pm 2.4 | 1.72 | 4.4 \pm 1.6 | 2.5 \pm 0.1 | 0.57 | 8.05 \pm 1.19 | 23.67 \pm 5.51* | 2.94 |
| Lamellar body subfractions | | | | | | | | | |
| lb A | 3.6 \pm 1.1 | 2.3 \pm 0.8 | 0.64 | 4.6 \pm 0.4 | 3.8 \pm 1.5 | 0.83 | 0.05 \pm 0.01 | 0.02 \pm 0.01 | 0.40 |
| lb B | 2.5 \pm 0.8 | 3.8 \pm 1.2 | 1.52 | 4.3 \pm 0.9 | 7.4 \pm 2.1 | 1.72 | 0.05 \pm 0.01 | 0.03 \pm 0.00 | 0.60 |

Values are means \pm S. D. for different preparations (n=3)

*p<0.01, **p<0.05 when compared with the levels in controls

Table 3 Conversion of large aggregates (LA) to small aggregates (SA) with bronchoalveolar lavage fluid from NMU-injected rats

| | Radioactivity (cpm) after incubation of ^3H -LA with BAL | |
|--------------------------|---|-----------------------|
| | Control BAL (n=2) | NMU-treated BAL (n=2) |
| LA | 41723 | 4176 |
| SA | 33437 | 77503 |
| % Conversion of LA to SA | 44.5 | 94.9 |

な高値を示した (Table 3). この結果は, NMU 投与ラットの肺胞中に LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換を促進する因子が存在することを示している.

4 考 察

各種の動物に NMU を投与すると, 形態学的, 生理学的な亜急性, 進行性の肺傷害を惹起することが報告されている⁴⁹⁻⁵²⁾. この NMU 投与動物は, ARDS と肺病態が極めて類似する³¹⁾ので, ARDS 類似動物モデルとして広く用いられている. NMU 投与動物における Sf リン脂質変化の特徴を従来の報告³¹⁻³³⁾から要約すると, 第 1 はその量的変動である. NMU 投与家兎では肺胞腔中の総リン脂質量は増加するが, 肺胞中飽和 PC 量の SA/LA 画分比は, NMU 投与後次第に上昇し, 4 日目では投与前の約 5 倍となった³¹⁾. この飽和 PC の SA/LA 画分比上昇の程度は, 肺コンプライアンス及び最大肺容量の低下の程度とよく相関する³¹⁾ことが判明している. 第 2 は, Sf リン脂質組成の質的変動である. NMU 投与動物の BAL リン脂質組成では, PG%が低下し, 代って PI%が上昇する. つまり, PG/PI 比が著しく低下することが報告^{31,52)}されている. BAL リン脂

質の PG/PI 比の低下は, シリカ処理ラット^{35,53)}, 特発性肺線維症⁵⁴⁾, 肺胞蛋白症⁵⁵⁾及び ARDS⁵⁶⁾等でも同様に認められる.

本研究の結果は, NMU 投与ラットにおける上記の Sf リン脂質変化の特徴を確認した. つまり, BAL 液と LB 画分において, PG/PI 比は著しく低下していた. Sf リン脂質の PG/PI 比の低下は, 肺胞 II 型細胞の増殖分化の一つの指標と考えられており, NMU 投与による広汎な肺胞表面の傷害に引き続き, 肺胞 II 型細胞の増殖, 再生が進行していることが示唆された. また, BAL 画分の小ベジクル構造に富む SA 画分及び alv 2 画分のリン脂質は, NMU 投与後次第に増加し, 投与後 7 日目で投与前の約 6-7 倍となり, PC 量の SA/LA 比は NMU 投与で著明に増加した. つまり, NMU による急性肺傷害時に, LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換が著しく進行していると考えられた. また, この現象は, 標識 LA 画分と生食及び NMU 投与ラットの BAL 液とのインキュベーション実験においても確認された. つまり, NMU 投与群では, 生食投与群に比較し ^3H 放射活性の LA 画分から SA 画分への移行が著明に進行しており, *in vitro* においても LA 型 Sf から SA 型 Sf への変

換の亢進を認めた。

LA 型 Sf (LA, alv 1 画分) と SA 型 Sf (SA, alv 2 画分) の代謝における Sf 蛋白質の関与を検討する目的で, NMU 投与ラットの LA, SA 画分及び alv 1, alv 2 画分中の SP-A, SP-B, SP-D 量を測定した。LA 及び alv 1 画分の SP-A と SP-B の NMU 投与に対する反応には明らかな違いが認められた。NMU 投与後 2 日目における LA 画分の SP-A, SP-B 値は, 投与前のそれぞれ約 1/5 に減少した。SP-A 値はその後徐々に増加し, LA 型 Sf の SP-A 値は 7 日目には投与前値の約 50-60% であった。これに対し, LA 型 Sf の SP-B 値は以後回復せず, 7 日目には投与前の約 1/5 のままであった。NMU 投与ラットにおける LA 型 Sf SP-B 値の著明な減少は, リン脂質を指標にした時に観察された LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換の促進と深く関連すると考えられる。LA 型 Sf は TM 様構造をもつのが特徴であるが, 再構成実験によるこの TM 様構造の形成機転の検討が報告されている^{26,27)}。すなわち, リン脂質 (DPPC:PG, 4:1), Ca^{2+} に SP-A あるいは SP-B を加えた場合, 形成されるのはリン脂質二重膜で, 膜相互の交叉は起こらないが, SP-A と SP-B が共存する時, リン脂質膜の交叉が出現し, 格子様構造をとり得ることが示されている。つまり, SP-A, SP-B のいずれかが欠けると TM 構造の維持は不能になると考えられる。NMU で惹起された肺傷害で, LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換が進行するのは, LA 型 Sf 中の SP-B の分解が進み, 回復しないことが主因と思われる。本研究では, NMU 投与後に SP-B の分解産物を SDS-PAGE で検出し得なかったが, より小さな分子へ分解したと考えられる。LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換は, 肺胞腔に可溶性に存在する約 75 kDa セリンプロテアーゼによると報告されている^{57,58)}。この酵素の由来細胞及び基質 Sf 蛋白質の特異性はまだ同定されていない。しかし, Veldhuizen *et al.*⁵⁹⁾ は, LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換と同時に, SP-B の分解が生じていることを証明しており, このセリンプロテアーゼが SP-B に特異的に作用し, LA 型 Sf から SA 型 Sf への変換が起こると考えられる。

NMU 投与後 2 日目の LA 画分 SP-A 値の著明な減少は, SA 画分 SP-A 値の増加が認められず, また著明な血中漏出の可能性も少ないので, SP-A の分解によると考えられる。Ryan *et al.*⁶⁰⁾ は, 活性化多核白血球と Sf との培養実験で, 電気泳動上 Sf 蛋白質 (SP-A) の減少といくつかの蛋白質バンドの出現を認め, 多核白血球からのプロテアーゼ, 特に白血球エラスターゼに

よる SP-A の分解を示唆した。また, Pison *et al.*⁶¹⁾ は, 多核白血球エラスターゼによる SP-A 及び SP-B の分解を証明している。本実験でも SDS-PAGE 上 SP-A の分解産物と想定される蛋白質バンドが先端部分に僅かに検出された。SP-A の分子構造は, 酵素処理に比較的安定といわれているが, NMU による急性肺傷害時に肺胞腔へ遊走する多核白血球のプロテアーゼによって一部の SP-A が分解したと考えられる。NMU 投与後 2 日目以降に SP-A 値が回復するのは, 肺胞 II 型細胞の増殖, 再生により肺胞腔への Sf 分泌が増加し, これが SP-A の分解を上回った結果と思われる。

NMU 投与による肺胞腔 SP-D の挙動は, SP-A, SP-B とは明らかに異なっていた。すなわち, SA 画分 SP-D 値は NMU 投与後 4 日目以降で有意な増加を認め, 投与後 7 日目では SA 及び alv 2 画分 SP-D 値は, 約 3 倍に増量した。ラット肺の免疫電顕⁶⁾ で, SP-D は肺胞 II 型細胞とクララ細胞に存在し, 肺胞 II 型細胞ではラメラ封入体に局在せず, SP-B 及び大部分の SP-A とは異なる機構で肺胞腔へ分泌されると考えられる。肺胞腔へ分泌直後の SP-A, SP-B は LA 型 Sf を形成し脂質と共存するが, SP-D の大部分は, BAL の 33,000×g 上清の可溶性画分に存在し⁶²⁾。大部分の脂質とは共存しない。このような肺組織, 肺胞腔における SP-D の SP-A, SP-B との局在の違いが, NMU 投与後の挙動の違いをもたらしと思われる。NMU 投与後の SA 型 Sf SP-D 値の増加は, 肺胞表面の急性傷害に引き続き, 肺胞 II 型細胞の増殖, 再生があって Sf 合成, 分泌が亢進した結果を反映していると考えられる。

本研究は, BAL 垂画分を二つの方法で LA 型 Sf と SA 型 Sf に分画した。LA 画分と alv 1 画分, SA 画分と alv 2 画分の分析結果はほぼ同じであった。alv 1 画分は LA 画分よりも凝集程度の大きな Sf であり, 分泌直後の Sf をより含むが, alv 1 画分と LA 画分との明らかな違いは認められなかった。SA 画分は alv 2 画分よりも, 小ベジクル構造をより多く含む Sf であるが, SA 画分と alv 2 画分の違いは著明には認められなかった。この結果は, LA 型 Sf と SA 型 Sf は, かなりの幅をもった Sf プールであることを示していると考えられる。

5 結 論

BAL 垂画分の総蛋白質, 総リン脂質, Sf 蛋白質 SP-A, SP-B, SP-D を指標として, NMU 投与により惹起されたラット急性肺傷害における肺 Sf の変動を検討し, 以下の知見を得た。

1. NMU 投与ラットの BAL 液では, PG の減少,

PIの増加があり、急性肺傷害に引き続き肺胞II型細胞の増殖、再生が進行していることが示唆された。SA画分リン脂質の増量から、LA型SfからSA型Sfへの変換の亢進が考えられた。

2. BAL画分の各Sf蛋白質は、NMUに対して異なった挙動を示した。LA型Sf画分SP-Bの著減があり、これによってLA型Sfの格子様構造物が維持不能となってSA型Sfへの変換が起こった。LA型Sf画分のSP-Aは最初減少するが、以後徐々に回復した。SP-DはSA型Sf画分に認められ、NMU投与後4日目以降に増量した。このSP-A、SP-Dの増量は、肺胞II型細胞の増殖、再生の亢進によると思われる。

謝 辞

本研究の御指導、御校閲をいただいた本学医学部生化学第1講座秋野豊明教授、本研究を遂行する機会をお与えいただきました本学医学部前内科学第3講座鈴木明教授、現内科学第3講座阿部庄作教授に深謝いたします。さらに御協力いただいた本学生化学第1講座

文 献

- van Golde LMG, Batenburg JJ, Robertson B. The pulmonary surfactant system: Biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev* 1988, 68: 374-455
- Williams MC. Morphologic aspects of the surfactant system. In: Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ, editors. *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice*. Amsterdam, Elsevier, 1992, 87-107
- Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987, 135: 426-444
- Fisher AB, Chander A. Introduction: Lung surfactant-phospholipids and apoproteins. *Exp Lung Res* 1984, 6: 171-174
- Hawgood S, Shiffer K. Structure and properties of the surfactant-associated proteins. *Annu Rev Physiol* 1991, 53: 375-394
- Voorhout WF, Veenedaal T, Kuroki Y, Ogasawara Y, van Golde LMG, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992, 40 (10): 1589-1597
- Benson B, Hawgood S, Schilling J, Clements J, Damm D, Cordell B, White RT. Structure of canine pulmonary surfactant apoprotein: cDNA and complete amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 6379-6383
- Thiel S, Reid KBM. Structure and functions associated with the group of mammalian lectins containing collagen-like sequences. *FEBS Lett* 1989, 250: 78-84
- Persson A, Chang D, Crouch E. Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* 1990, 265 (10): 5755-5760
- Shimizu H, Fisher JH, Papst P, Benson B, Lau K, Mason RJ, Voelker DR. Primary structure of rat pulmonary surfactant D. cDNA and deduced amino acid sequence. *J Biol Chem* 1992, 267 (3): 1853-1857
- Lu J, Willis AC, Reid KBM. Purification, characterization and cDNA cloning of human lung surfactant protein D. *Biochem J* 1992, 284: 795-802
- Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. *J Biol Chem* 1988, 263(7): 3388-3394
- Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett JA. Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *J Appl Physiol* 1987, 63(2): 692-698
- Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Venstrom K, Nellenbogen J. Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 1010-1014
- Wright JR, Wager RE, Hawgood S, Dobbs L, Clements JA. Surfactant apoprotein Mr=26,000-36,000 enhances uptake of liposomes by type II cells. *J Biol Chem* 1987, 262 (6): 2888-2894
- Tsuzuki A, Kuroki Y, Akino T. Pulmonary surfactant protein A-mediated uptake of phosphatidylcholine by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1993, 265: L 193-199
- Van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, Van Golde LMG. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 2: 91-98
- Van Iwaarden JF, van Strijp JAG, Ebskamp MJM, Welmers AC, Verhoef J, van Golde LMG. Surfactant protein A is opsonin in

- phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1991, 261: L204-209
19. Van Iwaarden JF, Shimizu H, van Golde PHM, Voelker DR, van Golde LMG. Rat surfactant protein D enhances the production of oxygen radicals by rat alveolar macrophages. *Biochem J* 1992, 286: 5-8
 20. Van Iwaarden JF, van Strijp JAG, Visser H, Haagsman HP, Verhoef J, van Golde LMG. Binding of surfactant protein A(SP-A) to herpes simplex virus type 1-infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A. *J Biol Chem* 1992, 267 (35): 25039-25043
 21. Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Haagsman HP, van Golde LMG, Demel RA. Interaction of lipid vesicles with monomolecular layers containing lung surfactant proteins SP-B or SP-C. *Biochemistry* 1991, 30: 8276-8281
 22. deMello DE, Chi EY, Doo E, Lagunoff D. Absence of tubular myelin in lungs of infants dying with hyaline membrane disease. *Am J Pathol* 1987, 127: 131-139
 23. Floros J, Phelps DS, deMellon D, Longmate J, Harding H. Surfactant proteins and respiratory distress syndrome. *Progress in respiratory research* 1990, 25: 231-236
 24. Hawgood S, Benson BJ, Hamilton Jr RL. Effects of a surfactant-associated protein and calcium ions on the structure and surface activity of lung surfactant lipids. *Biochemistry* 1985, 24: 184-190
 25. Efrati H, Hawgood S, Williams MC, Hong K, Benson BJ. Divalent cation and hydrogen ion effects on the structure and surface activity of pulmonary surfactant. *Biochemistry* 1987, 26: 7986-7993
 26. Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1989, 140: 75-81
 27. Williams MC, Hawgood S, Hamilton RL. Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, 5: 41-50
 28. Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LMG, Geuze HJ. Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. *J Histochem Cytochem* 1991, 39: 1331-1336
 29. Jobe AH, Ikegami M, Seidner SR, Pettenazzo A, Ruffini L. Surfactant phosphatidylcholine metabolism and surfactant function in preterm, ventilated lambs. *Am Rev Respir Dis* 1989, 139: 352-359
 30. Nicholas TE, Power JHT, Barr HA. Effect of pattern of breathing on subfractions of surfactant in tissue and alveolar compartments of the adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 3: 251-258
 31. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH. Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J Appl Physiol* 1990, 69 (6): 2303-2310
 32. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH. Metabolism of exogenously administered surfactant in the acutely injured lungs of adult rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1992, 145: 19-23
 33. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993, 147: 218-233
 34. Duck-Chong CG. The isolation of lamellar bodies and their membranous content from rat lung, lamb tracheal fluid and human amniotic fluid. *Life Sci* 1978, 22: 2025-2030
 35. Dethloff LA, Gilmore LB, Brody AR, Hook GER. Induction of intra- and extra-cellular phospholipids in the lungs of rats exposed to silica. *Biochem J* 1986, 233: 111-118
 36. Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Chemical modification of surfactant protein A alters high affinity binding to rat alveolar type II cells and regulation of phospholipid secretion. *J Biol Chem* 1988, 263(33): 17596-17602
 37. Shimizu H, Miyamura K, Kuroki Y. Appearance of surfactant proteins, SP-A and SP-B, in developing rat lung and the effects of in vivo dexamethasone treatment. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1081: 53-60
 38. Ogasawara Y, Kuroki Y, Shiratori M, Shimizu H, Miyamura K, Akino T. Ontogeny of surfactant apoprotein D, SP-D, in the rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1083: 252-256
 39. Dobbs LG, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II cells isolated from rats. Release of phosphatidylcholine in response to β -adrenergic stimulation. *J Clin Invest* 1979, 63: 378-387
 40. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 265-275
 41. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage

- T4. Nature 1970, 227: 680-685
42. Swank RT, Munkres KD. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Anal Biochem 1971, 39: 462-477
43. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 1959, 37: 911-917
44. Bartlett GR, Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem 1959, 234(3): 466-468
45. Esko JD, Raetz CRH. Mutants of chinese hamster ovary cells with altered membrane phospholipid composition. J Biol Chem 1980, 255(10): 4474-4480
46. Hallman M, Gluck L. Formation of acidic phospholipids in rabbit lung during perinatal development. Pediatr Res 1980, 14: 1250-1259
47. Hallman M, Epstein BL. Myoinositol decreases N-nitroso-N-methylurethane induced lung surfactant deficiency. Life Sci 1982, 31: 175-180
48. Akino T. Lipid components of the surfactant system. In: Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ, editors. Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice. Amsterdam, Elsevier, 1992: 19-31
49. Ryan SF, Bell Jr ALL, Barrett Jr CR. Experimental acute alveolar injury in the dog. Morphologic-mechanical correlations. Am J Pathol 1976, 82: 353-372
50. Ryan SF, Barrett CR, Lavietes MH, Bell ALL, Rochester DF. Volume-pressure and morphometric observations after acute alveolar injury in the dog from N-nitroso-N-methylurethane. Am Rev Respir Dis 1978, 118: 735-745
51. Ryan SF, Liau DF, Bell ALL, Hashim SA, Barrett CR. Correlation of lung compliance and quantities of surfactant phospholipids after acute alveolar injury from N-nitroso-N-methylurethane in the dog. Am Rev Respir Dis 1981, 123: 200-204
52. Liau DF, Barrett CR, Bell ALL, Ryan SF. Functional abnormalities of lung surfactant in experimental acute alveolar injury in the dog. Am Rev Respir Dis 1987, 136: 395-401
53. Kawada H, Horiuchi T, Shannon JM, Kuroki Y, Voelker DR, Mason RJ. Alveolar type II cells, surfactant protein A (SP-A), and the phospholipid components of surfactant in acute silicosis in the rat. Am Rev Respir Dis 1989, 140: 460-470
54. McCormack FX, King Jr TE, Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. Am Rev Respir Dis 1991, 144: 160-166
55. Honda Y, Kataoka K, Hayashi H, Takahashi H, Suzuki A, Akino T. Alterations of acidic phospholipids in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis. Clinica Chimica Acta 1989, 181: 11-18
56. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler III AA, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. J Clin Invest 1991, 88: 1976-1981
57. Gross NJ, Schultz RM. Serine proteinase requirement for the extra-cellular metabolism of pulmonary surfactant. Biochim Biophys Acta 1990, 1044: 222-230
58. Gross NJ, Schultz RM. Requirements for extracellular metabolism of pulmonary surfactant: tentative identification of serine protease. Am J Physiol 1992, 262: L 446-453
59. Veldhuizen RAW, Inchley K, Hearn SA, Lewis JF, Possmayer F. Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during *in vitro* conversion of large to small surfactant aggregates. Biochem J 1993, 295: 141-147
60. Ryan SF, Ghassibi Y, Liau DF. Effects of activated polymorphonuclear leukocytes upon pulmonary surfactant *in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol 1991, 4: 33-41
61. Pison U, Tam EK, Caughey GH, Hawgood S. Proteolytic inactivation of dog lung surfactant-associated proteins by neutrophil elastase. Biochim Biophys Acta 1989, 992: 251-257
62. Kuroki Y. Surfactant protein SP-D. In: Robertson B, van Golde LMG, Batenburg JJ, editors. Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice. Amsterdam, Elsevier, 1992: 77-85

別刷請求先

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部生化学第1講座 渡辺智之