

ヒト肺サーファクタント蛋白質 B(SP-B) の構造と肺における局在

片岡 賢治 村田 芳久* 佐藤 昌明**

札幌医科大学内科学第3講座 (主任 鈴木 明 教授)

*札幌医科大学生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

**札幌医科大学付属病院病理部 (主任 森 道夫 教授)

Structure and Localization of Surfactant Protein B(SP-B) in Human Lung

Kenji KATAOKA, Yoshihisa MURATA* and Masaaki SATOH**

Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical College

(Chief. Prof. A. SUZUKI)

**Department of Biochemistry (Section 1), Sapporo Medical College*

(Chief. Prof. T. AKINO)

***Pathology Division, Sapporo Medical College Hospital*

(Chief. Prof. M. MORI)

ABSTRACT Surfactant protein B (SP-B), a highly hydrophobic surfactant-associated protein, was isolated from lipid extract of bronchoalveolar lavage fluids of patients with alveolar proteinosis. The structure and size of the human SP-B were analyzed, and the localization and metabolism of the SP-B in human lung tissues were also examined using human SP-B antisera. The results obtained are summarized as follows:

1. The amino acid sequences of peptide fragments, obtained by treatments with lysylendopeptidase, thermolysin and CNBr of the SP-B after pyridylethylation of the Cys residues, were identical with that deduced by cDNA of human SP-B (Jacobs *et al.* J. Biol. Chem. 262: 9808-9811, 1987). The amino acid sequence of the C-terminal fragment isolated by CNBr cleavage was identified up to Met-79. These findings indicate that human SP-B has at least 79-residues with 7-half Cys.

2. By western blotting with human SP-B antisera, a 8 kDa protein, i. e., SP-B, was detected in lamellar body fraction isolated from human lung homogenate. However, 40-41 kDa and 25 kDa proteins were detected in microsomes by the blotting, suggesting that the 40-41 kDa and 25 kDa proteins are precursors of the mature form of SP-B.

3. By light microscopy using immunoperoxidase technique with human SP-B antisera and a monoclonal antibody (PE10) to human SP-A, the almost identical distribution of SP-B and SP-A was seen in the human adult lung tissue. However, in the sections of fetal lung tissues at late gestation, SP-A was localized mostly in alveolar spaces, while SP-B was localized mostly within the cells. Thus, there was a distinctive difference in the localization of SP-A and SP-B in human fetal lungs.

(Received September 30, 1991 and accepted October 21, 1991)

Key words: Pulmonary surfactant, Surfactant protein B(SP-B), Primary structure, Precursor proteins, Localization

1 緒 言

肺胞II型細胞で合成され、肺腔へ分泌される脂質

—蛋白質複合体(肺サーファクタント)の主成分はリン脂質であるが、これには重量比約10:1の比率で蛋白質が含まれている。この蛋白質は肺サーファク

ントに特異的に存在する蛋白質で、現在まで4種類の蛋白質が報告されている^{2,3}。親水性の蛋白質 (Surfactant protein, SP)SP-A^{4,5} および SP-D⁶ と、疎水性が高くリン脂質結合親和性の強い蛋白質 SP-B^{7,8} および SP-C^{9,10} である。疎水性蛋白質の SP-B と SP-C は、肺サーファクタントの脂質抽出画分にリン脂質とともに抽出される⁹。これらの疎水性蛋白質は、肺サーファクタントが肺胞表面の気相-液相界面で表面活性を発現する際、必須の成分であることが最近明らかとなった^{7,11-13}。肺サーファクタントに存在する SP-C の分子サイズはヒト、イヌ、ブタでアミノ酸残基数 35 個からなり、3.7 kDa である¹⁰ が、SP-B の分子サイズはブタでアミノ酸残基数 79 個、8 kDa と報告された⁸。SP-B の cDNA は、ヒト^{14,15}、イヌ⁷、ラット¹⁶ から分離され、その初期翻訳蛋白質は 42 kDa 蛋白質と同定された^{17,18}。初期翻訳蛋白質の N 末端シグナルペプチド部分が除去された ProSP-B (約 40 kDa) は、更に酵素分解を受けた後、肺サーファクタント画分へは mature SP-B (8 kDa) 蛋白質として出現すると思われる。しかし、ブタ以外では肺サーファクタント中の SP-B の分子サイズは決定されていない。水本、足立¹⁹ は肺胞蛋白質症患者の気管支肺胞洗浄液の脂質抽出液から SP-6 を分離した。この SP-6 は、N 末端アミノ酸配列がヒト SP-B の cDNA から得られるアミノ酸配列と同一なので、SP-B と同じものと考えられる。彼らはこのヒト SP-B のアミノ酸残基数は 57 個と報告した。しかし、この SP-B は患者肺胞腔での長期間の滞留中に分解した可能性もあり再検討が必要と考えられた。本研究では、肺胞蛋白質症患者材料からヒト SP-B を分離し、蛋白質化学的手法により詳細にその構造を再検討した。ついで、抗ヒト SP-B 抗体を作製、SP-B および ProSP-B のヒト肺画分における局在の検索を行い、さらに胎児肺における SP-A と SP-B の局在の違いを検討した。

2 実験方法

2.1 実験材料

2.1.1 肺胞蛋白質症患者気管支肺胞洗浄液

ヒト肺胞蛋白質症患者の気管支肺胞洗浄液を 33,000 × g, 60 分間遠心して得られた沈渣画分を Frosolono *et al.*²⁰ の方法で不連続シヨ糖密度勾配遠心し、粗肺サーファクタント画分を分離、-40℃ に凍結保存した。

2.1.2 ヒト肺組織の採取とラメラ封入体 (LB)、ミクロソーム (MS) 画分の分離

肺癌患者の手術肺から、肉眼的に明らかに腫瘍未侵襲で、かつ炎症所見が認められない部位の一部を検体

として用いた。採取された肺組織は、Jobe²¹ の方法に従い不連続シヨ糖密度勾配遠心法により LB と MS 画分に分離した。

2.1.3 ヒト肺組織パラフィン切片

肺組織の一部を 20%ホルマリン液で固定し、パラフィンに包埋した。

2.2 SP-B の分離精製

2.2.1 抽出

凍結保存した肺胞蛋白質症患者気管支肺胞洗浄液の粗肺サーファクタント画分を解凍後、Bligh and Dyer²² 法に準じ、クロロホルム/メタール (C/M) 混液を加えて攪拌し、4℃ にて 24 時間静置した。これを 700 × g, 10 分間遠心し、水層及び有機溶媒層に分離した。有機溶媒層を抽出液として用いた。別の方法として、粗肺サーファクタント画分を脱イオン水で懸濁、50 倍容量の 1-ブタノールを加え室温で 1 時間攪拌後、10,000 × g, 20 分間遠心した²³。この上清を減圧下に蒸発乾固し C/M (2:1) に溶解、ブタノール抽出液とした。

2.2.2 Sephadex LH-20 及び Sephadex LH-60 ゲルクロマトグラフィー

Bligh and Dyer²² 法またはブタノール抽出法²³ によって得られた抽出液を減圧乾固後、5%0.1 N 塩酸を含むクロロホルム/メタノール (1:1, v/v) 混合液 (以下、C/M/0.1 N 塩酸混合液) 5 ml に溶解し、上記混合液にて平衡化した Sephadex LH-20 (Pharmacia 社) ゲル濾過カラム (2.2 × 86 cm) を用い、流速 50 ml/hr, 230 滴/tube の条件で溶出した。Sephadex LH-20 ゲル濾過で得られた蛋白質画分を窒素気流下に蒸発乾固後、上記の C/M/0.1 N 塩酸混合液 5 ml に溶解し、この混合液で平衡化した Sephadex LH-60 (Pharmacia 社) ゲル濾過カラム (1.55 × 89 cm) を用いて、流速 10 ml/hr, 85 滴/tube の条件にて溶出を行った。

2.2.3 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置は 655-11 型 Liquid chromatography pump, L-5000 型 LC controller, 655A variable wave length UV monitor (日立) を使用した。カラムは逆相 C₈ カラム (46 × 250 mm, 10 μm, Nucleosil 社) を使用した。Sephadex LH-60 カラムクロマトグラフィーで得られた蛋白質画分を窒素気流下に乾固し、10%酢酸に溶解後、カラムに添加した。0.1%三フッ化酢酸 (TFA) (Pierce 社) を含むアセトニトリル/2-プロパノール (AcCN/2-PrOH) (2:1, v/v) 溶液を用い、流出速度 1.0 ml/min, 検出波長 215 nm, 溶出液採取 0.4 ml/tube にて、5%から 95%の直線濃度勾配溶出を行った。

2.3 SP-Bの構造解析

2.3.1 SP-Bのピリジルエチル化

HPLCで精製したSP-B(80 μg 相当)を窒素気流下で乾固し, 6 M 塩酸グアニジン及び0.01%EDTAを含む0.13 M Tris-HCl緩衝液(pH 7.6)500 μl に溶解した。これに上記緩衝液で溶解した0.1 M DTT溶液25 μl を加え, 3時間, 室温で還元した後, 100倍希釈した4-ビニルピリジン13 μl を加えて, 90分間, 室温で反応を行った²⁴⁾。88%ギ酸50 μl を加えて反応停止後, ピリジルエチル化されたSP-Bを逆相C₈カラムを使用したHPLCを用いて精製した。

2.3.2 リジルエンドペプチダーゼ処理

ピリジルエチル化SP-Bを8 M 尿素, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)緩衝液に溶解した後, 50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)を等量加えて尿素濃度を4 Mとし, リジルエンドペプチダーゼ(*Achromobacter liticus* プロテアーゼ I, 和光純薬工業)を基質/酵素比50対1(w/w)になるように加え, 37°Cで16時間反応させた。

2.3.3 サーマリシン処理

ピリジルエチル化SP-Bを1 mM CaCl₂を含む8 M 尿素, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)緩衝液に溶解し, 3分間煮沸した後, サーマリシンを基質/酵素比200対1となるように加え, 37°Cで3時間反応させた。

2.3.4 臭化シアン (CNBr) 分解

精製したピリジルエチル化ヒトSP-B(200 μg)を1 mlの70%ギ酸中に溶解後, 50 mgの結晶臭化シアンを加えて密栓し, 37°Cで48時間反応させた。反応後, 反応液は9倍量の精製水で希釈し, Centrifugal evaporator(RD-31型, ヤマト科学)にて減圧乾固することによりギ酸および臭化シアンを除去した。

2.3.5 ペプチド断片のHPLCによる分離

リジルエンドペプチダーゼ, サーマリシン処理によってピリジルエチル化SP-Bより生じたペプチド断片は逆相C₈カラムを, CNBr処理によって生じたペプチド断片は, 逆相C₁₈カラム(46×250 mm, 10 μm , 東洋曹達工業株式会社)を使用したHPLCを用いてそれぞれ分離した。溶出は0.1%TFAを含む5%から95%のAcCN/2-PrOH(2:1, v/v)の濃度勾配で行った。

2.3.6 ペプチド断片のアミノ酸一次配列の分析

HPLCにより分離したペプチド断片を0.1%TFAを含む40%アセトニトリルに溶解し, 477型気相シーケンサー(Applied Biosystems社)にて自動エドマン分解を行った。切断されたフェニルチオヒダントイン化(PTH化)したアミノ酸をPTHアナライザー120 A(Applied Biosystems社)で同定した。

2.3.7 ペプチド断片のFAB-質量分析

ペプチド断片(0.1-0.5 nmol)を凍結乾燥後, AcCN/水(1:1)に溶解, グリセロール/1-チオグリセロール(1:2, v/v)と混合し試料を調整した。FAB-質量分析は, FABイオン源を装置したDOUBLE-FOCUSING MASS SPECTROMETER (Joel JMS-HX100)で測定した。

2.4 抗ヒトSP-B抗血清の作製

Sephadex LH-60ゲル濾過で精製したヒトSP-B 250 μg に卵黄ホスファチジルコリン(PC)(QP社製)25 mgを加え, 窒素気流下で乾固した後, 生理食塩水0.5 mlを加えて超音波処理を行った。Freund's complete adjuvant 0.5 mlを加え, さらに超音波処理して得た懸濁液を抗原として用いた。Sigel *et al.*²⁵⁾の方法に従い, 家兎リンパ節に抗原を注入して免疫した。すなわち, まず生理食塩水0.5 mlで溶解した2%(w/v)エバンスブルー色素を家兎の後趾間に注射し, 翌日ネンブタールによる静脈麻酔を施行した後, 後肢の膝窩リンパ節(エバンスブルーで着色している)に直接抗原を注入し, 残りは背部皮内数カ所に分注した。

抗体価の検討はenzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA)²⁶⁾法で行った。精製したヒトSP-Bを窒素気流下で乾固し, 生理食塩水で60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度とした。この溶液をmicro ELISA plate (Immulon 1, Dynateck社)の各well当たり100 μl を滴下し, 室温で2時間吸着させた。その後2%スキムミルク(雪印社), 1%Triton X-100を加えた50 mMリン酸緩衝液(PBS)(TX/SM/PBS)で各wellを満たし, 37°C, 1時間処理した。TX/SM/PBSで3回洗浄後, PBSで段階希釈した免疫家兎血清を100 μl 加え, 37°Cで90分間反応させた。次にTX/SM/PBSで3回洗浄し, PBSで1500倍に希釈したhorseradish peroxidase 標識抗ウサギIgY抗体(Bio-rad社)を各wellに100 μl 加え37°C, 90分間反応させた。TX/SM/PBSで洗浄後, 0.1% o-phenylenediamine, 0.015% H₂O₂含有0.1 Mクエン酸緩衝液(pH 4.6)を100 μl 添加し室温, 暗所で30分間呈色反応を行った。反応は100 μl の2 N H₂SO₄を加えて停止し, オートリーダーMR 580(Dynateck社)で490 nmの吸光度を測定した。抗体価の十分な上昇を待ってSP-B 25 μg の追加免疫を家兎背部皮内に行い, 1週間後に耳静脈より30 ml採血し, 抗血清を得た。

一方, 水本, 足立¹⁹⁾の方法に従い, ケイ酸カラムクロマトグラフィーで得られたクロロホルム/メタノール, 4:1分画の一部(ヒトSP-B, 100 μg とリン脂質の混

合物)を窒素気流下で乾固後, 生理食塩水 0.5 ml にて懸濁液とし, Freund's complete adjuvant 0.5 ml とともに BALB/c マウスの腹腔内に投与した. その後 1 週ごとに 20 μ g の追加免疫を 3 回行い, 抗ヒト SP-B 抗血清を得た.

2.5 電気泳動法

2.5.1 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Laemmli²⁷⁾の方法に準じて蛋白質試料に 10% SDS, 10 mM EDTA, 66% グリセロール混合液を 4:1 の割合に加え, 90°C, 5 分間加熱したものを試料とした. 還元条件下での電気泳動の際には, 2% β メルカプトエタノール (β -ME) を加えた. 15% ポリアクリルアミド, 0.1% SDS の条件で 25 mM トリス, 192 mM グリシン, 0.1% SDS 混合液を緩衝液とし, スラブ電気泳動槽(マリソル産業)にて 30 mA, 3 時間電気泳動を行った. 分子量マーカーには, 低分子用マーカーキット及びペプチド用マーカーキット(Pharmacia 社)を使用した. 蛋白質の染色は銀染色キット(第一化学工業社)あるいはクマシー・ブリリアント・ブルー染色で行った.

2.5.2 8 M 尿素・SDS-PAGE

Swank and Munkres²⁸⁾の方法に準じて, 蛋白質試料を 1% SDS, 8 M 尿素, 0.01 M H_3PO_4 (pH 6.8) 溶液に溶解し, 60°C, 10 分間反応させた. 還元条件下での泳動の際には 1% β -ME を加えた. 12.5% アクリルアミド, 1.25% N-N'メチレンビスアクリルアミド, 8 M 尿素, 0.1% SDS の条件で 0.1 M H_3PO_4 (pH 6.8), 0.1% SDS の緩衝液にてスラブ電気泳動槽を用い, 40 V, 9 時間電気泳動を行った.

2.6 Western blotting

Towbin *et al.*²⁹⁾の方法に準じて電気泳動後のゲルをニトロセルロース膜(東洋濾紙, pore size 0.45 μ m) にトランスブロットした. 転写後のシートを 2% スキムミルク, 1% Triton X-100 を含む 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.4 (TX/SM/PBS) にて 37°C, 1 時間処理した後, 抗ヒト SP-B 抗血清(400 倍希釈)をシート上にマウントし, 37°C, 1 時間反応させた. 次に TX/SM/PBS にて洗浄, PBS で 1500 倍に希釈した horseradish peroxidase 標識抗ウサギ Ig ヤギ抗体(Bio-rad 社)を 37°C, 1 時間反応させた後, 再び TX/SM/PBS で洗浄した. 洗浄後 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を基質として 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.1% H_2O_2 溶液中にて発色させた.

2.7 免疫組織学的検討

抗ヒト SP-A 単クローン抗体 (PE10) および抗ヒト

SP-B マウス抗血清を用いた免疫組織学的検討を以下に述べる方法で行った. 肺組織を 20% ホルマリンで固定後作製したパラフィン薄切片をベンゼンで脱パラフィンした後, 0.1% トリプシンで 37°C, PE 10 の場合 30 分間, 抗ヒト SP-B 抗血清の場合 5 分間処理した. 次に 0.6% H_2O_2 メタノール溶液に 30 分浸して内因性 peroxidase を阻止した. PBS で洗浄後 160 倍希釈した PE 10 あるいは抗ヒト SP-B 抗血清を室温で 30 ないし 60 分間反応させた. PBS で洗浄後ビオチン化抗マウス IgG ウマ血清 (Vector 社) を二次抗体として室温で 30 分間反応させ, PBS で洗浄後, ABC 溶液 (Avidin D-biotinylated horseradish peroxidase) を室温で 30 分間反応させた. PBS で洗浄後, peroxidase 反応基質液 (0.01% H_2O_2 を加えた 3-3'-diaminobenzidine, 100 mM Tris-HCl, pH 7.6) 中で約 3 分間反応させた. PBS で洗浄後ヘマトキシリンで核染色し脱水, 透徹, 封入後に鏡検した.

2.8 その他の分析法

脂質リンは Bartlett 法³⁰⁾ で定量した. 蛋白定量は Lees *et al.*³¹⁾ の方法に従い, 改良 Lowry 法で行った.

3 成績

3.1 ヒト SP-B の分離精製

肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液の粗肺サーファクタント画分抽出液から, 疎水性蛋白質を分離する目的で, Sephadex LH-20 及び Sephadex LH-60 ゲル濾過を行った. 抽出液を Sephadex LH-20 カラムに添加し C/M/0.1 N 塩酸混合液で溶出した (Fig. 1 A). リン脂質はベッド体積の約 40% 以降に溶出され, 蛋白質はリン脂質の前にピークを形成して溶出した. リン脂質がまだ混在するこの蛋白質ピーク画分を集め, 更に蛋白質を精製する目的で, Sephadex LH-60 ゲル濾過を行った. 溶出液は C/M/0.1 N 塩酸混合液を用いた (Fig. 1 B). リン脂質ピークの前に溶出する蛋白質は, 早く溶出される大きなピーク (P-1) と遅く溶出される小さなピーク (P-2) の 2 つが認められた. P-1, P-2 両ピーク画分ともにリン脂質の混在は殆ど認められなかった. Sephadex LH-60 ゲル濾過で分離された 2 つの蛋白質ピーク画分を 8 M urea SDS-PAGE により分析した (Fig. 2). P-1 は非還元条件下で, 分子量約 18,000, 14,000, 12,000, に相当する 3 つの蛋白質バンドを示した (Fig. 2, lane a) が, 還元条件下では分子量約 8,000 のバンドのみを示した (Fig. 2, lane c). P-2 は非還元および還元条件下でともに分子量約 8,000 のバンドを示した (Fig. 2, lane b および d). 従って,

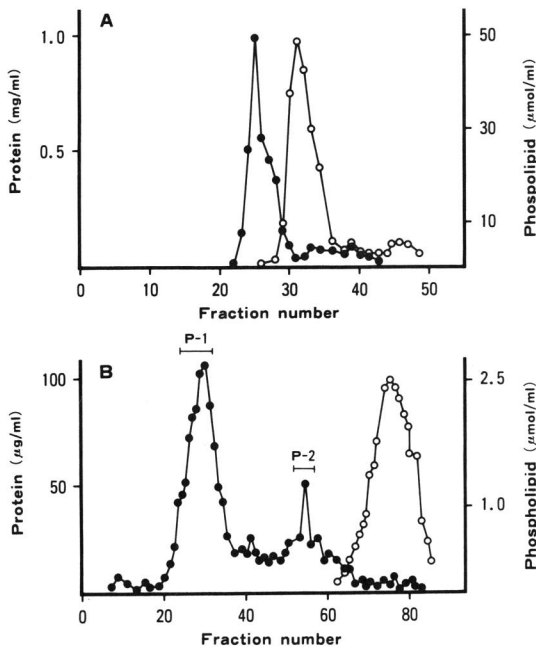


Fig. 1 Separation of hydrophobic surfactant-associated proteins from lipid extract of bronchoalveolar lavage fluid from patients with alveolar proteinosis.

The lipid extract was fractionated by Sephadex LH-20 gel chromatography(A) followed by Sephadex LH-60 gel chromatography(B). P-1(fraction 28 to 32) and P-2(fraction 53 to 56) were collected to analyse by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

●: protein
○: phospholipid

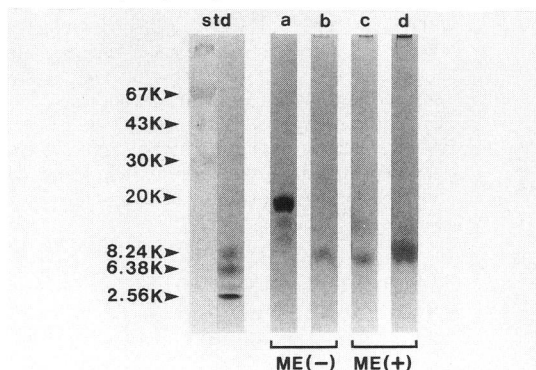


Fig. 2 Electrophoretic analysis of the fractions obtained by Sephadex LH-60 gel chromatography.

Samples of P-1(fraction 28 to 32), P-2 (fraction 53 to 56) were analysed by 8 M urea SDS-PAGE under either non-reducing (lane a and b) or reducing (lane c and d) condition, and stained with silver.

Lane a and c: P-1
Lane b and d: P-2

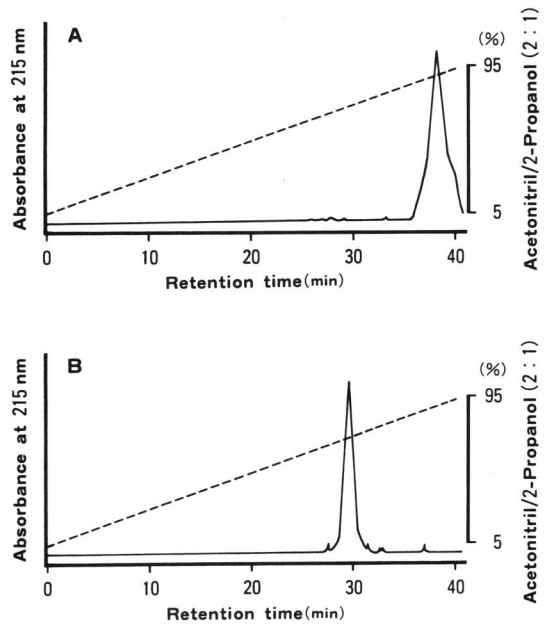


Fig. 3 High-performance liquid chromatographic purification of human SP-B isolated by Sephadex LH-60 gel chromatography.

The P-1(A) isolated by Sephadex LH-60 gel filtration and the pyridylethylated P-1(B) were applied onto a reverse-phase C_8 column (46×250 mm), and eluted with a linear gradient of 5 to 95% acetonitrile/2-propanol (2:1) in 0.1% trifluoroacetic acid at a flow rate of 1 ml/min. The peptides were detected with an absorbance at 215 nm.

A: P-1
B: pyridylethylated P-1

Johansson *et al.*⁹⁾ の報告で同定されたように、P-1はSP-B、P-2はSP-Cと考えられた。このP-1蛋白質(SP-B)をC₈逆相カラムを用いたHPLCによって精製した(Fig. 3 A)。保持時間37~39分に単一のピークが認められ、Sephadex LH-60ゲル濾過で分離したP-1は単一の蛋白質(SP-B)からなると考えられた。次にHPLCにより精製したSP-Bをピリジルエチル化し、同じ方法のHPLCにより分離した(Fig. 3 B)。保持時間29分に単一のピークを認め、SP-Bに存在するSH基をピリジルエチル化すると保持時間が10分程度短くなった。

3・2 ヒトSP-Bの構造解析

ピリジルエチル化しSH基を保護したSP-B(ピリジルエチル化SP-B)はN末端がブロックされておらず、N末端より18番目までのアミノ酸配列が判読された。このN末端より18番目までのアミノ酸配列はJacobs *et al.*¹⁴⁾によって報告されたヒトSP-BのcDNAの塩

基配列より得られたアミノ酸配列と完全に一致した。ピリジルエチル化 SP-B をリジルエンドペプチダーゼで

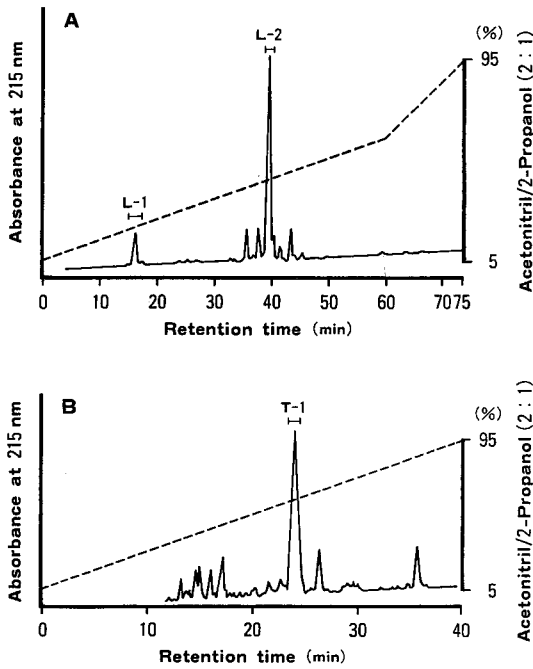


Fig. 4 Elution profiles of the lysylendopeptidase(A) and thermolysin(B) digests of the pyridylethylated P-1 on reverse phase high-performance liquid chromatography.

The pyridylethylated P-1 was digested with lysylendopeptidase or thermolysin as described in Materials and Methods. The resultant peptides were applied to a C₈ column (46×250 mm). Elution was carried out at a flow rate of 1 ml/min with a linear gradient of 5 to 95% acetonitrile/2-propanol in 0.1% trifluoroacetic acid. L-1, L-2 and T-1 were collected to analyse amino acid sequence.

A: lysylendopeptidase digests
B: thermolysin digests

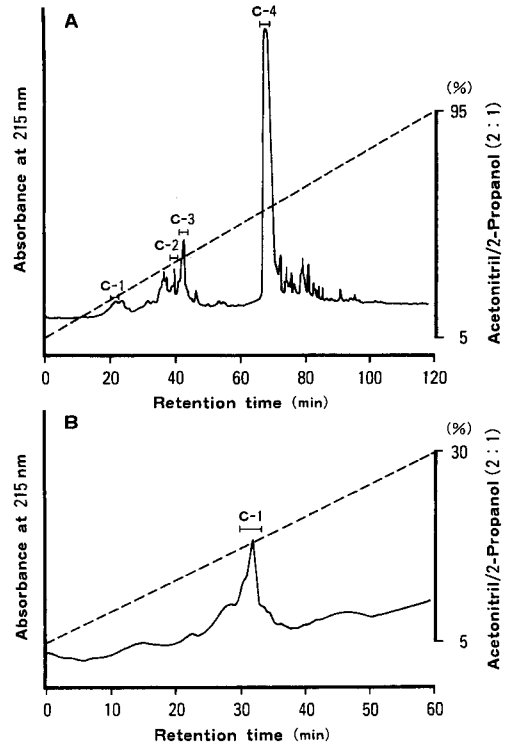


Fig. 5 Elution profiles of the cyanogen bromide peptides of the pyridylethylated P-1 on reverse phase high-performance liquid chromatography.

The pyridylethylated P-1 was cleaved by CNBr as described in Materials and Methods. The resultant peptides were applied to a C₁₈ (46×250 mm) column. Conditions were the same as for Fig. 4(A). C-2, C-3 and C-4 were collected to analyse amino acid sequence. C-1 was further purified by the same column with a linear gradient of 5 to 30% acetonitrile/2-propanol in 0.1% trifluoroacetic acid(B). The purified C-1 was collected to carry out amino acid sequence analysis and FAB-mass spectrometry.

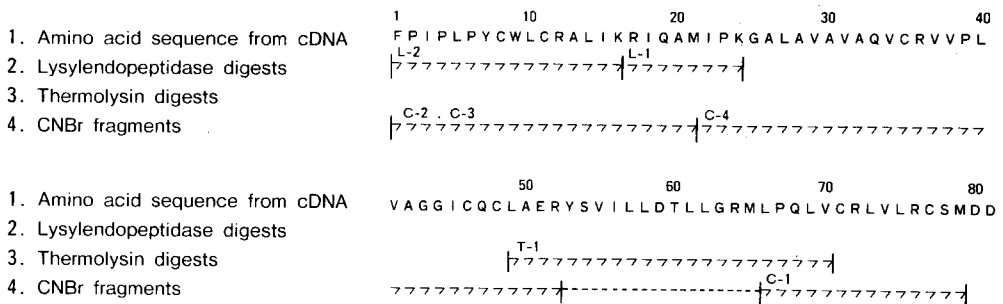


Fig. 6 Amino acid sequence of the peptides obtained by treatments with lysylendopeptidase, thermolysin and cyanogen bromide of the pyridylethylated P-1(SP-B).

酵素処理を行い、生じたペプチド断片を HPLC により分離した (Fig. 4 A). 保持時間 16 分に小さなピーク (L-1), 保持時間 40 分に大きなピーク (L-2) とその前後に 4 つの小ピークが認められた. L-1 断片は, SP-B の N 末端より 17 番目から 24 番目, L-2 断片は SP-B の N 末端より 1 番目から 16 番目までのペプチド断片と考えられた (Fig. 6). 25 番目以降のペプチド断片はカラムから溶出されなかった. 次にピリジリエチル化 SP-B をサーモリシンで酵素処理し, 生じたペプチド断片を HPLC により分離した (Fig. 4 B). 保持時間 24 分に大きなピーク (T-1) が認められた. T-1 以外のピークのアミノ酸シークエンスは分析できなかった. T-1 断片は, ヒト SP-B の cDNA から得られたアミノ酸配列¹⁴⁾ と対比すると, N 末端より 49 番目からのペプチド断片であり 70 番目まで判読することができた (Fig. 6). ピリジリエチル化 SP-B を CNBr 処理後, HPLC で分離すると比較的早く溶出される保持時間 21-22 分 (C-1), 40 分 (C-2), 及び 43 分 (C-3) の小さなピークと遅れて溶出される保持時間 70 分の大きなピーク (C-4) が得られた (Fig. 5 A). C-2 と C-3 は N 末端から 21 番目までのペプチド断片であり, C-4 は 22 番目からのペプチド断片及び未分解 SP-B の混合ピークで 53 番目まで判読可能であった (Fig. 6). C-1 は, アセトニトリル/2-プロパノール溶媒の濃度勾配を限定した HPLC でさらに精製 (Fig. 5 B) 後, アミノ酸シークエンス分析と質量分析を行った. C-1 は 66 番目から 79 番目 Met までのシークエンスが得られた (Fig. 6). C-1 の FAB-質量分析の結果は, LPQLVC* RLVLRCSHse (C* はピリジリエチル化システインを示す) の計算値: 1793.0 ($[M+H]^+$) に一致した.

3.3 肺組織における SP-B の存在形態

抗ヒト SP-B 抗血清を用いた Western blotting の結果 (Fig. 7), この抗体はヒト血清, SP-A, SP-C とは全く反応せず, SP-B とのみ反応した. このヒト SP-B 抗血清を用いて, 手術肺より得られた肺組織の MS および LB 画分の Western blotting を行った (Fig. 8). LB 画分は, 非還元条件下では分子量約 33,000, 26,000-28,000, 18,000 及び 18,000 から 24,000 の幅広いバンドを示す蛋白質が認識された. しかし還元条件下では主に分子量 8,000 の蛋白質が認識された. MS 画分は, 非還元条件下では分子量約 40,000-41,000, 24,000, 20,000 及び 18,000 の蛋白質が認められたが, 還元条件下では主に分子量約 40,000-41,000, 37,000, 25,000-26,000 及び 8,000 の蛋白質が認識された. 還元条件下で MS 画分において認められる分子量

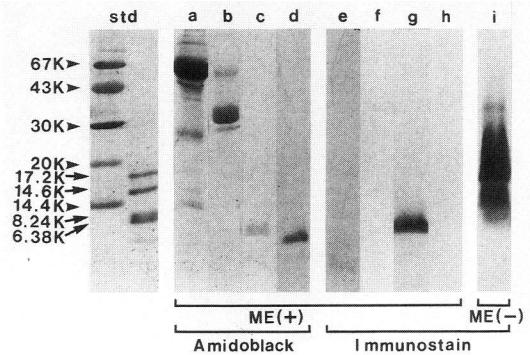


Fig. 7 Specificity of the human SP-B antisera.

Human serum, SP-A, SP-B and SP-C were subjected to SDS-PAGE under either reducing (lane a-h) or non-reducing (lane i) condition, transblotted to a nitrocellulose sheet, and stained with Amidoblack (lane a, b, c and d) or immunostained with human SP-B antisera (lane e, f, g, h and i).
lane a and e: human serum
lane b and f: human SP-A
lane c and g: human SP-B
lane d and h: human SP-C
lane i : human SP-B

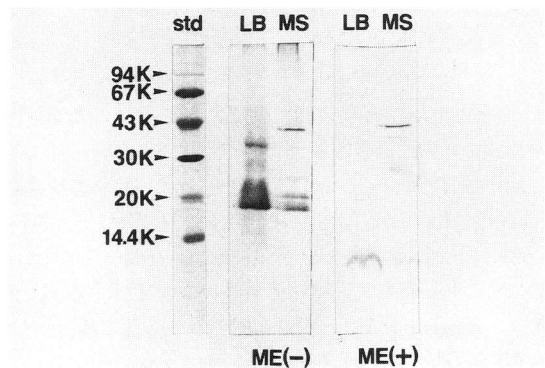


Fig. 8 Western blotting of proteins present in lamellar bodies and microsomes separated from human lung tissues using human SP-B antisera.

LB: lamellar bodies
MS: microsomes

40,000-41,000 の蛋白質は ProSP-B, 分子量 37,000, 25,000-26,000 の蛋白質は mature SP-B の前駆蛋白質^{17,18)}と考えられた.

3.4 ヒト肺組織における SP-B の局在-免疫組織学的検討

抗ヒト SP-B 抗血清を用いて, ヒト胎児肺及び成人肺の免疫組織学的検討を行った. 成人肺では, その大

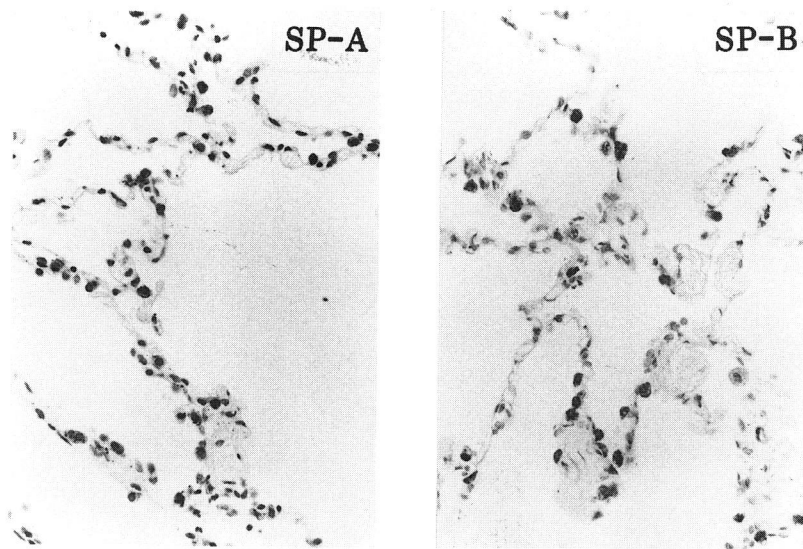


Fig. 9 Immunoperoxidase staining of sections of human adult lung.

Formalin-fixed human adult lung tissue was stained by the immunoperoxidase technique using a monoclonal antibody (PE 10) to human SP-A(SP-A) and antisera to human SP-B(SP-B). Magnification×200

きさ、肺胞壁における局在と分布状態から肺胞II型細胞と思われる細胞の細胞質が顆粒状に染色される像がみられ、SP-Aの肺組織における局在と区別はつかなかった(Fig. 9)。在胎20週までの胎児肺では、抗SP-B抗血清に対する陽性物質は認められなかったが、28週、34週、38週と在胎週数が進行するに伴い陽性反応を示す細胞が増加した(Fig. 10 A, B, C, D)。在胎週数の進行に伴う反応陽性物質の増加は、抗ヒトSP-A抗体を用いた際も認められた。しかし、在胎34週および38週の肺組織の両抗体による染色像を比較すると、抗SP-A抗体による陽性物質は肺胞腔内と肺胞表面に多く認めるのに対し、抗SP-B抗体の場合は肺胞II型細胞を主として染色し、肺胞腔内の反応は極めて弱いという明かな違いが認められ、胎児肺においてSP-AとSP-Bに局在の違いのあることが判明した。

4 考 察

4.1 SP-Bの分子サイズと構造

第2染色体に局在するSP-B遺伝子からの初期翻訳産物は、ヒトでは381個¹⁴⁾、ラットでは376個¹⁶⁾のアミノ酸残基数からなる蛋白質である。この初期翻訳蛋白質のN末端側から16個のアミノ酸残基の疎水性領域が除去されて、ProSP-Bとなり、これがさらに酵素分解を受けてヒト、ラットともに初期翻訳蛋白質の201番目のアミノ酸(ヒトではPhe, ラットではLeu)をN

末端とする分子サイズ7-8 kDaのmatureSP-Bが形成される。Curstedt *et al.*⁸⁾は、ブタmatureSP-Bの構造を蛋白質化学的手法で解析し、CNBr処理とペプシン処理で得られた断片ペプチドのC末端アミノ酸配列は一致したので、ブタSP-Bの分子サイズはアミノ酸残基79個と報告した。ヒト^{14,15)}、ラット¹⁶⁾、イヌ⁷⁾SP-BのcDNAが分離され、その一次構造は示されたが、matureSP-Bの分子サイズは、ブタにおけるアミノ酸残基79個が示されたのみである。当教室の水本、足立¹⁹⁾は、肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液から分離した6 kDa疎水性アポ蛋白質(SP-6)の構造を検討し、ヒトSP-Bのアミノ酸残基数は57個であろうとしたが、患者肺胞腔中で長期間滞留中に分解が進行したことも考えられ、本研究で再検討を行った。その結果、同じく肺胞蛋白症患者気管支肺胞洗浄液から分離したSP-BのCNBr処理で得られたC末端側断片C-1のシークエンス分析及びFAB-質量分析から、79番目Met(Met-79)までの配列を同定し得た。しかし、CNBr処理でMet-79のC末端側が切断されるので、80番目以降にペプチドが存在するのか、このMet-79がC末端であるのかは不明である。すなわち、肺胞蛋白症患者の肺胞に存在するSP-Bは、少なくともアミノ酸残基79個をもつことがわかった。

電気泳動上SP-Bは、還元条件では分子量8,000のバンドを示すが、非還元条件では分子量18,000、

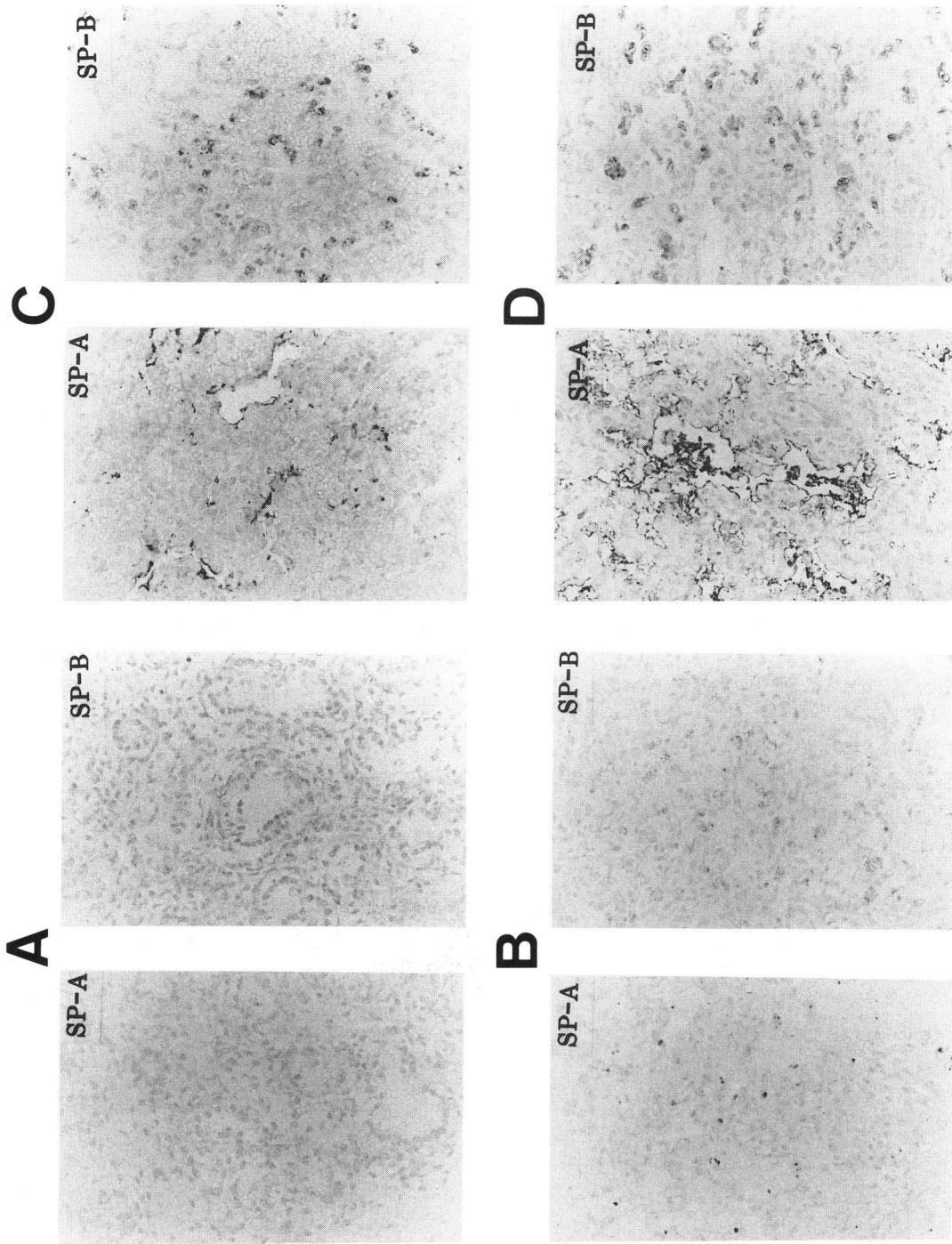


Fig. 10 Immunoperoxidase staining of sections of human fetal lungs. Formalin-fixed human fetal lungs at the gestations of 20(A), 28(B), 34(C) and 38(D) weeks were stained as described in Fig. 9. Magnification $\times 170$

14,000, 12,000 に相当するバンドを示した。ヒト SP-B のアミノ酸残基数を 79 個とすると、その中に 7 個の Cys 残基を持つ。本研究では、Cys 残基の SH 基をピリジリウムエチル化し、7 個の Cys 残基を同定し得た。SP-B の cDNA 解析によると、調べられた全ての動物種で 7 個の Cys の配置は同じく保持されており^{3,32)}、mature SP-B 構造の特徴の一つとなっている。Curstedt *et al.*³³⁾ は、SP-C の隣り合った 2 個の Cys 残基にはパルミチン酸を主とする脂肪酸がチオエステル結合しているが、SP-B の Cys 残基にはそのような構造修飾はないことを示した。すなわち、SP-B の Cys 残基は分子間あるいは分子内ジスルフィド結合を形成し、多量体を形成していると思われる。最近 Benson³⁴⁾ は、SP-B には 3 つの分子内ジスルフィド結合、つまり Cys-8 と Cys-77, Cys-11 と Cys-71 及び Cys-35 と Cys-46 があり、Cys-48 は分子間ジスルフィド結合に関与し、二量体を形成することを示唆している。

mature SP-B 構造の特徴として、疎水性が極めて高いこと、Cys 残基が多いことに加えて、Gly-43 と Arg-52 の間における proteinase inhibitor の活性部位との相同性が指摘されている¹⁹⁾。しかし、現在、mature SP-B 及び ProSP-B が、抗 proteinase 活性をもつことを示す直接の証拠はない。

抗ヒト SP-B 抗体は、SP-B 単独投与では作製されず、卵黄 PC と混合して投与し、初めて作製できた。つまり SP-B は、リボソームと共存した時、抗原性を獲得する高次構造をとると考えられる。ヒト SP-B アミノ酸配列の疎水性分析では、分子の大部分が疎水性領域にあり、Arg-12 から Lys-16, Gly-63 から Pro-67 の僅かな部分に親水性領域が限局している³⁵⁾。SP-B と脂質が共存する条件では、SP-B の大部分がリボソーム中へ入り込み、僅かな親水性領域がリボソーム表面に出現すると推定される。本研究で作製した抗ヒト SP-B 抗体は、この親水性領域を認識していると考えられる。

4・2 SP-B の細胞内代謝と局在

分子量約 40,000 の ProSP-B は、N 末端側から約 200 個のアミノ酸残基及び C 末端側から約 100 個のアミノ酸残基が切断され、分子量 7,000-8,000 の mature SP-B になることが示されてきた³⁾ が、ProSP-B から mature SP-B への酵素的分解過程は明かではない。本研究で、ヒト肺組織の MS 画分に、抗ヒト SP-B 抗体が認識する 40-41 kDa 蛋白質の存在が示された。しかし LB 画分に、40-41 kDa 蛋白質は認められず、主たる抗体反応蛋白質は 8 kDa 蛋白質であった。この 8 kDa 蛋白質は、気管支肺泡洗浄液から分離した、つまり肺

胞腔に分泌された SP-B と同一の蛋白質であろう。また、MS 画分に認められた 25-26 kDa 蛋白質は、Weaver and Whitsett¹⁸⁾、Weaver *et al.*³⁶⁾ がラット肺胞 II 型細胞及びヒト胎児肺組織の培養液中に検出した分子量 25,000 の中間体と同じ蛋白質と思われる。本研究の結果、肺胞 II 型細胞において SP-B 遺伝子から合成される ProSP-B はミクロソームにあり、25-26 kDa の中間体をへて mature SP-B となってラメラ封入体へ運搬されると考えられる。

本研究では、抗ヒト SP-B 抗体を用いヒト肺組織内の SP-B の局在を免疫組織学的に検討した。成人肺組織では、肺胞 II 型細胞と思われる細胞の細胞質が顆粒状に染色され、SP-A の局在との著明な違いは認められなかった。Phelps *et al.*³⁷⁾、Kogishi *et al.*³⁸⁾ 及び Katyal *et al.*³⁹⁾ も SP-B と SP-A の肺組織内の局在は同じであると報告している。一方、*in situ hybridization* の結果、SP-A mRNA は肺胞 II 型細胞に局在するが、SP-B 合成は肺胞 II 型細胞と Clara 細胞で行われる⁴⁰⁾ ことが示されている。しかし、本研究におけるヒト胎児肺を用いた検討では、SP-A と SP-B の明かな局在の違いが認められた。在胎週数の進行とともに、両抗体で免疫染色される細胞は増加した。しかし、抗 SP-A 抗体では肺胞腔内で染色される物質が主体であって、細胞の染色は著明でないのに対し、抗 SP-B 抗体では主として肺胞 II 型細胞が染色され、肺胞腔内の染色物質は殆ど認めなかった。すなわち胎児肺では、SP-A は肺胞腔へ積極的に分泌されており、胎生期の進行と共に羊水中への出現が増加する^{41,42)} ことが確認されている。しかし、SP-B は細胞内にとどまり、積極的に肺胞腔へは分泌されないか、あるいは分泌されても turn over が極めて速いため肺胞腔には蓄積しないかのいずれかであろう。一方、SP-B の mRNA は SP-A の mRNA よりも胎生期のより早期に出現することが示されている³⁾。SP-B mRNA から ProSP-B の生成は早期に起こるが、mature SP-B への酵素分解は遅れるのかもしれない。肺胞腔に存在する肺サーファクタントの主たる蛋白質は SP-A であるが、最近ラメラ封入体の主たる蛋白質は SP-B と SP-C で、SP-A はラメラ封入体の構成蛋白質ではあるが、主たる蛋白質ではないことが報告された⁴³⁾。肺胞腔の SP-A は、ラメラ封入体の分泌による経路以外に他の経路によってももたらされることが示唆されており^{44,45)}、胎児肺の肺胞腔内に認められる SP-A は、ラメラ封入体以外の経路から分泌されている可能性も考えられる。胎生期肺で認められた SP-A と SP-B の局在の違いは、肺胞 II 型細胞あるいはそ

の起源となる細胞における両蛋白質の代謝の違いを反映していると考えられ、そのメカニズムの解明が今後の課題として提起された。

5 結 論

肺サーファクタント蛋白質のうち、疎水性の極めて高い SP-B を肺泡蛋白症患者の気管支肺泡洗浄液の脂質抽出液から分離し、その構造と分子サイズ及び抗ヒト SP-B 抗体を用いて SP-B の肺組織内の局在と代謝を検討した。

1. ヒト SP-B のリジルエンドペプチダーゼ、サーモリシン及び CNBr 処理で得られたペプチド断片のアミノ酸配列は、ヒト SP-B の cDNA 解析から求められたアミノ酸配列と一致した。CNBr 処理で得られた C 末端断片ペプチドの解析から、SP-B の分子サイズは、少なくとも 79 番目 Met までは存在することを示した。
2. 抗ヒト SP-B 抗体による Western blotting の結果、ヒト肺組織のミクロソームには ProSP-B(40-41 kDa 蛋白質)と中間体の 25-26 kDa 蛋白質があるが、ラメラ封入体では SP-B(8 kDa 蛋白質)が主で、Pro SP-B は認めなかった。
3. 免疫組織学的検討の結果、ヒト成人肺で SP-B と SP-A の局在の違いは認めなかったが、胎生期肺では、SP-A は主として肺胞腔に存在するのに対し、SP-B は肺胞腔には殆ど認めず肺泡 II 型細胞に存在し、両蛋白質の局在の違いが認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った、本学生化学第 1 講座秋野豊明教授、同内科学第 3 講座鈴木明教授ならびに同付属病院病理部森道夫教授に深謝いたします。また、FAB-質量分析に御協力いただいた大阪大学蛋白質研究所高尾敏文博士に感謝申し上げます。さらに、本研究の遂行に御協力いただいた、本学生化学第 1 講座教職員各位に感謝致します。

文 献

1. Fisher, A. E. and Chander, A.: Introduction: Lung surfactant-phospholipids and apoproteins. **Exp. Lung Res.** **6**, 171-174 (1984).
2. Possmayer, F.: A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. **Am. Rev. Respir. Dis.** **138**, 990-998 (1988).
3. Hawgood, S.: Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. **Am. J. Physiol.** **257**, L13-L22 (1989).
4. Benson, B., Hawgood, S., Schilling, J., Clements, J. A., Damm, D., Cordell, B. and White, R. T.: Structure of canine pulmonary surfactant apoprotein: cDNA and complete amino acid sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 6379-6383 (1985).
5. Haagsman, H. P., White, R. T., Schilling, J., Benson, B. J., Golden, J., Hawgood, S. and Clements, J. A.: Studies of the structure of the lung surfactant protein, SP-A. **Am. J. Physiol.** **257**, L421-L429 (1989).
6. Persson, A., Rust, K., Chang, D., Moxley, M., Longmore, W. and Crouch, E.: CP4: Pneumocyte-derived collagenous surfactant-associated proteins. **Biochemistry** **27**, 8576-8584 (1988).
7. Hawgood, S., Benson, B. J., Schilling, J., Damm, D., Clements, J. A. and White, R. T.: Nucleotide and amino acid sequence of pulmonary surfactant protein SP18 and evidence for cooperation between SP18 and SP28-36 in surfactant lipid adsorption. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**, 66-70 (1987).
8. Curstedt, T., Johansson, J., Barros-Söderling, J., Robertson, B., Nilsson, G., Westberg, M. and Jörnvall, H.: Low-molecular weight surfactant protein type I. The primary structure of a hydrophobic 8kDa polypeptide with 8 half-cysteine residues. **Eur. J. Biochem.** **172**, 521-525 (1988).
9. Johansson, J., Curstedt, T., Robertson, B. and Jörnvall, H.: Size and structure of the hydrophobic low molecular weight surfactant-associated polypeptide. **Biochemistry** **27**, 3544-3547 (1988).
10. Johansson, J., Jörnvall, H., Eklund, A., Christensen, N., Robertson, B. and Curstedt, T.: Hydrophobic 3.7 kDa surfactant polypeptide: Structural characterization of the human and bovine forms. **FEBS Lett.** **232**, 61-64 (1988).
11. Yu, S. H. and Possmayer, F.: Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. **Biochem. J.** **236**, 85-89 (1986).
12. Takahashi, A. and Fujiwara, T.: Proteolipid in bovine lung surfactant: Its role in surfactant function. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **135**, 527-532 (1986).
13. Whitsett, J. A., Ohning, B. L., Meuth, J., Ross, G., Meuth, J., Weaver, T., Holm, B. A., Shapiro, D. L. and Notter, R. H.: Hydrophobic sur-

- factant-associated protein in whole lung and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. **Pediatr. Res.** **20**, 460-467 (1986).
14. Jacobs, K. A., Phelps, D. S., Steinbrink, R., Fisch, J., Kriz, R., Mitscock, L., Dougherty, J. P., Taesch, H. W. and Floros, J.: Isolation of a cDNA clone encoding a high molecular weight precursor to a 6-kDa pulmonary surfactant-associated protein. **J. Biol. Chem.** **262**, 9808-9811 (1987).
 15. Glasser, S. W., Korfhagen, T. R., Weaver, T., Pilot-Matias, T., Fox, J. L. and Whitsett, J. A.: cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL (Phe). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**, 4007-4011 (1987).
 16. Emrie, P. A., Shannon, J. M., Mason, R. J. and Fisher, J. H.: cDNA and deduced amino acid sequence for the rat hydrophobic pulmonary surfactant-associated protein, SP-B. **Biochim. Biophys. Acta** **994**, 215-221 (1989).
 17. O'Reilly, M. A., Weaver, T. E., Pilot-Matias, T. J., Sarin, V. K., Gazdar, A. F. and Whitsett, J. A.: In vitro translation, post-translational processing and secretion of pulmonary surfactant protein B precursors.: **Biochim. Biophys. Acta** **1011**, 140-148 (1989).
 18. Weaver, T. E. and Whitsett, J. A.: Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells. **Am. J. Physiol.** **257**, L100-L108 (1989).
 19. 水本雅彦, 足立英明: 疎水性 6 kDa ヒト肺サーファクタント・アポ蛋白質 (SP 6) の一次構造. **札幌医誌** **56**, 731-742 (1987).
 20. Frosolono, M. F., Charms, B. L., Pawlowski, R. and Silvka, S.: Isolation, characterization, and surface chemistry of a surface-active fraction from dog lung. **J. Lipid Res.** **11**, 439-457 (1970).
 21. Jobe, A. H.: The labelling and biological half life of phosphatidylcholine in subcellular fractions of rabbit lung. **Biochim. Biophys. Acta** **489**, 440-453 (1977).
 22. Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** **37**, 911-917 (1959).
 23. Kuroki, Y., Mason, R. J. and Voelker, D. R.: Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**, 5566-5577 (1988).
 24. Hermodson, M. A., Ericsson, L. H., Neurath, H. and Walsh, K. A.: Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator analysis. **Biochemistry** **12**, 3146-3153 (1973).
 25. Sigel, M. B., Sinha, Y. N. and VanderLaan, W. P.: Production of antibodies by inoculation into lymph nodes. **Methods Enzymol.** **93**, 3-12 (1983).
 26. Engvall, E.: Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. **Methods Enzymol.** **70**, 419-439 (1982).
 27. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature** **227**, 680-685 (1970).
 28. Swank, R. T. and Munkres, K. D.: Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. **Anal. Biochem.** **39**, 462-477 (1971).
 29. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets.: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**, 4350-4354 (1979).
 30. Bartlett, G. H.: Phosphorus assay in column chromatography. **J. Biol. Chem.** **234**, 466-468 (1959).
 31. Lees, M. B. and Paxman, S.: Modification of the Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. **Anal. Biochem.** **47**, 184-192 (1972).
 32. Hawgood, S.: Structures and properties of the surfactant-associated proteins. **Annu. Rev. Physiol.** **53**, 375-394 (1991).
 33. Curstedt, T., Johansson, J., Persson, P., Eklund, A., Robertson, B., Löwenadler, B. and Jörnvall, H.: Hydrophobic surfactant-associated polypeptides: SP-C is a lipopeptide with two palmitoylated cysteine residues, whereas SP-B lacks covalently linked fatty acyl groups. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **87**, 2985-2989 (1990).
 34. Benson, B.: Building a better surfactant. In: Symposium of Regulatory and Functional Aspects of Pulmonary Surfactant Proteins. 1991 ALA/ATS International Conference. May 14, Anaheim, USA.
 35. 黒木由夫, 白鳥正典, 秋野豊明: 肺胞II細胞とサーファクタントアポ蛋白質. **代謝** **27**, 797-809 (1990).
 36. Weaver, T. E., Sarin, V. K., Sawtell, N., Hull, W. M. and Whitsett, J. A.: Identification of surfactant proteolipid SP-B in human surfactant and fetal lung. **J. Appl. Physiol.** **65**, 982-987 (1988).
 37. Phelps, D. S. and Heather, H. P.: Immunohistochemical localization of a low molecular weight

- surfactant-associated protein in human lung. **J. Histochem. Cytochem.** **35**, 1339-1342 (1987).
38. Kogishi, K., Kurozumi, M., Fujita, Y., Maruyama, T., Kuze, F. and Suzuki, Y.: Isolation and partial characterization of human low molecular weight protein associated with pulmonary surfactant. **Am. Rev. Respir. Dis.** **137**, 1426-1431 (1988).
39. Katyal, S. L., Singh, G., Ryan, L. and Gottron, S.: Hydrophobic surfactant-associated proteins: Electrophoretic and immunologic analyses and cellular localization in human lung. **Exp. Lung Res.** **14**, 655-669 (1988).
40. Phelps, D. S. and Floros, J.: Localization of surfactant protein synthesis by in situ hybridization. **Am. Rev. Respir. Dis.** **137**, 939-942 (1988).
41. Kuroki, Y., Takahashi, H., Fukada, Y., Mikawa, M., Inagawa, A., Fujimoto, S. and Akino, T.: Two-site 'simultaneous' immunoassay with monoclonal antibodies for the determination of surfactant apoproteins in human amniotic fluid. **Pediatr. Res.** **19**, 1017-1020 (1985).
42. Hallmann, M., Arjoma, P., Mizumoto, M. and Akino, T.: Surfactant proteins in the diagnosis of fetal lung maturity. I. Predictive accuracy of the 35kDa protein, the lecithin/sphingomyelin ratio and phosphatidylglycerol. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **158**, 531-535 (1988).
43. Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., van Eijk, M., van Buel, B. L. M., van Golde, L. M. G. and Haagsman, H. P.: Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung. **Biochem. J.** **274**, 115-119 (1991).
44. Akino, T., Takahashi, H., Kuroki, Y. and Dempo, K.: Intracellular localization of surfactant-associated 35-kilodalton glycoproteins in human alveolar type II cells. In Basic Reserch on Lung Surfactant. **Prog. Respir. Res.** **25**, 24-28 (1990).
45. Nicholas, T. E., Power, J. H. T. and Barr, H. A.: 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.** **3**, 251-258 (1990).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌区科大学内科学第3講座 片岡賢治