

学位論文題名

フィブリン形成による肺サーファクタント  
の喪失に関する研究

—肺サーファクタントの不活性化の機序とその重要性について—

学位論文内容の要旨

肺サーファクタントは種々の病態において、肺胞腔へ漏出した血漿蛋白特にフィブリノーゲン (fbg) とその代謝産物により不活性化されることが知られている。この不活性化には2つの機序が報告されている。すなわち、血漿蛋白による活性阻害とフィブリン (fbn) 網への取り込みによる肺サーファクタントの喪失である。しかし後者の機序の生理学的意義に関してはいまだ結論は得られていない。したがって本研究の目的は、*in vitro* の肺胞モデルを用いて後者の機序の生理学的意義ならびに上記の2つの機序の相対的重要性を明らかにすることである。

材料と方法

1) 肺サーファクタント-フィブリノーゲン混合液の作成およびフィブリン形成  
本研究では肺サーファクタントとして surfactant-TA (S-TA、東京田辺) を用いた。S-TA は88%のリン脂質、11%の中性脂質および1%の疎水性蛋白 (SP-B, C) より構成されている。

人 fbg (ミドリ十字) を0.05 M の Tris buffered saline (TBS)、pH 7.4 に溶解し、4、1、 $2^{-2}$ 、 $2^{-3}$ 、 $2^{-4}$ 、 $2^{-5}$ 、0 mg/ml の7種類の濃度に希釈した。S-TA は TBS を加えリン脂質として2.5 mg/ml の濃度になるように調整した。2.5 mg/ml の S-TA 懸濁液 2 ml に上記の各濃度の fbg 溶液 2 ml を加え十分に混合し、S-TA 1.25 mg/ml に対し fbg 2、 $2^{-1}$ 、 $2^{-3}$ 、 $2^{-4}$ 、 $2^{-5}$ 、 $2^{-6}$ 、0 mg/ml の濃度の混合液とした。各混合液 4 ml のうち 2 ml を conical tube に取り、Ca 濃度が 0.4 mg/ml となるように  $\text{CaCl}_2$  を加えた後、牛トロンビン (持田

製薬)を2.5 unit/ml となるように加え fbn を形成させた。polyethylene telephthalate フィルターを通して fbn 塊除去後の溶液を採取し、fbn 形成後の検体とした。また残りの2 ml の S-TA-fbg 混合液を fbn 形成前の検体として用いた。

肺サーファクタントの取り込みに関しては、牛の天然肺サーファクタントおよび dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC、Sigma) についても同様の操作を行い検討した。

## 2) 表面活性の測定

表面活性の測定には Enhorning の pulsating bubble surfactometer を用いた。S-TA-fbg 混合液における fbn 形成前後の検体の表面吸着速度(気泡形成後10秒の表面張力)、pulsation 開始後5サイクル目と10分後の最大表面張力および最小表面張力を測定した。

## 3) リン脂質の測定

S-TA、DPPC には無機リンは全く含まれず、fbg 中にも極微量しか含まれていないので、リン脂質の測定は検体中の総リン量を測定することによって行った。天然肺サーファクタントでは無機リンが存在しているために、クロロホルム-メタノール(2:1, v/v)でリン脂質を抽出後総リン量を測定した。リンの測定は Bartllet の方法に従った。

## 4) SP-B,C の測定

SP-B,C の測定は Chida らの方法に従い competitive enzyme-linked immunosolvent assay により行った。一次抗体としては S-TA を日本白色家兎に免疫して作成された抗 SP-B,C 血清を用い、二次抗体は ペルオキシダーゼ 標識抗ウサギ IgG (Bio-Rad) を使用した。Lowry 法により蛋白量を測定した S-TA を SP-B,C のスタンダードとした。

## 5) 電顕的観察

S-TA-fbg 混合液から作成した fbn 塊を走査型電子顕微鏡で観察した。

## 6) 統計処理

各検体間の検定には Student あるいは Welch の t-test を用いた。また fbn 形成前後の検体の比較には paired t-test を用いた。危険率が0.05未満を有意とした。

## 結果

### 1) 表面活性

fbg を加えない検体を対照とした場合、fbn 形成前と後の両方の検体とも fbg が  $2^{-5}$  mg/ml 以上の濃度において有意に表面吸着速度の遅れがみられた。fbn 形成前と後との比較では、 $2^{-3}$  mg/ml 以上の fbg 濃度において、fbn 形成後の方が有意に表面吸着速度が遅かった。

最小表面張力に対する fbg の影響は、5 サイクル目では fbg の量に比例して高値を示した。対照との比較では、 $2^{-4}$  mg/ml 以上の fbg 濃度で有意差を認めた。しかしこの fbg の最小表面張力に対する阻害作用は pulsation するに従い低下し、10 分後にはすべての fbg 濃度で 10 mN/m 以下となり、その阻害作用は失われた。一方、fbn 形成後の検体における 5 サイクル目の最小表面張力は  $2^{-3}$  mg/ml 以上の fbg 濃度で対照より高値を示し、10 分後においても高値のままであった。fbn 形成前と後との比較では、5 サイクル目において、 $2^{-3}$  mg/ml 以上の fbg 濃度で fbn 形成後の方が有意に高かった。この差は 10 分後ではさらに著明となった。

最大表面張力は fbn 形成前の検体において、5 サイクル目、10 分後ともに 2 mg/ml の fbg 濃度で対照との差を認めた。fbn 形成後の検体の 5 サイクル目の最大表面張力は  $2^{-3}$  mg/ml 以上の fbg 濃度において対照に比し明らかに高値をしめし、10 分後では  $2^{-2}$ 、 $2^{-1}$ 、 $2^{-4}$  mg/ml において有意差を認めた。fbn 形成前と後との比較では、5 サイクル目において  $2^{-3}$  mg/ml 以上の fbg 濃度で fbn 形成後の方が高値を示し、10 分後では  $2^{-2}$ 、 $2^{-1}$ 、 $2^{-4}$  mg/ml で有意差を認めた。

### 2) 肺サーファクタントの喪失

$2^{-3}$  mg/ml 以上の fbg と 1.25 mg/ml の S-TA の混合液で fbn を形成させた場合、約 90% のリン脂質の喪失が認められた。 $2^{-3}$  mg/ml 以下の fbg 濃度ではリン脂質の喪失率は fbg の濃度に依存していた。一方、SP-B, C の喪失率は fbg の各濃度においてリン脂質の喪失率にほぼ一致していた。同様の喪失は天然肺サーファクタントと DPPC においても認められた。

### 3) フィブリン形成による肺サーファクタントの取り込み能

S-TA を TBS に懸濁し、80、40、20、10、5、2.5 mg/ml の 6 段階に希釈した。 $2^{-2}$ 、4 mg/ml の 2 種類の fbg 溶液 2 ml に各濃度の S-TA 2 ml を加

え、fbg  $2^{-3}$ および 2 mg/ml に対して S-TA 40、20、10、5、2.5、1.25 mg/ml の濃度になるように混合液を作成した。材料と方法の1)に記した方法に従い fbn 形成前と後の検体を得た。

$2^{-3}$ mg/ml の fbg と各濃度の S-TA との混合液で fbn 形成を惹起させた場合、S-TA の濃度を 5 mg/ml まで上昇させてもリン脂質、SP-B,C とともに90%の喪失を認め、10 mg/ml では60~70%の喪失率となった。2 mg/ml の fbg と各濃度の S-TA の混合液における検討では、40 mg/ml の S-TA の濃度までリン脂質および SP-B,C のほぼ90%が喪失した。

#### 4) 電顕像

走査型電顕では、S-TA が微小な particle として多数 fbn 網に取り込まれている像を認めた。

### 結論

1) フィブリノーゲンがフィブリンへ変換される過程において、肺サーファクタントのリン脂質ならびに SP-B,C の約90%がフィブリン網へ取り込まれることが明らかとなった。

2) 肺サーファクタントの表面活性は、血漿蛋白による活性阻害作用よりもフィブリン網への取り込みによる肺サーファクタントの喪失によってはるかに強い影響を受けるものと考えられた。また、その影響は前者が可逆的であるのに対し、後者は不可逆的であることが明確に示された。

3) 呼吸窮迫症候群、肺炎、出血性肺浮腫など肺胞上皮細胞の透過性が亢進する病態では、肺胞腔へ漏出したフィブリノーゲンがフィブリン網を形成する過程において肺サーファクタントを取り込み、肺胞被覆層の破壊ならびに肺胞腔内サーファクタントの reservoir の喪失をきたすことが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三  
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎  
副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

## フィブリン形成による肺サーファクタント の喪失に関する研究

—肺サーファクタントの不活性化の機序とその重要性について—

肺サーファクタントは肺胞腔へ漏出した血漿蛋白特にフィブリノーゲンとその代謝産物により不活性化される。この不活性化の機序には血漿蛋白による表面活性阻害とフィブリン網への取り込みによる肺サーファクタントの喪失の2つが知られている。しかし後者の機序に関してはいまだに結論が得られていないので、著者はこの機序の生理学的意義と同時に上記2つの機序のいずれが相対的に重要性が高いかを *in vitro* の肺胞モデルを用いて解明する目的で本研究を行った。

Surfactant-TA に種々の濃度のフィブリノーゲン溶液を加え、これらの混合液を2つに分け、一方にCaCl<sub>2</sub>とトロンピンを加えフィブリンを形成させる実験系を用いた。上記混合液のフィブリン形成前後における表面活性の測定はpulsating bubble surfactometerを用いて測定された。またこれらの検体中の総リン脂質ならびにサーファクタント関連蛋白 SP-B,C の濃度を測定した。

Surfactant-TA—フィブリノーゲン混合液において、フィブリノーゲン濃度が2<sup>-5</sup>mg/mlを越えると surfactant-TA の表面吸着速度の遅れおよび最小表面張力の上昇が認められた。この surfactant-TA に対するフィブリノーゲンの表面活性阻害作用は pulsation 開始後10分には完全に消失した。一方、表面吸着速度の遅れおよび最小表面張力の上昇はフィブリン形成後の検体でも認められ、しかもその影響はフィブリン形成前に比してフィブリノーゲンが2<sup>-3</sup>mg/ml 以上の濃度で有意に大きかった。また最小表面張力は pulsation 開始10分後においても高値のままであった。フィブリン形成による肺サーファクタントの取り込みに関する検討では、2<sup>-3</sup>mg/ml 以上のフィブリノーゲンがフィブリンに変換されると、リン脂質、SP-B,C ともその90%以上がフィブリン塊に取り込まれた。種々の濃度のsurfactant-TA に2mg/ml となるようにフィブリノーゲンを加えた混合液でフ

ィブリンを惹起させた場合、surfactant-TA の濃度を40mg/ml まで上昇させても surfactant-TAの90%がフィブリン塊に取り込まれた。このことはフィブリノーゲンがフィブリン塊を形成する過程において極めて大量の肺サーファクタントを取り込む能力を有することを示している。またこのフィブリン塊の走査型電顕像で、surfactant-TA が particle として多数フィブリン網に取り込まれている所見が得られた。

今回のこの研究によって、肺サーファクタントの表面活性は、フィブリノーゲンによる活性阻害作用よりもフィブリン網への取り込みによる肺サーファクタントの喪失によってはるかに強い影響を受けることが明らかとなった。しかも前者が可逆的であるのに対し後者は不可逆的であることも明確にされた。さらに重要なことはリン脂質のみならず肺サーファクタントの機能に必要不可欠な蛋白である SB-B,C の90%がフィブリン網に取り込まれたことであり、この結果として肺サーファクタントの表面活性がフィブリン形成後にほぼ完全に失われるものと考えられた。今回の研究の結果は、肺胞腔へ漏出したフィブリノーゲンはフィブリンへ変換される過程において肺胞被覆層の破壊ならびに肺胞腔内サーファクタント reservoirの喪失をきたすことを示唆しており、肺の透過性が亢進する疾患における呼吸不全の病態解明に極めて重要な見解を供するものであり、この結果は学位に値するものと考えられた。副査の小林、藤本両教授からはそれぞれ日を改めて個別に審査が行われたが、いずれも的確な答えが得られたと判断され、合格と判定された。