

低コストの脂質混合系及び

脂質—ペプチド混合系肺サーファクタントの開発

中村 幸弘¹⁾, 雪竹 浩²⁾, 李 相男³⁾

(平成20年8月4日受理)

Development of Low Cost Pulmonary Surfactant
Composed of a Mixture of Lipids or Lipids-PeptideYoshihiro NAKAMURA¹⁾, Ko YUKITAKE²⁾, and Sannamu LEE^{3)*}

(Received August 4, 2008)

Abstract

We attempted to develop artificial synthetic pulmonary surfactants (PS) that are much cheaper than natural source surfactants and have no infections. We employed very low cost lipids, octadecanol, egg yolk phosphatidylcholine (PC) and soybean lecithin. As peptides instead of lung surfactant proteins, a de novo-designed amphiphilic α -helical peptide, Hel 13-5, and its analogs containing D-amino acids were used. Monolayer experiments using a modified Langmuir-Whelmy surface balance and the recovery experiments using the lung-washed rats showed that a peptide-lipids mixture system has higher activity than a modified natural PS from bovine.

1 はじめに

肺胞細胞より生成分泌される肺サーファクタントは、肺胞の表面張力を低下させることにより肺機能をつかさどる生命維持に必須の脂質—タンパク質複合体である。肺の急性疾患として死亡率が高い新生児呼吸窮迫症候群 (RDS)、また重篤な呼吸障害をきたす急性呼吸窮迫症候

群 (ARDS) の治療薬として、牛肺から抽出された肺サーファクタント成分を人工的に調製した人工肺サーファクタント Surfacten が使用されている (1)。現在、その必要性は、RDS や ARDS 疾患への適用という側面のみならず、肺炎などの炎症性肺疾患、また、近年死亡率が急速に上昇している肺ガン等による重篤な末期症状の緩和からも増している。さらに、気管支で

¹⁾ 室町ケミカル株式会社企画課
Muromachi Chemical Co. LTD, 1-38-5 shinkattachi, Ohmuta, Fukuoka 836-0895, Japan

²⁾ 雪竹医院理事長 (元福岡大学病院総合周産期母子医療センター)
Yukitake Clinic, 1265-2 Soeda, Tagawa, Fukuoka 824-0602, Japan

³⁾ 福岡大学理学部化学科
Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

* Corresponding author (E-mail: leesan@cis.fukuoka-u.ac.jp)

の肺サーファクタント物質の分泌も知られており、それらが去痰的役割をしているとも言われている。肺サーファクタントの吸入によって、喘息発作が軽減する(2)など、呼吸障害の改善を必要とする多くの疾病に対する有用性が期待されている。

2 人工肺サーファクタントの必要性

新生児医療の領域において、小児が出生時に肺サーファクタントを充分作り出すことができない疾病がある。在胎34週頃より出生した未熟児では肺サーファクタント生成が十分でないためにRDSを発症する。RDSは死亡率が高く、また幸いその急性期を乗り切った場合も多くの後遺症を残す。1979年藤原らは、人工調製肺サーファクタントのヒトRDSに対する劇的な効果を報告、1987年にはSurfactenとして、世界で初めてRDS治療薬として完成させた(3)。Surfactenは、牛肺から抽出され調製されているが、その成分は、リン脂質(88%)、中性脂質(11%)、タンパク質(1%)からなる。

一方、肺サーファクタントが存在してもその機能が阻害される代表的疾患として、前述のARDSがある。これは色々な基礎疾患により肺胞に浮腫やサーファクタント活性阻害物質が出現することにより肺機能が低下し、重篤な呼吸障害をきたす疾患で、その発症は10万人あたり15から20人と報告されている。急性期の治療に用いた人工換気、酸素による肺損傷のため、基礎疾患が治療できたにもかかわらず不幸な転帰を取る場合も多く、その死亡率は50%前後と極めて高い。ARDS早期に人工肺サーファクタントを大量(400mg/kg)投与し肺機能を改善させ肺損傷を最小に抑える治療法は、対象群の死亡率を43.8%から18.8%にまで低下させると報告されているが、同時に人工肺サーファクタントの\$712/200mgという高価さも問題点として指摘されている(4)。

また多くの呼吸器疾患で肺サーファクタント活性が阻害されていることが報告されており、その重症例での人工肺サーファクタントの効果も確認されている。その必要性は、RDSやARDS疾患への適用という側面のみならず、

肺炎などの炎症性肺疾患また近年死亡率が急速に上昇している肺ガン等による重篤な末期症状の緩和からも増している。また、気管支での肺サーファクタント物質の分泌も知られており、その吸入によって、喘息発作が軽減する(2)など、呼吸障害の改善を必要とする多くの疾病に対する有用性が期待されている。

以上、人工肺サーファクタントは肺疾患の治療に重要であるが、Surfactenは12万円/vial(120mg)と非常に高価であるため、1kgの未熟児を助ける量は1vialもあれば十分だが、大人の場合1回にその50倍近くもの大量を要し、あまりに高価となる。そのため保険適用が認められているのはRDSのみで他の呼吸器疾患は、その効果が証明されているにもかかわらず保険適用外である。さらに、Surfactenは牛由来のタンパク質を含んでいるため、その抗原性および未知の病原性による感染の可能性、例えば狂牛病の問題などを含む。現在、日本では、地域的に安全な場所(オセアニア地域)の牛を使っているとはいえ、常に牛海綿状脳症(BSE)の問題を抱えていることは事実である。

一方、動物肺に由来せず、完全に人工的に調製されたものは完全合成型として区別される。これには、脂質混合系のみからなるExosurfがあるが、効能が動物由来型と比べて低い。またペプチド脂質混合系のSurfaxinがある。これは1991年Cochraneらによって初めて報告されたアミノ酸21残基からなる人工合成ペプチドKL₄(図1)と、ある種の脂質混合物からなる(5)。薬効については、牛肺由来の人工肺サーファクタントよりは生存率がわずかではあるが良いとの報告がある(6)。そのため、一般的に市販されれば、動物由来の人工肺サーファク

Hel13-5 : KLLKLLLKLWLKLLKLLL

Hel13-5D3 : KLLKLLLKLWLKLLKLLL

KL4 : KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK

図1、今回使用した人工肺サーファクタントペプチドの一次構造
K：リジン，L：ロイシン，W：トリプトファン 又、下線はD-アミノ酸を示す。

ントを凌駕する可能性がある。しかし、それも依然として96,000円/vialと高価である。特に、2007年、完全合成型肺サーファクタント Surfaxinが米国で認可された現在、ひとたびBSE問題が再燃すれば、日本ではこの高価な製品を輸入することになるであろう。

このように現在未熟児（新生児）呼吸窮迫症候群治療薬として使用されている人工肺サーファクタントは高価であるため、一般の肺疾患には適用が制限される。我々はRDSのみならず広範囲な肺疾患に適用できる安価な肺サーファクタントを開発するため、以下の研究を展開した。

3 脂質混合系及びペプチド混合系人工肺サーファクタント製剤の開発とそれらの試験管レベルでの有効性評価

肺胞細胞外に存在する肺サーファクタントは5%のタンパク質 (surfactant protein, SP-A, B, C, D) とリン脂質を中心とする脂質成分から成り立っている(1)。脂質のうち、特に中性リン脂質であるL- α -フォスファチジルコリン (PC) が多く、全脂質の80%を占め、酸性脂質であるL- α -フォスファチジルグリセロール (PG) が9%、L- α -フォスファチジルイノシトール (PI) が2.6%、その他コレステロール (Ch) が7.3%である。特に注目すべきことは、PCのうち飽和アルキルからなるジパルミトイル-L- α -フォスファチジルコリン (DPPC) が48%と約半分をしめるが、このことが肺を虚脱から防ぐ要因であると言われている。しかし、DPPCを含むリン脂質のみでは肺サーファクタント活性がないことから、少量含まれるタンパク質成分が重要であることが明らかにされた。事実多用されている人工肺サーファクタントであるSurfactenは、タンパク質を約1%及びDPPCを30%含む脂質-タンパク質混合物からなる。しかし、タンパク質及びリン脂質 (特にDPPC) は高価なため、目的の安価で副作用のない人工合成サーファクタントの調製は、原料的側面からみて困難である。

(1) 安価な脂質の選択

肺サーファクタントの活性発現メカニズムを考慮する時、安定な単分子膜及び二分子膜を形成する必要がある。肺圧の上昇・減少に伴っての単分子膜-二分子膜平衡を形成する上で、リン脂質は必須と考えられている。リン脂質の中でも肺の呼気の圧縮時の虚脱を防ぐために、DPPCは必須であると考えられており、さらに少量のPGも必要であると言われている。一方、肺サーファクタントに含まれるタンパク質は、このリン脂質の単分子膜-二分子膜平衡をスムーズに達成させるための触媒的な作用をすると考えられる(7)。

リン脂質として、DPPCは高価 (数百万円/kg) であるため、比較的安価な卵黄レシチン (egg PC)、安価な分別大豆レシチン (数千円/kg) をまず選択した。大豆レシチンは、辻製油株式会社製分別大豆レシチンPC-70を使用した。さらに、分別大豆レシチンPC-70を新たに有機溶媒系で再沈澱する方法で分別し分別大豆レシチンPC-70Dと命名し用いた。また飽和アルキル鎖を持つDPPCの代わりになるものとして飽和高級アルコール (1-octadecanol, OD) および水素添加大豆レシチン (辻製油社製、一万円前後/kg) を取り上げた。さらに、酸性成分として、従来の人工肺サーファクタント脂質として良く用いられている高級脂肪酸のパルミチン酸 (PA) を選んだ。

(2) ペプチドのデザインと選択

また、人工肺サーファクタントとして脂質-タンパク質混合系も考慮した。肺サーファクタントのなかで、全体の約5%の含量を占めるタンパク質SP-A, B, C及びD、なかでもSP-BとSP-Cは肺サーファクタント活性を示すのに重要であると言われている。これらタンパク質のSP-B及びSP-Cは膜に対する作用様式が異なりSP-Bは膜表面に存在し、SP-Cは膜を貫通している。両者は肺の気体-液体表面で起こる単分子膜-二分子膜平衡を触媒すると考えられている。

以前デザインしたペプチドのうち特にHel13-5は両親媒的性質を示し、かつ、酸性及び中性リン脂質膜の中に脂溶性部分を深く侵

入させる性質をもつ。このペプチドをDPPC- PG- PA脂質混合物と混ぜた系は、優れた肺サーファクタント活性を有する(7)。一方、Hel13-5それ自身単独では、強い溶血活性を有する(8)。しかしながら、脂質- Hel13-5複合体では、その性質は無くなるため、将来の医薬品としての適用の際に、実用上殆ど問題はないと考えられるが、念のため、今回ペプチド自身でも溶血活性のない化合物を新たにデザインすることとした。

近年、両親媒性ペプチドの中に一部D-アミノ酸を導入すると、その二次構造に微妙な変化が生じ、それが生理活性に劇的な変化を起こす事が報告された。例えば、Shaiらは、抗菌活性はあるが、同時に溶血活性などの毒性の強い両親媒性ペプチドにD-アミノ酸を導入すると、抗菌活性は変化なく、溶血活性のみなくなること、さらに、正常細胞には毒性が少なくガン細胞のみに選択的に働くことを示し、新たな抗腫瘍化学療法剤の可能性を示した(9)。おそらくそれは、D-アミノ酸を導入することにより生ずる微妙な親水性疎水性バランスの違いによって、細胞膜への作用様式に変化が生じたものと考えられるが詳細は明らかでない。そこで、Hel13-5にD-アミノ酸を導入して、溶血活性の軽減を試みた。D-アミノ酸を導入する位置は適当にバランスよく、また、導入数は全体の20~30%とした。デザインしたペプチドを図1に示す。

これら選択された脂質やペプチドを適当に混ぜ合わせて脂質混合系、及び、脂質-ペプチド混合系を作成し、表面張力-面積ダイアグラムを用いて表面活性を評価し、現在最も治療効果が高いSurfactenの表面張力-面積ダイアグラムに近いものを選択することを目標とした。対象として、ARDSに対する薬とされているExosurf, KL₄ (Surfaxinに含まれるペプチド)についても比較検討を行うこととした。

(3) 表面張力-面積ダイアグラムの測定と結果

呼吸運動によって、肺サーファクタントの表面吸着膜はたえず伸張・圧縮を繰り返しており、それにつれて分子の配列状態が変化する。この呼吸運動に似た状態で吸着挙動を表面張力

の変化で記すことによって、肺サーファクタント活性をin vitro的に評価することができる。図2に示すように、Modified Wilhelmy表面張力計で表面張力-面積曲線を測定すると、ヒステリシス曲線を描くことが肺サーファクタントの表面活性における特徴である。一般に圧縮時(呼気)の表面張力の低下速度が速いほど、また、拡張時(吸気)、自発的な表面拡散能力が速やかなものほど良好な肺サーファクタント活性を示すといわれている。すなわち、ヒステリシスカーブの形成する面積の大きい程、また、圧縮時の表面張力の小さいものほど良好であると考えられる。Surfactenの圧縮時の最小表面張力は 7mNm^{-1} 、各拡張時の最大張力は 45mNm^{-1} である。

上述のごとく、肺の呼吸圧の変化を模したWilhelmy表面張力計でヒステリシス曲線を測定することによって、いくつかの脂質混合系及び脂質-ペプチド混合系で、Surfactenと比較して、肺サーファクタントとしての可能性を示すヒステリシス曲線を描くものを得た(図2)。特に良好なヒステリシス曲線を描くものをいくつか選んで、ラットモデルでの肺サーファクタント活性評価をすることとした。選択としては、原料がなるべく安価であることを基準にした。次に選んだ系及びその略称を記す。

- Murosurf L; OD-egg PC-PA
(35:40:25)
- Murosurf SL; 水素添加大豆レシチン-分別大豆レシチンPC70D-PA (40:40:20)
- Murosurf LP; OD-egg PC-PA-Hel13-5
(35:40:22.5:2.5)
- Murosurf SLP; 水素添加大豆レシチン-分別大豆レシチンPC70D-PA-Hel13-5
(40:40:17.5:2.5)
- Murosurf SLPD3; 水素添加大豆レシチン-分別大豆レシチンPC70D-PA-Hel13-5D3
(40:40:17.5:2.5)

なお、赤血球を用いてのペプチドHel13-5D3の溶血活性は、Hel13-5と比べて4~8倍減少した。

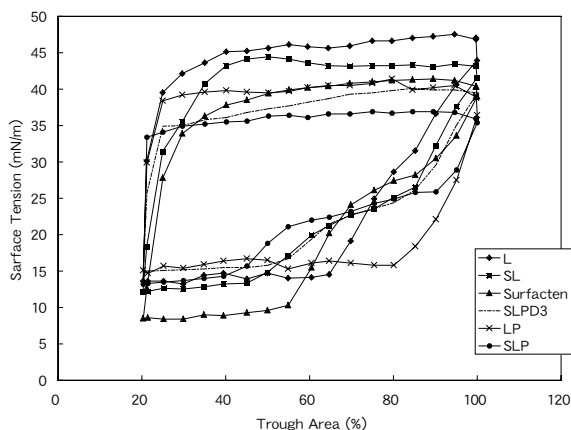


図2, 選択された脂質-, 及び脂質-ペプチド混合形のヒステリシス曲線

Murosurf L; OD-egg PC-PA (35:40:25) (L)

Murosurf SL; 水素添加大豆レシチン-分別大豆レシチンPC70D-PA (40:40:20) (SL)

Murosurf LP; OD-egg PC-PA-Hel13- (35:40:22.5:2.5) (LP)

Murosurf SLP; 水素添加大豆レシチン-分別大豆レシチンPC70D-PA-Hel13-5 (40:40:17.5:2.5) (SLP)

Murosurf SLPD3; 水素添加大豆レシチン-分別大豆レシチンPC70D-PA-Hel13-5D3 (40:40:17.5:2.5) (SLPD3)

Surfacten (三菱ウエルファーマKKより購入)

4 人工肺サーファクタントの動物実験 (in vivo) による有効性評価

試験管レベルで有効性が評価された脂質混合系及びペプチド混合系の肺サーファクタントとしての効果について動物モデルを用いて検討した。新生児呼吸窮迫症候群の動物モデルである肺サーファクタント欠乏モデルを用いて、我々が新規開発した肺サーファクタント、Surfactenおよび欧米で開発中の肺サーファクタント (Surfaxin) との比較検討を行った。また、肺サーファクタントの新たな効果として喘息発作に対する効果が報告され(2)、新たな適応疾患としての可能性も示唆されている。そこで、動物を用いて喘息モデルを作成し、その効果の検討も行った。

(1) 肺サーファクタント欠乏動物モデルの実験

成熟ウイスターラットに生理食塩水で肺洗浄を行い、肺サーファクタント欠乏モデルを作成した。肺サーファクタント欠乏モデルに対しては、100%酸素による人工換気下に、各種の人工肺サーファクタントを気管内投与し、経時的

に肺コンプライアンスを測定し、効果の指標とした(10)。人工サーファクタントとしては、Murosurf L, Murosurf LP, Murosurf SL, Murosurf SLP, Murosurf SLPD3, Murosurf SLPD5, Exosurf, SurfaxinおよびSurfactenを使用し、投与量は120mg/kgとした。肺コンプライアンスは肺洗浄前および肺洗浄後180分まで測定した。サーファクタントの効果は洗浄後(サーファクタント投与前)の肺コンプライアンスを基準にして、サーファクタント投与後の肺コンプライアンス回復率で検討した。

その結果、図3に示すように、Murosurf SLPD3はSurfactenに比して投与後30分において有意にコンプライアンス回復率は優れ、他の測定時間においても同等の効果を示した。Murosurf SLPは90分、120分の測定値を除きSurfactenと同等の効果を示した。Murosurf LPは180分でSurfactenと同等の効果を示した。

以上の、肺サーファクタント欠乏動物モデルにおける実験結果より、大豆レシチンとD体のペプチドからなるMurosurf SLPD3は、現在臨床で使用されているSurfactenより優れた臨床

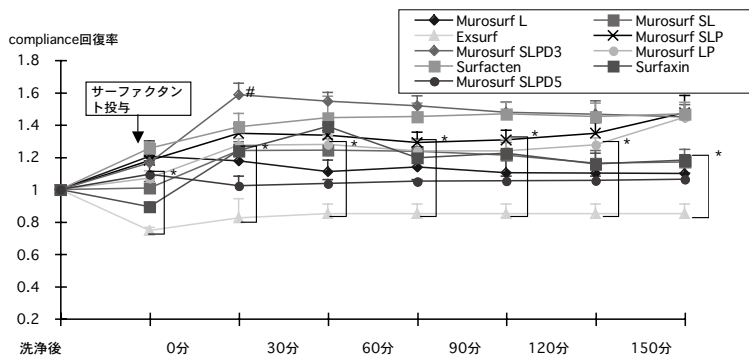


図3. 肺サーファクタント欠乏動物モデルにおける各種サーファクタントの効果

肺洗浄ラットモデルに、各サーファクタントを投与した後の肺コンプライアンス回復率を時間に対してプロットした。サーファクタントを投与しないラットは、回復はみられず死にいたる。なお、肺コンプライアンス、肺コンプライアンス回復率は以下の式により求めた。

1) 肺コンプライアンス = 1 回換気量 (ml) / 気道圧差 (cmH₂O)

2) 肺コンプライアンス回復率 = サーファクタント投与後肺コンプライアンス / 肺洗浄後肺コンプライアンス

統計学的処理はTurkey-Kremer法を用い $p < 0.05$ を有意とした。「#」はSurfactenより有意にコンプライアンス回復率が高く、「*」はSurfactenより有意にコンプライアンス回復率が劣ることを示す。

効果が期待できると考える。

(2) 喘息モデルの実験

ブラウンノルウェーラットを卵白アルブミン (OVA) で感作し、OVA 吸入で肺抵抗が上昇する喘息モデルを作成した。Murosurf SL, Murosurf SLP, Murosurf SLPD3, Surfacten をそれぞれ 0.1ml (20mg/ml) 気道内に投与して前処置を行った後にOVAを吸入し、Gilesらの方法に準じて経時的に肺抵抗を測定した。肺抵抗亢進の抑制作用を指標として、喘息に対する効果を検討した(11) (図4)。

サーファクタントを投与していないコントロールに比べてMurosurf SL, Murosurf SLP, Murosurf SLPD3, Surfactenのいずれのサーファクタントも有意にOVA誘発の気道抵抗の亢進を、OVA投与後45分まで抑制した。

Surfactenをはじめとして幾つかの人工サーファクタントで喘息発作に対する抑制効果が報告されている(2)。しかしながら、コスト・パフォーマンスやメカニズムが明確でないため、小規模な実験報告に留まっている。今回の我々の実験結果も、Surfactenと同等の喘息発作抑制効果をMurosurf SL, Murosurf SLP,

Murosurf SLPD3に認めた。Murosurf SL, Murosurf SLP, Murosurf SLPD3は従来のサーファクタントに比べて安価に製造が可能であり、そのコスト・パフォーマンスを考慮すると、喘息治療薬としての開発も十分可能と考える。また、ペプチドを含まないMurosurf SLも同等の効果を示したことは、サーファクタントの喘息発作抑制効果のメカニズムを考える上で興味深い。

5 研究成果のまとめと今後の展望

今回、研究開発中の人工調製肺サーファクタントは、現行の価格をはるかに下回るもので、脂質やペプチドの原料レベルでの原価コストが10~100円/vialと非常に安く製造できるため、現行の価格をはるかに下回る製品が期待でき、そのため、広範囲な肺疾患に適用拡大を図ることができるものである。また、完全合成型であるためBSEなどの心配もない。

次に得られた成果を箇条書きにすると、

- i) DPPC (1,000,000円/kg), PG (1,500,000円/kg), egg PC (200,000円/kg) に変わるものとして分別大豆レシチンPC70D

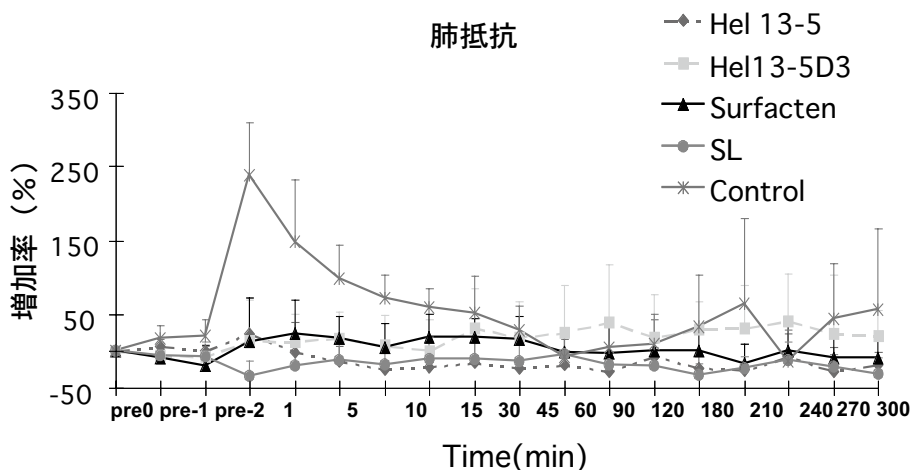


図4. 喘息モデルにおける各種肺サーファクタントの効果

卵白アルブミン (OVA) を腹腔内投与 (感作) 2 週間後に肺抵抗を測定 (pre-0,-1,2, この値を 0 とする), その後, 測定10分前に肺サーファクタントを気管内投与した後OVA を気管に投与, 肺抵抗の時間変化 (min) を測定した。

(50,000円/kg), 水素添加大豆レシチン (8,900円/kg) 使用に成功した。

ii) 動物実験では, 脂質-ペプチド混合系 Murosurf SLPD3は天然系市販 Surfacten より優れた効能, また, 合成系市販製品 ExosurfやSurfaxinと比べてもより優れた効能を示した。

iii) 喘息モデルにおいて, Murosurf SLおよびSLP系は有意に肺抵抗を抑制した。

このように, 牛肺等の天然材料に頼らない完全合成, かつ原料調達が容易でしかも安価で高効果の期待できる人工肺サーファクタントの合成に成功できた。今後, この実用化に向けて, 非臨床試験評価のためのデータの蓄積, 毒性試験, 効能試験及び安定供給のための製剤化とその安定性試験を実施する。これらの結果をもとに, 非臨床試験評価を行いPhase Iへの移行を検討する。

参考文献

1. 「肺表面活性物質の現在」吉田清一編, 真興交易医書出版部, 東京, 1990; Mo-

lecular Basis of Disease: Pulmonary Surfactant, ed., J. R., Riordan *Biochim. Biophys. Acta*, 1048,77-363 (1998)

2. K.S., Babu et al. *Eur. Respir. J.*, 21,1046-1049 (2003)

3. 藤原等, 特公昭61-9925号広報

4. T.J. Gregory, et al., *Am. J. Respir. Crit. Car. Med.* 155, 1309-1315 (1997)

5. C. G. Cochrane and S. D., Revak *Science*, 254, 566-568 (1991)

6. S. K. Ninha, et al., *Pediatrics*, 115, 1030-1038 (2005)

7. 李 相男, 杉原剛介, 柴田 攻, 雪竹 浩, 特願2003-98607 (科学技術振興事業団)

8. T. Kiyota et al., *Biochemistry*, 35, 13196-13204 (1996)

9. Y. Shai, et al., *J. Biol. Chem.*, 278, 21018 (2003)

10. W.H., Tooly et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136, 651-631 (1987)

11. A., Murai et al., *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312, 432-440 (2005)