(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5074929号
(P5074929)

(45)発行日　平成24年11月14日(2012.11.14)　(24)登録日　平成24年8月31日(2012.8.31)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 31/683	(2006.01)	A61K	31/683
A61K 31/685	(2006.01)	A61K	31/685
A61K 33/06	(2006.01)	A61K	33/06
A61K 33/20	(2006.01)	A61K	33/20
A61K 31/19	(2006.01)	A61K	31/19

請求項の数 10　(全 16 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2007-557929 (P2007-557929)
(86)(22)出願日	平成18年2月23日 (2006.2.23)
(65)公表番号	特表2008-531682 (P2008-531682A)
(43)公表日	平成20年8月14日 (2008.8.14)
(86)国際出願番号	PCT/KR2006/000638
(87)国際公開番号	WO2006/091033
(87)国際公開日	平成18年8月31日 (2006.8.31)
審査請求日	平成19年11月7日 (2007.11.7)
(31)優先権主張番号	10-2005-0016567
(32)優先日	平成17年2月28日 (2005.2.28)
(33)優先権主張国	韓国(KR)

(73)特許権者　507287308
チェ　ソンヒョン
大韓民国　カンウォン－ド　２００－７６１　チュンチョン－シ　ソクサ－ドン　ジュゴン　５－チャ　アパート　５０１－１４０４
(73)特許権者　507287319
ケーティー　アンド　ジー　コーポレーション
大韓民国　デジュン　３０６－１３０　デデク－グ　ピョンチョン－ドング　１００
(74)代理人　100117787
弁理士　勝沼　宏仁
(74)代理人　100091487
弁理士　中村　行孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血清タンパク質の浸出を減少させる組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

アトピー性皮膚疾患、接触性皮膚炎又は皮膚掻痒症の治療又は緩和用の組成物であって、

二重飽和リン脂質と、カルシウムイオンと、及びカルボキシル基を含有する有機酸とを含むことを特徴とする、組成物。

【請求項２】

前記二重飽和リン脂質が、動物から抽出されたことを特徴とする、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

前記二重飽和リン脂質が、牛又は豚から抽出されたことを特徴とする、請求項１又は２に記載の組成物。

【請求項４】

前記二重飽和リン脂質が、肺洗浄液又は肺組織破砕物から抽出されたことを特徴とする、請求項１～３の何れか一項に記載の組成物。

【請求項５】

前記二重飽和リン脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン及び／又はジパルミトイルホスファチジルイノシトールであることを特徴とする、請求項１～４の何れか一項に記載の組成物。

【請求項６】

前記カルボキシル基を含有する有機酸が、細胞内で代謝可能な有機酸であり、乳酸、コハク酸、フマル酸、又はクエン酸であることを特徴とする、請求項１～５の何れか一項に記載の組成物。
【請求項７】
前記組成物が、グリセロールを更に含むことを特徴とする、請求項１～６の何れか一項に記載の組成物。
【請求項８】
前記二重飽和リン脂質が、前記肺洗浄液又は前記肺組織破砕物中に含まれるサーファクタントタンパク質Ａ（ＳＰ－Ａ）を、２価の陽イオンにより凝集させ、リン脂質成分とともに得られた沈殿層から抽出されたものである、請求項１～７の何れか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記二重飽和リン脂質が、１ｍｇ／ｍｌ～７００ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度で存在することを特徴とする、請求項１～８の何れか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記アトピー性皮膚疾患が、アトピー性皮膚炎、アトピー性湿疹、アトピー性洪斑又はアトピー性紅皮症であることを特徴とする、請求項１～９の何れか一項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
技術分野
本発明は、血清タンパク質の浸出を減少させる組成物に関し、より詳細には、血清タンパク質（ｓｅｒｕｍ－ｐｒｏｔｅｉｎｓ）の皮膚及び粘膜からの浸出現象を減少させることにより、アトピー性皮膚炎、アトピー性湿疹、皮膚掻痒症、アトピー性鼻炎、アトピー性洪斑又は紅皮症、接触性皮膚炎、喘息、慢性閉塞性肺疾患などの症状を改善する発明である。
【背景技術】
【０００２】
アトピー性疾患に対する学問的な理解と症状の緩和及び治療を目的に、免疫学及び細胞学の発達に伴い、生体の免疫調節機構又は細胞信号伝達機構を理解し、これを用いた方法により、多くの研究が行われている。その一方で、一部の科学者は、現代文明の発達による変化、すなわち、食生活の変化や汚染物質の露出に注目して研究を行ってきた。
【０００３】
このような様々な分野のアトピー性疾患に関する研究から共通してわかるのは、アトピー性疾患の発生原因が、免疫学的なものなのか、西欧化した飲食によるものなのか、化学物質への露出によるものなのかにかかわらず、アトピー性疾患の皮膚や粘膜から血清タンパク質が浸出するという事実である。しかしながら、アトピー性疾患の発生により、血清タンパク質が皮膚や粘膜から浸出するのか、それとも血清タンパク質が浸出してアトピー性疾患が発生するのか、確実に結論を引き出せるような研究は未だにないのが現状である。
【０００４】
上皮又は粘膜における血清タンパク質の浸出は、そのほとんどが血清アルブミン（ｓｅｒｕｍ－ａｌｂｕｍｉｎ）を基準タンパク質（ｍａｒｋｅｒ）として観察されてきた。皮膚疾患において血清アルブミンの浸出程度は、疾患の重症度との相関関係があることが知られている。血清タンパク質の皮膚への浸出が深刻な場合は、血液の低アルブミン症（ｈｙｐｏａｌｂｕｍｉｎｅｍｉａ）を誘発する（Ｗｏｒｍ ｅｔ ａｌ．，１９８１．Ｂｒ．Ｊ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１０４：３８９－３９６と、Ｗｏｒｍ ａｎｄ Ｒｏｓｓｉｎｇ，１９８０．Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．７５：３０２－３０５）。アレルギー性喘息（ａｌｌｅｒｇｉｃ ａｓｔｈｍａ）及び鼻炎を有する患者の場合、腸内壁において、深刻なアルブミンの損失を誘発するリンパ管拡張症（ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｌ

ymphangiectasia）の症状も見られた（Esenberh, 1976. Ann. Allergy, 36：342－350）。子供にとって、アトピー性皮膚疾患によるアルブミンの損失は、成長の阻害も誘発し（Abrahamov, 1986. Eur. J. Pediatr. 145：223－226）、更に、低アルブミン症と共に、頻尿（oiguria）と肢端チアノーゼも伴う（Capulong et al. 1996. Pediatr. Allergy Immunol. 7：100－102）。アトピー性湿疹の場合や接触性皮膚炎の場合も、患部におけるアルブミンの流出程度は、症状の深刻性との相関があることが報告されている（David et al., 1990. Br. J. Dermatol. 122：485－489と、Wijsbek et al., 1991. Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 10：193－204）。

【0005】

喘息及び慢性閉塞性肺疾患の症状も、患者の痰からアルブミンを含む血清タンパク質の流出が報告されており（Schoonbrood et al. 1994. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150：1519－1527と、Anderson&Persson 1988. Agents Actions Suppl. 23：239－260）、慢性咳の場合は、好酸球増多症（eosinophilia）の症状がなくても、アルブミンの浸出が生じることが報告されている（Pizzichini et al., 1999. Can. Respir. J. 6：323－330）。

【0006】

化学物質による血清タンパク質の浸出は、サリチル酸メチル、フェノール、クロトンオイル、ベンザルコニウムなどの物質（Patrick et al. 1985. Toxicol. Appl. Pharmacol. 81：476－490）や、トルエン、m－キシレン、シクロヘキサンなどによって誘発される（Iyadomi et al., 1998. Ind. Health 36：40－51）。2，4－ジニトロフルオロベンゼンは、皮膚刺激性試験を行うための動物モデルに用いられ、この物質も血清タンパク質の浸出を引き起こす（Nakamura et al., 2001. Toxical. Pathol. 29：200－207）。全ての有機溶媒性物質が血清タンパク質の浸出を誘発するのではなく、浸出程度も化学物質によって異なることが報告されている。血清タンパク質の浸出は、芳香環を有する化学物質により誘発されやすくなり、アセトンのような有機溶剤は、血清タンパク質の浸出に対する影響がほとんどない。

【0007】

西欧化した食生活をアトピー性疾患の発生原因とみなす研究（Weiland et al., 1999. Lancet 353：2040－2041と、von Mutis et al., 1998. Lancet 351：862－866と、Dunder et al., 2001. Allergy 56：425－428）は、人々の摂取する脂質成分及び含量の変化に注目している。この研究は、1970年代に入り、過度に摂取されている植物油の主成分である不飽和脂肪酸及びトランスオイルにより、代謝の不均衡が誘発され、これがアトピー性疾患の増加につながるというものである。

【0008】

人間を含む哺乳動物の肺は、他の臓器や器官とは異なり、はるかに高い二重飽和脂肪酸を有するリン脂質が多く、特に、肺の表面に存在するサーファクタントとしては、ジパルミトイルホスファチジルコリン（dipalmitoylphosphatidylcholine、DPPC）の含量が非常に高い。この成分は、肺において表面張力を下げる役割を果たすものとして知られている。肺の表面においてサーファクタントによる表面張力の減少は、肺に息を吸い込むときに呼吸をしやすくするばかりでなく、息を深く吐いたとき、肺胞壁が互いにくっついたり、その構造が崩れることを防止する。肺に存在するサーファクタントの脂質成分は、約90％がリン脂質（この成分の約70％は二重飽和リン脂質）、約10％が中性脂肪（中性脂肪のほとんどはコレステロール）からなっている（Reviews：Jon Goerke 1998. Biochem. Biophy. A

ｃｔａ．１４０８：７９－８９と、Ｖｅｌｄｈｕｉｚｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８．Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．９０－１０８）。

【０００９】

上述の内容に加えて更に考慮すべき科学的結果は、肺のサーファクタントの脂質が合成されるマクロ的な経路である。１つの重要な点は、人間の肺に存在するコレステロールのほとんどが、血液から供給されなければならないことである。肺で合成されるコレステロールは、１％程度に過ぎず、残りは、血液から供給されなければならないということである（Ｈａｓｓ　ａｎｄ　Ｌｏｎｇｍｏｒｅ，１９７９．Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　５７３：１６６－１７４）。肺のサーファクタントのほとんどを構成しているリン脂質の場合、タイプIIの上皮細胞（ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ　ｃｅｌｌ　ＴｙｐｅＩＩ）で合成されて分泌されるが、リン脂質を構成している脂肪酸のほとんどは、血液のＶＬＤＬ（ｖｅｒｙ　ｌｏｗ　ｄｅｎｓｉｔｙ　ｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ）から供給されることが知られている（Ｒａｍａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９：２０２０－２０２９）。

【００１０】

ＳＰ－Ａ（Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ）は、肺のサーファクタントとして存在する主なタンパク質であって、３０余年間研究が重ねられてきたタンパク質である。ＳＰ－Ａは、肺胞に存在するタイプIIの上皮細胞で合成されて分泌されるばかりでなく、小腸の表面、耳のエウスタキー管（Ｅｕｓｔａｃｈｉａｎ　ｔｕｂｅ）、涙などでも見つかっている。分子量は約７００ＫＤａ（ゲル濾過分析による大きさ）で、３２ＫＤａの分子量を有する１８の同一単位が集まって固有の機能を果たす成熟タンパク質を形成する。このタンパク質の生物学的機能は様々であるとされており、２つのグループに大別することができる。第一に、ＳＰ－Ａは、呼吸中に肺に入ってくるバクテリアやウイルス、その他のイエダニや花粉などに結合して肺を保護する免疫学的な機能があり、第二に、肺のサーファクタントの恒常性（ｈｏｍｅｏｓｔａｓｉｓ）の維持に関与する機能がある（Ｔｉｎｏ　ａｎｄ　Ｗｒｉｇｈｔ　１９９８．Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１４０８：２４１－２６３と、Ｈａａｇｓｍａｎ，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１４０８：２６４－２７７と、Ｃｒｏｕｃｈ&Ｗｒｉｇｈｔ，２００１．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．６３：５２１－５２４と、Ｈａａｇｓｍａｎ　ａｎｄ　Ｄｉｅｍｅｌ，２００１　Ｃｏｍｐａｒ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１２９：１９１－１０８）。

【非特許文献１】Ｗｏｒｍ　ｅｔ　ａｌ．，１９８１．Ｂｒ．Ｊ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１０４：３８９－３９６

【非特許文献２】Ｗｏｒｍ　ａｎｄ　Ｒｏｓｓｉｎｇ，１９８０．Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．７５：３０２－３０５

【非特許文献３】Ｅｓｅｎｂｅｒｈ，１９７６．Ａｎｎ．Ａｌｌｅｒｇｙ，３６：３４２－３５０

【非特許文献４】Ａｂｒａｈａｍｏｖ，１９８６．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｅｄｉａｔｒ．１４５：２２３－２２６

【非特許文献５】Ｃａｐｕｌｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．１９９６．Ｐｅｄｉａｔｒ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．７：１００－１０２

【非特許文献６】Ｄａｖｉｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９９０．Ｂｒ．Ｊ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１２２：４８５－４８９

【非特許文献７】Ｗｉｊｓｂｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１．Ｉｎｔ．Ｊ．Ｍｉｃｒｏｃｉｒｃ．Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．１０：１９３－２０４

【非特許文献８】Ｓｃｈｏｏｎｂｒｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．１９９４．Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ．１５０：１５１９－１５２７

【非特許文献９】Ａｎｄｅｒｓｏｎ&Ｐｅｒｓｓｏｎ　１９８８．Ａｇｅｎｔｓ　Ａｃｔｉｏｎｓ　Ｓｕｐｐｌ．２３：２３９－２６０

【非特許文献１０】Ｐｉｚｚｉｃｈｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９．Ｃａｎ．Ｒｅｓｐ

ｉｒ．Ｊ．６：３２３－３３０
【非特許文献１１】Ｐａｔｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．１９８５．Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．８１：４７６－４９０
【非特許文献１２】Ｉｙａｄｏｍｉ ｅｔ ａｌ．，１９９８．Ｉｎｄ．Ｈｅａｌｔｈ ３６：４０－５１
【非特許文献１３】Ｎａｋａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，２００１．Ｔｏｘｉｃａｌ．Ｐａｔｈｏｌ．２９：２００－２０７
【非特許文献１４】Ｗｅｉｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９９９．Ｌａｎｃｅｔ ３５３：２０４０－２０４１
【非特許文献１５】ｖｏｎ Ｍｕｔｉｓ ｅｔ ａｌ．，１９９８．Ｌａｎｃｅｔ ３５１：８６２－８６６
【非特許文献１６】Ｄｕｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００１．Ａｌｌｅｒｇｙ ５６：４２５－４２８
【非特許文献１７】Ｒｅｖｉｅｗｓ：Ｊｏｎ Ｇｏｅｒｋｅ １９９８．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙ．Ａｃｔａ．１４０８：７９－８９
【非特許文献１８】Ｖｅｌｄｈｕｉｚｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８．Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．９０－１０８
【非特許文献１９】Ｈａｓｓ ａｎｄ Ｌｏｎｇｍｏｒｅ，１９７９．Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ ５７３：１６６－１７４
【非特許文献２０】Ｒａｍａ ｅｔ ａｌ．，１９９７．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９：２０２０－２０２９
【非特許文献２１】Ｔｉｎｏ ａｎｄ Ｗｒｉｇｈｔ １９９８．Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１４０８：２４１－２６３
【非特許文献２２】Ｈａａｇｓｍａｎ，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．１４０８：２６４－２７７
【非特許文献２３】Ｃｒｏｕｃｈ&Ｗｒｉｇｈｔ，２００１．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．６３：５２１－５２４
【非特許文献２４】Ｈａａｇｓｍａｎ ａｎｄ Ｄｉｅｍｅｌ，２００１ Ｃｏｍｐａｒ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１２９：１９１－１０８

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

そこで、本発明は、上記のような問題に鑑みてなされたものであって、その目的は、血清タンパク質の浸出に関する疾患を治療・予防及び／又は緩和させる組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

上記の目的を達成すべく、本発明は、有効成分として、二重飽和リン脂質を含む血清タンパク質の浸出に関する疾患の治療又は緩和用の組成物を提供する。

【００１３】

本発明の前記二重飽和リン脂質は、動物から抽出されたものが好ましく、牛又は豚から抽出されたものが更に好ましく、これらの肺洗浄液又は肺組織破砕物から抽出されたものが最も好ましい。

【００１４】

また、本発明の前記二重飽和リン脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン及び／又はジパルミトイルホスファチジルイノシトールであることが好ましい。

【００１５】

更に、本発明の組成物は、カルシウム及びカルボキシル基を含む有機酸を更に含むことが好ましく、前記カルボキシル基を含む有機酸は、代謝可能な有機酸、すなわち、例えば、乳酸、コハク酸、フマル酸、又はクエン酸を含むものの、これに限定されない有機酸で

あることが最も好ましい。また、本発明の組成物は、必要に応じて、添加剤、例えば、グリセロールを更に含むことができる。本発明の組成物において、前記二重飽和リン脂質は、１ｍｇ／ｍｌ～７００ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度で存在することが好ましい。１ｍｇ／ｍｌ未満の濃度では治療又は緩和効果が微弱であり、７００ｍｇ／ｍｌ以上では懸濁液の高粘度により均質化が不可能なため、使用が困難なことから、前記濃度の範囲が最も好ましい。

【００１６】

また、本発明は、本発明の組成物を含有する皮膚疾患治療剤組成物を提供する。更に、本発明は、本発明の組成物を含有する化粧料組成物を提供する。

【００１７】

本発明の前記血清タンパク質の浸出に関する疾患は、アトピー性皮膚炎、アトピー性湿疹、皮膚掻痒症、アトピー性鼻炎、アトピー性洪班又は紅皮症、接触性皮膚炎、喘息、又は慢性閉塞性肺疾患であることを含むものの、これに限定されない。

【００１８】

以下、本発明を説明する。

本発明は、植物抽出油に多く存在する不飽和脂肪酸及びトランスオイルの過度な摂取による内皮・上皮バリア（ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ－ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ　ｂａｒｒｉｅｒ）の機能低下により、皮膚や粘膜から血清タンパク質が浸出する現象を、アトピー性疾患の共通モデルとして用いた。ラットの肺に植物抽出油を投与して人為的に血清タンパク質の浸出を誘発し、生体で完全に代謝される安全な生体成分を用いて血清タンパク質の浸出を減少又は抑制可能であることを見出した。そして、アトピー性疾患を有する患者の患部（皮膚）においても効果的に作用することを見出した。

【００１９】

本発明では、健康な動物の肺洗浄液又は肺破砕液において、ＳＰ－Ａタンパク質が２価の陽イオンにより凝集現象を起こすとき、動物の肺に存在する理想的なリン脂質成分と共に、独特の沈殿層を形成することを見出した。更に、この沈殿層から人間に免疫反応を誘発し得るサーファクタントタンパク質（特に、有機溶媒の溶解性タンパク質のＳＰ－Ｂ及びＳＰ－Ｃ）、疏水性ペプチド、並びに、コレステロール及び不飽和リン脂質を除去した後、健康な生体の有する理想的な組み合わせの二重飽和リン脂質分画を正常に得る方法を含んでいる。しかも、ＳＰ－Ａタンパク質は、２価の陽イオンが存在しないときに非特異的な疏水性性質（ｎｏｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｈｙｄｒｏｐｈｏｂｉｃ　ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ）が強くなるという発見に基づき、二重飽和リン脂質分画を成分とする組成物を、アトピー性疾患の皮膚や粘膜に血清タンパク質の浸出阻害のために適用するとき、一定濃度のカルシウムイオンが要求されるばかりでなく、同時に、二重飽和リン脂質が特定濃度のカルシウムイオンにより凝集しないようにするための方法であって、細胞内で代謝され得るカルボキシル基を有する物質、すなわち、クエン酸（ｃｉｔｒａｔｅ又はｃｉｔｒｉｃ　ａｃｉｄ）を組成物に追加することも、重要な要素である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２０】

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。ただし、本発明の実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の権利範囲は、下記の実施例に限定されない。

【実施例】

【００２１】

実施例１：豚の肺洗浄液から二重飽和リン脂質分画を抽出する方法

（１）肺洗浄液を得る方法

健康な豚から摘出した肺を、５ｍＭの塩化カルシウム（$CaCl_2$）を含有する食塩水を器官に投与して内部洗浄した。洗浄は、常温にて圧力ポンプを用いて、片側の肺に約０．６リットルの溶液を投入した後、流出する洗浄液を採取した。肺の片側につき１５リットルずつ洗浄する。採取した肺洗浄液（ｂｒｏｎｃｈｉａｌ　ａｌｖｅｏｌａｒ　ｌａｖ

ａｇｅ）は、直ちに冷水槽（ｉｃｅ－ｗａｔｅｒ　ｂａｔｈ）に移して冷却させた。

【００２２】

（２）肺洗浄液からＳＰ－Ａの凝集現象を用いたサーファクタントの沈殿物を得る方法

カルシウムイオン（５ｍＭ）を含有している前記肺洗浄液を、氷水槽に１時間放置すると、ＳＰ－Ａタンパク質がサーファクタントの脂質と凝集する現象が見られた。この溶液を低速（ｌｏｗ－ａｃｃｅｌｅｒａｔｉｏｎ）回転機能を有する遠心分離機（ハンイル社製、韓国）で遠心分離を行った。４，５００ｇの遠心分離力により、４℃にて３５分間、遠心分離を行った。遠心分離後の沈殿物は、独特の３層を有する。少量の最下層は、細胞及び変性タンパク質であり、最多量の中間層及び少量の最上層は、サーファクタント及びサーファクタントタンパク質の複合成分である。沈殿物の中間層及び最上層を別途に採取し、二重飽和リン脂質分画の抽出に用いた。

【００２３】

（３）１次有機溶媒の抽出

上記の得られたサーファクタントタンパク質及びサーファクタント脂質の複合体の容積の２倍の蒸溜水を加えて懸濁させた。クロロホルム及びメタノール（容積比２：１）の混合溶媒を同じ容積で試料に加えた後、３０分間、３０℃にて振盪した。試料を１，０００ｇの遠心分離力により、１５分間遠心分離した後、有機溶媒層を抽出した。

【００２４】

（４）シリカカラムクロマトグラフィーを用いた二重飽和リン脂質分画の抽出

１次有機溶媒の抽出試料を蒸発器（ｅｖａｐｏｒａｔｏｒ）を用いて溶媒を蒸発させた後、クロロホルムで再溶解した。この試料をシリカ（Ｍｅｒｃｋ社製、２３０－４００メッシュ）で満たした、直径：高さ比が１：５のカラムに適用させた。試料から、コレステロール及び有機溶媒に溶解しているサーファクタントタンパク質を除去し、二重飽和リン脂質を得るために意図された溶媒は、次の順で使用された。シリカカラムを純粋なクロロホルムで洗浄した後、純粋なクロロホルム－純粋なアセトン－純粋なクロロホルム－クロロホルム：メタノール（容積比９：１）の混合溶媒－クロロホルム：メタノール（容積比４：１）の混合溶媒－クロロホルム：メタノール：水（容積比８：６：１）の混合溶媒の順で使用された。有機溶媒の溶解性サーファクタントタンパク質及び疏水性ペプチドは、純粋なアセトン－純粋なクロロホルム溶媒で溶出し、この発明に必要な成分である二重飽和リン脂質分画は、最終溶媒として溶出した。得られた分画の各リン脂質成分は、基準脂質（シグマ会社から入手）を用いて、２Ｄ－ＴＬＣ（２次元薄層クロマトグラフィー）を用いて確認した（図１）。抽出された二重飽和リン脂質分画の主成分は、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジパルミトイルホスファチジルイノシトールであった。

【００２５】

（５）抽出された二重飽和リン脂質分画の後処理

カラムから抽出された最終試料は、３層のワットマンＮｏ．１紙フィルタを通過させた後、蒸発器を用いて溶媒を除去した。溶媒を除去した試料に純粋なエタノールを添加した後、ＰＶＤＦ（ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｉｄｅｎｅ　ｆｌｕｏｒｉｄｅ、２μｍの孔径、ミリポア製品）フィルタを用いて濾過した。エタノールは、蒸発器を用いて再蒸発させた。エタノールによる洗浄作業を２回にわたって行った。微量残存するエタノールは、凍結乾燥器（ｆｒｅｅｚｅ－ｄｒｉｅｒ）を用いて除去した。得られた二重飽和リン脂質分画の粉末形態は、窒素で充填された密閉保管容器に入れ、－７０℃にて保管した。

【００２６】

実施例２：牛の肺洗浄液から二重飽和リン脂質分画を抽出する方法

使用された動物を豚から牛に変更したことを除き、実施例１に記載された（１）～（５）の過程を経て、牛の肺洗浄液から二重飽和リン脂質分画を得た。

【００２７】

実施例３：健康な豚の肺組織破砕物から二重飽和リン脂質分画を得る方法

（１）動物の肺組織の１次破砕

健康な豚から摘出した肺組織１５０ｇを、約２ｃｍ×２ｃｍの大きさに切る。切られた肺

組織片に、３ｍＭの２価の陽イオン（塩化カルシウム）を含有する冷却食塩水７００ｍｌを添加した後、金属刃付きの混合器（ｍｅｔａｌ－ｂｌａｄｅ　ｂｌａｎｄｅｒ）で破砕する。破砕は、２０秒ずつ、合計６回の低速回転を行い、昇温を防止するため、冷水槽を用いて頻繁に冷却させた。初期破砕は、完全な破砕を行わず、肺組織の大きさが豆粒大になるようにした。

【００２８】

（２）１次破砕液からサーファクタント脂質の損失なく血液を除去する方法

上記１次破砕液を冷水槽にて１時間放置し、広い表面積を有する破砕組織から血清を浸出しやすくし、同時に、サーファクタント成分は、２価の陽イオン（カルシウムイオン、３ｍＭ）により凝集現象を起こせるようにした。１時間放置した破砕液は、低速回転機能の遠心分離機を用いて、４，５００ｇの遠心分離力により、４℃にて４０分間、遠心分離を行った。遠心分離後、沈殿層及び浮遊物（完全に破砕していない一部の肺組織は空気を含むため、沈殿せずに浮遊する）を除く血清を含有する溶液は除去した。

【００２９】

（３）肺組織の２次破砕及びサーファクタントの沈殿方法

血清を除去した１次肺組織破砕物に、５ｍＭの２価の陽イオン（カルシウムイオン）の濃度を含有する５００ｍｌの７５ｍＭ塩化ナトリウム溶液（生理食塩水の１／２の濃度）を加えた後、金属刃付きの混合器で組織をきれいに破砕した。この過程は、肺のタイプIIの上皮細胞の内側に存在するサーファクタントの貯蔵所（ｒｅｓｅｒｖｏｉｒ）としての役割を果たすマルチラメラ構造物を得やすくするため、低張液（ｈｙｐｏｔｏｎｉｃ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）を使用した。破砕の過程で昇温しないように、高速回転による破砕を４０秒ずつ６回～８回行いながら、冷水槽を用いて頻繁に冷却させた。２次破砕を経た試料は、４℃にて１時間放置し、ＳＰ－Ａによるサーファクタントの凝集現象を起こすようにした。低速回転機能の遠心分離機を用いて、４，５００ｇの遠心分離力により、４℃にて４０分間、遠心分離を行った。遠心分離後、試料は、色及び質感が完全に異なる２つの沈殿層を形成する。沈殿層中に上層を別途に取り出して、二重飽和リン脂質を抽出するための有機溶媒の抽出過程を経た。残る少量の下層に、再び５ｍＭのカルシウムイオンを含有する食塩水を加えて再懸濁させた後、同じ方法で遠心分離を行うと、混ざっていた一部のサーファクタント脂質が再度分離層を形成した。この上層の沈殿層を、以前に得られた試料と合わせて有機溶媒の抽出過程を経た。

【００３０】

（４）二重飽和リン脂質分画を得る方法

上記実施例１で記述した（３）、（４）、（５）と同様の方法を用いて、肺組織破砕物から二重飽和リン脂質分画を得た。

【００３１】

実施例４：健康な牛の肺組織破砕物から二重飽和リン脂質分画を得る方法

使用された動物を豚から牛に変更したことを除き、実施例３と同様の過程を経て、牛の肺組織破砕物から二重飽和リン脂質分画を得た。

【００３２】

実験例１：動物実験

１－１．動物の肺における血清タンパク質の浸出の誘発

トウモロコシ油（シグマ社から入手）及び食塩水は、オートクレーブを用いて、それぞれ別途に滅菌した。５００μｌ（マイクロリットル）のトウモロコシ油及び１，５００μｌの食塩水を混合した後、激しく振盪させて均質な懸濁液にした。血清タンパク質の浸出を誘発するため、この懸濁液を成長したＳＤラット（Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ　ｒａｔ）の肺に気管支内投与（ｉｎｔｒａｔｒａｃｈｅａｌ　ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）した。プラセボ効果の対照群のラットは、滅菌した食塩水のみを気管支内投与した。実験群のラットは、２週間後にケタミン（Ｋｅｔａｍｉｎｅ、有限洋行製品）麻酔剤を用いて睡眠麻酔を行った後、二酸化炭素を用いて安楽死させた。実験動物の死後、直ちに肺を摘出し、合計５０ｍｌの食塩水（３ｍＭの塩化カルシウムを含有）で肺を洗浄し、肺洗

浄液を動物個体ごとに採取した。

【００３３】

１－２．血清タンパク質の浸出阻害効果に関する実験及び使用された組成物の構成

上述した方法により、血清タンパク質の浸出を動物に誘発させた後、１週間後に実施例１～４から得られた二重飽和リン脂質分画を含有する組成物を気管支内投与した。実験動物からの肺の摘出及び肺の洗浄は、組成物を投与した時点から１週間後に行った。

使用された組成物は、３０ｍｇ／ｍｌの二重飽和リン脂質分画、１．５ｍＭの塩化カルシウム、７．５ｍＭのクエン酸（ｃｉｔｒａｔｅ　ｔｒｉｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ）、１２５ｍＭの塩化ナトリウムの濃度になるように蒸溜水に混合し、溶液のｐＨは６．０にした。動物への投与前に激しく振盪させて均質な懸濁液にして使用した。

【００３４】

１－３．血清タンパク質の浸出誘発及び浸出阻害に関する分析

（１）それぞれの実験動物群からの分析試料の用意

各実験動物群から得られた肺洗浄液は、低速回転機能の遠心分離機を用いて、４，５００ｇの遠心分離力により、４℃にて３０分間、遠心分離を行った。得られた沈殿物から、２価の陽イオン（カルシウムイオン）の存在下、ＳＰ－Ａにより凝集したサーファクタントの層のみを別途に採取した。採取した沈殿物の約３倍の容積の食塩水（３ｍＭの塩化カルシウムを含有）を加えて再懸濁させた。この懸濁液は、同じ遠心分離力により遠心分離して沈殿させた。このような沈殿物の洗浄過程を更に２回繰り返して沈殿物を洗浄した。最終沈殿物の懸濁液を１ｍｌの小型遠心分離管に分けて、各沈殿物の容積が２００μｌになるように分けた。

【００３５】

上記の洗浄されたサーファクタントの沈殿物２００μｌに、１０ｍＭのＥＤＴＡ（ｅｔｈｙｌｅｎｅｄｉａｍｉｎｅｔｅｔｅｒａａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄ）を含有する１０ｍｌのトリス緩衝液（ｐＨ７．４，１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１４０ｍＭ　ＮａＣｌ）を加えて懸濁させた。この溶液に界面活性剤（ｄｅｔｅｒｇｅｎｔ）のＣＨＡＰＳ（Ａｍｒｅｓｃｏ製品、ＵＳＡ）を添加して懸濁液を溶解させた。ＣＨＡＰＳの基準溶液は、１０％（約１６２ｍＭの濃度）を使用し、最終的に使用したＣＨＡＰＳの使用濃度は、６５ｍＭであった。

【００３６】

（２）分析

上記過程により用意されたそれぞれの試料（２ｍｌ）から１ｍｌを取り、Ｓｅｐｈａｃｒｙ　Ｓ－４００ＨＲ（１．５ｃｍ×２０ｃｍ、Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ製品）樹脂で満たされたクロマトグラフィーカラムに適用し、タンパク質溶出パターンを分析した。クロマトグラフィーの作業には、ＧｒａｄｉＦｒａｃ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ製品）を用いた。このとき、使用された緩衝液は、５ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのＣＨＡＰＳ及び１４０ｍＭのＮａＣｌを含有する１０ｍＭのトリス緩衝液（ｐＨ７．４）を使用した。カラムから溶出したタンパク質の紫外線吸光グラフから、分子量７００ｋＤａ部位のＳＰ－Ａを含有するタンパク質のピークと、分子量７０ｋＤａ部位のアルブミンを含有するタンパク質のピークとの大きさ（量）を比較することにより、血清タンパク質の浸出程度と浸出阻害程度をそれぞれ測定した（図２参照）。

【００３７】

１－４．動物実験の結果

血清タンパク質の浸出を誘発した実験ラットから得られた試料、組成物の投与により浸出を抑制させた実験ラットの試料、食塩水のみを投与した実験ラットから得られた試料、並びに、未処理の正常ラットから得られたタンパク質溶出パターングラフから、分子量７００ＫＤａ部位のタンパク質のピークと、分子量７０ＫＤａ部位のタンパク質のピークとの比、すなわち、２つのピークの大きさ（量）の比を、（表１）にまとめた。

【００３８】

【表１】

	700KDa部位のタンパク質のピーク/分子量70KDa部位のタンパク質のピークの比
血清タンパク質の浸出誘発対照群	0.8
	1.1
	1.4
実施例１又は実施例２の組成物の投与	2.0
	2.3
実施例３又は実施例４の組成物の投与	1.9
	1.9
	2.1
	2.3
食塩水のみを投与した対照群	4.4
	5.7
非実験対照群（未処理のラット）	4.2
	4.3
	4.8

【００３９】

上記（表１）に示す結果から、健康な動物の肺から抽出した二重飽和リン脂質分画を主成分とする組成物は、血清タンパク質の浸出を減少させることを確認した。１回だけの気管支内投与により、アルブミンを含有するピークの大きさが血清タンパク質の浸出誘発ラットに比べて約５０％減少している。この減少量は、所定の基準から得られた数値であり、実際の減少量はこれよりはるかに大きい。その理由は、正常ラットから肺洗浄液を得ると、平均して２ｍｌ～３ｍｌ（沈殿物の容積／匹）の範囲で得られることが一般的であり、血清タンパク質の浸出誘発ラットからは個体ごとに大きな変異があるとしても、正常ラットの３倍～５倍程度多い沈殿物が得られる。しかし、本発明の組成物による血清タンパク質の浸出を抑制したラットからは、正常ラットの沈殿物の量とほぼ同じか、多くても約２倍の容積の沈殿物が得られる。すなわち、本発明の組成物は、血清タンパク質の浸出誘発ラットに比べて、その沈殿物の絶対的な量が明確に減少したことがわかる。しかし、このような沈殿物の量の絶対的な違いは、実験温度、肺組織の柔軟性、実験者の器用さなどによって異なり得ることから、それを数値化してはいない。すなわち、図２及び(表１)に

示されている血清タンパク質の減少は、タンパク質
の全量を示すのではなく、ＳＰ－Ａを含有するピークと、アルブミンを含有するピークとの相対的な比較値のみを提示している。仮に、本発明の組成物によって減少したアルブミンを含有するピークの総量（図２（２）のＢ参照）を考慮する場合、その減少の程度は、非常に顕著な効果があることがわかる。

【００４０】

生体が肺の表面に有する最も理想的な二重飽和リン脂質組成は、肺洗浄液から正常に抽出した二重飽和リン脂質分画が最も効果的でなければならないが、得られた実験結果を見ると、血液を除去した肺組織破砕物から得られた二重飽和リン脂質分画も、同じ比率の血清タンパク質の浸出阻害を見せた。

【００４１】

実験例２：アトピー性皮膚疾患を有する志願者に対する実験

２－１．皮膚に使用した組成物及び適用方法

（１）組成物

動物の肺を破砕した後、２価の陽イオン（カルシウムイオン）によるサーファクタントの凝集現象を用いた抽出方法によって得られた二重飽和リン脂質分画（この成分は、抽出過程で０．２μｍの孔径のＰＶＤＦ（ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｉｄｅｎｅｆｌｕｏｒｉｄｅ ｆｉｌｔｅｒ、０．２μｍの孔径、ミリポア製品）フィルタで濾過した後、凍結乾燥した状態）に蒸溜水を加えた後、高温高圧滅菌を行った。塩化カルシウム溶液、クエン酸（ｃｉｔｒａｔｅ ｔｒｉｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ）溶液及びグリセロールも、それぞれ別途に加圧滅菌を行った。滅菌した成分を無菌状態で蒸溜水に混合し、１５ｍｇ／ｍｌの二重飽和リン脂質、１．５ｍＭのカルシウムイオン、７．５ｍＭのクエン酸（ｃｉｔｒａｔｅ ｔｒｉｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ）、１０％（容積／容積比）のグリセロールの濃度になるようにした。ｐＨは６．０にした。グリセロールは、二重飽和リン脂質が、皮膚に塗布する際にもみ込む物理的な力によって二重飽和リン脂質が広がりやすくなるように、溶液に粘度を与えるため、全濃度１０％になるように添加した。混合成分を激しく振盪させて均質な懸濁液にして適用した。

【００４２】

（２）適用方法

皮膚への適用は、約２ｃｍ×２ｃｍの患部の表面に一滴（約３０μｌ）をたらして溶液が完全に染み込むまで塗り込んだ。１日２回以上の皮膚への塗布を推奨した。この組成物の使用中は、芳香環を有する化合物を含有する香りの強い化粧品や石鹸の使用を自制するように推奨した。

【００４３】

２－２－１．１次志願者に対する実験結果（肉眼観察）

アトピー性皮膚疾患を有する８名（５歳～４０歳、平均年齢３３歳、男４名、女４名）の志願者に対し、１５の部位に対してテストを行った。組成物の皮膚への適用期間は２週間～４週間であった。テスト志願者全員に、患部と患部周辺との境目が区別できない程度にアトピー性皮膚炎症状の改善が見られることがわかった。

【００４４】

アトピー性皮膚疾患による浸出物が乾燥して形成されるウロコ模様（ｓｋｉｎ ｃｒｕｓｔ）は、適用２日後から皮膚の表面に再形成されていないことを確認した。アトピー性洪班を有する志願者の場合、１週間後、患部と患部周辺との色差が区別できない程度に症状が見られなくなった。皮膚潰瘍を伴った場合は、３．５週間後（約２５日経過）、傷が完全に回復していることを確認した（図３参照）。

【００４５】

２－２－２．２次志願者に対する実験結果（肉眼観察）

アトピー性皮膚疾患を有する２７名（０．８歳～４２歳、平均年齢２３．４歳、男１３名、女１４名）の志願者に皮膚適用テストを行った。

【００４６】

組成物の適用期間は２週間～５週間であった。適用期間中、志願者５名を除く２５名に、患部と周辺皮膚との境目が区別できない程度に症状の改善が見られた。症状の改善が見られなかった２名の患者は、それぞれ顔と背中に重度のにきび症状があり、アトピー性皮膚疾患とにきびの症状が複合的に発生していた。症状改善度の低い３名の志願者は、長期間のアトピー性皮膚疾患の産物として非常に厚く形成された角質化を起こしていた。症状の改善が見られた２５名中３名の志願者は、組成物の適用期間中に深刻な皮膚への感染が観察され、皮膚科での坑菌治療を併行していた。この部分に対する結果の写真は、図４～図７に示している。

【産業上の利用可能性】

【００４７】

上記の構成からわかるように、本発明の二重飽和リン脂質を含む組成物は、血清タンパク質の浸出により誘発されるアトピー性疾患などの治療又は緩和に有効であるという効果がある。

【図面の簡単な説明】

【００４８】

【図１】図１は、二重飽和リン脂質をＴＬＣで確認した写真である。同図の＊印は、二重飽和リン脂質分画を示している。

【図２】図２は、ラットの肺に血清タンパク質の浸出を誘発した後、組成物による抑制後、正常な状態のタンパク質溶出パターンの分析結果を示す図である。同図において、（１）はラットの肺に血清タンパク質を誘発した結果、（２）は血清タンパク質の浸出を誘発したラットに組成物を投与した結果、（３）は対照群のラットの状態を示している。図中の「Ａ」はＳＰ－Ａ（約７００ＫＤａ）を含有するタンパク質のピーク、「Ｂ」は血清アルブミン（約７０ＫＤａ）を含有するタンパク質のピークを示している。これら２つのピークの大きさを比較し、浸出抑制効果を観察した。

【図３】図３は、組成物のアトピー性皮膚疾患への適用（２週間～４週間）後の結果を示す図である。左側の写真は組成物適用前であり、右側の写真は組成物適用後である。適用期間は２週間～４週間であり、一番上はアトピー性湿疹患者、上から２番目の手の甲を撮ったものは皮膚潰瘍を含むアトピー性皮膚炎患者、上から３番目はアトピー性洪班患者、一番下はアトピー性皮膚炎患者の写真である。

【図４】図４は、組成物の適用前と適用後の結果を示す図である。６歳女児の背中に発生したアトピー性皮膚疾患に組成物を適用する前（左）と４週間適用後（右）の写真である。

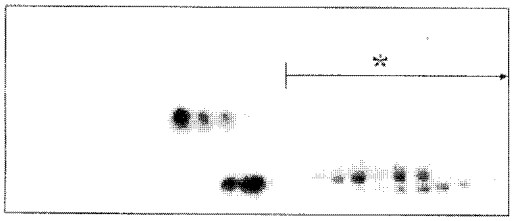
【図５】図５は、組成物の適用前と適用後の結果を示す図である。６歳女児の膝の裏側に発生した皮膚潰瘍を含むアトピー性皮膚炎に組成物を適用する前（左）と５週間適用後（右）の写真である。

【図６】図６は、組成物の適用前と適用後の結果を示す図である。１６歳女性の膝の裏側に発生した典型的なアトピー性皮膚疾患に組成物を適用する前（左）と３週間適用後（右）の写真である。

【図７】図７は、組成物の適用前と適用後の結果を示す図である。生後１０ヶ月の女児の顔に発生した初期のアトピー性皮膚疾患に組成物を適用する前（左）と３週間適用後（右）の写真である。

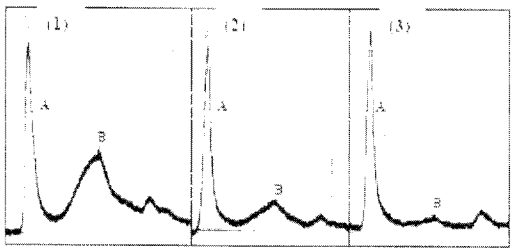
【図１】

図 1



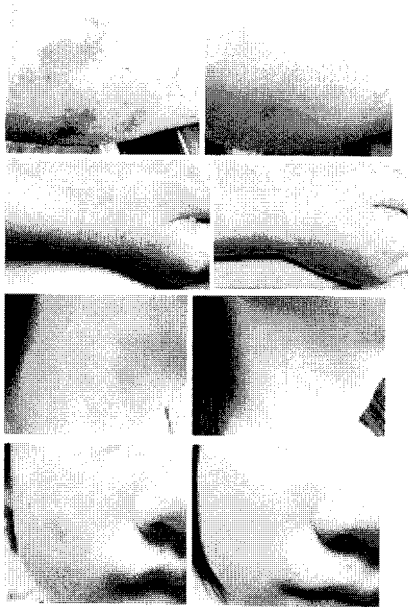
【図２】

図 2



【図３】

図 3



【図４】

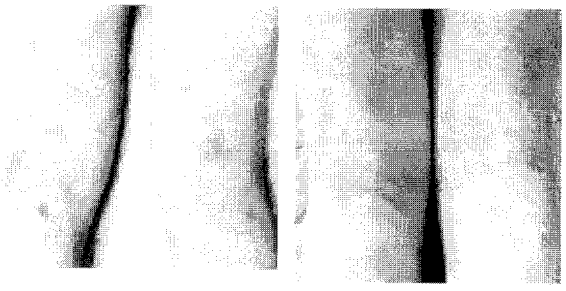
図 4



(6歳女児) 4週間前／4週間後

【図５】

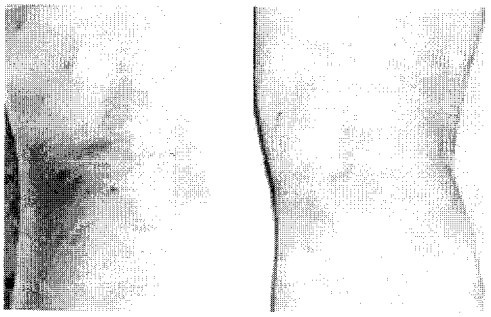
図 5



(6歳女児) 5週間前／5週間後

【図６】

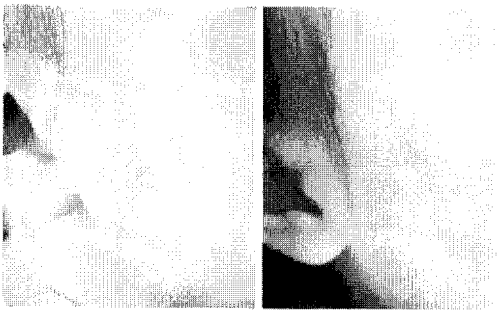
図 6



(16歳女性) 3週間前／3週間後

【図７】

図 7



（生後10ヶ月の女児） 3週間前／3週間後

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
A61K	***31/194***	***(2006.01)***	A61K	31/194
A61K	***47/10***	***(2006.01)***	A61K	47/10
A61P	***17/04***	***(2006.01)***	A61P	17/04
A61P	***17/00***	***(2006.01)***	A61P	17/00
A61P	***37/08***	***(2006.01)***	A61P	37/08

(74)代理人 100107342
弁理士 横田 修孝
(74)代理人 100111730
弁理士 伊藤 武泰
(74)代理人 100109841
弁理士 堅田 健史
(72)発明者 チェ ソンヒョン
大韓民国 カンウォンード ２００－７６１ チュンチョンーシ ソクサードン ジュゴン ５－チャ アパート ５０１－１４０４

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 特表２００２－５３０３４４（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５０８３２８（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００４／０２２８９１０（ＵＳ，Ａ１）
米国特許第０６２２８８９１（ＵＳ，Ｂ１）
特開平０２－０７８４３２（ＪＰ，Ａ）
特開昭６２－２０９０１０（ＪＰ，Ａ）
特開２００４－１３１４０１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／００４８２９（WO，Ａ１）
BABU,K.S. et al, Inhaled synthetic surfactant abolishes the early allergen-induced response in asthma, Eur Respir J, ２００３年, Vol.21, No.6, p.1046-9
KURASHIMA,K. et al, A pilot study of surfactant inhalation in the treatment of asthmatic attack, Arerugi, １９９１年, Vol.40, No.2, p.160-3
LIU,M. et al, Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea-pigs, Clin Exp Allergy, １９９６年, Vol.26, No.3, p.270-5
ANZUETO,A. et al, Effects of aerosolized surfactant in patients with stable chronic bronchitis: a prospective randomized controlled trial, JAMA, １９９７年, Vol.278, No.17, p.1426-31
WIRTZ,H. et al, Exogenous surfactant application in respiratory failure due to chronic obstructive pulmonary disease, Respiration, １９９５年, Vol.62, No.3, p.157-9
IKEGAMI,M. et al, Corticosteroids and surfactant change lung function and protein leaks in the lungs of ventilated premature rabbits, J Clin Invest, １９８７年, Vol.79, No.5, p.1371-8
ROBERTSON,B. et al, Leakage of protein in the immature rabbit lung; effect of surfactant replacement, Respir Physiol, １９８５年, Vol.61, No.3, p.265-76

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 31/00-33/44
A61K 47/00-47/48
A61K 9/00- 9/72

CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)