

## 국내 개발된 Modified Bovine Lung Surfactant의 물리학적 및 생물학적 활성도

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 유한양행 중앙연구소\*

이 철 · 박민수 · 박문성 · 김정년 · 이종욱\*  
유광현\* · 박원재\* · 박국인 · 남공란 · 한동관

### <한글 요약>

**목적** : 신생아호흡곤란증은 주로 미숙아에서 폐 표면활성제(surfactant)가 부족하여 발생된다. 연구자는 대한민국 과학기술처의 중간핵심개발지원 시범사업으로 선정되어 소 폐에서 추출 후 성분을 강화시킨 폐 표면활성제(YY-38)를 개발하고 물리학적 및 생물학적 활성도를 측정하였다.

**방법** : 물리학적 활성도에 관한 검사로서 안정 소포 검사 (stable microbubble test, SMR) 와 pulsating bubble surfactometer를 이용하여 표면장력을 측정하였다. 최소 및 최대 표면장력을 이용하여 표면장력-면적곡선(surface tension-surface area diagram, ST-SA diagram)을 측정하고, 표면장력 10mN/m에서의 압축도(compressibility)도 구하였다. 생물학적 활성도는 미숙 토끼 태자를 사용하여 폐 압력-용적곡선(pressure-volume curve)을 구하고, 폐조직 표본을 제작하여 확장된 폐 부분의 비(aerated area ratio)를 image analyzer를 이용하여 계산하였다.

**결과** : 폐 표면활성제의 농도와 안정소포의 수는 비례관계에 있었으며 낮은 농도인 25µg PL/ml에서도 142개의 소포가 형성되었다. 모든 검사농도에서 YY-38는 1분과 5분의 최소 표면장력이 10mN/m 미만의 낮은 표면장력을 나타내었다. 최대표면장력치는 1분 및 5분의 전 검사 농도에서 33.01mN/m-41.07mN/m 사이에 위치하였다. 표면장력-면적곡선은 1분과 5분 전 농도에서 확실한 해리를 나타내었으며, 20% 표면적 압축시 5분에서의 표면장력이 10mN/m 미만으로 감소되었다. 10mN/m의 표면장력에서 압축도도 5분에서 측정된 전 검사농도에서 0.02 mN/m 미만이었다. 토끼 미숙 태자 폐를 최대 30cm H<sub>2</sub>O 가압시에 폐 용적이 80.9ml/kg까지 증가하고, 5cm H<sub>2</sub>O까지 감압하여도 38.3ml/kg의 폐 용적을 유지하였다. 폐의 면적에서 확장된 폐부분은 전체의 45.4% 로 관찰되었다.

**결론** : YY-38은 충분한 양의 안정된 소포를 형성하였으며, 표면장력이 폐포의 안정을 유지시킬만큼 낮아 우수한 해리곡선을 나타내었다. YY-38은 동물실험에서 흡기시에 미숙 폐의 팽창을 도와주고, 호기시에는 미숙 폐의 허탈을 방지 시키는데에도 효과적이었다.

### 서 론

신생아호흡곤란증(respiratory distress syndrome,

RDS) 또는 유리질막증(hyaline membrane disease, HMD)은 신생아의 폐에서 생산되는 표면활성제(surfactant)가 부족하여 발생된다<sup>1)</sup>. 출생체중이나 재태주령이 낮을수록 발생빈도가 높아서 저출생체중아(low birth weight infant)의 40%에서 나타나고, 재태주령 29주에서는 60%에서 발생하나 재태주령 39주 이

접수일자 : 1996년 10월 22일  
승인일자 : 1997년 1월 9일

상의 신생아에서는 거의 나타나지 않는다. 유리질막증은 사망율이 30%로서 신생아기에 사망률이 가장 높은 질환중에 하나이다<sup>2, 3)</sup>.

이론적으로 유리질막증의 치료로서 외부로부터 투여된 표면활성제가 폐에서 가스교환을 도와줄뿐 아니라, 양압을 이용한 인공호흡기 사용시 발생하는 여러 가지 합병증들도 감소시킬수 있으리라고 기대되었다. 현재까지 개발된 폐표면활성제는 (1) 폐 세척에 의해 얻어지는 표면활성제 (2) 양수로 부터 얻어진 인간 폐 표면활성제 (3) 유기용매제를 사용하여 동물의 폐에서 추출한 표면활성제(organic solvent extract of surfactant) (4) dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)에 인지질(phospholipid, PL)이나 유화제(emulsifier) 등을 첨가한 표면활성제 등이 있다<sup>4)</sup>. 여러 가지 장단점으로 인하여 현재 상품화된 것은 동물 폐에서 유기용매를 이용하여 추출한 표면활성제와 DPPC에 인지질이나 유화제(emulsifier) 등을 첨가한 표면활성제 등이다.

Fujiwara는 소의 폐를 잘게 썬 데서 추출한 물질에 DPPC를 첨가한 Surfactant□ TA를 개발하였다<sup>5)</sup>. Surfactant TA는 1988년 일본에서 공인된후 널리 쓰이고 있으며, 우리나라에서도 Surfactan (Tokyo-Tanabe Co, Tokyo, Japan)이란 상품명으로 수입되어 사용되고 있다. 유기용매를 이용하여 추출한 표면활성제는 다음과 같은 장점이 있다. 합성이 아닌 자연 표면활성제이며, 표면장력을 낮추는 힘이 강력하고, 멸균되어 있으면서 단지 1-2%의 소량의 단백질질을 함유하고도 표면활성제의 기능을 발휘한다. 순수 DPPC는 제조가 간단하고 값이 저렴하나, 실제 생체 실험에서 air-water interface에 확산이 되지 않는 이유로 임상 사용이 불가능하다. DPPC와 phosphatidylglycerol (PG)혼합에다 확산제나 유화제로서 hexadecanol과 tyloxapol을 첨가한 Exosurf□(Wellcome Foundation Ltd, London, England)가 Clement 등<sup>6)</sup>에 의하여 개발되어 임상에서 활발하게 사용되고 있다. Exosurf□는 제조가 경제적이고 간단하면서 표면장력을 낮추는데 좋은 효과를 보이는 장점이 있으나, 효과면에서 유기용매 추출 표면활성제와 같지 않고 첨가제의 생물학적 영향에 대한 연구가 좀더 진행되어야한다.

본 연구는 과학기술처가 산학협동을 지원하여 기초

과학과 첨단과학을 연결시킬 중간핵심기술을 육성하고자 시행한 중간핵심개발 연구사업지원을 받아, 연세의대 소아과학교실 신생아학 연구원들과 유한양행 중앙연구실의 산학협동연구로서 개발한 소폐에서 유기용매 추출된 후 보강된 폐 표면활성제의 물리학적, 생물학적 활성도에 관한 연구보고이다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

#### 1) 폐 표면활성물질 제조 방법

살아있는 건강한 성숙 소의 신선한 양측 폐를 도살 직후 채취하여 분쇄기로 잘게 썰은후 5배의 0.9% 생리식염수 용액을 가해 1시간 동안 교반한 후 여과하여 여액을 추출물로 얻었다. 여액을 고속원심분리(8,000rpm, 4℃, 50분)해 침전물을 얻고 0.9% 생리식염수용액에 현탁시켜 저속원심분리(2,500rpm, 4℃, 10분)하여 혼입된 조직잔사를 침전물로 제거하였다. 이 원심분리 과정을 2회 반복하여 얻은 최종 상층액에 생리식염수를 첨가하여 비중을 1.2g/ml로 조정한 후 고속원심분리(8,000rpm, 4℃, 50분)로 상층(white pellicle)을 회수하고 증류수에 현탁시켜 탈염과정으로 염을 제거한 후 동결건조해 Crude Lung Surfactant(CLS)를 얻었다.

CLS에 미리 냉각된 ethyl acetate를 가하여 추출여과하고 불용물질을 건조한 후 chloroform : methanol(2:1, v/v) 혼액을 가하여 층분리로 chloroform 층만을 분리한 후 감압농축으로 solvent를 제거하고 남은 잔류물에 증류수를 가해 현탁시켰다. 현탁액을 동결건조하여 정제된 Natural Lung Surfactant(NLS)을 얻었다. NLS에 대해 성분분석과 표면활성을 측정하여 성분 재조정 과정을 통해 최종적으로 성분 재구성 표면활성제 (Modified Lung Surfactant : MLS)인 YY-38(Yonsei Yuhan-38)를 획득하였다. 38이란 38회에 걸쳐 성분 재구성을 시도한 후 확정된 표면활성제를 의미한다. 이상의 제조과정을 요약하면 Fig. 1과 같다.

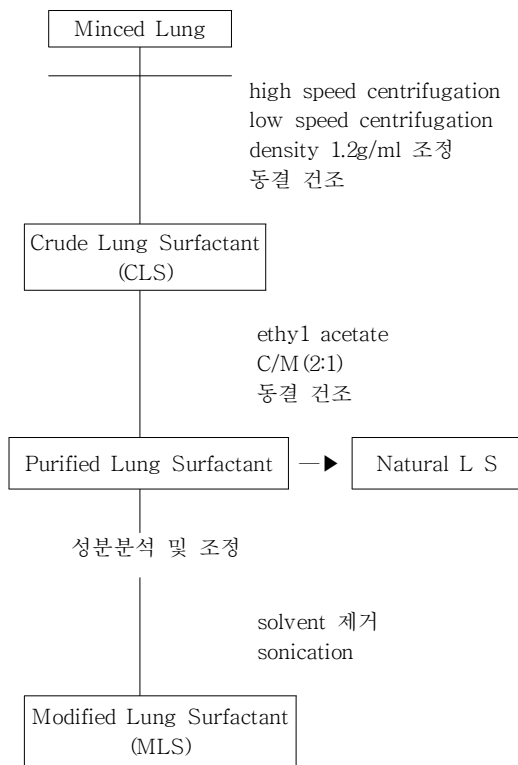
#### 2) YY-38의 화학적 조성

(1) Phospholipid의 성분 : 상기의 제조방법으로 성분 재조정 소 폐 표면활성제(MLS, YY-38)의 화학

**Table 1.** Chemical Composition of Modified Lung Surfactan (YY-38)

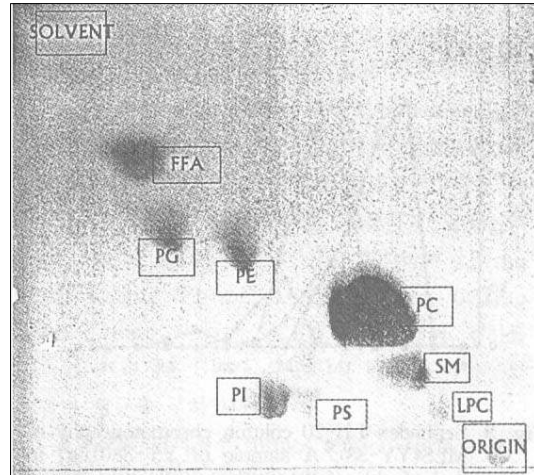
Chemical composition	%
Phospholipids	83.7±1.17
Free fatty acids	9.8±0.92
Triglycerides	3.6±0.42
Protein	1.1±0.17

mean±S.D, n=5



**Fig. 1.** Preparation of Lung Surfactant.

적 조성을 분석한 결과는 Table 1에 나타냈다. MLS는 지질성분이 97.1%, 단백질 성분이 약 1.1% 함유된 것으로 분석되었으며, 지질은 약 83.7%가 인지질(phospholipid)이고, 유리지방산(free fatty acid)이 9.8%, 트리지방산 글리세린(triglyceride)이 3.6% 함유된 것으로 나타났다. 인지질의 성분을 분석한 결과는 Table 2와 Fig. 2와 같다. 주성분은 phosphatidylcholine(PC)으로 약 80%가 함유되었으며 phosphatidylglycerol(PG), phosphatidylethanolamine(PE), sphingomyelin(SM), phosphatidylinositol(PI), lysophosphatidylcholine(LPC), phosphatidylserine(PS) 순으로 나타났다.



**Fig. 2.** 2-Dimensional thin layer chromatography of phospholipids.

- LPC : lysophosphatidylcholine
- PC : phosphatidylcholine
- PI : phosphatidylinositol
- PG : phosphatidylglycerol
- SM : sphingomyelin
- PS : phosphatidylserine
- PE : phosphatidylethanolamine
- FFA : free fatty acid

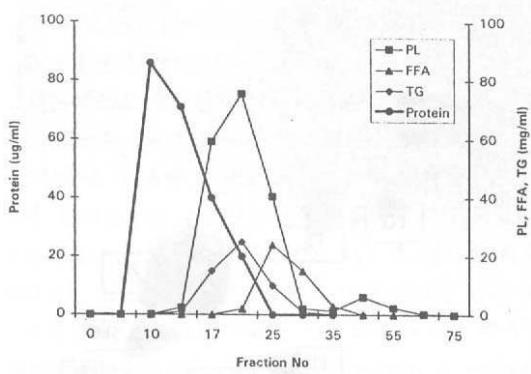
**Table 2.** Phospholipid Composition of Modified Lung Surfactant (YY-38)

Phospholipids	%
Phosphatidylcholine (PC)	80.01±4.66
Phosphatidylglycerol (PG)	6.24±2.16
Phosphatidylinositol (PI)	2.12±0.96
Phosphatidylethanolamine (PE)	5.77±1.79
Sphingomyelin (SM)	3.25±0.96
Lysophosphatidylcholine (LPC)	2.09±0.81
DSPC ( /surfactant)	48.4±1.56
( /phospholipid)	57.9±0.95

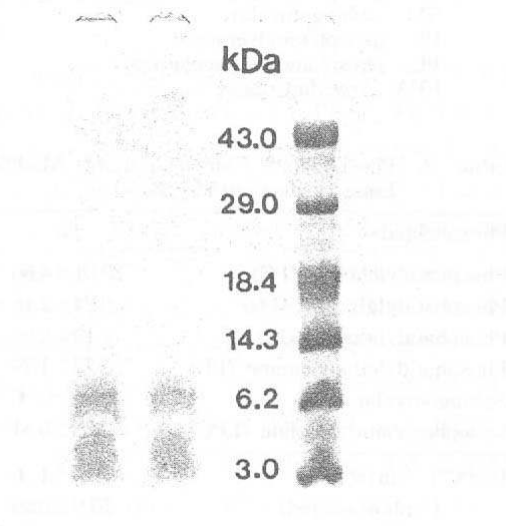
mean±S.D, n=5

특히 폐 표면 활성에 중요한 역할을 하는 성분으로 알려진 disaturated phosphatidylcholine (DSPC)은 표면활성제중에는 48%, 총 인지질중에는 58% 정도가 포함된 것으로 나타났다.

특히 폐 표면 활성에 중요한 역할을 하는 성분으로 알려진 disaturated phosphatidylcholine (DSPC)은 표면활성제중에는 48%, 총 인지질중에는 58% 정도가 포함된 것으로 나타났다.



**Fig. 3.** Sephadex LH-20 column chromatography of MLS (YY-38). A sample of YY-38 (0.5g) in 3ml of chloroform-methanol (2:1) was loaded on a column (1.5×45 cm) packed in the same solvent system and eluted with same solvent at a flow rate of 7 ml/hr.



**Fig. 4.** SDS-PAGE (15% gel) of lipoprotein fraction isolated from modified lung surfactant (YY-38).

(2) Surfactant protein (SP)의 분리 : 폐 표면활성물질의 성분중 SP의 역할은 아직까지 정확히 밝혀 지지는 않았지만 신생아 호흡부전증 치료의 표면활성제 보충요법에서는 거의 필수적인 성분으로 알려져 있으며 protein-free synthetic surfactant 와 natural lung surfactant 의 가장 중요한 차이점중 하나이다. 특히 SP-B 와 SP-C가 중요성분으로 표면확산

(surface spreading)과 표면장력의 감소에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>7, 8)</sup>.

Lipoprotein을 분리하기 위해서 Sephadex LH-20 Column을 사용하였으며 용출모양은 Fig. 3에 나타냈다. 앞 부분에서 분리되어 나온 단백분획을 모아 용매를 제거한 후 SDS-PAGE 전기영동법으로 확인한 결과는 Fig. 4와 같다. SDS-PAGE 결과에 의하면 2-mercaptoethanol를 가한 환원조건에서 분자량 10,000이하의 2개의 띠를 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 최근의 여러 문헌에서 발표된 SP-B, C와 유사한 것으로 보였다<sup>9-11)</sup>.

## 2. 연구 방법

새로이 개발된 YY-38을 실험군으로, 대조군으로는 YY-38을 용해하는데 사용된 용매인 생리 식염수를 사용하였다.

### 1) 물리학적 활성도에 관한 연구

(1) 안정 소포 검사 (stable microbubble test, SMR): 본 연구에서는 대단히 낮은 농도로 검체가 희석되기 때문에 Pattle 등의 방법<sup>12)</sup>을 다음과 같이 약간 변형된 방법으로 시행하였다.

① YY-38을 50µl정도 micropipette으로 취하여 덮개유리위에 떨어뜨리고 pasteur pipette을 수직이 되도록 세운후 6초 동안 약 20회의 리드미칼한 음이 나도록 거품을 낸다.

② 거품을 낸 후에는 덮개유리를 뒤집어 hole glass 위에 얹고 4분 동안 둔다.

③ 100배로 관찰하여 1mm<sup>2</sup> 중의 직경 < 15µm인 소포의 수를 산정한다.

④ 매 실험시에 안정소포의 수는 소포가 가장 많은 한곳만 세고 실험을 각각 5회를 실시하여 평균을 구하였다. 이유는 위액을 이용한 경우 검사시에는 소포 수가 적어 5시야의 평균이 가능하나 표면활성제 실험에서는 거품수가 너무 많고 시야마다 소포수의 차이가 대단히 크기 때문이다.

⑤ 한곳에서만 소포의 수를 셀 때 1mm<sup>2</sup>의 4칸 중에서 1칸의 수를 세어 ×4로 계산하였다. 한곳의 현미경시야 선택은 소포의 수가 가장 많고 균일한 곳으로 하였다.

YY-38의 농도 5mg PL/ml를 생리식염수를 이용

하여 1mgPL/ml로 희석하였다. 1mgPL/ml를 다시 생리식염수와 혼합하여 연속적으로 희석하여, 실험농도는 250 $\mu$ gPL/ml, 200 $\mu$ gPL/ml, 125 $\mu$ gPL/ml, 100 $\mu$ gPL/ml, 62.5 $\mu$ gPL/ml, 50 $\mu$ gPL/ml, 31.25 $\mu$ gPL/ml, 25 $\mu$ gPL/ml로 8가지 농도에서 검사하였다.

(2) Pulsating bubble surfactometer (PBS, Electronics Corp. Amherst, NY, USA)를 이용한 물리학적 활성도 측정 : 액체내에서 기포의 표면장력의 변화는 기포의 안정성에 영향을 미친다. 한개의 기포 모델에서 기포의 반경은 표면 장력과 표면압, 용적과 상관관계를 가진다. 연속적으로 기포를 팽창-수축을 반복할 때의 압력곡선을 측정하여 기포의 만곡도를 표시할수 있다. 이러한 원리를 이용한 PBS를 사용하여 최대와 최소 표면장력을 측정한후 표면장력-면적곡선을 얻을수 있다<sup>13)</sup>.

PBS는 1) sample chamber 2) pulsator unit 3) pressure-recording unit 등 세가지 주요부분으로 구성되어 있다. Sample chamber는 일회용으로 나일론과 테프론이 재질로서 필요한 검체의 양은 최소 20 $\mu$ l이다. Chamber는 섭씨 37도의 수조에 잠겨진 상태에서 검사가 시행되며, chamber의 상단은 공기와 작은 관을 통하여 연결되어 있다. 규칙적으로 움직이는 pulsator에 의해 분당 20회의 가압과 감압의 주기가 생성된다. 매 주기마다 기포는 수축과 팽창을하는데 직경이 최소 0.8mm에서 최대 1.1mm까지, 이에 따라 용적은 0.27에서 0.70 $\mu$ l, 표면적은 최소 1.8mm<sup>2</sup>에서 최대 3.6mm<sup>2</sup>까지 변함으로, 기포의 최소표면적은 최대 표면적의 50%까지 축소된다. 변화되는 압력은 0-30Torr의 미세한 변화를 감지할수 있는 transducer를 통한후 증폭되어 기록된다. 표면장력이 계산되는 원리인 LaPlace의 법칙은  $\Delta P = 2\gamma/r$ 이다.  $\Delta P$ 는 대기와 통해있는 기포 내벽의 압력과 검체와 면하는 기포 외벽의 압력차이며,  $\gamma$ 는 표면장력을, r는 반경을 뜻한다. 이때 transducer를 통하여 측정되는 압력이 바로  $\Delta P$ 이며, r은 기포의 반경을 나타내므로 이미 알고 있는 수치이기 때문에 표면장력  $\gamma$ 이 구해진다. 표면장력의 단위는 mN/m(dyne/cm)로 표시된다. 최대와 최소 기포를 만들기 위해 pulsator가 한 주기를 만드는 동안 0.06초마다 표면장력과 기포의 직경, 표면적 등이 PBS Graphic Series 2000 Software

Package에 의하여 컴퓨터에 초당 48회 저장된다. 5분간 측정된 자료중 본 연구에서는 1분과 5분의 자료를 분석하여 표면장력-면적곡선을 구하고 해리상태를 관찰하였다.

a) 최소 및 최대 표면장력( $\gamma$ -min &  $\gamma$ -max)

Sample chamber내에 검체를 넣고 기포가 팽창된 후 15초이후부터 분당 20회의 지속적 pulsation을 하여 매회 직경 0.8mm의 최소 직경에서 최소표면장력을, 1.1mm의 최대직경 기포에서 최대표면장력을 측정한다. YY-38을 생리식염수를 사용하여 용해시켜 5mg PL/ml의 농도를 만든후 연속 희석하여 2.5 mg PL/ml, 1.25mg PL/ml, 0.63mg PL/ml, 0.31mg PL/ml, 0.16mg PL/ml 등 6개의 농도에서 검사를 시행하였다. 측정은 5분간 시행하며, 매 농도마다 5회 측정하여 평균을 구하였다.

b) 표면장력-면적곡선(surface tension-surface area diagram, ST-SA diagram)

기포의 직경을 1.1mm에서 0.8mm까지 압축하면, 기포 표면면적의 변화는 3.6mm<sup>2</sup>에서 1.8mm<sup>2</sup>으로 50%가 감소한다. 이러한 표면면적의 변화에 따른 표면장력의 변화를 측정하여 표면장력-용적곡선을 그리고 이때 폐표면활성제의 농도별 해리(hysteresis)를 도시한다.

c) 표면장력 10mN/m에서 압축도(compressibility) 10mN/m의 표면장력에서 압축도를 구하는 공식은 다음과 같다.

$$C = (1/A) \times (dA/d\gamma).$$

C = compressibility

A = 10mN/m에서 기포의 면적

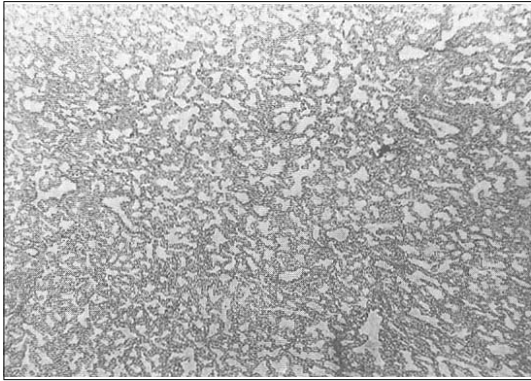
dA = 10mN/m 전후에서 기포의 면적변화

d $\gamma$  = 10mN/m 전후에서 기포의 표면장력 변화

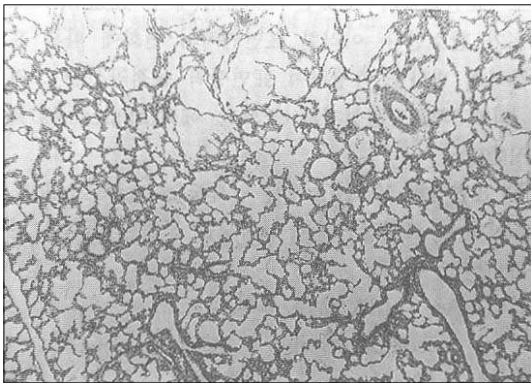
컴퓨터에 입력된 자료중 상기 공식에 필요한 결과를 이용하여 압축도를 계산하였다.

2) 토끼 태자를 이용하여 폐표면활성제의 생물학적 활성도 측정

(1) 토끼 미숙 태자의 폐 압력-용적곡선 (pressure-volume curve): 토끼는 30일이 만삭으로 27일의 토끼 태자폐는 전부 신생아호흡곤란증을 나타내어 좋은 실험모델이 된다. 암수 토끼를 합사한후 수정여부는 암



**Fig. 5.** Alveolar expansion pattern in ventilated preterm rabbit after normal saline administration (H-E stain,  $\times 40$ ).



**Fig. 6.** Alveolar expansion pattern in ventilated preterm rabbit after YY-38(25mg PL/kg) administration (H-E stain,  $\times 40$ ).

토끼 질내의 정충으로 임신 여부를 확인하였다. 합사만 27일에 ketamine hydrochloride 치사량을 토끼에게 정맥주사한후 즉시 제왕절개를 실시하였다. 양막이 터지지 않은 상태로 태자분만을 하면서 호흡에 의한 폐확장을 막기 위하여 첫 호흡전에 주둥이부분 전체를 무명사로 결찰하였다. 각각 토끼태자의 무게를 측정후 양측 서혜부에 깊은 절개를 가하여 대퇴 동맥과 정맥을 절단하여 체내에서 혈액을 제거하였다. 기관절개 후 삽관의 기관내 투입 확인은 흉곽을 약하게 눌러서 폐액이 삽관으로 유출되는 것으로 하였다. 삽관을 통하여 YY-38을 인지질기준 25mg/kg의 용량으로 폐에 투여하였다.

폐용적 측정은 다음과 같이 하였다. 각 토끼 태자

기관내 삽입된 관을 유리관(내경 3mm, 길이 약 110cm)에 연결하였다. 유리관은 연결된 폐의 용적변화를 측정하기 위한 것으로 실험전에 유리관에 물을 넣어 단위 길이당 용적을 계산하였다. 유리관 15개에서 각각의 길이당 용적을 측정후 평균값을 구하여 유리관 1mm 당 0.0068ml의 용적으로 환산하였다. 실험중 태자 폐 팽창시 용적측정은 유리관에 유색의 물기등을 주입하여 기준을 정한후에 폐팽창에 따라 움직인 물기등의 거리로 환산된다. 펌프(Atom exchange trans-fusion pump)를 통하여 일정한 속도로 공기를 폐에 주입하면서 수압계를 부착하여 투여압력을 측정하였다. 압력은 0cm H<sub>2</sub>O에서 시작하여 매 5cm H<sub>2</sub>O씩 가압하여 최대 30cm H<sub>2</sub>O까지 가압하였다. 가압시 공기도 압축됨으로 공기압축계수 [압력(cm H<sub>2</sub>O) $\times 1.2$ ]도 고려하였다. 30cm H<sub>2</sub>O까지 가압시에 매 5cm H<sub>2</sub>O 단위마다 공기 압축에 의하여 물기등이 이동하는 거리를 계산하여 실제 이동한 물기등의 거리에서 감하였다. 폐용적(ml/kg)의 계산 공식은 다음과 같다.

$$[\text{실제 물기등이 움직인 거리 (mm)} - \text{압력 (cmH}_2\text{O)} \times 1.2] / \text{태자무게 (gm)} \times 0.0068 \times 1000$$

가압중 기흉이 발생하여 실험이 불가능한 토끼태자는 실험에서 제외하였다. 30cm H<sub>2</sub>O에서 약 2분간 쉬후에 다시 5cm H<sub>2</sub>O 씩 감압하여 0cm H<sub>2</sub>O까지 감압하였다. 가압 및 감압에서 폐의 용적을 매 5cm H<sub>2</sub>O마다 구하였으나 감압시 폐용적이 가압시 폐용적보다 효과적인 정지상태의 압력과 폐용적과의 관계를 나타내므로 본 연구에서는 감압시 결과만 사용하였다<sup>14)</sup>.

(2) 확장된 폐 부분의 비(aerated area ratio): 폐 압력-용적을 측정한 뒤 동적상태에서의 폐확장 정도를 측정하기 위하여 토끼 태자 폐를 20분간 분당 20회, 20cm H<sub>2</sub>O의 최대 흡기압력으로 하여 강제 인공호흡을 실시하였다<sup>14)</sup>. 토끼 태자 폐를 분리적출하면서 육안으로 기흉의 존재여부를 확인하였으며 기흉이 확인된 경우는 실험에서 제외하였다. 10cm H<sub>2</sub>O압력으로 폐 전체를 확장 시킨후 확장 상태의 압력하에서 기관삽관을 폐쇄시키고 10% 포르마린용액내에 토끼 태자 폐를 4일간 고정하고 조직절편을 만들어 hematoxylin-eosin으로 염색 하였다(Fig. 5, 6). 확장된 폐와 허탈된 폐의 비를 산출하기 위하여 image analyzer (IBAS-2000)를 이용하여 음영 대비를 주어 전체 폐

면적과 공기로 확장된 부위를 측정하였다<sup>15)</sup>. 전체 폐면적을 산출할 때 기관지, 혈관 등은 제외하였다. 태자폐는 5mm 두께로 심장위치에서 횡측으로 절단된후 검사하였다<sup>16)</sup>. 동일한 방법으로 5개 부위를 검사하여 평균을 산출하였다.

## 결 과

개발초기부터 개발완료까지 전부 38차에 걸쳐 조성 및 추출과정을 각각 달리하여 bovine lung surfactant를 제조하였다. 각 제조 lot마다 물리학적 및 생물학적 활성도 검사를 각각 시행하였다. 물리학적 활성도는 매 검체마다 5회 반복하여 평균을 산출하였고, 생물학적 활성도는 매 lot마다 최소 8마리 이상의 토끼태자를 실험동물로 사용하여 평균을 구하였다. 아래의 결과는 최종으로 확정된 38차 조성변경 폐표면활성제 (YY-38)에 대한 결과이다.

### 1. 물리학적 활성도에 관한 연구

#### 1) 안정 소포 검사 (stable microbubble test, SMR)

개발된 표면 활성제(YY-38)를 낮게는 인지질 농도 25 $\mu$ g/ml부터 높게는 250 $\mu$ g/ml농도까지 8개 농도군에서 각각의 소포수를 측정하였다. 표면 활성제 농도와 소포의 수는 거의 직선 관계에 있었다. 고농도(250 $\mu$ g/ml)에서 소포수는 730개였으며, 가장 낮은 농도인 25 $\mu$ g/ml에서 142개가 형성되었다. 양수내 폐성숙을 나타내는 소포의 수는 20개/mm<sup>2</sup>이다. SMR검사에서는 아주 저농도에서부터 소포형성을 충분히 하는것으로 나타났다. 생리식염수에서는 전혀 소포가 관찰되지 않

**Table 3.** Stable Microbubble Count of YY-38

Concentration( $\mu$ g PL/ml)	SMR (/mm <sup>2</sup> , Mean $\pm$ SD)
25	142 $\pm$ 19
31	146 $\pm$ 27
50	222 $\pm$ 48
62	254 $\pm$ 34
100	365 $\pm$ 81
125	366 $\pm$ 101
200	716 $\pm$ 67
250	730 $\pm$ 55

았다(Table. 3).

### 2) Pulsating bubble surfactometer를 이용한

#### 물리학적 활성도 측정

#### a) 1분과 5분의 최소, 최대 표면장력

YY-38은 낮게는 0.16mg/ml부터 높게는 5mg/ml까지 6가지 인지질농도에서 pulsation후 1분과 5분의 최소표면장력이 각각 큰 차이없이 안정적 수치를 나타내었다. 이상적인 표면 활성제는 최소표면장력이 10 mN/m이하라야 한다. YY-38는 1분과 5분의 최소 표면장력이 모든 농도에서 전부 10mN/m의 낮은 표면장력을 나타내었다. 농도 5mg/ml에서 5분에 최소표면장력은 5.10mN/m였다. 최대표면장력은 1분 및 5분에서 모든 농도에서 33.01mN/m-41.07mN/m 사이에 위치하였다. 생리식염수는 최소표면장력이 1분과 5분에 각각 65.17 $\pm$ 4.56mN/m, 43.34 $\pm$ 5.75mN/m이며, 최대표면장력은 1분과 5분에 각각 72.72 $\pm$ 2.10mN/m, 66.89 $\pm$ 2.80mN/m였다(Table 4, 5).

#### b) 표면장력-면적곡선(surface tension-surface area)

**Table 4.** Minimum and Maximum Surface Tension of YY-38 after 1 Minute of Pulsation

Conc. (mg PL/ml)	Surface tension(mN/m, Mean $\pm$ SD)	
	Minimum	Maximum
0.16	7.67 $\pm$ 0.47	39.63 $\pm$ 1.42
0.31	6.98 $\pm$ 2.38	36.07 $\pm$ 1.15
0.63	5.79 $\pm$ 0.75	36.13 $\pm$ 1.51
1.25	5.27 $\pm$ 0.76	35.90 $\pm$ 2.38
2.50	4.65 $\pm$ 1.66	36.13 $\pm$ 1.75
5.00	4.31 $\pm$ 1.32	35.17 $\pm$ 0.45
Normal saline	65.17 $\pm$ 4.56	72.72 $\pm$ 2.10

**Table 5.** Minimum and Maximum Surface Tension of YY-38 after 5 Minute of Pulsation

Conc. (mg PL/ml)	Surface tension(mN/m, Mean $\pm$ SD)	
	Minimum	5 Maximum
0.16	7.89 $\pm$ 0.67	41.07 $\pm$ 2.70
0.31	5.82 $\pm$ 0.51	35.77 $\pm$ 1.39
0.63	5.40 $\pm$ 0.43	36.26 $\pm$ 0.99
1.25	4.77 $\pm$ 1.35	35.11 $\pm$ 2.62
2.50	5.55 $\pm$ 0.60	37.00 $\pm$ 1.22
5.00	5.10 $\pm$ 0.34	36.33 $\pm$ 0.78
Normal saline	43.34 $\pm$ 5.75	66.89 $\pm$ 2.80

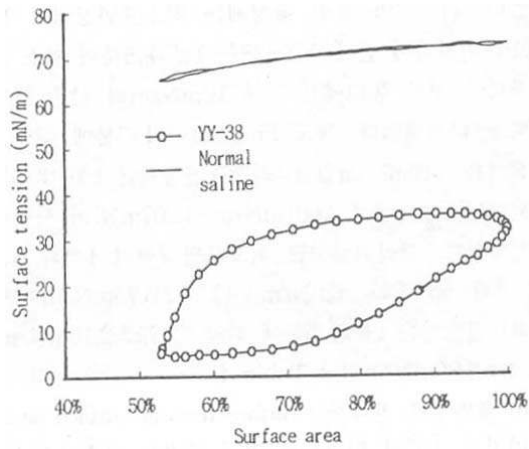


Fig. 7. Surface area-surface tension diagram of YY-38(5mg PL/ml) and normal saline at 1 minute of pulsation.

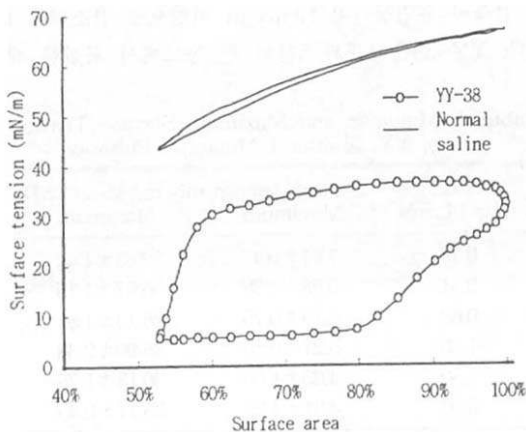


Fig. 8. Surface area-surface tension diagram of YY-38(5mg PL/ml) and normal saline at 5 minutes of pulsation.

일정한 속도와 압력으로 일정 면적을 압축시켰다가 다시 원상태로 회복시키는 주기를 반복하면서, 압축과 감압축 주기의 면적과 표면장력을 도형으로 표시하는 것이다. 효과적인 표면 활성제는 최소, 최대 표면장력 사이의 동적곡선의 헤리가 확실하여야 하며, 20% 표면적 압축시 표면장력이 10mN/m 미만으로 감소되어야 한다. YY-38은 1분과 5분의 전 농도에서 확실한 헤리를 나타내었으며, 20% 표면적 압축시 1분에서 11.01±3.42mN/m, 5분에 7.14±1.0mN/m으로 1분에서

Table 6. Surface Tension of YY-38 at 20% Compression of surface Area after 1 and 5 Minutes of Pulsation

Conc. (mg PL/ml)	Surface tension(mN/m, Mean±SD)	
	1 minute	5 minute
0.16	9.69±1.78	9.92±2.91
0.31	9.50±2.97	6.81±0.73
0.63	9.95±2.77	6.57±0.34
1.25	9.66±3.12	7.64±2.05
2.50	9.32±2.97	6.71±0.51
5.00	11.01±3.42	7.14±1.00
Normal saline	71.35±1.53	60.13±5.38

는 10mN/m 이상이었으나 5분이 경과된 후에는 10mN/m 미만으로 감소되었다. 생리식염수에서는 전혀 헤리곡선이 관찰되지 않았다. 20% 표면압축시 표면장력이 1분에 71.35±1.53mN/m 5분에는 60.13±5.38mN/m 였다(Table 6)(Fig. 7, 8).

c) 표면장력 10mN/m에서 압축도(compressibility)

10mN/m의 표면장력에서 0.02cm/dyne 미만의 낮은 압축도를 나타내는 것은 폐표면활성물질이 형성하는 단표면막(monolayer)에 saturated fatty acid chain이 높은 농도로 존재한다는 것을 의미한다. 표면 압축도가 낮으면 최소의 면적변화로부터 표면 장력을 최대로 낮출수 있기 때문에 폐포의 안정성을 유지하는데 중요하다.

YY-38은 1분과 5분에서 측정한 결과 1분의 0.625mg/ml와 1.25mg/ml에서 각각 0.02083cm/dyne과 0.02000cm/dyne를 나타낸 것을 제외하고는 전 농도에서 압축도가 0.02cm/dyne미만이었다.

대조군인 생리식염수는 최소 표면장력이 10mN/m 이상이어서 압축도 산출이 불가능하였다

## 2. 토끼 태자를 이용하여 생물학적 활성도 측정

### 1) 토끼 미숙 태자의 폐 압력-용적곡선 (pressure-volume curve)

토끼 미숙 태자 폐를 이용한 폐 압력-용적곡선에서 가압보다는 탈기시의 감압 압력-용적곡선이 더 의미를 지닌다. 또한 마지막 감압 직전인 5cm H<sub>2</sub>O 압력에서 폐 용적이 폐의 허탈 정도를 예견하는 지표로 중요하게 사용된다.

YY-38은 최대 30cm H<sub>2</sub>O 가압후 감압시작 직전에



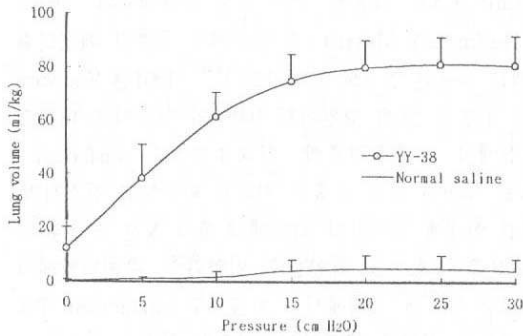


Fig. 9. Pressure-volume curve of YY-38(25mg PL/kg) and normal saline during deflation.

토끼 태자 폐 용적이  $80.9 \pm 0.7$  ml/kg까지 증가하고, 5cm H<sub>2</sub>O까지 감압하여도  $38.3 \pm 2.4$  ml/kg의 폐 용적을 유지하였다. 대조군으로 사용된 토끼태자 8예에서는 30cm H<sub>2</sub>O 가압시에  $3.8 \pm 4.5$  ml/kg, 5cm H<sub>2</sub>O 압력에서는  $0.7 \pm 0.5$  ml/kg의 폐용적을 유지하였다(Fig 9).

#### 2) 확장된 폐 부분의 비(aerated area ratio)

물리학적 연구보다 동물을 이용한 생체실험이 훨씬 실제에 가깝다. 그러나 폐 압력-용적곡선의 결과처럼 정지상태의 실험은 혈청 알부민 등에 의한 폐표면활성제의 불활성화를 예측하는데 제한이 있기 때문에 동적 생체실험이 요구된다. 단 1회의 폐압력-용적곡선 측정 후에 일정기간 태자폐를 강제호흡 시킨후 그 조직학적 개선 및 폐확장정도를 측정하였다.

YY-38 투여후 전체 폐 면적당 확장된 부분의 비율은 YY-38은  $45.4 \pm 4.0\%$ 로서 폐 확장 및 조직학적 개선이 관찰되었다. 생리 식염수를 투여한 대조군의 폐 확장은  $4.2 \pm 2.3\%$ 로 관찰되었다.

### 고 찰

폐표면활성제는 재태주령 20주에 이미 태아 폐세포 내에 높은 농도로 존재하며, 재태주령 26주에 이르러 폐포강에 나타나고, 양수내에는 재태주령 31주경에 나타난다. 폐에서 양수로 폐표면활성제가 배출되는 데는 약 5주의 시간적 차이가 존재한다. 폐표면활성제는 공기와 폐포의 접촉면의 표면장력을 감소시키며, 그 영향으로 호기시에 폐포가 완전히 쭈그러 드는것을 방지

한다. 폐표면활성제에 의하여 형성된 표면막은 호흡중에 일어나는 폐포변화에 따라 확장과 수축을 반복한다. 폐표면활성제 표면막은 다음 세가지 특성을 가지고 있어야 한다. 1)공기와 액체의 중간면 표면에 빨리 흡착되어야 한다. 2)안정된 막을 형성하여 대단히 낮은 표면장력을 유지할 수 있어야 한다. 3)형성된 막이 호기시에 수축되었다가 즉시 다시 퍼져서 다음 호흡시에 폐표면활성제의 새로운보충을 필요하지 않아야 한다. 폐표면활성제의 주요성분은dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC, lecithin), phosphatidylglycerol (PG), apoprotein(surfactant protein:SP-A, B, C), cholesterol 등이다. 그 성분비는 인지질이 85%, 중성지질(neutral lipid)이 5%, apoprotein이 5%, 기타 5%로 구성되어 있다. 그중에서 표면장력을 감소시키는데 결정적인 역할을 하는것이 DPPC이다<sup>17)</sup>.

현재까지 개발이 시도된 폐표면활성제의 종류는 매우 다양하다. 인간의 폐 세척에 의해 얻어지는 폐표면활성제는 동종 폐 표면활성제로서 여러가지 인지질, 중성지방과 단백 등을 포함하며, 다음의 두가지 단점이 있다. 첫째, 많게는 10%까지 단백질을 보유하는데 실제 미숙아에서 보충요법에 필요한 폐표면활성제로서 이런 대량의 단백질은 필요하지 않다. 둘째, 살균하는 과정에서 역가가 심하게 감소된다<sup>4)</sup>. 폐표면활성제는 만삭에 가까와지면 태아폐로 부터 양수로 나오게된다. 양수에서 추출된 폐표면활성제는 인간으로부터 추출되고 모든 폐표면활성 단백을 포함하고 있기 때문에 보충요법에 가장 적합하다. 그 구성은 saturated PC가 34%, 그외 인지질이 5%, 중성지질이 19%(주로 cholesterol 과 free fatty acid), SP-A를 포함한 단백질이 6%이다. 이중단백이 포함되어 있지는 않지만, 추출되는 양이 소량이라서 임상적으로 널리 쓰기에는 제한이 있다. 또한 cytomegalovirus, HIV, herpes virus 등의 감염위험이 따른다<sup>18-20)</sup>.

유기용매제를 사용하여 추출한 폐표면활성제(organic solvent extract of surfactant)가 현재 가장 널리쓰이고 있다. 일본의 Fujiwara<sup>5)</sup>, 미국의 Shapiro<sup>21)</sup>, 캐나다의 Goran Enhorning 등<sup>22)</sup>은 유기용매를 이용하여 폐표면활성제의 지방성분만을 추출하는 연구를 각각 시도하여 단백질을 98-99%까지 제거한 폐표면활성제를 개발하였다<sup>4)</sup>. 그러나 이렇게 동물에서 추출한 여러가

지의 인지질을 연구한 결과 인지질 단독으로는 기도의 장력이 안정화 될 수 없다는 결론에 도달하였다. 유기용매 추출 폐표면활성제에는 두개의 소수성 저분자량 단백질(SP-B, C)이 포함되어 있다. Enhorning과 Shapiro 등은 소 폐를 씻어낸후 원심분리하여, Robertson 등은 소와 돼지의 잘게 썬 폐로부터 chromatographic 방법으로 추출한 폐표면물질을 연구하였다<sup>23</sup>. Fujiwara는 소의 폐를 잘게 썬 데서 추출한 물질에 DPPC를 첨가한 Surfactant TA를 개발하였다<sup>5</sup>.

소폐를 갈아 얻은 추출물에서 crude surfactant 를 분획 원심분리법과 부동법(floatation)을 이용하여 1.2gm/ml로 농도 조정된 뒤 에틸 아세테이트를 이용하여 콜레스테롤을 제거하였다. 그후 chloroform-methanol로 추출하였다. 그 뒤 합성 DPPC, palmitic acid, triacylglycerol 을 첨가하여 최종산물을 인지질 84%, tripalmitin 7%, palmitic acid 8%와 소수성 단백질(hydrophobic protein) 1%로 하였다. 이 혼합물을 chloroform에 용해한후 고압여과법(high pressure filter system)으로 살균하였다. 분말로 제품화되어 사용전 생리식염수로 녹여 사용한다. Surfactant-TA의 변형인 Survanta<sup>□</sup>(Abbot, North Chicago, IL, USA)는 을 가압증기멸균법으로 살균하고 액상으로 제품화되어 냉동보관시킨후 사용직전에 병에서 뽑아 사용하는것이 차이점이다. Surfactant TA는 1988년 일본에서 공인된후 널리 쓰이고 있다. 유기용매를 이용하여 추출한 폐표면활성제의 장점은 자연 폐표면활성제이며, 표면장력을 낮추는 힘이 강력하고, 멸균되어 있으면서, 1-2%의 소량의 단백질을 함유하고도 폐표면활성제의 기능을 발휘한다. 반면에 단점은 소량의 단백질이라도 동물단백이라는 점과 최종산물에서 유기용매를 완전히 제거하기가 어려운점이다. SP-A는 친수성이 있어 유기용매 추출시 포함되지 않으며 폐표면활성제가 type II pneumocyte로 들어가 재활용되는 것을 돕는다. 본 연구에서 개발된 폐표면활성제는 성숙한 소 폐를 갈아서 crude lung surfactant(CLS)를 추출하여 얻고 유기용매 추출법으로 natural lung surfactant(NLS)를 획득하였으며 NLS를 기본으로 성분을 보강해 성분제 조정 폐표면활성제(modified lung surfactant, MLS)를 제조한 것이다. 개발된 YY-38의 화학적 성분조성

은 disaturated phosphatidylcholine (DSPC; DPPC)이 가장 많아 48% 이상이였으며, 분자량 10,000 이하의 surfactant-associated protein (SP-B, C)이 1% 이내로 나타났다. 이러한 분석 결과는 Surfactant-TA의 성분조성과 유사한 것이다<sup>20</sup>.

임상에서는 1980년 일본의 Fujiwara에 의하여 소폐에서 추출된 성분 보강 폐표면활성제인 Surfactant-TA를 사용한 것이 처음 발표되었다<sup>5</sup>. 1985년 Hallman과 Merritts가 양수에서 추출한 폐표면활성제를 사용한 연구도 보고하였다<sup>19</sup>. 1991년 Fujiwara 등은 일본의 21개 병원에서 100명의 미숙아를 대상으로 신생아 호흡곤란증의 치료요법으로 surfactant-TA를 투여한 결과 호흡기 치료의 의존도를 감소시켜, 6시간 이내에 투여군의 54%에서 흉부 X선 소견상 호흡부전증의 호전을 확인할수 있었다<sup>24</sup>. 우리나라에서는 남궁 등<sup>25</sup>이 국내에서는 처음으로 surfactant-TA를 사용한 임상보고를 하였으며 배 등<sup>26</sup>이 다기관 사용성적을 보고하였다.

합성제품으로 DPPC에 인지질이나 유화제(emulsifier) 등을 첨가한 폐표면활성제도 개발되었다. 순수 DPPC는 제조가 간단하고 값이 저렴하나, 실제 생체 실험에서 air-water interface에 확산이 되지 않는 이유로 임상사용이 불가능하다<sup>4</sup>. DPPC 70%에 phosphatidylglycerol (PG) 30%를 첨가한 ALEC(artificiallung-expanding compound)는 Morley와 Bangham<sup>27</sup>에 의하여 개발되었으며, 제조가 쉬우며 값이 싸다는 장점이 있다. 그러나 표면장력을 감소시키는 효과가 약하고, 투여후 수시간후 효력이 나타난다는 단점이 있다. 합성 폐표면활성제로는 John Clements에 의하여 개발된 Exosurf<sup>□</sup>가 있는데<sup>28</sup>, 이는 DPPC와 PG를 혼합한후 alcohol인 hexadecanol을 첨가하고 분산을 돕기 위하여 tyloxapol도 추가하였다. 1987년에 첫 임상연구가 시작되었으며, 현재 미국에서 공인되었다. 1992년 미국에서 23개 병원이 출생체중 700gm 미만의 초극저출생체중아 215명을 대상으로 단회의 예방요법을 실시한 결과, 투여군에서 투여 2시간에서 6시간 이내에 산소요구량 및 호흡지수의 호전이 있었으며, 이러한 호전은 생후 3일까지 지속되었고, 기흉 및 RDS에 의한 사망율도 감소하였다고 보고하였다<sup>29</sup>. Exosurf<sup>□</sup>는 제조가 경제적이고 간단하면서 표

면장력을 낮추는데 장점이 있으나, 효과면에서 유기용매 추출 폐표면활성제와 같지 않고 첨가제의 생물학적 영향에 대한 연구가 좀더 진행되어야한다<sup>30</sup>.

폐의 성숙도를 검사하기 위하여 여러가지 방법들이 사용되고 있다. 양수에서 lecithin/sphingomyelin 비율 검사<sup>31</sup>, 위 흡인액에서 shake test 등<sup>6</sup>이 있으나 검사의 간편성, 정확도, 혈액오염시 부정확성 등에서 안정소포검사보다 못하다. 이러한 태아 폐성숙 검사의 위양성율은 shake test는 1%에서, L/S ratio에서는 1.5%였으나 안정소포 검사에서는 0.6%로 가장 위양성율이 낮았다<sup>12</sup>. Pattle이 발표한 안정소포검사는 15 $\mu$ m보다 작은 직경의 소포를 형성시켜 그 숫자에 의하여 표면활성도를 측정하는 방법이다<sup>12</sup>. 안정성이란 표면장력 감소가 발생하여 안정된 소포를 형성하는 능력을 뜻하며 폐표면활성제의 surfellic property에 의하여 결정된다. 이때 안정소포란 30초 이상 계속 터지지 않고 소포 모양을 유지하는 방울을 의미하며, 안정소포의 수는 폐표면활성 물질의 검출 양을 측정하는데 유용하다. 표면활성제의 농도와 소포수는 비례하지만, 동일 농도에서는 합성 폐표면활성제보다는 동물에서 추출한 보강 폐표면활성제가 훨씬 많은 소포를 생성한다<sup>32</sup>. YY-38도 농도에 따라 소포수가 증가하고 아주 낮은 희석 농도에서도 충분한 소포를 형성하였다.

표면장력의 측정은 Clements에 의한 변형된 Wilhelmy balance를 이용한 방법<sup>33</sup>이 널리 쓰인다. 호흡 중 표면장력은 흡기시 폐포가 축소되어 표면적이 감소하면서 표면장력도 감소하며, 호기시에는 반대로 표면적이 증가하면서 표면장력도 커진다. Wilhelmy balance는 이러한 원리를 이용하여 수조의 온도를 섭씨 37 $\pm$ 0.5도를 유지시키면서 일정액상의 표면적을 압축-감압축 시키면서 최소 및 최대 표면장력을 구하는 동시에 면적과 표면장력의 관계에서 도시되는 헤리곡선(hysteresis)을 구한다. 그러나 Wilhelmy balance의 단점은 기술적인 면에서는 측정용 수조(trough)를 50ml의 생리식염수로 채운후 소량의 검체(20mg phospholipid/ml 농도에서 약 80 microgram phospholipid 검사)를 투여하기 때문에 검체가 크게 희석된다는 점과, 표면활성제가 유기용매에 녹여져 있기 때문에 검사 수조내에서 생리식염수의 전체가 아닌 상부표면에서만 평평한 막을 형성하는 점이다. 생리적인 면

에서도 검체는 원형인 폐포와 달리 편평한 표면상태에서 검사가 이루어지고, 최대 최소 표면적을 구하기 위하여 시행하는 압축과 감압축 속도가 정상 호흡보다 낮은 분당 3.3회이기 때문에 호흡 생리와 맞지 않는다<sup>13</sup>. 본 연구에서 사용된 Enhorning의 pulsating bubble technique은 검체를 채운 chamber 내에서 소포가 형성되고 이 소포는 폐포처럼 대기와 직접 연결되어 있으면서 pulsator에 의하여 소포의 크기가 조절되며 분당 20회의 압축-감압축 주기로 표면장력이 측정된다는 장점이 있다. Pulsating bubble technique을 이용할 때 드물게 기포의 크기가 최소에서 표면장력이 0에 가까워지면 LaPlace법칙에 의하여  $\Delta P$ 도 0에 가까워져 기포원형의 상태가 깨져서 수직보다 수평의 직경이 커지게 되면서 최소 표면장력이 허수로 증가하는 경우가 있다. 그러나 이러한 경우에 검사자가 PBS 기계에 부착된 접안경으로 기포의 형태를 관찰하면서 검사를 시행하기 때문에 검사결과에서 제외시켰다. 이러한 현상은 검사 대상의 폐표면활성제의 농도가 증가하여 표면장력이 매우 낮아질수록 자주 관찰되었다. LaPlace의 법칙( $\Delta P=2\gamma/r$ ) 의하면 표면장력이 변하지 않고 고정되어 있으면 폐포의 안정성이 나빠진다. 호기시에 폐포의 직경이 작아지면 동시에 표면장력도 감소해야 폐포내외의 압력차이인  $\Delta P$ 도 감소하여 폐포의 허탈이 발생하지 않는다. Clements 등<sup>34</sup>도 Wilhelmy balance를 이용하여 폐포면적이 감소할 때 표면장력이 같이 감소하는 것이 폐포의 안정성에 대단히 중요하다고 확인하였다. Wilhelmy balance는 이런 표면적 변화에 따른 표면장력의 감소를 실험완료후에 확인할 수 있지만, pulsating bubble surfactometer를 이용할 경우 컴퓨터를 이용하여 즉시 표면장력의 변화를 확인할 수 있다. 또한 검사시간이 매검체마다 5분이기 때문에 Wilhelmy balance보다 짧은 시간에 많은 표면장력 검사가 용이하다. Sample chamber가 일회용이기 때문에 Wilhelmy balance처럼 매 실험마다 수조를 완전하게 세척할 필요가 없다. 그러나 표면장력 감소 효과가 없는 증류수를 이용한 실험에서는 기포의 압축 감압축에 의한 표면적 변화시에 표면장력의 변화가 없기 때문에 헤리곡선은 나타나지 않는다. Wilhelmy balance에서는 수조를 이용하여 실험을 하기 때문에 표면 확산도와 표면 흡착도를 측정할 수 있으나

pulsating bubble surfactometer에서는 표면 확산도는 구할 수 없으며, 표면 흡착도는 측정할 수 있으나 신뢰도가 감소된다는 약점이 있다<sup>13)</sup>.

폐표면활성제의 시험관내 실험성적은 동물실험의 결과와 일치하지 않는 경우가 있다<sup>34)</sup>. 단백질을 포함하지 않은 표면활성제의 pulsating bubble surfactometer에서의 표면활성도가 좋게 나타났으나 동물실험에서는 효과가 없는 것으로 나타났다<sup>35)</sup>. 표면활성제 효과를 판정하는데 동물실험은 필수적이다. 실험동물로서는 미숙태자의 폐나 반복적 폐세척으로 폐표면활성제를 제거한 성숙 쥐 또는 guinea pig 등이 주로 실험동물로 사용된다<sup>36)</sup>. 미숙토끼태자는 실험동물로 쓰이기 위하여서는 재태연령 26-27일 사이가 적당하고 몸무게도 35gm 미만이 좋은 실험모델이 된다<sup>37, 38)</sup>. 재태 26일된 토끼태자의 폐포 상피에는 폐표면활성물질이 거의 존재하지 않는다<sup>39)</sup>. 실제 재태 27일된 토끼태자를 출생후 숨을 몇번 쉬게한후 측정된 기능적 잔류 용량(functional residual capacity)를 측정하면 거의 0에 가깝다<sup>40)</sup>. 재태 27일과 30일된 토끼태자에서 폐용적변화가 극적으로 확장되는 것은 주로 이 3일간에 일어나는 폐성숙에 의한 폐표면활성제의 생산 때문이다<sup>40)</sup>.

미숙 토끼태자의 폐는 5cm H<sub>2</sub>O의 감압시 정지 폐용적이 40ml/kg이 되는 경우에 만족할만한 치료효과를 나타낸다<sup>37)</sup>. YY-38은 5cm H<sub>2</sub>O 감압시 폐용적이 38.8ml/kg으로 40ml/kg에 약간 못 미치었다. 이유는 본 연구실험에서 투여된 인지질(PL)이 25mg/kg으로 다른 연구<sup>16)</sup>에서 투여량인 60mg/kg-160mg/kg보다 훨씬 적었기 때문이라고 생각된다. 실제 폐용적은 투여 폐표면활성제의 양에 비례한다.

실제 임상에서나 실험동물에서나 여러 인자가 폐의 확장 및 산소화에 부정적인 영향을 미친다. 미숙태자 폐에서 단백질의 폐포 공간(air space)내로의 누출은 폐표면활성제를 불활성화 시킨다<sup>41)</sup>. 이를 극복하기 위하여 호흡기의 양압을 더욱 증가시키면 단백질의 누출은 더욱 심하여진다. 미숙아는 출생후 몇일간은 동맥관개 존상태가 지속되는데, 단락에 의한 혈류의 증가에 의하여 폐혈관의 저항이 증가하는것도 산소화를 저하시키는 요인이 된다<sup>42)</sup>. 본 실험에서 토끼 태자를 제왕절개 분만후 양측 대퇴동맥을 절단하여 혈액을 배출시킨 이유는 장기간 심장박동 유지시 발생하는 단백질의 폐

포강내 유출이나, 폐혈관의 저항증가가 실험에 미치는 영향을 배제하기 위함이었다.

호흡개시전 폐확장이 일어나기 전에 폐표면활성제를 투여 하여 1회의 가압과 감압에서 얻은 정적 폐용적에 관한 결과는 혈청 알부민에 의한 폐표면활성제의 불활성화를 평가하기에는 미흡하다<sup>20)</sup>. 본 연구에서는 정적 폐용량을 측정후 20분간 강제환기를 시킨후 10cm H<sub>2</sub>O의 압력에서 확장된 폐의 비를 조사하였다. 폐를 고정시킨 압력이 10cm H<sub>2</sub>O인 이유는 Enhorning의 보고<sup>14)</sup>에 의하면 생리식염수와 인공폐표면활성물질을 투여한 동물실험에서 35cm H<sub>2</sub>O의 압력에서 폐용적의 차가 3배였으나, 10cm H<sub>2</sub>O의 압력에서는 5배까지 차이가 나타나서 10cm H<sub>2</sub>O의 압력이 가장 폐확장정도를 잘 나타내기 때문이다.

결론적으로 YY-38은 충분하고 안정된 소포를 형성하였다. 표면장력이 폐포의 안정을 유지시킬만큼 충분히 낮았으며, 우수한 해리곡선을 나타내어 호기 초기에 이미 표면장력을 충분히 감소시키는 능력이 있었다. YY-38은 동물실험에서 흡기시에 미숙 폐의 팽창을 도와주고, 호기시에는 미숙 폐의 허탈을 방지하는데에도 효과적이었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Avery ME, Mead J: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child* 97:517-523, 1959
- 2) Taeusch HW, Ballard RA, Avery ME: Schaffer and Avery's Diseases of the Newborn. 6th ed. Philadelphia, Saunders, 1991 p498-505
- 3) Behrman RE: Nelson Textbook of Pediatrics. 14th ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 1992, p463-469
- 4) Shapiro D: Surfactant Replacement Therapy; In Polin RA, Fox WW (Eds): Fetal and Neonatal Physiology. 1st ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 1992 p1007-1014
- 5) Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T: Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 1:56-59, 1980
- 6) Clements JA, Platzker ACG, Tierney DF, Hobel CJ, Creasy RK, Margolis AJ, Thibeault DW, Tooley WH, Oh W: Assessment of the risk of the respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *N Engl J Med*

- 286:1077-1081, 1972
- 7) Tanaka Y, Takei T, Aiba T, Masuda K, Kiuchi A, Fujiwara T: Development of synthetic lung surfactants. *J Lipid Res* 27:475-485, 1986
  - 8) Longo ML, Bisagno AM, Zasadzinski JA, Bruni R, Waring AJ: A Function of lung surfactant protein SP-B. *Science* 261:453-456, 1993
  - 9) Curstedt T, Jornvall H, Robertson B, Bergman T, Berggren P: Two hydrophobic low - molecular mass protein fractions of pulmonary surfactant: characterization and biophysical activity. *Eur J Biochem* 168:254-262, 1987
  - 10) Sarin VK, Gupta S, Leung TK, Taylor VE, Ohning BL, Whitsett JA, Fox JL: Biophysical and biological activity of a synthetic 8.7kDa hydrophobic pulmonary surfactant protein SP-B. *Proc Natl Acad Sci* 87:2633-2637, 1990
  - 11) Chida S, Phelps DS, Soll RF, Tausch W: Surfactant proteins and anti-surfactant antibodies in sera from infants with respiratory distress syndrome with and without surfactant treatment. *Pediatrics* 88:84-89, 1991
  - 12) Pattle R, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Roberts GJ, Currie JO, Parsons JH, Sutherland PD: Maturity of fetal lung tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 86:615-622, 1979
  - 13) Enhorning G: Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J Appl Physiol* 43:198-203, 1977
  - 14) Enhorning G, Robertson B: Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics* 49:58-66, 1972
  - 15) Rigaut JP, Robertson B: Quantitative evaluation of neonatal lung expansion with automated image analysis. *Pediatr Pathol* 6:11-24, 1986
  - 16) Nakamura T: Dose-response studies of different pulmonary surfactant. *J Iwate Med Assoc* 43:367-379, 1991
  - 17) Whitsett JA: Composition of pulmonary surfactant lipid & proteins; In Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ (Eds): Pulmonary surfactant (from molecular biology to clinical practice) Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1992 p941-949
  - 18) Hallman M, Merrit TA, Jarvenpaa AL, Boynton B, Mannino F, Gluck L, Moore T, Edwards D: Exogenous human surfactant for treatment of severe respiratory distress syndrome: A randomized prospective clinical trial. *J Pediatr* 106:963-969, 1985
  - 19) Hallman M, Merrit TA, Schneider HA, Epstein MS, Mannino F, Edwards DK, Gluck L: Isolation of human surfactant from amniotic fluid and a pilot study of it's efficacy in respiratory distress syndrome *Pediatrics* 71:473-482, 1983
  - 20) Fujiwara T, Robertson B: Pharmacology of exogenous surfactant; In Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ (Eds): Pulmonary surfactant (from molecular biology to clinical practice) Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1992 p561-592
  - 21) Shapiro PL, Notter RH, Morin FC, Deluga KS, Golub LM, Sinkin RA, Weiss KI, Cox C: A double-blind, randomized trial of calf lung surfactant extract administered at birth to very premature infants for prevention of the respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 76:593-599, 1985
  - 22) Enhorning G, Shennan A, Possmayer F, Dunn M, Chen CP, Milligan J: Prevention of neonatal respiratory distress syndrome by tracheal instillation of surfactant: A randomized clinical trial. *Pediatrics* 76:145-153, 1985
  - 23) Noack G, Berggren P, Curstedt T, Grossmann G, Herin P, Mortensson W, Nilsson R, Robertson B: Severe neonatal respiratory distress syndrome treated with the isolated phospholipid fraction of natural surfactant. *Acta Paediatr Scand* 76:697-705, 1987
  - 24) Fujiwara T, Konish M, Chida S, Okuyama K, Ogawa Y, Takeuchi Y, Nishida H, Kito H, Fujimura M, Nakamura H, Hashimoto T: Surfactant replacement therapy with a single postventilatory dose of reconstituted bovine surfactant in preterm neonates with RDS: Final analysis of a multicenter, double-blind, randomized trial and comparison with similar trials. *Pediatrics* 86:753-764, 1990
  - 25) 남궁란, 이철, 박국인, 한동관: 유리질막증치료에서 인공표면활성제의 보충요법에 관한 임상시도: 투여군과 대조군과의 임상적 비교관찰. *소아과* 33:22-34, 1990
  - 26) 배종우, 권영대, 고세중, 김기수, 김행미, 박원순, 변상현, 손창성, 안호식, 이상길, 장영표, 정윤주, 조경숙, 조규홍, 최규철, 최명재, 최중환, 윤종구, 안창일, 千田勝一, 藤原哲郎: 신생아 RDS에서 인공 폐surfactant 보충요법. *소아과* 36:244-265, 1993
  - 27) Morley CJ, Bangham AD, Miller N, Davis JA: Dry artificial surfactant and its effect on very premature babies. *Lancet* 1:64-68, 1981
  - 28) Durand DJ, Clyman RI, Heymann MA, Clements

- JA, Mauray F, Kitterman J, Ballard P: Effects of a protein-free, synthetic surfactant on survival and pulmonary function in preterm lambs. *J Pediatr* 107:775-780, 1985
- 29) Stevenson D, Walther F, Long W, Sell M, Pauly T, Gong A, Easa D, Pramanik A, LeBlanc M, Anday E, Dhanireddt R, Burchfield D, Corbet A: Controlled trial of single dose of synthetic surfactant at birth in premature infants weighing 500 to 699 grams. *J Pediatr* 120:S3-S12, 1992
- 30) Nemoto T, Sasaki M, Takahashi A, Fujiwara T: Comparison of the in vitro surface properties of three artificial pulmonary surfactants. *J Jpn Med Soc Biol Interface* 24:99-105, 1993
- 31) Gluck L, Kulovich MV, Borer RC Jr.: Estimates of fetal lung maturity. *Clin Perinatol* 1:125-139, 1974
- 32) Sasaki M: Comparison of five pulmonary surfactants: in vitro surface properties and ultra-structures. *J Iwate Med Ass* 42:883-896, 1990
- 33) Clements JA, Hustead RF, Johnson RP, Gribetz I: Pulmonary surface tension and alveolar stability. *J Appl Physiol* 16:444-450, 1961
- 34) Nohara K, Berggren P, Curstedt T, Grossman G, Nilsson R, Robertson B: Correlations between physical and physiological properties of various preparations of lung surfactant. *Eur J Respir Dis* 69:321-335, 1986
- 35) Holm BA, Venkitaraman AR, Enhorning G, Notter RH: Biophysical inhibition of synthetic lung surfactant. *Chem Phys Lipids* 52:243-250, 1990
- 36) Robertson B, Lachmann B: Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Exp Lung Res* 14:279-310, 1988
- 37) Schneider HA, Hallman M, Bernirschke K, Gluck L: A therapeutic trial in premature rabbits. *J Pediatr* 100:619-622, 1982
- 38) Kobayashi T, Shido A, Nitta K, Inui S, Ganzuka M, Robertson B: The critical concentration of surfactant in fetal lung liquid at birth. *Respir Physiol* 80:181-192, 1990
- 39) Mendelson CR, Chen C, Boggaram V, Zacharias C, Snyder JM: Regulation of the synthesis of the major surfactant apoprotein in fetal rabbit lung tissue. *J Biol Chem* 261:9938-9943, 1986
- 40) Lachmann B, Grossman G, Nilsson R, Robertson B: Lung mechanics during spontaneous ventilation in premature and fullterm rabbit neonates. *Respir Physiol* 38:283-302, 1979
- 41) Kobayashi T, Nitta K, Ganzuka M, Inui S, Grossmann G, Robertson B: Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatr Res* 29:353-356, 1991
- 42) Robertson B: Animal models for neonatal surfactant dysfunction. In Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ (Eds): *Pulmonary surfactant (from molecular biology to clinical practice)* Amsterdam, Elsevier Science Publishers 1992, p459-484

= Abstract =

## Physical and Biological Activity of Domestic Product of Modified Bovine Lung Surfactant

Chul Lee, M.D., Min Soo Park, M.D., Moon Sung Park, M.D.  
Jung Nyeon Kim, M.D., Jong Wook Lee, M.D.\* , Kwang Hyun You, M.D.\*  
Won Jae Kwag, M.D.\* , Kook In Park, M.D., Ran Nam gung, M.D.  
and Dong Gwan Han, M.D.

*Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine,  
Yuhan Research Center\**

**Purpose** : Neonatal respiratory distress syndrome is caused by the deficiency of lung surfactant in premature babies. For the treatment of RDS at present surfactants such as Surfacten<sup>□</sup> (Tokyo-Tanabe Co., Japan) and Exosurf<sup>□</sup> (Wellcome Co., USA) are used. As awarded the grant from the Ministry of Science and Technology for a model research project of Medium-Technology program, we have modified (supplemented) the bovine lung extracts to get YY-38, for which we have performed physical and biological activities.

**Methods** : For physical properties, we performed stable microbubble test (SMR) and measured surface tension lowering activity using a pulsating bubble surfactometer. Minimum and maximum surface tensions measured at 1 and 5 minutes gave surface tension-surface area diagrams, from which compressibility at surface tension 10mN/m was also calculated. As to the biological activity, we used premature rabbit fetuses as a model for the study of pressure-lung volume relationship. The lung pathology was examined on the lung tissues subsequently obtained, and aerated area ratios were calculated based on the area measured by an image analyzer.

**Results** : The minimum surface tensions of YY-38 at 1 and 5 minutes for all different concentrations were low at 10mN/m, while the maximum surface tensions ranged from 33.01mN/m to 41.07mN/m. The surface tension-surface area curve showed a definite hysteresis at 1 and 5 minutes for all concentrations, and the surface tension fell below 10mN/m with 20% surface area compression. The compressibilities at surface tension 10mN/m at 5minutes for all concentrations were all below 0.02. In animal experiments, the mean lung volume of premature rabbit fetuses was inflated to 80.9ml/kg at maximum 30cmH<sub>2</sub>O, while the lung volume was maintained at 38.3mg/kg when the lung was deflated to 5cmH<sub>2</sub>O. The overall aerated area ratio was 45.4%.

**Conclusions** : YY-38 formed sufficient amount of stable microbubbles and had a surface tension low enough to maintain alveolar stability and to exhibit a good hysteresis curve. In animal experiments it helped the expansion of premature lungs during inspiratory phase and was effective in the prevention of collapse during expiratory phase.

**Key Words** :

Modified bovine lung surfactant, Fetal rabbit lung, Pressure-lung volume curve, Surface tension-surface area diagram