生体膜モデルとしてのリポゾーム

玉 村 貞 夫

北里研究所 (東京都港区白金 5-9-1)

Liposomes, a Model for Biological Membranes

Sadao TAMAMURA

The Kitasato Institute (5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo)

1 はじめに

ここ近年生体膜の問題は現代生化学の中心課題の一つとなってきた観がある。また脂質生化学の分野でも脂質の生体内での種々の機能を考えるとき、生体膜成分としての役割が最も重要なものの一つとしてあげられるようになってきた。生体膜の研究は現在数多くの分野で活発になされているが、その一つのアプローチとして脂質人工膜の性質を調べ、得られた結果をもととして生体膜の機能を説明しようとする試みがかなり古くからある。そのための手段としては従来主として脂質単分子膜が用いられ、近年脂質二分子層膜もまた用いられるようになった。1964年に英国の Bangham ら¹⁾はフラスコ内面にレシチンの薄い被膜を作らせ、これに少量の塩溶液を加えて振動を与えたところ、しばらくすると液は白濁し、レシチンの薄膜中に塩溶液が捕捉された小粒子の懸濁液が形成され、このものが種々の点で生体膜に似た行動を示すことも見いだした。このものはリポゾーム (liposome) と名付けられたが、単分子膜法や二分子層膜法に比べて特殊の装置や技術を必要とせず、材料の脂質さえ用意すれば専門の物理化学者でなくても実験が行なえ、また膜の組成を変えることも容易で、形状や大きさなどの点でも生体膜に似た条件にあるなどの点が第三の脂質人工膜として多くの研究者の注目をひき、デタージェント、ステロイド、麻酔薬、抗生物質、溶血性毒素などの作用の研究、免疫溶血反応のモデル実験などのさまざまな分野にわたり数多くの研究がなされた。現在のところすでに約 70 の報文が発表されているが、それらは主として、1) Bangham らのグループ、2) 初期に Bangham の協力者であった Weissmann のグループ、3) 同じく Bangham の協力者であった Papahadjopoulos のグループ、4) Kinsky らのグループ、5) Van Deenen のグループ、以上五つのグループから発表されたものが多い。総説としては Sessa, Weissmann によるもの²⁾、Bangham によるもの³⁾がおもなもので、そのほか、抗生物質の人

工膜に対する作用⁴⁾、免疫溶解作用⁵⁾などの総説中にも一部分取り上げられている。わが国では実際の実験の報告は少なく、今のところ井上らによる解説^{6), 7)}が見られるのみである。本稿においては応用的な面を主としてリポゾームに関連した研究を紹介する。

リポゾームにつき注意すべきことの一つに、このものの名称が研究者により異なっていることで、Bangham らも初めは swollen phospholipid lamella¹⁾と呼び、その後 phospholipid structure, phospholipid liquid crystal, smectic mesophase などと変わり、リポゾームが提唱⁸⁾されてからこれを採用している。リポゾームは一般的にかなり広く用いられているが、vesicles や sphe-rules を採用しているグループもあり、統一されていない。発見者にちなみ Banghasome と呼ぼうという提案²⁾もあったが、提案者自身その後用いていない。

もう一つ注意すべきことはリポゾームには同名異物もあることで、細胞内の脂質を多く含んだ粒子に対しこの名称を用いる場合がときどきあるのでまぎらわしい。

2 リポゾームの材料と作り方

2.1 脂 質

Bangham ら¹⁾は卵黄レシチン (Lec) とコレステリン (Chol) のほかに荷電を与えるためにリン酸ジセチル (dicetyl phosphate, DCP) またはステアリルアミン (stearyl amine, SA) を Lec : Chol : DCP(SA) = 7: 1: 2 の mol 比で混じてリポゾームを作った。コレステリンはまったくなくてもリポゾームはできるし、またレシチンの半分くらいまで増やすことができるが、それ以上になるとリポゾームの形成が困難になる。レシチン以外のリン脂質もいろいろと用いられており、ホスファチジルセリン⁹⁾、ホスファチジン酸¹⁰⁾、ホスファチジルイノシット¹⁰⁾、ホスファチジルグリセリン¹¹⁾、カルジオリピン¹²⁾、ホスファチジルエタノールアミン¹³⁾などが用いられているが、多くはレシチンと混合して用いられる。コレステリンやリン酸ジセチルの混入比率もさまざま

あるが、上記のほか $\text{Lec} : \text{Chol} : \text{DCP} = 20 : 15 : 2.2$ の比もよく用いられる。

抽出した天然の混合脂質を用いてリポゾームを作った例もあり、Haxby ら¹⁴⁾ は免疫溶血のモデル実験としてヒツジとウシの赤血球膜から抽出した脂質でリポゾームを作った。また細胞壁を欠く細菌類の微生物マイコプラズマの膜の脂質を抽出してリポゾームを作った例¹⁵⁾がある。この菌は脂質の少ない培地にある脂肪酸を加えて培養するとその脂肪酸含量がとくに高いリン脂質を含む膜を作るのでリン脂質の脂肪酸組成の変化が膜の性質に及ぼす影響を研究するのに便利である。そのほか脂溶性の物質をいろいろと添加することも可能で、ステロイド系ホルモン¹⁶⁾、ホルスマン抗原¹⁷⁾、バクテリアのリポ多糖¹⁸⁾などを加えた例もある。脂溶性色素、たとえばオイルレッドを脂質の 1% くらい加えると赤いリポゾームができ顕微鏡で観察するのに便利である。

2.2 マーカー

リポゾームの中に入れる物質をマーカーと呼ぶ。塩化カリウム、リン酸カリウム、とくにクロム酸カリウムはその着色により 370 m μ での比色定量が可能のため初期の研究にはよく用いられた。膜の荷電により陽イオンは透過度に大きい影響を受け、リン酸ジセチルを加えた膜はよく透過するが、ステアリルアミンを加えた膜は透過しにくい。各種陰イオンは陽イオンより透過性が高く膜の荷電による差は少ない。マーカーは数 μg の量が正確に特異的に定量されることが必要なので最近ではアルカリ金属の放射性同位元素 $^{22}\text{Na}^+$ 、 $^{42}\text{K}^+$ 、 $^{86}\text{Rb}^+$ などがよく用いられる。二価の金属イオンは多くリン脂質と結合しやすい性質をもつので用いられない。放射性グルコースもよく用いられるが、非放射性グルコースでも次のように、酵素学的な微量定量が可能なので⁸⁾ 便利なマーカーである。

HK : ヘキソキナーゼ,

G-6-PDH : グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ

生成した TPNH の量は初めのグルコース量に対応する。TPNH は 340 m μ に特異的な吸収を有するので容易に定量できる。この方法によると遊離のグルコースのみが酵素と反応し、リポゾーム中に保持されているグルコースは反応しないのでリポゾームと外液を分離せずに溶出グルコースのみの定量が可能である。そのためグルコース溶出量を経時的に追って行くことができ、これもこの方法の特長の一つである。そのほかグリセリン、エチレングリコール、ショ糖、マンニット、エリトリット、酢酸アンモニウム、マロンアミド、プロピオンアミドなども試みられており⁶³⁾、赤インキを用いた例⁶⁴⁾もある。

また、酵素リゾチームを入れたリポゾームを作り、酵素を不活性な形にして膜が抗生物質などにより破壊されないとリゾチームの酵素活性が起きないことを示した実験²⁰⁾もあるがこの場合はもはやマーカーというより一種の細胞膜型をめざした研究といえよう。

2.3 リポゾームの作成⁹⁾

一定の mol 比に混じた脂質混合物のクロロホルム溶液をロータリーエバポレーターなどを用いて蒸発乾固し、器壁に薄い膜を作らせる。これを真空デシケーター中に入れ 10^{-2} mmHg で 30 min~1 hr 減圧に保ち有機溶媒および水分を完全に除く。これに必要な量のマーカー溶液を加える。その量はリン脂質 2 μmol あたり 0.1 ml である。少量の径 0.2 mm くらいのガラスビーズを加え Vortex などの振動式のミキサーで振動を与える。市販の電気アンマ器が便利である。また超音波処理 (sonication) による場合もあるがこの場合は窒素気流下で行なう方がよい。ある時間振動を与えていると液が急に不透明になり、リポゾームが形成される。器壁の脂質が完全に見えなくなった所で振動を止め、しばらく放置して安定化した後透析、遠心沈殿、ゲルろ過 (セファデックス G 50) などによって余分のマーカーとリポゾームとを分離する。マーカーの種類によって差があるが、一般にマーカーはかなり長時間リポゾーム内に保持される。振動法で一度形成されたものも sonication により単一分子層の小さいリポゾームになる。

3 リポゾームの性質

3.1 形態・サイズ

リポゾームの形態を顕微鏡で見ると通常球状の粒子であるが、ときには桿菌状、または細長いいわゆるミエリン状の形態を示すことがある。とくにホスファチジルエタノールアミンのリポゾームでは長いミエリン構造を示す¹⁹⁾。大きいリポゾーム中に小さい粒子が取り込まれた形になることがある⁶⁴⁾。観察には位相差顕微鏡の使用が便利のようであるが、小さい粒子は電子顕微鏡の逆染色法 (negative staining) で観察される。その場合二重輪や三日月状の形態の粒子が見られるが、Johnson ら²²⁾ は

図-1 リポゾーム電子顕微鏡像の模型図

その理由を 図-1 のように変形した粒子の上から電子線が照射されて生ずるとしている。

サイズは振動の与え方により異なり、機械的振動によるときは直径 $0.5 \sim 50 \mu$ とされる。振動法により作ったリポゾームの粒子サイズの分布を見ると 図-2⁶⁴⁾ のようになる。超音波処理法によると平均 0.5μ といわれ、とくに単一二分子層 リポゾームでは $250 \sim 500 \text{ \AA}$ ^{21), 22)} くらいの大きさである。

図-2 Lec : Chol (1 : 1) リポゾームの粒子サイズ分布 (電子顕微鏡写真より計算)

3.2 構 造

光学顕微鏡では単に球形の外形しかわからないが、逆染色法による電子顕微鏡写真では多くの層状をなしているのが見られ、多くの二分子膜の間にマーカー溶液を捕捉した薄い小室の層からなる多層ラメラ構造をしていると考えられている¹⁾。二分子膜間の距離は $55 \text{ \AA}$ ²³⁾ ラメラの厚さは $40 \text{ \AA}$ とされ、これは二分子膜として妥当な厚さである。Bangham¹⁾ によると添加した荷電分子間の相互反発力によって水層の幅が広がられているという。偏光顕微鏡による観察では表面の荷電に応じて正負またはゼロの複屈折が見られる。

Bangham ら⁶²⁾は多層ラメラリポゾームは条件が複雑で透過性などの理論的な解析が困難なためこれを単純化しようとして 4% ホスファチジン酸を含む レシチンリポゾームを N_2 ガス下 1.5 hr 超音波処理をしたところ、小さいリポゾームが得られ、電子顕微鏡像およびサイズから見て単一の二分子層に囲まれた粒子と思われるものを得た。その半径は $120 \pm 4 \text{ \AA}$ で一分子あたりの表面積は $66 \text{ \AA}^2$ である²²⁾。Seufert²¹⁾はレシチンのみを用い、少し異なった方法で作ったリポゾームを遠心沈殿、光散乱の二法で粒子直径を計算して $386 \text{ \AA}$ の値を得た。この単一二分子層リポゾームを用い麻酔剤³⁵⁾、抗生物質²⁸⁾、タンパク質⁴⁶⁾などの影響が調べられているが、Kornberg ら⁶⁶⁾はスピラベルしたレシチンを用いて単一二分子層リポゾームを作り、レシチン分子は内膜と外膜の間を相互に移動しうることを示した。図-3 に示すように外膜にあるラベルされた分子の磁性はアスコルビ

図-3 スピラベルレシチンリポゾーム

二分子層膜の構成分子が内膜-外膜間を移動

図-4 リポゾームの膜の一部

ン酸処理により消去されるが、一定時間後には再びラベルされた分子が検知されるので内膜に残っていた分子が 図-4 のように外膜に転移するものと推定した。

3.3 脂質組成と透過性

前述のようにマーカーに一価の陽イオンを用いたときには膜の荷電の正負とその強さにより透過性に著しく影響するが、陰イオンの場合には透過性は陽イオンより遥かに大きく、荷電による差も陽イオンほど著しくはない(表-1)⁹⁾。

表-1 Na^+ , K^+ , Cl^- のリポゾームよりの自然溶出率

リポゾーム組成	レシチン 90% ステアリル アミン 10%	レシチン 100%	レシチン 90% ステアリル アミン 10%	ホスファチジルセリン 100%
22°Cの自然溶出率 Na^+	—	—	4.4	3.6
K^+	0.6	0.6	4.4	2.6
Cl^-	68	26	34	26
溶 出 率 Cl^-/K^+	113	43	7.7	10

またホスファチジルセリンやホスファチジルグリセリンのみで作ったリポゾーム¹¹⁾では抗生物質を加えなくても Na^+ と K^+ との透過性に著しい差があり、ホスファチジルセリンでは pH 7.4 で K^+ は Na^+ の約 10 倍、pH 4.5 では約 7 倍であるが、ホスファチジルグリセリンでは約 5 倍、ホスファチジルセリン、レシチン混合物では 2~3 倍でホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミンではほとんど差がない。

リポゾームはコレステリンを添加した場合、マーカーのグルコースの溶出は添加量の増加とともに減るが、コレステリンエステルではほとんど減じない²⁴⁾。このコレステリンの溶出への影響はまた使用レシチンの脂肪酸の不飽和基の数によっても影響され合成レシチンを用いた実験ではその順序は

である。また脂肪酸の鎖長も影響し²⁵⁾、マーカーに KCl を用いたとき、脂肪酸の鎖長の短いほど、不飽和度の増すほど透過度は増加する。

このように不飽和脂肪酸の多いレシチンほど透過度の増大するということは、いわゆる必ス脂肪酸の役割を考える上の手がかりとなる。必ス脂肪酸はとくに生体の膜のリン脂質に密接な関係ありとされながらその役割は明らかでない。Moore²⁶⁾ らは卵黄、魚の内臓、必ス脂肪酸欠乏のエサで飼養したラットおよび正常ラットの心臓、ジン臓、肝臓から抽出したレシチンを用いて Na^+ をマーカーとするリポゾームを作り、その透過性を比較した。必ス脂肪酸欠乏ラットレシチンは正常ラットレシチンと比較してモノエンは 3 倍、トリエンは約 8 倍なのにジエンは 1/10、テトラエンは 1/10 しかなく、ペンタエンおよびヘキサエンもほとんど欠除し、リノレン酸は約 1/2、リノール酸は約 1/10 である。必ス脂肪酸欠乏ラットレシチンは 25°C および 37°C では透過性は正常ラット、卵黄、魚各レシチンより高いが、50°C においては正常ラットレシチンが著しく増大するのに欠乏ラットの方はあまり増大しないため順位は逆転する。グルコースをマーカーとした実験²⁷⁾では、欠乏ラットレシチンはすべての温度で正常ラットおよび魚レシチンより透過度が低く、卵黄レシチンとほぼ同じである。また ^{86}Rb をマーカーとした実験²⁸⁾では合成、天然レシチンを用いてリポゾームを作り透過度を比較したところ

$$\text{EPL} > \frac{18:1}{18:1} > \text{卵黄} > \frac{18:0}{18:1} > \frac{16:0}{16:0}$$

の順であった。EPL はリノレン酸を 70% 含むレシチンである。また卵黄レシチンおよび $\frac{18:1}{18:1}$ レシチンではコレステリンを添加したときの透過度の低下は著しい。酢酸カリウムをマーカーとした実験²⁹⁾では

$$\text{EPL} > \frac{18:1}{18:1} > \text{卵黄} > \frac{\text{卵黄} + \text{コレステリン}}{\text{コレステリン}} > \frac{18:1}{18:1} \\ + \frac{16:0}{16:0} (1:1) > \frac{18:1}{18:1} + \frac{16:0}{16:0} (1:3)$$

の順で、これら多くのデータは一致して不飽和脂肪酸、とくに必ス脂肪酸含量の高いレシチンで作ったリポゾームが透過度高く、飽和脂肪酸が多いほど透過性の低いことを示し必ス脂肪酸の生理作用について一つの示唆を与えている。

Klein³⁰⁾ は超音波処理によるリポゾーム調製の際、酸素が存在すると K^+ 透過性の再現性がよくないが、窒素存在下で超音波処理を行なうと再現性がよいとしているがこれも intact の不飽和脂肪酸が透過度に関連することを示した実験である。

Leibowitz ら⁶⁵⁾ は生体膜の脂質の過酸化化が透過性の増大と関連することから、リポゾームを種々の薬品で過酸化化し、同様の事実のあることを確かめ、また抗酸化剤のトコフェロール、BHT などの添加がこれを防止す

ることを見た。

4 リポゾームに対する化学物質の影響

4.1 ステロイド

膜モデルとしてリポゾームが発見されてまず初めに試みられたのはステロイドの影響であった^{31), 23)}。ある種のステロイド類、すなわち diethylstilbesterol, deoxycorticosterone や種々の 5 β -H steroid たとえば etiolanolone などはレシチン、コレステリン、リン酸ジセチルから作ったリポゾームのマーカーの陽イオンの溶出を促進するが、逆に 5 α -H 異性体の androsterone などでは影響がない。この性質はステロイドが赤血球からヘモグロビンを溶出させたり、細胞の lysosome から酸性ホスファターゼを遊離させたりする作用と類似している。また cortisone, cortisol, chloroquine などはリポゾームからの陽イオンの溶出を減少させる。cortisone をあらかじめ添加したリポゾームを作り、これに diethylstilbesterol, etiolanolone を作用させるとイオンの溶出は抑制される。

ステロイドの影響は陽イオンだけでなくグルコース¹⁶⁾、グリシン、 CrO_4^{2-} 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^{-23)}$ を含むリポゾームでも diethylstilbesterol, deoxycorticosterone, 5 β -H steroid の添加により溶出は促進される。しかしその作用する濃度は $10^{-3} M$ 程度で、生体膜に対しては $10^{-6} \sim 10^{-4} M$ で作用するのに比べると非常に濃度は高い。

etiolanolone はヒトに対して発熱させる作用があるが、男性の方が女性より敏感である。男性ホルモンの testosterone と女性ホルモンの 17 β -estradiol をそれぞれ膜に添加したリポゾームを作り etiolanolone の影響を比較すると estradiol では 1% の添加で陰イオンの溶出を抑制するが testosterone にはその作用がない³²⁾。このことは女性における etiolanolone 投与による発熱の抑制が estradiol に関係あることを思わせる。

Heap ら³³⁾ はステロイド類のリポゾームに対する作用を調べ、 $^{42}\text{K}^+$ の透過に及ぼす影響はステロイドの水に対する溶解性に比例し、脂質に対する溶解性に逆比例することを示した。

ステロイドはリポゾームの透過性に対して機能的な変化を与えるのみでなく脂質層そのものに構造的な変化を起こさせることがある。deoxycorticosterone はその例である¹⁶⁾。

4.2 麻 酔 薬

麻酔薬のうち有機溶剤（エーテル、クロロホルム、*n*-アルキルアルコールなど）と局所麻酔剤（nupercaine, tetracaine, cocaine, procaine）の二つのグループについてリポゾームに対する作用が調べられた³⁴⁾。リポゾームの陽イオンに対する透過性はこの両グループでまったく異なった影響を受け、有機溶剤グループは K^+ の透過

を増加させ、炭素鎖の長いほどその影響が著しいが、局所麻酔剤グループでは逆に K^+ の透過を減少させる。これは負に荷電した膜の表面電荷密度を低下させるためであると説明されている。

Johnson ら³⁵⁾は 4% ホスファチジン酸、96% レシチンの単一二分子層を用いてエーテル、クロロホルム、*n*-ブタノールによる K^+ 溶出の効果を調べた。

また局所麻酔剤³⁶⁾は Ca^{2+} とキック抗作用を有し、 Ca^{2+} なしではマーカ-の ^{22}Na の溶出を促進するが、 Ca^{2+} が存在すると Ca^{2+} により起こされる ^{22}Na の溶出を阻害する。またこの阻害は Ca^{2+} の濃度が増大すると消失する。

4.3 抗生物質⁴⁾

数多くの抗生物質のうち、膜に作用することが明らかになっているものは二つのグループ、ポリエン系とマクロサイクリック系である。前者では filipin, etruscomycin, amphotericin B, nystatin, pimaricin などがあり放線菌により生産されるもので、抗生物質としてはカビや酵母に対して作用するが細菌には作用しない。また溶血作用もある。いずれも構造式は明らかにされており、細胞膜に対する破壊作用の強さは炭素数と逆で C 数 37 の filipin が最も強いとされている。すなわち

の順でとくに filipin は膜の研究によく用いられる。

図-5 Filipin の構造式

ポリエン系抗生物質はコレステリンなどのステリンを含有する膜にのみ作用することが明らかにされている。カビや酵母はエルゴステリンなど、赤血球など動物細胞はコレステリンを含有するので作用を受けるが、細菌ではステリン類を含まないので filipin の作用を受けないと説明されている。単分子膜を用いた実験でもコレステリンを除くと filipin の作用を受けない。filipin, etruscomycin, amphotericin B, nystatin はいずれもレシチンリポゾームに対し $10^{-4} \sim 10^{-3} M$ でマーカ-の溶出を増進する。pimaricin のみはその作用がない。コレステリンを加えたリポゾームでは nystatin, amphotericin はこの作用が強くなるが、filipin のみは逆にコレステリンなしの方が溶出が増加するが³⁷⁾、 $10^{-6} \sim 10^{-5} M$ の低濃度ではコレステリンを加えた方が溶出増加することが確かめられた⁸⁾。また filipin のリポゾームへの作用は、膜の荷電が正負いずれでも差がない³⁸⁾。また filipin はその後構造の異なった四つの物質に分けられ、filipin I～IV と名付けられ、そのうち II と III が抗カビ

性、溶血性ともに強いがリポゾーム破壊性は III が強く II は弱いことがわかった³⁹⁾。

図-6 Valinomycin の構造式

性、溶血性ともに強いがリポゾーム破壊性は III が強く II は弱いことがわかった³⁹⁾。

マクロサイクリック系抗生物質は valinomycin, enniatin A, actin 類 (nonactin, monactin, dinactin, actin) などの環状化合物のほかに gramicidin S, alamectin などポリペプチド類, nigericin, dianemycin, monencin, gramicidin A, B, C などの非環状化合物も含まれる。

varinomycin のミトコンドリアの呼吸に対する作用は広く研究されており、gramicidin, actin 類, enniatin も同様の作用を有するがアルカリ金属の要求性をいくぶん異にする。これら化合物の作用はミトコンドリア膜の陽イオンの受動的な透過性を増大させる作用を有するもので、したがってマクロサイクリック化合物の膜に対する作用はステリンとは関係がない。Henderson ら⁴⁰⁾はこのグループの抗生物質の作用を精細に研究しているが、valinomycin は一価の陽イオン Na^+ , K^+ などの溶出を増強させる。カルジオリピンのリポゾームをさらに超音波処理したものは、valinomycin により ^{42}K は 8 倍、 ^{22}Na は 16 倍も溶出が増加するという¹²⁾。 ^{86}Rb のリポゾームからの溶出は非常に低い添加した脂質の疎水基の不飽和度の大きいほど varinomycin の添加による透過性の増大が大きいことをみている²⁸⁾。

4.4 毒 素

リポゾームを用いた生体膜に対し活性ある物質の作用をみたものに毒素がある。毒素 (toxin) とは通常高等動物に強い毒性を持つ生物体起原の物質で高分子かつ抗原性を有するものに対して呼ばれる名称で、細菌性 (破傷風毒素、ジフテリア毒素など)、動物性 (ヘビ毒、サソリ毒など)、植物性 (ヒマ毒 ricin など) があるがそれらのうち赤血球を破壊する作用を持つものを溶血毒といっている。細菌性では streptolysin O および S, staphylococcus α -toxin など、動物性ではヘビ毒、ミツバチ毒などがあり、いずれも生体膜に対し作用を有するが

その作用機構は明らかにされていない。これらの溶血毒を単分子膜などの人工膜に試みた実験はいくつかあるが、リポゾームに対して *staphylococcus* α -toxin^{(41), (42)}, streptolysine S^{(23), (31)}, mellitin⁽⁴³⁾ などの作用が調べられている。

streptolysine S は溶血性連鎖球菌 (溶連菌) の生産する毒素の一つで同じ菌の生産するもう一つの毒素 streptolysine O が酸素により容易に活性を失うのに反し安定である。同様に強い溶血作用を有し、分子量 12,000 の RNA タンパク質とされている⁽⁴⁴⁾。このものはレシチン、コレステリン、リン酸ジセチル 75:10:15 のリポゾームに対し Na^+ を 1 hr でコントロールの約 3 倍、 K^+ を約 10 倍溶出させる。またリン酸イオン PO_4^{3-} , グルコースでは 2 倍である⁽²³⁾。

staphylococcus α -toxin は病原性ブドウ球菌の出す毒素の一つでタンパク質である。強い溶血性を有するが、レシチン、コレステリン、リン酸ジセチル 7:1:2 のリポゾームに対して 60 min に CrO_4^{2-} の溶出をコントロールの約 3 倍にする⁽⁴¹⁾。またこれをさらに精製していくつかの分画に分けて同様の実験を行なったところ⁽⁴²⁾, コントロールでは 60 min に 60% の CrO_4^{2-} が溶出するのに毒素分画では 80% 以上、とくに 12 S 分画では 98% も溶出させる。

動物性毒素としてはミツバチ毒中の主成分は mellitin といわれるアミノ酸 26 個から成るペプチドが知られており、このものはやはり溶血性を持っているがリポゾームに対して $10^{-4} \sim 10^{-6} M$ でマーカーの $\text{Cr}_2\text{O}_4^{2-}$ をコントロールの数倍放出させ、また mellitin を作用させたりポゾームはもとのラメラ構造を失っているのが観察された。この作用は膜の荷電によりほとんど差がない⁽⁴³⁾。

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-
Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-
Lys-Arg-GluNH₂-Glu(NH₂)₂

図-7 Melittin のアミノ酸配列

4.5 タンパク質の作用

リン脂質とタンパク質の間には種々の相互作用が見られるが、Robertson⁽⁶⁰⁾ の単位膜説によると生体膜は脂質二分子層膜の両面にタンパク質層が形成されており、このタンパク質は α -ヘリックス構造をとっていると考えられている。この面からリポゾームとタンパク質の相互作用は非常に興味深いものがあり、Hammes ら⁽⁶¹⁾ はホスファチジルセリンリポゾームとポリ-L-リシンとの結合物を作り、これを円偏光二重性 (CD), 旋光分散, 電子顕微鏡写真, NMR などの方法によりタンパク質のコンフォーメーションを調べ、ポリ-L-リシンはリポゾーム表面に静電結合および疎水結合で固定され、 α -ヘリックス構造をしているとした。

Kimelberg ら^{(45), (46)} は負荷電のホスファチジルセリン

リポゾームと正荷電タンパク質のリゾチーム, チトクローム C, ポリ-L-リシンなどの結合によるマーカーの溶出への影響を調べ、荷電を異にするもの同志の結合にかかわらず、溶出増加は主として疎水結合に基づくとしている。この場合リゾチームによる溶出増加はとくに著しい。

Rand⁽⁶²⁾ もウシ血清アルブミンとレシチンリポゾームの結合は荷電が反対なのに静電結合は弱く、疎水結合の方が強いことを X 線回折法で証明している。

Sweet ら^{(47), (48)} はウシ血清アルブミンのマーカーの溶出に対する影響を調べ、静電結合と非極性結合でマーカー (^{14}C グルコース) の溶出が増加するとしている。

Juliano ら⁽⁴⁹⁾ は赤血球膜タンパク質のスペクトリンとホスファチジルセリンリポゾームとの作用を調べ、スペクトリンは構造タンパク質なのに可溶性タンパク質のウシ血清アルブミンと同様の溶出効果があることを見ている。

5 免疫溶解現象のモデル

リポゾームの利用で最も生化学者の興味をそそったのは免疫溶解現象のモデル化であろう。人工膜モデルを用いて抗原抗体反応の機構を解明しようとする試みは単分子膜法により立花ら^{(50), (51)} がカルジオリピンと梅毒血清との反応を試みたり、最近では林ら⁽⁵²⁾ がリン脂質とその抗体を用いた反応を行なったりしている。Kinsky 一派⁽¹⁴⁾ はリポゾームにより免疫溶解現象をモデル化することに成功した。動物に非経口的に注射などの手段でタンパク質や多糖類などの高分子物を体内に入れると動物の血液中のグロブリン分画にこれと反応する物質を生ずる。これを抗体と称し、さきに体内に注入した物質を抗原という。その反応は沈降反応や凝集反応などいろいろの形があるが、赤血球や細菌などを抗原としてこれに対する抗体を作り、この抗原と抗体の混合物に動物の新鮮血液中に存在する補体と称する物質 (とくにモルモット血清中に多い) を混ざると、抗原の血球や細菌が溶解し、血球ならば内部のヘモグロビンが放出される。この現象を免疫溶解現象といい、それぞれ溶血、溶菌などという。抗原が

図-8 免疫溶血のモデル化: ヒツジ赤血球膜糖脂質添加リポゾームよりのグルコースの溶出

固形物でない場合には溶解は起きないが補体の結合は起こる。この反応は非常に鋭敏なのでとくにヒツジ赤血球とその抗体（溶血素）とモルモット補体を用いた系は指示薬として梅毒検査のワッセルマン反応などに広く応用されている。この溶血現象の場合にはヒツジ赤血球の膜の部分に存在する糖脂質（ホルスマン抗原）とその抗体との反応であることが明らかになっているが、Kinsky ら^{14), 53)}はヒツジ赤血球膜から抽出した糖脂質分画を用いてリポゾムを作り、グルコースをマーカーとし、これにヒツジ赤血球で免疫した血清（ヘモリジンと称し市販されている）と補体を作用させて溶出するグルコースを測定し、かなりの量のグルコースが溶出されるのを見た（図-8）。対象として正常のウサギ血清を用いた場合、加熱して活性を失わせて補体を用いた場合にはグルコースの溶出は遙かに少なかった。またヒツジ赤血球の代わりにホルスマン抗原を含まないウシ赤血球から抽出した脂質で作ったリポゾムも同様の条件でマーカーの溶出は少ない。またレシチン（スフィンゴミエリン）、コレステリン、リン酸ジセチルのみで作ったリポゾムは同様な条件でグルコースの溶出はほとんどないが、これにあらかじめホルスマン抗原を添加しておくでグルコースが溶出される⁵⁴⁾。また補体には $C_1 \sim C_9$ の9成分があり、溶血の場合にすべての成分が一定の順序に結合することが必要であるが、リポゾムの溶解にも同様の条件が必要のようである⁵⁵⁾。またこれらのリポゾムの免疫溶解現象ではリン脂質はなんらの分解作用を受けていない⁵⁶⁾。レシチンのリポゾムにホスリパーゼCを作用させてマーカーが50%放出されたときにはレシチンも40~50%分解されていることからリポゾムの免疫溶解現象には脂質分解酵素作用はまったく関係ないとしている。またホスホリパーゼ作用を受けない合成レシチンで作ったリポゾムを用いても同様に抗体補体による溶解が起こることからもこれらの溶解現象はホスホリパーゼ作用と関係ないと思われる⁵⁷⁾。またホルスマン抗原を入れたリポゾムは抗ホルスマン血清とのみ、globosideを入れたリポゾムは抗グロボシド血清とのみ反応し交差反応はないという¹⁷⁾。

Kataoka ら¹⁸⁾は溶血反応のみでなく腸内細菌の *Salmonella minnesota* のリポ多糖体とレシチン、スフィンゴミエリンを混じてリポゾムを作り、これがこの菌体に対する抗血清と補体によりマーカーの溶出することを見ている。

このように一見きわめて複雑な反応と思われた免疫溶解現象を単純なリポゾムの系でモデル化したのは非常に興味あるところで、Humphrey ら⁵⁾により溶血を起こした後の赤血球の膜は電子顕微鏡の観察で多くの小孔が開いているのが観察されており、このような孔は filipin で溶血した後の赤血球膜、同じく filipin+saponin

で処理したリポゾムも孔が見られる点⁵⁸⁾、リポゾムを溶血現象のモデルとして用いることが妥当であることの示唆となろう。ただし免疫溶解をしたリポゾムについての電子顕微鏡写真は今のところ示されていない。

著者らはホスファチジルセリンやホスファチジン酸をハプテンとする抗体を作ること成功したが⁵⁹⁾、これにカルジオリピンを加えた計三種の酸性リン脂質とその抗血清との間には沈降反応などで交差反応が見られるが、それぞれ対応する抗原抗体間の反応が最も強い。すなわちそれぞれの特異性が見られる。この三種の酸性リン脂質のそれぞれにレシチン、コレステリンを混じてオイルレッドを混じて赤く着色したリポゾムを作り、そのおのおのと三種の抗血清との間の凝集反応を試みたところ、表-2のように各リポゾムとも対応する抗血清との反応がいずれの場合とも最も強い⁶⁰⁾。リポゾム表面のリン脂質は親水性基が外側の方に向いていると考えられるので、各リン脂質の抗原決定基がこの親水性部分にあることの一つの証明になる。

表-2 酸性リン脂質リポゾムの凝集反応

血清 リポゾム	抗PA	抗PS	抗CL	正 常
PA	256	16	16	—
PS	8	256	8	—
CL	8	8	128	—

数字は反応陽性を示す血清の最大希釈倍数

血清 0.1 ml をリポゾム 10 μ l と混和

PA: ホスファチジン酸, PS: ホスファチジルセリン,

CL: カルジオリピン

またホスファチジルセリンを含むリポゾムに補体と各種抗血清を作用させ、マーカーのグルコースの溶出を見たところ⁶¹⁾、正常ウサギ血清によってもいくらかの溶出は見られるが、抗ホスファチジルセリン血清によるもののがもっとも強く、抗ホスファチジン酸血清ではその中間の強さであった。抗血清中の抗体作用を有するのはグロブリン分画中の IgG, IgM, IgA などであるとされているが抗ホスファチジルセリン血清をアルブミン, IgG, IgM に分画してそれぞれのホスファチジルセリンリポゾムに対する作用を見たところ、いずれも多少のマーカーの流出は見られたが IgG では正常ウサギ血清 IgG および、アルブミンとほぼ同じ強さで、抗体としての特異性があると思われる。IgM 分画は明らかに特異的反応と思われる程度の強いマーカーの溶出が見られるが、全般的に見て抗酸性リン脂質抗体によるリポゾム溶解現象は Kinsky らのホルスマン抗原による研究に比し弱いように思われる。

6 お わ り に

Sessa, Weissmann がアメリカの学会でリポチームを

マーカーとするリボゾーム²⁰⁾について発表したとき、わが国のある大新聞に人工細胞として報ぜられたことがあった。しかしリボゾームの研究の現状は上に見られるように膜の機能のモデル化という面ではかなりの成功は収めており、とくに膜の組成と透過性とが、種々の薬品の膜に対する作用機構の面では従来の方法では及び得ないような成果を収めているが、人工細胞などと直接結びつけて考えるにはまだまだ大きな距離があるように思われる。

細胞膜型として古くから知らされているものにコアセルベートというものがあり、オパーリンがその著「生命の起原」の中で生命発生の初期の一段階としてこれを取り上げてから再び人々の注目を引き、最近ではマイクロカプセルを作る方法の一つとしてとり上げられている⁷⁰⁾。

また最近ではある種のマイクロカプセルによりガス交換を行ないうる人工赤血球を作ろうという試みもある程度進んでいるといわれる。

リボゾーム、コアセルベート、マイクロカプセルはそれぞれまったく異なった分野で発見され、発展してきたもので、現在もほとんど無関係に研究が行なわれているが、いずれも細胞機能の一面がモデル化されているという点で共通しているのは非常に興味深いことである。

(昭和47年3月17日受理)

文 献

- 1) A.M. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965)
- 2) G. Sessa, G. Weissmann, *J. Lipid Res.*, **9**, 310 (1968)
- 3) A.D. Bangham, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 29 (1968)
- 4) S.C. Kinsky, *Annu. Rev. Pharm.*, **10**, 119 (1970)
- 5) J.H. Humphrey, R.R. Dourmashkin, *Adv. Immunol.*, **11**, 75 (1969)
- 6) 井上, 代謝 **8**, 228 (1971)
- 7) 井上・野島, 蛋白質・核酸・酵素, **16**, 565 (1971)
- 8) S.C. Kinsky, J. Haxby, C.B. Kinsky, R.A. Demel, L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 174 (1968)
- 9) D. Papahadjopoulos, A.D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, **126**, 185 (1966)
- 10) D. Papahadjopoulos, J.C. Watkins, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 639 (1967)
- 11) D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 254 (1971)
- 12) J. Saha, D. Papahadjopoulos, C.E. Wenner, *Biochim. Biophys. Acta*, **196**, 10 (1970)
- 13) P.G. Fast Science, **155**, 1680 (1966)
- 14) J.A. Haxby, C.S. Kinsky, S.C. Kinsky, *Proc. Natl. Acad. U.S.*, **61**, 300 (1968)
- 15) R.N. McElhaey, J. DeGier, L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, 245 (1970)
- 16) G. Weissmann, G. Sessa, S. Sessa, *Nature*, **208**, 649 (1965)
- 17) K. Inoue, T. Kataoka, S.C. Kinsky, *Biochem.*, **10**, 2574 (1971)
- 18) T. Kataoka, K. Inoue, O. Lüderitz, S.C. Kinsky, *Europ. J. Biochem.*, **21**, 80 (1971)
- 19) D. Papahadjopoulos, N. Miller, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624 (1967)
- 20) G. Sessa, G. Weissmann, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3295 (1970)
- 21) W.D. Seufert, *Biophysik*, **7**, 60 (1970)
- 22) S.M. Johnson, A.D. Bangham, M.W. Hill, E.D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 820 (1971)
- 23) G. Weissmann, G. Sessa, S. Weissmann, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 1537 (1966)
- 24) R.A. Demel, S.C. Kinsky, C.B. Kinsky, L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 655 (1968)
- 25) J. De Gier, J.G. Mandersloot, L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 666 (1968)
- 26) J. L. Moore, T. Richardson, H.F. Deluca, *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 39 (1969)
- 27) Li-Fu Chen, D.B. Lund, T. Richardson, *Biochim. Biophys. Acta*, **225**, 89 (1971)
- 28) J. De Gier, C.W.M. Haest, J.G. Mandersloot, L.L.M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta*, **211**, 373 (1970)
- 29) A. Saha, J. De Gier, *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 789 (1971)
- 30) R.A. Klein, *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 486 (1970)
- 31) A.D. Bangham, M.M. Standish, G. Weissmann, *J. Mol. Biol.*, **13**, 253 (1965)
- 32) G. Sessa, G. Weissmann, *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 173 (1968)
- 33) R.B. Heap, A.M. Symons, J.C. Watkins, *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 482 (1970)
- 34) A.D. Bangham, M.M. Standish, N. Miller, *Nature*, **208**, 1295 (1965)
- 35) S.M. Johnson, A.D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 92 (1969)
- 36) D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, **211**, 467 (1970)
- 37) G. Weissmann, G. Sessa, *J. Biol. Chem.*, **242**, 616 (1967)
- 38) G. Sessa, G. Weissmann, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 416 (1967)
- 39) G. Sessa, G. Weissman, *J. Biol. Chem.*, **243**, 4364 (1968)
- 40) J.F. Henderson, J.D. McGivan, J.B. Chappell, *Biochem. J.*, **111**, 521 (1969)
- 41) G. Weissmann, G. Sessa, A.W. Bernheimer, *Science*, **154**, 772 (1966)
- 42) J.H. Freer, J.P. Arbutnot, A.W. Bernheimer, *J. Bacteriology*, **95**, 1153 (1968)
- 43) G. Sessa, J.H. Freer, G. Colaccico, G. Weissmann, *J. Biol. Chem.*, **244**, 3575 (1969)
- 44) A.W. Bernheimer, *J. Bacteriol.*, **93**, 2045 (1967)
- 45) H.K. Kimelberg, D. Papahadjopoulos, *J. Biol. Chem.*, **246**, 1142 (1971)
- 46) H.K. Kimelberg, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 805 (1971)
- 47) C. Sweet, J.E. Zull, *Biochim. Biophys. Acta*, **173**, 94 (1969)
- 48) C. Sweet, J.E. Zull, *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, 253 (1970)

- 49) R.L. Juliano, H.K. Kimelberg, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 894 (1971)
- 50) 立花, 科学, **18**, 492 (1948)
- 51) T. Ogata, T. Tachibana, K. Suzuki. K. Fukuda, S. Yamaoka, *J. Immun.*, **69**, 13 (1952)
- 52) 林, 鈴山, 玉村, 原, 第8回油化学討論会, 1969, 大阪
- 53) C.R. Alving, S.C. Kinsky, J.A. Haxby, C.B. Kinsky, *Biochem.*, **8**, 1582 (1969)
- 54) S.C. Kinsky, J.A. Haxby, D.A. Zopf, C.R. Alving, C.B. Kinsky, *Biochem.*, **8**, 4149 (1969)
- 55) J.H. Haxby, O. Götz, H.J. Müller-Eberhard, S.C. Kinsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **64**, 290 (1964)
- 56) K. Inoue, S.C. Kinsky, *Biochem.*, **9**, 4767 (1970)
- 57) S.C. Kinsky, P.P.M. Bensen. C.B. Kinsky, L.L.M. Van Deenen, A.F. Rosenthal, *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 815 (1971)
- 58) S.C. Kinsky, S.A. Luse, D. Zopf, L.L.M. Van Deenen, J. Haxby, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 844 (1967)
- 59) S. Tamamura, T. Hashimoto. I. Hara, *Jap. J. Exptl. Med.*, **41**, 31 (1971)
- 60) 玉村, 原, 第43回日本生化学会大会, 1970, 東京
- 61) 玉村, 橋本, 原, 第44回日本生化学会大会, 1971, 仙台
- 62) S.M. Johnson, A.D. Bangham, *Biochim. Biophys. acta*, **193**, 82 (1969)
- 63) A.D. Bangham, J. De Gier, G.D. Greiville, *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 225 (1967)
- 64) J.P. Reeves, R.M. Dowben, *J. Cell. Physiol.*, **73**, 49 (1969)
- 65) M.E. Leibowitz, M.C. Johnson, *J. Lipid Research*, **12**, 662 (1971)
- 66) R.D. Kornberg, H.M. McConnell, *Biochem.*, **10**, 1111 (1971)
- 67) G.G. Hammes, S.E. Schullery, *Biochem.*, **9**, 2555 (1970)
- 68) R.P. Rand, *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 823 (1971)
- 69) J.D. Robertson, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 349 (1958)
- 70) 小石, 近藤, 化学と工業, **22**, 1196 (1969)