総 説

最近のリン脂質の話題

難波幸弘・榊原敏之

日本精化(株)研究所(高砂市伊保町梅井 318-3)

Recent Research and Development of Phospholipids

Yukihiro NANBA and Toshiyuki SAKAKIBARA

Nippon Fine Chemical Co., Ltd. Research Laboratories
(318-3, Umei Ihocho, Takasago, Hyogo)

はじめに

リン脂質はその基本骨格中にリン酸基を有する複合脂質の一種であり、動物の臓器、神経、卵黄、植物の種子、微生物等に広く分布している。大豆油や卵黄から得られる低純度レシチン(ホスファチジルコリン)は各種リン脂質の混合物で、古くから、食品用の乳化剤や分散剤として広く利用されている。一方、生体内においては、リン脂質は生体膜などの主要な構成成分であることが良く知られており、生体膜の膜形成成分としてのリン脂質の働きにメスが入って久しい¹⁾。今までに解明された主な機能としては^{2), 3)},

- 1) 生体膜(細胞膜)の主成分として、脂質二分子膜を形成し、膜の流動性の制御等に関与し、外界からの細胞の保護
- 2) 血中コレステリン量を安定に保つ(コレステロールの代謝)
- 3) 血清中の脂質量のコントロール
- 4) 油脂や脂溶性ビタミンの消化、吸収を促進する
- 5) タンパク質の機能発現に適した環境を作り出す
- 6) コリン、イノシトール、リン、必ず脂肪酸の供給源
- 7) 肝臓、胆のうの代謝機能に関与⁴⁾
- 8) 生体膜に結合した酵素の制御に関与
- 9) プロスタグランジンの前駆物質

等がある。この様に一応のリン脂質の機能は解明されているのだが、分子レベルにおいても明確となると、はなはだ不透明であり、最近になって再び研究が盛んになって来たのが実情である。例えば、Chemical AbstractsのSubject indexから、“Phospholipid”及び“Phosphatidyl Choline”の項目を調べてみると、表-1の様になっており、研究件数は着実に増加して来ている。特に最近では生体内で特殊な機能を持つリン脂質が注目され、分子レベルでの機能解明が進んでいる。さらに、リポソ

表-1 リン脂質類に関する研究件数の推移

項目 \ 年代	1981	1982	1983	1984
Phospholipid	1203	1724	1866	1902
Phosphatidylcholine	1274	1208	1315	1390

単位: 件

ーム原料としても注目され、安定なリポソーム^{5)~8)}、機能を持ったリポソームの研究が盛んに行われている。ここでは、これら最近話題にのぼっているリン脂質及びその利用について述べてみたい。

1 リポソーム

リポソームはリン脂質が水中で形成する脂質二分子膜より成る小包のことである。その形態を図-1に示す。リン脂質は元来生体構成成分であるため、その毒性をあまり考慮する必要がないと思われる。又リポソームが内水相には水溶性物質を、疎水相には油溶性物質を保持できることから、リポソーム内に各種薬剤を閉じこめて一種のカプセルを作成し、細胞、組織あるいは個体にリポソーム内の物質を効果的に与えようとする試み(Drug

図-1 リポソームの形態

図-2 リン脂質の構造及び種類

Delivery System) の研究が盛んに行われている。

リポソーム原料として使用されるリン脂質は、ホスファチジルコリン (PC) が中心であり、卵黄 PC, DMPC (ジミリスチルホスファチジルコリン), DPPC (ジパルミチルホスファチジルコリン), DSPC (ジステアロイルホスファチジルコリン) 等がよく使用されている。リポソームの補強, 安定化のためにコレステロールがよく加えられている。さらに, 表面電荷を調整するために, PE (ホスファチジルエタノールアミン), PA (ホスファチジン酸) 等の酸性リン脂質又はオクタデシルアミン, ジヘキサデシルホスフェートなどを加える場合もある²⁾。短鎖脂肪酸 (C₆~C₈) を持った PC を加えるとリポソーム化が容易に行えるという報告も出ている⁹⁾。

卵黄 PC より調製したリポソームと合成リン脂質 (DSPC) 等から調製したリポソームには原料に基づく差がある。一般に, 前者はリポソームを形成しやすくトラップ率も良いが, トラップ後の経時における保持率という点では後者の方が優れている。研究目的により使用するリン脂質, リポソーム作成法もかなり違うので, どれが一番良いかは一概に言えない。安定性の一つの例では, DSPC-PA-コレステロールを用いて, カルボキシフルオレセインを内封したリポソームは, 4°C 蒸留水中では少なくとも 8 か月は安定であるという¹⁰⁾。さらにリポソームの安定性向上を目指して, リポソーム中の脂肪鎖部分を重合させた高分子化リポソームも研究されている^{11)~13)}。

リポソームの利用面では, リ

ポソームにモノクローナル抗体を組み込み, ターゲット部位に的確に薬剤を送り込むという研究が行われている¹⁴⁾。特にがん特有のモノクローナル抗体を用いた研究が盛んである。モノクローナル抗体をリポソームに組み込む際には PE が使用される。PE の極性頭部にあるアミノ基を利用して¹⁵⁾, 抗体がリポソーム表面に結合される。一般に DPPE が良く使用されている。

リポソームにスルファチドを添加したものは脳血管関門を通過することができる。このリポソームに D-グルコースオキシダーゼなどの酵素を封入すれば, 先天的酵素欠陥症の治療に有効であることが判明している。またムラミルジペプチドを内封したリポソームは抗原特異的免疫反応の強化¹⁶⁾, 微生物感染に対する抵抗力の強化¹⁶⁾に有効であり, マクロファージを活性化しがんの免疫療法としても研究されている¹⁴⁾。

リポソームを用いた診断薬も開発されている。リポソーム膜-抗体イムノアッセイ (Enzyme Membrane Immuno Assay, EMIA)¹⁷⁾ である。原理はリポソーム表面に測定する抗原を結合させ, リポソームにアルカリホスファターゼを内包させる。この系へ抗体と補体を入

図-3 リポソーム表面上に抗体を結合させる方法 (Leserman らの文献¹⁵⁾より引用)

れ酵素が流出する。抗原がある場合は競争的に抗体と反応するためリポソームはこわれにくい。つまり全体の酵素活性の減少度からサンプル中の抗原量を測定する仕組みになっている。B型肝炎、梅毒、免疫グロブリン、胎盤性ゴナドトロピンなど高分子抗原の測定法が開発されている。酵素の代わりにマーカーとしてカルボキシフルオレセインを内包したものも開発されており、マーカーの流出量から抗原量が測定できる。

その他、リポソームは遺伝子工学（リポソームとの細胞融合による形質転換）¹⁸⁾、化粧品分野¹⁹⁾にも使用されたり、ヘモグロビンや鉄（II）ポルフィリンを内包させて人工赤血球²⁰⁾にする試みも進展している。又、リポソームを利用して界面における電荷移動の研究も行われている^{21), 22)}。

上述した様に、リン脂質を用いたリポソームは治療薬、診断薬の分野を中心に盛んにその利用が研究されており、これから増々発展してゆく分野であろう。

2 血小板凝集とリン脂質

血小板凝集による血栓の形成はこれに引き続いて起こる血管閉塞（例 心筋こうそく、脳卒中）は医学上重大な問題であり、数多くの抗血小板凝集作用を持つ物質が検討されている。血小板凝集に関するメカニズムとしては次のことが良く知られている。

細胞に種々の化学的・物理的刺激が加えられるとホスホリパーゼ A₂ が活性化され、リン脂質膜の C-2 位に取りこまれたアラキドン酸が遊離する。遊離したアラキドン酸はプロスタグランジン合成酵素によって PGI₂ や TXA₂ に変換される。血小板で作られる TXA₂（強い血小板凝集作用を持つ）と血管壁で作られる PGI₂（血小板凝集阻止作用を持つ）とは、互いに脈管系を正常に保つための重要な因子として働いている（図-5）。

アラキドン酸遊離に関してはホスファチジルイノシトール（PI）及びそのリン酸化物の代謝が重要な役割を果たしていることは良く知られており、PI はアラキドン

酸の供給原と考えられている（図-6）。

しかし、最近の報告²⁴⁾では PC の重要性が指摘されている。PC の血小板凝集時における極めて早い時期での増加及び分解が認められ、これにより遊離するアラキドン酸量は PI のそれによる量を上回っていることがわかってきた。つまり、これは PC に結合したアラキドン酸がホスホリパーゼ A₂ により最も多く切り出されていることを示しており、血小板凝集における PC の役割は非常に大きいと考えられる。

アラキドン酸より二重結合の1つ多いイコサペンタエン酸(EPA)はアラキドン酸と同様プロスタグランジン合成酵素により PGI₃、TXA₃ へと変換される。PGI₃ は PGI₂ と同様の作用を持つが、TXA₃ は血小板凝集作用を持たないことが知られている。又 EPA はそれ自身で血小板におけるシクロオキシゲナーゼによるアラキドン酸の TXA₂ への変換を阻害する作用を持つ。上述の PC の血小板凝集における重要性及び EPA の作用を考え併せると、EPA を C₂ 位に持つ PC は有用な抗血小板凝集作用を持つと考えられる。事実、ラット血小板を EPA で修飾すると凝集は著しく抑制される。これは PC より遊離した EPA によりアラキドン酸の TXA₂ への変換が阻害されたものと考えられる。現在、EPA はエチルエステル形で動脈硬化、高血圧、血栓症等の治療薬として臨床試験が進められているが、生体内での利用過程を考えるとリン脂質に組みこんで利用した方がその効果は大きいのではないと思われる。また、血小板凝集を防ぐために、ホスホリパーゼ A₂ を特異的に阻害することも考えられる。この阻害剤として、PC 類似体である光学活性 1-アシル-2-アシルアミド-2-デオキシグリセロホスファチジルコリン²⁵⁾が合成されている。

図-5 PGI₂ と TXA₂ の関係

図-6 PI からのアラキドン酸遊離（鬼頭の文献より引用²⁴⁾）

図-7 アラキドン酸イコサペンタエン酸の構造

図-4 アラキドン酸の遊離と PGI₂, TXA₂ の生成

3 リン脂質の分化誘導能

動物のしゅよう細胞に対して分化誘導活性を有する物質がニジマスの受精後 12~14d のはい(胚)中から分離された²⁶⁾。各種分析の結果から、主成分として C₁ 位に C₁₅H₃₁CO

(二重結合を一つ有する), C₂ 位に C₂₁H₃₁CO (二重結合を 6 つ有する) の脂肪酸残基を持つグリセロホスファチジルコリンであることが判明した。分化誘導能はフレンド白血病細胞の分化誘導率, マウス骨髄性白血病細胞の分化誘導によるリゾチーム活性及びマウス奇形種細胞の分化誘導程度によって調べられた。その結果このリン脂質はがん細胞に対して正常細胞への分化誘導作用を示す制がん剤となり得ることが判明した。発生初期のはいの中に見いだされたリン脂質が分化誘導能を持つという非常に興味深い例である。リン脂質が細胞の情報伝達や細胞内反応の制御に深く関係していることを示している。

4 PAF 類似化合物の示す生理活性

リン脂質が強い生理活性を発現するものとして, PAF (血小板活性化因子) がよく知られている^{27), 28)}。血小板の活性化, 血圧降下, マクロファージの活性化等多彩な活性を発現する。現在これらの生理活性の分離を目指して多数の構造類似体が合成されその生理活性が検討されている²⁹⁾。しかし, うまく活性が分離された例はまだないが, きつ抗剤としては, CV-3988³⁰⁾ が合成されている。

一つの試みとして, PAF をリポソームに内包することが行われた³¹⁾。その結果, 溶血能, 降圧作用は 1/10 に低下し, 血小板活性化能は 1/100 に低下した。一方これに対してマクロファージの活性化能は 1000 倍に上昇した。これは前者ではリポソームに内包することにより PAF のモノマーとしての作用が減じられたこと, 後者ではリポソーム化により PAF の代謝が妨げられたこと, 効率良くマクロファージに取りこまれる形になったこと等が原因と考えられる。PAF の免疫

図-10 CV-3988 の構造³⁰⁾

賦活剤としての可能性が浮かび上がってきた。

ジアルコキシホスファチジルコリンには宿主依存性抗しゅよう作用, マクロファージ活性化を介した抗体産生抑制効果などが発見されている。例としては, ジオクチル PC, ジラウリル PC などがある³²⁾。これらのリン脂質は細胞膜に入りやすい構造をしているため細胞機能を修飾する可能性がある。アルコキシホスファチジルコリンを中心として, 分子種, 極性頭部に種々の修飾が加えられ医薬品として活発に開発が進められている^{33), 34)}。

5 肺表面活性物質

肺表面には肺胞の気-液界面の表面張力を著しく低下させる物質があり, 肺表面活性物質と呼ばれている。この物質が欠如すると肺胞は拡張, 収縮する能力を失う。未熟児の呼吸窮迫症候群 (RDS) はこの様な状態である。肺表面活性物質の主成分である DPPC は肺胞の気相-液相界面にあり, 界面の表面張力を低下させる作用を持ち, 他のリン脂質に比べその作用が一番大きい。肺表面活性物質についてはその分子種の変換機構や代謝機構が詳細に調べられており, その概要を図-11 に示す。DPPC のみでは生理条件下で機能することはできず, ホスファチジルグリセリン (PG), 脂肪酸, タンパク質, コレステロール等が必要である。人工サーファクタントが種々作成されているが, 藤原³⁶⁾によるサーファクタント-TA が RDS の治療に効果を上げている。成人への適用も進められており医薬品としての開発が進んでいる^{37), 38)}。

6 リン脂質の基本的化合物としての PC

上記 1~5 までにおいて、最近のリン脂質に関する話題を拾ってきた。ここではリン脂質化合物の互変性及び他の有用化合物への変換について触れてみたい。

生体内には分子種を含めると 1000 種を超えるリン脂質が存在すると考えられる。その中でも最も存在量が多く容易に入手できるものは PC である。又、PC はリン脂質関連酵素の非常に良い基質である。そこで PC を中心とした変換マップを作成した。

極性頭部の変換は大部分はホスホリパーゼ D を用いることにより達成される。また、ホスファチジン酸 (PA) を経由し化学的に縮合剤を用いて行うこともできる³⁹⁾。マップ中、PG は肺表面活性物質の重要な成分であり、又 PA カルシウムイオノフォア作用を持つ物質として注目されている。

一方、分子種の方はホスホリパーゼ A₂ を用いて C₂ 位のアシル基をはずしゾ体への変換を経由して各種のアシル基を導入することができる。PC のアシル基を加水分解により除去し、L- α -グリセロホスファチジルコリンとした後、C₁, C₂ 位を同じ脂肪酸でそろえることもできる。また、ホスホリパーゼ C を用いれば簡単に光学

活性な 1,2-ジアシルグリセリドが得られる。この方法は D-マンニトールを出発原料とする光学活性ジグリセリド合成法⁴⁰⁾よりもはるかに容易に目的物が得られる。さらに、このジグリセリドを基にして種々の光学活性脂質の合成が可能である。すなわち PC は各種リン脂質誘導体、光学活性グリセリン骨格を持つ化合物の基本的中間体ととらえることができる。今後のこの分野の出発原

表-2 ジアシル型 PC 類の安定性⁴³⁾

品目	条 件	項 目	0 d	30 d	60 d
DPPC	40°C Air 中 褐色瓶	TLC	1 spot	1 spot	1 spot
		$[\alpha]_D^{25}(C=2)$	7.0	7.0	7.0
		mp (°C)	229.2~ 229.7	229.1~ 229.8	229.3~ 229.6
DSPC	同 上	TLC	1 spot	1 spot	1 spot
		$[\alpha]_D^{25}$	6.8	6.8	6.8
		mp (°C)	228.0~ 228.7	227.8~ 228.6	228.2~ 228.8

DPPC: ジパルミトイルホスファチジルコリン

DSPC: ジステアリルホスファチジルコリン

注: DPPC 融点測定時 226°C からスタート 1°C/min で昇温

DSPC 融点測定時 225°C からスタート 1°C/min で昇温

DPPC 脂肪酸組成 パルミチン酸 95.4% 含有

DSPC 脂肪酸組成 ステアリン酸 98.5% 含有

料として利用されてゆくものと思われる。なお PC の全合成の研究も盛んに行われ、合成経路は確立されたと思われる^{41), 42)}。出発原料により D 体, L 体, DL 体と作りわけることができる。しかし、必要なのはあくまでも天然と同じ L 体ではないだろうか。DL 体, D 体では生体内での作用発現, 生分解性, 毒性に問題があると考えられる。最後にジアシル型 PC 類の安定性について触れておく。アシル基が飽和のものはかなり安定である。二重結合の数が多くなるほど安定性は減少してくるものと思われる。

7 Phosphonolipid (C-P 化合物)

リン脂質のリン酸基はジエステル型であるが、ホスホリピドは極性基側の炭素原子とリン原子が共有結合を有している。原生動物、下等動物に広く分布しており、テトラヒメナ (原生動物) が研究によく用いられているが、ホスホリピドほどの研究件数はない。P-C 化合物の代表的なものとしてはシチリアン (2-アミノエチルホスホン酸)、ジアシル型、ジエーテル型ホスホノコリン、エタノールアミン、スフィンゴホスホノリピド等が知られている。C-P 化合物はその C-P 結合のホスファターゼに対する安定性、分布の特異性、セファリン、PAF アナログ、農業原料等として注目を集めている

図-12 PC 変換マップ

る。又、毎年 C-P 化合物の研究会が開かれており機能面を中心に盛んに研究が行われている。ほら動物にはほとんど存在しない脂質だけに今後の研究に興味を持たれる。

おわりに

以上、最近話題に上っているリン脂質について生理活性を中心に紹介してみた。これらをながめてみると一つの共通点があることに気が付く。それは極性頭部がすべてホスファチジルコリン基であるということである。機能発現に関するリン脂質の役割は極性頭部の違いにより分業化されていると考えられていたが、本稿にて紹介した化合物の生理活性の違いはそれぞれが独特に持つ分子種に起因している。今後の生理活性を持つリン脂質開発の1つの指標となるのではないだろうか。つまり、極性頭部は PC を中心にし、分子種に種々の変換を施すことにより、いまだ知られていない生理活性を持つリン脂質が発見される可能性は大いにあると考えられる。本稿では触れなかったが、リン脂質が生体膜の基本構成成分であるという特徴を生かして、特殊コーティング剤⁴⁴⁾、細胞融合¹⁸⁾、酵素の精製⁴⁵⁾等への応用も研究されている。また脳脂質の大半がリン脂質から成っており⁴⁶⁾、その機構解明が盛んになされており、リン脂質を利用した老人性痴呆(痴呆)症の治療薬ができないかと新しいリン脂質の合成、抽出の研究が始まっている。リン脂質分野の研究は機能、生理活性の解明を中心にますます盛んになってきている。それに伴い、今まで少量 (mg 単位) でしか入手できなかったリン脂質も PC を中心にかなりの量 (~kg) で高純度のものが入手できる様になってきた。

今後、リン脂質の生理的意義及び独特な生理活性がさらに解明、発見され、その特徴を生かしたものが医薬関連分野を中心として積極的に利用されてゆくものと思われる。

(昭和 60 年 4 月 8 日受理)

文 献

- 1) 日本生化学会編, “生化学データブック・I”, 東京化学同人 (1974) p. 830
- 2) 松本宏一, 油脂, **36** (10), 46 (1983)
- 3) 日本生化学会編, “生化学実験講座・脂質の化学”, 東京化学同人 (1974) p. 252, p. 515
- 4) 秋野豊明, 油化学, **30**, 710 (1981)
- 5) M. Menashe, S. Donaldson, R.L. Bilton, *Lipids*, **19** (6), 395 (1984)
- 6) Y. Yamamoto, E. Niki, Y. Kamiya, H. Shimasaki, *Biochim. Biophys. Acta.*, **795**, 332 (1984)
- 7) L.R.C. Barclay *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6740 (1984)
- 8) L. Finegold, M.A. Singer, *Chem. Phys. Lipids*, **35**, 291 (1984)
- 9) N. Elise Gabriel, M.F. Roberts, *Biochemistry*, **23**, 4011 (1984)
- 10) Y. Ishimori, T. Yasuda, T. Tadokuma, *J. Immunological Methods*, **75**, 351 (1984)
- 11) 日高誠司, 戸田不二緒, 有合化, **40**, 377 (1982)
- 12) A. Akimoto, K. Dorn, L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 90 (1981)
- 13) N.K.P. Samuel, M. Singh, K. Yamaguchi, S.L. Leegen, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 42 (1985)
- 14) Medical Application of Liposomes (1984 Japan) 要旨集 in press
- 15) Lee O. Leserman, *Nature*, **228**, 602 (1980); **293**, 226 (1981)
- 16) 真鍋 仁, 内海英雄, 濱田 昭, 第 7 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム要旨集 p. 23 (1984)
- 17) 宮井 潔, ぶんせき, **1985**, 79
- 18) 内田 賢, 日本化学会第 47 春季年会予稿集 III, 1500 (1983)
- 19) 妹尾, 荒木, 木村, 公開特許, 昭56-75,412
- 20) 土田英俊, 公開特許, 昭59-31,786
- 21) L.Y.C. Lee, J.K. Hurst, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7411 (1984)
- 22) E. Elbelt, T. Folda, H. Ringsdorf, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7687 (1984)
- 23) 鬼頭 誠 編著 “生体膜成分の構造と機能”, 学会出版センター (1982), p. 210
- 24) 鬼頭 誠, 生化学, **56**, 597 (1984)
- 25) N.S. Chandrakumar, J. Hajdu, *Tetrahedron Letter*, **22**, 2949 (1981)
- 26) 磯野 清, 旭 建一, 公開特許 昭59-46,226
- 27) 井上圭三, 野島庄七, 医学のあゆみ, **127**, 478 (1983)
- 28) 里内 清, 化学と工業, **38**, 119 (1985)
- 29) 第 6 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1983) 要旨集 p. 26, p. 36
- 30) 第 6 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1983) 要旨集 p. 28
- 31) 第 7 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1984) 要旨集 p. 31
- 32) 井上圭三, 野島庄七, 津島 進, 生化学, **56**, 595 (1984)
- 33) 野村容郎, 津島 進, 公開特許 昭58-154,512, 58-192,825
- 34) 寺地 務, 藤堂栄司郎, 公開特許 昭58-164,596; 58-189,191
- 35) 秋野豊秋, 油化学, **30**, 709 (1981)
- 36) T. Fujiwara, H. Maeta, S. Chida, T. Morita, Y. Watanabe, T. Abe, *Lancet*, **1**, 55 (1980)
- 37) 吉田恒正, 三浦祝爾, 公開特許 昭58-164,513, 183,620, 222,022, 昭 59-95,219
- 38) 田中勇次, 公開特許 昭58-45,299
- 39) R. Radhakrishnan, R.J. Robson, Y. Takagaki, H.G. Khorana, *Methods in Enzymology*, **72**, 408 (1981)
- 40) L.D. Bergelson, “Lipid Biochemical Preparations”, Elsevier/North-Holland, p. 274 (1980)
- 41) R. Berchtold, *Chemistry and Physics of Lipids*, **30**, 389 (1982)
- 42) R.G. Jensen, D.T. Gordon, *Lipids*, **7** (1974)
- 43) 難波, 菅, 榎原, 未発表データ
- 44) S.L. Regen, P. Kirszensztejn, A. Singh, *Macromolecules*, **16**, 335 (1983)
- 45) A.J. Aarsman, *Biochim. Biophys. Acta*, **792**, 363 (1984)
- 46) L.J. Macala, R.K. Yu, S. Ando, *J. Lipid. Res.*, **24**, 1243 (1983)