リポソームの動的構造を見る

宝 谷 紘 一

京都大学理学部生物物理学教室 〒606 京都市左京区北白川追分町
昭和61年6月21日 第47回 膜研究会 京都大学工学部にて講演

Transformation of Liposomes Revealed by Dark-field Light Microscopy

Hirokazu HOTANI

Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606

Liposomes undergoing transformation were visualized by real time dark-field microscopy in order to study the role of lipid in morphogenesis of biological vesicular structures. Liposomes were found to transform sequentially in a well-defined manner through one of several transformation pathways. A circular biconcave form was an initial shape in all the pathway and it transformed into a stable thin flexible filament or small spheres *via* a variety of regularly shaped vesicles which possessed geometrical symmetry. The transformation was reversible up to a certain point in each pathway. Osmotic pressure was found to be the driving force for the transformations. Biological membrane vesicles such as trypsinized red cell ghosts also transformed by similar pathways.

Key words: Liposome, Dark-field microscopy, Transformation, Form, Red cell

膜器官は多様な形をしている
脂質が自己集合して膜になる
水溶液中のリポソームを光顕で見る
映画：ダイナミックリポソーム
リポソームは順次的に形態変換する
浸透圧の変化が形態変化の原動力である
赤血球型は安定な形である
順次的形態変化は膜に普遍的性質である

で微小管自身の話はもう一つピッタリと来ないので、今日はリポソームに話を絞らせていただきます。ダイナミックなリポソームの性質を見ていただくためには映画にまざるものではありません。そこで、話の途中で10分間づつの映画を2本ほど上映しながら、お話を進めてゆきたいと思います。

膜器官は多様な形をしている

Fig.1は皆さんよく御存知のいろいろな種類の細胞です。このような様々な形がどのような仕掛けで生じてくるかという点がこのお話の興味の中心です。これらの細胞の形はそれぞれずい分と違っています。この神経細胞の場合、本体自身は一般的な形をしています。特徴的なことは、それに大変細長い突起状の管状線維が生えていることです。筋肉の細胞は細胞自体の形が細長い線維状になっています。とにかく細胞の形は多様性に富んでいます。ところで細胞は膜で囲まれております。したがって細胞の形はある程度膜の性質によって決められているの

御紹介が難うございました。私は生物現象を分子レベルで見ることに昔から興味がありまして、このごろはもっぱら“何んでも見てやろう”の精神に徹しているわけです。今回の演題は「リポソームと微小管」だったので、この演題を見られた方はこの両者にどんな関連があるのか疑問をもたれたと思います。まあ生体膜には裏うちタンパク質が何種類か有り、その主成分の一つが微小管なので関連はあるのですが、この会は膜の研究会なの

Fig.1 細胞のさまざまな形

ではないかと考えられます。

一方、細胞の中味を見ますと、核やミトコンドリアやゴルジ体、あるいはエンドプラスミックレティキュラム等の様々な種類の細胞内器官が見えてきます。これらはほとんど膜から出来上っている構造なのです。つまり、細胞全体は膜に囲れ、その中身の細胞内小器官もほとんど膜器官ということになります。ところが、この臓器官は各々特異的な形をしているのです。形態学者はその形を見れば「これはゴルジ体である」とか「これはミトコンドリアである」とわかるわけです。ところで、各々の細胞内器官はそれぞれに特異的な機能を営んでいます。このことは逆に言えば機能にとって形態が大切な役割を果たしていることを意味します。こういうわけで、膜構造がどのようなメカニズムによってその形を構築するのかという疑問が興味をひくわけです。

脂質が自己集合して膜になる

膜構造を観察し始めた歴史はずっとさかのぼります。Fig. 2は1904年に出版されたO. Lehmannの「液晶」¹⁾という本から引用したものです。この本は世界中の図書館に現在3冊現存していることがわかっています。私が数年前にイエール大学におりました時に、なんと地質学教室でこの本をみつけました。つまり、前世紀の末にはすでに、脂質を水の中に入れるとこの絵に示されたような構造が生じてくることを当時の偏光顕微鏡によって観察していたのです。ここに見えているものは多重層のい

Fig.2 ミエリン像。O. Lehmannの「液晶」¹⁾より

わゆるミエリンフォームとかミエリンフィギュアと呼ばれるものですが、おそらくこれを見た人はこんな荒唐無稽いなものはサイエンスにならないと考えたのでしょう。ごく最近までこれらの形態を真剣に研究しようとする人はあらわれませんでした。

広い意味でリボソームといえはこれらのミエリンフォームも含むわけですから、リボソームの形態を研究する際には対象を吟味しないものすごく複雑な問題になってしまいます。例えば、生体膜をそのまま扱おうとすると、脂質だけを考えてみましても、たくさんの種類の脂質の混合系を調べることになります。したがって、扱う系の組成をもう少しシンプルにすればなんらかの法則性が見えてくるのではないかと考えたわけです。

一方、形態形成の問題を考える時、タンパク質が多数集合して球形や棒状あるいはもっと複雑な形態を作り出すメカニズムが参考になるのではないかと思います。タンパク分子の場合には個々の分子が、出来上った構造に関する情報を持っているので、構成タンパク分子の溶液を適切な条件にしてやればそれらの分子がつつぎと自動的に集合し、全体の構造がひとりでに出来上ります。このメカニズムを一般にセルフアセンブリー、日本語では自己集合と呼んでいます。脂質の場合も、水中で脂質分子が集合して二分子層膜を形成する過程は完全にセルフアセンブリーですから、この考え方をさらに延長してリボソーム全体の形にも適用出来ないかと考えたわけです。管状や球形やさらに複雑な形も脂質分子自身にある程度のインフォメーションが含まれていて自動的にそれらの形態が生じてくる可能性を調べたいのです。そのためには、さきに述べたように、出来るだけ簡単な系がよろしい。そこでDPPCとコレステロールだけから成る系を調べることになりました。リボソームを作る方法は普通一般に使われている方法でして、有機溶媒に溶けている脂質混合物を窒素ガス流でドライアップした後、水を加えるという方法です。

水溶液中のリポソームを光顕で見る

Fig. 3は、こうして作ったリポソームを電子顕微鏡によってネガティブステイニング法で見たものです。どこかの教科書にも載っているような多重層が観察され、全体の形は球状が少々ゆがんだものが多いのです。ところが、後で見いただきますが、同じ試料を光学顕微鏡で見ると全く異なった像が見えてきます。つまり染色・乾燥したリポソームと溶液中のそれとは形態的に大きく異なります。このことは、考えればあたりまえのことです。つまり、脂質二重層は水があってはじめて形成される構造で、厚さ5nmのようなうすい膜から成る全体の大きな形態が乾燥後も保たれていると期待することがはじめてから無理な話なのです。そこで我々は、溶液の中でのリポソームの形をあるがままに見る方法として高輝度暗視野光学顕微鏡法を用いることとし、それを改良しました。さきに述べました前世紀の光顕法でリポソームを見ても、さすがにうまく見えません。今見ているリポソームが、多重層ではなく単層であることに原因があると思われます。暗視野光顕法も古い歴史をもっていますが、改良によってきわめてパワフルになり、再び脚光をあびつつある方法です (Fig. 4)。改良の要点は高性能コンデンサーときわめて高輝度の光源が使えるようになったこと。そして超高感度ビデオカメラによってダイナミックな映像の記録が出来るようになったことです。他のいろいろな光顕法を試みましたが、膜は薄い構造ですから、なかなか良いコントラストが得られず、結局リポソーム観察には暗視野法につきるという感じです。

映画：ダイナミックリポソーム

ここで映画にいたします。暗視野像は目では大変はつきりと見えるのですが、それでも映画フィルムに直接撮影するためには暗いのです。この映画はビデオ画面を映画にしたものです。溶液中ではリポソームはどのような形をしているのかをまず見ていただきます。まず一種類の脂質から成る一番簡単なリポソームですが、これはDMPCのみで出来ています。相転移温度より高い30°C近辺で観察しているので、長く滑らかで柔い管状になっています。次のシーンはやはり単純な組成のリポソームで、DPPCのみから出来ています。この場合は相転移温度が44°C附近なので、50°C近辺で観察しています。やはり柔らかくて滑らかな線維状の管になります。次のシーンはDPPCリポソームを相転移温度より低い温度

Fig. 3 リポソームの電子顕微鏡像。スケール: 0.1 μm

Fig. 4 暗視野光学顕微鏡法

で見たものです。先程の柔い線維が極端に硬くなり、折れ曲り、ゴツゴツしたセグメントのつながりに変化しています。脂質二重層が液晶相から結晶相に転移したものです。目で見える相転移というわけです。次のシーンはDPPCとコレステロールのモル比1:1の混合物から出来たリポソームです。DPPCにコレステロールを加えてゆくと相転移温度が下がるとみえて、30°C前後でも滑らかで柔いリポソームを形成します。この場合は管状というよりも割合規則的な形のさまざまな小胞状リポソームが多く出来てきます。このシーンにはピーナツ形や赤血球形、あるいは四角板状の頭に管状の尻尾が着いたものとか、三角板状とかいろいろな小胞が見えています。

次は複雑な組成をもつ脂質の例としてエッグレシチンから成るリポソームが映っています。大変柔らかく細長

い線維状の管が出来ています。この中には2種類の太さのものが見えています。太いものと、細くて大変柔かく激しく曲げブラウン運動をしているものです。各々の1本の線維については太さは均一で途中から太さが変わっていくことはありません。一般的に言えば生体から抽出された脂質は非常にフレキシブルな線維状リボソームを作りやすい傾向があります。これは脂質組成が複雑なので流動性が高くなっているからだと推察されます。

このシーンはエッグレシチンの大きな固りの表面を見えています。つまり、リボソームが形成される過程を見たいのです。脂質の固まりの表面から様々の形の管が飛び出しているのがわかります。中には枝分れしている管もあります。それらがちぎれて小胞が形成されています。脂質表面ではきわめてドラスチックなことが次ぎ次ぎと起こっています。中にはこのような数珠状のものが出来てきます。ところがこれをたどってゆくと少しずつ連続的に変化し、やがて数珠がはっきりしなくなり、こちらの端では単なる管になっています。中程では管に多数のくびれが生じて数珠状になったり、あるいは逆の過程で管になったりして形態がゆらいでいます。数珠が更に進行すると一つづ外れて、小さな球状小胞になるのです。

つまり、脂質の固まりからは様々な形のダイナミックな構造が生じ、それらが安定な形へと形態変化しているのです。一つ一つを見るとミトコンドリアに似ているとかゴルジ体に似ているということです。また、神経線維等の基本構造は細長い管ですから、脂質自体が自然に神経管様構造を作り上げる能力を持っていると考えることも出来ます。ここで映画を中断してスライドにもどします。

リボソームは順次的に形態変換する

映画の中にも出て来ましたが、DPPCとコレステロールの混合モル比を変えた時のリボソームの形がFig. 5とFig. 6に示されています。100 : 5と、コレステロールが少ない時には脂質はほとんど固まりのままでリボソームがうまく形成されません。もちろん常温での話ですが、以下の実験は全て常温で行っています。100 : 20になるとFig. 5でわかるようになんか柔らかくなり、少し形がいびつですが管や小胞状リボソームが出来てきます。Fig. 6はモル比1 : 1のリボソームです。幾何学的対称性をもった美しい小胞状の柔らかいリボソームが出来ています。

ところでこのモル比1 : 1のリボソーム試料を観察し

Fig. 5 DPPCとコレステロールから成るリボソーム。
写真上部の数字は組成モル比

Fig. 6 DPPC : コレステロール = 1 : 1 (モル比) のリボソーム

Fig. 7 リボソームの経時的変化

ていると、時間とともにどんどん形態が変化してゆくことがわかりました。Fig. 7はその一例です。赤血球状小胞が枝分れた管状へと形態変化しています。これらの詳しい変換過程については後ほどもう一度映画で見えてい

たきます。1個1個の変換過程を観察していると、全部の小胞が同じ過程を経るのではなくて、各々が特異的な形態変化をしていることがわかりました^{2,3)}。しかし、最初の形はいつも赤血球型です。つまり円盤状で、まん中がくぼんでいるのです。直径は1~10 μm です。その後、これらが、様々な経過をたどるのですが、最後にはきわめて細い柔い線維状か小さな球状かどちらかに落ちつくことがわかりました。赤血球型から最終型へ変化するし方、いいかえれば、リポソームの形態変換パスウェイが数種類以上あるのです。それをまとめたものがFig. 8です。左端に示した赤血球型のみ正面からの2方向から見た図が示されています。

赤血球型は正面から見ると円形なのですが、時間とともに円形がゆらぎはじめ、Fig. 8に見られるごとく、五角形になったり四角形、三角形あるいは二角形に変化します。もちろん二角形はありませんから、実際上は楕円形に見えます。円形から多角形に変化する段階でパスウェイが大きく分岐するわけです。実際の変化の様子は最後に映画で見ていただきますが、これらのパスウェイは一見まとめようのない形態変換が起こっているように思えますが実は割合と規則性高く進行してゆく事象であることが解りました。

とり合えずFig. 8の最下段にそって進む五角形パスウェイについて説明します。より詳しい移行過程がFig. 9中の写真で解っていただけたと思います。出発点である赤血球型は正面から見るときれいな円形をしています。まずその円形がゆらぎはじめ多数の振動モードの混ざった運動をし、やがていずれかの多角形に落ちつきます。今の場合は五角形というわけです。そのうち五角形の角の部分がどんどん鋭くなり、辺の部分が内側へ落ちこみはじめ、やがて角が臨界的に突出して管が形成されます。その後、管がどんどん長くなりその分、頭の部が小さくなってゆきます。ある程度頭が小さくなると、残りの角から管が突出して、枝分れた管状になります。時間と共に管はますます長く、細く、柔くなって線維状になり、時には小さな頭の部分からもう一度劇的な変化が起こり、二重の球になったりします。二重であることは何故わかるかといいますと、最初の赤血球型の時の表面積は計算できています。一方最終の球の表面積もすぐ計算できるのですが、それが最初の表面積のちょうど半分になっているというわけです。

Fig. 9の黒丸は形の変化に伴う表面積の値を目もっています。形はずいぶん変化しても一定に保たれていま

Fig. 8 リポソームの形態変換パスウェイ

Fig. 9 五角形パスウェイにおける体積(○)と表面積(●)の変化

す。一重の膜である限り面積は一定に保たれているのです。二重膜になると光散乱能は一桁近く増大するので、上記の球は一重膜の球に比べてきわめて明るく輝くので、暗視野光顕で簡単に区別がつけます。これも暗視野光顕のメリットの一つです。

話がわき道にそれましたが、他の四角形、三角形についても基本的には同様の形態変化が進行しています。それぞれの多角形の角の突出がくりかえされて枝分れた管状になり、その一つの管がどんどん長く細く柔らくなって線維状になるのです。二角形にあたる楕円パスウェイでは角が突出すると同時にピーナツ状になり、これが管の連なった形に対応しているわけです。各パスウェイに見られる他の道は、枝分れた管に括れが入って、それが深くなり数珠状に変化し、やがてそれらがバラバラになって小さな小球リポソームになることもあります。最終的なリポソームの形態が小球になるか線維状になるか、これを区別している機構については全く手つかずの課題です。

Fig. 10 ソルビトールによって浸透圧を上げた時に生じるリボソームの形態変化

浸透圧の変化が形態変化の原動力である

次に興味ある問題はこれらの形態変化を進行させる原因は何であるかということです。ところでこの変化は試験管内で保存したリボソームには見られません。この試料を光学顕微鏡で観察しているとどんどん変化してゆくのです。しかし光や熱でこの変化が生じているのではありません。そこで変化の要因になりそうなものをかたっぱしから試してみました。膜にはカルシウムがいかにも効きそうですからまず最初に試しました。なるほど、ちゃんと変態変化を起こします。続いて様々な塩類を試すと全部効くのです。糖類を加えても変化します。

何を加えても効くということは化学的作用によって効いているのではなく、物理的作用によっているのだと考えるのが自然です。要するに浸透圧が効いているのだと思われます。そこで浸透圧調整剤であり、化学的には何ら反応性のないソルビトールを加えてリボソーム溶液の浸透圧を水から1 mMに上昇させると様々な小胞状リボソームは瞬時にして小球か又は線維状の最終形態へ変化していました。その様子はFig. 10に示されています (Fig. 10)。左図のような小胞状リボソームがソルビトールを添加して浸透圧を上げると右図のような最終形態になるのです。しかし、ひょっとすると浸透圧としてではなくソルビトール自身が効いている可能性もなきにしもあらずなので、はじめから1 mMソルビトール溶液でリボソームを調製しました。そうすると、水中と同じく小胞状リボソームが出来ました。そこで更にソルビトールを加えて5 mMに濃度上昇させると、やはり線維状と小球状の最終形態に変化してしまいます。つまり、形態変化の要因はソルビトールの化学的作用ではなく、

Fig. 11 様々な形態の円盤状小胞の曲げ弾性エネルギー. Canham⁴⁾ の図を改変

浸透圧の変化なのです。

先に述べた顕微鏡で観察中に生じる形態変化の場合は特に浸透圧を上昇させるような操作は行っていません。しかし、以上の事実を考慮すると、光顕観察中の試料からゆっくりと水分が蒸発し、試料中にわずかに存在していた塩分が濃縮され、リボソームの内外に浸透圧差が生じることが形態変化の要因だと思われます。これを確かめるために小胞の表面積と体積を測定することにしました。光学顕微鏡によって小胞の三次元的形態が映像として記録できるので少々複雑な形でもその表面積と体積を計算によって求めることが出来ます。五角形パスウェイにおけるこれらの値の変化がFig. 9に示されています。形態変化に伴って体積はどんどん減っていますが、表面積の方はおおむね一定に保たれています。予想通り、浸透圧差によってリボソーム中の水が膜を通過して外へ出るために体積が減少しているのです。表面積はとりもなおさず膜の面積ですから、少々リボソームの形が変わっても一定に保たれるわけです。他のパスウェイについても同様の測定を行いました。いずれも体積減少、表面積一定の結果が得られました。

赤血球型は安定な形である

以上の結果から形態変化の原動力がリボソーム内外の浸透圧差であることがわかりました。次の興味は赤血球型や多角形盤型などの形がどのような仕掛けで自然に生じてくるかということです。膜小胞の形に関して歴史的に古くから注目を浴びてきたものに赤血球があります。一見、奇妙で美しく、大きさもきっちり決まっていて、しかも何時でも手に入る材料ですから興味をひいたのはもっともなことです。百年以上の長きにわたってこの美しい形の生ずる機構について様々な説が出されてきましたが、今だに決定的な説はありません。その中の一説

ですが、1970年にCanhamという人が出した説がリボソームの形を理解する上にきわめて重要だと思われます⁴⁾。

アイデアのエッセンスは膜を二次元に広がった液晶と見なすことです。液晶だとすればFig. 11の左下に示したようなずり変形に対しては弾性エネルギーの蓄積はゼロで右上に示した曲げの変形に対しては、膜は極度に薄い構造だといえども弾性はあるはずで、そこで赤血球と同じ体積と表面積を与えて、この条件の中で小胞の形を変化させ、立体的に曲げによる全弾性エネルギーを計算するのは、その結果がFig. 11なのです。曲げエネルギーは曲率の2乗に比例します。したがって、曲がっている部分の多い赤血球型の方が、平面の多いパンケーキ型より弾性エネルギーが高いように思えます。ところがFig. 11で見られるごとく、赤血球型の方が安定になっています。理由はこうです。赤血球型ではまん中の部分をへこませることによって体積を減少させ、余った体積を周辺部へまわします。その結果周辺部の曲率が小さくなり、周辺部の弾性エネルギーが大きく減少し、さしひきすればパンケーキ型よりエネルギーが低くなるというわけです。つまり、赤血球形にするための特別な仕掛けがあるのではなく、一定の体積と表面積を与えれば膜小胞が一番安定な形として自然に赤血球型になるということです。

このような考え方を強く支持する、簡単ではありますがエレガントな実験がBull⁵⁾によって行われました。Fig. 12に示したように赤血球膜の一部分をガラス表面に固定するのです。そして赤血球上にレーザーによって小さな印を着けます。この赤血球を粘性流を使ってゆっくりと押すのです。そうするとFig. 12に示したように、固定部分を残して他の部分は移動します。しかも、全体の赤血球型を保ったままです。この移動は図に示されているように可逆的です。つまり、印をつけられた部分は周辺部でも、まん中のくぼんだ所でも、どんな曲率でもとることが出来るのです。この事実は昔から根強くあった、赤血球の内側に比較的固い裏うちタンパクのケージのようなものがあって、これが形を規定しているという考え方を否定します。赤血球の形は各部分の曲率を決める方式ではなく全体の安定性によって決められているのだと思われます。

順次的形態変化は膜に普遍的性質である

それでは赤血球膜も DPPC・コレステロールの系と

Fig. 12 赤血球の粘性流による変形 Bull⁵⁾ の図を改変

Removal of cytoplasmic-face proteins from an erythrocyte membrane

1. Wash, fresh red cells, 3 times, phosphate-buffered saline (PBS).
2. Add, 5 μ g/ml trypsin
3. Dialyze, against 6-fold diluted PBS, room temp, 1 hr, gently stir.

4. Wash, 1/6-PBS, 10 k.r.p.m., 15 min.

Fig. 13 赤血球の裏うちタンパク質を分解する方法
○はヘモグロビンを、★はトリプシンを示す

同様の形態変換をするでしょうか？ いきなり赤血球溶液の浸透圧を上げたのでは金平糖型になるだけで、変換パスウェイに沿ったような変化はしません。赤血球の内側には、膜の機械的強度を上げるために裏うちタンパク質がたくさん付いています。これらが、赤血球膜の本来もっている性質を発揮させてくくしているのだらうと考えたわけです。Fig. 13のような方法で赤血球内側の裏うちタンパク質をトリプシン分解で除きました。このゴースト赤血球膜小胞の浸透圧を上げてみると、Fig. 14に見られるように、DPPC・コレステロール系と同じ形

from Red Cell

Fig. 14 裏うちタンパク質を除いた赤血球の形態変化

Division of a liposome

4 min

Fig. 15 リボソームの分裂過程

態変換が生じました。他の脂質膜についても調べてみました。例えば、ディノフラジェレートという最も下等な単細胞生物から抽出された脂質を用いて作ったリボソームも同様の順次的多形変換を示します。

更に驚くことには、脂質様物質として有機合成されたある種の両親媒性分子が膜小胞を形成し、これもリボソームと同様の形態変換することが明らかにされたのです^{6, 7)}。つまり、膜小胞の多形変換する性質は、脂質膜の範囲を超えて、より一般的な二次元液晶膜の特質としてとらえることが出来るといえます。

話を元にもどしますが、形態パスウェイにおける赤血球型以降の多角形への変化も上記に述べたのと同じ原理によって説明可能だと考えています。つまり表面積一定で体積を減らしていった時の曲げエネルギーを計算する問題に還元しようというわけです。この問題は意外に難しく、緒についたばかりです。

いろいろな細胞内器官や赤血球の形、また神経細胞の軸索突起のような細長い管状構造も、リボソームで見ら

Fusion of a liposome

0.71 sec

Fig. 16 リボソームの融合過程

れる様々な形を組み合わせることによって作ることが出来るはずで、いいかえれば膜器官の形態は脂質膜ももっている本来の能力が発揮されたものだといえます。

リボソームは最近、医学的応用をめぐってにぎやかになってきています⁸⁾。一方では膜中の脂質分子間に架橋を入れた高分子化ポリソームが注目を浴びています⁹⁾。これらの研究においても溶液中の動的なリボソームの形態を研究することが不可欠になってくるものと思われます。ここで順次的多形変換の様子とリボソームの分裂 (Fig. 15) や融合 (Fig. 16) の過程を映画で見ていただきます。(この映画の部分は講演録から除きました)。

御清聴ありがとうございました。

文 献

- 1) O. Lehmann: "Flüssige Kristalle" Verlag von Wilhelm. Engelmann, Leipzig (1904) pp254
- 2) H. Hotani: *J. Mol. Biol.*, **178**, 113 (1984).
- 3) 宝谷紘一: 生体の科学, **36**, 523 (1985).
- 4) P. B. Canham: *J. Theoret. Biol.*, **26**, 61 (1970)
- 5) B. Bull "Red Cell Shape" eds. M. Bessis, R. Weed, P. Leblond, Springer-Verlag, New York (1973) pp115.
- 6) T. Kunitake, Y. Okahata, M. Shimomura, S. Yasunami, K. Takarabe: *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5401 (1981).
- 7) N. Nakashima, S. Asakuma, T. Kunitake, H. Hotani: *Chem. Lett.*, **1984**, 227 (1984).
- 8) 坂野喜子, 野沢義則: 膜, **10**, 235 (1985).
- 9) 北野博巳: 膜, **10**, 279 (1985)