[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (12) 1129-1136 (1981)]

諸種薬物のヒト赤血球内 K⁺ イオン流出促進効果と膜変形誘起効果との比較

佐藤隆司,^a 池田まさ子,^a 金保安則,^a 藤井達三*,^a

京都薬科大学^a

Comparison of the Effects of Drugs on K⁺ Efflux through the Membrane of Human Erythrocytes and on the Membrane Shape

TAKASHI SATO,^a MASAKO IKEDA,^a YASUNORI KANAHO,^a and TATSUZO FUJII*,^a

Department of Biochemistry, Kyoto College of Pharmacy,^a

Misasagi, Yamashina, Kyoto 607, Japan

(Received May 19, 1981)

Efflux of intracellular K⁺ from human erythrocytes was stimulated under non-hemolytic conditions by each of four phenothiazine derivatives, two non-steroidal anti-inflammatory drugs and a local anesthetic, and was dependent on time and temperature, while membrane shape change induced by them was independent of time and temperature. Cepharanthine, one of biscolaurine alkaloids, and lipid bilayer perturbing agents, such as lysolecithin, phospholipase A₂ and C, and quarternary ammonium compounds, induced membrane shape change without stimulating K⁺ efflux at any temperature. In contrast, N-ethylmaleimide, membrane protein modifying reagent, remarkably stimulated K⁺ efflux time- and temperature-dependently without inducing membrane shape change.

These results suggest that the K⁺ efflux may result from drug-induced rearrangement of a certain membrane protein (e.g. K⁺-channel protein) and is independent of membrane shape change, which appears to result from the perturbation of membrane lipid bilayer.

Keywords—human erythrocytes; membrane shape change; K⁺ efflux; phenothiazine derivatives; non-steroidal anti-inflammatory drugs; local anesthetics; phospholipase A₂; phospholipase C; quarternary ammonium compounds; N-ethylmaleimide

緒 言

組織細胞の膜系に作用するフェノチアジン系向精神薬、局所麻酔薬、非ステロイド性抗炎症薬などは、ヒト赤血球膜を始めとする種々の膜系に対しても種々の作用を発揮することが知られている。そのうち、chlorpromazine は、赤血球の浸透圧溶血に対する抵抗性の増大,¹⁾ 赤血球の可塑性 (deformability) の減少,²⁾ ニワトリ赤血球膜内粒子の凝集,³⁾ およびリソゾーム酵素の遊離抑制などの膜安定化,⁴⁾ レシチンリポソームでのグルコース透過性の増大,⁵⁾ レシチン単分子膜での表面圧の増大⁶⁾ など、多数の報告がある。局所麻酔薬についても、膜安定化以外に, dibucaine による酸性リン脂質ベシクルの相転移温度低下による流動性の上昇や,⁷⁾ マウス、ハムスター細胞のコンカナバリン A による凝集促進なども報告されている。⁸⁾ これらさまざまな現象にもかかわらず、それらの膜系への作用機作については未だ不明な点が多く、これら種々の現象が薬物の同一の作用機作によるものかどうかについても明らかではない。

著者らは、薬物の膜系への作用発現として、赤血球膜に誘起される形態変化を主な指標として薬物の膜への作用機作の解析を行なっている。⁹⁾ これらの薬物によって、赤血球膜には浸透圧抵抗性の変化や、膜損傷による赤血球内 K⁺ の流出なども誘起されるが、これらの現象と膜変形との関連性についてはほとんど知られていない。我々はすでに、薬物により誘起される赤血球膜変形と浸透圧抵抗性の変化との関連性について報告した。¹⁰⁾ 本報では、諸種薬物により誘起されることのある赤血球内 K⁺ の流出と、同時に誘起されることのある膜変形現象との関連性について詳細に検討し、薬物の赤血球膜への作用機作をさらに追求した。

実 験 の 部

赤血球 ヒト赤血球としては、新鮮ヒト血液より得た赤血球沈層 (日赤京都血液センターより分与、御好意

に感謝する)を, 150 mM choline chloride 含有 10 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4 (以下 TBC と略) で三回洗浄し, 白血球および血小板を除去した後, TBC に再懸濁させて実験に供した.

試薬 フェノチアジン系向精神薬である chlorpromazine, trifluoperazine, promethazine および perazine, ビスコクラウリン型アルカロイドの cepharanthine, および酸性非ステロイド性抗炎症剤の flurbiprofen は, それぞれ吉富製薬株式会社, 化研生薬株式会社および科研薬化工株式会社より提供されたものを用いた (御好意に感謝する). 局所麻酔剤の dibucaine, 酸性非ステロイド性抗炎症剤の flufenamic acid, および SH 剤の N-ethyl-maleimide (NEM) は市販品を用いた. また lysophosphatidylcholine (lysolecithin) は, 卵黄より抽出した lecithin に蛇毒 phospholipase (PLase) A₂ (Sigma 社製) を作用させた後, 分離精製して用いた.

これらの薬物は, TBC に溶解し, HCl または KOH で pH 7.4 に調整して, K⁺ 濃度が 6 mM になるように KCl を添加した後実験に供した.

脂質水解酵素である PLase A₂ (bee venom 由来) および PLase C (*Clostridium perfringens* 由来) (いずれも Sigma 社製) は, 5 mM CaCl₂ 含有 0.9% NaCl 溶液に溶解後, 夾雑物としての protease を失活させるために, 90°C, 5 分間加熱した後用いた.

赤血球内 K⁺ 流出量の測定 各種薬物溶液 1 容量を, ヘマトクリット (Ht) 20% 赤血球懸濁液 1 容量と混合し, 各温度にて各時間保温した後, メジウム中へ流出した K⁺ 量を測定した. 赤血球の酵素処理は, 5 mM CaCl₂ および 3 mM KCl 含有 TBC に懸濁した Ht 10% 赤血球懸濁液に, 1/500 容量の PLase A₂ (48 μg protein/ml cells) または 1/60 容量の PLase C (50 μg protein/ml cells) を加え, 無溶血下での K⁺ 流出量を測定した.

K⁺ 量の測定は, 基本的には穂積らの方法¹¹⁾ に従った. すなわち, 指示電極としてカリウム選択性ガラス電極 (東興化学研究所製), 参照電極としてダブルジャンクション塩化銀電極 (オリオン社製) を各種薬物処理赤血球懸濁液中にそう入し, その起電力を, 電位差計として Corning Digital 112 Research pH Meter を用いて測定した.

K⁺ 流出量は, あらかじめ塩化カリウム溶液を用いて求めた検量線より, K⁺ 濃度として求めた.

赤血球内 K⁺ 量は, 10% Triton X-100 で完全に溶血させて, 同様に求めた.

赤血球への薬物の取り込み量の測定 各種薬物溶液 1 容量を, Ht 20% 赤血球懸濁液 1 容量と混和し, 各温度で一定時間保温した. その後, 900 × g にて 10 分間遠心し, 上清中に残存する薬物量を, 各薬物の紫外外部特異吸収波長における吸光度より計算し, その減少量より取り込み量を算出した.

赤血球膜変形の観察 上述した赤血球反応混液 1 容量を, 0.9% グルタルアルデヒド溶液 (0.1 M リン酸緩衝

Fig. 1. Assignment of Morphological Score to Each Stage of the Shape Change of Human Erythrocytes

液, pH 7.4 に溶解) 4 容量に加えて固定した後, 位相差顕微鏡にて観察した. 変形の程度は, Fig. 1 に示すように, 外方突出型変形には +1—+4 の, 内方陥没型変形には -1—-4 の score を与え, 次式に従って morphological index を求めた.^{9a)} この morphological index の絶対値が大きくなる程, それぞれの変形の程度が亢進していることを示す.

$$\text{Morphological index} = \sum \left(\text{morphological score} \times \frac{\text{number of transformed cells}}{\text{total number of cells}} \right)$$

赤血球膜 SH 量の定量 赤血球膜 SH 量は, Dodge *et al.* の方法¹²⁾ に従って hemoglobin-free のゴーストを調製し, Ellman の方法¹³⁾ に従って測定した.

結 果

薬物処理による K⁺ 流出と変形

新鮮ヒト洗浄赤血球に陽荷電性薬物の chlorpromazine (0.25 mM) および陰荷電性薬物の flurbiprofen (5 mM) を, 37°C で作用させると, いずれも保温時間に依存して K⁺ 流出が促進される (Fig. 2). 90 分間におおの 11 および 7 μmol/ml cells の K⁺ 流出が見られる. この条件下では, 未処理赤血球では約 1 μmol/ml cells の K⁺ が流出するにすぎない. 90 分保温後, これら三者に Triton X-100 を添加し, 全溶血させた時の K⁺ 量は いずれも約 105 μmol/ml cells であり, 従って対照値を差し引いて, chlorpromazine で 9.5%, flurbiprofen で 5.7% の流出が起こったことになる. なお, 本実験条件下では, いずれも溶血はほとんど起こらない (1% 以下).

Table I に本実験で用いた各種薬物処理による K⁺ 流出と形態変化の関係を示す. 未処理赤血球においては, 37°C で 60 分間の保温では, 形態変化は全く見られず, K⁺ 流出も 0.3 μmol/ml cells と, ごく少量に留まる. 陽荷電性フェノチアジン系向精神薬である chlorpromazine, trifluoperazine, promethazine および perazine, 局所麻酔薬の dibucaine においては, それらの濃度上昇に伴い, 誘起される内方陥没型変形の程度は亢進し, この変形の程度は低濃度では保温時間の延長に伴い若干亢進する. K⁺ 流出量も作用濃度の上昇に伴い著明に促進するが, すべての濃度において保温時間の延長に伴い促進する. 一方, cepharanthine では, 変形は上記薬物と同様に誘起されるが,^{9b)} K⁺ 流出効果は 0.1 mM では全く見られず, 0.2 mM でもごく低い値にすぎず, K⁺ の流出促進は, 変形に伴って誘起される現象ではないように思われる.

一方, 陰荷電性の flurbiprofen, flufenamic acid では, いずれも初期 (保温時間 30 分) に著しい外方突出型変形を誘起し, その変形は保温時間の延長に伴い徐々に退行する傾向にあるが, K⁺ 流出は, 時間とともに促進される. 従ってこの場合も, 変形の程度と K⁺ 流出効果との間には関連性はないように思われる.

これら薬物による K⁺ 流出促進効果に対する温度依存性を, 0.25 mM chlorpromazine (Fig. 3) および 0.75 mM flufenamic acid (Fig. 4) を用いて調べ, 変形誘起効果および赤血球への薬物の取り込みにおける温度依存

Fig. 2. Effect of Incubation Time on K⁺ Efflux from Human Erythrocytes Treated with Chlorpromazine or Flurbiprofen

Erythrocyte suspension (10%) in 150 mM choline chloride-10 mM Tris (pH 7.4) was incubated at 37°C for 90 min with 0.25 mM chlorpromazine (—●—) or 5 mM flurbiprofen (—▲—), or without drug (—○—).

TABLE I. Relation between the Effects of Drugs on K⁺ Efflux from, and on Shape Changes of, Human Erythrocytes^{a)}

Drugs		K ⁺ released ^{b)}		Shape ^{c)}	
		30 min	60 min	30 min	60 min
Control		0.10	0.30	0	0
Chlorpromazine	0.125 mM	3.75	6.39	-1.5	-2.7
	0.250 mM	5.38	8.70	-2.8	-3.0
Trifluoperazine	0.060 mM	2.68	4.86	-1.5	-2.0
	0.080 mM	6.46	9.73	-1.7	-2.1
	0.120 mM	7.98	12.04	-2.8	-2.9
Promethazine	0.250 mM	5.20	9.25	-1.8	-2.1
Perazine	0.250 mM	3.37	7.06	-2.8	-2.9
Dibucaine	0.750 mM	2.28	4.58	-1.3	-2.0
	1.500 mM	6.45	15.56	-2.2	-2.7
Cepharanthine	0.100 mM	0.10	0.30	-2.3	-2.5
	0.200 mM	0.56	1.09	-2.9	-3.1
Flurbiprofen	1.00 mM	1.04	1.62	+1.9	+1.4
	5.00 mM	3.85	5.47	+2.4	+2.4
Flufenamic acid	0.15 mM	0.85	1.32	+1.3	+1.0
	0.75 mM	3.62	5.45	+1.8	+1.6

a) Erythrocyte suspension (10%) in 150 mM choline chloride-10 mM Tris (pH 7.4) was incubated with each drug at 37°C for 60 min.

b) The amounts of K⁺ released from erythrocytes were indicated as μmol per ml cells.

c) The shape change was expressed as the morphological indices.

性とを比較検討した。Chlorpromazine では温度依存的に K⁺ 流出が増大し、特に 10°C ではほとんど効果はないが (Fig. 3(A)), その取り込みと形態変化は即座に誘起され、時間、温度に非依存的である (Fig. 3(B), (C)). また flufenamic acid も温度依存的な K⁺ 流出促進効果と温度非依存的な取り込みが見られるが (Fig. 4(A), (B)), 即座に誘起された外方突出型形態は時間とともに退行し、その退行は温度の高いほど著しく (Fig. 4(C)), これらの場合も、変形誘起効果と K⁺ 流出促進効果との間に関連性はないように思われる。

膜脂質層および膜タンパク質修飾による K⁺ 流出と変形

薬物の K⁺ 流出促進機作をさらに検索するため、膜成分の脂質またはタンパク質を修飾した時の K⁺ 流出に対する影響を調べた。脂質層の乱れを誘起する処理として、PLase A₂ および C と lysolecithin を用いた。PLase A₂ および C による変形は、直接的には膜脂質二重層外層の phosphatidylcholine の水解により、それぞれ外層脂質層の膨張および収縮に基づく外方突出および内方陥没型変形が誘起されることが報告されており¹⁴⁾ また lysolecithin は脂質層外層への付加的な挿入により外方突出型変形が生じることが知られている¹⁵⁾

これらを赤血球に作用させると、Fig. 5(B) に示すように、PLase A₂ では時間依存的に、lysolecithin では添加直後より外方突出型変形が生じ、PLase C では時間依存的な内方陥没型変形が生じている。本実験条件下では 90 分の保温で、PLase A₂ 処理で脂質二重層外層中の phosphatidylcholine の約 50% が、PLase C 処理ではその約 30% が水解されていた。また lysolecithin 処理では、その膜含量が本来赤血球膜に存在する lysolecithin の約 8 倍まで増加した。このような脂質層の乱れにもかかわらず、K⁺ 流出は 90 分後でも PLase A₂ 処理では対照と差はなく、PLase C および lysolecithin 処理でも 0.80—2.85 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ cells (全 K⁺ 量の約 1—2%) の流出しか起こらない (Fig. 5(A)).

さらに、methochlorpromazine や zephiramine などの四級アンモニウム化合物は、赤血球に対して時間依存的に外方突出型から内方陥没型の二相性変形動態を誘起することを著者らは報告し^{9a)} これら化合物が脂質二重層を外層から内層へ徐々に移動することによると推論した。最近、同様な四級アンモニウム化合物である 1-py-

Fig. 3. Effect of Temperature on the Stimulation of K^+ Efflux and Induction of Membrane Shape Changes Resulted from Incorporation of Chlorpromazine into Human Erythrocytes

Erythrocyte suspension (10%) in 150 mM choline chloride-10 mM Tris (pH 7.4) was incubated with 0.25 mM chlorpromazine (CPZ) at 10°C (—□—), 20°C (—△—) and 37°C (—●—) up to 90 min. As the control, erythrocytes in the same suspension without drug were incubated at 10°C (—□—), 20°C (—△—) and 37°C (—○—). (A); K^+ efflux, (B); Incorporation of chlorpromazine (CPZ), (C); Shape change induced.

Fig. 4. Effect of Temperature on the Stimulation of K^+ Efflux and Induction of Membrane Shape Changes Resulted from Incorporation of Flufenamic Acid into Human Erythrocytes

Erythrocytes were incubated with 0.75 mM flufenamic acid (FA) under the same condition as in Fig. 3. The symbols in the figure were the same as in Fig. 3. (A); K^+ efflux, (B); Incorporation of flufenamic acid (FA), (C); Shape change induced.

renebutyrylcholine が全く同様な脂質層内での動態を示すことも報告されており,¹⁶⁾ これら化合物も脂質層攪乱試薬と考えられる。そこで methochlorpromazine および zephiramine を赤血球に作用させると、Fig. 6(B) に示すように、外方突出から内方陥没への二相性変形が時間依存的に生じるが、これより生じていると思われる脂質層の乱れにもかかわらず、 K^+ 流出は 90 分後でも 1.18–1.90 $\mu\text{mol/ml cells}$ (全 K^+ 量の 2% 以下) にすぎない (Fig. 6(A))。

一方、膜タンパク質修飾剤として、SH 阻害剤である NEM を赤血球に作用させると、Table II に示すごとく、膜 SH 量の著明な減少に伴い、NEM 作用濃度および保温時間依存的な K^+ 流出が誘起される。しかしながら、20°C では膜 SH 量の低下は 37°C の場合とほぼ同程度であるが、20°C の K^+ 流出量は 37°C でのその約 1/15 程度に留まり、 K^+ 流出促進の原因として、膜 SH の阻害に基づく膜タンパク質の構造変化に加えて、温度依存

Fig. 5. Effect of Phospholipases or Lysophospholipid on K⁺ Efflux from Human Erythrocytes and on the Membrane Shape

Erythrocyte suspension (10%) in 150 mM choline chloride-10 mM Tris (pH 7.4) was incubated at 37°C in the absence (—○—) or in the presence of 30 μM lysophosphatidylcholine (—●—), 48 μg protein of phospholipase A₂ (from bee venom) per ml of cells (—▲—) or 50 μg protein of phospholipase C (from *Cl. perfringens*) per ml of cells (—■—) up to 90 min. (A); K⁺ efflux, (B); Shape change induced.

Fig. 6. Effect of Quarternary Ammonium Compounds on K⁺ Efflux from Human Erythrocytes and on the Membrane Shape

Erythrocyte suspension (10%) in 150 mM choline chloride-10 mM Tris (pH 7.4) was incubated at 37°C in the absence (—○—) or in the presence of 0.08 mM zephiramine (—▲—) or 1.0 mM methochlorpromazine (—●—) up to 90 min. (A); K⁺ efflux, (B); Shape Change induced.

TABLE II. Effect of NEM on K⁺ Efflux from Human Erythrocytes^{a)} and on the SH Content of the Membrane

		K ⁺ released ^{b)}		Membrane SH remaining ^{c)}
		30 min	60 min	60 min
Control	37°C	0.09	0.51	100
NEM 2 mM	37°C	4.60	10.67	42
NEM 5 mM	37°C	7.37	18.17	34
NEM 10 mM	37°C	11.73	27.50	30
Control	20°C	0.09	0.51	100
NEM 10 mM	20°C	0.67	1.83	35

a) Erythrocyte suspension (10%) in 150 mM choline chloride-10 mM Tris (pH 7.4) was incubated with various concentrations of NEM at 37°C, or with 10 mM NEM at 20°C for 60 min.

b) The amounts of K⁺ released from human erythrocytes were indicated as μmol per ml of cells.

c) The remaining amount of membrane SH percentage of the original amount.

的な何らかの膜構造変化も関与することが示唆される。なお、この NEM 処理赤血球においては、膜変形は見られなかった。

察

察

本実験で用いた両親媒性薬物は、いずれも赤血球膜に作用して著明な変形を誘起するが、cepharanthine を除

く他の薬物は、赤血球内 K^+ の受動的流出も著明に促進することが認められた (Fig. 2, Table I). しかしながら、この両親媒性薬物による膜変形誘起と K^+ 流出促進という二つの効果は、おそらく相異なる膜構造部位への薬物の作用によって各々独立に引き起こされているであろうことが、次の事実より示唆される。

1) Cepharanthine は、フェノチアジン系向精神薬や局所麻酔剤と同様の変形を引き起こすにもかかわらず、 K^+ 流出は引き起こさない (Table I).

2) 陰イオン性薬物は、陽イオン性薬物とは異なった変形を誘起するにもかかわらず、同様に K^+ 流出を促進する (Table I). さらに、陰イオン性薬物により瞬間的に誘起された変形は、時間とともに回復するが、 K^+ 流出はむしろ時間依存的に促進される (Table I, Fig. 4).

3) 膜脂質層の乱れを誘起する lysolecithin, PLase A_2 および C, および methochlorpromazine, zephiramine などの四級アンモニウム化合物によっても赤血球膜変形は誘起されるが、 K^+ 流出は見られない (Fig. 5, 6).

4) SH 阻害剤である NEM は、膜変形は誘起しないが、顕著な K^+ 流出を引き起こす。

薬物のどのような膜構造攪乱作用によりこのような二種の効果が誘起されるかは、現在のところまだ詳細には不明である。変形誘起機構に関しては、脂質二重層への薬物の貫入に基づく内外層の不均質膨張によるとする仮説が提唱されており、¹⁷⁾ 最近これを支持する報告も見られる。¹⁶⁾ 事実、レンチン単分子膜を用いた実験でも、フェノチアジン系化合物で明らかな占有面積の増大が認められている。⁶⁾ しかし、他方では膜タンパク質、特にスペクトリンへの作用も報告されており、¹⁸⁾ 薬物や PLase 類により誘起される膜変形は、それらの膜脂質層攪乱効果による二次的な膜タンパク質の構造変化 (特にスペクトリンなどの裏打ちタンパク質の構造変化) に起因している可能性も否定できない。

一方、薬物による K^+ 流出促進機構については、(1) 薬物と脂質二重層との相互作用に基づく膜構造の乱れに起因する可能性、(2) 薬物の膜タンパク質、特に膜貫通タンパク質 (例えば K^+ チャネル形成タンパク質) への直接作用に起因する可能性が考えられる。Fig. 5 に示したように、PLase A_2 , C および lysolecithin の作用で、脂質層の攪乱による変形を誘起させても K^+ 流出を生じないことから、前者の可能性は少ないように思われ、 K^+ 流出には脂質層の攪乱以外の膜構造の変化が必要と思われる。

p-Chlormercuribenzenesulfonate は、赤血球からの K^+ 流出を著明に促進することが知られており、¹⁹⁾ 本実験でも Table II に示すように、同様な SH 阻害剤である NEM により、膜タンパク SH 阻害に伴う K^+ 流出促進効果が見られた。これらの事実は、膜タンパク質 (例えば K^+ チャネル形成タンパク質) への直接作用により K^+ 流出促進が誘起される可能性を示す。従って、薬物による K^+ 流出促進効果も、同様の作用機構により誘起されるとの推論も可能であろう。しかしながら、この NEM および薬物による K^+ 流出促進効果は、ともに温度依存的であり、さらに NEM 処理により膜 SH 量は 20°C でも 37°C でも同程度にまで減少しているのに反して、 K^+ 流出は 37° において 20°C の場合の 15 倍程度に達した (Table III). したがって、 K^+ 流出を促進するためには、これら薬剤の膜タンパク質への直接的な作用とともに、温度依存的なその他の膜構造の変化 (例えば、そのタンパク質周囲の脂質の流動性の上昇など) が必要なのであろう。

以上のごとく、薬物による赤血球膜変形および赤血球内 K^+ の流出促進は、各々独立した作用機構により引き起こされる可能性が大きいと考えられる。薬物の膜変形誘起効果は、薬物の脂質二重層との相互作用、あるいはその結果生じる裏打ちタンパク質 (例えばスペクトリン) の構造変化に起因し、赤血球内 K^+ 流出促進効果は、裏打ちタンパク質以外の膜タンパク質 (例えば、 K^+ チャネル形成タンパク質などの膜貫通タンパク質) の構造変化に起因する可能性が推察されるが、これらについては今後の実験的例証が必要である。

引用文献および注

- 1) a) A.R. Freman, M.A. Spirtes, *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 161 (1962); b) W.O. Kwant, J. van Steveninck, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 2215 (1968).
- 2) A.W. de Bruijine, J. van Steveninck, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 177 (1979).
- 3) Y. Gazitt, A. Loyter, I. Ohad, *Biochim. Biophys. Acta*, **471**, 361 (1977).
- 4) P.S. Guth, J. Amaro, O.Z. Sellinger, L. Elmer, *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 769 (1965).
- 5) M. Naoi, T. Suzuki, K. Yagi, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 295 (1978).

- 6) 中垣正幸, 岡田敏史, 持田研秀, 薬誌, **99**, 393 (1979).
- 7) D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, G. Poste, G. Shepherd, *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 504 (1975).
- 8) G. Poste, D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, W.J. Vail, *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 520 (1975).
- 9) a) T. Fujii, T. Sato, A. Tamura, M. Wakatsuki, Y. Kanaho, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 613 (1979); b) T. Sato, Y. Kanaho, T. Fujii, *Cell Struct. Funct.*, **5**, 155 (1980).
- 10) 金保安則, 佐藤隆司, 藤井達三, 薬誌, **99**, 8 (1979).
- 11) 秋元直茂, 穂積啓一郎, 分析化学, **20**, 1186 (1971).
- 12) J.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119 (1963).
- 13) G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959).
- 14) T. Fujii, A. Tamura, *J. Biochem.*, **86**, 1345 (1979).
- 15) a) T. Sato, T. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 152 (1974); b) N. Mohandas, A.C. Greenquist, S.B. Shohet, *J. Sup. Struct.*, **9**, 453 (1978).
- 16) E.D. Matayoshi, *Biochemistry*, **19**, 3414 (1980).
- 17) M.P. Sheetz, S.J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4457 (1974).
- 18) a) J.G.R. Elferink, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 511 (1977); b) D.D. Koblin, H.H. Wang, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1405 (1976); c) M.P. Sheetz, S.J. Singer, *J. Cell Biol.*, **73**, 638 (1977); d) W. Birchmeier, S.J. Singer, *J. Cell Biol.*, **73**, 638 (1977).
- 19) a) P.A. Knauf, A. Rothstein, *J. Gen. Physiol.*, **58**, 190 (1971); b) H. Passow, K.F. Schnell, *Experientia*, **25**, 460 (1969).