薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (6) 374-387 (1994)

血液細胞の細胞膜におけるリン脂質の動態と機能.¹⁾
両親媒性薬物の作用機構に関連して

藤井達三

京都薬科大学, 〒607 京都市山科区御陵中内町 5

Phospholipid Dynamics and Function in Cell Membrane of Blood Cells.¹⁾
With Reference to Mode of Action of Certain Amphiphilic Drugs

Tatsuzo FUJII

Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashinaku,
Kyoto 607, Japan

(Received March 1, 1994)

An asymmetric modification of the cell membrane lipid bilayer of erythrocytes by means of exogenous phospholipase (PL) treatment or of phospholipid addition induced an echinocyte- or stomatocyte-type shape change of the cells. Such membrane shape change was demonstrated to be due to asymmetric swelling or shrinkage of the lipid bilayer halves, from the simultaneous determination of the change or intra-bilayer transfer of the phospholipid molecules.

In the collagen-induced activation of blood platelets, the importance of PLA₂ activation as the initial reaction of the signaling system was demonstrated, and the regulatory effects of the membrane fluidity change on the enzyme activation were also shown. In the antigen-induced activation of peritoneal mast cells, a pathway through the PLD activation appeared to be more important. Phosphatidic acid produced from the membrane phospholipids through the PLD activation was shown to act as an intracellular mediator to stimulate the PLA₂ activation.

Various amphiphilic drugs, including benzyloquinoline alkaloids such as cepharanthine, were shown to inhibit the platelet activation and the mechanism was studied. The anti-platelet activity appeared to be mainly due to inhibition of the PLA₂ activation.

Keywords—blood cell; cell membrane; phospholipid; membrane lipid bilayer; erythrocyte; platelet

1. はじめに

細胞膜^{2,3)}において, 主としてリン脂質よりなる脂質二重層 (lipid bilayer) は膜の基本骨格をなし, 膜タンパク質の係留や細胞内外環境の隔離などの構造上重要な役割を演じている (Fig. 1). 同時に, 一部のリン脂質が脂質代謝酵素の作用を受けて生じる代謝産物は, 刺激時の情報伝達におけるメジエーターとして機能するので, 脂質二重層はこのような膜の機能発揮の上にも大きく貢献している. 我々は血液細胞 (あるいはそれより分化したもの) を用い, 細胞膜脂質二重層のこれらの構造的及び機能的役割について研究してきた. 前者については, 赤血球について膜変形現象における脂

本総説は, 平成5年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである.

Fig. 1. Schematic Representation of Plasma Membrane Structure (a Section)

質二重層の関与を中心に検討を進め、後者については、外部からの刺激に鋭敏に応答する血小板及び肥満細胞を用いて、刺激-応答時の情報伝達における脂質代謝酵素及び代謝産物の役割とその作用機構について研究してきた。ここでは、過去 20 年間の膨大な業績 (99 報の原著論文として発表されている) の中から特に重要なものを取り上げ、概要を紹介する。なお、略号一覧を引用文献 1) に示す。

2. ヒト赤血球の変形現象における細胞膜脂質二重層²⁾の関与

2-1. 両親媒性薬物による赤血球の膜変形 赤血球は種々の外的及び内的要因により、Fig. 2 のような 2 種類の変形を起こすことが知られている。²⁻⁵⁾ その 1 つは、膜が外方へ突き出るタイプの外方突出型変形 (crenation, echinocyte-spherocyte transformation) で、細胞は正常な中窪み円

Fig. 2. Echinocyte (Crenation) Type and Stomatocyte (Invagination) Type Shape Changes of Human Erythrocytes with the Morphological Score Assigned

盤状から、ウニ型、機雷型を経て最後には球状となる。もう1つは、膜が内方へ陥没するタイプの内方陥没型変形 (invagination, stomatocyte-spherocyte transformation) で、コーヒークップ型から図のような複雑に膜が陥没した形を経て、最後には千切れた膜よりなる小胞を内部に持つ球形となる。いずれも誘発因子の強さ (物質なら濃度) に依存して段階的に起こり、^{5,6)} その速度は極めて速く、^{5,7)} その因子が除かれれば可逆的にもとの正常形に戻る。⁵⁾

赤血球は細胞膜を唯一の膜として持つ細胞なので、このような変形現象を起こす原因はこの細胞膜にあることが明らかである。そこで、このような膜変形の誘発に膜の脂質二重層がどのように関与するかを調べるのに用いたわけであるが、この変形の程度を半定量的に表すために、Fig. 2 のように各段階の変形に対して任意に1から4までのスコアを与え、crenation にはプラスの符号を、invagination にはマイナスの符号を付けることにした。そして、赤血球の population のうちの何% が各スコアの変形を起こしているかを数え、その割合をスコアに掛けて全部を足し合わせ、その数値を population の形態学的指標 morphological index と定める。⁵⁾ このような表示法を用いると、正常形の赤血球では index がゼロ、最も強い外方突出型変形を起こした場合が +4、最も強い内方陥没型変形を起こしたものが -4 となる。

種々の薬物がこのような変形を誘発することは、既に知られていた。細胞膜に親和性を持つ両親媒性薬物のうち、一般に酸性のものは外方突出型を、塩基性のものは内方陥没型の変形を起こすとされてきた。⁴⁾ 著者らも、多数の薬物について変形誘発効果を調べ、^{5,6,8-10)} 特に非極性部分の構造がよく似た phenothiazine 誘導体について、酸性の protizinic acid と塩基性の chlorpromazine とが、それぞれこれらの相反する変形を誘発することを確かめた。¹⁰⁾ さらに、4級アンモニウム型の化合物は、外部から内部へと細胞膜を通過する速度が遅いため、最初は外方突出を起こし、ついで正常な円盤型を経て内方陥没を起こすことも明らかにした。⁵⁾

薬物によるこのような変形の機構を説明するものとして、Sheetz-Singer による bilayer couple hypothesis (Fig. 3) がある。¹¹⁾ それによると、負に荷電する陰イオン性極性基を持つ化合物は、膜脂質二重層の内層に局在する酸性リン脂質 phosphatidylserine (PS)¹²⁾ の負荷電との反発により

Fig. 3. Schematic Representation of the "Bilayer Couple Hypothesis" to Explain the Mechanism of Drug-Induced Erythrocyte Membrane Shape Change

二重層の外層に入り、外層のみの非対称的膨張を引き起こし、膜に凸型の曲率を与え、したがって外方突出型変形をもたらす。逆に、正に荷電しうる陽イオン性極性基のものは、PS にひかれて内層に入り、内層のみの膨張を起こさせて内方陥没型変形をもたらす。

この仮説によって、このような赤血球変形の機構をよく説明できるが、薬物がこのような膜への取り込まれ方をすることは、証明が非常に難しい。そこで、著者らは膜の成分であるリン脂質そのものに注目し、膜脂質二重層の外層内層のそれぞれを修飾する手法を用いて、この仮説を証明しようとしたのである。

2-2. 添加したリン脂質による膜変形 まず、ヒトの無傷赤血球を用い、溶血を起こさないような条件下で脂質を添加して、膜の脂質外層へ挿入したときの変形を調べた。^{13,14)} 膜を構成する長鎖脂肪酸よりなるリン脂質は、添加しても膜に入りにくいので、やや短いアシル基 (中鎖脂肪酸鎖, C_8-C_{12}) を持つリン脂質や、長いアシル基 ($C_{14}-C_{18}$) でも一本鎖のリゾ体を用いた。¹⁴⁾ これらが二重層の外層に入ってから、内層へと徐々に移行することは、放射性脂質を用いて外層中のもののみをリポソームで抽出する実験で、確かめることができた。¹⁵⁾

Fig. 4 には dilauroyl-phosphatidylcholine (DLPC, C_{12} の飽和アシル基 2 本を持つ) あるいは palmitoyl-lysophosphatidylcholine (lysoPC, C_{16} の飽和アシル基 1 本) を、それぞれ 10, 20, 50 μM の濃度で 37°C で 20 分作用させたときの赤血球の形態を示す。正常な形態と比較して、これらは濃度依存的に強くなる外方突出型変形を誘発していることが分かる。Fig. 5 は、 C_8-C_{14} の飽和アシル基 2 本をもつ PC と、 $C_{12}-C_{18}$ の飽和アシル基 1 本を持つ lysoPC について、それぞれの ^{14}C 標識体を用い、37°C での無傷赤血球の膜への取り込みを調べた結果である。¹⁵⁾ LysoPC はすべてほとんど瞬間的に取り込まれるが、PC ではこの範囲の鎖長では短くなるほど取り込み速度は速く、また取り込み量も増加することが分かる (同様な事実を、スピンラベル-ESR 法によっても例証している)。¹⁶⁾ また同鎖長では、不飽和鎖をもつものは飽和鎖を持つものよりも、取り込み速度は

Fig. 4. Shape Change Induced by Addition of Exogenous Amphiphilic Lipids into Human Erythrocyte Suspension (pH 7.4) as Shown by Scanning Electron Micrographs of the Treated Cells

Erythrocyte suspension was incubated with 10, 20, and 50 μM emulsion of dilauroyl phosphatidylcholine (B, C, and D) and with 10, 20, and 50 μM emulsion of palmitoyl lysophosphatidylcholine (E, F, and G) at pH 7.4 and 37°C for 20 min. Erythrocyte suspension without addition of lipid was also incubated under the same condition (A).

Fig. 5. Incorporation of Added Amphiphilic Lipids into Human Erythrocytes

Erythrocyte suspension was treated with 0.25 or 0.20 $\mu\text{mol}/10^{10}$ cells (concentration: 25 or 20 μM) of each phosphatidylcholine (PC) or lysophosphatidylcholine (lysoPC) species, respectively. C_8 – C_{18} mean the lipid species with saturated acyl chain(s) of 8–18 carbon atoms.

Fig. 6. Relationship between Amount of the Amphiphilic Lipid Incorporated into and the Shape Change Induced in Human Erythrocytes

The amount of phosphatidylcholine (PC) or lysophosphatidylcholine (lysoPC) species incorporated and the intensity of shape change induced (as morphological index) were measured as the functions of the total amount of the lipid added for every species with varying acyl chain length, and these data for each lipid class were replotted in each one graph.

速い。⁷⁾ データは省略するが、これらによってもたらされる赤血球の膜変形の誘起速度と程度は、この取り込みとほぼ並行していた。^{18,14)} これらの PC 及び lysoPC の各 species について得られた取り込み量とそれによる変形の程度との関係をプロットすると、Fig. 6 に示すようにそれぞれ 1 本の曲線上に載ることが分かった。¹⁴⁾ しかも、PC と lysoPC についての曲線の形状は重ね合わせられるくらいよく似ていた。これらの結果から、リン脂質による膜変形は、脂質二重層への取り込みによって起こるが、その取り込み量と速度はアシル鎖の疎水性の強さによって左右され、取り込みの結果起こる変形の程度はおそらく polar head の性状によって決定されることが示唆される。¹⁴⁾

このようにしてリン脂質の膜への取り込みによって起こった変形は、37°C に放置すると、Fig. 7 に lysoPC について例示するように、時間とともに退行して行く。¹⁷⁾ そしてこの退行速度は、 C_{14-18} の飽和アシル鎖では鎖長の短いほど速く、不飽和鎖では飽和鎖よりも速い。4°C では、 $\text{C}_{18:1}$ を例

として図に示すように、長時間放置しても変形は退行することはない。前述の PC による変形についても、同様な結果が観察される。¹⁷⁾ この場合、赤血球膜の脂質二重層内でのリン脂質の二層間の分布をリポソーム抽出法で調べると、変形の退行に伴って外層より内層への移行量が増えていることが示された。¹⁸⁾ さらに、変形の退行の起こらない 4°C では、このような二層間での脂質分子の移行も見られなかった。

以上の結果を総合して、これらのリン脂質による外方突出型変形は、脂質分子が膜脂質二重層の外層中に侵入してこの層のみを非対称的に膨張したために起こり、それらの分子がさらに内層中へと移行して内層の膨張も起これば変形が退行し、両層の膨張が等しくなるに及んで変形は消失すると説明できるであろう。

なお、詳細は省略するが、リン脂質による膜変形の程度は極性基の解離状態によっても左右されることを、種々の極性基を持つ脂質について細胞浮遊液のメジウム pH を変化させたときの変形の程度を測定することによって、明らかにしている。¹⁸⁾

2-3. 添加したホスホリパーゼによる膜リン脂質の部分加水分解とそれによる膜変形 次に行ったのは、赤血球膜の脂質二重層そのものを非対称的に修飾した場合にも、膜変形が起こるかどうかの検討である。既に、外から加えたホスホリパーゼ C の作用によって、無傷赤血球が内方突出型変形を起こすことが報告されていたので、¹⁸⁾ 我々は溶血を起こさせない条件下で種々のホスホリパーゼを作用させて、そのときに起こる膜リン脂質の加水分解と誘発する変形の程度とを測定した。¹⁹⁾ 赤血球膜では二重層の外層は大部分が PC と sphingomyelin (SM) とから成るが、普通のホスホリパーゼでは SM は水解されないの、外から加えた酵素によって水解されるのは事実上 PC のみである。ホスホリパーゼ A₂ を作用させると PC は lysoPC と遊離脂肪酸とになり、ホスホリパーゼ C あるいは D では極性基の全部あるいは一部が切れて、diacylglycerol (DG) あるいは phosphatidic acid (PA) が残るはずである。我々の実験条件下では、膜の全 PC の 50% 程度までが水解されたときには、これらの分解産物は膜にそのまま残っており、膜の破壊による溶血は起こらないことを、あらかじめ確かめた。

ヒト赤血球浮遊液にハチあるいはヘビ毒由来の精製ホスホリパーゼ A₂ を加え、37°C で 0.5—2 時間保温すると、PC の 20—50% が水解されるとともに、morphological index にして +1.5 から 3 程度の外方突出型変形が誘発された。¹⁹⁾ これに対して、微生物由来の精製ホスホリパーゼ C (*Clostridium perfringens* 及び *Pseudomonas aureofaciens*) あるいは D (*Streptomyces chromofuscus*) を作用させると、同じ条件下で PC の 20—40% 程度が水解され、-1 から -3 程度の内方陥没型変形が誘発された。この場合、D では C と比べて、同一程度の PC 水解によってもたらされる変形の程度はかなり低かった。¹⁹⁾ 以上のいずれの場合も、PC の水解の程度の増大に伴って変形の程度も増大した。¹⁹⁾

Fig. 7. Retrogression at 37°C of the Echinocyte-Type Shape Change of Human Erythrocytes Induced by Incorporation of Added Lysophosphatidylcholine Species with Different Acyl Chain Length

Erythrocyte suspension was treated with 1.25 μ M of each lipid species for 10 min at 37°C in the presence of 10 mM glucose, and incubated further. The shape change estimated at the time indicated is expressed by the morphological index. Dotted line indicates the control experiment in which the cells were allowed to stand at 4°C.

なお、いずれの場合にも、各酵素によって生じるはずの水解産物を薄層クロマトで同定できたし、各酵素標品中にプロテアーゼの活性は見られないこと、及び 4°C での水解の起こらない条件下では同一時間放置しても変形は起こらないことなども確かめた。したがって、これらの酵素処理によって起こる膜変形は、膜脂質二重層外層の修飾の結果起こったものであると結論した。¹⁹⁾

なぜこのような変形が起こるかの説明として、ホスホリパーゼ A₂ の作用では生じた遊離脂肪酸のカルボキシル基が極性基として付け加えられるので、外層のみの膨張を生じ、一方、C や D の作用では polar head の全部又は一部がなくなるので、外層の収縮を生じ、bilayer couple のバランスが崩れてそれぞれ外方突出型及び内方陥没型変形を誘発するものと言えるであろう。ホスホリパーゼ A₂ 及び D 処理細胞の場合、メジウム pH を高くしてカルボキシル基の解離を促進すると、変形の度はさらに強くなること²⁰⁾からも、負荷電同士の反発の増加によって外層の膨張が増強されることが理解できる。なお、ホスホリパーゼ A₂ や D 処理によって生じた水解産物の遊離脂肪酸及び PA が膜に留まり、その極性基を表面に露出するために表面の負荷電が増加することは、細胞電気泳動法によって確かめた。²¹⁾

以上のように、リン脂質を膜脂質二重層の外層に挿入させる方法に加えて、native な二重層の外層のみを酵素処理して修飾する方法を用いて、外方突出型のみならず内方陥没型変形をも起こさせることができたので、変形誘発を bilayer couple で説明できることをより確かに行うことができた。さらに、既述のような薬物による類似の変形もこれと同じ機構によるであろうことを、薬物による外方突出とホスホリパーゼ C, D による内方陥没、及び薬物による内方陥没とホスホリパーゼ A₂ による外方突出とが、それぞれ互いに拮抗することより推定した。²²⁾

3. 膜変形をもたらすヒト赤血球の膜異常

3-1. 家族性低 β リポタンパク血症における膜変形 遺伝性及び後天性の赤血球膜異常症のうちには、膜変形による細胞の変形をもたらすものが多い。前者に属する病気の 1 つとして、しばしば acanthocytosis を伴う家族性低 β リポタンパク血症（血漿リポタンパク質 LDL の著しい低下を伴う遺伝性疾患）を取り上げた。Acanthocyte とは、前記の echinocyte（外方突出型変形を起こした赤血球）と似てはいるが少し異なり、膜表面から 5—10 本の種々の長さ太さのとげを出した赤血球であり、本症にはこのような変形赤血球がしばしば観察される。

我々が滋賀医科大学第三内科学教室との共同研究によって観察した本症の家系で、遺伝子的にホモ接合の 3 人の患者では、全赤血球の 6—13% がこのような acanthocyte で占められていて、その検出は容易であった。しかしながら、ヘテロ接合の 2 人の患者では、このような異型の細胞は 2% 程度に過ぎず、その検出は容易ではなかった。²³⁾ ところが、このような患者では、見かけは変形を起こしてない赤血球でも、前記のような変形誘発性の薬物の作用に対して、正常者の赤血球とは感受性を著しく異にすることが見出された。すなわち、これらの赤血球は、正常な赤血球が影響を受けないほどの低濃度の crenator drug (lysoPC, フルフェナミン酸など) によって明らかな外方突出型変形を起こし、逆に正常な細胞が著しく内方陥没を起こす濃度の invaginator drug (クロロプロマジンなど) でわずかの程度の変形を起こすに留まった。²⁴⁾ 現在のところ、このような echinocyte-stomatocyte 変形誘発剤に対する感受性の異常と、acanthocyte を生じる膜異常との関係は明らかでないが、以上のような事実を利用して本症の検出が容易になったことは、臨床的に有意義なことと思われる。

3-2. 心臓手術時の人工心肺還流血液における膜異常 後天性の原因による赤血球膜異常の一例として、心肺バイパスを伴う開胸手術における長時間の体外循環時の赤血球を取り上げた。これは、滋賀医科大学第二外科学教室との共同研究である。患者を低体温のもとにおいてこのような長時間の体外循環を行うと、しばしば強い溶血が起こるので、それがどのような原因で起こるかを調

べた。²⁵⁾ 溶血を起こす血液では *echinocyte* がみられるので、患者血液より分離した血漿を正常人の赤血球と接触させたところ、体外循環開始後 2—3 時間の患者よりの血漿に最も強い外方突出誘発能が見られた。そこで、それを起こす原因物質を探索した結果、体外循環の時間が経過するにつれて血漿中の遊離脂肪酸の量が増加し、2—3 時間後に極大に達することを、12 人の患者について示すことができた。²⁵⁾

遊離脂肪酸が *echinocyte* を生じることは、既に *in vitro* 実験で明らかにしていたし、^{8,18)} 強い外方突出型変形は溶血をもたらすこともよく知られているので、⁸⁾ このような異常量の血漿遊離脂肪酸増加が溶血の原因となるものと推定した。遊離脂肪酸産生の原因についてはまだ明らかではないが、低体温によるエピネフリン分泌促進がこのホルモンに感受性のリパーゼの産生を促進し、脂肪よりの遊離脂肪酸の産生増加をもたらしたという可能性が考えられる。

4. ウサギ及びヒト血小板の活性化におけるホスホリパーゼの役割

4-1. 細胞質ホスホリパーゼ A₂ 活性化の関与とその作用様式 刺激-応答の盛んな細胞においては、リガンドの細胞膜受容体への結合を引き金とした一連の刺激伝達反応が生じるが、その初期反応としての受容体活性化に続く膜リン脂質代謝の亢進は、細胞内二次伝達物質を生成する重要な反応であり、各種ホスホリパーゼ (PL) がその役割をになっている (Fig. 8). これらの PL 類は刺激により素早く活性化される必要があり、そのためにその活性化が様々な物質や酵素によって制御されることが分かっている。PLC の活性化は既に広く証明されているが、我々は PLA₂ と PLD に焦点を当て、主として血小板について刺激下での活性発現の制御機構を検索してきた。

血小板 PLA₂ については、血小板活性化時 (凝集、セロトニンあるいは ATP 放出、及び Fig. 9 に示すような変形などを指標とする) に細胞外に放出されて炎症反応に関与する II 型 PLA₂ (分泌型 sPLA₂, 分子量 14 kDa) に加えて、アラキドン酸に親和性が高く高分子量の細胞質 PLA₂ (cPLA₂, 分子量 85 kDa) が知られており、 μM 以下の Ca イオンで活性化される後者が凝集や放出反応に直接関与するものと考えられている。²⁶⁾ ただしその関与の程度はアゴニストによって異なり、たとえばコラーゲン刺激では初発反応はほとんどこの酵素によると考えられるが、トロンビン刺激の場合はむしろ PLC が主体と思われる。前者では、この酵素によって膜リン脂質から遊離して

Fig. 8. Phospholipids, Their Metabolites, and Phospholipases Involved in Agonist-Induced Activation of Signal Transduction System in the Platelet

A, agonist, extracellular mediator; R, receptor; G, G protein; E, effector (enzyme).

Fig. 9. Shape Change (Sphere and Pseudopod Formation) of Rabbit Platelets upon Activation

くるアラキドン酸からアラキドン酸カスケード系を経て作られるトロンボキサン A_2 (TXA_2) が、細胞活性化に必須だからである。

そこで、コラーゲン刺激による PLA_2 活性化の様式、特に細胞内 Ca^{2+} とプロテインキナーゼ C (PKC) による PLA_2 活性化促進の機構を検討した。²⁷⁻³⁰⁾ その結果、細胞質に存在するこの酵素が活性化されるには、リン酸化された酵素分子が細胞膜へと移行することが必要であるが、それに必要な因子として、従来より知られている Ca^{2+} に加えて、刺激により再編成される細胞骨格タンパク質が関与することを、我々は推定した^{31,32)} (Fig. 10)。

Fig. 10. Probable Mode of Activation of Cytosolic Phospholipase A_2 in Agonist-Induced Platelet Activation

4-2. ホスホリパーゼ A_2 活性化の膜流動性による調節³³⁾ 細胞膜脂質二重層の刺激伝達過程において演じる役割の1つとして、その流動性が PLA_2 活性化の調節を介して細胞活性化の調節にもあづかっている可能性を検索した。

我々は既に、実験的高コレステロール血症ウサギの血小板や、*in vitro* でコレステロールを負荷したウサギとヒト血小板においては、コラーゲンなどの刺激による凝集能が亢進していることを例証していた。³⁴⁾ この原因を検索するため、流動性の低下した膜を持つ高コレステロール負荷ヒト血小板を刺激すると、アラキドン酸遊離が正常血小板に比して著明に増大することを見いだした。^{34,35)} さらに、このような血小板から調製した膜画分を用いて、 Ca^{2+} と $GTP\gamma S$ の添加時にアラキドン酸の遊離が亢進することをも示した。³⁵⁾

これと同様な効果が、同じく膜流動性を低下させる膜脂質過酸化に際しても見られた。^{36,37)} すなわち、*t*-ブチルヒドロペルオキシドで血小板膜脂質にわずかの過酸化を起こさせ、これにそれ自体では活性化を誘発しない程度の量の刺激剤を作用させると、相乗的な血小板活性化の生じること、さらにそれが PLA_2 活性化の増大に基づくことを見出した。^{36,37)}

これらとは逆に、膜流動性を上昇させる遊離不飽和脂肪酸 ($C_{18:1}$, $C_{18:2}$) を取り込ませた血小板では、コラーゲンや U46619 (トロンボキサン H_2 アナログ) による凝集能が低下したが、トロンビン凝集は影響を受けなかった。³⁸⁾ これらの脂肪酸は PLC 活性 (diacylglycerol 生成量を指標とし

て)には影響を与えることなく、また飽和脂肪酸はいずれにもまったく効果を及ぼさなかった。³⁸⁾

以上の結果は、膜流動性の低下又は上昇が血小板 PLA_2 の活性化を促進又は抑制するという、膜流動性変化と PLA_2 活性変化とのよい対応関係を示すように思える。しかも、この流動性の変化は、酵素タンパク質そのものへの影響よりも、むしろ PLA_2 とカップルした GTP 結合タンパク質と酵素との連関への影響、又は酵素と基質との間の相互作用への影響を与えるようで、結果として受容体刺激による活性化を亢進又は抑制させることが示唆されている。³⁸⁾

ただ問題は、不飽和脂肪酸の効果が *cis* 型のみならず、流動性への影響の弱いとされている *trans* 型にも見られた点である。したがって、膜脂質二重層全体の流動性というよりも、受容体-酵素系周縁の微小領域の流動性の変化が重要なものかもしれない。³⁸⁾ この点は今後解明されるべき問題である。

4-3. ホスファチジン酸によるホスホリパーゼ A_2 活性化の調節 細胞質 PLA_2 活性化に影響を与える因子の検索において、我々はホスファチジン酸 (PA) が有意な促進効果を発揮することを、外から PA を添加する実験^{39,40)} ($\text{C}_{18:0}$ と $\text{C}_{20:4}$ の PA_{SA} 、及び 2 本の $\text{C}_{10:0}$ をもつ C_{10} -PA を用いた)、 Ca^{2+} アイオノフォア又は $\text{GTP}\gamma\text{S} + \text{Ca}^{2+}$ でそれぞれ血小板又はそれより調整した膜標品を刺激し、内因性 PLD を活性化させて PA を生じさせた実験⁴¹⁾、及び外部から加えた PLD によって膜リン脂質を加水分解させて PA を生成させた実験⁴¹⁾ などによって確かめた (Fig. 11)。いずれの場合にも、アラキドン酸遊離の著しい亢進が見られた。なおこの際、これらの PA の効果が水解産物の DG を介して発揮されるのではないことを、propranolol 添加時でも影響されないことから確かめた。⁴¹⁾

Fig. 11. Presumed Function of Phosphatidic Acid Formed from Membrane Phospholipids in the Platelet

ここに得られた結果は、刺激下に活性化される PL 類 (PLD と PLA_2) の相互活性化機構の存在する可能性を示唆するものであろう。

5. ラット腹腔肥満細胞の活性化におけるホスホリパーゼの役割

我々の用いたラット腹腔肥満細胞の抗原刺激による活性化 (ヒスタミン放出及びプロスタグランジン (PG) D_2 産生を指標とする) 時には、血小板とは異なって、 PLA_2 とともにかなり強い PLD 活性が測定される。そこで、この細胞について PLD の情報伝達系における役割をより詳しく検討した。その結果、刺激時に PGD_2 の先駆体として膜リン脂質より遊離されるアラキドン酸は、 PLA_2 によるよりもむしろ PLD によって生じた PA の代謝産物である DG を経由するものが主力を占めることが見いだされた。^{42,43)} すなわち、この細胞においては、刺激による PGD_2 産生及びヒスタミン放出のための初発反応は、主として PLD によって担われているものと思われる。

6. 両親媒性薬物による血小板活性化阻害

6-1. 赤血球に膜変形を起こす薬物による血小板の変形と活性化阻害 2-1 で述べたような、赤血球に膜変形を起こすような crenator や invaginator としての両親媒性薬物が、血小板にも変形を誘起することを、我々が初めて見出した。⁴⁴⁾ 例えば lysoPC のような crenator を洗浄ヒト血小板浮遊液に加えると、生理的な刺激物質を加えて活性化させたときに生じる偽足 (Fig. 9) と似ているがややそれよりも細い偽足が形成された。クロルプロマジンのような invaginator を加えると、円盤状の細胞が球状に変形した。このような場合に凝集や放出反応のような活性化現象が全く起こ

Fig. 12. Chemical Structure of 4'-O-Substituted 1-Benzylisoquinoline Derivatives (A) and a Related Natural Bisbenzylisoquinoline Alkaloid, Cepharanthine (B)

らず、逆にこれらの薬物は生理的刺激による活性化応答を濃度依存的に抑制することが分かった。また、これらの薬物の作用が洗浄除去によって消失することは、赤血球変形誘発の場合と同様であった。⁴⁴⁾

これらの薬物の血小板に対するこのような作用の機構をいろいろ検討したところ、形態変化誘発機構についてはいまだ不明のままに留まっているが、凝集や放出抑制作用に関しては、以下に述べるように情報伝達系の初期段階のホスホリパーゼ活性化に対する抑制効果が関連することが推定された。さらにこのような薬物を抗血小板薬として応用できる可能性も考えられるようになった。

6-2. 両親媒性薬物による血小板に対する刺激-応答の阻害とその機構

種々薬物について、ヒト血小板及びこれと性質の比較的類似したウサギ血小板を用いて、生理的刺激剤に対する血小板の応答を凝集及び放出反応（セロトニン、ATP）を指標として検討したが、⁴⁵⁻⁵¹⁾ ここでは紙数の制限のため、セファランチン cepharanthine (Fig. 12, B) を代表とする bisbenzylisoquinoline alkaloid (biscoclaurine alkaloid) 類について、ウサギ血小板を用いて調べた結果のみに限定して報告する。セファランチンとその類縁体 (tetrandrine, isotetrandrine, berbamine) は、50—100 μM の濃度で血小板の凝集と放出反応をほぼ完全に阻害するが、トロンビンなどよりもコラーゲンを刺激剤として用いたときに最も低濃度で阻害効果を発揮することが明らかとなった。⁴⁹⁾ セファランチンでは、コラーゲン刺激時に凝集及び ATP 放出を 50% 阻害する濃度は、Table I に示すように約 25 μM であった。このような凝集阻害を起こす濃度で、これらの薬物は血小板の膜リン脂質からのアラキドン酸遊離を選択的に阻害することも示された。このほかの若干の証拠をも加えて、これらの薬物は刺激時のホスホリパーゼ A₂ 活性化の阻害によって凝集などの応答を阻害するであろうことを、我々は推定した。⁴⁶⁻⁴⁹⁾ ただし、それらは刺激時の細胞骨格系タンパク質の再編成（会合）をも阻害するので、このような作用も関与する可能性がある。^{50,51)}

TABLE I. Concentrations of the Test Compounds Required to Inhibit Collagen-Induced Aggregation and ATP Secretion by 50%

Compound ^{a)}	IC ₅₀ (μM)	
	Aggregation	ATP secretion
I	>200	—
II	120 $\pm$ 6.5	—
III	140 $\pm$ 2.6	—
IV	65 $\pm$ 3.5	62 $\pm$ 3.8
V	55 $\pm$ 3.2	51 $\pm$ 2.9
VI	34 $\pm$ 3.5	43 $\pm$ 3.1
VII	30 $\pm$ 3.8	36 $\pm$ 3.5
VIII	23 $\pm$ 3.0	19 $\pm$ 2.0
IX	24 $\pm$ 2.5	24 $\pm$ 2.6
Cepharanthine	25 $\pm$ 3.7	27 $\pm$ 3.0

Washed rabbit platelets were incubated at 37°C for 2 min with various concentrations of each test compound and then stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ collagen at 37°C for 5 min. The results are the means $\pm$ S.D. of five separate experiments.

a) The Roman number represents each benzylisoquinoline derivative shown in Fig. 12.

Fig. 13. Effects of the Test Compounds on the Shape of Human Erythrocytes

Erythrocyte suspension was incubated at 37°C with various concentrations of each compound and the stomatocytogenic effect is expressed as the morphological index. The values represent the means of three separate experiments. The Roman figures represent the benzyloquinoline derivatives shown in Fig. 12 and C cepharanthine.

セファランチンは戦前より非特異的免疫活性化剤などとして使用されてきた副作用のごく弱い薬であるので、関西医科大学第一内科安永幸二郎教授（当時、滋賀医科大学）との共同研究のもとに、*in vivo*での凝集抑制作用をヒトのボランチャーについて調べたところ、60 mg 量の1回経口投与で短時間持続する凝集阻害効果を認めた。⁵²⁾

6-3. セファランチンとその類縁化合物の血小板活性化抑制効果と赤血球変形誘発効果——構造活性相関 つぎに、これらの化合物の効果について、若干の構造活性相関を検討した。Fig. 12に示すように、セファランチンとその類縁体は2個の benzyloquinoline 化合物が酸素橋で結合した構造をもつが、このような bis 体が抗血小板効果の発揮に必須であるかどうかを検討するため、本学・富士谷憲徳教授及び科研生薬 KK との共同研究のもとに、Fig. 12, A のような単量体の 4'-O-substituted 1-benzyloquinoline 類を合成し、それらの血小板及び赤血球に対する効果を調べて、セファランチンのそれと比較した。⁴⁸⁾

Table I に示すように、コラーゲン刺激下でのウサギ血小板の凝集と ATP 放出に対するこれらの化合物の阻害効果は、いずれもほぼ同一の濃度でみられ、4'-置換基の炭素数の増大するほど低濃度で発揮されることが分かった。最強の効果をもつ2種の置換体の強さは、セファランチンのそれと匹敵していた。これと同様の傾向が、Fig. 13に示すように、ヒト赤血球に対する内方陥没型変形の誘発効果においても見られた。さらにこれらの化合物の細胞膜への結合量を赤血球膜標品を用いて測定したところ、Fig. 14に示すように、4'位に水素が付いただけで活性のごく低い化合物はほとんど膜に結合しないのに対して、4'-置換基の疎水性が大きくて活性の最強の2化合物はセファランチンに匹敵する程度の強い膜結合能を示した。

以上の結果は、これら血液細胞に対するいずれの効果についても、4'-置換基の疎水性が増大する

Fig. 14. Incorporation of Some Representative Test Compounds into Human Erythrocyte Membrane

Erythrocyte membrane (ghost) suspension was incubated at 37°C with various concentrations of each compound, and the amount of the compound in the supernatant was measured at 0 and 10 min incubation. The difference between these two values was taken as the amount incorporated into the membrane. Each value represents the means $\pm$ S.D. of three separate experiments. The Roman figures represent the benzyloquinoline derivatives shown in Fig. 12 and C cepharanthine.

ほどその強さを増すこと、それはこれら作用を発揮する場としての細胞膜への結合の強さに比例することが推定される。このような事実は、天然の bis 体の構造は一定の疎水性を分子に与えるために必要なもので、必ずしも bis 構造そのものが活性発揮に必要ではないであろうことを示唆する。⁴⁸⁾

謝辞 以上の研究は、佐藤隆司助教授を始めとする歴代の教室員、大学院生及び卒論実験生の大きい貢献のもとに成し遂げられたものである。ここに深い謝意を表する。

引用文献及び注

- 1) 略号一覧: PC, phosphatidylcholine; lysoPC, lysophosphatidylcholine; PS, phosphatidyl serine; PA, phosphatidic acid; DG, diacylglycerol; UFA, unsaturated fatty acid; TX, thromboxane; PG, prostaglandine; PL, phospholipase; PKC, protein kinase C.
- 2) 藤井達三, 蛋白質 核酸 酵素, **19**, 59 (1974).
- 3) 藤井達三, “細胞膜 (中外医学双書),” 中外医学社, 東京, 1985; 藤井達三, 寺田 弘, 野村靖幸, “薬物作用と生体膜,” 南江堂, 東京, 1987.
- 4) B. Deuticke, *Biochim. Biophys. Acta*, **163**, 494 (1968).
- 5) T. Fujii, T. Sato, A. Tamura, M. Wakatuki, Y. Kanaho, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 613 (1979).
- 6) 藤井達三, 佐藤隆司, 金保安則, 西野八重子, 松本康裕, 薬誌, **99**, 109 (1979).
- 7) H. Nagasawa-Fujimori, K. Hiromi, N. Moriwaki, T. Fujii, *Biochem. Int.*, **2**, 129 (1981); T. Fujii, A. Tamura, T. Tanaka, H. Nagasawa-Fujimori, K. Hiromi, *Biochem. Int.*, **8**, 83 (1984).
- 8) 金保安則, 佐藤隆司, 藤井達三, 薬誌, **99**, 8 (1979).
- 9) T. Sato, Y. Kanaho, T. Fujii, *Cell Struct. Funct.*, **5**, 155 (1980).
- 10) Y. Kanaho, T. Sato, T. Fujii, *Mol. Pharmacol.*, **20**, 704 (1981).
- 11) M. P. Sheetz, S. J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4457 (1974).
- 12) J. A. F. Op den Camp., *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 47 (1979).
- 13) A. Tamura, K. Morita, T. Fujii, *J. Biochem.*, **91**, 73 (1982).
- 14) T. Fujii, A. Tamura, *Biomed. Biochim. Acta*, **42**, S81 (1983); T. Fujii, A. Tamura, *Cell Biochem. Funct.*, **2**, 171 (1984).
- 15) T. Fujii, A. Tamura, T. Yamane, *J. Biochem.*, **98**, 1221 (1985).
- 16) A. Tamura, K. Yoshikawa, T. Fujii, K. Ohki, Y. Nozawa, Y. Sumida, *Biochim. Biophys. Acta*, **855**, 250 (1986).
- 17) A. Tamura, T. Sato, T. Fujii, *Cell Struct. Funct.*, **5**, 167 (1987).
- 18) D. Allan, M. G. Low, J. B. Finean, R. H. Michell, *Biochim. Biophys. Acta*, **413**, 309 (1975).
- 19) T. Fujii, A. Tamura, *J. Biochem.*, **86**, 1345 (1979).
- 20) A. Tamura, T. Fujii, *J. Biochem.*, **90**, 629 (1981).
- 21) A. Tamura, K. Morita, T. Fujii, K. Kojima, *Cell Struct. Funct.*, **7**, 21 (1982).
- 22) A. Tamura, T. Sato, T. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1904 (1984).
- 23) 田村 明, 富永展光, 藤井達三, 原納 優, 原田真理子, 中野隆光, 日高秀樹, 繁田幸男, 鈴木輝康, 大高 剛, 動脈硬化, **16**, 417 (1988).
- 24) A. Tamura, K. Kanda, T. Fujii, Y. Harano, M. Harada, T. Nakano, H. Hidaka, Y. Shigeta, T. Suzuki, T. Ohtaka, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **5**, 103 (1988).

- 25) 田村 明, 佐藤隆司, 藤井達三, 田端良宏, 渡田正二, 尾上雅彦, 白石昭一郎, 森 渥視, 日胸外科誌, **38**, 1152 (1990).
- 26) 工藤一郎, 井上圭三, 生化学, **64**, 1330 (1992); I. Kudo, M. Murakami, S. Hara, K. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 217 (1993).
- 27) T. Sato, S. Akiba, T. Fujii, *Thromb. Res.*, **49**, 567 (1988).
- 28) S. Akiba, T. Sato, T. Fujii, *Thromb. Res.*, **53**, 503 (1989).
- 29) S. Akiba, T. Sato, T. Fujii, *FEBS Lett.*, **254**, 29 (1989).
- 30) S. Akiba, T. Sato, T. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, **1044**, 291 (1990).
- 31) S. Akiba, T. Sato, T. Fujii, *J. Biochem.*, **113**, 4 (1993).
- 32) 秋葉 聡, 佐藤隆司, 藤井達三, 血栓止血誌, **4**, 225 (1993).
- 33) 佐藤隆司, 膜, **15**, 315 (1990).
- 34) T. Sato, H. Maegawa, M. Kometani, T. Fujii, *Thromb. Res.*, **40**, 59 (1985).
- 35) T. Sato, T. Fujii, T. Hashizume, T. Fujii, *Platelets*, **1**, 193 (1990).
- 36) T. Hashizume, H. Yamaguchi, A. Kawamoto, A. Tamura, T. Sato, T. Fujii, *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, 47 (1991).
- 37) 山口裕義, 佐藤隆司, 田村 明, 藤井達三, 過酸化脂質研究, **16**, 56 (1992).
- 38) T. Sato, K. Nakao, T. Hashizume, T. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, **931**, 157 (1987).
- 39) S. Sato, T. Hashizume, T. Fujii, *J. Biochem.*, **112**, 756 (1992).
- 40) T. Hashizume, T. Sato, T. Fujii, *Biochem. Int.*, **26**, 491 (1992).
- 41) T. Hashizume, M. Taniguchi, T. Sato, T. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, **1221**, 179 (1994).
- 42) T. Sato, T. Ishimoto, S. Akiba, T. Fujii, *FEBS Lett.*, **323**, 23 (1993).
- 43) T. Ishimoto, S. Akiba, T. Sato, T. Fujii, *Eur. J. Biochem.*, **219**, 401 (1994).
- 44) Y. Kanaho, T. Fujii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 513 (1982).
- 45) Y. Kanaho, T. Sato, T. Fujii, *Cell Struct. Funct.*, **7**, 39 (1982).
- 46) M. Kometani, Y. Kanaho, T. Sato, T. Fujii, *Eur. J. Pharmacol.*, **111**, 97 (1985).
- 47) Y. Kanaho, M. Kometani, T. Sato, T. Fujii, *Thromb. Res.*, **31**, 817 (1983).
- 48) T. Fujii, T. Sato, A. Tamura, M. Kometani, K. Nakao, K. Fujitani, K. Kodama, M. Akasu, *Eur. J. Pharmacol.*, **146**, 285 (1988).
- 49) T. Hashizume, H. Yamaguchi, T. Sato, T. Fujii, *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 419 (1991); S. Akiba, E. Kato, T. Sato, T. Fujii, *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 45 (1992).
- 50) M. Kometani, T. Sato, T. Fujii, *Thromb. Res.*, **42**, 567 (1986).
- 51) T. Sato, M. Kometani, T. Fujii, *Thromb. Res.*, **46**, 587 (1987).
- 52) 金保安則, 佐藤隆司, 藤井達三, 神崎光也, 安永幸二郎, 内科宝冠, **30**, 15 (1983).