

た。アンモニア代謝に関しては、RDF (Gln-) 培地(NH₄Cl 1mM)に 10%透析血清を加えたものを用いて検討した。初発細胞濃度は 1×10⁵ 個/mLを用いた。各時間毎に得られたサンプルの細胞濃度は、写真法および色素排除法を用いて計測した。また、培地中のアンモニア濃度はアンモニア濃度は、F-キット アンモニア (Boehringer Mannheim 社) を用いて測定した。写真撮影による細胞濃度測定は、T-フラスコ内の細胞を顕微鏡下で写真撮影を行い、細胞数を測定した。培養終了後、すなわち培養開始後 108 時間後に、色素排除法による生細胞の計数を行い、写真撮影法のデータを補正した。色素排除法は以下の手順で行った。まず、トリパンブルー水溶液 0.2% (w/v) と NaCl 水溶液 4.25% (w/v) を 4:1 の割合で混合し、この液に細胞浮遊液を等量混合し、Burker-Turk 型血球計算板 (ERMA 4296) に一滴 (約 15 μL) のせ、ただちに検鏡して生細胞濃度、全細胞濃度を計測した。

これらの実験における各細胞の比増殖速度 μ (h⁻¹) およびアンモニア比消費速度 V_{Amm} (mol·cell⁻¹·h⁻¹) を算出した。

構築した細胞株の薬物代謝能は下記の手法を用いて検証した。まず、P450 3A4 特異的代謝に関しては、Testosterone 代謝活性 (P450 3A4 活性) を用いて測定した。これは P450 3A4 のみによって代謝されるホルモン物質 Testosterone (第一化学薬品; UC-339) を基質とし、代謝物である 6-beta-hydroxytestosterone (第一化学薬品; UC-282) を HPLC で測定することにより薬物代謝活性 (P450 3A4 活性) を評価する手

法である(下図)。

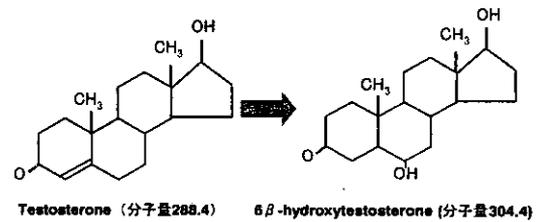


図 Testosterone代謝

複数の薬物代謝酵素によって非特異的に代謝される Lidocaine (Wako; 120-02691) の代謝活性については、主な代謝物である Monoethylglycylxyloside (MEGX) を HPLC で測定することにより薬物代謝活性を評価した。

薬物代謝活性は、一般的にタンパク量当たり、時間当りの代謝物量または基質減少量で表される。そこで活性測定のための培養後、細胞を超音波破碎し、総タンパク量を BCA Protein assay reagent kit (Pierce ; 23225) を用いて測定した。培養液から細胞を遠心分離後、5 sec 超音波処理、1 min 水冷を 4 回繰り返し細胞を破碎した。破碎した上清を用いて BCA アッセイを行った。

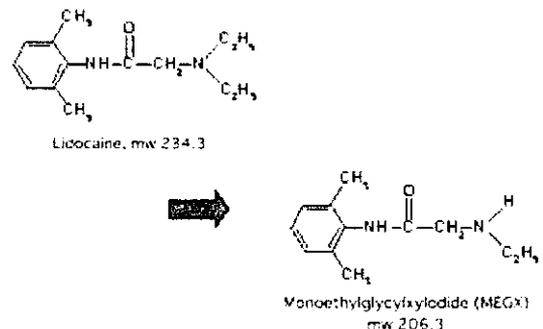
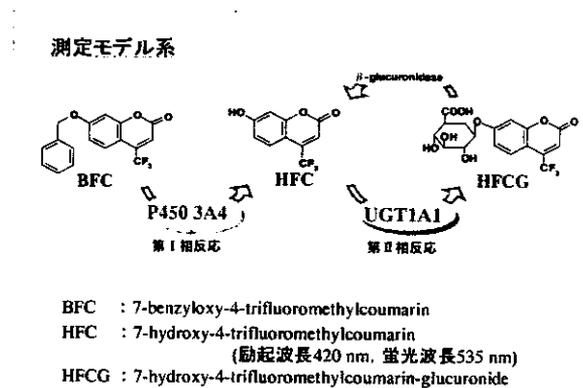


図 Lidocaine 代謝

共培養系における薬物代謝能力は 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC) を基質として用いて評価した。BFC は P450 3A4 (第 I 相反応) により 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (HFC) に、さらに UGT 1A1 (第 II 相反応) によって 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin -glucuronide (HFCG) に代謝される。HFC は蛍光物質であるため、これを蛍光プレートリーダーを用いて定量することが可能である。そこでまず、GS-3A4-HepG2 細胞による BFC 代謝および UGT 1A1-HepG2 細胞による HFC 代謝をそれぞれ評価した後、共培養系について評価した。

なお、各 well の総タンパク量の定量は Sulforhodamine B (SRB) 法 (Rubinstein *et al.*, 1990; Skehan *et al.*) を用いて行った。SRB 法は簡便かつ正確で再現性のある結果が得られる方法である。具体的には、BFC を基質として培養し、代謝物である HFC を蛍光プレートリーダーで測定することにより薬物代謝活性を評価した。HFC は一部、細胞が元来有している UGT 1A1 によって HFCG に代謝される。HFCG は蛍光を失うため、培養サンプルを β -glucuronidase で処理することにより脱抱合し、HFC に戻してから蛍光を測定することにより、HFCG まで代謝された HFC も 3A4 による代謝物とした。一方、UGT 1A1 活性は、HFC を基質として培養し、HFC の減少量から代謝物である HFCG を算出した。また、サンプルを β -glucuronidase で処理して HFCG を HFC に戻した後、蛍光プレートリーダーで測定して初期 HFC 濃度と一致するかを確認することにより、HFC の減少分が

HFCG 生成によるものかどうかを確認した。



(倫理面への配慮)

ここで用いた研究手法は、すでに既知(公表済)の細胞株および遺伝子を用いており、特に倫理面への配慮は必要としない。

C. 研究結果

薬物代謝能向上細胞の構築を目指して、グルタミン合成酵素遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子ヒト CYP3A4 遺伝子を含むベクターを構築し、これを用いて、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換し、細胞株を構築した。構築した細胞株の Testosterone 6 β -hydroxylation 活性および MEGX 生成活性を下記に示す。

表 Testosterone 6 β -hydroxylation 活性の比較

	K_m [μ M]	V_m [$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg-protein}^{-1}$]	P450 活性 [$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg-protein}^{-1}$] (S= 100 μ M)
GS-3A4	55 \pm 16	1100 \pm	694
-HepG2		170	
HepG2	-	-	0.6
ヒト初代肝*	206	611	200

* Sy *et al.*, Eur. J. Clin. Pharm.58: 357(2002)

表 MEGX 生成活性の比較

	K_m	V_m	P450 活性
--	-------	-------	---------

	[μM]	[$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$]	[$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$] (S= 100 μM)
GS-3A4-HepG2	6000 \pm 3400	5700 \pm 3200	81
HepG2	3400	-	-
HepG2	-	-	<0.1
ヒト初代肝**	65	1470	890

** Hoener *et al.*, *Biopharm. Drug Disposition* 15:295 (1994)

GS-3A4-HepG2 細胞は、ヒト初代肝細胞と比較して V_m 値が高いが K_m 値も高いため、同じ基質濃度 100 μM で比較した場合、ヒト初代肝細胞の 1/10 程度の P450 3A4 活性となる。ヒト初代肝細胞の 3 倍程度の活性(100 μM)を示した Testosterone 代謝活性測定結果とは異なり、ヒト初代肝により低い値となっている。これについてはいくつか理由が考えられるが、先に基質として用いた Testosterone は P450 3A4 によって特異的に代謝されるが、Lidocaine は P450 1A2 など複数の薬物代謝酵素によって代謝されるためと考えられる。

次に、これらの結果に基づいて、構築した細胞が血液浄化システムに適用された際の薬物代謝能の評価を行うためクリアランスを算出した。クリアランスは、単位時間あたりに臓器 (バイオ血液浄化システム) が薬物を完全に処理できる血液容積で定義され、クリアランスの算出により、 V_m や K_m 、血流量などの影響を含めた総合的な血液浄化システムの能力を比較することができる。今回のクリアランス算出では、バイオ血液浄化システムとして、本研究で以前にアンモニア代謝細胞を充填して構築したバイオ人工肝臓をモデルとした。3A4 導入 HepG2 細胞の Testosterone クリアランスは 0.7 ml/min と、ヒト初代肝細胞の約 7 倍であった。一方、Lidocaine クリアランスは 0.53 ml/min と、初代肝の 1/10 程度であった。つまり、P450 3A4 特異的な代謝能力

に関しては、初代肝を用いる場合の 7 倍の能力を発揮するということになる。従って、酵素を取り出して非細胞系バイオ人工肝を構築する場合も、このクリアランスがまず最初の目標値と考えられる。

次に、共培養における代謝について検討した。GS-3A4-HepG2 細胞および HepG2 細胞の BFC 添加培養結果を下記の表に示す。

表 BFC 代謝活性(第 I 相反応代謝)の比較

	K_m [μM]	V_m [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$]
GS-3A4-HepG2 細胞	42.7	0.04
HepG2 細胞	27.3	0.003

HepG2 細胞と比較して、GS-3A4-HepG2 細胞では BFC を代謝して HFC を生成していることが確認された。しかし、GS-3A4-HepG2 細胞においては、BFC が 100 μM 以上の高濃度になると代謝能が低下している。これは、大量に存在する BFC が代謝を阻害しているためか、蛍光測定時に何らかの影響を与えているためであると考えられる。そこで、この高濃度領域を除いての Line-weaver Burk plot を作成し、 K_m 値および V_m 値を求めた。その結果、構築した GS-3A4-HepG2 細胞の BFC 代謝における薬物代謝能力は $V_m = 0.04 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$ 、 $K_m = 42.7 \mu\text{M}$ と求まり、 V_m 値は HepG2 細胞の 10 倍程度であった。

また、初発 BFC 濃度 50 μM における BFC 代謝活性は、GS-3A4-HepG2 細胞が 0.02 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$ 、ラット初代肝細胞は約 0.005 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$ (Price *et al.*, 2000) であり、ラット初代肝の 4

倍程度の活性であった。

同様に、UDPGT 1A1-HepG2 細胞の代謝能を測定した。培養結果から、Line-weaver Burk plot を作成し、 K_m 値および V_m 値を求めた。その結果、 V_m 値は同程度であったが、 K_m 値は初代肝細胞の 3 倍程度であった。

表 HFCG 生成活性(第 II 相反応代謝)の比較

	K_m [μ M]	V_m [nmol \cdot min ⁻¹ mg-protein ⁻¹]
UDPGT 1A1-HepG2 細胞	238	2.04
HepG2 細胞	944	2.81

D. 考察

得られた結果から、共培養における薬物動態予測を行ない、薬物代謝について最適な反応比率(細胞比率)について考察した。今、GS-3A4-HepG2 細胞の K_m および V_m を K_{m1} および V_{m1} 、また UDPGT 1A1-HepG2 細胞の K_m および V_m を K_{m2} および V_{m2} とする。これらの細胞の薬物代謝が Michaelis-Menten 式に従うとすると、BFC、HFC および HFCG の薬物動態について、常微分方程式として以下の式が成り立つ。

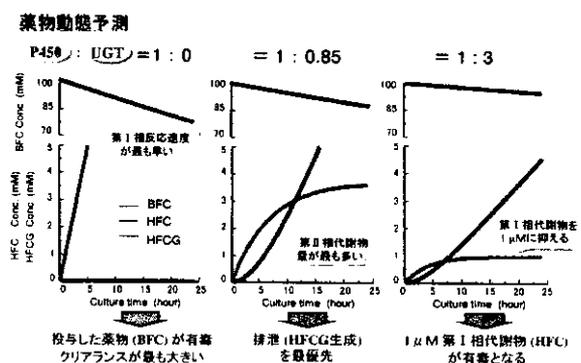
$$\frac{d[BFC]}{dt} = \frac{V_{m1}[BFC]}{K_{m1} + [BFC]}$$

$$\frac{d[HFC]}{dt} = \frac{V_{m1}[BFC]}{K_{m1} + [BFC]} - \frac{V_{m2}[HFC]}{K_{m2} + [HFC]}$$

$$\frac{d[HFCG]}{dt} = \frac{V_{m2}[HFC]}{K_{m2} + [HFC]}$$

以上の式より、第 I 相反応を行う GS-3A4-HepG2 細胞と第 II 相反応を行う

UDPGT 1A1-HepG2 細胞とを共培養した際の薬物動態を、Runge-Kutta 法を用いて予測した。 K_{m1} 、 V_{m1} 、 K_{m2} および V_{m2} は各細胞の薬物代謝活性測定結果を用いた。また血液浄化システムのリアクターとしてバイオ人工肝臓(細胞数 約 4×10^9 cells, 容積 1 L, 血流速度 $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) をモデルとし、このリアクター内でこれらの細胞を培養したと仮定した。その結果から、それぞれの共培養条件が最適となるケースを下記の図に示す。



上記のように、共培養した際の薬物の動態を予測し、目的とする薬物動態に適した反応条件を検討することが可能であった。

E. 結論

第 II 相反応を担うヒト UDPGT 1A1 の遺伝子を導入した pCAGGS ベクターを HepG2 細胞に導入し、構築した UDPGT 1A1-HepG2 と GS-3A4-HepG2 細胞株との共培養システムについて考察した。共培養系における薬物代謝能は 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC) をモデル基質として用いて評価した。BFC は P450 3A4 により 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (HFC、

蛍光物質(励起波長 420nm, 蛍光波長 535 nm) に、さらに UDPGT によって 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin-glucuronide (HGCG) に代謝されるため、連続した 2 相の薬物代謝反応における薬物の動態を評価することが可能である。3A4 導入細胞と UDPGT 導入細胞の薬物代謝活性を、基質としてそれぞれ BFC および HFC を用いて測定した結果、それぞれ $40 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg-protein}^{-1}$ 、 $2040 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg-protein}^{-1}$ であった。以上の結果に基づき、共培養した際の薬物の動態を予測し、目的とする薬物動態に適した反応条件を検討することが可能である。

F.健康危険情報

該当する情報は無い

G.研究発表

1.論文発表

1) **Takeshi Omasa**, Michimasa Kishimoto, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi "An attempt at decision making in tissue engineering: reactor evaluation using the analytic hierarchy process (AHP)" Biochemical Eng. J. 2004 (in press)

2. 総説

1. **大政健史** "バイオ人工肝のメカニズム -設計基準と評価-" 細胞 Vol. 35, No.12, 463-467 (2003)

3.著書

1)**大政健史** 「抗体医薬の生産技術－動

物細胞による物質生産の現状と課題－」(分担執筆) 「抗体エンジニアリングの最前線」植田充美編 シーエムシー出版 (2004)

2)**大政健史**ら「再生医療実用化にむけた生物工学研究」(分担執筆) 日本生物工学会セル&ティッシュエンジニアリング研究部会編 編集代表(高木睦、**大政健史**) 三恵社 (2003)

4.学会発表

(国際学会)

1) **Takeshi Omasa**, Masaya Kawase, Shin Enosawa "Reactor evaluation for bioartificial support system -BAL clearance and AHP analysis-" In, Cell culture engineering IX, Session Tissue engineering, P.I.D.5, Cancún, México (2004)

2) **Takeshi Omasa**, Shin Enosawa "Artificial mimicking of human drug metabolism for a bio-hemofiltration system" In, Engineering Conference International: Biochemical Engineering XIII (2003), Session Tissue engineering, No.II-4-1, Boulder, Colorado, USA

3) **Takeshi Omasa**, Shin Enosawa, "Reconstruction of human-drug metabolism by co-culture of recombinant HepG2 cells" In; Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2003, Biochemical Engineering Toward Global Biosociety, PP-D11, Jeju Island, Korea

4) **Takeshi Omasa**, Kazumi Kim, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Mutsumi

Takagi, Toshiomi Yoshida, and Shin Enosawa
“Engineering design for bioartificial liver support system” In the Engineering Tissue Growth 2003 (ETG2003), Pittsburgh, USA
(国内学会)

1) 大政健史 (特別講演)

“バイオ人工肝の設計と評価” 第1回 ラジアルフローバイオリクター研究会
2003年

2) 小林雅明、杉原伸宏、伊勢裕彦、根岸直樹、池田宇一、大政健史 “電気化学測定による肝由来細胞株中の薬物代謝酵素応答の検出” 第34回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会 2G03 2003年

3) 橋本忠明、門脇洋平、金和美、片倉啓雄、岸本通雅、菅健一、高木睦、吉田敏臣、塩谷捨明、絵野沢伸、大政健史 “肝由来細胞株共培養による薬物代謝システムの構築” 日本生物工学会、平成15年度大会 2C16-1

4) 寺田聡、石村純一、齊藤恭行、小川亜希子、三木正雄、大政健史、鈴木栄二 “バイオ人工肝臓のための細胞死耐性肝細胞株の樹立” 日本生物工学会、平成15年度大会 2C15-5

5) 大政健史、吉川智啓 “物質生産に適した宿主系とは？ 原理、応用、将来 — 遺伝子増幅系を中心として —” シンポジウム1：「動物細胞培養による医薬生産技術 — ICHガイドラインに関連して — 」

(オーガナイザー：細淵雅彦、大政健史)

2003年度日本動物細胞工学会大会 (JAACT2003)、S1-5

6) 橋本忠明、大西真亮、門脇洋平、金和美、片倉啓雄、岸本通雅、菅健一、高木睦、吉田敏臣、塩谷捨明、絵野沢伸、大政健史 “肝薬物代謝システム再構築を目指した肝由来細胞共培養系の開発” 2003年度日本動物細胞工学会大会 (JAACT2003)、Po-4 (ポスターセッション表彰 応用基礎部門第三位)

7) 齋藤 恭行、寺田 聡、石村 純一、三木正雄、大政健史、鈴木栄二 “バイオ人工肝臓のための細胞死耐性肝細胞株の樹立とその評価” 2003年度日本動物細胞工学会大会 (JAACT2003)、Po-19

8) 大政 健史、金和美、門脇洋平、片倉啓雄、高木睦、吉田俊臣、絵野沢伸 “薬物代謝細胞の構築と血液浄化システムへの応用” 第10回 HAB 研究機構学術年会、O-4、2003年

H. 知的財産権の出願・登録状況

大政健史、吉川智啓 “高発現型汎用哺乳動物宿主細胞” 特願 2003-317484 号
2003年9月9日

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発
Ⅲ ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究
薬剤輸送トランスポーターのメカニズム解析とバイオ人工肝開発に向けた研究

分担研究者 植田 和光（京都大学大学院農学研究科 教授）

研究要旨：

薬剤輸送トランスポーターMDR1 および MRP2 を精製し、それらを人工リン脂質膜に埋め込んだプロテオリポソームを用いてバイオ人工肝を開発するためには、それら薬剤輸送トランスポーターをどのようにして活性を保ったまま精製し、効率よくリポソームに再構成し、安定性を保つかが重要な課題である。そのためには、薬剤輸送トランスポーターの作用メカニズムを理解するとともに、膜からの可溶化条件、精製条件、再構成条件などの最適化が必要である。

A. 研究目的

A-1. 背景

MDR1 と MRP2 は ABC (ATP binding cassette) 蛋白質ファミリーに属しており、体内の有害物を体外へ排出すると同時に、環境中の有害物が体内へ吸収されるのを防いでいる。ABC 蛋白質は、よく保存されたヌクレオチド結合領域 (nucleotide binding fold : NBF) を持つ膜蛋白質であり、ヒト染色体上に 49 の ABC 蛋白質遺伝子がコードされている。MDR1 と MRP2 はどちらも ATP 加水分解のエネルギーを用いてさまざまな脂溶性の有害物を輸送するトランスポーターとして機能する。

MDR1 は、12 の膜貫通セグメントと 2 つの ATP 結合ドメインをもち、それら 2 つの ATP 結合領域が交互に ATP 加水分解を繰り返すことによって構造変化を繰り返し、その構造変化が物質の輸送と共役していると考えられる。

MRP2/cMOAT (multidrug resistance

protein 2 / canalicular multispecific organic anion transporter) (図 1) は、17 の膜貫通セグメントと 2 つの ATP 結合ドメインをもち、肝細胞特異的に発現し、老廃赤血球ヘモグロビン由来のビリルビンを肝細胞から胆管に輸送する。ビリルビンの肝臓からの排出に欠陥を生じると血中ビリルビンの濃度が上昇し、Dubin-Johnson 症候群 (DJS) と呼ばれる体質性黄疸が引き起こされる。最近、MRP2 が関与する DJS の原因として、C 末端側の NBF (NBF2) 内に存在するグルタミン残基の変異 Q1382R が同定され、MRP2-Q1382R では基質輸送能が失われていることが明らかになった。このグルタミン残基は多くの ABC 蛋白質でよく保存されており、ABC 蛋白質の機能にとって重要であることが予想される。MDR1 の幅広い基質認識機構、MRP2 のビリルビン認識機構、MDR1 と MRP2 の輸送機構の相違などの詳細は不明である。

薬剤輸送トランスポーターMDR1 および

MRP2 は、膜に埋め込まれており、さらにその膜中でダイナミックに構造変化することによって薬剤を輸送している。これらトランスポーターを精製し、それらを人工リン脂質膜に埋め込んだプロテオリポソームを用いてバイオ人工肝を開発するためには、それら薬剤輸送トランスポーターをどのようにして活性を保ったまま精製し、効率よくリポソームに再構成し、安定性を保つかが重要な課題である。そのためには、薬剤輸送トランスポーターの作用メカニズムを理解するとともに、膜からの可溶化条件、精製条件、再構成条件などの最適化が必要である。

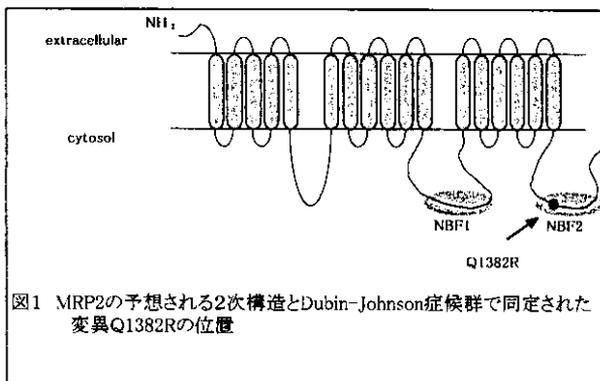


図1 MRP2の予想される2次構造とDubin-Johnson症候群で同定された変異Q1382Rの位置

B. 研究方法

B-1. 精製MDR1活性のマイクロアッセイ系の確立に関する研究

MDR1のC末端にThrombin切断部位とヒスチジンタグを融合した蛋白質をバキュロウイルスベクターに組み込み、昆虫細胞Sf9細胞に感染させた。発現量は、感染開始後48時間から72時間で最大となり、全膜蛋白質の約1%程度であった。膜画分を0.8%(w/v)のドデシルマルトシドによって可溶化し、可溶性画分からNi-NTAアガロースによって最終的にMDR1を90%以上の純度で精製できた。

精製MDR1を人工リポソームに再構成し、MDR1の輸送する代表的な基質としてペラパ

ミルを用いて、基質の添加によって誘導されるATP加水分解量を測定することによって、MDR1の活性を測定した。現行のATP加水分解測定系では、多量の精製蛋白質を必要とする、そこで新規なATP加水分解測定系を確立するために、酸化チタンカラムの有効性を検討した。酸化チタンカラムをHPLCにつなぎアデニンヌクレオチドの分離能を確かめた結果、1サンプル当たり3分以内でATPとADPを分離できることがわかった。さらにADPに対して5pmolから10nmolまで直線性を示し、幅広いダイナミックレンジで測定可能であることがわかった。オートサンプラーを装着することによって、MDR1のATP加水分解を1サンプル3分で自動的に測定できるようになった。

B-2. ビリルビン排出に関与するABC蛋白質MRP2の機能解析に関する研究

野生型MRP2を安定に高発現したHEK293細胞から細胞膜を調製し、生理的な輸送基質や抗がん剤がATP加水分解能に及ぼす影響をバナデートトラップ法により検討した。バナデートトラップ法とは、バナジン酸やBeFxといったリン酸アナログ存在下でトランスポーター型ABC蛋白質がATPを加水分解すると、 γ -リン酸の代わりにリン酸アナログがADPとともに保持され、安定な加水分解中間体が形成されることを言う。ATPとして8-azido[α - 32 P]ATPを用い、加水分解中間体を形成した状態でUV照射を行うことで、保持された8-azido-ADPを蛋白質に共有結合できる(光親和標識)。光親和結合した8-azido[α - 32 P]ADPの量はATP加水分解量を反映すると考えられる。

バナデートトラップの後、トリプシン限定分解により野生型MRP2をN末端側のNBF(NBF1)及びNBF2を含む断片に分解し、どちらのNBFで加水分解が行われているか検

討した。さらに、Dubin-Johnson 症候群で見出されたアミノ酸置換を導入した MRP2-Q1382R を安定に高発現した HEK293 細胞から細胞膜を調製し、Q1382R 変異が MRP2 の ATP 結合能や ATP 加水分解能に与える影響を、バナデートトラップ法により検討した。

C. 研究結果と考察

C-1. 精製 MDR1 活性のマイクロアッセイ系の確立に関する研究

リポソームに再構成した精製 MDR1 の ATP 加水分解反応によって生じた ADP を酸化チタンカラムを装着した HPLC によって分離、定量し、MDR1 特異的な ATP 加水分解活性を高感度で検出する系の開発を試みた。

精製 MDR1 はリポソームに再構成しなければ ATP 加水分解活性を示さず、再構成後にベラパミルを添加することで初めて強い ATP 加水分解活性を示した。また、リン酸アナログであるバナジン酸の添加によってほぼ完全に ATP 加水分解は阻害された。これらの性質はこれまで報告された MDR1 の ATP 加水分解の性質と一致しており、Sf9 で発現し精製した MDR1 が本来の活性を保っていることを示している。

本測定法で MDR1 の ATP 加水分解活性を測定した結果、0.5 ng の精製 MDR1 を用いることによって十分に MDR1 の活性を測定可能であることが明らかになった。従来一般的に用いられている ATP 加水分解測定法であるリン酸モリブデン法と比較して約 20 倍の感度であった。

C-2. ビリルビン排出に関与する ABC 蛋白質 MRP2 の機能解析に関する研究

ヒト培養細胞 HEK293 細胞に安定に高発現させた野生型 MRP2、MRP2-Q1382R の発現を Western blotting により調べたところ、蛋

白質の分子サイズは同じであった。このことから MRP2-Q1382R も野生型と同様に糖鎖付加された成熟型蛋白質として発現することが明らかになった。

野生型 MRP2 では、リン酸アナログ存在下、輸送基質であるビリルビンやエストラジオールグルクロン酸抱合体 ($E_217\beta G$) の濃度や、抗がん剤エトポシドに依存して光親和標識量が増加した (図 2 A, 図 3)。野生型 MRP2 の光親和標識量がリン酸アナログと輸送基質に依存して増加したことから、MRP2 は MDR1 や MRP1 と同様に、リン酸アナログ存在下 ATP 加水分解中間体を形成し、基質の結合によって ATP 加水分解が促進されることが示唆された。

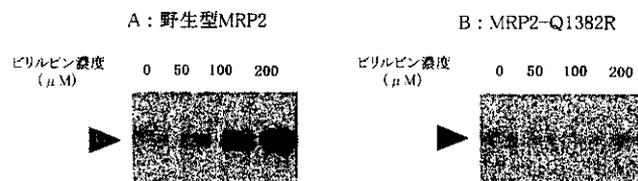


図2 MRP2の8-azido[α - ^{32}P]ATP光親和標識のビリルビンによる促進

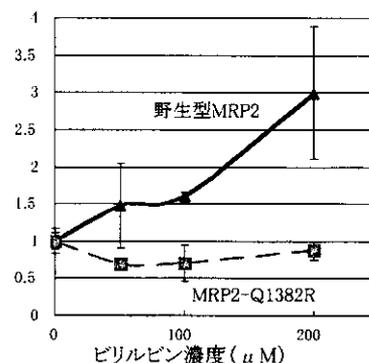


図3 MRP2の 光親和標識量のビリルビン濃度依存性

トリプシン限定分解の結果、野生型 MRP2 では NBF2 を含む断片でのみ光親和標識が観察できた。このことから MRP2 に基質が結合すると、まず NBF2 で ATP 加水分解が起こることが明らかになった。

一方 MRP2-Q1382R では、MRP2-Q1382R はリン酸アナログ非存在下でも弱く光親和標識されたが、基質を加えても光親和標識量の増加は見られなかった。(図 2 B、図 3)。MRP2-Q1382R の光親和標識がリン酸アナログ、基質のどちらにも依存しなかったことから、MRP2-Q1382R の加水分解活性は失われているか非常に弱くなっていると考えられた。しかし、8-azido[γ - 32 P] ATP を用いて同様の実験を行ったところ、野生型 MRP2、MRP2-Q1382R いずれも光親和標識されなかった。以上の結果は、MRP2-Q1382R は野生型 MRP2 と同様に ATP 加水分解活性を保持していること、しかし基質が結合することによって ATP 加水分解が促進されないこと、ATP 加水分解後の ADP が ATP 結合部位から遊離しにくいことを示唆している。

D. 考察および E. 結論

酸化チタンカラムを装着した HPLC を用いてリポソームに再構成した精製 MDR1 の活性を測定するマイクロアッセイ系が確立できた。本法を用いることによって、MDR1 を活性を保ったまま安定にリポソームに保持する条件のスクリーニングが可能になった。

バナデートトラップ法とトリプシン限定分解法を用いることによって、MRP2 の ATP 加水分解が主に 2 番目の ATP 結合領域で行われることが明らかになり、2 つの ATP 結合領域が等価な働きをする MDR1 とは異なった輸送機構であることが明らかになった。さらに、Dubin-Johnson 症候群と呼ばれる体質性黄疸を示す日本人患者で見出された MRP2 遺伝子の変異の ATP 加水分解に与える影響

を検討した結果、Q1382R 変異によって MRP2 のベーサルレベルの ATP 加水分解は影響を受けないが、基質の結合によって ATP 加水分解が促進されないこと、ADP の遊離に異常があることが明らかになった。そのため基質の輸送が損なわれ、Dubin-Johnson 症候群が引き起こされると予想される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Munehira, Y., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Imamura, M., Yokota, T., Takeda, S.i., Amachi, T., Matsuo, M., Kioka, N. and Ueda, K. α 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J Biol Chem* (2004) in press.
2. Suzuki, S., Nishimaki-Mogami, T., Tamehiro, N., Inoue, K., Arakawa, R., Abe-Dohmae, S., Tanaka, A.R., Ueda, K. and Yokoyama, S. Verapamil Increases the Apolipoprotein-Mediated Release of Cellular Cholesterol by Induction of ABCA1 Expression via an LXR-Independent Mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004) in press.
3. Fujise, H., Sasawatari, S., Annoura, T., Ikeda, T. and Ueda, K. 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl inhibits drug efflux through P-glycoprotein in KB-3 cells expressing mutant human P-glycoprotein. *J. Biomed. Biotech* (2004) in press.
4. Kimura, Y., Shibasaki, S., Morisato, K., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi,

- K., Matsuo, M., Amachi, T., Ueda, M. and Ueda, K. Microanalysis for MDR1 ATPase by high-performance liquid chromatography with a titanium dioxide column. **Anal. Biochem** (2004) in press.
5. Kimura, Y., Matsuo, M., Takahashi, K., Saeki, T., Kioka, N., Amachi, T., and Ueda, K. ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter, MDR1/P-glycoprotein. **Current Drug Metabolism**, in press
 6. Abe-Dohmae, S., Ikeda, Y., Matsuo, M., Hayashi, M., Okuhira, K. I., Ueda, K., and Yokoyama, S. Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate HDL. **J Biol Chem** 279(1):604-11 (2004)
 7. Ikeda, Y., Abe-Dohmae, S., Munehira, Y., Aoki, R., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Amachi, T., Kioka, N., Matsuo, M., Yokoyama, S., and Ueda, K. Post-transcriptional regulation of human ABCA7 and its function for the apoA-I-dependent lipid release. **Biochem Biophys Res Commun**, 311, 313-318 (2003)
 8. Tanaka, A. R., Abe-Dohmae, S., Ohnishi, T., Aoki, R., Morinaga, G., Okuhira, K. I., Ikeda, Y., Kano, F., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Murata, M., Yokoyama, S., and Ueda, K. Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. **J Biol Chem** 278, 8815-8819 (2003)
 9. Shitan, N., Bazin, I., Dan, K., Obata, K., Kigawa, K., Ueda, K., Sato, F., Forestier, C., and Yazaki, K. Involvement of CjMDR1, a plant MDR-type ABC protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100: 751-756 (2003)
 10. Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Imai, Y., Sugimoto, Y., Ueda, K., and Tsuruo, T. Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by estrogen antagonists and agonists. **Mol. Cancer Ther.** 2: 105-112 (2003)
 11. Terasaka, K., Shitan, N., Sato, F., Maniwa, F., Ueda, K., and Yazaki, K. Application of vanadate-induced nucleotide trapping to plant cells for detection of ABC proteins. **Plant Cell Physiol** 44, 198-200 (2003)
 12. Matsuo, M., Ueda, K., Ryder, K., and Ashcroft, F. The sulphonylurea receptor: An ABCC transporter that acts as an ion channel regulator. In: Holland, IB ed. ABC proteins. Academic Press. 551-576 (2003)
- G-2.学会発表
1. Keynote Plenary Lecture : ABC proteins: Key molecules in glucose and lipid homeostasis, Ueda, K. 4th FEBS Advanced Lecture Course“ABC proteins from genetic disease to MDR” in Austria (2003.3.5)
- G-3.新聞報道
なし
- H.知的所有権の取得状況
なし

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究 薬物トランスポーター機能発現環境の最適化

分担研究者 藤村昭夫 自治医科大学臨床薬理学教室 教授

研究要旨：ナノテクノロジーを応用した非細胞性代謝機能代替デバイスとしての、新しいタイプの人工肝臓作成に向けて、抱合型ビリルビンを効率よく輸送する新規膜蛋白 ABCA8 の機能解析を継続した。マウス ABCA8 ポリクローナル抗体を作成し蛋白の臓器発現を検討し、肝内胆管細胞および肝静脈周囲の肝実質細胞に発現が認められた。胆管閉塞モデルマウスにおいて、肝における蛋白発現が 24 時間をピークに増加した。よって、この蛋白は病態生理学的にも高ビリルビン血症時のビリルビン排泄蛋白として重要であることが判明した。今後は、非細胞性代謝機能代替デバイスへのこの蛋白の導入が急務である。

A. 研究目的

今までに様々なタイプの肝不全治療のための人工肝臓が考案されている。これらの一部は既に臨床応用され始めており、肝不全患者の救命に貢献しつつある。しかし、これらの人工臓器には抱合型ビリルビンの除去が困難であるという共通した欠点があり、このため人工肝臓を長期間使用することができなかった。一方近年の分子生物学の進歩により、ビリルビンを含めた、様々な薬物の体内からの排泄機序が明らかとなりつつある。

昨年までに研究者らは本研究においてナノテクノロジーを応用した非細胞性代謝機能代替デバイスとしての新しいタイプの人工肝臓作成に向けて、抱合型ビリルビンを効率よく輸送する新規膜蛋白 ABCA8 をクローニングし、その機能解析と mRNA 発現の変化の検討を行った。本年度はこれを更にすすめ、マ

ウス ABCA8 蛋白の正常組織における局在を明らかにするとともに、病態動物マウスモデルにおける蛋白発現の変化の様子を検討した。

B. 研究方法

昨年クローニングし直したマウス ABCA8 遺伝子配列をもとに、non-coding region をプローブとして正常マウスでの各臓器における mRNA 発現をノーザンブロットにより検討した。また、この塩基配列から抗原として適当と想定された部分に対する合成ペプチドをデザインし、ウサギに免疫することで、ポリクローナル抗体を作成した。得られた抗体は ELISA による検定では 5000 倍以上の titer を有していた。これを更にアフィニティーカラムで精製した後に、正常マウス組織に対する免疫組織化学を定法どおりに行った。その上で、基質の一つである抱合型ビリルビンおよびジゴキシンを急性に負荷し、正常

時において蛋白発現の多かった肝・心における蛋白発現変化を、ウェスタンブロット法を用いて、経時的に検討した。

C.研究結果

ノーザンブロットにおける臓器発現からも肝に最も発現が見られた(図1)。

ノーザンブロット法によるマウスにおける組織分布

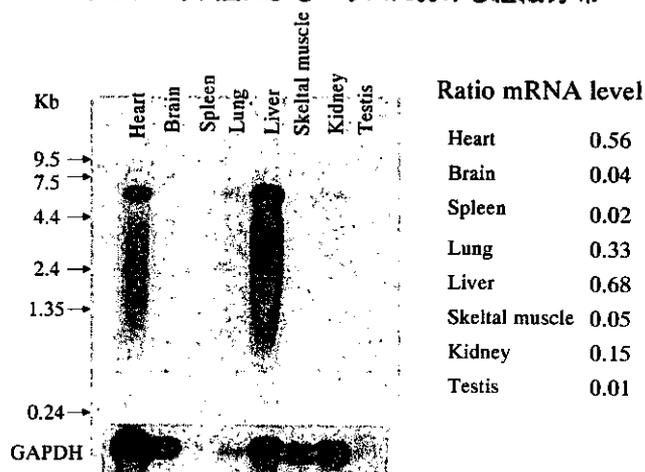


図1 マウスにおけるmRNA 発現臓器分布

また、得られたポリクローナル抗体を使って正常肝に対するウェスタンブロットを行ったところ、目的の分子量に相当する位置にシングルバンドを確認した。これを元に正常肝の免疫染色を行った。それによると肝内胆管細胞管腔膜周囲に最も強い染色があり(図2)、一部肝静脈周囲の肝実質細胞にも弱い染色が見られた。また、心においても弱い染色も見られた。

一方、ジゴキシン急性負荷時の肝における蛋白発現は16-24時間に一過性の大幅な減少を示し、48時間では回復した。この経過は昨年明らかにしたmRNA発現の推移と良く関連していた(図3)。心においては蛋白発現の経時変化は見られなかった(図4)

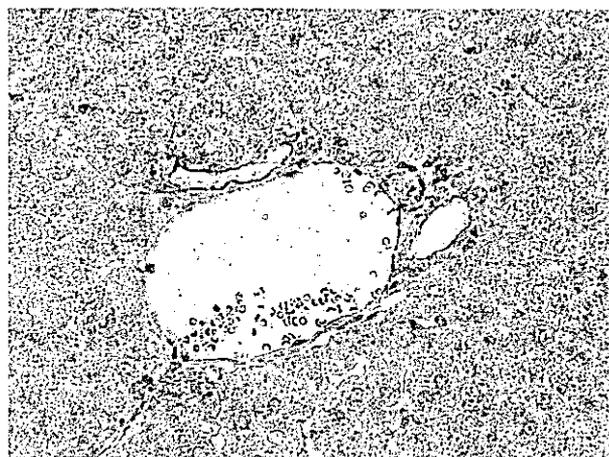


図2 マウス肝における ABCA8 蛋白の局在

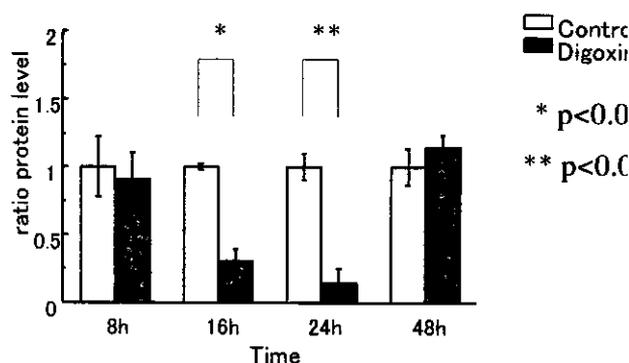


図3. ジゴキシン急性負荷時の肝における蛋白発現の変化

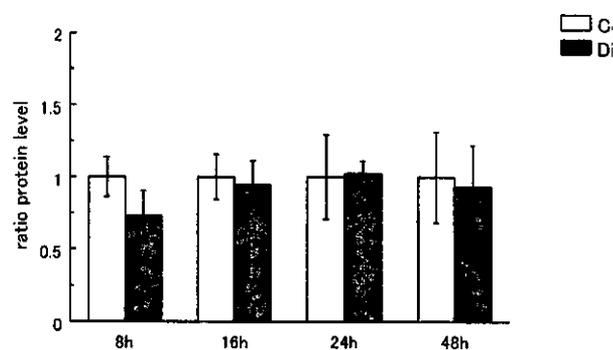
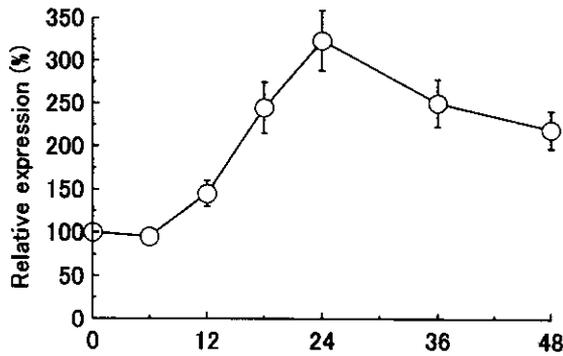


図4. ジゴキシン急性負荷時の心における蛋白発現の変化

また、胆管欠紮による急性高ビリルビン血症モデル肝臓においては、mRNA 発現は12時間を、

蛋白発現は12-24時間において増加するこ



とが判明した (図 5、6)。

図 5. 胆管欠紮時における肝での mRNA 発現の経時的変化

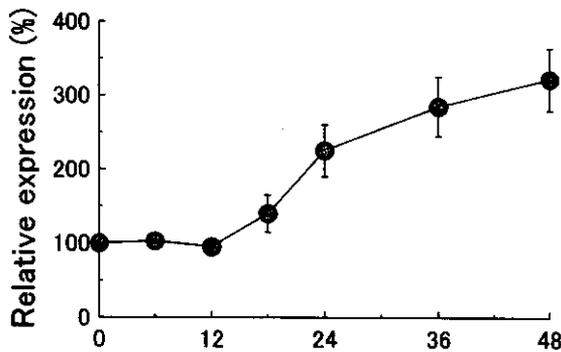


図 6. 胆管欠紮時における肝での蛋白発現の経時的変化

D. 考察

以上示したように、我々は抱合型ビリルビンを輸送する新しい蛋白 ABCA8 をクローニングし、今年度は主にその蛋白発現について検討した。マウスにおいても肝・心を中心に広く分布していることが判明し、これは昨年までのヒトにおける検討結果とほぼ合致していた。肝においては主に胆管細胞の管腔膜周囲に存在し、基質の輸送に関与しているこ

とを推察させる。胆管閉塞により高ビリルビン血症時に mRNA・蛋白発現が増加することから考えると、胆管細胞でのビリルビンの胆管への分泌に関与するものと考えられる。昨年度に得られたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現実験によると、抱合型ビリルビンや抱合型有機アニオンは卵母細胞内への取り込みが増加したのに対し、ジゴキシンについては汲み出しが増加しており、基質輸送方向が両者では逆になっていた。今年度検討したジゴキシン負荷時と胆管閉塞時の肝での mRNA・蛋白発現の推移もジゴキシン負荷時には減少・胆管閉塞時には増加と逆の方向であったことは、この基質輸送方向の相違によるのかもしれない。今後はこの蛋白を高発現させた細胞を大量作成、さらに精製し、非細胞系代謝機能付与デバイスに応用する予定である。これにより、現行の人工肝臓よりも機能の高いものが開発可能であると考えられ、肝不全治療法が大きく進歩するものと期待される。

E. 結論

抱合型ビリルビンをはじめとする異物排泄に関与する新しい膜蛋白 ABCA8 をクローニングし、その mRNA・蛋白発現を検討した。肝においては主に胆管細胞の管腔膜周囲に存在し、胆管閉塞モデルにおいては、その発現が増加することがあきらかになった。これにより、黄疸などの高ビリルビン血症をはじめとした病態においても、この蛋白が重要な役割を果たすことが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当する情報は無い

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishiki, K., Tsuruoka, S., Kawaguchi, A., Sugimoto, K., Imai, M., Fujimura A. Inhibition of Rho-kinase reduces Na-H exchanger activity and natriuresis in rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 304:723-8, 2003.
- 2) Nishiki K, Tsuruoka S, Wakaumi M, Yamamoto H, Koyama A, Fujimura A. Dosing-time dependent variation in the hypocalcemic effect of calcitonin in rat. *Eur J Pharmacol.* 460: 171-175, 2003.
- 3) Tsuruoka, S., Schwartz GJ, Wakaumi, M., Nishiki, K., Yamamoto H, Purkerson JM, Fujimura, A. Nitric oxide production modulates cyclosporine A-induced distal renal tubular acidosis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 305: 840-845, 2003.
- 4) Tsuruoka S, Wakaumi M, Sugimoto K, Saito T, Fujimura A. Chronotherapy of high dose active vitamin D3 in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism - repeated dosing study-. *Br J Clin Pharmacol.* 55:531-537, 2003.
- 5) Matsumoto N, Tsuruoka S, Iwamoto T, Tomich JM, Imai M, Suzuki M. Expression of an artificial Cl channel in micro-perfused renal proximal tubules. *J.Membr.Biol.* 193:195-200, 2003
- 6) Tsuruoka S, Nishiki K, Wakaumi M, Wang N, Yamamoto H, Ando H, Imai M, Fujimura A. Treatment of digoxin intoxication model by hybrid kidney with hollowfiber module for clinical hemodialysis. *Nephrol Dial*

Transplant in press.

- 7) 鶴岡秀一。ハイブリッド型人工腎臓の試み。腎と透析 54 : 653-656, 2003
- 8) 鶴岡秀一、川口敦弘、斎藤鉄男、藤村昭夫。ビタミンE固定化ダイアライザー反復使用による末梢血好中球機能の変化。Vitamembrane 3 : 10-14, 2003
- 9) 鶴岡秀一、若海美智、山本尚史、安藤仁。ハイブリッド型人工腎臓。日内会誌 92 : 2433-2438, 2003。

2. 学会発表

- 1) 鶴岡秀一、山本尚史、錦健太、催一民、王寧、今井正、藤村昭夫。MDR 遺伝子高発現細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓によるジゴキシン (D) 中毒イヌの治療。第2回日本再生医療学会大会。2003年3月10-12日、神戸(日本再生医療学会雑誌 2: (suppl) 171, 2003)。
- 2) Araki T, Tsuruoka S, Sugimoto K, Ohmori M, Cui Y, Maezono S, Yamazoe Y, Omasa T, Fujimura A. In vitro screening of drug metabolism and interaction using HepG2 overexpressing human drug metabolizing enzyme CYP3A4. 2003 Annual Meeting, American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Washington DC,
- 3) 鶴岡秀一、山本尚史、錦健太、催一民、王寧、今井正、藤村昭夫。MDR 遺伝子高発現細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓によるジゴキシン (D) 中毒イヌの治療。第48回日本透析医学会学術集会・総会。2003年6月20-23日大阪。(透析会誌 36:770, 2003)
- 4) 鶴岡秀一、錦健太、山本尚史、王寧、安藤仁、今井正、藤村昭夫。臨床血液透析用ホロファイバー型モジュールを用いたハイブリッ

ド型人工腎臓によるジゴキシン除去能の検討。

第 41 回日本人工臓器学会。2003 年 10 月 30

日-11 月 1 日、仙台。

5) 鶴岡秀一。薬物中毒とハイブリッド型人工臓器。(シンポジウム・再生医療と臨床薬理)

第 24 回日本臨床薬理学会年会。2003 年 12 月

11-12 日、横浜。

H.知的財産権の出願・登録状況

Drug transporter and use thereof. 国際公開 2003 年 4 月 10 日 (WO 03/029290)

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発
Ⅲ. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究
リポソーム微細構造観察法の開発

分担研究者 三枝順三（独立行政法人産業医学総合研究所 部長）

研究要旨：

リポソームの微細形態、薬物代謝酵素等の機能性タンパクを組み込んだ機能性プロテオリポソームの微細形態や組み込みタンパクの部位を検索するためには透過電子顕微鏡による観察が必須である。従ってリポソーム試料の形態を損なわずにしかも透過電子顕微鏡に適した標本作製法を開発しなければならない。今回血液を支持体とするリポソーム試料の永久電子顕微鏡標本作製法を開発した。同方法により作製法の異なるリポソーム試料を2種類（A、B）観察した。試料Aは直径100～125ナノメートルで2～6層の膜を有する中空円形構造を呈した。異なる方法で作製したリポソーム試料Bを観察したところ、直径60～250ナノメートルの中空あるいはタマネギ状の形態を示した。以上の結果から、今回開発した観察法はリポソーム微細形態検索に有用性が高いと考える。また、リポソームは作製方法によりその直径や構造がかなり異なることが示唆された。機能性プロテオリポソームを代替デバイスとして応用する場合にはどのような構造を呈するかを実際に電子顕微鏡で観察し、特徴的形態を確認する必要があると考えられる。

A.研究目的

人工リポソームおよび機能性タンパクを組み込んだプロテオリポソームの微細構造を透過電子顕微鏡的に観察する方法を開発する。開発された方法を駆使して機能的プロテオリポソームの機能と微細構造の相関を検討する。

B.研究方法

平成14年度はリポソーム試料封入のための支持体としてゼラチンや寒天を試みたが、試料の消失が多く、僅かに観察されたりリポソーム様構造も説得力が

あるものではなかった。その理由として、

- ①リポソーム懸濁液と支持体が十分に混和しなかったために試料が消失した、
- ②グルタルアルデヒドやオスミウム酸による固定が不十分であり脱水過程においてリポソームがアルコールや酸化プロピレン等の有機溶剤によって崩壊した、等のことが考えられた。そこで、通常電子顕微鏡標本作製方法ではなく凍結電子顕微鏡標本を作製しなければならないと考えた。事実文献検索してみると、リポソームの形態を観察した報告のほとんどが凍結電子顕微鏡標本を

用いていた。しかし凍結電顕を行う為には液化プロパンを冷媒とし -165°C で試料を急速浸漬凍結する特殊な凍結装置(図1)や試料を $-100\sim 130^{\circ}\text{C}$ で超薄切するクライオウルトラトーム(図2)が必要である。

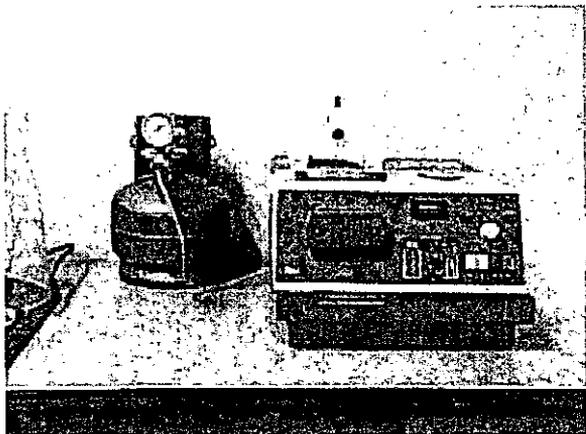


図1. 急速浸漬凍結装置

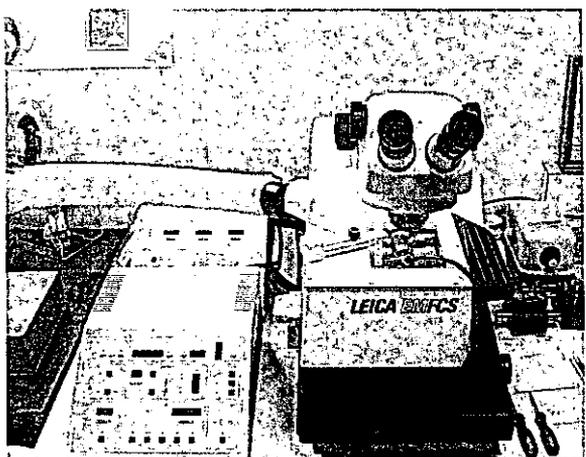


図2. クライオウルトラトーム

これらの機器を製作しているメーカーに問い合わせしてみた所、当該機器はレンタルであってもかなり高価であり、しかも日本国内に製品が少ないためレンタル期間は限られるとの返事を得、継続的な検索が不可能であった。また、技術的理由によりその結果はばらつきが大

きいためロットによる形態の比較が困難であり、かつ永久標本は得られないという重大な欠陥がある。そこで、原点に立ち戻り標本作製法を再考した。日常業務として実施している生物試料の電顕作製法では脳のように脂質の豊富な組織でも十分に固定を行えば満足できる微細構造観察は可能である。一般に細胞膜は脂質に富んでいるが支障なく微細構造の観察はでき、細胞内脂質は十分保持され電子密度の高い物質として観察される。従って人工リポソームを生体内と同様の条件におけば細胞膜を観察するようにその微細構造は観察されてしかるべきであろうと思われた。また、血液やリンパ液のような体液とリポソーム懸濁液と良く混和し固定すれば試料は固化され、通常の電顕試料として扱いは困難ではない。以上のことから下記の方法を試みた。

1) 組織内注入法

- ① 人工リポソーム懸濁液をマウスから採取した新鮮肝臓に局所的に注入する。
- ② 注入局所組織を4%グルタルアルデヒド液(カコジル酸緩衝液)で固定
- ③ カコジル酸緩衝液で洗浄
- ④ 1%オスミウム酸(カコジル酸緩衝液、6%ショ糖含有)で後固定
- ⑤ エチルアルコール系列により脱水
- ⑥ エチルアルコールから酸化プロピレンへの置換
- ⑦ 酸化プロピレンからエポキシ樹脂への置換

⑧ エポキシ樹脂へ包埋 (図6)

⑨ エポキシ樹脂の重合

2) 血管内注入法

① マウスの腹部大動・静脈を露出する。

② 手術用絹糸で静脈あるいは動脈の一部を袋状に結紮し、そこへ人工リポソーム懸濁液を注入 (図3)



図3. 静脈内への人工リポソーム懸濁液注入

試料を注入した袋状血管を採取し

(図4)、4%グルタルアルデヒド (カコジル酸緩衝液) で固定 (図5)

③ カコジル酸緩衝液で洗浄

④ 1%オスミウム酸 (0.1M カコジル酸緩衝液、6%ショ糖含有) で後固定

⑤ エチルアルコール系列により脱水

⑥ エチルアルコールから酸化プロピレンへの置換



図4. 袋状血管の採取

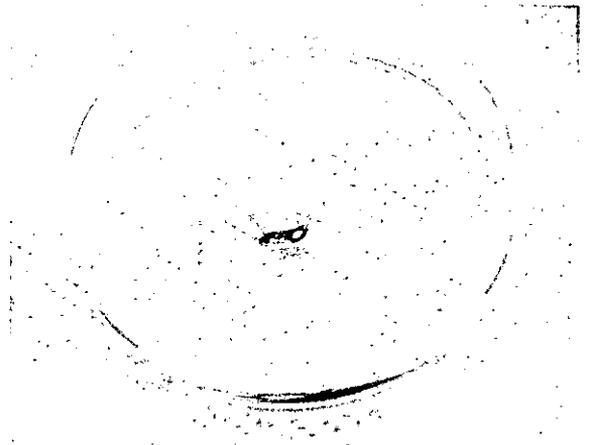


図5. 4%グルタルアルデヒドによる袋状血管の固定

⑦ 酸化プロピレンからエポキシ樹脂への置換

⑧ エポキシ樹脂へ包埋 (図6)

⑨ エポキシ樹脂の重合

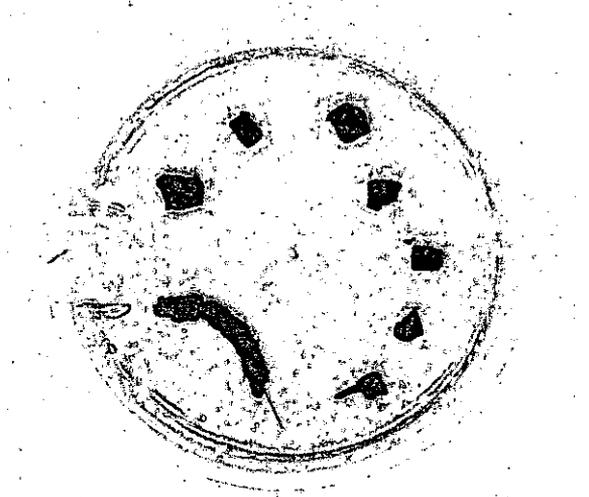


図6. エポキシ樹脂へ包埋された組織片

この方法では国立成育医療センター研究所由来のリポソーム懸濁試料 (A1) とそれを超遠心によって濃縮したリポソーム懸濁試料 (A2) および作製法の異なる大阪大学由来のリポソーム懸濁試料 (B) の合計 3 種類の試料と対照として懸濁緩衝液について検索した。

いずれの方法においても、エポキシ樹脂に平板包埋された試料を糸鋸で切り出し、トリミング後ウルトラトーム (Leica 社) で $1\mu\text{m}$ の厚切り切片を作製し、トルイジン青で染色したのち光学顕微鏡下で鏡検し電顕での観察部位を特定した。特定部位をブロック上でトリミングした後に (図 7)、 $20\sim 50$ ナノメートル厚の超薄切片を作製し、酢酸ウランと硝酸鉛で電子染色したのち、大型電子顕微鏡 (H-8000、日立製作所) で観察した。



図 7. トルイジン青染色 $1\mu\text{m}$ 厚切り血管切片

C. 研究結果

1) 組織内注入法

リポソーム試料注入部位を詳細に観察すると、破壊された細胞の辺縁部や内部に直径 100 ナノメートル前後の中空円形構造を認めたが、周縁構造は明確ではなかった。また、破壊されたあるいは切断された細胞内小器官との区別が不明瞭であり、観察した構造がリポソームと断定できなかった。一方、細胞間隙にはこのような構造をほとんど認めなかつ

た。

2) 血管内注入法

リポソーム懸濁液 (A1) を注入した標本では血漿内に $100\sim 125$ ナノメートルの中空円形構造を認めた。いずれも電子密度の高い $2\sim 6$ 層の膜を有していた (図 8A, B)。

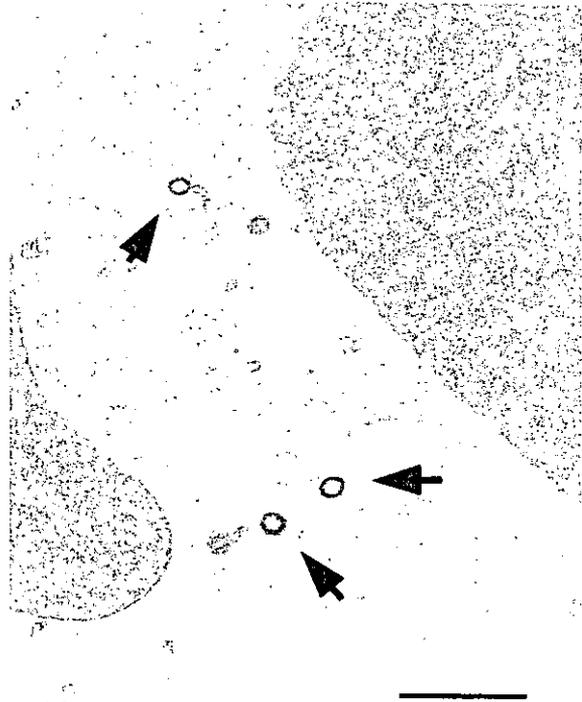


図 8A. 試料 A1 リポソーム (矢印) の電子顕微鏡像 (bar=500nm)



図 8B. 試料 A のリポソーム像。 $2\sim 6$ 層の膜を有している。(同倍率)

リポソームを含まない緩衝液を注入した対照標本ではこのような構造は認めなかった。従って、電子密度の高い膜を有する中空円形構造をリポソームと断定した。通常のリポソーム懸濁液を試料として用いると超薄切標本上での試料観察は効率が悪かったが、超遠心濃縮試