

綜 説

免疫学分野におけるモデル膜リポソームの応用

上 村 敬 一

信州大学医学部付属順応医学研究施設生化学部門

LIPID MODEL MEMBRANES (LIPOSOMES) IN IMMUNOLOGY

Kei-ichi UEMURA

Department of Biochemistry, Institute of Adaptation Medicine,
Faculty of Medicine, Shinshu University

Key words: リポソーム (liposome)
脂質二重膜 (lipid bilayer membrane)
モデル膜 (model membrane)
リン脂質 (phospholipid)
補体 (complement)

モデル膜リポソーム

リポソーム (liposome) とよばれるモデル膜系は14年前 Bangham ら¹⁾により確立され、以来生体膜に関連した多くの現象を再現する有力な研究手段となってきた。一般にリン脂質 (例えば卵黄レシチン) を水に懸濁させると、脂質の二分子膜が水層をはさんで何層も重なりあった構造をもつ閉じた小胞が形成される (図1)。この多重層リポソームは直径が0.1~5 μ m, ネガティブ染色による電顕像では10数層の膜が同心円状に認められる²⁾。これを超音波処理すると直径200~500Åのより小さな一層の二分子膜をもつ一枚膜リポソームが得られる³⁾。小胞内の水層には、種々のイオン、低分子物質、タンパク質などを閉じこめることができる。また最近、核酸、ウイルスなどを封入できる直径0.2~1 μ mの大きな一枚膜リポソームも工夫されている⁴⁾⁵⁾。生体膜を構成している脂質の大部分は二分子膜構造をとっているといわれており、リポソーム膜の物理的性質や透過性に関する性質は、天然膜のモデルとして数多くの知見をもたらしている。モデル膜としての特徴を以下にあげてみよう (図1参照)。

1) リン脂質からなる基本的な膜の中に、他の脂質 (コレステロール, 荷電物質, 糖脂質, 合成脂質など)

を組みこんで、種々の性質をもつリポソームをつくることことができる。組成はある制約内で自由に変えられる。また、膜タンパク質を二分子膜中に組みこむことも可能である。

2) 内部の水層には種々の物質を閉じこめることができ、リポソーム膜はバリアー能をもつカプセルとして働く。保持された物質の膜外への流出から、膜の透過性や膜に作用する種々の物質の作用機序が解析できる。

3) リポソームは、細胞膜と融合したり、細胞に貪食されることによって、二分子膜中あるいは水層内にもっていた物質を細胞に送りこんだり、また生体膜との間で脂質を交換させることも可能である。

これらの性質を利用して組み立てられたリポソームの実験系は、生命科学の全分野にわたっているが、以下に筆者が関心をもっている免疫学分野での研究に限って述べてみたい。一般的な実験法⁶⁾、医学、生物学分野での利用⁷⁾、生体内への酵素、制がん剤などの薬剤の輸送カプセルとしての利用⁸⁾⁹⁾に興味をもたれる方のためには、それぞれについての総説がある。

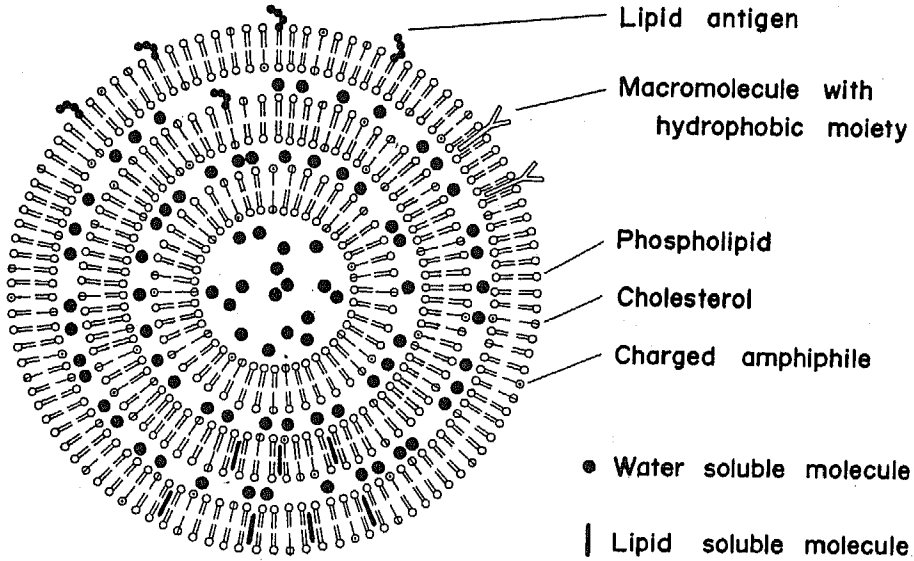


図 1 リポソームの模式図 (Gregoriadis⁸⁾を改変)

補体によるリポソーム膜損傷

免疫学におけるリポソームの利用は、1968年 Kinsky 研究室から報告された免疫溶血反応のモデル膜での再現に始まる¹⁰⁾¹¹⁾。この報告ではヒツジ血球膜から抽出した全脂質で調製したリポソームに、ウサギ抗ヒツジ血球血清と新鮮モルモット血清を加えると、内部にマーカーとして取りこませておいたグルコースの約70%が膜外へ流出することが観察された(リポソーム膜の免疫損傷反応)。また精製したヒト補体を用いた実験で、抗体の結合に続いて補体の classical pathway (C1~C9 成分) が活性化されていることが確認され、C8 までの作用でリポソーム膜からマーカーの流出が始まり、C9 はその速度をはやめるといふ天然膜の損傷と同じ結果が得られた¹²⁾。この場合抗原*はヒツジ血球膜脂質中に存在する Forssman 抗原であったが、単離した Forssman 糖脂質をリン脂質、コレステロール、ジセチルリン酸から成るリポソーム膜に組みこんでも同じ結果を得ることができた¹³⁾。

このように既知の脂質のみから調製したリポソーム

* 単離した脂質には免疫原性がないとされているが、ハプテン化脂質を含むリポソームには免疫原性がある(後述)。ここでは脂質(ハプテン)一般について“抗原”という語を用いることにする。

膜が免疫損傷を受けることは、補体による膜傷害の機構を解析するモデルとして注目された。一方 Lachmann ら¹⁴⁾¹⁵⁾は活性化された補体成分 C56 が C7~9 の存在下で赤血球を溶血させる現象(reactive lysis)をリポソーム膜で再現できることを示した。最近 Cunningham ら¹⁶⁾は糖脂質を含むリポソームが抗原抗体反応の関与しない補体の別経路(alternative pathway)を活性化する例を報告している。

Forssman 糖脂質以外にも種々の抗原がリポソーム膜に組みこまれ、補体依存性膜損傷反応によって抗体との反応性が検討されている(表1)。糖脂質抗原と抗体との反応を解析した例が多いが、血清中の未知抗体の同定、細胞膜から抽出した未知成分の同定などにも用いられる。糖脂質の場合疎水性部分が脂質二分子層内に組みこまれ、抗原決定基である糖鎖部分が外側に出ており、天然膜における存在状態に近いと考えられる。またリン脂質のひとつである phosphatidylethanolamine (PE) のアミノ基を dinitrophenyl (DNP) 基などで置換した合成抗原(図3参照)を用いる系も確立され¹⁷⁾¹⁸⁾、免疫学領域でのリポソームの利用は一層拡大した。

リポソーム内に保持させるマーカー物質とその測定法も、最もよく使われるグルコースの酵素反応による測定¹⁰⁾以外に、蛍光物質の蛍光光度計による測定¹⁹⁾²⁰⁾、スピラベルの電子スピン共鳴による測定^{21)~23)}

表 1

リボソーム膜に組みこまれた抗原

抗 原 ^{a)}	マーカー物質 (文献) ^{b)}
糖 脂 質	
Galactosylceramide	Glucose (37-39, 75) ; [Radioimmunoprecipitation] (26)
Lactosylceramide	Glucose (75)
Trihexosylceramide	Glucose (75)
Gangliosylceramide	4-Methylumbelliferyl phosphate* (76)
Globoside I	Glucose (27, 37) ; Enzyme (32) ; 4-Methylumbelliferyl phosphate* (77) ; [Agglutination] (24)
Forssman glycolipid	Glucose (13, 27, 29, 37) ; ⁸⁶ Rb ⁺ (42) ; 4-Methylumbelliferyl phosphate* (77) ; [Agglutination] (25)
A型活性糖脂質 (A ^b)	4-Methylumbelliferyl phosphate* (77)
Sulfatide	4-Methylumbelliferyl phosphate* (78)
Ganglioside G _{M2}	1-Aminonaphthalene-3, 6, 8-trisulfonate* (79)
Ganglioside G _{M3}	4-Methylumbelliferyl phosphate* (Taketomi and Uemura, 未発表)
Mono-, digalactosyldiglyceride	Glucose (38)
Lipopolysaccharide	Glucose, Enzyme (32) ; Tempocholine chloride** (21)
Lipid A	Glucose (80)
Cholesterol	Fluorescein* (82)
Cardiolipin	[Complement fixation] (81)
Phosphatidylethanolamine (PE) 誘導体^{c)}	
DNP-PE	Glucose (17, 18)
DNP-Cap-PE	Glucose (18) ; Umbelliferyl phosphate* (19) ; ⁸⁶ Rb ⁺ (48)
DNP-(Ala-Gly-Gly)-PE	[Antibody response] (59)
ABA-Tyr-PE	Glucose (51)
Fluorescein-PE	[Antibody response] (49, 53, 55)
Nitroxide-PE	[Complement fixation] (40)
Thyroxine-DNP-PE	Tempocholine bromide** (23)
組織適合抗原	
AgB (rat)	Horseradish peroxidase (74)
H-2, Ia (mouse)	[Radioimmunoassay] (72, 73)
HLA-A, -B	[Cytotoxicity inhibition] (68, 69)
HLA-A, -B ; HLA-D	[Radioimmunoprecipitation] (70)

a) : 単離された物質に限り, 天然膜脂質分画や未同定物質は省いた。

b) : 免疫損傷反応の測定のためにリボソーム内に保持させた物質 (* 蛍光物質, ** spin label)。免疫損傷反応以外の方法は括弧内に示した。本文中に出てくるものを中心にまとめ, 文献的に網羅はしていない。

c) : DNP, 2, 4-dinitrophenyl ; DNP-Cap, 2, 4-dinitrophenyl-ε-aminocaproyl ; ABA-Tyr, mono(p-azobenzenearsonic acid)tyrosyl (図3参照)。

などが開発されている。その他抗体によるリボソームの凝集を吸光度変化により測定する方法²⁴⁾²⁵⁾や, ³H-cholesterol を含むリボソームを用いた radioimmunoprecipitation²⁶⁾によって糖脂質に対する抗体の測定も試みられている。

補体による膜損傷の機構

活性化された補体はどのような機構で細胞膜に損傷を起こすのであろうか。膜タンパク質が関与している可能性は, 脂質のみから構成されるリボソームが補体

による損傷を受けることから否定された。次に膜リン脂質が活性化補体によって分解されて膜損傷が起こる可能性が検討された。Inoue と Kinsky²⁷⁾は ³²P で標識したリン脂質を含むリボソームが抗体、補体の反応で損傷を受け、約60%のグルコースが流出したあとにもリン脂質の分解産物は全く検出できないことを明らかにした。さらにホスホリパーゼの基質になり得ない合成リン脂質類似体を用いて調製したリボソームでも補体による損傷が起こることから、膜損傷には酵素による分解は関与しないことが確認された²⁸⁾。通常リボソームを構成する他の脂質についても、コレステロールを含まないリボソーム膜でも免疫損傷は起こること²⁹⁾、荷電物質は天然膜には存在せず荷電の (+), (-) は補体による損傷反応に影響を及ぼさないこと、抗原は表1にみられるように種々の物質が用いられることなどから、いずれも活性化補体が作用する対象とは考えられない。

これらの事実から Kinsky は、一連の補体活性化により最終段階の C8, C9 タンパク質に立体構造の変化が起こり、疎水性部分が表面に露出して膜内にもぐりこむ結果、脂質二重構造が乱されて膜の透過性が増大するという仮説を提唱した¹³⁾²⁷⁾。一方 Mayer³⁰⁾は活性化補体複合物 (C5b-9) は膜に侵入してドーナツ型の穴を形成するのではないかという考え方をとっている。補体により損傷を受けたリボソーム膜上にはネガティブ染色後電顕で観察すると穴の様な構造が形成されているという報告¹⁵⁾と、これを否定する報告³¹⁾と

がある。Kataoka ら³²⁾の検討によると補体による損傷を受けタンパク質 (分子量 $1\sim 5 \times 10^6$) を流出させたリボソーム膜上にも穴は認められず、マーカー流出と直接関連した穴構造の存在は疑問視された。

活性化された補体は最後の5成分が分子量 1.7×10^6 の複合体 (C5b-9)²⁾を形成して、これが膜に直接作用することが知られている³³⁾。精製されたこの複合体とリボソーム膜との相互作用に関して最近2つの報告がある。Bhakdi と Traum-Jensen³⁴⁾は精製した C5b-9 をヒツジ血球膜脂質に加え、可溶化に用いたデオキシコール酸を透析で除く方法により C5b-9 をリボソーム膜に導入した。電顕による観察で直径 10 nm 高さ 15nm の中空、円筒状の C5b-9 が膜に垂直に配置しており、この C5b-9 複合体をもつリボソームでは内部に染色液が浸入しているが、C5b-9 複合体を含まないリボソームの内部はネガティブ染色で染まらないことを示した。このことから彼らは C5b-9 が膜を貫通する穴として働くとする Mayer の説を支持している (図2 a)。

これに対して Podack ら³⁵⁾は、同様の方法でレンチンのリボソームに導入した C5b-9 は自然に膜から離れる傾向があり、CsCl 密度勾配遠心で分離すると C5b-9 はリン脂質との複合体として存在し、脂質二重膜構造は電顕的に認められないとしている。彼らは C5b-9 がリン脂質と混合ミセルをつくる結果、隣接する脂質二重層に再配列を生じ channel が形成されるというモデルを考えている (図2 b)。

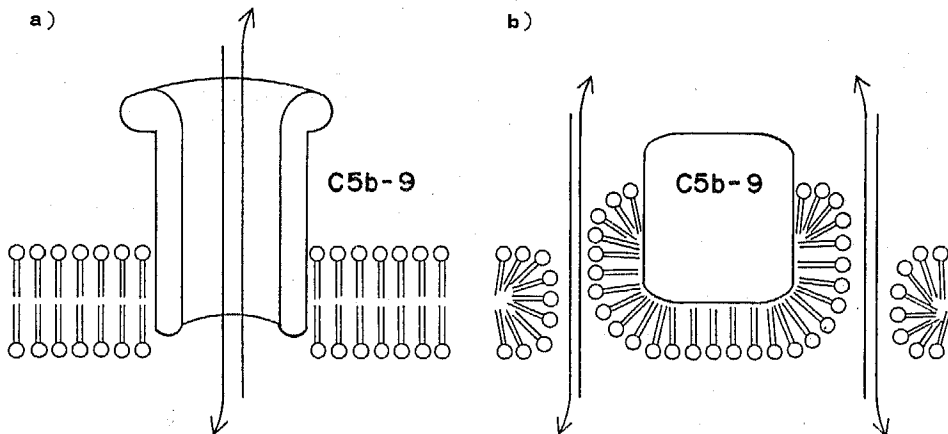


図 2 補体による膜損傷の機構

- a) Protein channel model (Bhakdi と Traum-Jensen³⁴⁾による)
- b) Protein-phospholipid micelle model (Podack ら³⁵⁾による)

fracture および freeze-etching 法では膜を貫通する穴構造は見つからないという報告³⁶⁾は後者のモデルを支持している。補体による膜損傷の真の機構がどちらのモデルに近いのか、さらに検討を重ねなければならぬであろう。

膜脂質の組成と膜の流動性

リポソームは既知の構成成分からその組成を自由に变えてつくり出すことができるので、抗体、補体による膜損傷に与える種々の因子の影響が調べられている。

膜の電荷：膜に電荷があると脂質二重層どうしが静電的に反発し、リポソーム水層内に保持されるマーカー量をふやすことができる。荷電は (+), (-) いずれでも免疫損傷反応には影響しない¹³⁾。

抗原密度：免疫損傷反応が起こるにはリポソーム膜に一定量以上の抗原が存在する必要がある¹³⁾。赤血球の溶血とは異なり、リポソーム膜では "one hit theory" が成立せず、膜上の抗原抗体複合体の量に応じマーカーの流出が見られる³⁷⁾。これはリポソームでは膜透過性の変化によるマーカーの拡散のみで、赤血球の場合のように浸透圧変化による膜崩壊がないためと考えられる。

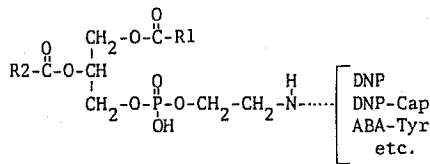
抗原の疎水性：リポソーム膜に抗原を組みこむには一定の疎水性部分が必要である。例えば DNP-PE (図3) の2個の脂肪酸鎖のうち1個を除いて DNP-lyso-PE としてもリポソーム膜に組みこめるが、2個とも除いてしまうと感作できない¹⁷⁾。一方 DNP-lyso-PE にはすでに形成されたリポソーム膜にあとから加えた場合脂質二重層に入りこむ性質がある (passive sensitization)¹⁷⁾。

リン脂質のアシル基：Alving ら³⁸⁾はガラクトセレブロシドを抗原としたリポソームの免疫損傷反応は、リン脂質の脂肪酸が短いほど起こり易いことを数種の合成レシチンを用いて示し、リン脂質の脂肪酸が長いほど抗原決定基が膜内に埋って、抗体との結合が妨げられるためと考えた。同じリン脂質に組みこんだ場合ガラクトセレブロシドの脂肪酸が長い方が抗体とよく反応することも、同じ理由であるとしている³⁹⁾。脂質二重膜から抗原決定基が十分突き出していない場合に抗体との結合が立体的に制限される可能性はハプテン化リン脂質の場合にも認められている¹⁸⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾。一方、活性化補体の最終産物が膜に侵入し損傷を与える段階でも、リン脂質の脂肪酸が長いほどマーカーの流出が少なく、膜の厚さが膜損傷部位の形成に影響する可能

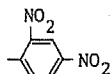
性も示唆されている⁴²⁾。

膜の流動性：膜に一定以上の流動性がないと補体による膜損傷は起こらないことが Kitagawa と Inoue によって明らかにされている²⁹⁾。コレステロールを含まない合成レシチン (C16:0) リポソームの活性化補体による損傷は、15°C では起こらず温度を上げていくにつれマーカーの流出が起こる。しかしリポソームにコレステロールを加えて膜の流動性を高めてやるとこの温度依存性は見られなくなる。この現象はメチル化アルブミンによるリポソーム膜崩壊と平行することから、補体最終産物が膜の中に入りこむのに一定の流動性が必要なのであろうと考えられた。またスピンドルしたガラクトセレブロシドを用いた検討では、抗原が膜上で一定の分散状態をとれるような膜の流動性が、抗体との結合段階にも必要であることが示されている⁴⁰⁾。Brület と McConnell も膜の流動性、すなわちリポソーム膜上の抗原の可動性が補体結合反応には必要であり、特に抗原密度が低い場合に膜の流動性の影響が大きいことを示している⁴⁰⁾。さらに彼らは、リポソーム膜上の抗原への IgG 抗体と補体 C1q の結

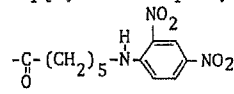
Phosphatidylethanolamine (PE)



DNP [2,4-dinitrophenyl]-PE



DNP-Cap [2,4-dinitrophenyl-ε-aminocaproyl]-PE



ABA-Tyr [mono (p-aminobenzenearsonic acid) tyrosyl]-PE

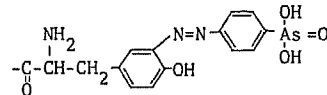


図3 ハプテン化リン脂質の化学構造 (R1, R2: 脂肪酸, R2 を除いたものを lyso-PE, R1 と R2 を除いたものを glycerophosphorylethanolamine という。)

合の段階は、膜の流動性の影響を受けないという結論を得ている⁴⁴⁾。抗体、補体による膜損傷の過程には、抗原と抗体の結合、C1の結合、膜上でのC423の形成、最終産物C5b-9の侵入など多くの段階が関与しており³⁹⁾、それぞれに対する影響をさらに分析していかねばならないだろう。

細胞によるリボソーム膜損傷

特異抗体と正常リンパ球中のK細胞とによる標的細胞に対する細胞障害反応 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), あるいは感作されたTリンパ球による標的細胞破壊における膜損傷の機構を解明するモデル系をつくることができるだろうか。HenkartとBlumenthal⁴⁵⁾はDNP-PEを抗原とした脂質二分子膜に、ウサギ抗trinitrophenyl IgGとヒトリンパ球を作用させると膜の電気伝導度が増加する現象を見出した。さらに抗体のF(ab)₂部分や、Fc receptorをもつ細胞を除いたリンパ球では効果がなく、抗体のFc部分を介してリンパ球が膜に結合することが確かめられた。その結果膜にイオン透過性のchannelができ、これが膜傷害の第一段階ではないかと推論している。その後cardiolipin⁴⁶⁾、DNP-PE⁴⁷⁾を抗原としたリボソームとマウスリンパ球を用いる系でADCCを再現できるという報告がある。前者では18時間反応後にリボソームから約70%のマーカ (³H-グルコース)が流出するが、抗体のみを加えた対照でも50%近くのマーカが流出し、リボソーム膜の安定性に問題がある。後者の実験系では蛍光物質を閉じこめたリボソームを用い、IgG抗体を介してリンパ球に結合したリボソームのみを分離して、8~10時間後に35~50%のマーカが流出してくることを見ている。抗体のみ、あるいはリンパ球のみと反応させた対照でのマーカ流出は10%以下であった。この場合effector細胞を分析するとナイロンウール非附着性、Thy-1⁻、Fc⁺のK細胞の性質をもつものであるという。しかしOzatoら⁴⁸⁾の報告では、DNP-Cap-PE (図3)を抗原としたリボソームは抗DNP IgG及びヒトリンパ球とを反応させると損傷を受け⁸⁶Rb⁺の膜外への流出がみられるが、これはリンパ球のADCC活性と平行しない。Fc⁻リンパ球あるいはマウス胸腺細胞によっても、同程度のマーカがリボソームから流出した。

補体による膜損傷の場合と異なり、細胞の関与する膜損傷反応をリボソームを用いて解析するには多くの

問題点がある。例えばリボソームは非特異的にリンパ球などの細胞に吸着したり、融合してDNP-Cap-PE抗原を細胞膜へとtransferさせることも知られている⁴⁹⁾。細胞膜との相互作用はリボソーム膜の組成、形状などに大きく影響されるので、今後の検討によってより非特異反応の少ない、安定なリボソームが得られれば、細胞による膜損傷の機構をさぐることも可能であろう。

リボソーム抗原に対する免疫応答

脂質はハプテン活性をもつが免疫原性はないとされておき、細胞膜の糖脂質抗原など脂質抗原に対する抗体は、脂質ミセルとcarrierタンパク質を混ぜて免疫することによって得られている。Uemuraら⁴⁹⁾はDNP化リン脂質(DNP-Cap-PE)を組みこんだリボソームを、Freund完全アジュバントと共にモルモットに免疫すると抗DNP抗体が産生されることを見出した。リボソームに組みこまないDNP-Cap-PEに対する抗体産生ははるかに弱く、抗原を含まないリボソームを共存させても抗体産生は増強されなかった。またDNP-Cap-PEの脂肪酸を除いていくと、リボソーム膜に組みこめるDNP-Cap-lyso-PEは同程度の抗体産生を起こしたが、水溶性のDNP-Cap-glycerophosphorylethanolamineでは抗体産生がみられなかった(図3参照)。従って抗原がリボソーム膜に組みこまれていることが必要であり、リボソーム構造はアジュバント中でも保たれていると考えられる。プラーク形成細胞のハプテンによる阻止および抗DNP抗体の等電点電気泳動の結果から、産生される抗体のpopulationはかなり均一であることがわかっている⁵⁰⁾。

DNP-Cap-PEに対しては細胞性免疫応答は認められないが⁴⁹⁾、mono(p-azobenzene-earsonic acid) tyrosine (ABA-Tyr) 化PE (図3)を免疫原とするとモルモットに細胞性免疫(遅延型過敏症)を起こすことが可能である⁵¹⁾。ABA-Tyrは細胞性免疫応答のみを起こす抗原であるが、PEと結合させることにより抗体産生も同時に誘導できることが明らかになった。ABA-Tyr-PEをリボソームに組みこむと抗体産生は増強されるが、細胞性免疫応答は変化しない。またDNP-Cap-PEとABA-Tyr-PEを共に組みこんだhybridリボソームで免疫すると、ABA-Tyr-PEは抗DNP抗体産生を増強させるが、DNP-Cap-PEは抗ABA抗体産生を完全に阻止する⁵²⁾⁵³⁾。この現象は両抗原が同じリボソームに組みこまれているときにみ

られ、それぞれの抗原のみを組みこんだリポソームを混ぜて動物を免疫しても効果がないという興味ある知見が得られている。

リポソーム自体には免疫原性がなく、抗体産生⁴⁹⁾も細胞性免疫応答⁵¹⁾も認められないが、組みこんだハプテン化脂質の carrier として働くこと、また脂質組成、抗原の種類や密度を自由に変えられることなどに、リポソーム抗原の特徴がある。さらに Yasuda ら⁵⁴⁾によってマウスでの実験系が確立され一層解析が進められた。彼らは DNP-Cap-PE が T 細胞非依存性抗原であることをマウスで確かめ、また純系マウス間には免疫応答に差があることも観察している⁵⁵⁾。B 細胞に対する mitogen である lipid A (リポ多糖 LPS の脂質部分) を抗原と共にリポソーム膜に組みこむと抗体産生細胞は著しく増加するが、両者を別々のリポソームに組みこんだものを混ぜて免疫しても効果はない⁵⁶⁾。DNP-Cap-PE リポソームをマウス腹腔内に注射し、抗 DNP 抗体産生細胞をプラーク形成法で調べると、リポソームを構成するリン脂質の種類の影響が大きい⁵⁴⁾⁵⁷⁾。すなわちリン脂質の相転移温度が高いほど抗体産生が強いという現象がみられ、リポソーム膜の流動性が免疫原性に影響することが示唆された。

リポソームの荷電、コレステロール含量は *in vivo* では抗体産生に影響を及ぼさないことが示されている⁵⁷⁾。しかし最近確立された *in vitro* の系では、リン脂質の種類によってはコレステロールを加えると抗体産生が高まること明らかになった⁵⁸⁾。また *in vitro* での検討でも DNP-Cap-PE が T 細胞非依存性抗原であることが確認されている⁵⁸⁾。すなわち抗 Thy-1 血清と補体で処理した脾細胞あるいはヌードマウスの脾細胞でも、明らかに抗体産生が観察された。マクロファージ依存性はヒツジ赤血球に対する抗体産生とくらべると弱いという。リポソーム膜上の抗原密度 (epitope density) を変えると *in vivo*⁵⁵⁾、*in vitro*⁵⁸⁾ ともにリン脂質に対して約 5% の量で、抗体産生は最大に達する。

以上のことから、一定の抗原密度と膜の流動性が、B 細胞レセプターへの結合と活性化に必要であろうと考えられる。Dancy ら⁴¹⁾は DNP 基と PE の間に種々の長さの spacer をはさんだ一連の DNP 化 PE 誘導体を合成してリポソームに組みこみ、マウスでの免疫応答を検討したところ炭素数 3~6 の spacer をもったときが至適であった。免疫損傷反応においてもまた、炭素数 3~6 の spacer をもった DNP 化 PE が

抗 DNP 抗体との反応性が最も高い。van Houte ら⁵⁹⁾は spacer として tripeptide をもつハプテン化 PE を用いた系で、抗原の T 細胞非依存性、抗原密度の影響など上記の結果を確認している。ハプテン化リポソームに対する免疫応答の実験系は多くの利点をあわせもち、今後 B 細胞活性化の機構を解明していく上で役立つものと思われる。

免疫応答の増強と抑制

リポソームには内部に閉じこめたタンパク質に対する抗体産生を高めるアジュバント活性がある。(一)荷電をもつリポソーム内に diphtheria toxoid を入れてマウスを免疫すると、抗原単独の場合にくらべて一次応答、二次応答ともより強い抗体産生が認められた⁶⁰⁾。静脈内、皮下、筋肉内注射のいずれでも同じ結果であったが、(+)荷電をもつリポソームでは効果がみられない。しかしウシ血清アルブミンを抗原とした追試⁶¹⁾では (+) のリポソームも同じく有効であり、むしろリン脂質の種類、コレステロール含量がアジュバント活性に影響を与えるという結果が得られた。抗原を含まないリポソームを free の抗原と共存させて免疫しても弱いアジュバント効果は認められるが、リポソーム内部に抗原を取りこませた方がはるかに強い抗体産生が認められる⁶²⁾。一方リポソーム内に閉じこめた抗原は、free の抗原にくらべて Arthus 反応を起こしにくいことが知られている⁶³⁾。

リン脂質、コレステロール、荷電物質から作成したリポソーム自体には抗原性はなく⁴⁹⁾毒性もないことから、ヒトに用いても安全で効果的であろうといわれている。しかしリポソーム膜の荷電、流動性の影響などの詳細な検討は今後の問題であろう。最近 Manesis ら⁶⁴⁾が、B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs 抗原) を含むリポソームを作成してモルモットを免疫すると、HBs 抗原単独あるいは百日咳ワクチンとともに免疫した場合とくらべて、はるかに強い抗体産生と細胞性免疫を起こさせることを明らかにしたことは注目される。

(+) の荷電をもつリポソームが細胞表面に結合し易いことを利用して、抗ウイルス抗体を含むリポソームを培養細胞表面に結合させるとウイルスの感染が阻止される⁶⁵⁾。また抗リンパ球抗体と immune RNA を含むリポソームを正常モルモットリンパ球と反応させると、syngeneic な肝がん細胞に対する細胞障害性を誘導できるという報告もある⁶⁶⁾。いずれの場合も

抗体の一部がリポソーム表層に抗原と結合できる形で存在すると考えられているが、直接的な証明はない。

抗原特異的な抗体産生の抑制についての Schwenk ら⁶⁷⁾の知見は興味深い。DNP 化卵白アルブミン (DNP-OA) に対するマウスの IgE 抗体産生は、正常マウスまたはあらかじめ IgE 抗体を産生しているマウスに DNP-Cap-PE を組みこんだリポソームを投与することにより、抗 DNP IgE 産生が著しく減少し一方抗 OA IgE は影響を受けない。この抑制の機構について彼らは細胞移入実験の結果から、B 細胞レセプターの blocking が原因ではなく、特異的抑制 T 細胞によるものらしいことを示唆している。リポソームには DNP 以外のハプテンを組みこむことが可能であり、抗原特異的な抗体産生抑制の手段として一般化できるかもしれない。またリポソーム内部に保持させた活性物質を選択的に抗原特異的リンパ球に輸送する手段としても、抗原を組みこんだリポソームを用いる可能性が考えられる。

組織適合抗原の導入

最近、組織適合抗原をリポソーム膜に組みこむことが試みられている。リンパ球膜より可溶化、精製された組織適合抗原とレンチンをコール酸などの界面活性剤といったん共存させておき、次に透析などによりコール酸を除いてゆくとリポソームが形成される。この方法によりヒト (HLA)⁶⁸⁾⁻⁷¹⁾、マウス (H-2, Ia 抗原)⁷²⁾⁷³⁾、ラット (AgB)⁷⁴⁾の各抗原を導入したりポソームを得ることができる。加えた組織適合抗原の大部分はリポソーム膜の表面から外側に向けた形で組みこまれており⁶⁸⁾⁶⁹⁾⁷¹⁾、抗原活性を保った状態にある⁶⁸⁾⁻⁷⁴⁾。高濃度の塩や EDTA によってでは抗原は溶出されず、パイン処理で遊離してくること⁷³⁾、予めパイン処理した抗原はリポソーム膜に組みこまれないこと⁶⁹⁾⁷⁰⁾、HLA タンパク質の C 末端側を切るトリプシンはリポソーム膜上の抗原に作用しないこと⁶⁸⁾などから、組織適合抗原タンパク質は細胞膜にある場合と同じ方向性をもって、リポソームの脂質二分子膜中に存在することが確認された。Curman ら⁷²⁾は高度に精製したマウスの H-2 抗原と Ia 抗原をそれぞれリポソーム膜に組みこんで mixed lymphocyte reaction の二次反応を刺激する抗原として用い得ることを示した。また Engelhard ら⁷¹⁾は HLA-A および -B 抗原を含むリポソームを感作されたマウス脾細胞に加えて

培養し、細胞障害性 T リンパ球の誘導に成功している。この場合リポソーム膜上の HLA 分子の密度が重要で、直径 0.1 μ m のリポソームに約 20 分子が存在するとき最大の反応が得られるという。Klareskog ら⁷⁰⁾は組織適合抗原が何らかの形で外来抗原と相互作用するのではないかとの考え方から、HLA-A, B 抗原あるいは HLA-D 抗原を組みこんだリポソームを調製して、これらが *Neisseria catarrhalis* などいくつかの細菌に結合すること、HLA の heavy 鎖や HLA-D に対する抗体 Fab によりこの結合が阻止されることを明らかにした。これらの例にみられるように、リポソームを用いたモデル系は組織適合抗原や Ia 抗原の免疫応答における役割の分子レベルでの解析に、有力な手段となる可能性をもっているように思われる。

おわりに

免疫学分野に話を限って簡潔にまとめてみようと思ったものの、その難しさ、リポソームを利用した研究の多彩さをあらためて知らされた。単純化されたモデル系に限界はあるにせよ、現象の解析には不可欠なものであろう。リポソームは特殊な装置もいらず、どこかの研究室でも容易につくりだせる“合成された天然膜”である。今後さらに多くの研究に利用されていくことが期待される。

文 献

- 1) Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. molec. Biol.*, 13: 238-252, 1965
- 2) Bangham, A. D. and Horne, R. W.: Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. molec. Biol.*, 8: 660-668, 1964
- 3) Huang, C.: Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8: 344-352, 1969
- 4) Papahadjopoulos, D., Vail, W. J., Jacobson, K. and Poste, G.: Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochim. biophys. Acta*, 394: 483-491, 1975

- 5) Papahadjopoulos, D. and Vail, W. J. : Incorporation of macromolecules within large unilamellar vesicles (LUV). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 308 : 259-267, 1978
- 6) 井上圭三 : リボソーム. 生化学実験講座 3, 脂質の化学, 日本生化学会編, pp. 605-621, 東京化学同人, 東京, 1974
- 7) Papahadjopoulos, D. (ed.) : Liposomes and their uses in biology and medicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 308 : 1-462, 1978
- 8) Gregoriadis, G. : The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *New Engl. J. Med.*, 295 : 704-710, 765-770, 1976
- 9) Finkelstein, M. and Weissmann, G. : The introduction of enzymes into cells by means of liposomes. *J. Lipid Res.*, 19 : 289-303, 1978
- 10) Haxby, J. A., Kinsky, C. B. and Kinsky, S. C. : Immune response of a liposomal model membrane. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 61 : 300-307, 1968
- 11) Alving, C. R., Kinsky, S. C., Haxby, J. A. and Kinsky, C. B. : Antibody binding and complement fixation by a liposomal model membrane. *Biochemistry*, 8 : 1582-1587, 1969
- 12) Haxby, J. A., Götze, O., Müller-Eberhard, H. J. and Kinsky, S. C. : Release of trapped marker from liposomes by the action of purified complement components. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 64 : 290-295, 1969
- 13) Kinsky, S. C., Haxby, J. A., Zopf, D. A., Alving, C. R. and Kinsky, C. B. : Complement-dependent damage to liposomes prepared from pure lipids and Forssman hapten. *Biochemistry*, 8 : 4149-4158, 1969
- 14) Lachmann, P. J. Munn. E. A. and Weissmann, G. : Complement-mediated lysis of liposomes produced by the reactive lysis procedure. *Immunology*, 19 : 983-986, 1970
- 15) Hesketh, T. R., Dourmashkin, R. R., Payne, S. N., Humphrey, J. H. and Lachmann, P. J. : Lesions due to complement in lipid membranes. *Nature*, 233 : 620-623, 1971
- 16) Cunningham, C. M., Kingzette, M., Richards, R. L., Alving, C. R., Lint, T. F. and Gewurz, H. : Activation of human complement by liposomes : A model for membrane activation of the alternative pathway. *J. Immunol.*, 122 : 1237-1242, 1979
- 17) Uemura, K. and Kinsky, S. C. : Active vs. passive sensitization of liposomes toward antibody and complement by dinitrophenylated derivatives of phosphatidylethanolamine. *Biochemistry*, 11 : 4085-4094, 1972
- 18) Six, H. R., Uemura, K. and Kinsky, S. C. : Effect of immunoglobulin class and affinity on the initiation of complement-dependent damage to liposomal model membranes sensitized with dinitrophenylated phospholipids. *Biochemistry*, 12 : 4003-4011, 1973
- 19) Six, H. R., Young, W. W., Jr., Uemura, K. and Kinsky, S. C. : Effect of antibody-complement on multiple vs. single compartment liposomes. Application of a fluorometric assay for following changes in liposomal permeability. *Biochemistry*, 13 : 4050-4058, 1974
- 20) Smolarsky, M., Teitelbaum, D., Sela, M. and Gitler, C. : A simple fluorescent method to determine complement-mediated liposome immune lysis. *J. Immunol. Meth.*, 15 : 255-265, 1977
- 21) Humphries, G. K. and McConnell, H. M. : Immune lysis of liposomes and erythrocyte ghosts loaded with spin label. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 71 : 1691-1694, 1974
- 22) Wei, R., Alving, C. R., Richards, R. L. and Copeland, E. S. : Liposome spin immunoassay : A new sensitive method for detecting lipid substances in aqueous media. *J. Immunol. Meth.*, 9 : 165-170, 1975
- 23) Hsia, J. C. and Tan, C. T. : Membrane immunoassay : Principle and application of spin membrane immunoassay. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 308 : 139-148, 1978
- 24) Hamers, M. N., Donker-Koopman, W. E., Reijngoud, D. -J., Schram, A. W. and Tager, J. M. : An optical method for the detection and quantitation of antibodies to glyco-

- sphingolipids and other antigens. *Immunochemistry*, 15 : 97-105, 1978
- 25) Uemura, K., Yuzawa, M. and Taketomi, T. : Immunochemical studies of lipids. V. Effect of modified hydrophobic moiety on immunogenicity and immunologic reactivity of Forssman glycolipid. *Japan. J. exp. Med.*, 49 : 1-8, 1979
- 26) Fry, J. M., Lisak, R. P., Manning, M. C. and Silberberg, D. H. : Serological technique for detection of antibody to galactocerebroside. *J. Immunol. Meth.*, 11 : 185-193, 1976
- 27) Inoue, K. and Kinsky, S. C. : Fate of phospholipids in liposomal model membranes damaged by antibody and complement. *Biochemistry*, 9 : 4767-4776, 1970
- 28) Kinsky, S. C., Bensen, P. P. M., Kinsky, C. B., van Deenen, L. L. M. and Rosenthal, A. F. : Preparation of immunologically responsive liposomes with phosphonyl and phosphinyl analogs of lecithin. *Biochim. biophys. Acta*, 233 : 815-819, 1971
- 29) Kitagawa, T. and Inoue, K. : Effect of temperature on immune damage of liposomes prepared in the presence and absence of cholesterol. *Nature*, 254 : 254-256, 1975
- 30) Mayer, M. M. : Mechanism of cytolysis by complement. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 69 : 2954-2958, 1972
- 31) Knudson, K. C., Bing, D. H. and Kater, L. : Quantitative measurement of guinea pig complement with liposomes. *J. Immunol.*, 106 : 258-265, 1971
- 32) Kataoka, T., Williamson, J. R. and Kinsky, S. C. : Release of macromolecular markers (enzymes) from liposomes treated with antibody and complement. An attempt at correlation with electron microscopic observations. *Biochim. biophys. Acta*, 298 : 158-179, 1973
- 33) Müller-Eberhard, H. J. : Complement. *Ann. Rev. Biochem.*, 44 : 697-724, 1975
- 34) Bhakdi, S. and Traum-Jensen, J. : Molecular nature of the complement lesion. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 75 : 5655-5659, 1978
- 35) Podack, E. R., Biesecker, G. and Müller-Eberhard, H. J. : Membrane attack complex of complement : Generation of high-affinity phospholipid binding sites by fusion of five hydrophilic plasma proteins. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 76 : 897-901, 1979
- 36) Iles, G. H., Seeman, P., Naylor, D. and Cinader, B. : Membrane lesions in immune lysis. Surface rings, globule aggregates, and transient openings. *J. cell Biol.*, 56 : 528-539, 1973
- 37) Inoue, K., Kataoka, T. and Kinsky, S. C. : Comparative response of liposomes prepared with different ceramide antigens to antibody and complement. *Biochemistry*, 10 : 2574-2581, 1971
- 38) Alving, C. R., Fowble, J. W. and Joseph, K. C. : Comparative properties of four galactosyl lipids as antigens in liposomes. *Immunochemistry*, 11 : 475-481, 1974
- 39) Alving, C. R. and Richards, R. L. : Immune reactivities of antibodies against glycolipids — I. Properties of anti-galactocerebroside antibodies purified by a novel technique of affinity binding to liposomes. *Immunochemistry*, 14 : 373-381, 1977
- 40) Brûlet, P. and McConnell, H. M. : Structural and dynamical aspects of membrane immunology using model membranes. *Biochemistry*, 16 : 1209-1218, 1977
- 41) Dancy, G. F., Isakson, P. C. and Kinsky, S. C. : Immunogenicity of liposomal model membranes sensitized with dinitrophenylated phosphatidylethanolamine derivatives containing different length spacer. *J. Immunol.*, 122 : 638-642, 1979
- 42) Shin, M. L., Paznekas, W. A. and Mayer, M. M. : On the mechanism of membrane damage by complement : The effect of length and unsaturation of the acyl chains in liposomal bilayers and the effect of cholesterol concentration in sheep erythrocyte and liposomal membranes. *J. Immunol.*, 120 : 1996-

2002, 1978

- 43) 鈴木多美子, 井上圭三, 野島庄七, 内海英雄: リポソーム膜上における糖脂質の存在状態. 脂質生化学研究, 21: 102-105, 1979
- 44) Parce, J. W., Henry, N. and McConnell, H. M.: Specific antibody-dependent binding of complement component C1q to hapten-sensitized vesicles. Proc. nat. Acad. Sci., 75: 1515-1518, 1978
- 45) Henkart, P. and Blumenthal, R.: Interaction of lymphocytes with lipid bilayer membranes: A model for lymphocyte-mediated lysis of target cells. Proc. nat. Acad. Sci., 72: 2789-2793, 1975
- 46) Juy, D., Billecocq, A., Faure, M. and Bona, C.: Damage of liposomes in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Scand. J. Immunol., 6: 607-614, 1977
- 47) Geiger, B. and Schreiber, A. D.: The use of antibody-coated liposomes as a target cell model for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Clin. Exp. Immunol., 30: 149-154, 1979
- 48) Ozato, K., Ziegler, H. K. and Henney, C. S.: Liposomes as model membrane systems for immune attack. II. The interaction of complement and K cell populations with immobilized liposomes. J. Immunol., 121: 1383-1388, 1978
- 49) Uemura, K., Nicolotti, R. A., Six, H. R. and Kinsky, S. C.: Antibody formation in response to liposomal model membranes sensitized with N-substituted phosphatidylethanolamine derivatives. Biochemistry, 13: 1572-1578, 1974
- 50) Uemura, K., Claflin, J. L., Davie, J. M. and Kinsky, S. C.: Immune response to liposomal model membranes: Restricted IgM and IgG anti-dinitrophenyl antibodies produced in guinea pigs. J. Immunol., 114: 958-961, 1975
- 51) Nicolotti, R. A. and Kinsky, S. C.: Immunogenicity of liposomal model membranes sensitized with mono(p-azobenzene-*ortho*-carboxylic acid)tyrosylphosphatidylethanolamine derivatives. Antibody formation and delayed hypersensitivity reaction. Biochemistry, 14: 2331-2337, 1975
- 52) Kochibe, N., Nicolotti, R. A., Davie, J. M. and Kinsky, S. C.: Stimulation and inhibition of anti-hapten responses in guinea pigs immunized with hybrid liposomes. Proc. nat. Acad. Sci., 72: 4582-4586, 1975
- 53) Nicolotti, R. A., Kochibe, N. and Kinsky, S. C.: Comparative immunogenic properties of N-substituted phosphatidylethanolamine derivatives and liposomal model membranes. J. Immunol., 117: 1898-1902, 1976
- 54) Yasuda, T., Dancey, G. F. and Kinsky, S. C.: Immunogenicity of liposomal model membranes in mice: Dependence of phospholipid composition. Proc. nat. Acad. Sci., 74: 1234-1236, 1977
- 55) Yasuda, T., Dancey, G. F. and Kinsky, S. C.: Immunogenic properties of liposomal model membranes in mice. J. Immunol., 119: 1863-1867, 1977
- 56) Dancey, G. F., Yasuda, T. and Kinsky, S. C.: Enhancement of liposomal model membrane immunogenicity by incorporation of lipid A. J. Immunol., 119: 1868-1873, 1977
- 57) Dancey, G. F., Yasuda, T. and Kinsky, S. C.: Effect of liposomal model membrane composition on immunogenicity. J. Immunol., 120: 1109-1113, 1978
- 58) 保田立二, 多田隈卓史, Kinsky, S. C., Pierce, C. W.: ハプテン化リポソーム人工膜抗原を用いた In vitro での B 細胞活性化機構の研究. 日本疫学会総会記録, 8: 171-172, 1978
- 59) van Houte, A. J., Snippe, H. and Willers, J. M. N.: Characterization of immunogenic properties of haptenated liposomal model membranes in mice. Immunology, 37: 505-514, 1979
- 60) Allison, A. C. and Gregoriadis, G.: Liposomes as immunological adjuvants. Nature, 252: 252, 1974
- 61) Heath, T. D., Edwards, D. C. and Ryman, B.

- E.: The adjuvant properties of liposomes. *Biochem. Soc. Trans.*, 4 : 129-133, 1976
- 62) van Rooijen, N. and van Nieuwmegen, R.: Liposomes in immunology: The immune response against antigen-containing liposomes. *Immunol. Commun.*, 6 : 489-498, 1977
- 63) Gregoriadis, G. and Allison, A. C.: Entrapment of proteins in liposomes prevents allergic reactions in pre-immunized mice. *FEBS Lett.*, 45 : 71-74, 1974
- 64) Manesis, E. M., Cameron, C. H. and Gregoriadis, G.: Hepatitis B surface antigen-containing liposomes enhance humoral and cell-mediated immunity to the antigen, *FEBS Lett.*, 102 : 107-111, 1979
- 65) Magee, W. E. and Miller, O. V.: Liposomes containing antiviral antibody can protect cells from virus infection. *Nature*, 235 : 339-341, 1972
- 66) Magee, W. E., Cronenberger, J. H. and Thor, D. E.: Marked stimulation of lymphocyte-mediated attack on tumor cells by target-directed liposomes containing immune RNA. *Cancer Res.*, 38 : 1173-1176, 1978
- 67) Schwenk, R., Lee, W. Y. and Schon, A. H.: Specific suppression of anti-hapten reaginic antibody titers with hapten-coated liposomes. *J. Immunol.*, 120 : 1612-1615, 1978
- 68) Engelhard, V. H., Guild, B. C., Helenius, A., Terhorst, C. and Strominger, J. L.: Reconstitution of purified detergent-soluble HLA-A and HLA-B antigens into phospholipid vesicles. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 75 : 3230-3234, 1978
- 69) Turner, M. J. and Sanderson, A. R.: The preparation of liposomes bearing human (HLA) transplantation antigens. *Biochem. J.*, 171 : 505-508, 1978
- 70) Klareskog, L., Banck, G., Forsgren, A. and Peterson, P. A.: Binding of HLA antigen-containing liposomes to bacteria. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 75 : 6197-6201, 1978
- 71) Engelhard, V. H., Strominger, J. L., Mescher, M. and Burakoff, S.: Induction of secondary cytotoxic T lymphocytes by purified HLA-A and HLA-B antigens reconstituted into phospholipid vesicles. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 75 : 5688-5691, 1978
- 72) Curman, B., Östberg, L. and Peterson, P. A.: Incorporation of murine MHC antigens into liposomes and their effect in the secondary mixed lymphocyte reaction. *Nature*, 272 : 545-547, 1978
- 73) Littman, D. R., Cullen, S. E. and Schwartz, B. D.: Insertion of Ia and H-2 alloantigens into model membranes. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 76 : 902-906, 1979
- 74) Willoughby, E. M., Turner, M. J. and Sanderson, A. R.: Incorporation of rat histocompatibility (AgB) antigens into liposomes, and their susceptibility to immune lysis. *Europ. J. Immunol.*, 8 : 628-634, 1978
- 75) Alving, C. R. and Richards, R. L.: Immune reactivities of antibodies against glycolipids — II. Comparative properties, using liposomes, of purified antibodies against mono-, di- and trihexosyl ceramide haptens. *Immunochemistry*, 14 : 383-389, 1977
- 76) 上村敬一, 湯沢松子, 武富保: モルモット赤血球膜糖脂質に対する抗体 — Anti-ganglioside ceramide. *脂質生化学研究*, 20 : 351-354, 1978
- 77) Young, W. W., Jr., Hakomori, S. and Levine, P.: Characterization of anti-Forsman (anti-Fs) antibodies in human sera: Their specificity and possible changes in patients with cancer. *J. Immunol.*, 123 : 91-96, 1979
- 78) Uemura, K., Kunishita, T. and Taketomi, T.: Reactions of anti-sulfatide antibodies with sulfatide in natural and artificial membranes. In "Glycoconjugates", Schauer, R., Boer, P., Buddecke, E., Kramer, M. F., Vliegthart, J. F. G. and Wiegandt, H. (eds.), pp. 522-523, G. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1979
- 79) Geiger, B. and Smolarsky, M.: Immunochemical determination of ganglioside GM₂ by inhibition of complement-dependent liposome

- lysis. *J. Immunol. Meth.*, 17 : 7-19, 1977
- 80) Kataoka, T., Inoue, K., Galanos, C. and Kinsky, S. C. : Detection and specificity of lipid A antibodies using liposomes sensitized with lipid A and bacterial lipopolysaccharides. *Europ. J. Biochem.*, 24 : 123-127, 1971
- 81) Humphries, G. M. K. and McConnell, H. M. : Antigen mobility in membranes and complement-mediated immune attack. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 72 : 2483-2487, 1975
- 82) Sato, J. and Hara, I. : Anti-cholesterol activity in antisera against human serum lipoproteins. *Immunochemistry*, 9 : 585-587, 1972

(54. 10. 5 受稿)