

Cepharanthine 含有リポソーム製剤の
基礎的研究

篠田健一

①

Cepharanthine 含有リポソーム製剤の
基礎的研究

(富山医科薬科大学博士論文)

篠田 健 一

目次

緒論	1
本論	
第1章 CEP含有リボソーム製剤の調製とその物性	3
1. 緒言	3
2. 実験材料と方法	3
2-1 試料および試薬	3
2-2 リボソームの調製	3
2-3 膜透過性実験	4
2-4 粒子径の測定	4
3. 実験結果	5
3-1 CFの膜透過実験	5
3-2 CEP含量とリボソームの粒径変化	7
4. 考察	8
第2章 CEP含有リボソームによる抗体産生の増強	9
第1節 抗原特異的 IgM 抗体産生におよぼす影響	9
1. 緒言	9
2. 実験材料と方法	9
2-1 試料および試薬	9
2-2 実験動物	9
2-3 リボソームの調製	10
2-4 免疫方法	10
2-5 抗原特異的 IgM 抗体量の測定	10
3. 実験結果	12
3-1 抗原投与量と抗体産生挙動	12
3-2 リボソーム投与量と抗体産生	13
3-3 リボソーム中のコレステロール量と抗体産生	14

3-4	MLV中のCEP含量と抗体産生	15
3-5	CEP含有MLV投与時の抗体産生とその経時変化	16
3-6	リボソームの形態を変化させた場合の抗体産生挙動	17
4.	考察	18
第2節	脂溶性陰性荷電物質共存下におけるCEP含有リボソームの特異抗体産生	19
1.	緒言	19
2.	実験材料と方法	19
2-1	試料および試薬	19
2-2	実験動物	19
2-3	リボソームの調製	20
2-4	免疫方法	20
2-5	抗原特異的IgM抗体量の測定	20
3.	実験結果	21
3-1	脂溶性陰性荷電物質含有リボソームと抗体産生挙動	21
4.	考察	23
第3章	CEP含有リボソームの体内動態と組織分布	24
1.	緒言	24
2.	実験材料と方法	24
2-1	試料および試薬	24
2-2	実験動物	24
2-3	リボソームの調製	24
2-4	薬物投与	24
2-5	血漿中及び組織中CEP濃度の測定	25
2-6	封入率の測定	26
2-7	データ解析	26
3.	実験結果	26
3-1	CEPの血漿中動態	26
3-2	CEPの組織中動態	28

3-3 CEP含有リポソームの組織選択性	29
4. 考察	30
第4章 CEP含有リポソームのマクロファージ貪食能におよぼす影響	32
1. 緒言	32
2. 実験材料と方法	32
2-1 試料および試薬	32
2-2 実験動物	32
2-3 リポソームの調製	33
2-4 腹腔マクロファージ貪食能の測定	33
3. 実験結果	34
3-1 CEP投与と腹腔マクロファージの細数	34
3-2 CEP含有リポソームとマクロファージ貪食能	35
3-3 CEP含有リポソームの形態と腹腔マクロファージの貪食能	36
3-4 CEP含有MLVによる腹腔マクロファージの貪食能増強の経時変化	37
4. 考察	38
総括及び結論	40
謝辞	42
引用文献	43
付記	46
付録 セファランチン製剤に含有のその他のアルカロイドの化学構造	47

緒 論

セファランチンはツツラフジ科植物であるタマサキツツラフジの根茎から抽出されたものである。タマサキツツラフジは古くは台湾の山中に自生し、原住民から蛇毒の解毒剤として珍重されており、1914年に早田文蔵博士が「台湾植物図鑑」に学名 *Stephania cepharantha* Hayata として発表した。セファランチンは1934年に近藤平三郎博士等によって玉咲ツツラフジから抽出分離され¹⁾、1935年に長谷川秀治博士等によって、結核菌の発育を阻止することが認められて²⁾1942年に結核の治療及び予防薬として承認された。その後、蝮咬傷や百日咳、気管支喘息、胃潰瘍、胃酸過多、胃炎、円形脱毛症、枇糠性脱毛症、中耳炎への適応が承認され、1962年には放射線による白血球減少症が追加承認された。1995年の医薬品再評価により、臨床では放射線による白血球減少症や円形脱毛症、中耳炎やマムシ咬傷に注射あるいは経口で投与されている。

セファランチン製剤の主成分は methylenedioxy 基をもつ cepharanthine (CEP) で、化学構造は Fig. 1 に示すようなビスベンジルイソキノリン型（慣用名：ビスコクラウリン型）の分子量606のアルカロイドである。この他に isotetrandrine、cycleanine、berbamine、cepharnoline、homoaromoline の5種類のアルカロイドをこの製剤は含んでいる(巻末付録にその他のアルカロイドとして化学構造を記す)。

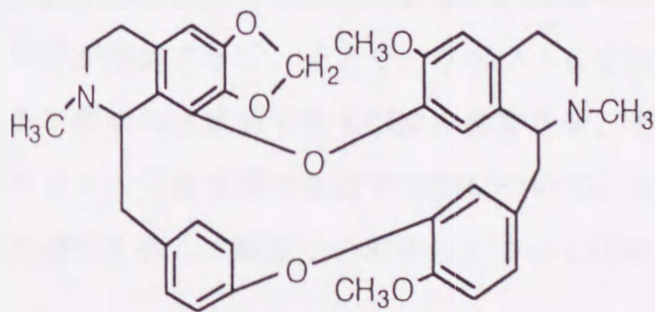


Fig. 1 The Chemical Structure of Cepharanthine (CEP)

CEPは可逆的に速やかに生体膜に取り込まれる。例えば、CEPを赤血球に添加すると直ちに形態変化が起きる。これはCEPが細胞膜の脂質二重膜の内側へ取り込まれ、分子の占有面積の増加によって起こる現象と考えられている^{3,4)}。また、CEPは細胞形質膜

にとどまらず他の生体膜に移行することで多くの薬理作用を示す。現在までに明らかにされた作用は、膜透過抑制に基づく抗毒素作用^{5,6)}、膜の安定化によるヒスタミン遊離抑制に基づく抗アレルギー作用^{7,8)}、膜脂質間で起きるラジカルの連鎖反応を阻害し脂質の過酸化を抑制することによる抗白血球減少効果^{9,10)}、膜電位反応やPLA₂あるいはC-キナーゼの阻害効果¹¹⁾、血液幹細胞の増殖、抗脂質過酸化、副腎皮質ホルモン産生増強、末梢血管拡張、および胸腺からの末梢リンパ組織へのT細胞の動員¹²⁾、natural killer (NK) 活性やマクロファージの細胞傷害活性を増強する作用がある¹³⁾。

近年、CEPは腫瘍の制癌剤に対する耐性化に関与すると云われているP-糖蛋白の機能を阻害することが報告され¹⁴⁾、将来、多剤耐性腫瘍に対して抗癌剤の効果を高める補助薬としての適用も期待される。CEPを始めとするこれらアルカロイドは疎水性で、蛋白結合率が高く肝臓への移行が高い点が指摘されているが、一方では *in vitro* の効果を示す濃度より低い血中濃度においてもその作用が認められたとの報告もある¹⁵⁾。このようにCEPは多様な生理活性をもつ反面、解明されていない点が多く、臨床で繁用されているが、なお基礎的研究の必要とされる薬物である。

セファランチン製剤は先に述べたようにCEPを主剤とし他の類似のアルカロイドも含有するが、混合物製剤の *in vitro* 効果は純粋アルカロイドのCEPと差はないと考えられている¹⁵⁾。ところで、リポソームは薬物担体あるいは薬物の組織移行性を改善する可能性を有しており注目されている。リポソーム製剤の医療応用には安定性や組織移行性、投与形態、薬物放出の制御等を検討する必要がある。CEPはリポソームの膜を安定化し、免疫機能を賦活する作用が期待できる。そこで、リポソームを担体とし、多様な生理活性をもつセファランチン製剤の主成分であるCEPを含有させ、その物性、体内動態、抗体産生能およびマクロファージ貪食能に及ぼす作用についてCEP溶液と比較検討した。本製剤の基礎的性質の研究を通して临床上の有用性について探究し、新たな知見を得たので以下詳述する。

本 論

第1章 CEP含有リポソーム製剤の調製とその物性

1. 緒言

リポソームは生体膜モデルとして基礎的な研究に用いられるばかりでなく、薬物担体として応用研究がなされている。リポソーム製剤は生体膜成分であるリン脂質からなる閉鎖小胞であるため生体との適合性や体内分解性が優れており、水溶性薬物も脂溶性薬物も封入することが可能である。制癌剤や免疫賦活剤などを標的臓器あるいは組織へ運ぶ Drug Delivery System の担体として臨床応用が注目され、徐放性や標的指向性を有する担体として有用であり、主に持続性の向上と、副作用の軽減が期待されている。しかし、一般にリポソームは粒子同士が凝集したりトラップされた薬剤が漏出し易く安定性に問題があるため、コレステロール¹⁶⁻²⁰⁾ やビタミンE^{21, 22)} 等の添加やポリマー化²³⁾ によって安定性の向上を図る工夫がなされている。CEPは膜流動性を低下させて膜機能を安定化させる作用をもつ他、脂質過酸化阻止作用をもつこと^{5, 9)} も知られており、この章ではCEPを膜安定化剤としてリポソームに添加した際の膜透過性と体内動態に影響する因子である粒子径について解析し、CEP含有リポソームの担体としての機能について検討した。

2. 実験材料と方法

2-1. 試料および試薬

CEPの原末は化研生薬(株)より提供を受けた。また卵黄L- α -フォスファチジルコリン(以下PCと略す)はミドリ十字社製を、5(&6)-カルボキシフルオレセイン(以下CFと略す)は和光純薬社製を用いた。緩衝液に用いたEDTAやNaCl、Trisは半井化学社製を用いた。

2-2. リポソームの調製

25 mM PCのクロロホルム/メタノール(9:1)溶液に種々のモル比でCEPを添加し、その1mlを分取、溶媒を窒素気流下で留去し、ガラス壁に生じた脂質の薄膜を減圧下で一日

乾燥した。ここに Tris 緩衝液 (20mM Tris, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, pH7.4) 2 ml を加え、Vortex ミキサーで数分間攪拌し懸濁液とした。この懸濁液を氷浴条件下で Probe 型の Ultrasonic Disruptor (Model UR-200P) を用い45分間超音波処理を行って小さいサイズの単層リポソーム (SUV) を調製した。サイズを均一化²⁴⁾ する場合は日立55P-72型遠心機を用いて100,000 × g、20分間遠心分離し、その上清を採取し使用した。透析法を用いて調製する場合は、20mM sodium cholate 溶液で脂質を溶解後、セルロースチューブ (Union carbid 社製, 8/32型) に入れ、40mlの緩衝液を外液として4℃で Oken Rotator (応研商事)で攪拌しながら48時間以上透析した。透析外液の交換は8回行い、透析後の内液を試料とした。またリポソーム調製後にCEPを添加する場合は、種々のモル比のCEPをエタノール 30 μl に溶解し添加した。

2-3. 膜透過性実験

Tris 緩衝液 (pH7.4) にCFを100 mMになるよう溶解した。その2 mlを脂質の薄膜に添加して、超音波をかけてリポソームを調製した後、free のCFは Sephadex G75で除去した。蛍光の測定には、島津製 RF-503A 型分光蛍光光度計を用いて励起光490nm、蛍光波長520 nm で蛍光強度の測定を行いCFの溶出挙動を検討した。

2-4. 粒子径の測定

準弾性光散乱法による LPA-3000/3100 型レーザー粒径解析システム (大塚電子)を用い 25℃で平均粒子径を測定した。

3. 実験結果

3-1. CFの膜透過実験

リポソームからのCF漏出に伴う蛍光強度の変化を模式的に示したのが Fig.2 である。

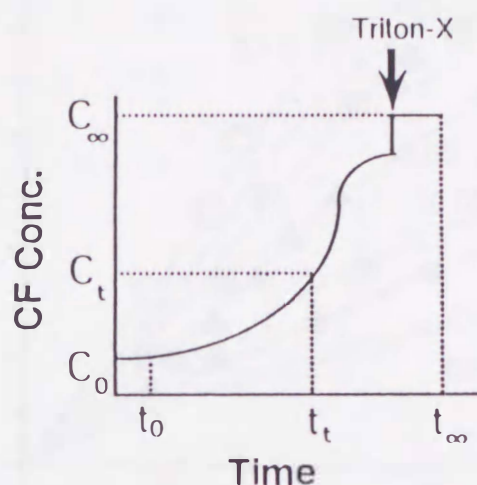


Fig.2 CFの溶出挙動

CFの膜透過性が一次の速度式に従うとして、蛍光強度の変化は(1)式を用いて解析できる²⁵⁾。

$$\ln(C_\infty - C_t) = \ln(C_\infty - C_0) - kt \quad \text{.....(1)}$$

ここで C_∞ は $t = \infty$ の時、即ち 10% triton-X を加えた後のCFの濃度； C_0 はCFの初期濃度； C_t は時間 t に於ける透過したCFの濃度； k は透過速度定数である。

CFを含むリポソームを超音波を用いて調製後、種々の濃度のCEPを添加してCF漏出の時間的变化について検討した結果を Fig.3 に示す。リポソーム形成後にCEPを添加した場合は、CEP添加量に比例してCFの漏出が増大した。(1)式を用いて求めたCFの透過速度定数とCEP濃度との関係を Fig.4 に示す。また、Fig.4 には予めリン脂質溶液にCEPを添加した脂質薄膜を用い調製したリポソームを用いCFの漏出実験を行って求めた k 値も記載している。なお、PCのみで調製したリポソームにエタノールを加えても、30 μ lまでは膜透過に対する影響は比較的小さかった。これらのグラフから判るように、予めCEPを添加した脂質薄膜から形成したリポソームでは、 k 値はほぼ一定値となり膜透過性に影響を与えない。一方、リポソーム調製後にCEPを加えた場合は、低濃度の

CEPでは顕著な k 値の増大が、その後はゆるやかな上昇が認められた。繰り返し実験の結果も同様な傾向を示した。

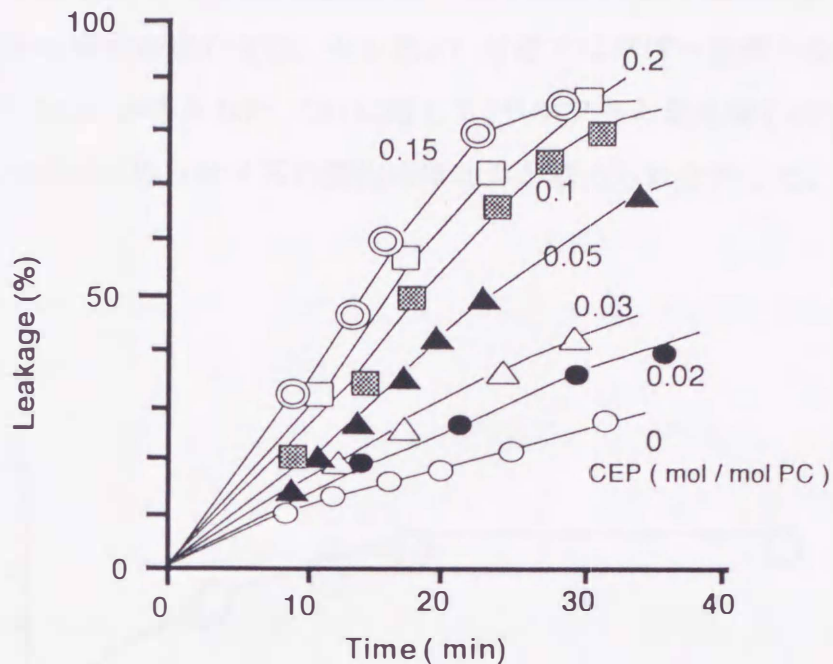


Fig.3. Effects of CEP on the leakage of CF entrapped in liposomes

CEP was added to liposome suspension after liposome formation. Liposomes were composed of CEP and PC at molar ratios of 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and of PC alone.

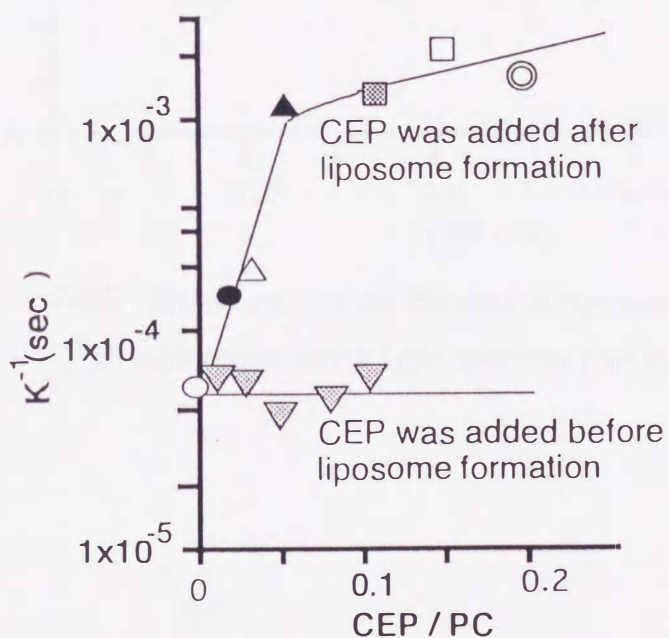


Fig.4. The effect of CEP on the rate constant of carboxyfluorescein efflux, when it was added to sonicated liposomes

3-2. CEP含量とリポソームの粒径変化

透析法を用い調製したリポソームのCEP含量と粒子径との関係について検討を加えた (Fig.5)。CEPを含むリン脂質溶液からリポソームを調製した場合 (○) はCEPの低濃度から粒子径の増大が認められ、モル比0.1 付近ではほぼ一定値となり平均粒子径が 80 ~ 90 nm の SUV が得られた。これに対して、リポソーム形成後にCEPを加えた場合 (●) はCEP濃度の増加に伴うサイズの変化はほとんど認められなかった。

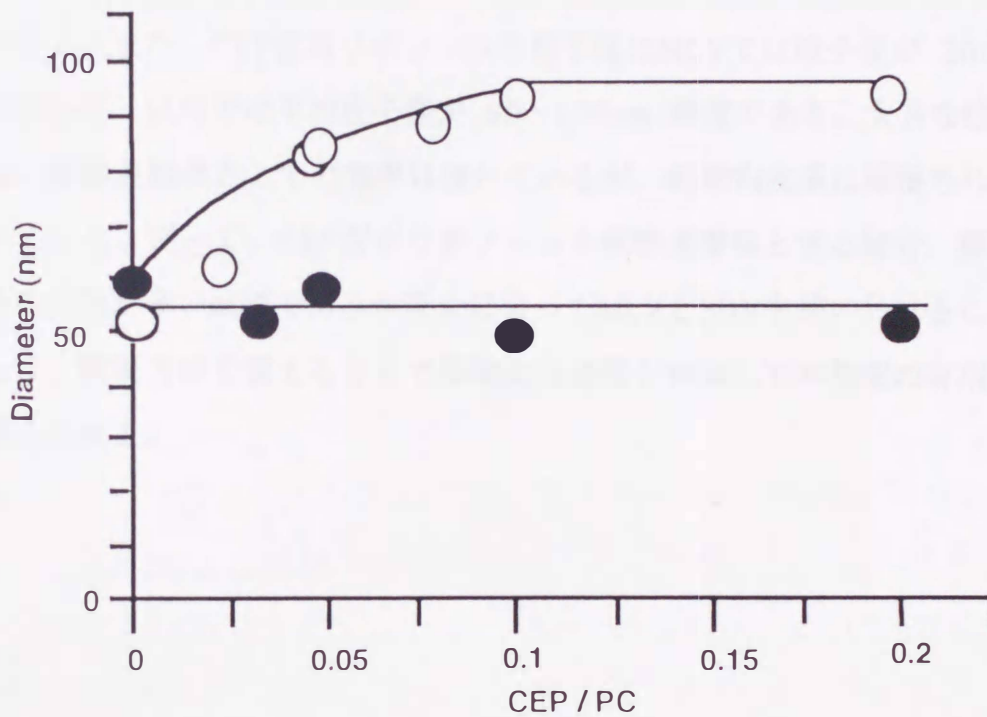


Fig.5 Effects of CEP on the size of liposomes

CEP was added before (○), and after (●) liposome formation.

4. 考 察

CEP含有リポソームの製法の違いにより、膜透過に対する影響とCFの漏出におよぼす効果に差異が認められた。膜透過速度定数(k値)は膜の多重度や粒子の表面積に依存する値である²⁶⁾。リポソーム形成後にCEPを添加した場合にはk値の増大が認められたが、リポソームの平均粒子径にはほとんど影響がなかったことから、膜バリアー能の低下が起こったと推察される。一方、CEPを含むリン脂質溶液からリポソームを調製した場合は平均粒子径の増大が認められたが、CEPが膜中に均一に分散することで膜が安定になりk値がほぼ一定となったと推察される。

このように、CEP含有リポソームはその膜透過性を調製方法で制御できる可能性が考えられる。また、CEP含有リポソームの粒子径はMLVでは粒子径が200nm以上になるのに対して、SUVでは平均粒子径が50~100nm程度である。大きな粒子径のリポソームは、薬物運搬体としての効率は優れているが、細網内皮系に捕獲されやすいことが知られている。従って、CEP含有リポソームを薬物運搬体とする場合、標的臓器が細網内皮系の細胞が多い組織であるか否かによってMLVとSUVを使い分けることが必要である。さらに、調製方法を変えることで薬物放出速度を制御して本製剤の有用性を増す可能性も考えられる。

第2章 CEP含有リポソームによる抗体産生の増強

第1節 抗原特異的IgM抗体産生におよぼす影響

1. 緒言

漢方方剤や生薬成分の中には、インターフェロン誘起作用やT細胞活性化因子、腫瘍壊死因子産生促進作用、補体第二経路活性作用など免疫系に対する多彩な活性を有するものがあることが知られている²⁷⁻³³⁾。植物性アルカロイドであるセファランチンも早くから免疫賦活作用のあることが報告され、抗体産生の促進^{34,35)}が認められている。現在は免疫リンパ機能の賦活³⁶⁾や immunopotentiator としての役割³⁷⁾が注目され臨床で使用されている。一方、リポソームは循環血中から除去されやすく、その性質を利用して免疫応答を量的に増強したり質的に変化させたりする試みもなされている³⁸⁾。

本章では、これらの性質を考慮してリポソームにCEPを含有させることにより、抗体産生を増強せる得るか否か検討した。

2. 実験材料と方法

2-1. 試料および試薬

CEPの原末は化研生薬社より提供を受け、抗原として用いた23価肺炎球菌莢膜多糖は万有製薬社製を用いた。また卵黄L- α -フォスファチジルコリン(PC)は日本油脂の製品を用いた。コレステロール(Chol)は和光純薬の特級品を用いた。洗浄液、基質液および緩衝液に用いた Tween20、Na₂CO₃ は和光純薬社製特級品を用い、ジエタノールアミン、NaHCO₃、NaN₃、NaCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄ は半井化学社製特級品を用いた。

2-2. 実験動物

近交系マウスの雄性BALB/cCr Slc (7-8週令)を Shizuoka Laboratory Animal Center から購入し、水及び標準固形飼料を自由に摂取させ実験に供した。

2-3. リポソームの調製

12.5 mM PC / 3.5 mM Chol のクロロホルム/メタノール(9:1)溶液1mlにCEPを溶解した。溶媒を窒素気流下で留去、ガラス壁に生じた脂質薄膜を減圧下で一晩乾燥した。これにPBS緩衝液(pH7.4)1mlを加えた後、Vortexミキサーで30秒攪拌、続いて30秒静置する操作を10回繰り返してリポソーム (MLV) 懸濁液を調製した。この懸濁液を氷浴条件下でプローブ型ソニケーター (Ultrasonic Disruptor, TOMY SEIKO社, Model UR-200P型) を用いて45分間超音波処理を行い単層リポソーム(SUV)を調製した。サイズを均一化する場合には、超遠心機 (日立、55P-72型) を用い100,000×g、20分間遠心分離し²⁴⁾、その上清を採取しスモールサイズの単層リポソーム (SUV) とした。調製したリポソーム懸濁液は動的光散乱法によるレーザー粒径解析システム(大塚電子、LPA-3100/3000型)を用いて解析し、25℃での平均粒子径を算出した。CEPを含まないPC/Cholモル比7:2での平均粒子径は、SUVで60 nm、MLVで1644 nmであった。

2-4. 免疫方法

抗原およびCEP含有リポソームを近交系マウスである BALB/cCr Slc (雄性、7-8週令) の腹腔内にそれぞれ 200 μl 投与した。抗原の投与後、5-14日後に尾静脈より採血し免疫血清を得た。

2-5. 抗原特異的IgM抗体量の測定³⁹⁾

96穴マイクロプレート (Falcon3912) の各wellにコーティング用緩衝液 (0.05M carbonate-bicarbonate 液、pH 9.6) で 10 μg/ml に調製した抗原溶液 150 μl を加え、4℃で一晩インキュベートした。これをELISA用プレートウォッシャー (Slt-Lab Instruments社812 SW2型) を用い洗浄液 (PBS-0.05% Tween20 液、pH 7.4) で5回洗浄した後、1% BSA を含むコーティング緩衝液 150 μl を加え、4℃で一晩インキュベートした。採取した血清は洗浄液で2倍希釈列に調製した。このように希釈した血清サンプルを抗原コーティングを行った96穴プレートに 100 μl ずつ分注し、4℃で一晩インキュベートした。その後、プレートを洗浄液で5回洗浄し、さらに洗浄液で1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗マウス μ-chain specific IgM 特異的 IgG (シグマ社 No.A-7784) 100 μl を各wellに分注し、37℃で1時間インキュベートした。これを5回洗浄後、2.7 mM p-nitrophenyl phosphate 基質溶液 (10% diethanolamine) を 100 μl 添加し、室温で30分間反応させた。反応後、酵素抗体法リーダー (Biorad 社、

Model450 型) を用いて405 nm の吸光度を測定した。また、既知量のマウス IgM (Intercell Technologes、INC. 社製) を用いた検量線より血清中のIgM量を算出した。なお、この測定系はマウスIgMに対する特異抗体と酵素による反応を利用しているため、選択性が高く検出感度にも優れており測定限界は 20 pg/ml であった。Chart 1. にCEP含有リポソームによる特異抗体の測定方法の概要を示す。

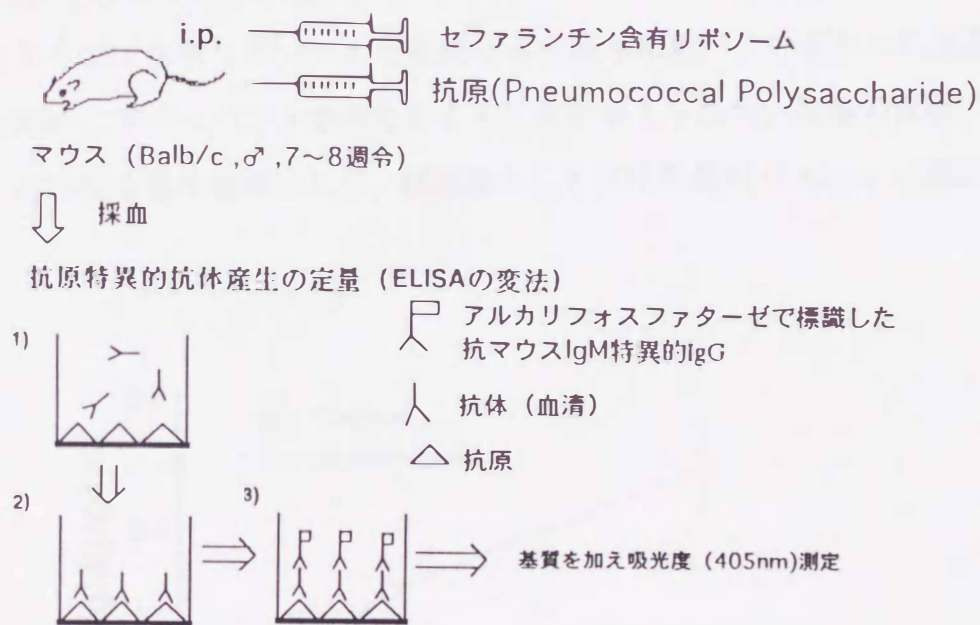


Chart 1. CEP含有リポソームによる特異抗体の産生増強の測定法

3. 実験結果

3-1. 抗原投与量と抗体産生挙動

CEPを 2 mg 含有するリポソームを投与した場合と投与しない場合それぞれに於いて、抗原量をマウス当たり 0.01 μ g から 0.5 μ g まで変化させた際の抗体産生を Fig.6 に示す。CEP含有リポソームを投与しないコントロールでは (●)、抗原量0.2 μ gで最大の抗体産生がみられたが、抗原が0.5 μ gでは抗体産生は低下し阻害がみられた。これに対しCEP 2mg を含有するMLVを抗原と同時に投与すると (○)、IgM産生が増強された。このことからCEP含有リポソームは抗原のみの投与に比べ、いずれの抗原量でもIgM抗体産生を高め、アジュバント効果を有することが考えられた。以後の実験では臨床におけるヒトでの投与量を参考にして、抗原量としては低用量の 0.05 μ g に設定した。

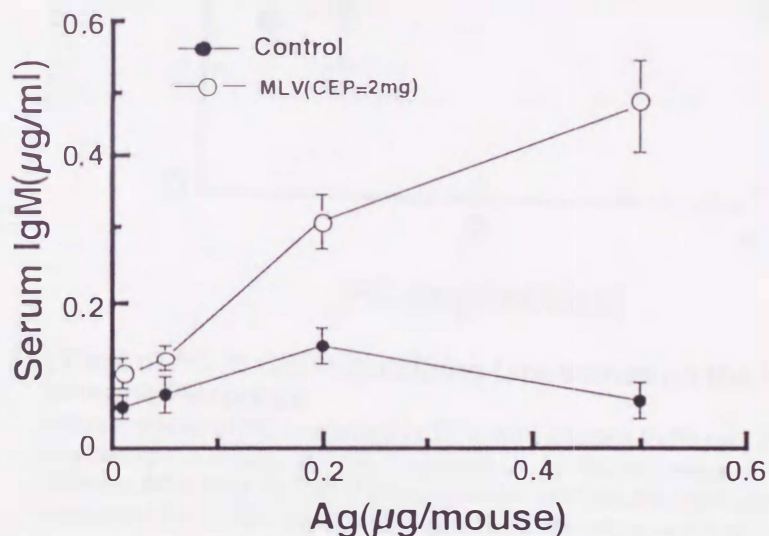


Fig. 6. Effects of antigen dose on the primary immune response in mice

Various doses of antigen with (○) or without (●) 2 mg CEP contained in MLV were injected i.p. to BALB/C mice. Animals were bled on day 5 and plasma was obtained. The specific IgM antibody in plasma was measured by ELISA. Data in the figure represent the mean \pm SD of 3 mice.

3-2. リポソーム投与量と抗体産生

CEP含有リポソームによる抗体産生増強において、リポソーム量を変化させた際の結果を Fig.7 に示す。CEPを 0.4 mg 含有するSUVを用い、リポソーム量はPC量で表してある。この結果から、PC量にして2 mg 近傍で抗体産生が最も高くなることが判った。

3-5.より以降の実験ではPCは2 mg と一定になるようにした。

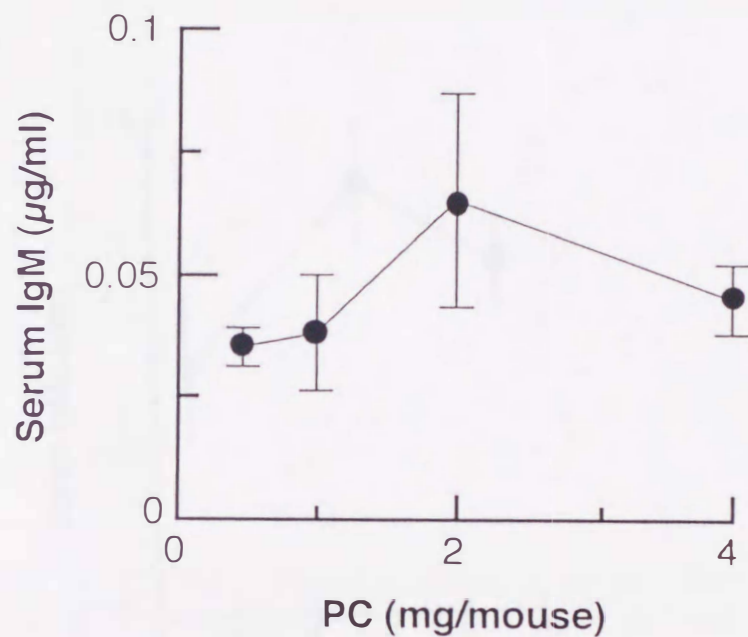


Fig. 7 Effect of PC in CEP-Containing Liposomes on the Primary Immune Response

Various doses of PC contained in SUV with antigen (0.05 µg) and SUV containing 0.4 mg of CEP were injected i.p. to BALB/C mice.

Animals were bled on Day 7 after injection, and specific IgM antibody was measured by ELISA. Each point represents the mean ± SD of 3 mice.

3-3. リポソーム中のコレステロール量と抗体産生

コレステロール(Chol)はリポソーム膜を安定化しリポソームのバリアー能を向上させる働きがある。そこで、Chol 量を変化させた場合のCEP含有リポソームによる抗体産生への影響について検討を加えた。CEP0.4mgを含有するMLVについて、PC/Chol の組成比を変化させた際の抗体産生挙動の結果を Fig.8 に示す。マウス一匹当たりの投与量にしてChol が $5.4 \mu\text{moles}$ の時に IgM 抗体産生が高くなり、PC/Chol モル比で7:3付近の組成がアジュバント効果発現に有利であると推定された。

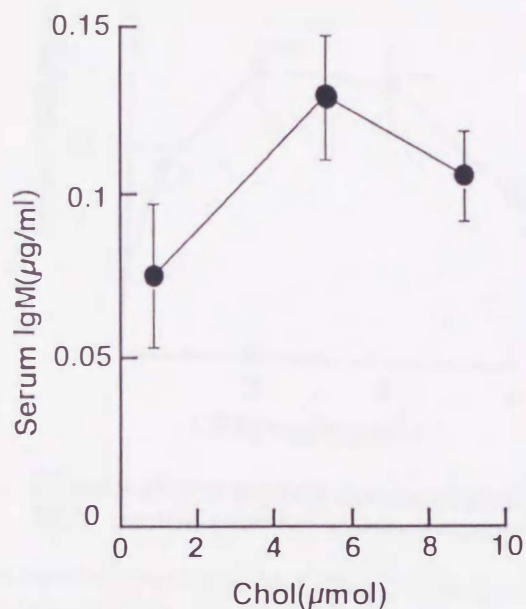


Fig. 8. Effect of increasing concentrations of Chol in CEP-containing liposomes on the primary immune response with antigen in mice

Antigen of $0.05 \mu\text{g}$ and MLV containing 0.4 mg of CEP were injected i.p. to BALB/C mice. Animals were bled on day 5 after injection, and specific IgM antibody was measured by ELISA. Data in the figure represents the mean \pm SD of 3 mice.

3-4. MLV中のCEP含量と抗体産生

CEP含量を変えた場合の効果について検討した (Fig.9)。CEP量が 0.2 mg から有意な抗体産生の増大が見られ、2 mg でほぼ最大となり、投与量が 6 mg になると逆に減少傾向が認められた。CEP量が 2 mg 近傍までCEPの含有量に依存的な抗体産生の増大が認められたので、以後の実験ではCEPの投与量を 2 mg 以下に設定した。

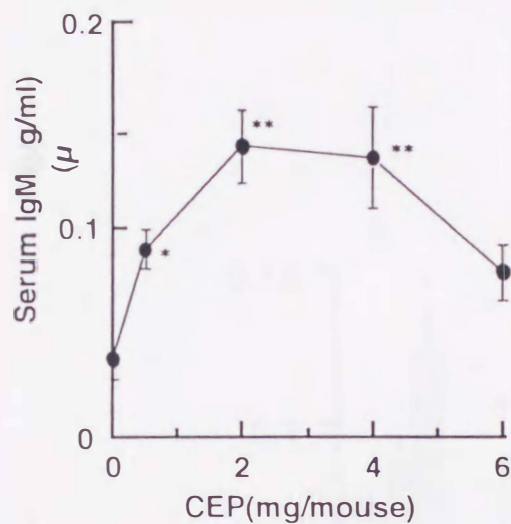


Fig.9. Effects of increasing concentrations of CEP in MLV on the primary immune response in mice

Mice were injected i.p. with 0.05 μ g of antigen and various amounts of CEP contained in MLV. Animals were bled on day 5 after injection, and specific IgM antibody was measured by ELISA. Data in the figure represent the mean \pm SD of 3 mice.

- * Significantly different from CEP of control value ($P < 0.05$)
- ** Significantly different from CEP of control value ($P < 0.01$)

3-5. CEP含有MLV投与時の抗体産生とその経時変化

CEPを含まないMLVと含有させたMLVを投与した際の抗体産生の結果を Fig.10 に示す。CEPの投与量を 0.2 mg あるいは 2 mg とし、投与後7日、10日、14日と経時的に採血して測定した。CEP溶液では投与量を増加させても有意なIgMの抗体産生の増加は認められなかった (Fig.10A)。しかし、CEPをMLVに含有させた場合はIgMの抗体産生はCEP量に依存して増大した。これらはコントロールの抗原のみやCEPを含有しない脂質のみ(空のリポソーム)の場合と比較して有意であった (Fig.10B)。また、投与後14日目になると、CEP量が 2 mg の場合、7日目や10日目に比して抗体産生が低下する傾向が認められた。

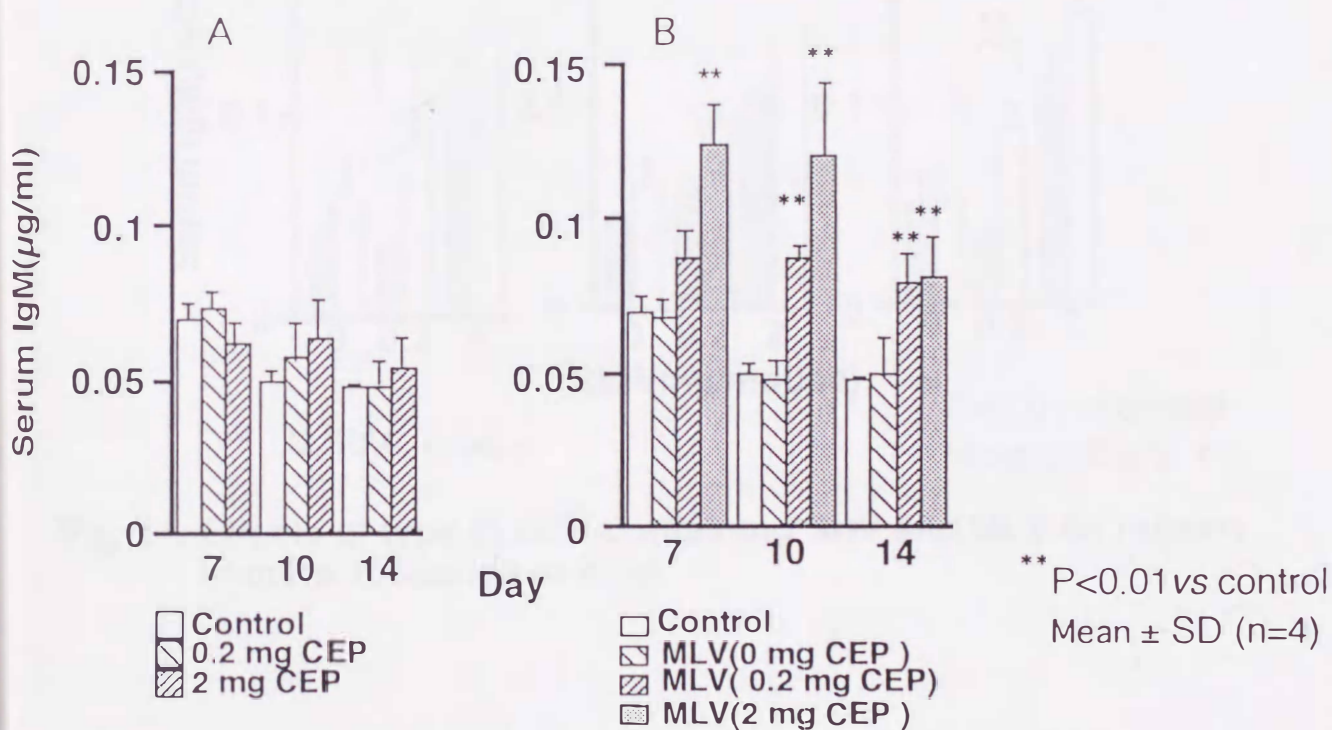


Fig. 10. Time course of the primary immune response with CEP-containing liposomes

3-6. リポソームの形態を変化させた場合の抗体産生挙動

CEPを 0.2 mg あるいは 2 mg 含有するMLVやSUVを抗原とともにマウスに投与した。投与後5日目、7日目、9日目に採血して経時的な抗体産生を比較した (Fig.11)。CEP含有リポソームを投与した場合、MLVでもSUVでも抗体産生はCEPの用量に依存して増加した。しかし、投与後5日目、7日目、9日目のいずれの点でもMLVの方がSUVに較べ高い傾向が認められた。すなわち、CEP含有リポソームによる抗体産生の増強においては、MLVの方がSUVより優れていると考えられた。

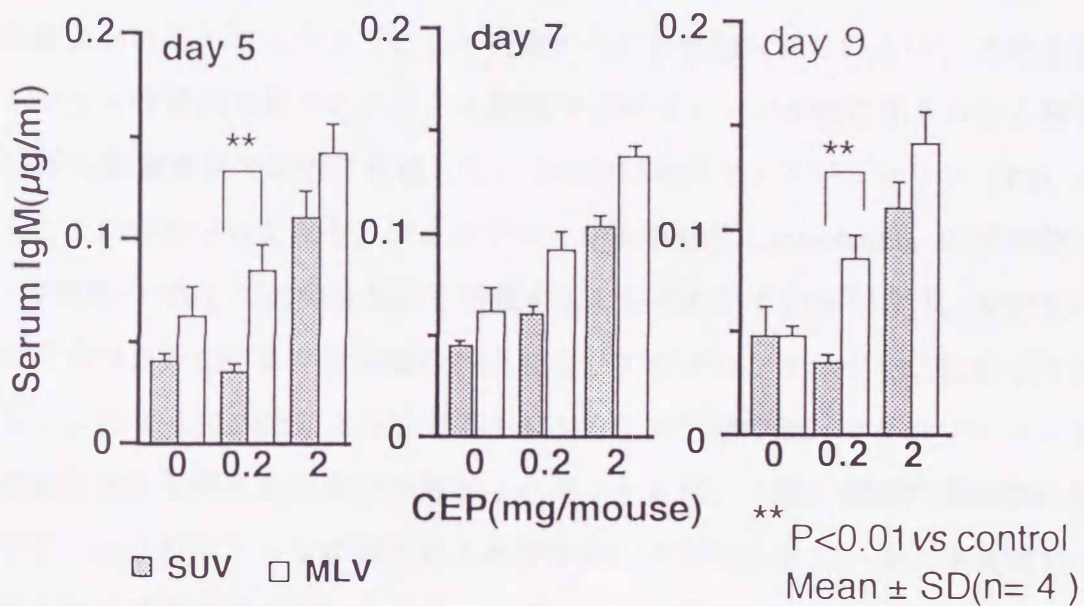


Fig. 11. Effects of type of CEP-containing SUV and MLV on primary immune response in mice

4. 考 察

マウスにおける肺炎球菌夾膜多糖に対する特異抗体の産生増強が、CEP含有リポソームで認められた。特にMLVではその効果が顕著であった。一方、CEP溶液や空のリポソーム投与では抗体産生の増強はほとんど見られなかった。高橋金彌等はCEPは抗原刺激によりBリンパ球から分化した形質細胞に働き抗体産生を促進したと述べている⁴⁰⁾。今回の結果は、実験条件の違いもありCEP溶液には抗体産生促進作用は見られなかったが、CEP含有リポソームに認められた顕著な抗体産生の増強にも同様な機序が考えられる。

一方、生体内で異物処理にあたるマクロファージはT細胞への抗原提供細胞として機能したりサイトカイン (interleukin-1など) の放出を介しリンパ球機能を制御する他、細胞性免疫におけるエフェクターとして機能することが知られている⁴¹⁾。志村圭志郎等はCEPをマウス腹腔内に投与したところ腹腔マクロファージが活性化されたと報告している⁴²⁾。また両親媒性で陽性に荷電しているCEPはホスファチジルセリン (PS) と強く結合することが報告されており、マクロファージを活性化しinterleukin-2 産生能の高いヘルパーT細胞の Th1 での免疫反応を増強するとも言われている^{7,12,43)}。本研究のリポソームに含有されたCEPも、生体膜のPSと結合してマクロファージを活性化したとも考えられる。このようにCEPによる抗体産生にはBリンパ球の他、マクロファージも関与し免疫調節作用を発揮した可能性がある。リポソームは、一般に細網内系細胞に取り込まれやすく、マクロファージに取り込まれやすいことが知られている。本実験で、CEP溶液に抗体産生増強効果が認められず、リポソームに含有させて始めてその作用が認められたことは、CEP含有リポソームとマクロファージの相互作用が抗体産生の増強に重要な役割を担っていることを示唆している。また、CEP含有MLVはSUVより強く抗体産生を増強する傾向が見られた。マクロファージ系細胞は一枚膜のSUVなどよりMLVをより多く貪食する⁴⁴⁻⁴⁶⁾との報告もあり、このことも上記の推論を支持している。CEP含有リポソームがマクロファージに及ぼす影響については、第4章でさらに詳細に検討を加えたい。

第2節 脂溶性陰性荷電物質共存下における CEP含有リポソームの特異抗体産生

1. 緒言

リポソームは細胞形質膜と近接・接触すると、リン脂質の交換が起こることが知られている⁴⁷⁾。CEPは陽性荷電物質であり⁴⁸⁾、細胞膜中の陰性荷電を持つ酸性リン脂質との相互作用については検討しておく必要がある。また、リポソーム中の荷電脂質の組成は抗体産生能⁴⁹⁾やマクロファージへの取り込みに影響を与えるとの報告もされている⁵⁰⁾。そこで、陰性荷電を持つ、リン脂質ホスファチジン酸 (PA) ならびに合成化合物であるジセチルホスフェイト (DCP) を選び、これらをCEP含有リポソームに添加した場合の特異抗体産生への影響について検討を加え二・三の新知見を得た。

2. 実験材料と方法

2-1. 試料および試薬

CEPの原末は化研生薬社より提供を受け、抗原として用いた23価肺炎球菌莢膜多糖は万有製薬社製を用いた。また、卵黄L・ α ・フォスファチジルコリン (PC) は日本油脂の製品を用いた。脂溶性荷電物質であるL・ α ・フォスファチジン酸 (PA) とジセチルリン酸 (DCP)、ヤギ由来のアルカリフォスファターゼ標識抗マウス μ 鎖特異的IgG抗体、およびウシ血清アルブミン (BSA; Fraction V) はシグマ社(アメリカ)製を使用した。抗体量の検量線作成には Intercell Technologies 社(アメリカ)から購入したマウスIgMを用いた。Tween20やNa₂CO₃、ジエタノールアミン、NaHCO₃、NaN₃、NaCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄ は和光純薬の特級品あるいは半井化学の特級品を用いた。

2-2. 実験動物

近交系マウスの雄性BALB/c Cr (7-8週令) を Shizuoka Laboratory Animal Center から購入し、水及び標準固形飼料を自由に摂取させ実験に供した。

2-3. リポソームの調製

12.5 mM PC / 3.5 mM Chol (モル比7:2) のクロロホルム/メタノール (容積比9:1) 溶液1mlにCEP 2 mg およびPAあるいはDCPを種々のモル比で添加した。そして、種々

のリポソームを前章の方法に準じて調製し実験に供した。

2-4. 免疫方法

抗原および種々のリポソームを近交系マウスである BALB/c Cr (雄性、7-8週令) 腹腔内にそれぞれ 200 μ l 投与した。抗原の投与後5日目あるいは7日目に尾静脈より採血し血清を得た。またCEPをリポソームに含ませずに投与 (投与量0.4 mg及び2 mg) した場合と荷電物質を含まない空のMLVを抗原と共に投与する実験も行った。CEPによる抗体産生能の変化は試験実施時期の違いにより多少の変動が見られたので、データの比較は同時期に行ったもののみの間で行った。同じ条件で繰り返し実験を行うことによりデータの信頼性を確認した。統計処理には Student の t-検定法を用いた。

2-5. 抗原特異的 IgM 抗体量の測定

前章に記述した方法に従い、既知量のマウスIgMを用いた検量線を利用して血清中の抗原特異的 IgM 量を算出した。

3. 実験結果

3-1. 脂溶性陰性電物質含有リポソームと抗体産生挙動

CEP含有SUVにPAを添加した場合の抗体産生に及ぼす影響について、CEPを含まない場合と比較検討した(Fig.12)。PAの添加により抗体産生の著明な減少が認められたが、CEPが存在するとPAで減少した抗体産生を回復させる傾向のあることが判った。DCPの影響について、SUVおよびMLVを用いて検討した結果を Fig.13 および 14に示す。SUV、MLV、いずれを用いた場合でも、DCPは濃度依存的に抗体産生を減少させた。一方、CEPを含有させた場合は、DCPによる抗体産生の減少が回復・増強されることが示された。すなわち、PAあるいはDCPが存在している場合でも、同じ条件で比較すると、CEPは特異抗体の産生を増強することが判明した。

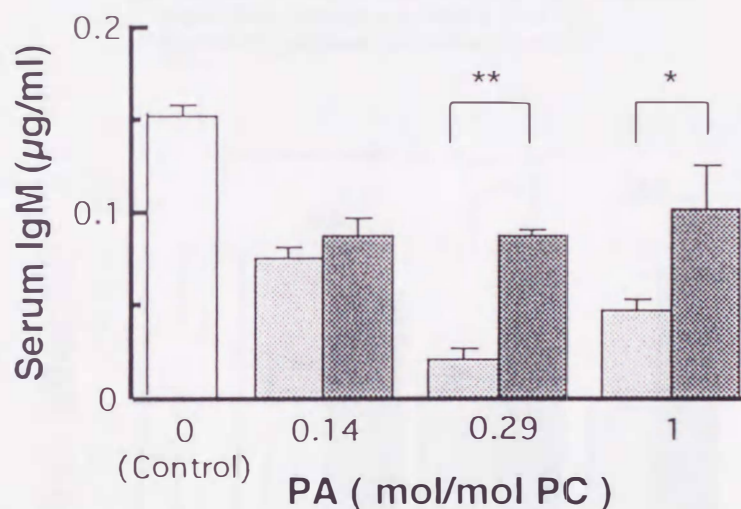


Fig. 12 Effects of PA in SUV on the primary immune response in mice

Antigen (0.05 µg) and liposome were injected i.p. to BALB/c mice. Animals were bled on Day 7 after injection, and specific IgM antibody was measured by ELISA. Each value represents the mean ± SD of 3 mice. Various doses of PA contained in SUV (without CEP) were injected with antigen.

□ : Empty SUV (as a control) □ : SUV liposomes composed of PA.
▨ : CEP-containing SUV liposomes composed of PA.

* Significantly different from control (p<0.05) .

** Significantly different from control (p<0.01) .

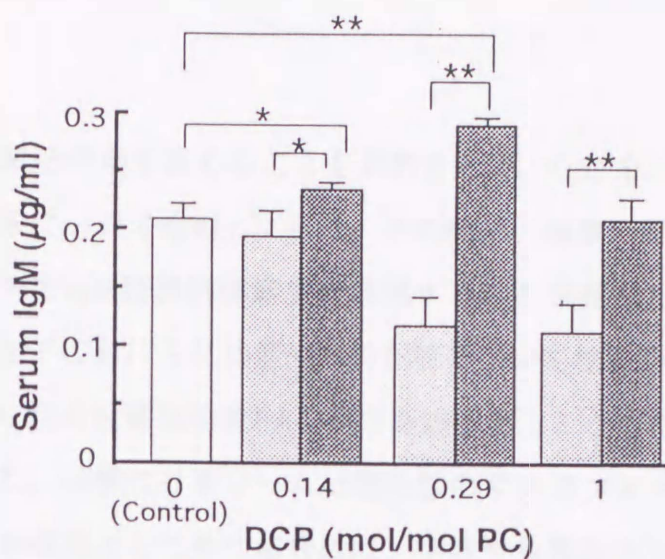


Fig. 13 Effects of DCP in SUV on the Primary Immune Response in mice

Antigen ($0.05 \mu\text{g}$) and liposome were injected i.p. to BALB/c mice. Animals were bled on Day 5 after injection, and specific IgM antibody was measured by ELISA. Each value represents the mean \pm SD of 3 mice. Various doses of DCP contained in SUV (without CEP) were injected with antigen.

□ : Empty SUV (as a control) □ : SUV liposomes composed of DCP.
 ▨ : CEP-containing SUV liposomes composed of DCP.

* Significantly different from control ($p < 0.05$).
 ** Significantly different from control ($p < 0.01$).

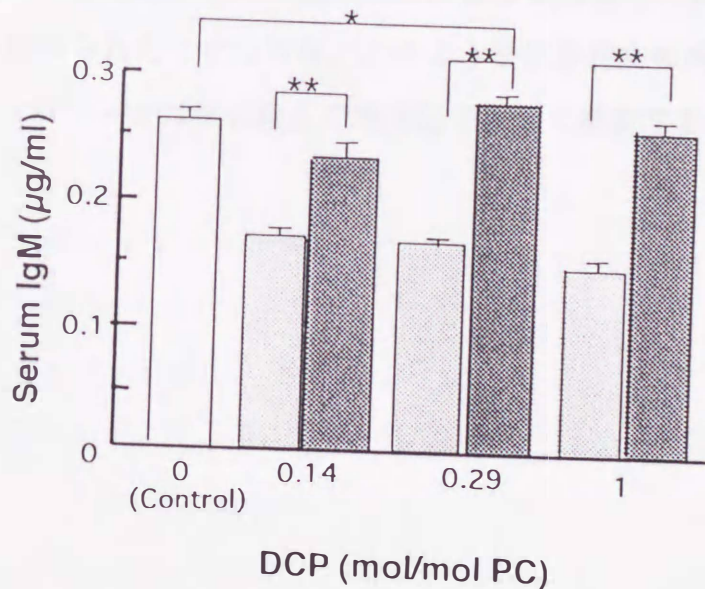


Fig. 14. Effects of DCP in MLV on the Primary Immune Response

Antigen ($0.05 \mu\text{g}$) and liposome were injected i.p. to BALB/c mice. Animals were bled on Day 5 after injection, and specific IgM antibody was measured by ELISA. Each value represents the mean \pm SD of 3 mice. Various doses of DCP contained in MLV (without CEP) were injected with antigen.

□ : Empty MLV (as a control) □ : MLV liposomes composed of DCP.
 ▨ : CEP-containing MLV liposomes composed of DCP.

* Significantly different from control ($p < 0.05$).
 ** Significantly different from control ($p < 0.01$).

4. 考 察

CEPの免疫賦活作用を高めることを目的として、CEPをリポソームに含有させ、その性質および効果について検討してきた。その結果、前章で記述したように CEP含有リポソームがマウスでIgM特異抗体産生を増強することを見出した。本章では、脂溶性陰性荷電物質の存在下における抗体産生への影響について検討を加えた。

リポソームに脂溶性荷電物質PAやDCPを添加することによって抗体産生は減少する傾向が認められた。一般にリポソームは常在性のマクロファージに取り込まれるが、正電荷のリン脂質を組成として持つ場合には、中性や負電荷のリポソームと比べると細胞との相互作用が強いと言われている⁵¹⁾。逆に、リポソームの負電荷はマクロファージへの補体依存的な取り込みを抑制するという Wassef ら⁵²⁾の報告もある。これらを考慮すると本実験系ではPAやDCPの負荷電を有する物質はリポソームのマクロファージへの取り込みを抑制し、IgM抗体産生を阻害したのではないかと推測できるが、PAやDCPが直接的に抗体産生に関わる細胞に阻害的に働いた可能性も否定できない。一方、CEPを含有させて投与した場合には、PAやDCPによる抗体産生の抑制を阻害・回復する作用のあることが認められた。すなわち、このような抗体産生の抑制因子が存在する場合にも、CEP含有リポソームは抗体産生の増強因子として機能する可能性が示された。

第3章 CEP含有リポソームの体内動態と組織分布

1. 緒言

セファランチンは制癌剤投与や放射線照射時の副作用である免疫機能低下状態（白血球減少症）に幅広く臨床利用されている。しかし、その主成分であるCEPの薬物動態に関する報告は僅かであり、CEPを含有させたリポソームの体内分布に関する報告はない。薬物運搬体として用いるリポソームの体内動態は、リポソームの組成や荷電、サイズ、投与方法によって変化し、細網内皮系細胞に富む肝臓や脾臓、肺に高い停滞率を示す⁵³⁾。CEPを含有したリポソームを腹腔内投与した際の体内動態の解析は標的と考えられる臓器（脾臓）への到達性とCEPのもつ免疫調節作用の関連を考える上で重要である。

2. 実験材料と方法

2-1. 試料および試薬

CEPの原末は化研生薬社より提供を受け、抗原として用いた23価肺炎球菌莢膜多糖は万有製薬社製を用いた。また、卵黄 L- α -フォスファチジルコリン (PC) は日本油脂の製品を用いた。その他の試薬は和光純薬または半井化学の特級品を使用した。

2-2. 実験動物

近交系の雄性ddyマウス（8週令）を Shizuoka Laboratory Animal Center から購入し、水及び標準固形飼料を自由に摂取させ、実験に供した。

2-3. リポソームの調製

前述した方法に準じてCEP含有リポソームを調製した。調製したリポソームは、動的光散乱法によるレーザー粒径解析システム（大塚電子，LPA-3100/3000型）を用いて25℃で解析して平均粒子径を算出した。なお、PC/Cholのモル比7:2の場合には平均粒子径はSUVで60 nm、MLVで1.6 μ mであった。

2-4. 薬物投与

マウスにCEP溶液もしくはCEP含有MLVの懸濁液 200 μ l を腹腔内に投与した。経時的に尾静脈より約 200 μ l 採血した。投与後 2、12、120 時間でマウスをエーテル麻酔下で屠殺し肝臓と脾臓、肺を摘出し分析に供するまで -35℃ で保存した。

2-5. 血漿中及び組織中 CEP 濃度の測定

血漿中 CEP は Chart 2 に示すように、血漿 0.2 ml を Bond Elut C2 column (1ml, GLサイエンス) を通して抽出操作を行った後、HPLC 試料とした⁵⁴⁾。一方、組織中 CEP についても Chart 2 に示すように酸による除蛋白と有機溶媒による分配法を用いた抽出操作を行い、HPLC 試料とした。HPLC 装置は LC-6AD (島津) を用い、215 nm の吸光度を UV detector (SPD-10A, 島津) で測定した。カラムには、Diol-0201-R column (200 × 4 mm i.d.; pore size 5 μm) (センシユー科学) を、移動相として血漿サンプルにはアセトニトリルとリン酸緩衝液 (pH 2.4) の混合液 (4 : 1) を、また組織サンプルにはアセトニトリルとリン酸緩衝液 (pH 3.9) の混合液 (5 : 1) を用いた。流速は 2 ml/min とした。マウス血漿 200 μl に CEP 標準物質を加えた場合の HPLC 解析より算出したピーク面積・濃度比をもとに検量線を作成した。また、CEP を投与していないマウスから抽出した各組織に 0.14 N HCL を加えホモジナイズした溶液に CEP を加えて作成した検量線を用いてサンプル中の CEP を定量した。定量限界は血漿中 CEP の場合には約 2 ng/ml、組織中 CEP では 0.1 μg/g tissue であった。

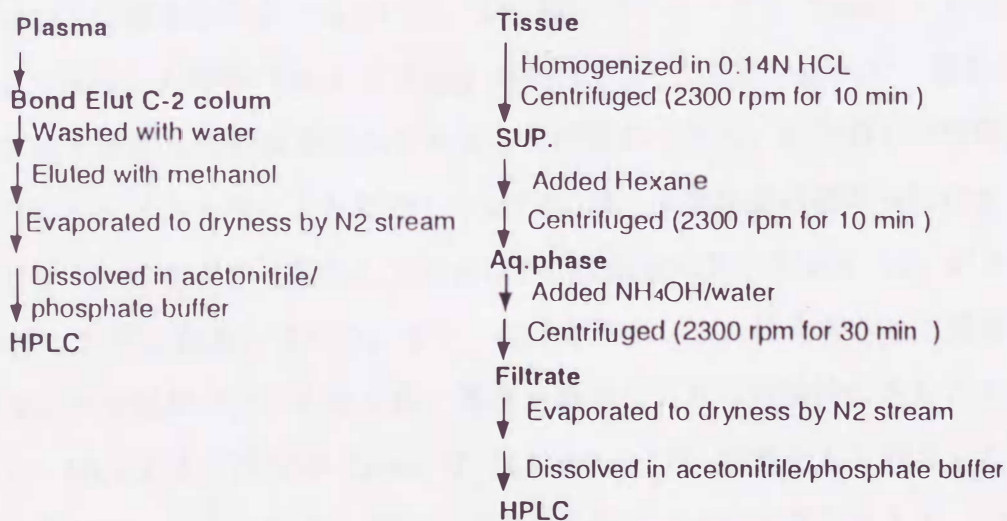


Chart 2. Extraction procedures for CEP

2-6. 封入率の測定

調製したCEP含有リポソーム懸濁液ならびにリポソームを遠心分離して free のCEPを除いたCEP含有リポソームについて、それぞれCEPを抽出してHPLCで定量した。その結果、CEPの封入率は94.6 % であった。

2-7. データ解析

CEP投与後の血漿中濃度及び組織中濃度データからモーメント法⁵⁵⁾によりモデルに依存しないパラメータとして最高血中濃度(C_{max})、 C_{max} に到達する時間(T_{max})、血漿中濃度終末部分における生体内半減期($t_{1/2}$)、濃度曲線下面積(AUC)、分布容積(V_{dss})、平均滞留時間(MRT)を求めた。AUCとMRTは投与120時間までのデータをもとに算出した⁵⁶⁾。また、組織移行性の指標となる K_p 値は、 $K_p = AUC_{tissue} / AUC_{plasma}$ として算出した。

3. 実験結果

3-1. CEPの血漿中動態

2 mgのCEPを溶液あるいはMLVやSUVに含有させて、マウス腹腔内に投与した場合の血漿中CEPの濃度推移を Fig.15 に、また動態パラメータを Table. 1 に示す。CEPを溶液として投与した際の T_{max} と C_{max} は約 1.0 hr と 333 ng/mlで、腹腔からの CEP の吸収が速く消失も比較的速やかであることが認められた。投与後120時間までのデータをもとにモーメント法により算出したMRTには、大きな差は認められなかった。しかし、リポソームに含有させ投与した場合は、CEP溶液に比べAUC_{0~120} が3~4倍高く、 $t_{1/2}$ は約 2 倍に延長していた。また、CEPをリポソームに含有させて投与した場合には、投与後十分時間がたった後も高い濃度を維持しており持続性のあることが示唆された。また、MLVおよびSUVの C_{max} は 718 ng/ml で、溶液として投与した場合に比し高い値を示した。これらのことから、CEPをリポソームに含有させると、CEPの生物学的利用能が大幅に上昇し、かつ血中CEP濃度が高く維持されることが判明した。

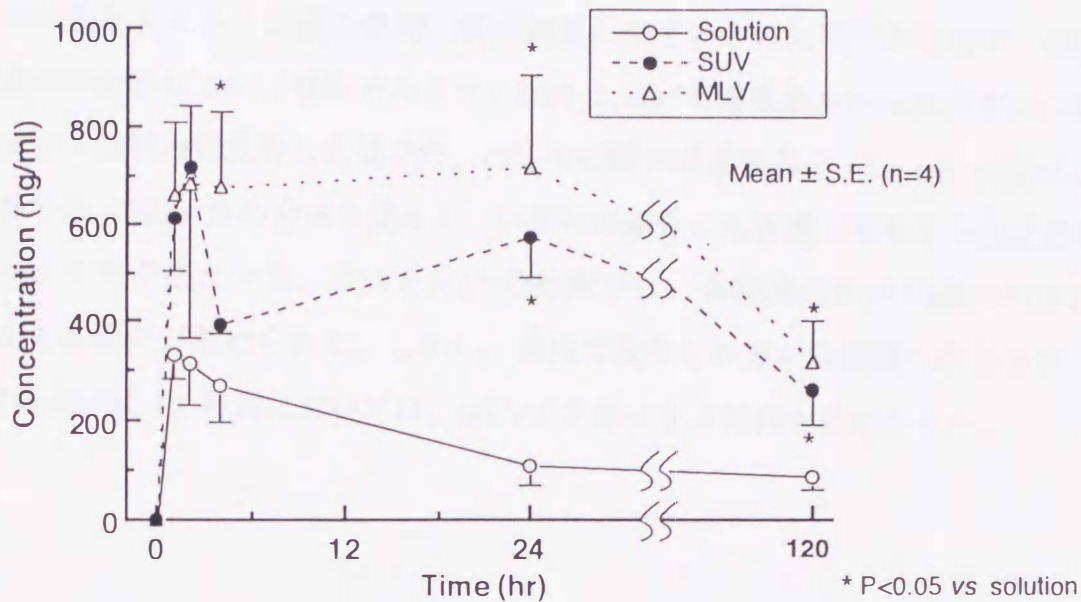


Fig.15 Plasma concentration profile of CEP (2 mg/body) after intraperitoneal administration in solution or liposomes

Table I Pharmacokinetic parameters of CEP in plasma after intraperitoneal injection in solution or liposomes

Parameter	Solution	SUV	MLV
T_{max} (hr)	1.0	2.0	24.0
C_{max} (ng/ml)	333	718	718
$t_{1/2}$ (hr)	68.2	142.2	107.3
$AUC_{0\sim 120}$ (ng/ml · hr)	14038	47467	63510
$MRT_{0\sim 120}$ (hr)	50.4	55.8	52.0
Vd_{ss} / F (ml/body)	10112	3906	2642
CL_{tot} / F (ml/hr/body)	92.2	19.4	17.5

Each parameter value was calculated from the pooled data from three mice.

3-2. CEPの組織中動態

CEPを投与すると、肝臓や脾臓、肺に集積しやすいとの知見があるので、CEPのこれら臓器への分布について検討を加えた。CEP 2 mg を溶液あるいはMLVやSUVに含有させてマウス腹腔内に投与した場合の、CEPの組織中濃度推移を Fig.16 に示す。十分時間の経った 120hr 後の分布を見ると、いずれの場合にも脾臓に分布するCEP量が肝臓や肺に比べてやや高かった。SUVとMLVの比較では、各組織に於いてMLVの方がSUVより高くなる傾向が認められた。しかし、溶液で投与した方が各組織への分布が、投与後2時間あるいは12時間においては、MLVより高くなる傾向も認められた。

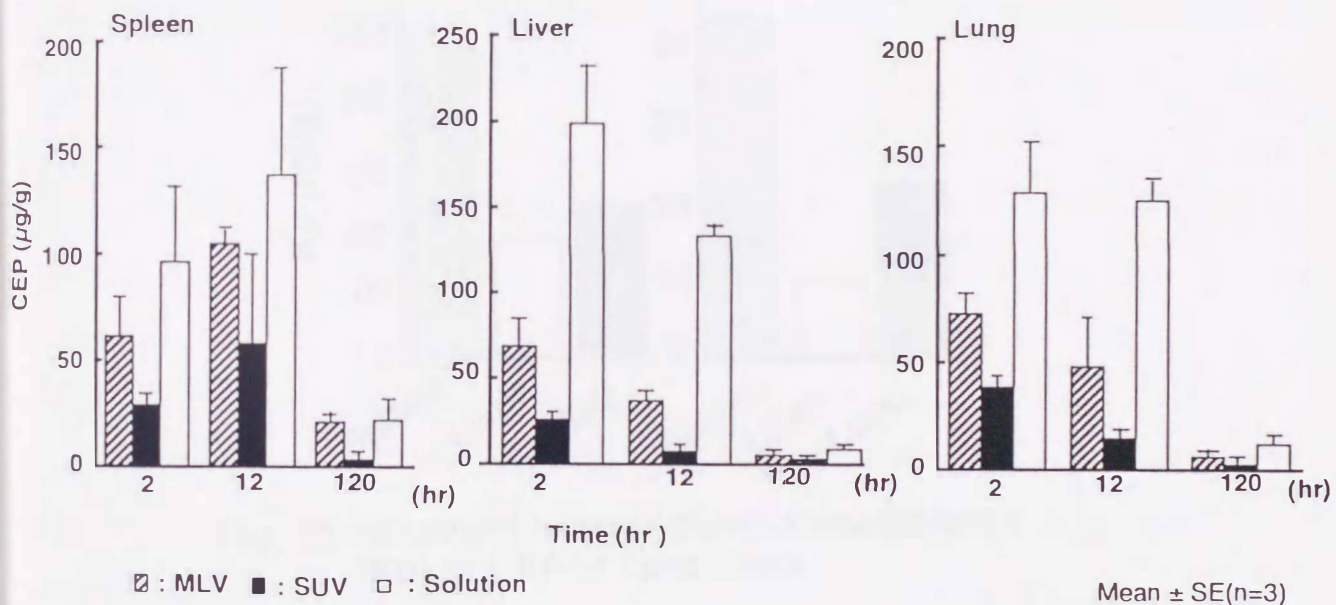


Fig. 16. Tissue concentrations of CEP after intraperitoneal injection in solution or liposome

3-3. CEP含有リポソームの組織選択性

CEPの各組織における濃度の時間的変化を求め、モーメント法によりAUCを算出した。このようにして求めた AUC_{tissue} と AUC_{plasma} の比で各組織への選択性を示す指標となる K_p 値をMLVとSUVで検討した (Fig.17)。その結果、CEPを含有するMLVあるいはSUVでは肝臓や肺に比べ脾臓への選択性が顕著に高った。また、 K_p の絶対値よりMLVとSUVの組織選択性を比較した場合には、いずれの組織においてもMLVを用いた方が数倍ほど高くなることが判った。

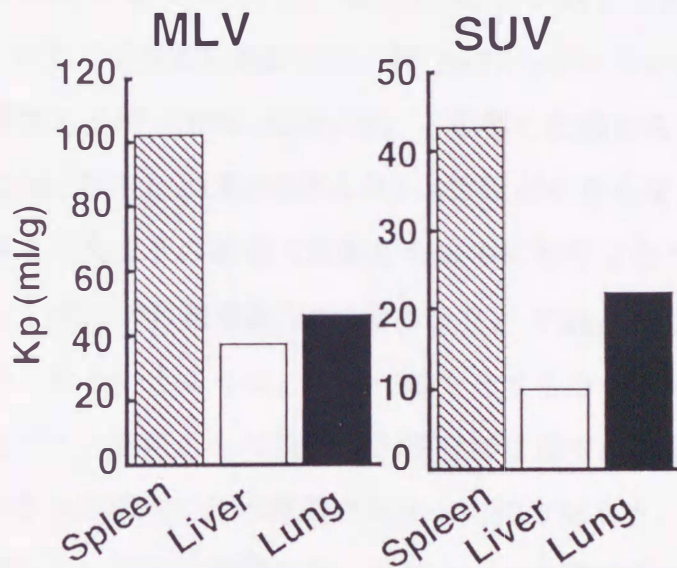


Fig. 17. Apparent tissue / plasma coefficients (K_p) of CEP in liposomes

4. 考 察

前章ではCEPを溶液として投与するより、リポソームに含有させて投与する方が抗体産生増強効果が優れていることを示した。そこで、CEP含有リポソームの免疫調節作用と体内動態との関係を検討するため、CEPの血漿中濃度推移ならびに脾臓や肝臓、肺への組織移行について検討を加えた。

CEPの血中動態は、溶液として投与した場合とリポソームに含有させた場合で大きく異なっていた。 $t_{1/2}$ や MRT は溶液に比べリポソームの場合の方が大きく、血中滞留性が上昇していることが示された。また、血漿中の T_{max} から、CEPが比較的速く腹腔内から吸収されることが考えられた。腹腔内投与されたCEP溶液の CL_{tot} は約92 ml/hr/body で、マウスの体重を考慮すると約 3680 ml/hr/Kg となり、ヒト⁵⁴⁾ の静注投与の報告より算出した約 4800 ml/hr/Kg と近似した値であった。CEP含有リポソームの V_{dss} と CL_{tot} をみるとCEP溶液より3-4倍ほど小さくなっていた。これはCEPがリポソームに含有されたままの状態でも腹腔から血中に移行したためと考えられる。AUCを比較してみると、MLVでは溶液投与の5倍となり、 T_{max} は 24 hr と遅くなっており、直接血液系に移行したというよりは、リンパ節を介するなどして間接的に血中に移行したと考えられる⁵⁷⁾。溶液として投与した場合には速やかに腹膜より吸収される為、リポソームに含有させた場合に比べ吸収が早かったのであろう。

CEPの体内動態については、脾臓や肺、肝臓といった細網内皮系の細胞に富む臓器内濃度が一般に高くなることが知られている⁵⁸⁾。そしてCEPは脾臓や骨髄、胸腺、リンパ節といった組織のリンパ球やマクロファージ、樹状細胞と直接接触することによって生体防御を補助するものと考えられている⁵⁸⁾。そこで、リポソーム製剤の組織移行性の指標 (K_p 値) を算出するなどして、細網内皮系の細胞に富む臓器への組織分布を検討した。その結果、脾臓における滞留性が他の組織に比べ高い傾向にあり、とくにMLVの場合には顕著であることが判明した。しかし、溶液として投与した場合の脾臓への組織移行も良好であることも判った。CEPは他の組織よりも標的臓器である脾臓へ移行しやすいといえる。

一般にリポソームは肝臓や脾臓などの臓器に取り込まれ易く、細網内皮系やマクロファージなどを標的部位としたBRMのような薬物の運搬体として適している⁴⁴⁾ といわれ

る。また、リポソームの細網内皮系への取り込みには粒子サイズや荷電、投与量、脂質組成が影響するといわれている⁵⁹⁾。脾臓ではリポソームの取り込みは粒子サイズに依存することが知られており、SUVリポソームよりMLVリポソームが取り込まれ易いと報告されている⁶⁰⁾。今回の結果では、SUVよりMLVを用いた方がCEPの脾臓への移行性が高かったことから、腹腔内からリポソームの形態を保ったまま体循環中に移行した可能性が支持される。

CEP含有リポソームの免疫調節作用と体内動態の特性との関係を考察することが重要である。当初、脾臓への移行性の増大が抗体産生の増強効果と関連している可能性が考えられたが、CEPはもともと細網内皮系に富む臓器に移行し易いので溶液として投与した場合にも脾臓への選択性がかなり高いことが示された。CEPを溶液とした場合とMLVに含有させた場合で、標的組織としての脾臓に残存するCEP濃度は同程度であることから、CEPの抗体産生を効率的に増強するために必ずしも脾臓中CEP濃度が重要ではないことが判る。これらの事実を考慮すると、リポソームを用いることによるCEPの血中滞留性の向上とともに、CEPとリポソームの共存によってマクロファージやリンパ球との反応性が質的に高くなったものと推察される。しかし、今回はリンパ系組織として脾臓しか検討していないので、他のリンパ系組織としてリンパ節などにおける組織分布などが抗体産生に影響を及ぼした可能性については否定できない。

第4章 CEP含有リポソームのマクロファージ貪食能におよぼす影響

1. 緒言

CEPは脾細胞のNK活性や肺胞マクロファージ活性を増強すること^{61,62)}が種々の実験系で明らかにされており、Biological response modifier (BRMs) のひとつと考えられている。多くのBRMsは末梢血や脾臓、腹腔浸出細胞のNK活性の増強とマクロファージの細胞傷害活性を増強することが知られており、CEPは低分子の免疫活性化剤であるムラミルペプチドと同様に補体を活性化させマクロファージの貪食能を上昇させる作用をもつことが報告されている⁴³⁾。CEPの免疫系に対する作用を更に高めるべく、CEPを含有させたりポソームを試作し、その物理化学的性質や抗体産生増強効果、体内動態について検討を加えた結果を前章までで示した。本章では、免疫調節作用の一つと考えられ生体内の異物処理機構としても重要なマクロファージの貪食能に及ぼすCEP含有リポソームの影響について検討を加えた。

2. 実験材料と方法

2-1. 試料および試薬

CEPの原末は化研生薬社より提供を受け、コレステロール(Chol) は、和光純薬より購入した。抗原として用いた23価肺炎球菌莢膜多糖は萬有製薬社製を用いた。また、卵黄L- α -フォスファチジルコリン(PC)は日本油脂の製品を用いた。ラテックスビーズ(IMMUTEX G0401: 粒径 $1.0\mu\text{m}$)は日本合成ゴムの製品を用いた。また、FBS (Fetal Bovine Serum) は General Scientific Laboratories 社製を用いた。硫酸カナマイシンは明治製薬社製を用いた。その他の試薬は和光純薬または半井化学の特級品を使用した。

2-2. 実験動物

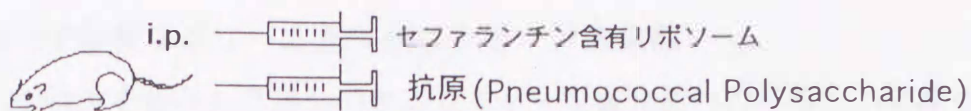
近交系マウスの雄性 BALB/c Cr(7-8)週令を Shizuoka Laboratory Animal Center から購入し、水及び標準固形飼料を自由に摂取させ、実験に供した。

2-3. リポソームの調製

前述した方法に準じてCEP含有リポソームを調製した。調製したリポソームは動的光散乱法によるレーザー粒径解析システム（大塚電子、LPA-3100/3000型）を用いて25℃で解析し、平均粒子径を算出した。なお、PC/Chol比7:2の場合、平均粒子径はSUVで60 nm、MLVで1.6 μ mであった。

2-4. 腹腔マクロファージ貪食能の測定

腹腔マクロファージの貪食能の測定方法の概要をChart.3に示す。マウスに抗原0.05 μ gを腹腔内に投与し、続いてCEP溶液もしくはCEP含有MLVの懸濁液200 μ lを腹腔内に投与した。投与後3、4、7日と経日的にマウスをエーテル麻酔下で屠殺した。温度0℃に冷却したHanks液5mlを腹腔内に急速注入し、腹壁をマッサージした後、腹腔内に侵出して来る細胞（peritoneal exudate cell；PEC）を含むHanks液を滅菌済み丸底スピッツ（栄研機材）に回収した。これを遠心機（05PR-22型、日立）で1,000 \times g、4℃で10分間遠心し上清を除き、冷Hanks液2mlを加え懸濁した。細胞を計数した後、Hanks液を加えて細胞濃度を 1.5×10^6 /mlと一定にした。PECを含むHanks液に容量比400:1の割合でlatex beadsを含有するリン酸緩衝液（PBS, PBS/latex beads容積比12.5:1）を加え、5%CO₂インキュベーター（LNA-Ⅲ、TABA I製作所）を用い37℃、2時間インキュベート後、1,000 \times g、4℃で10分間遠心し上清を除いた。沈渣に冷Hanks液4mlを加え懸濁する洗浄操作を2回行った。洗浄して得られたPECを塗付標本とし、さらに無水メタノール中に浸漬し、室温で1~2分間固定した後、風乾した。乾燥標本は室温でGimsa液1mlに10分間浸漬し、水洗後乾燥して試料とした。油浸顕微鏡用オイル（immersion oil for microscopy, nd=1.516、23℃、オリンパス光学工業）および油浸レンズを用いた光学顕微鏡（OLYMPUS BH-2、オリンパス光学工業）で細胞数ならびに細胞内に取り込まれたlatex beadsを計数しphagocytosis (%)を算出した⁶³⁾。有意差検定にはStudentのt検定法を用いた。



マウス (Balb/c, ♂, 7~8週令)

↓ Hanks液を5 ml 腹腔に注入

腹腔内浸出細胞 (peritoneal exudate cells; PEC)

↓ Culture with latex beads

光学顕微鏡により細胞数とLatex beadsの計測

$$\text{Phagocytosis percents} = \frac{\text{Cell number of latex beads ingested}}{\text{Total number of cell}} \times 100$$

Chart 3. 腹腔マクロファージ貪食能測定法

3. 実験結果

3-1. CEPの投与と腹腔マクロファージの細胞数

CEP投与後4日目に得られたPEC細胞数を Table.2 に示す。CEPを溶液あるいはリポソームとして投与しても、細胞数に有意な変化は認められなかった。これはCEPやリポソームの投与では、PEC数そのものには影響せず、マクロファージを腹腔内に誘導する作用はないことを示している。

Table 2. Number of peritoneal macrophages after liposome injection

	CEP (mg/mouse)	cell number (× 10 ⁶ /mouse)
Solution	0	1.24 ± 0.07
	0.2	1.42 ± 0.49
	2	1.39 ± 0.09
SUV	0	1.39 ± 0.05
	0.2	1.36 ± 0.02
	2	1.36 ± 0.04
MLV	0	1.39 ± 0.09
	0.2	1.29 ± 0.08
	2	1.59 ± 0.23

Antigen (0.05 μg) and liposome were injected i.p. to BALB/c mice.

Each value represents the mean ± SD of four mice.

3-2 CEP含有リポソームとマクロファージ貪食能

CEP含有MLVを投与した場合のマクロファージ貪食能への影響を、抗原を投与した場合と投与しない場合について比較検討した。マクロファージ貪食能は抗原の存在に影響を受けず、CEP量に依存して貪食能を増加させた。結果をFig.18に示す。

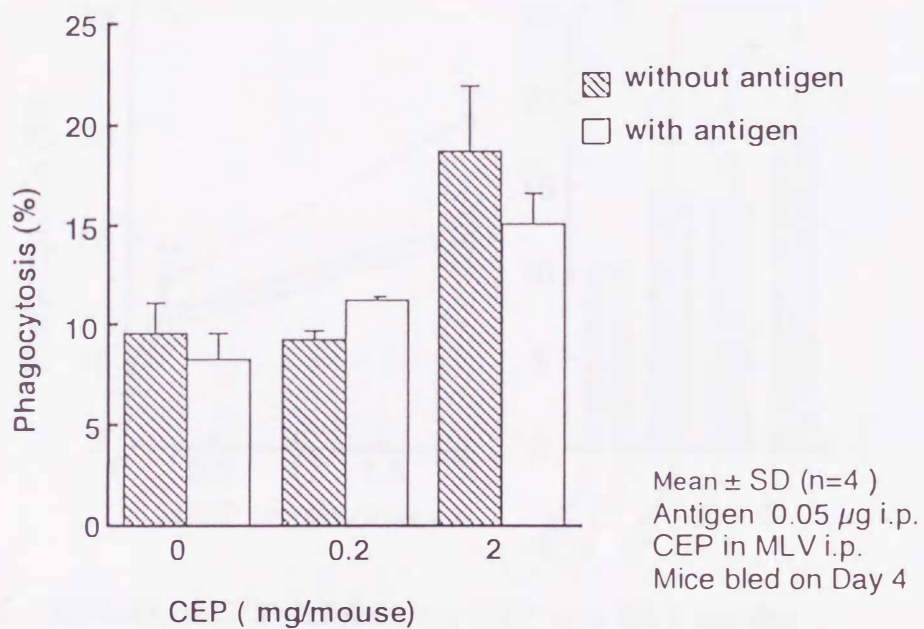


Fig.18 . Liposomal CEP enhanced the phagocytosis of peritoneal macrophages in the absence of antigen

3-3. CEP 含有リポソームの形態と腹腔マクロファージの貪食能

0.2 mg あるいは 2 mg の CEP を直接投与した場合と、SUV あるいは MLV に包含させた場合の結果を Fig.19 に示す。いずれの場合でも腹腔マクロファージの貪食能は CEP 量に依存して増強された。CEP 含有 MLV は CEP 含有 SUV や CEP 溶液を投与した場合に比べ、有意に腹腔マクロファージ貪食能を増強した。

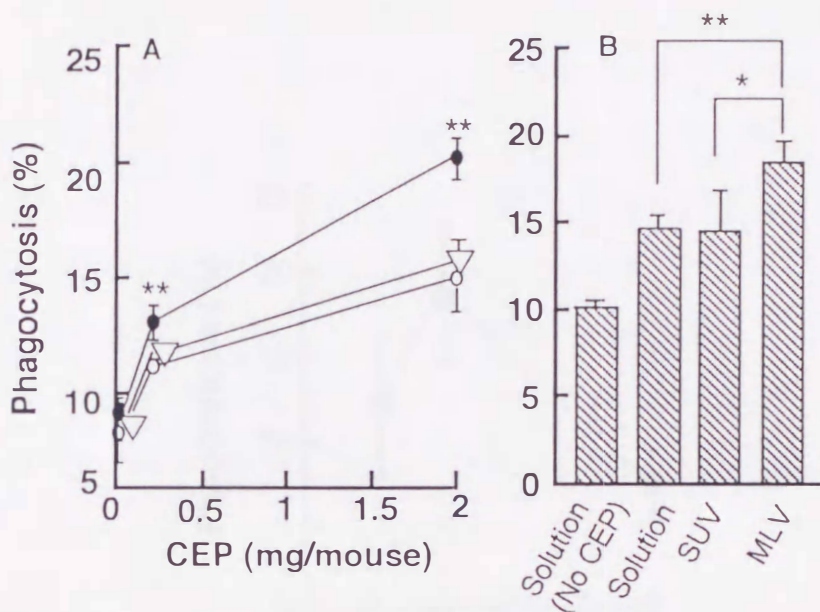


Fig. 19. Effects of CEP-containing SUV and MLV on the phagocytotic activity of peritoneal macrophages

Antigen ($0.05 \mu\text{g}$) and / or somal and non-liposomal) were injected i.p. to BALB/c mice. Animals were bled on Day 4 after injection, and phgocytosis response was measured by latex beads (panel A). In panel B, the amount of CEP was fixed at 2 mg. Each value represents the mean \pm SD of four mice.

○: CEP-solution ▽ : CEP-containing SUV ● : CEP-containing MLV

** CEP-MLV vs. CEP-solution ($p < 0.01$).

* CEP-SUV vs. CEP-MLV ($p < 0.05$).

3-4. CEP含有MLVによる腹腔マクロファージの貪食能増強の経時変化

CEP 2 mg を含有するMLVをマウスに投与し、3日、4日、7日後に得られた腹腔マクロファージの貪食能を latex beads の取り込みを指標とした場合の経時変化を Fig.20 に示す。投与4日後では、3日後より貪食能は高くなる傾向が認められた。また、7日後には貪食能が4日後より低下することが判明した。CEP含有リボソームの抗体産生の経時変化もこの貪食能の経時変化と似た挙動を示したことから、両者に関連性の有ることが示唆された。

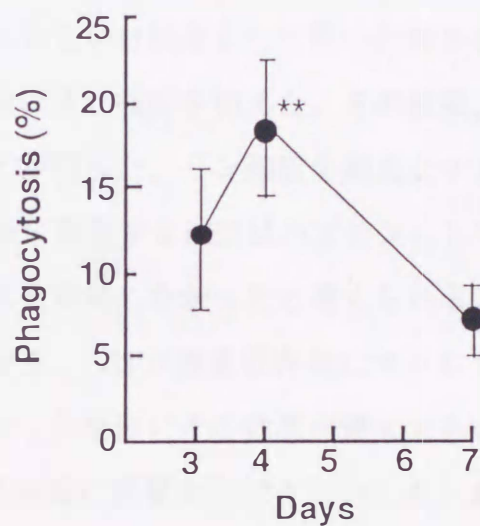


Fig. 20 Time course of the liposomal CEP-enhanced phagocytosis of peritoneal macrophages

CEP 2mg in MLV i.p.

Each point represents the mean \pm SD of four mice.

** Day 4 vs. Day 7 ($p < 0.01$).

4. 考 察

CEPの免疫賦活作用を高めるためにCEP含有リポソーム製剤を試作し、その性質および効果について検討した結果、マウスを用いた実験では優れたIgM抗体産生増強作用のあることを見出した。この作用機序に関しては、リポソーム中に含有させることによるCEPの血中滞留性の向上、CEPの免疫担当細胞への移行性の向上あるいはマクロファージの活性化⁴³⁾など様々な要因が考えられる。

本章では、マクロファージ機能の指標として貪食能を取り上げ、CEP含有リポソームが腹腔マクロファージ機能を活性化するか否か検討を加えた。まず実験に用いた投与量で、CEP含有リポソームあるいは抗原として用いた肺炎球菌莢膜多糖がマクロファージの腹腔内侵出に影響を及ぼすか検討を加えた。その結果、両者の投与は腹腔内侵出細胞数に影響を与えないことが判った。リン脂質を組成とするリポソームは免疫原性が低く⁶⁴⁾、またリポソーム膜中に存在するCEPはハプテンとしては作用しないので、マクロファージの腹腔内への浸出を誘発しなかったと考えられる。CEPを溶液あるいはリポソームに含有させ投与した結果、CEPが濃度依存的にマクロファージ貪食能を増強すること、またMLVに含有させ投与した場合にその効果が最も大きいことが判った。一方、抗原の投与はマクロファージ貪食能に影響を及ぼさないこと、およびSUVとして投与した場合と溶液として投与した場合とに大きな差が認められなかったことから、リン脂質の存在が貪食能に影響を与えているとは考えにくい。MLVはSUVよりもマクロファージに効率良く貪食される³⁹⁾ことが報告されており、このことからCEP含有MLVのマクロファージに対する効果が強く出た可能性が考えられる。また、正電荷を有するリポソームは、中性あるいは負電荷のリポソームと比し細胞との相互作用が強い⁴⁹⁾ことが知られている。正に荷電しているCEPを含有するリポソームも、MLVの場合は、免疫細胞の機能が強まり、CEPの抗体産生作用を増強したと推察される。

マクロファージは抗原を貪食し抗原提供細胞として働き、免疫応答に関与することが知られている⁶⁵⁾。リポソームをアジュバントとして用いた場合、抗原を認識したヘルパーT細胞では、interleukin-2の分泌が日を追って誘発され4日後にこれが観察された⁶⁶⁾との報告もある。本実験系では、CEP含有MLV投与による腹腔マクロファージの貪食能

は4日後に明確に認識され、この時期にマクロファージ活性が強くなったものと考えられる。このような経時的变化は、前章で述べたIgM抗体産生の挙動と類似しており、腹腔マクロファージの活性化がIgM抗体の産生を増大させた可能性も高いと考えられる。

総括および結論

CEPをリポソームに含有させて投与すると、CEPの血中滞留性が向上して半減期が延長し、溶液として投与した場合に比べAUCも約5倍増加した。また、本剤の投与でCEPは肝臓や肺よりも脾臓に多く蓄積されることが判った。MLVとSUVとでは、いずれの組織でもMLVを用いた方が移行性の良いことが判明したが、CEPを溶液として投与しても各組織への移行はかなり良好であった。すなわち、CEP含有リポソームの抗体産生やマクロファージ貪食能の増強作用は、脾臓への選択性の高さのみでは説明できず、CEPの血中滞留性の向上も、これに関与する要因の一つと考えられる。このようなCEPの体内動態は、CEP含有リポソームが優れた薬物運搬体となりうる可能性を支持するものである。

CEP含有リポソームは、特にMLVで抗原特異的IgM抗体産生ならびにマクロファージの貪食能をCEP溶液より効率良く増強した。また、これらの機能の経時的挙動ならびにMLVやSUVへの反応パターンが類似していることから、CEPによる特異抗体の産生増強とマクロファージ貪食能の亢進に何らかの関連性のあることが示唆された。リポソームは一般にマクロファージなどの細網内皮系に取り込まれ易いことが知られており、またマクロファージは広範な免疫反応の発現と制御に関与していることが知られている。さらに、CEPはマクロファージ活性化能を有することも既に知られている。このような点と本研究の結果を総合すると、リポソームにCEPを含有させることによりCEPが長い時間マクロファージなどの免疫担当細胞と接触・作用することで、それらの機能を亢進したと考えられる。ただ溶液として投与した場合もCEPが脾臓へ集積しやすいことが確認されているので、CEPと細胞との接触の様式は溶液とリポソームの場合で異なっている可能性も高い。例えば、溶液状態のCEPは直接的に細胞形質膜に進入することが予測されるのに対して、リポソームに包含されたCEPでは細胞形質膜への分布と共に細胞内へのphagocytosisが起こることにより、CEPの生理機能発現に差異が生じたとも考えられる。

本研究の結論として以下の3点が明らかになった。

1. CEP含有リポソーム製剤は、CEPの含量や調製方法により薬物の放出を制御することが可能なことから、有用な薬物担体となる可能性がある。
2. Biological response modifier 作用を有するCEPを含有した本製剤は、特にMLVを用いた場合、抗体産生能およびマクロファージ貪食能を顕著に増強する。
3. CEP含有リポソーム製剤はCEPの血中滞留性を向上させ、CEPとリポソームの共存によって免疫担当細胞の機能を亢進する。

またCEPは免疫機能亢進作用の他に、近年P-糖蛋白質阻害作用を示すことが報告されている。そこで、抗癌剤などとの併用あるいは抗癌剤を内包するCEP含有リポソーム製剤を用いることにより、癌細胞の多剤耐性を克服して抗癌剤の効果を高め、かつ免疫担当細胞の機能を亢進させ得ることも予測できる。今後、本製剤の製剤学的安定性や免疫機能亢進のメカニズムの解明を含めた基礎的研究を充実し、将来の臨床応用の可能性を追求してより適正な医療の実現に貢献して行きたい。

謝 辞

本研究の機会を与えられ、終始御指導と御鞭撻を賜りました富山医科薬科大学薬剤部堀越 勇教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究に対して多大なる御助言、御協力をいただきました富山医科薬科大学薬学部 上野雅晴教授、薬剤部 足立伊佐雄助教授ならびに薬剤部 佐藤 均助手に厚く御礼申し上げます。

さらに、共同研究者として本研究を支えていただきました佐藤康裕修士、芝田由香子学士、長谷川麻里学士、家田直幸学士、浅野史佳学士に感謝いたします。

最後に、様々な御便宜を計っていただきました中川輝昭副薬剤部長をはじめとする薬剤部の職員各位に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 近藤平三郎, 山下泰朗, 廣松一郎 : 薬学雑誌, 54, 620 (1934).
- 2) 長谷川秀治 : 結核, 13, 1720 (1935).
- 3) T. Sato, Y. Kanaho, T. Fuji : Cell Struct. Funt., 15, 155 (1980).
- 4) Y. Kanaho, T. Fuji : Biochem. Biophys. Res. Comm, 106, 513 (1982).
- 5) K.Utsumi, M.Miyahara, K.Sugiyama, J.Sasaki : Acta Histochem.Cytochem., 9, 59 (1976).
- 6) K.Utsumi, M.Miyahara, M. Inoue, M. Mori, K.Sugiyama, J.Sasaki : Cell Struct. Funt., 1, 133 (1975).
- 7) 杉山勝三, 佐々木順造, 内海耕慥, 宮原正信 : アレルギー, 25, 685 (1976).
- 8) 杉山勝三, 吉田裕昭 : 基礎と臨床, 18, 33 (1984).
- 9) S. Nagatsuka, S. Nakazawa : Biochim. Biophys. Acta, 691, 171 (1982).
- 10) N.Shiraishi, Y.Morimoto, K.Utsumi, T.Arima, K.Aono, B.Inouye : Physiol.Chem. Phys., 12, 299 (1980).
- 11) 沖増英治, 枝重圭祐, 北岡由美, 内海耕慥 : 第12回アルカロイド研究会報告集, 72 (1987).
- 12) Y.Nihasi, Y.Koga, H.Gondo, K.Taniguchi, K.Nomoto : Immunobiology 170:351 (1985).
- 13) 小野稔, 卜部貴光, 山本浩史, 立本昭彦, 渡辺良平, 猶本良夫, 日伝晶夫, 折田薫三, 田中紀章 : 消化器と免疫, 21, 193 (1988).
- 14) M.Hirai, K. Tanaka, T. Shimizu, Y. Tanigawara, M. Yasuhara, R. Hori, Y. Kakehi, O.Yoshida, K. Ueda, T. Komano, K. Inui : J. Pharmacol. Exp. Ther., 275: 73 (1995).
- 15) 野本亀久雄 監修: アルカロイド研究会REVIW, 1986, p.17-20
- 16) P.I.Lelkes, P.Friedmann : Biochim.Biophys.Acta, 775, 395 (1984).
- 17) J.Senior, G.Gregoriadis : Life.Sci., 30, 2123 (1982).
- 18) C.Kirby, J.Clarke, G.Gregoriadis : Biochem.J., 186, 591 (1980).
- 19) K.Inoue : Biochim.Biophys.Acta, 339, 390 (1974).
- 20) G.Gregoriadis, C.Davis : Biochem.Biophys.Res.Comm., 89, 1287 (1979).
- 21) A.T.Diplock, J.A.Lucy, M.Verrinder, A.Zieleniewski : FEBS lett., 82, 34 (1977).
- 22) J.Sunamoto, Y.Baba, K.Iwamoto, H.Kondo : Biochim.Biophys.Acta, 833, 144 (1985).

- 23) H.J.Krause, R.L.Juliano, S.Regen : J.Pharm.Sci.,76,1 (1987).
- 24) A.Watts, D.Marsh, P.F.Knowles : Biochemistry,17,1792 (1978).
- 25) M.Ueno, C.Tanford, J.A.Reynolds : Biochemistry,23,3070 (1984).
- 26) 寺田弘, 吉村哲郎 編著 : ライフサイエンスにおけるリポソーム—実験マニュアル, シュプリンガー・フェアラーク東京, 1992, p173-181
- 27) 伊藤均 : 医薬ジャーナル, 21, 79 (1985).
- 28) 伊藤均, 志村圭志郎 : 癌と化学療法, 12, 2145 (1985).
- 29) H.Ito, K. Shimura : Jpn. J. Pharmacol,41,307 (1986).
- 30) 伊藤均, 志村圭志郎 : 漢方医学, 10, 18 (1986).
- 31) 伊藤均 : 現代医療学, 2, 44 (1986).
- 32) 伊藤均, 志村圭志郎 : 癌と化学療法, 12, 2149 (1985).
- 33) 志村圭志郎, 伊藤均 : 漢方医学, 8, 13 (1984).
- 34) 笠島 武, 土橋陸夫, 柳沼良夫, 小島瑞 : 日本網内誌,14, 1(1974).
- 35) 野本亀久雄, 榎殿玲子, 武谷健二 : 日本臨床,31,3548 (1973).
- 36) 小野 稔, 藤原良一, 田頭良章, 松井武志, 大橋勝英, 上川康明, 田中紀章, 小長英二, 折田薫三 : 癌と化学療法,8,1565 (1981).
- 37) 新上哲夫, 前田栄樹, 橋本修治 : 消化器と免疫, 11, 201 (1983).
- 38) G.Gregoriadis, D. Davis, A. Davies : Vaccine, 5,145 (1987).
- 39) M.Khater, J.Macial, C.Genyea, J.Kaplan : J.Exp.Med 164:1505 (1986).
- 40) 高橋金彌, 志村壬一, 宮沢淑, 伊藤正夫, 岡本容子, 木内恒次郎 : 総合医学,6,1125 (1949).
- 41) C.F.Nathan, H.W.Murray, Z.A.Cohn : N.Engl.J.Med.,303,622 (1980).
- 42) 志村圭志郎 : 薬理と治療, 17,5461 (1989).
- 43) K .Shimura : Japan. Pharmacol. Ther., 17, 239 (1989).
- 44) S.Sone : Biochim Biophys Acta 823:227 (1986).
- 45) I.Fidler : Cancer Res ,45,4714 (1985).
- 46) M.J.Hsu, R.L.Juliano : Biochem.Biophys.Acta.720,411 (1982).
- 47) T. Kobayashi, H. Itabe, K. Inoue, S. Nojima : Biochim.Biophys.Acta.,814,170 (1985).
- 48) 秋山伸一 : 抗癌剤のはたらき—課題と展望, 共立出版, 1991, p108-110

- 49) D. Timothy, D. Heath, E. Cairid, R.E.Ryman : Biochem.Soc.Trans. 4,129 (1976)
- 50) S.Kanagasaki, T. Tomita, T. Yasuda : Recent Adv.RES Res., 21, 190 (1983).
- 51) R. C.Roozmond, D. C. Urli : Biochim. Biophys. Acta, 689, 499 (1982) .
- 52) N.M. Wassef, C.R. Alving : Chem. Phys. Lipids, 64, 239-48 (1993).
- 53) G.L.Berestein, L.Kasi, MG.Rosenblum, T.Haynie, M.Jahns, H.Glenn, R.Mehta, GM.Mavligit, EM.Hersh : Cancer Res 44,375 (1984).
- 54) K.Yasuda, M.Moro, A.Ohnishi,M. Akasu,A. Shishido,M. Tsunoo : Jpn. J.Clin. Pharmacol. Ther., 20: 735 (1989).
- 55) K.Yamaoka, T. Nakagawa, T. Uno : J. Pharmacokinet. Biopharm, 6, 547 (1978).
- 56) H. Sato, S. Sato, Y.M.Wang, I. Horikoshi : Comp. Methods Prog. Biomed., 50,43 (1996).
- 57) M.F.Flessner, R.L. Dedrick, J.S. Schultz : Am. J. Physiol., 248: H15 (1985).
- 58) M.Yamakawa, Y.Imai, T.Kasajima : Drug Metab.Dispos., 2 : 275-290 (1987).
- 59) 寺田弘、吉村哲郎 編著 : ライフサイエンスにおけるリポソームー実験マニュアル, シュプリンガー・フェアラーク東京, 1992, p316-334
- 60) D.Liu, A.Mori, L.Hung : Biochem.Biophys.Acta.1066,159 (1991).
- 61) 森岡 栄, 小野 稔, 田中紀章, 折田薫三 : 癌と化学療法, 12,1470 (1985) .
- 62) 小野 稔, 卜部貴光, 村上 仁, 立本昭彦, 大野 聡, 山本孝史, 渡辺良平, 日伝 晶 夫, 田中紀章, 折田薫三 : 癌と化学療法,15,127 (1988).
- 63) K.Shimura, H.Ito, T.Shiomi, H.Hidaka, K.Nishioka : Immunological .Comun. 12,363 (1983).
- 64) S.L.Snyder, W.E.Vannier : Biochim .Biophys.Acta. ,772,288 (1984).
- 65) R.H.Schwartts, A.Yano, W.E.Paul : Immunol.Rev.,40,153 (1978).
- 66) E.Shahum, HM.Theren : Int J.Immunopharmac. ,17, 9 (1995).

付 記

本稿の内容は、下記に報告した結果に基づいて作成した。

第 1 章

篠田健一、足立伊佐雄、上野雅晴、堀越 勇, “リポソームの膜透過性及び粒子径に及ぼすセファランチンの影響”, 薬学雑誌, 110, 186—190 (1990).

第 2 章

第 1 節

篠田健一、佐藤康裕、佐藤 均、足立伊佐雄、堀越 勇, “セファランチン含有リポソームの免疫調節作用に関する研究-抗体産生増強効果を中心として”, Drug Delivery System 10, 43—48 (1995).

第 2 節

篠田健一、佐藤 均、足立伊佐雄、堀越 勇, “セファランチン含有リポソームの免疫調節作用に及ぼす負電荷リン脂質組成の影響”, 薬剤学 56, 163-168 (1996).

第 3 章

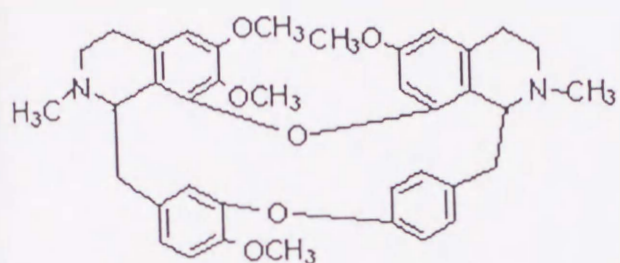
K.Shinoda, H.Sato, I.Adachi, and I.Horikoshi, “Disposition of Liposomal Cepharanthine after Intraperitoneal Administration in Mice”, Drug Metab.Dispos. 12, 1—4 (1997).

第 4 章

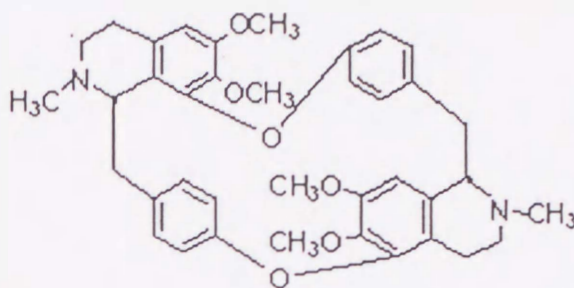
篠田健一、佐藤 均、足立伊佐雄、堀越 勇, “セファランチン含有リポソームのマクロファージ貪食能に及ぼす影響”, Drug Delivery System 12, 57—61 (1997).

付 録 セファランチン製剤に含有のその他のアルカロイドの化学構造

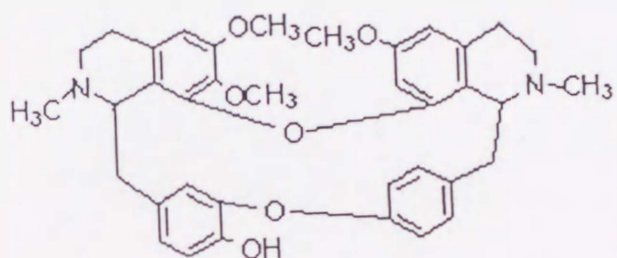
Isotetrandrine



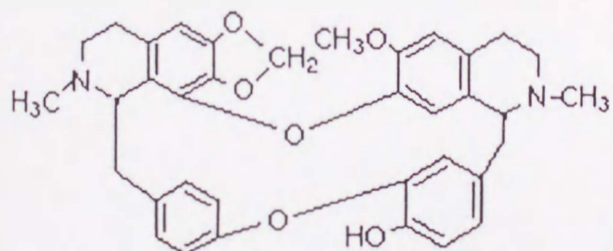
Cyleanine



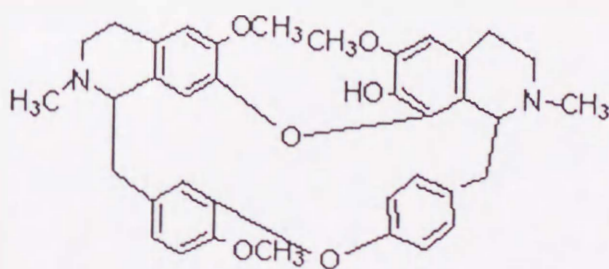
Berbamine

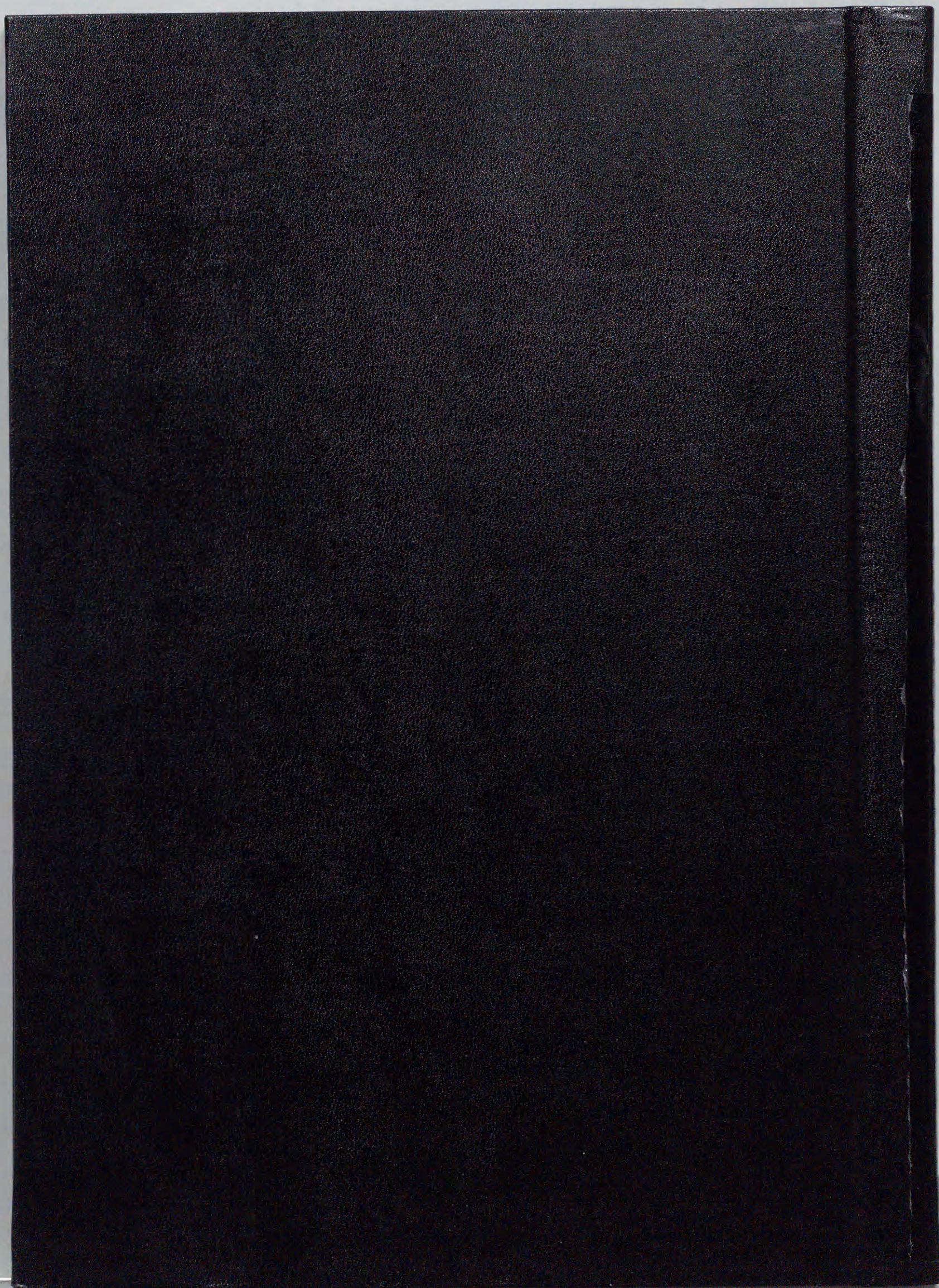


Cepharanoline



Homoaromoline





inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

