

## 人工血液

第11巻 第2号 2003年7月

総説	ナノバイオマシン .....	西谷孝子	132
	高分子型薬剤の現状 .....	前田 浩	137
	$\alpha_1$ -酸性糖蛋白質の血液循環系に及ぼす 作用 .....	小田切優樹	145
	リポソームと補体系との相互作用 .....	阿部英樹	153

## ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 11 No. 2 June, 2003

	<i>Review: Nano-biomachine .....</i>	<i>Takako Nishiya</i>	<i>132</i>
	<i>The State of the Art of Polymeric Drugs .....</i>	<i>Hiroshi Maeda</i>	<i>137</i>
	<i>Effects of <math>\alpha_1</math>-acid glycoprotein on blood circulation .....</i>	<i>Masaki Otagiri</i>	<i>145</i>
	<i>Interaction between complement system and liposomes .....</i>	<i>Hideki Abe</i>	<i>153</i>

# ナノバイオマシン

## Nano-biomachine

西谷 孝子

Takako Nishiya

### 和文抄録

ナノバイオマシン、即ち“分子アッセムブリーシステム”を構築するための手法、および分子アッセムブリー構築に用いられる材料について述べる。特に、量子ドット、金ナノ粒子、ナノシェル、デンドリマー、分子集合体、フラーレン、カーボンナノチューブについて、最近注目される技術を紹介する。

### Abstract

Rapid advances in our ability to probe, image and manipulate the properties of matter at the atomic scale.....together with emerging insights into structure, function and self-assembly in biological system.....is bringing to fruition the tremendous promise of nanotechnology first recognized by Richard Feynman over 40 years ago. In the next decade, current research into the science and technology of nanostructures will have a major impact on fields ranging from consumer electronics to space exploration and medicine. In this review, new materials, methods, and concepts used for construction of nano-biomachine will be discussed focused on quantum dots, nanoparticles, nanoshells, dendrimers, fullerene and carbon nanotube.

### Keywords

Nano-Biomachine, Quantum Dot, Nanoparticles, Nanoshells, Dendrimers, Fullerene, Carbon nanotube.

### 序

原子を組み上げ、新物質、新デバイス、新システムを作り上げるといふナノテクノロジーにおける“ボトムアップ的手法”では、量子力学の法則が支配する分子、原子の世界とマクロな世界に挟まれた境界領域における議論が必要である。おそらく10 - 25年後であろうが、シリコンエレクトロニクスが破綻すると、ナノテクノロジー応用の電子デバイスがそれに取って代わる可能性は高く、さらに、細胞の秘密を解き、究極的に小さいデバイス作りを目指す研究に向かいつつある。事実、ナノバイオはシリコン時代の後に現れるであろうナノコンピューターの発達に先行して、実用面での模索を始めている。ナノコンピューターが機能するには億や兆の数のトランジスタがすべて働かなくてはならないのとは対照的に、細胞内の活動を検出する場合、比較的少数の半導体ナノ標識で充分であり、このようなナノテクノロジー製品の先駆としてナノ粒子の応用がある。生命現象を司る分子機構を参考にした分子アッセムブリーシステム

の構築に必要な素材、部品としてのナノ粒子は、迅速な生物学的試験システムの確立のみならず、様々な病変を早期に捉えその情報を外部の受信装置に伝えるとともに、局所治療を成し遂げる極小のデバイスの開発にも利用の道が開かれつつある。さらに、薬物療法として、合成医薬などの従来の薬物に加え、遺伝子や種々のレセプター分子を含む生理活性蛋白質、抗原分子などを用いた効果的な遺伝子治療やサイトカイン療法、免疫、ワクチン療法や抗体療法などが増加し、さらに、生きた細胞を薬として治療に用いる再生医療、細胞性製剤などが現れ、薬物概念のパラダイムシフトが起こりつつある。Drug Delivery System (DDS) には、<sup>1)</sup> 標的指向化機能、吸収障壁克服機能 (必要な場所に)、<sup>2)</sup> 放出制御機能 (必要な量を)、<sup>3)</sup> 自己制御機能 (必要なときに) の3つの機能のシステム化が求められる。DDSのためのバイオナノマシンに必要とされるものは、上記の薬物概念のパラダイムシフトに対応し、かつDDSに求められる3つの機能に加え、薬物の体内動態制御にとどまらない、診断

機能や治療機能をも統合したシステムである。ここでは、このような観点から、ナノバイオマシンの構築につながる材料、技術、コンセプトを紹介する。

### 1) 量子ドット<sup>1-6)</sup>

CDプレーヤーの中では、無機半導体からできているレーザーダイオードの光がディスクの情報を読み取っている。このような無機半導体から切り出した、蛋白質ほどのサイズの半導体ナノ結晶は“量子ドット (Quantum Dot)”と呼ばれている。QDは、原子中の電子がある不連続なエネルギーレベルに拘束されるというルールに基づいた挙動をとる。有機色素分子は、基底状態の電子が励起状態に遷移するエネルギーとぴったり一致した光子 (フォトン) だけを吸収し、光子の吸収で励起した電子が低いエネルギー準位に戻る際に蛍光を発する。一方、ある程度の大きさを持つ半導体 (バルク半導体) では、電子のとり得る状態は明確な準位ではなく、2つの広いエネルギーバンドとなっている。このような材料では、2つのバンド間のギャップを飛び越えるのに十分なエネルギーならばすべて吸収されるため、広い範囲のエネルギーを吸収できる。つまり、試料にあてる光は特定の波長でなくてもよいが、光の放射に関しては、バンドギャップ間のエネルギーに対応する一つの波長の光しか放射しない。QDは、バルク半導体と有機色素分子の中間の性質を持つ。QDは、バルク半導体のようにバンドギャップの閾値以上のエネルギーを持つすべての光子を吸収し、QDが発する光は、バルク半導体とは異なり、ドットのサイズによって決まる。即ち、1種類の半導体材料からサイズの異なるドットを作れば、明確に異なる一群のカラーラベルが得られる。QDは、従来の有機色素分子に比べて対光性が強いので、より長時間スケールで細胞や組織を観察できる。又、様々な生体分子を異なるサイズのQDで標識し同じ光で励起すると、混在するすべての標識分子を異なる色で1度にモニターすることが可能である。様々な色を発する量子ドットを一つのラテックスビーズに詰め、ビーズに光を当て、発せられた蛍光をプリズムで分光すれば、ビーズ中の量子ドット組成に応じた波長と強度を持つスペクトルパターンが得られる。このカラーバーコードは量子ドットの組成ごとに異なるので、ビーズの識別、ひいてはそのビーズに結合しているプローブを特定できる。例えば、固有のバーコードビーズを結合した全遺伝子ライブラリーに遺伝子断片試料を加え、結合した遺伝子ライブラリーのスペクトルバーコードを読み取ることにより、試料中に含まれる遺伝子を決定することができる。

### 2) 金ナノ粒子<sup>7-10)</sup>

HAuCl<sub>4</sub>をcitrateで還元すると、直径1-200nmの金微粒子をえることができる。溶液中の特定の遺伝子を検出する手段としてこの金微粒子を用いる方法が考案されている。この方法では、標的配列の半分に結合するDNAが付いた金微粒子と、残り半分に結合するDNAが付いた金微粒子を作り、試料中に完全な標的配列を持つDNAがあれば、この2組の金微粒子上のDNA

断片の両方に結合して金微粒子が架橋される。密度の高い金微粒子ネットワークが構築されると、その光学的性質が著しく変化するため、溶液の色が赤から青へと変化するので、目視で確認できる。金微粒子の散乱光は、そのサイズに依存するので、サイズの異なる金微粒子を用いて、一度に異なるDNAの存在を確認することも可能である。また、金微粒子を付けたプローブDNAを、検出したいターゲットDNAに結合させて電気伝導度を変化させることにより、塩基配列が識別できる。Ag溶液を用いて伝導度変化を強調させると、その検出感度は500フェトム (10<sup>-15</sup>) モルと、注目すべき値となる。機能性分子の単分子層で覆われた金微粒子を、高分子を介して自己集合させて、構造を持つ集合体を作ることできる。集合体の大きさと形状は熱的にコントロールでき、ワイヤーやロットなどの多様な構造のモチーフを作れる可能性もある。材料に複数のスケールでの秩序を持たせることは、分子系を巨視的デバイスに応用する際に重要であり、非共有相互作用の選択的制御に基づく自己集合は、分子レベルでの構造を持つ系を創出するための強力な道具となる。金微粒子のDDSとしての応用として、細胞核の膜を通過できるサイズ (直径30nm) の金微粒子に、癌細胞を認識するペプチドと、エンドサイトーシスを引き起こすペプチドを付けて癌細胞と培養し、この金微粒子を細胞核へ侵入させることが試みられている。

### 3) ナノシェル<sup>11)</sup>

ナノシェルは、金でコーティングされたナノサイズのガラスビーズで、様々な波長の光を吸収するナノシェルを作ることができる。近赤外線は、生体組織中に数センチもの深さまで容易に到達するので、近赤外線を吸収するナノシェルを体内に注入し、体外から強い赤外線を当てると、ナノシェルを加熱することができる。温度感受性物質でできたカプセルに赤外線吸収ナノシェルと薬物を内包させて体内に注入すると、体外からの赤外線で熱せられたナノシェルによってカプセルが変形し、薬物が放出される。がん治療の分野では、癌細胞に対する抗体を結合したナノシェルを癌細胞近傍に局在化させ、赤外線照射により、正常細胞にくらべ熱に弱い癌細胞を特異的に消滅させることが試みられている。

### 4) デンドリマー<sup>12-14)</sup>

デンドリマーは、内側から外側へ次々に枝分かれしていく構造をしており、あらゆる方向に向かって枝が突き出ているので、内部には空間があり、その表面積は膨大である。薬物を患部へ運ぶナノ構造体として開発が進められている物質のなかで、デンドリマーが優れている点は、デンドリマー内の空間の大きさや構造を自在に調節できることである。即ち、内包したい治療薬やDNAなどのサイズに適した空間を、分子内に作り上げることができ、順次段階的に合成されるため、従来の高分子とは異なり、分子量が一定で分布が無く、分子サイズや形状まで予測がつく特徴を持っている。デンドリマーは通常の蛋白質と同じくらいの大きさであるが、共有結合で構成されているので、

蛋白質のように容易に分解、変性することはない。遺伝子治療の研究では、DNAを細胞内へ運ぶ能力を持った dendriマールが検討されており、この方法は、従来の遺伝子組換えウイルスを使う方法に比べ、安全性が高いと考えられている。また、最近では、コアの dendriマール周辺に、疾患部位へのターゲティング機能を付与した dendriマールやイメージング機能を付与した dendriマールなどの機能パーツを結合させる方法が進んでおり、治療目的に応じた診断、特定部位へのターゲティングなど個々の機能パーツの取替えが可能で、分子レベルでのテーラーメイドなマシンの構築が実現しつつある。 dendriマール内部に、分子インプリンティングの手法で、ゲスト分子を選択的に捕捉するホストを形成できることも報告され、上記の技術との複合化により、分子認識などの機能を備えた薬物キャリアーへの展開が期待される。分子インプリンティングは、高分子樹脂内にゲスト分子の型を抜き、ゲスト分子に対してテーラーメイド的に結合部位を作る方法である。この方法は、ゲスト分子の形だけでなく、ゲスト分子の持つ官能基と水素結合、静電的相互作用などを介した結合部位を高分子マトリックス内に構築し、ゲスト分子だけを選択的に認識するホスト分子を形成する手段である。近年では、架橋モノマー類を利用せず、高分子の組織体形成に着目した相変換インプリンティングやゲルによるインプリンティングも行われており、インテリジェントな高分子構築のための重要な手段となっている。

#### 5) 分子集合体<sup>15-19)</sup>

リポソームや水溶性高分子はDDSのための薬物キャリアーとして用いられており、これらが、肝臓や肺の細網内皮系により非特異的に血中から排除されることなく、十分な血中滞留時間を示すためには、これらのサイズがメゾスコピックサイズ(数十~150nm程度)であることや、表面をPEGなどの親水性高分子で修飾され、水中で優れた立体反発効果を示し、非特異的相互作用を抑制することが重要である。このような観点から、PEGを表面に固定化したりリポソームや、PEGと疎水性ポリマーからなるブロック共重合体から形成される高分子ミセルが良好な薬物キャリアーとして用いられており、これらにターゲティング機能を付与することや、刺激応答性を付与するなどのインテリジェント化が重要である。遺伝子治療分野においても、1999年にアデノウイルスベクターによる死亡事故が発生し、非ウイルスベクター開発が重要となっている。近年、HIV-1 Tatペプチドなどの塩基性ペプチドを用いた蛋白質や薬物の細胞内導入が注目されている。化学的架橋や遺伝子操作を用いてこれらの配列を導入することにより、分子量が数万の蛋白質が細胞内に容易に導入されることがわかり、細胞機能の解明や薬物伝達のための新しい手段として期待されている。多くのアルギニンに富む塩基性ペプチドは、従来知られているエンドサイトーシスとは異なるメカニズムで、効率的かつ膜に損傷を与えずに細胞膜を透過するので、このような性質を利用した蛋白質、薬物の細胞内導入は、様々な細胞機能の調節とメカニズム解明に応用可能であり、細胞生物学的研究において大きなポテ

ンシャルを有しており、新しいタイプの薬物輸送系として発展する可能性もある。導入できる分子としては、微小磁石、リポソーム、ペプチド、蛋白質の非共有結合的複合体、オリゴ核酸、天然物、ラジオアイソトープなどを挙げるができる。リポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与した膜融合リポソームを用いて、内包した遺伝子、蛋白質、高分子ナノスフェアなどを細胞内へ導入することも試みられている。

#### 6) フラーレン<sup>20,21)</sup>

フルーレンは、炭素原子が作る五角形の周りに六角形が配列した構造でできている球状炭素分子で、炭素原子が20, 36, 60, 70, 80, 84, 120 と集合したC<sub>20</sub>からC<sub>120</sub>などの巨大分子までである。フルーレンの内部は、炭素の電子雲で取り囲まれているが、C<sub>60</sub>やC<sub>84</sub>のような高次フルーレンの内部には、金属を内包することができ、電子構造的および材料物質的に興味深い性質を示す。また、後述の単層カーボンナノチューブ(SWCNT)にフルーレンが内包された“ピーポット”を高収率で合成することができ、高次フルーレンや金属内包フルーレンを内側に包み込んだSWCNTを容易に生成することができる。フルーレンのなかで代表的なC<sub>60</sub>は、直径1nmの炭素原子だけでできているため疎水性で、光エネルギーを吸収しやすく、化学反応性が高い。近年、有機化学反応によって、C<sub>60</sub>の球面上にカルボン酸やアミンなどの有機官能基を結合させた有機フルーレンに変換する手段が進展し、有機フルーレンを用いた医薬品や機能材料の開発を目指した研究が活発になっている。フルーレンカルボン酸化合物は、光照射により活性酸素を発生し、細胞の増殖阻害、DNAの切断、HIVプロテアーゼ阻害などを引き起こすことがわかっている。樹状の官能基を持つフルーレン dendriマールは、既存の治療薬が効かなくなった変異株のHIVに対しても効果がある。有機フルーレンは、活性酸素と速やかに反応するため、抗酸化作用を示す。神経伝達物質であるグルタミン酸が大量に分泌されると、神経細胞の表面にあるグルタミン酸受容体が刺激されて活性酸素を発生し、その結果、神経細胞が死んでしまうことが、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因とされており、有効な治療法が確立していないALSに対し、有機フルーレンが有望な効果をもつことが報告されている。ラットを使った実験で、有機フルーレンが脳血管閉塞を通り抜け、脳に到達することが明らかになり、神経疾患の病巣に薬物を運搬するだけでなく、ガドリニウムを内包したフルーレンはMRIの造影剤として使うことができる。負電荷を持ち、フェニル基を結合したフルーレンは、水溶液中で1万2700個集まり、直径34nmのベシクルを形成する。このベシクルの壁はフルーレン分子でできた2重膜で構成されており、機能性分子を表面に結合したり、内包することにより有機フルーレンに様々な機能を付与することができる。

#### 7) カーボンナノチューブ<sup>22)</sup>

炭素の結晶としては、ダイヤモンドとグラファイトが以前から知られており、ダイヤモンドは炭素原子が正四面体の頂点に

位置するように結合した結晶構造をしている。グラファイトは炭素原子が六角形の網目状につながったシートが積み重なった構造である。カーボンナノチューブ (CNT) の基本骨格は、グラファイトの1枚面を直径数nm~数十nm、長さ1 $\mu$ m程度の筒状構造になるように巻いたものと考えられ、多層 (Multi-Walled CNT) と単層 (Single-Walled CNT) の2種類がある。また、おなじような円筒形でも、3つに分類できる。筒を輪切りにした際に、断面の炭素原子の並び方がジグザグのものをジグザグ型、斜めに並んだ場合をらせん型、肘掛け椅子のようなものをアームチェア型と分類できる。CNTは、興味深い特性を多数備えていると予想されている。たとえば、CNTが金属製になるか半導体状態になるかは、CNTの直径の大きさ、あるいは、チューブの壁をつくる六角形の格子列の“らせん度”に微妙に左右される。ジグザグ型とらせん型が導体と半導体の両方の性質を持つのに対して、アームチェア型は必ず導体になることが実証されており、多様な物性が実現できることから、分子細線としてだけでなく、分子エレクトロニクスの主要構成要素になるものと期待されている。すでに、CNTで電界効果型トランジスタ (FET) が作られ、また、それらを3つまでつなぎ合わせることでSRAM (static random-access memory) などをはじめとする理論回路も構成されている。また、SWCNTと金属電極の平面接合では達成できなかったp型としてもn型としても動作する両極性のSWCNT-FETも、TiCとの点接合で実現されている。CNTは、原子間力顕微鏡 (AFM) などの探針に適した特性をいくつも兼ね備えている。たとえば、アスペクト比 (長さとの直径の比) が高いこと、有効半径が小さいことから、水平方向の解像度は市販のシリコン製探針を超えるであろう。さらに、CNTは弾性的に曲げられるという特徴を持っているので、壊れやすい生物試料にかかる力を小さく抑えることができるであろう。実際に、CNTの探針の先端に存在するカルボキシル基に塩基性、疎水性の官能基、生体分子プローブなどを結合させ、この修飾CNTをAFMの探針として用いて、分子間相互作用に基づいた材料表面のパターンの画像化、蛋白質 リガンド間の結合力の測定などが行われている。

## 文献

1. Alivisatos AP. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 1996; 271: 933-937.
2. Bruchez MJr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998; 281: 2013-2016.
3. Chan WC-W, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998; 281: 2016-2018.
4. Han M, Gao X, Su JZ, Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multi-plexed optical coding of biomolecules. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: 631-635.
5. Klarreich E. Biologists join the dots. *Nature* 2001; 413: 450-452.

6. Mitchell P. Turning the spotlight on cellular imaging. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: 1013-1017.
7. Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* 1997; 277: 1078-1081.
8. Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* 1998; 120: 1959-1964.
9. Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* 2000; 289: 1757-1760.
10. Taton TA, Lu G, Mirkin CA. Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 5164-5165.
11. Pham T, Jackson JB, Halas NJ, Lee TR. Preparation and characterization of gold nanoshells coated with self-assembled monolayers. *Langmuir* 2002; 18: 4915.
12. Esfand R, Tomalia DA. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today* 2001; 6: 427-436.
13. Tomalia DA, Brothers II HM, Pihler LT, Durst HD, Swanson DR. Partial shell-filled core-shell tecto (dendrimers): A strategy to surface differentiated nanoclefts and cusps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99: 5081-5087.
14. Zimmerman SC, Wendland MS, Rakow NA, Zharov I, Suslick KS. Synthetic hosts by monomolecular imprinting inside dendrimers. *Nature* 2002; 418: 399-403.
15. Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98: 8786-8791.
16. Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Yanaka S, Ueda K, Sugiura Y. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 5836-5840.
17. Futaki S, Ohashi W, Suzuki T, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Harashima H, Sugiura Y. *Bioconjugate Chem.* 2001; 12: 1005-1011.
18. Futaki S, Nakase I, Suzuki T, Zhang Y, Sugiura Y. *Biochemistry* 2002; 41: 7925-7930.
19. Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 2437-2443.
20. 炭素第三の同素体 フラーレンの化学 . 日本化学会編 . 季刊化学総説 No. 43, 学会出版センター .
21. Zhou S, Burger C, Chu B, Sawamura M, Nagahama N, Toganoh M, Hackler U, Isobe H, Nakamura E. Spherical bilayer vesicles of fullerene based surfactant in water: A laser light scattering study. *Science* 2001; 291: 1944-1947.
22. カーボンナノチューブ.....ナノデバイスへの挑戦 . 田中

一義編．化学同人．2001.

## 高分子型薬剤の現状

### The State of the Art of Polymeric Drugs

前田 浩

Hiroshi Maeda

#### 和文抄録

合成高分子が薬剤として広く用いられている例として、1960年代のポリビニルピロリドン (PVP) をベースとする消毒剤・ポビドンヨード (イソジン) がある。古くは代用血漿 (プラズマエキスパンダー) として第二次大戦中にPVPやポリエチレングリコール (PEG) が用いられ、それらが優れた生体親和性を有することは広く知られている。筆者は1970年代より制癌剤ネオカルチノスタチン (NCS) に合成ポリマー (styrene-maleic acid copolymer, SMA) を結合させた高分子型制癌剤 (SMANCS) を世界で初めて合成した。このものはアルブミンと結合し、みかけ上の分子量約 8 万で、もとのNCSとは全く異なり、はるかに有用な薬剤となった。即ち、高分子の血中半減期は20倍も延長し、とくに腫瘍部や炎症部には正常組織の 5 ~ 10倍も集積し、まさに腫瘍に対しミサイル攻撃が可能となった。また、この高分子結合体は高い脂溶性が付与されたことから、油性造影剤Lipiodolに溶かした動注用油性製剤の剤型が可能となった。即ち、SMANCS/Lipiodolは造影能があるため、腫瘍部のみが濃染し (腫瘍部は血中濃度の2000倍)、高感度の造影 (診断) が可能となることと、同時に本製剤の腫瘍選択的なデリバリーにより、副作用のない適確な治療が可能となった。一方、これら高分子が正常組織内に分布集積した場合は、リンパ系を介してゆるやかに回収されるが、腫瘍部からの回収は極めて遅く、一回の投与で腫瘍局所に長時間にわたり薬効を發揮する。この固型腫瘍にユニークな現象は生体親和性のある高分子やリポソームに共通して観察され、我々はこれをEPR効果 (enhanced permeability and retention effect) と命名した。一般に高分子の薬剤として実用可能になるための要件は、中性~酸性の水溶性で分子量 5 万以上である。4 万以下では主として尿 (疎水性が高いものは胆汁中) から急速に排出される。ある種の高分子は皮膚への集積が、癌や炎症部に次いで高いことがある。分子量約 2 万を 5 万に改変したPEG-インターフェロンの場合、血中 $t_{1/2}$ が 8 時間から80時間となり、毎日~隔日の注射が、週 1 回となり、薬効ははるかに高められた。SMANCSでは 1 ~ 3 ヶ月に1回の投与で顕著な抗癌効果を達成した。これらSMANCSおよびPEG化インターフェロン [ペガサス®] および類似のイントロン®の例では何れも薬効はもちろん患者に対するコンプライアンスが格段に向上し、副作用は低減し、優れた薬剤となることがわかってきた。本論文では、上記EPR効果についても概説した。

#### Abstract

As an ideal drug (oxygen) carrier system the red blood cells (RBC) are highly sophisticated in that they are equipped with all fail-safe considerations such as safe-guard against oxygen radical species such as superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) and hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ . Although not so perfect as RBC, polymeric macromolecular drugs have various unique advantages not seen in conventional lowmolecularweight drugs. For example, increment of plasma half-life in vivo, usually 10-20 folds and highly enhanced tumor targeting efficiency of 5-30 folds (to tumor over plasma level), compared with conventional lowmolecularweight drugs, are among the hallmarks. The requirements of polymeric drugs are immunological inertness (or biocompatibility), eventual elimination from the body, molecular size above 45 KDa (above renal threshold), and neutral to weakly acidic in nature.

Examples discussed are pegylated interferon, in which ten times prolonged plasma half-life enabled once weekly injection adequate, instead of daily or every other day, and far superior clinical outcome can be attained. Another example is SMANCS, poly (styrene-maleyl-n-butylate) conjugated neocarzinostatin, that exhibits powerful anticancer effect against human liver cancer but very little side effect. Lipophilic nature of SMANCS also made formulation in Lipiodol (lipid contrast agent) possible that allows most sensitive X-ray imaging of tumor as small as 3 mm. Advantage of polymeric drugs, including liposomes and

micelles, is full utilization EPR (enhanced permeability and retention) effect of solid tumor for more selective tumor delivery of these drugs. EPR effect facilitates vascular leakage (permeation) of macromolecular drugs only in the tumor tissue because of unique properties of vascular pathophysiology of cancer tissues which are discussed more details in the text. Therefore, designing of macromolecular anticancer drug is becoming a gold standard in cancer drug development.

#### Keywords

Polymer drugs, macromolecular drugs, EPR (enhanced permeability and retention) effect, tumor targeting, plasma half-life, compliance.

### 1. はじめに

本稿は2002年9月4・5日の日本血液代替物学会での特別講演の内容をもとに、標題の分野における筆者の研究を中心にレビューを行った。

この分野は合成高分子科学、薬剤学、さらに癌化学療法、インターフェロンやサイトカイン、タンパク性ホルモンなどの研究者の関与するmultidisciplinaryな領域で、その多くの成果は、世界的に過去数十年の蓄積がある。筆者らは1977年頃より、がんのリンパ転移巣を標的として、リンパ学の知識を借りつつ、研究をすすめているうちに(1) 生体親和性のあるポリマーや油(滴)が特にリンパ行性が強いこと(2) さらに癌部への集積が、正常組織よりはるかに高くなり、なおかつ腫瘍部から血中やリンパ系へ回収されることがなく、極めて長期間にわたり癌部に残存することを見いだした(3)。その現象をEPR効果(enhanced permeability and retention effect)と命名し、その発見以来、EPRのメカニズム(4-5)とEPRに基づく高分子性薬剤による癌治療法の改善と高分子型制癌剤の創生を行ってきたので、それについても論じたい。

### 2. 理想的なドラッグデリバリー：赤血球による酸素運搬

近年DDS (drug delivery system) の学問は長足の進歩を遂げている。そのメインテーマは、必要なところ(多くは疾患病巣)へ必要な量(濃度)を長期間にわたり維持またはデリバリーすることであり、日本DDS学会やその国際姉妹学会のControlled Release Societyなどは、このことを研究する研究者の学会であり、近年にぎわっている。

DDS分野における成果は、我国と米国が先導的な役割を演じており、筆者の制癌剤スマンクス(特にX線造影剤リピオドール懸濁油性製剤として動脈注射剤となる)や、武田薬品のリユーブリン(前立腺がんのための筋注用徐放デポ剤)、さらに最近では後述する米国のポリエチレン結合(PEG-)インターフェロンなどが注目されている。

本学会の最大関心事である血液に関して、赤血球を酸素のデリバリーのための薬剤と見立てると、Table 1に示すように、赤血球(RBC)はまことにDDSとして多面的な必要事項を満たしている。Table 1に筆者が考えるレベルでの投与する薬物の生体に対する安全性を考えた項目を列挙している。酸素をただ運ぶためならばPEG化ヘモグロビンのみでよい訳であるが、

**Table 1. RBC is the Most Sophisticated Drug (Oxygen) Delivery System**

**“Build-in” safeguard system and “fail-safe system” for all probabilities**

- Avoidance of direct contact of heme with nitric oxide and hydroperoxides; prevented by membrane enclosure
- prevent peripheral circulatory insufficiency (hypertension) and formation of biologically hostile ROO<sup>•</sup> from ROOH
- Safe-guard against reactive oxygen radicals (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>): - catalase and SOD.
- Long circulation time/durability/biocompatibility: t<sub>1/2</sub> = 120 days
- Specified and highly developed degradation system: spleen, liver and RES
- Scavengers of transition metals: ferritin/transferrin/ceruloplasmin/haptoglobin and HO induction etc.

RBCでは予想される多くの生体内での反応に対応したすばらしいドラッグデザインになっているといえる。つまり、現今のリポソームやミセル化製剤も足下にも及ばない。さらに、これは生化学(酵素学上)のいわゆるアロステリック効果に基づく(Bohr効果)酸素分圧(pO<sub>2</sub>)を感知して低いpO<sub>2</sub>ではO<sub>2</sub>を放出し、pO<sub>2</sub>の高いところではO<sub>2</sub>を吸収し溜め込むという、まことにもって良く出来ている。これに加えて、火薬のように危険な酸素という分子を運搬する時に予想される非常事態に対応するための備品としてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を処理するカタラーゼ、スーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に変換するSOD(スーパーオキシドデイズムターゼ)などを消火器(消火剤)のように配置してある。また、はだかのヘムは、生体内に多く存在するNO(一酸化窒素)やヒドロパーオキシドと接触すると、前者のNO(血管弛緩因子)はヘムにトラップされ血管の収縮をきたし、末梢循環不全をもたらす、後者は発火するごとく長寿命型のパーオキシラジカルとなり、生体内で種々の好まざる反応を引き起こし、毒性発現の原因となる。そのようなことがないようにヘモグロピンは、多くの血清タンパクとは違って、膜につつまれて、赤血球(RBC)として血中を挙動している。何れにしろ、RBCは薬物(O<sub>2</sub>)キャリアーとして、このようにすばらしいDDS (drug delivery system)の機能を有している。以下にRBCほどではないにしろ、高分子薬剤が在来型の低分子薬剤に比べて

いかに有用であるかを記したい。

これに対して、宿主側からみると、RBCを主体とする血球細胞が極めて微小な（血球よりも小さい）間隙をスムーズに目詰まりを起こさないようにするため、酸性糖タンパク質を存在させ、血球に潤滑性を賦与している（6）。また、ヘモグロビン（Hb）の崩壊時に、本質的に毒となりうる遊離鉄の回収に対してもトランスフェリン、フェリチン、ハプトグロブリンなどの鉄の捕獲タンパク質、あるいは脾臓・肝臓等、網内系細胞の機能のバックアップシステムを有することを指摘できる。

### 3. 高分子薬剤の有用性 [その(1)] : 半減期の延長

何がポリマー結合によってもたらされる有用な結果なのかをTable 2に示した。ここで、高分子とは、腎から排泄されない

**Table 2. Why Polymer Drugs?**

(1) Enhancement of:			
• Plasma $t_{1/2}$	cost/benefit	cost/effectiveness	Improvements of 5 - 100 folds
• Tumor Targeting			
• Compliance / QOL			
(1) Reduction in side effects			

サイズ、つまり分子量4.5万以上の大きさである。しかも用いる高分子は生体に対してinert（不活性）で異物として認識されない生体親和性の高いものでなければならない。つまり免疫原性を示さないことが必要である。これらは一般的に水溶性であることが望ましく、かつ長期的には次第に分解し、尿か胆汁中から体外へ排泄される必要がある。この点に関し二つ以上のブロックポリマーの結合（cross link）体であれば、その結合を切れ易い化学結合種にすれば、比較的早く低分子化し排泄するといえる。

分子量数万の高分子の生体内（血中）半減期はヒトの赤血球（120日）ほどではないにしろ、高分子化は薬剤の体内半減期を大幅に延長する（Table 3）。このことは投与頻度の大幅な減少をもたらし、注射を毎日する代わりに週一度で充分となる。あるいは経静脈的な持続点滴をやめて、入院が不必要（bed free）となる。その最も最近の例では、PEG化したインターフェロン（PEG-IFN）（ロシュ社のPegasusおよびシェーリング・ブライウ社のIntron）がある。もとのインターフェロン（ $t_{1/2}$  : 8時間）は毎日～2日に一回の投与（筋肉注射）が必要であるが、PEG-IFN（ $t_{1/2}$  : 80時間）では週一回でよい。武田の抗ホルモンペプチドのLHRHアナログのリニュープリンは3ヶ月に一回の投与でよい。Enzon社のPEG-アデノシンデアミネースは月1回でよく、これはリンパ球の遺伝子治療法より優れている。Table 4にこれらの代表的な例を示した。

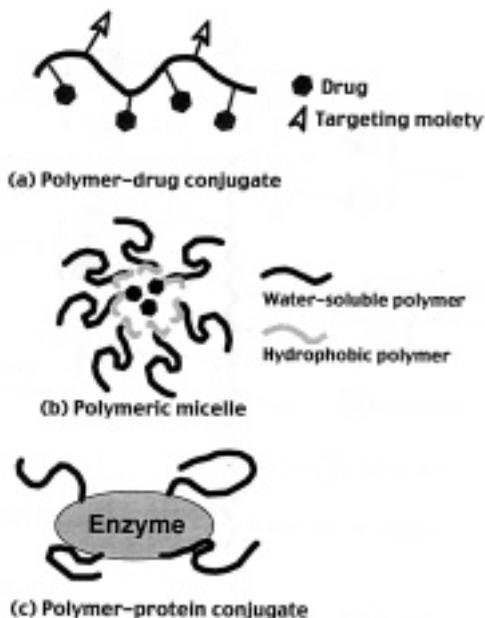


Figure 1A. Water-soluble formulation of polymer drug conjugates. (a) represents pendant type drug-polymer conjugate; (b) polymeric micelle which contains the drug in the core of micelle. Outer layer of the micelle consist of water soluble polymer, and inside cluster contains hydrophobic polymer; and (c) protein (enzyme)-polymer conjugate such as PEG-interferon.

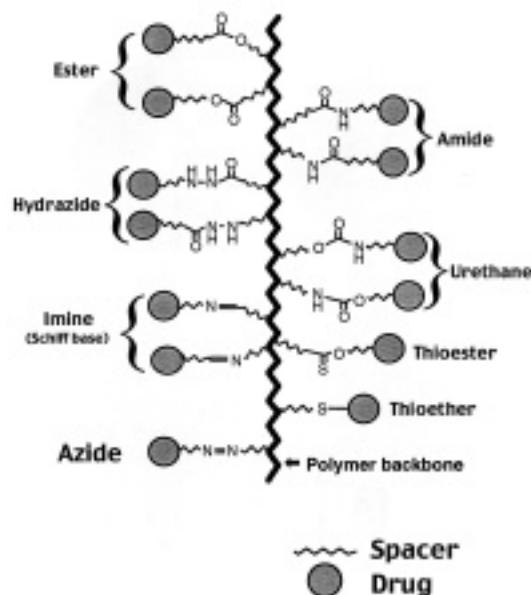


Figure 1B. Chemical structures of various types of drug-polymer conjugates.

**Table 3. Plasma clearance times of various proteins and their polymer conjugates or modified proteins (from Ref. 10, 12 with permission)**

Protein	Type of polymer or modification	Molecular mass (kDa)	t <sub>1/2</sub>	t <sub>1/10</sub>	Test animal
Neocarzinostatin (NCS)	None	12	1.8 min	15 min	Mouse
SMANCS	SMA-NCS <sup>a</sup>	16	19 min	5 hr	Mouse
Ribonuclease	None	13.7	5 min	30 min	Mouse
Ribonuclease dimer	Cross-linked	27	18 min	5 hr	Mouse
Soybean trypsin inhibitor (SBTI <sup>b</sup> )	None	20	< 2 min	3 min	Rabbit
Dextran-SBTI	Dextran	127	20 min	> 80 min	Rabbit
Ovomucoid	DTPA/NH <sub>2</sub> <sup>31</sup> Cr <sup>c</sup>	29	5 min	34 min	Mouse
Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> superoxide dismutase (SOD)	None	30	4 min	30 min	Rat
SOD-SMA	SMA conjugate <sup>a</sup>	40	> 300 min	> 10 hr	Rat
Bilirubin oxidase	None	50	< 1 min	1.8 min	Rat
PEG <sup>d</sup> -bilirubin oxidase	PEG	70	5 min	48 hr	Rat
Serum albumin, mouse	None	68	3-4 day <sup>e</sup>	-	Mouse
Serum albumin, mouse	Evans blue dye	-	2 hr	30 hr	Mouse
Serum albumin, human	Formaldehyde/ <sup>125</sup> I	-	25 min	4 hr	Rat
L-Asparaginase	None	65 × (2-8)	1.5-3.4 hr	-	Rat
PEG-L-Asparaginase	PEG	-	56 hr	11 day	Mouse
Immunoglobulin G, mouse	DTPA	150	60 hr	-	Rat
<sub>2</sub> -Macroglobulin <sup>f</sup>	Iodination/ <sup>125</sup> I	180 × 4	140 hr	22 day	Mouse
<sub>2</sub> -Macroglobulin <sup>f</sup> -plasmin complex	Iodination/ <sup>125</sup> I	180 × 2	2.5 min	20 min	Mouse
Native interferon (IFN)	none	18	8hr	-	Man
PEG-IFN	PEG	52	80hr	-	Man

<sup>a</sup> binds to albumin

<sup>b</sup> SBTI, Kunitz type.

<sup>c</sup> DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid.

<sup>d</sup> PEG, polyethylene glycol.

<sup>e</sup> Human albumin in humans: 19 days.

<sup>f</sup> Human.

**Table 4. Polymeric Drugs in the Market**

Water soluble polymer - SMANCS, PEG-ADA, <sup>a)</sup> Pegasus/Intron (IFN- ), PEG-L-asparaginase
Liposomes - Doxil (doxorubicin), <sup>b)</sup> PEG-mAb-liposome/Dox
Micelles - PEG-Poly-L-Asp/Adm <sup>b)</sup>
Lipidic formulation - SMANCS/Lipiodol (ia/HCC): good for 1 ~ 2 months. imaging and missile targeting in cancer.
Insoluble depot - LHRH analogue / Poly[ lactate/glycolate ] Slow release (3-6 months)

PEG, polyethyleneglycol; ADA, adenosine deaminase; IFN, interferon; HCC, hepatocellular carcinoma = hepatoma; i.a., intraarterial injection; dox, doxorubicin; Adm, adriamycin; a) see reference (12); b) see reference (18)

**Table 5. Factors affecting the EPR effect of macromolecular drugs in solid tumor**

- (1) Active angiogenesis and high vascular density in tumor
- (2) Extensive production of vascular mediators that facilitate extravasation,
  - (a) bradykinin
  - (b) nitric oxide
  - (c) VPF/VEGF
  - (d) prostaglandins
  - (e) collagenase (MMP)
  - (f) peroxy nitrite
- (3) Defective vascular architecture, for example, lack of smooth muscle cells, lack of or reduced numbers of receptors for angiotensin II, large gap in endothelial cell-cell junctions, anomalous vascular conformation (e.g., branching or stretching)
- (4) Impaired lymphatic clearance of macromolecules and lipids from interstitial tissue (resulting in their retention)

Adapted from reference 5

#### 4. 高分子薬剤の有用性 [ その ( 2 ) ] :

炎症や腫瘍へのターゲティング、EPR効果に基づくミ  
サイル療法

癌細胞には存在するが正常細胞に存在しないという癌細胞固有の標的分子は存在しないというものの、分子よりもはるかに複雑な4次元、5次元的存在である臓器・組織、さらにその機能においては、癌は正常組織とは大きく違っている。今ここで述べようとしているのは腫瘍の血管と正常組織の血管の間に

おける諸々の違いである。すなわち正常組織の血管は動脈 細動脈 毛細血管 細静脈 静脈に続いており、正常組織の全ての末梢血管部レベルにおいて、正常組織の血管構築 (architecture) は均一で完成されたものである (もちろん、肝、脳、その他で固有の特性はあるが)。つまり、血管内皮細胞、それをとりまく平滑筋細胞、それらの細胞上に分布する各種血管作動物質のレセプター (例、アンジオテンシン レセプターなど) の存在、さらに血管密度や走行状態も含め、正常組織の

血管は概ね均一である。ところが、腫瘍部のそれは、血管の走行状態、分岐パターン、平滑筋層細胞の異状や欠陥が数多くあり、加えて各種レセプターの欠陥、さらにまた、血管密度は高度な新生血管の増生のために多くの場合、極めて密になっており、正常のそれとは大きく異なっているといえる(4,5)。

このような腫瘍血管の構造・構築上の異常に加え、腫瘍部では数多くの血管作動物質〔とくにブラジキニン、NO(一酸化窒素)血管内皮細胞増殖因子(VEGF、もとは血管透過促進因子vascular permeability factorと呼ばれていた)、プロスタグランジン、プラスミン(プラスミン活性化因子)、コラゲナーゼ、ヘムオキシゲナーゼ、等々〕(Table 5)が大過剰に生成され、その作用によりタンパク質などの血漿成分の漏出が促進される(7)。これは炎症と全く同様の病態が一段とひどい状態で継続している状況である。つまり、「治癒なき炎症」(H. Dvorak)であって、上記の血管構造・構築上の粗雑さに加えて、これらの血管メディエーターの過剰の産生によって腫瘍とその周辺の正常組織の血管も含めて透過性が著しく亢進し、血液成分の血管外腔へ向って多量の漏出が生ずる(3-5, 7)。この現象は、低分子は勿論のこと、とくに高分子の物質において顕著である。高分子物質は本来、血管内腔から外腔(組織内)へはほとんど漏出しませんが、炎症等(特に癌部)ではゆっくりではあるが、徐々に漏出し次第に蓄積する(浮腫)。この高分子薬剤の癌部での蓄積のレベルは血中濃度よりはるかに高くなる(場合によっては10倍近くなる)。その理由は、血行性(逆行性)あるいはリンパ系を介しての高分子(成分)の組織(matrix tissue)からの回収がほとんどないためである(3)。この事実を我々は約16年前に見出し、この現象をEPR効果(Enhanced permeability and retention effect of macromolecules and lipids in solid tumor)として報告した(3-5, 7, 8)。このEPR効果は血中に投与した薬物(高分子制癌剤)が癌部へ効率よく到達、蓄積し、癌へのミサイル攻撃を可能にする理論的な根拠となっている(Figure 2)。

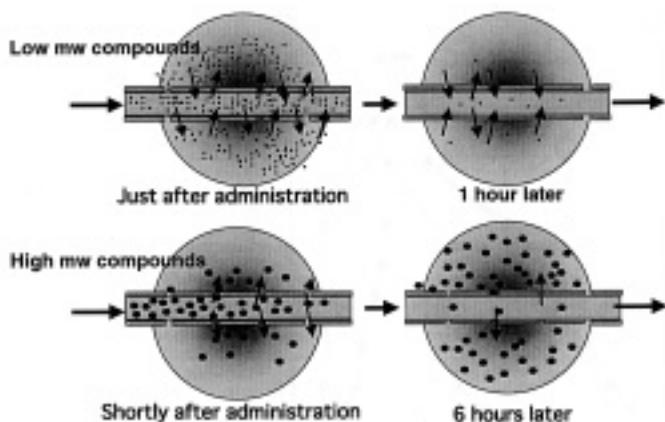


Figure 2. Schematic representation of the EPR effect of macromolecules in solid tumor. Intratumor distributions of low-molecular-weight compounds (upper panel) and high-molecular weight compounds (lower panel) are represented in a time dependent manner. Low-molecular-weight compounds rapidly disappear from blood stream, and no tumor accumulation would be observed. In contrast, high-molecular-weight compounds gradually accumulate in solid tumor due to the EPR effect after long time.

話をEPR効果の発見に至る前に戻そう。我々はネオカルチノスタチン(NCS)(発見1964年)という蛋白性制癌剤(小型で、分子量約1万)が10ng/mlという極めて低濃度域で強い活性(in vitroでの殺細胞作用)をもつことを見出ししていたが、全身性の強い毒性がその一般的な普及上の問題であった。NCSをいかに選択的に癌部へ蓄積させるかの工夫の一環としてその化学修飾を高分子結合体を用いて試み、その結果、生まれたのがスチレンマレイン酸ブチレート(SMA)コポリマー結合NCS、いわゆるSMANCS(即ちスマンクス)である。これが高分子制癌剤の世界の魁となった。この高分子化制癌剤スマンクスの発明によって我々には次に示す数多くの薬理学上、あるいは固形癌における選択毒性発現のためのEPR効果を含む、重要な一般則を発見した。これについて以下に記す。

通常の低分子制癌剤では腫瘍内濃度を血中濃度よりも高くすることはまず不可能である。また、一般の低分子制癌剤は血中半減期が短いため持続点滴により血中濃度を一定に高く保つ必要がある。これに対し高分子制癌剤はボラス/ワンショット静注でも通常血中濃度は高く維持することが可能となり、しかも腫瘍内濃度は薬剤投与12~24時間後には、EPR効果により血中濃度に比べ5~15倍[tumor/blood(T/B)比]と高くなるのである。この時の腫瘍内濃度は、他の正常組織の10~30倍であり、副作用の出現は少なく、癌部に対する傷害がはるかに大きくなり、薬効発現も大幅に改善される。このようなT/B比の著しい改善は他の多くのポリマー薬剤についても一般にすでに認められている。合成高分子以外にアルブミン、トランスフェリン、IgGでも同様であることを我々は既に報告している(3-5, 8)(Figure 3)。また、ヒドロキシプロピルメタアクリレート・コポリマー(HPMA)とドキシソルピシン結合体(PK-1)やPEG-結合-ポリアスパラギン酸-ドキシソルピシンのミセル化物、ポリビニルピロリドン結合TNF-、その他でもよく知られている(5, 9-12)。これらの分子量と血中濃度、腫瘍集積性、さらに腎排泄の関係をFigure 4に示した。

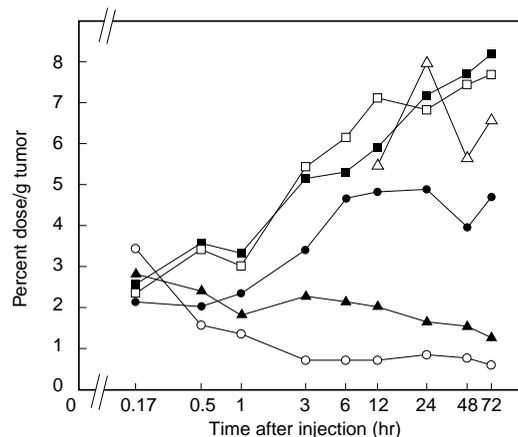


Figure 3. Intratumor accumulation of various  $^{51}\text{Cr}$ -tagged proteins in solid tumor-bearing mice: (○) neocarzinostatin (NCS) (12 kDa); (□) SMANCS (16 kDa, but known to bind to albumin); (△) ovomucoid (29 kDa); (◇) bovine serum albumin (69 kDa); (▽) mouse serum albumin (68 kDa); (○) mouse immunoglobulin G (160 kDa). Radiolabeled proteins were injected i.v. at time zero. The tumor model used was solid sarcoma S-180 in mice. (From (3) with permission.)

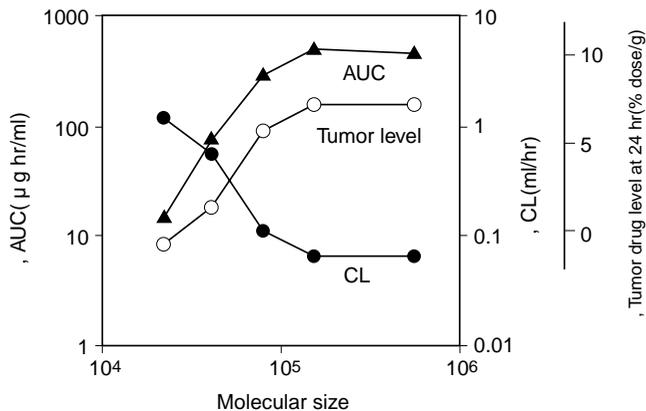


Figure 4. Relationship between molecular size of polymer drugs and their plasma concentration, AUC (area under the concentration curve), renal clearance, and intratumor uptake as expressed by percentage of injected dose. Putative polymer drugs are <sup>125</sup>I-Tyr-HPMA copolymers of various molecular sizes given i.v. at 1.8 × 10<sup>6</sup> cpm. The tumor model was sarcoma S-180 in mice. (From (5) with permission.)

興味ある報告として、癌抗原に対するモノクローナル抗体と普通のイムノグロブリン (IgG) を比べた報告があるが、腫瘍内集積性で見ると、投与数時間後では、両者間に差はないという (11)。このことはモノクローナル抗体の腫瘍蓄積は他の高分子型薬剤と同様であり、EPR効果によって、より高い腫瘍内蓄積が生ずることがKeyとなっていることを示すものである。勿論、in vitroでの抗腫瘍効果は当然モノクローナル抗体結合薬剤の方がより強い活性を示すが、pharmacokinetics/pharmacodynamics、さらにマウス由来のモノクローナル抗体を用いれば抗マウス・IgG抗体が出現するなど、さらには、cost performanceがよくないなど多くの問題があり、多面的に考えれば、いずれが有利で現実的であるかはおのずと明らかである。

このような水溶性高分子化製剤の静脈内投与によるターゲティング能をさらにもう一段改善したのが、その油剤化物の動注療法である。つまり、スマンクスをリピオドール (油性造影剤) に溶かした剤型 (スマンクス/リピオドール) を用いる動注療法である。これはリピオドールという油性造影剤にスマンクスを溶かし、X線で血管造影をしながら、腫瘍の栄養動脈 (の上流部位) にスマンクス/リピオドールを注入する方法である。この方法だとT/B比は2000と圧倒的なミサイル的選択性をもって腫瘍部に集積し、しかも油 (リピオドール) から薬剤 (スマンクス) が持続的に徐放されるため、肝癌では月1回あるいはそれ以上の投与間隔で十分である (13)。一般に肝癌患者は2~3日で退院可能となり、その後は普通の日常生活に復帰できる。これによって肝癌患者の多くは在来のように3~5ヶ月で死亡することもなくなっている。さらにこの方法では一般的な治療法 (化学療法剤投与) にみられるような副作用がなく、その苦痛からも解放されている。

それに加えて、このスマンクス/リピオドール療法はリピオドールの造影能によって、診断がより精密 (3~5mmの腫瘍も検出) となり、さらに薬剤 (スマンクス) が到達したかどうか、また到達していれば何割の腫瘍部が薬剤でカバーされたかな

ど、半定量的な薬剤の到達度 (残存度) がCT画像により知ることができる。つまり癌の診断と治療上、本法 (スマンクス/リピオドール) ほど有用な方法はないといえる。しかしながら、この治療法も十分に習熟したドクターの教育の方が遅れているので、どの施設でも行われているとはいえない。さらに、この方法が肝癌の塞栓療法と混同誤解され、一部にスポンジゲルによる塞栓療法が過って併用され、ショック等の副作用が発生したことは誠に残念である。

腫瘍の検出の立場から考えると、ガリウムシンチグラフィという診断法は、放射性同位元素ガリウム (<sup>67</sup>Ga) のクエン酸塩を投与し、2~3日後に、全身用の放射線検出装置を用いて放射能の集積部位 (腫瘍) を検出同定する方法である。この時、ガリウムは血清蛋白のトランスフェリン (分子量約9万) に結合し、その放射性高分子 (<sup>67</sup>Ga-トランスフェリン) が徐々に腫瘍部に集積している状態を検出しているわけである。つまり、ガリウムシンチグラフィも固形癌のEPR効果にもとづいているといえる。同様のことをHPMAポリマーにチロシンを含むペプチドを挿入し、このチロシンをヨード [<sup>131</sup>I] (放射性) 化し、それを静注すると2~5日後に腫瘍のイメージングができることを英国グループが報告している (文献12に記載)。

## 5. 高分子薬剤の有用性 [その(3)] : その他の有用性と機能付与

### (1) 抗原性の払拭

我々はSMANCS合成の当初に、まれにNCSの抗原性が原因で出現する免疫反応 (抗原性の問題) をSMAの結合によって回避できることを明らかにしたが (8)、それ以外にPEG-化によっても多くの異種動物の血清蛋白や酵素の抗原性を払拭できることが数多くの研究で報告されており、今日ではほとんどの直鎖状のポリマーについてこのことは常識的に知られている (例えば、ポリビニルアルコール、HMPAコポリマー、ポリビニルピロリドン、SMA、ポリアスパラギン酸など) (8, 10, 12)。天然物でもゼラチン、ヒドロキシルエチルスターチやアミロースなどでも抗原性が極めて低く、それらを結合した蛋白の抗原性を抑制することが知られている。

### (2) 油性製剤の創生

多くのペプチドやタンパク質は消化酵素 (ペプシン、トリプシン等) により容易に分解するため、これらは経口投与の薬剤とはなりがたい。しかしながら、親油性 (油性) 残基を側鎖に結合したペプチドや小型のタンパク質; あるいは水溶性低分子化合物は油溶化が可能となる。ちなみに、稲田らはPEG-結合リパーゼがベンゼンに可溶になることを示している (14)。油溶化のメリットはペプチドや酵素が油の粒子内に留まっている限り、水溶性の加水分解酵素 (プロテアーゼなど) の作用を受けないこと、さらにまた、経口投与後の腸管吸収の効率が10倍以上あげることが可能となるなどである。これは、小腸内の上皮細胞のトランスポーターシステムに依存する以外に、いわゆる微粒子のエンドサイトシスと同様な油滴 (カイロミクロン)

のトランスサイトシスによる吸収によると考えられる(15)。さらにまた、血中に取り込まれた後は親油性側鎖やベンゼン環を有する誘導体は、アルブミンその他の脂質結合性蛋白によって血清タンパクとして挙動するため、血中濃度を高く維持することができる利点がある(16)。

### (3) 癌細胞の多剤耐性の克服

癌化学療法上の大きな問題の一つは薬剤耐性である。これに対して、高分子化薬剤のもう一つの利点は癌細胞における多剤耐性を克服できることである。高分子薬剤はP-糖蛋白依存性のefflux(薬剤の細胞外排出)機構にのらないので、細胞内の薬物濃度を高く保つことができることである。それ故、高分子化により多剤耐性克服が可能になる。これはSMANCSで最初に見い出されたが(17)、ユタ大学のHPMA-結合-doxorubicinの例でも確認されており、他の高分子薬剤にも共通の利点である。

### (4) その他の特定機能の付与

Figure 1A、Bに記載のように高分子(ポリマー)の結合により、数多くのそれぞれ異なった機能を付与することができる。プロドラッグとしてペンダント型にすれば、薬剤の放出速度は化学結合の種類(エステル、ペプチド/アミド等)や、側鎖の長さや種類を変えることにより、任意に変えることができる(Figure 1B)。さらに、DTPA(キレート剤)を結合すれば任意の放射性金属を結合することもできる。これにより癌部や炎症部位のEPR効果によるシンチグラフィによる描出も可能となる。また、特定の臓器や組織に親和性を付与することも可能である。例えば、ガラクトースを誘導素子としてガラクトースレセプターを標的(肝、マクロファージ)としてデリバリーすることができる。その他の利点についてはTable 2を、また各種実用化の例についてはTable 4を参照されたい。

## 6. 2001年の国際高分子治療剤シンポジウムの印象と高分子薬剤の今後の展望

筆者は2001年7月13、14日奈良市においての標記シンポジウムを開催したが、この会はこれまで英国と日本で4回開催されている。奈良でのシンポジウムの主眼は高分子薬剤において臨床試験の第1相試験に到達したか、それを終了しより実用化の高いレベルに達した高分子薬剤を中心に、その将来性を見極めることであった。

そのうちでも、米・欧で一昨年臨床の第1相試験を終了したPEG-IFN- $\alpha$  (ロシュ社)のデータは衝撃的であった(上述)。この報告は、これまでどちらかといえば実際にはあまりパツとしなかったサイトカインやインターロイキン、蛋白性ホルモンなどに対する研究・開発における今後の方向を明瞭に示したといえる。その著明な有用性は上記各項に示した通りである。さらに発表されたいずれの制癌剤の1相のデータともに、毒性の大幅な軽減が認められ、来年以降の薬効評価のデータに期待をもたせるものであった。そのキーワードは何れもEPR効果、ターゲティング、徐放性、薬効の強化と毒性軽減で

あった。話題にはならなかったが、高分子薬剤は患者のコンプライアンスに大いに貢献していることも注目に値するといえる。

## 7. あとがき

筆者が世界最初の高分子型制癌剤スマンクスを開発してから約23~24年、また、EPR効果という固形癌に普遍的な原理を発見してから約16~17年になる。ようやくインターフェロンというマーケットサイズの大きい医薬品の高分子化薬剤が開発され、その顕著な有効性が実証されるに及んで、癌のみならず、感染症、炎症等に同様のコンセプトが応用できることが明らかになってきたといえる。ともすれば我が国の薬業界は保守的であるとの指摘が強いが、実際にこの分野での取り組みは遅れている。我が国においては筆者を含め、早くから大学の研究者でこの分野の重要性を指摘する人は少なくなかったが、現在では欧米の後塵を押しつつあるのはまことに残念である。

ともあれここに述べた高分子製剤のテクノロジーはDDSの原則にのっとった21世紀の重要な課題であり、患者のコンプライアンスとトータルの医療費の削減の立場からも大切な社会的要請であると信じるものである。2002年までのこの分野のより総合的で詳しい文献として、文献(12)を参照されたい。

## 文献

1. Maeda H, Takeshita J, Kanamaru R. A lymphotropic derivative of neocarzinostatin with antimetastatic property. Conversion into a derivative soluble in water and solvent with improved pharmacological property. Proc. Int'l Symp. on Proteins, Taipei, Taiwan. March 1978.
2. Maeda H, Takeshita J, Kanamaru R, Sato H, Katoh J, Sato H. Anti-metastatic and antitumor activity of a derivative of neocarzinostatin. An organic solvent-and water-soluble polymer-conjugated protein. Gann. 1979; 70: 601-606.
3. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 1986; 70: 6387-6392.
4. Maeda H, Sawa T, Konno T. Mechanism of tumor-delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drugs SMANCS. J. Control Release 2001; 74: 47-61.
5. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. Advan. Enzyme Regul. 2001; 41: 189-207.
6. Maeda H, Morinaga J, Mori I, Nishi K. Further characterization of effects of alpha-1-acid glycoprotein on the passage of human erythrocytes through micropores. Cell Struct. and Funct. 1984; 9: 279-290.

7. Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumor by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res.* 1998; 58: 159-165.
8. Maeda H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1991; 6: 181-202.
9. Gianasi E, Wasil M, Evagorow EG, Kedde A, Wilson G, Duncan R. HEMA-copolymer platinum as novel antitumor agents. In vitro properties, pharmacokinetics, and antitumor activity in vivo. *Europ. J. Cancer.* 1999; 35: 994-1002.
10. Maeda H, Kojima Y. Polymer-drug conjugates. in *Desk Reference of Functional Polymers, Syntheses and Applications*. Reza Arshady, ed. American Chem. Society 1997; pp.753-767.
11. Marecos E, Weissledek R, Bogdanov AJ. Antibody-mediated versus non-targeted delivery in human small cell lung carcinoma model. *Bioconj. Chem.* 1989; 9: 184-191.
12. Maeda H, Kabanov A, Kataoka K, Okano T eds. *Polymer Drugs in Clinical Stage: Advantages and Prospects*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London 2003;
13. Konno T, Maeda H, Iwai K, Maki S, Tashiro S, Uchida M, Miyauchi Y. Selective targeting of anti-cancer drug and simultaneous image enhancement in solid tumors by arterially administered lipid contrast medium. *Cancer* 1984; 54: 2367-2374.
14. 稲田祐二. 有機溶媒中で働く酵素ハイブリッド (第4章) タンパク質ハイブリッド: ここまで来た化学修飾 共立出版 1987; p.87-118.
15. Oka T, Miyamoto Y, Matsumura Y, Tanaka Y, Oda T, Maeda H. Enhanced intestinal absorption of a hydrophobic polymer-conjugated protein drug, smancs in an oily formation. *Rharm. Res.* 1990; 7: 852-855.
16. Kobayashi A, Oda T, Maeda H. Protein binding of macromolecular anticancer agent SMANCS: characterization of poly(styrene-co-maleic acid)derivatives as an albumin binding ligand. *J. Bioact. Compat. Polymers.* 1988; 3: 319-333.
17. Miyamoto Y, Oda T, Maeda H. Comparison of the cytotoxic effects of the high- and low- molecular-weight anticancer agents on multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells in vitro. *Cancer Res.* 1990; 50: 1571-1575.
18. Gabizon A, Tzemach D, Mak L, Broansrein M, Horowitz A.T. Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in murine model. *J. Drug Target.* 2002; 10: 539-548.

# 1 $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質の血液循環系に及ぼす作用

## Effects of $\alpha_1$ -acid glycoprotein on blood circulation

松元一明<sup>a</sup>, 岡本茂洋<sup>a</sup>, 徳富芳子<sup>b</sup>, 徳富直史<sup>b</sup>, 西勝英<sup>b</sup>, 丸山徹<sup>a</sup>, 末永綾香<sup>a</sup>, 小田切優樹<sup>a</sup>

**Kazuaki Matsumoto<sup>a</sup>, Shigehiro Okamoto<sup>a</sup>, Yoshiko Tokutomi<sup>b</sup>, Naofumi Tokutomi<sup>b</sup>, Katsuhide Nishi<sup>b</sup>,  
Toru Maruyama<sup>a</sup>, Ayaka Suenaga<sup>a</sup>, Masaki Otagiri<sup>a</sup>**

### 和文抄録

急性期反応物質である  $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質 (AGP) は主に肝臓で合成され、炎症、火傷などでは血液中濃度は数倍増加することが知られている。しかしながら、AGPの生理作用についてはまだ十分に明らかにされていない。そこで、AGPの血液循環動態や生理作用の機序解明の基礎的検討の一環として、AGPの体内動態特性ならびに赤血球及び血管に対するAGPの影響について検討した。その結果、AGPは赤血球の流れを促進し、血管を弛緩させ、血液循環をより良いものにする事で、火傷時などの末梢循環系における組織の低酸素血症の防止に極めて重要な働きをしていることが推察された。

### Abstract

$\alpha_1$ -Acid glycoprotein (AGP) is an acute phase protein that is synthesized largely by the liver. AGP serum concentrations that remain stable under physiological conditions (about 0.5 - 1.0 g/L) increase several-fold during inflammation or burn. However, its exact biological function and mechanism of action remain obscure.

In this review, we report pharmacokinetics and pharmacodynamics of AGP in elucidating of action of AGP. An increase in the AGP content of serum found under pathological conditions may improve blood rheology based upon its own activity. These findings will be useful in terms of understanding the role of acute phase proteins that are produced of an accelerated rate during acute phase response.

### Keywords

$\alpha_1$ -acid glycoprotein, blood rheology, pharmacokinetics, biological function, blood cell

### 1. はじめに

ヒト  $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質 (AGP) は、分子量約44100で、183個のアミノ酸と5本のN-結合型糖鎖からなり、その糖鎖末端にはシアル酸が結合している<sup>1-4)</sup>。したがって、約40%の高い糖含量と低いpI値2.7を特徴とする血漿蛋白質である。またその糖鎖のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合したシアリルルイスX (sLe<sup>x</sup>) 型を形成する場合もある。通常、健康人のAGP 1分子当たり約60%がフコシル化されている<sup>5)</sup>。

AGPはイヌの摘出肝実験<sup>6)</sup>やラット肝臓の灌流実験<sup>7)</sup>により、肝臓での生合成が明らかにされ、血中のAGPの大部分は肝臓で作

a 熊本大学大学院薬学教育部薬物動態制御学分野 〒862-0973 熊本市大江本町5-1

b 熊本大学大学院医学教育部生体機能薬理学分野 〒860-8556 熊本市本荘1-1-1

a Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University; 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan

b Department of Cell and Biological Pharmacology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University; 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan.

小田切 優樹

熊本大学大学院薬学教育部薬物動態制御学分野 〒862-0973 熊本市大江本町5-1

Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University; 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan

論文受付 2003年6月2日 受理 2003年6月19日

られると考えられている。Weisman<sup>8)</sup>らは<sup>131</sup>I-AGPのturn overから、その半減期を5日と報告している。また、その血漿中濃度は、健常時に0.5~1.0 g/Lであるが<sup>9)</sup>、炎症、火傷、感染症、腫瘍(癌)、心筋梗塞、妊娠時などに血液及び組織中で2~4倍増加する<sup>10, 11)</sup>。このAGPの誘導・発現は、免疫、炎症反応に重要なインターロイキン1(IL-1)、インターロイキン6、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )といった炎症性サイトカイン及び糖質コルチコイドにより制御されていることが報告されている<sup>12, 13)</sup>。興味深いことに、Table 1に示すように、AGPは肝臓だけでなく炎症反応に深く関わりのある単球、リンパ球、血管内皮細胞などでも合成され<sup>14)</sup>、さらに、炎症部位に局在することが蛍光電顕などで明らかにされている<sup>15, 16)</sup>。そのため従来より生合成が亢進する急性炎症時に、AGPはその病巣部位で何らかの働きをしているものと推察されてきた。現在までに報告されているAGPの生理作用としては、例えば、血小板凝集抑制<sup>17, 18)</sup>、IL-1レセプターアンタゴニスト誘導<sup>19, 20)</sup>、リンパ球増殖抑制<sup>21, 22)</sup>、抗好中球活性、抗補体活性<sup>23)</sup>などがある。また、最近では白血球と血管内皮細胞の接着因子であるセレクチンと高親和性のsLe<sup>x</sup>残基の発現増大が炎症時AGPで観察されており<sup>24)</sup>、セレクチンとsLe<sup>x</sup>残基の結合をAGPが阻害する可能性も見出されている<sup>25)</sup>。さらに、AGPは微小血管の内皮細胞に結合し、自身の負

電荷を供与することにより<sup>26, 27)</sup>、ポリアニオン高分子量蛋白質の血管透過抑制に関与していると考えられている<sup>26, 28)</sup>。このように、AGPの抗炎症効果や免疫抑制効果については数多くの報告がなされている。しかしながら、急性炎症は、局所における微小循環系を中心としたものである。急性炎症時には、腫瘍壊死因子などのサイトカインによりもたらされる活性酸素などによって赤血球膜障害が起こり、異型化した赤血球がマクロファージによる貪食反応を受けるようになる。

なかでも脾臓は特有のフィルター構造が発達しており、停滞した赤血球に対し代謝的ストレスを与えることと相まって、変形能の低下した赤血球を高感度に検出して除去し、貧血や組織の低酸素血症を引き起こすことが知られている<sup>29, 30)</sup>。また火傷時では、大量の体液が失われ、浸透圧低下や末梢循環血流量が減少する結果、末梢組織への酸素供給が不足し、ショック症状を引き起こす。また、組織の修復過程における細胞の増殖と分化、さらに損傷部位の再形成にとって損傷組織への血液供給は極めて重要である。

そこで本稿では、AGPの血液循環系への作用について、最近、当研究室で得られた知見を中心に紹介する。

## 2. AGPの体内動態特性

作用部位などを考える場合、AGPやその糖修飾体の生体内における動態を明らかにすることは、AGPの構造・機能発現という観点から大変興味深い。一般にAGP、セルロプラスミン、フェツインなどの糖蛋白質の半減期は数時間であるのに対し、糖鎖末端のシアル酸をシアリダーゼにより除去し、アシアロ体にすると半減期は数分になる。これはシアル酸を除去することにより、Fig. 1に示すように、露出したガラクトースが肝臓のアシアログリコプロテインレセプターに認識され、取り込まれることによって生じることが明らかにされている<sup>31, 32)</sup>。この仮説を実証すべく、石橋らはアシアログリコプロテインレセプターノックアウトマウスを作成し、AGPの血中濃度推移をノーマルマウスと比較検討したところ、予想に反し両者共にまったく同様な血中濃度推移を示した。このことから、著者らはAGPの血中からの消失にはアシアログリコプロテインレセプター以外の経路が関与している可能性を報告している<sup>33)</sup>。このように、AGPの消失経路や消失部位については、様々な説があり、未だ不明瞭な点が多く残されている。しかしながら、生体内において様々な生理作用を発揮するのは未変化体のAGPであると考えられる。なぜなら、生体内で糖蛋白質がシアリダーゼによりアシアロ体になるという報告は未だなく(Fig. 1)、仮に、生体内でAGPがアシアロAGPになったとしてもすぐに肝臓のアシアログリコプロテインレセプターに取り込まれることは明らかで<sup>31)</sup>、生体内には未変化体のAGPしか存在していないと考えられる。

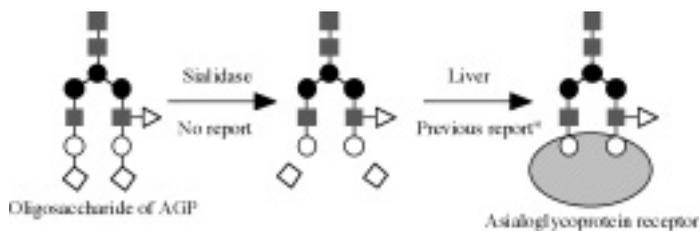
また当研究室で<sup>131</sup>I標識したAGPをマウス尾静脈より投与し、30分後における臓器分布を調べた結果、AGPはほとんど消失部位である肝臓と血液中に存在した。さらに、血液中に存在するAGPのうち約3分の1は血球中に存在することが示唆され、

Table 1 Extra-hepatic expression of AGP

Organs or cell types	Protein	mRNA	Constitutive	Inducible
Kidney	-	+	-	+
Adipose	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-
Thymus	-	-	-	-
Heart	+	-	+	-
Testis	-	-	-	-
Ileum	+	-	-	+
Stomach	+	-	-	+
Colon	+	-	+	+
Intestinal epithelial cell	-	+	-	+
Prostatic epithelial cell	+	-	-	+
Brain	-	-	-	-
Breast	+	-	+	+
Breast epithelial cell	+	-	+	+
Uterus	-	-	-	-
Decidua	+	-	-	+
Lung	+	-+	-	+
Pulmonary fibroblast	-	+	-	+
Pneumocyte II	+	+	-	+
Alveolar macrophage	+	+	-+	+
Peritoneal macrophage	-	-	-	-
Monocyte	+	-	+	+
Lymphocyte	+	-	+	+
Granulocyte	+	-	+	+
Endothelial cell	+	+	+	-

The expression (+) or the absence of expression (-) of AGP protein and mRNA are described for the extra-hepatic tissues and cell types studied. When the AGP gene expressed, constitutive (basal) or inducible (inflammation, cancer) expression in the corresponding tissue or cell type is indicated.

Fournier et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1482**: 157-171 (2000)



**Fig. 1 A model for elimination route of AGP**  
 Terminal sialic acid residues were removed by sialidase, then desialylated (terminal galactose residues) AGP was uptaken in asialoglycoprotein receptor on parenchymal cells of the liver.  
 ■: N-acetylglucosamine, ●: mannose, ○: galactose,  
 ◆: sialic acid, ▴: fucose.  
 a); Morell A. G., et al., *J. Biol. Chem.*, **246**: 1461-7 (1971)

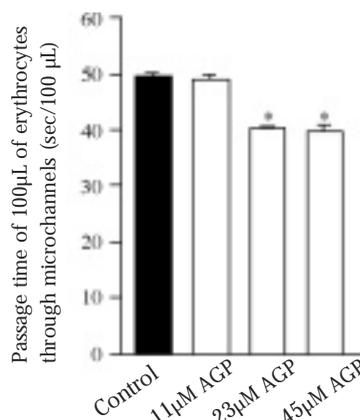
AGPが血管及び血球に対して何らかの影響を及ぼしている可能性が十分に考えられた。

### 3. 赤血球に対するAGPの影響

両凹円盤状の特徴的な形状を持つ赤血球の径はヒトの場合約7.2~8μmあり、毛細血管の平均的径(5~6μm)より大きい。したがって、赤血球は変形して毛細血管を通過することになる。そのため、赤血球の変形能が毛細血管での血流速度ないし血流量を左右する最も重要な因子になる。一方、赤血球の主な役割は酸素運搬であるが、そのためには正常な細胞形態と機能が不可欠である。特に末梢循環系における赤血球の変形能は、組織の低酸素血症の防止に極めて重要な働きをしている。そこでまず、菊池らによって開発された半導体微細加工技術(集積回路制作技術)を用いてシリコン単結晶基板表面に加工した微細な溝(マイクロチャンネル)のアレイを毛細血管モデルとして用いる流動性測定法により<sup>34)</sup>、AGPの赤血球変形能に対する影響を調べた。すなわち、等張リン酸緩衝液に50%に調製した健常人の赤血球がポアサイズ5μmのマイクロチャンネルを100μL通過するために要する時間を測定した。Fig. 2に示すように、AGPIは健常人の血中濃度である23μM、炎症時の血中濃度である45μMにおいて、赤血球のマイクロチャンネル通過時間を有意に短縮した。さらに、マイクロチャンネル通過後の赤血球の溶血の度合いを調べたところ、AGPIは通過後の溶血を有意に抑制した。したがって、AGPIは赤血球の変形能を良好にし、毛細血管における赤血球の流れを改善することが示唆された。

赤血球を低張の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液(pH 7.4)に浮遊させると、赤血球内は外部より高張であるので、水分は血球内に入り込み、結果として膨張し球状となり、遂には膜が破れて溶血に至る。この原理を利用して赤血球膜の安定性を評価した<sup>35)</sup>。50%に調製した赤血球は約150mOsm以下で有意な溶血が認められたが、その溶血を23、45μMのAGPIは有意に抑制した。このとき用いたAGPによる浸透圧の変化は認められなかった。したがって、AGPIには赤血球膜安定化作用があることが示唆された。

急性炎症時には、腫瘍壊死因子などのサイトカインによりも



**Fig. 2 Effects of AGP on the time required for 100 μL erythrocytes to pass through microchannels**  
 The data are average values of 3 - 4 experiments (±S. D.).  
 \*P < 0.01 as compared with control.

たらされる活性酸素などによって赤血球膜障害が起こり、異型化した赤血球がマクロファージによる貪食を受けたり、脾臓のフィルターにより変形能の低下した赤血球が検出され除去されたりする<sup>29)</sup>。そこで、AGPが活性酸素種添加による赤血球膜障害を抑制するかどうか検討した。25mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を50%に調製した赤血球に添加すると、1時間で膜障害による溶血が確認され、3時間後まで増大した。そこで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加3時間後における溶血の度合いを検討したところ、23、45μM AGPIは有意に溶血を抑制した。次にジヒドロローダミン123がローダミン123に酸化されると蛍光を発する特徴を利用し<sup>36)</sup>、25mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による酸化をAGPが抑制するかどうか検討した。23、45μM AGPIはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加によるローダミン123の蛍光を有意に抑制し、AGPIには抗酸化活性があることを示した。また、AGPの糖鎖末端にあるシアル酸にはこのような作用はなく、アシアロAGPIはAGPと同様な抗酸化活性を有していたことから、アルブミンと同様、赤血球の代わりにAGPのペプチド部分が活性酸素種によって酸化され、赤血球を活性酸素種から守っているのかもしれない。

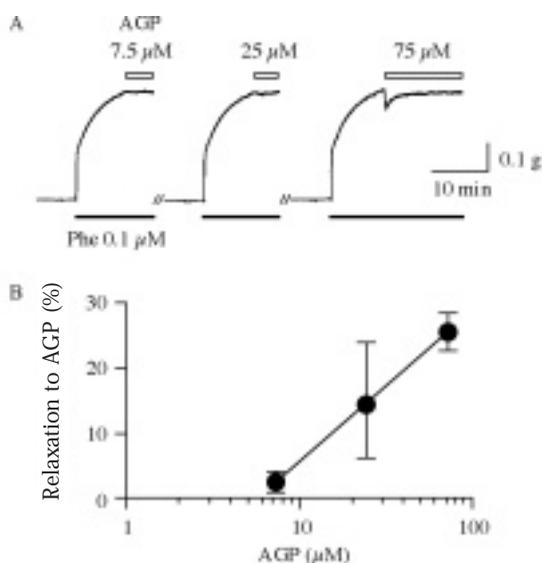
以前、AGPが赤血球膜表面に結合していることが報告されている<sup>37)</sup>。すなわち、AGPIは赤血球膜表面に結合することによって、毛細血管を通過するときは潤滑油の役目をし、さらに膜を安定化させ、AGP自ら酸化されることで外敵から赤血球を守っている可能性が示唆された。

### 4. 血管に対するAGPの影響

前項において、AGPによる組織修復効果のメカニズムの可能性として、循環改善、すなわち血流促進作用を作業仮説とし、AGPが赤血球の流動性を改善していることを示唆した。次に、マウス胸部大動脈摘出標本にAGPを直接作用させて弛緩反応が得られるかどうかについて、等尺性張力測定法(Magnus法)<sup>38)</sup>を用いて検討した。2本のワイヤーで標本が垂直になるように留め、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>で十分に通気し、37℃に温めた栄養液で

満たした標本層中で実験を行った。受容体アゴニストであるフェニレフリンの受容体刺激で活性化されたホスホリパーゼCによりイノシトール3-リン酸が生成され、そのイノシトール3-リン酸により細胞内カルシウム貯蔵部位からカルシウムが放出されて、カルシウム濃度が上昇し、血管の収縮が起こる<sup>39)</sup>。Fig. 3に示すように、標本に対してフェニレフリン(0.1  $\mu$ M)前処理により立ち上がりの速い収縮が現れ、その後、その収縮は持続した。また、フェニレフリンによる収縮が見られた後、AGPを投与すると濃度依存的に弛緩した。これらのことから、AGPは血管弛緩作用を有することが示唆された。

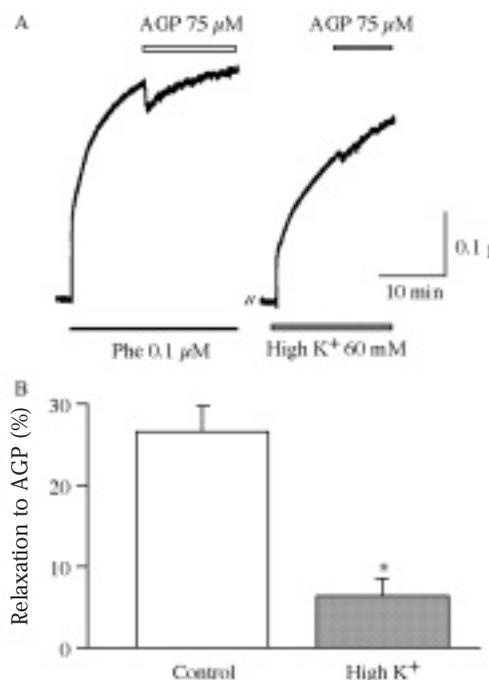
血管においては、内皮細胞由来弛緩因子、すなわちNOが平滑筋弛緩作用を示す。その弛緩のメカニズムは、まず内皮細胞において様々な生理活性物質やアゴニストの受容体が活性化されて起こるカルシウム濃度上昇がきっかけとなっている。カルシウム濃度が上昇すると、活性型のカルシウム/カルモジュリン複合体が形成され、カルシウム/カルモジュリン依存性のNO合成酵素が活性化される。その結果、産生されるNOが平滑筋細胞内に移動し、そこでグアニレートシクラーゼを活性化させ、サイクリックグアノシン 3', 5'-リン酸(cGMP)量が増加し、cGMP依存性プロテインキナーゼが活性化される。このキナーゼによって、細胞膜のカリウムチャンネル及びホスホリパーゼC、筋小胞体のカルシウム放出チャンネル及びカルシウムポンプがリン酸化されることでカルシウム濃度が減少し、平滑筋の弛緩が生じる<sup>40)</sup>。そこで、AGPの血管弛緩作用がNOを介して起こるかどうか検討するために、NO合成阻害剤であるN<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)前処理後の標本に対



**Fig. 3 Concentration-dependent relaxation with AGP**  
(A) Representative traces showing the AGP-induced relaxation at indicated concentrations in Phenylephrine (Phe) (0.1 $\mu$ M)-precontracted rings of mouse aorta. (B) Average concentration-relaxation curves to AGP from experiments as depicted in (A). The relaxations are expressed in per cent of the maximal Phe-induced contraction prior to application of AGP. The data are average values of 5 - 26 experiments ( $\pm$ S. D.).

するAGPの影響をみた。さらに、内皮細胞を除去した標本に対する影響も検討した。アセチルコリンはM1受容体を介してNO合成酵素を活性化し、血管を弛緩することが報告されている<sup>41)</sup>。フェニレフリン誘導収縮をアセチルコリン(1  $\mu$ M)は弛緩させたが、報告通りL-NAME(1mM)の前処理により弛緩の抑制が見られた。しかしながら、AGPの弛緩作用はL-NAMEにより抑制されなかった。他のNO合成阻害剤であるN<sup>o</sup>-monomethyl-L-arginine(0.1mM)においてもアセチルコリンの弛緩作用は抑制されたが、AGPの弛緩作用は影響されなかった。これらのことから、AGPの弛緩作用にNOは関与しないことが示唆された。また、内皮細胞除去によりアセチルコリンの弛緩作用は抑制されたが、AGPの弛緩作用への影響は認められず、内皮細胞の寄与はないことが示唆された。したがって、AGPの弛緩作用に内皮細胞由来のNOの関与はなく、直接平滑筋細胞に作用することが示唆された。

ヘパリンはカルシウムに依存してセレクチンと結合し、sLe<sup>x</sup>残基のセレクチンへの結合を阻害することが知られている<sup>42, 43)</sup>。そこで、ヘパリンの前処理が、フェニレフリン誘導収縮に対するAGPの弛緩作用に影響を与えるかどうか検討した。その結果、ヘパリン(100unit/mL)はAGPの弛緩作用を抑制した。また、アセチルコリンの弛緩作用には影響を与えなかった。ヘパリンはsLe<sup>x</sup>残基を含むリガンドとセレクチンの結合を特異的に阻害し、急性炎症時、腹腔内への好中球の流入を減少させることが



**Fig. 4 Relaxations to AGP in aortic rings precontracted with K<sup>+</sup> solution**  
(A) Representative traces showing the AGP-induced relaxation in Phe (0.1  $\mu$ M)- and high K<sup>+</sup> (60 mM)-precontracted aortic rings. (B) Average relaxation to AGP (75  $\mu$ M) in the Phe-precontracted (open column) and high K<sup>+</sup>-precontracted (dotted column) rings from experiments as depicted in (A). Values (mean $\pm$ S.D.) are expressed as per cent reversal of the maximal Phe-induced contraction prior to application of AGP. \*P < 0.01 vs. control.

報告されているので<sup>42, 43</sup>、今回の結果は、ヘパリンが平滑筋細胞表面に発現したレクチン様ドメインとAGPのsLe<sup>x</sup>残基との結合を阻害したことにより惹起された可能性が考えられる。

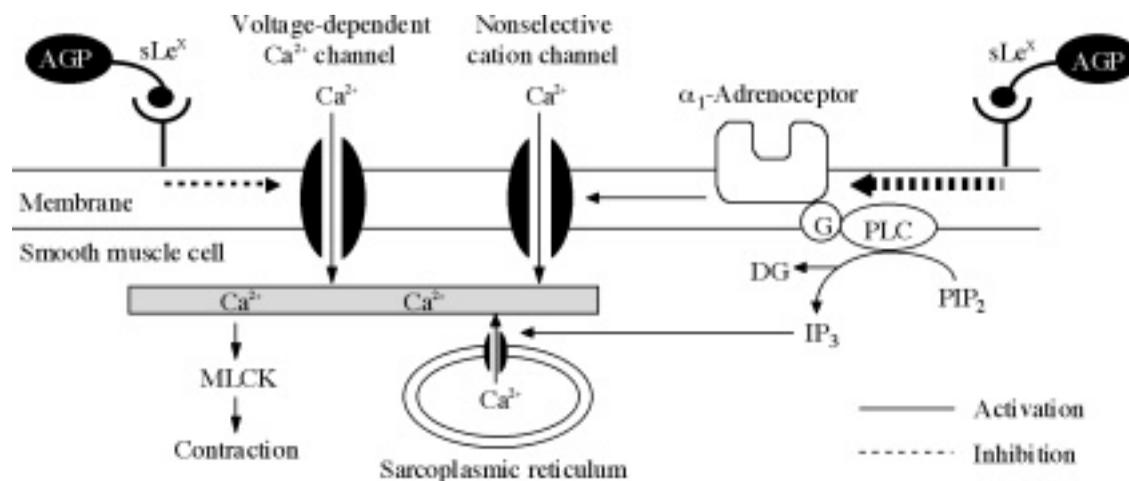
AGPの弛緩作用が前処理の方法によって変わるかどうか検討するために、高濃度のカリウム溶液で前処理を行い、フェニレフリンによる前処理のときと比較した。Fig.4に示すように、栄養液中のカリウムを通常の5mMから60mMまで増やした高カリウム溶液の方が、フェニレフリンを前処理したときよりAGPの弛緩作用の程度は小さかった。なお、細胞外カリウム濃度を増やすと平滑筋細胞膜が脱分極し、電位依存性カルシウムチャンネルが活性化されて開き、カルシウムが細胞内へ流入するため、細胞内カルシウム濃度が上昇して収縮する<sup>44</sup>。すなわち、今回の結果からAGPの弛緩作用は電位依存性カルシウムチャンネルよりむしろ、受容体の活性化による収縮反応に対して効果があることが示唆された。

最近、唐木らは平滑筋細胞で、受容体刺激による非選択的カチオンチャンネルが収縮に關与することを示し、平滑筋細胞の受容体活性化がイノシトール3-リン酸依存性のカルシウム放出と非選択的カチオンチャンネルを介したカルシウム流入によって、細胞内カルシウム濃度を増加させることを報告した<sup>45</sup>。以上のことから、AGPの血管弛緩作用は、AGPが平滑筋細胞膜上のレクチン様ドメインに結合し、受容体刺激によるイノシトール3-リン酸依存性のカルシウム放出、及び非選択的カチオンチャンネルを介したカルシウム流入の阻害によるものと、作用としては小さいものの、電位依存性のカルシウムチャンネルからのカルシウム流入を阻害することによって引き起こされることが示唆された (Scheme 1)。

## 5. おわりに

急性期蛋白質であるAGPは赤血球に対して変形能改善作用、膜安定化作用、抗酸化作用を有することが示唆された。さらに、AGPはマウス大動脈平滑筋細胞のレクチン様ドメインに結合し、血管拡張作用を示すことが示唆された。また、その作用機序として、イノシトール3-リン酸依存性のカルシウム放出阻害、及び非選択的カチオンチャンネルの阻害、作用としては小さいが電位依存性カルシウムチャンネルの阻害が示唆された。すなわち、AGPは生合成が亢進する急性炎症時に、赤血球の流れを保護し、血管を拡張させ、血液循環をより良いものにすることで、末梢循環系における組織の低酸素血症などの防止に極めて重要な働きをしていると推察される。

これらの知見は、急性期蛋白質AGPの生体内での役割の一端を明らかにしたもので、今後、医薬品開発上の観点から更なるデータの蓄積が望まれる。



**Scheme 1 Mechanism of vasorelaxant effect by AGP**

G : G protein, PLC : phospholipase C, PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, IP<sub>3</sub> : inositol-1, 4, 5-trisphosphate, DG : 1,2-diacylglycerol, MLCK : myosin light chain kinase, sLe<sup>x</sup> : sialyl Lewis X.

## Reference

1. Schmid K, Kaufmann H, Isemura S, Bauer F, Emura J, Motoyama T, Ishiguro M, Nanno S. Structure of alpha 1-acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins. *Biochemistry* 1973;12:2711-24.
2. Schmid K, Burgi W, Collins JH, Nanno S. The disulfide bonds of alpha 1-acid glycoprotein. *Biochemistry* 1974;13:2694-7.
3. Aubert JP, Loucheux-Lefebvre MH. Conformational study of alpha 1-acid glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976;175:400-9.
4. Schmid K, Binette JP, Dorland L, Vliegenthart JF, Fournet B, Montreuli J. The primary structure of the asialo-carbohydrate units of the first glycosylation site of human plasma alpha 1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1979;581:356-9.
5. Van Dijk W, Poland DCW. Occurrence and anti-inflammatory properties of specific glycoforms of human alpha 1-acid glycoprotein. *Proceedings of the International Symposium on Serum Albumin and Alpha 1-Acid Glycoprotein* (Eds. M Otagiri, Y Sugiyama, B Testa, J-P Tillement), Tokyo Print, Kumamoto, Japan 2000;115-22.
6. Athineos E, Kukral JC, Winzler RJ. The site of glucosamine incorporation into canine plasma alpha 1-acid glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 1964;106:338-42.
7. Sarcione EJ. Synthesis of alpha 1-acid glycoprotein by the isolated perfused rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 1963;100:516-9.
8. Weisman S, Goldsmith B, Winzler R, Lepper MH. Turnover of plasma orosomucoid in man. *J. Lab. Clin. Med.* 1961;57:7-15.
9. Kremer JM, Wilting J, Janssen LH. Drug binding to human alpha 1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 1988;40:1-47.
10. Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982;389:39-48.
11. Fey GH, Fuller GM. Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. *Mol. Biol. Med.* 1987;4:323-38.
12. Baumann H, Firestone GL, Burgess TL, Gross KM, Yamamoto KR, Held WA. Dexamethasone regulation of alpha 1-acid glycoprotein and other acute phase reactants in rat liver and hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 1983;258:563-70.
13. Kulkarni AB, Reinke R, Feigelson P. Acute phase mediators and glucocorticoids elevate alpha 1-acid glycoprotein gene transcription. *J. Biol. Chem.* 1985;260:15386-9.
14. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha 1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 2000;1482:157-71.
15. Shibata K, Okubo H, Ishibashi H, Tsuda-Kawamura K, Yanase T. Rat alpha 1-acid glycoprotein: uptake by inflammatory and tumour tissues. *Br. J. Exp. Pathol.* 1978;59:601-8.
16. Jamieson JC, Turchen B, Huebner E. Evidence for the presence of rat alpha 1-acid glycoprotein in granuloma tissue: a fluorescence microscopy study. *Can. J. Zool.* 1980;58:1513-7.
17. Snyder S, Coodley EL. Inhibition of platelet aggregation by alpha 1-acid glycoprotein. *Arch. Intern. Med.* 1976;136:778-81.
18. Costello M, Fiedel BA, Gewurz H. Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha 1-acid glycoprotein. *Nature* 1979;281:677-8.
19. Bories PN, Feger J, Benbernou N, Rouzeau JD, Agneray J, Durand G. Prevalence of tri- and tetraantennary glycans of human alpha 1-acid glycoprotein in release of macrophage inhibitor of interleukin-1 activity. *Inflammation* 1990;14:315-23.
20. Tilg H, Vannier E, Vachino G, Dinarello CA, Mier JW. Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 1993;178:1629-36.
21. Pos O, Oostendorp RA, Van der Stelt ME, Scheper RJ,

- Van Dijk W. Con A-nonreactive human alpha 1-acid glycoprotein (AGP) is more effective in modulation of lymphocyte proliferation than Con A-reactive AGP serum variants. *Inflammation* 1990;14:133-41.
22. Pukhal'skii AL, Toptygina AP, Kalashnikova EA, Shiian SD, Nasonov VV, Bovin NV, Liutov AG, Bairushin FT. Immunomodulating effects of alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid) in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1994;118:71-3.
  23. Williams JP, Weiser MR, Pechet TT, Kobzik L, Moore FD Jr, Hechtman HB. Alpha 1-acid glycoprotein reduces local and remote injuries after intestinal ischemia in the rat. *Am. J. Physiol.* 1997;273:G1031-5.
  24. De Graaf TW, Van der Stelt ME, Anbergen MG, Van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid) in human sera. *J. Exp. Med.* 1993;177:657-66.
  25. Jorgensen HG, Elliott MA, Priest R, Smith KD. Modulation of sialyl Lewis X dependent binding to E-selectin by glycoforms of alpha 1-acid glycoprotein expressed in rheumatoid arthritis. *Biomed. Chromatogr.* 1998;12:343-9.
  26. Curry FE, Rutledge JC, Lenz, JF. Modulation of microvessel wall charge by plasma glycoprotein orosomuroid. *Am. J. Physiol.* 1989;257:H1354-9.
  27. Schnitzer JE, Pinney E. Quantitation of specific binding of orosomuroid to cultured microvascular endothelium: role in capillary permeability. *Am. J. Physiol.* 1992;263:H48-55.
  28. Haraldsson B, Rippe B. Orosomuroid as one of the serum components contributing to normal capillary permselectivity in rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 1987;129:127-35.
  29. Yoshida M, Kajii E, Kitagawa S. Macrophages and erythrocytes. *Rinsho Ketsueki* 1989;30:1244-7.
  30. Shiga T, Maeda N. The aging and destruction of erythrocytes and rheology. *Rinsho Ketsueki* 1989;30:1256-60.
  31. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.* 1971;246:1461-7.
  32. Morell AG, Irvine RA, Sternlieb I, Scheinberg IH, Ashwell G. Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. *J. Biol. Chem.* 1968;243:155-9.
  33. Ishibashi S, Hammer RE, Herz J. Asialoglycoprotein receptor deficiency in mice lacking the minor receptor subunit. *J. Biol. Chem.* 1994;269:27803-6.
  34. Kikuchi Y, Sato K, Mizuguchi Y. Modified cell-flow microchannels in a single-crystal silicon substrate and flow behavior of blood cells. *Microvasc. Res.* 1994;47:126-39.
  35. Fujii H. Osmotic fragility test. *Nippon Rinsho* 1997;55 Suppl 1:153-5.
  36. Hondal RJ, Motley AK, Hill KE, Burk RF. Failure of selenomethionine residues in albumin and immunoglobulin G to protect against peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;371:29-34.
  37. Maeda H, Morinaga T, Mori I, Nishi K. Further characterization of the effects of alpha 1-acid glycoprotein on the passage of human erythrocytes through micropores. *Cell Struct. Funct.* 1984;9:279-90.
  38. Karaki H, Sato K, Ozaki H. Different effects of verapamil on cytosolic Ca<sup>2+</sup> and contraction in norepinephrine-stimulated vascular smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* 1991;55:35-42.
  39. Schnabel P, Nohr T, Nickenig G, Paul M, Bohm M. Alpha-adrenergic signal transduction in renin transgenic rats. *Hypertension* 1997;30:1356-61.
  40. 平田結喜緒 . NOのすべて . 東京 : 医歯薬出版 , 1996;88-91.
  41. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991;43:109-42.
  42. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82:3253-8.
  43. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A.

Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* 1998;101:877-89.

44. Imaizumi Y, Muraki K, Takeda M, Watanabe M. Measurement and simulation of noninactivating Ca current in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1989;256:C880-5.
45. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Siata M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 1997;49:157-230.

## リポソームと補体系との相互作用

### Interaction between complement system and liposomes

阿部英樹、藤原満博、東 寛、池田久實

Hideki Abe, Mitsuhiro Fujihara, Hiroshi Azuma, Hisami Ikeda

#### 和文抄録

脂質二分子膜からなるリポソームはその内部に様々な物質を包埋することができ、抗ガン剤、抗真菌剤などがリポソーム製剤として応用されている。人工酸素運搬体においても、セルフリー・ヘモグロビン修飾体に起因する副作用防止を目的とし、リポソームにヘモグロビンを包埋したセル型人工酸素運搬体の開発研究が行われている。しかし一方で、生体にとって異物であるリポソームは生体の感染防御機構により認識され、種々の生体反応を引き起こす。その一つが補体活性化であり、構成脂質や動物種に依存して古典経路あるいは第二経路が活性化される。また、リポソーム投与による補体活性化が原因と考えられる副作用が、動物試験および臨床例で報告されている。本総説では、補体系を活性化するリポソームの特徴と機序について概説する。

#### Abstract

Liposomes consisting of lipid bilayer can encapsulate various kinds of compounds such as anticancer drugs and antifungal antibiotics. Encapsulation of hemoglobin into liposomes as an artificial oxygen carrier has been studied to prevent adverse reactions due to cell-free hemoglobin substitutes. However, liposomes administered are recognized by host defense system, resulting in the trigger of a variety of biological reactions. Complement system is activated by liposomes *via* classical and/or alternative pathway depending on a lipid composition of liposomes and animal species used. Recently, adverse reactions caused by liposome administration have been reported in experimental animal models and human clinical settings. This review will outline the mechanisms of complement activation by liposomes and their characteristics.

#### Keywords

liposome, complement, artificial oxygen carrier, anaphylaxis

#### 1. はじめに

1965年、イギリスのBanghamらは、両親媒性の性質を持つ脂質を水溶液に分散させると、物質を内包できる脂質閉鎖小胞が形成されることを発見し、後にその小胞はリポソームと呼ばれるようになった。それ以降、生体膜の研究において、リポソームは欠かすことの出来ないモデルとして広く用いられている。このモデルにより、生体膜はリン脂質二分子膜にタンパク質が埋まった構造をしているという流動モザイクモデルが広く受け入れられるようになった。そして生体膜の基礎研究を行う上で、リポソームは生体機能解析のモデル系として用いられ、相転移、相分離、物質透過に関わる流動性、膜電位、表面電位、

膜透過性、膜損傷、脂質過酸化、再構成膜による膜タンパク質の機能などについて多くの知見が得られている。特に免疫学の分野では、補体の活性化要因や作用機序を解析する人工膜として貢献してきている。

#### 2. リポソーム製剤

リポソームによる膜の基礎研究の進展とともに、内部に様々な物質を封入できることから医学分野での応用が試みられている(1, 2)。封入されるものとして、抗ガン剤、免疫賦活剤、抗菌剤、抗炎症剤、遺伝子などがある。薬剤をリポソーム製剤とする目的は、薬効を持続させるために徐放性を持たせたり、標

的臓器に効果的に薬剤を到達させ副作用の軽減をはかることである。また遺伝子をリポソームに封入し、細胞融合により外来遺伝子を細胞に導入するという遺伝子治療への試みもなされている。使用目的に応じてリポソームの構成脂質、サイズ、構造、荷電などを変えて調製することにより、ガン細胞や貪食細胞に取り込まれやすくすることができる。また局所投与も有効な方法である。このような利点から、ドラッグデリバリーシステム(DDS)としてのリポソームの応用が考案されている(3)。また、リポソームの血中半減期を長くする研究も盛んであり、血中に長く留まり酸素運搬を担うというセル型人工酸素運搬体としての利用に期待が持たれている(4)。

### 3. リポソームの人工酸素運搬体への応用

セル型人工酸素運搬体創製の可能性は、1957年のDr. Changの検討により示唆された。その後1980年代、ヘモグロビンを脂質二分子膜で包埋したリポソーム包埋ヘモグロビン酸素運搬体が検討され始めた。1990年代には様々な改良が加えられ、*in vitro* および動物モデル試験により多くの知見が得られてきている。多くの酸素運搬体がセルフリー型のヘモグロビン分子修飾体であり、分子修飾により血中半減期の延長がはかられたものの、血管内皮由来弛緩因子NOの消去によると考えられる血圧上昇、消化管運動抑制などの副作用が観察された。この副作用は、ヘモグロビン分子が血管内皮のギャップジャンクションを通過する大きさであり、内皮細胞と平滑筋の間隙に入り込んだヘモグロビンがNOを消去するからであると考えられている。したがって、脂質膜によりヘモグロビンを包埋し分子サイズを大きくした人工酸素運搬体は、このような副作用の防止に有望であると考えられている。加えて、抗酸化物質などを同時封入することにより、ヘモグロビンの機能維持、酸素運搬能以外の機能の付与などに期待が持たれている。

リポソームの体内動態は、(1)投与方法、(2)粒子径と投与量、(3)構成脂質と荷電、表面修飾、(4)封入物質、により異なってくる。現在、セル型人工酸素運搬体を精力的に開発研究しているグループには、早稲田大学/慶應義塾大学/北海道血液センター、テルモ社、アメリカ陸軍研究所がある。三者三様の開発を行っているが、人工酸素運搬体の投与方法は静注であり、封入物質はヘモグロビン(ストローマ・フリー・ヘモグロビン)と共通している。粒子径は、封入効率、作業性、貪食細胞との相互作用や血流動態などを考慮し、いずれも200-400 nmとなっている。また、投与量により血中半減期が異なることも明らかとなっている。したがって、それぞれのグループから報告される異なる生体反応は、構成脂質と荷電、表面修飾に起因すると考えられる。つまり生体適合性を高めるためには、構成脂質と荷電、表面修飾に細心の注意を払わなければならないと言える。

### 4. リポソームに対する生体反応

リポソームは細胞膜と同様リン脂質を構成成分としているため、代謝産物も含めて安全かつ生体適合性に優れていると考えられている。とは言え、生体にとっては異物であるため、血球

細胞や血漿タンパク質と相互作用する。またこの作用は、リポソームの大きさや構成脂質および荷電により異なってくる。リポソームは、異物や老化細胞などの処理を担う細網内皮系により血流中から排除される。また、陰性表面荷電や脂質が反応の引き金となる補体系、凝固系、カリクレイン-キニン系へも影響を及ぼすと考えられる(5,6)。近年、リポソームによる補体系の活性化が、副作用との関連において注目されている。ブタモデル実験において、ある種のリポソームは静脈投与によりアナフィラキシー様反応、肺動脈圧の上昇、心拍出量減少、肺血管抵抗上昇など偽アレルギー反応が起こり、これらの症状と補体系活性化との関連が指摘されている(7-9)。したがって、セル型人工酸素運搬体として投与されるリポソームは、補体系を活性化しないことが重要となる。

### 5. 補体とは

ここでは概要を紹介するので、詳しくは成書を参照されたい(10)。19世紀末、血清中に非耐熱性の溶菌作用を示す因子の存在が発見され、これが後に補体と呼ばれることとなった。補体系は30種以上の因子からなり、生体にとっての異物、例えば細菌のリポ多糖などに反応する自然免疫として殺菌、溶菌を担い、また獲得免疫の補助として、生体の感染防御機構において重要な役割を果たしている。補体が活性化される経路には、古典経路(classical pathway)と第二経路(alternative pathway)、レクチン経路の3つがあり、プロテアーゼカスケードを成している(Figure 1)。それぞれの経路の活性化は異なる機序により起こる。

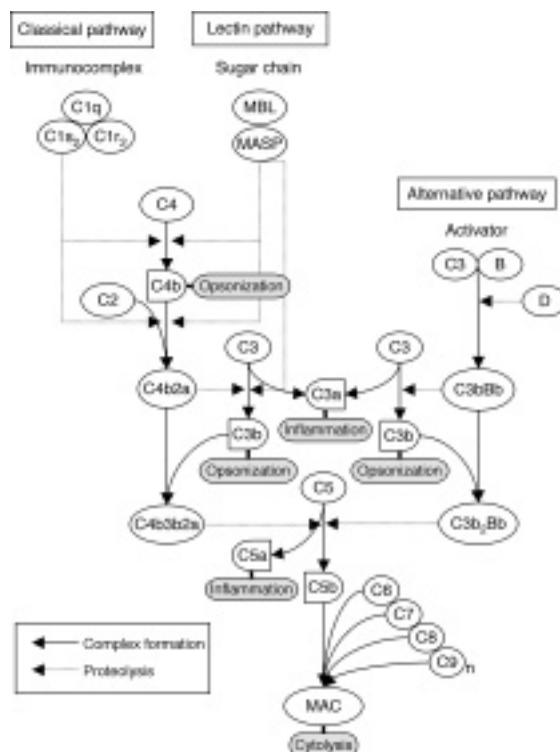


Figure 1. Overview of complement activation pathway

古典経路の活性化は抗原に結合した抗体が構造変化を起こし、そのFc部分に補体成分C1が結合することから始まる。活性化のためにはC1のサブユニットであるC1qがFcに多価性に結合する必要があることから、抗体がIgMであれば1分子でよいが、IgGでは少なくとも2分子以上が近接して抗原に結合しなければC1qの多価性結合が起こらず補体活性化は起こらない。こうして活性化したC1はC4をC4aとC4bに加水分解し、抗体結合部位周辺の細胞膜へのC4bの沈着が起こる。この沈着は、加水分解により表出したC4bのチオエステル結合(-S-CO-)が、膜表面のNH<sub>2</sub>基、OH基と共有結合する事により起こる。その後C4bはC2aと複合体(C4b2a)を形成してC3分解酵素活性を獲得し、C3を活性化(C3aとC3bに分解)する。C3活性化は古典経路、第二経路、レクチン経路に共通した反応であり、これ以降のカスケード反応は共通である。

レクチン経路は血清中に存在するマンノース結合レクチン(MBL)/MASP-1&2複合体を介する経路である。MBLの糖鎖認識ドメインが細菌やウイルス表面のマンノースやN-アセチルグルコサミンと結合するとセリンプロテアーゼ前駆体であるMASPsは活性化し、C4をC4aとC4bに、C3をC3aとC3bに加水分解する。こうして抗体非依存的に補体の活性化が起こる。

第二経路では特異的な認識を必要とせず、補体活性化が起こる。自然状態ではC3の活性化が僅かずつではあるが持続的に発生しており、血中のH因子、I因子という抑制因子によりそれ以降のカスケード反応が抑え込まれている。この活性化が細菌表面などで起こるとC3bの沈着が始まり、抑制因子による阻害効果が十分働かなくなり、一連の活性化カスケード反応が進行する。

それぞれの経路で生じたC4bおよびC3bは複合体C4b3b2aおよびC3b2Bbを形成しC5をC5aとC5bに加水分解する。生じたC5bは次々と補体C6、C7、C8、C9と複合体を形成し、膜傷害複合体(membrane attack complex: MAC)となる。MACは細胞膜を貫通する穴を形成し、膜内外のイオンバランスを崩すことで膜破壊を引き起こし、殺菌作用を示す。一方、細菌やウイルスに結合したC4b、C3bは目印となり(オプソニン効果)、補体レセプターを有する食細胞による貪食作用を増強する。もう一つの補体の生理活性として、加水分解で生じたC3a、C5a、(C4a)の炎症メディエーターとしての作用がある。アナフィラトキシンと呼ばれるこれらのペプチドは、肥満細胞からのヒスタミン遊離、血管透過性の亢進、平滑筋の収縮などを引き起こし、局所に炎症を引き起こす。また走化性因子として炎症部位に好中球や単球・マクロファージを引き寄せ、活性化する。

したがって、リポソームにより補体系が活性化されると、リポソームの破壊やアナフィラトキシンによる全身性の炎症反応が起こり、重篤な副作用を引き起こす可能性があることから、セル型人工酸素運搬体には高い生体適合性が求められる。

## 6. リポソームと補体の反応

リポソームと補体系との相互作用に関しては、研究者によって相反する結果が報告されている。この矛盾は、リポソームの

表面荷電密度、粒子径、膜流動性、構成脂質、脂質飽和度、血清あるいは血漿に加える脂質量、動物種の違いによりもたらされる(11)。そのため現時点では、リポソームが補体系に及ぼす影響を、個々の結果に基づき系統立てて解説することは困難である。以下にこれまでの主だった検討結果をまとめた。一般的には、中性荷電脂質を構成成分としコレステロール含量が低い場合には、多くの動物種で補体活性化がみられない傾向にあるようだが、相矛盾する結果もあり、相互作用の複雑さが伺われる。

### 6.1 第二経路の活性化

血清あるいは血漿に酵母や細菌、異種赤血球を添加すると補体系が活性化し、これらは抗体に依存しない第二経路によることが知られていた。その機序を探るため、リポソームに膜タンパク質を埋め込んで人工膜モデルを構築し、検討が進められた。シアル酸糖タンパク質で表面をコーティングすると第二経路による補体活性化が抑制され(12)、また血中滞留時間を延ばすことが出来る(13)。その一方、未修飾のリポソームを血清と反応させると内容物が漏出し、またリポソーム表面がオプソニン化されることから血中からの消失が促進され、DDSとしての使用が問題になることが明らかになり始めた。

#### リポソーム表面荷電の影響

多くの検討において第二経路依存性は、Ca<sup>2+</sup>非依存的Mg<sup>2+</sup>依存的な補体の活性化により古典経路と区別している。また活性化の有無は、リポソームへのC3(C3b、iC3b)の結合、感作赤血球溶血活性の低下などにより判断している。リポソームによる第二経路活性化は表面荷電に依存すること、即ちstearylamineに付与される陽性荷電が活性化の引き金になり、また、脂肪酸鎖長や飽和度も影響する(14, 15)。モルモットおよびヒト血清を用いた検討では、陰性荷電リポソームでは第二経路は活性化されない(15)。一方、ラット血清においては、陽性荷電、陰性荷電両リポソームとも古典経路により補体活性化を引き起こすと報告されている(16)。また、ラット血漿を用いた検討では、陰性荷電リポソームにより古典経路ではなく第二経路により補体が活性化されるとの報告もある(17)。この乖離は先の論文の著者らにより、血漿分離に用いたヘパリンが第二経路活性化を優位にしているためであろうと指摘されている(16)。リポソーム製剤が生体に投与されたときに相互作用するのは血漿なので、血漿を用いた検討の方がより臨床に近い状態といえる。しかし、*in vitro*の検討においては、用いる抗凝固剤によっては補体系に影響を及ぼすため、注意が必要と思われる。

#### コレステロール含量の影響

多くのリポソーム製剤はphosphatidylcholine(PC)とcholesterol(CHOL)を主たる構成脂質としている。CHOLは膜の流動性を高めるために用いられ、PC:CHOL(55:45)では表面荷電は中性であり、モルモット、ラット、およびヒト血清

**Table 1. Electric charge of liposomes and the activation of complement system**

Charge	Lipid composition	Subject	Classical pathway	Alternative pathway	Reference
Positive	DMPC:CHOL:GC:SA	Human serum	-	+	13
	PC:CHOL:SA	Human serum	-	+	14
	PC:CHOL:SA	Guinea pig serum	-	+	
Negative	PC:CHOL:SA	Rat serum	+	-	15
	DMPC:CHOL:GC:DCP	Human serum	-	-	13
	PC:CHOL:(PG/PA/CL/PI/PS)	Human serum	+	-	14
	PC:CHOL:(PG/PA/CL/PI/PS)	Guinea pig serum	+	-	
	PC:CHOL:(PG/PA/CL/PI/PS)	Rat serum	+	-	15
	HEPC:CHOL:DCP	Rat plasma	-	+	16
	PC:CL/PG PC:PA	Human purified complement	+	ND	32
PC:CHOL:CL/PG/PI	Human Ig-depleted serum	-	ND		
Neutral	PC:CHOL PC:CHOL:DPPE	Human serum Guinea pig serum Rat serum	-	-	14, 15
	PC:CHOL PC:CHOL:DPPE	Human serum	ND ND	- +	

+, Activated; -, Not activated; ND, Not determined.

DMPC, dimyristoyl phosphatidylcholine; CHOL, cholesterol; GC, galactosyl ceramide; SA, stearylamine; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PA, phosphatidic acid; CL, cardiolipin; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; HEPC, hydrogenated egg PC; DCP, dicetylphosphate; DPPE, dipalmitoyl phosphatidylethanolamine.

**Table 2. Cholesterol contents and the activation of complement system**

Lipid composition	CHOL(Mol %)	Subject	Classical pathway	Alternative pathway	Reference
DMPC:CHOL:GC:SA	20	Human serum	-	-	13
	43, 60		-	+	
PC:CHOL:PG (lipid 10 mM)	0 - 10	Rat serum	-	-	15
	25 - 40		+	-	
PC:CHOL	45	Human serum	-	-	14, 15
		Guinea pig serum			
		Rat serum			
HEPC:CHOL:DCP	22, 33	Rat serum	+	-	18
	44		-	+	

+, Activated; -, Not activated

では補体活性化は起こらない(15, 16)。これはdipalmitoyl phosphatidylethanolamin (DPPE) を含むリポソーム PC:CHO:DPPE (35:45:20) においても同様であった(15, 16)。その一方、PC:CHOL (66:33) では活性化が起こらないが DPPE を導入することにより DPPE 含量依存的に第二経路の活性化が起こり、これはアミノ基をジメチル化した三級アミンおよびトリメチル化した PC にするとその活性が失われるとの報告もある(18)。両者の違いは用いた PC による膜の流動性の違いによるかも知れないと推測されている。話は CHOL に戻るが、ヒト血清において高 CHOL 含量 (43 mol%) により第二経路を介した補体の活性化が起こるとの報告もある(14)。また、ラットにおいては高 CHOL 含量 (44 mol%) では第二経路を介した活性化が、低 CHOL 含量 (22 or 33 mol%) では古典経路を介した活性化が起こり、古典経路の活性化は血液中に存在する抗脂質自然抗体、特に IgM が関与しているとの報告もある(19)。

#### 抗体依存性の第二経路活性化

基本的に第二経路の活性化には抗体は必要としないが、抗体介在による第二経路の活性化も報告されている(20)。C4欠損モルモット血清 (C4D-GPS) と paragloboside (PaGlo) 含有リポソームを反応させると Ca<sup>2+</sup>非依存的に補体活性化が起こる。しかし specific pathogen-free 飼育モルモット血清 (SPF-GPS) では補体活性化が起こらない。また通常飼育モルモット血清 (GPS) による PaGlo リポソーム溶解は PaGlo 抗体量と相関すること、Ca<sup>2+</sup>非存在下で SPF-GPS に非働化 C4D-GPS あるいは C4D-GPS の精製 IgM 画分を添加すると PaGlo リポソームを溶解することが観察された。これらのことから、PaGlo リポソームは、通常飼育ラット血液中の PaGlo に対する IgM タイプ自然抗体を介した第二経路の活性化により溶解したと結論づけられた。こうした自然抗体は自己の抗原とも反応し補体活性化を引き起こす可能性があるが、生体膜ではシアロ糖タンパク質の共

存によりその反応が抑制され、それにより非自己に対してのみの反応性を発揮しているとの仮説が提案されている(21)。

## 6.2 古典経路の活性化

古典経路による補体系活性化とリポソーム傷害の機序解明には、ヒツジ赤血球膜により調製したリポソームと、抗ヒツジ赤血球ウサギ血清およびモルモット血清を用い検討された。これはヒツジ赤血球の糖脂質画分に見いだされたForssman抗原と抗血清の抗原抗体反応がリポソーム上で起こり、そこに補体が関与して内容物の漏出を引き起こす(22, 23)。補体タンパク質のアッセブリーの検討は主にヒツジ赤血球を用い行われていたが(24) 構成脂質の影響をみるため、ヒツジ赤血球膜脂質に種々の脂質を添加したリポソームでの検討が行われた。この結果、第二経路と同様、古典経路によるリポソーム傷害にも脂肪酸鎖長や飽和度が関与し、鎖長が長くなると補体による内容物の漏出が低下し(25) 補体の活性化が抑制される(16)。これは脂質二分子膜が厚くなることによると思われる。補体活性化とリポソーム内容物の漏出はコレステロール含量の増加および不飽和脂肪酸の存在によっても抑制される(16, 25)。

## コレステロールと自然抗体

全ての動物は血液型抗体に代表される、様々な生体物質に対する自然抗体を持っている。リポソーム研究においては種々の脂質に対する自然抗体が報告されている(20, 26)。ウサギ血清中にはスフィンゴミエリン含有リポソームと反応する自然抗体が存在し、モルモット血清存在下で内容物の漏出を誘導し、この反応はIgM依存性であった(26)。高CHOLリポソーム(71%)はヒト血清により傷害を受け、内容物の漏出が起こるが(低CHOL(43%)およびモルモット血清では起こらない)これは古典経路を介した補体活性化によるものと考えられていた(27)。後に、この補体活性化はヒト血清中に存在する抗CHOL自然抗体により誘導され、陽性荷電リポソームやeggPCをDPPCで置き換えたリポソームでは活性化しないことが報告された(28)。また検討したヒト血清のほぼ全てにおいて、抗CHOL IgGおよびIgMが検出されている(29)。近年、この抗CHOL自然抗体が血中LDLコレステロールの代謝に重要な役割を果たしているとの説が提唱され(30)、このことはアテローム性動脈硬化症と関連があるのかも知れない(31)。またヒト血清中には交差反応性抗リン脂質自然抗体の存在も指摘されており、リポソームへの結合はPCやATPで抑制されること、リポソームとの混合により補体消費が起こることが報告されている(32)。

## 抗体非依存性の古典経路活性化-陰性荷電リポソーム

抗体依存性の第二経路の活性化が示されているのと同様、抗体非依存性に古典経路が活性化されるとの報告も数多い。陰性荷電を持つcardiolipin (CL) およびPGからなるリポソーム(PC:CL(20:80) PC:PG(20:80))には直接C1が結合して活性化し、この作用はCLでより強い(33)。また、抗体依存性の活

性化の場合、生理的なC1インヒビターの結合はC1活性化を阻害しないが、PC:CLリポソームではCL含量依存性(CL:40-80%)にC1インヒビターにより活性化が抑制される。一方、PC:PGではPG:40-80%の範囲でC1インヒビターにより活性化が抑制される。C1qはPC:CLのCL含量依存性に結合したが、PC:PGには結合しなかった。CLによる古典経路の活性化は抗原抗体複合体のそれと機序が異なり、またCLとPGでも異なる。リポソームによる抗体非依存性の古典経路の活性化には、マイクロモル濃度という比較的多量の脂質を必要とする。種々の陰性荷電リポソームにより補体活性化が起こるが、化学構造、荷電密度により活性化の度合いが異なる(34)。陰性荷電リポソームによる第二経路の活性化は、ヒト血清においてはみられていない(34)。

## 6.3 細網内皮系とリポソーム

リポソームによる補体活性化の結果、リポソームはオプソニン化される。オプソニン化され表面にC3bを共有結合した異物は補体レセプターCR1、CR3を介して細網内皮系により排除されるが(35) リポソームもオプソニン化により肝臓のKupffer細胞により貪食される(36)。この貪食はリポソームのサイズに依存し、eggPC:CHOL:DCP(50:40:10)リポソームでは、粒子径200 nmでは補体活性化が起こらず、ラット肝の取り込みもオプソニン未処理リポソームと変わらないが、粒子径800 nmでは肝臓の取り込みも増大し、補体も活性化する(37)。しかし後に、補体の活性化は粒子の大きさではなく粒子の数に依存し、粒子径200 nmのリポソームでも400 nmおよび800 nmのリポソームと同等の内容物漏出が起こることが報告された(38)。表面荷電に関しては、マウス腹腔マクロファージもオプソニン化リポソームを貪食するが、リポソームの陰性荷電の増大とともに貪食量が低下するとの報告がある(39)。つまりこの報告によると、リポソームの陰性荷電は、*in vitro*では抗体非依存性に古典経路を活性化してオプソニン化を促進するが、マクロファージによる貪食を抑制することになる。また、CHOL含量はその増大とともにラット腹腔マクロファージへの付着と取り込みが増大するが、さらに取り込み速度にも影響を及ぼし、補体依存性と非依存性の貪食経路の存在が示唆されている(40)。加えて、動物種によっては*in vitro*と*in vivo*の結果の乖離にも注意を要する(41)。ラットでは血小板上に補体レセプターが存在するため、投与されたPG含有リポソームはオプソニン化されて血小板と結合し、血小板減少を来す(42, 43)。一方、ヒトでは血小板には補体レセプターCR1が存在しないため、PG含有の有無にかかわらず補体を活性化しオプソニン化されたりリポソームとは相互作用しないと考えられる(43)。

## 6.4 補体からのエスケープ

このようにオプソニン化されたリポソームは細網内皮系により捕捉され、血中から速やかに消失してしまう。そのため、補体からのエスケープおよび血中半減期の延長を目的として、リポソームの表面修飾が検討されてきた。リポソーム構成脂質にmonosialoganglioside (GM<sub>1</sub>)を用いるとマウスにおいて血中

滞留時間が延長することが示された(13)。しかし、マウスでは血中滞留時間が延長したものの、ラットにおいては逆に短縮された(44)。このリポソームをヒト血清で処理したのち肝灌流実験に供しても、マウス肝では延長するもののラット肝では血中滞留時間は短縮した。一方、リポソームをポリエチレングリコール(PEG)修飾すると、ヒト血清との反応においても内容物の漏出は認められず、マウスにおいて血中半減期は30分以下から5時間に延長した(45)。ラットにおいてもこの特性は維持され、コレステロールや陰性荷電脂質の影響を受けなかった(46)。補体活性化の防止には、PEG分子量が大きい場合は、より少ない割合でリポソームに導入しても効果がある(47)。

しかし、PEG修飾リポソーム製剤において、予想外な副作用が報告され始めている(9)。抗ガン剤doxorubicinを封入したPEG修飾リポソーム製剤Doxil/Caelyx(hydrogenated soy PC:CHOL:PEG2000-distearoyl PE(60:20:20))は1995年にエイズ関連カポジ肉腫を適用として認められた。しかし、Doxilの投与により急性症状として、呼吸困難、紅斑、顔面紅潮、胸痛、背面痛、血圧変化が報告されている。Doxilより一足早く認可された深在性(内臓性)真菌感染治療薬AmBisome(amphotericin B封入非PEG修飾リポソーム製剤)でも、輸注後数分以内の急性副作用(血圧低下、紅斑、発熱、気管支痙攣、顔面浮腫)が観察され、原因は内包された薬剤ではなくリポソームに起因するアナフィラキシー反応と考えられている(48, 49)。また、Doxilと同じ脂質組成である放射性画像診断造影剤<sup>99m</sup>Tc標識PEGリポソームの投与でも、紅潮や胸部圧迫感の発症が見られ(50) 0.1 μmol/kg bodyweightの少量投与では4時間後のシンチグラムで肝臓、脾臓、骨髄に高い放射活性が検出された(51)。このことは、<sup>99m</sup>Tc標識PEGリポソームが血中から細網内皮系に取り込まれたことを示す。<sup>99m</sup>Tc標識PEGリポソーム投与により副作用を起こした患者において輸注直前、副作用発症直後の血液を調べたところ、C3、BおよびC4の低下が認められ、補体の活性化が示唆されている(52)。PEG修飾されているにもかかわらず補体が活性化される理由は不明であるが、PGを構成脂質として用いているためかもしれない。

## 7. セル型人工酸素運搬体と補体

上述のように、リポソームと補体系の相互作用は、表面荷電密度、粒子径、膜流動性、構成脂質、脂質飽和度、血清あるいは血漿との混合比により左右され、また用いる動物種の違いによっても結果は様々である。これらのパラメーターに留意しながら、セル型人工酸素運搬体の開発を行うことが重要である。

アメリカ陸軍研究所のセル型人工酸素運搬体はLEH(liposome-encapsulated hemoglobin)と呼ばれ、distearoyl phosphatidylcholine(DSPC):dimyristoyl phosphatidylglycerol(DMPG):CHOL:α-tocopherol(50:4.5:45:0.5 mol%)からなる平均粒子径388 ± 55 nmのPEG未修飾リポソームである(53)。初期の動物実験では、ラット投与10分後には血漿の補体溶血活性(CH50)は著明に減少し、同時にトロンボキサン<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)の劇的な増加が観察された。

ラット血液中にはLEHに反応する抗体が検出されたが、補体活性化は第二経路を介して起こったと考えられた(53)。ラット血清を用いた*in vitro*の検討でもCH50は同様に低下し(54)、投与試験では平均動脈圧と心拍数の増加、血小板減少、血圧低下、頻脈、心係数低下などが観察された(55, 56)。血液生化学的パラメーターの変化は一過性であり、肝臓、脾臓マクロファージへのLEHの蓄積が観察されている(57)。その後、LEHに反応する抗リン脂質自然抗体がヒト血清中に見いだされ(32)、LEHは古典経路および第二経路の両経路を介してヒト補体系を活性化することが報告された(58)。またこの活性化は、可溶性補体レセプター-type 1(sCR1)により効果的に抑えることができる。このLEH投与により起こる症状は感作を必要とせず、初回投与後1-5分以内に起こることから“補体活性化関連偽アレルギー”と名付けられ、感受性の高いブタを用い、心臓脈管系への影響が詳細に調べられた。その結果、ラットと同様、平均動脈圧と心拍数の増加、血小板減少、TXB<sub>2</sub>の産生などが観察された。このようなことから、外傷患者にとっては症状を悪化させる可能性が示唆されている(59)。

テルモ社が開発したセル型人工酸素運搬体はNeo Red Cell(NRC)と呼ばれ、hydrogenated soy PC:CHOL:myristic acid:α-tocopherol:PEG5000-PE(7:7:2:0.28:0.4)を構成脂質とする平均粒子径220 nmのPEG修飾リポソームである(60, 61)。ヒト新鮮血漿との相互作用において、生食群に比べC3a値の若干の上昇がみられたもののC5aの生成は両者ともほとんど無く、補体系への影響は無いと考えられた(62)。

早稲田大学が開発したセル型人工酸素運搬体はヘモグロビン小胞体(HbV; hemoglobin vesicles)と呼ばれ、DPPC:CHOL:DP-L-glutamate-N-succinic acid(DPEA):PEG5000-DSPE(5:5:1:0.033)を構成脂質とする平均粒子径250 nmのPEG修飾リポソームである(63)。我々の検討の結果、HbVとヒト血清との混合において補体価CH50の低下、即ち補体の活性化は起こらないことが観察された(論文作成中)。ラット血清およびラット*in vivo*投与においても補体は活性化されない(64)。加えて、凝固系、カリクレイン-キニン系への影響も無いことが示されている(65)。HbVのゼータ電位を測定したところ、生理的食塩水中では表面荷電は-2.6 mVとほぼ中性であった。一方、構成脂質にDPEAではなくDPPGを持つPEG修飾リポソームの表面荷電も-3.4 mVであったが、凝固系に影響を及ぼし、カリクレイン-キニン系も活性化した(65)。このことは、単に表面荷電だけではなく、構成脂質の親水性頭部(head group)が影響を及ぼすものと推測される。このようにHbVは補体系を活性化しないことから、“補体活性化関連偽アレルギー反応”と呼ばれる投与直後の心血管系の急性副作用に対する懸念はほとんど無いと考えられる。またHbVのラット投与において15%投与より25%投与の方が血中半減期は15時間から24時間と長くなり、最終的にHbVは肝臓、脾臓、骨髄に分布した(66)。HbVは補体を活性化しないため、オプソニン化されないと考えられる。したがって、このような細網内皮系への分布は、補体レセプターを介さない貪食や補体以外の血漿タ

ンパク質の関与が推測される(67)。投与量増加に伴う血中半減期の延長は、個々のリポソームへの血漿タンパク質の結合量が減少したためとも考えられるが(68)、細網内皮系の飽和による可能性もある。

## 8. おわりに

リポソーム製剤が上市され、その使用拡大とともに補体活性化が関与すると考えられる副作用が報告され始めている。これらアナフィラキシー様の副作用は少量投与でも発生することから、人工酸素運搬体のように出血時の大量投与を想定した場合、なおさら懸念されるべき問題点である。セルフリー型人工酸素運搬体の欠点を補うべくして開発されているセル型人工酸素運搬体において、セル型故の問題点が浮き彫りになってきたといえる。リポソームによる補体活性化の機序が数多く報告され、また矛盾する報告もあることから、それらの情報を基に補体活性化を回避するリポソームを創製することは非常に困難と言える。しかし、早稲田大学が開発したセル型人工酸素運搬体HbVは、我々がその生体適合性評価を行った結果、ヒト血清と20%v/vおよび40%v/v混合しても補体系を活性化しない。このことは臨床において非常に重要な特性といえる。このHbVの脂質組成は人工酸素運搬体のみならず、現行のリポソーム製剤に応用することにより、補体関連の副作用防止にも役立つものと期待が持てる。

## 参考文献

1. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988.
2. 金尾義治. 進歩する薬物治療. DDS最前線. 東京: 広川書店, 2002.
3. 際田弘志. リポソームによるDDS. 水島裕 編. Molecular Medicine別冊 DDSの進歩1995-96. 東京: 中山書店, 1995;44-8.
4. 関口定美, 仲井邦彦. 人工血液. 水島裕 編. Molecular Medicine別冊 DDSの進歩1995-96. 東京: 中山書店, 1995;222-7.
5. Griep MA, Fujikawa K, Nelsestuen GL. Binding and activation properties of human factor XII, prekallikrein, and derived peptides with acidic lipid vesicles. *Biochemistry* 1985;24:4124-30.
6. Mitropoulos KA, Martin JC, Reeves BEA, Esnouf MP. The activation of the contact phase of coagulation by physiologic surfaces in plasma: the effect of large negatively charged liposomal vesicles. *Blood* 1989;73:1525-33.
7. Wassef NM, Johnson SH, Graeber GM, Swartz Jr GM, Schultz CL, Hailey JR, Johnson AJ, Taylor DG, Ridgway RL, Alving CR. Anaphylactoid reactions mediated by autoantibodies to cholesterol in miniature pigs. *J Immunol* 1989;143:2990-5.
8. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, Morse DS, Basta M, Stahl GL, Bunger R, Alving CR. Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1319-H28.
9. Laverman P, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM, Storm G. In vivo applications of PEG liposomes: unexpected observations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001;18:551-66.
10. 菊池浩吉, 上出利光. 医科免疫学. 東京: 南江堂, 2001.
11. Szebeni J. The interaction of liposomes with the complement system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998;15:57-88.
12. Okada N, Yasuda T, Okada H. Restriction of alternative complement pathway activation by sialosylglycolipid. *Nature* 1982;299:261-3.
13. Allen TM, Chonn A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* 1987;223:42-6.
14. Cunningham CM, Kingzette M, Richards RL, Alving CR, Lint TF, Gewurz H. Activation of human complement by liposomes: a model for membrane activation of the alternative pathway. *J Immunol* 1979;122:1237-42.
15. Chonn A, Cullis PR, Devine DV. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol* 1991;146:4234-41.
16. Devine DV, Wong K, Serrano K, Chonn A, Cullis PR. Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim Biophys Acta* 1994;1191:43-51.
17. Funato K, Yoda R, Kiwada H. Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochim Biophys Acta* 1992;1103:198-204.
18. Mold C. Effect of membrane phospholipids on activation of the alternative complement pathway. *J Immunol* 1989;143:1663-8.
19. Ishida T, Yasukawa K, Kojima H, Harashima H, Kiwada H. Effect of cholesterol content in activation of the classical versus the alternative pathway of rat complement system induced by hydrogenated egg phosphatidylcholine-based liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2001;224:69-79.
20. Okada N, Yasuda T, Tsumita T, Okada H. Activation of the alternative complement pathway by natural antibody to glycolipids in guinea-pig serum. *Immunology* 1983;50:75-84.
21. Okada N, Yasuda T, Okada H. Antibody-mediated alternative complement pathway activation resists

- inhibition by sialoglycolipids. *J Immunol* 1985;134:3316-9.
22. Haxby JA, Kinsky CB, Kinsky SC. Immune response of a liposomal model membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;61:300-7.
  23. Alving CR, Kinsky SC, Haxby JA, Kinsky CB. Antibody binding and complement fixation by a liposomal model membrane. *Biochemistry* 1969;8:1582-7.
  24. Hammer CH, Nicholson A, Mayer MM. On the mechanism of cytolysis by complement: evidence on insertion of C5b and C7 subunits of the C5b,6,7 complex into phospholipid bilayers of erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:5076-80.
  25. Shin ML, Paznekas WA, Mayer MM. 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* 1978;120:1996-2002.
  26. Strejan GH, Smith PM, Grant CW, Surlan D. Naturally occurring antibodies to liposomes. I. Rabbit antibodies to sphingomyelin-containing liposomes before and after immunization with unrelated antigens. *J Immunol* 1979;123:370-8.
  27. Alving CR, Richards RL, Guirguis AA. Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J Immunol* 1977;118:342-7.
  28. Alving CR. Natural antibodies against phospholipids and liposomes in humans. *Biochemical Society Transactions* 1984;12:342-4.
  29. Alving CR, Swartz GM, Jr., Wassef NM. Naturally occurring autoantibodies to cholesterol in humans. *Biochemical Society Transactions* 1989;17:637-9.
  30. Alving CR, Wassef NM. Naturally occurring antibodies to cholesterol: a new theory of LDL cholesterol metabolism. *Immunology Today* 1999;20:362-6.
  31. Alving CR, Swartz GM, Jr., Wassef NM, Ribas JL, Herderick EE, Virmani R, Kolodgie FD, Matyas GR, Cornhill JF. Immunization with cholesterol-rich liposomes induces anti-cholesterol antibodies and reduces diet-induced hypercholesterolemia and plaque formation. *J Lab Clin Med* 1996;127:40-9.
  32. Szebeni J, Wassef NM, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1996;1285:127-30.
  33. Kovacsovic TJ, Peitsch MC, Kress A, Isliker H. Antibody-independent activation of C1. I. Differences in the mechanism of C1 activation by nonimmune activators and by immune complexes: C1r-independent activation of C1s by cardiolipin vesicles. *J Immunol* 1987;138:1864-70.
  34. Marjan J, Xie Z, Devine DV. Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1994;1192:35-44.
  35. Brown EJ. Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol* 1991;3:76-82.
  36. Moghimi SM, Patel HM. Modulation of murine liver macrophage clearance of liposomes by diethylstilbestrol. The effect of vesicle surface charge and a role for the complement receptor Mac-1 (CD11b/CD18) of newly recruited macrophages in liposome recognition. *J Control Release* 2002;78:55-65.
  37. Harashima H, Sakata H, Funato K, Kiwada H. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharmaceutical Research* 1994;11:402-6.
  38. Yamada M, Harashima H, Kiwada H. Kinetic analysis of the interaction between liposomes and the complement system in rat serum: re-evaluation of size-dependency. *Biol Pharm Bull* 1998;21:964-8.
  39. Roerdink F, Wassef NM, Richardson EC, Alving CR. Effects of negatively charged lipids on phagocytosis of liposomes opsonized by complement. *Biochim Biophys Acta* 1983;734:33-9.
  40. Huong TM, Harashima H, Kiwada H. Complement dependent and independent liposome uptake by peritoneal macrophages: cholesterol content dependency. *Biol Pharm Bull* 1998;21:969-73.
  41. Huong TM, Ishida T, Harashima H, Kiwada H. Species difference in correlation between in vivo/in vitro liposome-complement interaction. *Biol Pharm Bull* 2001;24:439-41.
  42. Reinish LW, Bally MB, Loughrey HC, Cullis PR. Interactions of liposomes and platelets. *Tromb Haemost* 1988;60:518-23.
  43. Loughrey HC, Bally MB, Reinish LW, Cullis PR. The binding of phosphatidylglycerol liposomes to rat platelets is mediated by complement. *Tromb Haemost* 1990;64:172-6.
  44. Liu D, Hu Q, Song YK. Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1995;1240:277-84.
  45. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990;268:235-7.
  46. Woodle MC, Matthay KK, Newman MS, Hidayat JE, Collins LR, Redemann C, Martin FJ, Papahadjopoulos D. Versatility in lipid compositions showing prolonged

- circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992;1105:193-200.
47. Bradley AJ, Devine DV, Ansell SM, Janzen J, Brooks DE. Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol)-lipids. *Arch Biochem Biophys* 1998;357:185-94.
  48. Laing RB, Milne LJ, Leen CL, Malcolm GP, Steers AJ. Anaphylactic reactions to liposomal amphotericin. *Lancet* 1994;344:682.
  49. Ringden O, Andstrom E, Remberger M, Svahn BM, Tollemar J. Allergic reactions and other rare side-effects of liposomal amphotericin. *Lancet* 1994;344:1156-7.
  50. Dams ET, Oyen WJ, Boerman OC, Storm G, Laverman P, Kok PJ, Buijs WC, Bakker H, van der Meer JW, Corstens FH. 99mTc-PEG liposomes for the scintigraphic detection of infection and inflammation: clinical evaluation. *J Nucl Med* 2000;41:622-30.
  51. Laverman P, Brouwers AH, Dams ET, Oyen WJ, Storm G, van Rooijen N, Corstens FH, Boerman OC. Preclinical and clinical evidence for disappearance of long-circulating characteristics of polyethylene glycol liposomes at low lipid dose. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:996-1001.
  52. Brouwers AH, Laverman P, Boerman OC, Oyen WJ, Barrett JA, Harris TD, Edwards DS, Corstens FH. A 99Tcm-labelled leukotriene B4 receptor antagonist for scintigraphic detection of infection in rabbits. *Nucl Med Commun* 2000;21:1043-50.
  53. Szebeni J, Wassef NM, Spielberg H, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:255-63.
  54. Szebeni J, Wassef NM, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation by liposome-encapsulated hemoglobin in vitro: the role of endotoxin contamination. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1995;23:355-63.
  55. Rabinovici R, Rudolph AS, Feuerstein G. Characterization of hemodynamic, hematologic, and biochemical responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin in the conscious, freely moving rat. *Circulatory Shock* 1989;29:115-32.
  56. Rabinovici R, Rudolph AS, Feuerstein G. Improved biological properties of synthetic distearoyl phosphatidyl choline-based liposome in the conscious rat. *Circulatory Shock* 1990;30:207-19.
  57. Rudolph AS, Cliff RO, Spargo BJ, Spielberg H. Transient changes in the mononuclear phagocyte system following administration of the blood substitute liposome-encapsulated haemoglobin. *Biomaterials* 1994;15:796-804.
  58. Szebeni J, Wassef NM, Hartman KR, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in vitro by the red cell substitute, liposome-encapsulated hemoglobin: mechanism of activation and inhibition by soluble complement receptor type 1. *Transfusion* 1997;37:150-9.
  59. Szebeni J, Fontana JL, Wassef NM, Mongan PD, Morse DS, Dobbins DE, Stahl GL, Bunger R, Alving CR. Hemodynamic changes induced by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin in pigs. A model for pseudoallergic cardiopulmonary reactions to liposomes: role of complement and inhibition by soluble CR1 and anti-C5a antibody. *Circulation* 1999;99:2302-9.
  60. Ogata Y, Goto H, Kimura T, Fukui H. Development of Neo Red Cells (NRC) with the enzymatic reduction system of methemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1997;25:417-27.
  61. Kimura T, Kurosawa H, Goto H, Kora S, Ogata Y, Amano Y. Oxygen carrying capacity and oxygen supply rate of artificial oxygen carrier, Neo Red Cell (NRC). *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1998;26:455-64.
  62. 血液代替物前臨床評価試験専門委員会（池淵研二）. 人工赤血球ネオレッドセル（NRC）の品質評価. 日本血液代替物学会 編. 評価報告書. 1986;15-20.
  63. Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, Tsai AG, Intaglietta M, Tsuchida E. Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1191-H9.
  64. Abe H, Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Hirayama J, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H. Effects of hemoglobin vesicles on blood cells and complement in rat. The 9th International Symposium on Blood Substitute. *人工血液*, 2003;11:114.
  65. 阿部英樹, 藤原満博, 若本志乃舞, 平山順一, 東 寛, 武岡真司, 土田英俊, 池田久實. ヘモグロビン小胞体が血漿凝固及び血漿タンパク質に及ぼす影響. 第8回日本血液代替物学会年次大会. *人工血液*, 2001;9:79.
  66. Sou K, Klipper R, Goins B, Phillips WT, Takeoka S, Tsuchida E. Pharmacokinetics of the hemoglobin-vesicles (HbV) in rats. The 9th International Symposium on Blood Substitute. *人工血液*, 2003;11:117.
  67. Chonn A, Semple SC, Cullis PR. Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes. *J Biol Chem* 1992;267:18759-65.
  68. Oja CD, Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim Biophys Acta* 1996;1281:31-7.

## 編集後記

今回は、富士レビオ社の西谷孝子博士より最先端のナノバイオマシ、熊本大学の前田浩教授より有名な高分子型制癌剤(SMANCS)に関する読みごたえのある総説をご執筆頂いた。既に1月には原稿を投稿して頂いたのが、丁度、年次大会の要旨集の時期と重なり印刷が大幅に遅れてしまいご迷惑をおかけした。また、熊本大学の小田切優樹教授のグループから 1- 酸性糖蛋白質の新しい機能の紹介、北海道赤十字血液センターの

阿部英樹博士よりリポソーム投与等にまず懸念される補体活性に関する詳細な総説をご執筆頂いた。いずれも人工血液の今後の方向を予測する上で重要な総説であり、興味をもって読んでいただくことができれば幸いである。今後人工血液やその周辺分野からの原著論文や総説の投稿をお願いしたい。

(武岡真司)

## 投稿規定

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広くを集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

### 執筆規定

ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords

- (英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
  - 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
  - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm,  $\mu$ m, L, mL,  $\mu$ L, mol, g, mg,  $\mu$ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
  - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
  - 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では<sup>(2)</sup>, <sup>(3,5)</sup>, <sup>(1, 4, 6)</sup>などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名・論文題名・誌名西暦発行年; 巻数: 頁~頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名・題名・編集者名・書名・発行地: 発行書店, 年号; 頁~頁。の順

とする。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清, リボソームの調製, 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編, リボソーム, 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985; 111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表, その他を引用, 転載する場合には, あらかじめ版權所有者の許可を得ること。また, 掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを越える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

## 編集委員会

武岡真司(委員長), 池淵研二, 津田良夫, 仲井邦彦, 福島昭二, 堀之内宏之, 宮尾秀樹, 村田満, 渡辺真純

## 日本血液代替物学会 会誌

発行 日本血液代替物学会

編集・制作「人工血液」編集委員会

印刷 株式会社 研恒社

## 人工血液 vol.11(2) 2003年 月 日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

TEL(03)5286-3217 FAX(03)3205-4740

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

TEL(03)3265-8961 FAX(03)3264-1995