

ポリエチレングリコール修飾リポソーム投与時に生ずる
Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象

石田 竜弘, 際田 弘志*

Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon Induced
by Administration of PEGylated Liposome

Tatsuhiko ISHIDA and Hiroshi KIWADA*

*Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima, 1-78-1 Sho-machi,
Tokushima City 770-8505, Japan*

(Received September 18, 2007)

PEGylated liposomes (approximately 100 nm in diameter) lose their long-circulating characteristic upon repeated injection at certain intervals in the same animal (referred to as the “accelerated blood clearance (ABC) phenomenon”), as described by our group and by researchers in the Netherlands. Recently, it was demonstrated by our group that anti-PEG IgM, induced by the first dose of PEGylated liposomes, is responsible for the ABC phenomenon. The IgM produced in this manner then selectively bound to the surface of subsequently injected PEGylated liposomes, leading to substantial complement activation. It is generally believed that nanocarriers coated with a polymer, such as PEG, have no immunogenicity. However, unexpected immune responses occurred even in response to polymer-coated liposomes. This immunogenicity to PEGylated liposomes presents a serious concern in the development and clinical use of liposomal formulations. In this review, we demonstrate our recent observations regarding with the ABC phenomenon against liposomes.

Key words—PEGylated liposomes; anti-PEG IgM; polyethylene glycol (PEG); accelerated blood clearance (ABC) phenomenon; repeated injection; complement activation

1. はじめに

ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム (PEGylated liposome, sterically stabilized liposome, STEALTH liposome (SL) (Fig. 1)) は, 長期血中滞留性リポソームとして開発され, ドキソルビシン封入体が既に Doxil あるいは Caelyx という商品名で北米及びヨーロッパで上市されており,¹⁻⁴⁾ 本邦においても 2007 年 2 月に承認され使用が開始されている. SL の高い血中滞留性は, リポソーム表面の PEG 鎖が形成する水和相と PEG 鎖自体による立体障害によるものと考えられており,⁵⁻¹⁰⁾ このような PEG 鎖の作用によりリポソームとオプソニンなどの血清タンパクや単核食細胞系 [mono-

nuclear phagocyte system (MPS)] に属する細胞との相互作用が抑制され, このことが主たる理由であると理解されている.

ところで, リポソームのみならず微粒子キャリアを DDS キャリアとして用いる場合, どのような状況で生体内に投与されたとしても, そのキャリアの生体内分布・血中動態は一定でなければならない. もし万一, その動態が変化すれば, 含有薬物の体内動態がキャリアの動態に付随するため, 薬効の予測が不可能となるばかりか重篤な副作用を誘導する原因となり得るからである. しかし, リポソームを薬物キャリアとして用いた研究のほとんどは, 単回投与時の体内動態のみ, あるいは仮に複数回投与したとしてもその薬理効果のみが検討されており, その際の体内動態に関する検討はほとんど行われていない. このような状況にあって, われわれは SL の頻回投与時の動態変化について検討を行ってきた. 本稿では SL 繰り返し投与時の動態変化, すなわち

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部薬物動態制御学分野 (〒770-8505 徳島市庄町 1-78-1)

*e-mail: hkiwada@ph.tokushima-u.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 127 年会シンポジウム S6 で発表したものを中心に記述したものである.

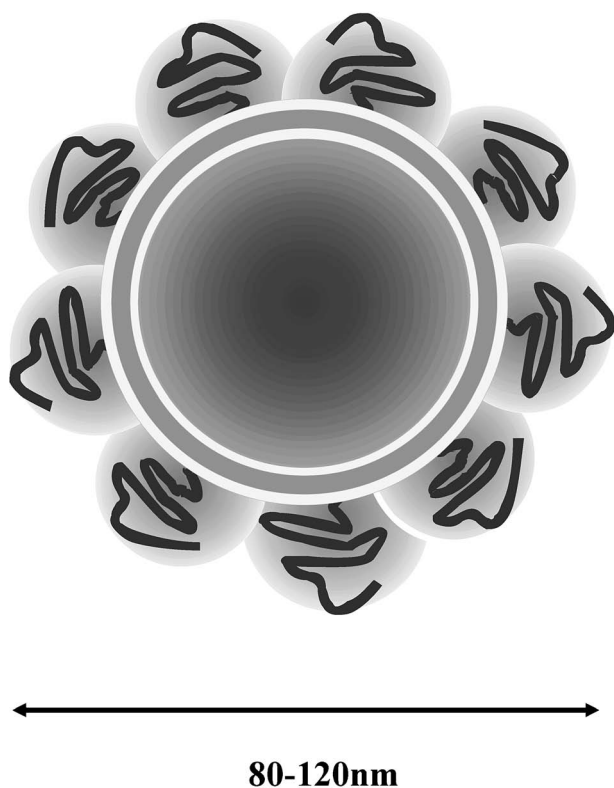


Fig. 1. Structure of PEGylated Liposome (Sterically Stabilized Liposome, STEALTH Liposome (SL))

accelerated blood clearance (ABC) 現象に関する概略を述べたのち、その発現機構に関する研究について詳述する。

2. 実験条件

われわれの一連の検討において、特に断らない限り、SLの脂質組成は hydrogenated egg phosphatidylcholine (HEPC), cholesterol (CHOL), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*n*-[methoxy (polyethyleneglycol)-2000]; mPEG₂₀₀₀-DSPE) がモル比で 1.85 : 1 : 0.15 のものを用いた。粒子径はエクストリュージョン法を用いて平均粒子径が 110 ± 10 nm となるように調整した。2 回目投与時の SL の体内動態は、脂質相マーカーである ³H-cholesterylhexadecyl ether (³H-CHE) をトレーサー量添加して検討を行った。体内動態測定時の SL の投与量は、5 μmol phospholipids (PL)/kg とした。実験動物は Wistar 系雄性ラット (200–250 g) を用いた。

3. Accelerated blood clearance (ABC) 現象に関して

ラットにおいて、SL の初回投与量を 5 μmol PL/kg とし、初回投与から 3, 5, 7 日後に投与した 2 回

目投与 SL の動態について検討した。¹¹⁾ その結果、2 回目投与 SL は、単回投与時に比べて、速やかに血中から消失することが明らかとなった (Fig. 2 (A))。さらに、リポソームの血中からの除去において重要な役割を果たす肝臓、脾臓への 2 回目投与 SL の蓄積を測定したところ、特に肝臓において顕著な SL の取り込み亢進が観察された (Fig. 2 (B))。SL は PEG によって表面修飾されているため、通常は MPS に属する細胞によって認識され難いと考えられている。しかし、Fig. 2 に示した結果は、SL が頻回投与時になんらかの理由によって「肝臓のマクロファージに認識され易くなる」ことを示唆しており非常に興味深い。

一方、オランダのグループ¹²⁾も、同様の現象を発見し報告している。彼らは初回投与から 2 回目投与の間の投与間隔を 1 週間とし、2 回目投与 SL の体内動態を検討した。投与後 4 時間において、2 回目投与 SL の血中濃度が単回投与時の約 1/10 になること、一方肝臓への移行量は約 6 倍に、脾臓への移行量も約 3 倍に増加することを示した。さらに彼らは、コラゲナーゼ灌流法を用い、SL 取り込み後の肝臓を実質細胞及び非実質細胞に分けることで、SL を取り込む細胞は主としてクッパー細胞などの非実質細胞であることも示した。¹²⁾ この結果は、われわれの電子顕微鏡を用いた検討によっても支持される (Fig. 3)。¹³⁾ 得られた写真を詳しく観察した結果、ABC 現象発現時に 2 回目に投与された SL がクッパー細胞内のライソゾーム・エンドソームとみられる構造体中に多数集積していることが確認された。一方、このような像は実質細胞では全く観察されなかった。

以上の結果から ABC 現象は、「初回投与 SL によってそれ以後にある投与間隔で投与された SL の肝移行性が著しく亢進し、その高い血中滞留性が消失する現象」と定義することができる。さらに、この現象は初回投与 SL が生体に 2 回目以降に投与された SL の肝取り込みを亢進させるためのなんらかのシグナルを与える過程 (誘導期)、肝臓がそのシグナルに呼応して次回投与 SL を積極的に取り込む過程 (発現期)、という 2 つの過程に分けることができる。オランダのグループは、それぞれの過程を induction phase と effectuation phase とした (Fig. 4)。¹⁴⁾

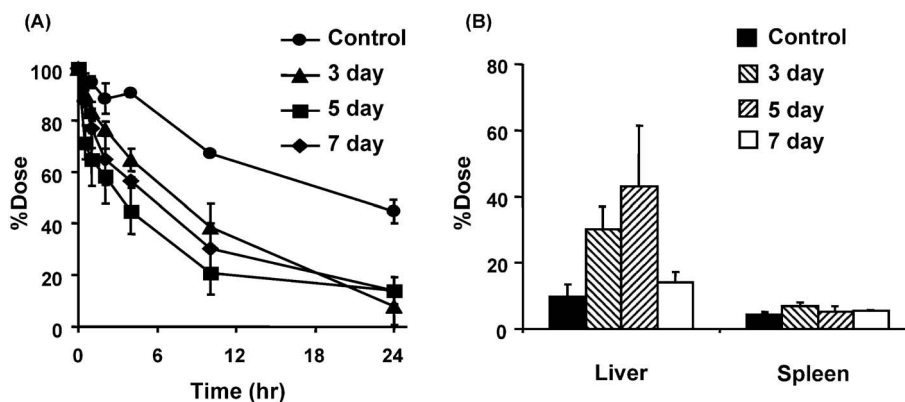


Fig. 2. Blood Clearance Profile and Hepatic or Splenic Accumulation of Second Injected SL in Rats

³H-CHE-labeled SL were injected at 3, 5 or 7 day post-first injection. Hepatic or splenic accumulation was determined at 24 hr post-second injection. Rats that received a single injection of ³H-CHE-labeled SL served as a control. Each value represents mean \pm S.D. of three separate experiments. (cited from Ref. 11).

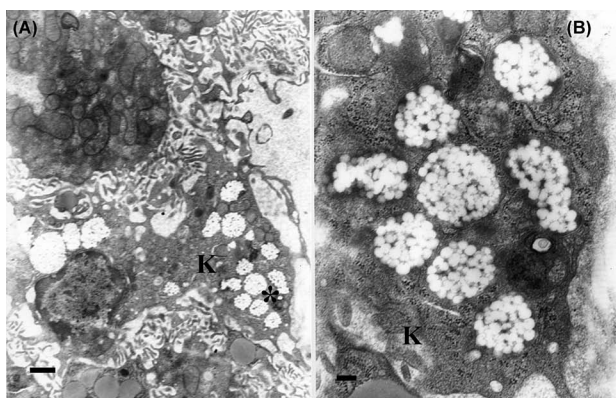


Fig. 3. Electron Micrographs of Rat Livers 2 hr (A, B) after Intravenous Administration of Second Dose SL

(A and B) a sinusoidal Kupffer cell, from a rat which had received SL (0.001 μ mol/kg) as a first dose 5 day before, at 2 hr after second injection of SL; bar in (A) = 1 μ m. (B) higher magnification view of the region marked in (A); bar = 200 nm. K, a sinusoidal Kupffer cell. (cited from Ref. 13)).



Fig. 4. Schematic Representation of the Time Frame of the Two Phases of the So-called Enhanced Clearance Effect

The induction phase following the first injection with liposomes, and the effectuation phase following the second or subsequent injections. The effect is only observed when the time interval between first and second injection is between 5 and 21 days. Δt represents the time interval between first and second injection. (cited from Ref. 14).

リポソームは粒子径や表面電荷などの物理化学的な性質の違いにより、その生体内動態が異なることが知られている。^{15,16} これは、その性質の違いにより生体との相互作用の様式や程度が異なるからである。したがって、初回投与リポソーム (inducer)

の物理化学的性質の差異によって induction phase における ABC 現象誘導の程度が変化し、これが結果として effectuation phase における 2 回目投与リポソーム (acceptor) の肝移行性に影響を与える可能性が十分に考えられる。そこで、induction phase に及ぼすリポソームの物理化学的性質の影響について詳細な検討を行った。

1) PEG 修飾の影響 PEG 修飾を施していないリポソーム (PEG 非修飾リポソーム, conventional liposome (CL)) によっても ABC 現象が引き起こされるか検討した。CL (HEPC : CHOL = 2 : 1 (mol/mol), 116 \pm 12 nm, 5 μ mol PL/kg) をラットに投与し、投与後 3, 5, 7, 14 日後における SL の体内動態を評価した。その結果、投与後 3 日で ABC 現象が発現し始め、14 日経過後でも十分に ABC 現象の発現が維持されていることが分かった。¹³⁾ オランダのグループ¹⁴⁾ も DPPC-liposome [dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) : CHOL : HYNIC-DSPE = 1.85 : 1 : 0.07 (mol/mol), 100 nm, 5 μ mol/kg] を前投与して、1 週間後の SL の体内動態に関して検討を行っているが、SL を前投与した場合と同程度の ABC 現象の発現が確認されたと報告している。以上の結果から、リポソームの PEG 修飾は ABC 現象誘導の原因因子ではかならずしもなく、ABC 現象はリポソーム全般に起こり得る現象であることが分かった。

2) PEG 修飾量, PEG 鎖長の影響 PEG 修飾量の増加はリポソーム表面の PEG 密度を変化させ、結果として生体との相互作用に影響を与える。そこで、PEG 含量が総脂質量に対して 0, 5, 10,

15%のリポソームを調製し、これらを投与することによって ABC 現象誘導が変化するかを調べた。¹³⁾ PEG を 15% 含むリポソームであっても、顕著に ABC 現象を誘導することが示された。(Fig. 5) しかし、PEG を 5% 含むリポソームに比べて誘導の程度は低かった。これらの結果から、リポソーム表面の PEG 密度は現象の誘導に重要であるが、その密度を上昇させることで ABC 現象の誘導をコントロールできる訳ではないことが示唆された。

ついで、PEG 鎖長を 2000 から 5000 に増加させ

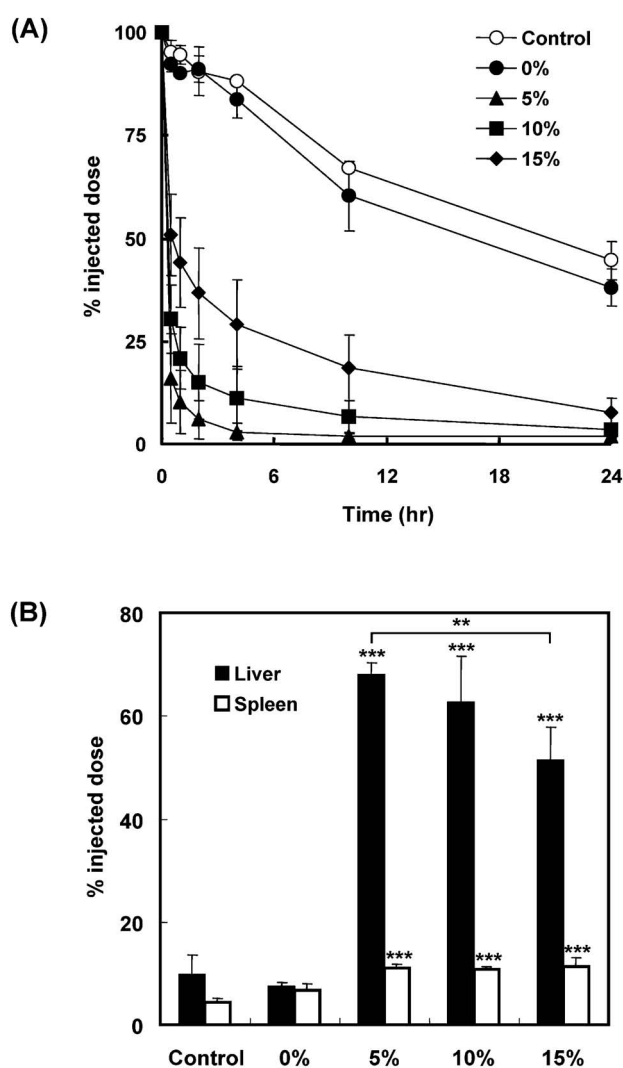


Fig. 5. Effect of PEGylated Lipid Content on the Induction of the ABC Phenomenon

Rats were pretreated with either HEPES buffered saline, CL without PEG-coating or SL containing either 5, 10 or 15 mol% of mPEG₂₀₀₀-DSPE. ³H-CHE-labeled SL were intravenously injected at 5 day post-first injection. (A) Blood clearance profile of subsequently injected ³H-CHE-labeled SL. (B) Hepatic and splenic accumulation of subsequently injected ³H-CHE-labeled SL at 24 hr following the injection. Each value represents the mean \pm S.D. of three separate experiments. *P* values apply to differences between the control and treated mice. ***p* < 0.01, ****p* < 0.005 (cited from Ref. 13).

て PEG 鎖長の影響について検討を行ったが、両条件とも同程度の ABC 現象を誘導することが分かった。¹³⁾ 同様に、Bendas ら¹⁷⁾は PEG 鎖長が 3000 のものを用いて検討を行い、PEG2000 を用いた場合と同程度の ABC 現象誘導が観察されることを報告しており、PEG 鎖長の増加は現象の誘導に影響を与えないことが示唆された。

3) 表面電荷の影響 平均粒子径が 100 nm で正電荷、負電荷を持つリポソームをそれぞれ前投与 (0.1 μ mol PL/kg) することで、その 5 日後に投与した SL (5 μ mol PL/kg) の体内動態が変化するか検討した。¹⁸⁾ その結果、SL の肝移行性が若干増加し、これに相関して血中濃度が減少したものの、肝移行性を指標とした場合、最も強く ABC 現象が誘導された場合のおよそ 1/4 とわずかであった。したがって、表面電荷は ABC 現象の発現を促進せず、むしろ抑制する可能性が示唆された。

4) 粒子径の影響 ABC 現象誘導におけるリポソームの粒子径の影響は大きいようである。前項の ABC 現象の誘導を示さなかったリポソームであっても粒子径を約 60 nm まで小さくすると顕著な ABC 現象の誘導が観察された。¹⁸⁾ この際、負電荷の方が正電荷に比べて誘導能が高い傾向がみられた。また、SL においても粒子径を小さく (60 nm) することによって ABC 現象の誘導が亢進された。これらのことから、ABC 現象誘導においてリポソームの粒子径は非常に重要な要因の 1 つであることが示唆された。

5) 前投与量の影響 前投与量を 0.001 μ mol PL/kg から 5 μ mol PL/kg まで変化させ、5 日経過後に SL (5 μ mol PL/kg) を投与したときの動態を検討したところ、前投与量に逆相関した形で ABC 現象の誘導がみられた (Fig. 6).¹³⁾ なぜ少ない量を投与したときにより大きな現象の誘導がみられるのか現時点では分かっていない。しかし、免疫における抗原刺激を例にとりて考えてみると、多量の抗原による刺激は強い反応よりもむしろ寛容 (トレランス) を誘導することが知られている。したがって、SL 前投与時に同様の免疫寛容 (トレランス) が生じている可能性が考えられる。一方、CL (PEG 非修飾リポソーム) では低投与量 (0.001 μ mol PL/kg) ではほとんど ABC 現象が誘導されないのに対して、高い投与量 (5 μ mol PL/kg) では顕著に誘導

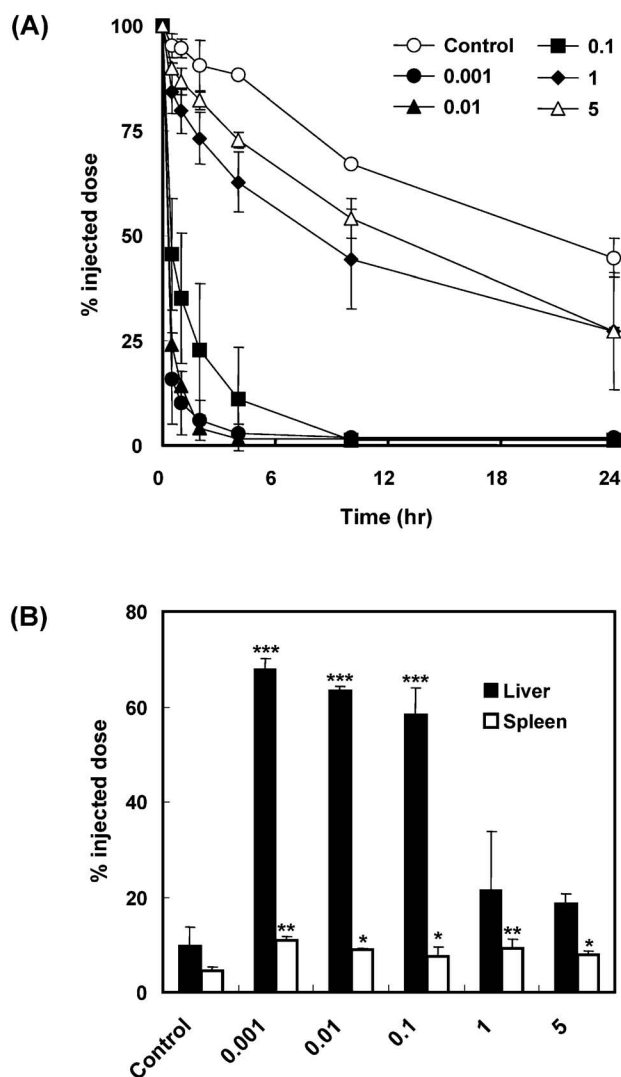


Fig. 6. Effect of Lipid Dose on the Induction of the ABC Phenomenon

Rats were pretreated with SL at a dose of either 0.001, 0.01, 0.1, 1 or 5 $\mu\text{mol/kg}$ of body weight. The rats pretreated with HEPES buffered saline instead of liposomes were served as a control. At 5 day post-first injection, ^3H -CHE-labeled SL were intravenously injected. (A) Blood clearance profile of subsequently injected ^3H -CHE-labeled SL. (B) Hepatic and splenic accumulation of subsequently injected ^3H -CHE-labeled SL at 24 hr following the injection. Each value represents the mean \pm S.D. of three separate experiments. *P* values apply to differences between the control and treated mice. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.005 (cited from Ref. 13).

することが明らかとなり、現象の誘導は投与量依存的である可能性が示唆されている。^{13,18,19)}

6) 種差の影響 これまでの検討から、ABC現象はラット、^{11,12)} マウス、²⁰⁾ サル¹²⁾で確認されている。

興味深いことに、マウスとラットではABC現象の誘導パターンが異なっており、種差が存在するようである。われわれの検討では、SLの前投与によって誘導されるABC現象発現ピークは、ラットで

は初回投与後4-7日であり、マウスにおいては10日前後であった。オランダのグループは、ABC現象はマウスにおいては生じない、¹²⁾としているが、これは彼らが投与間隔を1週間間隔にしてしまったため、10日前後に生じるABC現象を捉えることができなかったからであると考えられる。

4. ABC現象発現機構の解明

4-1. 血清因子の誘導とその関与 オランダのグループ¹²⁾は、SL投与後1週間後に血清を採取し、これを正常ラットに輸注したところABC現象の発現が正常ラットにおいて再現されることを確認した。また、投与したSLの血中濃度減少と肝蓄積量の増加は輸注された血清の容量に依存して増加することも示した。われわれの検討¹¹⁾でも、輸注によって現象が再現されることを確認しており、induction phaseでなんらかの血清因子が分泌され、これがeffectuation phaseで重要な役割を果たしていることが示唆された。

オランダのグループ¹²⁾はこの血清因子の characterizationを試み、この血清因子は1)分子量がおよそ150 kDaであるが、IgGやIgMのような抗体ではなく、2)熱処理(56度、30分)によって活性を失うタンパクである事を示した。

4-2. 血清因子の同定 前項で述べたように、前投与されたSLによって誘導された血清因子がABC現象発現時に重要な役割を果たしていることが示唆された。この血清因子の機能としては、1)2回目投与SL表面に結合してオプソニンとして働く、2)肝臓のマクロファージを直接活性化し2回目投与SLの取り込みを亢進させる、又は3)1)、2)の機構が並行して進行するの3つが推察される。

これまでにリポソームの表面に結合したオプソニンなどの血清タンパクがリポソームの体内動態に重要な役割を果たしていることが報告されてきた。^{15,16,21-23)} また、先にも述べたように、SLはその表面にPEG鎖が存在することから、オプソニンなどの血清タンパクは結合し難いと考えられてきた。しかし、一方で特に補体系によるオプソニン化は、PEGの存在によってある程度抑制されるが、完全に抑制される訳ではないことが報告されてもいる。²⁴⁾ また、Szebeniらのグループは臨床データを含む多くのデータ²⁵⁻²⁸⁾の検証からSLは十分に補体系の活性化を誘導する能力があることを示して

いる.²⁹⁻³²⁾そこでわれわれは先に示した3つの機構のうち、1)が最も可能性が高いと考え、以下の検討を行った。

4-2-1. SL 表面結合タンパク量と ABC 現象発現との関連³³⁾ 正常ラット血清あるいは ABC 現象発現時のラット血清と SL をインキュベーション (37 度, 30 分) し, その後ゲルろ過 (Sephrose CL-4B) によりリポソーム画分のみを採取した。採取したリポソーム画分に関して protein binding value [P_B 値, amount of bound protein(g)/amount of PL (mol)]^{21,34)}を測定した。 P_B 値は, 用いた ABC 現象発現血清の SL 前投与後経過日数に応じて 2 日から 5 日まで徐々に増加する傾向にあったが, 6 日目以後減少に転じ, 14 日後までにほぼコントロール・レベルまで減少した。この P_B 値の変動を ABC 現象発現時の SL 肝取り込み亢進の指標である肝クリアランス (CLh) の経日的変動と比較した。CLh は SL 投与後 4 日から急激な増加を示し, 8 日までにほぼコントロール・レベルに戻った (Fig. 7) ことから, 先に観察された P_B 値の増加はかならずしも ABC 現象の発現の程度と直接関係しないことが分かった。

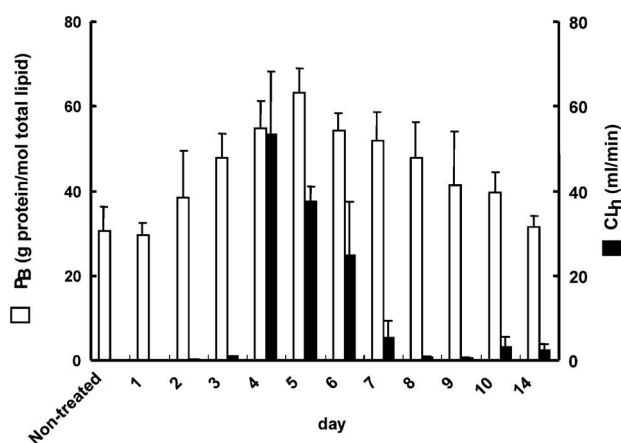


Fig. 7. Relationship between the Amount of Bound Serum Proteins to SL and Hepatic Clearance (an Indication of the Degree of induced ABC Phenomenon)

SL was incubated at 37°C for 30 min with the sera that were collected from rats had already received first dose of SL at indicated days before. The serum proteins associated with the SL were separated from unbound serum proteins with gel chromatography. The P_B value, which is an indication of how much protein was bound to the SL, was calculated by dividing the total proteins on the liposomes by the total lipid in the collected liposome fractions. The hepatic clearance (CLh) was calculated as follows: $CLh = Xh(24) / AUC(0 \rightarrow 24)$ where $Xh(24)$ is the amount of liposomes accumulated in the liver at 24 hr post-injection. $AUC(0 \rightarrow 24)$ is the area under the blood concentration-time curve from time 0 to 24 hr. (cited from Ref. 33).

以前 Cullis らはリポソーム表面に結合したタンパク量 (P_B 値) とそのリポソームの血中半減期の間に負の相関があること, すなわち P_B 値が大きいリポソームほど生体から排除され易いことを示した.²¹⁾一方でわれわれは, 特異的にリポソーム表面に結合するオプソニンなどの血清タンパクが重要な役割を果たしていることを示してきている.³⁵⁻³⁸⁾したがって, 先に述べた結果はリポソーム表面に特異的に結合した異物除去能力の高いオプソニンなどの血清タンパクが ABC 現象発現においても重要な役割を果たしている可能性が高いことを示唆しているものと考えられた。

4-2-2. 結合タンパクの単離・同定³³⁾ ついで, SL 結合タンパクに関して a) SDS-PAGE, b) 2D-PAGE を行い特異的結合タンパクの有無について検討を行った。その結果, 無処置血清 (コントロール) と比較して, SL 投与後 5 日目の血清を用いた場合, SDS-PAGE (Fig. 8 (A)) においても 2D-PAGE においても特異的なバンド, あるいは特異的なスポットが観察された。血清タンパクは分子量が比較的大きなものが多いため, 両検討ともに還元下で実験を行っている。このため, バンドあるいはスポットの位置や数からその分子量や種類を類推することは困難であった。しかし, 特に 2D-PAGE から得られたスポットを既報の情報³⁹⁾と比較すると, 少なくとも数種類の血清タンパク (IgM, IgG, apo-A I, apo-E など) がスポットに含まれていることが分かった。

ついで, SDS-PAGE において観察された特異的バンド (7 本: Fig. 8 (A) 矢印) に関して LC-MS/MS による解析を行った。その結果, Fig. 8 (B) に示す通り, 特異的バンドに含まれるタンパクは, そのほとんどがイムノグロブリンのフラグメントあるいは補体系に属するものであることが分かった。

イムノグロブリンには種々のクラスがあることが知られているが, リポソームの動態に影響を与えることが知られているのは IgG と IgM のみである。そこで, LC-MS/MS により示されたイムノグロブリンがどちらのクラスに属するものであるかを特定するために Western blotting を行った。その結果, SL 結合タンパク中には IgG は全く含まれず, IgM のみが多量に含まれていることが明らかとなった。IgG・IgM とともに強力な補体活性化能を持つ血清タ

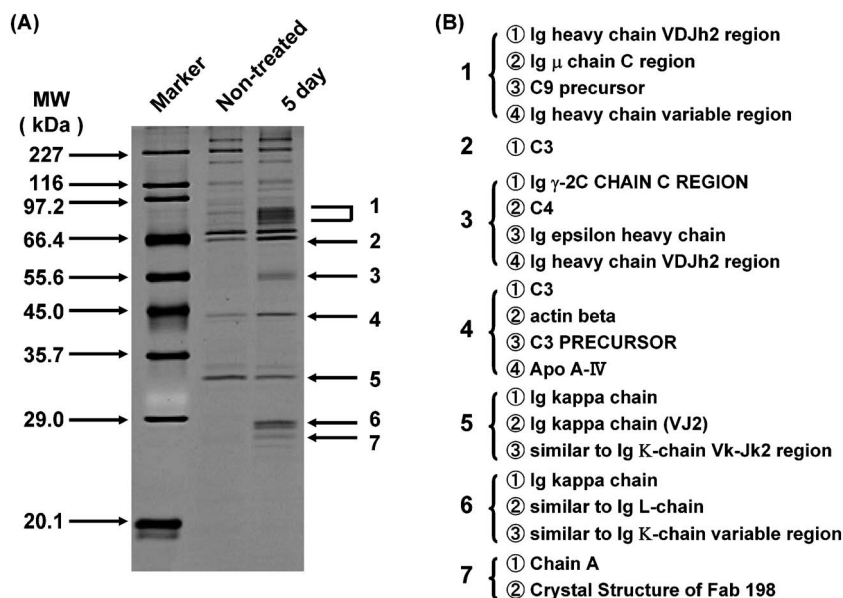


Fig. 8. (A) The Result of a SDS-PAGE Analysis of Serum Proteins Bound to SL under Reducing Conditions, (B) The Result of a LC-MS/MS Analysis on Serum Proteins Specifically Bound to SL

(A) The right lane represents the bound proteins from serum collected 5 days after the first injection. The middle lane represents the bound proteins from normal serum. (cited from Ref. 33).

ンパクであるが、IgGがマクロファージ上のFc受容体を介して異物の取り込みを直接促進するのに対して、IgMは同様の受容体がマクロファージ上に存在しないため、補体系を活性化させて補体成分を結合させてマクロファージ上の補体受容体を介して異物の取り込みを促進させることが知られている。そこでさらに、IgMによる補体活性化の有無に関しても同じくWestern blottingを用いて検討を行った。その結果、ABC現象が顕著に発現されているSL投与5日後の血清を用いた場合、結合タンパク中の補体第三成分(C3)のほとんどが強力なオプソニン活性を持つiC3bに変換されていたのに対して、無処置血清を用いた場合、結合タンパク中のC3はほとんどiC3bに変換されてないことが明らかとなった。

4-2-3. IgM 認識部位の検討 さらに、先の検討においてABC現象誘導時にSLに多量に結合することが見いだされたIgMがSLにのみ高い親和性を有しているか検討を行った。³³⁾ その結果、ABC現象が誘導されていると考えられるラットから得られた血清において、SLに対してのみ顕著なIgMの結合が観察され、CLにはそれほど大きな結合は観察されなかった (Fig. 9)。一方で、無処置のラットから得た血清では、これまで言われてきた通り、

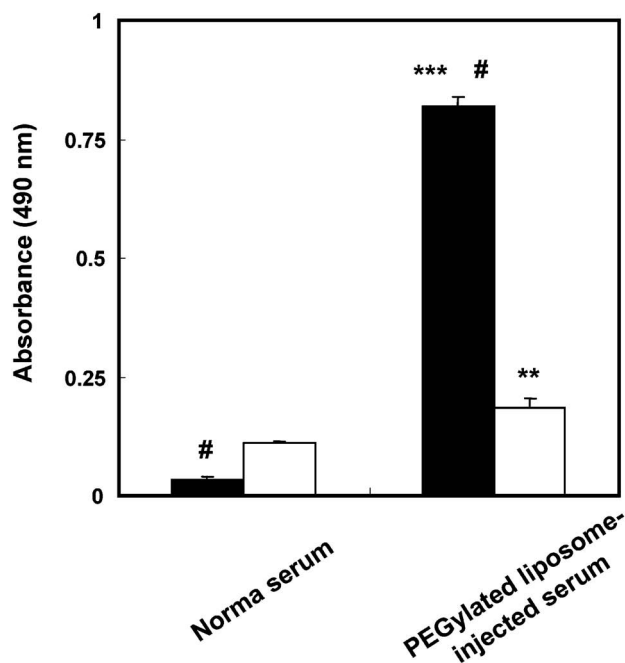


Fig. 9. Semi-quantitative Determination of IgM in Liposome-associated Proteins

Serum proteins associating with SL were prepared by incubation with naïve serum or serum collected at day 5 post-first injection and subsequent chromatography on Sepharose 4 Fast Flow column. IgM in the fraction containing liposomes was semi-quantitatively determined using the Rat IgM ELISA Quantitation Kit. Closed column represents SL. Open column represents CL. Each value represents the mean \pm S.D. of three separate experiments. *P* values apply to differences between the control (naïve serum) and SL-treated rats. ***p* < 0.01, ****p* < 0.005 vs HEPES-injected serum, [†]*p* < 0.005 vs CL, (cited from Ref. 33).

SLの方がCLに比べて著しく低いIgM結合量となり、SL表面のPEG鎖は非特異的なIgMの結合を抑制することが示された。したがって、ABC現象誘導時に分泌され、SLに結合するIgMは、リポソーム表面のPEGに特異的に結合することが示唆された。

ついで、SLに特異性を持つIgMが表面のPEG鎖に特異性を持つかどうかを調べるために、リポソーム構成脂質をそれぞれプレートに固相化して、これらを抗原としてELISA法によりIgMの特異性について評価した (Fig. 10).¹⁹⁾ 結果、PEG化リン脂質 (mPEG₂₀₀₀-DSPE) を固相化した際に顕著なIgMの結合が観察されたのに対して (Fig. 10(C)), 脂質のみ (HEPC, CHOL, DSPE) を固相化した際には有意なIgMの結合は観察されなかった。特にDSPEに対して特異性を有するIgMが誘導されなかったことから (Fig. 10(D)), SL前投与によって誘導される“SLに親和性を持つIgM”はanti-PEG IgMであることが強く示唆された。また、このanti-PEG IgM誘導量は前投与に用いたSLの投与量に逆相関する傾向があることも分かった (Fig. 10

(C))。このことから、SLを前投与した際に観察された前投与量逆依存的なABC現象発現 (Fig. 6) は、SL前投与に呼応して分泌されるanti-PEG IgMの誘導量の違いによることが示唆された。

4-2-4. Anti-PEG IgM 分泌における脾臓の役割

脾臓は血流中の抗原に対する免疫反応において重要な役割を果たし、またIgMの主たる分泌臓器であることから、脾臓を摘出 (splenectomy) したラットを用いてそのABC現象発現への関与について検討を行った。⁴⁰⁾ SL初回投与前に脾臓を摘出したラットにおいてABC現象の発現は観察されなくなるとともに、anti-PEG IgMの分泌も抑制されることが分かった。これらの結果から、初回投与SLに呼応して脾臓からanti-PEG IgMが分泌されることが示され、induction phaseにおいて脾臓が極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、SL前投与後経日的に脾臓を摘出したところ、SL前投与後3日までに脾臓を摘出するとABC現象発現が抑制されるが、4日目あるいは5日目に脾臓を摘出した場合にはABC現象誘導が抑制されなくなることが分かった (Fig. 11)。このことから、

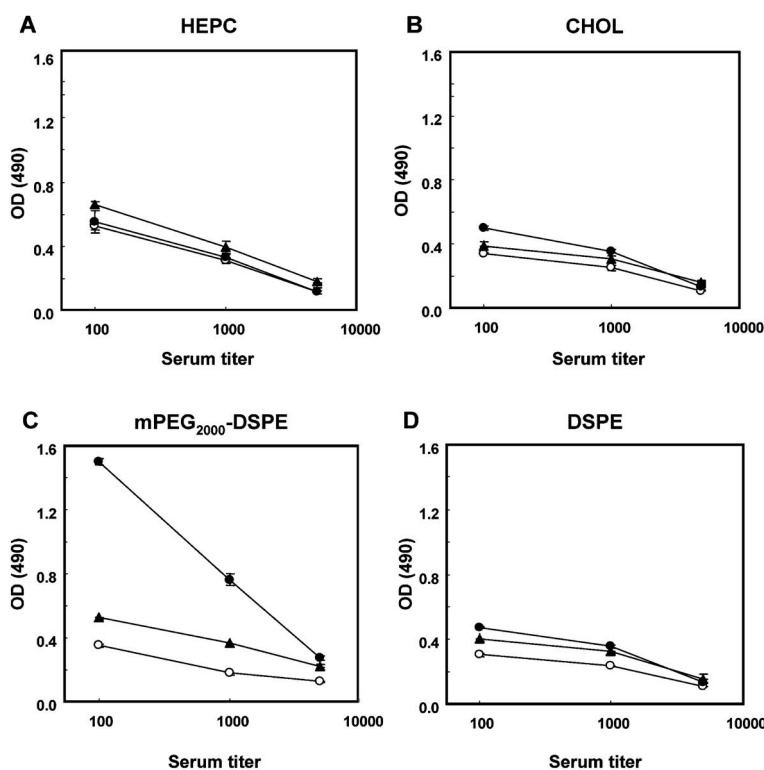


Fig. 10. IgM Titers of Sera against Individual Lipid Components of SL

Titers of IgM reactive against individual lipid components of SL were determined in the sera collected at 5 day after the first SL injection. Sera were pooled from rats treated with HEPES buffered saline (○), SL (0.001 μmol/kg) (●), SL (5 μmol/kg) (▲). (cited from Ref. 19)

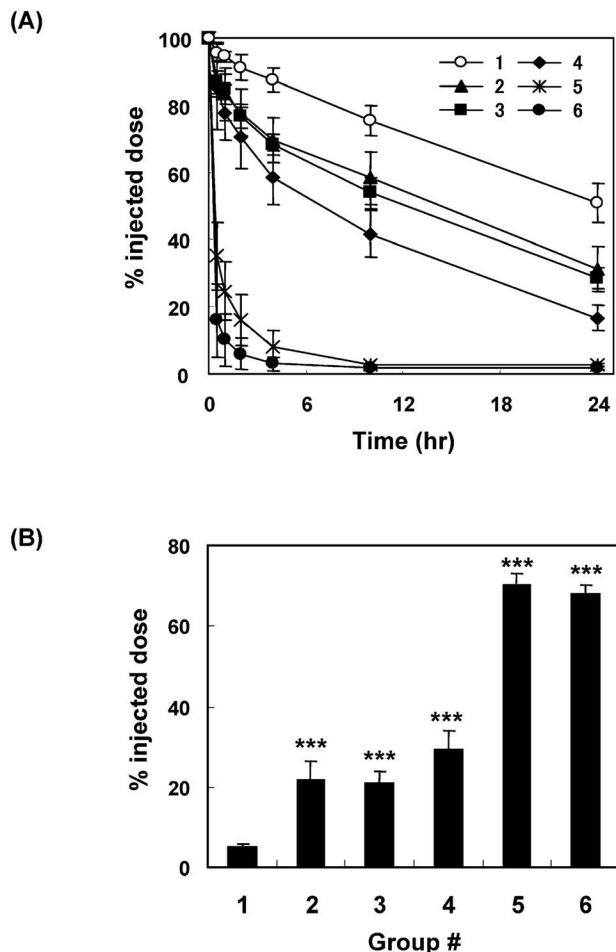


Fig. 11. Impact of a Sequential Splenectomy on the Biodistribution of Second-dose (test) SL

The animals were divided in 6 groups of 4 animals. Splenectomy was carried out at either 1, 2, 3 or 4 day following first SL injection. Radio-labeled (test) SL was intravenously injected on day 5 post-first SL injection. Rats receiving only the radio-labeled SL served as controls. Group 1: no pre-dose, no splenectomy. Group 2: pre-dosed, splenectomized after 1 day. Group 3: pre-dosed, splenectomized after 2 days. Group 4: pre-dosed, splenectomized after 3 days. Group 5: pre-dosed, splenectomized after 4 days. Group 6: pre-dosed, no splenectomy. (A) Blood clearance. (B) Hepatic accumulation at 24 h following injection of the test dose. Each value represents the mean \pm S.D. of three separate experiments. *P* values apply to differences against control. ****p* < 0.005 (cited from Ref. 40).

脾臓内に移行した SL はおよそ 3 日かけて脾臓細胞に刺激を与え、その結果として anti-PEG IgM の分泌を誘導している可能性が示唆された。

4-2-5. ABC 現象誘導機構 以上の結果から、SL 初回投与に呼応して脾臓から anti-PEG IgM が血中に分泌され、この IgM が 2 回目投与 SL 表面に選択的に結合することで補体系が強力に活性化され、結果としてこの SL が補体受容体を介して肝マクロファージ (Kupffer cell) により認識され易くなり、その血中滞留性が減少するという一連のメカ

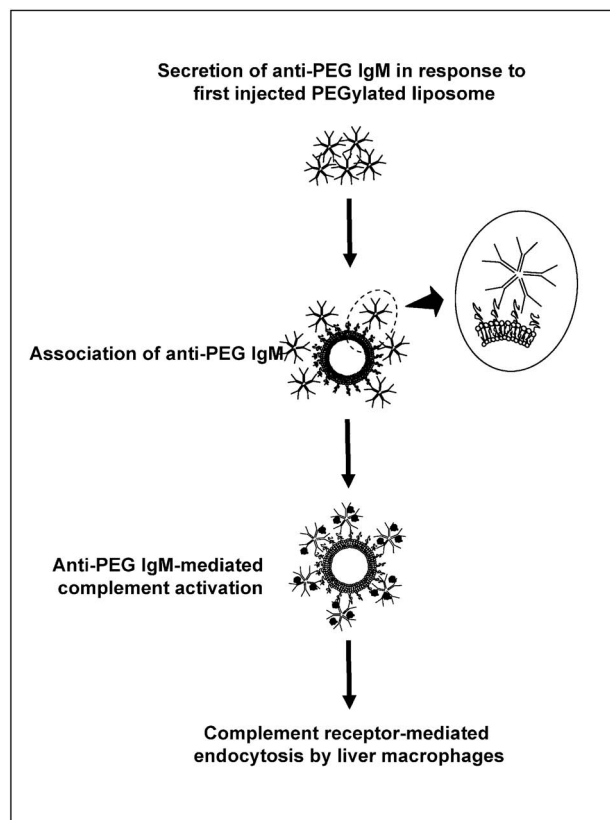


Fig. 12. Representation of the Sequence of Events Leading from Anti-PEG IgM Induction to Accelerated Blood Clearance of SL

(cited from Ref. 33) with minor modification).

ニズムが明らかとなった (Fig. 12)。

Figure 11 に示したように、初回投与 SL は 3 日程度をかけて脾臓を刺激し、anti-PEG IgM を血中に分泌させていると考えられる。一般に、抗原提示細胞を介した抗体産生において、抗原刺激に対する一次応答は 6 日程度の日数を要し、さらに 10 から 20 日の間に反応のピークを迎えることが知られている。この免疫応答におけるタイムコースの違いは、初回投与 SL における免疫刺激が抗原提示細胞や T 細胞の補助を必要としない T-cell independent な経路を介している可能性を示唆している。われわれの最新の検討⁴¹⁾では、ABC 現象誘導において、SL は T-cell independent antigen として機能し、脾臓の marginal zone (MZ) に局在する MZ B-cell を活性化することを明らかにしている。今後、さらに詳細な検討を行い、SL と MZ B-cell との相互作用様式の解明などに取り組んでいく予定である。

一方で、CL を前投与した場合に誘導される ABC 現象においても同様に IgM が関与しているこ

とを明らかにしている。¹⁹⁾しかし、SLで誘導した場合とは異なり、SLに結合するIgMに含まれるanti-PEG IgMの割合は低く、PEG以外のエピトープを認識するIgMが分泌されている可能性が示唆されている。今後、IgMの認識部位を特定することで、CLによって誘導されるABC現象の詳細に近づいていけるものと考えている。

5. 終わりに

本稿で示したように、ABC現象はリポソームの物理化学的な性質や投与量の違い、投与間隔の違い、種差などによってその誘導・発現が大きく影響を受ける非常に複雑な現象である。発現機構に関する検討から、脾臓から血中に分泌されるanti-PEG IgMやこのIgMのSLへの結合に起因する補体系の活性化が重要な役割を果たしていることも明らかとなり、なぜ前述のような影響が現れるのか、普遍性の高い回答を得ることができる段階に進んできたものと考えている。今後さらにABC現象の誘導・発現機構が解明されれば、ABC現象を回避することができるリポソーム製剤の開発にもつながるものと期待される。

昨今ナノテクノロジーとライフサイエンスの融合が進められ、生体への適用を目指したデバイスの開発が進められている。しかし、これらの研究の多くが封入した薬物の効果増強を目的としたものであり、生体適用時にどのような反応が生じるかについてはほとんど検討されていない。本稿で紹介したわれわれの検討結果は、デバイス開発時に並行して生体との相互作用に関する基礎的検討を行うべきであることを示唆しており、多くのデバイス開発に携わる研究者にとって有用な情報となればと考えている。

謝辞 本研究は徳島大学薬学部薬剤学教室(現・薬物動態制御学教室)で行われたものであり、研究遂行に当たり協力してくれた学生諸子に深謝する。また、組織学的検討に協力頂いた大鵬薬品工業安全性研究所・入村兼司氏に、SL結合タンパクの解析に協力頂いたアプロサイエンス・真島英司博士、山本謙治博士に深謝する。本研究は、精神神経・血液医薬研究振興財団、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団、持田記念医学薬学振興財団、先進医薬研究振興財団、薬学研究奨励財団、中富健康科学振興財団、黒住医学研究振興財団、花王芸

術・科学財団、住友財団の研究助成によって遂行されたものであり、各財団のご援助に対し心より謝意を表する。

REFERENCES

- 1) Harrison M., Tomlinson D., Stewart S., *J. Clin. Oncol.*, **13**, 914-920 (1995).
- 2) Chidiac T., Budd G. T., Pelley R., Sandstrom K., McLain D., Elson P., Crownover R., Marks K., Muschler G., Joyce M., Zehr R., Bukowski R., *Invest. New Drugs*, **18**, 253-259 (2000).
- 3) Halm U., Etzrodt G., Schiefke I., Schmidt F., Witzigmann H., Mossner J., Berr F., *Ann. Oncol.*, **11**, 113-114 (2000).
- 4) Muggia F. M., Hainsworth J. D., Jeffers S., Miller P., Groshen S., Tan M., Roman L., Uziely B., Muderspach L., Garcia A., Burnett A., Greco F. A., Morrow C. P., Paradiso L. J., Liang L. J., *J. Clin. Oncol.*, **15**, 987-993 (1997).
- 5) Allen T. M., Austin G. A., Chonn A., Lin L., Lee K. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1061**, 56-64 (1991).
- 6) Kenworthy A. K., Hristova K., Needham D., McIntosh T. J., *Biophys. J.*, **68**, 1921-1936 (1995).
- 7) Lasic D. D., Martin F. J., Gabizon A., Huang S. K., Papahadjopoulos D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 187-192 (1991).
- 8) Lee K. D., Hong K., Papahadjopoulos D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**, 185-197 (1992).
- 9) Needham D., McIntosh T. J., Lasic D. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1108**, 40-48 (1992).
- 10) Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C., Gregoriadis G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 77-82 (1991).
- 11) Ishida T., Maeda R., Ichihara M., Irimura K., Kiwada H., *J. Control. Release*, **88**, 35-42 (2003).
- 12) Dams E. T., Laverman P., Oyen W. J., Storm G., Scherphof G. L., van Der Meer J. W., Corstens F. H., Boerman O. C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 1071-1079 (2000).
- 13) Ishida T., Harada M., Wang X. Y., Ichihara M., Irimura K., Kiwada H., *J. Control. Release*, **105**, 305-317 (2005).

- 14) Laverman P., Carstens M. G., Boerman O. C., Dams E. T., Oyen W.J., van Rooijen N., Corstens F. H., Storm G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 607–612 (2001).
- 15) Ishida T., Harashima H., Kiwada H., *Biosci. Rep.*, **22**, 197–224 (2002).
- 16) Senior J. H., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 123–193 (1987).
- 17) Bendas G., Rothe U., Scherphof G. L., Kamps J. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**, 63–70 (2003).
- 18) Wang X. Y., Ishida T., Ichihara M., Kiwada H., *J. Control. Release*, **104**, 91–102 (2005).
- 19) Wang X., Ishida T., Kiwada H., *J. Control. Release*, **119**, 236–244 (2007).
- 20) Ishida T., Masuda K., Ichikawa T., Ichihara M., Irimura K., Kiwada H., *Int. J. Pharm.*, **255**, 167–174 (2003).
- 21) Chonn A., Semple S. C., Cullis P. R., *J. Biol. Chem.*, **267**, 18759–18765 (1992).
- 22) Devine D. V., Marjan J. M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **14**, 105–131 (1997).
- 23) Bradley A. J., Devine D. V., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 19–29 (1998).
- 24) Bradley A. J., Devine D. V., Ansell S. M., Janzen J., Brooks D. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **357**, 185–194 (1998).
- 25) Brouwers A. H., De Jong D. J., Dams E. T., Oyen W. J., Boerman O. C., Laverman P., Naber T. H., Storm G., Corstens F. H., *J. Drug Target.*, **8**, 225–233 (2000).
- 26) Chanan-Khan A., Szebeni J., Savay S., Liebes L., Rafique N. M., Alving C.R., Muggia F. M., *Ann. Oncol.*, **14**, 1430–1437 (2003).
- 27) Szebeni J., Fontana J.L., Wassef N. M., Mongan P. D., Morse D. S., Dobbins D. E., Stahl G. L., Bunger R., Alving C. R., *Circulation*, **99**, 2302–2309 (1999).
- 28) Skubitz K. M., Skubitz A. P., *Anticancer Drugs*, **9**, 45–50 (1998).
- 29) Szebeni J., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **18**, 567–606 (2001).
- 30) Szebeni J., Baranyi L., Savay S., Bodo M., Morse D. S., Basta M., Stahl G.L., Bunger R., Alving C.R., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H1319–1328 (2000).
- 31) Szebeni J., Baranyi L., Savay S., Milosevits J., Bunger R., Laverman P., Metselaar J. M., Storm G., Chanan-Khan A., Liebes L., Muggia F. M., Cohen R., Barenholz Y., Alving C. R., *J. Liposome Res.*, **12**, 165–172 (2002).
- 32) Moghimi S. M., Szebeni J., *Prog. Lipid Res.*, **42**, 463–478 (2003).
- 33) Ishida T., Ichihara M., Wang X., Yamamoto K., Kimura J., Majima E., Kiwada H., *J. Control. Release*, **112**, 15–25 (2006).
- 34) Chonn A., Semple S. C., Cullis P. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 215–222 (1991).
- 35) Ishida T., Harashima H., Kiwada H., *Curr. Drug Metab.*, **2**, 397–409 (2001).
- 36) Ishida T., Kojima H., Harashima H., Kiwada H., *Int. J. Pharm.*, **205**, 183–193 (2000).
- 37) Funato K., Yoda R., Kiwada H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**, 198–204 (1992).
- 38) Harashima H., Sakata K., Funato K., Kiwada H., *Pharm. Res.*, **11**, 402–406 (1994).
- 39) Haynes P., Miller I., Aebersold R., Gemeiner M., Eberini I., Lovati M.R., Manzoni C., Vignati M., Gianazza E., *Electrophoresis*, **19**, 1484–1492 (1998).
- 40) Ishida T., Ichihara M., Wang X., Kiwada H., *J. Control. Release*, **115**, 243–250 (2006).
- 41) Ishida T., Wang X., Shimizu T., Nawata K., Kiwada H., *J. Control. Release*, **122**, 349–355 (2007).