

様式G

論文目録

報告 番号	甲薬第 38号	氏名	石田 竜弘
学位論文題目	「リポソームと補体系の相互作用に関する研究」		
公刊論文			
<p>Enhancing effect of cholesterol on the elimination of liposomes from circulation is mediated by complement activation. Tatsuhiko Ishida, Kouichi Funato, Shigeo Kojima, Ritsuko Yoda and Hiroshi Kiwada <i>International Journal of Pharmaceutics</i>, 156: 27-37 (1997)</p> <p>A novel plasma factor initiating complement activation on cetylmannoside-modified liposomes in human plasma. Tatsuhiko Ishida, Shinya Iida, Kouichi Funato and Hiroshi Kiwada <i>International Journal of Pharmaceutics</i> (in press)</p>			
公刊参考論文			
<p>セチルマンノシド修飾リポソームへのC3フラグメントの結合における粒子径の影響 石田竜弘, 篠原美加, 際田弘志 <i>Drug Delivery System</i>, 12: 127-132 (1997)</p> <p>Effect of serum components from different species on destabilizing hydrogenated phosphatidylcholine-based liposomes. Liu S., Ishida T. and Kiwada H. <i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i>, 20: 874-880 (1997)</p>			
以下別紙に続く			
その他 (総説・単行本等)			
なし			

公刊参考論文(続き)

Synergistic effect between size and cholesterol content in the enhanced hepatic uptake clearance of liposomes through complement activation in rats.  
Hideyoshi Harashima, T. M. Huong, Tatsuhiro Ishida, Yoko Manabe, Hirotami Matsuo and Hiroshi Kiwada  
*Pharmaceutical Research*, 13: 1702-1707 (1996)

Size-dependent release of carboxyfluorescein from cetylmannoside-modified liposomes in human plasma.  
Abu Jamil Ferdous, Tatsuhiro Ishida, Mika Shinohara, Hideyoshi Harashima and Hiroshi Kiwada  
*Biopharmaceutics Drug Disposition*, 17: 145-154 (1996)

抗ヒトC3モノクローナル抗体を用いたリポソーム表面上のC3フラグメント定量  
石田竜弘, 篠原美加, 岩田房子, 大本安一, 際田弘志  
*Drug Delivery System*, 9: 25-30 (1994)

リポソーム膜中のコレステロール含量が及ぼす補体第3成分(C3)の結合と体内動態への影響  
小島弘子, 石田竜弘, 原島秀吉, 際田弘志  
*Drug Delivery System*, (in press)

Liu S., Ishida T. and Kiwada H.  
Characterization of bovine serum factor triggering the lysis of liposomes via complement activation.  
Liu S., Ishida T. and Kiwada H.  
*Biological Pharmaceutical Bulletin* (in press)



報告番号	甲 薬 第 38 号	氏 名	石田 竜弘
学位論文題目	リポソームと補体系の相互作用に関する研究		
内容要旨	<p>生体内投与後のリポソームの排除機構として、血中での不安定化と単核食細胞系(MPS)による取り込みという二つの機構が想定されている。両機構において重要な役割を果たすと考えられているのが、補体系である。補体系は20種類以上の血液成分から構成される体液性初期生体防御機構の一つであり、補体系によるリポソームの認識は、MPS上の補体レセプターのリガンドであるC3フラグメントの結合と、内封物質の漏出を促す小孔(MAC)の形成を促進させるため、リポソームの体内動態に大きな影響をおよぼすと考えられる。したがって、補体系がリポソームをどのように異物として認識するか、そしてその相互作用がどのような要因によって支配されているかを明らかにすることは、有用なリポソーム製剤を開発する上で非常に有用な情報を提供すると考えられる。</p> <p>そこで、補体系とリポソームとの相互作用に関して詳細な検討を行った。</p> <p><b>I 補体系のリポソームの体内動態への寄与の検討</b></p> <p>上述のとおり、補体系によるオプソニン化(C3フラグメント結合)および膜破壊(MAC形成)がリポソームの動態と密接な関係にあると考えられる。そこで、リポソーム表面に結合したC3フラグメント量と、血清中でのリポソームの崩壊度を測定し、リポソームの体内動態とどのような関係にあるか検討した。その結果、C3フラグメント結合量は、リポソームの肝移行性の指標である肝クリアランスと良好な相関関係にあることが明らかとなった。このことは、肝臓によるリポソームの取り込みが、C3フラグメント結合量、すなわち補体系との相互作用によって支配されていることを示すものである。一方、飽和リン脂質を基剤としたリポソームの血清中での不安定化は補体依存的であったのに対して、不飽和リン脂質からなるリポソームの不安定化は補体系以外、例えばHDLなどのリポタンパクとの相互作用によることが示された。しかし、血清中での補体依存的な崩壊の程度と、in vivoでの不安定化の指標である腎クリアランスとの間には一定の相関関係があることが示された。このことから、in vitroで補体依存的な崩壊を示すリポソームにあっては、in vivoにおいてもその安定性が補体系に支配されることが明らかとなった。以上の結果から、補体系との相互作用、特にC3フラグメントの結合およびMAC形成がリポソームの動態と密接な関係にあることが明らかとなった。</p>		

**II 補体系によるリポソーム認識機構の検討**

補体系の活性化経路には古典経路と第二経路の二つの経路があることが知られている。検討の結果、22%、33%コレステロール含有リポソームは古典経路を、44%コレステロール含有リポソームは第二経路を活性化することが示され、リポソーム組成中のコレステロール含量(ホスファチジルコリン含量)の違いにより活性化される経路が異なることが明らかとなった。これまでに、コレステロール(あるいはホスファチジルコリン)含量の違いがリポソームによる補体活性化経路を変化させるという報告はなく、本報告が初めてである。そこで、この原因について検討した。その結果、低温下(0°C)でリポソーム表面に吸着する血清因子の寄与により起動されることが明らかとなった。また、興味深いことに、古典経路に寄与する因子と第二経路に寄与する因子とは別個のものであり、特に第二経路に寄与する因子はコレステロールに親和性を有する可能性が示唆された。

また、このような活性化経路の違いがおよぼす補体系によるオプソニン化および膜破壊への影響について検討した。古典経路を介したオプソニン化は非常に速やかであり、第二経路を介したオプソニン化は僅かなlag timeの後緩やかに上昇することが明らかとなった。また、古典経路を介した膜破壊は非常に速やかであったのに対して、第二経路を介した場合lag timeの後上昇することが明らかとなった。したがって、補体活性化の経路の違いは、リポソームと補体系との相互作用の速度を変化させることが明らかとなった。

**III ヒト補体系との相互作用に関する検討**

本来、リポソームはヒトへの適応が志向されており、ヒト補体系との相互作用について検討することは、ヒトにおけるリポソームの動態を推察する上で有用な情報を与えると考えられる。そこで、糖修飾リポソーム(Man-Lip)をモデルリポソームとしてヒト補体系によるリポソームの認識機構について検討した。その結果、Man-Lipによるヒト補体系の活性化は古典経路を介したものであり、この活性化には自然抗体由来IgMのMan-Lip表面への吸着が必須であることが明らかとなった。IgMは、分子量約900KDaの巨大血液蛋白であり、ヒト補体系による粒子径依存的なMan-Lipの認識において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

以上の検討から、生体内投与後のリポソームの動態は、それらを異物として認識する生体防御機構と密接に関連しており、その中でも特に自然抗体などの補体活性化因子のリポソームへの結合、そしてその結合に連動した補体系の活性化という基本的な体液性生体防御機構の寄与が大きいことが明らかとなった。このことは、リポソームを用いた薬物送達システムの開発が、単にリポソーム化による薬物の薬効発現あるいは副作用の軽減を目指すだけでなく、生体防御機構との相互作用を十分に考慮し、基本的な生体反応に立脚して行われるべきであることを示唆していると思われる。また、リポソームの脂質組成(コレステロール含量)の変化により補体活性化経路が変化するという新たな知見は、未だ明らかでない古典経路と第二経路の関係を解明する上で、有用な情報を与えると考えられる。



リポソームと補体系の相互作用に関する研究

1998年

石田 竜 弘



3

リポソームと補体系の相互作用に関する研究

1998年

石田 竜弘



## 目次

第一章 序論.....	1
引用文献.....	4
第二章 補体系のリポソームの体内動態への寄与.....	7
第一節 リポソームと補体系との相互作用.....	8
第二節 リポソームの体内動態.....	10
第三節 補体系とリポソームの体内動態との関連.....	16
第四節 小括.....	18
第五節 実験の部.....	19
引用文献.....	23
第三章 補体系によるリポソーム認識機構の検討.....	27
第一節 リポソームによる補体活性化経路の検討.....	27
第二節 補体活性化起動因子の寄与.....	30
第三節 補体活性化経路の違いがおよぼすオプソニン化と膜破壊の違い.....	37
第四節 小括.....	43
第五節 実験の部.....	44
引用文献.....	47
第四章 ヒト補体系との相互作用に関する検討.....	50
第一節 ヒト補体系とリポソームとの相互作用に関する考察.....	50
第二節 糖修飾リポソームによる補体活性化を起動する血漿因子の検討.....	58
第三節 既知の補体活性化因子とM-CAFとの異同.....	60
第四節 自然抗体寄与の検討.....	63
第五節 ヒトとラット間のリポソームによる補体活性化における種差.....	67
第六節 小括.....	70
第七節 実験の部.....	72
引用文献.....	75
第五章 総括.....	79



略語表

Ab	:antibody
AUC	:area under the blood concentration curve
CF	:5(6)-carboxyfluorescein
CHE	:cholesterylhexadecyl ether
Chol	:cholesterol
CLh	:hepatic clearance
CLr	:renal clearance
CLs	:spleen clearance
DCP	:dicetyl phosphate
DDS	:drug delivery system
EPC	:egg phosphatidylcholin
EDTA	:ethylenediaminetetraacetic acid
GlcNAc	:N-acetylglucosamine
HDL	:high density lipoprotein
HEPC	:hydrogenated egg phosphatidylcholin
EGTA	:ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid
ELISA	:enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	:horseradish peroxidase
IgG	:immunoglobulin G
IgM	:immunoglobulin M
LDL	:low density lipoprotein
MAC	:membrane attack complex
Man	:cetylmannoside
M-CAF	:mannose specific complement activating factor
Man-NAc	:N-acetylmannosamine
MASP	:MBP-associate serine protease
MBP	:mannose-binding protein (mannan-binding protein)
MLV	:multilamellar vesicle
MPS	:mononuclear phagocyte system
PBS(-)	:phosphate buffered saline without Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>
PBS(+)	:phosphate buffered saline with Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>
PEG	:polyethyleneglycol
SAP	:serum amyloid P component

第一章 序論

薬物送達システム(Drug Delivery System; DDS)は、薬物の体内動態を精密に制御し、生体内に存在する特異的な作用点に望ましい濃度-時間パターンのもとに送達させることによって、最適な治療効果を得ることを目的とする新しい薬物治療の概念である[1,2]。現在検討されているDDS開発のアプローチの多くは、①生体に対する薬物吸収～薬物を生体にコントロールされた速度で供給する(放出制御)こと～、②生体表面にある吸収障壁の通過(吸収制御)、③臓器・組織間での分布の振り分け(標的指向化)、のいずれかに分類される。中でも標的指向化の試みは、薬物の治療効果が特定の標的部位への薬物の到達(分布)によってはじめて発現するとともに、標的部位以外への薬物の移行が副作用の原因になることから、薬物療法の効果を改善する重要な取り組みの一つであると考えられる。

リポソームはマイクロスフェア[2]、エマルジョン[2]などとともに微粒子キャリアの一つであり、脂質組成、粒子径などの物理化学的性質を自由にかつ広範に変化させることが可能であるだけでなく、標的指向化に必要な標的指向素子(糖や蛋白など)の表面修飾も容易であることから、DDSの中で最も期待される薬物運搬体の一つである。アイルランドにおいてアムフォテリシンBのリポソーム製剤が1990年に上市されたのをはじめとして、表1-1に示すように、多くのリポソーム製剤が開発[3-9]されており、医療現場での利用が本格的に開始されようとしている。最近注目を集めている遺伝子治療やアンチセンス療法分野において、ヌクレオチド鎖を細胞内へ送達するベクターとしての利用もその一例といえよう[10,11]。

表1-1 臨床応用されているリポソーム製剤

Company	Drug	Drug Class	Commercial Name	Countries	Delivery form
SEQUUS Pharmaceuticals, Inc., Menlo Park, CA	Doxorubicin	anti cancer	Doxil	USA	Liposome
			Caelyx	Europe	Liposome
	Amphotericin B	anti fungel	Amphotec	USA	Lipid colloidal dispersion
			Amphocil	Europe, Israel	Lipid colloidal dispersion
NeXstar Inc., San Dimas, CA	Daunorubicin	anti cancer	DaunoXome	USA, Canada & Europe	Liposome
	Amphotericin B	anti fungel	AmBisome	Europe, Middle East, Mexico, Australia & others	Liposome
The Liposome Company Princeton, NJ	Amphotericin B	anti fungel	Abelcet1	USA & Europe	Lipid complex



このようにリポソームの様々な有用性が明らかにされる一方、リポソームを臨床応用する際に、従来からいくつかの問題点が指摘されてきた。大量生産法、薬物の保持の効率化法、滅菌法の開発、安定化や均一化といった製剤的問題点と生物的要因の関与する問題点がそれである。生物的要因の関与する問題点、即ちリポソームを生体に投与した後の生体側の様々な因子とリポソームとの相互作用に関わる問題点としては、①血液循環中において血液成分との相互作用により包含薬物の放出（不安定化作用）が起こる[12-14]、②肝臓や脾臓などの単核食細胞系(MPS)に捕捉されやすい[12,14,15]、③薬物を真の作用点へ送達するための組織内あるいは細胞内動態が十分に理解されていない、という点が挙げられる。これらの問題点の内、特に①、②は薬物の血中濃度と滞留性に関わる重要な要因であり、多くの基礎的な研究がなされてきた。

リポソームの血中での不安定化は血液成分との相互作用の結果と考えられる。これまでに、リポソームの不安定化機構として、HDL[16-20]、LDL[21]などのリポタンパクによるリポソーム膜中のリン脂質やコレステロールなどの引き抜きや置換、ホスホリパーゼ[22]によるリン脂質の分解、さらに初期生体防御機構の一つである補体系による膜の損傷[12,13,23-25]が報告されている。一方、MPSによる取込機構としては、非特異的な取込機構および受容体を介する特異的な取込機構に大別される[30]。非特異的な取り込みは異物の持つ物理化学的性質が要因となり、疎水性あるいは表面電荷がその要因としてあげられている[30]。一方、特異的な取込機構はオプソニンといわれる免疫グロブリン[16,25,31]、フィブロネクチン[16,32,33]、急性期タンパクであるC-reactive protein(CRP)[16,25,34,35]、Mannose-binding protein(MBP)[25]、B2-glycoprotein I[36]あるいは補体成分（主にC3フラグメント）[16,25,37-39]等の血清タンパクが異物に特異的に結合（オプソニン化）し、これらをそれぞれに特異的な受容体が認識する取込機構、あるいは異物膜上のホスファチジルセリンを直接認識する受容体を介した取込機構[40,41]があげられる。

血液循環中に投与されたリポソームは血液タンパクと相互作用した後、MPSによる認識・捕捉を受けると考えられる。したがって、血液成分との相互作用は血液循環中でのリポソームの不安定化だけでなく、MPSによる取り込みにおいても重要な役割を果たしており、リポソームの体内動態に影響をおよぼす最たる要因であると考えられる。事実、Chonnら[42-45]はリポソーム結合蛋白量とリポソームの血中半減期( $t_{1/2}$ )との間に負の相関関係、換言すれば血液タンパクと相互作用しやすいリポソームほど血液循環から排除されやすいという規則性を示した。この結果は、リポソームと血液成分との相互作用の程度がリポソームの体内動態に影響をおよぼすことを裏付けるものである。このように、リポソームと血液成分、特に上述のオプソニンなどのような特異的に作用する血液成分との相互作用の様式あるいは程度を理解することは、リポソームの不安定化、MPSによる捕捉機構の理解に通じ、真に有効なリポソーム製剤を開発する上で非常に有用な情報を提供すると考えられる。

最近、多くの研究者によって、リポソームの血中での不安定化およびMPSによる捕捉において補体系が重要な役割を果たしている可能性が示され[40,41,50-57]、補体系とリポソ-

ムとの相互作用がリポソームの動態を支配する要因の一つである可能性が示唆されている。補体系は20種類以上の血液成分から構成され、異物の侵入に際して最も初期に機能する体液性生体防御機構であり、古典経路および第二経路と呼ばれる二つの経路を介して活性化され、膜破壊およびオプソニン化を通じて異物排除をはかることが知られる[58-60]。以前から、リポソームによる補体活性化に関して研究が行われており、その活性化の程度はリポソームの物理化学的性質に依存することが明らかとなっている[16,24,25,46-49]。しかしながら、その活性化の程度がリポソームの動態とどのような関係にあるか、そして補体系がどのようにしてリポソームを異物として認識するかなど、明らかでない点が多く残されている。

そこで、本研究では、まずリポソームと補体系の相互作用の程度を定量的に評価し、リポソームの体内動態との関連について検討した（第二章）。さらに、第三章では、未だ明らかでない点が多く残されている補体系による認識機構、およびその違いがおよぼす影響について検討した。また、第四章では、リポソームの臨床応用を試みる場合、特に問題となるヒト補体系との相互作用について糖修飾リポソームを用いて検討した。



引用文献

- 1) 水島裕 : DDSの範囲と将来. *Drug Deliv. Sys.*, **2**: 3-12 (1987)
- 2) 橋田充 : ドラッグデリバリーシステム-創薬と治療の新たなる挑戦-. 新バイオサイエンスシリーズ, 化学同人 (1995)
- 3) Liposomes offer hope as medical tools. *Inform.*, **6**: 793-802 (1995)
- 4) Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A. and Barenholz, Y. : Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.*, **54**: 987-992 (1994)
- 5) Northfelt, D.W., Martin, F.J., Working, P., Volberding, P.A., Russell, J., Newman, M., Amantea, M.A., and Kaplan, L.D. : Doxorubicin encapsulated in liposome containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor, localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Pharmacol.*, **36**: 55-63 (1996)
- 6) Gill, P.S., Espina, B.M., Muggia, F., Cabriaes, S., Tulpule, A., Esplin, J.A., Liebman, H.A., Forssen, E., Ross, M.E. and Levine, A.M. : Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal doxorubicin. *J. Clin. Oncol.*, **13**: 996-1003 (1995)
- 7) Tollemar, J., Hockersted, K., Ericzon, B.C., Jalanko, H. and Ringden, O. : Liposomal amphotericin B prevents invasive fungal infections in liver transplant recipients: a randomized, placebo controlled study. *Transplant.*, **59**: 45-50 (1995)
- 8) Kline, S., Larsen, T.A., Fieber, L., Fishbach, R., Greenwood, M., Harris, R., Kline, M.W., Tennican, P.O. and Janoff, E.N. : Limited toxicity of prolonged therapy with high doses of amphotericin B lipid complex. *Clin. Infect. Dis.*, **21**: 1154-1158 (1995)
- 9) Amantea, M.A., Bowden, R.A., Forrest, A., Working, P.K., Newan, M.S., and Manelok, R.D. : Population pharmacokinetics and renal function-sparing effects of amphotericin B colloidal dispersion in patients receiving bone marrow transplant. *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, **39**: 2042-2047 (1995)
- 10) Gregoriadis, G. and Florence, A.T. : Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs*, **45**: 15-28 (1993)
- 11) Juliano, R.L. and Akhtar, S. : Liposomes as a drug delivery system for antisense oligonucleotides. *Antisense Res. Develop.*, **2**: 165-176 (1992)
- 12) Senior, J.H. : Fate and behavior of liposomes in vivo: A review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.*, **3**: 123-193 (1987)
- 13) Bonte, F. and Juliano, R.L., Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem. Phys. Lipids*, **40**: 359-372 (1986)
- 14) Jones, M.N. and Nicholas, A.R. : The effect of blood serum on the size and stability of phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1065**: 145-152 (1991)
- 15) Allen, T. M. : Interactions of liposomes and other drug carriers with the mononuclear phagocyte system. In *Liposomes as Drug Carriers*, Gregoriadis, G., editor. Jone Wiley & Sons Ltd., 37-50 (1988)
- 16) Patel, H.M., Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**: 39-90 (1992)
- 17) Senior, J.s., Gregoriadis, G. and Mitropoulos, K.A. : Stability and clearance of small unilamellar liposomes studies with normal and lipoprotein-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **760**: 111-118 (1983)
- 18) Tischler, U., Ruckert, D., Schubert, R., Jaroni, H.W., Schmidt, K.H. : Non-leaky vesiculation of large unilamellar vesicles (LUV) induced by plasma high density lipoprotein (HDL): detection by HPLC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**: 1219-1226 (1989)
- 19) Damen, J., Regts, J. and Scherphof, G. : Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **665**: 538-545 (1981)
- 20) Scherphof, G. and Morselt, H., On the size-dependent disintegration of small unilamellar phosphatidylcholine vesicles in rat plasma. Evidence of complete loss of vesicle structure. *Biochem. J.*, **221**: 423-429 (1984)
- 21) Tall, A.R., Small, D.M. : Solubilization of phospholipid membranes by human plasma high density lipoproteins. *Nature*, **265**: 163-164 (1977)
- 22) Comisky, S.J., Heath, T.J. : Serum induced leakage of negatively charged liposomes at nanomolar lipid concentrations. *Biochem.* **29**: 3236-3241 (1990)
- 23) Alving, C.R., Richrds, R.L. and Guirguis, A.A. : Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J. Immunol.*, **118**: 342-347 (1977)
- 24) Richards, R.L., Habbersett, R.C., Scher, I., Janoff, A.S., Schieren, H.P., Mayer, L.D., Cullis, P.R. and Alving, P.R. : Influence of vesicle size on complement-dependent immune damage to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **855**: 223-230 (1986)
- 25) Devine, D.V. and Marjan, M.J. : The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.*, **14**: 105-131 (1997)
- 30) 徳永徹 : マクロファージ. 講談社サイエンティフィック (1986)
- 31) Metzger, H. : Fc receptors and membrane immunoglobulin. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**: 40-46 (1991)
- 32) Water, L.V.D., Destree, A.T. and Hynes, R.O. : Fibronectin binds to some bacteria but does not promote their uptake by phagocytic cells. *Science*, **220**: 201-204 (1983)
- 33) Falcone, D.J. : Fluorescent opsonization assay: binding of plasma fibronectin to fibrin-derivatized fluorescent particles does not change their uptake by macrophages. *J. Leukocyte Biol.*, **39**: 1-12 (1986)
- 34) Volanakis, J.E. and Wirtz, K.W.A. : Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayer. *Nature*, **281**: 155-157 (1979)
- 35) Ballou, S.P. and kushner, I. : C-reactive protein and the acute phase response. *Adv. Internal Med.*, **37**: 313-336 (1992)
- 36) Chonn, A., Semple, S.C. and Cullos, P.R. :  $\beta$ 2-glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles. *J. Biol. Chem.*, **270**: 25845-25849 (1995)
- 37) Brown, E.J. : Complement receptors and phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**: 76-82 (1991)
- 38) Wright, S.D. : Receptors for complement and the biology of phagocytosis. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Gallin, J.I., Goldstein, I.M. and Synderman, R., editors. Raven Press, Ltd., New York, 477-495 (1992)
- 39) Tomlinson, S. : Complement defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol.*, **5**: 83-89 (1993)
- 40) Liu, F. and Liu, D. : Serum independent liposome uptake by mouse liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **1278**: 5-11 (1996)
- 41) Liu, D. : Animal species dependent liposome clearance. *J. Liposome Res.*, **6**: 77-97 (1996)
- 42) Chonn, A., Semple, S.C. and Cullis, P.R., Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. *J. Biol. Chem.*, **267**: 18759-18765 (1992)
- 43) Chonn, A., Semple, S.C. and Cullis, P.R., Protein-membrane interactions in the complex biological milieu. In Jos A.F. Op den Kamp (Ed.), *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics*, NATO ASI Series, Vol. H **82**, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 101-106 (1994)



- 44) Semple, S.C., Chonn, A., Cullis, P.R. : Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochem.*, **35**: 2521-2525 (1996)
- 45) Oja, C.D., Semple, S.C., Chonn, A., Cullis, P.R. : Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1281**: 31-37 (1996)
- 46) Shin, M.L., Paznekas, W.A. and Mayer, M.M. : On the mechanism of membrane damage by complement: the effect of length and unsaturation of the acyl chains in liposomal bilayers and the effect of cholesterol concentration in sheep erythrocyte and liposomal membranes. *J. Immunol.*, **120**: 1996-2002 (1978)
- 47) Chonn, A., Cullis, P.R. and Devine, D.V. : The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J. Immunol.*, **146**: 4234-4241 (1991)
- 48) Devine, D.V., Wong, K., Serrano K., Chonn, A. and Cullis, P.R. : Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1191**: 43-51 (1994)
- 49) Marjan, J., Xie, Z. and Devine, D.V. : Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1192**: 35-44 (1994)
- 50) Szebeni, J., Wassef, N. M., Spielberg, H., Rudolph, A.S. and Alving, C.R., Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**: 255-263 (1994)
- 51) Matsuo, H., Funato, K., Harashima, H. and Kiwada, H., The complement- but not mannose receptor-mediated phagocytosis is involved in the hepatic uptake of cetylmannoside-modified liposomes in situ. *J. Drug Targeting*, **2**: 141-146 (1994)
- 52) Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., Kiwada, H. : Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size liposomes. *Pharm. Res.*, **11**: 402-406 (1994)
- 53) Harashima, H., Huong, T.M., Ishida, T., Manabe, Y., Matsuo, H. and Kiwada, H. : Synergistic effect between size and cholesterol content in the enhanced hepatic uptake clearance of liposomes through complement activation in rats. *Pharm. Res.*, **11**: 1702-1707 (1994)
- 54) Liu, D., Song, Y.K. and Liu, F. : Antibody dependent, complement mediated liver uptake of liposomes containing GM1. *Pharm. Res.*, **12**: 1775-1780 (1995)
- 55) Szebeni, J., Wassef, N.M., Rudolph, A.S. and Alving, C.R. : Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1285**: 127-130 (1996)
- 56) Harashima, H. and Kiwada, H. : Liposomal targeting and drug delivery: kinetic consideration. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **19**: 425-444 (1996)
- 57) Harashima, H. and Kiwada, H. : Studies on the mechanism of uptake of liposomes using an isolated perfused liver system. *J. Liposome Res.*, **6**: 61-75 (1996)
- 58) Müller-Eberhard, H.J. : Complement. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**: 697-724 (1975)
- 59) Porter, P.R. and Reid, K.B.M. : Activation of the complement system by antibody-antigen complexes: the classical pathway. *Adv. Prot. Chem.*, **33**: 1-71 (1979)
- 60) Pangburn, M.K. : Activation of complement via the alternative pathway. *Federation Proc.*, **42**: 139-143 (1983)

## 第二章 補体系のリポソームの体内動態への寄与

生体内に投与されたりポソームは、血液循環中での不安定化やMPSに属する細胞により捕捉されるため、速やかに排除される。このため、組織への選択的なターゲティングや血中滞留性の保持が困難となっている。補体系はオプソニン化（特にC3フラグメントの結合）によるMPSへの親和性の亢進、および膜侵襲複合体(MAC)の形成による膜破壊を通してリポソームの血液循環からの排除に寄与していると考えられる。事実、多くの研究者によって、リポソームの血中での崩壊および肝臓への移行において補体系が重要な役割を果たしていることが報告されている[1-10]。

Cullisらのグループによる一連の研究[11-13]から、リポソームと補体系の相互作用はリポソームの物理化学的性質（電荷、流動性、粒子径、表面修飾など）の違いにより異なることが明らかとなっている。しかしながら、これらの検討は補体消費を指標としたものであり、この方法では補体系がどの段階まで活性化されているか特定できず、リポソームと補体系の相互作用の程度が正確に反映されているとはいいがたい。

補体系は20種以上の血液成分の集合体であり、古典経路および第二経路とよばれる活性化経路を介して連鎖的な酵素反応により活性化される[14-17]。いずれの経路を介して活性化されたにせよ、オプソニンとして作用するC3フラグメントの異物表面への結合段階において、両経路は合流し、MAC形成へとつながる（図2-1）。これら一連の連鎖的な反

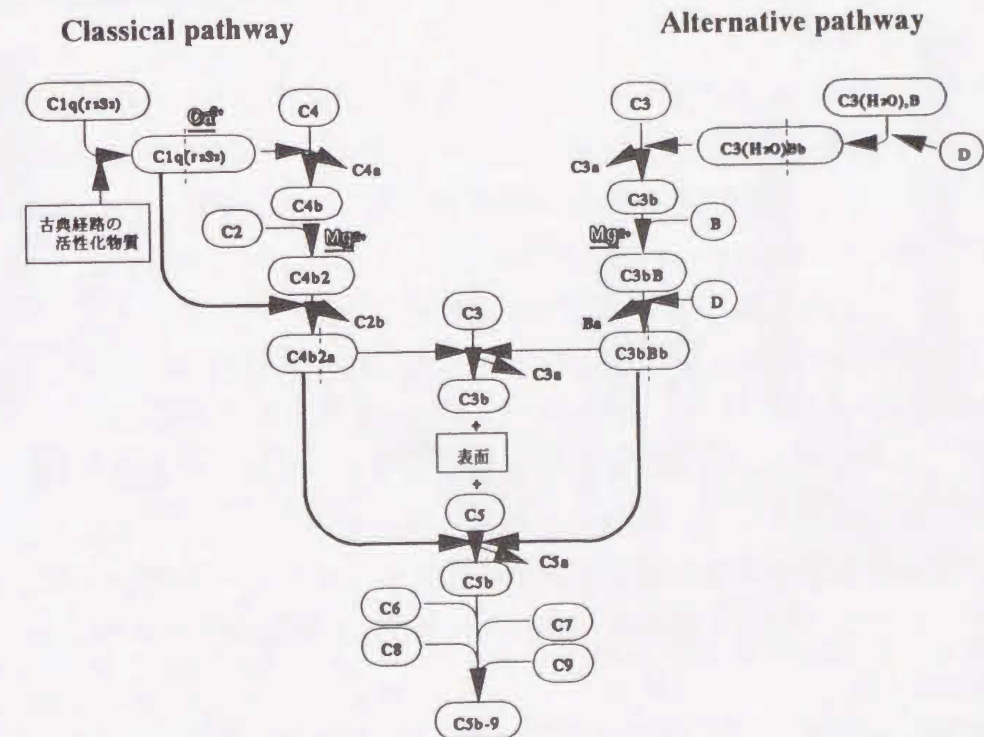


図2-1 補体系の二つの活性化経路

抗原抗体複合体（免疫複合体）によって引き起こされる古典経路の活性化（左），と免疫複合体非依存的な活性化である第二経路（右）。



応は、そのほとんどが膜表面で行われるものであり、それぞれの段階で膜の物理化学的性質の影響を受けると考えられる。したがって、補体系のリポソームの動態への寄与を評価するためには、リポソームの動態と密接な関係にあると考えられるC3フラグメント結合量、およびMAC形成による膜破壊の程度を個々に評価すべきである。

そこで本章では、血清と接触後のリポソーム表面のC3フラグメント結合量を定量的に評価することにより補体系によるオプソニン化の程度を、さらに血清中でのリポソームからの内封物の放出を測定することにより補体系による膜破壊の程度を明らかにし、これらリポソームと補体系との相互作用の程度がリポソームの体内動態とどのような関係にあるか検討した。

### 第一節 リポソームと補体系との相互作用

コレステロールは生体膜の基本的な構成成分であり、膜中で近傍のリン脂質などと相互作用することによって、流動性などの膜の基本的な性質を変化させる[18]。リポソームはリン脂質を主成分とする二分子膜であることから、コレステロールの添加は著しくその物理化学的性質を変化させ、結果的にその血中滞留性を変化させることが報告されている[19-21]。この現象の理由として、コレステロール含量の増加がリン脂質の相互作用を強め膜のパッキングを高める[22]、膜のイオンや水分子の透過性を抑制する[23-25]、タンパクやオプソニンの結合を抑制する[24,26]、肝クッパー細胞への親和性を抑制する[27-29]ことなどがあげられている。

しかしながら、その一方でリポソームはその膜中のコレステロール含量の増加に依存して補体系を消費する[13,30]ことが報告されており、リポソーム膜中のコレステロール含量の増加がリポソームの血液循環中からの排除を促進する可能性も考えられる。最近、Harashimaら[2]は、コレステロール含量の増加に伴ってリポソームの血中からの消失が促進されること、そしてこの現象は補体系との相互作用が増加したためであることを報告している。同様の結果はMoghimiriら[31,32]の検討にも見られ、臓器特異的なオプソニンのコレステロール依存的なリポソームへの結合の増加がその理由であるとしている。

このように、リポソームの動態におよぼすコレステロール含量の影響は顕著であるが、その理由は未だ確定的ではなく、補体系との相互作用が一つの要因であることも考えられる。そこで、飽和度の異なるリン脂質を基剤としたコレステロール含量の異なるリポソームをモデルリポソームとして、補体系との相互作用について検討した。

#### ラット血清中での安定性

リポソームの安定性は、ラット血清中でのリポソームからの蛍光色素の漏出を測定し、評価した。図2-2Aに示すように、不飽和脂質（卵黄ホスファチジルコリン；EPC）を基剤としたリポソームでは、コレステロール含量の低いリポソームほど不安定であった。

一方、図2-2Bに示すように、飽和脂質（水素添加卵黄ホスファチジルコリン；HEPC）からなるリポソームでは、コレステロール含量依存的に蛍光物質の漏出が観察され、コレステロール含量の多いリポソームほど不安定であることが示された。これらの結果は、基剤とするリン脂質の飽和度の違いにより、リポソームの安定性が変化することを示している。さらに、血清中で崩壊が観察されたリポソームを用いこのような不安定化のメカニズムを明らかにすることを目的として、熱処理(56°C/30min)、EDTA処理血清中での安定性について検討した。その結果、熱処理(56°C/30min)により、リン脂質の飽和度・コレステロール含量によらず、その漏出は抑制された。一方、EDTA処理血清を用いた場合、飽和リン脂質からなるリポソームからの漏出がほぼ完全に抑制されたのに対して、不飽和リン脂質からなるリポソームからの漏出は完全には抑制されなかった。一般に、補体系は熱処理(56°C/30min)およびEDTA処理(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>の枯渇)によって失活することが知られている[33,34]。したがって、飽和脂質からなるリポソームのラット血清中での不安定化は、補体系の活性化によるMAC形成の結果である可能性が強く示唆された。一方、不飽和脂質からなるリポソームの崩壊は、補体系以外の熱感受性の血液成分および2価カチオンを消費する何らかの機構によって促進されている可能性が示唆された。

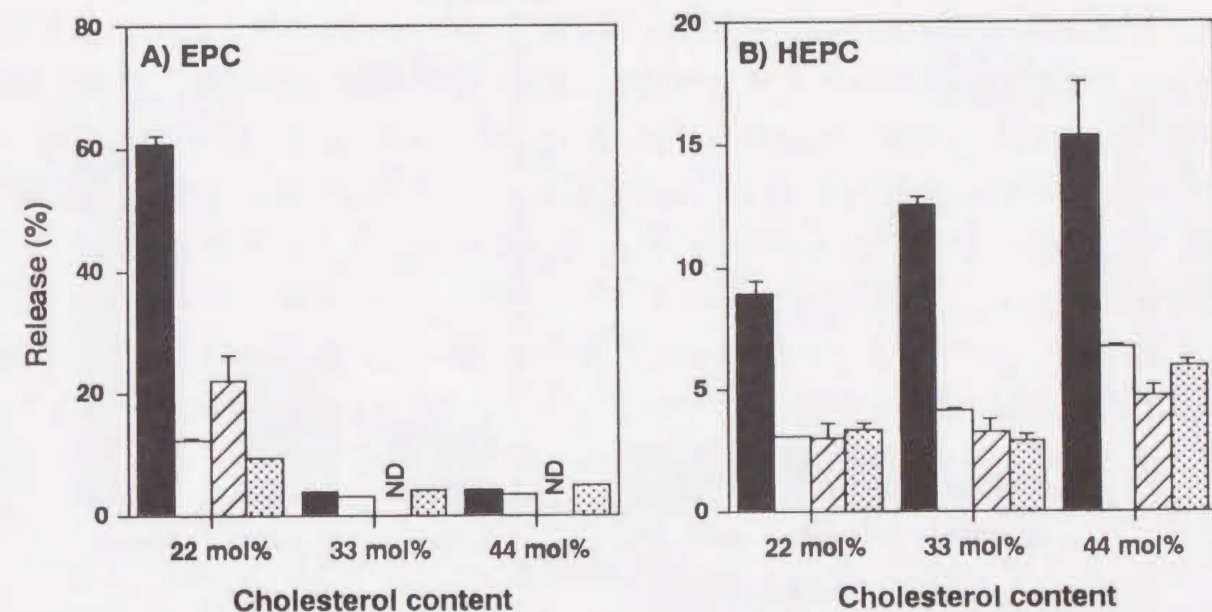


図2-2 リポソームのラット血清中での崩壊におよぼす脂質組成の影響

コレステロール含量の異なる卵黄ホスファチジルコリン(EPC)からなるリポソーム(A)、水素添加卵黄ホスファチジルコリン(HEPC)からなるリポソーム(B)を非処理、処理血清(80%v/v)あるいはリン酸緩衝液と37°Cで30分間インキュベートし、リポソーム内から漏出した蛍光色素(カルボキシフルオレセイン)の蛍光強度を測定した。各値は平均値±SE (n=3 or 4)で表した。各シンボルは、■；非処理、□；熱処理、▨；10mM EDTA処理血清を、▩；はリン酸緩衝液を表す。ND: not determined



不飽和脂質からなるリポソームにコレステロールを添加すると、二分子膜中のリン脂質分子間のパッキングが良くなり[22]イオンや水分子の透過性[23-25]が減少すること、さらに低コレステロール含量のリポソームでは、高密度リポタンパク(HDL)によるリン脂質やコレステロールの引き抜きが起こり、内封物の放出が促進されることが報告されている[35-40]。したがって、図2-2Aで示されたコレステロール依存性なリポソームの安定化は、コレステロールによる膜安定化作用によると考えられる。一方、飽和リン脂質を基剤としたリポソームでは、補体系による不安定化のみが観察された。一般に、相転移温度の高い飽和脂質を基剤としたリポソームでは、HDLによる脂質の引き抜きは著しく抑制される[35,38,41]ことが報告されており、補体系の寄与以外の崩壊が観察されなかったのはこのためであると考えられる。

#### リポソーム表面上のC3フラグメントおよび血清たんぱく質の結合量

それぞれのリポソームをラット血清とインキュベートした後、リポソーム表面上に結合したC3フラグメント量を測定した(図2-3A, B)。

リポソーム表面へのC3フラグメント結合量は、飽和リン脂質を基剤としたリポソームのほうが不飽和脂質を基剤としたリポソームよりも全般的に高く、その量はリン脂質の飽和

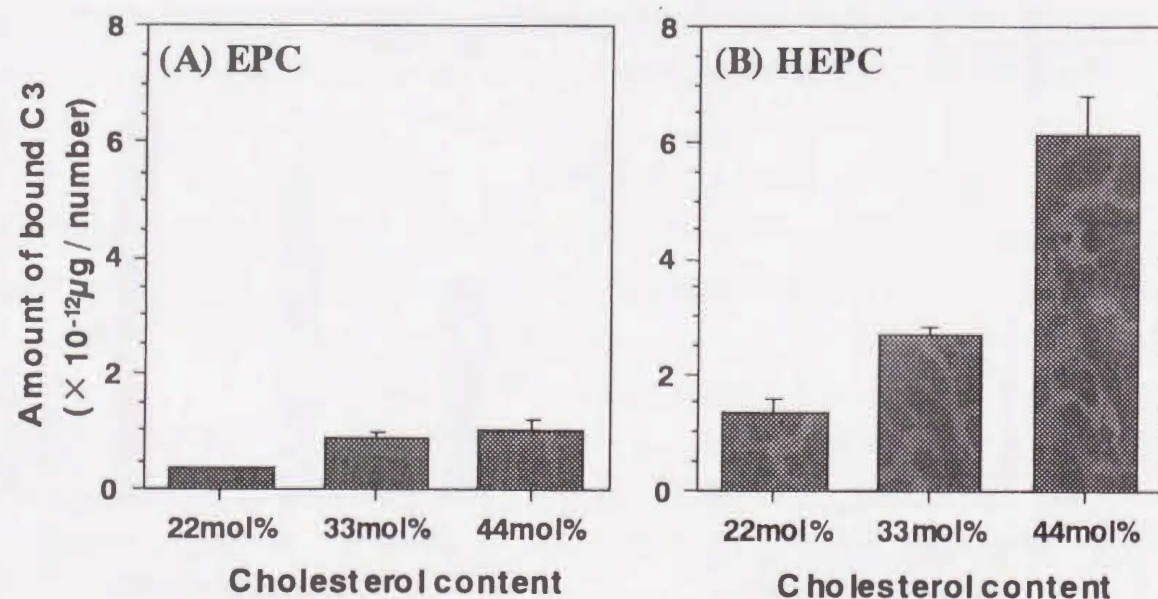


図2-3 C3フラグメント結合におよぼす脂質組成の影響

コレステロール含量の異なる卵黄ホスファチジルコリン(EPC)からなるリポソーム(A)、水素添加卵黄ホスファチジルコリン(HEPC)からなるリポソーム(B)をラット血清とインキュベート(37°C/30分)した後、リポソームを回収し、表面に結合したC3フラグメント量を定量した。定量値は既報に基づいて換算した総粒子数で除し、リポソーム1個あたりの結合量として表した。各値は平均値±SE (n=3 or 4)で表した。

度に関係なくそのコレステロール含量に依存して増加することが明らかとなった。特筆すべきは、先の検討で補体系依存的な膜破壊が起きなかった不飽和リン脂質からなるリポソームにおいても、そのコレステロール含量に依存してC3フラグメントの結合が観察されたという事実である。この結果は、補体系によるオプソニン化と膜破壊が必ずしも平行に起きるわけではないことを意味しており、リポソームと補体系との相互作用を検討する場合、リポソームの動態に影響を与えると考えられるオプソニン化の程度(C3フラグメント結合量)および膜破壊の程度(内封物の漏出)はそれぞれ独立して評価する必要があることを示唆すると思われる。

また、本検討で明らかとなった、コレステロール依存性なC3フラグメント結合量の増加は、以下のような機構によって生じたと考えられる。C3は、通常、血中で非活性体として存在しており、補体系の活性化とともに高次構造が変化し、活性体(C3b)へと変換される。この過程で、分子内の4つの-Cys-Gly-Glu-Gln残基からなるチオエステル結合が分子表面に現れる。チオエステル結合は水と反応すると急速に加水分解され、近くにある水酸基やアミノ基と共有結合する[42-44]。このことから、活性化されたC3はリポソームの膜表面の水酸基、すなわちコレステロール分子中の水酸基に結合したと推察される。

さらに、飽和リン脂質からなるリポソームのほうがC3フラグメント量が多かったという結果は、リポソーム膜の流動性も補体系との相互作用を変化させる重要な要因であることを示唆している。膜の流動性が補体系活性化のどの段階(例えば、活性化を起動する抗体等の結合過程、補体系成分の膜への結合過程、膜侵襲複合体(MAC)の形成過程)に影響を与えるか現時点では特定することはできないが、少なくともC3フラグメントの結合段階までの補体系活性化の初期段階であるということはできる。以前、McConellらのグループ[45-47]は、リポソーム膜に抗原(ハプテン)を埋め込み、抗原抗体複合体によるC1活性化(古典経路)における膜流動性の影響について検討を行っている。彼らの検討によると、膜流動性は抗体(IgG)の抗原(ハプテン)への結合には影響を与えないが、C1活性化のために必要なC1q分子のIgGへの結合に影響を与えるため、流動性の高い膜の方が高い補体系活性化を示すことを見出している。その原因としては、抗原(ハプテン)に結合した抗体の拡散速度の相違が考えられており、抗体分子が膜上で動きやすいため2分子のIgGのFc間の距離が最適(40nm以下)に保たれるためであると解釈されている。しかしながら、リポソームがどのような機構によって補体系を活性化するかによって寄与する補体系成分は異なると思われることから、膜流動性の影響も自ずと異なることが予想される。したがって、正確に膜流動性の影響を理解するには、補体系の個々の分子と膜との相互作用を補体系活性化の各段階で評価する必要があると思われる。

一方、リポソーム表面へのタンパクの結合は、飽和リン脂質を基剤とした低コレステロール(22 mol%)のリポソームで顕著な増加が観察されたが、リン脂質の飽和性にかかわらず、コレステロール依存性は見られなかった(図2-4A, B)。飽和リン脂質からなる低コレステロール(22 mol%)のリポソームに顕著なタンパク結合量が観察された理由は、以



下のように推察される。飽和リン脂質のみから構成された膜では、angular fractureな表面、すなわちパッキングの欠如があるが、コレステロールを添加した膜ではなめらかな表面構造を形成すると報告されており[48]、不完全なパッキングはリン脂質のアシル鎖を露出させ、膜表面の疎水性領域を増加させると考えられる[49]。その結果、タンパク質との相互作用が増加したためであると考えられる。

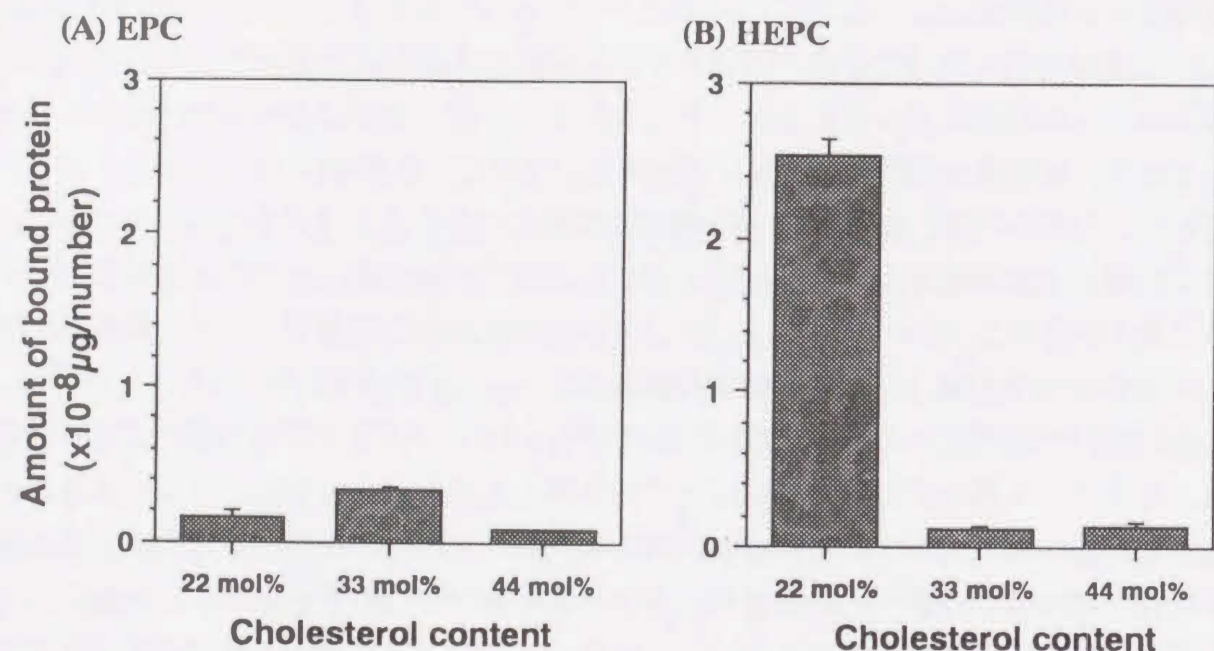


図 2-4 血清タンパクの結合におよぼす脂質組成の影響

コレステロール含量の異なる卵黄ホスファチジルコリン(EPC)からなるリポソーム(A)、水素添加卵黄ホスファチジルコリン(HEPC)からなるリポソーム(B)をラット血清とインキュベート (37°C/30min) した後、リポソームを回収し、表面に結合した血清タンパク量を定量した。定量値は既報に基づいて換算した総粒子数で除し、リポソーム 1 個あたりの結合量として表した。各値は平均値±SE (n=3 or 4) で表した。

## 第二節 リポソームの体内動態

前節までの結果から、基剤であるリン脂質の飽和性にかかわらず、オプソニンとして作用するC3フラグメントの結合量がコレステロール含量に依存して増加すること、さらには飽和脂質からなるリポソームではコレステロール含量の増加にともなって補体依存的な膜破壊が促進されることが明らかとなった。そこで、本節では、リポソームの体内動態を評価し、その動態(血中での安定性、MPSへの移行性)が、前節で得られた補体系との相互作用の程度(C3フラグメント結合量、補体依存的な膜破壊)とどのような関係にあるか検討した。

### リポソームの体内動態

リン脂質の飽和性およびコレステロール含量の異なる[<sup>3</sup>H]-イヌリン封入リポソームをwistar系雄性ラットに急速静注した後のリポソームの血中濃度の経時変化を図 2-5 A, B に示した。不飽和リン脂質を基剤としたリポソーム(図 2-5 A)では、33mol%のコレステロールを添加したリポソームが最も高い血中濃度を示した。一方、飽和リン脂質を基剤としたリポソーム(図 2-5 B)では、コレステロール含量の最も低いリポソーム(22mol%)が最も高い血中濃度を示した。このように、基剤として用いたリン脂質の飽和性によってリポソームの動態が異なることが明らかとなった。

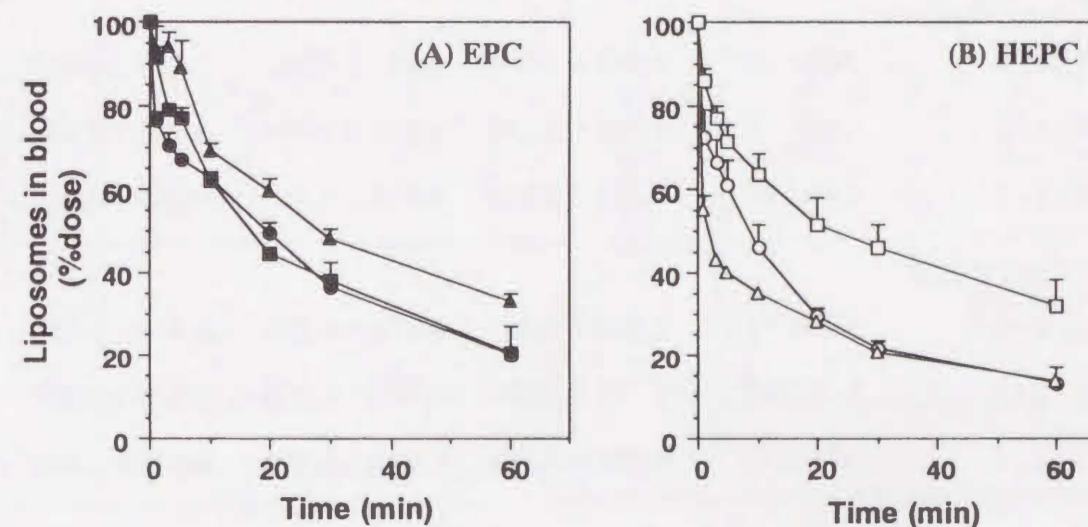


図 2-5 リポソームの血中濃度経時変化におよぼす脂質組成の影響

コレステロール含量の異なる (A) 卵黄ホスファチジルコリン(EPC)からなるリポソーム、および (B) 水素添加卵黄ホスファチジルコリン(HEPC)からなるリポソームを20 μmol/kg B.W. の投与量で、ラット静脈より投与した。各値は平均値±SE (n=3-5) で表した。各シンボルは、EPC/Chol/DCP = 6/2/1 (■), = 5/3/1 (▲), = 4/4/1 (●), HEPC/Chol/DCP = 6/2/1 (□), = 5/3/1 (△), = 4/4/1 (○) を表す。



本検討において水溶性薬物のモデルとして用いたイヌリンは、非代謝性の物質であり、リポソームから血中へ放出された遊離型のイヌリンは組織中に移行することなく速やかに腎から排泄される。したがって、血中の放射活性はリポソームの濃度とみなすことができる。一方、リポソーム封入型のままでファゴサイトーシスなどにより組織内に取り込まれたイヌリンは、短時間で血液循環中に再放出されることはない。このため、組織中の放射活性は、組織へ移行したリポソーム量とみなすことができる。

#### 血中での崩壊とMPS移行性における速度論的解析

リポソームの各臓器への移行性は、各臓器中の移行量を単純に比較することからだけでは明らかにすることはできない。なぜなら、特定の臓器へのリポソームの移行量の増加に起因した血中濃度の低下の影響を受ける可能性があるからである（スピルオーバー現象）。そこで、各リポソーム間の血中濃度推移の差の影響を考慮し、臓器クリアランスを算出し、各リポソームの臓器親和性および血液循環中での不安定性を比較した（表2-1）。

表2-1 非修飾リポソームの体内動態における速度論的評価

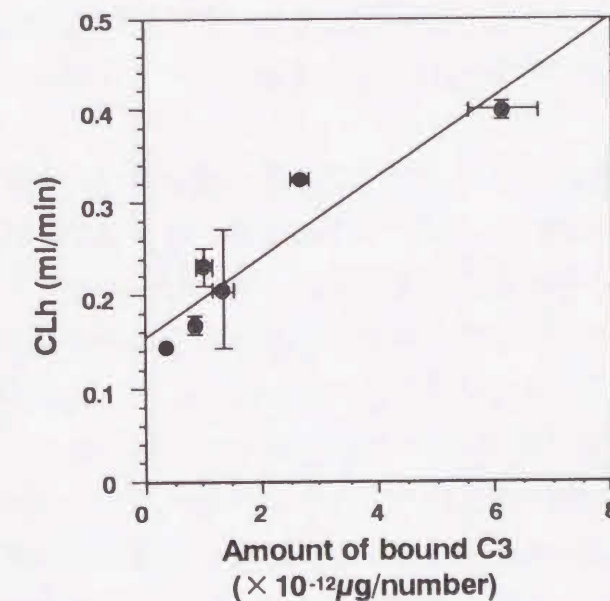
Lipid composition (molar ratio)	AUC (%dose/ml/min)	CLh (ml/min)	CLs (ml/min)	CLr (ml/min)
<b>EPC / Chol / DCP</b>				
= 6 / 2 / 1	180 ± 15	0.143 ± 0.008	0.063 ± 0.005	0.091 ± 0.011
= 5 / 3 / 1	252 ± 2	0.166 ± 0.010	0.054 ± 0.003	0.085 ± 0.004
= 4 / 4 / 1	147 ± 15	0.229 ± 0.020	0.051 ± 0.013	0.035 ± 0.006
<b>HEPC / Chol / DCP</b>				
= 6 / 2 / 1	357 ± 79	0.205 ± 0.063	0.074 ± 0.003	0.019 ± 0.006
= 5 / 3 / 1	143 ± 32	0.324 ± 0.006	0.091 ± 0.004	0.330 ± 0.058
= 4 / 4 / 1	102 ± 8	0.399 ± 0.010	0.104 ± 0.009	0.372 ± 0.041

肝臓および脾臓クリアランスは、リポソーム投与1時間後の肝臓および脾臓における取り込み量を台形公式により求めたAUC(0→1hr)で除することにより求めた。一方、腎クリアランスは、リポソーム投与後1時間までの累積尿中排泄量をAUC(0→1hr)で除することにより求めた。各値は平均値±SE (n=3-5)で表した。AUC: area under the blood concentration-time curve, CLh: hepatic clearance, CLs: splenic clearance, CLr: renal clearance,

肝への親和性の指標である肝クリアランスは、基剤とするリン脂質の飽和性に関係なく、コレステロール含量に依存して増加することが明らかとなった。また、血液循環中でのリポソームの不安定化の指標である腎クリアランスは、飽和リン脂質を基剤としたリポソームではそのコレステロール含量の増加に依存して増加したのに対して、不飽和リン脂質を用いたリポソームではそのコレステロール含量との間に相関性は見られなかった。この傾向は前節で示した血清中での安定性（図2-2）とよく一致する。これらの結果は、飽和リン脂質からなるリポソームの肝への親和性と血中での不安定化がそのコレステロール含量に依存した何らかの機構に基づくのに対して、不飽和リン脂質を基剤としたリポソームでは肝親和性のみがコレステロール含量に依存した何らかの機構に基づくことを示すものである。

一方、肝臓とならびリポソームの排除において主要な臓器である脾臓へのリポソームの親和性（脾臓クリアランス）は、全てのリポソームにおいてほぼ同程度の値を示した。この結果は、今回用いたリポソームの脾臓への移行性がコレステロール含量に依存した何らかの特異的な機構によって支配されているのではなく、肝臓への移行性や血中での不安定化によるリポソームの血中濃度の変化により影響を受けていることを示唆していると考えられる。

(A) Hepatic clearance - Bound C3



(B) Renal clearance - Release (%)

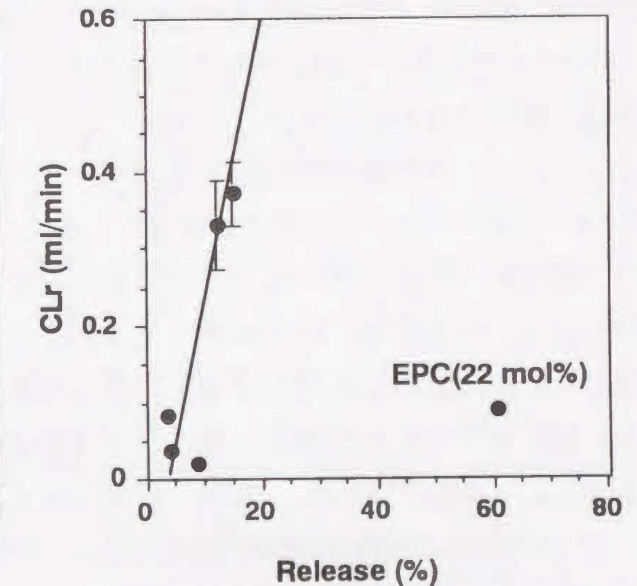


図2-6 補体系との相互作用と体内動態との関係

(A) リポソーム表面に結合したC3フラグメント量と肝クリアランス, (B) in vitroでの不安定性とin vivoでの不安定性の指標である腎クリアランスとをプロットした。C3フラグメント結合量は図2-3から、in vitroでのリポソームの不安定性 (Release(%)) は図2-2から、さらに、肝臓および腎臓クリアランスは表2-1で示された結果を用いた。



### 第三節 補体系とリポソームの体内動態との関連

図2-6 A, Bは、第一節・第二節の検討結果に基づき、各リポソーム表面上に結合したC3フラグメント量と肝クリアランス、および血清中でのリポソームの不安定性と腎クリアランスとの関係について示したものである。

C3フラグメント結合量と肝クリアランスの間には、良好な正の相関関係 ( $r^2=0.880$ ,  $p<0.01$ )が見られた(図2-6 A)。一方、血清中でのリポソームの不安定性と腎クリアランスとの間には、不飽和脂質からなるコレステロールを22mol%含有するリポソーム(EPC 22mol%)を除いて、一定の相関関係があることが明らかとなった(図2-6 B)。これらの結果は、補体系、特にC3フラグメント結合量がリポソームの肝移行性に密接に関係することを示唆するとともに、補体系との相互作用を示すリポソームに関しては、*in vitro*での不安定性が*in vivo*での不安定性を予測する上で一つの指標となる可能性を示唆していると思われる。

これまでに、*in situ*ラット肝灌流法を用いた検討において、リポソームの肝への取り込みは血清成分存在下で促進されること、そして、この取り込みを促進させる成分としてオプソニンの一つであるC3フラグメントが重要な役割を果たすことが示唆されている[1,3,5-8,10,50]。リポソームに結合したC3フラグメントは、MPS細胞上の補体受容体へのリガンドとして機能し、MPSへのリポソームの親和性を亢進させることにより、補体受容体を介したファゴサイトーシスによるリポソームの取り込みを促進すると考えられている[51-53]。今回のC3フラグメント結合量と肝クリアランスとの間の良好な相関関係は、この機構を定量的に裏付けるものである。

その一方で、本検討の結果は、リポソームの肝移行性が補体系との親和性のみで決定されるわけではないことを示唆している。このことはC3フラグメント結合量と肝クリアランスとの相関が、原点を通る直線とならなかったことから明らかである。貪食細胞による異物排除には、補体成分以外のオプソニンを介した取り込み、電荷や疎水性などの異物の物理化学的性質に依存した取り込みなど様々な形式がある[54]ことが知られており、このC3フラグメント結合量と無関係の肝クリアランスは、MPSによる補体非依存的な異物取り込み機構によると考えられる。最近、リポソームのMPSによる取り込みには、血液成分(オプソニン)依存的、非依存的な機構があることが報告されており、これらは動物種に依存することが示されている[5-8,10,55]。これらの報告にしたがえば、ラットはオプソニン依存的な取り込み機構を有しており、先に示された補体非依存的なリポソームの取り込みは、その大部分が補体系以外のオプソニン依存的な機構によっている可能性が高い。

また、興味深いことに、図2-6 Bに示されたように、相関からはずれたリポソーム(EPC 22mol%)は、*in vitro*では極めて不安定であったのに対して、*in vivo*では安定であり、*in vitro*と*in vivo*でリポソームの崩壊機構が異なる可能性が示唆された。この原因を断定することは現時点では難しいが、*in vivo*では血球成分の存在や血流による攪拌などの影響を受

ける可能性があり、これが安定性の違いを誘起する原因の一つであるかも知れない。したがって、*in vitro*での安定性と*in vivo*での安定性の関連に関しては、今後さらに検討していく必要があると思われる。

一方、リポソーム表面に結合した血清タンパク量とリポソームの肝移行性、および血液循環中での崩壊の指標である腎クリアランスとの間には、相関関係はみられなかった(2-6 A, B)。以前、Hernandez-Casellesら[56]は、タンパク結合量の多いリポソームほどヒト血清中で不安定であること、さらに、Cullisらのグループ[57-60]は、リポソームに結合した総タンパク量がリポソームの血液循環からの消失に寄与する重要な要因であることを報告している。しかしながら、Cullisらは同時に、リポソームに結合したC3フラグメント量もまた総タンパク結合量に依存して増加していることを示している[57]。したがって、結合タンパク量と血中滞留性との間の負の相関は、オプソニンなどの特異的タンパク結合量と血中滞留性との間に負の相関が存在すると読み変えることも可能であり、我々の今回の結果と一致する。一方、結合タンパク量と血液循環中での崩壊はなんら相関が見られず、非特異的に結合したタンパクが崩壊に寄与するのではなく、むしろ特異的に結合するタンパクが重要な役割を果たすことを示唆していると思われる。

(A) Hepatic clearance - Bound protein (B) Renal clearance - Bound protein

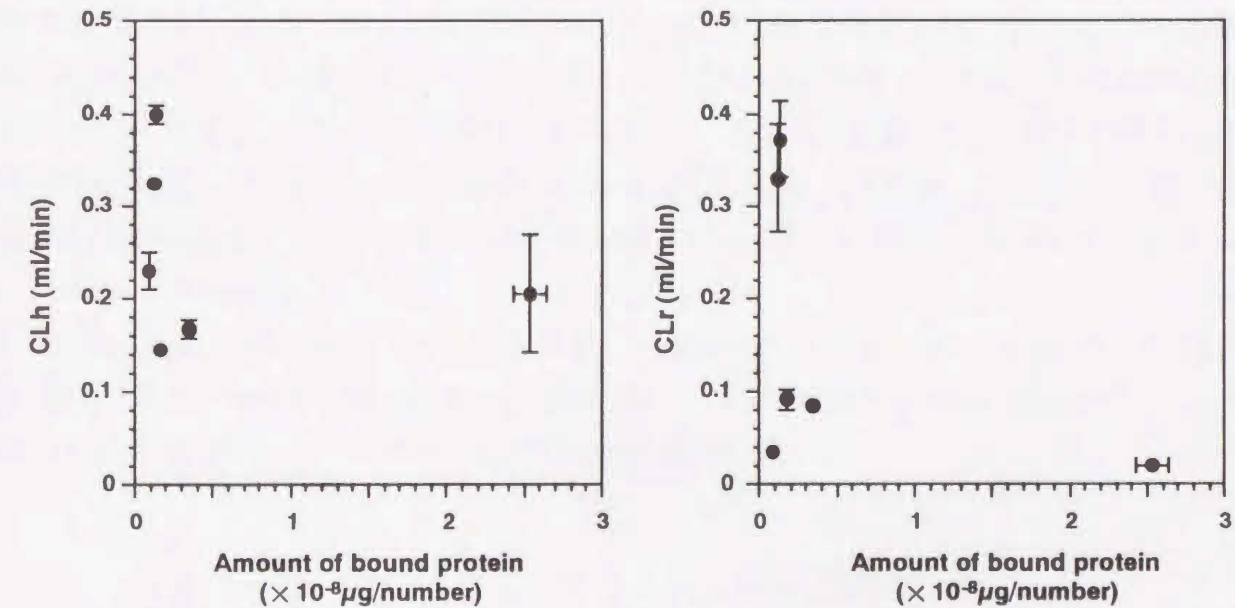


図2-7 血清タンパク結合量と体内動態との関係

リポソーム表面に結合した血清タンパク量と(A)肝クリアランスおよび(B) *in vivo*での不安定性の指標である腎クリアランスとをプロットした。血清タンパク結合量は図2-4から、*in vitro*でのリポソームの不安定性(Release(%))は図2-2から、さらに、肝臓および腎臓クリアランスは表2-1で示された結果を用いた。



#### 第四節 小括

本章における検討から、リポソームの体内動態に補体系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これまでもリポソームの動態への補体系の寄与を示唆する報告はなされているが、我々の試みのように補体系とリポソームの相互作用の程度を定量的に評価し、体内動態との関連を明らかにした例はこれまでにない。

本検討で明らかとなった、C3フラグメント結合量がリポソームの肝移行性を、補体系による相互作用を受けやすいリポソームにあってはin vitroでの安定性が血液循環中(in vivo)での安定性を表す、という結果は、リポソームと補体系との相互作用の程度を評価することにより、これまで予測不可能であった生体内投与後のリポソームの動態を予測するうえで有用な知見を得ることができる可能性を示唆していると思われる。

しかしながら、in vivoとin vitroでのリポソームの安定性は、その脂質組成などの物理化学的性質、あるいはin vivoとin vitroとの環境の違いによって異なる可能性も示唆されており、今後さらなる検討が必要であると思われる。

#### 第5節 実験の部

##### 試薬

水素添加卵黄ホスファチジルコリン(HEPC)は日本精化(大阪)から、卵黄ホスファチジルコリン(EPC)は日本油脂(東京)より供与されたものを用いた。リン酸ジセチル(DCP)はナカライテスク(京都)より、コレステロール(Chol)は和光純薬工業(大阪)よりそれぞれ購入した。リポソームの水相マーカーとして用いた5(6)-カルボキシフルオレセイン(CF)はEastman Kodak (NY, USA)より、 $[^3\text{H}]$ -inulinはNew England Nuclear(NEN)(MA, USA)より、また脂質相マーカーとして用いた $[^3\text{H}]$ -cholesterylhexadecyl ether( $[^3\text{H}]$ -CHE)はNEN(MA, USA)からそれぞれ購入した。液体シンチレーションカクテルとしてのシンチゾールEX-Hは同仁化学(熊本)より購入した。その他の試薬は試薬特級品を用いた。

##### リポソームの調製

CFおよび $[^3\text{H}]$ -inulin封入リポソーム、あるいは $[^3\text{H}]$ -CHE添加リポソームは既報[34]にしたがって調製した。実験に用いたリポソームの脂質組成は表2-2に示し、脂質濃度:  $20\mu\text{mol/ml}$ 、平均粒子径:  $400\text{nm}$ のリポソームをそれぞれ調製した。

表2-2に示した脂質組成および上記脂質濃度にしたがい各脂質を秤量した後、クロロホルムに溶解し、減圧下で溶媒を留去することにより脂質薄膜を形成させた。これにCF ( $40\text{mM}$ )等張溶液、トレーサー量の $[^3\text{H}]$ -inulinを含むリン酸緩衝液(PBS(-)) (リポソーム溶液  $5\text{ml}$  に対し  $20\mu\text{Ci}$ )、あるいはトレーサー量の $[^3\text{H}]$ -CHEを添加し、手振盪により脂質薄膜を水和させ、多重層リポソーム(Multilamellar vesicles: MLV)を調製した。MLVの粒子径は、孔径 $400\text{nm}$ のポリカーボネート膜(Nuclepore, CA, USA)を用いてextrusion法により調整した。各粒子径は動的光散乱法(NICOMP 370 HPL submicron particle analyzer (Particle Sizing System, CA, USA)により確認した。

未封入のCF及び $[^3\text{H}]$ -inulinはセルロースチューブ(Seamless Cellulose Tubing, Small Size 18, 和光純薬工業)とSpectra/Por membrane;  $50000\text{M.W. Cut}$ (Spectrum Medical Industry, CA, USA)を用いたPBS(-)に対する平衡透析によりそれぞれ除去した。

表2-2 リポソームの脂質組成(モル比)

EPC / Chol / DCP = 6 : 2 : 1		HEPC / Chol / DCP = 6 : 2 : 1	
	5 : 3 : 1		5 : 3 : 1
	4 : 4 : 1		4 : 4 : 1



### リポソームの体内動態

実験動物として、Wistar系雄性ラット（井上実験動物（熊本），体重 $225 \pm 50$ g）を使用した。エーテル麻酔下，ラット大腿動，静脈および膀胱に常法にしたがってカニューレーションを行った。手術終了後，ボールマンケージに固定し，麻酔より覚醒させた後，大腿静脈より $20 \mu\text{mol lipid/kg}$ の投与量でリポソームの投与を行った。大腿動脈および膀胱より経時的に採血，採尿を行った。さらに投与1時間後に肝臓および脾臓を採取した。

血液，尿，肝臓，脾臓中の $[^3\text{H}]\text{-inulin}$ の放射活性は既報[61]にしたがって測定した。すなわち，血液は $0.2\text{ml}$ を採取し， $0.5\text{ml}$ の過酸化水素水及び $0.5\text{ml}$ の $2\text{N-KOH/isopropanol}$ 溶液 $0.2\text{ml}$ を添加した。尿は精製水を加え全量を $10\text{ml}$ とした後 $1.0\text{ml}$ を採取し，過酸化水素水 $0.2\text{ml}$ ， $2\text{N-KOH/isopropanol}$ 溶液 $0.2\text{ml}$ を添加した。この後，血液・尿，共に $37^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートした。インキュベート終了後， $10\%$ 酢酸を血液には $1\text{ml}$ ，尿には $0.4\text{ml}$ 添加することで中和し，シンチレーションカクテル $10\text{ml}$ を加えた。

一方，肝臓はホモジナイズした後，精製水を加え全量を $50\text{ml}$ にメスアップし，このうち $1\text{ml}$ を採取した。過酸化水素水 $0.2\text{ml}$ ， $2\text{N-KOH/isopropanol}$ 溶液 $0.2\text{ml}$ を添加し， $37^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートした。インキュベート終了後， $10\%$ 酢酸 $0.4\text{ml}$ により中和し，シンチレーションカクテル $10\text{ml}$ を加えた。脾臓は全組織に過酸化水素 $2\text{ml}$ ， $2\text{N-KOH/isopropanol}$ 溶液 $2\text{ml}$ を添加し， $37^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートした。インキュベート終了後， $10\%$ 酢酸 $2.4\text{ml}$ を加えて中和し，精製水で全量を $10\text{ml}$ としたうちの $1\text{ml}$ にシンチレーションカクテル $10\text{ml}$ を加えた。

各試料の放射活性は液体シンチレーションカウンター(LSC-3500, Aloka, 東京)を用いて測定した。

### リポソームの体内挙動における速度論的解析

循環血中からのリポソームの消失は，非線型最小二乗法プログラムMULTI[62]を用いて(式1)に基づいて解析を行った。AlgorithmはDamping Gauss-Newton methodを用いた。

$$C_b = A \cdot \exp(-\alpha t) \quad (1)$$

$$\text{AUC}(0 \rightarrow t) = A/\alpha \quad (2)$$

(A: 時間0における濃度， $\alpha$ : 速度定数，t: 時間，AUC: 血中濃度時間曲線下面積)

全身クリアランスは投与量を $\text{AUC}(0 \rightarrow \infty)$ で除することにより求めた。肝クリアランスおよび脾臓クリアランスは各臓器のリポソーム投与1時間後における取り込み量(%Dose)を，腎クリアランスは投与後1時間における累積尿中排泄量を $\text{AUC}(0 \rightarrow 1\text{h})$ で除することにより算出した。

$$\text{CL}_{\text{tot}} = \text{Dose}/\text{AUC}$$

$$\text{CL}_h = X_h(t)/\text{AUC}(0 \rightarrow t)$$

$$\text{CL}_s = X_s(t)/\text{AUC}(0 \rightarrow t)$$

$$\text{CL}_r = X_r(t)/\text{AUC}(0 \rightarrow t)$$

(Dose: 投与量， $X_h(t)$ : 肝臓への取り込み量， $X_s(t)$ : 脾臓への取り込み量， $X_r(t)$ : 尿中への累

### 積排泄量)

### 血清中におけるリポソームの安定性評価

実験に用いた血清は，Wistar系雄性ラットの頸動脈より採取した血液を約60分間放置することにより凝固させた後， $4^\circ\text{C}$ にて遠心分離( $1250 \times g$ ,  $15\text{min}$ )して調製した。

リポソームの安定性の評価は既報に従って行った[34]。すなわち，調製した血清 $0.45\text{ml}$ に対しCF封入リポソーム( $6 \mu\text{mol/ml}$ )を $0.05\text{ml}$ 添加し， $37^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。インキュベート終了後，リポソーム-血清混合液 $60 \mu\text{l}$ をPBS(-) $5\text{ml}$ に添加した(試料溶液A)。試料溶液Aより $1\text{ml}$ を採取し，Triton-X溶液( $5\%$ v/v) $1\text{ml}$ を添加してリポソームを完全に崩壊させた後，精製水 $2\text{ml}$ を加え，4倍に希釈した(試料溶液B)。各試料溶液の蛍光強度は分光蛍光光度計(Hitachi 650あるいはF-4500(日立))；励起波長 $490\text{nm}$ ，測定波長 $520\text{nm}$ により測定し，次式により崩壊率(Release(%))を算出した。

$$\text{Release}(\%) = \{A \div (B \times 4)\} \times 100$$

A: 試料Aの蛍光強度， B: 試料Bの蛍光強度

### リポソーム表面に結合したC3フラグメント及び血液タンパクの定量

ラット血清 $900 \mu\text{l}$ にリポソーム溶液(脂質濃度;  $20 \mu\text{mol/ml}$ )を $100 \mu\text{l}$ 加え， $37^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。この後，Chonnら[63]の報告したスピнкаラム法を用いてリポソームをリポソーム-血清混合液から分離した。

すなわち，インキュベート後の混合液 $1\text{ml}$ をスピнкаラム(Terumo syringe (10ml), Bio-Gel A-15m (200-400 mesh size)(Bio-Rad, CA, USA))に添加し，遠心分離( $500\text{rpm}$ ,  $1\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ )してベツト中にしみこませた。次いで溶出液(PBS(-)) $500 \mu\text{l}$ を添加し，遠心分離( $500\text{rpm}$ ,  $1\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ )してfraction-1を得た。溶出液の添加と遠心分離を順次繰り返す，各サンプルについてfraction-15程度まで採取した。溶出してきたリポソームは各fraction中の $[^3\text{H}]\text{-CHE}$ の放射活性を測定することで確認した。確認後，リポソームを含むfractionを一つにまとめ，リポソーム画分を超遠心(Optima TL Ultracentrifuge (Beckman, USA),  $75000\text{rpm}$ ,  $1\text{hr}$ )により濃縮し，試料とした。試料中のリポソーム濃度は $^3\text{H-CHE}$ の放射活性から換算した。また，試料中のリポソーム由来脂質は以後の定量に悪影響をおよぼすため，等量の $2\%$  Triton-X溶液の添加によりリポソーム膜を崩壊させた後，試料に対して3倍量の $1,1,2\text{-trichloro},1,2,2\text{-trifluoroethane}$ (和光純薬工業)を添加することにより抽出除去した。この試料中のC3フラグメント量を当研究室において作製された抗ラットC3モノクローナル抗体と市販のHRP-conjugated抗ラットC3ポリクローナル抗体(Cappel, PA, USA)を用いたサンドイッチELISA法により，また結合血清タンパク量はDC protein assay(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)により測定した。

サンドイッチELISAによるC3定量は既報[64]にしたがって行った。すなわち，非標識抗ラットC3モノクローナル抗体( $10 \mu\text{g/ml}$ )を $100 \mu\text{l/well}$ ずつ96wells ELISA plate(Nunc, Denmark)に分注し，室温で2時間反応させ，コーティングとした。反応終了後，抗体溶液を除き，



0.1%-BSA含有PBS(-)(BPBS)を390 $\mu$ l/wellずつ分注し、室温で30分反応させ、ブロッキングとした。試料をBPBSを用いて適度に希釈し、各wellに100 $\mu$ lずつ分注し、室温で一晩反応させた。反応終了後、0.05%-Tween 20含有PBS(-)(washing buffer)を用いて3回洗浄した。この後、HRP標識抗ラットC3ポリクローナル抗体をBPBSで3000倍に希釈したものを100 $\mu$ l/wellずつ分注し、室温で2時間反応させた。反応終了後、washing bufferを用いて3回洗浄した後、o-phenylene diamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で発色させ、3-5分後に反応を2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させた。波長490nmにおける吸光度はMicroplate reader (Model450, Bio-Rad Laboratories)を用いて測定した。濃度換算のために用いた精製ラットC3は当研究室で精製したものをを用いた。

結合C3フラグメント量、および血液蛋白量は、PideonとHunt[65]の既報にしたがって換算した総リポソーム粒子数で除することにより、1個あたりの結合量として示した。

## 引用文献

- 1) Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., Kiwada, H. : Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size liposomes. *Pharm. Res.*, **11**: 402-406 (1994)
- 2) Harashima, H., Huong, T.M., Ishida, T., Manabe, Y., Matsuo, H. and Kiwada, H. : Synergistic effect between size and cholesterol content in the enhanced hepatic uptake clearance of liposomes through complement activation in rats. *Pharm. Res.*, **11**: 1702-1707 (1994)
- 3) Matsuo, H., Funato, K., Harashima, H. and Kiwada, H., The complement- but not mannose receptor-mediated phagocytosis is involved in the hepatic uptake of cetylmannoside-modified liposomes in situ. *J. Drug Targeting*, **2**: 141-146 (1994)
- 4) Szebeni, J., Wassef, N. M., Spielberg, H., Rudolph, A.S. and Alving, C.R., Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **205**: 255-263 (1994)
- 5) Liu, D., Song, Y.K. and Liu, F. : Antibody dependent, complement mediated liver uptake of liposomes containing GM1. *Pharm. Res.*, **12**: 1775-1780 (1995)
- 6) Liu, D., Hu, Q. and Song, Y.K. : Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1240**: 277-284 (1995)
- 7) Liu, D., Liu, F. and Song, Y.K. : Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**: 140-146 (1995)
- 8) Liu, D. : Animal species dependent liposome clearance. *J. Liposome Res.*, **6**: 77-97 (1996)
- 9) Szebeni, J., Wassef, N.M., Rudolph, A.S. and Alving, C.R. : Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1285**: 127-130 (1996)
- 10) Harashima, H. and Kiwada, H. : Studies on the mechanism of uptake of liposomes using an isolated perfused liver system. *J. Liposome Res.*, **6**: 61-75 (1996)
- 11) Richards, R.L., Habbersett, R.C., Scher, I., Janoff, A.S., Schieren, H.P., Mayer, L.D., Cullis, P.R. and Alving, P.R. : Influence of vesicle size on complement-dependent immune damage to liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **855**: 223-230 (1986)
- 12) Chonn, A., Cullis, P.R. and Devine, D.V. : The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J. Immunol.*, **146**: 4234-4241 (1991)
- 13) Devine, D.V., Wong, K., Serrano K., Chonn, A. and Cullis, P.R. : Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1191**: 43-51 (1994)
- 14) Müller-Eberhard, H.J. : Complement. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**: 697-724 (1975)
- 15) Porter, P.R. and Reid, K.B.M. : Activation of the complement system by antibody-antigen complexes: the classical pathway. *Adv. Prot. Chem.*, **33**: 1-71 (1979)
- 16) Reid, K.B.M. : Proteins involved in the activation of the classical pathways of human complement. *Biochem. Soc. Transact.*, **11**: 1-12 (1983)
- 17) Pangburn, M.K. : Activation of complement via the alternative pathway. *Federation Proceedings*, **42**: 139-143 (1983)
- 18) Wum E.S., Jacobson, K. and Papahadjopoulos, D. : Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochem.*, **16**: 3836-3841 (1977)



- 19) Kirby, C., Clarke, J. and Gregoriadis, G. : Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.*, **186**: 591-598 (1980)
- 20) Senior, J. and Gregoriadis, G. : Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life. Sci.*, **30**: 2123-2136 (1982)
- 21) Senior, J.H. : Fate and behavior of liposomes in vivo: A review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**: 123-193 (1987)
- 22) Demel, R.A. and De Kruffyff, B. : The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **457**: 109-132 (1976)
- 23) Demel, R.A., Bruckdorfer, K.R. and Van Deejen, L.L.M. : The effect of sterol structure on the permeability of liposomes to glucose, glycerol and Rb<sup>+</sup>. *Biochim. Biophys. Acta*, **255**: 321-330 (1972)
- 24) Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S. and Isac, T. : Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, **311**: 330-348 (1973)
- 25) Corvera, E., Mouristen, O.G., Singer, M.A. and Zukermann, M.J. : The permeability and the effect of acyl-chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: theory and experiment. *Biochim. Biophys. Acta*, **1107**: 261-270 (1992)
- 26) Moghim, S.M. and Patel, H.M. : Serum opsonins and phagocytosis of saturated and unsaturated phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **984**: 384-387 (1989)
- 27) Patel, H.M., Tuzel, N.S. and Ryman, B.E. : Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen. *Biochim. Biophys. Acta*, **761**: 142-151 (1983)
- 28) Dave, J. and Patel, H.M. : Differentiation in hepatic and splenic phagocytic activity during reticuloendothelial blockade with cholesterol-free and cholesterol-rich liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **888**: 184-196 (1986)
- 29) Claassen, E. and Van Rooijen, N. : The effect of elimination of macrophages on the tissue distribution of liposomes containing [<sup>3</sup>H]methotrexate. *Biochim. Biophys. Acta*, **802**: 428-434 (1984)
- 30) Alving, C.R., Richrds, R.L. and Guirguis, A.A. : Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J. Immunol.*, **118**: 342-347 (1977)
- 31) Moghim, S.M. and Patel, H.M. : Tissue specific opsonins for phagocytic cells and their different affinity for cholesterol-rich liposomes. *FEBS Let.*, **233**: 143-147 (1988)
- 32) Moghim, S.M. and Patel, H.M. : Differential properties of organ-specific serum opsonins for liver and spleen macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **984**: 379-383 (1989)
- 33) Okada, N., Yasuda, T., Tsumita, T., and Okada, H. : Activation of the alternative complement pathway of guinea-pig by liposomes incorporated with trinitrophenylated phosphatidylethanolamine. *Immunol.*, **45**: 115-124, 1982
- 34) Funato, K., Yoda, R. and Kiwada, H., Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**: 198-204 (1992)
- 35) Patel, H.M., Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**: 39-90 (1992)
- 36) Senior, J.s., Gregoriadis, G. and Mitropoulos, K.A. : Stability and clearance of small unilamellar liposomes studies with normal and lipoprotein-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **760**: 111-118 (1983)
- 37) Tischler, U., Ruckert, D., Schubert, R., Jaroni, H.W., Schmidt, K.H. : Non-leaky vesiculation of large unilamellar vesicles (LUV) induced by plasma high density lipoprotein (HDL): detection by HPLC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**: 1219-1226 (1989)
- 38) Damen, J., Regts, J. and Scherphof, G. : Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteina. *Biochim. Biophys. Acta*, **665**: 538-545 (1981)
- 39) Scherphof, G. and Morselt, H., On the size-dependent disintegration of small unilamellar phosphatidylcholine vesicles in rat plasma. Evidence of complete loss of vesicle structure. *Biochem. J.*, **221**: 423-429 (1984)
- 40) Tall, A.R., Small, D.M. : Solubilization of phospholipid membranes by human plasma high density lipoproteins. *Nature*, **265**: 163-164 (1977)
- 41) Gregoriadis, G. : Fate of injected liposomes : observations on entrapped solute retention, vesicle clearance and tissue distribution in vivo. In *Liposome as Drug Carriers* (Gregoriadis, G. Ed., John Wiley and Sons) 3-18 (1988)
- 42) Levine, R.P., Finn, R. and Gross, R. : Interactions between C3b and cell-surface macromolecules. *Ann. New York Acad. Sci. USA*, **421**: 235-245 (1983)
- 43) Sahu, A., Lozel, T.R. and Pangburn, M.K. : Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem. J.*, **302**: 429-436 (1994)
- 44) Law, S.K.A. and Dodds, A.W. : The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Science*, **6**: 263-274 (1997)
- 45) Parce, J.W., Henry, N. and McConnell, H.M. : Specific antibody-dependent binding of complement component C1q to hapten-sensitized lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 1515-1518 (1978)
- 46) Esser, A.F., Bartholomew, R.M., Parce, J.W. and McConnell, H.M. : The physical state of membrane lipids modulates the activation of the first component of complement. *J. Biol. Chem.*, **254**: 1768-1770 (1979)
- 47) Parce, J.W., McConnell, H.M., Bartholomew, R.M. and Esser, A.F. : Kinetics of antibody-dependent activation of the first component of complement on lipid bilayer membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**: 235-242 (1980)
- 48) Nayar, R., Hope, M.J, Cullis, P.R. : Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochim. Biophys. Acta*, **986**: 200-206 (1989)
- 49) Schullery, S.E., Schmidt, C.F., Felgner, P., Tillack, T.W. and Thompson, T.E. : Fusion of di-palmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochem.* **19**: 3919-3923 (1980)
- 50) Kiwada, H., Miyajima, T. and Kato, Y. : Studies on the uptake mechanism of liposomes by perfused rat liver. II. An indispensable factor for liver uptake in serum. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**: 1189-1195 (1987)
- 51) Brown, E.J. : Complement receptors and phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**: 76-82 (1991)
- 52) Wright, S.D. : Receptors for complement and the biology of phagocytosis. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Gallin, J.I., Goldstein, I.M. and Snyderman, R., editors. Raven Press, Ltd., New York, 477-495 (1992)
- 53) Tomlinson, S. : Complement defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol.*, **5**: 83-89 (1993)
- 54) 徳永徹 : マクロファージ. 講談社サイエンティフィック (1986)
- 55) Harashima, H., Komatsu, S., Kojima, S., Yanagi, C., Morioka, Y., Naito, M. and Kiwada, H. : Species difference in the disposition of liposomes among mice, rats, and rabbits: allometric relationship and species dependent hepatic uptake mechanism. *Pharm. Res.*, **13**: 1049-1054 (1996)



- 56) Hernandez-Caselles, T. Villalain J. and Gomez-Fernandez, J.C. : Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. *Mol. Cell. Biochem.*, **120**: 119-126 (1993)
- 57) Chonn, A., Semple, S.C. and Cullis, P.R. : Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes. *J. Biol. Chem.*, **267**: 18759-18765 (1992)
- 58) Chonn, A., Semple, S.C. and Cullis, P.R., Protein-membrane interactions in the complex biological milieu. In Jos A.F. Op den Kamp (Ed.), *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics*, NATO ASI Series, Vol. **H 82**, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 101-106 (1994)
- 59) Semple, S.C., Chonn, A., Cullis, P.R. : Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochem.*, **35**: 2521-2525 (1996)
- 60) Oja, C.D., Semple, S.C., Chonn, A., Cullis, P.R. : Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1281**: 31-37 (1996)
- 61) Kume, Y., Maeda, H., Harashima, H. and Kiwada, H., Saturable, Non-Michaelis-Menten uptake of liposomes by the reticuloendothelial system. *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**: 162-166 (1991)
- 62) Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. and Uno, T. : A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**: 879-890 (1981)
- 63) Chonn, A., Semple, S.C., Cullis, P.R. : Separation of large unilamellar liposomes from blood components by spin column procedure : toward identifying plasma proteins which mediate liposome clearance in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**: 215-222 (1991)
- 64) Ferdous, A.J., Ishida, T., Shinohara, M., Harashima, H. and Kiwada, H. : Size-dependent release of carboxyfluorescein from cetylmannoside-modified liposomes in human plasma. *Biopharm. Drug Disposit.*, **17**: 145-154 (1996)
- 65) Pidgeon, C., Hunt, A. : Calculating number and surface area of liposomes in any suspension. *J. Pharm. Sci.*, **70**: 173-176 (1981)

### 第三章 補体系によるリポソーム認識機構の検討

第二章において、リポソームの体内動態に補体系が重要な役割を果たすことが明らかとなった。このことは、生体内投与後のリポソームの動態を予測、あるいは制御するためには、補体系によるリポソーム認識機構の理解が大切であることを示唆していると考えられる。

一般に、補体系は古典経路と第二経路という二つの活性化経路を介して活性化されることが知られている。古典経路はIgGやIgMを含む免疫複合体や凝集物とC1複合体のC1q部分の相互反応によって起動される。一方、第二経路は抗体などの起動因子が標的細胞上の特異的な分子を認識することによって起こるのではなく、むしろ液相中で持続的に非常にゆっくりと活性化されているC3分子の標的細胞への非特異的な結合によりその活性化が起動されると考えられている。両経路は、それぞれが形成したC3転換酵素（古典経路；C4aC2b, 第二経路；C3bBb）が産生したC3bの異物表面への結合段階において合流し、最終的に膜侵襲複合体(MAC)を形成して膜破壊を生ずる（図2-1）。

リポソームは生体膜と類似した構造を持つことから、しばしば生体成分と生体膜との相互作用を検討する際のモデル膜として用いられてきている。しかしながら、補体系と膜との相互作用に関する研究の多くはハプテン（抗原）などをリポソームに組み込み、補体系との親和性を人為的に増加させて行われたものであり、その知見を薬物運搬体として用いる非修飾リポソームにそのままあてはめることはできない。前章で示したように、リポソームの動態に補体系が重要な役割を果たすことから、異物性が比較的低いと考えられる非修飾リポソームを補体系がどのようにして異物として認識するかを解明することは非常に重要である。また、抗原性が低いにもかかわらず、非修飾リポソームによって補体系が活性化されたという事実は、これまでいわれてきた補体系の機能とは異なる新たな機能を明らかにする可能性をも含んでいる。

そこで本章では、第二章において補体系がその体内動態を支配する要因である可能性が示された飽和リン脂質からなる三種のコレステロール含量の異なるリポソームをモデルリポソームとして用い、補体系によるリポソーム認識機構、およびその違いがおよぼすオプソニン化（C3フラグメントの結合）および膜破壊（MAC形成）への影響について詳細に検討した。

#### 第一節 リポソームによる補体活性化経路の検討

##### ラット血清中での非修飾リポソームの崩壊への補体系の寄与

一般に、補体系の親和性はリポソームの粒子径の増加に依存して増加することが知られている[33,35,40,42]。したがって、本章ではより補体系との親和性が高いと考えられる粒子径が800nmのリポソームを用い、まずこのリポソームのラット血清中での安定性をまず評



価した。

表3-1に示すように、リポソームからの蛍光色素の放出はコレステロール含量の増加に伴って増加するとともに、この放出は熱処理(56°C/30min)およびEDTA処理によりほぼ完全に抑制された。したがって、リポソームからの蛍光色素の放出が補体系の活性化によるリポソーム膜破壊の結果であること、さらに補体系の親和度がリポソーム中のコレステロール含量に依存して増加することが改めて示された。

表3-1 ラット血清中での非修飾リポソームの崩壊への補体系の関与

Treatment	Lipid composition (Chol content)		
	6/2/1 (22mol%)	5/3/1 (33mol%)	4/4/1 (44mol%)
None	18.5 ± 3.4	30.3 ± 1.5	40.1 ± 2.0
EDTA (10mM)	3.0 ± 0.4	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.4
56°C / 30min	3.0 ± 0.4	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.4
Control*	3.0 ± 0.4	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.4

コレステロール含量の異なる各リポソームと非処理あるいは処理血清(80%v/v)を37°Cで30分間インキュベートを行い、リポソーム内から漏出した蛍光色素(カルボキシフルオレセイン)の蛍光強度を測定した。各値は平均値±SD (n=3 or 4)で表した。

\*controlとは、ラット血清を含まないリン酸緩衝液中でのリポソームからの蛍光色素の漏出を表す。

#### 非修飾リポソームによる補体活性化経路の検討

補体系の活性化は、古典経路と第二経路の二つの経路を介して行われることが知られている。先にも示したとおり、古典経路の活性化にはCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>の二価カチオンが、第二経路の活性化にはMg<sup>2+</sup>のみが必要である[1,2]。そこで、EDTA溶液およびEGTA/MgCl<sub>2</sub>溶液を用いて、表3-1に示された補体系によるリポソームの崩壊がいずれの経路を介しているか検討した。

EDTA溶液はCa<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>の両二価カチオンを、EGTA/MgCl<sub>2</sub>溶液はMg<sup>2+</sup>のみを枯渇させる。したがって、EDTA処理は古典経路および第二経路の両経路を、EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理は古典経路のみを阻害すると考えられる[1,2]。EDTA処理を施した血清中でのリポソームの崩壊はほぼ完全に抑制された。これに対して、EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血清中では44%コレステロール含有リポソームの崩壊はほとんど抑制されなかったものの、低コレステロール含有リポ

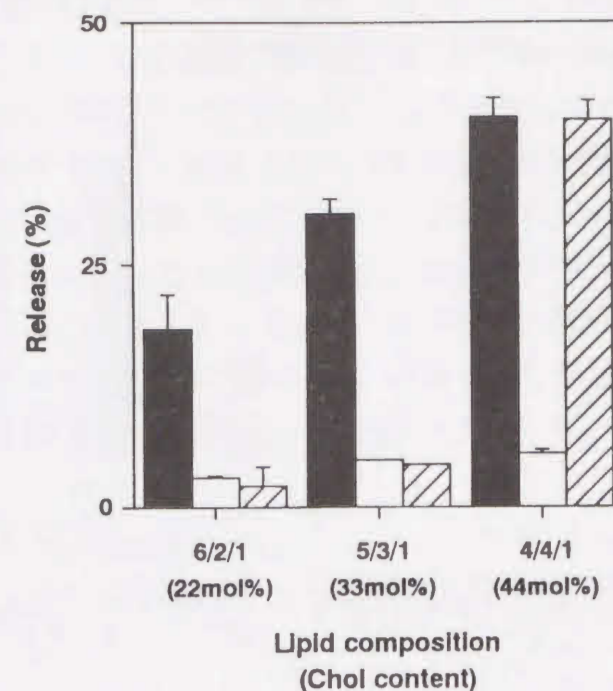


図3-1 非修飾リポソームの補体依存的な崩壊における補体活性化経路の違い

コレステロール含量の異なる各リポソームと非処理あるいは処理血清(80%v/v)を37°Cで30分間インキュベートし、リポソーム内から漏出した蛍光色素(カルボキシフルオレセイン)の蛍光強度を測定した。各値は平均値±SD (n=3 or 4)で表した。各シンボルは、■; 非処理, □; 10mM EDTA処理, ▨; 10mM EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血清を表す。

ソーム(22%, 33%Chol含有)の崩壊はほぼ完全に抑制された(図3-1)。したがって、高コレステロール含有リポソーム(44% Chol含有)の崩壊は、第二経路を介した活性化の結果であり、低コレステロール含量のリポソーム(22%, 33% Chol含有)の崩壊は、古典経路を介した活性化の結果であることが明らかとなった。

以前、Chonnら[3]はリポソーム表面の表面電荷の違いが補体系の活性化経路を変化させる要因であること、すなわち負電荷リポソームでは古典経路を、正電荷リポソームでは第二経路を介して補体を消費することを示している。今回用いたリポソームは生理的条件下で負に帯電するジセチルリン酸(DCP)を約11mol%含有しており、net chargeは負である。にもかかわらず、コレステロール(ホスファチジルコリン)含量の違いにより補体活性化経路が変化したという我々の結果(図3-1)は、Chonnらが示した表面電荷だけではなく、コレステロールあるいはそれに付随したホスファチジルコリン含有量の違いもまた補体活性化経路を変化させる要因であることを強く示唆するものである。

さらに、低コレステロール含量のリポソーム(22%, 33% Chol含有)が古典経路を、高コレステロール含量(44%Chol含有)のリポソームが第二経路を活性化したという結果は、コレステロール含量あるいはそれに付随して変化するホスファチジルコリン含量に、補体



系の活性化を古典経路から第二経路へ、あるいは第二経路から古典経路へシフトさせる閾値が存在する可能性を示唆している。以前、コレステロールを40%含有したリポソーム(HEPC:Chol:DCP=5:4:1)のラット血清中での崩壊は第二経路を介したものであることが報告されている[4,5]。また、Szebeniら[6]は最近、コレステロールを45%含むヘモグロビン含有リポソームがラット補体第二経路を活性化することを報告した。さらに以前Cunninghamら[7]は、コレステロールを43%含んだリポソームによるヒト補体系の活性化はやはり第二経路を介したものであり、この活性化の増強には至適なコレステロール量(20%以下では第二経路を介したC3のC3bへの転換が十分に起こらない)ことを報告している。これらの結果はリポソームによる第二経路の活性化にはリポソーム組成中のコレステロール含量が重要であり、少なくとも40%以上のコレステロール含量が必要である可能性を示唆していると思われる。

一方、今回用いたリポソームにおいて、コレステロール含量の減少はホスファチジルコリンの増加を意味する。図3-1に示した結果から、古典経路を介したリポソームの崩壊はホスファチジルコリン含量が重要であり、ホスファチジルコリンが55%以上存在する時進行すると解釈することもできる。

## 第二節 補体活性化起動因子の寄与

### 補体依存的な非修飾リポソームの崩壊への吸着処理の影響

先にも述べたように、古典経路の活性化は抗体(IgG, IgM)などの補体活性化因子の異物表面への特異的な結合に端を発することが知られる。したがって、22%, 33%コレステロール含有リポソームにおいて観察された古典経路を介した崩壊は、何らかの補体活性化因子の寄与の結果である可能性が考えられる。一方、第二経路の活性化は、液相で自然にC3bへと自己開裂したC3分子の異物表面への非特異的な結合に端を発する抗体非依存的なものであるといわれており、特別な活性化因子の存在は一般には知られていない。しかしながら、以前から第二経路の活性化に寄与する血液成分が存在する可能性が報告されてもいる[4,8]。したがって、古典経路、第二経路にかかわらず、コレステロール含量の異なる三種の非修飾リポソームに特異的に結合し、補体系の活性化を誘導する何らかの血液成分が存在している可能性が十分考えられる。

図3-2 Aは補体系が起動しない温度(4°C)において血清とコレステロール含量の異なる三種のリポソームをそれぞれ十分接触させ(吸着過程)、遠心分離によりリポソームを完全に除去した血清(吸着因子除去血清)中におけるコレステロール含量の異なる各リポソームの崩壊を示したものである。22%コレステロール含有リポソームを用いて吸着処理した場合、同種リポソームの崩壊だけでなく33%コレステロール含有リポソームの崩壊も抑制された。しかしながら、興味深いことに、44%コレステロール含有リポソームの崩壊はほとんど抑制されなかった。さらに、33%コレステロール含有リポソームを用いて吸着処理

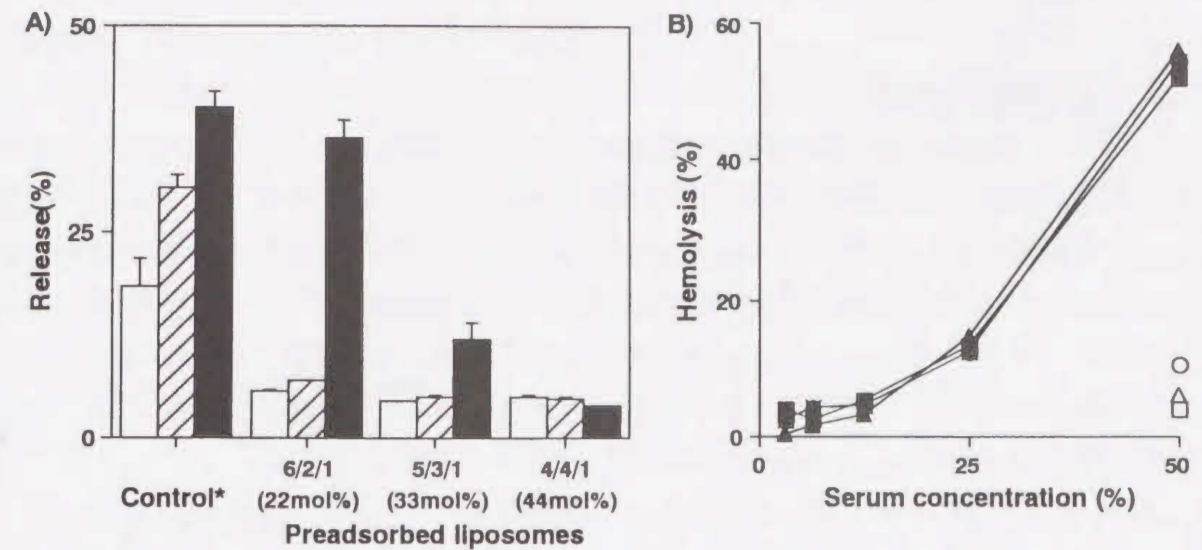


図3-2 非修飾リポソームによる補体活性化における血清因子の寄与

A) コレステロール含量の異なる3種の非修飾リポソームで血清を処理(0°C/30min)した後、リポソームを除去した血清中での蛍光色素封入非修飾リポソーム(HEPC/Chol/DCP=6/2/1; □=5/3/1; ▨=4/4/1; ■)からの蛍光色素の漏出を測定した。各値は平均値±SE (n=3)で表した。\*Controlは、非処理血清中での各リポソームからの蛍光色素の漏出を測定した結果を示した。

B) 非処理およびA)と同様に非修飾リポソームを用いて処理(0°C/30min)した血清中でのウサギ赤血球の溶血反応を測定した。各シンボルは、\* ; 非処理血清, ● ; リポソーム(6/2/1)処理, ▲ ; リポソーム(5/3/1)処理, ■ ; リポソーム(4/4/1)処理, ○ ; リポソーム(6/2/1)処理+10mM EDTA, △ ; リポソーム(5/3/1)処理+10mM EDTA, □ ; リポソーム(4/4/1)処理+10mM EDTA。

した場合、22%, 33%コレステロール含有リポソームの崩壊はほぼ完全に抑制されるとともに、44%コレステロール含有リポソームの崩壊もまた約50%の抑制を受けることが明らかとなった。さらに、44%コレステロール含有リポソームを用いて吸着処理したところ、全てのリポソームの崩壊がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。

一方、それぞれの吸着因子除去血清中でのウサギ赤血球に対する溶血活性は非処理血清と同様に十分に保持されており(図3-2 B)、図3-2 Aにおいて観察された吸着処理によるリポソームの崩壊の抑制は、吸着過程での補体成分の消費あるいは除去によるものではなく、何らかの補体活性化因子の特異的な除去によるものであると考えられる。

以上の結果は、22%, 33%コレステロール含有リポソームによる古典経路の活性化にだけでなく、44%コレステロール含有リポソームによる第二経路の活性化に寄与する何らかの活性化因子が確かに存在することを示唆していると考えられる。さらに、22%, 33%コレステロール含有リポソームによる補体活性化に寄与する血液成分は同一のものであり、本検討で用いた全てのリポソームに親和性を有する可能性が示された。一方、44%コレステロール含有リポソームの第二経路を介した崩壊は、吸着処理に用いたリポソーム中のコレステロール含量に依存して抑制されたことから(図3-2 A)、44%コレステロール含



有リポソームの崩壊に寄与する血液成分は膜中のコレステロールに親和性を有する可能性が非常に高い。

#### 自然抗体寄与の可能性の検討

近年、リポソームによる補体活性化に自然抗体由来IgGあるいはIgMが寄与する可能性があることが報告されている[9-13]。多くの動物種で血中に抗コレステロール自然抗体あるいは抗リン脂質自然抗体が含まれることが報告されており[13,14]、22%、33%コレステロール含有リポソームによる古典経路を介した補体活性化にこれらの自然抗体が寄与する可能性が十分考えられる。さらに、自然抗体由来IgG[15-20]およびIgM[9,10]依存的な第二経路の活性化も報告されており、44%コレステロール含有リポソームによる第二経路の活性化にもまた自然抗体由来IgG、IgMが寄与する可能性が十分考えられる。そこで、抗ラットIgGおよび抗ラットIgM抗体を用いて処理した血清中でのリポソームの崩壊、および各リポソームに親和性を有する自然抗体の有無について検討した。

表3-2に示すように、22%コレステロール含有リポソームの崩壊は抗ラットIgG抗体処理により約50%抑制された。これに対して、抗ラットIgM抗体処理ではほとんど影響を受けなかった。一方、興味深いことに、44%コレステロール含有リポソームの崩壊は、抗IgG抗体、抗IgM抗体、それぞれの処理によってほぼ完全に抑制された。これらの結果は、低コレステロール含有リポソームによる補体活性化には自然抗体由来IgGおよびそれ以外の何らかの補体活性化因子が、一方高コレステロール含有リポソームによる補体活性化には自然抗体由来IgGおよびIgMが寄与する可能性を示唆するものである。

表3-2 非修飾リポソームの補体依存的な崩壊への自然抗体の関与

Treatment	Lipid composition (Chol content)			
	6/2/1 (22mol%)		4/4/1 (44mol%)	
	Release (%)	Inhibition (%)	Release (%)	Inhibition (%)
None	45.5	—	62.0	—
Anti Rat IgM Ab	42.9	5.6	7.8	87.4
Anti Rat IgG Ab	25.7	44.9	14.9	75.9

非処理あるいは処理血清(80%v/v)を非修飾リポソームと37°Cで30分間インキュベートを行い、リポソーム内から漏出した蛍光色素の蛍光強度を測定した。阻害率(inhibition(%))は、補体系を失活させるEDTA処理血清中での漏出を100%として換算した。

図3-3は各非修飾リポソームに対して親和性を有する自然抗体由来IgG量および同種リポソームを用いて吸着処理した後のIgG量を、一方図3-4は自然抗体由来IgM量および吸着処理後のIgM量を検討した結果である。

リポソームに結合したIgG量は、コレステロール含量の増加に依存して増加した(図3-3)。この結果は、ラット血清中にリポソームに対する自然抗体(IgG)が存在することを示唆するとともに、コレステロールに高い親和性を持つ自然抗体(IgG)が多量に存在していることを示唆するものである。さらに、吸着処理後の自然抗体(IgG)量は、22%コレステロール含有リポソームを用いて吸着処理した場合には顕著な減少は観察されなかったが、

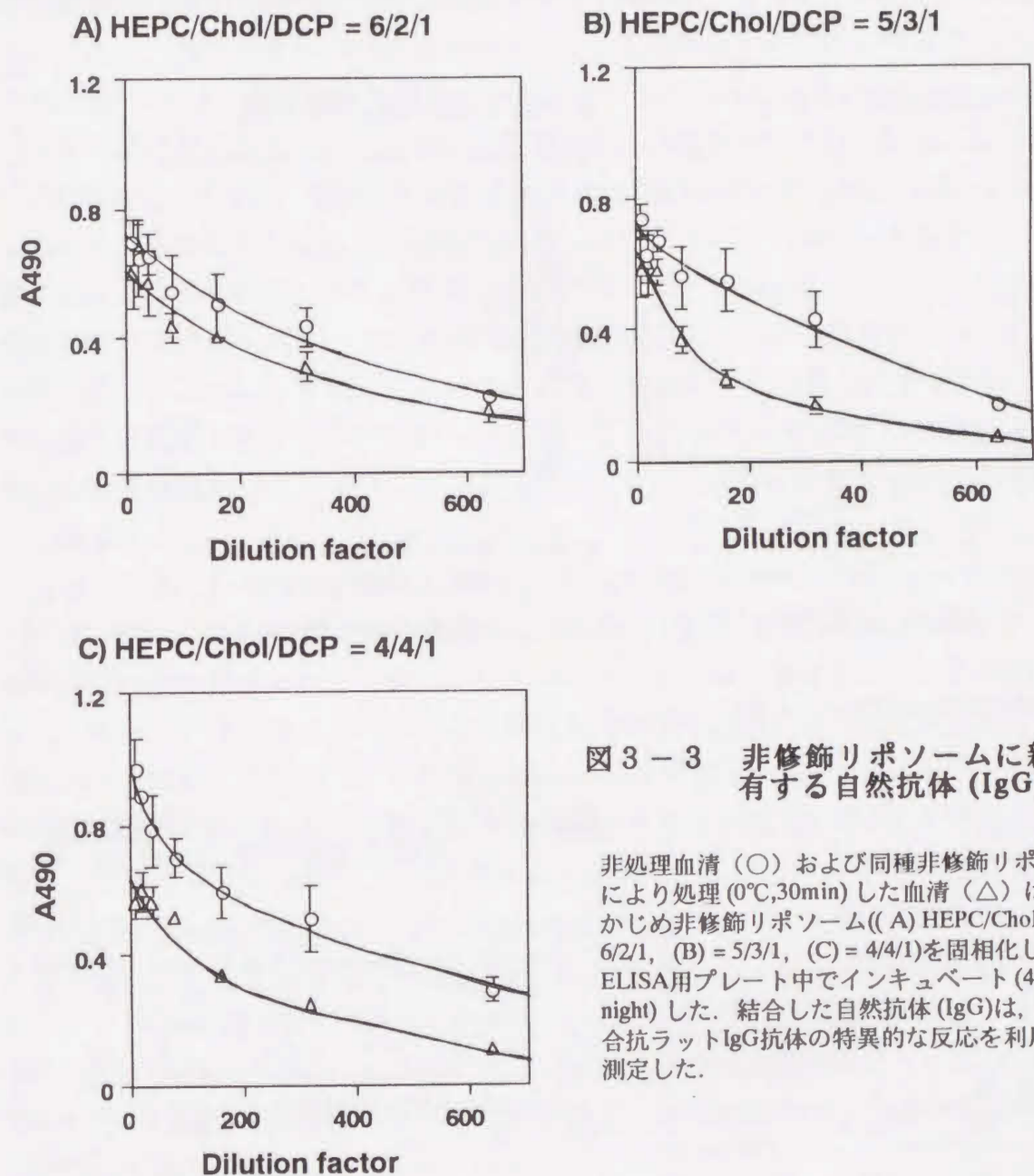


図3-3 非修飾リポソームに親和性を有する自然抗体(IgG)の存在

非処理血清(○)および同種非修飾リポソームにより処理(0°C,30min)した血清(△)は、あらかじめ非修飾リポソーム((A) HEPC/Chol/DCP = 6/2/1, (B) = 5/3/1, (C) = 4/4/1)を固相化したELISA用プレート中でインキュベート(4°C, overnight)した。結合した自然抗体(IgG)は、HRP結合抗ラットIgG抗体の特異的な反応を利用して測定した。



33%, 44%コレステロール含有リポソームを用いて吸着処理した場合, それぞれのリポソームに結合するIgG量を減少させた. この結果は, 先に示した22%コレステロール含有リポソームの補体依存的な崩壊に自然抗体(IgG)以外の血液成分が寄与している可能性を支持するとともに, 高コレステロール含有リポソーム(33%, 44%)の補体依存的な崩壊への自然抗体(IgG)の寄与の可能性を支持するものである.

一方, 各リポソームに結合するIgM量もまたリポソーム中のコレステロール含量の増加に伴って増加した(図3-4). この結果もまた, ラット血清中にリポソームに親和性を有する自然抗体(IgM)が存在することを示している. さらに, 吸着処理後のIgM結合量は22%コレステロール含有リポソームを用いて吸着処理した場合には顕著な減少は観察され

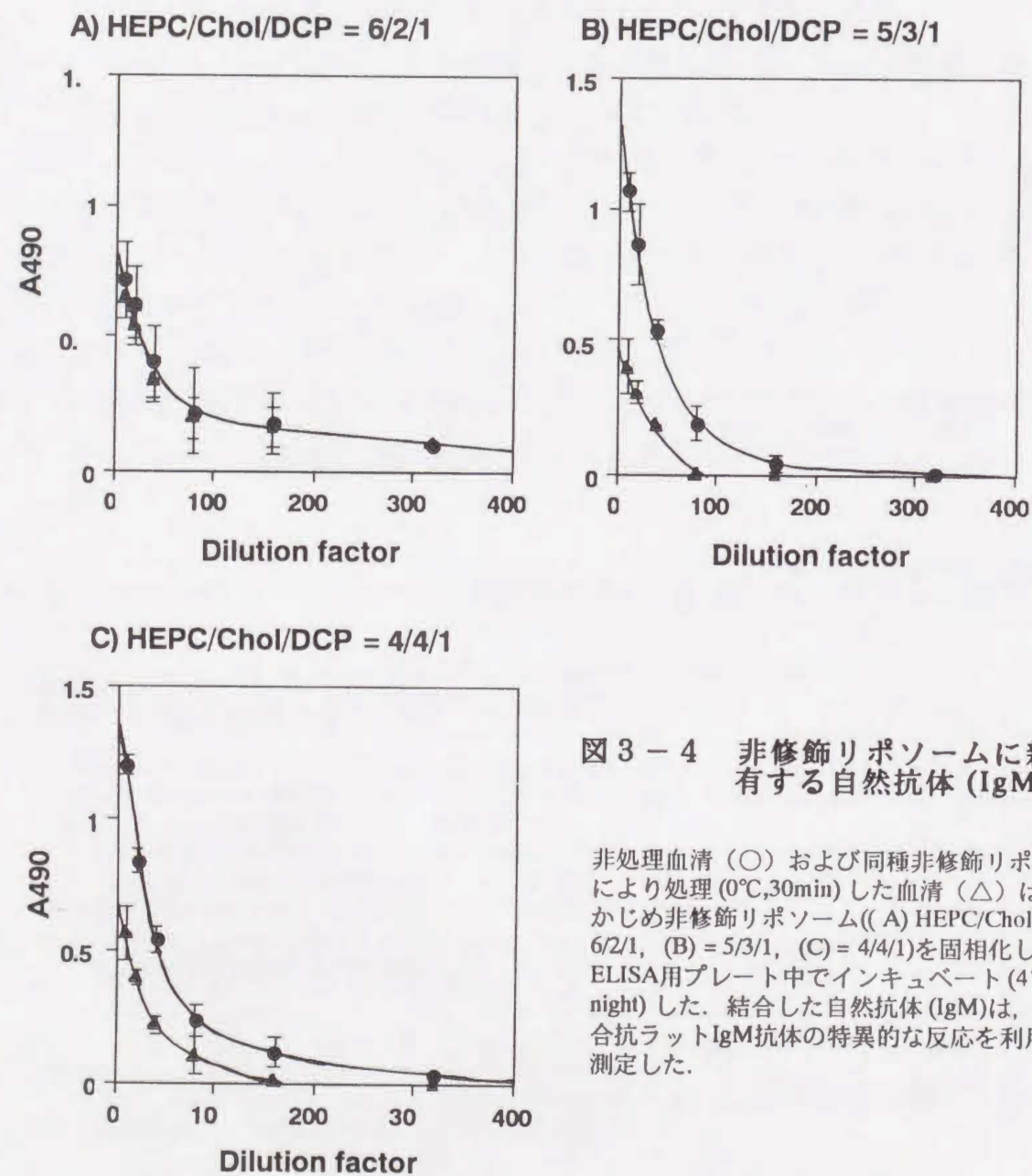


図3-4 非修飾リポソームに親和性を有する自然抗体(IgM)の存在

非処理血清(○)および同種非修飾リポソームにより処理(0°C, 30min)した血清(△)は, あらかじめ非修飾リポソーム(A) HEPC/Chol/DCP = 6/2/1, (B) = 5/3/1, (C) = 4/4/1を固相化したELISA用プレート中でインキュベート(4°C, overnight)した. 結合した自然抗体(IgM)は, HRP結合抗ラットIgM抗体の特異的な反応を利用して測定した.

なかったが, 33%, 44%コレステロール含有リポソームを用いて吸着処理した場合, それぞれのリポソームに結合するIgM量は減少した(図3-4). この結果は, 先に示した高コレステロール含有リポソーム(33%, 44%)の補体依存的な崩壊への自然抗体(IgM)の寄与の可能性を強く支持するものである.

一般に, IgMによる補体活性化はIgGに比べて10倍以上強いことが知られている[43]. にもかかわらず, 22%, 33%コレステロール含有リポソーム(66%, 55%ホスファチジルコリン含有リポソーム)の補体依存的な崩壊にIgMではなくIgGが寄与する可能性が示されたのは, 図3-4に示したように, これらのリポソームに親和性を有するIgM抗体が低濃度あるいは低い力価しか持たないからであると考えられる. IgM分子は分子量約800kDaの巨大分子であり, 異物表面への1分子の結合により古典経路を介した補体活性化を起動する. 一方, IgGによる古典経路の活性化には異物表面への少なくとも2分子のIgGの結合とFc領域の提示が必要であり, しかも両Fc間の距離には至適値が存在し, 少なくとも40nm以下でなければならない[21]. IgMと比較して補体活性化能が低いにも関わらず, IgGクラスの抗体の寄与が観察されたのは, 抗体自身の持つ高い力価と, リポソーム膜中の高いリン脂質(ホスファチジルコリン)の密度によるホスフェート残基のクラスターの形成により, 最適な結合部位がリポソーム表面に形成されたからであると推察される. しかしながら, 同種リポソームによる吸着処理により, このリポソームに特異性を有するIgGクラスの顕著な減少は観察されておらず(図3-3), しかも抗ラットIgG抗体処理により崩壊が完全に抑制されなかった(表3-2)ことから, IgG以外の補体活性化因子の存在を仮定しなければならない.

抗体(IgG, IgM)以外の補体活性化因子としてはマンノース結合タンパク(Mannose-binding protein: MBP)[22-24], C-reactive protein: CRP)[25]やSerum amuloid P component: SAP)[26]などの動物レクチンやコレクチン・ファミリーに属するタンパクが報告されている. これらの活性化因子の中でもCRPは生体組織の損傷に伴う炎症反応時に血中に分泌される急性期タンパクの一つであり, *Pneumococcus*由来のC-polysaccharideだけでなく, 細胞膜構成脂質であるホスファチジルコリンのホスホリル残基を特異的に認識し, 古典経路を介して補体系を活性化することが知られる[25]. リポソームを用いた検討において, Richardsら[27]は, ホスファチジルコリンを含有したリポソーム膜はCRPとヒト補体系の共存下において障害を受け内封物(glucose)を放出すること, またOhsawa[28]はホスファチジルコリン/コレステロール/ジセチルリン酸からなるリポソームにおいて, その組成比が1.6:0.4:0.1のとき最も高いCRP依存的なリポソームの崩壊が起きることを報告している. したがって, これらの報告はCRPがIgG以外のもう一つの補体活性化因子である可能性を強く示唆すると考えられる.

一方, 図3-2Aにおいて示された結果は, 第二経路を介したリポソームの崩壊を促進する何らかの血液成分が存在する可能性を示唆するだけでなく, この血液成分はリポソーム膜中のコレステロールに対して親和性を有する可能性があることを強く示唆している.



図3-2 A, Bに示された結果は, ラット正常血清中に44%コレステロール含有リポソームに対して親和性を持つ自然抗体由来IgGおよびIgMが存在し, このリポソームの第二経路を介した崩壊にこれらの自然抗体が寄与する可能性があることを示唆するものである. 多くの動物種の血液中にコレステロールに対する自然抗体が存在することは以前から報告[13]されている. したがって, 第二経路を介して補体系を活性化する血液成分がコレステロール含量依存的な結合を示した(図3-2 A)ことから, この血液成分がコレステロールに対する自然抗体である可能性は極めて高い.

以前から, 自然抗体による第二経路の活性化に関する報告は多く, 特にIgGに関して多くの報告がなされている[15-20]. IgGによる第二経路の活性化は, 異物表面に結合したIgGのFab領域がC3bに結合部位を提供し, さらにH因子とI因子によるiC3bへの転換(不活化)から結合したC3bを保護することにより, 結果的にC3転換酵素であるC3bBbの形成を促進するためであると考えられている[20]. 本検討から明らかとなったIgG依存的な44%コレステロール含有リポソームによる第二経路の活性化も同様の機構により促進されていると考えられる. 一方, IgMは最も一般的な古典経路の起動因子の一つである. 最近Kozelらのグループにより報告された結果[29]は, 本検討において見出されたリポソームの第二経路を介した補体活性化へのIgMの寄与を考える上で興味深い. 彼らは, *Candida albicans*による補体系の活性化は, 自然抗体由来抗マンナン抗体依存的古典経路と同抗体依存的第二経路の活性化が同時に起こることで進行することを明らかにした. 古典経路の活性化は, ある種の活性化因子の異物への特異的かつ選択的な結合により速やかにC3転換酵素であるC4bC2a複合体を形成させ, 多量のC3bを液相中へ放出する. 第二経路は, この古典経路の活性化の結果産生されたC3bを核として活性化する一種の増幅経路であるとの捉え方もされており[30], Kozelらの見出した結果はこのような機構にしたがっていると考えられる. したがって, 我々の検討の結果明らかとなった44%コレステロール含有リポソームによる補体活性化へのIgMの寄与は, 第二経路活性化のためのC3bの供給源として機能している可能性も考えられる. しかしながら, 図3-1において示されたように, EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理(Ca<sup>2+</sup>の涸渇)によって44%コレステロール含有リポソームの崩壊が影響を受けておらず, IgM依存的な古典経路の活性化がこのリポソームによる第二経路活性化のinitiatorとして機能するという可能性は否定される.

そこで, IgMの寄与に関して以下の3つの可能性を考えた. 1つめは, IgMのFab領域がIgGのFab領域と同様にC3bのacceptorとして機能するとともに, H因子とI因子による不活化からC3bを保護する. 2つめは, EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理により失活するC1qを消費しない古典経路を介するC3bの産生への寄与. 最後は, IgMによって誘導される古典経路と, 何らかの因子(本検討ではIgGによる可能性を示唆)により誘導される第二経路の両経路が何らかの機構によって相補的に補体系の活性化を進めているという可能性である.

表3-2において示されたIgG, IgMが別々に機能しているのではなくむしろ相補的に機能することを示す結果は, 三番目の可能性を強く支持すると考えられる. 以前, Okadaら

[9,10]は自然抗体由来IgMが第二経路を活性化することを報告した. その詳細な機構は明らかではないが, IgMが寄与するこれまで解明されていない新たな補体活性化機構が存在する可能性も現時点では否定できず, 今後, さらなる検討が必要であると思われる.

### 第三節 補体活性化経路の違いがおよぼすオプソニン化と膜破壊の違い

補体系の活性化は古典経路を介したものであれ, 第二経路を介したものであれ, 最終的に異物のオプソニン化と細胞膜破壊を生じる. しかしながら, 第二章において述べたように, 補体活性化によるオプソニン化と膜破壊の程度は, リポソームの物理化学的性質の違いにより異なる可能性がある. すなわち, オプソニン化されやすいリポソームが必ずしも崩壊しやすいわけではなく, またオプソニン化されにくいからといってそのリポソームが必ずしも崩壊しにくいわけではない. さらに, 本章におけるこれまでの検討から, リポソームの物理化学的性質の違い(コレステロール(ホスファチジルコリン)含量の違い)により, 活性化される補体系の経路が異なることが明らかとなった. この結果は, リポソームの物理化学的性質が補体系による認識機構を変化させ, その結果として補体系によるオプソニン化および膜破壊に影響を与える可能性を示唆すると考えられる. しかしながら, リポソームに関して, この点に関する検討はこれまで全くなされていない.

そこで, 本節では, オプソニン化の指標としてリポソーム表面へのC3フラグメントの結合を, そして膜破壊の指標として蛍光色素の漏出を経時的に測定し, 補体系の活性化経路の違いがおよぼすリポソームのオプソニン化と膜破壊への影響について検討した.

#### C3フラグメントの非修飾リポソームへの結合における経時変化

図3-5 Aに示すように, 22%コレステロール含有リポソームへのC3フラグメントの結合は反応開始後速やかに増加し, 約6分で最大に達した後一定となった. また, 33%コレステロール含有リポソームへのC3フラグメントの結合は, 22%リポソームへの結合と比較してゆるやかであったが, 同様に上昇し, 約8分で最大に達した後ほぼ一定となった. 一方, 44%コレステロール含有リポソームへのC3フラグメントの結合は約2分ほどのlagtimeの後, ゆっくりと増加し, 約20分かけて最大に達した. このように, それぞれのリポソームへのC3フラグメントの結合パターンは異なることが明らかとなった.

そこで, このようなパターンの違いが先に示された補体活性化機構の違いによるものであるかを明らかとするために, EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血清(古典経路を選択的に抑制)を用いて同様の検討を行った. その結果, 図3-5 Bに示すとおり, 非処理血清を用いた場合に観察された22%, 33%コレステロール含有リポソームにおける素早い結合パターンは消失し, lag timeのある緩やかな結合パターンへと変化した. 一方, 44%コレステロール含有リポソームへのC3フラグメント結合パターンはほとんど変化しないことが示された. これらの結果は, リポソームへのC3フラグメントの結合において, 補体系の活性化機構の違いが



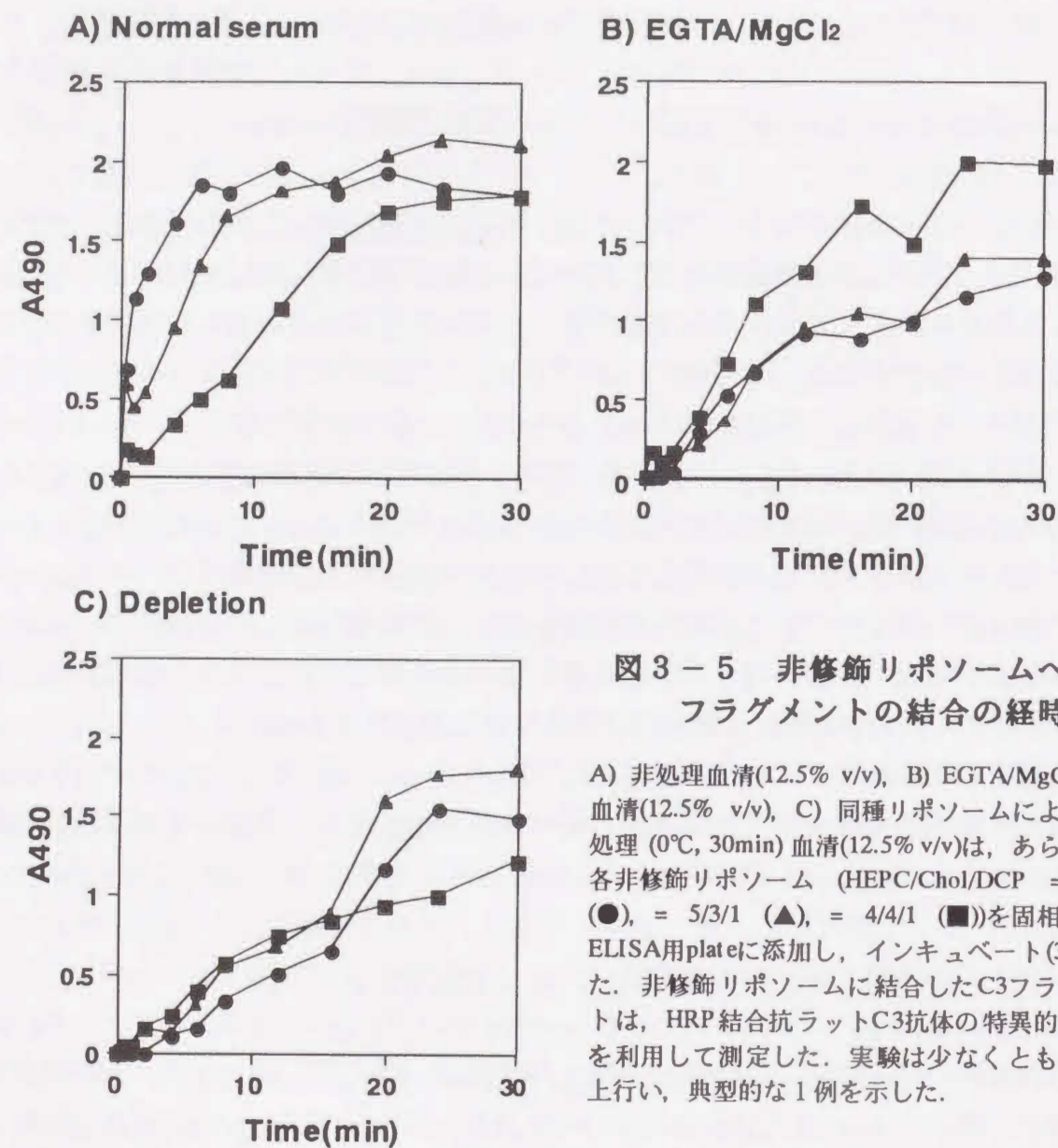


図3-5 非修飾リポソームへのC3フラグメントの結合の経時変化

A) 非処理血清(12.5% v/v), B) EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血清(12.5% v/v), C) 同種リポソームによる吸着処理(0°C, 30min)血清(12.5% v/v)は、あらかじめ各非修飾リポソーム (HEPC/Chol/DCP = 6/2/1 (●), = 5/3/1 (▲), = 4/4/1 (■))を固相化したELISA用plateに添加し、インキュベート(37°C)した。非修飾リポソームに結合したC3フラグメントは、HRP結合抗ラットC3抗体の特異的な結合を利用して測定した。実験は少なくとも3例以上行い、典型的な1例を示した。

その結合パターンを変化させる要因であることを示唆するものである。

さらに、先に明らかにした補体活性化因子のC3フラグメント結合への寄与について検討するために、吸着処理血清を用いて同様の検討を試みた。その結果、非処理血清を用いた際の結合パターンとは明らかに異なる結合パターンが観察された。また、この結合パターンは、EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血清を用いた場合(図3-5 B)とほぼ同様のパターン(図3-5 C)であったことから、このC3フラグメントの結合は第二経路のspontaneousな活性化に起因したものである可能性が考えられる。また、興味深いことに、C3フラグメントの結合量に若干の減少が観察された。これらの結果は、先に示した補体活性化因子が、補体系によるオプソニン化の速度と程度に極めて重要な役割を果たしていることを示していると思われる。

非修飾リポソームからの蛍光色素の放出(膜破壊)の経時変化

22%コレステロール含有リポソームからの蛍光色素の放出は、lag timeのない非常に速やかなものであった(図3-6 A)。ところが、33%コレステロール含有リポソームからの蛍光色素の放出は、22%コレステロール含有リポソームと同様に古典経路を介したものであるにも関わらず、約5分のlag timeのある放出であった(図3-6 B)。一方、44%コレステロール含有リポソームからの蛍光色素の放出は、33%コレステロール含有リポソームと同様に約5分ほどのlag timeの後に生じた。興味深いことに、この放出のlag timeはEGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血清を用いた場合、さらに大きくなった(図3-6 C)。この結果は、第二経

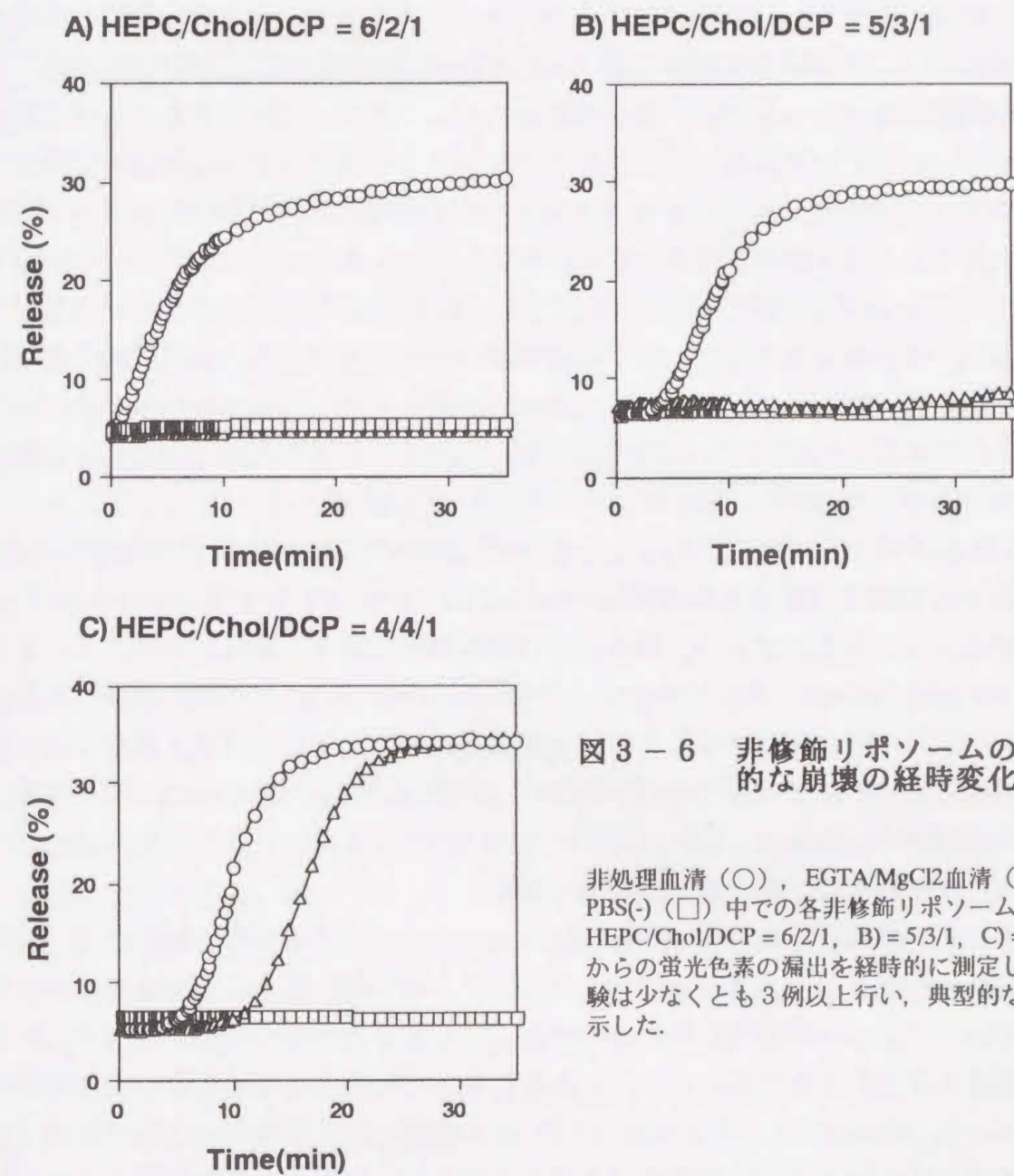


図3-6 非修飾リポソームの補体依存的な崩壊の経時変化

非処理血清(○), EGTA/MgCl<sub>2</sub>血清(△), PBS(-)(□)中の各非修飾リポソーム(A) HEPC/Chol/DCP = 6/2/1, B) = 5/3/1, C) = 4/4/1)からの蛍光色素の漏出を経時的に測定した。実験は少なくとも3例以上行い、典型的な1例を示した。



路を介したリポソームの崩壊はC3フラグメントの結合パターンと同様に、lag timeのあるパターンであることを強く示唆するとともに、第二経路の活性化に古典経路が何らかの促進作用を与えている可能性を示していると思われる。

以前、Zhangら[29]は、C3b分子の*Candida albicans*への結合は、古典経路を介した活性化の場合非常に速やかに増加し、第二経路を介した活性化の場合lag timeの後速やかに増加することを報告している。この報告は、リポソームが起動する補体系の活性化経路の違いによりオプソニン化の速度が異なる可能性を示唆しており、図3-5A及び図3-6Aにおいて示された、22%コレステロール含有リポソームによる古典経路を介した素早いC3フラグメントの結合と蛍光色素の漏出と一致する。古典経路を介した補体活性化がlag timeのないものであったのは、リポソーム表面にまんべんなく分布するエピトープ、すなわちホスフェート残基に抗リン脂質IgGが素早く結合して補体系を活性化し、大量のC3転換酵素(C4bC2a複合体)をリポソーム表面に一様に形成したからであると推察される。この可能性は、同種リポソームを用いて吸着処理した血清を用いてC3フラグメントの結合の経時変化を検討した結果、その結合パターンがEGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血清を用いた際の結合パターンに近づいたことから示唆される(図3-5A, C)。

一方、44%コレステロール含有リポソームにおいて観察されたC3フラグメントの結合と崩壊におけるlag timeのある経時変化は、以前Pangburnら[31]が報告した第二経路を介したC3b結合の経時変化、すなわち①lag phase, ②amplification phase, ③plateau phaseという三段階を経るという結果と一致している。それでは、このような経時変化はどのような機構に基づいて生じるのであろうか。我々は、以下のように推察している。

補体第二経路は液相中で非常にゆっくりと自己分解を続けるC3の異物表面へのspontaneousな結合に端を発する活性化機構であり、通常液相中で形成されたC3bあるいは異物表面に結合したC3bは、速やかにH因子とI因子の作用によりiC3bへと変換され、生理活性を失う[21](lag phase)。しかしながら、このような不活化作用を免れたC3bがC3転換酵素(C3bBb)を形成し、新たなC3bを産生することにより、H因子とI因子による不活化作用を免れるC3bが増加し、新たなC3b転換酵素(C3bBb)を異物表面に形成し、大量のC3bの結合を誘起する(amplification phase)。やがて、C3bの結合サイトが飽和すると、それ以上の結合は生じなくなり、結合量は一定となる(plateau phase)。

したがって、第二経路に特徴的なlag timeは、spontaneousあるいはC3転換酵素によるC3bの産生と、H因子とI因子による不活化作用とのバランスで決まっていると考えられ、古典経路によるC3フラグメントの結合にlag timeがみられなかったのはC3転換酵素(C4bC2a)を素早く形成し、多量のC3bを産生するからであると考えられる。蛍光顕微鏡による観察により、*C. albicans*へのC3フラグメントの結合は、古典経路を介した場合は菌表面全体で起こるのに対して、第二経路を介した場合、その結合は不均一に起こることが明らかにされており[29,32]、このような機構の違いに基づくC3フラグメントの結合様式の違いが

amplification phaseにおける素早い結合(古典経路)と緩やかな結合(第二経路)を生じさせる原因であると思われる。

また、上記検討から、C3フラグメントの結合と崩壊の経時変化が必ずしも一致しないことが明らかとなった。この傾向は第二経路を介した場合に顕著であり、C3フラグメントの結合はlag timeの後に緩やかに上昇したのに対して、崩壊は急激に上昇した。補体系が生体膜上に膜侵襲複合体を形成して膜破壊を誘起するためには、その連鎖的活性化機構から考えてC3フラグメントの膜表面への結合過程は必須である。しかしながら、C3フラグメントの結合パターンと崩壊パターンが必ずしも平行に進行しなかったという結果は、補体系によるMAC形成はC3フラグメント結合量に必ずしも依存しないことを意味していると思われる。

また、22%、33%コレステロール含有リポソームにおいて、EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理により補体系による膜破壊は顕著に抑制された(図3-6A, B)のに対して、C3フラグメントの結合は抑制されない(図3-5B)ことが明らかとなった。この結果もまた、C3フラグメントの結合が必ずしも膜破壊を生じさせるわけではないことを強く示唆していると思われる。C3フラグメントの結合が確認されたにもかかわらず膜破壊が起らなかったのは、spontaneousな第二経路の活性化によるC3bのゆるやかな産生により、リポソーム表面に結合したC3bのほとんどが速やかにH因子とI因子によって不活化され、十分なC3転換酵素(C3bBb)あるいはC5転換酵素(C3bBbC3b)を形成することができなかったからであると考えられる。

吸着処理によるC3フラグメント結合パターンの変化は、リポソームを異物として認識し、シグナルを送る何らかの血液成分が存在することを強く示唆するものである(図3-5)。古典経路の活性化に寄与する成分の吸着除去は、C3フラグメント結合の速度も程度も減少させ、その結合パターンはEGTA/MgCl<sub>2</sub>処理した血清を用いた際のそれとほぼ同様となった。この現象は、古典経路を活性化する起動因子の除去により、古典経路由来C3転換酵素であるC4bC2aが22%、33%コレステロール含有リポソーム上で形成されなかったことによると考えられ、古典経路の活性化因子は、リポソーム表面で素早くかつ多量にC3転換酵素(C4bC2a)を形成することにより、多量のC3b分子を産生し、MAC形成につながる補体系の活性化を促進していると考えられる。さらに、第二経路の活性化に寄与する血液成分の吸着除去もまた、C3フラグメント結合パターンを変化させることが示された。この結果は、第二経路の活性化に寄与する血液成分が存在することを改めて強く示唆するとともに、吸着処理によってC3フラグメントの結合量が減少したことから、この血液成分は補体系の活性化を起動するのではなく、むしろ第二経路本来のspontaneousなゆっくりとした活性化を安定化するために機能していると考えられる。先にこの血液成分の候補として、自然抗体(IgG, IgM)の可能性が示唆されている(表3-1)。そこで、その安定化機構を以下のように類推した。リポソーム表面に結合した自然抗体(IgGあるいはIgM)は、第二経路のspontaneousな活性化によって産生されたC3b分子の強力なacceptorとして働き、H因



子とI因子の攻撃から結合したC3bを保護することにより、C3転換酵素(C3bBb)の形成を補助する。形成されたC3転換酵素は新たなC3bを産生し、新たなC3転換酵素(C3bBb)の形成とC5転換酵素(C3bBbC3b)の形成を促進することにより、MAC形成につながる補体活性化が生じたと考えられる。

この一方で、図3-6Cに示された、EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理により44%コレステロール含有リポソームの崩壊に至るlag timeが増加したという結果は、第二経路の活性化への古典経路の寄与を強く示唆しており、非常に興味深い。補体系に関しては古くから研究がつくされてきたが、古典経路と第二経路の関係については不明な点が多く残されている。以前から、それぞれの経路は独立して機能する、あるいは第二経路は古典経路の増幅経路にすぎない[30]という可能性が示されているが、未だ確定的ではない。我々が見出した「第二経路が主経路である補体活性化に古典経路が寄与する」という結果に類似した報告は示されておらず、分子レベルで本現象を解明していくことは、古典経路と第二経路の関係において新たな知見を提供する発見につながる可能性が考えられ、非常に興味深い。

本節における検討から、以下に示す結論をえた。

- ・古典経路を介した補体系の活性化は、第二経路を介したそれよりも速やかにリポソームのオプソニン化および膜破壊を行う。すなわち、補体系の活性化経路が異なることにより、リポソームのオプソニン化と膜破壊の速度が異なる。
- ・第二経路を介したC3フラグメントの結合は、lag timeの後、緩やかに進行する。一方、膜破壊は同様のlag timeの後増加する。しかし、この速度はC3フラグメントの結合よりも速やかである。
- ・古典経路を介すにせよ、第二経路を介すにせよ、補体系によるリポソームのオプソニン化の程度と膜破壊の程度は必ずしもパラレルに進行しない。
- ・古典経路と第二経路はそれぞれ独立して機能しているのではなく、両者が相補的に機能する結果としてオプソニン化と膜破壊が誘導される。

#### 第四節 小括

本章における検討から、リポソーム中のコレステロール含量、あるいはこれに付随して変化するホスファチジルコリン含量の違いにより活性化される補体系の経路が異なること、そして、それぞれの経路を介した補体活性化には自然抗体由来のIgGあるいはIgMが寄与している可能性が示された。さらに、大変興味深いことに、その活性化経路の違いが補体系によるリポソームのオプソニン化と膜破壊の速度に影響をおよぼすことが明らかとなった。

Chonnら[3]は、以前、リポソームによる補体活性化における普遍的な法則として、リポソーム表面の電荷の違いがその経路を変化させる要因であることを示した。事実、これまでの多くの研究において、電荷を含まないリポソームは補体系を活性化しない[3,33,34]ことが報告されており、リポソームによる補体活性化を考えると、リポソームの表面電荷は非常に重要な要因である。しかしながら、電荷以外の物理化学的諸性質の違いにより補体系の相互作用が異なる[2-4,33-36]ことも以前から報告されており、著者らが今回示した「コレステロール(ホスファチジルコリン)含量の違いもまたリポソームによる補体活性化経路を変化させる要因である」という結果は、未だ統一的な見解が示されないリポソームと補体系との相互作用に関する研究に新たな知見を提示するものであると考える。

さらに、古典経路を介したオプソニン化と膜破壊が非常に速やかであったのに対して、第二経路を介したそれが数分間のlag timeを要したという結果は、補体系の活性化経路の違いが生体内投与後のリポソームの動態を変化させる可能性を示している。しかしながら、数分のlag timeがその動態にどれだけの影響を与えるか、疑問も残る。この問題に対して、以前Gelfandら[37]と、HanとCutler[38]が細菌(*C. albicans*)を用いて行った検討は、一つの可能性を示唆している。Gelfandらは、C4欠損モルモット(古典経路欠損)を用いて*C. albicans*の体内動態と分布を検討し、何ら正常モルモットと変わらないことを報告した。この結果は、古典経路あるいは第二経路のいずれにも異物排除能力に優位がないことを示すと考えられる。しかしながら、この検討で*C. albicans*に対する特異抗体の存在を確認しておらず、正常モルモットにおいても古典経路の寄与はない可能性が考えられ、不十分なものである。一方、HanとCutlerの報告した、抗マンナンモノクローナル抗体(IgM)は*C. albicans*の感染を防ぐが、他のIgM抗体を用いた場合には全く感染を防げなかったという結果は、古典経路の活性化が第二経路の活性化よりも重要であるという可能性を示唆するものであり、古典経路を介した素早いオプソニン化が生理的に非常に重要な意味を持つことを示した。しかしながら、これらの検討は、増殖性のある細菌を用いてのものであり、増殖する以前に、すなわち侵入時点での排除が最も重要であると思われる感染症の防御に際しては、素早いオプソニン化を進める古典経路が重要であるのはむしろ当然であるように思われる。リポソームの動態に、古典経路を介した素早いオプソニン化がどれだけの役割を果たすか、現時点では全く明らかではなく、今後の検討課題であると思われる。



## 第五節 実験の部

### 試薬

水素添加卵黄ホスファチジルコリン(HEPC)は日本精化(大阪)から供与されたものを用いた。コレステロール(Chol)は和光純薬工業(大阪), リン酸ジセチル(DCP)はナカライテスク(京都)から購入した。リポソームの水相マーカーとして用いた5(6)-カルボキシフルオレセイン(CF)はEastman Kodak(NY, USA)より購入した。プロテイン-A-セファロースはファルマシア(Upsala, Sweden)から購入した。抗ラットIgG, 抗ラットIgM抗体, HRP結合抗ヒツジIgG抗体, HRP結合抗ウサギIgG抗体, HRP結合抗ラットC3抗体はCappel(CA, USA)からそれぞれ購入した。その他の試薬は試薬特級品を用いた。

### リポソームの調製

CF封入リポソームおよび空リポソームは第二章第五節に示したと同様の方法で調製した。実験に用いたリポソームの脂質組成は表3-2に示し, 脂質濃度: 20 $\mu$ mol/ml, 平均粒子径: 800nmのリポソームをそれぞれ調製した。粒子径は動的光散乱(NICOMP 370 HPL submicron particle analyzer (Particle sizing system, CA, USA))により測定した。未封入のCFはセルロースチューブ(Seamless Cellulose Tubing, Small Size 18, 和光純薬工業(大阪))を用いたPBS(-)に対する平衡透析により除去した。

### 血清中におけるリポソームの安定性の評価

リポソームの安定性の評価は第二章第五節に示した方法にしたがって行った。

リポソームからの蛍光色素の経時的な放出は, 既報[50,51]の方法にしたがって測定した。すなわち, 非処理あるいは種々の処理を施したラット血清(2.7ml)を分光蛍光光度計(Hitachi 650, Hitachi, 東京)にセットした石英セル中であらかじめ37°C/5minインキュベートした。この後, 蛍光色素封入リポソームを添加し, 緩やかな攪拌下, 37°C/30minインキュベートした。リポソームからの遊離蛍光色素の蛍光強度は一定時間毎に記録した(Fs)。反応終了後, 5%(v/v)-Triton Xを添加し, リポソーム中に含まれる総蛍光強度(Ft)を測定した。また, コントロールとしてPBS中でのリポソームからの蛍光色素の放出(Fs PBS), およびリポソーム中に含まれる総蛍光強度(Ft PBS)を測定した。各時間におけるリポソームからの蛍光色素の放出率(Release(%))は, 以下の式にしたがって計算した。

$$\text{Release (\%)} = \{ Fs \div Ft - Fs \text{ PBS} \div Ft \text{ PBS} \} \times 100$$

### 血清因子除去血清の調製

血清因子除去血清の作製は既報[4]にしたがって行った。すなわちPBS(-)封入リポソーム(空リポソーム; 脂質濃度20 $\mu$ mol/ml, 粒子径800nm)を血清に1対9の割合(体積比)でそれぞれ加え, 0°C/30minインキュベートした。遠心分離(5000rpm, 30min)後, 上層に浮上したリポソームをアスピレーターを用いて注意深く除去し, 血清因子除去血清を得た。

### ウサギ赤血球を用いた補体活性の測定

ウサギ赤血球は, クエン酸-リン酸緩衝液中に採取した後, PBS(+)で洗浄した。洗浄後, PBS(+)中に5 $\times 10^8$ 個/mlとなるように浮遊させた。ウサギ赤血球浮遊液(5 $\times 10^8$ 個/ml)0.1mlに蒸留水1.4mlを加えて溶血させた時の吸光度は, 波長542nmで0.666を示す。補体活性の測定はMayer法に準じて行った[52]。赤血球0.2ml(5 $\times 10^8$ 個/ml)を希釈血清(非処理あるいは処理済)0.8mlに加え, 37°C/60minインキュベートした。反応終了後, PBS(+)を2ml添加し, 遠心分離して未反応の赤血球を除去した。上清を採取し, 吸光度を波長542nmで測定し, 同数(1 $\times 10^8$ 個)の赤血球を蒸留水で完全に溶血させた際の波長542nmでの吸光度を100%として, 相対溶血度(Hemolysis(%))を求めた。

### 自然抗体(IgG, IgM)除去血清の調整

ラット血清に抗ラットIgG抗体(6.7mg/ml)あるいは抗ラットIgM抗体(9mg/ml)を9対1の割合(体積比)で加え, 4°Cで一晩インキュベーションした。インキュベーション終了後, 混合液にプロテイン-A-セファロースを1対9の割合(容積比)で加え, さらに4°Cで2時間インキュベートした。遠心分離(5000rpm, 30min)によりプロテイン-A-セファロースを除去し, IgGおよびIgM除去血清を得た。これらの血清中でのリポソームの崩壊を測定した。

### 抗リポソーム自然抗体(IgG, IgM)の測定

リポソームに対する自然抗体の測定は既報[6,51]の方法を一部改変して行った。すなわち, 50 $\mu$ lのリポソーム溶液(100nmol/ml)を96wells ELISA plateに分注し, 乾燥機中で一晩加温しコーティングした。次いで0.3%-ゼラチン含有PBS(-)を390 $\mu$ l/wellずつ分注し, 室温で4hr反応させ, 未反応のプレート表面をブロッキングした。血清をPBS(-)を用いて希釈し, 各wellに100 $\mu$ lずつ分注し, 4°Cで一晩反応させた。反応終了後, PBS(-)で3回洗浄した。その後, ウサギ抗ラットIgG抗体あるいはヒツジ抗ラットIgM抗体を0.1%-BSA含有PBS(-)で3000倍に希釈したものを100 $\mu$ l/wellずつ分注し, 室温で2時間反応させた。反応終了後, PBS(-)で3回洗浄した。この後, HRP結合抗ウサギIgG抗体あるいはHRP結合抗ヒツジIgG抗体を0.1%-BSA含有PBS(-)で5000倍に希釈したものを100 $\mu$ l/wellずつ分注し, 室温で2時間反応させた。反応終了後, PBS(-)で3回洗浄した。この後, o-phenylene diamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で発色させ, 3分後に反応を2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させた。波長490nmにおける吸光度を測定した。



#### リポソームへのC3フラグメントの結合の経時変化

50 $\mu$ lのリポソーム溶液(100nmol/ml)を96wells ELISA plateに分注し, 乾燥機中で一晩加温しコーティングした. 次いで0.3%-ゼラチン含有PBS(-)を390 $\mu$ l/wellずつ分注し, 室温で4hr反応させ, 未反応のプレート表面をブロッキングした. 次いで12.5%に希釈したラット血清を各wellに添加し, 37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした. 反応は各時間において100 $\mu$ lのEDTA溶液(20mM)の添加により停止させた. PBS(-)を用いて3回洗浄した. この後HRP結合抗ラットC3抗体を0.1%-BSA含有PBS(-)で3000倍に希釈したものを100 $\mu$ l/wellずつ分注し, 室温で2時間反応させた. 以後の操作は前項にしたがった.

#### 引用文献

- 1) Okada, N., Yasuda, T., Tsumita, T., and Okada, H. : Activation of the alternative complement pathway of guinea-pig by liposomes incorporated with trinitrophenylated phosphatidylethanolamine. *Immunol.*, **45**: 115-124 (1982)
- 2) Funato, K., Yoda, R. and Kiwada, H., Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**: 198-204 (1992)
- 3) Chonn, A., Cullis, P. R., and Devine, D. V., The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J. Immunol.*, **146**: 4234-4241 (1991)
- 4) Funato, K., Yamashita, C., Kamada, J., Tominaga, S. and Kiwada, H., Plasma factor triggering alternative complement pathway activation by liposomes. *Pharm. Res.*, **11**: 372-376 (1994)
- 5) Matsuo, H., Yamashita, C., Akiyama, K. and Kiwada, H. : Effect of cetylmannoside modification on the alternative complement pathway activation by liposomes in rat serum. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**: 581-585 (1995)
- 6) Szebeni, J., Wassef, N. M., Spielberg, H., Rudolph, A.S. and Alving, C.R., Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**: 255-263 (1994)
- 7) Cunningham, C.M., Kingzette, M., Richards, R.L., Alving, C.R., Lint, T.F. and Gewurz, H. : Activation of human complement by liposomes: a model for membrane activation of the alternative pathway. *J. Immunol.*, **122**: 1237-1242 (1979)
- 8) Alving, C.R., Richards, R.L. and Guirguis, A.A. : Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J. Immunol.*, **118**: 342-347 (1977)
- 9) Okada, H., Okada, N. and Yasuda, T. : Activation of the alternative complement pathway by IgM antibody reacted on paralogoside incorporated into liposome membrane. *Mol. Immunol.*, **20**: 499-500 (1983)
- 10) Okada, N., Yasuda, T., Tsumita, T. and Okada, H. : Activation of the alternative complement pathway by natural antibody to glycolipids in guinea-pig serum. *Immunol.*, **50**: 75-84 (1983)
- 11) Liu, D., Song, Y.K. and Liu, F. : Antibody dependent, complement mediated liver uptake of liposomes containing GM1. *Pharm. Res.*, **12**: 1775-1780 (1995)
- 12) Szebeni, J., Wassef, N.M., Rudolph, A.S. and Alving, C.R. : Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1285**: 127-130 (1996)
- 13) Alving, C.R. and Swartz, G.M. Jr. : Antibodies to cholesterol, cholesterol conjugates, and liposomes: implications for atherosclerosis and autoimmunity. *Crit. Rev. Immunol.*, **10**: 441-453 (1991)
- 14) Wassef, N.M., Swartz, G.M. Jr. and Alving, C.R. : Antibodies to liposomal phosphatidylcholine and phosphatidylsulfocholine. *Biochem. Cell Biol.*, **68**: 54-58 (1990)
- 15) Winkelstein, J.A., Shin, H.S. and Wood, W.B. Jr. : Heat labile opsonins to Pneumococcus. III. The participation of immunoglobulin and of the alternate pathway of C3 activation. *J. Immunol.*, **108**: 1681-1689 (1972)
- 16) Winkelstein, J.A. and Shin, H.S. : The role of immunoglobulin in the interaction of Pneumococci and the properdin pathway: evidence for its specificity and lack of requirement for the Fc portion of the molecule. *J. Immunol.*, **112**: 1635-1642 (1974)
- 17) Schenkein, H.A. and Ruddy, S. : The role of immunoglobulins in alternative complement



- pathway activation by zymosan. I. Human IgG with specificity for zymosan enhances alternative pathway activation by zymosan. *J. Immunol.*, **126**: 7-10 (1981)
- 18) Schenkein, H.A. and Ruddy, S. : The role of immunoglobulins in alternative complement pathway activation by zymosan. II. The effect of IgG on the kinetics of the alternative pathway. *J. Immunol.*, **126**: 11-15 (1981)
- 19) Moore, F.D.Jr., Austen, K.F. and Fearon, D.T. : Antibody restores human alternative complement pathway activation by mouse erythrocytes rendered functionally deficient by pretreatment with pronase. *J. Immunol.*, **128**: 1302-1306 (1982)
- 20) Fries, L.F., Gaither, T.A., Hammer, C.H. and Frank, M.M. : C3b covalently bound to IgG demonstrates a reduced rate of inactivation by factors H and I. *J. Exp. Med.*, **160**: 1640-1655 (1984)
- 21) Morgan, B.P. : Complement. Clinical aspects and relevance to disease. Academic press limited, London, UK.
- 22) Kawasaki, T., Etoh, R. and Yamashita, I. : Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *B.B.R.C.*, **81**: 1018-1024 (1978)
- 23) Ihara, I., Harada, Y., Ihara, S. and Kawakami, M. : A new complement-dependent bactericidal factor found in nonimmune mouse sera : specific binding to polysaccharide of Ra chemotype salmonella. *J. Immunol.*, **128**: 1256-1260 (1982)
- 24) Matsushita, M. and Fujita, T. : Activation of the classical complement pathway by mannosyl-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.*, **176**: 1497-1502 (1992)
- 25) Volanakis, J.E. : Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann. New York Acad. Sci.*, **235**: 235-250 (1982)
- 26) Baltz, M.L., Holford, S., de Beer, F.C., Whaley, K. and Pepys, M.B. : The interaction between human serum amyloid P component and fixed complement. *Ann. New York Acad. Sci.*, **429**: 429-430 (1982)
- 27) Richards, R.L., Gewurz, H., Osmond, A.P. and Alving, C.R. : Interactions of C-reactive protein and complement with liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5672-5676 (1977)
- 28) Ohashi, T. : Change in permeability of liposomal membranes mediated by C-reactive protein and its inhibition by cholesterol. *Japan. J. Exp. Med.*, **50**: 67-71 (1980)
- 29) Zhang, M.X., Lupan, D.M. and Kozel, T.R. : Mannan-specific immunoglobulin G antibodies in normal human serum mediate classical pathway initiation of C3 binding to *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **65**: 3822-3827 (1997)
- 30) Meri, S. and Pangburn, M.K. : A mechanism of activation of the alternative complement pathway by the classical pathway: protection of C3b from inactivation by covalent attachment to C4b. *Eur. J. Immunol.*, **20**: 2555-2561 (1990)
- 31) Pangburn, M.K., Schreiber, R.D. and Müller-Eberhard, H.J. : C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface. *J. Immunol.*, **131**: 1930-1935 (1983)
- 32) Kozel, T.R., Weinhold, L.C. and Lupan, D.M. : Distinct characteristics of initiation of the classical and alternative complement pathways by *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **64**: 3360-3368 (1996)
- 33) Devine, D.V., Wong, K., Serrano K., Chonn, A. and Cullis, P.R. : Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1191**: 43-51 (1994)
- 34) Marjan, J., Xie, Z. and Devine, D.V. : Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1192**: 35-44 (1994)
- 35) Richards, R.L., Habbersett, R.C., Scher, I., Janoff A.S., Schieren, H.P., Mayer, L.D., Cullis, P.R. and Alving, C.R. : Influence of vesicle size on complement-dependent immune damage to liposomes. *Biochem. Biophys. Acta*, **855**: 223-230 (1986)
- 36) Shin, M.L., Paznekas, W.A. and Mayer, M.M. : On the mechanism of membrane damage by complement: the effect of length and unsaturation of the acyl chains in liposomal bilayers and the effect of cholesterol concentration in sheep erythrocyte and liposomal membranes. *J. Immunol.*, **120**: 1996-2002 (1978)
- 37) Gelfand, J.A., Hurley, D.L., Fauci, A.S. and Frank M.M. : Role of complement in host defense against experimental disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.*, **138**: 9-16 (1978)
- 38) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.*, **63**: 2714-2719 (1995)
- 39) Harashima, H., Ochi, Y. and Kiwada, H. : Kinetic modeling of liposome degradation in serum: effect of size and concentration of liposomes in vitro. *Biopharm. Drug Dispos.*, **15**: 217-225 (1994)
- 40) Ferdous, A.J., Ishida, T., Shinohara, M., Harashima, H. and Kiwada, H. : Size-dependent release of carboxyfluorescein from cetylmannoside-modified liposomes in human plasma. *Biopharm. Drug Dispos.*, **17**: 145-154 (1996)
- 41) 永木和義 : ClassicalおよびAlternative Pathwayを介して測定した補体の溶血活性. 臨床免疫, **13**: 154-160 (1981)
- 42) Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., Kiwada, H. : Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size liposomes. *Pharm. Res.*, **11**: 402-406 (1994)
- 43) Borsos, T. and Rapp, H.J. : Complement fixation on cell surface by 19S and 7S antibodies. *Science*, **150**: 505, (1965)



#### 第四章 ヒト補体系との相互作用に関する検討

リポソームを薬物運搬体としてヒトに適用する際に考慮すべき点として、種差の問題があげられる。新規薬物を開発する際においても、種差は非常に大きな問題であることが知られ、特に肝における薬物代謝において種差の存在は重大な問題であり、動物実験からヒトでの代謝を予測するいわゆるアニマル・スケールアップの適用には限界がある[1]。リポソームに関しても、その体内動態において種差が存在することが報告されている[2-5]。

以前から補体系の活性化能やそのメカニズムにもまた、顕著な種差が存在することが示されている[6,7]。このような種差は、補体系が約20種、制御系の成分を含めれば30種を越える血液成分の連鎖的な酵素的反応の結果として機能することを考えればむしろ当然であろう。我々は第二章でのラットを用いた検討を通じ、リポソームの体内動態に補体系が重要な役割を果たすことを明らかにした。以前、Scieszkaら[8]はヒト多形核白血球(PMNs)によるリポソームの取り込みがヒト血清存在下でC3フラグメントの一つであるiC3bを認識する受容体を介して起こることを報告しており、さらにLiuら[4,5]は、in situ肝灌流法を用いた検討において、ヒト血清はリポソームの肝臓による取り込みを促進させる能力があり、その本体は補体系によるオプソニン化であることを報告している。これらの結果は、ヒトにおいても補体系がリポソームの体内動態を支配する要因として作用することを示唆すると考えられる。しかしながら、動物間で補体系とリポソームの相互作用が異なるなら、動物実験から得られた結果をそのままヒトに外挿することはできず、ヒト補体系とリポソームの相互作用を直接検討する必要がある。

そこで本章では、ヒト補体系とリポソームの相互作用に関して、リポソーム膜破壊の指標であるヒト血漿中でのリポソームの不安定化(崩壊)とオプソニン化の指標であるC3フラグメント量について検討した。さらに、リポソームによるヒト補体系の活性化機構について検討するとともに、種差の原因についても考察した。

##### 第一節 ヒト補体系とリポソームとの相互作用

第二章において、補体系がリポソームの動態を支配する要因の一つであり、リポソーム表面のC3フラグメント結合量が肝移行性を、血清中での補体依存的な崩壊が血液循環中での不安定性の指標となる可能性を示した。したがって、ヒト血漿中での補体依存的な崩壊およびリポソーム表面へのC3フラグメント結合量を評価することは、ヒトにおけるリポソームの動態を考える上で非常に有用な情報を与えると考えられる。そこで、粒子径の異なる糖修飾リポソームおよび非修飾リポソームをモデルリポソームとして用い、ヒト血漿中におけるリポソームの不安定化およびヒト血漿と接触後のリポソーム表面に結合したC3フラグメント量の測定を行った。

#### ヒト血漿中におけるリポソームの安定性

リポソームの崩壊は糖修飾リポソームにのみ観察され、その崩壊は熱処理(56°C/30min)によって顕著に抑制された(表4-1)。先にも述べたように、古典経路を介した活性化に寄与するC1q, および第二経路の活性化に寄与するB因子が熱感受性であることから、補体系は熱処理(56°C/30min)により失活する。したがって、糖修飾リポソームの崩壊は補体系の活性化の結果であることが示された。一方、非修飾リポソームの崩壊はほとんど観察されず、その崩壊は熱処理(56°C/30min)血漿中でのそれとほとんど同じであった(表4-1)。したがって、非修飾リポソームはヒト補体系と相互作用しない可能性が示唆された。

表4-1 ヒト血漿中でのリポソームの不安定性

Treatment	Man-MLV	HEPC-MLV
None	61.2 ± 2.3	6.2 ± 0.3
Heated (56°C / 30min)	5.6 ± 0.5	7.2 ± 0.5

脂質組成が Man/HEPC/Chol/DCP=3:2:4:1 (Man-MLV), HEPC/Chol/DCP = 5:4:1 (HEPC-MLV) となるリポソームを非処理あるいは処理ヒト血清(80%v/v)でインキュベート(37°C/30min)し、リポソーム内から漏出した蛍光色素(カルボキシフルオレセイン)の蛍光強度を測定した。各値は平均値 ± SE (n=3 or 4) で表した。

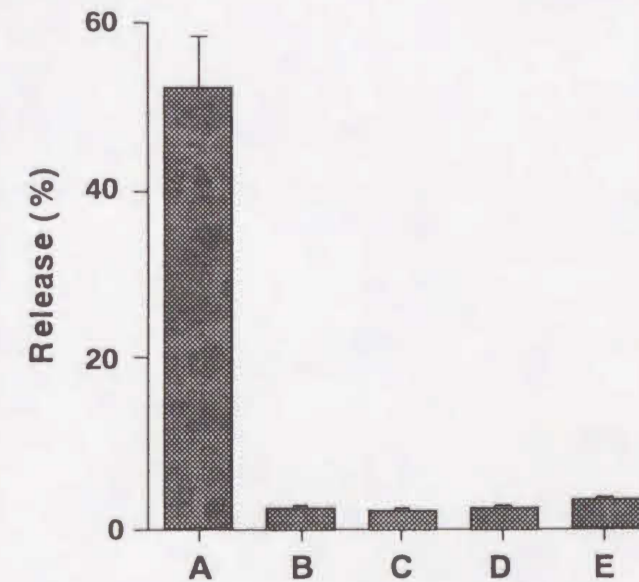


図4-1 糖修飾リポソームによる補体活性化経路の違い

糖修飾リポソームを非処理あるいは処理ヒト血清(80%v/v)中でインキュベート(37°C/30min)し、リポソーム内から漏出した蛍光色素(カルボキシフルオレセイン)の蛍光強度を測定した。各値は平均値 ± SE (n=3 or 4) で表した。各カラムは、A ; 非処理, B ; 熱処理 (56°C/30min), C ; 10mM EDTA処理, D ; 10mM EGTA/MgCl2処理, E ; 抗ヒトC1q抗血清処理血漿を表す。



ヒト補体系と相互作用する可能性が示された糖修飾リポソームに関して、補体系の活性化を阻害するEDTA, EGTA/MgCl<sub>2</sub>, 抗ヒトC1q抗血清処理ヒト血漿中での不安定化を検討した(図4-1)。糖修飾リポソームの崩壊は、熱処理(56°C/30min)だけでなく、EDTA, EGTA/MgCl<sub>2</sub>, 抗ヒトC1q抗血清, いずれの処理によっても、ほぼ完全に抑制され、粒子径の大きな(800nm)の糖修飾リポソームのヒト血漿中での崩壊は補体系の活性化の結果であることが確かめられた。古典経路の活性化にはCa<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>の両イオンが、一方、第二経路の活性化にはMg<sup>2+</sup>のみが必要である[9,11,12]とともに、C1qは古典経路の活性化に寄与する重要な補体成分の一つである[13]。したがって、ヒト血漿中での糖修飾リポソームの崩壊は、補体系の古典経路を介したものであることが明らかとなった。

#### 補体依存的な崩壊への粒子径の影響

ヒト血漿中での補体依存的な崩壊へのリポソームの粒子径の影響について検討した。その結果、ヒト血漿中での糖修飾リポソームの補体依存的な崩壊はその粒子径の増加に依存して増加し、リポソームの崩壊の程度と粒子径の間には非常に良好な相関関係( $r^2=0.953$ ,  $p<0.005$ )が存在した(図4-2)。この粒子径依存的な糖修飾リポソームの崩壊は、粒子径に依存した補体系の親和性の増加を示していると考えられる。また、小さな粒子径(SUV:50nm)の糖修飾リポソームの崩壊は、非修飾リポソーム(HEPC/Chol/DCP=5/4/1)のそれとほぼ同値であり、ヒト補体系の糖修飾リポソームへの親和性は、単に糖(セチルマンノシド)の付加だけでなく、粒子径の違いによっても影響を受ける可能性が示唆された。

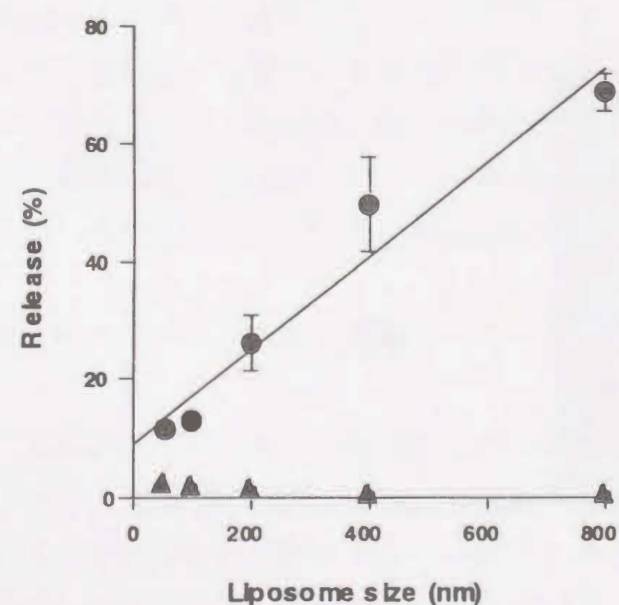


図4-2 ヒト血漿中でのリポソームの崩壊への粒子径の影響

粒子径の異なるリポソームをヒト血漿(90% v/v)中でインキュベート(37°C/30min)し、リポソーム内から漏出した蛍光色素(カルボキシフルオレセイン)の蛍光強度を測定した。各値は平均値±SE (n=3 or 4)で表した。各シンボルは、●;糖修飾リポソーム (Man/PC/Chol/DCP = 3/2/4/1), ▲;非修飾リポソーム(Man/PC/Chol/DCP = 0/5/4/1)。( $r^2=0.953$ ,  $p<0.005$ )

補体系による不安定化におけるリポソームの粒子径の影響に関しては、Harashimaら[14,15], Richardsら[16], LiuとHu[38]によっても同様の報告がなされている。この詳細な機構は明らかではないが、粒子径の減少に伴うリポソームの曲率の増加、さらにはそれに付随した膜のパッキング状態の変化が膜侵襲複合体(MAC)のリポソーム膜への侵入に影響を与えたためと考えられる。

#### C3フラグメント結合における粒子径の影響

C3フラグメント結合量の測定は、当研究室において調製した2種類の抗ヒトC3モノクローナル抗体(KOCO2801-KOCO2804)の組み合わせを用いたサンドイッチELISA法により定量的に行った[18]。また、Chonnら[19-22]により、リポソームの血中滞留性の指標となりうることが報告されている総結合タンパク量も同時に測定した。さらに、粒子径の異なるリポソームでは血漿成分と接触する総表面積は異なるため、PedgeonとHuntの既報[23]にしたがって各リポソームの総表面積を計算し、この値で各定量値を除し、単位表面積あたりの結合量(g of protein per unit surface area of liposomes)として結合C3フラグメント量および結合タンパク量を換算した。

C3フラグメントの結合は、ヒト血漿中での崩壊が観察された糖修飾リポソームにのみ観察された。そして、その結合量は粒子径の増加に依存して増加し(図4-3A), 両者の

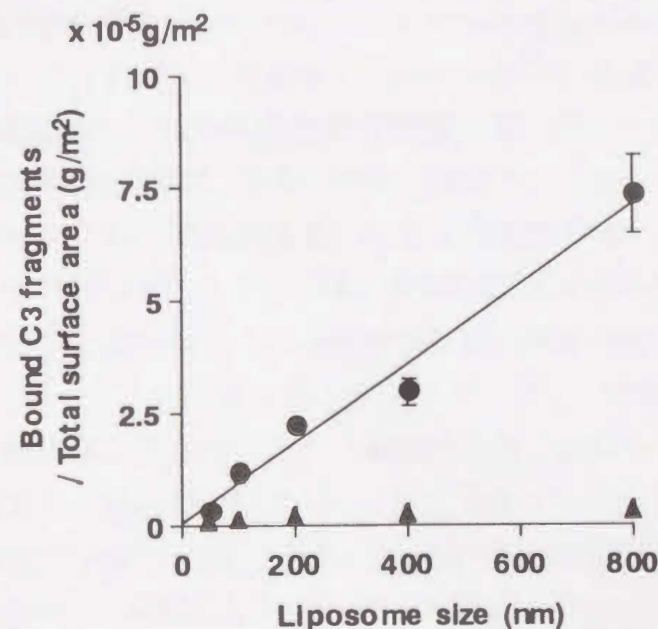


図4-3 C3フラグメント結合における粒子径の影響

粒子径の異なるリポソームをそれぞれヒト血漿(90%v/v)中でインキュベート(37°C/30min)し、その表面に結合したC3フラグメント量を測定した。定量値は実験に用いたリポソームの総表面積で除し、単位表面積あたりに換算した。各値は平均値±SE (n=3 or 4)で表した。各シンボルは、●;糖修飾リポソーム(Man/PC/Chol/DCP=3/2/4/1), ▲;非修飾リポソーム(Man/PC/Chol/DCP=0/5/4/1)を示す。



間には良好な相関関係( $r^2=0.981$ ,  $p<0.002$ )が見られた。この結果は、図4-2で観察された粒子径依存的な糖修飾リポソームの崩壊の増加とよく一致しており、ヒト補体系の糖修飾リポソームへの親和性はその粒子径に依存して増加することが定量的に示された。

図4-1で示したように、糖修飾リポソームはヒト補体系を古典経路を介して活性化する。古典経路の活性化は、一般に、①抗体などの活性化因子の結合、②C1, C2, C4の連鎖的な酵素的反応によるC3転換酵素(C4bC2a)の形成、③形成されたC3転換酵素により活性化されたC3フラグメント(C3b)の異物表面への結合と、C5転換酵素(C4bC2aC3b)の形成、④C5, C6, C7, C8, nC9によるMAC形成、という段階を経て内容物の放出を引き起こす[24-26]。したがって、C3フラグメント結合量が粒子径に依存して増加した原因は、③のリポソーム表面へのC3フラグメントの結合段階以前の補体活性化の初期段階にある可能性が示唆された。この糖修飾リポソームへの粒子径依存的なヒト補体系の認識機構の詳細に関しては次節以降で詳しく述べる。

一方、非修飾リポソームへのC3フラグメントの結合はその粒子径によらずほとんど観察されなかった(図4-3)。この結果は、非修飾リポソームがヒト補体系によってオプソニン化も膜破壊をも受けないことを示すとともに、非修飾リポソームがヒト補体系と相互作用しない原因は、少なくともC3フラグメントの結合以前の段階、すなわち補体系の活性化の初期段階(活性化因子のリポソームへの結合、あるいは古典/第二経路の活性化に関わる補体成分の結合)にある可能性を示唆する。

さらに、著者は第二章において、非修飾リポソームがラット補体系の作用により崩壊することを示しており、これら非修飾リポソームがヒト補体系と相互作用しなかったという結果は、ラット補体系とヒト補体系との間に顕著な種差が存在することを示唆している。ヒト補体系がなぜ非修飾リポソームと相互作用しないのかについては第五節で詳細に述べるが、このような種差の存在は、実験材料としてヒト血漿を用い、*in vivo*でのリポソームの安定性と血液成分との相互作用を定量的に評価しようとする我々の試みが妥当なものであり、リポソーム製剤の開発において有用な情報を与えることを示唆していると考えられる。

一方、タンパク結合量は、表面修飾、粒子径の違いによらずほぼ一定であった(図4-4)。以前、Chonnら[20]は結合タンパク量とリポソームの血中半減期との間に負の相関関係が存在することを報告した。換言すれば、血液タンパクと相互作用しやすいリポソームほど速やかに血液循環から排除されることを示している。このChonnらが報告した法則にしたがうなら、糖修飾リポソームと非修飾リポソームの血中滞留性はほぼ同じであると考えられる。しかしながら、ヒト血漿中で糖修飾リポソームは非常に不安定(表4-1)であり、また、以前Matsuoら[27]は、ラットを用いた検討において、顕著な補体系との相互作用により、糖修飾リポソームは非修飾リポソームよりもはるかに速く血液循環から排除されることを報告している。したがって、ヒト生体内において糖修飾リポソームが安定であるとは考えがたい。著者は、Chonnらの報告は、種々の血液タンパクと相互作用しや

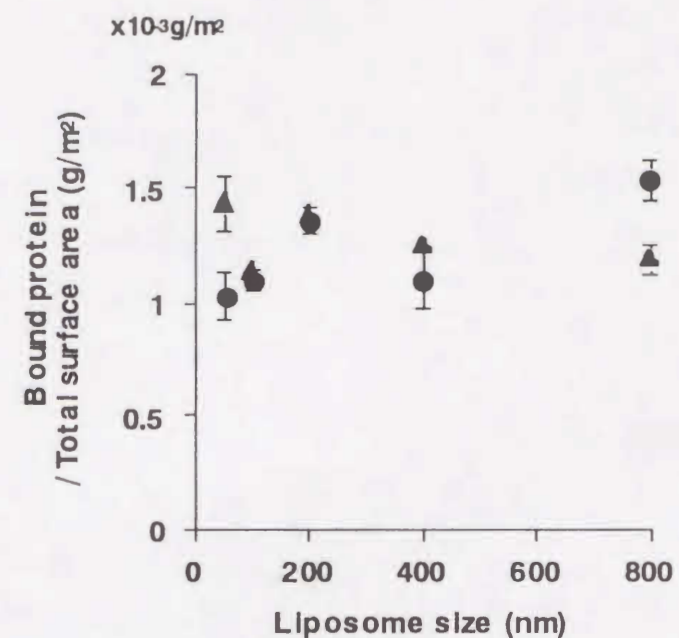


図4-4 タンパク結合における粒子径の影響

粒子径の異なるリポソームをそれぞれヒト血漿(90%v/v)中でインキュベート(37°C/30min)し、その表面に結合した血漿タンパク量を測定した。定量値は実験に用いたリポソームの総表面積で除し、単位表面積あたりに換算した。各値は平均値±SE (n=3 or 4)で表した。各シンボルは、●;糖修飾リポソーム(Man/PC/Chol/DCP=3/2/4/1), ▲;非修飾リポソーム(Man/PC/Chol/DCP=0/5/4/1)を示す。

すい(結合蛋白量の多い)リポソームはオプソニンなどとも相互作用しやすく、このため前述の規則性が見られたのであろうと類推している。事実、Chonnら[28]は、最近の報告において、リポソームの動態にβ2-glycoprotein I がオプソニンとして機能していることを示唆しており、特異的結合タンパクの重要性にも注目している。したがって、その体内動態が異なると予想されるリポソームの結合タンパク量が、その表面修飾、粒子径の違いによらずほぼ一定であったという結果は、オプソニンなどの特異的結合タンパクの重要性を改めて示唆すると考える。

#### ヒト補体系とリポソームとの相互作用に関する考察

リポソームの粒子径の違いはその動態に影響を与える要因の一つであることが知られている[32-37]。この原因として、血液成分や補体系との相互作用の違い[17,38]、あるいは肝クッパー細胞などの貪食細胞による取り込み機構の違い[4,5,14,15,39,40]などが指摘されているが、現時点では明確な解答は示されていない。

我々は第二章で、C3フラグメント結合量はリポソームの肝移行性の、血清中での安定性は血液循環中での安定性の指標にそれぞれなる可能性を示した。また、最近Liuら[4,5]は、ヒト血清にオプソニン活性が存在し、その本体は補体成分であることを報告している。ま



た, Scieszkaら[8]により, ヒトにおいてもまた貪食細胞による取り込みに異物表面に結合したC3フラグメントの一つであるiC3bが重要な役割を果たすことが報告されている. これらの結果は, ヒトにおいても補体系がリポソームの体内動態を支配する要因として作用する可能性を示唆していると考えられる. したがって, ヒト補体系によって相互作用を受けやすい大きな粒子径の糖修飾リポソーム(400, 800nm)は, ヒト血液循環中で非常に不安定であるとともにMPSへの高い移行性を示すことが予想される. また, 糖修飾リポソームのオプソニン化の程度(C3フラグメント量)および血漿中での補体依存的な崩壊がその粒子径と良好な相関関係にあったという結果は, リポソームの動態が粒子径依存的な補体系との相互作用によって支配される可能性を示唆していると思われる.

一方, 非修飾リポソームは補体系をはじめとする種々の血液成分と相互作用せず, 血液循環中で安定に存在する可能性があり, 有効なドラッグキャリアーとしてヒトに適応することが可能かもしれない. リポソームによる補体系の活性化は, アナフィラキシーなどの重篤な副作用を誘導する可能性があり, リポソームの投与による炎症反応や発熱などの副作用の発生がすでに報告されてもおり[41,42], このような観点からも非修飾リポソームは有用であるかもしれない.

通常, ヒト血漿中の総タンパク濃度およびC3濃度はそれぞれ約70mg/ml[43], 0.90mg/ml[44]であることが知られており, C3含有率は $1.3 \pm 0.5\%$ と算出される. 図4-3, 図4-4に示された定量値をもとに総結合タンパク量あたりのC3フラグメント結合量, すなわちC3含有率を計算したところ, 400nmの糖修飾リポソームでは約2倍, 800nmの糖修飾では約4倍濃縮されていることが明らかとなった(表4-2). この結果は, ヒト補体系の粒子

表 4-2 総結合血漿タンパク中のC3フラグメント含量

	Mean diameter of liposomes (nm)				
	50	100	200	400	800
Man-liposomes	0.320 ± 0.100	1.038 ± 0.291	1.654 ± 0.310	2.716 ± 0.143	4.821 ± 0.680
HEPC-liposomes	0.029 ± 0.002	0.115 ± 0.014	0.133 ± 0.024	0.179 ± 0.008	0.234 ± 0.042

糖修飾リポソーム(Man/HEPC/Chol/DCP=3/2/4/1)および非修飾リポソーム(Man/HEPC/Chol/DCP=0/5/4/1)に結合した血漿タンパク中に含まれるC3フラグメント量を示した. 計算には図4-3, 図4-4で示した定量値を用いた. 各値は平均値±SE (n=3 or 4)で表した

径依存的な糖修飾リポソームへの親和性の増加が, 非特異的な反応の結果ではなく, 補体活性化によって生じる特異的な反応の結果であることを強く示唆している. 古典経路を介したものにせよ, 第二経路を介したものにせよ, 液相中で活性化型に変換されたC3は反応性に富むチオールエステルを外部に露出し, 異物表面の水酸基あるいはアミノ基と共有結合する[45]. したがって, 糖修飾リポソームへのC3フラグメントの結合は脂質組成中の糖(マンノース)あるいはコレステロール由来の水酸基に対して特異的に生じると考えられる. したがって, 図4-3に示された粒子径依存的なC3フラグメント結合量の増加は, このような結合部位が粒子径に依存して増加したためであるとも考えられる. しかしながら, 糖修飾リポソーム上の糖(マンノース)あるいはコレステロールの密度は粒子径にかかわらず一定であり, C3フラグメントの結合部位数が粒子径に依存して増加するとは考えがたい. 著者は, 第三章において, リポソームによる補体活性化は, 何らかの補体活性化因子のリポソーム表面への結合過程を必要とする可能性があることを明らかにした. 第一節で示したように, ヒト血漿中での糖修飾リポソームの崩壊は補体系の古典経路を介したものであり(図4-1), 古典経路の活性化は抗体などの活性化因子の結合によって起動されることが知られている. そこで, 糖修飾リポソームによる補体活性化が何らかの活性化因子の寄与により起動されると仮定し, この仮定に基づいて, 図4-2および図4-3において示された糖修飾リポソームへのヒト補体系の親和性と粒子径との間の良好な相関関係を説明するモデルを以下のように構築した(図4-5).

補体活性化因子のリポソーム表面への多価結合を考えると, 半径Rのリポソーム曲面に接触する平面の存在を仮定した. この平面上にあってリポソーム中心から距離(R+δ)で表される点とこの平面のリポソームとの接点との間の距離をxとすると, リポソームの

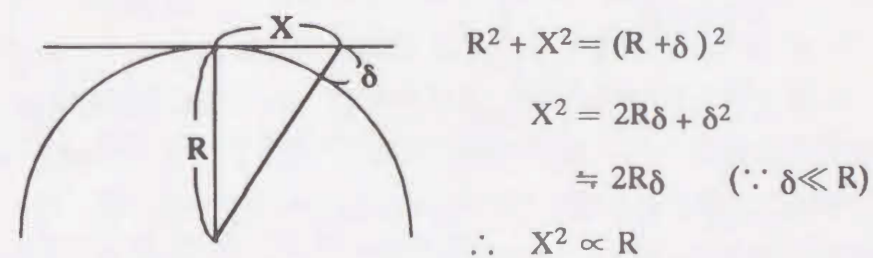


図 4-5 補体系の粒子径依存的な親和性の増加を説明するモデル

半径Rのリポソームに接触する平面について, リポソームの中心からR+δとなる点とリポソームと平面の接触点の二点間の距離をxとすると, 上記の関係式より接触面積x<sup>2</sup>とリポソームの半径Rは一次の相関性を持つ.

R: リポソームの半径, x: リポソームの中心からR+δとなる点とリポソームと平面の接触点の二点間の距離, δ: 接触平面上のある点とリポソーム表面までの距離



半径 (R), 接触円の半径 ( $\chi$ ) および接触円とリポソーム曲面との間の厚み ( $\delta$ ) の3者は

$$\chi^2 = 2R\delta + \delta^2$$

という関係式で表される (図4-5). この時,  $\delta$  は活性化因子の結合を維持するための限界値 ( $R \gg \delta$ ) を持つと仮定すると,

$$\chi^2 \approx 2R\delta$$

となり, リポソームの粒子径はリポソーム曲面と接触する接触円の面積と相関関係にあることが示された. このモデルは, 粒子径依存的な糖修飾リポソームによる補体活性化には三点以上の結合部位を必要とする何らかの血液成分の存在が必要であることを示唆しており, 非常に興味深い.

この仮説の妥当性を明らかにするために, 次節において糖修飾リポソームによる補体活性化に寄与する血漿因子の存在の有無について検討した.

## 第二節 糖修飾リポソームによる補体活性化を起動する血漿因子の検討

補体古典経路は抗体 (IgG, IgM) などの補体活性化因子の異物表面への結合によって起動される. したがって, この活性化因子は異物識別と補体活性化の二つの能力を兼ね備えたものであると考えられる. このような特異性を持つ活性化因子の存在の有無が, 糖修飾リポソームがヒト補体系を活性化し, 非修飾リポソームはヒト補体系を活性化し得なかった理由であるかもしれない. そこで, 糖修飾リポソームに特異的に結合し, 補体活性化を起動する血漿因子が存在するかどうか検討を行った.

図4-6は補体活性化が起動しない温度 (0°C) でヒト血漿とリポソーム (糖修飾リポソームあるいは非修飾リポソーム) を接触させ (吸着過程), 遠心分離により血漿成分が吸着したリポソームを完全に除去した血漿 (吸着因子除去血漿) 中における糖修飾リポソームの崩壊およびウサギ赤血球の溶血を示したものである. 糖修飾リポソームの崩壊は非修飾リポソームを用いて前処理した血漿中では無処理血漿と同程度に観察されたが, 同種リポソームを用いて処理した血漿中ではほぼ完全に抑制された. 一方, 吸着因子除去血漿中でのウサギ赤血球の崩壊は, 非処理血漿中でのそれとほぼ同程度であった. ウサギ赤血球は, ヒト血漿中で補体第二経路の活性化の結果溶血することが報告されている [46]. したがって, 糖修飾リポソームを用いた吸着処理による同種リポソームの崩壊の抑制は, 吸着過程における補体成分の枯渇が原因ではなく, 何らかの補体活性化因子の特異的な除去によることが示された. これらの結果は, ヒト血漿中に糖修飾リポソームを選択的に認識し, その補体依存的な崩壊に寄与する何らかの血漿因子が確かに存在することを示している.

次いで, 吸着因子の補体活性化能について検討をおこなった (表4-3). 吸着因子を結合させた糖修飾リポソーム (吸着因子結合リポソーム) を吸着因子除去血漿に添加 (再構成) し, インキュベート (37°C/30min) したところ, 非処理血漿中でのそれと同程度の崩

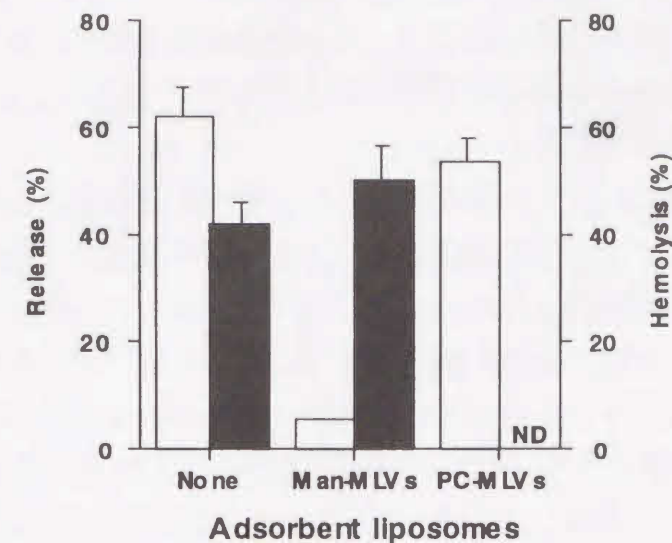


図4-6 糖修飾リポソームによる補体活性化における血漿因子の寄与

糖修飾リポソーム (Man/HEPC/Chol/DCP=3/2/4/1) あるいは非修飾リポソーム (Man/HEPC/Chol/DCP=0/5/4/1) で血漿を処理 (0°C/30min) した後, リポソームを除去した血漿中, あるいは非処理血漿 (none) 中での蛍光色素封入糖修飾リポソーム (□; Man/HEPC/Chol/DCP=3/2/4/1) からの蛍光色素の漏出を測定した. 各値は平均値 ± SE (n=3) で表した.

一方, 非処理 (none) 血漿および糖修飾リポソームを用いて処理 (0°C/30min) した血漿中でのウサギ赤血球の溶血反応を測定した.

ND; Not determination

表4-3 血漿因子の補体活性化能

Condition	Release (%)
Man-MLV + Normal plasma	44.7 ± 1.7
Man-MLV + Factor-depleted plasma	12.6 ± 0.4
Factor-adsorbed Man-MLV + Factor depleted plasma	47.9 ± 1.5
Factor-adsorbed Man-MLV + PBS	5.5 ± 1.5

糖修飾リポソーム (Man/HEPC/Chol/DCP=3/2/4/1) で血漿を処理 (0°C/30min) した後, リポソームを除去し, 血漿因子除去血漿 (Factor-depleted plasma) を調整した. 一方, 因子結合蛍光色素封入糖修飾リポソーム (Factor-adsorbed Man-MLV) を同様の吸着過程 (0°C/30min) を介して調整した. 両者を混合し, インキュベート (37°C, 30min) し, リポソームから漏出したの蛍光色素を測定した. 各値は平均値 ± SE (n=3) で表した.



壊が観察された。図4-6でも示したように、吸着因子除去血漿中でのリポソームの崩壊は観察されず、また吸着因子結合リポソームもPBS中で崩壊しておらず、吸着因子結合リポソームと吸着因子除去血漿を混合（再構成）した際に観察された顕著な崩壊は、血漿因子を吸着させたことによるspontaneousな膜破壊によるものではなく、あくまでも生理的な反応の結果であることが示唆された。

以上の結果から、糖修飾リポソームの補体依存的な崩壊に寄与する血漿因子が存在し、この血漿因子は、糖修飾リポソームに選択的に吸着するだけでなく、補体系の活性化を起動する能力を有することが明らかとなった。この血漿因子は、糖修飾リポソームに選択的に結合することから、リポソーム表面の糖鎖（マンノース）を認識して糖修飾リポソームに結合することが考えられる。したがって、マンノース(mannose)に特異性のある補体活性化因子(complement activating factor; CAF)であることから、この血漿因子を以下M-CAFと略すことにする。

### 第三節 既知の補体活性化因子とM-CAFとの異同

血漿中に存在し、古典経路を介して補体系を活性化する能力を有するタンパクとしては、イムノグロブリン(IgG, IgM)[47-49], C-reactive protein(CRP)[50-55], Serum amyloid P component(SAP)[51,56], Mannose-binding protein(MBP)[51,58-60], MBP-MASP complex[61-63]をあげることができる。

イムノグロブリンによる補体活性化の起動は、免疫複合体中などのIgGのCH<sub>2</sub>ドメインや、抗原と反応して平板状の'planar'型からつぼくぎ状の'staple'に分子立体構造の変化した単分子IgM分子のCH<sub>3</sub>ドメインにC1qが結合することにより起動される[64]。さらに、ペントラキシン・ファミリーに属するCRP, SAPもまたC1qを介したイムノグロブリンと類似した機構で補体活性化を行う。CRPは*Pneumococcus*由来C-polysaccharideだけでなく、細胞膜構成脂質であるホスファチジルコリンのホスホリル残基を特異的に認識し、Ca<sup>2+</sup>依存的な結合を行う。一方、SAPはガラクトースあるいはマンノース残基にCa<sup>2+</sup>依存的に結合することが知られる。この結合におけるCa<sup>2+</sup>依存性がイムノグロブリンによる補体活性化とは異なる特徴的な点である。さらに、動物レクチンの一種であるMBP, MBP-MASP complexは、異物表面の糖鎖中のマンノース残基にCa<sup>2+</sup>依存的に結合し、C1q非依存的に古典経路を活性化することが知られている。MBPはその分子構造中にC1qと同様の構造を持ち、血中に存在するセリンプロテアーゼ活性を持つC1r-C1s複合体を結合させC4, C2を活性化する。これに対し、MBP-MASP complexは、MASPがC1r-C1sと同様のセリンプロテアーゼ活性を持つことからC4, C2を直接活性化する。さらに、近年MASPにC3を活性化する能力が備わっていることが明らかとなる[65]など、MBPによる補体活性化はレクチン経路[60,66]と呼ばれ、新たな活性化経路として注目されている。

これら古典経路の活性化に寄与する血液成分とM-CAFとの異同を検討する上で有用な特

徴としては、①その活性化がC1qを介したものであるか、②結合にCa<sup>2+</sup>を必要としているか、ということがあげられる。我々は既に第一節において、ヒト血漿中での糖修飾リポソームの崩壊がC1qを介した古典経路の活性化により生ずることを示しており、M-CAFはMBPやMBP-MASPとは異なる活性化因子であると考えられる。さらに、M-CAFの結合におけるCa<sup>2+</sup>要求性を検討するために、EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血漿を用いてM-CAF結合糖修飾リポソームを調整し、再構成実験を行った(表4-4)。MBPの多糖へのCa<sup>2+</sup>依存的な結合はEGTA/MgCl<sub>2</sub> 10mMによって完全に抑制されることが報告されている[58,60,66]ことから、処理に用いたEGTA/MgCl<sub>2</sub>濃度は10mMに設定した。M-CAFの糖修飾リポソームへの結合がCa<sup>2+</sup>依存的であるなら、キレート(EGTA/MgCl<sub>2</sub>)処理によってその結合は生じず、その結果補体依存的な崩壊は観察されないか、あるいは抑制されるはずである。しかしながら、表4-4に示すように、糖修飾リポソームの崩壊はキレート処理によって変化しなかった。この結果はM-CAFの糖修飾リポソームへの結合にCa<sup>2+</sup>が必要ではないことを示しており、M-CAFはCa<sup>2+</sup>依存的な結合を示すCRP, SAPとも異なる可能性が示唆された。また、MBPはその高次構造維持のために、MBP-MASP complexはMBPとMASPが複合体を形成する際にCa<sup>2+</sup>を必要とすることが知られている[62,63]。したがって、Ca<sup>2+</sup>除去によって何ら崩壊が抑制されなかったという結果は、M-CAFがMBP, MBP-MASP complexとは異なることを改めて示唆するものである。以上の結果から、M-CAFはC1qを消費して古典経路を活性化すること、糖修飾リポソームへの結合はCa<sup>2+</sup>非要求性であること、さらにその構造維持にもCa<sup>2+</sup>を必要としないことが明らかとなり、CRP, SAP, MBP, MBP-MASP complexとは異なる活性化因子である可能性が示唆された。

表4-4 血漿因子の吸着過程に対するCa<sup>2+</sup>除去および糖質添加の影響

Treatment of plasma before preparation factor-adsorbed liposomes	Release activity (%)
None	100.0
EGTA / Mg <sup>2+</sup> (10mM)	105.2
N-Acetylglucosamine (100mM)	108.2
N-Acetylmannosamine (100mM)	93.6
D-Mannose (100mM)	102.1
Mannan (100mg / ml)	109.2

あらかじめ10mM EGTA/MgCl<sub>2</sub>, あるいは可溶性糖質を添加したヒト血漿を用いて因子結合蛍光色素封入糖修飾リポソームを調整した。これを血漿因子除去血漿に添加し、インキュベート(37°C, 30 min)後、リポソームから漏出したの蛍光色素を測定した。各値は非処理血漿中での崩壊を100とした崩壊活性として表した。



最近, Marjanら[67]は, 負電荷リポソームによる古典経路の活性化は, 抗体の結合によって起動されるものではなく, リポソーム表面に形成される負電荷脂質のクラスターへの強い正電荷を持つC1q分子の直接的な結合により起動されることを報告した. 本実験で用いた糖修飾リポソームもDCPを10mol%含有することから, 弱い負電荷を有すると考えられる. したがって, C1qの直接的な結合による古典経路の活性化の可能性を否定することはできない. しかしながら, 同一負電荷を有する非修飾リポソームによってヒト補体系は活性化されておらず(表4-1), 糖修飾リポソームへのC1q分子の直接的な結合により補体系が活性化されているとは考えにくい. 図4-7はM-CAFの熱感受性について検討した結果である. M-CAFは56°C/30minの熱処理には比較的安定であるが, 65°C/5minの熱処理によりその補体活性化能を失うことが明らかとなった. C1qは易熱性のタンパクであり, 56°C/30minの熱処理によってその生理活性を失うことが知られている[9]. したがって, 熱感受性の観点からもM-CAFによる補体活性化はC1qの直接的な結合によるものではないことがいえる.

以上の検討結果から, M-CAFは自然抗体由来IgG, IgM, あるいは未知の補体活性化因子である可能性が示唆された.

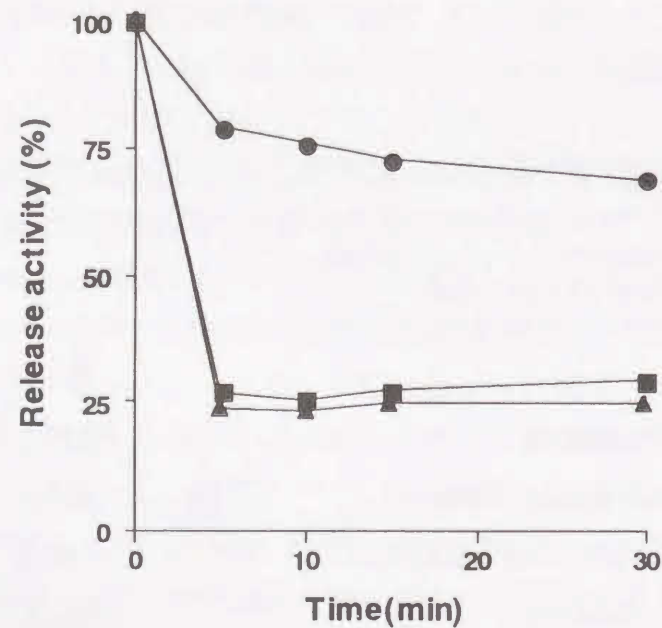


図4-7 血漿因子の熱感受性

調整した血漿因子結合蛍光色素封入糖修飾リポソームを熱処理(●; 56°C, ▲; 65°C, ■; 75°C)した. 熱処理後, 血漿因子除去血漿に添加し, インキュベート(37°C, 30min)し, リポソームから漏出したの蛍光色素を測定した. 各値は熱処理していない血漿因子結合リポソームの血漿因子除去血漿中での崩壊を100とした崩壊活性(%)として表した.

#### 第四節 自然抗体の寄与の検討

近年, リポソームによる補体系の活性化を促進させる要因として自然抗体(IgG, IgM)の寄与が報告されている[68-72]. 我々も, 第三章において, ラット血清中での非修飾リポソームによる補体活性化はリポソームに親和性を有する自然抗体の寄与により促進される可能性を示した. 古典経路の活性化因子の候補としては, まず最初に自然抗体を疑うのが常法であると思われるが, ヒト補体系は糖修飾リポソームによってのみ活性化されたこと, 修飾に用いたセチルマンノシドがマンノースを含み, MBPがマンノースを特異的に認識する[58-60]ことなどから, M-CAFとして自然抗体以外の起動因子を想定し, 検討を行ってきた. しかしながら, これまでの検討から, M-CAFが自然抗体由来IgG, IgM, あるいは未知の補体活性化因子である可能性が強く示唆されており, 本節では糖修飾リポソームの補体依存的な崩壊への自然抗体(IgG, IgM)の寄与の可能性について検討した.

図4-8は, 抗ヒトIgG抗血清, 抗ヒトIgM抗血清を用いて前処理したヒト血漿中での糖修飾リポソームの崩壊を経時的に測定した結果である. 抗ヒトIgG抗血清を用いて前処理したヒト血漿中でのリポソームの崩壊は, 非処理血漿中での崩壊と比較して約20%減少し

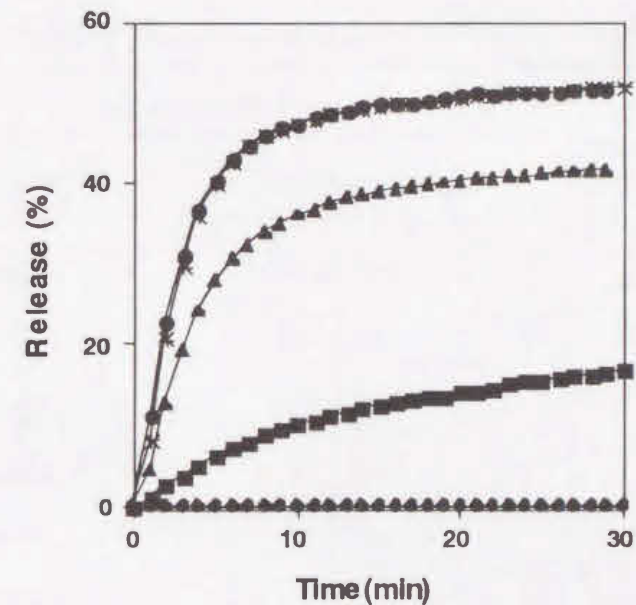


図4-8 処理血漿中での糖修飾リポソームの補体依存的な崩壊の経時変化

血漿(●), 血漿+ウサギ血清(\*), 血漿+抗ヒトIgM抗血清(■), 血漿+抗ヒトIgG抗血清(▲), 血漿+抗ヒトC1q抗血清(◆)中での糖修飾リポソーム(Man/HEPC/Chol/DCP=3/2/4/1)からの蛍光色素の漏出を経時的に測定した. 実験は少なくとも3例以上行い, 典型的な1例を示した.



た。一方、抗IgM抗血清を用いて処理した血漿中での崩壊は顕著に抑制され、抑制率は70%に達した。この結果は、M-CAFは糖修飾リポソームに親和性を持つ自然抗体由来IgGあるいはIgMである可能性を示唆していると考えられる。

また、同時にM-CAFの部分精製を試みた。両親媒性の高分子であるポリエチレングリコール(PEG)を用いた分画では、5~7.5%(w/v)と15%(w/v)の2つの画分に活性が観察された(表4-5)。PEGを用いた分別沈殿法では、4.5%(w/v)までに補体第一成分(C1)・C4b結合タンパク・プロパージンが沈殿[78]し、4.5~12%(w/v)の間にC3, C5, C6, C7, C8, C9, およびH因子, B因子, IgMが沈殿する[79]ことが知られている。また15%(w/v)以上画分には血漿中に最も多く含まれるアルブミンと自然抗体由来のIgGが沈殿する[80]ことが知られてもいる。したがって、二つの活性画分のうち15%(w/v)以上画分に現れた活性は自然抗体由来のIgGによる可能性が考えられた。そこで、ヒトIgGの全てのサブクラス(IgG1・IgG2・IgG3・IgG4)に結合特性を持つプロテイン-G-セファロースによる処理を行った。その結果、処理後、15%(w/v)以上画分の崩壊は抑制された。このことから、15%(w/v)以上画分の活性は自然抗体由来のIgGに起因した補体活性化であることが明らかとなった。一方、5~7.5%(w/v)画分を用いた際の崩壊は何ら影響を受けなかった(表4-5)。したがって、5~7.5%(w/v)画分を用いた際に観察された崩壊は、IgGによるものではないことが示された。

表4-5 ポリエチレングリコールを用いたM-CAFの分画

Source of plasma factor	Release(%)	
	Non-treated	Protein-G treated
Whole plasma	64.4 ± 1.6	—
Fraction 0-5 %	5.8 ± 1.2	—
5-7.5 %	64.4 ± 3.4	64.8 ± 1.6
7.5-10 %	4.4 ± 0.1	—
10-15 %	4.0 ± 0.2	—
15- %	41.1 ± 7.2	0.2 ± 0.1

ヒト血漿にポリエチレングリコール(PEG 4000)を添加することにより、M-CAFの分離を試みた。また、活性画分に関して、M-CAFと自然抗体(IgG)との異同を明らかにするために、Protein-Gを処理の影響を検討した。各実験値は、平均±SE (n=3)として表した。

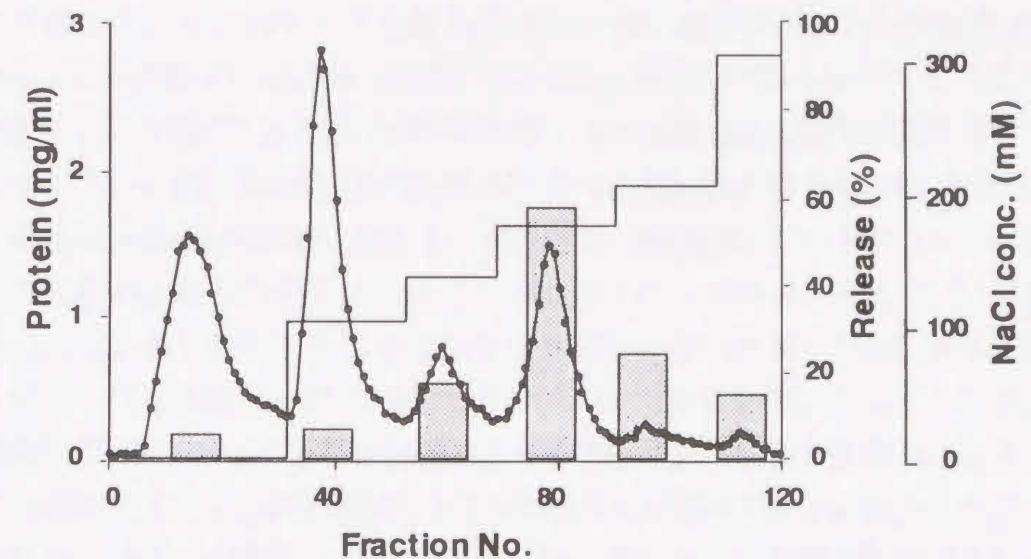


図4-9 DEAE Sepharose CL 6Bを用いたM-CAFの分離

PEG画分(5-7.5%v/v)をDEAE Sepharose CL-6Bカラム(50x25mm, 流速: 125ml/hr)に添加した。溶出は様々な濃度のNaClを含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)を用いて行った。画分をまとめ、タンパク量(●)と活性(■)をそれぞれ測定した。

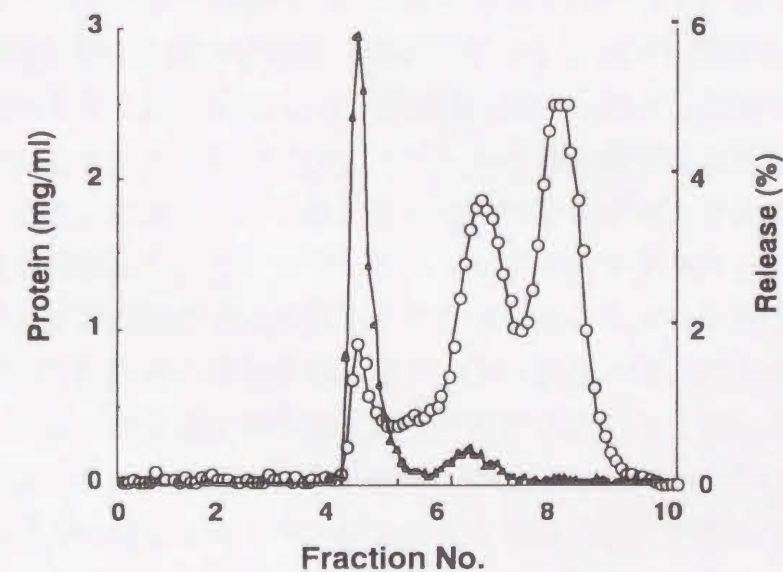


図4-10 Sephacryl S-300を用いたM-CAFの分

陰イオン交換クロマトグラフィー後の活性画分(135-170mM NaCl)を濃縮後、Sephacryl S-300カラム(1.5 x 65 cm, 流速: 24 ml/hr)にアプライした。各画分中のタンパク量(○)と活性(▲)をそれぞれ測定した。



そこで、5~7.5%(w/v)画分をDEAE-SepharoseCL-6Bにアプライし、分離した。その結果、活性は塩濃度 135~170mM のところに溶出した(図4-9)。次いで、分子量の差を利用して分離するため、活性画分をSephacryl S-300のカラムにアプライし、溶出させた。その結果、蛋白ピークが3つ観察され、活性は第一の蛋白ピークに一致して現れた(図4-10)。活性はvoid volume付近に溶出しており、非常に大きな分子量を持つことが推測される。したがって、分子量という観点からもM-CAFがIgMである可能性が強く示唆された。

IgGは分子量約150KDaの単量体であり、2つのFab領域を持つことから2価の結合能力を有する。通常、IgG主導型の古典経路の活性化は、2分子のIgGが40nm以内の間隔で結合する必要がある[73]ことが知られている。したがって、IgGにより古典経路が活性化されるためには少なくとも2分子のIgGが全体で2価以上の結合をする必要があり、先に示したモデルと一致する。一方、IgMは分子量約900KDaの5量体であり、10個のFab領域を持つことから10価の結合能力を有する。IgM主導型の古典経路の活性化は1分子のIgMの結合により起動され、その程度はIgMが多価結合すればするほど増加することが知られる。したがって、自然抗体IgMの糖修飾リポソームの崩壊への強力(70%)な寄与は、IgMの多価結合による可能性を示唆しており、この点でも先のモデルと一致する。また、IgGが約20%、IgMが70%の寄与を示したということは、IgMのほうがIgGよりもリポソームに対する高い親和性を持つ可能性を示唆すると考えられる。しかしながら、IgM分子はIgGよりも10倍以上の補体活性化能を持つとも言われており、親和性と基本的な補体活性化能の違いという両面から検討する必要があると思われる。しかし、いずれにせよIgG、IgMが多価結合を形成する際に、リポソームの粒子径の減少による曲率の増加が顕著な影響を与え、その結果として糖修飾リポソームによる粒子径依存的な補体活性化が観察されたと考えられる。

最近、*Candida*菌の細胞膜上のマンナンを特異的に認識する自然抗体(IgG, IgM)がヒト血液中に存在することが報告された[74]。この自然抗体は*Candida*菌以外の細菌にも親和性を持ち、感染症の初期段階において細菌のオプソニン化(C3フラグメントの結合)あるいは溶菌を促進し、生体からのこれらの細菌の排除を促進することもまた報告されている。したがって、筆者等が用いたリポソームがマンノースを用いて表面修飾されたものであることから考えると、このリポソームの崩壊に寄与する自然抗体は先に報告されたマンナンに親和性を有する自然抗体である可能性が高い。糖修飾リポソームの崩壊に抗マンナン抗体が寄与するならば、その結合サイトはリポソーム表面に付加されたマンノースであり、この結合は可溶性糖質(D-Mannose, Mannan, Man-NAc, GlcNAc)の共存により競合的に阻害されると予想される。事実、先の抗マンナン抗体の*Candida*菌への特異的な結合は、*Candida*菌の細胞膜から抽出されたマンナンの過剰量の共存によって抑制されることが報告されている[74]。そこで、Kawasakiら[59]によってMBPのMannanへの結合性を調べるために用いられた実験条件を参考にして、可溶性糖質の共存の影響について検討した(表4-4)。その結果、MBPの結合をほぼ完全に抑制することが報告されている可溶性糖質の添加によって糖修飾リポソームの崩壊は抑制されず、自然抗体の認識部位はリポソーム表面

のマンノースではない可能性が示唆された。しかしながら、抗原抗体反応は、抗原結合部位に存在するアミノ酸残基と抗原との間に、非共有結合(水素結合、静電気力、ファンデルワールス力、疎水結合など)が形成されることで安定化され、大きな結合力を得ることが知られている。したがって、糖修飾リポソームの崩壊に寄与する自然抗体はリポソーム表面のマンノースを含む場を認識する可能性も残されている。したがって、今後、分子量の小さな糖質を用いるのではなく、*Candida*菌などから抽出した糖質などを用いて競合性を検討し、どのような構造を認識する自然抗体であるか明らかにする必要があると思われる。

また、ヒト血漿中での糖修飾リポソームからの蛍光色素の放出はlag timeのない非常に速やかなものであり、約10分で最大に達することが示された(図4-8)。この特徴的な崩壊の経時変化は、第三章において示したラット血清中での22%、33%コレステロール含有非修飾リポソームの崩壊パターンと類似している。前章でも述べたように、補体系の活性化経路の違いがin vivoでのリポソームの動態に具体的にどのような影響を与えるかは今後の検討課題であるが、本検討において明らかとなった結果は、少なくとも古典経路を介したリポソームの崩壊パターンがlag timeのない非常に速やかなものであるという第三章の結果を支持すると思われる。

#### 第五節 ヒトとラット間のリポソームによる補体活性化における種差

第二章・第三章を通じ、非修飾リポソームのラット血清中で補体依存的に崩壊し、リポソーム中のコレステロール含量の違いはリポソームによる補体活性化経路を変化させる要因であることを示した。しかしながら、本章において非修飾リポソームはヒト血漿中で補体依存的な崩壊を示さず、かつまたヒト補体系によってオプソニン化されないことが明らかとなっている。これらの結果は、ヒト補体系とラット補体系との間に種差が存在する可能性を示唆するものである。補体系はリポソームの体内動態を支配する要因の一つであると考えられている。したがって、補体系とリポソームとの相互作用の程度に種差が存在するならば、動物実験で得られたデータからヒトでの血中滞留性・臓器分布などの体内動態の予測、あるいは副作用の発現の程度を予想することは非常に難しい。しかしながら、種差の原因が解明されれば、動物実験から得られた結果に何らかの補正を加えることでヒトへのスケールアップが可能かも知れない。そこで本節では、非修飾リポソームがヒト補体系と相互作用しなかった原因について検討した。

先にも述べたように、非修飾リポソームはヒト補体系により膜破壊だけでなくオプソニン化も受けなことが示されている。非修飾リポソームがヒト補体系によってオプソニン化を受けなかったという結果は、種差の原因がC3フラグメントの結合以前の段階にある可能性を示すものである。著者は既に第三章において、コレステロール含量の異なる非修飾リポソームによる補体活性化は、それぞれのリポソームに親和性を有する自然抗体によって起動されることを示している。したがって、種差の原因としてまず何らかの活性化因子



の欠如を疑い、検討を行った。

実験は単純な概念に基づいて行った。すなわち、ラット吸着因子結合リポソームを調整し、これをヒト血漿に添加した後インキュベート(37°C/30min)を行い、リポソームの崩壊を観察した。ラット因子がリポソーム表面に結合することによって非修飾リポソームの崩壊が誘導されれば、ヒトはラットの持つ何らかの活性化因子を持っていない可能性が示唆される。図4-11に示すように、コレステロール含量の異なる3種のリポソームはともにラット血清因子をリポソームに吸着させることでヒト血漿中で崩壊し、これらの崩壊はEDTA処理ヒト血漿中では観察されないことが示された。これらの結果は、ラット血清因子の添加によりヒト補体系が活性化されたことを示しており、ヒトは非修飾リポソームに親和性を持つ補体活性化因子を持っていないか、あるいは持っているも極めて活性が低い状態にあることを示していると思われる。さらに、興味深いことに、EGTA/MgCl<sub>2</sub>処理血漿中での崩壊は全ての非修飾リポソームにおいて観察されず、ラット血清因子結合リポソームのヒト血漿中での崩壊は、古典経路を介したものであることが明らかとなった。著者は

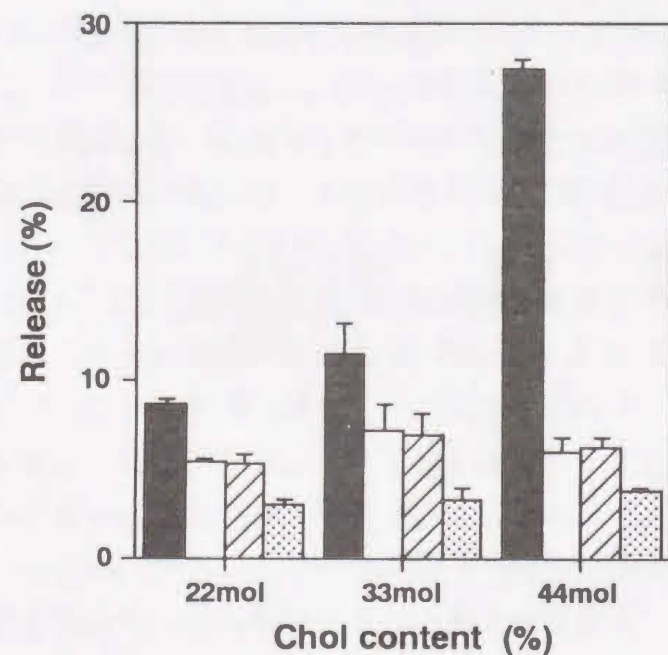


図4-11 ラット血清因子結合非修飾リポソームのヒト血漿中での崩壊

コレステロール含量の異なる3種の非修飾リポソーム(HEPC/Chol/DCP=6/2/1(22mol%), =5/3/1(33mol%), =4/4/1(44mol%))とラット血清を低温(0°C, 30min)下で吸着させ、ラット因子結合蛍光色素封入非修飾リポソームを調整した。調整したリポソームは種々の処理を加えたヒト血漿に添加し、インキュベート(37°C, 30min)した後、リポソームからの蛍光色素の漏出を測定した。各値は平均値±SE (n=3)で表した。

各カラムは、■; 非処理ヒト血漿, □; 10mM-EDTA処理ヒト血漿, ▨; 10mM EGTA/MgCl<sub>2</sub>; 緩衝液, 中でのラット因子結合非修飾リポソームの崩壊を示す。

第三章において、ラット補体系による非修飾リポソームの崩壊は、22%、33%コレステロール含有リポソームにおいては古典経路を、44%コレステロール含有リポソームにおいては第二経路を介して生じ、それぞれの活性化にはリポソームに親和性を有する血清因子(自然抗体(IgG, IgM), あるいはCRP, または未知血清因子)が寄与する可能性を示している。したがって、44%コレステロール含有リポソームにおいて、ヒト血漿中でのラット因子依存的な補体活性化が古典経路を介したものであったという結果は、一つの矛盾を呈する。この結果は、ヒト補体系を活性化したラット因子が必ずしも先に明らかとしたラット補体系の活性化因子ではない可能性を示唆すると思われる。

このような矛盾を説明するには、さらなる検討が必要であるが、補体成分の活性化因子への結合性がヒトとラット間で異なること、あるいは補体活性化を制御する因子の活性あるいは濃度が異なることなど、現段階においてもいくつかの可能性が考えられる。図4-12に示した結果は、このような可能性を論じる上で有用かも知れない。22%および44%コレステロール含有リポソームのヒト血漿中での崩壊を促進するラット血清因子はカラムのvoid volume付近に溶出された。両リポソームの崩壊が観察された画分はほぼ一致しており、同一の因子が両リポソームの崩壊を促進した可能性が示唆される。その一方で、44%コレステロール含有リポソームに結合したラット血液成分中には第二経路の起動因子も含まれていると考えられることから、44%コレステロール含有リポソームの崩壊が第二経路を介したのではなく、古典経路を介したものであったという矛盾はヒト補体系の持つラット補体系とは異なる何らかの性質により生じていることが考えられる。

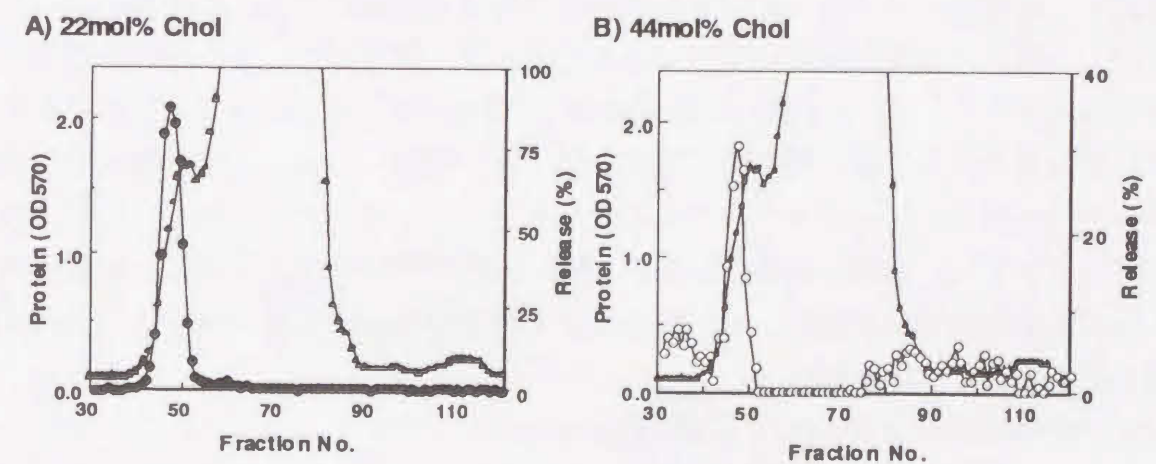


図4-12 ヒト血漿中での非修飾リポソーム崩壊へのラット血清成分の促進作用

ラット血清をSephacryl S-300カラムを用いて分画し、各画分、蛍光色素封入非修飾リポソーム(HEPC/Chol/DCP=6/2/1(A): 22mol%), =4/4/1(B): 44mol%), ヒト血漿を混合し、インキュベート(37°C, 30min)した。インキュベート後、リポソームからの蛍光色素の漏出を測定した。実験は少なくとも3回行い、典型的な一例を示した。



補体活性化因子の存在の有無，血中濃度の違い，活性の違い[75,76]は，以前から知られた事実であり，動物間だけでなく疾病などによってもまた顕著に異なることが報告されている[77]．さらには，補体系の活性自体も動物種間で異なることが報告されており，この原因は補体活性化因子の有無だけでなく，特定の補体成分あるいは補体抑制系の成分の血中濃度あるいは活性の違いによる可能性が報告されている．本検討から明らかとなった結果は，補体系の種差の原因は単純なものではなく，非常に複雑な要因によって生じていることを改めて示唆したにすぎない．しかしながら，ヒト補体系とラット補体系の間の種差の原因が，補体活性化因子あるいは少なくともC3フラグメントの結合以前の段階に寄与する補体成分にある可能性が示唆されたことは，一つの進歩として評価されると思われる．

#### 第六節 小括

本章において，ヒト補体系は糖修飾リポソームによってのみ活性化され，補体系の親和度はリポソームの粒子径に依存することが明らかとなった．リポソームの粒子径により補体系の親和性が変化したという結果は，粒子径の小さなリポソームほど血液循環中で安定であることを意味し，粒子径の小さなリポソームほど血中滞留性が良いというこれまでの報告と一致する．しかしながら，粒子径の大きなリポソームはMPSによって補体受容体を介したファゴサイトーシスにより取り込まれるのに対して，粒子径の小さなリポソームはパイノサイトーシスにより取り込まれることが明らかとされている[14,39,40]．したがって，小さいリポソームのMPSによる取り込みに補体系が寄与しない可能性も考えられ，小さいリポソームの高い血中滞留性の機構に関してはさらなる検討が必要であると考えられる．

さらに，糖修飾リポソームによる粒子径依存的な補体活性化は，このリポソームに親和性を持つ自然抗体(IgG, IgM)の寄与による可能性が示唆された．これは，リポソームの曲率が自然抗体のリポソーム表面への結合過程に影響を与えるためであると推察されている．自然抗体の機能としては，微生物に対する第一次防御線，損傷した自己構成物の排除，免疫系のイディオタイプネットワークにおける相互作用などがあげられる．通常，血中には低いアビディティを持った多反応性のIgMが高濃度存在することから，糖修飾リポソームに親和性をもつ自然抗体は，微生物の侵入の対処のために生体が保持する自然抗体のうちの一部であると推察される．

また，非修飾リポソームはヒト補体系と相互作用しないことが示された．このリポソームはラット補体系を活性化することから(第二章，第三章)，ヒト補体系とラット補体系との間に顕著な種差が存在することが明らかとなった．第二章の検討から，非修飾リポソームによるラット補体活性化に自然抗体が寄与する可能性が示唆されている．したがって，ヒト補体系と相互作用しない理由として，非修飾リポソームに対する自然抗体の欠如あるいは低い力価が推察された．リン脂質やコレステロールに対する自然抗体の存在は多くの動物種で報告されており，もちろんヒトでの存在も確認されている．したがって，ラット

補体系とヒト補体系との間の種差は，自然抗体の欠如よりもむしろその低い力価が原因でと考えられる．



## 第七節 実験の部

### 試薬

セチルマンノシド(Man), 水素添加卵黄ホスファチジルコリン(PC)は日本精化(大阪)より供与されたものを用いた。リン酸ジセチル(DCP)はナカライテスク(京都)より, コレステロール(CH)は和光純薬工業(大阪)よりそれぞれ購入した。リポソームの水相マーカーとして用いた5(6)-カルボキシフルオレセイン(CF)はEastman Kodak (NY, USA)より, また脂質相マーカーとして用いた $^3\text{H}$ -cholesterylhexadecyl ether( $^3\text{H}$ -CHE)はNENからそれぞれ購入した。D(+)-マンノースは和光純薬工業(大阪)から, N-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc), N-アセチル-D-マンノサミン(ManNAc)はPfanstiehl Laboratories, Inc. (IL, USA)から, マンナンはシグマ(MO, USA)からそれぞれ購入したものを用いた。さらにウサギ抗ヒトIgG抗血清, およびウサギ抗ヒトIgM抗血清はCappel(CA, USA)からそれぞれ購入した。プロテイン-G-セファロース, DEAE-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-300はPharmacia社から購入した。また, リポソームの安定性の評価に用いた正常ヒト血漿は日本赤十字社徳島血液センターから研究用に供与されたものを使用時まで $-130^\circ\text{C}$ で冷凍保存して用いた。その他の試薬は試薬特級品を用いた。

### リポソームの調製

CF封入リポソームおよび空リポソーム(粒子径800nmのみ)は第二章第五節に示したのと同様の方法で調製した。実験に用いたリポソームの脂質組成は表4-6に示し, 脂質濃度:  $20\mu\text{mol/ml}$ としてそれぞれ調製した。内水相としてリン酸緩衝液(PBS(-))またはCF等張溶液(40mM)を添加し, 手振盪により脂質薄膜を水和させ, MLVを調製した。MLVの粒子径は, 孔径800, 400, 200, 100nmのポリカーボネート膜(Nuclepore, CA, USA)を用いてextrusion法により調整した。また, SUVは100nmリポソームをプローブ型ソニケーター(Sonifier-450, Branson)を用いて氷冷下約15分間超音波処理することで調整した。粒子径は動的散乱(NICOMP 370 HPL submicron particle analyzer (Particle Sizing System, CA, USA))により確認した。また, トレーサー量の $^3\text{H}$ -CHEを添加したリポソームも同様に調製した。

未封入のCFはセルロースチューブ(Seamless Cellulose Tubing, Small Size 18, 和光純薬工業)を用いたPBS(-)に対する平衡透析により除去した。

表4-6 リポソームの脂質組成(モル比)

HEPC / Chol / DCP = 6 : 2 : 1	Man / HEPC / Chol / DCP = 3 : 2 : 4 : 1
5 : 3 : 1	Man : cetylmannoside
4 : 4 : 1	
5 : 4 : 1	

### ヒト血漿中でのリポソームの安定性評価

リポソームの安定性の評価は第二章・第五節に示した方法にしたがって行った。さらに, リポソームからの蛍光色素の経時的な放出は, 第三章・第五節に示した方法にしたがって行った。

### リポソーム表面に結合したC3フラグメント及び血清タンパクの定量

結合C3フラグメント量及び血清タンパク量は第二章第五節に示した方法を一部改変して行った。

すなわち, 正常ヒト血漿2.7mlにリポソーム溶液(脂質濃度:  $20\mu\text{mol/ml}$ , 粒子径: 800, 400nm)を0.3ml添加し,  $37^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。これに過剰量のPBS(-)を加え, 遠心分離(15000rpm, 15min)し, リポソームを回収した。回収したリポソームは適量のPBS(-)に懸濁し, 再度遠心分離(15000rpm, 15min)した(洗浄)。この操作を2回繰り返した後, PBS(-) 3mlに懸濁させ試料とした。

一方, 粒子径の小さなリポソーム(200, 100, 50(SUV) nm)は, 第二章第五節に示したスピンドラム法を用いて血漿-リポソーム混合液から分離した。分離後, リポソームを含むfractionを一つにまとめ, 超遠心(95000rpm, 1hr)によりリポソームを回収し, 試料とした。この後, 第二章第五節に示した方法にしたがってリポソーム由来脂質を抽出除去し, 試料とした。

以上二つの方法により調整した試料を用い, 第二章第五節の方法にしたがってサンドイッチELISA法によりC3フラグメント量をDC protein assay(Bio-Rad laboratories, CA, USA)を用いて結合蛋白量を測定した。サンドイッチELISAに用いた抗ヒトC3モノクローナル抗体は当研究室において作製したKOCO2801とKOCO2804の組み合わせを用いた。

### 崩壊への自然抗体(IgG, IgM)の寄与の検討

ヒト正常血漿にウサギ抗ヒトIgG抗血清, あるいはウサギ抗ヒトIgM抗血清を9対1の割合(体積比)で加え,  $4^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートした。インキュベート終了後, 遠心分離(15000rpm, 30min)により形成された免疫複合体を除去し, IgGおよびIgM除去血漿を得た。これらの血漿中でのリポソームの崩壊を経時的に測定した。

### 血漿因子除去血漿の調製

血漿因子除去血漿の調製は第三章第五節に示した方法にしたがって行った。

### 血漿因子結合リポソームの調製および再構成実験

ヒト血漿, あるいは種々の処理を施した血漿にCF封入リポソームを最終濃度が $2\mu\text{mol/ml}$ になるように9対1(体積比)の割合で混合した後,  $0^\circ\text{C}$ で30minインキュベートしてリポソームに血漿因子を吸着させた。また, この際, 可溶性糖質による結合阻害の検討にお



いては、可溶性糖質(N-アセチルグルコシド(GlcNAc), N-アセチルマンノシド(ManNAc), マンナン, D-マンノースをそれぞれ終濃度が100mM (マンナンのみ100mg/ml)となるように添加し、インキュベート(0°C/60min)後、遠心分離して不溶性の凝集物を除去した血漿を用いた。過剰量のPBS(+を加えた後、遠心分離(15000rpm, 30min)し、リポソームを沈殿させた。回収したリポソーム沈殿に少量のPBS(+を添加し再懸濁させ、さらに洗浄のため過剰量のPBS(+を加え、同条件で遠心分離を行い再度リポソームを回収した。洗浄操作を3回繰り返し、血漿因子結合リポソームを調製した。

血漿因子結合リポソームの濃度は、10 μmol/mlとなるように希釈した。なお、この場合のリポソーム濃度は5% Triton-X 100溶液を添加してリポソームを完全に崩壊させたときの蛍光強度を、既知濃度のリポソームを完全に崩壊させたときのそれと比較することにより決定した。このようにして調整した血漿因子結合リポソーム0.05mlに、前項の方法にしたがって調製した血漿因子除去血漿0.45mlを添加、混合し、インキュベート(37°C/30min)した。インキュベート後の混合溶液中の蛍光強度を測定した。

Release(%)は第二章第五節に示した式にしたがって計算した。さらに、Release activity(%)は次式により算出した。

$$\text{Release activity (\%)} = \{ (a - c) \div (b - c) \} \times 100$$

a : 種々の処理を加えた血漿を用いた際の Release (%)

b : 非処理血漿を用いた際の Release (%) (Positive control)

c : PBS(+ 中での Release (%) (Negative control)

#### ラット血清因子とヒト血漿の再構成

ラット血清因子結合リポソームは前項と同様の方法により調整し、再構成実験も前項の方法に準じた。

ゲル濾過画分を用いた再構成は以下の方法で行った。すなわち、Sephacryl S-300カラム(50x750mm)に1mlのラット血清を添加し、400 μl/minの流速で溶出させた。各画分は1ml毎に採取した。画分は100 μlずつあらかじめ50 μlのCFリポソーム(0.40 μmol/ml)が添加されたELISA用96well plateに添加した。次いで、100 μlのヒト血漿(33%v/v)を添加して、インキュベート(37°C/30min)を行った。各well中の蛍光強度を測定するとともに、Triton-X溶液(5%v/v)を添加してリポソームが完全に壊された際の蛍光強度も測定した。Release(%)は第二章第五節に示した式にしたがって計算した。

#### 引用文献

- 1) Boxenbaum, H. : Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **8**: 165-176 (1980)
- 2) Liu, D., Liu, F. and Song, Y.K. : Monosialoganglioside GM1 shortens the blood circulation time of liposomes in rats. *Pharm. Res.*, **12**: 508-512 (1995)
- 3) Harashima, H., Komatsu, S., Kojima, S., Yanagi, C., Morioka, Y., Naito, M. and Kiwada, H. : Species difference in the disposition of liposomes among mice, rats and rabbits: Allometric relationship and species dependent hepatic uptake mechanism. *Pharm. Res.*, **13**: 1049-1054 (1996)
- 4) Liu, D., Hu, Q. and Song, Y.K. : Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1240**: 277-284 (1995)
- 5) Liu, D. : Animal species dependent liposome clearance. *J. Liposome Res.*, **6**: 77-97 (1996)
- 6) Okada, N., Yasuda, T., Tsumita, T., and Okada, H. : Differing reactivities of human and guinea-pig complement on haptenized liposomes via the alternative pathway. *Mol. Immunol.*, **20**: 857-864 (1983)
- 7) Tanaka, S., Kitamura, F., Suzuki, T. : Studies on the hemolytic activity of the classical and alternative pathway of complement in various animal species. *Complement*, **4**: 33-41 (1987)
- 8) Scieszka, J.F., Maggiora, L.L., Wright, S.D., Cho, M.J. : Role of complement C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. *Pharm. Res.*, **8**: 65-69 (1991)
- 9) McManus, L.M. and Nakane, P.K. : Isolation and characterization of mouse C1q. *J. Immunol. Methods*, **36**: 159-171 (1980)
- 10) Alving, C.R., Richrds, R.L. and Guirguis, A.A. : Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J. Immunol.*, **118**: 342-347 (1977)
- 11) Okada, N., Yasuda, T., Tsumita, T., and Okada, H. : Activation of the alternative complement pathway of guinea-pig by liposomes incorporated with trinitrophenylated phosphatidylethanolamine. *Immunol.*, **45**: 115-124, 1982
- 12) Funato, K., Yoda, R. and Kiwada, H., Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**: 198-204 (1992)
- 13) Cooper, N.R. : Activation and regulation of the first complement component. *Federation Proc.*, **42**: 134-138 (1983)
- 14) Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., Kiwada, H. : Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size liposomes. *Pharm. Res.*, **11**: 402-406 (1994)
- 15) Harashima, H. and Kiwada, H. : Studies on the mechanism of uptake of liposomes using an isolated perfused liver system. *J. Liposome Res.*, **6**: 61-75 (1996)
- 16) Richards, R.L., Habbersett, R.C., Scher, I., Janoff A.S., Schieren, H.P., Mayer, L.D., Cullis, P.R. and Alving, C.R. : Influence of vesicle size on complement-dependent immune damage to liposomes. *Biochem. Biophys. Acta*, **855**: 223-230 (1986)
- 17) Devine, D.V., Wong, K., Serrano K., Chonn, A. and Cullis, P.R. : Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1191**: 43-51 (1994)
- 18) Ferdous, A.J., Ishida, T., Shinohara, M., Harashima, H. and Kiwada, H. : Size-dependent release of carboxyfluorescein from cetylmannoside-modified liposomes in human plasma. *Biopharm. Drug Disposit.*, **17**: 145-154 (1996)



- 19) Chonn, A., Semple, S.C. and Cullis, P.R. : Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes. *J. Biol. Chem.*, **267**: 18759-18765 (1992)
- 20) Chonn, A., Semple, S.C. and Cullis, P.R., Protein-membrane interactions in the complex biological milieu. In Jos A.F. Op den Kamp (Ed.), *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics*, NATO ASI Series, Vol. H 82, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 101-106 (1994)
- 21) Semple, S.C., Chonn, A., Cullis, P.R. : Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochem.*, **35**: 2521-2525 (1996)
- 22) Oja, C.D., Semple, S.C., Chonn, A., Cullis, P.R. : Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1281**: 31-37 (1996)
- 23) Pidgeon, C. and Hunt, A.C. : Calculating number and surface area of liposomes in any suspension. *J. Pharmaceut. Sci.*, **70**: 173-176 (1981)
- 24) Müller-Eberhard, H.J. : Complement. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**: 697-724 (1975)
- 25) Porter, P.R. and Reid, K.B.M. : Activation of the complement system by antibody-antigen complexes: the classical pathway. *Adv. Prot. Chem.*, **33**: 1-71 (1979)
- 26) Reid, K.B.M. : Proteins involved in the activation of the classical pathways of human complement. *Biochem. Soc. Transact.*, **11**: 1-12 (1983)
- 27) Matsuo, H., Funato, K., Harashima, H. and Kiwada, H., The complement- but not mannose receptor-mediated phagocytosis is involved in the hepatic uptake of cetylmannoside-modified liposomes in situ. *J. Drug Targeting*, **2**: 141-146 (1994)
- 28) Chonn, A., Semple, S.C. and Cullis, P.R. :  $\beta$ 2-glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles. *J. Biol. Chem.*, **146**: 4234-4241 (1991)
- 29) Jensenius, J.C., Laursen, S.B., Zheng, Y. and Holmskov, U. : Conglutinin and CL-43, two collagenous C-type lectins (collectins) in bovine serum. *Biochem. Society Transactions*, **22**: 95-100 (1994)
- 30) Ogunremi, O., Tabel, H., Kremmer, E. and Wasiliu, M. : Differences in the activity of the alternative pathway of complement in BALB/c and C57Bl/6 mice. *Exp. Clin. Immunogenet.*, **10**: 31-37 (1993)
- 31) Ballou, S.P. and Kushner, I. : C-reactive protein and the acute phase response. *Adv. Internal Med.*, **37**: 313-336 (1992)
- 32) Senior, J. and Gregoriadis, G. : Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Lett.*, **145**: 109-114 (1982)
- 33) Gregoriadis, G. and Senior, J. : The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation. *FEBS Lett.*, **119**: 43-46 (1980)
- 34) Souhami, R., Patel, H.M. and Ryman, B.E. : The effect of reticuloendothelial blockade on the blood clearance and tissue distribution of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **674**: 354-371 (1981)
- 35) Roerdink, F., Dijkstra, J., Hartman, G., Bolscher, B. and Scherphof, G. : The involvement of parenchymal, Kupffer and endothelial liver cells in the hepatic uptake of intravenously injected liposomes. Effect of lanthanum and gadolinium salts. *Biochim. Biophys. Acta*, **677**: 79-89 (1981)
- 36) Allen, T.M. and Everest, J.M. : Effect of liposome size and drug release properties on pharmacokinetics of encapsulated drug in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **226**: 539-544 (1983)
- 37) Senior, J., Crawley, J.C. and Gregoriadis, G. : Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous injection. *Biochim. Biophys. Acta*, **839**: 1-8 (1985)
- 38) Liu, Z. and Hu, V.W. : Fluorescence analysis of size distribution and mode of dye release from carboxyfluorescein-loaded vesicles: application to the study of complement-membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **945**: 253-262 (1988)
- 39) Beaumier, P.L. and Hwang, K.L. : Effects of liposome size on the degradation of bovine brain sphingomyelin/cholesterol liposomes in the mouse liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **731**: 23-30 (1983)
- 40) Chow, D.D., Essien, H.E., Padki, M.M. and Hwang, K.J. : Targeting small unilamellar liposomes to hepatic parenchymal cells by dose effect. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **248**: 506-513 (1989)
- 41) Barenholz, Y., Amslem, S. : Quality control assays in the development and clinical use of liposome-based formulations. In : Gregoriadis, G. ed. *Liposome technology. 2nd ed.*, Boca Raton: CRC Press, 527-616 (1993)
- 42) Levine, S.J., Walsh, T.J., Martincz, A., et al. : Cardiopulmonary toxicity after liposomal amphotericin B infusion. *Ann. Intern. Med.*, **114**: 664-666, (1991)
- 43) 血漿蛋白, 臨床検査法提要 (金井正光編, 金原出版) pp480-505, (1993)
- 44) 竹村周平, 近藤元治 : C3. *日本臨床* **53**: 45-47 (1995)
- 45) Law, S.K.A. and Dodds, A.W. : The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Science*, **6**: 263-274 (1997)
- 46) Platts-Mills, T.A.E. and Ishizaki, K. : Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.*, **113**: 348-358 (1974)
- 47) Pike, R.M. : Antibody heterogeneity and serological reactions. *Bacteriological Reviews*, **31**: 157-174 (1967)
- 48) Müller-Eberhard, H.J. : Complement. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**: 697-724 (1975)
- 49) Porter, P.R. and Reid, K.B.M. : Activation of the complement system by antibody-antigen complexes: the classical pathway. *Adv. Prot. Chem.*, **33**: 1-71 (1979)
- 50) Volanakis, J.E. : Complement activation by C-reactive protein complexes. *Annals New York Academy of Sciences*, 235-250 (1982)
- 51) Pepys, M.B., Dash, A.C., Fletcher, T.C., Richardson, N., Munn, E.A. and Feinstein, A. : Analogues in other mammals and in fish of human plasma proteins, C-reactive protein and amyloid P component. *Nature*, **273**: 168-170 (1978)
- 52) Stanley, P., Ballou, M.D. and Irving Kushner, M.D. : C-reactive protein and the acute phase response. *Adv. Int. Med.*, **37**: 313-336 (1992)
- 53) Abernathy, J.T. and Avery, O.T. : The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. *J. Exp. Med.*, **73**: 173-182 (1941)
- 54) Volanakis, J.E. and Kaplan, M.H. : Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. II. Consumption of guinea pig complement by CRP complexes : requirement for human C1q. *J. Immunol.*, **113**: 9-17 (1974)
- 55) Claus, D.R., Siegel, J., Petras, K., Osmand, A.P. and Gewurz, H. : Interactions of C-reactive protein with the first complement of human complement. : *J. Immunol.*, **119**: 187-192 (1977)
- 56) Baltz, M.L., Holford, S., de Beer, F.C., Whaley, K. and Pepys, M.B. : The interaction between human serum amyloid P component and fixed complement. *Annals New York Academy of Sciences*, 429-430 (1982)
- 58) Turner M.W. : Mannose binding protein. *Biochem. Society Transactions*, **22**: 88-94 (1994)
- 59) Kawasaki, T., Etoh, R. and Yamashita, I. : Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *B.B.R.C.*, **81**: 1018-1024 (1978)
- 60) Thiel, S. : Mannan-binding protein, a complement activating animal lectin. *Immunopharmacology*, **24**: 91-99 (1992)
- 61) Ihara, I., Harada, Y., Ihara, S. and Kawakami, M. : A new complement-dependent bactericidal factor found in nonimmune mouse sera : specific binding to polysaccharide of Ra chemotype



- salmonella. *J.Immunol.*, **128**(3), 1256-1260 (1982)
- 62) Matsushita, M. and Fujita, T.: Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J.Exp.Med.*, **176**, 1497-1502 (1992)
- 63) Matsushita, M.: Complement activation by mannose-binding protein(MBP) and MBP-associated serine protease(MASP). *臨床免疫*, **25**(11), 1530-1536 (1993)
- 64) Duncan, A.R. and Winter, G.: The binding site for C1q on IgG. *Nature*, **332**: 738-740 (1988)
- 65) Matsushita, M and Fujita, T: Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. *Immunobiol.*, **194**: 443-48 (1995)
- 66) Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R.B. and Jensenius, J.C.: Collectins: collagenous C-typelectins of the innate immune defense system. *Immunol.Today*, **15**: 67-74 (1994)
- 67) Marjan, J., Xie, Z. and Devine, D.V.: Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin. *Biochem.Biophys.Acta*, **1192**: 35-44 (1994)
- 68) Okada, H., Okada, N. and Yasuda, T.: Activation of the alternative complement pathway by IgM antibody reacted on paragloboside incorporated into liposome membrane. *Mol. Immunol.*, **20**: 499-500 (1983)
- 69) Okada, N., Yasuda, T., Tsumita, T. and Okada, H.: Activation of the alternative complement pathway by natural antibody to glycolipids in guinea-pig serum. *Immunol.*, **50**: 75-84 (1983)
- 70) Liu, D., Song, Y.K. and Liu, F.: Antibody dependent, complement mediated liver uptake of liposomes containing GM1. *Pharm. Res.*, **12**: 1775-1780 (1995)
- 71) Szebeni, J., Wassef, N.M., Rudolph, A.S. and Alving, C.R.: Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1285**: 127-130 (1996)
- 72) Alving, C.R. and Swartz, G.M. Jr.: Antibodies to cholesterol, cholesterol conjugates, and liposomes: implications for atherosclerosis and autoimmunity. *Crit. Rev. Immunol.*, **10**: 441-453 (1991)
- 73) Morgan, B.P.: Complement. Clinical aspects and relevance to disease. Academic Press. (1990)
- 74) Zhang, M.X., Lupan, D.M. and Kozel, T.R.: Mannan-specific immunoglobulin G antibodies in normal human serum mediate classical pathway initiation of C3 binding to *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **65**: 3822-3827 (1997)
- 75) Jensenius, J.C., Laursen, S.B., Zheng, Y. and Holmskov, U.: Conglutinin and CL-43, two collagenous C-type lectins (collectins) in bovine serum. *Biochem.Society Transactions*, **22**: 95-100 (1994)
- 76) Ogunremi, O., Tabel, H., Kremmer, E. and Wasiliu, M.: Differences in the activity of the alternative pathway of complement in BALB/c and C57Bl/6 mice. *Exp. Clin. Immunogenet.*, **10**: 31-37 (1993)
- 77) Ballou, S.P. and Kushner, I.: C-reactive protein and the acute phase response. *Adv. Internal Med.*, **37**: 313-336 (1992)
- 78) DiScipio, R.G.: The fractionation of human plasma proteins. III. Purification of complement factors D and I using affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, **5**: 164-169 (1994)
- 79) DiScipio, R.G. and Sweeney, S.P.: The fractionation of human plasma proteins. II. The purification of human complement proteins C3, C3u, and C5 by application of affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, **5**: 170-177 (1994)
- 80) Freid, M. and Chun, P.W.: Water-soluble nonionic polymers in protein purification. *Methods in Enzymology* (Jakoby, W.B. ed., Academic press, New York), **22**: 238-248 (1971)

## 第五章 総括

補体系はリポソームの血液循環中での不安定化およびMPSによる捕捉において重要な役割を果たす可能性が示唆されている。本研究は、補体系とリポソームとの相互作用に関して検討し、以下に示す知見を得た。

第二章では、リポソームと補体系との相互作用が、リポソームの体内動態とどのような関係にあるか検討した。その結果、リポソーム表面のC3フラグメント結合量は、肝クリアランスと良好な相関関係にあることが明らかとなった。この結果は、肝臓によるリポソームの取り込みが、C3フラグメント結合量、すなわち補体系との相互作用によって支配されていることを示すものであり、MPSによるリポソームの認識・捕捉が補体受容体を介したファゴサイトーシスによるものであるとの報告と一致するものであった。一方、飽和リン脂質を基剤としたリポソームの血清中での不安定化は補体依存的であったのに対して、不飽和リン脂質からなるリポソームの不安定化は補体系以外、例えばHDLなどのリポタンパクとの相互作用による可能性が示された。しかしながら、血清中での補体依存的な不安定化の程度と、in vivoでの不安定化の指標である腎クリアランスの間には一定の相関関係があることが示され、補体系がリポソームの血液循環中での不安定化の要因の一つであることが示唆された。以上の結果から、補体系がリポソームの動態を支配する要因の一つであることが明らかとなった。

第三章では、補体系によるリポソーム認識機構について検討した。補体系の活性化経路には古典経路と第二経路の二つの経路があることが知られている。そこで、飽和リン脂質を基剤とした三種のコレステロール含量(22, 33, 44mol%)のリポソームをモデルリポソームとして、リポソームによる補体活性化経路を検討した。その結果、リポソーム組成中のコレステロール含量(ホスファチジルコリン含量)の違いにより、活性化される経路が異なることが明らかとなった(22%, 33%コレステロール含有リポソーム; 古典経路, 44%コレステロール含有リポソーム; 第二経路)。補体活性化経路を変化させるリポソームの物理化学的性質に関する報告は、表面電荷に関するもののみであり、本検討において明らかとなった「コレステロール(あるいはホスファチジルコリン)含量の違いがリポソームによる補体活性化経路を変化させる」という結果は新規な発見である。さらに、これらの補体活性化は、低温下(0°C)でリポソーム表面に結合する血清因子によって起動されること、そして古典経路に寄与する因子と第二経路に寄与する因子とは異なることが明らかになるとともに、これらの因子が自然抗体(IgG, IgM)である可能性が示唆された。

また、活性化経路の違いがおよぼす補体系によるオプソニン化(C3フラグメントの結合)および不安定化(膜破壊)への影響について検討した。古典経路を介したオプソニン化は非常に速やかであり、第二経路を介したオプソニン化は数分のlag timeの後上昇することが明らかとなった。また、古典経路を介した膜破壊は非常に速やかであったが、第二経路を介した場合lag timeの後上昇することが明らかとなった。したがって、補体活性化の経路の



違いは、リポソームと補体系との相互作用の速度を変化させることが明らかとなった。

第四章ではヒト補体系とリポソームの相互作用について検討した。

ラット補体系と相互作用することが示されたリポソームではヒト血漿中での不安定化もC3フラグメントの結合も観察されなかった。この結果は、ヒト補体系とラット補体系との間に種差が存在することを強く示唆する。この原因として、ヒトでは抗コレステロール、あるいは抗リン脂質自然抗体の力価が低いこと、あるいは血中濃度が低いことが推察された。一方、糖修飾リポソームがヒト補体系を活性化することが観察された。このリポソームを用いてヒト補体系との相互作用に関して検討したところ、補体系の親和性はリポソームの粒子径の増加に依存して増加することが明らかとなった。この現象は、糖修飾リポソームに親和性を持つ自然抗体(IgG, IgM)の寄与の結果であり、これら自然抗体の結合過程がリポソームの曲率によって影響を受けるためであると推察された。糖修飾リポソームに親和性をもつ自然抗体は、細菌などの侵入の対処のために生体が保持している自然抗体のうちの一部であると考えられる。

以上、生体内投与後のリポソームの動態は、それらを異物として認識する生体防御機構と密接に関係しており、その中でも特に生体が持つ自然抗体のリポソームへの結合、そしてその結合に連動した補体系の活性化という極めて基本的な体液性生体防御機構と密接に関係にあることが明らかとなった。したがって、リポソームを用いた薬物送達システムの今後の開発は、単にリポソーム化による薬物の薬効発現あるいは副作用の軽減を目指すだけでなく、生体防御機構との相互作用を十分に考慮し、基本的な生体反応に立脚した研究開発が志向されるべきであると考えられる。また、リポソームが生体防御機構により異物として認識されているという事実は、リポソームの生体内投与により様々な免疫反応が生じ、予想もしない副作用が発現する危険性を示唆する。このような点からも、リポソームと生体防御機構との相互作用の解明は、リポソーム製剤の開発において有意義な知見を与えると考えられる。

さらに、本検討で明らかとなったコレステロール(ホスファチジルコリン)含量に依存して補体系の認識機構が変化するという知見は、これらの脂質が細胞膜の基本的な構成成分であることから非常に興味深い。補体系は、細菌などの異物除去だけでなく、老化した自己細胞の除去にも機能することが知られている。しかしながら、本来自己である細胞が補体系によってなぜ異物として排除されるか、その機構は明らかではない。したがって、本検討において明らかとなった知見は、このような補体系による異物排除機構の解明にも寄与する重要な知見であると考えられる。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学薬学部 際田弘志教授に深甚なる謝意を表します。

また、終始御指導いただき、有益なる御助言をいただきました、徳島大学薬学部 原島秀吉助教授、松木洋子先生に深く感謝いたします。

また、本論文をまとめるにあたり、御教示を賜りました、徳島大学薬学部 福澤健治教授ならびに徳島大学薬学部 横田雅之教授に心から感謝いたします。

また、本研究に際し、有益なる御助言をいただきました、大塚製薬細胞工学研究所 大本安一主任研究員、村口正宏研究員の両氏に心から感謝いたします。

また、数々の貴重な御助言と御協力をいただきました、船戸耕一博士、松尾浩民博士、鎌田順子修士、阿部信貴修士、小島繁郎修士、依田律子学士に深く感謝いたします。

本研究は、徳島大学薬学部薬剤学教室において行われたものであり、御協力いただいた、篠原美加修士、飯田慎也修士、市川和美学士、小島弘子学士、三輪純子学士、三好ひづる学士、藤本直美学士、安川和美さん、佐野健三君に深く感謝いたします。

また、実験にともなう諸々の些事に及んで御協力いただきました徳島大学薬学部薬剤学教室の諸氏に心からお礼申し上げます。

また、ヒト精製C3を御供与下さいました、北海道大学薬学部 長澤滋治教授に深謝いたします。研究用ヒト血漿をご提供いただきました徳島県赤十字血液センターにお礼申し上げます。

最後に、深い理解を持って常に見守ってくれた郷里の両親に深く感謝いたします。




1998年3月







## 論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 葉 第 38 号	氏 名	石田 竜弘
審査委員	主 査	際 田 弘 志 	
	副 査	福 澤 健 治 	
	副 査	横 田 雅 之 	

## 学位論文題目

リポソームと補体系の相互作用に関する研究

## 審査結果の要旨

リポソームの血中での不安定化や貪食細胞による取り込み等の体内動態を支配する要因として補体系が注目されている。本研究は、リポソームによる補体活性化の機構を明らかにし、より有用なリポソーム製剤の開発のための基礎的知見を得ることを目的としたものである。

まず、血清と反応後のリポソーム表面のC3フラグメントの定量法を確立し、その量と不安定化や貪食細胞による取り込み等の体内動態との定量的関係を明らかにした。その結果、膜流動性の低いリポソームに関しては、これらの動態と補体活性化の程度とは良く相関するものの、膜流動性が高いリポソームにおいては相関せず、補体系以外の要因が存在することを明らかにした。次に、補体系によるリポソーム認識機構について検討し、活性化の程度及び経路がコレステロールの含量に依存し、またその活性化は自然抗体由来のIgG、IgMにより起動される可能性を示唆する知見を得た。また、活性化経路の違いにより、リポソームの膜破壊に時間的な遅れが生じることも明らかにした。さらに、ヒト血漿中での糖修飾リポソームの補体活性化機構について検討を加え、リポソームの粒子径により補体活性化の程度が異なる原因として、低温下でリポソームに吸着する補体起動因子の親和性がリポソーム表面の曲率に応じて低下する接着モデルを提唱し、補体活性化の粒子径依存性の原因を解明した。

本研究は、上述のようにリポソームの体内動態を支配する要因に関して多くの新規な知見を提供し、またその知見はリポソームの体内動態を制御し、より有用なリポソーム製剤の開発のために極めて有益であり、博士論文に値するものと認められる。