

ガラクトース残基修飾リポソーム Interleukin-2 による 肝類洞内抗腫瘍リンパ球の 選択的増強と肝転移抑制効果

中村 勝人 奥野 清隆 田中 晃

近畿大学医学部第1外科学教室

抄 録

転移性肝癌に対してわれわれはリンパ球の分化、増殖因子である Interleukin 2 (IL-2) と Mitomycin C (MMC), 5-Fluorouracil (5-FU) を併用する免疫化学肝動注療法を施行し良好な結果を報告してきたが, IL-2 の血中半減期が大変短いため週に1~2回の外来投与を余儀なくされている。そこでこれらの点を改善すべく IL-2 に徐放性を持たせ、肝臓に多く存在する Galactose receptor を介し特異的に肝臓へ IL-2 を集積させ、抗腫瘍効果を高める Liposome 製剤の作製を検討した。種々の方法で Galactose 残基修飾 Liposome IL-2 製剤 (Lipo・DG・IL-2) を作製し C3H/He マウス門脈内、尾静脈内に投与し経時的に臓器分布、肝臓リンパ球の YAC-1, Colon 26 癌細胞を標的細胞とする抗腫瘍活性、および X5563 形質細胞腫を用いたマウス肝転移モデルに対する各製剤の抗腫瘍効果を検討したところ、経時的臓器分布では、Lipo・DG・IL-2 製剤が他の製剤に比べ薬剤投与後14日目におけるまで明らかに肝臓に高い持続集積を認め、肝臓リンパ球の抗腫瘍活性も門脈内、尾静脈内投与いずれの経路においても Lipo・DG・IL-2 製剤が14日目におけるまで有意に高い抗腫瘍活性を持続した ($P<0.01$)。またマウス肝転移予防モデル、肝微小転移モデルに対して各製剤を門脈内、尾静脈内投与した結果、14日目に Lipo・DG・IL-2 投与群で有意な腫瘍増殖抑制効果を認め ($P<0.01$)、これらの結果より本製剤の *in vivo* での有効性が確認された。以上の結果より Lipo・DG・IL-2 製剤は肝転移の治療に応用できる、よりすぐれた IL-2 製剤となる可能性が示唆された。

Key words : Galactose 残基, Liposome, IL-2, 転移性肝癌

緒 言

転移性肝癌に対する治療としてわれわれは、リンパ球増殖因子である Interleukin-2 (IL-2) を主体として、化学療法剤である Mitomycin-C (MMC), 5-fluorouracil (5-FU) を併用する免疫化学肝動注療法を施行しすぐれた治療効果を報告してきたが¹⁻²、問題点として IL-2 の血中半減期が短く毎週1~2回の投与を余儀なくされている。そこで通常の投与方法ではすみやかに血中より消失する IL-2 を、肝実質細胞、類洞細胞に効果的に集積させ、さらにこれに徐放性を獲得させることにより肝局所における抗腫瘍リンパ球活性を持続的に増強させる Liposome 製剤の作製を検討した。ことに肝実質細胞に多く存在する Galactose receptor³ に着目し、

Galactose 残基を修飾した Liposome 製剤を作製することにより肝臓への Active Targeting をめざした。

実験材料及び方法

1. 実験動物

8~10週齢の雄性 C3H/He マウス(日本エスエルシー株式会社, 静岡, より購入)を1日12時間照明のもと, 室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\pm 10\%$ の空調下で飼育し, 飼育用飼料(舟橋 SP)と水道水は自由摂取とし使用した。なお実験動物の取り扱いに関しては, 動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)及び実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和55年総理府告示第6号)を遵守した。

2. 腫瘍細胞

2.1. 抗腫瘍活性測定のための標的細胞として BALB/c 由来 N-nitroso-N methyl urethane 誘発結腸癌細胞 Colon 26 (横浜市大 西山潔博士より恵与) と, A系マウス由来 YAC-1 リンパ腫細胞を使用した。

2.2. 肝転移モデル作成に C3H/He 由来 X5563 形質細胞腫 (大阪大学浜岡利之教授より恵与) を使用した。

3. Interleukin-2 (IL-2)

塩野義製薬(株)より供与を受けたヒト型 recombinant IL-2 (S-6820) を使用した。

4. Liposome 製剤の作製

4.1. 逆相蒸発法による Liposome・IL-2 製剤の作製⁴

Egg PC (NC-10S, 日油商事株式会社, 東京), Cholesterol (和光純薬, 東京), Stearylamine (S-6755, SIGMA, USA), Galactoserebroside (C-4905, SIGMA, USA) を molar ratio を 5:5:0.5:0.5 に調整したものを基剤として用いた。

まず Egg PC と Chloroform 混合溶液をエバポレーター (EYELA V 型 東京理科機械株式会社, 東京) を用いてガラス面に Lecithin (白膜) を付着させ, 次に 5% mannitol (関東化学, 東京), recombinant IL-2 混合溶液に 5 分間超音波破碎を加えた。

次に Lecithin に Diethyl Ether (5 ml 和光純薬, 東京), Stearylamin (6.2 mg), Galactoserebrosid (2.6 mg) を加え, 超音波を用いて混合し 40°C の温浴下でエバポレーターのフラスコを浸け混合内溶液を攪拌した。

各溶液を混合し超音波破碎を 5 分間加えた。再度エバポレーターを用いて Ether を蒸発させ, EXTRUDER (日油リポソーム株式会社, 東京 濾過膜; 0.6 μm 窒素圧 3.5 kgf/cm²) を用いて 1 回 2 時間の限外濾過を 3 回おこなった。以上の作成過程により平均 3.5 ml の IL-2 封入 Liposome 製剤を得た。

4.2. 凍結乾燥 Liposome 製剤の作製⁴

第一製薬(株)より供与を受けた凍結乾燥 Liposome 製剤 (基剤: dimyrystoyl phosphatidyl glycerol, cholesterol=26 mM:24 mM) (Lipo 製剤) 及び, Galactose 残基 (digalactosyl diglyceride) 修飾 Liposome 製剤 (基剤: dimyrystoyl phosphatidyl glycerol, cholesterol, digalac tosyl diglyceride=26 mM:24 mM:2.5 mg/ml) (Lipo・DG 製剤) を凍結乾燥法を用いて作成し, これらの Liposome に 50°C (Liposome 脂質の相転移温度以上) に加熱した recombinant IL-2 (Lipo・DG・IL-2 作製に 10.5×10⁵ JRU, Liposome・IL-2 作製に 75×10⁴ JRU) を

加え, 4×10⁵ g にて超高速遠沈後, 沈殿 Liposome を蒸留水 2 cc で攪拌し用いた。この方法により Liposome・IL-2, Lipo・DG・IL-2 を作製した。今回用いた IL-2, Liposome・IL-2, Lipo・DG・IL-2 の各製剤中の IL-2 投与量は封入率を考慮し 2×10⁴ JRU/100 μl と調整し門脈内, 尾静脈内に 1 回注入した。

5. Liposome 製剤における粒子径および IL-2 封入率の測定

5.1. 逆相蒸発法を用いて作製した Liposome 製剤の IL-2 封入率の測定

Liposome・IL-2 製剤に -20°C に冷却した acetone を加えて十分に攪拌した後, 3×10³ rpm 10 分遠沈し, 沈殿物に蒸留水 1 ml を加えそのうち 100 μl を Interleukin-2 [¹²⁵I] assay system (RPA531, Amersham, England) を用いて測定し, Liposome・IL-2 作製時の IL-2 使用量と比較し算出した。

5.2. 凍結乾燥 Liposome 製剤の IL-2 封入率の測定

¹²⁵I-IL-2 (2×10⁶ cpm/100 μl) に recombinant IL-2 を加えた約 50 度に加熱したものを凍結乾燥 Liposome に加え, 超遠沈 6 時間 (4×10⁵ g) 後, 上澄み液と沈殿 Liposome の放射比活性の差より求めた。

5.3. 粒子径の測定

重量平均径を大塚電子 DSL-700 を用いて測定した。

6. Galactose 残基の Liposome 表面への修飾⁵

Galactose 残基が多価のレクチン (Agglutinin RCA 120 L-7886, Sigma, USA) と結合することを利用し吸光度 450 にて測定した。

Liposome および Lipo・DG 製剤を PBS にて総脂質量として 0.5 mM に希釈した溶液と, 多価レクチンを PBS にて 200 μg/ml に調整した溶液を混合し 15 分間放置後, 450 nm の吸光度で測定した。

7. Liposome・IL-2 製剤の経時的臓器分布の測定

¹²⁵I-IL-2, ¹²⁵I-IL-2 封入 Liposome, ¹²⁵I-IL-2 封入 Lipo・DG 製剤 (各 8×10⁴ cpm/100 μl) をマウスの門脈内, 尾静脈内に注入後 2 日目, 4 日目, 7 日目, 14 日目, 20 日目の肝臓, 脾臓, 腎臓, 肺臓, 甲状腺を摘出し, 単位重量当りの放射比活性を測定した。

8. 脾臓リンパ球の採取

C3H/He マウスをエーテル麻酔下に, 脾臓を摘出し細切後細胞浮遊液を作製し, PBS 液で 3 回洗浄した後リンパ球分離液 (Ficoll-Paque, Pharmacia, Sweden.) を用いて遠沈 (2500 rpm 30 分) 後採取し

た。

9. 肝類洞内リンパ球の採取

Wiltrout⁶らの方法に準じ、肝灌流法を用いて肝類洞内リンパ球を採取した。まずエーテル麻酔後腋窩動静脈を切離し犠死させる。次に門脈内に27G針を挿入し下大静脈にカニューレ後結紮、上大静脈結紮切離後PBSを高圧(30 cmH₂O)にて送液し下大静脈カニューレ後より灌流液を回収した。灌流液をFicoll-Isopaque 30 ml (DDW 158 ml と Isopaque440 (鳥居薬品社, 東京) 40 ml と Ficoll400 : Pharmacia 社9.72 g の合計を200 ml としオートクレーブ15分間かけたもの。)に重層し、遠沈2500 rpm 30分後中間層(白濁部)を採取し、細胞数を測定した。

10. 肝類洞内リンパ球および脾臓リンパ球の抗腫瘍活性の測定⁷

標的腫瘍細胞 5×10⁶ cell/ml を Na₂CrO₄ (NEZ-030S, New England Nuclear, MA, 390 mCi/mgCr.) 100 μCi にて標識(37°C 1時間)した後PBS液で3回洗浄し遊離⁵¹Crを完全に除去したのち、細胞培養液で10⁶ cell/ml の濃度に調整して標的細胞とした。エフェクター細胞として脾臓リンパ球ならびに肝類洞内リンパ球を使用し、10⁴ cell の標的細胞を種々の比率(10:1~40:1)のエフェクター細胞とともに10% FCS 添加 RPMI-1640 培養液中で混合し、96穴丸底マイクロプレートにて(37°C, 5% CO₂)培養した。natural killer(NK)活性は YAC-1 を標的細胞として4時間, natural cytotoxic (NC) 活性は Colon26 を標的細胞として16時間, 培養した。その後2,000 rpm, 10分間遠沈(RL-500SP, 株式会社精工, 東京)し、各ウェルの上清を100 μl 採取して放射活性をアロカオートウェルガンマシステム (ARC-251, アロカ社, 東京) で測定した。

各群の細胞障害活性(%)は次式によって算出した。

$$\% = \frac{\text{試料解離 (c.p.m)} - \text{自然解離 (c.p.m)}}{\text{最大解離 (c.p.m)} - \text{自然解離 (c.p.m)}} \times 100$$

11. マウス各肝転移モデルの作製

11.1. 対照の作製

C3H/He マウスにエーテル麻酔下で X5563 形質細胞腫を10⁶ cells/100 μl 門脈内注入し、その後4日目, 7日目, 14日目に肝臓を摘出し重量を測定し標準腫瘍増殖曲線を作製した。

11.2. 微小肝転移治療モデルの作製

C3H/He マウスにエーテル麻酔下で X5563 形質細胞腫を10⁶ cells/100 μl 門脈内注入後、微小肝転移形成時期である4日目に IL-2, Liposome・IL-2, Lipo・DG・IL-2 製剤(2×10⁴ JRU/100 μl)を門脈

および尾静脈より注入し、その後4日目, 7日目, 14日目の肝臓を摘出し重量を測定し腫瘍増殖曲線を作製した。

11.3. 肝転移予防モデルの作製

IL-2, Liposome・IL-2, Lipo・DG・IL-2 製剤(2×10⁴ JRU/100 μl)をエーテル麻酔下で C3H/He マウスの門脈内, 尾静脈内に注入後、肝類洞抗腫瘍リンパ球活性が確実に上昇を認める4日目に, X5563 形質細胞腫細胞を10⁶ cells/100 μl 門脈内注入後4日目, 7日目, 14日目の肝臓を摘出し重量を測定し腫瘍増殖曲線を作製した。

12. 肝転移組織の Hematoxylineosin (H.E) 染色および面積評価

経時的にマウス転移モデルの肝臓を摘出, H.E 染色を施行し, プレパラートを写真におさめ方眼紙を用いて肝断面および、腫瘍占拠部位の断面積の総和を求め、その百分率比⁹(腫瘍/肝面積比)により経時的肝転移率を定量評価した。

13. 統計処理

マウスの実験では測定数値は平均値±標準偏差(mean±SD)で表し、有意差検定には Student's t-test を用い、P<0.05で有意差ありと判断した。

結 果

1. Liposome 製剤への Galactose 残基の露出

多価 Lectin が Galactose 残基と結合することを利用して本製剤の外膜に Galactose 残基が露出していることを確認した。吸光度450の測定値が高値であることは Galactose 残基が多価 Lectin と結合していることを示しており、今回吸光度450を用いて測定した各製剤の値はそれぞれ、Liposome 製剤では 0.24±0.007, Lipo・DG 製剤では 0.41±0.01, Liposome・IL-2 製剤では 1.23±0.25, Lipo・DG・

表1 各種 Liposome 製剤の粒子径および IL-2 封入率

	担体基剤	粒子径	封入率
A	Egg PC+Cholesterol+ stearylamine+ galactose	230 nm	4.2%
B	Egg PC+Cholesterol +Dimyristoylphosphatidylglycerol	126 nm	61.6%
C	Egg PC+Cholesterol +Stearylamine	133 nm	45.8%
D	Dimyristoylphosphatidylglycerol +Cholesterol	112 nm	73.9%
E	Dimyristoylphosphatidylglycerol +Cholesterol +Digalactosyldiglyceride	92 nm	50.0%

製剤 A, B, C は逆相蒸発法, 製剤 D, E は凍結乾燥法を用いて作製した。

IL-2 製剤では 1.45 ± 0.02 であり Lipo・DG 製剤, Lipo・DG・IL-2 製剤においていずれも対照に比較して有意に高値を示した ($P < 0.01$) (図1).

2. 各種作製 Liposome 製剤の粒子径および IL-2 封入率

逆相蒸発法を用いて作製した製剤は, 表1のA, B, Cに示したように IL-2 封入率はそれぞれ4.2%, 61.6%, 45.8%と比較的低く, 粒子径も230 nm,

126 nm, 133 nm と不均一であった。

一方, 凍結乾燥法を用いて作成した製剤D, Eの粒子径は114 nm, 92 nm と比較的均一な値を示し, IL-2 封入率もそれぞれ73.9%~50.0%と高値であった。

3. 臓器集積率の経時的变化

各薬剤注入後20日間における各臓器集積においては IL-2, Liposome・IL-2 製剤は腎臓, 肝臓, 脾臓,

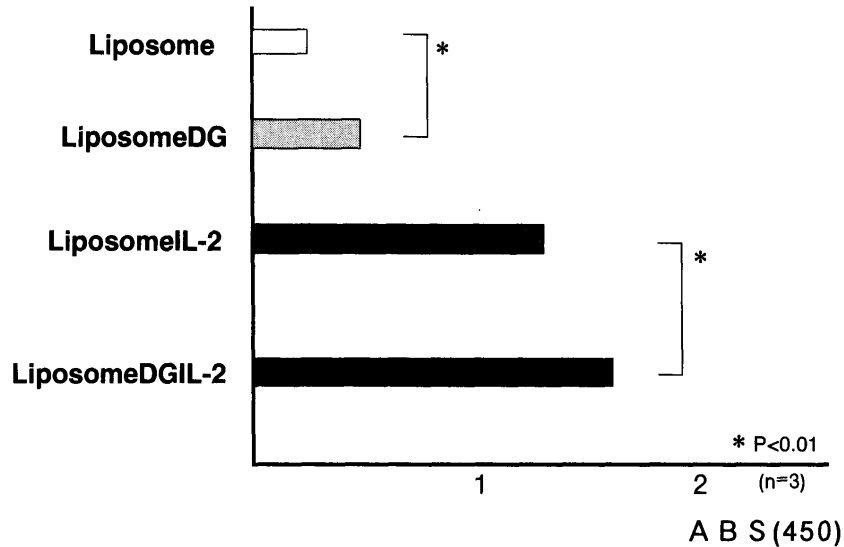


図1 各種 Liposome 製剤表面における Galactose 残基修飾の比較
Galactose 残基が多価 Lectin と結合することを利用し吸光度450にて測定した。

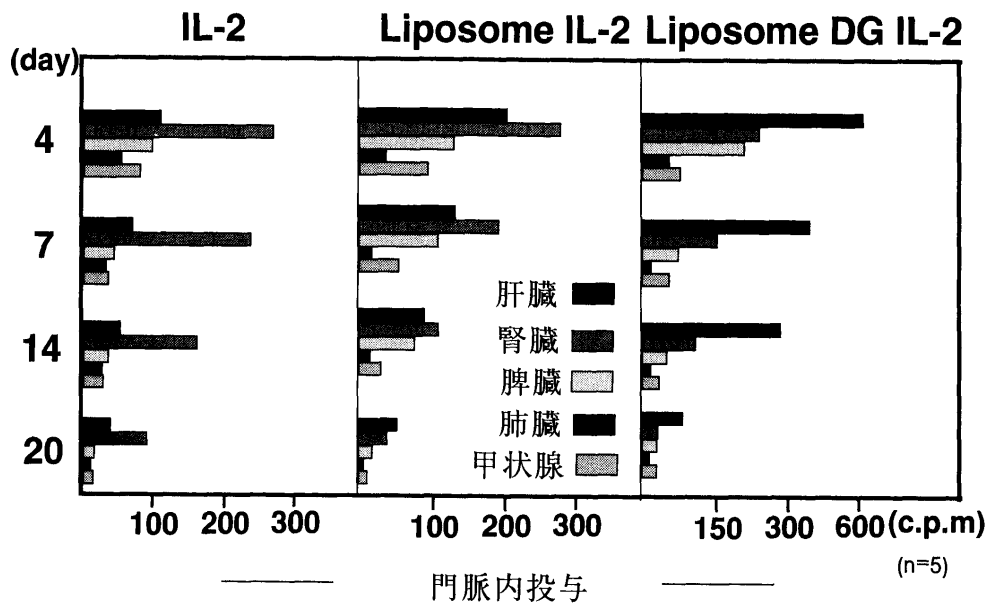


図2 各種 Liposome 製剤門脈内投与後の経時的臓器分布
マウス門脈より方法に準じて各種 ^{125}I -IL-2 製剤を注入し4日目, 7日目, 14日目, 20日目における各臓器を摘出し放射活性を測定した。

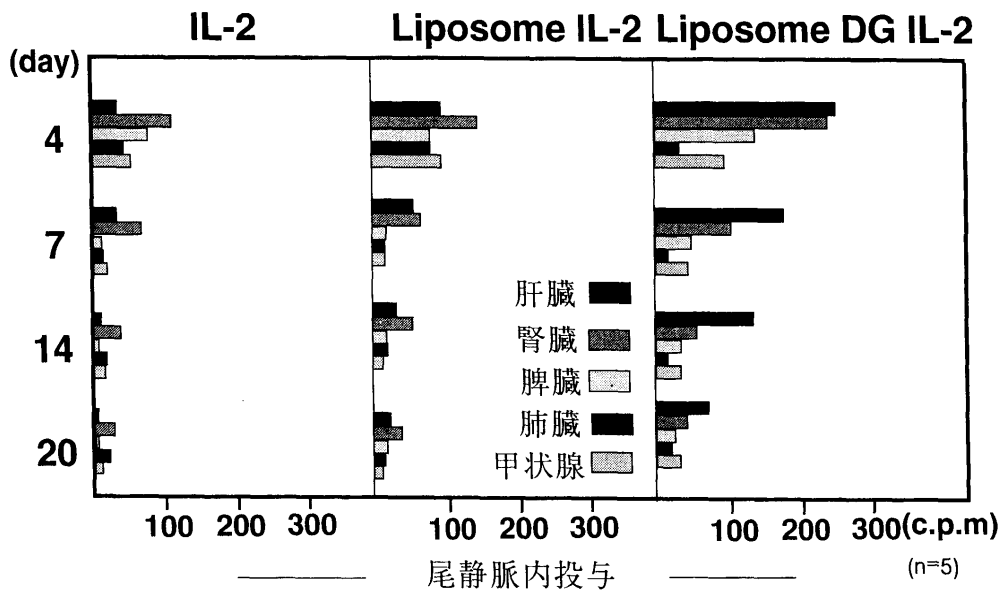


図3 各種 Liposome 製剤静脈内投与後の経時的臓器分布
マウス尾静脈より方法に準じて各種 ¹²⁵I-IL-2 製剤を注入し4日目, 7日目, 14日目, 20日目における各臓器を摘出し放射活性を測定した。

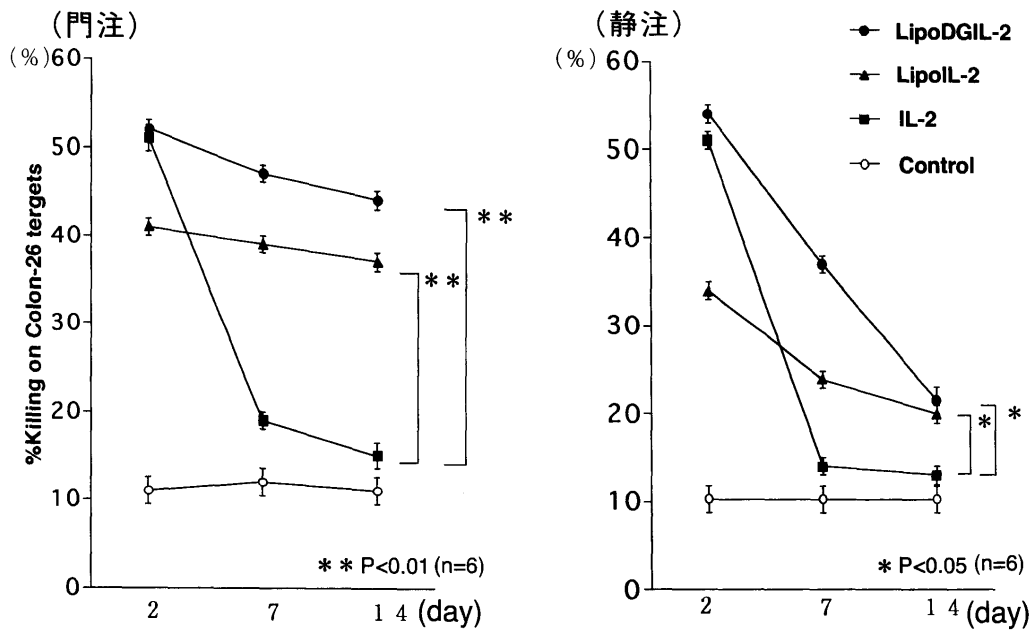


図4 各種 IL-2 製剤門脈内, 尾静脈内投与後の経時的肝リンパ球 NC 性の比較
標的細胞に Colon 26 細胞を用いて16時間 ⁵¹Cr release assay 法にて測定した。Effector/Target ; 40 : 1 Student's t-test : P < 0.05 を有意差ありとした。

甲状腺, 肺臓の順に集積を認めましたが, Lipo・DG・IL-2 製剤では肝臓, 腎臓, 脾臓, 甲状腺, 肺臓の順に14日目におけるまで尾静脈内, 門脈内いずれの投与経路においても, 明らかに肝臓に高い集積を認めた(図2)(図3)。

4. 肝リンパ球抗腫瘍活性

4.1. Colon26 結腸癌細胞に対する抗腫瘍効果

E/T=40/1における各製剤門脈内, 尾静脈内投与経路の比較において, IL-2 単独では両投与経路ともに経時的に著しい活性の低下を示したが,

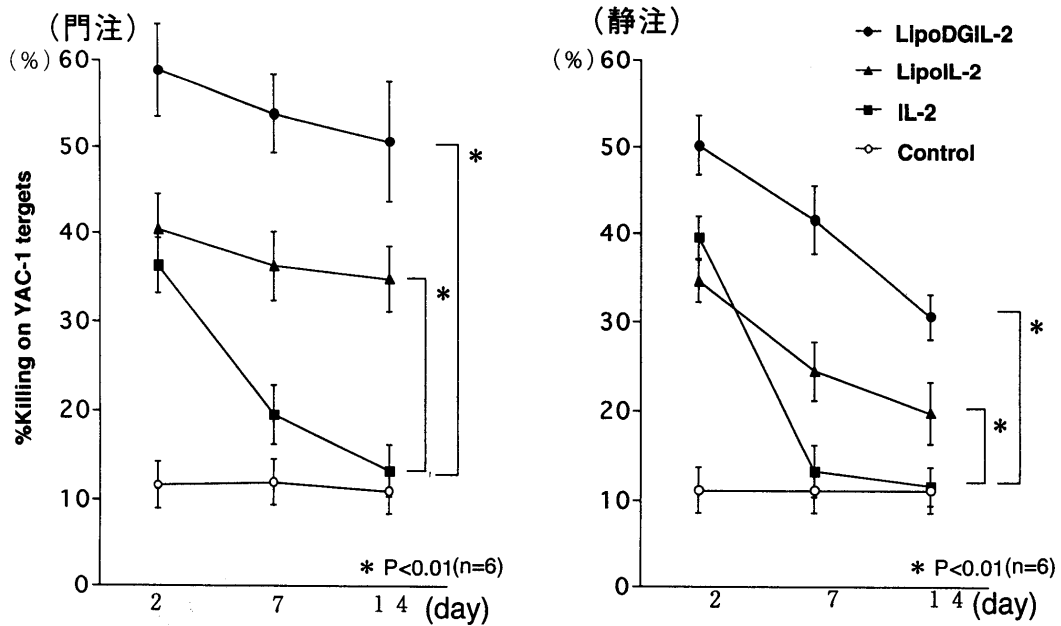


図5 各種IL-2製剤門脈内、尾静脈内投与後の経時的肝リンパ球NK性の比較
 標的細胞にYAC-1細胞を用いて4時間⁵¹Cr release assay法にて測定した。Effector/Target; 40:1 Student's t-test: P<0.05を有意差ありとした。

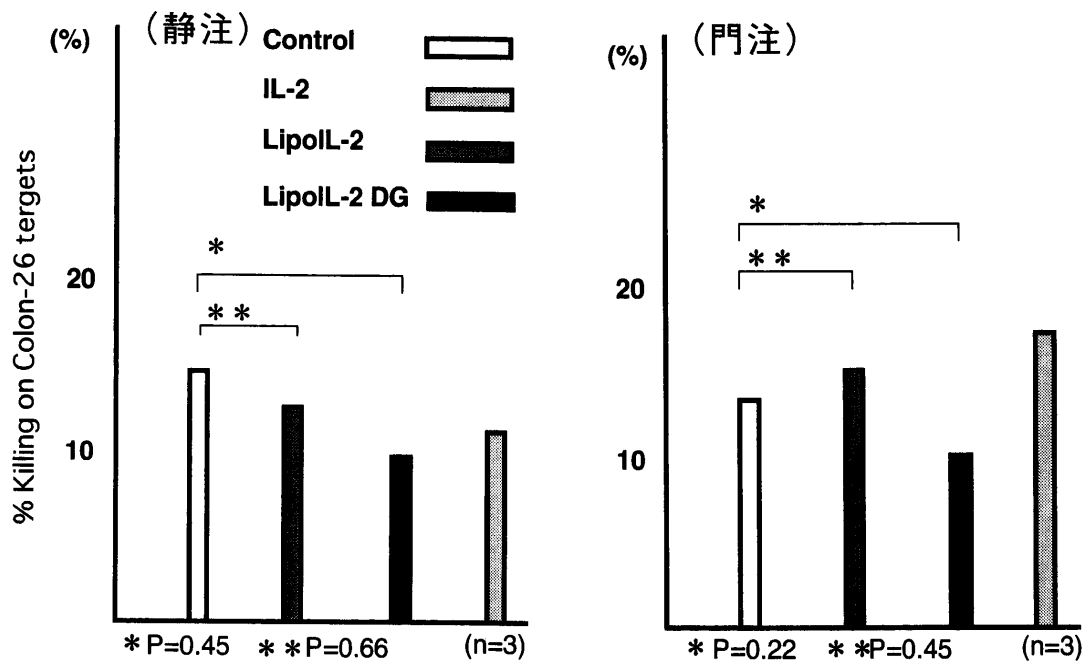


図6 各種IL-2製剤門脈内、尾静脈内投与後14日目における脾臓リンパ球NK活性の比較
 標的細胞にColon 26細胞を用いて16時間⁵¹Cr release assay法にて測定した。Effector/Target; 40:1 Student's t-test; P<0.05を有意差ありとした。

Liposome・IL-2, Lipo・DG・IL-2 製剤の門脈内投与では, IL-2 単独投与に比べ14日間わずかな低下傾向を示したものの, 対照に比較して有意に高い抗腫瘍活性の持続を認めた ($P < 0.01$) (図4).

Liposome・IL-2, Lipo・DG・IL-2 製剤の尾静脈内投与においても, 門脈内投与に比べ経時的に活性の低下傾向を認めるものの IL-2 単独投与に比較し14日間高い抗腫瘍活性が持続した ($P < 0.05$) (図4).

4.2 YAC-1 腫瘍細胞に対する細胞障害活性

E/T=40/1における各製剤門脈内, 尾静脈内投与群の Natural Killer (NK) 活性の比較において Lipo・DG・IL-2 製剤は, いずれの投与経路においても, IL-2 単独投与と比較し14日間有意に高い抗腫瘍

活性の持続を認めた ($P < 0.01$) (図5).

5. 脾リンパ球抗腫瘍活性

各製剤門脈内, 尾静脈内後14日目における脾臓リンパ球の抗腫瘍活性において両投与経路ともに Liposome・IL-2, Lipo・DG・IL-2 製剤投与は IL-2 単独投与と比較して有意差を認めず低い活性を示した (図6).

6. 微小肝転移に対する抗腫瘍効果

各種薬剤を門脈内投与し, その後経時的な抗腫瘍効果を観察したところ Lipo・DG・IL-2 製剤投与が対照に比較し, 薬剤投与後14日目に有意な増殖抑制効果を認めた ($P < 0.01$) (図7).

薬剤の尾静脈内投与においても Lipo・DG・IL-2 製剤投与が対照に比較し, 薬剤投与後14日目に有意

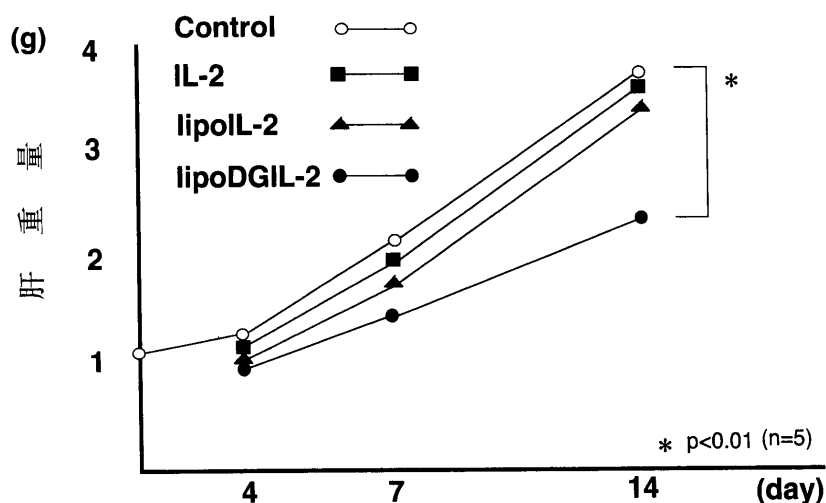


図7 各種 IL-2 製剤門脈内投与における微小肝転移抑制効果の比較
各製剤投与後経時的に肝臓を摘出し重量を比較した。

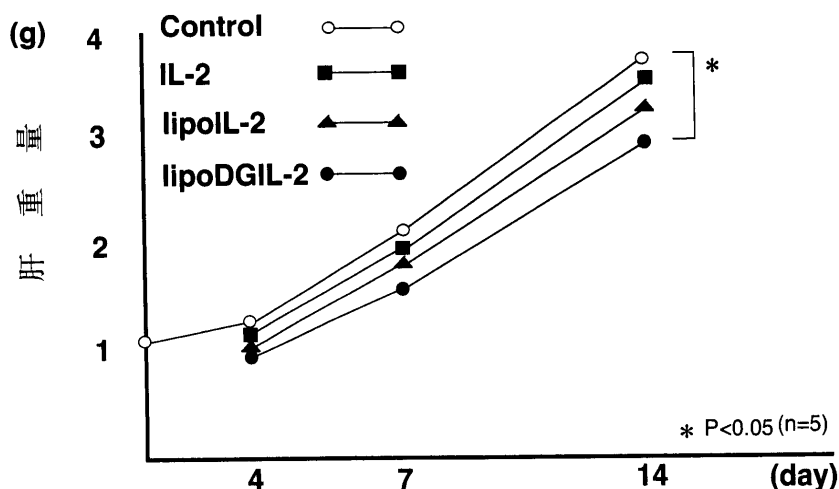


図8 各種 IL-2 製剤尾静脈内投与における微小肝転移抑制効果の比較
各製剤投与後経時的に肝臓を摘出し重量を比較した。

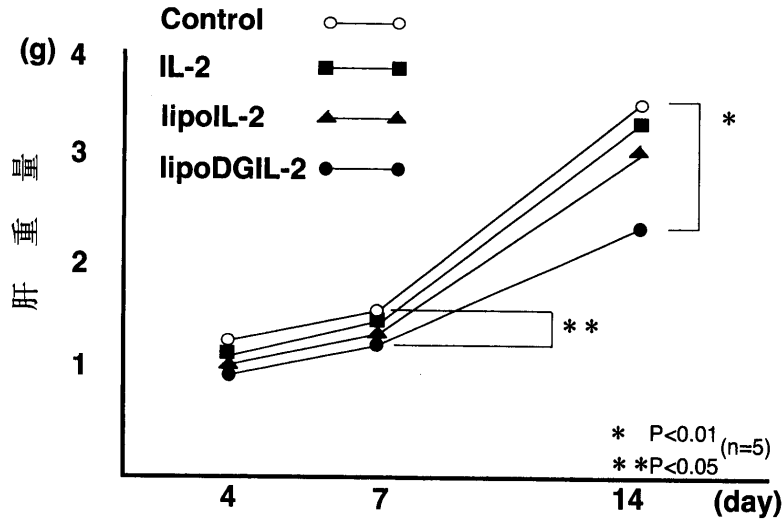


図9 各種 IL-2 製剤門脈内投与における肝転移予防効果の比較
各製剤投与後経時的に肝臓を摘出し重量を比較した。

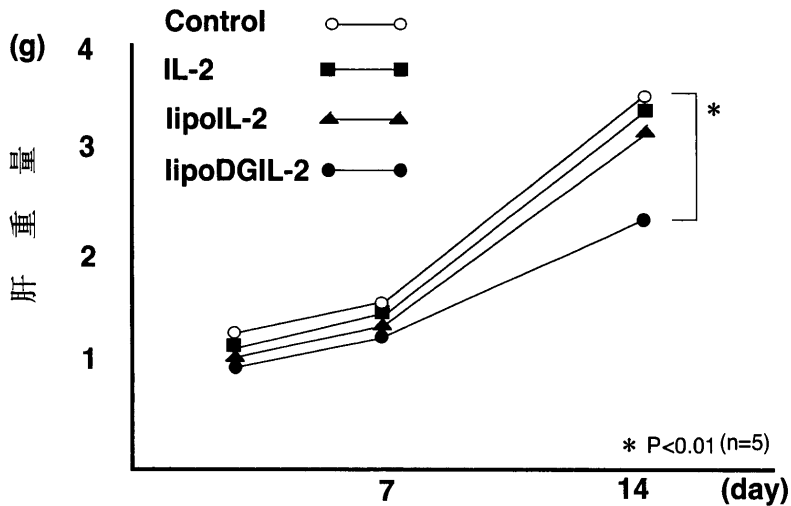


図10 各種 IL-2 製剤尾静脈内投与における肝転移予防効果の比較
各製剤投与後経時的に肝臓を摘出し重量を比較した。

表2 各 IL-2 製剤門脈内、静脈内投与後14日目における肝転移予防、抑制効果の面積評価における比較

	転移予防効果 門注	転移予防効果 静注	微小転移抑制効果 門注	微小転移抑制効果 静注
Control	84.2±9.7*	86.3±8.7*	87.3±5.0*	82.0±7.0*
IL-2	83.8±11.0	81.3±10.6	82.2±7.8	85.2±8.6
LipoIL-2	78.8±11.0	76.3±10.6	77.7±7.6	82.2±8.6
LipoDGIL-2	73.8±11.0**	73.3±10.6**	67.6±7.6**	74.5±8.6**

***p<0.01 (n=5)

な増殖抑制効果を確認した (P<0.05) (図8)。

7. 各種薬剤前投与による腫瘍転移予防効果

各製剤を腫瘍移植前に投与する予防モデルにおいて、Lipo・DG・IL-2 製剤の門脈内投与では7日目、14日目において対照に比較し有意な増殖抑制効果を

認め(P<0.05, P<0.01), 尾静脈内投与では Lipo・DG・IL-2 投与が14日目において対照に比較し有意な増殖抑制効果を確認した (P<0.01) (図9) (図10)

8. 各製剤投与後14日目における肝転移組織の H.E 染色による面積評価

8.1. 予防的各種薬剤門脈内投与では Lipo・DG・IL-2 製剤投与では73.8±11.0%, 対照では84.2±9.7%と有意差を認め (P<0.01), 尾静脈内投与においても Lipo・DG・IL-2 製剤投与では73.3±10.6%, 対照では86.3±8.7%と有意差を認めた (P<0.01).

8.2. 微小肝転移治療における各種薬剤門脈内投与群では Lipo・DG・IL-2 製剤投与では67.6±7.6%, 対照では87.3±5.0%と有意差を認め (P<0.01), 尾静脈内投与においても Lipo・DG・IL-2 製剤投与では74.5±8.6%, 対照では82.0±7.0%と有意差を認め (P<0.01) た (表2).

考 察

Interleukin-2 (IL-2) は1976年 Morgan⁹ らにより phytohemagglutinin (PHA) 刺激ヒト末梢血リンパ球培養上清中に存在する Tリンパ球増殖因子 (TCGF) として報告された Cytokine の一種である。その後 Grim¹⁰ らによりリンパ球を IL-2 存在下に培養することにより natural killer (NK) 非感受性細胞に対しても強く広い細胞障害活性を示す lymphokine activated killer (LAK) 細胞が誘導されることが示され, IL-2 は新しい biological response modifier (BRM) として癌治療の臨床応用に大きな期待を寄せられるようになった。

Rosenberg¹¹ ら米国国立癌センター (NCI) グループが中心となってあらゆる進行癌患者に対して IL-2 単独または IL-2, LAK 細胞併用療法が試みられ, その結果悪性黒色腫や腎癌, 大腫瘍などに有効例が認められたものの, 大量投与に伴う副作用も明らかとなり, 当初期待されていたほどの成果が得られなかった経緯がある。その理由の一つは IL-2 の血中半減期が極めて短いため大量投与を余儀なくされた側面があり, われわれはこの反省から治療対象とする疾患を限定し, IL-2 の効果的な投与法をめざしてきた。その適切な疾患の一つは, 大腸癌肝転移である。肝転移は大腸癌の約50%~60%に発生¹² する最も一般的な転移様式で, しかも予後を規定する極めて重要な因子である。また肝転移巣は本来経門脈的に形成されるが着床した後の発育はその90%が肝動脈からの血液供給を受けると言う理論的根拠¹³ から IL-2 の肝動脈内局所投与が極めて有効と考えられる。さらに肝臓には生理的に抗腫瘍効果を持つ免疫担当細胞が豊富に存在し, しかも腫瘍が存在する場合には抗原としての癌細胞や腫瘍浸潤リンパ球, tumor infiltrating lymphocyte (TIL) も存在するなど, 生体内 killer 細胞誘導の「場」としてきわめて適しており, 肝血管内に選択的に IL-2 を持続的に投与すれば, 全身投与のように多量の IL-2 を使

用しなくとも, 高濃度の IL-2 を肝内の IL-2 応答細胞に分布させることができるため, 副作用も軽減され, しかも強い抗腫瘍活性を持った killer 細胞が肝内に誘導される可能性が考えられる。肝には本来網内系の70%を占める Kupffer 細胞が存在し, 門脈系のフィルターとして作用し, また pit cell と呼ばれる肝独特の NK 細胞も存在する¹⁴. pit cell は NK 感受性の腫瘍のみならず, NK 抵抗性の固形癌をも殺す活性のあることが見出され肝局所のバリアーとしての意義がにわかに注目を浴びている。近年安保¹⁵ は肝臓内で, 胸腺とは異なる独自の T細胞分化が起こる経路があることを報告しており, 肝臓内 T細胞の特徴は 1) CD4.8 がいずれも negative の比率が高い。2) T細胞レセプターは $\gamma\delta$ 型の占める比率が高く, $\alpha\beta$ 型も発現様式からみると中間型が多い事などがあげられる。肝類洞内 T細胞も Pit cell も IL-2 レセプターを介して IL-2 によって増殖し, その活性が増強されるし, 腫瘍組織に浸潤した T細胞 (TIL) も同様であると考えられる¹⁶。またこれらの肝類洞内抗腫瘍リンパ球を活性化するために IL-2 肝動注投与は全身投与に比較して, 肝転移にはきわめて有効な方法といえる。しかしながらいぜん IL-2 の短い血中半減期のために来院回数が多く, 患者の Quality of Life (QOL) を損ねている。そこでわれわれは IL-2 の欠点とも言える短い血中半減期¹⁷ を克服し, IL-2 の薬理効果を肝臓で特異的に発揮させるために Drug Delivery System に着目した。その作用¹⁸ は大別すると 1) 薬物の吸収性改善 2) 薬物の放出制御 (delivery control) 3) 薬物の標的指向化 (targeting) の3点にわけられる。

1) は吸収促進剤やプロトドラッグを用いて薬物が投与部位から循環血中に移行する吸収過程の障壁を克服するものであり, 難吸収性薬物である抗生物質や生理活性ペプチドの吸収改善が試みられている, いわゆる passive targeting であり, 2) は薬物の血中濃度をなるべく長時間治療域に維持するために, 各種剤型を用いて薬物の放出を制御することである。3) は高分子物質, 微粒子, 細胞等を薬物運搬体として用い, 癌, 炎症部位等の生体の病巣部位に選択的に薬物を送達させるものでありいわゆる active targeting であり, 代表的担体として Liposome が広く臨床応用¹⁹⁻²¹ されている。Liposome の特色²² は, 1) 生体膜に大量に存在するリン脂質, コレステロールなどを主成分とするため, 毒性が少なく, 異物として働く可能性も少ない。2) 生体内に Liposome を構成する分子を分解処理する系を持っている。3) 再構成膜であるので, 構成脂質分子の種類や構成比, 荷電を容易に変えられる。また

大きさや封入物質を変えるなどの条件の変更が広い範囲で行え、最適化条件を容易に求めることが可能である。4) 薬剤については、直接化学修飾する必要がないので、現在市販されている薬品を用いればよく、臨床応用、実用化への過程が短く、また脂溶性、水溶性いずれの薬物もカプセル化できる。5) 脂質二分子膜で外界から隔離されているため、酸素などの生理活性をもつ物質が血液中で不活化されることを防ぐことができる。またそれと同時に封入した物質が免疫機構により異物として認識される可能性も低くなる。6) 組織障害性や、毒性がカプセル化することにより軽減される。7) 抗体やレクチン、糖脂質などを Liposome 表面に組み込むことにより、特定の組織または細胞に対して指向性を持つ Liposome が作製できる、などがあげられる。

そこで今回われわれは肝臓に多く存在するとされる Galactose receptor に注目し、これを介することにより肝臓への理想的 Active targeting を可能にする糖修飾 Liposome の作製に成功した。

Galactose receptor の特徴⁵として 1) 肝細胞をはじめとして生体内における受容体の分布がかなり明確である。2) リガンドの受容体への親和性が高く、血中濃度の低い状態においても結合可能である。3) 受容体は再利用が可能であり、そのリサイクル速度も速く、ダウンレギュレーションも受けにくい。4) リガンドと受容体とが結合しても、細胞の生理状態は変動しにくい、などがあげられる。

今回われわれが最初に用いた逆相蒸発法で作製した Liposome 製剤は、一回作製量が大変少なく、薬物封入率が低率であり製剤径も不均一なものであった。これらの原因として 1) 基剤に用いた Stearylamine の作用により、Liposome 製剤表面の膜電荷が positive charge となることで封入率を低下させること。2) Egg PC を用いることにより Galactose 残基の Liposome 製剤表面への修飾率を低下させること、3) 逆相蒸発法において使用する器具では、作製時間を要する割には量産には限度があること、などが考えられた。これらの点を改善すべく新たに製剤作製法として凍結乾燥法を用いて、基剤としては 1) を改善すべく基剤に cholesterol を用いることにより Liposome 表面膜電荷を neutral charge とし、2) を改善すべく基剤として糖タンパクである dimilystoyl phosphatiglycerol を用いた。

これらの改善において、作製した Liposome 製剤の作製量は量産可能となり、IL-2 封入法も前述のごとく簡便となり、封入率も 50~70% と高率なものとなった。製剤径も 100 nm 前後と肝類洞壁細胞間孔と

類似した大きさに調整が簡便であり、理論的に Galactose receptor との結合率を上昇させるものであると考えられた。

Galactose 残基が多価レクチンと結合することを利用し、各製剤と多価レクチンとの混合溶液を吸光度 450 を用いた値の測定結果では、Liposome, Lipo・DG 間及び、Liposome IL-2, Lipo・DG・IL-2 間に有意差を認め明らかに、各 Lipo・DG 製剤に Galactose 残基が修飾されていると考えられた。なお Liposome・IL-2 の測定値が Lipo・DG 値よりも高値であるがこれは IL-2 を Liposome 製剤に混合したばあい混合溶が軽度混濁（白濁）することによって考えられた。

各製剤の経時的各臓器分布において、Lipo・DG・IL-2 製剤が 14 日間にわたり、高率に肝臓への持続集積性を示し、これは galactose 残基である digalactosyl diglyceride (DG) を Liposome 製剤表面に修飾することにより、Lipo・DG・IL-2 製剤が肝細胞表面に存在するとされる galactose receptor と特異的に結合するゆえであると考えられた。IL-2, Liposome・IL-2 は腎臓にも多く集積を認めたが、Lipo・DG・IL-2 は肝臓以外の他臓器への集積は低率であり、これは IL-2 の代謝臓器である腎臓を回避する意味でも効果的な薬剤であると考えられた。

事実 Lipo・DG・IL-2 製剤を用いた肝転移予防及び、微小肝転移抑制における *in vivo* 実験において、この製剤の門脈内投与のみならず尾静脈内投与において有意な予防効果、微小肝転移抑制効果が認められた。なお Lipo・DG・IL-2, Liposome・IL-2 の門脈内、尾静脈内両投与における経時的肝重量測定において、明かな変化（減少）は認めなかった。

Bouwens ら²³ は、IL-2 投与は肝臓内において抗腫瘍活性をつかさどる Pitt cell を活性化させるとしており、また Joffret ら²⁴ は、Liposome・IL-2 を投与することにより CTLL (cytotoxic T lymphocyte) 活性が増強されるとしている。また Adibzades ら²⁵ は Liposome・IL-2 を投与することにより T cell cloning を刺激し、*in vitro* において LAK 細胞を誘導し、また OKT₄, OKT₈ 陽性細胞を増殖させると述べている。

今回作製した Liposome・DG・IL-2 製剤を用いることにより IL-2 に肝臓特異的集積性を獲得させ、また肝局所において IL-2 封入 Liposome より徐放性に IL-2 が放出されることにより、上記の肝臓内抗腫瘍リンパ球活性が持続的に活性化され、肝転移増殖抑制効果を示したと考えられた。

以上のことから Lipo・DG・IL-2 製剤は、IL-2 に徐放性を獲得させる事により短い IL-2 の血中半減

期を延長させ、IL-2 の効果を持続的に標的臓器である肝臓に与えることができると考えられた。今後は本製剤の臨床応用をめざして、さらに研究を進めるとともに、この手法を用いて Cytokine や化学療法剤の臓器特異的な Targeting therapy への応用を考えていきたい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲賜りました、近畿大学第1外科学教室 安富正幸教授に深く謝意を表するとともに、御協力いただきました同教室各兄に厚く御礼申し上げます。

本研究の要旨は第5回 JBRM 学会学術集会総会(平成4年12月10日、岡山)、第31回日本癌治療学会総会(平成5年10月27日、大阪)、第32回日本癌治療学会総会(平成6年10月5日、岡山)、第16回癌局所療法研究会(平成6年6月3日、富山)、第16回癌免疫外科研究会(平成7年5月25日、富山)、第33回日本癌治療学会総会(平成7年9月20日)において発表した。

文 献

1. 奥野清隆, 安富正幸 (1993) IL-2 による大腸癌肝転移の治療. 外科 10: 1093-1098
2. 奥野清隆 (1995) 化学療法とサイトカイン併用療法の現状と展望. Biotherapy 1: 40-46
3. Ashwell G, Morewell A.G. (1974) The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. AdvEnzymol 41: 99-128
4. 菊池 寛, 井上圭三. (1983) リポソーム. 細胞工学 9: 61-75
5. 砂本順三, 佐藤智典 (1989) 細胞特異性リポソームの開発とその応用. 日本化学雑誌 2: 161-173
6. Wiltout RH, Mathieson BJ, Talmadge JE (1984) Augmentation of organ-associated natural killer activity by biological response modifiers. J Exp Med 160: 1431-1449
7. 奥野清隆, 水落利明, 藤原大美 (1982) キラー T 細胞の誘導 (in vitro sensitization) とその活性測定 (cytotoxicity test). 日本免疫学会編. 免疫実験操作法 XI. 金沢: 金沢大学癌研究所発行; 3551-3563
8. 石田秀行, 岩間毅夫, 西岡良薫, 大久保靖, 今城真人, 三鳥好雄 (1992) 肝転移予防に対する持続門脈化学療法の実験的検討. 日消外会誌 25: 44-48
9. Morgan DA, Ruscetti FW, and Gallo R (1976) Selective invitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science 193: 1007-1008
10. GRIMM EA, MAZUMDER A, ZHANG HZ, ROSENBERG SA (1982) LYMPHOKINE - ACTIVATED KILLER CELL PHENOMENON. Journal of Experimental Medicine 155: 1823-1841
11. Resenberg SA (1991) Adoptive cellular therapy: clinical applications (In) Biologic Therapy of Cancer (ed.) JB Lippincott Company Philadelphia: 214-236
12. Kemeny N, Daly J (1987) Intrahepatic or systemic infusion of fluorodeoxyuridine in patients with liver metastasis from colorectal carcinoma, a randomized trial. Ann. Intern 107: 459-465
13. Taylor J, Bennet R, Sheriff S (1979) The blood supply of colorectal liver metastases. Br. J. Cancer 39: 749-756
14. 織田正也, 塚田信廣, 小松弘一, 土屋雅春 (1985) 肝類洞壁細胞の形態と機能. 肝胆膵 10: 181-198
15. 安保 徹, 渡辺久実. (1992) 胸腺外 T 細胞の分化と増殖. 感染・炎症・免疫 22: 209-219
16. 碓 彰一 (1990) 門脈内 IL-2 持続投与による肝転移増殖の抑制と肝臓内単核球の細胞傷害活性の増強. 山口医学 39: 401-411
17. Ohnishi H, Okuno k, Koh K, Yasutomi M (1990) The serum half-life of exogenous human recombinant interleukin-2 in a dog model. Acta Med Kinki Univ 15: 97-103
18. 山本 昌, 村西昌三 (1993) DDS の概念. 外科治療 69: 139-145
19. 山本正幸, 瀬川 徹, 石田 享, 門原原留夫, 井沢邦英, 角田 司, 土屋涼一, 権藤禎彦, 大畑教昭, 石井伸子, 小路敏彦, 森口信弘, 佐藤智典, 秋吉一成, 砂本順三 (1991) ガラクトース残基を有する多糖被膜リポソームを用いた肝癌化学療法への基礎的検討. Drug Delivery System 6: 355-359
20. Loeffler CM, Platt JL, Katsanis E, Ochoa JB, Urba WJ, Longo DL, Leonard AS, Ochoa AC (1991) Antitumor Effect of Interleukin-2 Liposomes and AntiCD3-Stimulated T-Cells against Murine MCA-38 Hepatic Metastasis. CANCER RESERCH 51: 2127-2132
21. Konno H, Yamashita A, Tadakuma T, Sakaguchi S (1991) Inhibition of growth of rat hepatoma by local injection of liposomes containing recombinant interleukin-2. Biotheraph 3: 211-218
22. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三編. リポソーム. 東京: 南江堂
23. Bouwens L, Marinelli A, Kuppen PJK, Errermont AMM, Vav de velde CJH, Wisse E (1991) Pit cell and kupffer cell reactions in rats treated with systemic or hepatic continuous infusion of interleukin-2. Cells of the Hepatic Sinusoid 3: 306-311
24. Joffert Marie-Line, Morgeaux Sylvie, Leclerc Claude, Oth Daniel, Zanetti Carlos, Sureau Pierru, Perrin Pierre (1990) Enhancement of interleukin-2 activity by Liposome. Vaccine 8: 385-389
25. Adizadeh Medi, Biol Dipl, Weder HG, Rehbein A, Schwulera Udo, Obermeier J, Pawelec Graham (1992) Activity of Liposomal interleukin-2 in vitro. Mol Biother 4: 24-28