セファランチン含有リポソームのマクロファージ
貪食能に及ぼす影響

篠田健一・佐藤 均・足立伊佐雄・堀越 勇*

Effect of cepharanthine-containing liposomes on the phagocytotic activity of peritoneal macrophages

Cepharanthine (CEP) is reported to be effective in prevention of immune suppression and leukopenia induced by administration of antitumor agents. In this study, we examined relationship between the phagocytotic activity of peritoneal macrophages and the immuno-modulating action of CEP-incorporating liposomes composed of egg phosphatidylcholine and cholesterol in a molar ratio of 7:2.

Multilamellar liposomes (MLV) were prepared by vortexing dried lipid films, and small unilamellar liposomes (SUV) by ultrasonication of MLV. Antigen (pneumococcal polysaccharides) and CEP-containing liposomes were injected intraperitoneally to BALB/c mice, and peritoneal macrophages were collected at designated times. The phagocytotic activity of the peritoneal macrophages was assessed with regard to the uptake of latex beads by the cells. The time-course of phagocytotic activity was shown to be correlated with the antigen-specific IgM antibody production. The phagocytotic activity was dependent on the dose of CEP, but was not influenced by peritoneal exudate cell number or the presence of antigen. The CEP-containing MLV increased the phagocytotic activity of peritoneal macrophages to a greater extent than SUV.

In conclusion, it was demonstrated that the immuno-modulating activity of peritoneally injected CEP is closely related to the phagocytotic activity of peritoneal macrophages, that CEP-containing MLV exhibit greater stimulatory effect on the phagocytotic activity of macrophages than CEP-containing SUV, and that the immuno-modulating action of CEP is enhanced by incorporation into liposomes.

Ken-ichi Shinoda・Hitoshi Sato・
Isao Adachi・Isamu Horikoshi**key words: liposomes, cepharanthine, phagocytosis, peritoneal macrophages, latex beads*

Biological response modifiers (BRMs) の一つと考えられるセファランチン (CEP) は、脾細胞の NK 活性や肺マクロファージ活性を増強することなどが種々の実験系で明らかにされている^{1,2)}。多くの BRMs は、末梢血、脾臓、腹腔渗出細胞の natural killer (NK) 活性の増強と、マクロファージの細胞傷害活性を増強することが知られており、CEP は低分子のムラミルペプチドと同様に、補体を活性化させ、マクロファージの貪食能を上昇させる作用をもつことが報告されている³⁾。BRM としての作用のほか、両親媒性の CEP は膜に作用して、多剤耐性の機序の一つである細胞外薬剤排泄能 (P 糖蛋白質の機能) を抑制し、多剤耐性を克服する作用を有している⁴⁾。したがって CEP は、その免疫調節作用とあわせ、癌治療で有用な補助薬となることが期待される。

CEP の臨床での有用性をさらに高めるべく、これまで筆者らは CEP を含有させたりポソーム製剤を試作し、その物理化学的性質および抗体産生増強効果について検討を加え、結果を報告してきた^{5,6)}。今回はさらに、CEP 含有リポソームがもつ免疫調節作用の機構を解明するため、腹腔マクロファージの貪食能に及ぼす影響について検討を加え、若干の知見を得たので、その詳細を報告する。

方 法

(1) 試料および試薬

CEP (ベンゼン・アセトン付加体) 原末およびコ

* Department of Hospital Pharmacy, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-01 富山医科薬科大学附属病院薬剤部
Offprint requests to: Isamu Horikoshi, Ph.D.

表 1 Protocol treatment schema

Group	CEP solution (CEP dose)	CEP containing MLV (CEP dose)	CEP containing SUV (CEP dose)	Antigen (0.05 μ g)
A	○ (0, 0.2, 2 mg)	—	—	—
B	○ (0, 0.2, 2 mg)	—	—	○
C	—	○ (0, 0.2, 2 mg)	—	○
D	—	—	○ (0, 0.2, 2 mg)	○

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

(2) 動物

近交系の雄性 BALB/c Cr マウス(7~8 週齢)を静岡実験動物センターから購入し、使用した。

(3) リポソームの調製

既報⁶⁾と同様に、25 mM PC/7mM Chol(モル比 7:2)のクロロホルム/メタノール(容積比 9:1)溶液 1 ml に CEP を添加し、溶媒を窒素気流中で留去、ガラス壁に生じた脂質薄膜を減圧下で一晩乾燥した。これに等張リン酸緩衝液(PBS, pH 7.4)1 ml を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒攪拌後、続いて 30 秒静置することを 10 回繰り返す、多重層リポソーム(MLV)懸濁液とした。

この懸濁液を氷浴下で、プローブ型ソニケーター(UR-200P 型, TOMY SEIKO 社)を用い 45 分間超音波処理を行い、さらにサイズの均一化を図るため、超遠心機(55P-72 型, 日立)を用い 100,000 $\times$ g で 20 分間遠心した⁷⁾。その上清を採取し、小さいサイズの単層リポソーム(SUV)懸濁液とした。なお、添加する CEP は、マウスへの投与液量 200 μ l 中に規定量を含有するように調製した。

調製した各リポソームは、動的光散乱法によるレーザー粒径解析システム(LPA-3100/3000 型, 大塚電子)を用いて 25°C で解析し、平均粒径を算出した。なお、PC/Chol 比 7:2 の場合、平均粒径は SUV で 60 nm, MLV で 1.6 μ m であった。

(4) 薬物投与と腹腔マクロファージの貪食能の測定

マウスに抗原 0.05 μ g を腹腔内に投与した。続いて、CEP 溶液もしくは CEP 含有 MLV リポソームの懸濁液 200 μ l を腹腔内に投与した。抗原を前投与したのは、CEP 含有リポソームによる抗原特異的な抗体産生能の増強⁸⁾を検討するためである。具体的な投与内容を表 1 に示す。

投与後 3, 4, 7 日と経日的にマウスをエーテル麻酔下で屠殺した。冷 Hanks 液 5 ml を腹腔内に急速流入し、腹壁をマッサージしたのち、腹腔内渗出細胞(peritoneal exudate cell, PEC)を含む Hanks 液を滅菌済み丸底スビッツ(栄研機材)中に回収した。これを遠心機(05PR-22 型, 日立)で 1,000 $\times$ g, 4°C で 10 分間遠心し上清を除き、冷 Hanks 液 2 ml を加え懸濁した。細胞数を測定したのち、Hanks 液を加えて細胞濃度を 1.5 $\times$ 10⁶/ml と一定にした。PEC を含む Hanks 液に、容量比 400:1 の割合でラテックスビーズ含有リン酸緩衝液(PBS)(PBS/ラテックスビーズ容積比 12.5:1)を加え、5% CO₂ インキュベーター(LNA-III, TABAI 製作所)を用い 37°C で 2 時間インキュベート後、1,000 $\times$ g, 4°C で 10 分間遠心し上清を除いた。沈渣に冷 Hanks 液 4 ml を加え、懸濁する洗浄操作を 2 回行った。

図1 Time course of the phagocytotic activity of peritoneal macrophages from mice treated with CEP-containing liposomes

Antigen (0.05 μ g) and/or CEP (liposomal and non-liposomal) were injected i. p. to BALB/c mice. Animals were bled on day 4 after injection, and phagocytosis response was measured by latex beads. $\triangle$: Antigen alone (as a control). $\blacktriangle$: CEP-alone (2 mg). $\bullet$: CEP-containing MLV (CEP: 2 mg)

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

**Significantly different from day 7 ($p < 0.01$)

表2 Effect of CEP on the peritoneal macrophages on day 4 after injection

	CEP (mg/mouse)	Cell number ($\times 10^6$ /mouse)
Solution	0	1.24 $\pm$ 0.07
	0.2	1.42 $\pm$ 0.49
	2	1.39 $\pm$ 0.09
SUV	0	1.39 $\pm$ 0.05
	0.2	1.36 $\pm$ 0.02
	2	1.36 $\pm$ 0.04
MLV	0	1.39 $\pm$ 0.09
	0.2	1.29 $\pm$ 0.08
	2	1.59 $\pm$ 0.23

Antigen (0.05 μ g) and liposome were injected i. p. to BALB/c mice. Each value represents the mean $\pm$ SD of four mice.

表3 Effect of antigen on the phagocytosis of peritoneal macrophages

CEP (mg/mouse)	Phagocytosis (%)	
	without Antigen	with Antigen
0	9.66 $\pm$ 1.52	8.33 $\pm$ 1.23
0.2	9.23 $\pm$ 0.50	11.27 $\pm$ 0.25
2	18.67 $\pm$ 3.26	15.07 $\pm$ 1.50

Antigen (0.05 μ g) and liposome were injected i. p. to BALB/c mice. Each value represents the mean $\pm$ SD of four mice.

このようにして得た PEC をスライドガラスに塗付して標本を作製し、さらに無水メタノール中に浸し、室温で1～2分固定したのち風乾した。乾燥標本は室温でGimsa液1 mlに10分間浸し、水洗後乾燥して分析試料とした。油浸顕微鏡用オイル(比重1.516, 23°C, オリンパス光学工業)および油浸レンズを用いた光学顕微鏡(OLYMPUS BH-2, オリンパス光学工業)で、細胞数ならびに細胞内に取り込まれたラテックスビーズを計測した⁸⁾。有意差検定には Student の t-検定法を用いた。

結果

(1) 腹腔マクロファージの貪食能の経日変化
CEP の投与量を 2 mg とした場合、マクロファージが取り込んだラテックスビーズ総数から予測される貪食能の経日変化を図1に示す。投与後4日目で貪食能は有意に高くなった。また、

CEP 含有 MLV リポソーム投与群、CEP 溶液投与群および抗原のみの投与群(コントロール)の三者を比較したところ、CEP 含有 MLV リポソーム投与群の貪食能がもっとも高かった。そこで以後の実験では、すべて投与後4日目のマクロファージ貪食能を利用し、比較評価した。

また表2には、投与後4日目の PEC 細胞数を示す。それぞれの細胞数には有意差はなく、CEP の投与量および投与形態(リポソームへの含有/非含有)は、PEC 数そのものには影響を与えないことがわかった。さらに、CEP 含有 MLV リポソームおよび抗原をマウスに腹腔内投与した場合と、CEP 含有 MLV リポソームのみをマウスに腹腔内投与した場合の、抗原の有無による影響も検討した。表3にみられるように、貪食能は抗原の存在によっては影響を受けないことが判明した。

図2 Effects of increasing concentrations (A) and liposomal fomulations (B) of CEP on the phagocytotic activity of peritoneal macrophages

Antigen (0.05 μ g) and/or CEP (liposomal and non-liposomal) were injected i.p. to BALB/c mice. Animals were bled on day 4 after injection, and phagocytosis response was measured by latex beads. In panel B, the amount of CEP was fixed at 2 mg.

Each value represents the mean $\pm$ SD of four mice. $\circ$: CEP-solution. ∇ : CEP-containing SUV. $\bullet$: CEP-containing MLV

*¹⁾ CEP-MLV vs. CEP-solution ($p < 0.01$)

*²⁾ CEP-SUV vs. CEP-MLV ($p < 0.05$)

(2) リポソーム中 CEP 量およびリポソーム形態を変えた際の腹腔マクロファージの貪食能
CEP の投与量を 0.2 mg または 2 mg とし、リポソームに含ませず単独投与した場合と、SUV および MLV に含有させた際の結果を図 2 A に示す。いずれの場合も、腹腔マクロファージの貪食能は CEP 量に依存し、増大した。CEP を MLV リポソームに含有させた場合は、CEP 単独投与の場合に比し、腹腔マクロファージ貪食能に有意な増加が認められた。また、CEP を含有する MLV および SUV を投与した場合の腹腔マクロファージの貪食能をくらべると、図 2 B に示すように MLV のほうが SUV よりも有意に高かった。

考 察

CEP の免疫賦活作用を高めるために、CEP 含有リポソーム製剤を試作し、その性質および効果について検討した。その結果、CEP をリポソーム

に含有したほうがマウスの IgM 抗体産生増強効果のすぐれていることを見出した⁶⁾。この理由として、リポソーム自体の免疫賦活作用、リポソーム中に含有させることによる CEP の脾臓への分布増大、CEP の荷電による脂質二重層の秩序の乱れやマクロファージの活性化³⁾など、さまざまな要因が考えられる。

CEP 含有 MLV リポソームをマウスに投与したところ、腹腔マクロファージの貪食能は投与後 4 日目でもっとも効果の大きいことがわかった (図 1)。これは、リポソームをアジュバントとして用いた場合、抗原を認識したヘルパー T 細胞において、IL-2 の分泌が day のオーダーで徐々に起こり 4 日後に観察されたこと⁹⁾を考えあわせると、本実験においても約 4 日後に免疫系の活性化がピークを迎えたものと推測される。また、先に筆者らが報告した IgM 抗体産生挙動と一致しており、腹腔マクロファージの活性化が IgM 抗体の増大の要因の一つと考えられる。

本研究では、CEP 含有リポソームが腹腔マクロファージの貪食能に及ぼす影響についてさらに検討を加え、表 2 および表 3 に示されるように、CEP 含有リポソームによるマクロファージの貪食能の増強効果は、マクロファージの細胞数や抗原の有無によらないことがわかった。卵黄由来のリポソームは免疫原性が低く¹⁰⁾、リポソーム膜中に存在する CEP はハプテンとしては作用しないので、マクロファージの腹腔内への浸出を引き起こさなかったと考えられる。

さらに、CEP の投与量とリポソームの形態による、マクロファージの貪食作用の変化について検討した。その結果、マクロファージの貪食能は、リポソーム中あるいは溶液中の CEP の含有量によって影響を受け、用量依存的な上昇傾向が認められた (図 2 A)。CEP 含有 MLV を投与した場合、CEP 単独投与あるいは CEP 含有 SUV を用いた場合に比べ、マクロファージの貪食能は有意に増強された (図 2 B)。これはリポソームサイズの影響と考えられ、MLV のほうが SUV よりもマクロファージに効率よく貪食される¹¹⁾ためであると考えられる。抗原特異的な抗体産生の場合

も、マクロファージの貪食能が深く関与しており、免疫防御機構にマクロファージが抗原提供細胞として働き、特異的免疫応答に関与している可能性が示唆されている^{12,13)}。

一般に、リポソームは主として常在性のマクロファージに取り込まれるが、正電荷のリン脂質を組成として持つリポソームは、中性、負電荷のそれとくらべると、細胞との相互作用が強い¹⁴⁾。陽性に荷電している CEP は、リポソーム膜中のホスファチジルセリンの陰性荷電を中和し¹⁵⁾、その結果、表面電位が正に傾き、細胞とリポソームとの相互作用を促進したことも考えられる。CEP 含有リポソームによる免疫調節作用はマクロファージの活性化以外に、膜構造の変化や CEP の脾臓への分布が増大した可能性などさまざまな要因が考えられるので、これらの点に関して引き続き検討中である。

以上まとめると、CEP をリポソームに含有させることにより腹腔マクロファージの貪食能は増大し、このようなマクロファージの活性化が免疫調節作用の要因の一つであることが示された。

文 献

- 1) 森岡 栄, 小野 稔, 田中紀章, 折田薫三: 肺胞マクロファージの活性化に及ぼす Cepharanthin と OK-432 の相乗効果. 癌と化学療法 12: 1470-1475, 1985.
- 2) 小野 稔, 卜部貴光, 村上 仁, 立本昭彦, 大野 聡・他: Cepharanthin による Organ-associated 免疫細胞の活性化. 癌と化学療法 15: 127-133, 1988.
- 3) Shimura K: Effect of cepharanthin C3 and peritoneal macrophages in mice. Jpn. Pharmacol. Ther. 17: 239-243, 1989.
- 4) Hirai M, Tanaka K, Shimizu T, Tanigawara Y, Yasuhara M et al.: Cepharanthine, a multidrug resistant modifier, is a substrate for P-glycoprotein. J. Pharmacol. Exp. Ther. 275: 73-78, 1995.
- 5) 篠田健一, 足立伊佐雄, 上野雅晴, 堀越 勇: リポソームの膜透過性および粒子径に及ぼすセファランチンの影響. 薬学雑誌 110: 186-190, 1990.
- 6) 篠田健一, 佐藤康裕, 佐藤 均, 足立伊佐雄, 堀越 勇: セファランチン含有リポソームの免疫調節作用に関する研究—抗体産生増強効果を中心として—. DDS 10 (1): 43-48, 1995.
- 7) Watts A, Marsh D, Konowles PF: Characterization of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles and their dimensional change through the phase transition: molecular control of membrane morphology. Biochemistry 17: 1792-1801, 1978.
- 8) Shimura K, Ito H, Shiomi T, Hidaka H, Nishioka K: Enhancement of antibody-independent phagocytosis by N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7). Immunological Commun. 12: 363-374, 1983.
- 9) Shahum E, Theren HM: Liposomal adjuvanticity: effect of encapsulation and surface-linkage on antibody production and proliferative response. Int. J. Immunopharmac. 17: 9-20, 1995.
- 10) Snyder SL, Vannidier WE: Immunologic response to protein immobilized on the surface of liposomes via covalent azo-bonding. Biochim. Biophys. Acta 772: 288-294, 1984.
- 11) Hsu MJ, Juliano RL: Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. II Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages. Biochim. Biophys. Acta 720: 411-419, 1982.
- 12) Schwartts RH, Yano A, Paul WE: Interaction between antigen-presenting cell and primed T lymphocytes. Immunol. Rev. 40: 153-180, 1978.
- 13) Nihashi Y, Koga Y, Gonda H, Taniguchi K, Nomoto K: Thymus-dependent increase in number of T cell in parathymic lymph nodes induced by the biscoclaurine alkaloid, cepharanthine. Immunobiology 170: 351-364, 1985.
- 14) Roozmond RC, Urli DC: Peculiar behaviour of rabbit thymocytes in interaction with liposomes of different compositions shown by fluorescence polarization studies, lipid analysis, and uptake of vesicle-entrapped carboxyfluorescein. Biochim. Biophys. Acta 689: 499-512, 1982.
- 15) 秋山伸一: 抗癌剤のはたらき—課題と展望. 共立出版, 1991, p 108-110.