抗原徐放性の生体内分解性マイクロスフィアによる 急速減感作療法の改良

—モルモット減感作モデルにおける基礎的検討—

高木 一平・西村 穰・金 洋・伊藤 博隆
馬場 駿吉・国松 己歳*・佐々木 實*

Rush Immunotherapy Using Antigen-Containing Biodegradable Microspheres

—An Evaluation Using Immunotherapy Models of Guinea Pigs—

Ippeï Takagi, Jo Nishimura, Yang Kim, Hiroataka Ito,
Shunkichi Baba, Mitoshi Kunimatsu and Makoto Sasaki
(Nagoya City University Medical School)

We produced antigen-containing repository microspheres consisting of ovalbumin (OA) as an antigen and poly (lactic acid/glycolic acid) (LGA) as a biodegradable polymer for a safer and simpler method of antigen administration in rush immunotherapy. The efficacy and the changes of the immunological parameters obtained by rush administration of antigen-LGA microspheres were compared with those in a current rush immunotherapy model, a conventional immunotherapy model, and a linear antigen administration model using implantable osmotic pumps in guinea pig models. In the rush immunotherapy model using OA-LGA microspheres (LGA group), the threshold values in the antigen inhalation test was significantly increased after 10-week immunotherapy. The increase of the threshold value in the LGA group showed an intermediate type between the current rush immunotherapy model (rush group), and the conventional immunotherapy model (conventional group). The LGA group showed a most drastic increase of anti-OA IgG2 blocking antibody among the groups. The rush immunotherapy using implantable osmotic pumps (Alzet group) revealed only a gradual and slight increase of the threshold values in comparison with the other three groups. The Alzet group was inferior to the LGA group in the production of IgG2 blocking antibody despite the induction of IgE reagin. The excellent therapeutic effect of the LGA group compared to the Alzet group was attributable to the unique antigen releasing manner of antigen-LGA microspheres in which a relatively high dose of antigen was released in the early period, and also to the property of the microspheres to be easily ingested by phagocytes.

In conclusion the novel rush immunotherapy using antigen-LGA microspheres could be safer and simpler than the current method with an excellent therapeutic efficacy.

Key words: rush immunotherapy, biodegradable microspheres, repository antigen administration

名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

* 名古屋市立大学医学部生化学第二講座

緒 言

近年、I型アレルギー疾患に対する減感作療法の効果を短期間の間に得る目的で急速減感作療法が紹介され¹⁾、鼻アレルギーに対しても臨床応用されつつある²⁾。急速減感作療法は遮断抗体の早期産生誘導により早期に臨床効果が得られるのが特長であるが、アナフィラキシーショックや尋麻疹等の重篤な副作用の起きる頻度は現行の減感作療法に比べても一層高いことが懸念されている。

我々は現行の減感作療法をより安全に、同時に簡便なものとするために、生体内分解性ポリマーを使用して抗原含有の徐放性マイクロスフィアを作製した。その安全性ならびに有効性についてはモルモットを用いた減感作療法モデルにおいてすでに確認し、本法が安全で注射間隔を延長させることのできる新しい減感作療法の担い手としての価値を有することを報告した³⁾。そこで今回モルモットを用いて本法による急速減感作療法モデルを作製し現行の急速減感作モデルと比較し、本法の安全な急速減感作療法への応用の可能性を検討した。さらに本法と埋め込み式浸透圧ポンプを用いた持続均等抗原投与方法との比較を行い、徐放化抗原の抗原放出パターンと減感作効果との関係について検討した結果を報告する。

材料と方法

1) 抗 原

卵白アルブミン (ovalbumin, OA, Sigma 社製) を用いた。

2) 生体内分解性ポリマー

和光純薬製ポリ(乳酸/グリコール酸) (LGA, LGA-5010, 乳酸:グリコール酸比1:1, 分子量1万) を用いた。

3) 抗 体

家兎抗モルモット IgG1, IgG2 抗血清 (Bethyl Laboratories Inc. 製) を用い、プロテインAセファロースカラムを通じて精製し、さらにビオチン化して用いた。

4) 抗原 (OA)—LGA マイクロスフィア (OA-LGA MS) の作製

既報¹⁾のごとく液中乾燥法にて行った。すなわち OA を含む16%ゼラチン溶液と 50%LGAジクロロメタン溶液を1:20の容積比で混合し、ホモジナイザーおよび超音波破碎器にて十分に乳化した。これを 22~23G の注射針を通じて 0.2%ポリビニルアルコール溶液中に攪拌下に注入しマイクロスフィア化した。さらに3~6時間攪拌した後ステンレスメッシュにて直径50~150 μm とし、洗浄して乾燥させた。結果として乾燥重量 1 mg 当たり放出可能量として OA 1.7 μg を含む OA-LGA MS を得た。in vitro および in vivo にて OA-LGA MS は約10日から14日間にわたり OA を徐放化することが確認された¹⁾。

5) 実験動物

ハートレイ系白色モルモット (雄, 雌, 体重 250 g) を用いた。

6) モルモットの抗原感作

OA 10 μg /alum 5 mg を2週間隔で4回腹腔内投与し、感作の成立は抗原吸入試験にて確認した。

7) 抗原吸入試験

各濃度の OA 溶液を低濃度より順に超音波ネブライザーにて各2分間モルモットに吸入させ、明らかな呼吸サイクルの延長とチアノーゼを認めた最低の OA 濃度を抗原吸入試験の閾値とした。

8) 7日間 PCA 反応⁴⁾

被検モルモット血清を希釈し、非感作モルモット背部皮内に 0.1 ml ずつ注射し、7日後に 0.1% OA, 1%エバンスブルー溶液 1 ml を血管内に投与した。30分後に屠殺し、明らかな皮内の色素斑を認める最大の被検血清希釈倍率を7日間 PCA 反応の titer とした。

9) OA 特異的 IgG1, IgG2 抗体価の測定

ELISA 法によって測定した。すなわち OA を固相化したマイクロプレートに希釈被検血清を加え反応、洗浄後、ビオチン化抗モルモット

IgG1 または IgG2 抗体を加え反応させた. 更に洗浄後, アビジン- β -ガラクトシダーゼを加え洗浄後質質として 4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシドを加え酵素基質反応を行った. 得られた蛍光強度は MTP マイクロプレートリーダー (コロナ社) によって測

定した. 標準血清として OA 感作モルモットのプール血清を用い, 標準血清の1000倍希釈液の蛍光強度に対する被検血清の蛍光強度の比, Index を算出し, さらにこの対数 $\log(\text{Index})$ を求め被検血清の titer とした.

表 1 実験的減感作療法のスケジュール

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9w
RUSH	136 (total)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
LGA	11*50*100	/	100	/	100	/	100	/	100	/
CONV.	11 2	3 5	7 10	20 30	50 50	50 50	50	75	75	75
ALZET	11*50*100	/	100	/	100	/	100	/	100	/

↓
数字は OA 投与量を示す. 総 OA 投与量は, それぞれ, Rush 群: 586 μg , LGA 群: 561 μg , Conv. 群: 563 μg , Alzet 群: 561 μg とした.

*: OA 生食溶液を用いての抗原投与.

↓: 採血および抗原吸入試験.

図 1 抗原吸入閾値の変化

10) 埋め込み式浸透圧ポンプ

alza corporation 製 mini-osmotic pump, alzet : model 2002 (約 2 週間にわたり薬物の均等な持続放出が可能)を用いた。

11) 実験的減感作療法

表 1 に示すスケジュールのごとく OA 感作モデルモットを 4 群に分け, Rush 群 (6 匹), LAG 群 (6 匹), Conventional 群 (6 匹), Alzet 群 (5 匹)とした。Rush 群および Conventional 群は抗原として OA 生食溶液を用いた。LAG 群は OA-LGA MS を Rush 群と同様の抗原増量法で投与した。Alzet 群は Rush 群と同様の抗原増量法で OA 100 μ g を含む alzet : mini-osmotic pump を皮下に埋め込み, 2 週間毎に外科的に新しいものと交換した。ただし LGA 群および Alzet 群の 1 週間以内の抗原投与の一部は抗原増量カーブを Rush 群と同一にするため OA 生食溶液を用いて行った (* 印)。

減感作療法開始前より終了後まで 2 週間毎に抗原吸入試験, 血清抗 OAIgG2 抗体価の測定を行い, 4 週間毎に 7 日間 PCA 反応 titer, 血清抗 OAIgG1 抗体価の測定を行った。

12) 統計学的解析

paired t-TEST を用い, 危険率 5 % 以下を有意水準とした。

結 果

1) 抗原吸入閾値 (図 1)

Rush 群は減感作療法開始後 2 週ですでに閾値の上昇傾向を認めたが統計学的には有意の差を認めなかった。LAG 群では 4 週で閾値の上昇傾向を認め 6 週間後に有意の閾値の上昇を認めた ($p < 0.05$)。Conventional 群では上記 2 群に比べやや遅く 6 週間で有意の閾値の上昇を認めた ($p < 0.01$)。Alzet 群では閾値の上昇は最も緩慢で減感作療法開始 10 週後で有意の閾値の上昇を認めた ($p < 0.05$)。

図 2 7 日間 PCA 反応 titer の変化

2) 7日間 PCA 反応 (図2)

Alzet 群において減感作療法開始8週後で7日間 PCA 反応 titer の上昇傾向を認めたが統計学的には有意差は認められなかった. 他の3群では titer の明かな変動は認められなかった.

3) 抗原特異的 IgG1 抗体価 (図3)

Rush 群, LGA 群, Conventional 群ともに減感作療法開始4週後までに OA 特異的 IgG1 抗体価の有意の上昇を認め (各々 $p < 0.02$, $P < 0.02$, $p < 0.02$), 8週後までにさらに抗体価の上昇傾向が認められた. Alzet 群では他の3群に比べ抗体価の上昇は緩慢で8週後におい

て有意の上昇が認められた ($p < 0.05$).

4) 抗原特異的 IgG2 抗体価 (図4)

Rush 群, LGA 群ともに減感作療法開始後2週で有意の IgG2 抗体価の上昇を認めた (各々 $p < 0.01$, $p < 0.01$). 特に LGA 群では2週以降も抗体価の上昇が著明で6週後をピークとして4群中最も高い IgG2 抗体価の上昇を認めた. Conventional 群は上記2群に比べ遅く6週後で有意の IgG2 抗体価の上昇を認めた ($p < 0.05$). Alzet 群では2週後において有意の抗体価の上昇を認めた ($p < 0.05$) がその後は減感作療法終了時まで抗体価上昇は認められなかった.

図3 抗原特異的 IgG1 抗体価の変化

5) 随伴症状

Rush 群において減感作療法開始 4 週以降で抗原吸入試験の際に喘息死をきたした動物が計 4 匹あった。LGA 群においても 6 週において吸入試験時に 1 匹が喘息死をきたした。以上の死亡例以外には減感作療法施行中に特記すべき全身、局所の随伴症状は認められなかった。

考 察

現在までに減感作療法の欠点を改良するための研究は主に二つの方向で行われてきた。その一つには抗原分子に化学的修飾を加えて免疫原

性を保ったままアレルギー性を抑えて副作用を抑制する試みがある。今一つには抗原を注射局所から徐々に吸収させて局所全身の副作用を軽減し抗原の注射間隔も延長させる試みがある。後者の試みの中では alum 吸着抗原^{5)~7)}、難溶性アミノ酸吸着抗原⁸⁾⁹⁾ が知られており既に臨床応用されているが、副作用の解消と抗原注射間隔の延長という課題は完全には解決されていない。

我々は後者の試みの延長上に立ち、drug delivery system (DDS) の理論を応用した抗原

図4 抗原特異的 IgG2 抗体価の変化

投与法の開発に着手した。我々が使用した抗原徐放化のための基剤, ポリ(乳酸/グリコール酸)(LGA)は外科用吸収性縫合糸の材料として初めて医学応用されて以来, 薬物の徐放化用基剤としてホルモン療法¹⁰⁾, 抗癌剤の DDS¹¹⁾等に臨床応用されている。LGA は生体内でも非酵素的に加水分解される。分解産物は生体に対して無害であり, 加水分解の速度は LGA の分子量と乳酸:グリコール酸の配合比によって決定されることが知られている¹²⁾。以上の特質により LGA は安全で, 数日から数カ月にもわたる薬物の制御放出が可能な DDS 用基剤として応用が広がりつつある。

今回は LGA を基剤として抗原(OA)を含有するマイクロスフィア(OA-LGA MS)を作製し, 以下の点について新たな検討を加えた。第一点として OA-LGA MS を現行の急速減感作療法モデルと同様の抗原増量法で投与した場合の有効性, 安全性ならびに背景にある免疫学的パラメータの変動について比較検討した。第二点として持続的で均一な抗原の徐放化投与が減感作療法にとって有用であるかどうかの検討を行った。すなわち徐放化抗原の中でも均一な抗原放出の可能な埋め込み式浸透圧ポンプを用いた抗原投与法を設定し, 有効性と各種免疫学的パラメータの変動が抗原—LGA MS に比べどのよう異なるかについて検討した。

OA-LGA MS を用いた急速減感作療法(LGA 群)は治療効果の発現時期すなわち抗原吸入閾値の上昇時期の点で従来からの減感作療法モデル(Conventional 群)と急速減感作療法モデル(Rush 群)の中間に位置する性格を有することが明かとなった。これは LGA 群が Rush 群と同様の抗原増量法で投与されたにもかかわらず生体内で徐放化されるために抗原の認識, 処理が Rush 群に比べ若干遅れることによると推察される。また LGA 群はモルモットにおける遮断抗体として認められている IgG2 抗体¹³⁾の産生誘導においては上記 4 群中最も優位であることが認められた。LGA 自身¹⁴⁾,

さらには抗原とともにマイクロスフィア中に含有されるゼラチン¹⁵⁾はマクロファージに極めて良く貪食されることが知られている。我々の報告においても抗原—LGA MS はモルモットにおいて投与初期に比較的大量の抗原放出を来すこと, さらには抗原放出後半期にマクロファージによるマイクロスフィアの貪食が盛んに行われること³⁾, により良好な遮断抗体の産生をもたらすことが推察されている。このため今回の急速減感作療法への応用においても上記の機序により IgG2 遮断抗体の著明上昇が得られ, その結果良好な抗原吸入閾値の上昇を得たと考えられた。

一方, 均等な徐放性抗原投与のモデルとしての Alzet 群は抗原増量法を同じくする Rush 群, LGA 群に比べ, 抗原吸入閾値の上昇が明かに緩慢であった。この免疫学的背景としては, まず IgG2 遮断抗体の産生誘導が LGA 群に比べて劣ることがあげられる。さらにモルモットにおけるレアギン抗体の一つである IgG1 抗体⁴⁾の上昇が他群に比べて低いにもかかわらず, もう一つのレアギン, IgE 抗体の指標としての 7 日間 PCA 反応 titer⁴⁾が 4 群中最も上昇する傾向を示すことが特徴的であった。すなわち遮断抗体に比較して IgE レアギン抗体の誘導能が高いことが示唆された。Alzet 群に対しては抗原を含まない埋め込み式浸透圧ポンプを投与する対照群を設けていないため, 2 週毎の外科的侵襲が生体の免疫能に与える影響を純粋に評価することは困難である。しかしながら減感作療法中, 体重の増減も含めた随伴症状の有無に関しては何等特記すべきこともなく, この点から Alzet 群における上記の結果は均一な持続的抗原投与様式に起因すると考える。従来より動物実験でレアギン抗体を産生誘導させるためには少量の抗原を適切なアジュバントとともに反復投与することが有用であった¹⁶⁾。水銀化アルミニウムゲル(alum)はこのようなレアギン抗体産生誘導のための優れたアジュバントとして広く用いられている。alum は抗原に対し, 充分

な量を用いた場合、投与局所で比較的均一な抗原の徐放をもたらすことが報告されており¹⁷⁾、この点で Alzet 群の抗原放出様式に類似するといえる。従って抗原の均一徐放化投与は抗原の担体を問わずレアギン抗体産生が優位に生ずると推論され、このような徐放化抗原による減感作療法の有用性は低いと結論された。

結 語

抗原 (OA) と生体内分解性ポリマー；ポリ(乳酸／グリコール酸) (LGA) よりなるマイクロスフィア (OA-LGA MS) を作製し、急速減感作療法への応用の可能性をモルモット減感作療法モデルにおいて検討した。さらに均一な徐放化抗原投与モデルと比較検討し、以下の成績を得た。

1) OA-LGA MS を用いた急速減感作療法モデル (LGA 群) は抗原吸入閾値上昇の発現時期において抗原単独溶液を用いた急速減感作療法モデル (Rush 群) と現行の減感作療法モデル (Conventional 群) の中間に位置することが明かとなった。

2) LGA 群では全ての群の中で最も高い IgG2 遮断抗体の産生誘導が認められた。

3) 埋め込み式浸透圧ポンプを用いた均一な持続抗原放出による急速減感作療法モデル (Alzet 群) は LGA 群に比べて抗原吸入閾値上昇が緩慢で、IgG2 遮断抗体の産生に劣り、IgE レアギン抗体の産生傾向が優位であった。

4) LGA 群では Alzet 群と異なり、マイクロスフィアからの初期の抗原放出が比較的多く、マクロファージによる貪食が盛んであることにより抗原の認識、処理が容易となることが良好な減感作効果をもたらしたものと考えられた。

以上より抗原 — LGA MS は急速減感作療法をより有効に、安全に遂行するための手段として有用であると結論された。また均等で持続性の抗原投与は遮断抗体に比してレアギン抗体の産生が優位となり減感作療法にとっては有用性が低いと考えられた。

参考文献

- 1) Miller DL and Mansmann HC : Rapid injection therapy in children with intractable asthma : safety and technique. *Ann Allergy* **29** : 178~186, 1971.
- 2) 伊藤和行 : 鼻アレルギーに対する急速減感作療法. *アレルギー* **38** : 11 ; 1246~1254, 1989.
- 3) 高木一平 : 抗原含有の生体内分解性マイクロスフィアを用いた新しい減感作療法の研究. *名市大医誌* **42** : 2 ; 269~285, 1991.
- 4) Levine BB, Chang Jr H and Vaz NM : The production of hapten-specific reaginic antibodies in the guinea pig. *J Immunol* **106** : 29~33, 1971.
- 5) Gaillard GE, Schellin R and Mayers RA : Observation of alum-precipitated pyridine extract. *Ann Allergy* **20** : 81~89, 1962.
- 6) Tuft L and Torsney PL : Treatment of ragweed hay fever with Allpyral extracts. *J Allergy* **36** : 265~272, 1965.
- 7) Tuft L and Friedman H : Prolonged immunotherapy with alum-precipitated pyridine ragweed extracts; a clinical and immunological study. *Ann Allergy* **39** : 426~430, 1977.
- 8) Palmer WR and Balacescu A : Multi-centre trial of pollen-tyrosine adsorbate. *Acta Allergologica* **32** : 44~57, 1977.
- 9) Miller ACML and Tees EC : A metabolizable adjuvant; clinical trial of grass pollen-tyrosine adsorbate. *Clin Allergy* **4** : 49~55, 1974.
- 10) Sanders LM, Kent JS, McRae GI, et al : Controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone analogue from poly (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Pharm Sci* **73** : 1294~1297, 1984.
- 11) Yolles S, Leafe TD and Meyer FJ : Timed-release depot for anticancer agents. *J Pharm Sci* **64** : 115~116, 1975.
- 12) Miller R, Brady JM and Cutright DE : Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates) rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J Biomed Mater Res* **11** : 711~719, 1977.
- 13) Yamauchi N, Ito K, Suko M, et al : IgG2 an-

- tibodies block IgE antibody-induced asthma in guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **80** : 76~80, 1986.
- 14) Tabata Y and Ikada Y : Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J Biomed Mater Res* **22** : 837~858, 1988.
- 15) Filkins JP and Di Luzio NR : Effect of gelatin and heparin on intravascular phagocytosis. *J Reticuloendothel Soc* **3** : 471~485, 1966.
- 16) Levine BB and Vaz NM : Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse; a potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. *Int Arch Allergy* **39** : 156~171, 1970.
- 17) Holzman RS and Norman PS : The effect of alum concentration on the repository and adjuvant properties of alum-precipitated antigens. *Allergy* **38** : 65~73, 1966.

(別刷請求先 : 高木一平
〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1
名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室)