非イオン性界面活性剤ベシクルの開発と DDS への利用

加藤敬一

愛媛大学 大学院理工学研究科 物質生命工学・応用化学コース
〒790-8577 愛媛県松山市文京町3

Development of Surfactant Vesicle and Application of the Vesicle to DDS

Keiichi Kato

Department of Materials Science and Biotechnology,
Graduate School of Science and Engineering, Ehime University,
3, Bunkyo-cho, Matsuyama 790-8577, Japan

Nonionic surfactant Span80 was applied in the preparation of surfactant vesicle (niosome). We revealed that the membrane of Span80 vesicle was consisted of a mixture of sorbitan ester molecules with different four kinds of alkyl chains (1~4 chains). Furthermore, the ester composition in the membrane of the vesicles with constant diameter was found to be almost constant because the vesicle membrane was constructed by the thermodynamic self-assembly of the ester molecules. The comparison of the characterization between Span80 vesicles and conventional natural-lipid liposomes revealed that the Span80 vesicles had higher values in either fluidity or membrane fusion capability, and lower values in phase-transition temperature as compared with liposomes. The characteristics of Span80 vesicles were very effective in the application of Span80 vesicles to the drug delivery system (DDS). As a result, we could demonstrate the potential application of Span80 vesicles from the experiments *in vitro* and *in vivo* as alternatives to conventional liposomes in DDS.

Key words : Span80 / niosome / vesicle / liposome / membrane stress / DDS

1. はじめに

松本ら¹⁾は、非イオン性の界面活性剤 Span80 (ソルビタンモノオリエート) がリポソームのような小胞体構造を形成することを発見した。この発見をベースとして、筆者らは非イオン性の界面活性剤 Span80 (ソルビタンモノオリエートとして市販) を主成分とする、ハイブリッド型でナノサイズからマイクロサイズのベシクルの開発に成功し、生体内や血中におけるベシクルの安定化を実現するとともに、

その膜構造を明らかにした。このベシクルは人工細胞モデルとして知られる従来のリポソームと似て異なるものであり、Span80膜で囲まれた小胞体構造を有している。一般に非イオン性界面活性剤 (nonionic surfactant) によるベシクルはニオソーム (niosome) とも呼ばれている^{2,3)}。このベシクルの表面に癌細胞へのミサイル装置としてのタンパク質や抗体などの生理活性物質を固定化して癌細胞を標的・攻撃する方法、あるいは遺伝子を固定化して遺伝子導入する方法を開発した。筆者らのその後の研究で、この Span80 を主成分とするベシクルが、従来のリポソームにはない、優れた流動性、膜融合性などを有することを明らかにした。市販の Span80 は商品名がモノオリエートとなっており、1本鎖のエステルのみを有

Fig. 1 Chemical structures of sorbitol (= D-glucitol, 1) and the products that can be formed upon acid treatment of sorbitol: 1,4-anhydro-D-glucitol (2), 3,6-anhydro-D-glucitol (3), 2,5-anhydro-L-iditol (4), 2,5-anhydro-D-mannitol (5), 1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol (6). The chemical structure of oleic acid (7) is also shown. Commercially available sorbitan esters like Span80 or Span85 are non-ionic surfactants prepared from sorbitol. They, however, do not contain sorbitol as the central polyol but rather mixtures of sorbitol that has been anhydridized to various degrees.

するように思われがちであるが、実際には1本, 2本, 3本, 4本のアルキルエステル鎖を有する脂肪酸エステルの複雑な混合物から成っている。しかし, Span80から調製したベシクルは, それらエステル混合物の一定組成で構成されることが明らかになった。また, Span80は非常に安価で食品添加物として国内で認可されており⁴⁾, その安全性については筆者らの行ったマウス実験でも証明された。また, Span80の人体への投与例も既にあり⁵⁾, Span80ベシクルの人体への投与が可能である。

本稿では, Span80ベシクルの調製法, そのベシクル構造, ベシクルの特徴などについて述べる。さらに, 筆者らが開発したSpan80ベシクルを癌細胞に標的・結合させて, メンブレンストレスとしてのアポトーシスシグナルを伝達させて癌細胞を殺傷させるDrug Delivery System (DDS) のメカニズムについて紹介するとともに, 抗体を固定化したイムノベシクルや遺伝子ベクターとしてのSpan80ベシクルの利用方法についても述べる。

2. Span80ベシクルの調製法

これまでに筆者らは, 二段階乳化法^{6,7)}により調製した, Span80を主成分とする直径約1~10 μm 大粒径ベシクル^{6~10)}, あるいは約10~300 nmの小粒径ベシクル^{11,12)}について数多くの研究を行ってきた。これらの研究で用いたSpan80ベシクルの調製法は, 利用目的によっていくらか異なるが, 基本原理は全て以下に述べるようなものである^{6,7,11)}。

Span80を溶解したヘキサン中に, 内水相となる水滴を滴下しながらホモミキサーで乳化(一次乳化)して, W/Oエマルジョンを調製する。その後, エバポレーターでヘキサンを除去してW/L (water/lipid) エマルジョンを調製する。このW/LエマルジョンをTween80 (ポリオキシエチレンソルビタンモノオリエート) 水溶液で乳化して(二次乳化), ベシクル懸濁液を調製する。このTween80はW/Lエマルジョンの分散剤として用いるものである。二次乳化後, この懸濁液に遠心操作, 透析あるいは限外濾過などの処理を行うことにより, 膜形成しなかったSpan80成分やTween80を除去して, 最終的にSpan80ベシクル懸濁液を調製する。このベシクル懸濁液には, 大まかに分類して大粒径ベシクル(1~10 μm)と小粒径ベシクル(10~300 nm)が混在している。これらのベシクルは限外濾過法や超

遠心分離法などで分別することができる。また, エクストルージョン法で粒径を制御することも可能である。

なお, HPLCによるSpan80ベシクルの膜構造解析実験においては, 解析を単純化するため, Span80単一成分でベシクルを調製した。しかし, 実際の利用を目的としたSpan80ベシクルの調製では, 上記の一次乳化時に, 主成分のSpan80に対して, 若干の大豆レシチン (Span80に対して9.0 wt%), コレステロール (Span80に対して4.5wt%) をヘキサン中に配合した。それにより, Span80単一成分のベシクルよりもさらに安定性に優れた, ハイブリッド型のSpan80ベシクルを調製することができた。

3. Span80ベシクルの形状と構造

3.1 市販のSpan80の組成

Span80はFig. 1に示すような種々の構造を有する混合物からなる非イオン性の界面活性剤で, グルコースを還元して得られるD-ソルビトールの脂肪酸エステルであり, 常温では油性の均一な液状である。Span80の成分は, 大別して1本鎖~4本鎖のソルビタンエステル成分からなり, さらに1本鎖, 2本鎖エステルについては, ソルビット型(1個のエーテル環を有する)とソルバイト型(2個のエーテル環を有する)が含まれる事が知られている^{4,13~15)}。筆者らは, この均一系Span80 (和光純薬製, 試薬特級) を, HPLCを用いて組成解析した。

Table 1 Comparison of the compositions of sorbitan esters between commercial surfactants (Span80, Span85) and the vesicle membranes prepared from the surfactants

	Monoester(%)	diester(%)	triester(%)	tetraester(%)
Commercial Span80	19	49	19	13
Commercial Span85	6	26	15	53
Span80 vesicle	13	61	17	9
Span85 vesicle	16	60	17	7

3.2 Span80 ベシクルの組成分析

Span80 ベシクルは、天然リン脂質を主成分とするリポソームと比較して、前述のように多くの優れた特性を有している。しかし、そのベシクルの膜組成や膜構造については、これまで不明な点が多かった。我々は、市販の Span80 (均一系)、および Span80 から調製したベシクルを、HPLC を用いて分析し、Span80 ベシクル膜の組成・構造の解析を試みた。ここでは、それらの結果^{11, 16)}の一部を紹介する。

結果の図は省略するが、市販の Span80 では、大別して4本のピークから成り、ソルビタンのモノ-、ジ-、トリ-、テトラ-のエステル混合物で構成されていることが確認され、これらのエステル分子組成はそれぞれ約 19, 49, 19, 13% となった。なお、この組成は Span80 の製品ロット番号で若干異なる。ここで使用したもののロット番号は TCJ1112 (和光純薬製) である。一方、Span80 ベシクルに関しても同様に4本のピークが現れ、ベシクル膜もまた、上記の4種類のエステル分子で構成されていることがわかった¹⁶⁾。さらに、市販の Span85 および、Span85 ベシクル系についても、同様に組成の解析を行った。Span85 は、エステル含有物は Span80 と同じであるが、テトラエステルが主成分であり、商標ではソルビタントリエステルとして市販されている。上記の解析結果を Table 1 に示す。その表に示すように、出発原料である Span80 と Span85 の組成が異なっているにもかかわらず、それらから調製した Span80 ベシクルと Span85 ベシクルでは、ソルビタンのモノ-、ジ-、トリ-、テトラ-のエステルの分子組成は、ほぼ同じになった。またベシクルでは2本鎖と3本鎖のエステル分子が全体の約 80% を占めた。このことは、ベシクルを形成すると、1本鎖、4本鎖エステル分子が原料組成よりも減少して、特に2本鎖が増加することがわかる。これらの結果から、「ベシクルの原料となるソルビタンエステルの組成が異なっても、ベシクルは熱力学的に自己組織化して生成され、2本鎖エステルを主成分とする一定の膜組成を形成する」事実が明らかになった¹⁶⁾。一般に、薬剤は均一製品が要求されるが、この

Fig. 2 Various electron microscopies of Span80 vesicles prepared by two-step emulsification technique: (a) phase-contrast microscope, (b) SEM, (c) cryo-TEM, (d) TEM with freeze fracture method.

Span80 ベシクル膜のエステル分子組成が一定になるという新しい発見は、このベシクルが、その薬剤に利用できることを意味するものである。なお、筆者らは2本鎖エステル分子を多く含有する Span80 をベシクル調製原料として用いた。

3.3 Span80 ベシクルの膜構造^{11, 16)}

上記の結果から、ベシクルはハイブリッドな膜構造をとることによって、自己組織化して、安定化していると推測される。非イオン性の Span80 は、リポソームにおけるイオン性のリン脂質などと比較して、親水部のソルビタン間の相互作用が弱い。そのためベシクル膜中の Span80 の分子運動の自由度はリポソームのそれよりも大きいと考えられる。また、モノエステル～テトラエステルまでの種々のエステル成分が、Span80 ベシクルの二分子膜の内膜と外膜のそれぞれ異なる曲率を補うように細密充填的に自己組織化され、安定な膜を形成すると考えている¹⁶⁾。なお、二次乳化時に使用する Tween80 は、非常に親水性が高い (HLB 値は約 15.0) ため、ベシクル調製の最終段階での透析操作時にほとんど系外に除去される。

Fig. 2 に Span80 ベシクルの種々の電子顕微鏡写真を示す。これらの写真から、この Span80 ベシクルがリポソームのような、きれいな小胞体構造を有していることがわかる。ハンディ型のミニエクストルダー (Avanti PolarLipids, Alabaster, AL: ポリカーボネート膜で細孔径 100 nm) を使用して、粒径制御すると、粒径が約 100 nm 前後のベシクルが生成した。Fig. 2

Table 2 Comparison of either 1/P values or phase transition temperatures (T_m 's) among commercial Span80, Span80 vesicle, and POPC, DOPC and DPPC liposomes

Sample	1/P		T_m [°C]
	20 °C	40 °C	
Commercial Span80	—	—	-20.3 ± 3.2 (n=2)
Span80 vesicle	10.8	18.3	-40.3 ± 2.6 (n=4)
DOPC liposome	9.98	15.6	-17.5 ± 1.2 (n=4)
POPC liposome	7.81	13.9	-2.6 ± 2.1 (n=3)
DPPC liposome	3.14	3.31	42.2 ± 2.6 (n=4)

(a), (b) に示すベシクルは上記のエクストルダーを使用しないで調製したマイクロサイズベシクルである。Fig. 2 (c) の Cryo-TEM の写真¹¹⁾ に用いた Span80 ベシクルは、上記のエクストルダーを使用して調製したもので、この Cryo-TEM 写真からの直接測定した粒径は 63 ± 21 nm となった (207 個のベシクルを数えた)。一方、DLS による粒径測定では、約 105 ± 13 nm (測定回数: $n = 9$) となった。この粒径の違いは、DLS 測定が間接的な測定法であり、水和半径なども含むためと考えている。また、Cryo-TEM 写真の結果、Span80 ベシクルの膜厚が約 4.8 ± 0.8 nm ($n = 207$) となり、POPC リポソームについて同様に計算した結果である 4.8 ± 0.9 nm の値とほぼ一致した¹¹⁾。このことは、Span80 ベシクル膜が、リポソームのようなエステル分子混合物の二分子膜構造を有していることを示唆している。また上記の写真測定の結果から、Span80 ベシクルの約 84% が一枚膜構造で、残りが二枚膜ラメラ構造を有していた。

4. Span80 ベシクルの特性

Fig. 2 (a), (c) に示すように、Span80 ベシクルは、大粒径の場合 (a) でも小粒径の場合 (c) でもきれいな球形をしている。また、このベシクルは、その形状を自由に変化させることができ、マイクロサイズの大粒径ベシクルでも狭い毛細血管中を栓塞することなく自由に流動できることが、顕微鏡観察で確認されている¹⁰⁾。また、大きな内水相容積を有し、遺伝子などのマクロ分子も包括可能である。さらに、ベシクル調製法が二段階乳化法であるため、ベシクルの内水相溶液と外水相溶液とを、それぞれ異なった水溶液で構成させることができる。親水性の物質はベシクルの内水相中に、また疎水性の物質は油性のベシクル膜中にそれぞれ包括できる。例えば、筆者らの実験で、疎水性の非常に大きい抗癌剤ドセタキセル (商品名タキソテール, TXT) も、高い内包率でこのベシクル膜中に内包することができた。ま

Fig. 3 Membrane fluidity measurements carried out with DPH. The inverse of the degree of polarization (1/P) is plotted as a function of temperature for Span80 vesicles (100 nm) (■), DOPC liposomes (○), POPC liposomes (▲) and DPPC liposomes (□). The phospholipid liposomes were prepared by PBS. The solid lines between the data point are drawn to guide the eyes.

た親水性の抗癌剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) も TXT と同時にベシクルの内水相に包括され、かつ安定であることもわかっている。この様に、Span80 ベシクルはリポソームにはない多くの優れた特性を有しており、抗癌剤や遺伝子など様々な生理活性物質が包括可能である。

4.1 相転移温度

比較するためのリポソームは、リン脂質である、POPC (1-パルミトイル-2-オレイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン, $M_w = 760.1$), DOPC (1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン, $M_w = 786.2$), DPPC (L- α -ジパルミトイルホファチジルコリン, $M_w = 734.0$) を用いて、エクストルダー法あるいは逆相蒸発法によりそれぞれ調製した。これらのリン脂質リポソームの相転移温度を Table 2 に示す¹¹⁾。また、市販の Span80 および Span80 ベシクルの相転移温度についても Table 2 に示した。前述したように Span80 ベシクルの組成は、原料となる Span80 の組成とは異なる。その組成の違いが、市販の Span80 と Span80 ベシクルとの相転移温度が異なる原因の一つと考えられる。Table 2 から、Span80 ベシクルの相転移温度の方が、リン脂質リポソームのそれよりも低いことがわかる。このことは、室温あるいは 40 °C (生体温度近傍) では、Span80 ベシクルの方がより液晶状態が進んだ状態にあると言える。そのことが、Span80 ベシクルが、これらのリポソームよりもより

Fig. 4 Negative staining electron micrographs of various fusion Span80 vesicles (100 nm) which were stored for 3 days at 42 °C before they were analyzed by electron microscopy. Length of the bar: 300 nm.

流動性が高くなる要因の一つであると言える。

4.2 膜流動性

Span80 ベシクルと種々のリン脂質リポソームの膜流動性を、疎水性蛍光プローブ (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH (和光純薬製)) を用いて測定した蛍光偏角度 P 値^{17, 18)} の逆数から評価した結果を Fig. 3 に示す¹¹⁾。Span80 ベシクルの $1/P$ 値は, POPC, DOPC, DPPC のいずれのリポソームの $1/P$ 値よりも高い値となり, Span80 ベシクルが, これらのリポソームよりも流動性に優れていることが判明した^{11, 18)}。この原因としては, 前述したように 1) Span80 ベシクルの相転移温度が低いこと, 2) Span80 の成分であるソルビタンエステル親水性の部分で中性でありイオン間相互作用がないこと, 3) 多種の分子が自己組織化して膜を形成していること, などが考えられる。Table 2 にこれらの膜流動性の結果も前述の相転移温度の結果と比較して記したが, これらの流動性は相転移温度が低いほど高くなっていることがわかる。DDS の薬物キャリアとしてベシクルを利用する場合, このような Span80 ベシクルの優れた膜流動特性は, 生体での血管内流動, 血管内皮細胞中の移動, 癌細胞近傍の血管壁細孔のベシクルの通過, あるいはベシクル-癌細胞間の膜融合などで大きな利点となると考えられる¹⁹⁾。

4.3 膜融合

Span80 ベシクルの高い膜融合性は, 筆者らのこれまでの実験からもある程度わかっていたが, 電子顕微鏡 (ネガティブ染色法) により, さらに詳しく, ベシクル-ベシクル間の膜融合を観察した。その結果を Fig. 4 に示すが, ベシクルの融合が生じていること

Fig. 5 The schematic scheme of the specific combining of ESA-immobilized vesicles with tumor cell by recognizing the special sugar chain on the surface of a tumor cell.

がわかる (42 °C)。このような融合は, インキュベート温度が -4 °C, 25 °C では観察されなかった。またこの融合は温度に対して不可逆であった。なお, リポソームでは, このような融合は観察されなかった¹¹⁾。この高い膜融合は, *in vitro* でのベシクル-細胞間で室温でも観察された⁸⁾。この膜融合性は Span80 ベシクルの低い相転移温度のみが原因でなく, Span80 の親水基の部分の温度上昇に伴う脱水和にも起因していると考えている¹¹⁾。

5. Span80 ベシクルの癌治療 DDS への利用

5.1 DDS における Span80 ベシクルの利用

筆者らは, これまでに Span80 ベシクルの多くの利用について検討してきた^{7, 20, 21)} が, 本章では DDS における利用を中心として, いくつか代表例を解説する。

ミサイル攻撃的に薬物封入 Span80 ベシクルを誘導して, そのベシクル中の抗癌剤や遺伝子などを目的細胞に集中的に導入することが可能となれば, 癌治療, 遺伝子治療などの分野で大きな成果が予測でき, 実用化が期待される。このような手法は一般に Drug Delivery System (DDS) と称されている。

筆者らは, この Span80 ベシクルを癌治療や遺伝子治療のための DDS に利用することを着想した。Span80 ベシクルを癌治療の DDS における薬物キャリアとして人体に投与する場合, 血中でのベシクル安定性, 血管壁のベシクル透過性, 癌細胞へのベシクル融合などの点で多くの利点を有している¹⁹⁾。さらに, Span80 は天然リン脂質に比べはるかに安価であり, また食品添加剤として認可されており, 人体への注射投与例も既にある⁵⁾。そこで, Span80 ベシク

Fig. 6 Comparison of the antitumor activities of the injected samples in BALB/c mice burdened with Colon26 tumor (mouse colon-cancer cell-line). Samples = PBS, docetaxel (antitumor agent: TXT), EPV (ESA-PEG Span80 vesicle immobilized with both ESA and PEG), and TEPV (EPV entrapped with TXT); the samples were injected by tail vein every three day; ESA concentrations = EPV (1.5 mM), TEPV (1.5 mM); TXT concentrations = TXT (0.7 mM), TEPV (0.7 mM); injected sample volume = 10 μ l/g (mouse).

ルをDDSに利用できれば、これまでにない多くの利点が得られると考えた。このような視点から、Span80ベシクル表面上に、癌細胞へのミサイル装置を装着するアクティブターゲティングを検討した。ここでは、主に癌治療や遺伝子導入を目的として、癌細胞表面の固有の分子を認識するリガンド、すなわち癌細胞への“ミサイル誘導装置”をそのベシクルに装着（固定化）して、癌細胞への標的機能を付与する例を挙げる。

5.2 癌細胞攻撃ミサイル装置としてのESA

ミサイル装置として、抗体^{22, 23}やレクチン¹⁰などのような特定の物質と特異的な結合親和性を持つ分子を用いることにより、以下に述べるようにベシクルに標的指向性を付与することが可能となる。レクチンとは特定の糖鎖構造を認識して結合する糖結合性タンパク質である。我々は癌細胞、特に大腸癌細胞と特異的に強い結合性を示す新規の海藻由来レクチンをミサイル装置としてSpan80ベシクル表面上に固定化し、そのベシクル膜内部には制癌剤のドセタキセル (TXT) を包み込んだSpan80ベシクルを開発した²⁴。本研究で用いたレクチンESA (*Euchuma Serra agglutinine*) は海藻トゲキリンサイ由来の新規レクチンであり、筆者らの共同研究グループが開発したものである²⁵。ESAは分子量約28000の単純タンパク

質で、複雑な枝分かれをしたハイマンノース構造を特異的に認識して結合する²⁶。癌細胞表面上の糖鎖構造は、正常細胞の糖鎖構造よりも非常に複雑化（ハイマンノース化）していることが知られている²⁷。本レクチンは癌細胞上のその複雑な構造の糖鎖を特異的に認識することにより、正常な細胞に対してよりも強い結合力で癌細胞表面に結合する。さらに、ヒトの大腸癌細胞、子宮癌細胞、肺癌細胞、骨肉腫など、多くの癌細胞に特異結合するばかりでなく、癌細胞にアポトーシス²⁸と呼ばれる細胞死を誘導する効果があることも明らかとなった²⁶。さらに動物実験レベルにおいてもレクチン自身の抗腫瘍効果が実証された¹²。

Fig. 5に模型図を示すが、このESAを癌細胞への“ミサイル装置”として利用して、Span80ベシクル表面上に固定化し、そのESA・PEG固定化ベシクル（PEGも同時に固定化してマクロファージからの攻撃を回避させた：以下EPVと略称）を癌細胞に対して特異標的させ、さらには殺傷することを試みた^{29, 30}。

ここで用いたEPVは、2章で述べたようにベシクルの安定性を強化するために、若干の大豆由来のレシチンとコレステロールをSpan80に混合させた、いわゆるハイブリッド型のSpan80ベシクル（粒径が100～300 nmの範囲で使い分けた）である。

まず、Span80ベシクルに固定化したESAが癌細胞へのミサイル装置としての機能を果たすことを確認するため、ESA固定化ベシクル（PEGを固定化していない：EVと略称）を用いて、*in vitro*で実験を行った。種々の癌細胞および正常細胞へのEVの結合能をフローサイトメーター（FACS）により測定して検討した³⁰。なお、EV内部にはトレーサーとしての蛍光物質を包括した。用いた癌細胞は、HB4C5（リンパ腫由来）、Colo201（ヒト大腸癌細胞株）、MCF7（ヒト乳癌細胞株）などであり、正常細胞として、臍帯由来繊維芽細胞（Fibroblast）や乳腺細胞（MCF10-2A）を用いた。その結果、このEVが正常細胞にはほとんど結合せず、癌細胞に対して特異結合することが明らかになった。また、上記の癌細胞や正常細胞に対して、ESAを固定化していないSpan80ベシクルとEVの癌細胞増殖抑制能を、*in vitro*で比較検討した³⁰。いずれも細胞培地に対して、1wt%のベシクルを添加した。Colo201、MCF7などの癌細胞に対しては、EVの方が細胞増殖抑制効果が大きくなった。

Fig. 7 Schematic scheme³⁸⁾ of the experiments of the specific binding between immunovesicle and HB4C5 cell (human-human hybridoma): (a) non masking of the IgM on the cell; (b) masking of the IgM.

また、それらの細胞が、ベシクル投与後1日を経過すると障害を受けていることも、顕微鏡観察により明らかにし、この現象が固定化ESAによるCaspase3経路のアポトーシス発現であることを確認した²⁶⁾。一方、正常細胞のFibroblastに対しては、そのような細胞増殖抑制能や障害の影響は観察されなかった³⁰⁾。特にヒト大腸癌細胞(Colo201)に対してその強い特性を発現した。

そこで、EVにステルス機能を付与したEPVを用いて、マウスへの投与実験を行った抗癌活性発現の一例をFig. 6に示す。マウスに移植した癌細胞は、マウス大腸癌細胞Colon26である。投与サンプルとして以下の4種類のものを用い、それらを投与した場合のマウス癌細胞の体積の経日変化を表したものである^{12, 31~35)}。サンプルは、PBS、フリーの抗癌剤ドセタキセル(TXT)、ESA・PEG固定化ベシクル(EPV)および、TXT内包のEPV(TEPV)である。Fig. 6からわかるように、抗癌剤TXTを内包したSpan80ベシクル(TEPV)の投与の場合、マウス大腸癌細胞の増殖をほぼ完全に抑制させることに成功した。また、抗癌剤TXTを内包していないSpan80ベシクル(EPV)を投与した場合でも、フリーのTXT投与の場合とほぼ同程度の抗癌活性を発現した。また、EPVの投与により、腫瘍組織の血管周辺の癌細胞にアポトーシスによる細胞死誘導のメカニズムが働くことが明らかとなった^{31, 32, 36)}。さらに、このベシクルが血管壁を通過して、癌細胞を特異的に標的する体内動態なども担癌マウスに対する放射性アイソトープ(RI)実験で実証した^{33, 34, 36)}。

以上の結果から、Span80ベシクルに抗癌剤を内包し、癌細胞に対してミサイル効果を発揮する物質(ここではESA)を膜表面に固定化することにより、癌に対するDDSを構築することが可能であり、動物

実験レベルではあるが、癌増殖抑制の治療効果が実証された。また、ヒト大腸癌細胞(Colo201)を持つ担癌マウスに対しても同様の結果が得られた。さらに、抗癌剤を使用することなく、このEPVをDDSに用いることにより、癌細胞を死滅させ、癌治療に利用できることも示すことができた。

5.3 イムノベシクルの調製とその機能

ここではミサイル物質として抗体を利用する場合について述べる。このSpan80ベシクルの表面に抗体を固定化して(イムノベシクル)、癌細胞表面の抗原(その固定化抗体に対する)を狙い撃ちさせる、いわゆる癌細胞標的機能ベシクルの調製に成功した^{22, 23, 37)}。このイムノベシクルの模型図をFig. 7に示す³⁸⁾。使用例としてのモデル癌細胞は、ヒト-ヒトハイブリドーマのHB4C5細胞(肺癌患者由来のリンパ球とヒトリンパ腫細胞の掛け合わせ細胞)であり、この細胞はその表面にIgM抗体を産生する。一方、抗体(IgGモノクローナル抗体で、ここでは抗IgM抗体を使用)のFc部分と特異結合するプロテインAを、予めベシクル表面に固定化した。そのプロテインAを媒介させて、抗IgM抗体を姿勢制御した形でSpan80ベシクル上に固定化した。なお、癌細胞は一般に負電荷を帯びているので、Span80ベシクルの癌細胞への標的性を増すために、Span80中に10~20wt%のカチオン性ペプチド脂質(*N,N*-ジヘキサデル-N^α-[6-(トリメチルアンモニウム)ヘキサノイル]-L-アラニンアミドプロマイド: N⁺C₅Ala2C₁₆, CPL¹⁷⁾と略称)を混合させた。

上記のイムノベシクルが、IgMの抗原(抗IgM抗体の標的となる)を有するHB4C5細胞にどのような標的性を有するか検討した³⁷⁾。Fig. 7(a)および(b)は、それぞれHB4C5上のIgMを、抗IgM抗体で予めマスキングしない場合と、マスキングした場合の、イムノベシクルの結合の様子を示す模型図である。イムノベシクル内部には、蛍光物質であるプロピディウムアイオダイド(PI)でラベルしたニシン精巢由来のDNAを内包させ、そのDNAのPIの蛍光をフローサイトメーター(FACS)で測定することにより、このイムノベシクルとHB4C5細胞との結合能を調べた。詳細は省略するが、マスキングしない(a)の場合にはベシクルはHB4C5細胞に結合するが、マスキングした(b)の場合にはほとんど結合しなかった。このことは、このイムノベシクルがHB4C5上のIgM抗体を認識して、HB4C5に特異結合する機能を有していることを示している。また、ヒトリンパ球上のCD45タンパク質¹⁰⁾や、ERM5-1細胞³⁹⁾上のEGFRを抗原とする場合についても、これらの抗原に対す

る抗体を固定化したイムノベシクルを用いて、それらの細胞への標的機能を、上記と同様に発現させることに成功した。

以上述べてきたように、Span80ベシクル上に抗体を固定化した、いわゆるイムノベシクルがその抗体の抗原を有している細胞に対して特異的に結合し、ベシクルに内包したDNAを、その標的細胞内に導入することができた。この導入効率はベシクル膜の膜融合性によっても大きく左右されるものと予測される。先に述べたSpan80ベシクル膜の高い融合性、流動性は*in vivo*の遺伝子導入に大きく寄与するものと期待している。

6. Spanベシクルによる遺伝子導入

本章では、我々の行った遺伝子ベクターとしてのSpan80ベシクル利用の基礎実験の結果について述べる。ベシクルで遺伝子導入する場合、導入する遺伝子をベシクル内部に内包する内包ベシクルと、ベシクル表面に遺伝子を多数結合させて遺伝子導入する外付けベシクルの2通りの方法がある。ここでは、外付けベシクルによる遺伝子導入効果⁴⁰⁾についての一例を紹介する。

Span80にカチオニックペプチド脂質CPLを混合させたナノサイズのプラスミド外付けベシクルを調製した。このベシクルの遺伝子導入ベクターとしての機能を、ヒト子宮癌細胞であるHela細胞を用いて検討した。リポーター遺伝子としては、pcDNA3にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだpcDNA3-luciを使用した。Hela細胞に遺伝子を導入後、その遺伝子発現量をルミネッセンスにより検出した。筆者らは、遺伝子導入効率を上昇させるために遺伝子とSpan80ベシクルの複合体の形成を促進するいくつかの処理剤（プロタミン、ポリLリジン（PLL）、ヒストン）を塩基性分子を中心に検討した。その結果、アミノ酸の一種であるPLLが有効であることが確認され⁴⁰⁾（実験結果は省略）、PLLの遺伝子処理により、遺伝子導入効率は約1,000倍向上することがわかった。遺伝子導入にはベシクル膜の高い流動性と安定性が必要となるが、前述のようにこのSpan80ベシクルはその条件を満たしており、市販のリポソームを用いたリポフェクタミン法に代わる遺伝子導入ベクターとして、今後の開発が期待される。

7. おわりに

Span80が複雑なエステル分子の混合物であるため、Span80ベシクル膜もまた組成がばらばらで、医薬品

には不向きという意見もあった。しかし、筆者らは、そのSpan80ベシクル膜の構成がそのエステル分子の熱力学的な自己組織化によるため、その膜の組成は一定になることを発見した。また、Span80ベシクルの高い膜流動性や膜融合性の故に、このベシクルがDDSの分野において有効である事もわかってきた。Span80の人体への注射投与は既に認可されており、筆者らの行ったSpan80ベシクルのマウス体内での毒性試験でも問題は見られなかった。こうして、従来のリポソームに代わるSpan80ベシクルの臨床応用は身近なところに来たように思われる。“ミサイル装置”としての生理活性物質を固定化したSpan80ベシクルを癌細胞に標的させ、癌細胞膜上のレセプターを介してメンブレンストレスとしてのアポトーシスシグナルを核に伝達させて癌細胞を殺傷する機能の付与、あるいは遺伝子導入機能の付与、などに関する新しい技術は、メンブレン・ストレスバイオテクノロジー分野に大きな貢献を果たせると信じる。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、地域連携推進研究（No.11793066）、基盤研究（B）（No.16360415）、科学技術振興機構（JST）シーズ発掘試験研究（平成20年度A-1199）の援助を受けた。また、本研究は下記の多くの研究者のご協力を得たプロジェクト研究として遂行することができた。ここに深く謝意を表する：（スイス連邦工科大学（ETH））Peter Walde教授；（愛媛大・医）宮崎龍彦准教授；（東海大・医）山崎等准教授；（愛媛大・総研支援）藤原隆准教授，増田晴造講師，秋山浩一助教，首藤政親技術専門職員；（愛媛大・農）菅原卓也准教授；（筑波大院）市川創作准教授；（国立四国がんセンター）佐伯俊昭臨床部長（現埼玉医大教授），青儀健二郎腫瘍外科主任研究員，平家勇司主任研究員；（ヤマキ（株））稲田明宏研究開発所長。最後に、メンブレン・ストレスバイオテクノロジーの研究會を通じて、多くのご助言を頂いた大阪大学大学院基礎工学研究科の久保井亮一教授，馬越大准教授，島内寿徳助教に深謝の意を表す。

文 献

- 1) Matsumoto S, *et al.* : *J. Colloid Interface Sci.*, **62**, (1), 149-157 (1977)
- 2) Florence AT : *Liposome Technology*; G. Gregoriadis Ed., CRC Press (Boca Raton), FL, **1**, 157-176 (1993)
- 3) Uchegbu IF and Vyas SP : *Int. J. Pharm.*, **172**, 33-70.(1998)
- 4) 藤本武彦：新・界面剤入門，三洋化成工業（株）（1981）
- 5) 粧原基：日本薬局方解説書，CAS, No.8007-43-0

- 6) Kato K, Walde P, Mitsui H and Higashi N : *Biotech. Bioeng.*, **84**, 415-423 (2003)
- 7) Kato K, Ikeda T and Shinozaki M : *J. Chem. Eng. of Japan*, **26** (2), 212-216 (1993)
- 8) Kato K, Sugahara T *et al.* : *Proc. of the 16th meeting of European Society for Animal Cell Technology* (ESACT) (Lugano), Kluwer Academic Publishers, 429-431 (1999)
- 9) Kato K, Sugahara T, *et al.* : *Proc. of Biotechnology 2000* (Berlin), 79-81 (2000)
- 10) Kato K and Hirashita J : *Proc. of the 4th APBioChEC'94* (Beijin), 592-596 (1997)
- 11) Kato K, Walde P, Koine N, Ichikawa S, *et al.* : *Langmuir* **2008**, **24**, 10762-10770 (2008)
- 12) Fukuda Y, Sugahara T, *et al.* : *Anti-Cancer Drugs*, **17**, 943-947 (2006)
- 13) Lewis JL : *Nonionic Surfactants; Organic Chemistry*, van Os, NM, Ed., Marcel Dekker Inc: New York, Surf. Sci. Ser. **72**, pp.201-240 (1998)
- 14) Wang Z and Fingas M : *HRC-J. High Res. Chrom.*, **17**, 15-19 (1994)
- 15) Bock K, Pedersen C and Thogersen H : *Acta Chem. Scand. B*, **35**, 441-449 (1981)
- 16) Kato K, Walde P, *et al.* : *J. Disp. Sci. Technol.*, **27** (8), :1217-1222 (2006)
- 17) 村上幸人編：超分子化学の基礎と応用；蛍光プローブによる反応場の評価（横野照尚），エヌ・ティー・エス，566-570 (1996)
- 18) 重川庸介，加藤敬一，戸潤一孔，佐藤玲子，河本 涼，太田多寿，辻井哲也： *Membrane*, **32** (5) , 302-310 (2007)
- 19) 重川庸介：大腸がん標的攻撃機能を有する新規レクチン固定化界面活性剤ベシクルの開発と機能解析。愛媛大学博士論文 (2008)
- 20) Kato K and Hirata K : *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, **3**, 62-73 (1996)
- 21) Kato K, Tsutanaga A and Shinozaki M : *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, **4**, 51-61 (1997)
- 22) Sugahara T, Kawashima S, Kato K, *et al.* : *Cytotechnology*, **47**, 51-57 (2005)
- 23) Kato K, Sugahara T, *et al.* : *Proc. of the 16th meeting of European Society for Animal Cell Technology* (ESACT) (Lugano), Kluwer Academic Publishers, 433-435 (1999)
- 24) 小林 猛編：“バイオターゲティングのための生体分子デザイン”，文部省科学研究費「特定領域研究」成果報告書 (1999)
- 25) Kawakubo A, *et al.* : *J. Appl. Physiol*, **9**, 331-338 (1997)
- 26) Sugahara T, Kato K, *et al.* : *Cytotechnology*, **36**, 93-99 (2001)
- 27) 日経バイオテク：日経バイオテク最新用語辞典，日経BP社 (1995)
- 28) 米原 伸編：アポトーシス研究の新展開，現代化学増刊35，東京化学同人 (1997)
- 29) 加藤敬一： *BIOINDUSTRY*, シーエムシー, **15** (15), 11-18 (1998)
- 30) 加藤敬一，菅原卓也，川久保明宏ら：化学工学シンポジウムシリーズ, **76**, 230-238 (2001)
- 31) Kato K, Walde P, *et al.* : *Proc. of 11th Liposome Research Days Conference*, P43, 168 (2008)
- 32) Kato K, Walde P, *et al.* : *Proc. of International Scientific Seminar "Science and Engineering of Biomembrane and Its Mimics"* : Japan/Switzerland, 27-28 (2008)
- 33) Kato K, Omokawa Y, Akiyama K, *et al.* : *Proc. of 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science* (ESBES 6), in Salzburg/Austria (2006)
- 34) Kato K, Fukuta Y, Fukuda Y, *et al.* : *Proc. of 6th European Symposium on Biochemical Engineering Science* (ESBES 6), in Salzburg/Austria (2006)
- 35) Kato K, Omokawa Y, Fukuda Y, Sugahara T, *et al.* : *Proc. of the 4th Symposium on Engineering Science of Liposome*, Zurich (2006)
- 36) Kato K, Omokawa Y, *et al.* : *Proc. of the 10th Asian Pacific Confederatio of Chem. Eng. (APCChE)* , Vol. 2004, No. SPACE pp.500- (2004)
- 37) 加藤敬一，川嶋真一，菅原卓也：ケミカルエンジニアリング, **45** (6), 49-55 (2000)
- 38) 秋吉一成・辻井 薫 監修：リポソームの応用の新展開－人工細胞の開発に向けて－；非イオン界面活性剤 Span80 の構造と利用（加藤敬一），エヌ・ティー・エス，第8章, 407-414 (2005)
- 39) Kato K, Manabe T, *et al.* : *Proc. of the 10th Asian Pacific Confederatio of Chem. Eng. (APCChE)* Vol. 2004, No. SPACE pp.501- (2004)
- 40) Ohama Y, Heike Y, Sugahara T, *et al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69** (8), 1453-1458 (2005)

(Received 15 October 2008 ;

Accepted 17 October 2008)

著者略歴

加藤 敬一（かとう・けいいち）

1975年 3月 九州大学大学院工学研究科化学機械工学専攻博士課程単位修得退学
 1977年 12月 工学博士
 1977年 4月 九州大学工学部 助手
 1982年 3月 愛媛大学工学部資源化学学科 助教授
 1999年 文部省在外研究員として，スイス連邦工科大学およびマンチェスター工科大学に留学
 2007年 4月 愛媛大学大学院理工学研究科物質生命工学専攻 准教授

現在に至る