薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
106(7) 605-608 (1986)

リピッドマイクロスフェアと MM46 腫瘍細胞との親和性

東海林洋子,^{*,a} 水島 裕,^a 亀谷哲治^b

聖マリアンナ医科大学第一内科,^a 星薬科大学^b

The Interaction of Lipid Microspheres and MM46 Tumor Cells

YOKO SHOJI,^{*,a} YUTAKA MIZUSHIMA,^a and TETSUJI KAMETANI^b

Department of Internal Medicine, St. Marianna University, School of Medicine,^a
2095, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa, 230, Japan and Institute of
Medicinal Chemistry, Hoshi University,^b 2-4-41, Ebara,
Shinagawa-ku, Tokyo, 142, Japan

(Received February 20, 1986)

Lipid microspheres (LM) with 0.2 μ m in diameter possess properties as drug carriers resembling liposome. The interaction of LM with MM46 tumor cells *in vitro* was investigated for the application in drug delivery systems of anti-tumor drugs. LM were recognized by electron microscopy to be taken up by tumor cells. The uptake of LM by tumor cells increased when an anti-MM46 monoclonal antibody was added. The uptake of LM by the tumor cells increased about 3-fold by use of anti-MM46 monoclonal antibody and protein A which had been incorporated into the surface of LM. The results suggest that LM, particularly with the use of anticancer antibodies, is valuable in drug delivery systems for anti-tumor drugs.

Keywords—lipid microsphere; drug delivery system; MM46 tumor cell; anti-MM46 monoclonal antibody; protein A

緒 言

栄養輸液として、臨床的に大量に用いられているリピッドマイクロスフェア (LM) は、その特性がリボゾームと類似し、炎症部位や網内系細胞に親和性を有することから、LM を薬剤キャリアーとする drug delivery system (DDS) が報告されてきた。¹⁻³⁾

ところで、抗腫瘍化合物は、毒性が強く、全身性の副作用など、投与上重大な問題を抱えているため、癌細胞へのターゲッティングを行う適切な DDS が要望されている。副作用の軽減を計り、ターゲッティング効果を増強する目的で、抗腫瘍化合物含有リボゾームは、数多く報告されている。⁴⁾ リボゾームに含有した化合物は、free の形より抗腫瘍効果があることから、⁵⁾ 治療への期待は大きい。しかしながら、安全性、製剤の安定性、粒子サイズの不均一性など問題点が多く、実際に臨床に応用するのは難しい。⁶⁾

一方、LM は栄養輸液として副作用もなく多量に用いられていることから、安全な薬剤キャリアーとして注目して良いと思われる。^{1,2)} そこで、LM を癌治療における薬剤キャリアーとして用いるために、C3H/He 自然発生乳癌由来の腹水化腫瘍 MM46 細胞と LM の親和性を *in vitro* にて、¹⁴C 標識 LM 及び電顕観察にて検討した。更に、ターゲッティング効果を高める目的で、腫瘍 MM46 に対するモノクローナル抗体の 1 つ MM1- γ 2b-1 抗体⁷⁾ (MCA) を LM に結合させ、MM46 腫瘍細胞と LM の親和性に及ぼす影響をみた。

実 験 の 部

1. LM 及び ¹⁴C 標識 LM (¹⁴C-LM) の作製 10% (w/v) 大豆油、1.2% (w/v) 大豆レシチン、2.5% (w/v) グリセロールの混合液を既述の方法に従い、²⁾ マントン-ゴーリン乳化機にて乳化し、LM を作製した。次に、10% (w/v) 大豆油、1.2% (w/v) 大豆レシチン、2.5% (w/v) グリセロールの混合液に 0.013% (w/v) glycerol tri[1-¹⁴C] palmitate (Amersham 社) を加え、同様にして乳化し、比放射能 9.04 μ Ci/ml の ¹⁴C-LM を作製した。

2. Protein A 結合 LM 及び Protein A 結合 ¹⁴C-LM の作製 Protein A (Sigma 社) を結合させた LM 及

び ^{14}C -LM を作製した。N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP, Pharmacia 社) を用いたタンパク共有結合法に準じて行った。⁹⁾ まず、10 μM dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) のクロロホルム-メタノールの9対1混合溶液に12 μM SPDP と20 μM triethanolamine を添加し、2時間、室温にて攪拌することにより反応させた。反応終了後、有機層を水にて洗浄して未反応物を除去し、SPDP と DPPE の結合物 (PDP-PE) を得た。20% (w/v) 大豆油、2.4% (w/v) 大豆レシチン、5% (w/v) グリセロール、0.04% (w/v) PDP-PE を混合し、LM の製法に従い、PDP-PE 含有 LM を作製した。次に、protein A を0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) にて1 mg/ml に溶解し、0.36 mM SPDP 無水エタノール溶液を添加し、SPDP 結合 protein A (PDP-protein A) を得た。Protein A 未結合 SPDP を除去後、更に、50 mM dithiothreitol にて還元し、還元 PDP-protein A を得た。過剰 dithiothreitol を除去後、還元 PDP-protein A 溶液80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に、先に調製した PDP-PE 含有 (20% (w/v) 大豆油含有) を等量加え、室温にて一夜、攪拌することにより、protein A 結合 LM (10% (w/v) 大豆油含有) を調製した。同様にして ^{14}C -LM に protein A を結合させた。 ^{125}I 標識 protein A を用いて同様にして LM と共有結合させた後、Sephacrose 4B にて未結合の protein A を除去して LM に結合する protein A の量をみると、LM 1 ml に対してほぼ30 μg であった。加えた protein A 量の75%に相当していた。

3. モノクローナル抗体結合 LM の作製 腫瘍 MM46 に特異的な MCA⁷⁾ と、LM, ^{14}C -LM, protein A 結合 LM, protein A 結合 ^{14}C -LM それぞれを容量比1対9、最終タンパク濃度が3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように混和し、室温にて2時間反応させた。MCA の各種 LM に対する結合率は次のようにして求めた。すなわち、 ^3H 標識マウス Ig (immunoglobulin) G を用い、同様にして LM 及び protein A 結合 LM と反応させ、未反応の IgG を孔径0.1 μm のミリポアフィルターにてろ過し、ろ液の放射活性を測定し、未反応 IgG 量を求めた。加えた全 IgG 量から未反応 IgG 量を差し引き、LM に結合した IgG 量とした。この時、ミリポアフィルターに吸着する IgG 量は無視し得る値であり、孔径0.1 μm のミリポアフィルターを通過する LM は約0.28% であった。これより、LM 及び protein A 結合 LM に対する MCA の結合率はタンパク濃度にかかわらず、それぞれ約71%、95% であった。なお、反応は2時間で平衡に達していた。

4. 細胞培養 5×10^6 個の MM46 腫瘍細胞を RPMI-1640 培養液 1 ml に浮遊させた浮遊液に ^{14}C -LM, MCA 結合 ^{14}C -LM, マウス IgG (mIgG) 結合 ^{14}C -LM, protein A 結合 ^{14}C -LM, MCA 結合 protein A 結合 ^{14}C -LM, mIgG 結合 protein A 結合 ^{14}C -LM それぞれ50 μl (大豆油含有量4.5 mg) を混合し、37°C にて60分間、CO₂ インキュベーターにてインキュベートした。この時の MCA 及び mIgG のタンパク濃度は3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いた。反応終了後、1000 rpm にて5分間遠心し、0.0005% (v/v) Tween 20 生理食塩水溶液にて5回洗浄した。洗浄後、1000 rpm にて5分間遠心し、沈殿した細胞を集め、Soluene 350 (Packard 社) にて溶解し、液体シンチレーションカウンタ (Aloka 社) にて、細胞内に取り込まれた放射活性を測定した。細胞内に取り込まれた LM の値は、加えた全放射能に対する百分率で表示した。有意差検定は、Student's *t*-test にて行った。

5. 電顕 RPMI-1640 培養液にて 5×10^6 個/ml に浮遊させた MM46 細胞浮遊液 1 ml に LM, MCA 結合 LM, MCA 結合 protein A 結合 LM それぞれ100 μl を加え37°C にて60分間インキュベートした。反応終了後、1000 rpm にて5分間遠心し、冷リン酸緩衝液にて、3回洗浄した。洗浄後、1000 rpm にて5分間遠心し、沈殿した細胞を集め、1% 四酸化オスミウム酸液にて4時間固定し、常法に従い、電顕用の試料を作製した。電顕観察は、JEOL (日本電子) 透過型電子顕微鏡にて行った。

結 果

1. MM46 腫瘍細胞による LM の取り込みに及ぼす MCA の影響

MM46 腫瘍細胞による LM の取り込み率と、取り込みに及ぼす MCA の影響を検討した結果を Fig. 1 に示した。LM のみの取り込みをコントロールとすると、MCA を結合させた LM の MM46 腫瘍細胞による取り込みは、有意に増加した。特に、protein A を介して MCA を LM に結合させると、単に LM と MCA を結合させた時に比べ、2倍近い取り込み率を示した。mIgG は、取り込みに対し有意な影響は及ぼさなかった。

2. MM46 腫瘍細胞による LM の取り込み、電顕による観察

Fig. 2 は、MM46 腫瘍細胞 5×10^6 個/ml の浮遊液 1 ml と、MCA 結合 LM (MCA 濃度30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 100 μl を混和した時の電顕像である。細胞表面に接着している LM が観察され、また、偽足を出し、典型的なエンドサイトーシスの形態を呈しながら、細胞内に取り込まれている LM も観察された。Fig. 3 は、protein A を介して MCA を結合させた LM と MM46 腫瘍細胞を混和させた時の電顕像である。やはり、偽足を出しながら、LM を取り込もうとしているのが観察された。MCA の存在なしに LM と腫瘍細胞を混和させた時は、細胞表面に接

Fig. 1. Uptake of Lipid Microspheres (LM) by MM46 Tumor Cells

5×10^6 MM46 tumor cells suspended in a volume of 1 ml of RPMI-1640 were incubated with $50 \mu\text{l}$ of LM for 60 min at 37°C . After an incubation, radioactivities taken up by cells were estimated. LM-MCA: LM coupled by anti-MM46 monoclonal antibody, LM-mIgG: LM coupled by mouse IgG. Statistical analysis comparing to non-coated LM alone was performed by Student's *t*-test.

a) $p < 0.01$, b) $p < 0.001$.

□ non-coated LM, ▨ protein A-coated LM.

着している LM は観察されたものの、MCA 存在下に見られたような活発なエンドサイトーシスは観察されなかった。

考 察

以上の結果より、LM は MM46 腫瘍細胞に対し親和性があり、細胞内移行は、形態学的にはエンドサイトーシスにより行われるものと思われた。特に LM の腫瘍細胞内移行は、MCA により増強され、エンドサイトーシスも活発に行われるようであった。また、MCA の効果も、単に LM と混和結合させるだけでなく、IgG の Fc 部分と親和性の高い protein A⁹⁾ を介して強固に LM に結合させることにより、倍増した。リボゾーム表面へのタンパク結合法もいくつか報告されているが、¹⁰⁾ リボゾーム表面の修飾あるいは抗体そのものに修飾を施すため、抗体活性の低下やリボゾーム粒子の破壊が考えられる。今回、protein A を介して抗体を LM に結合させたが、抗体を修飾する必要がないことから、結合時に抗体活性低下を考慮する必要がなく、容易に結合することができた。また、protein A 結合 LM は比較的安定で、長期保存後も粒子サイズが変化しなかった。

これらのことから、LM を用いた DDS は、癌治療にも有効である可能性が示唆された。また、臨床的に使用の難しいリボゾームの欠点を克服し得る薬剤キャリアーとして期待できる。

Fig. 2. Electronmicrograph of a MM46 Tumor Cell Taking up LM with Anti-MM46 Monoclonal Antibody

$5 \times 10^6/\text{ml}$ of MM46 tumor cells were incubated with $100 \mu\text{l}$ of LM and $30 \mu\text{g}$ of anti-MM46 monoclonal antibody at 37°C for 60 min in a atmosphere of 5% CO_2 . Arrows show LM. $\times 10000$.

Fig. 3. Electronmicrograph of MM46 Tumor Cells Taking up LM Coupled by Anti-MM46 Monoclonal Antibody via Protein A

$5 \times 10^6/\text{ml}$ of MM46 tumor cells were incubated with $100 \mu\text{l}$ of LM coupled by anti-MM46 monoclonal antibody via protein A at 37°C for 60 min in a CO_2 incubator. Arrows show LM. $\times 5400$.

謝辞 本研究を行うに当り、実験にご協力下さいました聖マリアンナ医科大学中央電子顕微鏡研究施設 與那覇朝英氏、リビッドマイクロスフェアの作製にご協力下さいました森下製薬株式会社に深謝致します。

引用文献

- 1) Y. Mizushima, A. Yanagawa, K. Hoshi, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 666 (1983).
- 2) Y. Mizushima, T. Hamano, K. Yokoyama, *Ann. Rheum. Diseases*, **41**, 263 (1982).
- 3) Y. Mizushima, Y. Wada, Y. Etoh, K. Watanabe, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 398 (1983).
- 4) J. N. Weinstein, *Cancer Treat. Reports*, **68**, 127 (1984).
- 5) I. J. Fidler, Z. Barnes, W. E. Fogler, R. Kirsh, P. Bugelski, G. Poste, *Cancer Res.*, **42**, 496 (1982).
- 6) S. B. Kaye, *Cancer Treat. Rev.*, **8**, 27 (1981).
- 7) M. Seto, N. Umemoto, M. Saito, Y. Masuho, T. Hara, T. Takahashi, *Cancer Res.*, **42**, 5209 (1982).
- 8) D. Pain, A. Surolia, *J. Immunol. Methods*, **40**, 219 (1981).
- 9) J. W. Goding, *J. Immunol. Methods*, **20**, 241 (1978).
- 10) T. D. Heath, *Science*, **210**, 539 (1980); L. D. Leserman, J. Barbet, F. Kourilsky, *Nature* (London), **288**, 602 (1980); D. Sinha, F. Karush, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 554 (1979).