HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高度不飽和リン脂質リポソームの性状とその抗腫瘍効果
Author(s)	藤本，章人；佐々木，甚一；細川，雅史 他
Citation	脂質生化学研究，43，318-321
Issue Date	2001
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49842
Type	journal article
File Information	PJCBL43_318.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

III－25

高度不飽和リン脂質リポソームの性状とその抗腫瘍効果

藤本章人（北大院・水産）、佐々木甚一（弘前大・医）
細川雅史、高橋是太郎（北大院・水産）

[要旨]

高度不飽和リン脂質は多様な機能を有する生体適合性（生体親和性）に優れた脂質形態である。本研究では高度不飽和リン脂質リポソームの免疫賦活促進機能を調べることを目的として、フィトグリコーゲン(PG)を内包させた高度不飽和リン脂質リポソーム及びPG未内包高度不飽和リン脂質リポソームを調製し、それらの性状と *in vitro* , *in vivo* 相方における抗腫瘍効果について検討した。調製した *sn*-2 位 DHA 結合型リン脂質リポソーム（PC:PS＝7:3 モル比）は６～９層からなるマルチラメラベシクル(MLV)*であり、粒度分布のピークは約１μm付近にあった。PG を内包させなかった *sn*-2 位 DHA 結合型リン脂質 MLV は少なくとも１ヶ月以上の粒度分布安定性を示し、Meth-A fibrosarcoma に対して比較的強い抗腫瘍効果を示した。

[目的]

高度不飽和リン脂質は多様な機能を有する生体適合性（生体親和性）に優れた脂質形態である。しかし高度不飽和リン脂質からなるリポソームに関しては僅かに酸化安定性については調べられている[1]ものの、DDS などのターゲティング療法用素材としての有用性については検討した例が見当たらない。

我々は、最近、抗腫瘍性が明らかになったホタテ貝由来グリコーゲン(phytoglycogen: PG、分子量:47×10^4)[2]を内包させた高度不飽和リン脂質MLV*がマクロファージあるいは単球などに貪食され、それらを活性化することにより[3,4]、癌の予防あるいは転移の抑制が、ある程度可能になるのではないかと考えた。

そこで本研究では、高度不飽和リン脂質リポソームの免疫賦活促進剤としての機能を調べることを目的とし、PG を内包させた高度不飽和リン脂質リポソーム及び未内包のものの性状と *in vitro* , *in vivo* 相方における抗腫瘍効果について検討した。

脚注　*MLV：マルチラメラベシクル（多重層小胞）

[実験方法]

高度不飽和リン脂質リポソームの調製

高度不飽和ホスファチジルコリン(PC)は、ブタ膵臓由来の phospholipase A_2 により大豆由来リゾ PC の *sn*-2 位に DHA を、選択的にエステル合成させて調製した（調製物を 2-DHA-PC と呼称)。更に 2-DHA-PC を *Streptomyces* sp. 由来の phospholipase D を用いて、ホスファチジル基転移し、高度不飽和ホスファチジルセリン（2-DHA-PS）も調製した。これらのリン脂質を材料とし、薄膜剥離法によりリポソームを調製した。すなわち、2-DHA-PC：2-DHA-PS（モル比 7:3)7.15 mg を 1 ml のバイアル中に乾固させ、その中に 50 mg/ml PG-PBS 溶液（PG を内包させないものは PBS 溶液のみ）を 143 μl 入れ、30 rpm、30 min 攪拌した。その後、PBS 657 μl を同バイアルに追加し、更に 1500 rpm、20 min 攪拌して、最終的にリン脂質量と PG 量が共に 1 mg/ml PBS 溶液（PG を含まない場合は PG 0 mg/ml PBS）になるように調整した。調製したリポソームを孔径 1 μm のフィルターに通し、粒子径をそろえてから使用した。

高度不飽和リン脂質リポソームの性状

調製したリポソームの平均粒子径と粒度分布の経時的な変化は、粒度分布測定装置によって調べた。また透過型電子顕微鏡を用い、ネガティブ染色法にて膜の形態を観察した。PG を内包させたリポソームについては超遠心分離法(70000 rpm×1 h)により上清から回収された PG をアンスロン硫酸法で測定してリポソーム中に内包された PG 量の割合を差し引きによって求めた。

Meth-A fibrosarcoma の増殖に及ぼす高度不飽和リン脂質の影響

RPMI 1640 培地で培養した繊維芽肉腫ガン細胞(Meth-A fibrosarcoma) 1×10^4 個を 96 well プレートにまき、所定の濃度になるようにリポソーム試料を添加した。細胞増殖への影響は WST-1 試薬を用いた発色法により生細胞数を換算することで評価した。

BALB/C マウスにおける高度不飽和リン脂質の抗腫瘍効果

BALB/c マウス(N=5)の皮内に繊維芽肉腫ガン細胞（Meth-A fibrosarcoma）2.7×10^6 個を移植後、2、4、6 日目にそれぞれのリポソーム試料 1 ml(1 mg/ml)を腫瘍移植部に注射した。移植後の 3 週目に腫瘍サイズを計測することにより、抗腫瘍効果を評価した。

[結果及び考察]

PLA_2 を用いて DHA を *sn*-2 に選択的にエステル合成させた 2-DHA-PC は脂肪酸組成比で DHA を 46.7%含んでおり、他にパルミチン酸を 15.3%、リノー

ル酸を 26.0%含有していた(Table 1)。2-DHA-PS の脂肪酸組成も殆ど同様であった。

透過型電子顕微鏡で高度不飽和リン脂質リポソームの形態を観察したところ6～9層からなる MLV を認めた(Fig. 1)。

リポソームの平均粒子径は約1 μmであった (Table 2)。PG を内包させたリポソーム(内包率 約 30～50%)は内包させていないリポソームよりも僅かに広い粒度分布を示していた(Fig. 2)。調製後6日目までの粒度分布変化を調べたところ、PG を内包させたリポソーム及び内包させていないリポソームのいずれにおいても大きな変化はみられなかった。しかしその後、PG を内包させたリポソームでは、約 5μm 付近に新たなピークが現われ始め、その割合が時間の経過と共に徐々に増加した。一方、PG を内包させていないリポソームはその後約1ヶ月を経ても粒子径に大きな変化は見られず、安定であることが明らかとなった。

高度不飽和リン脂質リポソームである 2-DHA リン脂質 MLV の抗腫瘍性を明らかにするため、*in vitro* 及び *in vivo* 相方の Meth-A fibrosarcoma に対する影響を調べた。*in vitro* の Meth-A fibrosarcoma に対する増殖抑制試験では 2-DHA リン脂質 MLV の添加により、PG 内包、未内包共 24 h で約 60%、48h では約 80%の増殖抑制能がみられた。一方、PG の単独添加においてはほとんど増殖抑制能を示さなかった。

in vivo の抗腫瘍試験では PG を内包しない 2-DHA リン脂質 MLV を 1 mg/ml ×3 shot した群でも control に対し約 50%の増殖抑制効果を認めた (Fig. 3)。PG 内包型については現在検討中である。

本リポソームは生体内でマクロファージに最も貪食されやすいと考えられる PS 含有型(PC:PS = 7:3 mole rate)の MLV である。本研究で高度不飽和 PC/PS 型 MLV が高い粒度分布安定性を示し、更に *in vivo* において比較的強い抗腫瘍効果を示したことから、今後免疫賦活作用機序の解明が待たれる。

[参考文献]

1) E. Nara, K. Miyasita and T. Ota : Oxidative stability of liposomes prepared from soybeans PC, chicken egg PC and salmon egg PC. , *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1736-1738 (1997)

2) Y. Takaya, H. Ichinohe, H. Uchisawa, J. Sasaki, H.Matsue and K. Isida : Antitumor glycogen from scallops and the interrelationship of structure and antitumor activity. , *Marine Biotechnology* , **6** , 208-213,(1998)

3) 寺田 弘 ,吉村 哲郎 編著 ライフサイエンスにおけるリポソーム実験マニュアル, pp 289-334 (シュプリンガー・フェアラーク東京)

4) Isaiah J.Fidler : Macrophages. in Encyclopedia of Cancer, Vol. II , Academic press, pp1031-1041, (1997)

Table 1. 高度不飽和リン脂質の脂肪酸組成

Fatty acid	LPC(%)	2-DHA-PC (%)
$C_{16:0}$	29.9	15.3
$C_{18:0}$	7.4	1.8
$C_{18:1}$	10.3	7.0
$C_{18:2}$	48.0	26.0
$C_{18:3}$	4.5	2.0
$C_{20:4}$	n.d	0.8
$C_{20:5}$	n.d	0.4
$C_{22:6}$	n.d	46.7

LPC：大豆レシチン由来リゾホスファチジルコリン
（大豆レシチンのホスホリパーゼA_2加水分解物）
2-DHA-PC：*sn*-2 DHA導入型ホスファチジルコリン

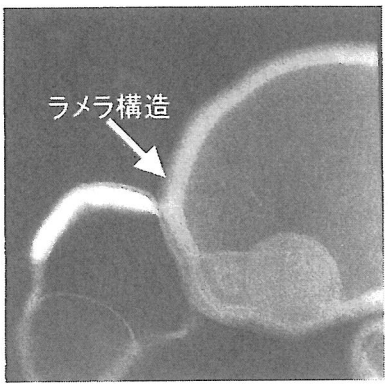


Fig. 1. 高度不飽和リン脂質リポソーム
(2-DHAリン脂質MLV)の電子顕微鏡像

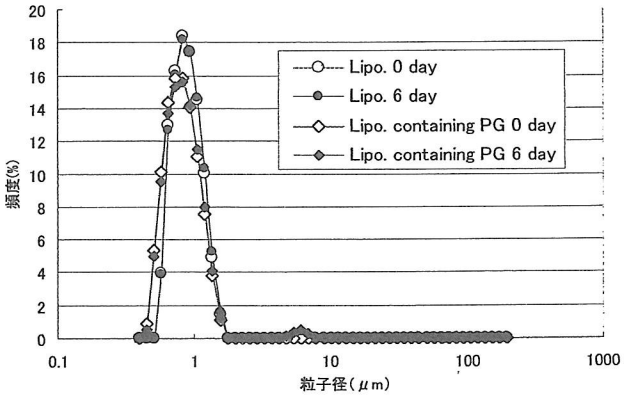
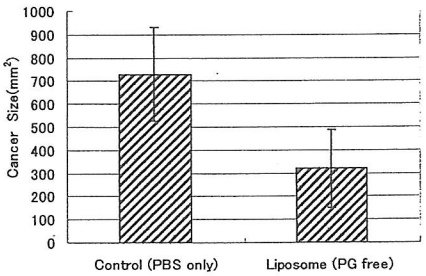


Table 2. 2-DHAリン脂質MLVの平均粒子径

	Mean(μm)
liposome	0.8526±0.0220
lipo. containing PG	0.8086±0.0404

Fig. 2. 各リポソームの粒度分布とその経時的変化
Lipo.: 2-DHAリン脂質MLV
lipo. containing PG：PG内包型2-DHAリン脂質MLV



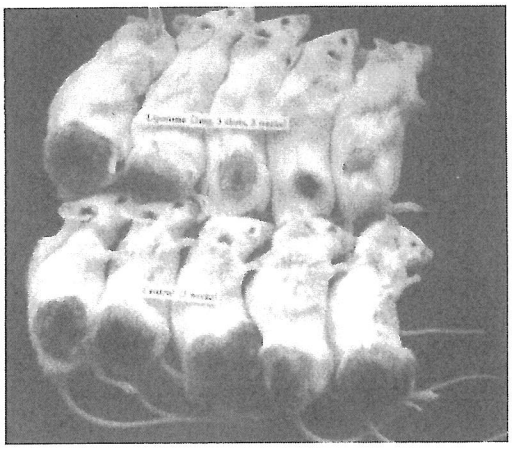


Fig. 3. BALB/cマウスを用いたMeth-A fibrosarcomaに対する2-DHAリン脂質MLVの抗腫瘍効果
写真　上5匹：2-DHAリン脂質MLV(PG未内包)*治療区　；下5匹：コントロール区(PBSのみ)
*PG内包型については現在検討中