

# 免疫抑制剤リポソーム化タクロリムスの開発と 臓器移植における有用性の検討

奈良県立医科大学第1外科学教室

八倉 一晃

## THE EFFICACY OF LIPOSOMAL TACROLIMUS IN ORGAN TRANSPLANTATION

KAZUAKI YAGURA

First Department of Surgery, Nara Medical University

Received July 2, 2001

*Abstract*: The tissue distribution and immunosuppressive efficacy of liposomal tacrolimus were investigated. For the pharmacokinetic study, 0.5mg/kg of tacrolimus was administrated to male Wistar rats intravenously as conventional intravenous (iv) formula (group A) or liposomal formula (group B). Changes in time of blood and tissue tacrolimus levels were compared between the two groups. Tacrolimus levels in the liver and spleen were significantly higher in group B than in group A ( $p < 0.05$ ). On the contrary, tacrolimus levels in the kidney and brain were significantly lower in group B. In a canine liver transplantation model, 0.05mg/kg/day of liposomal tacrolimus for 14 days significantly prolonged allograft survival (MST: 202 days), in comparison to the same dose of tacrolimus as iv formula (MST: 24 days). In a canine allogeneic kidney transplantation, however, liposomal tacrolimus showed lower immunosuppressive efficacy (MST: 16 days) in comparison to iv formula (MST: 26 days). The difference of results between liver and kidney transplantation models suggests that local immunosuppressive effect in the liver allograft is the dominant mechanism of enhanced immunosuppressive efficacy of liposomal tacrolimus.

**Key words** : liposome, tacrolimus, local immunosuppression, organ transplantation

### 緒 言

タクロリムスは強力な免疫抑制剤で今日、全世界で様々な臓器移植の際に用いられている<sup>1,2)</sup>。しかし、その副作用である神経障害や腎障害のため、減量や薬剤の変更が必要となることもしばしば経験される<sup>1,2)</sup>。中枢神経障害については、脳内にタクロリムス親和性を有するFK binding protein (FKBP)が高濃度に存在する事との関連が示唆されており<sup>3)</sup>、副作用のtarget organへのタクロリムスの集積を抑制する事が副作用の軽減につな

がると推察される。一方、臓器移植における免疫抑制効果は、免疫抑制剤をグラフト局所に集積させることによって高められる事が報告されている<sup>4-9)</sup>。肝移植モデルにおいて、タクロリムスと同じカルシニューリン阻害薬であるサイクロスポリンの経門脈投与による局所免疫抑制療法が、通常の全身投与に比べて良好な拒絶反応抑制効果をもたらす事も明らかにされている<sup>10, 11)</sup>。

リポソーム化タクロリムスは、細網内皮系(RES)に取り込まれ易い性質をもつリポソームにタクロリムスを包埋した製剤であり、タクロリムスの免疫抑制効果を損な

わずに副作用を軽減する Drug Delivery System として開発された。リポソームはリン脂質多重膜構造をとる小球で、静注投与すると RES に富む肝、脾などの臓器に取り込まれやすい性質を持つ<sup>12)</sup>。一方、タクロリムスの副作用の主たる標的臓器である腎や脳は、RES に乏しくリポソームが集積しにくい。したがってリポソーム化タクロリムスは免疫臓器である脾の免疫反応の抑制、さらに肝移植においては移植臓器局所への集積による局所免疫抑制効果をもたらすと同時に、腎障害や中枢神経障害を軽減することが期待される。本研究では、リポソーム化タクロリムスが *in vivo* でどのような薬物分布を示すのかを検討し、さらに臓器移植における拒絶反応抑制効果についても動物実験モデルにおいて検討した。

## 実験材料と方法

### I. リポソーム化タクロリムスの作製方法

以下に述べる方法にてタクロリムスをリン脂質多重膜を呈する小球に包埋した。タクロリムスの原末(藤沢製薬株式会社、大阪)を chloroform 中で phosphatidylcholine, cholesterol ならびにタクロリムスを、分子量比が 7:7:0.8 となるように混合した。次にこの溶液を evaporator(大竹製作所株式会社、東京)で 50℃ にて乾燥し、生理食塩水にて溶解した。このリポソーム溶液を高圧にて膜フィルターに通し、リポソームの直径を平均 145 nm に調整した。生体内で安定するよう、リポソーム表面を HSPE-PEG5K (hydrogenated soy phosphatidil ethanolamine bound with polyethylene glycol) にて処理した (Fig. 1)。

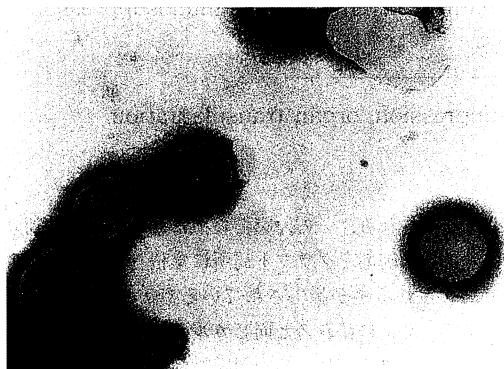


Fig. 1. Electron microscopic view of liposomal tacrolimus. Tacrolimus was incorporated into the liposomes which are multilamellar phospholipid vesicles. The diameter of liposomes was 100–150 nm.

比較対照のために用いた静注製剤は、通常の静注用タクロリムスをリポソーム化製剤と同一濃度となるように生理食塩水に溶解して作製した。

### II. 薬物動態実験

#### 1) 実験動物

薬物動態実験には、体重 180–220 g の雄性 Wistar シラット(竹内実験動物、大阪)を用いた。

#### 2) 実験群

雄性 Wistar シラットに、静注用タクロリムス 0.5 mg/kg (A 群, n=12) または、リポソーム化タクロリムス 0.5 mg/kg (B 群, n=12) を尾静脈より投与した。それぞれ静注 10 分, 1, 6, 24 時間後に、各群 3 頭ずつ犠牲死させ脾臓、肝臓、腎臓、脳、小脳における組織内タクロリムス濃度および血中タクロリムス濃度を測定した。

#### 3) タクロリムス濃度の測定法

血中および組織内タクロリムス濃度は、抗タクロリムスモノクローナル抗体を用い酵素抗体法にて測定した<sup>13)</sup>。本法では遊離およびリポソーム化タクロリムス双方の総和が測定される。血中濃度は測定に全血を用いた。組織内濃度では検体をホモジネートして生理食塩水にて希釈、遠沈した上清を測定した。

### III. 移植実験

#### 1) 実験動物

肝移植および腎移植実験には体重 8–14 kg のビーグル犬(東洋ビーグル、静岡および NRD ビーグル、北海道)を用いた。

#### 2) 犬同種同所性肝移植方法

我々の施設で従来より行っている方法を用いた<sup>14)</sup>。麻酔にはサイアミラールナトリウム、臭化パンクロニウムを用いて導入、気管内挿管し、酸素、笑気混合ガスにより維持した。ドナー肝は、門脈より 4℃ のヘパリン 1000 単位含有乳酸加リンゲル液 1000 ml にて灌流後、肝を摘出し移植するまで 4℃ 有乳酸加リンゲル液に単純浸漬保存した。レシピエント犬は、右大腿静脈–右外頸静脈間、脾静脈–左外頸静脈間にバイパスを設置し、自己肝を摘出後、同所性にドナー肝を肝上部大静脈、門脈、肝下部大静脈、肝動脈の血管吻合により移植した。胆道再建は胆嚢十二指腸吻合にて行った。

#### 3) 犬同種異所性腎移植方法

麻酔は肝移植と同様の方法で行った。ドナー犬より左腎動脈、腎静脈および尿管を結紮切離し左腎を摘出した。摘出後ただちに 4℃ 有乳酸加リンゲル液に単純浸漬し、4℃ のヘパリン 1000 単位含有乳酸加リンゲル液 200 ml にて腎動脈より灌流した。グラフトの腎動脈をレシピエントの右内腸骨動脈に、腎静脈を右総腸骨静脈に吻合し、

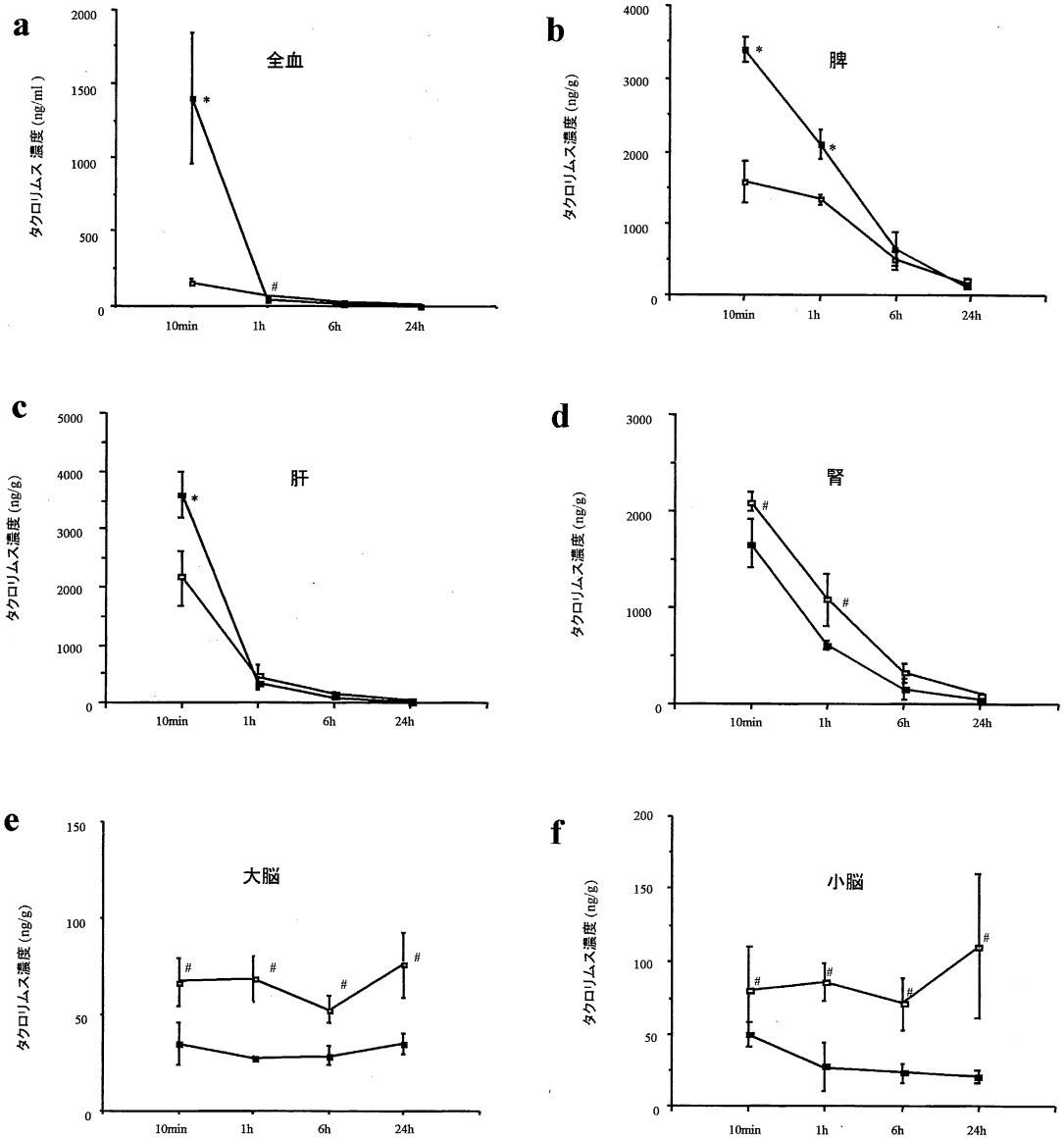


Fig. 2. Time-dependent changes of blood (a) and tissue (b-f) tacrolimus levels in the pharmacokinetic study in the rats. The values show tacrolimus levels after intravenous injection of 0.5 mg/kg of tacrolimus as iv formula (group A, open square) or liposomal formula (group B, closed square). The tacrolimus levels of the spleen and liver in group B are significantly higher than those in group A (\* p<0.05), whereas the tacrolimus levels in the kidney, cerebrum, and cerebellum in group A are significantly higher than those in group B (# p<0.05).

尿路再建は尿管膀胱吻合にて行った。右腸骨窩への異所性腎移植終了後、レシピエントの自己腎は摘出した。

#### 4) 実験群

肝移植ならびに腎移植のレシピエントそれぞれにおいて以下の3群を作製した。肝移植は、L-I:免疫抑制剤を投与しない対照群(n=5), L-II:タクロリムス0.05 mg/kg/dayを静注用製剤で術当日より術後13日目まで静注投与した群(n=5), L-III:同量のタクロリムスをリポソーム化製剤で静注投与した群(n=5)とした。腎移植は、K-I:免疫抑制剤を投与しない対照群(n=5), K-II:タクロリムス0.05 mg/kg/dayを静注用製剤で術当日より術後13日目まで静注投与した群(n=5), K-III:同量のタクロリムスをリポソーム化製剤で静注投与した群(n=7)とした。肝移植、腎移植群とも移植14日目以降、免疫抑制剤の投与は行わなかった。

#### 5) 検討項目

各群間でレシピエント犬の生存日数を比較した。肝移植、腎移植群とも、死亡後直ちに剖検し、組織学的検索を行った。さらに肝移植群では移植14日目に開腹肝生検を行い拒絶反応について組織学的に検討した。拒絶反応の程度は、肝移植ではKemnitzら<sup>18)</sup>の診断基準にしたがい、腎移植ではThe Banff working classification of kidney transplant pathology<sup>19)</sup>にしたがった。

#### IV. 統計学的処理方法

タクロリムス濃度は、平均値±SDで表し、2群間のタクロリムス濃度の比較にはStudent's t-testを用いた。生存日数の比較にはgeneralized Wilcoxon検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意の差とした。

## 結 果

### I. 薬物動態実験

#### 1) 血中濃度(Fig. 2a)

投与後10分では、リポソーム化タクロリムスを投与したB群はA群に比較し有意に高値であった。B群での濃度は急激に低下し、投与1時間後以降有意差を認めなかった。

#### 2) 組織内濃度(Fig. 2b-f)

脾臓組織内タクロリムス濃度は、静注後10分、1時間でB群はA群に対し有意に高値であった。また、肝においても投与後10分でB群がA群に対し有意に高値であった。一方、腎の組織内濃度は投与後10分、1時間でB群が有意に低い値であった。大脳、小脳では、タクロリムスの組織内での停滞がみられ、タクロリムス濃度は、投与直後から24時間後までを通じてB群が有意に低値

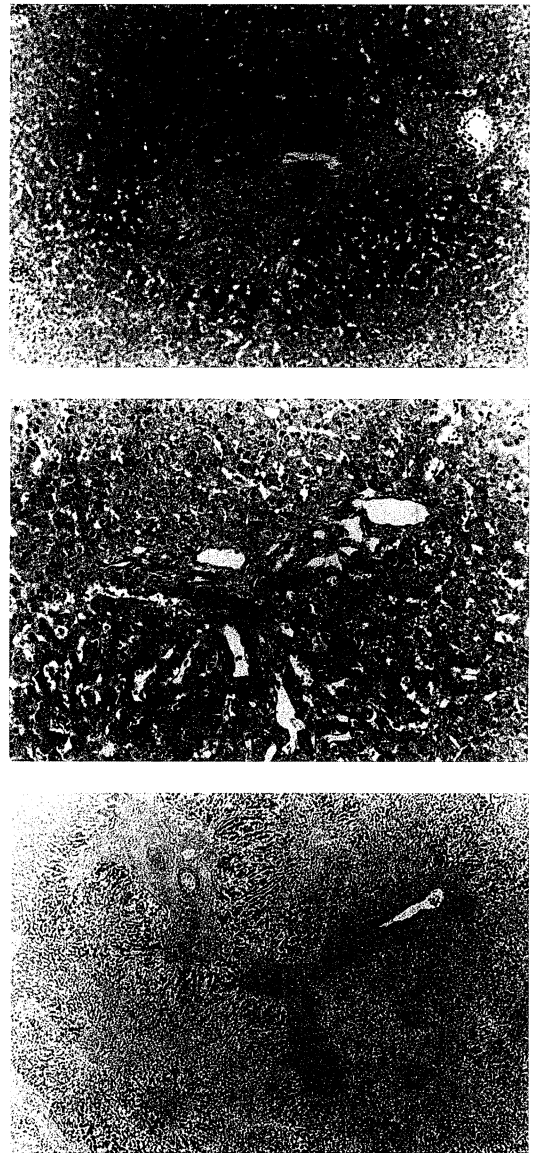


Fig. 3. Histology of the allograft after orthotopic liver transplantation (Hematoxylin & eosin staining). A: Histology of the liver allograft on day 14 in group L-II shows mild to moderate mononuclear infiltration. B: Histology of the liver allograft on day 14 in group L-III shows no mononuclear infiltration of the portal area and no other signs of acute rejection. C: Histology of liver allograft on autopsy of long-term survivor (>200 days) in group III shows severe fibrous enlargement of the portal area. Decrease of bile ducts and atrophy of hepatocytes can be seen.

Table 1. Survival time and histology of graft rejection in liver transplantation model

実験群	タクロリムス製剤	移植後生存期間(日)	MST* (日)	グラフト肝の組織学的拒絶反応所見**	
				移植後14日目の肝生検	剖検時
L- I (n=5)	投与せず	6, 9, 10, 13, 13	10		severe × 5
L- II (n=5)	静注製剤	8, 11, 24, 27, 33	24	mild, moderate × 2	severe × 5
L- III (n=5)	リボソーム化製剤	32, 33, 202, 205, 291	202***	none × 4, mild	undiagnosed, severe chronic × 3

\*Median survival time

\*\*Kemnitz ら<sup>15)</sup>の criteria を用いて評価

\*\*\*p<0.05; vs. groups L- I, L- II

Table 2. Survival time and histology of graft rejection in kidney transplantation model

実験群	タクロリムス製剤	移植後生存期間(日)	MST* (日)	グラフト腎の組織学的拒絶反応所見**	
K- I (n=5)	投与せず	8, 11, 13, 14, 14	13	Grade III × 5	
K- II (n=5)	静注製剤	24, 26, 26, 29, 38	26***	Grade III × 5	
K- III (n=7)	リボソーム化製剤	9, 9, 16, 16, 18, 21, 22	16	Grade III × 7	

\*Median survival time

\*\*Banff criteria<sup>16)</sup>に基づいて評価

\*\*\*p<0.05; vs. groups K- I, K- III

であった。

## II. 移植実験

### 1) 肝移植

対照群であるL-I群のMedian survival time (MST)は10日、静注用タクロリムスを投与したL-II群では24日であった。リボソーム化タクロリムスを投与したL-III群では、5頭中3頭が200日を超えて生存し、MSTは202日とL-IならびにL-II両群と比較して、有意な生存延長効果を認めた(Table 1)。病理組織学的検討では、L-I群の剖検におけるグラフト肝はすべて severe acute rejection を呈していた。L-II群のうちの3頭では移植後14日目の開腹肝生検にて mild から moderate の急性拒絶を認め(Table 1, Fig. 3A)、剖検ではすべて severe acute rejection であった。L-III群での開腹肝生検では1例に mild rejection を認めたのみで、他の4例では non rejection であった(Table 1, Fig. 3B)。200日以上生存したL-III群の3例での剖検時の移植肝病理組織では慢性拒絶反応の所見が認められた(Fig. 3C)。

### 2) 腎移植

K-II群のMSTは26日と、K-I群に比べて、生存延長効果を認めた(p<0.05)。K-III群でのMSTは16日と、K-I群と比較して若干延長したが、K-II群よりも有意に短縮していた(Table 2)。剖検時の病理組織学的所見では、すべての群のグラフト腎で、Grade III の高度急性拒絶反応を示していた。

## 考 察

本研究における薬物動態実験では、リボソーム化タクロリムスは従来の静注製剤に比べ肝、脾に集積し易く腎、脳への組織移行を抑制することが示された。これは、リン脂質多重膜構造を有するリボソームがRESに取り込まれやすい性質を有し、RESの豊富な脾、肝臓に特異的にとりこまれた結果であると考えられた。今回明らかにされたリボソーム化タクロリムスの肝への集積より、本製剤が局所免疫抑制療法の観点から見て、肝移植において有効性を発揮することが予想された。実際、リボソーム化タクロリムスは、本研究における犬肝移植モデルにおいて従来の静注製剤に比べ良好な拒絶反応抑制効果を示した。

肝移植での免疫抑制効果の増幅の機序としては、肝での局所免疫抑制効果の他、免疫臓器である脾へのリボソーム化タクロリムスの集積も役割を果たしている可能性がある。しかしリボソーム化タクロリムス集積が通常の静注製剤に比べて低い臓器である腎の移植モデルでは、従来の静注用製剤よりも免疫抑制効果が減弱していることから、脾における効果よりも、移植臓器内での局所免疫抑制効果が重要であることが示唆された。

拒絶反応には Interleukin-2 (IL-2)、interferon- $\gamma$ 、Interleukin-1 (IL-1)、や Tumor necrotic factor- $\alpha$  など種々のサイトカインが関わっている。タクロリムスの

免疫抑制作用は主として T 細胞での IL-2 の産生抑制によると理解されている<sup>17)</sup>。これらのサイトカインは autocrine または paracrine として働いており<sup>18,19)</sup>、移植肝に集積したタクロリムスがグラフト内で、これらのサイトカイン分泌を抑制することが拒絶反応の recognition phase と effector phase を block する事につながると考えられる。

リポソーム化タクロリムスの投与において興味深いことは、肝移植モデルにおいて、リポソーム化タクロリムス投与を中止した後も長期に移植肝が生着したことである。肝における RES 系細胞は主として Kupffer 細胞であり、リポソーム化タクロリムスはこれらの細胞に高濃度に取り込まれると推測される。Kupffer 細胞に対するタクロリムスの作用に関する報告は見当たらないが、肺胞マクロファージに対してタクロリムスが IL-1 産生抑制効果を示すと報告されている<sup>20)</sup>。リポソーム化タクロリムスが、肝局所での抗原提示細胞である Kupffer 細胞の IL-1 産生を抑制した結果、Kupffer 細胞からの、T 細胞に対する抗原刺激が不完全なものとなることで免疫不応答が誘導された可能性がある<sup>21-23)</sup>。

リポソーム化タクロリムスの副作用に及ぼす効果については、薬物動態実験において、リポソーム化タクロリムスが腎、脳への薬剤分布を抑制したことから、タクロリムスの副作用である腎機能障害、神経障害がリポソーム化タクロリムスによって減弱されることが期待された。しかし本実験は通常の静注製剤でも副作用の発現にくい低用量での実験であったため、腎機能障害、神経障害発現についての検討はできなかった。また、観察期間中、肝への集積による肝障害などリポソーム化タクロリムスによると思われる副作用は認められず、投与に際しての安全性が大動物実験で確認された。

## 結 語

リポソーム化タクロリムスは、肝移植において拒絶反応抑制効果を増強した。今後、慢性拒絶反応を回避するための投与量、投与期間や併用薬剤についての検討が必要と思われた。また、本製剤は、脳、腎での組織内濃度の低下によるタクロリムスの副作用の減弱効果も期待できることから、肝移植における有効な免疫抑制剤として臨床応用を検討する価値のあるものと考えられた。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学第 1 外科学教室中島祥介助教授に深甚の謝意を捧げます。また、終始御指導、

御協力をいただきました奈良県立医科大学第 1 外科学教室の高 濟峯先生に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Starzl, T. E., Todo, S., Fung, J., Demetris, A. J., Venkataramanan and R., Jain, A. : FK506 for human liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* **8670** : 1000-1004, 1989.
- 2) European FK506 Multicentre Liver Study Group: Randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in prevention of liver transplantation. *Lancet* **344** : 423-428, 1994.
- 3) Steiner, J. P., Dawson, T. M., Fotuhi, M., Glatt, C. E., Snowman, A. M., Cohen, N. and Snyder, S. H. : High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcinurin. *Nature* **358** : 584-587, 1992.
- 4) Ascher, N. L., Chen, S., Hoffman, RA. and Simmons, R.L. : Maturation of cytotoxic T cells within sponge matrix allografts. *J. Immunol.* **131** : 617-621, 1983.
- 5) Orosz, C. G., Zinn, N. F., Sirinek, L. P. and Ferguson, R. M. : In vivo mechanisms of alloreactivity : I. Frequency of donor reactive cytotoxic T lymphocytes in sponge matrix allografts. *Transplantation* **41** : 75-83, 1986.
- 6) Orosz, C. G., Zinn, N. F., Sirinek, L.P. and Ferguson, R. M. : In vivo mechanisms of alloreactivity : II. Allospecificity of cytotoxic T lymphocytes in sponge matrix allografts as determined by limiting dilution analysis. *Transplantation* **41** : 84-92, 1986.
- 7) Ruers, T. J., Daemen, M. J., Thijssen, H. H., van der Linden C. J. and Buurman, W. A. : Sensitivity of graft rejection in rats to local immunosuppressive therapy. *Transplantation* **46** : 820-825, 1988.
- 8) Gruber, S. A. : The case for local immunosuppression. *Transplantation* **54** : 1-11, 1992.
- 9) Gruber, S. A., Canafax, D. M., Cipolle, R. J., Erdmann, G. R., Burke, B. A., Matas, A. J., Simmons, R. L. and Hrushesky, W. J. : Local immunosuppression of the vascularized graft. *Surgery* **107** : 209-214, 1990.

- 10) Ko, S., Nakajima, Y., Kanehiro, H., Taki, J., Aomatsu, Y., Yoshimura, A., Yagura, K., Kin, T., Ohashi, K. and Nakano, H. : The significance of local immunosuppression in canine liver transplantation. *Transplantation* **57** : 1818-1821, 1994.
- 11) Ko, S., Nakajima, Y. and Nakano, H. : Local Immunosuppression of Organ Transplants (Gruber, S.A., ed.). R.G. Landes Company, Austin, pp97-105, 1996.
- 12) Sakaguchi, K., Suzuki, M., Ogata, Y., Suzuki, K. and Kamitani, T. : Biodistribution of the neo red cell and effect on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system. *Jpn. J. Artif. Organs* **22** : 560-556, 1993.
- 13) Tamura, K., Kobayashi, M. and Hashimoto, K. : A highly sensitive method to assay FK506 levels in plasma. *Transplant. Proc.* **19** : 23-29, 1987.
- 14) Nakajima, Y., Hisanaga, M., Taki, J., Kanehiro, H. and Nakano, H. : Cytoimmunologic monitoring using DNA analysis in canine liver transplantation. *Transplantation* **55** : 480-483, 1993.
- 15) Kemnitz, J., Gubernatis, H., Bunzendahl, H., Ringe, B., Pichlmayr, R. and Georgii, A. : Criteria for histopathological classification of liver allograft rejection and their clinical relevance. *Transplant. Proc.* **21** : 2208-2210, 1989.
- 16) Solez, K., Axelsen, R., Benediktsson, H., Burdick, J., Aurthier, H., Cohen, A.H., Colvin, R.B., Croker, B.P., Droz, D., Dunnill, M.S., Halloran, P.F., Hayry, P., Jannete, J.C., Keown, P.A., Marcussen, N., Mihatsch, M.J., Morozumi, K., Myers, B.D., Nast, C.C., Olsen, S., Racusen, L.C., Ramos, E.L., Rosen, S., Sachs, D.H., Salomon, D.R., Sanfilippo, F., Verani, R., von Willebrand, E. and Yamaguchi, Y. : International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection : The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney. Int.* **44** : 411-422, 1993.
- 17) Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Gotoh, T., Okuhara, M., Koshisaka, M., Aoki, H. and Imaoka, H. : FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomycetes. 1. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.* **40** : 1249-1255, 1997.
- 18) Martinez, O. M., Krams, S. M., Sterneck, M., Villanueva, J. C., Falco, D. A., Ferrell, L. D., Lake, J., Roberts, J. P. and Ascher, N. L. : Intragraft cytokine profile during human liver allograft rejection. *Transplantation* **53** : 449-456, 1992.
- 19) Hoffmann, M. W., Wonigeit, K., Steinhoff, G., Herzbeck, H., Flad, H. D. and Pichlmayr, R. : Production of cytokines (TNF-alpha, IL-1-beta) and endothelial cell activation in human liver allograft rejection. *Transplantation* **55** : 329-335, 1993.
- 20) Keicho, N., Sawada, S., Kitamura, K., Yoshimoto, H. and Takaku, F. : Effects of an immunosuppressant, FK506, on Interleukin 1-alpha production by human macrophages and a macrophage-like Cell Line, U937. *Cell. Immunol.* **132** : 285-294, 1991.
- 21) Metcalfe, S. M. and Richards, F. M. : Cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Transplantation* **49** : 798-802, 1990.
- 22) Shevach, E. M. and Dorsch, S. E. : The effects of cyclosporine A on the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* **3** : 397-423, 1985.
- 23) Benson, A. and Ziegler, H. K. : Macrophages as targets for inhibition by cyclosporine. *Transplantation* **47** : 696-703, 1989.