

—総説—

## 標的指向機能を有するポリマーコーティングリポソームの設計に関する研究

小島 宏行

**要約:** パッシブターゲティングを目的とした静注用キャリアーを設計することを目的として、いくつかの部分疎水化水溶性ポリマーによるリポソーム (Lip) の表面修飾の検討を行った。部分疎水化水溶性ポリマーは疎水基の脂質二重膜へのアンカーリング効果によりリポソーム膜表面に立体的なコーティング層を形成することを明らかにした。ラットに静注した場合の体内動態を評価した結果、ポリマーコーティングリポソーム (PC-Lip) は RES (reticuloendothelial system) 回避能を有し、それに伴いキャリアーの血中滞留性が有意に延長することを明らかにした。また、制ガン剤である塩酸ドキソルビン封入したポリマーコーティングリポソーム (Dox-PC-Lip) は担癌ラットにおける薬物の腫瘍移行性が有意に増大し、そのパッシブターゲティング効果が明確となるとともに、担癌マウスにおける腫瘍増殖を最も抑制し、延命率を顕著に改善することも明らかにした。以上、リポソームに部分疎水化水溶性ポリマーを用いて表面修飾することにより、標的指向機能を付与し得ることを明らかにし、機能性微粒子 DDS の設計に有用な指針を提示することができた。

**索引用語:** リポソーム、部分疎水化水溶性ポリマー、ポリマーコーティング、血中滞留性、細網内皮系組織、パッシブターゲティング、制ガン剤

## Surface modification of liposomes with hydrophilic polymers bearing hydrophobic anchors for passive targeting of drugs

Hiroyuki KOJIMA

**Abstract:** In this review, we introduced the feasibility of polymer coating of liposomes with various hydrophilic polymers bearing hydrophobic anchors for desiring the injectable drug carriers for passive targeting of drugs. The thick coating layer was confirmed for the polymer coated liposomes (PC-Lip) by comparing the particle size and zeta potential of the liposomes before and after polymer coating. The PC-Lip showed significantly improved circulation with fewer RES uptake of liposomes after i.v. administration in rats. It was also confirmed that the circulating property of the PC-Lip was well correlated to their coating properties. A significant improvement in therapeutic efficiency of doxorubicin was obtained with the polymer coated liposomal formulation with a higher drug accumulation into the tumor site in tumor-bearing animals.

**Keyphrases:** liposomes, hydrophilic polymers bearing hydrophobic anchors, polymer coating, long circulation, reticuloendothelial system (RES), passive drug targeting, antitumor agents

### 1. 緒言

薬物治療において、投与された薬物は安全・確実に体内に移行すると同時に、必要な部位のみに作用し、必要としない臓器や組織に対しては作用しないことが理想的である。しかしながら、実際には血中半減期が短く生体内において不安定な薬物の場合には、十分な治療効果が得られず

注射による頻回投与が余儀なくされたり、抗癌剤などの微量で高活性を示す薬物の場合には標的部位以外の組織に分布することにより重篤な毒性が発現してしまうという問題点を抱えている。そこで、これらの問題点を製剤学的に改善し、有効な量の薬物を必要とする臓器や組織に、必要な時間だけ作用させる薬物送達システム (Drug delivery

system: DDS)の概念が、患者の QOL (Quality of Life)の向上の観点から注目を集めている。

以下、DDS の最近の動向について微粒子キャリアーを中心に解説し、著者らが開発したリポソーム製剤について紹介したい。

## 2. ドラッグデリバリーシステム

### 薬物ターゲティング

薬物ターゲティングを達成するための方法として局所投与、特異的生体反応の利用、薬物運搬担体(キャリアー)の利用などが知られているが、その中でも高分子<sup>1)</sup>、リポソーム<sup>2)</sup>、リピッドエマルジョン<sup>3)</sup>、マイクロスフェア<sup>4)</sup>、高分子ミセル<sup>5)</sup>などのキャリアーを用いる手法が最も一般的で有用性が高い。一方、薬物のターゲティングは機構の面から、微粒子製剤や高分子のように、体内挙動が生体各部位の形態的、生理的特性とキャリアーの物理化学的性質のバランスによって規定される“受動的(パッシブ)ターゲティング”と、これらに特殊な仕組みを加え、体内挙動をより積極的に制御しようとする“能動的(アクティブ)ターゲティング”に分類される<sup>6)</sup>。後者には抗体<sup>7)</sup>や、磁力や熱のように体外から作用する物理的な力を利用する方法<sup>8)</sup>が知られているが、アクティブターゲティングにおいても非特異的な移行を制御することは重要であるため、いずれの場合もパッシブターゲティングは必要と考えられる。

血中に投与された微粒子キャリアーは、その粒子径が毛細血管の直径(5 $\mu$ m)よりも大きい場合、毛細血管を通過できずにその臓器に捕足される。従って、静脈内投与後には、最初の通過臓器である肺に、動脈内投与後には、その下流臓器を塞栓する。一方、5 $\mu$ m よりも小さな微粒子は、血液中を循環するが、肝臓のクッパー細胞や脾臓の洞内マクロファージなど細網内皮系組織(reticuloendothelial system: RES)に貪食され、循環血流から速やかに消失してしまうため<sup>9-11)</sup>、RES 以外の部位を標的とする場合には新たな粒子設計法が必要となる。特に、血管透過性が亢進している腫瘍組織は、かなり大きな物質でも血管より癌組織間質へ漏出し、そこに蓄積しやすい性質(EPR: Enhanced vascular Permeability and Retention effect)を有しているために<sup>12)</sup>、パッシブターゲティングを目的とした静注用 DDS キャリアーを設計する場合、キャリアーの血中滞留性をいかに向上させるかが重要となる。

### リポソーム

1965年に英国の Bangham らによって、リン脂質が水中で二分子膜からなる閉鎖小胞を形成することが発見されて以来<sup>13)</sup>、リポソームは細胞膜やエンドサイトーシスの機能解明のための生体膜モデルとして、さらにはドラッグ

キャリアーとして幅広く研究されるようになった<sup>14-15)</sup>。特に、リポソームは他の高分子キャリアーとは異なり、生体膜成分であるリン脂質から成るために、生体内分解性で生体適合性が良く、抗原性、及び、毒性が比較的 low、その利用が期待されている<sup>16-17)</sup>。また、リポソームが有する他の利点として、リン脂質は親水基と疎水基両者を備えているため、遺伝子や高分子を含め、水溶性から脂溶性の薬物まで多くの物質を封入でき、生理活性物質に化学修飾を施す必要がない。封入された薬物や生理活性物質は外界から隔離されているため、血中における失活を防ぐことができる。脂質成分、組成比、調製方法を変化させることにより、リポソーム膜の流動性、膜荷電状態、粒子径をコントロールすることができる。膜上に抗原、抗体、糖、アミノ酸、高分子等を結合させて表面修飾が可能であり、多くの機能性を付与できる<sup>18)</sup>、などが挙げられ、ドラッグキャリアーとしての研究が盛んに行われている。一方、保存安定性の確保、大量生産、滅菌、品質保証などの克服すべき製剤学的問題点が指摘されていたが、脂質組成の最適化<sup>19)</sup>、さらには凍結乾燥時に糖などの凍結保護剤を添加する検討が行われ、薬物封入率や粒子の再分散性が確保されるようになった<sup>20-22)</sup>。特に、保存安定性に関しては、製薬企業での研究が進みほぼ克服可能となってきた。

### ステルステクノロジー

パッシブターゲティングを目的としたリポソーム研究については、ガングリオシド G<sub>M1</sub><sup>23)</sup>やポリエチレングリコール(PEG)<sup>24-26)</sup>などの脂質誘導体を用いてリポソームを表面修飾することにより血中滞留性を向上させる“ステルステクノロジー”が注目されている。これは疎水性の高い粒子ほど RES に貪食されやすいことに着目し、親水性分子でリポソーム粒子表面を被覆することにより、RES による認識を積極的に低下させる、あるいは、オプソニンなどの血清成分の吸着を立体的に阻害する原理に基づいている<sup>27-28)</sup>。その中でも、特に優れた血中滞留性を示す PEG 修飾リポソームは、“PEG ステルスリポソーム”とも呼ばれ、血管透過性が亢進している固形肉腫組織への蓄積が顕著に増大することが明らかとなっており、すでに欧米においては、制癌剤であるドキシソルビン封入 PEG 修飾リポソームが DOXIL<sup>®</sup>として LTI 社より上市され、高い治療効果を収めている<sup>29)</sup>。

### リポソームのポリマーコーティング法

リポソームのポリマーコーティングによる粒子設計は、新たな表面修飾法として注目されている。砂本らは、多糖類に長鎖アルキル基のような疎水基を導入し、その水溶液をリポソーム懸濁液と物理混合することにより疎水基を脂質膜にアンカーリングさせ、表面修飾(コーティング)が可能であることを報告している<sup>30)</sup>。この手法の特徴は、

①リポソーム懸濁液を調製した後にコーティングを行うため、粒子表面のみが選択的に修飾され、ポリマー分子が内水層に配向せずリポソームの物理的安定性の向上が期待できる。②物理化学的性質の異なる種々の部分疎水化水溶性ポリマーを表面修飾剤として使用することにより様々な機能性を付与できる。③薬物封入前後どちらにおいてもコーティングできるため、薬物とポリマーの相互作用が無視でき広範囲の薬物に対して適応できるなどが挙げられる。そこで、著者らは標的指向機能を有するリポソーム製剤の設計を目的とし、部分疎水化水溶性ポリマーによるリポソームの表面修飾法の開発を行った。

### 3. 部分疎水化水溶性ポリマーによるリポソームコーティング ポリマーコーティングリポソームの調製法

リポソームの調製法としては薄膜水和法、逆相蒸発法、エーテル注入法などが知られているが、著者らは操作法が簡便な薄膜水和法を選択した。必要量のリン脂質(L- $\alpha$ -ジミリストイルホスファチジルコリン:DMPC、または卵黄レシチン:EPC)、負電荷物質(ジセチルリン酸:DCP)、膜安定化物質(コレステロール:Chol)を少量のクロロホルムにて溶解し、ロータリーエバポレーターにて溶媒留去することにより脂質薄膜を得る。その薄膜を加温条件下pH7.4リン酸緩衝液にて水和することにより粒子径数 $\mu\text{m}$ のMLV(multilamellar large vesicle)リポソームが形成され、さらに超音波処理を施すことにより目的サイズ(粒子径約100nm)のSUV(small unilamellar vesicle)リポソームを得ることができる。また、リポソームのポリマーコーティングはSUVリポソームと予めpH7.4リン酸緩衝液に溶解したポリマー溶液を物理混合し、10°Cで60分間インキュベートすることにより行った。なお、リポソームの表面修飾剤としてポリビニルアルコール(PVA:平均分子量20,000)、及びPVAの末端に長鎖アルキル基を導入した誘導体(PVA-R:同20,000)を用いた。

#### ポリマーコーティングリポソームの表面特性

リポソームの粒子径、表面電荷、膜の流動性や透過性などの粒子物性は、薬物キャリアーの物理化学的安定性、生体内安定性を考える上で重要な因子である<sup>31)</sup>。ポリマーコーティングリポソームの表面特性、特にポリマーによるコーティングの成否を推定する有用な方法として、荷電リポソームの表面電位の測定が挙げられる。リポソーム粒子表面には電気二重層が形成されており、ポリマーが粒子表面に存在すると表面電位の変化が期待できるからである。実際には、真のコロイド粒子表面の電位を測定することは困難であるため、ゼータ電位を表面電位に代わる指標として用いることが多い。これまでにリポソーム粒子を両親水性ポリマーであるプルロニック F-68<sup>32)</sup>やポリエチレングリコール<sup>33)</sup>でコーティングし、ゼータ電位を測定することに

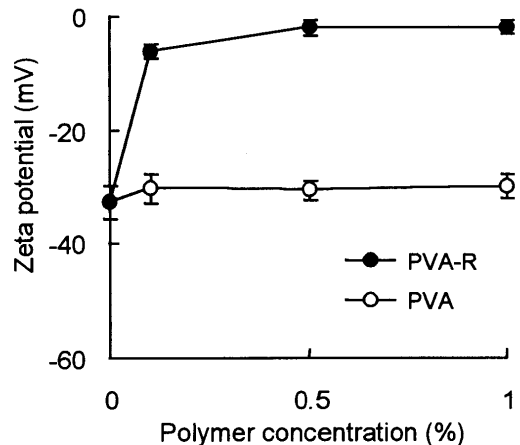


Fig.1 Effect of polymer coating on the change in zeta potential of the liposomes. (Lipid composition: DMPC: DCP:Chol= 7:1:3. Particle size of liposomes=100nm.)

より、ポリマーの吸着層の厚みを推定した研究も報告されている。また、近年においては、コロイド懸濁液にレーザー光線を照射して得られる散乱光(チンダル現象)のゆらぎを統計的処理する動的光散乱法(DLS)の開発により、サブミクロンサイズの粒子径測定が比較的正確にできるようになり、コーティングポリマー層の厚みを推定した報告もされている<sup>34)</sup>。

そこでまず初めに、DMPC:DCP:Chol= 7:1:3 からなる約100nmにサイジングした負電荷リポソームをPVA及びPVA-Rでコーティングした場合のpH7.4リン酸緩衝液中におけるゼータ電位を測定した。その結果、Fig.1に示すように部分疎水化水溶性ポリマーであるPVA-Rでコーティングしたリポソームは、ポリマー濃度依存的にゼータ電位の負電荷が0方向へシフトしていく様子が観察された。既に述べたように、リポソームのゼータ電位はコーティング層の厚みの程度に応じて変化するため、PVA-Rはリポソーム膜表面に立体的なコーティング層を形成していることが示唆された。一方、分子内に疎水基を持たないPVAでコーティングしたリポソームは、コーティング濃度によらずこのようなゼータ電位の変化は認められなかった。これらの結果は、両者のコーティング様式の差を反映したものと推察される。すなわち、水溶性高分子であるPVAはリポソーム膜表面に物理的に吸着するのに対し、PVA-Rはポリマーの末端に存在する疎水基のリポソーム二重膜への貫入により、リポソーム膜表面を立体的にコーティングするために、厚みを有した水和層が形成され、それに伴い滑り面が外側へと移動し、その程度に応じてゼータ電位の変化が観察されたものと思われる。

次にポリマーコーティングリポソームの表面特性を動的光散乱法(DLS)による粒子径変化にて評価した。これはリポソーム膜表面にコーティング層が形成されると粒子径の増大が期待できるためである。Fig.2にはコーティング前の粒子径D(original)に対するコーティング後の粒子径

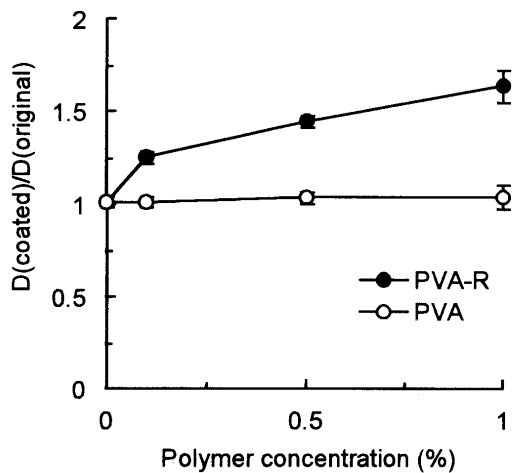


Fig.2 Effect of polymer coating on the change in particle size of the liposomes. (Lipid composition: DMPC: DCP:Chol= 7:1:3. Particle size of liposomes=100nm.)

D(coated)の比をとり、コーティング濃度に対してプロットした。なお、平均粒子径は重量基準による。リポソームを部分疎水化水溶性ポリマーである PVA-R でコーティングすると、ポリマー濃度依存的に粒子径の増大が観察され、リポソーム膜表面に立体的なコーティング層が形成されていることが示唆された。リポソームの粒子径には粒度分布があるために、観察された平均粒子径の増大が直接コーティング層の厚みを示すものではないが、PVA-R 濃度 1% の時の粒子径変化より、リポソーム膜表面に形成されているコーティングポリマー層の厚みは約 25~30nm 程度であることが推定された。一方、分子内に疎水基を持たない PVA でコーティングした場合は、ポリマー濃度によらずこのような粒子径の変化は認められず、ゼータ電位変化の結果とよく対応した。さらに、電荷を持たないリポソームの場合にはゼータ電位測定によるコーティングの可否の判断は困難であったが、このような場合にも粒子径測定により同様にコーティング特性を推定することができた。

そこでこれらポリマーコーティングリポソームのコーティング特性を明確にすることを目的とし、実際にリポソーム膜表面のコーティングポリマー量の測定を行った。コーティングポリマー量は、超遠心操作によりポリマーコーティングリポソームをペレットとコーティングに利用されなかったポリマーを含有する上澄みに分離した後、上澄み中のポリマー濃度を定量し、コーティング前後のポリマー濃度の差より算出した。その結果、ゼータ電位・粒子径測定の検討において、有意な変化が認められなかった PVA コーティングの場合においてもコーティングポリマー量が検出され、コーティング層の形成が確認された。しかしながら、その値はコーティングポリマー濃度にかかわらずほぼ一定の値を示したことから、Fig.3(b)に示すように、PVA はリポソーム膜表面への物理的吸着によりコーティング層を形成していることが明らかとなった。一方、表面

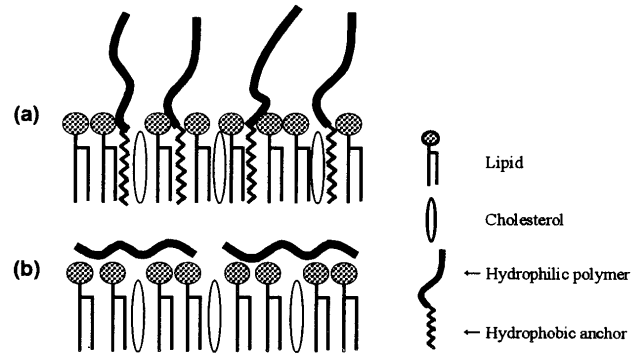


Fig.3 Schematic drawing of coating of liposomes with (a) PVA-R and (b) PVA

修飾剤として PVA-R を用いた場合、ポリマー濃度依存的にリポソーム膜表面のコーティングポリマー量が増大し、さらに、PVA コーティングリポソームと比較して、それらの値は有意に高いことが判明した。ポリマーコーティングによるゼータ電位・粒子径変化の結果を併せると、PVA-R コーティングリポソーム膜表面には、厚みを有した立体的なコーティング層が形成されていることが明確となった。PVA-R は、ポリマーの末端に存在するアルキル基とリン脂質のアシル基部分の疎水的相互作用によりコーティングするため、高濃度のポリマー溶液でコーティングした場合においても、効率よくポリマー分子がリポソーム膜にアンカーリングできたものと推察される。さらに、ポリマー分子のコーティング密度の増加に伴い、ポリマーがリポソーム表面に対して垂直に整列する、いわゆる“櫛型”のコーティング層が形成され、その結果、ポリマー濃度が高くなるにつれて、コーティング層の厚みが増大したものと考えられる (Fig. 3(a))。

#### ラットに静注した場合の血中滞留性・体内分布

リポソーム粒子の体内動態を評価する方法として、ラジオアイソトープによるリポソームの標識化や蛍光プローブ法などが汎用される。著者らはより簡便な蛍光プローブ法を選択し、脂溶性蛍光のマーカである Cholesteryl-anthracene-9-carboxylate (CA)を含有したリポソームを用い、ラットに尾静脈投与した場合のキャリアーの血中滞留性及び体内分布の評価を行った。

PVA-R でコーティングしたリポソームは、コーティングしていないリポソームと比較して、血中滞留性が有意に延長した(Fig.4)。一方、分子内に疎水基を持たない PVA でコーティングしたリポソームの血中滞留性は、PVA-R コーティングほどの優れた血中滞留性を示さなかった。

そこで、PVA-R コーティングによる血中滞留性向上の要因を明確にするためにリポソームの体内分布を評価したところ、リポソームを PVA-R でコーティングすることにより、肝臓、脾臓へのリポソームの移行量が顕著に減少し、PVA-R コーティングリポソームが RES 回避能を有するこ

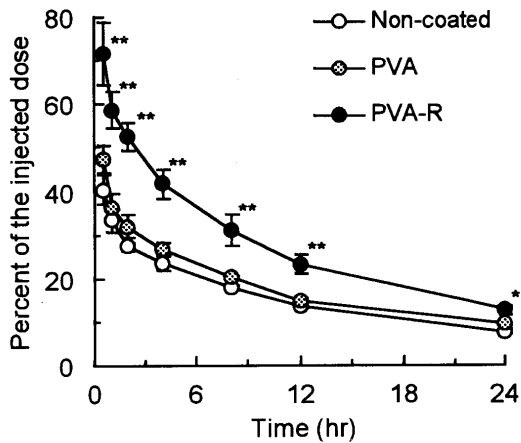


Fig.4 Effect of polymer coating on the circulation profiles of the liposomes in plasma after i.v. administration in rats. (Lipid composition: EPC:Chol = 5:5 Polymer conc.: 1%. \*p<0.05, \*\*p<0.01)

とが判明し、この RES 回避が先に示した血中滞留性向上の主要因であることが明らかとなった(Fig.5)。一方、PVA コーティングしたリポソームは、投与後 1 時間において肝臓による取り込みを若干抑制したものの、肝臓、脾臓どちらにおいてもコーティングしていないリポソームに比べて有意な差は認められず、リポソームのような微粒子キヤ

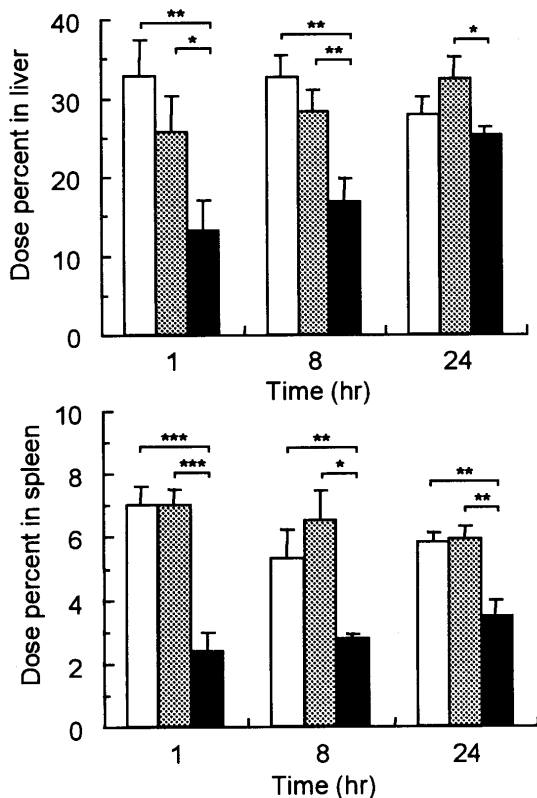


Fig.5 Effect of polymer coating on the distribution of the liposomes in liver and spleen after i.v. administration in rats (Lipid composition: EPC:Chol = 5:5 Polymer conc.: 1%. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

リアーが RES に取り込まれやすいことをよく反映した。

以上の結果より、ポリマーコーティングによるリポソームの血中滞留性向上には、ポリマー分子内の疎水基によるコーティング様式が重要な役割を果たしていることが示された。すなわち、PVA-R コーティングリポソーム表面には厚みを有した立体的なコーティング層が形成されているために、血中においてオプソニンタンパク質などの吸着を阻止し、肝臓や脾臓に存在するマクロファージやクッパー細胞による異物としての認識能を低下させたものと考えられる。一方、リポソーム膜表面への物理的吸着によりコーティング層を形成する PVA コーティングリポソームは、コーティング層の厚みが小さいためにこのような安定化効果が得られなかったものと思われる。

#### 4. ドキソルビシン封入ポリマーコーティングリポソームのパッシブターゲティング効果

##### ドキソルビシン封入ポリマーコーティングリポソームの調製

制癌剤である塩酸ドキソルビシンは、広い抗腫瘍スペクトルをもち、固形癌、造血器腫瘍、各種の肉腫に有効である。しかしながら、低分子量の制癌剤のほとんどは腫瘍細胞と正常細胞の選択性が極めて低く、正常臓器や組織に対する毒性が問題となっている。例えば、ドキソルビシンの場合には重篤な心毒性や他の多くの制癌剤にみられる骨髄毒性などが知られている。このような副作用の軽減と薬理効果の向上を目指した DDS のチェックポイントは、癌組織へのターゲティングと、その局所での薬物放出の制御である。これらの目的のために制癌剤のリポソーム化が数多く検討されており、これまでに体内分布の改善や血中滞留性の向上が報告されている<sup>35-36)</sup>。

そこで、キャリアの血中滞留性向上が確認されたポリマーコーティングリポソーム(PC-Lip)に塩酸ドキソルビシン(Dox)を封入し、制癌剤 DDS キャリアーとしての有用性を評価した。薬物の封入は pH 勾配法を改変して行った。pH 勾配法とは、脂質薄膜を水和するときの溶液の pH を低く(酸性)することでリポソームの内水相の pH を低くし、その外水相に薬物溶液と pH の高い(アルカリ性)溶液を添加することで、リポソームの内水相と外水相の pH 勾配を利用して、薬物をリポソーム内水相に封入する方法である。本検討では、外水相としてポリマーのアルカリ溶液を用いることにより薬物をリポソームに封入すると同時にポリマーコーティングを施すことができた。

##### ドキソルビシン封入ポリマーコーティングリポソームの血中滞留性・体内分布

ドキソルビシン溶液をラットに静注した場合、投与後直ちに血中から薬物が消失したのに対し、薬物をリポソーム

Table 1 Effect of polymer coating of liposomes on the doxorubicin concentration in plasma after i.v. administration of free or liposomal doxorubicin in rats. (n=4~6). (Lipid composition: EPC:Chol=5:5. Polymer conc.: 1 % for PVA and PVA-R, 0.43% for HPMC and HPMC-R. Dose of doxorubicin: 5mg / kg weight. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001: significantly different from the levels for non-coated liposomes.)

Time (hr)	Conc. of doxorubicin in plasma (µg/mL)					
	Sol	Non-coated	PVA	PVA-R	HPMC	HPMC-R
0.5	0.15 ± 0.01	73.1 ± 2.7	76.2 ± 3.1	88.8 ± 5.2 **	70.2 ± 2.0	109.6 ± 4.5 ***
1	0.15 ± 0.00	63.5 ± 2.1	60.8 ± 5.5	79.1 ± 4.0 ***	61.6 ± 3.2	91.3 ± 2.0 ***
2	0.14 ± 0.00	42.7 ± 2.8	45.3 ± 3.4	57.0 ± 3.6 **	47.5 ± 2.9	63.0 ± 3.9 ***
4	0.13 ± 0.01	28.8 ± 2.2	34.0 ± 2.0	38.2 ± 2.2 **	32.7 ± 2.4	44.6 ± 1.6 ***
8	0.13 ± 0.01	13.5 ± 0.8	16.5 ± 0.7	19.4 ± 2.3 *	16.7 ± 1.8	23.3 ± 1.4 ***
12	0.11 ± 0.00	4.1 ± 0.7	5.2 ± 0.4	7.7 ± 1.2 **	6.5 ± 0.6 *	6.8 ± 0.5 **
24	0.00 ± 0.00	0.7 ± 0.0	1.1 ± 0.5	1.4 ± 0.2 **	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.1 ***
AUC <sup>#</sup>	2.22	353.2	386.7	473.3	374.3	499.7

AUC<sup>#</sup>: (µg/mL·hr)<sup>0-24hr</sup>

に封入することにより、血漿内薬物濃度は顕著に増加した。疎水基を持たない PVA でコーティングした場合には、コーティングによる有意な変化は認められなかったのに対し、部分疎水化水溶性ポリマーである PVA-R でコーティングした場合、キャリア自身の血中滞留性向上を反映して、血漿内薬物濃度は有意に増大した。また、他の部分疎水化水溶性ポリマーとしてヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)の一部に長鎖アルキル基を導入した HPMC-R を用いた場合、PVA-R と同様に高い血中濃度を維持したのに対し、疎水基を持たない HPMC ではこのような変化が認められなかったことから、血漿内薬物濃度の増大にはポリマーの分子内疎水基が重要な役割を果たしていることが確認された(Table1)。また、いずれのリポソームにおいてもドキソルビシン封入リポソームを投与したときの薬物の血中滞留性は、蛍光プローブ法にて評価したキャリアの滞留性よりも低く、さらに時間の経過とともにその差が顕著となることから、循環血液中においてドキソルビシン封入リポソームから薬物が徐々に漏出していることも確認された。

ドキソルビシンの体内分布については、PVA-R コーティングリポソームはキャリア自身の RES 回避能を反映して、肝臓・脾臓内薬物濃度が有意に減少していることが確認され、血中滞留性の結果とよく対応した。また、心臓内薬物濃度についてはドキソルビシンをリポソームに封入することで有意に減少した。さらに、リポソームを PVA-R でコーティングした場合、その値はさらに有意に減少することが明らかとなり、血中滞留性を延長させるばかりでなくドキソルビシンの心毒性を軽減できる可能性が示唆された。

#### ドキソルビシン封入ポリマーコーティングリポソームのパッシブターゲティング効果

腫瘍組織は毛細血管の透過性が亢進しており、さらにリンパ系が未発達のために、かなり大きな物質でも血管より

癌組織間質へ漏出し、そこに蓄積しやすい性質を有している<sup>12)</sup>。これは、EPR 効果と呼ばれ、高分子キャリアーやリポソームなどの微粒子ドラッグキャリアーを利用した腫瘍ターゲティングを考える上で重要な特性である。最近、本邦で開発され、世界で初めて認可されたリピオドール・スマックス複合製剤は、こうした EPR 効果を積極的に利用した DDS 製剤である。また、腫瘍血管内皮細胞ではピノサイトーシス活性が向上しており、その結果、高分子も取り込まれ、さらに、細胞を介した物質移動の細胞内物質透過性が亢進しているとの報告もされている<sup>37)</sup>。リポソームや高分子ミセル場合、その透過経路は細胞間隙であると考えられており固形癌局所の血管は 400nm までの大きさのものを通過することが報告されている<sup>38)</sup>。

著者らが開発したドキソルビシン封入ポリマーコーティングリポソーム(Dox-PC-Lip)を背部皮下に固形肉腫を移植した担癌ラットに投与し、薬物の腫瘍移行性を評価した。その結果、ドキソルビシン封入リポソームを PVA-R

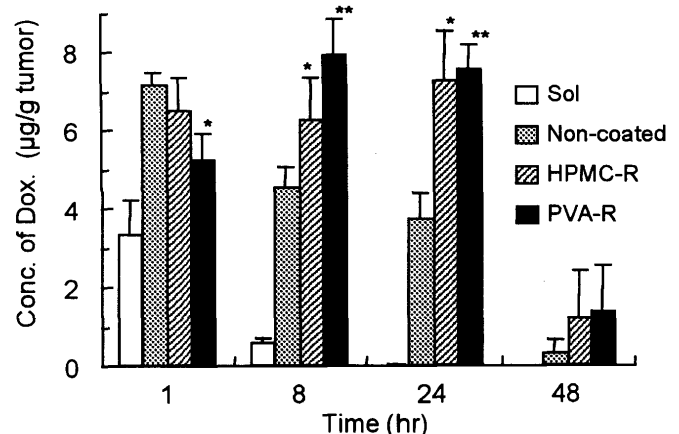


Fig.6 Effect of polymer coating on the tumor accumulation of doxorubicin after i.v. administration in tumor-bearing rats. (Lipid composition: EPC:Chol = 5:5. Polymer conc.: 1 % for PVA-R and 0.43% for HPMC-R. Dose of doxorubicin: 5mg / kg weight. \*p<0.05, \*\*p<0.01: significantly different from the levels for non-coated liposomes.)

及び HPMC-R でコーティングすることにより、腫瘍内薬物濃度（腫瘍 1g あたりに分布している薬物量）は顕著に増大し、投与 48 時間後においても腫瘍内に薬物が残存していることが明らかとなった(Fig.6)。また、これらはコーティングしていないリポソームに比べ、有意に高濃度であった。一方、分子内に疎水基を持たない PVA、及び、HPMC でコーティングした場合の腫瘍移行性は、コーティングしていないリポソームと同程度であったことより、ポリマーコーティングリポソームは血中滞留性の差異を反映して薬物の腫瘍移行性が有意に増大することが示された。

そこで、Dox-PC-Lip の制癌剤キャリアーとしての有用性について、Takakura<sup>39)</sup>らが報告している薬物動態学的パラメーターより評価した。Dox-PC-Lip を担癌ラットに静注した場合の血中濃度曲線下面積(AUC plasma)、腫瘍内薬物濃度曲線下面積(AUC tumor)、クリアランス(CL)、及び、腫瘍部位へのターゲティング効率を算出した (Table 2)。リポソームをポリマーコーティングすることにより、RES によるリポソームの食食が抑制されるため、全身クリアランス (CL total) は小さい値を示した。薬物の腫瘍移行性パラメーターである投与後 48 時間までの AUC tumor は、PVA-R、及び、HPMC-R でコーティングすることにより、コーティングしていない場合と比較してそれぞれ 1.76 倍、1.62 倍増大し、これらのリポソームを用いることにより薬物の腫瘍移行性が有意に向上することが確認された。また、PC-Lip において CL tumor が有意に高い値を示したことから、血中滞留性の向上のみを反映したのではなく、キャリアーと腫瘍細胞との親和性の増大、あるいは、腫瘍部位におけるリポソーム粒子の安定性の向上が示唆された。これらを反映して、CL tumor と CL total から算出するターゲティング効率は、PC-Lip を用いることにより約 5 倍増大することが判明し、パッシブターゲティングを目的としたキャリアーとして有用であることが明確となった。

**ドキシソルビシン封入ポリマーコーティングリポソームの抗腫瘍効果**

制癌剤キャリアーとしての有用性について担癌マウスにおける抗腫瘍効果、延命効果の観点から評価した。固形肉腫を背部皮下に移植した担癌マウスに薬物投与量が 2.5、または 7.5mg/kg/回となるように 3 回（腫瘍細胞移植後 9、16、23 日目）尾静脈投与した後の腫瘍体積及び生存率を経時的に測定した。

担癌マウスにおける腫瘍増殖は、溶液投与群、及び、リポソーム群を投与することにより、いずれの場合も薬物投与量依存的に抑制された。そのなかでも PVA-R、及び、HPMC-R コーティングしたドキシソルビシン封入リポソームが最も高い細胞増殖阻害効果を示した(Fig.7)。薬物投与量 7.5mg/kg/回の場合、溶液投与群、及び、ドキシソルビシン封入リポソーム投与群では、それぞれ移植 25 日後、及

Table 2 Pharmacokinetic parameters of liposomal doxorubicins injected intravenously in tumor-bearing rats. (Lipid composition: EPC:Chol = 5:5. Polymer conc.: 1 % for PVA-R and 0.43% for HPMC-R.)

	Non-coated	PVA-R	HPMC-R
AUC Plasma (µg · h/mL)	391.2	555.2	567.8
CL total (mL/h)	3.20	2.25	2.20
AUC Tumor (µg · h/g)	159.6	280.8	258.1
CL tumor (mL/h)	$9.24 \times 10^3$	$2.99 \times 10^2$	$2.58 \times 10^2$
Targeting efficiency	$2.89 \times 10^3$	$1.33 \times 10^2$	$1.17 \times 10^2$
Total tumor accumulation (µg)	3.6	16.6	14.6

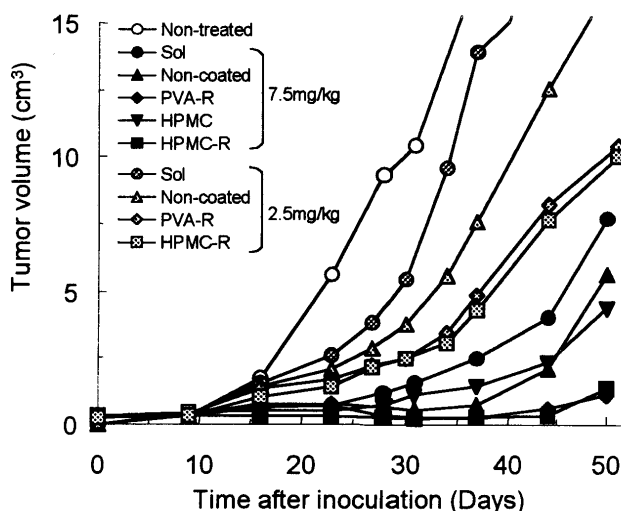


Fig.7 Change in tumor size after i.v. administration of doxorubicin solution or various liposomal doxorubicins in Ehrlich ascite carcinoma bearing mice (n=5-10). (Lipid composition: EPC:Chol = 5:5. Dose of doxorubicin: 2.5 or 7.5mg/ kg weight/ each. The numbers of injection: 3 times with 7 days intervals.)

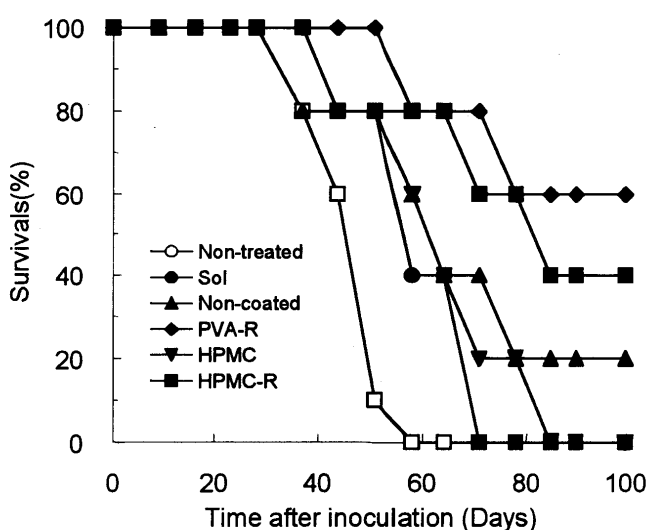


Fig.8 Survival time of Ehrlich ascite carcinoma bearing mice treated with i.v. administration of doxorubicin solution or various liposomal doxorubicins (n=5-10). (Lipid composition: EPC:Chol = 5:5. Dose of doxorubicin: 7.5 mg/ kg weight/ each.)

び、35日後まで腫瘍増殖を抑制したものの、それ以降徐々に腫瘍体積が増加した。一方、リポソームを PVA-R、及び、HPMC-R でコーティングすることにより、移植 45 日後まで、腫瘍増殖をほぼ完全に抑制することができ、抗腫瘍効果が有意に向上していることが示された。

また、延命効果については、薬物投与群はいずれの場合も、薬物を投与していないコントロール群（平均生存期間：46.8 日）と比較して生存期間の向上が認められた（溶液投与群：同 60.4 日）。ドキシソルビシンをリポソームに封入することにより、生存期間は 67.4 日まで延長したが、有意な差を示すには至らなかった。一方、PVA-R、及び、HPMC-R コーティングしたリポソームを投与した場合、抗腫瘍効果の差異を反映し、その生存期間は有意に向上し、平均生存期間がそれぞれ、87.2 日、80.0 日まで延長した（Fig.8）。特に、PVA-R コーティングリポソームについては、腫瘍移植 100 日後においても 60%のマウスの生存が確認された。一方、分子内に疎水基を持たない HPMC コーティングリポソームではこのような抗腫瘍効果、延命効果が観察されなかったことより（同：64.4 日）、部分疎水化水溶性ポリマーによるリポソームコーティングの有用性が明確となった。

#### 5. リポソームキャリアーの設計と処方最適化検討

これまでに部分疎水化水溶性ポリマーでコーティングしたリポソームが標的指向機能を有し DDS キャリアーとして有用であることを示した。また、生体内安定性に優れたリポソーム製剤を開発するには、脂質組成などのキャリアー側の因子や、表面修飾剤として用いるポリマー側の因子の制御が重要な課題である。そこで、薬物キャリアーとして最適な PC-Lip の設計に関する指針を得ることを目的とし、PVA-R コーティングリポソームの血中滞留性に及ぼす諸因子について最適化検討を行った。

#### キャリアー側の因子

一般に、細胞表面にはシアル酸が非還元末端に結合した糖タンパク質や糖脂質が分布して負に帯電している。そのため、微粒子キャリアーの表面電荷は細胞との電気的相互作用に影響を及ぼし、血中滞留性に反映する。そこで、電荷の異なるリポソームを調製し、リポソームの表面電荷、及び、ポリマーコーティングによる影響について評価した。

コーティングしていない正電荷リポソームの血中滞留性は低く、電荷を持たないリポソームと同程度であったのに対し、負電荷リポソームの血中滞留性は有意に高かった。これは、肝臓内マクロファージは比較的強く負に帯電している（ゼータ電位：約-20mV）ために、これら単核系食細胞(MPS: Monocyte Phagocyte System)との静電的相互作用の程度の違いによるものと推察される<sup>40)</sup>。また、中性、もしくは正電荷リポソームは血中においてアルブミン、ア

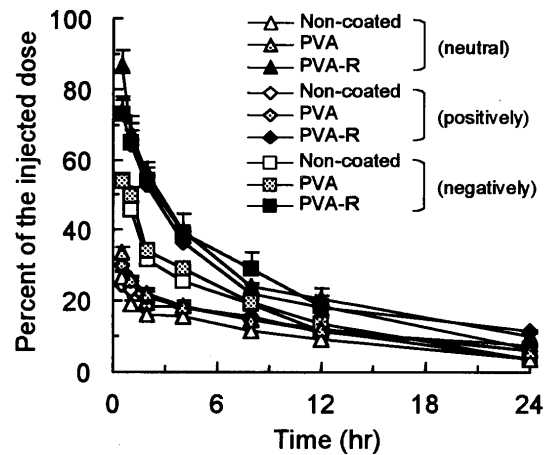


Fig.9 Effect of polymer coating and liposomal charge on the circulation of the liposomes after i.v. administration in rats. (Lipid composition: DMPC:DCP:Chol= 7:1:3 (negatively charged liposomes), DMPC:SA:Chol=7:1:3 (positively charged liposomes) and DMPC:Chol=7:3 (neutral liposomes). Polymer conc.: 1%.)

ポリタンパク質 A1、IgG や高分子量 (20 万以上) のタンパク質が大量に結合し、凝集体を形成することも報告されており<sup>41)</sup>、これらの結果と良く対応した。一方、PVA-R でコーティングしたリポソームは、いずれの場合もコーティングしていないリポソームと比較して血中滞留性が有意に延長し、さらにそれらはリポソーム電荷の種類にかかわらずほぼ同様の挙動を示した(Fig.9)。PVA-R コーティングリポソームはリポソームの電荷に関わらず厚みを有した立体的なコーティング層が形成されているため、十分なコーティング量を有するポリマー層が表面電位をカバーし、血中における安定性を向上させたものと推察される。これは PVA-R コーティングリポソームのゼータ電位がリポソーム電荷の種類に関わらずほぼ 0mV までシフトしている結果からも支持された。

次に脂質組成中のコレステロール含量による影響について評価した。Ishida らはリポソーム組成中のコレステロール含量の増大に伴い補体系が活性化され、RES による異物としての認識能が増大することを報告している<sup>42)</sup>。その一方で、脂質組成中のコレステロールはリポソーム粒子の物理化学的な安定性や薬物の保持効率に影響を及ぼすことから、処方の最適化は表面電荷と同様に重要な課題であると考えた。

本検討においてもコーティングしていないリポソームは、組成中のコレステロール含量の増大に伴い、RES 内分布量が増大するとともに血中滞留性が低下し、補体系の関与が示唆された。リポソームを PVA でコーティングした場合には、コーティングによる有意な変化が認められなかったのに対し、PVA-R コーティングリポソームの血中滞留性は、同じコレステロール含量のコーティングしていないリポソーム、及び、PVA コーティングリポソームと



比較して有意に延長していることが確認され、特に、EPC:Chol=7:3 からなる PVA-R コーティングリポソームが最も優れた血中滞留性を示した。また、EPC:Chol=9:1 からなる PVA、及び、PVA-R でコーティングしたリポソームは、リポソーム膜表面に同程度のコーティング量を有していたにもかかわらず、PVA-R が優れた血中滞留性を示した (AUC 値で約 1.22 倍) ことから、コーティング層の厚みが血中滞留性の向上に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、脂質組成中のコレステロール含量はポリマーコーティングリポソーム表面に形成されるコーティング層の均一性に密接に関与していることが判明し、リポソームの血中滞留性の向上には最適なコレステロール含量が存在した。

### ポリマー側の因子

リポソームの表面修飾剤として用いているポリマー側の因子について述べる。まず、ポリマーの分子量による影響について評価するために、これまでの検討にて用いてきた平均分子量約 20,000 (平均重合度:480) の他に、分子量 9,000 (同 200)、6,000 (同 135) のグレードである PVA-R<sub>20000</sub>、PVA-R<sub>9000</sub>、PVA-R<sub>6000</sub> を使用した。

PVA-R コーティングリポソームの血中滞留性は、いずれの場合もコーティングしていないリポソーム、及び、PVA コーティングリポソームと比較して有意に向上した。さらにその滞留性向上の程度は PVA-R の分子量が増大するにつれて顕著となることが判明した (Fig.10)。これらの PVA-R コーティングリポソームはほぼ同程度のコーティング量を有し、ポリマーの分子量が増大するにつれて粒子表面に形成されるコーティング層の厚みが増大していたことから、リポソームの血中滞留性向上にはポリマー層の厚みの重要性が確認された。

リポソーム表面のコーティングポリマー量はポリマーの分子量と同様に、キャリアーの安定性に影響を及ぼす因子と考えられる。ポリマー濃度 1% の時の PVA-R<sub>20000</sub>、PVA-R<sub>9000</sub>、及び、PVA-R<sub>6000</sub> コーティングリポソームのコーティングポリマー量をポリマーの分子 (モル) 数に換算した場合、それぞれ、1.0、2.8、4.8 mol % であった。最も低いコーティング値を示した PVA-R<sub>20000</sub> が優れた血中滞留性を示したことより、リポソーム表面のコーティングポリマー量よりもむしろコーティング層の厚みが滞留性向上に有用な因子であることが示された。すなわち、PVA-R<sub>20000</sub> でコーティングしたリポソーム膜表面には、十分な厚みを有した立体的なコーティング層が形成されているために、血中においてタンパクなどの吸着を十分に阻止できたのに対し、分子量が比較的小さい 6,000、9,000 の PVA-R の場合には、立体的なコーティング層が形成されているもののその厚み、及び、flexibility が低いために、十分な効果が得られなかったものと推察される。

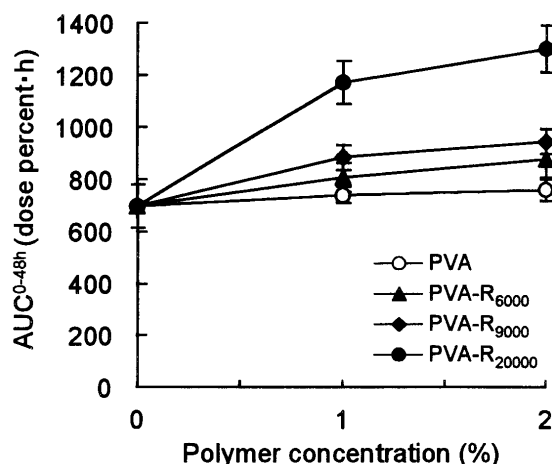


Fig.10 Effect of molecular weight of PVA-R and polymer concentration in coating on the values of area under the circulation-time curves of the liposomes from 0 to 48 hr after i.v. administration in rats. (Lipid composition: EPC:Chol=7:3.)

次に、コーティング時のポリマー濃度による影響について評価した。PVA-R コーティングリポソームの血中滞留性はポリマー濃度に依存して増大し、さらに高分子量の PVA-R ほどその程度は顕著であった (Fig.10)。これは、コーティング時のポリマー濃度が増大するにつれ、コーティングポリマー量、及び、コーティング層の厚みが増大するため、上述したようなタンパクなどに対する立体的阻害効果が有効に機能したものと考えられる。一方、表面修飾剤として PVA を用いた場合は、ポリマー濃度にかかわらずほぼ一定の血中滞留性を示し、生体内安定性の向上は認められなかった。これは、リポソーム膜表面への物理的吸着によりコーティングを行う PVA は、コーティング濃度にかかわらずコーティングポリマー量、及び、コーティング層の厚みが小さいことに起因していると考えられ、これまでの結果とよく対応した。

### PEG ステルスリポソームとの血中滞留性比較

これまで示してきた PVA-R コーティングリポソームの有用性を明確にすることを目的とし、既に DDS キャリアーとしての優れた機能が確認されている PEG ステルスリポソームの血中滞留性と比較検討した。PEG ステルスリポソームの調製には、優れた生体内安定化効果が確認されている DSPE-PEG<sub>2000</sub> を処方した。

PEG ステルスリポソームの血中滞留性は、DSPE-PEG 含量の増加とともに有意に向上することが確認され、これまでに報告されている結果とよく一致した<sup>2, 43)</sup>。一方、EPC 系のリポソームと同様に DSPC:Chol= 7:3 からなるリポソームをコア粒子として用いた場合においても、リポソームを PVA-R でコーティングすることにより血中滞留性が有意に向上することが確認された。さらに、1% PVA-R

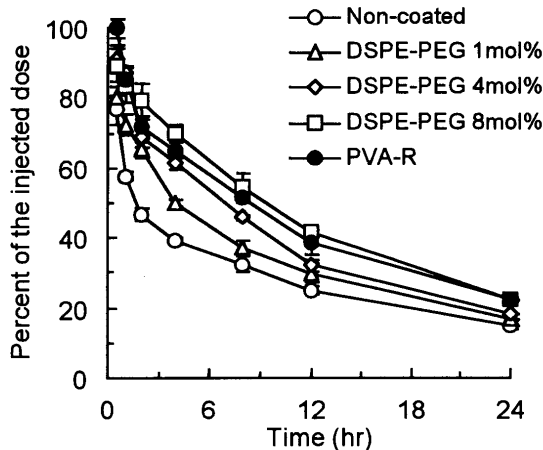


Fig.11 Comparison of the circulation of the PVA-R coated liposomes with that of PEG-modified liposomes after i.v. administration in rats. (Lipid composition: DSPC: Chol=7:3 for non-coated and PVA-R coated liposomes, and DSPC:DSPE-PEG2000:Chol=69:1:30, 66:4:30 and 62:8:30 for PEG-modified liposomes. Polymer concentration of PVA-R: 1%.)

コーティングリポソーム (1.3 mol %) は、1 mol %、及び、4 mol %の DSPE-PEG 含有リポソームの血中滞留性と比較して有意に高く、8 mol %の DSPE-PEG 含有リポソームと同程度であることが確認された(Fig.11)。また、投与後 48 時間までの AUC 値から、1 % PVA-R コーティングリポソームによる滞留性延長効果は、約 5.6 mol %の DSPE-PEG に対応することが明らかとなり、PVA-R コーティングによる生体内安定化効果が明確となった。これは、DSPE-PEG と比較して、PVA-R の分子量が 20,000 と大きいことと、後者の場合には粒子表面のみを効率よくコーティングするために、少量のポリマーによりリポソーム表面に立体的なコーティング層が形成され、血中滞留性の向上に有効に機能したものと推察される。

#### ポリマーコーティングリポソームの in vitro における安定性評価

リポソームは生体膜成分であるリン脂質から構成されているため生体適合性は高い。しかしながら、これまで示してきたように、実際には投与されたリポソーム粒子は異物として認識され、循環血液中から速やかに消失してしまう。そして、この血中からの消失には血液中に存在する種々の血漿タンパク質の関与が考えられている。例えば、Chonn らはリポソーム膜表面に結合した血漿タンパク質量と血中滞留性の間に良好な相関性を示し、血漿タンパク質の結合が高いキャリアーほど血中から速やかに消失することを報告している<sup>40)</sup>。

著者らは、生体内環境に近い血清中におけるリポソーム粒子の分散安定性を粒子径変化の観点より評価した。EPC 系リポソームでは最も滞留性に優れていた EPC:Chol

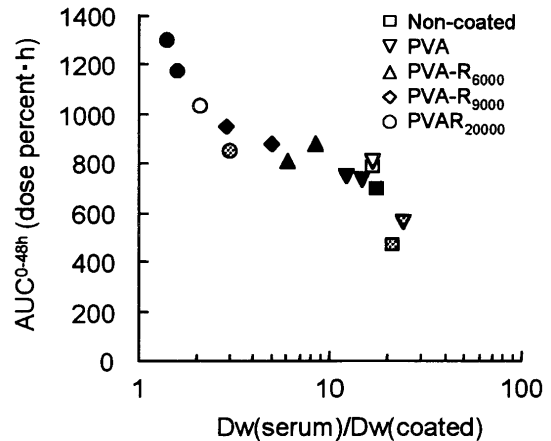


Fig.12 Correlation of the area under the circulation-time curves values from 0 to 48 hr after i.v. administration in rats and change in particle size of the liposomes in calf serum. (Lipid composition: EPC:Chol= 9:1 (open symbols), 7:3 (closed symbols) and 5:5 (gray symbols). Polymer conc.: 1%.)

=7:3 からなる PC-Lip を仔牛血清にて 10 倍希釈し、それを 37°C で 1 時間インキュベーションした。血清添加前後のリポソームの粒子径を測定し、血清添加前の粒子径  $Dw(\text{coated})$  に対する添加後の粒子径  $Dw(\text{serum})$  の比をとり、それを分散安定性の指標とした。その結果、コーティングしていないリポソームを血清で処理すると粒子径の増大が観察され、リポソーム粒子が凝集・融合していたのに対し、PVA-R コーティングリポソームの場合には粒子径の有意な増大は観察されず、リポソーム粒子の凝集・融合を顕著に抑制した。さらにその程度はポリマー濃度の増大とともに顕著となることが判明し、2 % PVA-R コーティングリポソームは血清添加前の粒子径をほぼ維持した。これは、リポソーム膜表面に形成されている厚みを有した立体的なコーティング層が、オプソニンタンパクや血清成分などによる不安定化に対して保護的に作用したものと推察される。一方、表面修飾剤として PVA を用いた場合、リポソームの粒子径の増大を若干抑制したものの、その効果は PVA-R コーティングと比べて有意に小さいことから、粒子表面のコーティング層の厚み、及び、その密度が安定化に対して重要な役割を果たしていることが示唆された。

一般に、リポソームの血中滞留性はその粒子径に依存し、大きい粒子ほど血中から速やかに消失することから、血清中におけるリポソームの凝集・融合特性も血中滞留性に影響を及ぼすと推察される。そこで、種々のリポソームの血中滞留性をラットに静注後 48 時間までの AUC 値に換算し、血清中におけるリポソームの粒子径変化の比に対してプロットしたところ、両者の間に良好な相関関係が認められた(Fig.12)。さらに、ラットに静注 1 時間後におけるリポソームの RES 内分布量との関係から、血清中で凝集・融

合を起ししやすいリポソームほど RES に食食されやすいことが明らかとなり、静注後のリポソーム粒子の血中滞留性、及び、RES 回避能を *in vitro* 試験にて推定できることが示された。リポソーム表面に結合する補体系タンパク質量と、静注後の肝クリアランスが良好な相関を示すことが報告されていることから、血清中における補体タンパクがリポソームの凝集・融合特性に関与している可能性が示唆された。さらに、PVA コーティングリポソームは希釈により、リポソーム膜表面からのポリマーの脱離が認められたのに対し、PVA-R の場合にはこのようなポリマーの脱離は認められず、両者の差が生体内におけるリポソーム粒子の安定性に関与していることが示唆された。

#### 6. おわりに

リポソームに部分疎水化水溶性ポリマーを用いて表面修飾することにより、標的指向機能を付与し得ることを明らかにし、微粒子製剤設計に有用な指針を提示することができた。今後、物理化学的性質の異なる種々の部分疎水化水溶性ポリマーを表面修飾剤として用いることにより様々な機能性を付与した DDS 製剤の開発が期待される。

#### 7. 謝辞

本総説に記述した研究は岐阜薬科大学製剤学教室で行われたものであり、研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました恩師川島嘉明教授、竹内洋文助教授、ならびに同教室の各位に深甚なる謝意を表します。本研究に際し、試料の提供を賜りました株式会社クラレ、三協化学株式会社、日本油脂株式会社、協和発酵株式会社、東北大学医学部加齢医学研究所に感謝致します。

#### 8. 参考文献

- 1) Y. Takakura and M. Hashida, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **18**, 207 (1990)
- 2) G. Gregoriadis (ed.), "Liposomes as drug carriers", John Wiley & Sons, Chichester, (1988)
- 3) N. Hodoshima, C. Udagawa, T. Ando, H. Fukuyasu, H. Watanabe and S. Nakabayashi, *Int. J. Pharm.*, **146**, 81 (1997)
- 4) L. Illum and S.S. Davis, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1086 (1983)
- 5) M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, H. Ekimoto, C. Shibasaki and K. Kataoka, *Cancer Res.*, **51**, 3229 (1991)
- 6) 高倉喜信, 丸山一雄, 横山昌幸, *Drug Delivery System*, **14**, 425 (1999)
- 7) A.L. Klibanov, K. Maruyama, A.M. Beckerleg, V.P. Torchilin and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 142 (1991)

- 8) J.N. Weinstein, R.L. Magin, M.B. Yatvin and D.S. Zaharko, *Science*, **204**, 188, (1979)
- 9) D. Papahadjopoulos and A. Gabizon. *Ann. NY Acad. Sci.*, **507**, 64 (1987)
- 10) G. Poste, C. Bucana, A. Raz, P. Bugelski, R. Kirsh and I.J. Fidler, *Cancer Res.*, **42**, 1412 (1982)
- 11) T.M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann and A. Yau-Young, *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29 (1991)
- 12) Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.*, **46**, 6387 (1986)
- 13) A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965)
- 14) G. Sessa and J. Weissmann, *Biochim. Biophys. Acta.*, **135**, 416 (1967)
- 15) A.J. Versluis, E.T. Rump, P.C. Rensen, T.J. Van Berkel and M.K. Bijsterbosch, *Pharm. Res.*, **15**, 531 (1998)
- 16) C.K. Kim and J.H. Han, *J. Microencapsul.*, **12**, 437 (1995)
- 17) M.E. Brewster, P.J. Druzgala, W.R. Anderson, M.J. Huang, N. Bodor and E. Pop, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 38 (1995)
- 18) J. Senior, C. Celgado, D. Fisher, C. Tilcock and G. Gregoriadis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 77 (1991)
- 19) E.C.A. van Winden, W. Zhang and D.J.A. Crommelin, *Pharm. Res.*, **14**, 1151 (1997)
- 20) L.M. Crowe, C. Womersley, J.H. Crowe, D. Reid, L. Appel and A. Rudolph, *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 131 (1986)
- 21) N.J. Zuidam and D.J.A. Crommelin, *Int. J. Pharm.*, **126**, 209 (1995)
- 22) E.C.A. van Winden and D.J.A. Crommelin, *Euro. J. Pharm. Biopharm.*, **43**, 295 (1997)
- 23) T.M. Allen, C. Hansen and J. Rutledge, *Biochim. Biophys. Acta*, **981**, 27 (1989)
- 24) T.M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann and A. Yau-Young, *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29 (1991)
- 25) D. Papahadjopoulos, T.M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthay, S.K. Huang, K.D. Lee, M.C. Woodle, D.D. Lasic, C. Redemann and F.J. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11460 (1991)
- 26) A.L. Klibanov, K. Maruyama, V.P. Torchilin and L. Huang. *FEBS Lett.*, **268**, 235 (1990)
- 27) J. Senior, C. Delgado, D. Fisher, C. Tilcock and G. Gregoriadis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 77 (1991)
- 28) S.M. Moghimi and H.M. Patel, *Biochim. Biophys. Acta*, **984**, 384 (1989)
- 29) A. Coukell and C. Spencer, *Drugs*, **53**, 520 (1997)
- 30) J. Sunamoto, K. Iwamoto, M. Takada, T. Yuzuriha and K. Katayama (E. Chiellini and P. Giusti ed.), "Polymers in medicine", Plenum, New York, 157 (1983)
- 31) K. Shimada, S. Matsuo, Y. Sadzuka, A. Miyagishima, Y. Nozawa, S. Hirota and T. Sonobe, *Int. J. Pharm.*, **203**, 255 (2000)

- 32) M. Jamshaid, S.J. Farr, P. Kearney and I.W. Kellaway, *Int. J. Pharm.*, **48**, 125 (1988)
- 33) K. Shimada, A. Miyagishima, Y. Sadzuka, Y. Nozawa, Y. Mochizuki, H. Ohshima and S. Hirota, *J. Drug Targeting*, **3**, 283 (1995)
- 34) H. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Toyoda, H. Toyobuku, T. Hino and Y. Kawashima, *Int. J. Pharm.*, **164**, 103 (1998)
- 35) A. Rahman, A. Kessler, N. More, B. Sikic, G. Rowden, P. Woolley and P.S. Schein, *Cancer Res.*, **40**, 1532 (1980)
- 36) A. Gabizon, A. Dagan, D. Goren, Y. Barenholz and Z. Fuks, *Cancer Res.*, **42**, 4734 (1982)
- 37) H.F. Dvorak, J.A. Nagy, J.T. Dvorak and A.M. Dvorak. *Am. J. Pathol.*, **133**, 95 (1988)
- 38) R.K. Jain, *Cancer Metastasis Rev.*, **6**, 559, (1987)
- 39) Y. Takakura and M Hashida, *Pharm. Res.*, **13**, 820 (1996)
- 40) S.E. Mutsaers and J.M. Papadimitriou, *J. Leukoc. Biol.*, **44**, 17 (1988)
- 41) A. Chonn, P.R. Cullis and D.V. Devine, *J. Immunol.*, **146**, 4234 (1991)
- 42) T. Ishida, K. Funato, S. Kojima, R. Yoda and H. Kiwada, *Int. J. Pharm.*, **156**, 27 (1997)
- 43) D.D. Lasic and D. Papahadjopoulos (ed.), "Medical Application of Liposomes", Elsevier, Amsterdam, (1998)
- 44) A. Chonn, S.C. Semple and P.R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 215 (1991)

\* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（甲第 80 号）の内容を中心にまとめたものである。