

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

新しい肝がん発症予防法および治療法の開発に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋田 充

平成16（2004）年 4月

目 次

I 総括研究報告	
新しい肝がん発症予防法および治療法の開発に関する研究	
橋田 充	1
II 分担研究報告	
1 抗癌剤の高分子ミセル型受動的ターゲティング製剤開発とその評価に関する研究	
岡野光夫	6
2 肝がん治療用ピラルヒシン封入肝ターゲティングリポソーム製剤の開発に関する研究	
米谷芳枝	8
(資料) Fig	
III 研究成果の刊行に関する一覧表	15
IV 研究成果の刊行物・別刷	18

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

新しい肝がん発症予防法および治療法の開発に関する研究
主任研究者 橋田 充 京都大学大学院薬学研究科

研究要旨 現在、肝細胞癌に対し確実な腫瘍縮小効果あるいは延命効果を有する抗癌剤は少なく、十分な治療効果を保障する標準的な化学療法は確立されていない。また、肝動脈注射やアルコールの肝臓注入法などの新規治療技術も、外科手術が必要など適用には問題が多い。肝癌治療が困難な理由として、わが国では、多くの肝癌がウイルス性肝炎、肝硬変を経て多段階的に発症することや、大腸や直腸癌からの転移性癌が多いことが挙げられる。我々はこうした認識のもと、これまでナノ技術を用いて種々の微粒子性製剤を開発し、薬物の肝ターゲティング特に肝癌化学療法への応用を検討してきた。その結果、肝癌の予防と治療には、癌の進行度や組織学的特性等を考慮に入れた適切な化学療法あるいは遺伝子治療が有用であることを確認し、その実現に特に組織・細胞特異的デリバリーを可能とする精密な肝ターゲティング技術の確立が必須であることを明らかにした。例えば、肝癌では抗癌剤のナノ粒子製剤の方が薬物単独に比べて効果・毒性が共に高くなる場合もあり薬物の特性に応じた担体（高分子ミセルやリポソーム）の最適化設計・選択が必要であること、さらに、腫瘍縮小効果に優れる抗癌剤併用投与を可能とする抗癌剤ナノ粒子製剤の開発が臨床的に重要性が高いこと等が確かめられ、その基盤構築が臨床的・社会的に極めて重要性の高い課題であることに確信を得た。本研究では、肝癌の病態に応じた幅広い特性を有する抗癌剤肝ターゲティング・ナノ粒子製剤を開発し、その動態制御と治療効果に関してモデル動物を用い評価を行い、肝細胞癌に対する化学療法・抗癌剤併用療法を確立する。また、インターフェロン遺伝子治療を目指して、ナノ粒子を利用した細胞特異的遺伝子デリバリー技術の開発にも取り組む。本年度は、研究基盤の確立を目指して、種々のナノ粒子担体（橋田は肝ターゲティング型遺伝子導入キャリア開発、岡野は高分子ミセルへの抗癌剤の安定な封入、米谷はリポソームと脂質エマルジョンを用いた抗癌剤の肝ターゲティング）の調製技術を確立し、その肝ターゲティング特性を評価して、治療応用への可能性を検証した。

岡野光夫・東京女子医科大学先端生命医科学研究科・教授
米谷芳枝・星薬科大学医薬品化学研究所創剤構築学研究室・教授

A 研究目的

(1) 薬物封入肝ターゲティング・ナノ粒子製剤の開発 これまでに大豆由来ステロールグルコシド(SG)あるいはその主成分であるβ-シトステロールグルコシドにより修飾したドキシソルピシン封入リポソームは、肝臓へ薬物を集積させ、肝がんモデルマウスの治療効果を向上させることを明らかにした。また、これは、Sit-G 修飾リポソーム表面のグルコース残基と肝細胞のアシアロ糖タンパクレセプターとの親和性による可能性も報告した。

そこで、乳癌や卵巣癌、白血病等に適用を

受け、これらの癌に対して優れた抗腫瘍効果を示す脂溶性抗癌剤であるピラルビシン(4'-O-tetrahydropyranyldoxorubicin, THP)をSit-G 修飾リポソームへ封入し、製剤の安定性、体内動態解析、胆癌モデル動物を用いた治療効果実験により、THP 封入 Sit-G 修飾リポソームの肝癌治療薬としての有用性を評価した。

(2) 高分子ミセルを用いた抗癌剤の安定封入製剤の開発 抗癌剤の高分子ナノミセル型受動的ターゲティング製剤は、アドリアマイシン、タキソールに関して既に臨床試験が行われており、新しい癌治療用ナノ粒子製剤として注目されている。高分子ミセルを用いたターゲティングにおいては、抗癌剤の製剤への安定封入が癌化学療法の成功の鍵を握っており、薬物特性にあったナノ粒子の精密な分子設計

に基づいた製剤設計が重要である。本研究では、難水性の抗癌剤(カンプトテシン)を安定・高収率で内包し、肝臓癌へのターゲティングを達成する高分子ミセルキャリアシステムの構築することを目的に、高分子ミセル形成ブロックポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸側鎖に疎水性のヘンシル基を様々な割合で導入した新規高分子ミセルを分子設計し、カンプトテシンの放出制御製剤としての有用性を評価した。

(3) ガラクトース修飾カチオン性キャリア・pDNA 複合体の肝局所動態解析 前年度までに、大容量の注射用水の急速静脈内投与方法(ハイドロダイナミクス法)による遺伝子導入によりインターフェロン(IFN)遺伝子導入が有効な肝癌治療法になり得ることを示した。しかしながら、臨床での肝臓に遺伝子治療の為には、ハイドロダイナミクス法は実用化が難しい為、安全性が高い非ウイルス性の遺伝子キャリアの開発が必要であると考えられる。そこで、体内動態解析に基づいた独自の非ウイルス性遺伝子導入キャリアの設計を試みた。肝細胞選択的遺伝子デリバリー効率の改善を目的として、標的細胞が特異的に発現する受容体を介して遺伝子を導入するアプローチが目ざされ、さまざまなキャリアの開発が進められている。多くの場合 *in vitro* 培養細胞を使って機能評価がなされているが、*in vivo* 遺伝子導入を実現するには投与部位から標的細胞までに到達するまでの全体のプロセスを考慮する必要があり、血液循環や組織構造に依存する障壁の実体を解明することが不可欠である。そこで、肝灌流実験系を用いてガラクトース修飾遺伝子リポソーム、高分子キャリアの肝臓組織での局所動態を解析し、各過程における遺伝子キャリアの動態特性を整理した。

(4) ガラクトース修飾カチオン性リポソーム・pDNA 複合体の物性制御による肝実質細胞への遺伝子導入効率の改善 肝灌流実験系により、複合体の粒子径が遺伝子導入において障壁になっていることが示唆された。複合体形成時における分散溶媒のイオン濃度は、カチオン性リポソームおよび pDNA の表面電荷については複合体の凝集に影響を与えられ、そこで、溶媒中イオン濃度を精密に設定することによって複合体の安定化による粒子径の増大抑制が可能になると考え(電荷制御複合体)、物性を評価すると共に肝臓に対する

遺伝子導入効率改善に関し評価した。

B 研究方法

(1) THP 封入リポソームの調製

THP 封入リポソームの組成には、精製卵黄レシチン (EPC)、コレステロール (Chol)、Sit-G、オレイン酸 (OA) を用いた。これらの脂質成分から成る小さな空の一枚膜リポソーム (粒子径 約 80 nm) を調製し、これに THP と糖を加え、凍結乾燥後、少量の水で復水して THP 封入 Sit-G 修飾リポソームを得た。平均粒子径は、電気泳動光散乱光度計を用いて測定し、薬物封入率は超遠心分離でリポソームと未封入の THP とを分離後、上清の THP 濃度を蛍光光度で測定した。

転移性肝癌モデルマウスは、C57BL/6J マウスにマウス組織球腫 M5076 細胞を移植して作成した。体内動態の評価には、マウス 1 匹あたり 1×10^5 細胞の M5076 細胞を尾静脈から移植後、10 日目に THP として 5 mg/kg を尾静脈内投与し、0.5、1、2、6、24 時間後の血清および各臓器中(肝臓、脾臓、心臓、腎臓、肺)の薬物濃度を HPLC 法により測定した。肝癌治療効果の評価には、M5076 細胞 (1×10^5 細胞)を尾静脈から移植後 3 日目に THP として 10 mg/kg で投与し、その後の生存日数より延命率を算出した。

(2) 高分子ミセルへのカンプトテシンの安定封入 高分子ミセル形成ブロックポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸側鎖に疎水性のベンジル基を様々な割合で導入した、種々の新規高分子ミセルを合成・開発した。これら高分子ミセルにカンプトテシンを封入し、ゲルパーミエーションクロマトおよび緩衝液中での薬物放出実験により封入効率を評価した。

(3) ガラクトース修飾カチオン性キャリア・pDNA 複合体の肝局所動態解析 モデル遺伝子として、CMV プロモーターを組み込んだホタルルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (pDNA)を用いた。遺伝子導入キャリアの開発を目的として、ガラクトース修飾ポリエチレンイミンを Lee らの報告に従って合成した。また、糖修飾リポソームを調製するため、新規ガラクトース修飾カチオン性コレステロール誘導體 (Gal-C4-Chol) を合成し、得られた誘導體とカチオン性脂 N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-trimethyla

mmonium chloride (DOTMA)と中性脂質、Cholを混合し、vortexおよびextrusion法により約60 nmの糖修飾カチオン性リポソームを調製した。pDNA/キャリア複合体の物理化学的性質に関しては、動的光散乱により平均粒子径の評価を行った。

肝局所動態の解析は、放射標識pDNAを用いて、ラット肝灌流実験系により肝臓内動態を、2-compartment dispersion modelに基づいて速度論的な評価を行った。

(4) ガラクトース修飾カチオン性リポソーム・pDNA複合体の物性制御による肝実質細胞への遺伝子導入効率の改善 pDNA/キャリア複合体の物理化学的性質に関して、蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)、平均粒子系の経時変化を評価した。10 mM NaClを含むpDNA (pCMV-Luc) 溶液とガラクトース修飾リポソームを等容量で混合し、電荷制御複合体(5mM NaCl)を調製した。遺伝子発現実験は、ICRマウス(5週令、雌)に対し、30 µg pDNAの投与量で300 µlの複合体を門脈内より投与した。一定時間後、肝臓、肺を摘出し、臓器内でのホタルルシフェラーゼの発光を測定することで遺伝子発現の指標とした。さらに、肝局所動態の解析は、ラット肝灌流実験系により肝臓内動態を評価した。

C 結果

(1) 薬物封入肝ターゲティング・ナノ粒子製剤の開発 薬物封入率に関して、OA添加のSit-G修飾リポソーム(EPC Chol Sit-G OA=7321)で約80%の封入率が得られ、その平均粒子径は約340 nmであった。静脈内投与後の血清および各臓器内THP濃度を検討したところ、THP水溶液投与ではTHPは血中から速やかに消失し、心臓、肺、脾臓に分布した。一方、Sit-G修飾リポソーム封入THP投与群ではTHPの分布が大きく変化し、心臓や肺への薬物分布が抑制され、肝臓への集積量が増加した。Sit-G修飾リポソーム封入THPは肝臓でのAUCを約4倍上昇し、心臓でのAUCを約半分に減少させた。また、THP水溶液投与群に比べSit-G修飾リポソーム封入THP投与群において生存日数の延長が見られた。THP投与後のマウスの体重変化を比較すると、THP水溶液群では約10%程度の体重減少を示したのに対し、Sit-G修飾リポソーム封入THP群では体重の減少はほとんど観察されな

かった。

(2) 高分子ミセルを用いた抗癌剤の安定封入製剤の開発 カンプトテシンの高分子ミセル封入安定性をゲルパーミエーションクロマトで評価した。ヘンシル基の導入率を25、44、61%と上げてゆくと封入安定性が高まった。ヘンシル基の導入率を75%まで高めた場合も封入安定性は同じであったが、この条件下、リン酸緩衝液中でのカンプトテシンの放出は遅くなり、半減期が24時間という長期間にわたる制御放出を達成できることが示された。

(3) ガラクトース修飾カチオン性キャリア・pDNA複合体の肝局所動態解析 瞬時投与されたリポソーム・³²P] pDNA複合体の静脈側流出曲線をモーメント解析した結果、ガラクトース修飾複合体は、未修飾複合体の場合に比べて肝抽出率が高くなることが示された。さらに、2-compartment dispersion modelに基づいて速度論的に評価したところ、ガラクトース修飾複合体は、高い組織結合性および内在化速度定数を示すことが明らかとなった。肝臓実質細胞と非実質細胞との移行比(PC/NPC比)に関しても、ガラクトース修飾複合体のほうが未修飾複合体に比べ約1.8倍高い値を示し、実質細胞選択性が増大していることが示されたが、そのPC/NPC比の絶対値は各細胞の血漿接触表面積比よりも小さく、類洞内皮の透過性が制限されていることが示唆された。一方、より小さな複合体を形成するカチオン性高分子のポリエチレンイミンでは、カチオン性リポソームの場合に比べ高い実質細胞移行性を示したことから、複合体の粒子径が組織移行の重要な因子の一つであることが推察された。

(4) ガラクトース修飾カチオン性リポソーム・pDNA複合体の物性制御による肝実質細胞への遺伝子導入効率の改善 グルコースと塩化ナトリウムからなる等張溶液中における各種ガラクトース修飾複合体の粒子径を測定した結果、低濃度(5 mM)の塩化ナトリウム存在下複合体の粒子径は最小となり、そのときの平均粒子径は120 nmとなった。また、5 mM塩化ナトリウム存在下調製した複合体(電荷制御複合体)の場合には、グルコースのみからなる溶媒で調製した場合に比べ、生理食塩水で希釈した際の凝集速度が小さくなることが示された。肝灌流実験系において両複合体の肝局所動態を評価したところ、電荷制御複合体では組

組織結合性が顕著に高くなり、肝実質細胞への移行性が増大する傾向にあった。そこで両複合体をマウス門脈内に投与し、肝臓での遺伝子発現を検討したところ、電荷制御複合体では、肝臓での遺伝子発現が20倍増大し、標的の肝実質細胞で特に高い値を示した。

D 考察

OA比を増加させるとリポソームへのTHP封入率は増加し、ほぼ100%近くになった。これは、OAの割合を増加させると、リポソームの表面電位が大きく負に帯電し、そのため正電荷薬物であるTHPが電気的に吸着したためと推察された。しかし、薬物封入率が向上すると共にリポソームの平均粒子径も大きくなった。これはリポソーム表面に吸着したTHPがリポソームの表面電荷を打ち消したために電気的反発が弱くなって凝集が起こり、粒子径が大きくなったためと考えられる。

Sit-G修飾リポソーム封入THP群ではTHP水溶液群に比べTHP分布が大きく変化し、心臓、肺への薬物分布が抑制され、肝臓への集積量が増加した。このTHPの肝臓への移行性の増大により、Sit-G修飾リポソーム封入THP群では、THP水溶液群に比べ有意な肝がん治療効果が得られたと考えられる。また、THP水溶液群では約10%程度の体重減少を示したのに対し、Sit-G修飾リポソーム封入THP群では体重の変化はほとんど見られず、副作用軽減の可能性が示された。これは、THPの重大な副作用として心筋障害があげられるが、Sit-G修飾リポソーム封入THPでは心臓への薬物分布を抑制したためと考えられる。

高分子ミセルへのカンプトテシンの安定封入に関して、疎水性ベンジル基のプロックコポリマーへの導入量の増大に伴って、封入安定性、薬物徐放性ともに高まったが、100%のベンジル基導入のPEG-PBLAブロックコポリマーでは安定性、徐放性とも非常に低いことが示された。このことは、疎水性ブロックの部分と薬物分子と相互作用する際にはポリマー側の疎水性基の間隔などの立体的要因が重要であることを示唆しており、従来情報に乏しかった高分子ミセルを用いた薬物封入キャリアシステムに関して新たな設計指針を示すことができた。

ガラクトース修飾遺伝子キャリアの肝局所動態を、肝灌流実験系により評価した。その結果、

カチオン性リポソームにガラクトース修飾を施すことで、組織結合性、内在化速度が向上し、効率的かつ速やかに肝臓へ移行することが明らかとなり、ガラクトース修飾の有用性が示された。一方で、ガラクトース修飾により実質細胞への移行性が改善されるものの、依然として類洞内皮壁透過性が制限を受けており、改善の余地があることが明らかとなった。

PEI複合体においても、未修飾、ガラクトース修飾ともに一回通過で投与量のほとんどが肝臓に移行し、また平均滞留時間(MRT)もリポソームに比べ短く、PEIの複合体は速やかにかつ効率的に肝臓へ移行することが明らかとなった。また速度論解析から、未修飾PEI、ガラクトース修飾PEIともに、ガラクトース修飾リポソームより高い組織結合性を示した。一方、PEIにおいては良好な肝局所動態にも関わらず、*in vivo* 遺伝子導入効率はさほど高くなく、リポソームの方が高い結果となった。したがって、効率的な実質細胞選択的遺伝子導入を実現するためには、リポソームの粒子径を生体内において小さくする製剤設計が合理的だと考えられた。

ガラクトース修飾リポソーム複合体の製剤設計を電荷制御仮説に基づいて行うことで、肝細胞への*in vivo* 遺伝子導入効率の改善に成功した。電荷制御仮説は、FRET解析によって実証され、実際に複合体の粒子径を縮小することならびに複合体を安定化させることが一連の結果により確認された。この安定化効果は肝局所動態の改善をもたらした。結果として、肝実質細胞選択的に遺伝子導入を20倍も改善することができたものと考えられる。

E 結論

THPをSit-G修飾リポソームに封入することにより肝臓へ送達することが可能となり、肝臓に対するTHPの新たな有用性を見出すことができた。また、カンプトテシンを安定性高く高分子ミセルに封入することに成功した。また、肝臓に対するIFN遺伝子による遺伝子治療の実現に向けて、肝灌流実験系を用いてガラクトース修飾遺伝子キャリアの肝臓組織での局所動態を解析し、粒子径の生体内での増大が遺伝子導入効率の障壁であることを明らかにした。そこで、遺伝子導入キャリアの粒子径の増大を制御する新

規設計により、肝細胞における *in vivo* 遺伝子導入効率を大きく改善することに成功し、IFN β や IFN γ 遺伝子導入のための新規キャリアシステムに得ることが示された。これらの知見は、今後の新しい肝癌治療法の確立において有益な基礎的情報を提供するものと思われる。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) K Morimoto, M Nishikawa, S Kawakami, T Nakano, Y Hattori, S Fumoto, F Yamashita and M Hashida Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver, *Molecular Therapy* 7, 254-261 (2003)
- 2) S Fumoto, F Nakadori, S Kawakami, M Nishikawa, F Yamashita and M Hashida Analysis of hepatic disposition of galactosylated cationic liposome/plasmid DNA complexes in the rat perfused liver, *Pharmaceutical Research* 20, 1452-1459 (2003)
- 3) M Nishikawa, T Nakano, T Okabe, N Hamaguchi, Y Yamasaki, Y Takakura, F Yamashita and M Hashida Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study, *Bioconjugate Chemistry* 14, 955-961 (2003)
- 4) E Ishida, C Managit, S Kawakami, M Nishikawa, F Yamashita and M Hashida Development of galactosylated emulsions for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drug in mice, *Pharmaceutical Research*, in press
- 5) S Fumoto, S Kawakami, M Ishizuka, M Nishikawa, F Yamashita and M Hashida Analysis of hepatic disposition of native and galactosylated polyethylenimine complexed with plasmid DNA in perfused rat liver, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 18, 230-237 (2003)
- 6) C Managit, S Kawakami, M Nishikawa, F Yamashita and M Hashida Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes, *International Journal of Pharmaceutics* 266, 77-84 (2003)
- 7) M Nishikawa, S Kawakami, F Yamashita, and M Hashida Glycosylated cationic

liposomes for carbohydrate receptor-mediated gene transfer, *Methods in Enzymology* 373,384-399 (2003)

2 学会発表

- 1) 麓伸太郎、伊藤佳孝、川上 茂、西川元也、山下富義、橋田 充、物性制御によるガラクトース修飾リポソーム/pDNA 複合体の肝細胞選択的遺伝子導入効率の改善、日本薬剤学会第 18 年会、2003 年 4 月 4-6 日、京都
- 2) 梅山夕香里、熊井仁美、兵頭健治、西川元也、山下富義、橋田 充 癌転移におけるマトリノクス分解酵素活性の関与と活性酸素消去酵素デリバリーによる抑制、第 19 回日本 DDS 学会、2003 年 6 月 19-20 日、京都
- 3) 兵頭健治、西川元也、山下富義、橋田 充 癌細胞動態・増殖の定量的解析法を用いた活性酸素消去酵素デリバリーによる癌転移抑制効果の評価、第 19 回日本 DDS 学会、2003 年 6 月 19-20 日、京都
- 4) 兵頭健治、西川元也、梅山夕香里、山下富義、橋田 充 活性酸素消去酵素誘導体による癌転移抑制機構の検討、第 18 回日本薬物動態学会年会、2003 年 10 月 8-10 日、札幌
- 5) 麓伸太郎、重田耕佑、伊藤佳孝、川上 茂、山下富義、橋田 充 ガラクトース修飾リポソーム/pDNA 電荷制御複合体の物理化学的性質と肝臓内動態特性及び遺伝子発現効率に関する検討、第 18 回日本薬物動態学会年会、2003 年 10 月 8-10 日、札幌
- 6) S Kawakami, F Yamashita and M Hashida Glycosylated cationic liposomes as a targeting device for cell-selective gene delivery, *4th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference*, May, 11-14, 2003, Florida, USA
- 7) M Nishikawa, T Kuramoto, T Okabe, Y Takakura and M Hashida Utilization of biological response against nonviral vectors for enhancing transgene expression, *The 6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy*, June, 4-8, 2003, Washington, DC, USA

H 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書

抗癌剤の高分子ミセル型受動的ターゲティング製剤開発とその評価

分担研究者 岡野光夫 東京女子医科大学教授

研究要旨 難水性の抗ガン剤（カンプトテシン）を安定・高収率で内包し、肝臓ガンへのターゲティングを達成する高分子ミセルキャリアシステムの構築することを目的に、高分子ミセル形成ブロックコポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸側鎖に疎水性のベンジル基を様々な割合で導入した新規高分子ミセルを分子設計し、カンプトテシンの放出制御製剤としての有用性を評価した。

A 研究目的

水に難溶性の抗ガン剤カンプトテシンを安定・高収率で内包し、固形ガンに効率よく運ぶ高分子ミセルターゲティングシステムを設計・作成する。

B 研究方法

高分子ミセル形成ブロックコポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸側鎖に疎水性のベンジル基を様々な割合で導入し、カンプトテシンのミセル封入を最適化した。

C 研究結果

カンプトテシンの高分子ミセル封入安定性をゲルパーミエーションクロマトで評価した。ベンジル基の導入率を 25%、44%、61%と上げてゆくと封入安定性が高まった。導入率をさらに 75%に高めても封入安定性は同じであったが、リン酸緩衝液中でのカンプトテシンの放出は遅くなり、半減期が 24 時間という制御放出を達成した。

D 考察

疎水性ベンジル基のブロックコポリマーへの導入量の増大に伴って、封入安定性、薬物徐放性ともに高まったが、100%の

ベンジル基導入の PEG- PBLA ブロックコポリマーでは安定性、徐放性とも非常に低い。このことは、疎水性ブロックの部分と薬物分子と相互作用する際にはポリマー側の疎水性基の間隔などの立体的要因が重要であることを示唆し、高分子ミセル薬物キャリアシステム設計の新たな指針となると考えられる。

E 結論

カンプトテシンを安定性高く高分子ミセルに封入することに成功した。

F 健康危険情報 なし

G 研究発表

1 論文発表

1) 横山昌幸、「DDSに用いるバイオマテリアル」最新医学、58、263-278 (2003)

2) 横山昌幸、「ナノテクノロジーの医療への応用」臨床消化器内科、18、1681-1683 (2003)

3) 中山正道、岡野光夫「温度応答性高分子と薬物治療」、「生物医学研究・先端医療のための最先端テクノロジー ドラッグデリバリーシステム」メディカル ドウ、

228-232 (2003)

2 学会発表

- 1) 中山正道、横山昌幸、岡野光夫ら、温度応答性高分子ミセル、第19回日本DDS学会、2003 6 19
- 2) M Yokoyama, M Nakayama, and T Okano, et al, Temperature responsive polymeric micelles for double targeted drug deliver, 14th international Symposium on Microencapsulation, 2003 9 4
- 3) M Yokoyama and T Okano, Anti-cancer

Drug Loading and Release on/from Polymeric Micelle Carrier Systems, FNCI-JSPS Conference, "Tumor-specific Delivery by Non-viral Systems", 2003 2 14

G 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝がん治療用ピラルビシン封入肝ターゲティングリポソーム製剤の開発に関する研究
分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学医薬品化学研究所

肝がんの化学療法においては、副作用を軽減し治療効果を高めるために、長期滞留性製剤による受動的ターゲティングと、糖残基による肝細胞への能動的ターゲティングが研究されている。グルコース残基を有する β -シトステロールグルコシドによって修飾したリポソーム製剤(Sit-G 修飾リポソーム)は肝実質細胞へのターゲティングに有用である。そこで、肝がんへのターゲティング担体として Sit-G 修飾リポソームを用い、抗がん剤としてピラルビシン(THP)を用いて、THP 封入肝ターゲティングリポソーム製剤(L-THP)の構築を目指した。L-THPの最適処方、粒子径と薬物封入率から決定し、担癌マウスにおける抗腫瘍効果を調べ、その有効性を評価した。

A 研究目的

これまでは、肝がんの化学療法において、副作用を軽減し治療効果を高めるための薬物送達システム(DDS)として、長期滞留性製剤による受動的ターゲティングと、糖残基による肝細胞への能動的ターゲティングが研究されてきた。後者の例では、肝実質細胞にガラクトース残基を認識するアシアロ糖タンパクレセプターが発現していることから、ガラクトース修飾リポソームが用いられている。私達はこれまでに、大豆由来ステロールグルコシド(SG)あるいはその主成分である β -シトステロールグルコシド(Sit-G, Fig 1)により修飾したドキシソルビシン封入リポソームは、肝臓へ薬物を集積させ、肝がんモデルマウスの治療効果を向上させることを明らかにした。また、これは、Sit-G 修飾リポソーム表面のグルコース残基と肝細胞のアシアロ糖タンパクレセプターとの親和性による可能性も報告した。

抗がん剤ピラルビシン(4'-O-tetrahydropyranlydoxorubicin, THP, Fig 2)は、ドキシソルビシンの副作用軽減を目的として合成された誘導体である。THPは、乳がんや卵巣がん、白血病等に適用を有し、ドキシソルビシンに比べ心毒性や消化器障害などの副作用の発現は低く、ドキシソルビシン

耐性細胞にも有効であり、優れた抗腫瘍効果を有する。また、ドキシソルビシンに比べ脂溶性が高いため、組織への移行速度が速く、肝動脈内投与や門脈内投与といった局所投与では、肝臓中の薬物濃度が向上し、転移性肝がんや原発性肝がんにも有効性を示している。しかし、THPの全身投与による肝臓への送達については、未だ報告されていない。そこで、Sit-G 修飾リポソームにTHPを封入することにより、肝臓へTHPを選択的に送達するリポソーム製剤の構築を試みた。

B 研究方法

脱水復水法(dehydration-rehydration vesicle 法, DRV 法)によるTHP封入リポソームの調製

THP封入リポソームの組成には、精製卵黄レシチン(EPC)、コレステロール(Ch)、Sit-G、オレイン酸(OA)を用いた。これらの脂質成分から成る小さな空の一枚膜リポソーム(粒子径約80nm)を調製し、これにTHPと糖を加え、凍結乾燥後、少量の水で復水してTHP封入リポソーム(L-THP)を得た。

薬物封入率

L-THPの粒子径は、電気泳動光散乱光度計(ELS-800、大塚電子)を用いて測定し、薬物封入率は超遠心分離(100,000×g、60分、4℃)でリポソームと未封入のTHPとを

分離後、上清の THP 濃度を蛍光光度計(励起波長 482nm、蛍光波長 550nm)で測定し、以下の式より算出した。

薬物封入率(%) = $(1 - C_{\text{supernatant}} / C_{\text{total}}) \times 100$
ここで、 $C_{\text{supernatant}}$ は上清の未封入薬物濃度を示し、 C_{total} は添加した総薬物濃度を示す。

L-THP の体内動態と抗腫瘍効果の評価

転移性肝がんモデルマウスは、C57BL/6J マウス(雌性、体重約 17g)にマウス組織球腫 M5076 細胞を移植して作成した。

L-THP の体内動態の評価には、マウス 1 匹あたり 1×10^5 細胞の M5076 細胞を尾静脈から移植後、10 日目に THP として 5mg/kg を尾静脈内投与し、0.5、1、2、6、24 時間後の血清および各臓器中(肝臓、脾臓、心臓、腎臓、肺)の薬物濃度を HPLC 法により測定した。

L-THP の肝がん治療効果の評価には、M5076 細胞(1×10^5 細胞)を尾静脈から移植後 3 日目に THP として 10mg/kg で投与し、その後の生存日数より延命率(ILS)を以下の式より算出した。

$$ILS = (T/C - 1) \times 100 (\%)$$

ここで T は治療群の生存日数を、C は対照群の生存日数を示す。また、Kaplan-Meier 法により生存率曲線を作成し、log-rank 検定により生存率の比較を行った。

C 結果

リポソームへの THP 濃度

THP の添加量は THP/EPC = 0.1 (w/w) で調製した場合には、リポソームの平均粒子径が 1254nm と非常に大きくなったが、THP/EPC = 0.05 (w/w) では約 300nm と比較的小さく調製できたので、以後の検討は THP/EPC = 0.05 (w/w) を用いることにした。最終的には L-THP の THP 濃度は 0.5mg/mL とした。

凍結乾燥時に添加する糖の種類と量

グルコース、ショ糖、乳糖の各糖をリポソームの脂質と等質量加え、OA 有無の処方について、復水後の粒子径と THP 封入率を測定した。その結果、凍結乾燥前の空リポソームの粒子径が約 80nm であったのに対し、糖を添加せずに凍結乾燥を行うと、薬物封入リポソームの平均粒子径は約 1 μ m となっ

た。一方、各糖を加えると粒子径は大きくなり、特にグルコースとショ糖では乳糖に比べて粒子径増大を抑制することが明らかになった。そのため以後の検討はショ糖を用いて行った。

薬物封入率

薬物封入率については、OA 無添加の L-THP (EPC Ch Sit-G OA = 7320) では 30-35% 程度であるのに対し、OA 添加の L-THP (EPC Ch Sit-G OA = 7321) では約 80% の封入率が得られた。同じ組成から成るリポソーム懸濁液を THP 溶液と混合しただけでは、約 10% 程度しか薬物は封入されなかった。すなわち凍結乾燥後復水することで THP の薬物封入率は向上し、さらに OA との親和性により 80% まで封入率が增加することが明らかとなった。

次に L-THP (EPC Ch Sit-G OA = 7321) において、ショ糖の添加量を変えて調製し、粒子径の調整を試みた。その結果、凍結乾燥時に加えるショ糖の量を増すと共に薬物封入リポソームの粒子径は小さくなり、ショ糖/脂質 = 8 (w/w) のときに 80% の薬物封入率で、約 340nm のリポソームとなった。

リポソームへの THP 封入率は、組成中の OA 量に大きく影響されることがわかった。そこで他の組成は固定して OA 比を変えてリポソームを調製した (Fig 3)。OA 比を増加させると THP 封入率は増加し、EPC Ch Sit-G OA = 7323 (モル比) ではほぼ 100% 近くになった。

以上のように、粒子径が小さく薬物封入率の高い L-THP (EPC Ch Sit-G OA = 7321) は、脂質の 8 倍量のショ糖を添加した DRV 法により調製できた。

体内動態

各時間における血清中および各臓器内 THP 濃度を Fig 4 に、濃度-時間曲線下面積 (AUC) を Table 1 にまとめた。THP 溶液 (F-THP) 投与では THP は血中から速やかに消失し、心臓、肺、脾臓に分布した。一方、L-THP 投与では THP の分布が大きく変化し、心臓や肺への薬物分布が抑制され、肝臓への集積量が増加した。L-THP は肝臓での AUC を約 4 倍上昇し、心臓での AUC を約半分に減少させた。

抗腫瘍効果

5%ブドウ糖液を投与した対照群の生存日数は約14日であったが、各治療群では延命効果を示し、生存日数が延長した (Table II)。THP 溶液 (F-THP) 投与群に比べ L-THP 群において生存日数の延長が見られ、生存日数中央値は20日であった。延命率を算出すると、F-THP では28.6%、L-THP では42.9%となり、いずれも対照群に比べ有意に延長した。L-THP は肝臓への THP 集積を増加させたために、肝がんの治療効果が向上したと考えられた。THP 投与後のマウスの体重変化を比較すると、F-THP 群では約10%程度の体重減少を示したのに対し、L-THP 群では体重の変化はほとんど見られず、対照群と有意な差は見られなかった。

D 考察

リポソームの粒子径

凍結乾燥時に添加する糖の種類や量は、復水後のリポソーム粒子径に大きく影響する。各糖をリポソームの脂質と等質量加え、復水後の粒子径と THP 封入率を測定した結果、糖を添加せずに凍結乾燥を行うと、薬物封入リポソームは大きくなったが、糖を添加すると粒子径は大きくなり、特にグルコースとショ糖では乳糖に比べて粒子径増大を抑制することが明らかになった。これは、Crowe らや Zadi らの報告である、単糖 (グルコース) より二糖 (ショ糖) の方が粒子径増大の抑制作用が大きく、ショ糖はトレハロースと同等の強い保護作用を有することによく対応した。

一般に、糖は多価アルコール (グリセロール) 等と同様に凍結保護物質 (cryoprotectant) として、リポソームを凍結乾燥する場合に用いられている。リポソームを凍結乾燥すると、親水性基から水分子が取り除かれて脱水和が起こることにより、リン脂質膜の不安定化が起こり、リポソーム同士の融合や封入物の漏出が起きる。しかし、リポソーム内外の水相に糖を存在させると、糖がリポソーム表面に水和した水分子と置き換わるために、リポソーム二重層の再配列を抑えられ、融合を防ぎ、封入物の漏出を防ぐことができる。ここでは、糖をリポソームの外液

のみに存在させることにより、リポソーム膜を揺らがせて薬物の封入を亢進させると共に、適切な量の糖を用いることでリポソームの融合を抑制して、粒子径の増大を抑制したと考えられる。

薬物封入率

Fig 3 に示すように、OA 比を増加させると THP 封入率は増加し、ほぼ100%近くになった。これは、OA の割合を増加させると、リポソームの表面電位が大きく負に帯電し、そのため正電荷薬物である THP が電気的に吸着したためと推察された。しかし、薬物封入率が向上すると共に粒子径も大きくなった。これはリポソーム表面に吸着した THP がリポソームの表面電荷を打ち消したために電気的反発が弱くなって凝集が起こり、粒子径が大きくなったと推察された。

体内分布と抗腫瘍効果

M5076 細胞はマウス卵巣がん由来の肉腫で、マウス皮下、腹腔内もしくは静脈内移植後、いずれも主に肝臓や脾臓に転移し、マウスを致死させるため、転移性肝がんモデルとして用いられている。なお、尾静脈より細胞移植後14日目に肝臓は肥大し、多くの結節が観察され、肝がんになっていることを確認した。

L-THP 投与では F-THP に比べ THP の分布が大きく変化し、心臓や肺への薬物分布が抑制され、肝臓への集積量が増加した。また、F-THP 群では約10%程度の体重減少を示したのに対し、L-THP 群では体重の変化はほとんど見られず、対照群と有意な差は見られなかった。これは、L-THP は正常組織への薬物移行を抑制し、有害作用を抑制したためと推察された。

THP の重大な副作用として心筋障害があげられるが、L-THP は心臓への薬物分布を抑制し、さらに肺や腎臓等、正常組織への薬物分布を抑制しているため、副作用の軽減が示唆された。

以上のことから、DRV 法により調製された L-THP は、静脈内投与後、肝臓に THP を集積して肝がんの治療効果を向上させ、他の組織への分布を抑制して有害作用を軽減することが明らかとなった。

E 結論

リポソームの組成に OA を加え、DRV 法の改良によって、静脈内投与可能な薬物封入率の高い THP 封入リポソームの調製を可能にした。このリポソームは、静脈内投与後、肝臓へ THP を集積して肝がんの治療効果を向上させることを明らかにした。THP のように肝臓への分布が低い薬物も Sit-G 修飾リポソームに封入することにより肝臓へ送達することが可能となり、肝がんに対する THP の新たな有用性を見いだすことができた。

F 研究発表

1 論文発表

J Wang, K Takayama, T Nagai and Y Maitani, Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of and PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol *Int J Pharm*, 251, 30(1-2) 13-21(2003)

K Kawano, K Takayama, T Nagai and Y Maitani, Preparation and pharmacokinetics of pirarubicin loaded dehydration-rehydration vesicles, *Int J Pharm*, 252(1 2) 73-9 (2003)

K Shimizu, K Tamagawa, N Takahashi, K Takayama, and Y Maitani, Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid - loaded liposomes contained sterylglucoside mixture, *Int J Pharm*, 258(1 2) 45 53 (2003)

K G Lau, S Chopra and Y Maitani, Entrapment of bleomycin in ultra-deformable liposomes, *STP Pharm* 13(1) 241 245 (2003)

X Qi, M H Liu, H Y Liu, Y Maitani, and T Nagai, Topical econazole delivery using liposomal gel, *STP Pharm* 13(4) 241-245 (2003)

N Takahashi, K Tamagawa, K Shimizu, T Fukui, and Y Maitani, Effects on M5076-hepatic metastasis of retinoic acid

and N (4-hydroxyphenyl) retinamide, fenretinide entrapped in SG liposomes, *Biol Pharm Bull* 26(7)1060 3 (2003)

C Xiao, X Qi, Y Maitani, and T Nagai, Sustained-release of cisplatin from multivesicular liposomes potentiation of antitumour efficacy against S180 murine carcinoma, *J Pharm Sci*, in press

Y Maitani, K Nakamura, and K Kawano, Application of sterylglucoside containing particles for drug delivery, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, accepted

2 学会発表

田村麻衣、永井恒司、米谷芳枝、エタノール注入法による微粒子製剤の特性、日本薬学会 122 年会 (長崎) 2003 年 3 月

塩川智規、米谷芳枝、葉酸修飾マイクロエマルジョンによる癌ターゲティング化学療法、日本薬剤学会第 18 年会 2003 年 4 月 4 日~6 日

服部喜之、森田紗絵、米谷芳枝、Midkine プロモーターを用いた自殺遺伝子治療用リポソームヘクターの調製と抗腫瘍効果、第 19 回日本 DDS 学会 2003 年 6 月、京都

長本隆浩、永井恒司、高山幸三、米谷芳枝、経鼻吸収用キトサン微粒子ワクチン製剤の調製と in vivo 評価、第 19 回日本 DDS 学会 2003 年 6 月、京都

米谷芳枝、ターゲティング用脂質微粒子の創剤構築—マイクロエマルジョン、第 22 回物性物理化学研究会 2003 年 7 月、京都

Y Maitani, S Yano, and K Hayashi, Liposome vector containing biosurfactant-complexed DNA and entrapping DNA as herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery system *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of 6th international conference of Liposome Advances*, p 109, London, UK, Dec 15-19, 2003

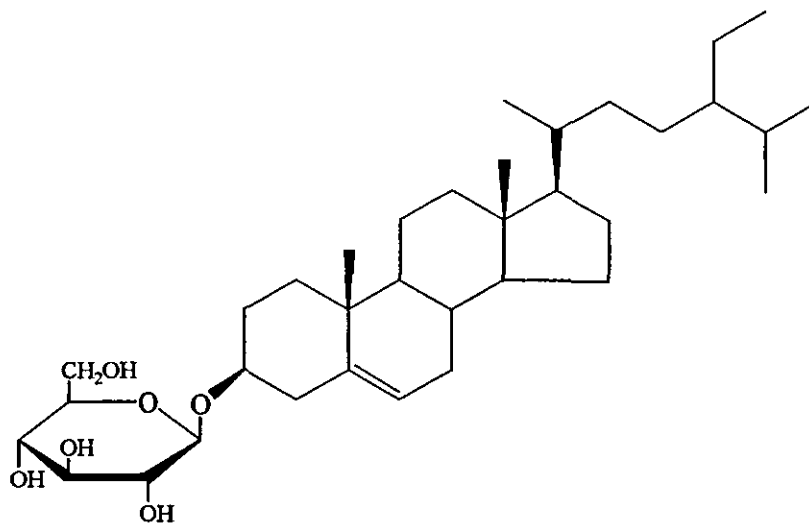


Fig 1 Chemical structure of β -sitosterol β -D-glucoside (Sit-G)

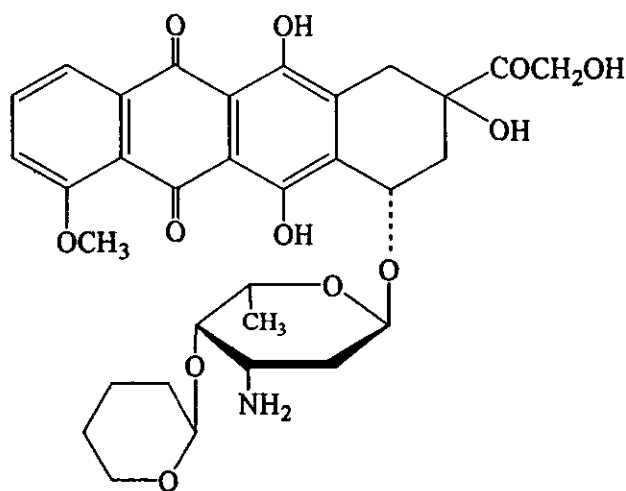


Fig 2 Chemical structure of pirarubicin (THP)

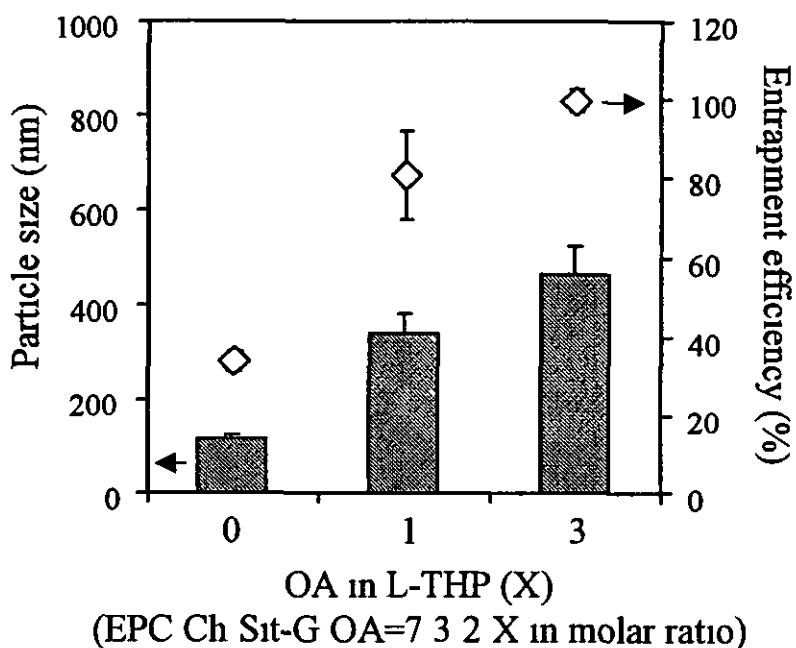


Fig 3 The effect of OA ratio in L-THP on the particle size of liposomes (bar) and the entrapment efficiency (\diamond) L-THP was prepared from EPC Ch Sit-G OA=7 3 2 X (molar ratio) at sucrose/lipid=8 (w/w) and THP/EPC=0.05 Each value represents the mean \pm S D (n=3)

Table I Tissue AUC₀₋₂₄ values after injection of F-THP and L-THP in mice bearing M5076 at a dose of 5 mg/kg at 10 days after tumor inoculation (n=4)

	Tissue AUC ₀₋₂₄ (µg h /g)					
	Serum ^{a)}	Liver	Heart	Lung	Kidney	Spleen
F-THP	1 13	6 6 (0 8)	7 7 (1 0)	485 1(179 5)	90 2 (50 5)	130.7(24 4)
L-THP ^{b)}	1 45	24 4 * (3 2)	3 7 * (0 9)	93 0 * (4 3)	24 0 * (1 8)	101 3(20 9)

^{a)} Serum AUC is given as µg h /ml ^{b)} L-THP consisted of EPC Ch Sit-G OA=7 3 2 1 (molar ratio) and prepared with sucrose/lipid= 8 (w/w) The numbers in parentheses represent S D

Table II Antitumor effects of F-THP and L-THP in mice bearing M5076 liver metastasis tumors treated at 10 mg/kg at 3 days following tumor inoculation (n=7)

	Median survival time (days)	ILS ^{a)} (%)
Control	14 0	
F-THP	18 0	28 6 *
L-THP ^{b)}	20 0	42 9 *

^{a)} Percentage increase in life span, $(T/C-1) \times 100$ (%), where T and C represent the median survival time of the treated and control animals, respectively ^{b)} L-THP consisted of EPC Ch Sit-G OA=7 3 2 1 (molar ratio)

* $P < 0.05$, compared with control

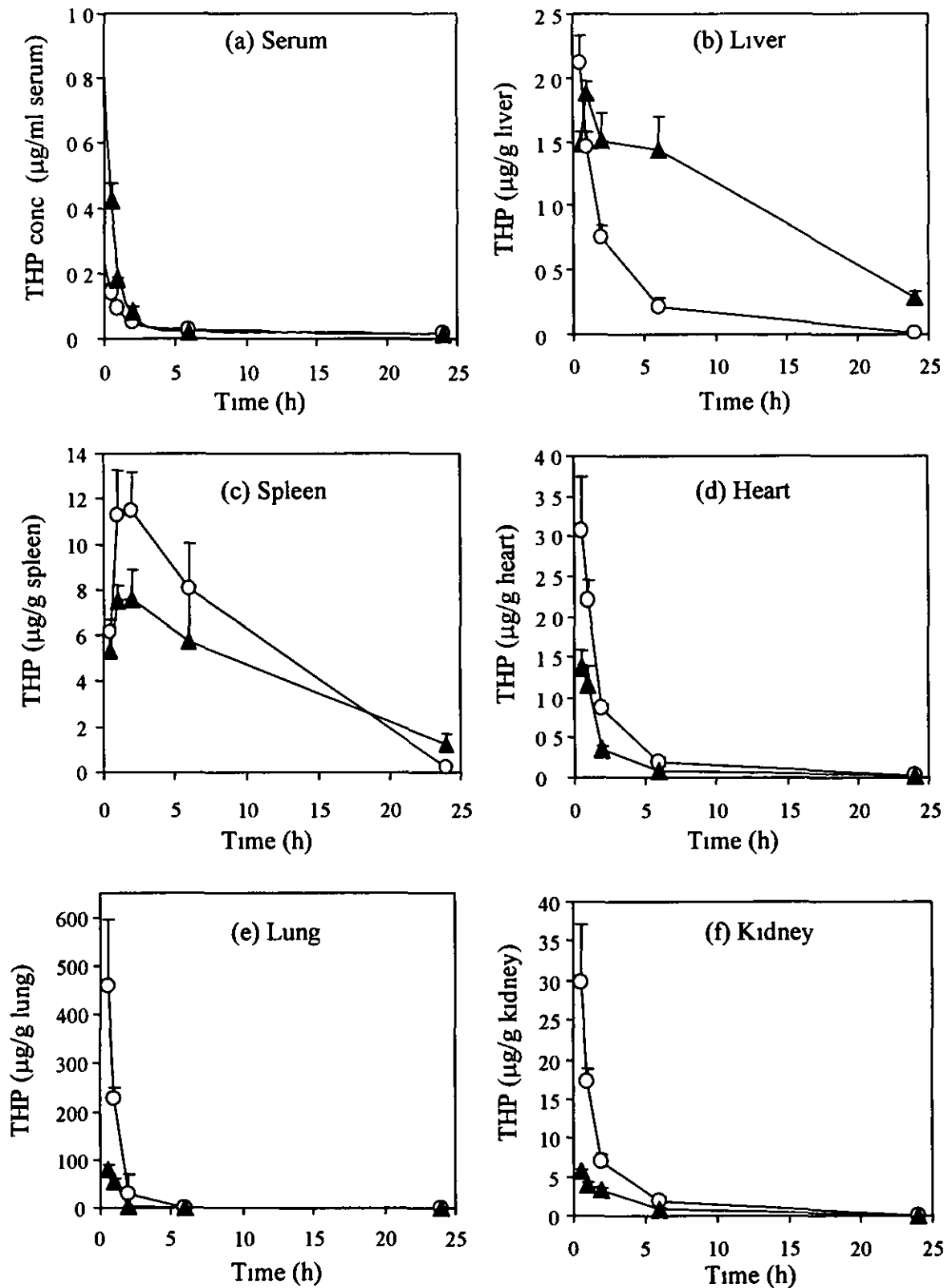


Fig 4 THP levels in serum (a) and tissues (b, liver, c, spleen, d, heart, e, lung, f, kidney) after i v injection of L-THP (▲) and F-THP (○) in mice bearing M5076 at a dose of 5 mg/kg at 10 days after tumor inoculation THP levels in the serum were simulated by the two-compartment model Each value represents the mean \pm S D (n=4)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
E Ishida C Managit S Kawakami M Nishikawa F Yamashita M Hashida	Biodistribution characteristics of galactosylated emulsions and incorporated probucol for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drugs in mice	Pharmaceutical Research		in press	
K Morimoto, M Nishikawa, S Kawakami, T Nakano, Y Hattori, S Fumoto, F Yamashita, M Hashida	Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethylenimine on hepatoma cells and mouse liver	Molecular Therapy	7(2)	254-261	2003
P Opanasopit, M Nishikawa, C Managit, F Yamashita, M Hashida	Control of hepatic disposition of mannosylated liposomes by PEGylation effect of the molecular weight of PEG and the density of PEG and mannose	S T P Pharma Sciences	13(1)	57-62	2003
A Kawase, T Nomura, K Yasuda, N Kobayashi, M Hashida, Y Takakura	Disposition and gene expression characteristics in solid tumors and skeletal muscle after direct injection of naked plasmid DNA in mice	Journal of Pharmaceutical Sciences	92	1295-1304	2003
S Fumoto, F Nakadori, S Kawakami, M Nishikawa, F Yamashita, M Hashida	Analysis of hepatic disposition of galactosylated cationic liposome/plasmid DNA complexes in the rat perfused liver	Pharmaceutical Research	20(9)	1452-1459	2003
M Nishikawa, T Nakano, T Okabe, N Hamaguchi, Y Yamasaki, Y Takakura, F Yamashita, M Hashida	Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study	Bioconjugate Chemistry	14(5)	955-961	2003
S Fumoto, S Kawakami, M Ishizuka, M Nishikawa, F Yamashita, M Hashida	Analysis of hepatic disposition of native and galactosylated polyethylenimine complexed with plasmid DNA in perfused rat liver	Drug Metabolism and Pharmacokinetics	18(4)	230-237	2003
F Sakurai, T Terada, M Maruyama, Y Watanabe, F Yamashita, M Hashida	Therapeutic effect of intravenous delivery of lipoplexes containing the interferon-beta gene and Poly I poly C in a murine lung metastasis model	Cancer Gene Ther	10(9)	661-668	2003
C Managit, S Kawakami, M Nishikawa, F Yamashita, M Hashida,	Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes	International Journal of Pharmaceutics	266	77-84	2003

F Verbaan, I van Dam, Y Takakura, M Hashida, W Hennink, G Storm C Oussoren	Intravenous fate of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes	European Journal of Pharmaceutical Sciences	20	419-427	2003
M Nishikawa, S Kawakami, F Yamashita, M Hashida	Glycosylated cationic liposomes for carbohydrate receptor-mediated gene transfer	Methods in Enzymology	373	384-399	2003
M Yokoyama P Opanasopit T Okano Y Maitani K Kawano	Polymer design and incorporation method for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin	Journal of Drug Targeting		in press	
M Annaka T Matsuura M Kasai T Nakahira Y Hara T Okano	Preparation of comb-type n- isopropylacrylamide hydrogel beads and their application for size-selective separation media	Biomacromolecules	4	395-403	2003
H Yamanaka K Yoshizako Y Akiyama H Sota Y Hasegawa Y Shinohara A Kikuchi T Okano	Affinity chromatography with collapsibly tethered ligands	Analytical Chemistry	75(7)	1658-1663	2003
J Kobayashi A Kikuchi K Sakai T Okano	Cross-linked thermoresponsive anionic polymer-grafted surfaces to separate bioactive basic peptides	Analytical Chemistry	75(13)	3244-3249	2003
H Otsuka E Uchimura H Koshino T Okano K Kataoka	Anomalous binding profile of phenylboronic acid with n-acetylneuraminic acid(Neu5Ac) in aqueous solution with varying pH	American Chemical Society	125	3493-3502	2003
中山 正道 岡野 光夫	4 温度応答性高分子と薬物治療	メディカル ドウ		228-232	2003
中山 正道 岡野 光夫	温度応答性高分子の合成とその 応用	メディカル ドウ		263-264	2003
横山 昌幸	ナノテクノロジーの医療への応 用	臨床消化器内科	18(12)	1681-1683	2003
横山 昌幸	DDSに用いるバイオマテリア ル	最新医学	6月増刊 号	265-278	2003
Wang J, K Takayama, T Nagai, Y Maitani	Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of and PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol	International Journal of Pharmaceutics	251	13-21	2003
K Nakamura, Y Maitani, K Takayama	Regional Intestinal Absorption of FITC-dextran 4,400 with Nanoparticles Based on [[beta]]-Sitosterol [[beta]]-D-Glucoside in Rats	Journal of Pharmaceutical Sciences	92(2)	311-318	2003
K Kawano,	Preparation and pharmacokinetics of	International Journal of	252(1-2)	73-79	2003

K Takayama, T Nagai, Y Maitani	pirarubicin loaded dehydration-rehydration vesicles	Pharmaceutics			
K Shimizu, K Tamagawa, N Takahashi, K Takayama, Y Maitani	Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid – loaded liposomes contained sterylglucoside mixture	International Journal of Pharmaceutics	258(1-2)	45-53	2003
K G Lau, S Chopra, Y Maitani	Entrapment of bleomycin in ultra-deformable liposomes	S T P Pharma Sciences	13(1)	241-245	2003
X Qi, M H Liu, H Y Liu, Y Maitani, T Nagai	Topical econazole delivery using liposomal gel	S T P Pharma Sciences	13(4)	241-245	2003
N Takahashi, K Tamagawa, K Shimizu, T Fukui, Y Maitani	Effects on M5076-hepatic metastasis of retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide, fenretinide entrapped in SG-liposomes	Biological and Pharmaceutical Bulletin	26(7)	1060-1063	2003
C Xiao, X Qi, Y Maitani, T Nagai	Sustained-release of cisplatin from multivesicular liposomes potentiation of antitumour efficacy against S180 murine carcinoma	Journal of Pharmaceutical Sciences		in press	
T Nagamoto, Y Hattori, K Takayama, Y Maitani	Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing immune response via intranasal vaccine delivery	Pharmaceutical Research		in press	

20031141

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。