

まず、懸念されたのはAC7700/ADRミセル併用によって、副作用が重篤になることである。AC7700/ADRミセル併用群における体重減少は、図39に示すように、薬剤投与初日の体重と比較しても5%以内に留まった。また他群と比較してもマウスの挙動に、特に目立った点はなかった。体重変化からみた副作用評価では、今回の実験で使用したAC7700 20 mg/kg、ADRミセル 10 mg/kgが安全に実験を行える範囲内であることが分かった。

がん体積の変化の様子を示したのが図40である。また、図41にはday28の実験終了時での、マウスの写真を示す。皮下移植から19日目の腫瘍体積について各種薬物投与群を未処置のコントロールとダネット法で比較したところ、AC7700は $p < 0.05$ 、ADRミセルは $p < 0.01$ 、AC7700/ADRミセル併用群 $p < 0.01$ 、といずれも有意な腫瘍成長抑制効果が得られた。しかし、多重比較によるこれらの治療群間の有意差は見いだされなかったが、併用群の平均体積が最も小さかった。今後は項目(5)のMRIによる解析等を参考にし、両薬剤の投与間隔等の最適化によって併用効果を得ることが課題となる。

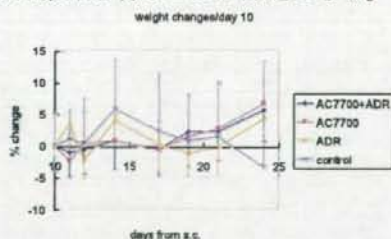


図39 AC7700/ADRミセル投与に伴う体重変化。(AC7700をday 10、ADRミセルをday 11に投与した。)

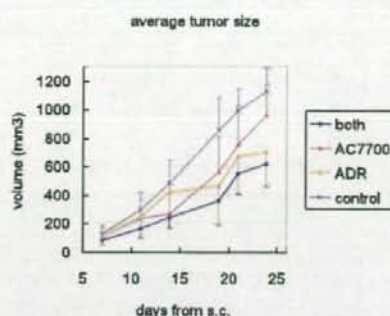


図40 腫瘍体積変化



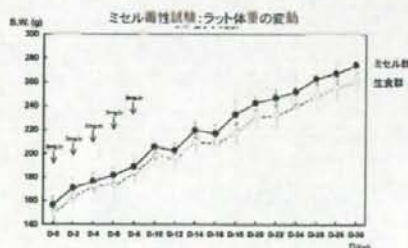
図17 Day 28のマウスの全身像

今回用いたがんモデルは、HSC-44PE ヒトスキルス胃がん症例(linitis plastica-type)における、胸水から採取した細胞から樹立された株である。44As3はこのHSC-44PEをparentとする細胞株で、マウスで同所移植を行うと高頻度で腹水を形成し、ヒトスキルス胃がん に似た特徴を示す。(Cancer Sci 2005, 96, 323-332. Cancer Sci 2004, 95, 575-582.) 今回使用した細胞は、ルシフェラーゼを発現しているため、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光で腫瘍量を測定することが可能である。ただし今回の実験では腫瘍の外径を計測しており、発光による腫瘍量測定は今後の課題となる。

(7) ラットによる生体毒性評価

ラット体重変化観察

ミセル20mg/kg投与量での、ラット体重の変動を図C-1に掲げたが、ミセル群と対照群の間に有意な差はなかった。また、大脳、心臓、肺、肝臓、脾臓の重量にもミセル群、対照群の間に差はなかった(表C-1)。主要な組織を病理組織学的に検討したが、特記



すべき病的所見はなかった。

図C-1 ラット体重変化

臓器重量:高分子ミセル急性毒性実験1

	ミセル群			生食群		
	平均(g)	SD	動物数(n)	平均(g)	SD	動物数(n)
脳	1.36	0.06	6	1.35	0.09	6
心臓	0.95	0.09	6	0.89	0.09	6
肺	1.33	0.11	6	1.27	0.19	6
肝臓	18.18	1.47	6	16.8	2.09	6
脾臓	0.7	0.09	6	0.64	0.1	6
腎臓	2.47	0.7	6	2.39	0.16	6

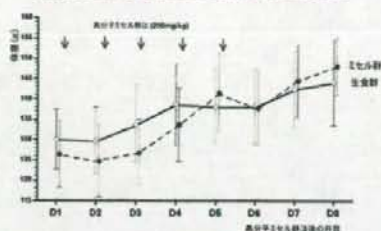
p<0.05

表C-1 臓器重量

次に、200mg/kgを1ml連日5回、対照群(6匹)には生理食塩水1mlを連日5回尾静脈内に注入した。ミセル群と生食群との間に体重変動や主要臓器重量に差はなかった(図C-2、表C-2)。しかし、病理組織学的に検討したところ、ミセル群と対照群とでは、脾臓と肝臓に大きな差が認められた。

図C-2

高分子ミセルの静注によるラット体重の経時的変動



表C-2

高分子ミセル急性毒性実験2:臓器重量

	ミセル群			生食群		
	平均(g)	SD	動物数(n)	平均(g)	SD	動物数(n)
脳	1.65	0.1	6	1.57	0.1	6
心臓	0.58	0.06	6	0.67	0.07	6
肺	1.21	0.08	6	1.44	0.12	6
肝臓	10.6	1.08	6	10.55	0.67	6
脾臓	0.37	0.06	6	0.46	0.07	6
腎臓	1.61	0.16	6	1.73	0.16	6

いずれの臓器でもミセル群と生食群の間に有意差はなかった(p<0.05).

すなわち、ミセル群の赤脾髄には著しい抗ラットCD68陽性の泡沫細胞の集積がみられた。これらの泡沫細胞の胞体はベルリン青鉄染色では生食群に比較して淡い傾向があった(図C-3)。またミセル群では肝臓のKupffer細胞の著しい腫大が観察された。

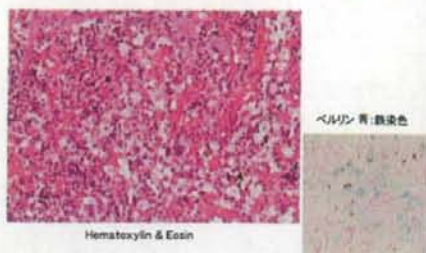
図C-3

脾臓における泡沫細胞集積1



図C-4

脾臓における泡沫細胞の集積2



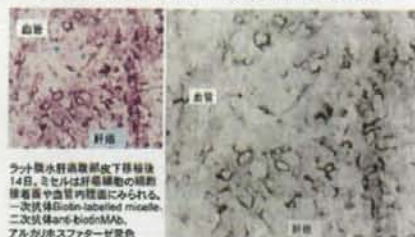
ビオチン標識高分子ミセルを用いた免疫組織学的研究

まずビオチン化ミセルを①avidin-biotin complex法で免疫組織学的に検出できるか否か、②発色法の選択peroxidase発色、alkaline phosphatase法、③メタノール、キシレン処理が可能か、の3点を検討した。

PVDF膜にプロットしたビオチン化ミセルは2mol、10molとも濃度に依存した反応強度を示した。Alkaline phosphatase発色でよく検出された。ただし、メタノール、キシレン処理を経る条件では検出できなかった。また、皮下にビオチン化ミセルを注射し24時間後に組織をホルマリンやパラホルムアルデヒド、亜鉛固定を施し免疫組織学的に検出を試みたが、明瞭な陽性像は得られなかった(写真略)。次に、凍結癌組織へのビオチン化ミセルの結合性の検証のための2つの実験を行った。一つはラット腹水肝癌AH109A細胞を皮下に移植し2週間後に腫瘍を摘出、凍結標本を作製し、ビオチン化ミセルの結合性を検討した。その結果、ミセルは肝癌細胞に一致して高率に、強く結合すると考えられる結果が得られた。またところどころで、血管壁にも結合するように思われた(図C-5)。

図C-5

ラット腹水肝癌AH109A皮下移植腫瘍

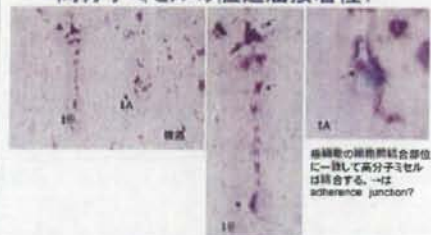


ラット腹水肝癌細胞皮下移植後14日、ミセルは肝癌細胞の細胞核や血管内腔面にみられる。一次抗体biotin-labelled micelle、二次抗体streptavidin-MAb、アルカリホスファターゼ発色

類似の結果はヒト胆管癌でも得られた(図C-6)

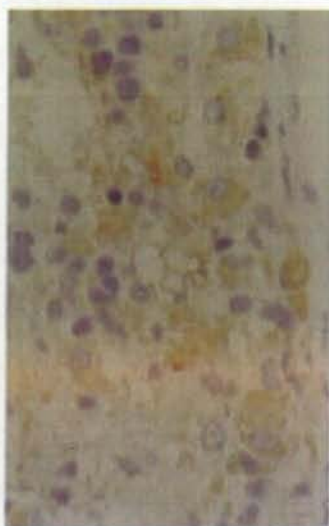
図C-6

高分子ミセルの胆管癌接着性:

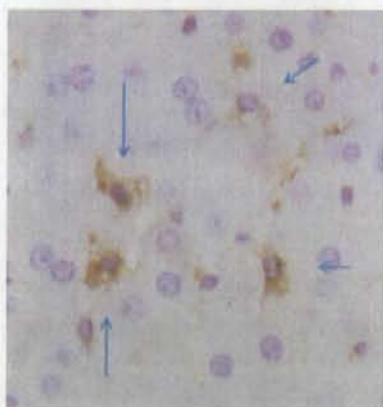


手術で摘出されたヒト胆管癌組織からマイクロンの凍結標本を作製。ビオチン標識高分子ミセルを4℃で1時間反応、抗ビオチンマウス単クローン抗体で室温1時間反応させ、ビオチン標識ツバギのジクロロメタン抽出液で30分反応、アルカリホスファターゼで発色した。免疫組織学検査と並行に一致して強い免疫染色反応が検出された。癌細胞とミセルはこれと類似的に結合すると考えられる。

脾臓での高分子ミセル集積の免疫学的手法で観察した。図C-7に示すように、赤脾髄内に抗ビオチン免疫染色陽性の泡沫細胞が多数認められた。また、肝臓(図C-8)においても、肺においても認められた。図C-9は肺である。肺胞内マクロファージが高範囲に陽性である。このほか気管支粘膜上皮の一部が陽性であった。



図C-7 脾臓での集積

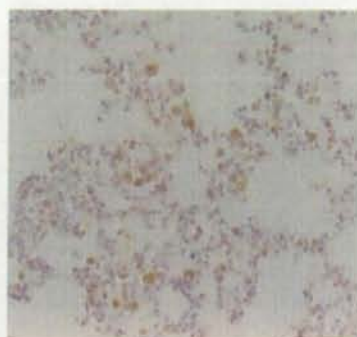


Kupffer細胞

図C-8 肝臓での集積

(8) ラット腫瘍のウインドウチャン
バーモデルによる解析

高分子ミセルの腫瘍血流と全身血圧に
及ぼす影響

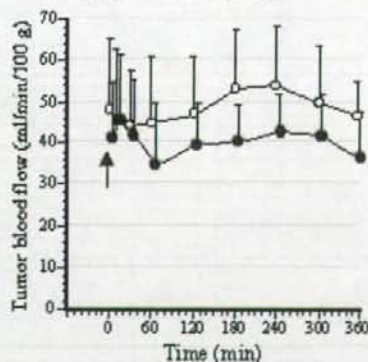


肺胞マクロファージ

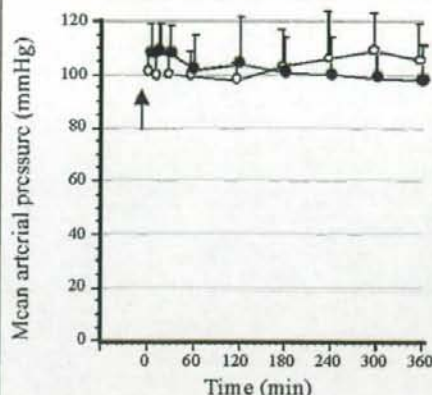
図C-9 肺での集積

高分子ミセルの腫瘍血流と全身血圧に
及ぼす影響

静脈内投与した40 mg/kg PEG₁₂-PBLA₁₄
、および10 mg/kgのアドリアマイシン
を封入したPEG12-P(Asp(ADR))₂₂が腫瘍
血流と全身血圧に及ぼす影響を、経時
的に6時間計測した結果を、それぞれ図
D-1と図D-2に示す。



図D-1 高分子ミセルの腫瘍血流に及ぼ
す影響○, PEG₁₂-PBLA₁₄ (n = 15); ●, ア
ドリアマイシン封入ミセルPEG₁₂-P(Asp)₂₂ (n
= 8) 平均値 ± SD 矢印, ミセル静脈
内投与

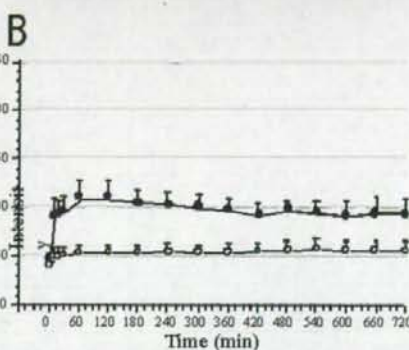
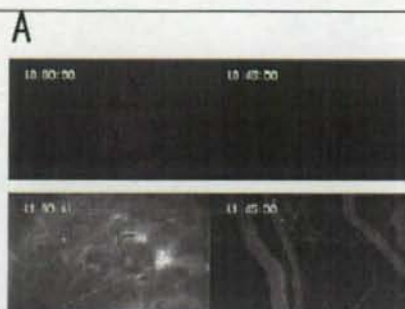


図D-2. 高分子ミセルの全身血圧に及ぼす影響

○, PEG₁₂-PBLA₁₄ (n = 15); ●, アドリアマイシン封入ミセルPEG₁₂-P(Asp)₂₂ (n = 8) 平均値 ± SD 矢印, ミセル静脈内投与

FITCミセルの腫瘍組織内濃度の経時的変化

FITCミセルを静脈内投与した後、正常皮下組織と腫瘍組織における組織内濃度を、同一部位で12時間、経時的に計測した結果を図D-3に示す。正常皮下組織では、静脈内投与されたFITCミセルは、細動脈、毛細血管、集合細静脈、細静脈と通過していくが、毛細血管からの漏れは、12時間の経過観察中ごくわずかであった。一方、腫瘍組織では、投与直後から、腫瘍血管から漏れ始め、約1時間でピークに達した。分子量4,000のFITCデキストランを静脈内投与した場合には、腫瘍組織に分布した蛍光色素は約2時間で完全に抜けるのに対し、FITCミセルは、12時間経過後も、腫瘍組織からほとんど抜けなかった。なお、画像解析により、FITCミセルの血中半減期は9~10時間と算出された。



図D-3. FITCミセルの組織移行性

A. FITCミセル移行性の典型例

左上, FITCミセル投与前の腫瘍組織; 左下, FITCミセル投与1時間後の腫瘍組織; 右上, FITCミセル投与前の正常組織; 右下, FITCミセル投与1時間後の正常組織

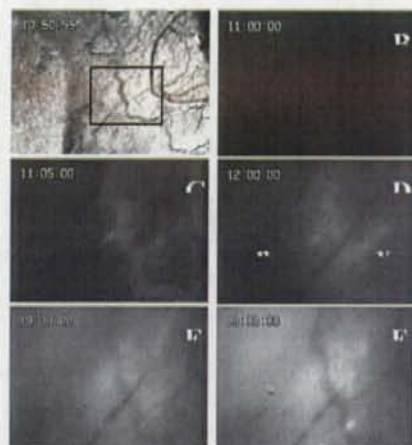
B. 輝度の定量○, 正常皮下組織; ●, 腫瘍組織 平均値 ± SD

腫瘍、正常共にそれぞれ4頭のラットを用い、腫瘍では22の関心領域(100ピクセル/関心領域)、正常では20の関心領域を計測した。

壊死近傍領域における高分子ミセルの移行性

高分子ミセルの壊死近傍領域と壊死巣への移行性の典型例を図D-4に、その蛍光強度の経時的変化の定量を図D-5に示す。

投与直後、ミセルは腫瘍血管から漏れ、腫瘍内のviableな領域 [各写真の右側の領域 (v)] に移行する。壊死領域 [各写真の左側の領域 (n)] には血管がないため、最初は移行しないが、時間経過と共に、この領域にもミセルが徐々に浸透し、蓄積されることが注目された。血流はないが、ゆっくりした間質液の流れがあることが示唆された。

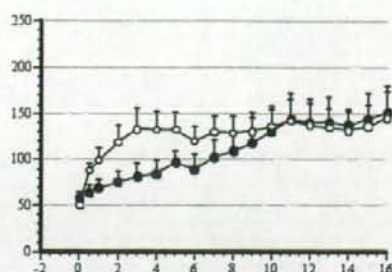


図D-4. 壊死近傍領域における高分子ミセルの移行性

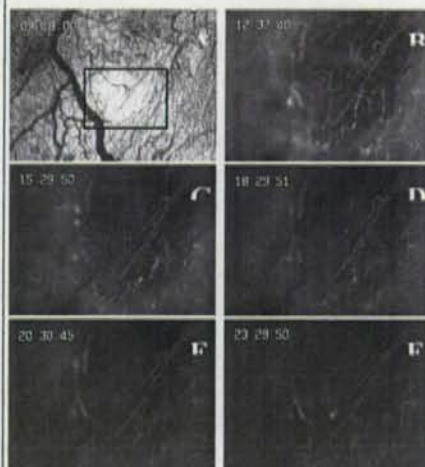
BからFまでの落射蛍光の所見は、Aの黒四角の枠内で得られた。B, 投与前; C, 投与5分後; D, 投与1時間後; E, 8時間後; F, 投与16時間後。

微小増殖巣での高分子ミセルの移行性

高分子ミセルの腫瘍微小増殖巣とその周辺領域への移行性の典型例を図D-5に示す。



図D-5. 蛍光強度の時間推移. ○, viable領域 (n=5); ●, 壊死領域 (n=5). Viable領域では投与3時間後、壊死領域では11時間後に蛍光強度はプラトーに達した。



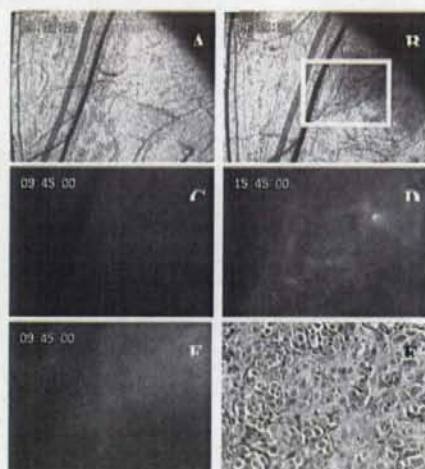
図D-5. 微小増殖巣における高分子ミセルの移行性

BからFまでの落射蛍光の所見は、Aの黒四角の枠内で得られた。B, 投与170秒後; C, 投与3時間後; D, 投与6時間後; E, 8時間後; F, 投与11時間後。B~Fの中心の黒く抜けた部分が微小増殖巣である。

図D-5の腫瘍は径約300 μm の大きさの微小増殖腫瘍である。FITCミセルを静脈内投与すると、腫瘍外周の正常組織とのインターフェイス領域で、ミセルの著明な漏れが見られた。腫瘍内部の血管からはほとんど漏れはなく、したがってミセルの腫瘍内蓄積は観察されなかった。

AC7700で誘導した腫瘍変性領域への高分子ミセルの移行

腫瘍血管破断剤AC7700で腫瘍の一部に変性領域を作り、FITCミセルを静脈内投与した時の所見を図D-6に示す。

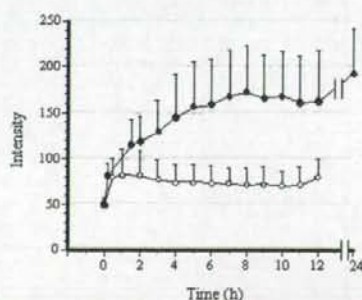


図D-6. 腫瘍変性領域へのミセルの移行と蓄積。A, AC7700投与前(右上に腫瘍がある)；B, AC7700投与24時間後、白四角枠内の黒くなった楔形の領域が変性領域。CからEまでの落射蛍光の所見は、Bの白枠内の領域で得られた。C, FITCミセル投与前；D, ミセル投与6時間後；E, ミセル投与48時間後；F, ミセルが蓄積した領域の組織像であり、肉芽組織となっている。

血管破断剤AC7700によって変性した領域に一致してミセルの蓄積が起こり、48時間後には分布が均質になっていることが注目された。

微小腫瘍におけるFITCミセルの動態に及ぼすAC7700前投与の効果

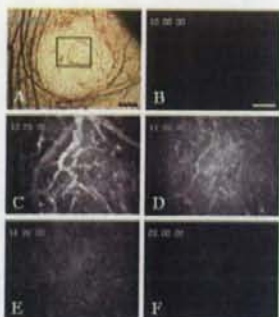
図D-7はAC7700(10 mg/kg)静脈内投与3日後に、静脈内投与したFITCミセルの腫瘍組織内蛍光強度の変化を、無処置の微小腫瘍のそれと比較した結果である。微小腫瘍では、FITCミセルの血管外移行も腫瘍内集積も低かったが、AC7700処置後に生き残った腫瘍血管では、無処置の腫瘍血管と比べて、血管外移行は著しく亢進していた ($P < 0.0001$)。FITCミセルは、特に循環機能が低下した変性領域に多量に蓄積し、24時間経過後も高い組織内濃度が維持されていた。



図D-7 FITCミセルの腫瘍組織内蛍光強度。FITCミセルはTime 0で静脈内投与。(●) FITCミセル投与3日前にAC7700(10 mg/kg)を静脈内投与；(○) AC7700の前投与なし

微小腫瘍におけるFITCミセルの動態に及ぼす放射線の効果

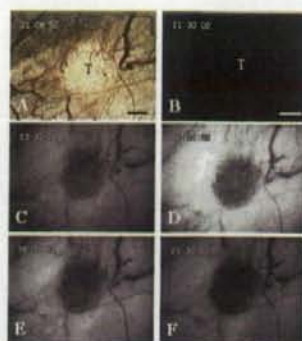
図D-8は径約1 mmの微小腫瘍に10Gy照射をし、3日後にFITCミセルを静脈内投与した結果である。投与5分後にはかなりのFITCミセルが血管外に移行した(図2C)。これは、微小腫瘍の腫瘍血管透過性が放射線によって著しく高まったことを示している。照射により腫瘍組織は著しく変性したが、AC7700の場合とは異なり、血管外に移行したFITCミセルは変性組織に留まらず、ウオッシュアウトされた。



図D-8 FITCミセルの腫瘍組織内動態への10Gy照射の効果。A, 生体観察像。丸く明るい部分が微小腫瘍。黒枠、蛍光観測領域。Bar, 100 μ m; B, FITCミセル投与直前。Bar, 100 μ m; C, 投与5分後; D, 1時間後; E, 4時間後; F, 10時間後

微小腫瘍におけるFITCアルブミンの動態

図D-9は、径約500 μ mの微小腫瘍内外でのFITCアルブミン動態の典型例である。微小腫瘍内でのアルブミンの血管外移行は、腫瘍と正常組織間のインターフェイスにおける血管外移行と比べて著しく低かった。また、インターフェイスの血管から漏れ出たアルブミンもそこに留まらず、徐々にウオッシュアウトされた。



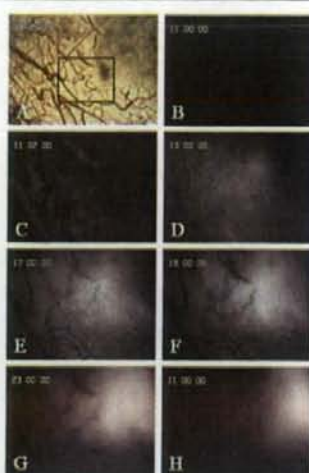
図D-9 微小腫瘍、および腫瘍と正常組織間インターフェイスにおけるFITCアルブミンの動態。A, 生体観察像。Tは径約500 μ mの微小腫瘍。Bar, 200 μ m; B, FITCアルブミン投与直前。Bar, 200 μ m; C, 投与1時間後; D, 5時間後; E, 7時間後; F, 10時間後。

FITCアルブミンの腫瘍内動態に及ぼすAC7700の効果

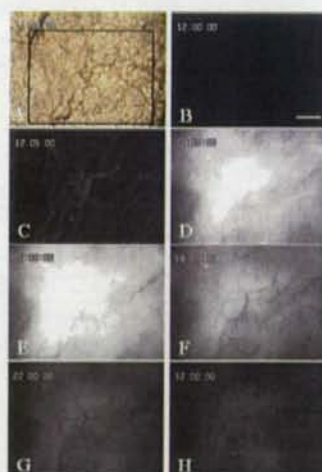
図D-10は、FITCアルブミンを静脈内投与する24時間前にAC7700が静脈内投与された腫瘍におけるFITCアルブミンの動態である。AC7700により、組織の一部に壊死が誘導されている(図4A右上の変色部分)。FITCアルブミンはこの壊死領域に移行蓄積し、投与24時間後もなおそこに留まっていた。

FITCアルブミンの腫瘍内動態に及ぼす放射線の効果

図D-11は、透明窓内の腫瘍に10Gy照射を行い、3日後に静脈内投与されたFITCアルブミンの腫瘍内動態の典型例である。

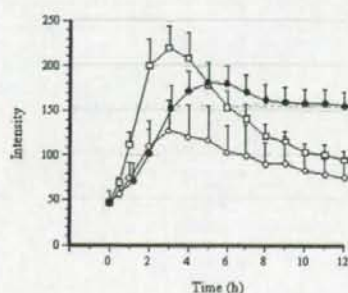


図D-10 FITCアルブミンの腫瘍内動態へのAC7700前投与の効果。A, 生体観察像, 右上の変色部分が壊死領域。黒枠, 蛍光観測領域; B, FITCアルブミン投与直前; C, 投与2分後; D, 1時間後; E, 6時間後; F, 8時間後; G, 12時間後; H, 24時間後



図D-11 FITCアルブミンの腫瘍内動態への10Gy照射の効果。A, 生体観察像, 蛍光観測領域; B, FITCアルブミン投与直前, Bar, 100 μ m; C, 5分後; D, 2時間後; E, 3時間後; F, 6時間後; G, 10時間後; H, 24時間後

放射線照射により、腫瘍血管のFITCアルブミンに対する透過性は著しく亢進した。照射3日後は、癌細胞が著しく変性する時期である。しかし、その時期の腫瘍血管の循環機能はむしろ活発になった。血管外移行したFITCアルブミンは変性部位に蓄積せず、腫瘍組織から除々にウオッシュアウトされた。



図D-12 AC7700, 放射線照射によるFITCアルブミンの腫瘍組織内動態の変化。(○) 無処置 (n = 18); (●) FITCアルブミン投与3日前にAC7700 (10 mg/kg) を静脈内投与 (n = 10); (△) FITCアルブミン投与3日前に10Gy照射 (n = 10)

図D-12は、AC7700投与後、および照射後におけるFITCアルブミンの腫瘍組織内蛍光強度の経時的変化を、無処置の微小腫瘍のそれと比較した結果である。

照射を受けた腫瘍では、FITCアルブミンの血管外移行は、無処置の腫瘍と比べて、著しく亢進した ($P < 0.0001$)。しかし、組織からのウオッシュアウトも10.0 \pm 2.1時間 (n = 17) から5.2 \pm 0.4時間 (n = 10) へと有意に速くなり ($P < 0.0001$)、FITCアルブミンは腫瘍組織には停留しなかった。AC7700処置の場合も、生き残った腫瘍血管からのFITCアルブミンの血管外移行は、無処置の場合の血管外移行と比べ、著しく亢進していた ($P < 0.0001$)。しかし、放射線照射の場合とは異なり、FITCアルブミンのウオッシュアウトは著しく遅くなり、12時間経過後も腫瘍組織内に高い濃度が維持されていた。

(9) 臨床に近い動物モデルによる解析

NK012投与後の腫瘍集積性の評価

NK012は、SN-38がポリエチレングリコール (PEG) とポリグルタミン酸の両親媒性のブロックコポリマーのポリグルタミン酸鎖にエステル結合され、その後ミセル可溶化した製剤で平均粒径は20nmである。SN-38とブロックコポリマーの結合は酵素非依存的に加水分解される。よってNK012は、患者間の酵素活性の差に影響されることがなく安定した薬効を示すことが期待できる。NK012もしくはCPT-11の静脈投与1・24・96時間後の胃原発巣・腹膜転移巣を抽出し、それぞれの自家蛍光を観察したところ、CPT-11投与群では投与1時間後に腫瘍に集積するものの、24・96時間後にはほぼ消失していたが、NK012投与群では72時間後でも腫瘍集積が確認された。(図E-1, E-2)

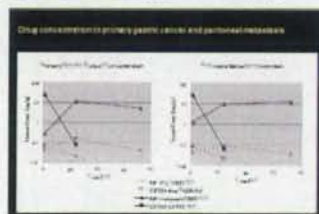


図E-1 NK012とCPT-11投与後の胃原発巣における腫瘍集積性の比較



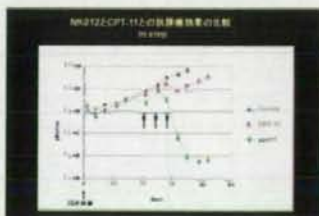
図E-2 NK012とCPT-11投与後の腹膜播種巣における腫瘍集積性の比較

次にNK012とCPT-11を胃癌同所移植腹膜播種マウスに静脈投与し、1・24・96時間後の胃原発巣・腹膜転移巣を抽出し、HPLCにてfree SN-38、polymer結合型SN-38とCPT-11の組織内同度を測定したところ、投与1時間後の胃原発巣・腹膜播種巣のNK012濃度はCPT-11濃度のそれぞれ約1/100、約1/30であるが、24時間後には胃原発巣および腹膜播種巣のいずれでもSN-38高分子ミセルはCPT-11の約100倍の濃度であった。NK012、CPT-11それぞれにおいて胃原発巣と腹膜転移巣への集積性を比較するとほぼ同程度の腫瘍AUCであった。また胃原発巣および腹膜転移巣におけるfree SN-38濃度は、NK012投与群においては72時間後まで高濃度を保っていたのに対し、CPT-11投与群では24時間後にはNK012投与群を著明に下回り、72時間後には測定不能であった(図D-3)。



図D-3 NK012とCPT-11投与後の胃原発巣・腹膜播種巣での薬物濃度の比較

NK012投与後の抗腫瘍効果の比較: SN-38高分子ミセル投与群はCPT-11投与群に比して著明な抗腫瘍効果が得られた(図D-5)



図D-4 NK012とCPT-11投与後の抗腫瘍効果の比較

D. 考察

(1) カンプトテシン封入高分子ミセルの作製

- ・ 多種類の疎水性基を高率で導入することが可能になり、カンプトテシン封入最適な高分子構造が得られた。
- ・ 高分子ミセルへの薬物封入の溶媒の効果が極めて大きいことがわかった。一つの仮定として、溶媒蒸発時の薬物分子の結晶化の大小が封入の正否に関連していると予想される。この点での更なる発展が望まれる。

(2) ビオチン修飾ブロックコポリマーの合成

- ・ 従来の合成法に比べてアビジンに認識されやすい設計の高分子ミセルを作製した。これを利用して、分担研究者によるがん組織内、血管内の高分子ミセルの分布を精密に追跡することが可能となった。

(3) レチノイドの高分子ミセルへの封入

- ・ レチノイン酸、4-HPR, Am80など新しい機能のがんの化学療法剤として有望なレチノイドを高分子ミセルに封入して固形がんへのターゲティングに成功した。従来の細胞障害性の抗がん剤と比べると動物がん移植モデルでは活性が低く出てしまうので、従来の抗がん剤との組み合わせ、あるいはがん細胞の分化誘導が大きな影響をもつがんモデルでの検討が望まれる。
- ・ 合成レチノイド処理によるがん細胞に対する選択的な細胞死誘導のメカニズムには細胞周期停止が関与し、合成レチノイドによるがん分化誘導療法は副作用の少ない治療法になりえると考えられる。またAm80の高分子ミセルへの封入により腹腔内から血中への移行が抑制され、腹腔内への滞留またはリンパ節への移行によりがん細胞の

腹膜播種モデルマウスにおいて、がん細胞の増殖抑制ならびに生存期間の延長が認められた。

(4) MRI造影剤用高分子の合成とT1緩和能測定

- ・ 対イオンのポリマーを相互作用させることで、T1緩和能が変化し得る高分子ミセルMRI造影剤は、ブロックコポリマーの組成と対となるポリマーの組成を変化させることで、その緩和能と高分子ミセル形成について系統的に理解することができた。
- ・ 中でも、イオン相互作用と疎水性の関係を新たに見だし、これらの性質を十分に活かすことが緩和能の変化を大きくするために必要で有ることがわかった。この点を重点的に検討することで、今後もっと大きな緩和能変化を生み出す組成を発見して行くことが望まれる。また、対イオンを最適化することで、かなり安定な血中循環がえられることがわかった。
- ・ 一方、アニオン性ブロックコポリマー単独で高分子ミセルを形成するMRI造影剤はよい血中滞留性を示し、24時間後において腫瘍への高分子ミセルの集積性とMRIの腫瘍における画像強度がそれぞれ最大となることが確認された。この挙動は合成高分子の精密な組成の制御に基づいて得られた結果である。造影剤のがんターゲティングを極めて効果的に達成し、マウスがんの画像コントラストを顕著に高めることを実証した。また、高分子ミセル抗がん剤と同一の体内分布・動態を示すことから、高分子ミセルによる化学療法の効果を予測し得るシステムとして高分子ミセルMRI造影剤が活用されることが明らかとなった。

- ・また、AC7700による高分子ミセルターゲットティングの増強効果を、MRIで検証できることがわかった。このことは、ウインドウチャンパー法、病理的解析などの基礎医学の手法と合わせることで、腫瘍血管の透過性という基礎医学での貢献をし得ることを意味する。
- ・DCE-MRIを用いて、TGF- β 阻害剤A-83-01による腫瘍血管透過性の変化を評価した。A-83-01の繰り返し処置によって、腫瘍内血液量の増加と血管透過性の亢進が見られ、特にGd-Lの移行性を増加した。また、腫瘍血管の形態が正常血管に近づき、ペリサイトの新生が見られたことや、血管周辺で増殖期にある細胞数が増加したことから、血流の回復が示唆された。A-83-01処置によるADCの低下は、血流の回復によって腫瘍中の細胞外液が回収されたためと考えられ、その結果腫瘍間質圧が低下したことが微粒子の腫瘍移行性を高めた理由と推察される。以上のことから、A-83-01は血液送達能力の低い腫瘍新生血管を正常な血管の形態に近づけ、血流を回復させたことにより造影剤の移行性を増加することが示唆された。特にGd-Lの腫瘍移行性は著しく増大し、A-83-01処置は微粒子の腫瘍集積性を改善できると考えられる。

(5) 腫瘍血管破断薬AC7700と 高分子ミセルの併用効果

両者の併用によって、格段に副作用が増強することはない事がわかったので、投与スケジュールの最適化によって、ターゲットティング効果及び抗がん活性の増強が期待される。また、分担研究者(堀)のウインドウチャンパー法による解析およびMRIによる観察においても両派の併用

効果が実証された。以上より、併用によるターゲットティング療法という新たな方法論の確立に向けて、詳細な活性評価、毒性評価が今後なされることが望まれる。

(6) 葉酸結合高分子ミセル

- ・葉酸の結合により、高分子ミセルにアクティブターゲットティング能を付与できることがわかったが、その効果はEPR効果に基づくパッシブターゲットティングを大きく超えるものではなかった。

(7) ラットによる生体毒性評価

- ・高分子ミセルの投与によって、体重変化・臓器重量変化は観察されず、病理学的な病態は観察されなかった。但し、脾臓や肝臓などMPS経の臓器で比較しけいたかい濃度のミセル集積が観察された。この結果から、MPSの刺激などの影響が、高分子ミセルのキャリアー毒性を把握する重要な側面であると推察された。

(8) ラット腫瘍のウインドウチャンパーモデルによる解析

- ・高分子ミセルは、血中半減期は約10時間と長く、その間、正常組織にはほとんど移行しないため、抗癌剤や診断薬を腫瘍選択的に到達させることが可能である。また、全身血圧に影響を与えず、微小循環を擾乱することもないため、薬剤のキャリアーとしての安全性も高いと思われる。
- ・本研究で開発した新しい実験システムを用いて、新規高分子ミセルの組織への移行性と組織内分布の観察と計測を行った。高分子ミセルは正常血管、および初期増殖巣における新生したばかりの腫瘍血管からは漏れにくく、結果として、

・ミセルはそれらの血管が支配する組織にはほとんど蓄積しなかった。高分子ミセルの血管外移行は、正常と腫瘍間のインターフェイス、および腫瘍組織と壊死との間のインターフェイスで顕著であった。

このように異質の組織のつなぎ目で高分子が漏れ易い問題については、そこにある血管の形態と機能をさらに詳細に研究する必要がある。

高分子ミセルが初期の腫瘍血管から漏れにくいという所見は、全身に撒布された微小増殖巣をも治療の対象とする時に隘路となる。全身療法を成立させるためには、この微小増殖巣にも高分子ミセルを多量に送達させ、そこに長時間停留させる必要がある。

・上記の問題を解決するために、腫瘍血管破断剤の使用が有効であると考えられた。本研究で、AC7700を用いて腫瘍の一部を変性させると、そこに高分子ミセルが蓄積してくることを明らかにした。最初は腫瘍内の分布に偏りが見られるが、時間の経過と共に腫瘍内の組織内濃度が均質になってきた。これは、変性領域に蓄積した高分子ミセルが、間質液流に乗って、徐放性にviableな組織に移行することによると考えられた。これはAC7700の前投与で、微小腫瘍にもEPR効果を起こすことができることを示している。一方、ナノ粒子投与3日前に10Gy照射を行った場合には、それらナノ粒子に対する腫瘍血管の透過性は著しく亢進したものの、ナノ粒子は腫瘍組織に留まらず、徐々にウオッシュアウトされた。10Gy照射3日後には、腫瘍内の広範囲で変性した癌細胞が観察された。

しかし、ナノ粒子がそこに留まらなかったという事実は、ナノ粒子に対する腫瘍血管の透過性亢進と、腫瘍変性領域へのナノ粒子の蓄積とが、必ずしも連動した現象ではないことを示している。我々は、別の研究で、放射線照射3日後に腫瘍血流の増量が最大となり、組織液の流れを含む循環状態の改善が著明になることを示した。放射線照射後に、ナノ粒子が腫瘍内に留まらず、ウオッシュアウトされる理由は、この循環改善が寄与している可能性が高い。

以上の結果は、腫瘍血管の透過性亢進と腫瘍組織の変性は、EPR効果が起きるための必要条件ではあるが、十分条件ではないことを示している。我々は、EPR効果が起きるための必要十分条件は、腫瘍血管の透過性亢進は無論、腫瘍内に変性した組織が存在しており、しかもその変性組織の循環が破綻していることと考察した。

(9) 臨床に近い動物モデルによる解析
胃癌同所移植腹膜播種マウスモデルにおいて、NK012はCPT-11に比し、胃原発巣および腹膜播種巣において長時間腫瘍内に集積し、より高濃度のSN-38を放出することが確認された。また薬剤集積性の向上に伴ってSN-38高分子ミセル投与群の方がCPT-11投与群に比し抗腫瘍効果もすぐれていた。SN-38は時間依存型の抗腫瘍活性を有することから、高分子ミセル化することによりSN-38を直接体内に投与できるメリットのみならず、腫瘍における薬剤の集積性が向上し曝露時間が延長することで、優れた抗腫瘍効果を示すことができたものと考えられる。

F. 結論

種々の薬物やMRI造影剤成分を高分子ミセルに安定に封入するための高分子設計、封入法について大きな進展を得た。これは、学術的な価値と共に、臨床製剤の開発過程にも大きな寄与をなし得る。

また、高分子ミセルMRI造影剤によって微小がんの精密な描写が可能となると共に、MRI画像診断と抗がん剤ターゲティング療法を組み合わせたがん医療の可能性が実験的に提示されたことは、本研究の最も重要な目的が果たされたと言える。

さらに、レチノイドを新規なタイプの抗がん剤として固形がんへ適用したり、AC7700とい選択的腫瘍血管破断薬を組み合わせることで診断及び治療での高分子ミセルの到達効率を増加させる新しい組み合わせ療法が提示されたことは大きな意義がある。

G. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masato Watanabe, Kumi Kawano, Masayuki Yokoyama, Praneet Opanasopit, Teruo Okano, and Yoshie Maitani, Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability, *International J. of Pharmaceutics*, 308, 183-189 (2006)
- 2) Kumi Kawano, Masato Watanabe, Tatsuhiro Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Praneet Opanasopit, Teruo Okano, and Yoshie Maitani, Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles, *J. Controlled Release*, 112, 329- 332 (2006)
- 3) Y. Murakami, M. Yokoyama, T. Okano, H. Nishida, Y. Tomizawa, M. Endo and H. Kurosawa, A novel synthetic tissue-adhesive hydrogel using a crosslinkable polymeric micelle, *Journal of Biomedical Materials Research: 80 A*, 421- 427 (2007)
- 4) Emiko Nakamura, Kimiko Makino, Teruo Okano, Tatsuhiro Yamamoto, and Masayuki Yokoyama A polymeric micelle MRI contrast agent with changeable relaxivity, *J. Controlled Release*, 114 (3), 325- 333 (2006)
- 5) Masamichi Nakayama, Teruo Okano, Takanari Miyazaki, Fukashi Kohori, Kiyotaka Sakai, and Masayuki Yokoyama Molecular design of biodegradable polymeric micelles for temperature-responsive drug release, *J. Controlled Release*, 115, 46- 56 (2006)
- 6) Masayuki Yokoyama, "Polymeric Micelle Drug Carriers for Tumor", *Polymeric Drug Delivery I, Particulate Drug Carriers*, 2006, American Chemical Society, 27-39 (2006)
- 7) 横山昌幸, 「DDSとナノテクノロジー」, ウィルスをを用いない遺伝子導入法の材料、技術、方法論の新たな展開, (株)メディカルドゥ、173-177 (2006)
- 8) 横山昌幸, "ドラッグデリバリーシステム (ターゲティング、安定化)", 再生医療の基礎シリーズ5-生医学と工学の接点-, 再生医療のためのバイオマテリアル, コロナ社 179-203 (2006)
- 9) 横山昌幸, DDS (ドラッグデリバリーシステム), 材料の科学と工学 (日本材料学会誌)、43(4), 168-172 (2006)
- 10) Masayuki Yokoyama, Chapter 10: Thermoresponsive polymer assemblies for tumor targeting, in K. Kono ed., *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*, MML Series, volume 8, Kentus Books, pp. 363- 393 (2006)
- 11) 横山昌幸, DDSに用いられるナノサイズのキャリア、*Drug Delivery System*, 21(6), 615-622 (2006)
- 12) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Intracellular delivery of proteins in complexes with oligoarginine γ -modified liposomes and the effect of oligoarginine length, *Bioconjugate Chemistry*, 17: 935-942 (2006)
- 13) Y. Hiruta, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Obata, Y. Maitani, Novel ultra-deformable vesicles entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin, *J. Control. Release*, 113: 146-154 (2006)

- 14) Y. Hattori, M. Sakaguchi and Y. Maitani Folate-linked lipid-based nanoparticles deliver a NF- κ B decoy into activated murine macrophage-like RAW264.7 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 1516-1520 (2006)
- 15) Y. Hattori and Y. Maitani Two-step transcriptional amplification-lipid-based nanoparticles using PSMA or midkine promoter for suicide gene therapy in prostate cancer. *Cancer Science*. 97: 787-798 (2006)
- 16) S. Igarashi, Y. Hattori, Y. Maitani, Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome. *J. Control. Release.*, 112: 362-368 (2006)
- 17) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Design, synthesis and gene delivery efficiency of novel oligo-arginine linked PEG-lipids: effect of oligo-arginine length. *Int. J. Pharm.*, 316(1-2): 109-116 (2006)
- 18) Fumiaki Koizumi, Masayuki Kitagawa, Takahito Negishi, Takeshi Onda, Shin-ichi Matsumoto, Tetsuya Hamaguchi, and Yasuhiro Matsumura, Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors, *Cancer Research*, 66, 10048-10056 (2006)
- 19) Kawakami, S. Suzuki, F. Yamashita, M. Hashida: Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes, *Journal of Controlled Release*, 110 (3), 514-521 (2006)
- 20) N. Chansri, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida: Inhibition of liver metastasis by all-trans retinoic acid incorporated in O/W emulsions in mice, *International Journal of Pharmaceutics*, 321 (1-2), 42-49 (2006).
- 21) W. Yeeprae, S. Kawakami, S. Suzuki, F. Yamashita, M. Hashida: Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of cationic liposomes, *Pharmazie*, 61 (2) 102-105 (2006).
- 22) S. Suzuki, S. Kawakami, N. Chansri, F. Yamashita, M. Hashida: Inhibition of pulmonary metastasis in mice by all-trans retinoic acid incorporated in cationic liposomes, *Journal of Controlled Release*, 116 (1), 58-63 (2006).

- 23) Tatsuhiro Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Praneet Opanasopit, Akihiro Hayama, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, What are determining factors for stable drug incorporation into polymeric micelle carriers? Consideration on physical and chemical characters of the micelle inner core, *J. Controlled Release*, 123, 11-18 (2007)
- 24) M. Nakayama, J.E. Chung, T. Miyazaki, M. Yokoyama, K. Sakai, and T. Okano, Thermal modulation of intracellular drug distribution using thermoresponsive polymeric micelles, *Reactive & Functional Polymers*, 67, 1398-1407 (2007)
- 25) 横山昌幸 月刊 マテリアルインテグレーション 20 (9) 38-43 TIC (株)、特集 バイオ関連材料と技術の最近の話題、DDS (ドラッグデリバリーシステム)
- 26) 横山昌幸 製剤と機械 第332号 製剤技術 2-4 (2007.4.15) 高分子ミセルの薬物キャリアーシステムとしての可能性 (1)
- 27) 横山昌幸 製剤と機械 第333号 製剤技術 2-4 (2007.5.15) 高分子ミセルの薬物キャリアーシステムとしての可能性 (2)
- 28) 横山昌幸 炎症と免疫 16 (1) 21-26、高分子ミセルターゲティング、特集 I 先端医療を切り拓くナノメディシン株式会社 先端医学社
- 29) 横山昌幸 映像情報 Medical 39 (4)、398-404 (2007) 特集 I 分子イメージング: MRIからのアプローチ「薬物ターゲティングとMRI造影剤」
- 30) Masayuki Yokoyama, American Scientific Publishers, 63-72 (2007) Nanoparticles for Pharmaceutical Applications, Chapter 2 "Polymeric Micelles as Nanosized Drug Carrier Systems"
- 31) Kawaguchi et al., Demonstration and identification of aberrant MUC1 bearing Tn antigen in rat ascites hepatoma AH109A cells with strong lymph node metastasis propensity, *Cancer Metastases Research*, F. Columbus ed., Nova Science Publisher, NY, 2008, in press
- 32) Shio Y., Kawaguchi, T., et al., Carbohydrate status detecting by PNA is changeable through cancer prognosis from primary to metastatic nodal site: A possible prognostic factor in patient with node-positive lung adenocarcinoma, *Lung Cancer*, 57, 187-192 (2007)
- 33) M. Fukushima, Y. Hattori, H. Tsukada, K. Koga, E. Kajiwara, K. Kawano, T. Kobayashi, K. Kamata, Y. Maitani. Adiponectin gene therapy of streptozotocin-induced diabetic mice using hydrodynamic injection. *J. Gene Med.*, 9: 976-985 (2007)
- 34) Y. Hattori, Y. Maitani. Low-molecular-weight polyethylenimine enhanced gene transfer by cationic cholesterol-based nanoparticle vector, *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 1773-1778 (2007)
- 35) Y. Maitani, S. Igarashi, M. Sato, Y. Hattori. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression, *Int. J. Pharm.*, 342: 33-39 (2007)

- 36) E. Kajiwara, K. Kawano, Y. Hattori, M. Fukushima, K. Hayashi, Y. Maitani. Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy, *J. Control. Release*, 120: 104-110 (2007)
- 37) Y. Hattori, M. Fukushima and Y. Maitani. Non-viral delivery of connexin 43 gene with histone deacetylase inhibitor to human nasopharyngeal tumor cells enhances gene expression and inhibits in vivo tumor growth, *Int. J. Oncol.*, 30: 1427-1439 (2007)
- 38) Y. Zhang, X.R. Qi, Y. Gao, L. Wei, Y. Maitani, T. Nagai. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J. Control. Release*, 117: 281-290 (2007)
- 39) Y. Hattori and Y. Maitani, DNA/lipid complex incorporated with fibronectin to cell adhesion enhances transfection efficiency in prostate cancer cells and xenografts. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 603-607 (2007)
- 40) M. Fukushima, Y. Hattori, T. Yoshizawa, Y. Maitani. Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice. *International Journal of Oncology*. 30:225-231 (2007)
- 41) T. Terada, M. Mizobata, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida: Optimization of tumor-selective targeting by basic fibroblast growth factor-binding peptide grafted PEGylated liposomes, *Journal of Controlled Release*, 119(3) 262-270 (2007)
- 42) Y. Lu, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida: Development of antigen presenting cells-targeted DNA vaccine against melanoma by mannosylated liposomes, *Bio materials*, 28(21) 3255-3262 (2007)
- 43) Hamaguchi T, Kato K, Yasui H, Morizane C, Ikeda M, Ueno H, Muro K, Yamada Y, Okusaka T, Shirao K, Shimada Y, Nakahama H, Matsumura Y.; A Phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation. *Br J Cancer*. 97, 170-176, 2007
- 44) Minami H, Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Suzuki K, Kaniwa N, Sawada J, Hamaguchi T, Yamamoto N, Shirao K, Yamada Y, Ohmatsu H, Kubota K, Yoshida T, Ohtsu A, Saijo N.; Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: role of UGT1A1*6 and *28. *17. 497-504*, 2007
- 45) Narin Chansri, Shigeru Kawakami, Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro Yamamoto, Pensri Charoensit, and Mitsuru Hashida, Anti-tumor Effect of All-Trans Retinoic Acid Loaded Polymeric Micelles in Solid Tumor Bearing Mice, *Pharmaceutical Research*, 25, 428-434 (2008)

- 46) 横山昌幸、高分子ミセルを用いた
ナノメディン、宇理須恒雄編「ナノ
メディン：ナノテクの医療応用」
オーム社、102-118、2008
- 47) Akihiro Hayama, Tatsuhiro Yamam
oto, Masayuki Yokoyama, Kumi Kaw
ano, Yoshiyuki Hattori, Yoshie M
aitani, Polymeric micelles modif
ied by folate-PEG-lipid for targ
eted drug delivery to cancer cel
ls in vitro, *J. Nanoscience and
Nanotechnology*, **8**, 3085-3090 (20
08)
- 48) Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawakam
i, Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro
Yamamoto, Fumiyo Yamashita, a
nd Mitsuru Hashida, Block copoly
mer design for stable encapsulat
ion of N-(4-hydroxyphenyl)retina
mide into polymeric micelles in
mice, *International J. of Pharma
ceutics (Note)*, **357**, 318-322 (2
008)
- 49) Yoshihiko Murakami, Masayuki Yo
koyama, Hiroshi Nishida, Yasuko,
Tomizawa and Hiromi Kurosawa, A
simple hemostasis model for the
quantitative evaluation of hydr
ogel-based local hemostatic biom
aterials on tissue surface,
*Colloids and Surfaces B: Bioint
erfaces*, **65**, 186-189 (2008)
- 50) Hiroyuki Koide, Tomohiro Asai, K
entaro Hatanaka, Takeo Urakami,
Takayuki Ishii, Eriya Kenjo, Mas
amichi Nishihara, Masayuki Yokoy
ama, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi K
iwada, and Naoto Oku, Particle si
ze-dependent triggering of accel
erated blood clearance phenomeno
n,
*International Journal of Pharmac
eutics*, **362**, 197- 200 (2008)
- 51) Masamichi Nishihara, Yoshihiko
Murakami, Takashi Shinoda, Jun Y
amamoto, Masayuki Yokoyama,
Synthesis and Characterization of
A Temperature-responsive Amphiph
ilic Block Copolymer Containing a
Liquid Crystalline Unit,
Chemistry Letters, **37 (12)** 1214-
1215 (2008)
- 52) T. Inoue, Y. Yamashita, M. Nis
hihara, S. Sugiyama, Y. Sonoda,
T. Kumabe, M. Yokoyama, T. Tomina
ga, Therapeutic efficacy of a pol
ymeric micellar doxorubicin infus
ed by convection-enhanced deliver
y against intracranial 9L brain t
umor models, *Neuro-Oncology*, **in
press**.
- 53) Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawaka
mi, Yuriko Higuchi, Taku Satoh, Y
oshimi Oka, Masayuki Yokoyama, an
d Mitsuru Hashida, Enhanced antit
umor activity of N-(4-hydroxyphen
yl)retinamide by polymeric micelle
s following intravenous injection
into tumor-bearing mice, *Cancer
Science*, **in press**.
- 54) Kouichi Shiraishi, Kumi Kawano;
Takuya Minowa, Yoshie Maitani,
and Masayuki Yokoyama, Preparat
ion and in vivo imaging of PEG -
poly(L-lysine)-based polymeric
micelle, MRI contrast agents, *Jo
urnal of Controlled Release*, **in
press**
- 55) Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawaka
mi, Yuriko Higuchi, Taku Satoh,
Yoshimi Oka, Masayuki Yokoyam
a, Fumiyo Yamashita, and Mit
suru Hashida, Enhanced in vivo
antitumor efficacy of fenretini
de encapsulated in polymeric mi
celles,
*International Journal of Pharma
ceutics*, **in press**

- 56) Yoshihiko Murakami, Masayuki Yokoyama, Hiroshi Nishida, Yasuko, Tomizawa and Hiromi Kurosawa, In Vivo and In Vitro Evaluation of Gelation and Hemostatic Properties of a Novel Tissue-Adhesive Hydrogel Containing a Crosslinkable Polymeric Micelle, *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*, **in press**
- 57) Takanori Kawaguchi, Takashi Honda, Masamichi Nishihara, Tatsuhiro Yamamoto, and Masayuki Yokoyama, Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats, *Journal of Controlled Release*, **in press**
- 58) Taku Satoh, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida, Hiroyuki Kagechika, Koichi Shudo, Masayuki Yokoyama, Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids' release control, *Journal of Controlled Release*, **in press**
- 59) 横山昌幸
高分子ミセルターゲティング、炎症と免疫、**16 (1)** 21-26 (2008)
- 60) 白石貢一、横山昌幸、ターゲティングを用いたMRI造影剤、特集 分子イメージングとDDS、*Drug Delivery System* **23(1)** 33-39 (2008)
- 61) 横山昌幸、白石貢一
分子イメージングのためのナノ材料、秋吉一成、岸田晶夫監修、「次世代医療のための高分子材料工学」シーエムシー出版、276-286 (2008)
- 62) 横山昌幸
高分子ミセル、岡田弘監監修、「機能性DDSキャリアの製剤設計」シーエムシー出版、42-54 (2008)
- 63) 横山昌幸
薬物キャリアに用いられる高分子材料、特集 DDSに利用される高分子化学、*Drug Delivery System* **23 (6)** 610-617 (2008)
- 64) Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Kaniwa N, Kamatani N, Shirao K, Yamamoto N, Hamaguchi T, Kunitoh H, Ohe Y, Tamura T, Yamada Y, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Sawada J.; Impact of CYP3A4 haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer Patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, **in press**
- 65) T. Okuda, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, F. Yamashita, M. Hashida: Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide into polymeric micelles in mice, *International Journal of Pharmaceutics*, **in press** (2008)
- 66) Y. Kuramoto, S. Kawakami, S. Zou, K. Fukuda, F. Yamashita, M. Hashida: Efficient peritoneal dissemination treatment by immunostimulatory phosphorothioate-type CpG DNA/cationic liposome complex in mice, *Journal of Controlled Release*, **126(3)**, 274-280 (2008)
- 67) W. Wijagkanalan, S. Kawakami, M. T. akenaga, R. Igarashi, F. Yamashita, M. Hashida: Efficient targeting to alveolar macrophages by intratracheal administration of mannosylated liposomes in rats, *Journal of Controlled Release*, **125(2)**, 121-130 (2008)
- 68) M. Furuhata, R. Danev, K. Nagayama, Y. Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani. Decaarginine-PEG-artificial lipid/DNA complex for gene delivery: nanostructure and transfection efficiency, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **8:1-8** (2008)
- 69) N. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Maitani, T. Yamauchi, K. Higashiyama, T. Ohba, p-Dodecylaminophenol derived from the synthetic retinoid, fenretinide: Antitumor efficacy in vitro and in vivo against human prostate cancer and mechanism of action. *Int. J. Cancer*, **122: 689-698** (2008)