PEG 修飾化リポソームの展開

岩手医科大学 薬学部*

杉山育美*・佐塚泰之*

The development of PEGylated liposomes

Liposome is known as one of drug delivery system carriers. The most important factor of liposome for exerting a targeting effect is to have long circulation time in blood stream. For avoiding liposomes from immune system, it is generally used poly(ethylene glycol) (PEG)-lipid which makes aqueous layer around liposomal membrane. In this review, it was summarized our study on some characters of liposome with unique PEG modification, it is focused the relation between fixed aqueous layer thickness (FALT) around liposome and antitumor effect by changing molecular weight of PEG or combination various PEGs.

薬効の持続化や薬物への効率的な送達を可能とする DDS 技術の 1 つに、薬物キャリアであるリポソームによるものがある。リポソームがターゲティング製剤として効果を発揮するためには、生体内にて異物として認識されることなく血中を滞留することが重要な因子であり、そのためにリポソームの膜表面に水和層を形成することが可能な PEG 脂質が一般的に用いられている。本稿では異なる PEG 脂質を組み合わせることにより変化するリポソーム膜表面の水和層の厚さと抗腫瘍効果の関係に焦点をあて、PEG 修飾により得られる DDS キャリアとしてのリポソームのさまざまな特性に関する筆者らの研究を示すとともに、このストラテジーに基づいて合成した新規 PEG 脂質を紹介する。

Ikumi Sugiyama*, Yasuyuki Sadzuka*

Keywords: Liposome, PEGylation, Fixed aqueous layer thickness, antitumor

1. はじめに

現在、さまざまな医薬品において Drug Delivery System (DDS) 技術が利用されており、薬効の持続化や薬物の標的部位への効率的な送達を可能としている。DDS 技術研究の目的は、がん細胞に対する効率のよい薬効発現や正常細胞に対する副作用の軽減のみならず、1 日の投与回数を減少させることによる生活の質 (Quality of Life : QOL) の向上や、微量で強い効果を有する薬物の薬効の発現コントロールなどがある。DDS 技術のなかで特にターゲティングに焦点をあてた場合、薬物キャリア、分子標的薬、高分子複合体、プロドラッグなどさまざまな戦略が用いられている。

薬物キャリアの 1 つであるリポソームは、リン脂質の 2 分子膜よりなる水層を持つ閉鎖小胞であり、1965 年に Bangham らによって発見された¹⁾。以来、DDS への応用検討がなされ、1970 年に Sessa と Weissmann により DDS キャリアとしての可能性が示された²⁾。リポソームは、化学的な修飾が可能であること、物理学的性質をコントロールしやすいこと、脂溶性・水溶性薬物のいずれも内封可能であることなどのメリットにより、さまざまな疾患の治療への応用、標的部位への送達および薬効の増大が期待されてきた。しかしながら、両親媒性のリン脂質を主な構成脂質とするリポソームは、生体内に投与した場合、異物として認識され肝臓や脾臓などの細網内皮系 (reticuloendothelial system : RES) 組織に捕捉され、速やかに血中より消失する^{3~6)} ことによりキャリアとしての有用性を損なう。長期にわたる

* School of Pharmacy, Iwate Medical University

血中滞留性は、リポソームがターゲティング製剤として効果を発揮するために最も重要な因子であるといっても過言ではない。そこで、リポソームの血中滞留性の増大を目的にリポソーム膜表面に修飾されたのが、生体適合性に優れているポリエチレングリコール(PEG)である^{7,8)}。

マウスに PEG 未修飾リポソームを投与した場合、速やかに血中より消失し、投与5時間後にはその多くが RES 組織に分布した。一方、PEG 修飾リポソームを投与した場合には1時間後では85%が血中に存在し、RES 組織に分布した量はわずかであった⁷⁾。投与5時間後でも約50%のリポソームが血中に存在していたことより、PEG でリポソーム膜表面を覆うことは血中滞留性の増大を可能とすることが証明された。現在では、リポソーム製剤の開発において PEG を用いることは最も基本的な戦略とされている。

本稿では、PEG 修飾により得られる DDS キャリアとしてのリポソームのさまざまな特性に関する筆者らの研究を示すとともに、この戦略に基づいて合成した新規 PEG 脂質を紹介する。

2. PEG 分子量と FALT

リポソームの PEG 修飾による血中滞留性の増大は、PEG が水分子を抱き込むことによりリポソーム膜表面に水の層が形成されること、すなわちリポソームのステルス化によるものである。筆者らはリポソーム膜表面に形成された水層の厚さが厚いほど血中滞留性を増大できるものと考え、表面固定水層の厚さ(Fixed Aqueous Layer Thickness: FALT)を数値化する方法を確立した⁸⁾。本法はコロイド粒子が持つ表面電荷、すなわちゼータ電位の測定により得られ、非常に簡便な方法で FALT を求めることができる。ゼータ電位を異なる塩濃度の緩衝液中で測定し、測定溶液中の電解質濃度より求めた Debye-Hückel parameter κ (1/nm) に対して $\ln |\psi(L)|$ をプロットすれば、得られた直線の傾き L はすべり面の位置を示すことになり、FALT を nm 単位で求めることができる。このことは、Poisson-Boltzmann の式に基づく電位分布の模式図におい

て、膜表面から距離 L に存在するすべり面における電位ゼータは、FALT が一定ならば溶液の電解質濃度が上昇するとともに減少することからも示される。これまで、リポソームの物性は粒子径とゼータ電位で示されてきたが、PEG 修飾化の効果をこれらのパラメーターでは規定できなかった。FALT は、この PEG 修飾の効果を数値化できる数少ない物性データであるといえる。

高分子化合物である PEG にはさまざまな分子量のものが存在する。抗腫瘍剤ドキソルビシン(DOX)を内封した PEG 未修飾リポソーム(PLDOX)の FALT は 0.34 ± 0.05 nm であり⁹⁾、これは水の層がほとんど形成されていない疎水コロイドであることを示している。このリポソームに分子量が340、500、900および2000の PEG を修飾した際の PEG 修飾率は900以下では90%以上、2000では46.4%となり、2000以上の分子量ではその修飾率が半減した。その一方、各 PEG で修飾したリポソームの FALT の値はそれぞれ 0.94 ± 0.03 nm、 1.00 ± 0.01 nm、 2.10 ± 0.02 nm および 2.52 ± 0.03 nm となり⁹⁾、リポソーム膜表面に修飾する PEG 分子量が大きくなるにともない、FALT も増大することが明らかとなった。しかしながら、PEG 分子量の増加率に比較すると FALT の増大はわずかであった。

リポソーム表面に修飾されている PEG の形態は、マッシュルーム構造およびブラッシュ構造の少なくとも2種類に分類することができる¹⁰⁾。分子量が大きい PEG はマッシュルーム構造をとりやすい一方で、低分子量の PEG は直鎖のブラッシュ構造を示すことが X 線回折法にて Needham と Kenworthy により報告されている^{11,12)}。すべてブラッシュ構造をとった場合、分子量500および2000の理論上の鎖長はそれぞれ4.18 nm、16.72 nm となる。分子量が小さい PEG を修飾した場合には FALT が薄く RES 回避を期待できないため、RES 回避による血中滞留性の増大を目的にリポソーム膜表面に PEG を修飾する場合、多くの研究者は分子量が2000もしくは5000を選択する。分子量が大きい PEG はどマッシュルーム構造をとりやすくなることより理論値と実測値の差が大きくなり、血中滞留性の効果

図1 DOX含有PEG修飾リポソームの抗腫瘍効果に対するPEG分子量の影響

担がんマウスにDOXとして2.5 mg/kgを3回尾静脈内投与し、最終投与から72時間後に解剖し測定した。

(A)腫瘍重量。

(B)腫瘍中DOX濃度。 a) $p < 0.01$; b) $p < 0.001$ vs. PLDOX

はPEG分子量を大きくすれば増大するわけではなく、PEG2000が最適であるといえる。

調製段階でリポソームの有用性を判断できる物性として最も重要な点は、抗腫瘍剤を内封した場合、FALTと抗腫瘍効果との相関性である。DOX内封リポソームに異なる分子量のPEGを修飾したDOX内封PEG修飾リポソームを担がんマウスの尾静脈内へ繰り返し3回投与したところ、分子量が500のPEGを修飾したDOX内封リポソーム(PEG(500)-LDOX)投与群の抗腫瘍効果は、PLDOX投与群と同程度しか得られなかった(図1)⁹⁾。一方、分子量が2000のPEGを修飾したリポソーム(PEG(2000)-LDOX)では、その腫瘍重量はPLDOXの60%となり、PLDOXに比べて2.5倍の抗腫瘍効果を示した。このときの腫瘍中DOX濃度はPLDOXの1.5倍($p < 0.001$)に増大(図1)し、PEG修飾化によるRES組織への捕捉回避に基づき、肝臓でのDOX蓄積は低く、さらにDOXの副作用として代表的な心筋障害を誘発する心臓への集積量も減少した。以上の結果より、PEG(2000)-LDOXは、優れた血中滞留性と、enhanced permeability retention (EPR)効果^{13,14)}に基づく腫瘍部位へのリポソーム集

積による抗腫瘍効果の増大をもたらし、その効果はFALTにより規定できることが明らかとなった。

3. PEG分子量が異なる 2種類のPEGによるリポソームの修飾

FALTの増大は抗腫瘍効果の増大と副作用の減少を導く可能性が明らかとなったことから、よりFALTを増大させることが次の課題となる。分子量がより大きいPEGを修飾することがストラテジーの1つとしてあげられるが、5000や12000のような、分子量が大きく鎖長が長すぎるPEGをリポソーム膜表面に修飾することは、リポソーム膜上でのPEGの不安定化を招き、むしろ血中滞留性を減少させるという報告もある¹⁵⁾。また、前述のように高分子量のPEGで鎖長を長くしても、大きなマッシュルーム構造を形成し有効なFALTの増大に結びつかないだけではなく、リポソームと腫瘍細胞の接触効率を阻害するPEGジレンマ^{16,17)}を助長させることも懸念される。そこで、筆者らは異なる分子量を持つ2種類のPEGをリポソーム膜表面に修飾した混合PEG修飾リポソームについて検討した^{9,18)}。用

いる2種類のPEGは、総PEG修飾量がリポソーム構成脂質量に対して5 mol%となるように添加し、混合PEG修飾リポソームのゼータ電位を測定することによりFALTを算出した。分子量900と500のPEGを1:1 mol/molで修飾したDOX内封リポソーム(PEG(900:500=1:1)-LDOX)のFALTは 1.84 ± 0.13 nmであり、PEG(900)-LDOXと同程度であった。一方、分子量2000と500のPEGを1:1 mol/molで修飾したDOX内封リポソーム(PEG(2000:500=1:1)-LDOX)のFALTは 2.95 ± 0.03 nmとなり、PEG(2000)-LDOXよりも有意に大きな値となったことから、マッシュルーム構造をとる高分子量のPEGとブラッシュ構造をとる低分子量のPEGを混合することによりFALTを増大させることが可能となった。さらに、分子量2000と500を混合修飾したPEG(2000:500)-LDOXのFALTをPEGの混合比率より検討した結果、2000と500を2:1 mol/molの割合で混合修飾したときに最も大きなFALTが得られることが明らかとなり、その値は 3.30 ± 0.26 nmであった。このように、低分子量のPEGと高分子量のPEGを最適な比率で混合することによるFALT増大のメカニズムは以下のように考察できる。短鎖PEGのブラッシュ構造が長鎖PEGのマッシュルーム構造の下に挿入されることによりマッシュルーム構造が下から押し上げられ、コイル状になっていたPEG鎖が延ばされ

るなど立体構造の変化によるもの、PEG修飾率の変化など化学的な要因によるもの、その他2種類のPEGを混合することによりもたらされる何らかの変化など、これらの因子が単独、もしくは複雑に関与しFALTの増大につながったものと考えている。詳細はさらに検討する必要があるが、本稿では立体構造の変化によるFALTの増大モデルを図2Dに示した。

このようにFALTが増大した混合PEG修飾リポソームをマウスに投与したところ、血中DOX濃度は24時間以上高濃度で維持されていた。投与24時間後のPEG(2000:500=2:1)-LDOX投与群の血中DOX濃度は、PEG(500)-LDOX投与群の投与6時間後のレベルと同等であった。肝臓でのDOXの集積はPLDOX > PEG(500)-LDOX > PEG(2000)-LDOX > PEG(2000:500=2:1)-LDOXの順であり、混合PEG修飾リポソームはRES捕捉を回避していることが明らかとなった。また、このRES捕捉の回避レベルはFALTに相関しており、FALTの増大は血中滞留性およびRES回避に有効であることが示唆された。PEG(2000:500=2:1)-LDOXの腫瘍への分布はPLDOXに比べて9.1倍高く、混合PEG修飾リポソームは高い腫瘍集積性を示した。さらに、PEG(2000:500=2:1)-LDOXは有意に腫瘍重量を減少し強い抗腫瘍効果を発揮した(図3)。FALTと腫瘍重量の相関関係

図2 PEG修飾リポソームの模式図

- (A) PEG未修飾リポソーム(PLDOX) (B) 短鎖PEG修飾リポソーム(分子量340～500)
(C) 長鎖PEG修飾リポソーム(分子量2000以上) (D) 短鎖PEGと長鎖PEGを混合修飾したリポソーム

図3 混合PEG修飾リポソームによる抗腫瘍効果の増強

担がんマウスにDOXとして2.5 mg/kgを3回尾静脈内投与し、最終投与から72時間後に解剖し測定した。

(A)腫瘍重量。

(B)腫瘍中DOX濃度。 a) $p < 0.01$; b) $p < 0.001$ vs. PLDOX

をグラフに示すと、 $r^2 = 0.99$ の負の傾きの直線が得られ、FALTと抗腫瘍効果の相関性が示された。心臓中DOX濃度はいずれのPEG修飾リポソームも同程度であり、DOX水溶液に比べて集積量が減少した。すなわちPEG修飾リポソームのなかでも厚いFALTを有する混合PEG修飾リポソームは、抗腫瘍効果の増大と副作用の軽減が期待される結果となった。

4. アンカー部が異なる 2種類のPEGによるリポソームの修飾

これまでPEG分子量に焦点をあて述べてきたが、リポソーム膜表面にPEGを修飾するためのPEG脂質は、PEG部、スペーサー部、アンカー部からなり、PEGの分子量、アンカーである脂肪酸鎖長、あるいは脂質とPEGを結ぶスペーサー部の構造により物性が異なる。また、アンカー部の構造によりPEG脂質のリポソームからの離脱性が異なることが示されている^{18,19)}。一般的にPEG脂質は、アンカー部にアルキル基を有する1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(DSPE)や1,2-distearoyl-sn-glycerol(DSG)が使用され、アルキルアンカーを有するPEG脂質は安定にリポソ-

ム膜表面に修飾される。

筆者らは新たな戦略として、アルキルアンカーを持つPEG(2000)-DSGとコレステロールアンカーを持つPEG(2000)-コレステロール(PEG(2000)-CHO)^{20,21)}との混合修飾を試みた。PEG-CHOは血漿中でリポソーム膜から離脱しやすく、血中滞留性の向上がほとんど認められない。一方、リポソームに内封された薬物が腫瘍細胞へ有効に移行するためには、標的部位やその周辺で薬物が放出されることも必要である。PEG-CHOと腫瘍細胞を37℃でインキュベーションした結果、PEG-CHOの細胞移行性はPEG-DSGの4.2倍($p < 0.01$)となり、腫瘍細胞との親和性に優れていた²²⁾。そこで、高い血中滞留性をもたらすPEG-DSGとリポソーム膜上で不安定であるが腫瘍細胞との親和性に優れているPEG-CHOを混合修飾したリポソームに関する検討を試みた。

PEG-DSGとPEG-CHOを混合修飾したDOX内封リポソームのFALTは、PEG-DSG、PEG-CHOをそれぞれ単独で修飾したときよりも大きな値を示し、FALT値より評価した最適混合比率は、PEG-DSG:PEG-CHO=3:1 mol/mol(DSG-CHO(3:1)-LDOX)であった(FALT値 3.93 ± 0.43 nm)²³⁾。さらに、細胞親和性を評価

表1 アンカー混合修飾リボソームの殺細胞効果

Liposome	IC ₅₀ (μM DOX)
PLDOX	6.11 ± 0.05
DSG-LDOX	3.47 ± 0.18
CHO-LDOX	1.56 ± 0.10 ^{a)}
DSG-CHO(1:1)-LDOX	1.23 ± 0.04 ^{b)}
DSG-CHO(3:1)-LDOX	1.30 ± 0.03 ^{b)}

a) p < 0.001; b) p < 0.01 vs. DSG-LDOX

するためにP388白血病細胞に対するDSG-CHO(3:1)-LDOXの殺細胞効果を*in vitro*にて評価した²²⁾。PEG-CHO修飾リボソーム(CHO-LDOX)、DSG-CHO(3:1)-LDOXのIC₅₀は、それぞれPEG-DSG修飾リボソーム(DSG-LDOX)と比較して2.2倍(p<0.01)、2.7倍(p<0.01)の効果を示し、本結果はPEG-CHOの細胞親和性が良好であることに基づくものであると考えられた(表1)。

DSG-CHO(3:1)-LDOXは、投与6時間後には高い血中DOX濃度が認められた一方、24時間後にはPEGを修飾していないPLDOXと同レベルのDOX濃度が検出されたのみであった。ただし、腫瘍中DOX濃度はPLDOXの6倍の量が集積しており、EPR効果で腫瘍部位へ集積後はPLDOXより腫瘍細胞への移行性に優れていることが示唆された。しかしながら、その集積量は前項にて検討したPEG(2000)-LDOXやPEG(2000:500=2:1)-LDOXと比較すると十分量ではないと考えられ、腫瘍重量はコントロール群よりも約30%抑制するに留まった。

アンカーが異なる混合PEG修飾リボソームにおいても、FALTと血中滞留性、抗腫瘍効果の相関性について評価した。PEG-DSGとPEG-CHOを1:1 mol/molの割合で修飾したDSG-CHO(1:1)-LDOXのFALTは3.11 ± 0.23 nmであった。血中DOX濃度は投与6時間後でDSG-CHO(3:1)-LDOXの1/3、腫瘍重量はコントロール群と同程度という結果が得られている。*In vitro*における殺細胞効果の検討では、DSG-CHO(1:1)-LDOXとDSG-CHO(3:1)-LDOXで同等の効果が得られていることより、両者の差は血中滞留性が異なるものによると考えられ、アンカーが異なる混合PEG

修飾リボソームにおいても、FALTが血中滞留性の指標となることが明らかとなった。本リボソームは、腹腔内や膀胱のような腔内病変の局所投与による治療に効果を発揮できるものと期待される。

5. 1分子中に異なる2本のPEG鎖を有するPEGによるリボソーム修飾

3項にてPEG2000とPEG500を混合修飾したリボソームの有用性について述べた。本リボソームは分子量2000のPEGと500のPEGをリボソーム調製時に2:1 mol/molで量り取り、混合修飾したものであった。しかしながら、PEG(2000:500=2:1)-LDOXの実際のPEG修飾比率を測定した結果、分子量2000と500は1:1 mol/molで修飾されていることが明らかとなった^{9,18)}。一般的に低分子のPEGのほうが優先的に取り込まれやすいとされていることより、リボソーム膜へPEGを修飾する際にも低分子と高分子で優先度が異なり、さらには血中など体内でのリボソームからのPEG離脱にも両者で差がある可能性が示唆された。そこで、2種類のPEGの存在比率を常に一定にするため、2000と500のPEGが1分子中に1:1で存在するdifferent double arms PEG(DDA-PEG)を新規に合成した²⁴⁾(図4)。

DDA-PEGを修飾したリボソーム(DDA-LDOX)においてもFALTを測定した結果、PEG(2000)-LDOXの2.52 ± 0.03 nmを上回る3.57 ± 0.20 nmであり、この値はPEG(2000:500=2:1)-LDOXと同程度であった。さらに、DDA-PEGの添加量を半分にしたDDA-LDOX(1/2)のFALT

図4 Different Double Arms PEG (DDA-PEG) の構造

値は 3.10 ± 0.13 nm であり、添加量を半分にしても PEG(2000)-LDOX よりも FALT が厚くなることが明らかとなった。

これらリポソームの腫瘍細胞への薬物移行性を *in vitro* にて評価すると、DDA-LDOX(1/2)は PEG(2000:500=2:1)-LDOX に比べて有意に細胞内へ移行した。これは、PEG 修飾量を半量にしたことにより腫瘍細胞とリポソームの接触効率が増大し、PEG ジレンマが減弱したためであると考えられた。さらに、DDA-LDOX(1/2)の血中滞留性は優れており、そのレベルは強い抗腫瘍効果が得られた PEG(2000:500=2:1)-LDOX や DDA-LDOX と同程度であった。よって、DDA-LDOX(1/2)は血中滞留性と細胞親和性の両方を保持する新たな特性を有する PEG 修飾リポソームである可能性が示唆された。

血中滞留性と細胞親和性の両方の特性を有する DDA-LDOX(1/2)は、肝転移モデルマウスに対する転移抑制効果においても優位性を示している²⁵⁾。肝転移モデルマウスに DDA-LDOX(1/2)を投与すると、肝臓中 DOX 濃度は PEG(2000)-LDOX と同程度であり、RES 組織に捕捉される PLDOX よりも有意に抑制されていた。しかしながら、肝臓中の転移レベルを目視で評価し、1~5 のスコアを付けたところ、PLDOX は 4.5 ± 0.4 だった一方、DDA-LDOX(1/2)は 1.3 ± 0.5 であり有意に転移を抑制していた。さらに、免疫染色による組織学的観察においても、PLDOX 投与群に比べて DDA-LDOX(1/2)群の肝臓中腫瘍結節は6分の1に減少した。以上の結果より、新規に合成した

DDA-PEG は PEG 修飾量の減量により腫瘍細胞とリポソームとの接触効率を増大させるのみならず、高い血中滞留性を維持したことより転移抑制製剤としての応用が期待された。

6. おわりに

以上、本稿では新規 PEG 脂質を含むさまざまな PEG を用いたリポソーム化検討とその物性について紹介した。PEG は非抗原性で生体成分との相互作用が小さい水溶性高分子であり、安価で分子量をコントロールしやすいなど、多くの特徴を有する工業的に有用な高分子である。さらに、リポソーム製剤の開発においては非常に重要な膜表面修飾物質であり、これまでは passive targeting のための血中滞留性を得ることを目的に PEG 修飾が施されることが多かった。現在は active targeting リポソームの開発研究も数多く進められているが、生体のトラップを逃れるためにはリポソームへの PEG 修飾は必要不可欠である。ますます進化し複雑になる DDS 製剤技術において、PEG の分子量や構造を見直し、ストラテジーに従い合成することは新たな発見やブレイクスルーにつながる可能性があると考えられる。

謝辞

本研究を遂行にあたり DDA-PEG を合成していただきました日油株式会社 伊藤智佳博士、山本裕二博士に心より御礼申し上げます。

文献

- 1) Bangham A.D. et al. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 1965; 13: 238-52.
- 2) Sessa G. et al. Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure-linked latency. *J. Biol. Chem.* 1970; 245: 3295-301.
- 3) Patel H.M. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1992; 9: 39-90.
- 4) Devine D.V. et al. The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1997; 14: 105-31.
- 5) Berenstein G.L. et al. Distribution and pharmacology of intravenous technetium-99m-labeled multilamellar

- liposomes in rats and mice. *Cancer Res.* 1984; 44: 375-8.
- 6) Sadzuka Y. et al. The effect of dose on the distribution of adriamycin encapsulated in polyethyleneglycol-coated liposomes. *J Drug Targeting.* 1995; 3: 31-7.
- 7) Klibanov A.L. et al. Amphipathic polyethyleneglucols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 1990; 268: 235-7.
- 8) Shimada K. et al. Determination of the thickness of the fixed aqueous layer around the polyethyleneglycol-coated liposomes. *J. Drug Target.* 1995; 3: 283-9.
- 9) Sadzuka Y. et al. Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome. *Int. J. Pharm.* 2002; 238: 171-80.
- 10) Needham D. et al. Exchange of monooleoyl-phosphatidylcholine as monomer and micelle with

- membranes containing poly(ethylene glycol)-lipid. *Biophys J.* 1997; 73: 2615-29.
- 11) Needham D. et al. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1108: 40-8.
  - 12) Kenworthy A.K. et al. Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophys J.* 1995; 68: 1921-36.
  - 13) Matsumura Y. et al. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986; 46: 6387-92.
  - 14) Maeda H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics. *J. Control. Release.* 2000; 65: 271-84.
  - 15) Maruyama K. et al. Effect of molecular weight in amphipathic polyethyleneglycol on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes. *Chem. Pharm. Bull.* 1991; 39: 1620-2.
  - 16) Hatakeyama, H. et al. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumors based on the EPR effect: a strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011; 63: 152-60.
  - 17) Hatakeyama, H. et al. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Ther.* 2007; 14: 68-77.
  - 18) Sadzuka Y. et al. Study on the characterization of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin. *J. Control Release.* 2003; 91: 271-80.
  - 19) Hirota S. Physicochemical specification of drug carrying liposomes for the quality control in the industrial production. *Int. J. Pharm.* 1998; 162: 185-94.
  - 20) Yuda T. et al. Prolongation of liposome circulation time by various derivatives of polyethyleneglycols. *Biol. Pharm. Bull.* 1996; 19: 1347-51.
  - 21) Ishiwata H. et al. Physical-chemistry characteristics and biodistribution of poly(ethylene glycol)-coated liposomes using poly(ethylene glycol) cholesteryl ether. *Chem. Pharm. Bull.* 1995; 43: 1005-11.
  - 22) Sugiyama I. et al. Effect of hybridized liposome by novel modification with some polyethyleneglycol-lipids. *Int. J. Pharm.* 2009; 372: 177-83.
  - 23) Sugiyama I. et al. Characterization of novel mixed polyethyleneglycol modified liposomes. *Biol. Pharm. Bull.* 2007; 30: 208-11.
  - 24) Sugiyama I. et al. Enhanced antitumor activity of different double arms polyethyleneglycol-modified liposomal doxorubicin. *Int. J. Pharm.* 2013; 441: 279-84.
  - 25) Sugiyama I. Effect of liposomes with different double arms polyethyleneglycol on hepatic metastasis model mice and evaluation using a fluorescent imaging device. *Current Drug Deliv.* 2016; 13: in press.