モノクローナル抗体結合アドリアマイシン
封入リポソームの組織内分布

河野 謙 治*

Tissue distribution of adriamycin-encapsulated liposomes conjugated with monoclonal antibody

Pullulan-coated liposomes conjugated with monoclonal antibody (immunoliposomes) have been developed. The usefulness of the immunoliposomes-encapsulated adriamycin (MoAb-Lipo [ADR]) was examined on targeting cancer chemotherapy in an animal model. The mouse monoclonal IgM antibody (CSLEX 1) by immunization with human stomach cancer was used. MoAb-Lipo [ADR] was compared with pullulan-coated liposomes-encapsulated adriamycin without CSLEX 1 antibody and ADR alone. There was no differences in cytotoxic activity *in vitro* against human lung cancer cell line (PC-9), reacting with CSLEX 1, among them. However, MoAb-Lipo [ADR] inhibited the growth of the implanted PC-9 tumor *in vivo* more strongly than the others.

The ADR concentration in tumor was higher at 30 min to 8 hr after the administration in MoAb-Lipo [ADR] than in the others. In the heart, it was lower in liposomal ADR than in ADR alone, which was a significant benefit.

These results demonstrated that MoAb-Lipo [ADR] was an ideal drug carrier on targeting cancer chemotherapy.

Kenji Kawano*

key words : liposomes, monoclonal antibody,
cancer chemotherapy, immunoliposomes,
adriamycin

癌化学療法においては、抗癌剤の副作用を最小限に止め、最大の治療効果を得ることが一つの目標である。このためには、十分量の有効な抗癌剤を腫瘍組織へ選択的に到達させることが必要条件となる。

近年、これらの目標を達成すべく、癌に対する

targeting 療法が種々の方法で試みられている。モノクローナル抗体の癌治療への応用として、抗体に抗癌剤を直接結合させた複合体も用いられている¹⁻³⁾。

一方、人工脂質小胞であるリポソームは、生体への安全性もあり、すでに一部において薬剤キャリアとしての有用性は知られている⁴⁾。そこで、天然の多糖であるプルランで被覆された、多糖被覆リポソームに adriamycin を封入し、この表面に癌に対するモノクローナル抗体 (CSLEX 1 抗体) を結合させた MoAb-Lipo [ADR] を作成した⁵⁾。¹⁴C でラベルした抗体結合リポソームの組織内分布の検討では、リポソーム単独よりも腫瘍組織への高い集積が認められた⁶⁾。

本研究では、癌の targeting 療法における MoAb-Lipo [ADR] の有用性を、リポソームに封入された ADR の体内分布および腫瘍組織内濃度の観点から検討した。

材料と方法

(1) 薬剤と試薬

adriamycin (ADR) は協和発酵より、adriamycinol (ADR-OH) と adriamycinone (ADR-ON) は、ともに Farmitalia (Milan, Italy) より供与された。acetonitrile methanol は HPLC 用 (和光純薬株式会社) を使用し、その他の試薬はすべて特級試薬を用いた。

(2) 動物と培養細胞

動物は、6 週齢、オスの BALB/c ヌードマウス (nu/nu) (日本 SLC, 静岡) を使用し、長崎大学医学部附属動物実験施設で飼育された。

ヒト肺腺癌株 PC-9 は、早田義博教授 (東京医大) より分与され、5% CO₂ 下で 10% FCS 加 RPMI 中にて継代培養した。

* Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine 長崎大学医学部第二内科学教室

(3) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、ヒト胃癌組織を抗原として Fukushima ら⁷⁾が作成した Sialosylated Le^x を認識するマウス IgM 抗体(CSLEX 1 抗体)を使用した。本研究では、IgM を 0.05 M システイン存在下 pH 8.0 で 15 分間反応させ、セファデックス G25 によりシステインを除いて得られた IgMs(subunit of IgM)として使用した。

(4) リポソーム

Szoka ら⁸⁾の方法で作成した卵黄レシチンリポソームの外表面を、天然由来の多糖である分子量 5 万のプルランで被覆した large unilamellar vesicle(LUV)を使用した⁹⁾。

(5) モノクローナル抗体結合 ADR 封入りポソーム(MoAb-Lipo [ADR]), および ADR 封入りポソーム(Lipo [ADR])

MoAb-Lipo [ADR] と Lipo [ADR] は、砂本らの方法⁵⁾で作成され供与された。すなわち、ADR 30 mg/生食水 4 ml が卵黄レシチン 180 mg に加えられ、逆相法により LUV を作成し、遊離の ADR は超遠心(35000 G, 30 分, 3 回)により除いた。これに抗体を結合させるため、プルラン誘導体にマレイシド基を導入した aminoethylcarbamyethyl pullulan を、18 mg/水 4 ml に加えてリポソームを被覆した。

さらに、IgMs 1.5 mg/生食水 6 ml を加え、0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0)のなかで、4°C、約 20 時間反応させたあと、遊離の IgMs を超遠心(35000 G, 30 分)にて除き、MoAb-Lipo [ADR] を作成した。Lipo [ADR] も、同様の方法で作成された。リポソーム内の ADR の濃度は、励起波長 470 nm, 蛍光波長 590 nm における ADR の蛍光強度により測定した⁶⁾。

(6) *in vitro* 細胞障害試験

PC-9 細胞 5×10^4 /ml に ADR, Lipo [ADR], MoAb-Lipo [ADR] のいずれも ADR 量として、1, 5, 10, 25, 50 μ g/ml になるように加え、37°C 5% CO₂ 下で 30 分間培養した。培養後、細胞を 3 回洗浄し、再び 10% FCS 加 RPMI 培養液 1 ml に再浮遊し、96 穴平底マイクロプレートに 200 μ l/well を接種した。12 時間培養後、H³-thymidine 1.0 μ ci/well 加え、さらに 12 時間培養後セルハーベスターで腫瘍細胞を回収し、液体シンチレーション

カウンタで放射活性を測定した。

% cytotoxicity は、以下の式で算出した。

% cytotoxicity

=100 ×

$$\left(1 - \frac{\text{癌細胞と各剤型を混合培養時の cpm}}{\text{癌細胞単独培養時の cpm}}\right)$$

(7) *in vivo* 腫瘍増殖抑制効果

BALB/c ノードマウスの腹腔で増殖した PC-9 を *in vitro* にて培養し、 10^7 /0.1 ml に調整してノードマウス皮下に移植した。移植後第 13 日, 21 日, 28 日目に、ADR 量として 2 mg/kg の ADR, Lipo [ADR], MoAb-Lipo [ADR] を尾静脈より 1 日 2 回投与した。なお、投与開始時の推定腫瘍重量は約 300 mg であった⁶⁾。推定腫瘍重量は、Batlle Columbus Laboratories Protocol¹⁰⁾に従って長径 × (短径)² × (1/2) として算出した。効果判定は、治療群と対照群の推定腫瘍重量比(relative mean tumor weight: RW)を求め、有意差検定は Wilcoxon paired sum test で行った。

(8) 血漿および組織内 ADR 濃度の測定

① 血漿および組織標本の作成

生後約 6 週、体重 25~30 g の BALB/c ノードマウス(nu/nu)の雄に、*in vitro* で培養増殖した PC-9 細胞 10^7 /0.1 ml を皮下に移植し、腫瘍を作成した。ADR 群, Lipo [ADR] 群および MoAb-Lipo [ADR] 群にわけ、尾静脈より ADR 濃度として 10 mg/kg を静注し、経時的に(30 分, 1, 2, 4, 8 時間)屠殺し、頸動脈より採血後脱血死させて各臓器を摘出した。

② 血漿および組織からの ADR の抽出方法

血漿 0.3 ml に pH 9.0 のホウ酸緩衝液 0.7 ml を加え、各組織は pH 9.0 のホウ酸緩衝液の 10% ホモジネート液とした。これにクロロフォルム 4 ml とメタノール 1 ml を加え、10 分間振盪後、10 分間 3000 rpm/分で遠心分離した。その後、有機層 3 ml を蒸発乾固し、移動相の 100~200 μ l に再溶解し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供した。

③ ADR の定量法

ADR の定量は、蛍光検出器(RF-530, 島津製作所)を使用し、HPLC 法にて行った。測定条件は、HPLC カラム: μ Bondapak C₁₈ (Waters 社, USA), 移動相: アセトニトリル: 0.02 M リン緩

図 1 High-performance liquid chromatogram of ADR
 (a) tumor blank (b) a mixture of authentic samples (c) tumor obtained at 30 min after injection of ADR

図 2 Calibration curves for ADR in plasma(a) and tissue(b)

衝液, pH 3.0(26:74), 流速: 1.0 ml/分, 測定波長: 励起波長(Ex) 470 nm, 螢光波長(Em) 560 nm, 記録計(C-R3A, 島津製作所) チャート速度: 10 mm/分, 保持時間: ADR-OH 2.9 分, ADR 5.8 分, ADR-ON 8.9 分で行った。

ADR およびその代謝物(ADR-OH, ADR-ON) の分離は, 標準試料や生体材料ともに良好であった(図 1)。

血漿および組織の検量線は, 上記の抽出方法, 測定条件にて血漿 0~2.0 $\mu\text{g/ml}$, 組織 0~40 $\mu\text{g/g}$

図3 *In vitro* cytotoxicity of antibody-conjugated liposome on PC-9 cell (incubation for 30 min at 37°C)

表1 Antitumor effect of antibody-conjugated liposome at the end of experiment (at 25 days after initial treatment)

group	n	RW (mean±SD)	TRW/CRW (%)
control	10	35.1±7.1	
Lipo(ADR)	8	23.4±6.8 ^{*1)}	52
MoAb-Lipo(ADR)	10	15.2±5.6 ^{*2)}	31

¹⁾ : P<0.05 vs control

²⁾ : P<0.05 vs control, P<0.05 vs Lipo(ADR)

g の範囲で作成した。いずれの検量線も良好な直線性 ($r=0.999$) を示した (図2)。以上の条件で、いずれも外部標準法にて ADR 濃度の測定を行った。また、各測定値の検定は t 検定により行った。

結果

(1) *in vitro* 細胞障害試験

ADR, Lipo [ADR], MoAb-Lipo [ADR] での細胞障害試験は、ADR 濃度 0~50 $\mu\text{g/ml}$ 30 分間の接触で、3 群間に差は認められなかった (図3)。

(2) *in vivo* での腫瘍増殖抑制効果

Lipo [ADR] 群の推定腫瘍重量比の最低比 (T_{RW}/C_{RW}) は 52% であり、MoAb-Lipo [ADR] 群では 31% と、明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、Lipo [ADR] 群と MoAb-Lipo [ADR] 群の治療開始後 25 日目の推定腫瘍重量比は、それぞれ 23.4 ± 6.8 , 15.2 ± 5.6 であり、危険率 0.05 以下で有意の差を認めた (表1)。ADR 群はすでに報告しているように、Lipo [ADR] 群と

図4 Concentration of ADR in plasma and tissues of tumor-bearing mice

図5 Concentration of ADR in tumor-bearing mice

* P<0.01 vs ADR, ** P<0.05 vs ADR.

*** P<0.05 vs Lipo (ADR)

ほぼ同様の増殖曲線を示した⁶⁾。

(3) 血漿中の ADR 濃度 (図4)

血漿中の ADR 濃度は、ADR 群, Lipo [ADR] 群, MoAb-Lipo [ADR] 群の 3 群ともに投与後 30 分で、おのおの平均 6.0 $\mu\text{g/ml}$, 4.5 $\mu\text{g/ml}$, 5.7 $\mu\text{g/ml}$ と低値を示した。つまり、投与した ADR のほとんどが組織へ移行しており、投与後 8 時間まで 3 群間に差はみられなかった。

(4) 腫瘍組織内 ADR 濃度 (図5, 表2)

腫瘍組織内の単位重量当りの ADR 濃度は、他

表 2 Concentration of ADR in tissues of tumor-bearing mice

tissue	ADR	time after injection				
		30 min	1h	2h	4h	8h
liver	ADR	16.9±1.5	24.8±1.0	19.2±1.3	18.1±1.7	17.1±3.3
	Lipo	24.2±1.1	33.9±2.8	24.3±3.8	24.1±1.6	24.3±4.6
	MoAb-Lipo	25.7±0.9	34.4±2.2	21.5±2.9	23.4±3.3	23.7±2.5
spleen	ADR	19.5±0.8	17.2±0.2	16.2±8.8	20.5±0.4	17.1±1.9
	Lipo	26.7±1.9	21.7±2.2	27.6±1.2	28.2±3.1	24.0±1.8
	MoAb-Lipo	28.2±3.6	21.8±4.0	31.7±4.4	30.8±12.3	26.8±6.7
lung	ADR	22.2±1.5	25.4±5.4	21.5±5.0	21.7±3.0	18.6±1.6
	Lipo	20.6±5.3	24.2±1.2	20.1±1.5	17.7±1.2	18.7±1.9
	MoAb-Lipo	16.5±2.6	16.8±1.8	20.9±2.4	18.7±2.0	16.0±1.1
kidney	ADR	32.5±2.9	20.1±5.1	17.1±2.5	12.8±0.6	14.8±3.6
	Lipo	23.7±2.9	15.5±0.6	11.9±1.5	9.9±0.7	16.1±1.6
	MoAb-Lipo	14.7±1.1	13.4±0.7	10.9±2.0	13.0±0.6	15.9±2.1
heart	ADR	13.9±0.62	8.6±0.7	6.9±0.87	4.4±0.1	3.5±1.0
	Lipo	6.3±2.1	2.8±0.29	5.0±0.6	4.4±0.9	2.6±0.1
	MoAb-Lipo	5.0±1.1	2.5±0.1	3.3±0.51	3.6±0.3	3.1±1.0
tumor	ADR	1.8±0.23	2.3±0.23	2.0±0.15	2.2±0.2	1.0±0.06
	Lipo	2.8±0.71	2.3±0.32	2.8±1.2	3.1±0.35	1.5±0.26
	MoAb-Lipo	2.8±0.78	3.6±0.35	2.8±0.1	3.5±0.23	1.7±0.11

(μg/g, mean±SD)

臓器と比較すると低値を示していたが、ADR 群が投与後 1 時間で平均 2.3 μg/g とピークに達していたのに対し、MoAb-Lipo [ADR] 群では 1 時間後平均 3.6 μg/g、4 時間後でも平均 3.5 μg/g と、ADR 群にくらべ有意に高値を示していた。Lipo-[ADR] 群と、MoAb-Lipo [ADR] 群との比較では、測定した限り投与後 1 時間では後者が前者より有意に高値を示し、投与後 8 時間までは MoAb-Lipo [ADR] 群のほうが高値を示す傾向が認められた。つまり、腫瘍組織への ADR の到達性は、MoAb-Lipo [ADR] 群が 2 群より比較的良好であった。

(5) 組織内 ADR 濃度(図 4, 表 2)

MoAb-Lipo [ADR] 群と Lipo [ADR] 群は、ADR 群に比して、肝臓や脾臓において高濃度を示し、投与後 8 時間までその濃度を保持していた。腎臓および心臓では、逆に ADR 群が投与後 30 分から 4 時間まで高値を示していた。とくに心筋では、ADR 群では投与後 30 分で平均 13.9 μg/g、1 時間で平均 11.2 μg/g であったのに対し、Lipo [ADR] 群は投与後 30 分で平均 6.3 μg/g、1 時間で平均 2.8 μg/g であった。MoAb-Lipo (ADR) 群

も投与後 30 分で平均 5.0 μg/g、1 時間で平均 2.5 μg/g と ADR 群の 1/2 以下の濃度であり、ADR をリボソームに封入することにより、心筋への ADR の集積が有意に抑制されているのが認められた。

一方肺では、MoAb-Lipo [ADR] 群が、投与後 30 分と 1 時間で、他の 2 群より若干低値を示した。

考 案

人工脂質小胞であるリボソームは、生体への毒性が少ないため、目的とした薬剤を封入することにより、その薬剤活性を保った状態で生体に利用できる。また、脂溶性や水溶性薬剤のいずれも封入できることから、すでに薬剤キャリアとしての有用性は認められている⁴⁾。リボソームに抗癌剤を封入することにより、その抗腫瘍効果が増強するという報告も散見されている^{11,12)}。

なかでも Mayhew らは、リボソームに Ara-c を封入することにより、*in vitro* では抗腫瘍効果の増強はみられなかったが、*in vivo* にて抗腫瘍効果が増強したことを報告した¹¹⁾。そして、その原因

としてリポソームに組織選択性はなく、リポソームに薬剤を封入することにより、リポソームが血中の酵素から薬剤を保護し薬剤が血中に長時間滞在したためと述べた。

しかし本研究では、ADR, Lipo [ADR], MoAb-Lipo [ADR] の投与後 30 分から 8 時間まで血漿中 ADR 濃度を測定したが、差はみられなかった。これは、生体内に投与されたりポソームは、投与後 30 分以内に 90% 以上が血中より消失してしまうためと考えられた¹³⁾。

近年、モノクローナル抗体を応用した targeting 療法として、モノクローナル抗体に抗癌剤であるメトトレキサート¹⁾、ネオカルチノスタチン、マイトマイシン C²⁾、ドキソルビシン³⁾などを直接結合させる方法が試みられている。しかしながら抗体と抗癌剤を直接結合することにより、抗体および抗癌剤の活性の低下や、臨床的に必要量の抗癌剤と抗体とを結合させることは困難である²⁾、などの問題点が残されている。このため、抗体と抗癌剤の間に中間支持体(アルブミンやデキストランなど)を用いる工夫がなされている^{1,3)}。

そこで、薬剤キャリアとしてのリポソームに抗癌剤を封入し、これにモノクローナル抗体を結合する方法が注目されている^{14,15)}。橋本らは、アクチノマイシン D を封入したりポソームに、マウスの腫瘍関連抗原である MM 抗原に対するモノクローナル抗体を結合させ、*in vitro* と *in vivo* にて抗腫瘍効果を増強することを報告した¹⁶⁾。

一般に、リポソームが生体内に投与された場合、血中リパーゼなどにより容易に破壊されるため、本研究では天然のプルランにて被覆されたプルラン被覆リポソームを用いた。このプルラン被覆リポソームは、単純なリポソームと比較すると、酵素のおよび化学的安定性、機械的強度が補強され、生体へ投与されたときの安定性が高いものと考えられる^{9,17)}。このことが、MoAb-Lipo [ADR] の *in vivo* における抗腫瘍効果増強の一因と考えられる。

本研究では、*in vitro* の細胞障害試験では MoAb-Lipo [ADR] の効果増強は認められなかった。これは、ADR の直接毒性のため差がみられなかったものと考えられた。しかしながら、用いたモノクローナル抗体(CSLEX 1 抗体)および抗体

結合リポソームの腫瘍結合性が良好である⁹⁾ことにより、*in vivo* の抗腫瘍効果が増強したものと考えられた。

以上のような targeting 療法において、抗癌剤をいかに選択的に腫瘍組織へ到達させるかは重要なことである。抗癌剤をリポソームに封入することにより、腫瘍組織内の抗癌剤の濃度が上昇することが報告されている¹⁸⁾。

本研究でも、Lipo [ADR] 群の腫瘍組織内濃度は、ADR 群の最高値より投与後 4 時間まで高値を示していた。Lipo [ADR] 群と MoAb-Lipo [ADR] 群を比較してみると、MoAb-Lipo [ADR] 群が投与後 8 時間まで高値を示しており、MoAb-Lipo [ADR] 群の腫瘍到達性が向上することが確認された。

ところで ADR をリポソームに封入するもう一つの利点として、ADR をリポソームに封入することにより、心筋への ADR の取り込みが低下する報告がみられている^{12,19)}。Rahman らは、電子顕微鏡にて心筋を観察し、心毒性の低下することを報告した²⁰⁾。

本研究でも、Lipo [ADR], MoAb-Lipo [ADR] 群ともに、心筋内の ADR 濃度は、投与後 1 時間まで ADR 群の 1/2 以下の濃度であった。これは、MoAb-Lipo [ADR] を用いた治療において、副作用の軽減や ADR 投与量の増量などの利点になりうると考えられた。一方、肝臓、脾臓への ADR の集積は、従来の報告^{12,19,20)}と同様に、ADR をリポソームに封入することにより、集積濃度が著明に高かった。

肝臓や脾臓などの網内系へのリポソームの捕捉を防ぐため、橋本ら¹⁶⁾は、治療前に薬剤の封入されていない空のリポソームを投与することにより、モノクローナル抗体結合抗癌剤封入リポソームの抗腫効果の増強を報告しており、今後は網内系への捕捉を防ぐ工夫が必要と考えられる。

モノクローナル抗体に抗癌剤を結合させた剤型を、動注療法にて臨床的に使用した報告²⁾もみられるようになってきている。大量の抗体を必要とする全身投与は、副作用の問題があり、現時点では困難と考えられる。

本研究で用いたモノクローナル抗体も、マウス IgM 抗体であり、ヒトの正常細胞の一部と反応す

るため臨床応用は困難である。しかし、モノクローナル抗体の改良や、多糖被覆リポソームの組織指向性の改善も可能であり^{9,17)}、さらに薬剤の腫瘍到達性が向上すると思われる。これらの問題点が解決すれば、本法は癌の **targeting** 療法としてより理想的な方法になるものと考えられる。

まとめ

① MoAb-Lipo [ADR], Lipo [ADR], ADR の間に、*in vitro* における細胞障害試験では差が認められなかった。しかし、*in vivo* における抗腫瘍効果は、MoAb-Lipo [ADR] が、Lipo [ADR], ADR 群より有意に抗腫瘍効果の増強を認めた。

② 腫瘍組織の ADR 濃度は、MoAb-Lipo [ADR] 群が Lipo [ADR] 群や ADR 群より高値を示し、ADR の腫瘍組織への到達性が向上することが確認された。

③ ADR の体内分布では、ADR をリポソームに封入することにより、肝臓や脾臓などの網内系で ADR は高値を示したが、心筋への取り込みは抑制されていた。

④ MoAb-Lipo [ADR] は、癌の **targeting** 療法として有用な方法と考えられた。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました恩師原耕平教授に深謝致します。また本研究のご指導、ご援助をいただきました京都大学工学部砂本順三教授、ならびに多大なるご協力をいただきました教室員の皆様に感謝致します。

文 献

- 1) Baldwin, R. W., Embleton, M. J., Garnett, M. C., Pimm, M. V. : Conjugates of monoclonal antibody 791T/36 with methotrexate in cancer therapy. NCI Monogr. 3 : 95-99, 1987.
- 2) Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Suzuyama, H., Honda, M. et al. : Clinical application of monoclonal antibody-drug conjugates for immunotargeting chemotherapy of colorectal carcinoma. Cancer 61 : 881-888, 1988.
- 3) Dillman, R. O., Shawler, D. L., Johnson, D. E., Meyer, D. L., Koziol, J. A. et al. : Preclinical trials with combinations and conjugates of T101 monoclonal antibody and doxorubicin. Cancer Research 46 : 4886-4891, 1986.
- 4) 野呂俊一, 石井文由. : Drug Delivery system を中心とした新しい投与剤形の開発設計—DDS としてのリ

ポソーム—薬局 35 : 1489-1499, 1984.

- 5) Sunamoto, J., Sato, T., Hirota, M., Fukushima, K., Hiratani, K. et al. : A newly developed immunoliposome—an egg phosphatidylcholine liposome coated with pullulan bearing both a cholesterol moiety and IgMs fragment. Biochim. Biophys. Acta 898 : 323-330, 1987.
- 6) Hirota, M., Fukushima, K., Hiratani, K., Kadota, J., Kawano, K. et al. : Targeting cancer therapy in mice by use of newly developed immunoliposomes bearing adriamycin. Journal of Liposome Research 1 : 15-33, 1988-1989.
- 7) Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P. I., Wakisaka, A., Togashi, H. et al. : Characterization of sialosylated Lewis^x as a new tumor-associated antigen. Cancer Research 44 : 5279-5285, 1984.
- 8) Szoka, F., Papahadjopoulos, P. : Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 4194-4198, 1978.
- 9) Sunamoto, J., Iwamoto, K., Takada, M., Yuzuriha T., Katayama, K. : Improved drug delivery to target specific organs using liposomes as coated with polysaccharides. Polymers in medicine. (ed. Chiefflini, E., Giusti, P.), New York, Plenum Press, p 157-168, 1984.
- 10) Ovejera, A. A., Houchens, D. P., Barker, A. D. : Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. Ann. Clin. Laboratory Science 8 : 50-56, 1978.
- 11) Mayhew, E., Papahadjopoulos, D., Rustum, Y. M., Dave, C. : Inhibition of tumor cell growth *in vitro* and *in vivo* by 1- β -D-arabinofuranosyl-cytosine entrapped with phospholipid vesicles. Cancer Research 36 : 4406-4411, 1976.
- 12) Gabizon, A., Dagan, A., Goren, D., Barenholz, Y., Fuks, Z. : Liposomes as *in vivo* carriers of adriamycin : reduced cardiac uptake and reserved antitumor activity in mice. Cancer Research 42 : 4734-4739, 1982.
- 13) McDougall, I. R., Dunnick, J. K., McNamee, M. G., Kriss, J. P. : Distribution and fate of synthetic lipid vesicles in mouse : a combined radionuclide and spin label study. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 : 3487-3491, 1974.
- 14) Bankert, R. B., Yokota, S., Ghosh, S. K., Mayhew, E., Jou, Y. : Immunospecific targeting of cytosine arabinonucleoside-containing liposomes to the idiotype on the surface of a murine B-cell tumor *in vitro* and *in vivo*. Cancer Research 49 : 301-308, 1989.
- 15) Onuma, M., Odawara, T., Watarai, S., Aida, Y., Ochiai, K. et al. : Antitumor effect of adriamycin entrapped in liposomes conjugated with monoclonal antibody against tumor-associated antigen

- of bovine leukemia cells. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 77 : 1161-1167, 1986.
- 16) Hashimoto, Y., Sugawara, M., Masuko, T., Hojo, H. : Antitumor effect of actinomycin D entrapped in liposomes bearing subunits of tumor specific monoclonal immunoglobulin M antibody. *Cancer Research* 43 : 5328-5334, 1983.
- 17) Sunamoto, J., Iwamoto, K., Takada, M., Yuzuriha, T., Katayama, K. : Polymer coated liposomes for drug delivery to target specific organs. *Recent advances in drug delivery systems.* (ed. Anderson, J. M., Kim, S. W.), New York and London, Plenum Press, p 153-161, 1984.
- 18) Shinozawa, S., Araki, Y., Oda, T. : Tissue distribution and antitumor effect of liposome-entrapped doxorubicin(adriamycin)in Ehrlich solid tumor-bearing mouse. *Acta Med. Okayama* 35 : 395-405, 1981.
- 19) Parker, R. J., Priester, E. R., Sieber, S. M. : Effect of route administration and liposome entrapment on the metabolism and disposition of adriamycin in rat. *Drug Metabolism and Disposition* 10 : 499-504, 1982.
- 20) Rahman, A., Kessler, A., More, N., Sikic, B., Rowden, G. et al. : Liposomal protection of adriamycin-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Research* 40 : 1532-1537, 1980.