リポソーム封入による制癌剤の効果増強に関する基礎的研究

橘 政 昭
 出 口 修 宏
 萩 原 正 通
 実 川 正 道
 畠 亮*
 田 崎 寛

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室
(主任：田崎 寛教授)

ENHANCEMENT OF ANTITUMOR EFFECT ON UROLOGICAL CANCER IN VITRO AND IN VIVO BY DRUGS ENTRAPPED IN LIPOSOME

Masaaki Tachibana, Nobuhiro Deguchi, Masamichi Hagiwara, Seido Jitsukawa,
Makoto Hata* and Hiroshi Tazaki

Dept. of Urology, School of Medicine, Keio University

*Dept. of Urology, National Defence Medical College

Liposome is a bilayered phospholipid vesicles, and was originally developed as a model for biomembranes. Liposome has attracted attention in recent years as a potential carrier of anticancer drugs thereby enhancing the therapeutic effect. This study was designed to clarify the following problems associated with clinical application of liposome in future.

- 1) The influence of liposome-entrapped anticancer drugs on cytotoxic activity in in vitro system.
- 2) The effect of liposome-entrapped anticancer drugs in the host tissues.
- 3) The in vivo therapeutic efficacy of liposome-entrapped bleomycin in the treatment of testicular tumor transplanted in nude mice.

For cytotoxicity test, KU-2 cells, derived from human renal cell carcinoma were used. Effect of free and liposome-entrapped bleomycin on the growth of KU-2 cells was determined. Enhanced effect was noted in the latter group. Also effect of free and liposome-entrapped bleomycin on the cell cycle traverse of KU-2 cells was determined by means of flow microfluorometry. Obvious effects of G₂-block was noted in liposome-entrapped bleomycin.

Therapeutic effect of free and liposome-entrapped bleomycin on the testicular tumor bearing nude mice (KUNU-1) was examined. Antitumor effects of bleomycin was enhanced by entrapment of bleomycin into liposome, mean growth rates of the tumor by administration of free and liposome-entrapped bleomycin at day 5 were $91.1 \pm 8\%$ and $76.1 \pm 14\%$, respectively.

Bleomycin, either free or liposome-entrapped, was injected into the peritoneal cavity of KUNU-1 mice in a dose of 5mg. When liposome-entrapped bleomycin was given, increase in the concentration of bleomycin was sixfold in the spleen; threefold in the liver; twofold in the kidney and one and half fold in the lung.

These results indicate that liposome entrapment modified the pharmacokinetics and enhanced the anticancer activity of the drug mediated by slow delivery rather than providing selective cytotoxic effect of the drug to tumors.

要旨：癌化学療法剤の効果増強を計る目的で制癌剤のリポソーム封入を行ない、その増強効果につき検討した。

* 現 防衛医科大学校泌尿器科

ヒト腎癌培養細胞(KU-2)に対する殺細胞能の実験では, bleomycin, methotrexate, において, リポソーム封入側に, より強い増殖抑制効果を認めたが, cytosine-arabinoside, cis-platinum, では, free 薬剤との間に, 明らかな差を認めなかつた。Flow microfluorometry により, KU-2 細胞の細胞周期に及ぼす影響を検討すると, bleomycin 封入リポソームで, free-bleomycin に比し, G_2 -block effect の増強が観察された。そこで, リポソーム添加 medium 中で培養した KU-2 細胞を電顕下に観察すると, 細胞質内に, 多重層構造を呈するリポソームが認められ, 培養細胞内へのリポソームの取り込みが証明された。

ヌードマウス可移植性ヒト睾丸腫瘍(KUNU-1)に対する抗腫瘍効果を, 5mg の free および, リポソーム封入 bleomycin にて, 比較検討すると, 腹腔内投与 5 日後の腫瘍の size は, free-bleomycin 群が $91 \pm 8\%$ に対し, リポソーム封入群は $76 \pm 14\%$ と, リポソーム封入群により強い腫瘍増殖抑制を認めた。しかしながら, この時の, bleomycin の組織内濃度を測定すると, リポソーム封入群で, 肝, 脾に約 3 ~ 6 倍の薬剤濃度を認めるが, 腫瘍内濃度では, 両者に差を認めなかつた。したがって, この治療効果増強は, bleomycin のリポソーム封入にともなう徐放性によると考えられた。

結 言

近年, 癌化学療法の進歩とともに, 多くの制癌剤が開発され, その効果も目覚しく向上してきているが, いまだ充分とは言えない。これらの薬剤濃度の体内持続性の欠如にあると思われる。薬剤を目的とする臓器や細胞に選択的に到達させるため, 従来より, 各種の担体物質が考案されてきている。最近, 人工脂質膜の微小胞球である, リポソームが注目され, 制癌剤の封入による種々の実験的検討が進められている。著者らは, このリポソームに, 各種制癌剤を封入し, 以下の項目につき実験を行ない, 将来の臨床応用への可能性を導いた。

(1) in vitro におけるリポソーム封入制癌剤の殺細胞能の検討。

(2) in vivo におけるリポソーム封入制癌剤の体内分布。

(3) ヌードマウス可移植, ヒト睾丸腫瘍に対する bleomycin 封入リポソームの抗腫瘍効果の検討。

I. 方 法

(1) リポソーム封入薬剤の作成。

卵黄レシチン PL-100* (キュービー研究所)

cholesterol (CHOL) (東京化成工業)

stearylamine (SA) (東京化成工業)

の 3 種の脂質を PC/CHOL/SA = 7 : 2 : 1 (mol 比) にて調製し, クロロホルム溶液中に溶解する。100 ml の心臓型フラスコ中に, この溶解液を入れ, ローターエバポレーターに接続, フラスコ内面に均一な厚

さの薄膜を形成するため, デシケータに入れ, 吸引ポンプにて一夜吸引する。次に薄膜を形成したフラスコ内に, ガラスビーズ(日本クロマト工業 mesh 80-100) をスパテール($\phi 7 \times 10 \text{ mm}$) 3 杯と, 薬剤水溶液 5 ~ 10 ml を加え, Thermo-Mixer で激しく攪拌する。このことにより, フラスコ内の薄膜は, ガラスビーズによりはがされ, リポソームの懸濁液が得られる。この溶液を, 0.075 M NaCl と 0.075 M KCl の等量液を適量使用し, ガラスビーズを除去, 更に懸濁液を遠心(14,500 rpm, 13,000G, 4°C, 20分) すると, リポソームの白沈が得られる。上清をすて, 更に遠心にてリポソームを洗浄, 上記の NaCl, KCl の等量液中に懸濁, 4°C にて保存した。

(2) bleomycin : 4°C, 0.075 M NaCl と 0.075 M KCl の等量液中に浮遊された薬剤封入リポソームを遠沈(14,500 rpm, 13,000 G, 4°C, 20分) し, 上清液をすて, 下層液の一定量を取り, クロロホルムを加えてリポソームを分解し, さらに 0.1 M リン酸 buffer (PH 6.8) を加え抽出および希釈を行ない, これを遠心分離後, 上層液を日本抗生物質医薬品基準, 塩酸プレオマイシン, 力価試験法-II, 標準曲線法¹⁾ に準じて力価測定を行なつた。

(b) cis-platinum diammine dichloride (CPDD) : bleomycin と同様にクロロホルムで処理後, 日立 170-30 原子吸光光度計, Hallow cathode lamp L 233-78NU ランプ, $2659 \cdot 5 \text{ \AA}$ の分析波長にて測定した。

(c) cytosine-arabinoside (ara-C) : クロロホルムにて処理後, 蒸留水にて希釈し, これに濃塩酸 5ml を添加, PH を 2 付近にする。これを分光光度計(Gilford spectrophotometer 24D) で吸収波長 280nm にて計測した。

* phosphatidylcholine (PC) : phosphatidylethanolamine : sphingomyelin : ribophosphatidylcholine = 40 : 4.8 : 1.6 : 3.5 (mol 比)

(d) methotrexate (MTX): クロロホルムで処理後分光光度計 (日立100-10) 吸収波長300nmにて測定し, standard MTX solution (Unicam) により, 薬剤量を求めた。

(a)~(d)の薬剤の取り込み率は次式に求めた。

$$\frac{\text{リポソーム内の薬剤取り込み量}}{\text{封入するのに用いた水溶液中の薬剤量}} \times 100$$

(3) in vitro における殺細胞効果

ヒト腎癌由来培養細胞株(KU-2) (10% fetal bovine serum 加, Eagle MEM 中, 5% CO₂ air, 37℃にて培養)を multi well culture plate に 1×10^4 個/ml/well 移植, 3~4日後に, free および薬剤封入リポソームを培養液中に添加し, 持続接触の形で作用させ, 24時間ごとの生理細胞数を計測した。薬剤封入リポソームは free 薬剤を濃度を一定にするため, リポソームにとりこまれず free のままで残った薬剤を含めて, 等量の薬剤溶液になるようにして使用した。

bleomycin については, flow microfluorometry により, 細胞周期におよぼす影響を検討するため, 1×10^5 個/ml の KU-2 細胞を plastic シャーレ (Falcon ϕ 8cm) に移植, 4~5日後10mcg/ml の free および, リポソーム封入 bleomycin を持続接触させ, 薬剤接触3日後の細胞の DNA 含量の分布を観察した。

(4) in vivo における薬剤封入リポソームの体内動態。

ヌードマウス可移植性ヒト睾丸腫瘍 (KUNU-1, ter-

ato carcinoma) は, その腫瘍組織を細切し, 約500mgの腫瘍片を trocar 針にて, ノードマウス側背部皮下に移植, 10~14日後, 腫瘍が確実に増殖することを確認し, 5 mg/頭の free およびリポソーム封入 bleomycin (封入率10~12%) を腹腔内に1回投与し, 薬剤投与後, 12時間, 24時間の各臓器および腫瘍組織の bleomycin 濃度を, bio-assay にて求めた。

(5) in vivo における抗腫瘍効果。

前述の条件にて処理した KUNU-1, 担癌ヌードマウスに, 5 mg/頭の free およびリポソーム封入 bleomycin を腹腔内に1回投与後, 腫瘍径を毎日測定した。腫瘍径は, 最長(a)高さ(b)を計測し, $a \times b^2/2$ を腫瘍量とし, 薬剤投与時の腫瘍量を100として算定した。

II. 結 果

(1) 薬剤のリポソーム封入量および安定性

前述の方法で作製したリポソームを透過型電子顕微鏡にて観察すると, 大小不同, 多重層構造を呈する微小泡が, 観察された(図1)。薬剤封入率は, bleomycin 12%, CPDD 4%, Ara-C 13%, MTX 3%と, 薬剤により, 封入率に多少の差を認めた。薬剤入りポソームを, 生理食塩中, 37℃にて incubate した場合の release rate を計測すると, BLM, CPDD, Ara-C, 共に, 24時間後でも80%程度, リポソーム内に保持されており, 比較的安定であつた(図2)。

(2) in vitro における殺細胞効果

図1 重層する膜より成り立つ, リポソーム電顕像

1 × 10⁴/ml の KU-2 細胞に対し Eagle MEM を封入したリポソーム浮遊液を 10mcl/ml 培養液中に混入し、KU-2 細胞の増殖を検討すると、正常培養条件での control 群と、リポソーム封入群の間に差を認めず、リポソーム単独では、増殖抑制が起こらないことが確認された (図 3)。

BLM, 10mcg/ml の濃度における, KU-2 細胞の増殖曲線を検討すると、薬剤作用後 4 日目の生細胞数は、free-BLM で 87.6% リポソーム封入 BLM では、74.5% と、リポソーム封入側により強い増殖抑制効果を認めた (図 4)。これを、flow microfluorometry により、細胞周期におよぼす影響についてみると、薬剤接触 3 日目において、G₂ + M fraction が、free-BLM

図 2 Release rate of drugs from liposome

図 3 Effect of liposome vesicles on the growth of KU-2 cells in vitro

図 4 Effect of free or liposome-entrapped bleomycin on the growth of KU-2 cells in vitro

で 22%, リポソーム封入 BLM で 27.5% と、リポソーム封入側に、G₂-block effect の増強されていることが観察された (図 5)。Ara-C においては、2mcg/ml, 10 mcg/ml の濃度では、free およびリポソーム封入側の間に明らかな殺細胞効果の差を認めないが (図 6), 6 mcg/ml においては、リポソーム封入に著しい増殖抑制を認めた (図 7)。CPDD では、2mcg/ml の濃度で、リポソーム封入側に、強い増殖抑制を認めたが (図 8), 5mcg/ml, 10mcg/ml の濃度では、両者共に、著しく増殖が抑制され free および、リポソーム封入側との間に、差はみられなかつた。同様に、MTX の KU-2 細胞間に対する殺細胞能を検討すると、free-MTX では、5mcg/ml, 20mcg/ml の濃度のいずれにおいても増殖抑制効果は低く、両群間に、明らかな差は認めなかつたが、liposome-MTX では、共に著明な増殖抑制を示し、リポソーム封入による、殺細胞効果の増強を示した (図 9)。

培養細胞に対する、リポソーム球の作用を検討するため、透過型電子顕微鏡にて、リポソーム接触 24 時間後の KU-2 細胞を観察すると、細胞質内に多重層構造を呈する、リポソーム球が観察され、細胞内への取り込みが証明された (図 10)。

(3) in vivo における薬剤封入リポソームの体内動態

5mg の free およびリポソーム封入 BLM を腹腔内投与した際の、薬剤投与 24 時間後の各種臓器における BLM 組織内濃度は、リポソーム BLM において、肝に

Figure 5 Effect of free & liposome-entrapped bleomycin on the cell cycle traverse of KU-2

Figure 6 Effect of free or liposome-entrapped ara-C on the growth of KU-2 cells in vitro

Figure 7 Effect of free or liposome entrapped ara-C on the growth of KU-2 cells in vitro

図8 Effect of free or liposome-entrapped CPDD on the growth of KU-2 cells in vitro

図9 Effect of free or liposome-entrapped MTX on the growth of KU-2 cells in vitro

3 倍，脾に5.8倍と，リポソーム BLM において，高値を認め，リポソーム BLM が網内系に集積する傾向を認めた．しかしながら腫瘍組織では free およびリポソーム封入側，共に低値であつた（図11）．

（4） in vivo における治療効果

ヌードマウス可移植性ヒト睾丸腫瘍（KUNU-1）に対する free およびリポソーム封入 BLM の治療効果に対する検討では，薬剤投与後 5 日後の腫瘍サイズで，

図10 KU-2 の細胞質内に，多重層構造を示す，リポソームが多数認められた．

図11 Concentration of bleomycin in the tissues

	12 hours after injection		24 hours after injection	
	free-BLM	Liposome-BML	free-BLM	Liposome-BLM
Liver	0.14±0.09	0.36±0.09	0.12±0.045	0.36±0.09
Spleen	0.50±0.18	3.3 ±1.2	0.42±0.15	3.0 ±0.26
Kidney	0.36±0.09	0.66±0.3	0.32±0.045	0.5 ±0.07
Lung	0.36±0.05	0.54±0.05	0.34±0.054	0.42±0.044
Bone	0.1	0.1	0.1	0.1
Brain	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Tumor	0.175±0.09	0.2±0.08	0.2±0.1	0.17±0.058
Blood	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

図12 Growth rate of the testicular tumor transplanted to the nude mice

free-BLM は、 $91.1 \pm 8\%$ であつたが、リポソーム封入群では、 $76.1 \pm 14\%$ と、リポソーム封入群により強い腫瘍縮小効果を認めた (図12)。

III. 考 案

リポソーム膜の作製にあつては、できるだけ均一で安定性のあるものを作るため、種々の工夫がなされ、現在のところ、その基剤として、phosphatidylcholine (PC)が多く使用されている。これはPCが比較的自然界に多く、得やすいこと、物性研究が進んでいることなどがその理由として挙げられる。また小胞球の安定化に寄与すると考えられるコレステロールの添加²⁾、

リポソーム表面に帯電するための、Deamer 法⁴⁾、Papahadjopoulos 法⁵⁾の開発、均一な一枚膜リポソームを作成するための超音波処置など⁶⁾、目的に応じた、より安定なリポソームの作製のための努力が重ねられている。著者らはKinsky⁷⁾らの方法に準じて、リポソームを作製したが、薬剤封入率は4～13%、release rate は、24時間後で20～30%と、比較的安定な、薬剤封入リポソームが、作製されたものと考えられる。

in vitro における殺細胞効果に対するリポソームの影響を検討した結果では、BLM、MTXにおいて、明らかにリポソーム封入による細胞増殖抑制効果の増強を認め、さらにリポソーム封入 BLM においては、flow microfluorometry により、BLM の G_2 block effect の増強を確認しており、この殺細胞効果が、リポソーム封入による薬剤自身の効果増強のためであると考え、Mayhew⁸⁾らによれば、ara-C 封入リポソームでは、L1210 細胞に対する殺細胞効果は、free ara-C との間に差を認めなかつたとする報告があり、一方、Papahadjopoulos⁹⁾らにより、アクチノマイシン D の場合、in vitro で、リポソーム封入化による効果増強を示す結果が示されており統一された結論はでていない。著者らの実験では、ara-C の場合、その薬剤濃度を序々に増して行くと、リポソーム封入側に、低濃度で強い増殖抑制を認めており、in vitro においても、その効力増強を示しているものとする。この殺細胞効果の増強される理由として、まず薬剤の不活性化の抑制が挙げられる。たとえば、BLM の場合、マウスの組織乳剤と薬剤を混合し、incubate すると、肝、脾、睾丸、腎組織では、短時間でかなりな程度に不活化が起こることが知られており¹⁰⁾、この不活化が、リポソーム封入により妨げられるものと思われる。次に細胞内への薬剤の取り込みの増加が考えられる。この点に関して、Papahadjopoulos¹¹⁾ Martin¹²⁾、前述の Mayhew⁸⁾ら諸家により、薬剤の細胞内への取り込みが、リポソーム封入化により、free の薬剤と培養細胞とを接触させた場合に比し、著明に増加する報告がされている。このような、薬剤の細胞内取り込みを増加させる機序、つまり、細胞とリポソームとの相互作用に関しては明らかでないことが多く、吸着によるとするもの¹³⁾、6-カルボキシルフルオレッセンを使用した実験結果により、融合 (fusion) とするもの¹⁴⁾、endocytosis により細胞内に入るとする説¹⁵⁾¹⁶⁾、がある。著者らの、培養細胞にリポソームを作用させた後の電顕観察では、多数のリポソームが細胞内に証明されており、培養細胞の

ような, endocytic activity の高まっている状態では, リポソームは, endocytosis により細胞内に取り込まれるものと考えられる。

in vivo における薬剤封入リポソームの体内動態に関しては, 網内系に集積することが多くの実験系により明らかにされており, 著者らの KUNU-1 を使用した実験でも, 同様の結果を得た。McDougall¹⁷⁾, Dunnick¹⁸⁾らの, 腹腔内投与により, 網内系への移行が減少するという報告や, リポソームの大きさ, 電荷等によつても, その体内分布に変化が生じるようである。いずれにしても, リポソームの単独投与では, 標的細胞に薬剤を特異的に取り込ませることは不可能であり, Uchida,¹⁹⁾ Yatvin²⁰⁾, Leserman²¹⁾, 等により, 標的細胞への薬剤の取り込みを高めるための種々の工夫がなされている。

in vivo における抗腫瘍効果については, リポソーム封入化による薬剤の治療効果増強を示す結果が, BLM²²⁾, Ara-C²³⁾, MTX²⁴⁾, ACD²⁵⁾²⁶⁾, において, 諸家により示されている。最近, Kaye²⁷⁾らによる報告では, Ridgway osteosarcoma (ROS) 移植 AKR マウスに対し, phase non specific は薬剤である actinomycin D と, phase specific な methotrexate の 2 種の薬剤に対して, リポソーム封入化による, 抗腫瘍効果を検討したところ, methotrexate においては, free-methotrexate より, 腫瘍増殖抑制の増強および正常組織に対する毒性の増加を認めたのに対し, actinomycin D では, free actinomycin より, 腫瘍増殖抑制効果の減弱, 正常組織への毒性低下を認めた実験系を示し, 薬剤の体内分布と考え併わせて, methotrexate 封入リポソームの抗腫瘍効果増強は, 徐放性によるものと結論している。著者らの実験結果でも, リポソーム封入による腫瘍組織内濃度が, free-BLM に対し, 差を認められないことより, in vivo における bleomycin のリポソーム封入化による抗腫瘍効果の増強は, 徐放性によるものと考えられる。したがって, 現在のところ, 薬剤のリポソーム封入による, 抗腫瘍効果増強は, phase specific な薬剤に限り有効であると考えられる。

以上, 癌化学療法における薬剤修飾法として, 薬剤のリポソーム封入化は, その有力な一手法と考えられるが, さらに標的細胞に対する選択性を保持させるための研究が必要と考えられた²⁸⁾。

IV. 結 語

- ① phosphatidylcholin/cholesterol/stear-

ylamine = 7 : 2 : 1 の 3 種の脂質により, リポソーム封入制癌剤を作成した。

② ヒト腎癌培養細胞株 (KU-2) に対する殺細胞効果は, bleomycin, methotrexate, において, リポソーム封入化により増強された。

③ ノードマウス可移植性ヒト睾丸腫瘍 (KUNU-1) に対する腫瘍増殖抑制効果は, free-bleomycin に比し, リポソーム封入 bleomycin で増強された。

④ KUNU-1 に対し, free およびリポソーム封入 bleomycin を腹腔内投与後, 12時間, 24時間の各種臓器の bleomycin 濃度を比較すると, リポソーム封入群で, 脾, 肝, 腎において free-bleomycin に比し高値と認めた。しかし, 腫瘍内 bleomycin 濃度には差がなかった。

⑤ 以上の結果より, bleomycin のリポソーム封入に伴う, 抗腫瘍効果の増強は, 徐放性によるものと考えた。

文 献

- 1) 日本公定書協会監修：日本薬局方解説書。第十改正。E48—51, 廣川書店, 東京, 1981。
- 2) Papahadjopoulos, D., Cowden, M. and Kimelberg, H.: Role of cholesterol in membranes, effects on phospholipid protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 330 : 8—26, 1973.
- 3) Kobayashi, T., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Enhancement of the cancer chemotherapeutic effect of cytosine arabinoside entrapped in liposomes on mouse leukemia L-1210. *G.A.N.N.*, 66 : 719—720, 1975.
- 4) Deamer, D. and Bangham, A.D.: Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochem. Biophys. Acta* 443 : 629—634, 1976.
- 5) Papahadjopoulos, D., Vail, W.J., Jacobson, K. and Poste, G.: Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 394 : 483—491, 1975.
- 6) Huang, C.: Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8 : 344—352, 1969.
- 7) Haxby, J.A., Kinsky, C.B. and Kinsky, S.C.: Immune response of a liposomal model membrane. *Proc. N.A.S.*, 61 : 300—307, 1968.
- 8) Mayhew, F., Papahadjopoulos, D., Rustum, Y. M. and Dave, C.: Inhibition of tumor cell growth in vitro and in vivo by 1-D-arabinofuranosylcytosine entrapped within phospholipid vesicles. *Can. Res.* 36 : 4406—4411, 1976.

- 9) Papahadjopoulos, D., Poste, G., Vail, W.J. and Biedler, J.L.: Use of lipid vesicles as carriers to introduce actinomycin D into resistant tumor cells. *Can. Res.*, **36** : 2988—2993, 1976.
- 10) 藤田 浩, 沢部孝昭, 土田裕子, 木村禮代二: Bleomycin の不活性化について. *Chemotherapy*, **18** : 372—373, 1970.
- 11) Papahadjopoulos, G., Poste, G., Schaeffer, B.E. and Vail, W.J.: Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **352** : 10—28, 1974.
- 12) Martin, F. and MacDonald, R.: Liposomes can mimic virus membranes. *Nature*, **252** : 161—163, 1974.
- 13) Panano, R.E. and Takeichi, M.: Adhesion of phospholipid vesicles to chinese hamster fibroblast. *J. Cell Biol.*, **74** : 531—546, 1977.
- 14) Weinstein, J.N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R. and Hagins, W.A.: Liposome-cell interaction: Transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science*, **195** : 489—492, 1977.
- 15) Poste, G. and Papahadjopoulos, D.: The influence of vesicle membrane properties on the interaction of lipid vesicles with culture cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **309** : 164—184, 1978.
- 16) Papahadjopoulos, D., Poste, G. and Mayhew, E.: Cellular uptake of cyclic AMP captured within phospholipid vesicles and effect on cell-growth behaviour. *Biochim. Biophys. Acta*, **363** : 404—418, 1974.
- 17) McDougall, R., Dunnick, J.K., Goris, M.L. and Kriss, J.P.: In vivo distribution of vesicles loaded with radiopharmaceuticals: A study of different routes of administration. *J. Nucl. Med.*, **16** : 488—491, 1975.
- 18) Dunnick, J.K., Badger, R.S., Takeda, T. and Kriss, J.P.: Vesicle interactions with antibody and peptide hormone. Role of vesicle composition. *J. Nucl. Med.*, **17** : 1073—1076, 1976.
- 19) Uchida, T.: Reconstitution of lipid vesicles associated with HVJ (Sendai virus) spikes. Purification and some properties of vesicles containing non-toxic fragment A of diphtheria toxin. *J. Cell. Biol.*, **80** : 10—20, 1979.
- 20) Yatvin, M.B., Muhlensiepen, H., Porschen, W., Weinstein, J.J. and Feinendegen, L.E.: Selective delivery of liposome-associated cis-dichlorodiammineplatinum (CDDP) by heat and its influence on tumor drug uptake and growth. *Can. Res.*, **41** : 1602—1607, 1981.
- 21) Leserman, L.D., Weinstein, J.N., Moore, J.J. and Terry, W.D.: Specific interaction of myeloma tumor cells with hapten-bearing liposomes containing methotrexate and carboxyfluorescein. *Can. Res.*, **40** : 4768—4774, 1980.
- 22) Gregoriadis, G. and Neerujun, E.D.: Homing of liposomes to target cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **65** : 537—544, 1975.
- 23) Kataoka, T. and Kobayashi, T.: Enhancement of chemotherapeutic effect by entrapping 1-D-arabino-furano-sylcytosine in lipid vesicles and its mode of action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **309** : 387—394, 1978.
- 24) Kimelberg, H.K., Tracy, T.F., Biddlecome, S.M. and Bourke, R.S.: The effect of entrapment in liposomes on the in vivo distribution of ³H methotrexate in a primate. *Cancer Res.*, **36** : 2420—2457, 1976.
- 25) Rahman, Y., Cerny, E.A., Tollaksen, S.L., Wright, B.J., Nance, L.S. and Thomson, J.F.: Liposome-encapsulated actinomycin D: Potential in cancer chemotherapy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **146** : 1173—1176, 1974.
- 26) Rahman, Y., Kisieleski, W.E., Busess, E.M. and Cerny, E.A.: Liposomes containing ³H-actinomycin D. Differential tissue distribution by varying the mode of drug incorporation. *Europ. J. Cancer*, **11** : 883—889, 1975.
- 27) Kaye, S.B., Boden, J.A. and Ryman, B.E.: The effect of liposome (phospholipid vesicle) entrapment of actinomycin D and methotrexate on the in vivo treatment of sensitive and resistant solid murine tumours. *Europ. J. Cancer*, **11** : 279—289, 1981.
- 28) 曾根三郎, 蝶良英郎, Fjidler, I.J.: 癌転移治療—人工脂質膜(リボソーム)を用いた新しい試み—. *Oncologia*, **1** : 18—36, 1982.
(1982年5月17日受付, 特別掲載)