薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (12) 1211-1222 (1984)

Drug Delivery をめぐる動き

瀬崎 仁

京都大学薬学部, 〒606 京都市左京区吉田下阿達町

Trends in Drug Delivery

HITOSHI SEZAKI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
Yoshidashimoadachicho, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan*

This paper reviews the developments of drug delivery with special attention on its controlled release and drug targeting. Finally, the importance of multidisciplinary informations and how they are integrated in a systematically meaningful manner to achieve an optimization of cancer drug delivery are discussed by taking lipophilic prodrugs and dextran-conjugated macromolecular prodrugs of mitomycin C as an example.

Keywords—drug delivery; controlled release; targeting; cancer chemotherapy; macromolecule-drug conjugate; prodrug

疾病のメカニズム解明が進むにつれて、薬物の作用の本質も次第に浮き彫りにされようとしている。生化学的手法の発達には薬物の作用をレセプターレベルでとらえ得る道を開き、洗練された速度論的アプローチは生体内における薬物量の時間的推移をかなりの確度で追跡することを可能にした。これに伴って古くから用いられてきた薬物の投与手段すなわち剤形や適用方法などが、薬物固有の性質を最大限に発揮するという点で最適のものであったかどうか、また、安全性、使用上の便、経済性など様々な面で改良すべき余地が残されていないかどうかということが再検討されはじめ、ここに物質としての医薬品に関する科学と投与方法に関する科学とを巧みに総合することによって、より洗練された医薬品の使い方を可能にしようとする **drug delivery** なる概念が注目されるようになってきた。

新しく開発されつつある薬物の中には、それ自身不安定で生物学的利用性の点でも問題がある上に、微量で生理活性が強いものが少なからず見出されてきている。それらの製剤化に際しては、これ迄にも増して安定性や均一性の保証といった製剤技術の厳しい適用が求められつつあり、中には、先行する原体の開発に対応すべき製剤技術の水準が、それらを医薬品として世に送り出す鍵を握っている事例すら見受けられ、不断の努力により各種新技術の導入が試みられつつある。**Drug delivery** の概念を広義に解釈すればこのような場合をも包含することになるが、少なくとも研究あるいは製剤設計の思考過程ではより狭義に、各種のソフトテクノロジー、とくに薬物の物性、作用、体内速度論や適用条件に関する情報などを主体として1つの形あるものに組み上げる科学としてとらえられている。すなわち、究極的には薬物の作用発現部位もしくは標的部位における時間と薬物量の関係がどうあるべきか、また逆に望ましくない作用の発現についてはどうかをとらえ、両者を総合して、薬物が与えられるであろう **host** 側の諸条件に対応した薬物量の最適な時間的推移像を明らかにし、これに薬物の体内への送り込み様式を対応させるということになる。¹⁾ この際、送り込みの科学を支える上で新しい製剤技術や新素材の導入が不可欠となることはいう迄もない。²⁾

標的細胞の増殖サイクルを考慮した薬物の投与や、日内変動を加味した投与時間、投与量の調節などの試みはこれ迄にも行われてはいたが、一般に、薬物を体内に送り込む速度や時間によって用量・反応曲線がシフトするとか、体内分布や作用の質そのもの迄も変化するという現象に対する理解は乏しく、明確な意識を持ってそれらを剤形の設計に結びつけるという試みが現実のものとなり始めたのは比較的最近のことである。³⁾ しかしなが

本総説は昭和 58 年度日本薬学会年会特別講演者に薬誌編集委員会より執筆を依頼したものである。

ら、ひとたび具体的な製剤が出現しその成果が認識されるに及んで **drug delivery** に対する関心もにわかに高まり、薬学のみならず他の多くの関連領域でも活発に採り上げられはじめるに至った。⁴⁾

Controlled Release

Drug delivery の分野に大きな刺激を与えたものは米国 **Alza** 社による一連の **drug delivery system (DDS)** の開発であった。**Alza** 社の **DDS** は、錠剤とかカプセル剤、貼布剤といった外観的な形状よりも、むしろ一群の製剤が共通して持っている特異な機能性 (**functionality**) とくにいわゆる “**controlled drug delivery**” に重点を置いたものである。ここでいう **controlled delivery** とは「生体に適用されたあとの薬物の放出性、体内動態などをシミュレートし得る *in vitro* の系においてあらかじめ設定され予測し得る放出速度、放出時間 (放出様式) に従って薬物が放出される」また、さらに進んで特定の症状あるいは治療条件に最も望ましい放出様式を考え、それが生体内でうまく再現される (**pattern specific** な **drug delivery** が可能な) ように工夫されているという意味である。

これ迄に開発され実用化された **DDS** は、**pilocarpine**, **scopolamine**, **progesterone**, **indomethacin**, **phenylpropanolamine** など古くから用いられてきた薬物に関するものが多かった。また、**nitroglycerin** 外用剤のように、はじめて予防を目的とした使用を可能にしたものなどもあり、**clonidine (seven-day transdermal)** のように臨床試験段階のものもある。⁵⁾ **Alza** 社の **DDS** のあるものは既に米国薬局方にも収載されていたが、各種の **controlled release** 型の製剤の流通に伴って、米国薬局方委員会としてもその対応を迫られ、1983 年夏、**Modified-release** 製剤の一部について用語の定義付けを行うと共に、**extended-release**, **delayed-release** の 2 種の剤形についての試験法案を提出している。^{6,7)}

かつての徐放性製剤の多くが経口剤を対象としていただけに、現在でもこの経路についての **controlled release** の研究は精力的に進められつつある。^{8,9)}

また、放出速度調節のみならず **Table I** に示したような消化管内での滞留時間を延長する各種の試みも行われている。^{10,11)} これらは、一般の薬物は勿論、消化液への溶解性に問題があるとか消化管の特定部位での作用を期待する、あるいは吸収部位が限定されているといった薬物に対しても有用と考えられている。¹²⁾ 今後内因性物質もしくはそれらに近似した合成医薬品の開発が進められ、各種のペプチド医薬品などが生まれてくると予測されているが、それらの生物学的半減期がほとんど秒～分単位であるところから、**controlled release** 型の **delivery** に頼らなければならない面が多い。¹³⁾ また、人工睾丸における **testosterone** のように、薬物自体の半減期を云々する範囲をはるかに超える長期間にわたっての放出技術、それも再現性のあるものが求められるものと思われる。

DDS はまた、医薬品の研究開発段階への応用が精力的に進められつつあり種々の新しい試みが発表されつつある。これについては **Urquhart** らの総説¹⁴⁾ に詳しく述べられているが、埋め込み型 **DDS** による組織への薬液の連続的な微量定量注入 (**tissue microperfusion**)、定量送達によるホルモン濃度の制御、生体リズム、薬物速度論、リバウンド、耐性などの研究をはじめ多方面への応用が検討されつつある。これらの研究が進むにつれて、従来からひろく用いられてきた実験法が改良されるなどの例も見受けられている。¹⁵⁾ また、体内での放出部位近傍における薬物側の諸性質の変化 (生体成分との結合、薬物自身の会合や組織内拡散性など) やそれらの調節といった薬物自体の化学に関しても、**DDS** 化の立場からする地味な検討が必要なものも明らかになってきた。¹⁶⁾ このような問題は、**DDS** 自体の性能や取り扱い、さらには用途に関しても新しいヒントを与えるものであり、それが次の改良につながるというケースも生まれつつある。このように **controlled release** の技術は医薬品についてもなお多くの潜在的な可能性を持っているが、最近では、生理活性物質全般について各方面から興味を持たれるに至っており、そのための学会 (**Controlled Release Society**) や学会誌 (**Journal of Controlled Release**) の誕生を見た。そこにとりあげられている内容は **Table II** に示すごとくまことに多様であり、個々の技術、材料、応用、ソフト、行政面での扱いなどそれぞれについて広汎な検討が行われている。

TABLE I. Prolongation of the Gastrointestinal Residence Time

1. Intragastric floating tablets
2. Intragastric floating drug delivery device
3. Gastro-inflatable drug delivery device
4. Intragastric osmotic-controlled drug delivery system
5. Intragastric drug-containing film
6. Intra-rumen controlled release drug delivery device
7. Bioadhesive system

TABLE II. Areas Covered in the 1984 Meeting of the Controlled Release Society (Florida)

Agricultural products	Pheromones, herbicides <i>etc.</i>
Pharmaceutical products	Orals, injectables, transdermal, <i>etc.</i>
Veterinary products	Nutrients, growth regulators <i>etc.</i>
Cosmetics	Fragrances, emollients <i>etc.</i>
Processes and devices	Coating, microencapsulation <i>etc.</i>
Polymeric excipients	Natural, biodegradable <i>etc.</i>
Encapsulated living cells	Cell culture, scale-up <i>etc.</i>
Pharmacology and biocompatibility	Efficacy, pharmacokinetics <i>etc.</i>
Liposomes and erythrocytes	Crosslinked, targeted delivery <i>etc.</i>
Controlled release theory	Diffusion, externally modulated <i>etc.</i>
Targeted delivery	Receptor specific, bioadhesion <i>etc.</i>
Regulatory matters	Government policy, recent approvals <i>etc.</i>
Commercial products	Economics, marketing <i>etc.</i>

Targeting

薬物投与の最適化をはかる上で治療係数の増大は大きな目標の1つとなっている。これを達成するためには、薬物を本来望まれる部位にのみ送り込む、あるいは分布させ、そこでの薬物量の時間的推移をもコントロールすることが最も望ましいわけである。勿論、薬物が到達すべき部位と副作用発現部位が同一である場合には、より特別な工夫が必要となる。また、薬物自体の化学的安定性、生体膜透過性、生物学的半減期、分布容積、使用上の便、経済性など他の多くの理由から **targeting** が望まれる場合も少なくない。現在までのところ、標的は微生物そのものから特定の臓器、腫瘍、酵素あるいはレセプターと多岐にわたっているが、薬物の作用機序が明らかにされてくるのに伴ってより明確なものとしてとらえられ、それへの対応すなわち **targeting** が望まれるようになることは明らかである。

Tomlinson は、**drug delivery** を Table III に示すように4つの世代に分けている。¹⁷⁾ そこでは **targeting** は第四世代の DDS に位置づけられている。一方 Widder ら¹⁸⁾ は **targeting** を三段階に分類し、一次の **targeting** を特定器官への分布、二次のそれを器官内の特定部位への分布、三次を細胞内への特異的送り込みとしている。これらは薬物投与形態、投与方法といった、薬を与える側の条件設定によってコントロールすることが可能である一方、併用薬物や病気といった、**host** 側の諸条件によって影響を受ける。

Targeting に関しては一般的な手法がいくつか発表されている¹⁹⁾ が最も直接的な方法は局所適用型の **delivery** である。これらは、既に開発されている眼科用 DDS、子宮内適用 DDS、粘膜付着製剤の例を待つ迄もなく、放出コントロールの技術が中心となっている。しかし中には腫瘍内注入のように特殊な

TABLE III. Phases of Drug Targeting¹⁷⁾

First generation	Pills, tablets, capsules <i>etc.</i>
Second generation	Sustained release, prodrugs <i>etc.</i>
Third generation	Controlled release devices
Fourth generation	Targetable delivery systems

のもあり、**inverse-targeting** と呼ばれている **nitroglycerin** 外用剤の例もある。直接適用であるだけに、あらかじめ設定した放出速度や意図したシステムの特徴が適用部位での生体側条件によって影響を受けることが比較的少なく多くの場合治療の中断も容易である。また、併用薬物による相互作用や疾病による速度論的パラメータの変動もほとんどない。放出のコントロールは多くの場合速度を規定する高分子膜の利用や薬物自身ないしは系内の薬物の熱力学的活量の定量化などに依存しており、*in vitro* の系における基礎的研究が進められている。薬物によっては、単位のシステムに組み込むべき量に制限がある、つまり必要量が多過ぎるとか、定量的に放出される部分が単位システム内の全薬物量に対して小さ過ぎるとか **dumping** 防止策など、なお解決されるべき問題が少なくない。また、薬物自体のままではその物性からしてシステムへの組み込みに難があり、化学修飾あるいは添加物を利用して改変し適用の幅を拡げなければならない場合も少なくない。

局所投与がマクロ的にもせよ **targeting** そのものであるのに対し、経口投与であれ注射剤による投与であれ、投与後薬物が血流によって体内を循環しながら分布してゆくタイプでは **targeting** はたとえマクロレベルのそれであっても容易ではない。このような場合、(1) 薬物に製剤的な修飾を施すことにより **targeting** をはかる、つま

り製剤処方上の工夫や、なんらかの物理的な担体 (carrier, vehicle など) を利用するか, (2) 化学構造に手を加えるとか, (3) 両者の組み合わせによる DDS の設計, さらには (4) として, できあがった DDS に実際に使用する際の医療技術を加味するなどの方法が考えられる.²⁰⁾ これらのうち (1) については脂質・界面活性剤混合ミセルと dextran sulfate-bleomycin 複合体による大腸内投与後のリンパ移行性の賦与に見る製剤処方面での研究²¹⁾のほか, 担体としての emulsion, liposome, それらをも含めてひろく microsphere に関するものなど多種多様な研究が行われている. それらは, microsphere の材料, 製造技術, 薬物包含性, 放出性, 安定性をはじめとする製剤上の問題,^{22,23)} 投与後の生体適合性, 体内挙動, 投与方法, 投与後の誘導法, 体外からの観察法, さらには特殊用途の開発などにも及んでいる. また, 「Frontiers in liposome research-targeted chemotherapy」「Use of liposomes in Medicine」²⁴⁾ であるとか「Microspheres and drug therapy」といった個々の担体についてのシンポジウムなどがさかんに開かれている. この種の targeting はいわば担体の性質とくに物理的な寸法が体内分布の大まかなふりわけの鍵をにぎっており, 生体側に備わっている処理機構によって支配される場合が多くどちらかといえば passive な targeting と考えられるものである.

注射による脈管内投与法では, 担体の寸法の基準として毛細血管の内径を考えると, これより大きいものはたとえば腫瘍近傍への投与によって動脈血管を塞栓²⁵⁾する形となり, 同じかより小さいものは網内系によって処理されたり endocytosis によって細胞内へ取り込まれたりすることになる. したがって, 静脈内に投与した場合, ある範囲のものが肝臓に集まり, より大きなものが肺に集まることを大まかに予測することができる. これらの臓器が標的部位であれば問題はないが, 血液中での滞留時間の延長をはかるとか, 他の部位に分布させようとするればそれなりの工夫が必要である. また, 医薬品として開発され安定した品質の生産が得られるためには生産性, 薬物及び担体の化学的, 物理的安定性, 担体への薬物の包含性, 抗原性, 体内での分解性²⁶⁾などと共に他剤との併用の可否, 病態時の体内挙動, 連続投与時の体内動態, 注射速度をはじめとする投与条件などが十分に検討されていなければならない.²⁷⁾

生産性の問題は, liposome における凍結乾燥法, 凍結融解法など界面活性剤や有機溶剤を使わず緩和な条件による製造法も発表されており,²⁸⁾ 動物用薬品を含め具体的な製品の開発も進められつつある.²⁹⁾ また粒度分布の点でも種々の改良が行われている. 安定性についても, 担体の材料の改良, 薬液処方による化学的安定性の確保, 用時溶解型などが検討されている. 包含効率については, 凍結融解法の採用, 薬液のイオン強度や組成に対する配慮によって増大をはかる試みが発表されており, このような改良によってもなお包含性の劣るものあるいは担体内の特定部位 (たとえば脂質相) への薬物の局在性の改良を目的として, 主薬と添加物の相互作用や主薬の化学修飾による物性改良の試みが報告されている. 物性の改良は包含率や放出性の調節のみならず, 投与後の薬物の体内挙動にも大きな影響を与えるものであり, 今後個々の薬物についての詳細な研究が望まれるところである. すなわち, 担体の形としての分布特性に加えて, 標的における主薬の放出挙動とか, prodrug であればその放出あるいは親化合物への変換速度などを種々調節することにより, より多様な delivery 様式を持たせることが可能となるからである. たとえば, 静注用脂肪乳剤の油滴中にステロイド剤である dexamethasone palmitate を包含させた場合, 油滴の炎症巣への移行が著しく高く, より少ない投与量で効果を発現し副作用を抑制する.³⁰⁾ この際, 脂溶性 prodrug を用いることは油滴中への包含率を高める点で有利である. しかし, prodrug の加水分解速度が加わるため, 急性の炎症であるラットカラゲニン浮腫ではフリーの dexamethasone とその抗炎症効果がほぼ同じであり炎症のタイプによって効果に差が現れるなどの興味ある性質が見られる. 同様の試みは prostaglandin E₁ (PGE₁) についても行われている.³¹⁾ また, indomethacin ester を用いた同種製剤では, targeting 以外にも, これ迄不可能であった静脈内投与を可能にするという剤形拡大のメリットも生まれている.

この種の delivery system の脈管内投与に際しての大きな問題の 1 つは網内系への分布の調節であり³²⁾ 他の 1 つは脈管外への送り込みである.³³⁾ 前者については担体の大きさ, 表面の荷電状態, 膜の流動性, 生物学的認識能の賦与などが試みられている. 後者については先の脂肪乳剤のように, 炎症部位の血管透過性の昂進を利用するとか担体をさらに単球やマクロファージの動きに託す, いわば薬物の入った運搬体をさらにコンテナに積みかえて輸送する形なども考えられている.³⁴⁾ 事実, ヒト単球を介してのマクロファージ活性化因子の送り込みは liposome に包含させた方が有利であるなどの知見も得られている. また, 抗体の利用³⁵⁾のほか脂質二分子膜小胞の可逆的重合-脱重合のコントロール³⁶⁾ 磁力による外部からの誘導,³⁷⁻³⁹⁾ 構成脂質の相転位一熱に対する性質を

TABLE IV. Some Properties Required for Macromolecular Carriers

1. The carrier and its metabolic degradation products lack all intrinsic toxicity.
2. The carrier and its metabolic degradation products must be nonantigenic and should not adversely alter the antigenicity of transported agents.
3. The carrier and its metabolic degradation products must be biodegradable or at least should not show any serious accumulation in the body.
4. The carrier must have adequate functional groups for chemical fixation.
5. The carrier-agent conjugate must retain the original activity of conveyed agent, until it reaches the site of action or release the transported drug in predesigned manner.
6. The carrier-agent conjugate must retain the desirable specificity of the original carrier compound.

利用し、投与後体内局部を加温することによって内容薬物を liposome から放出させる⁴⁰⁾といった外部エネルギーの利用による **active targeting** も種々検討されている。

担体の中には、これ迄述べてきたような人工微粒子のほか赤血球などを用いる場合もある。⁴¹⁾ また各種の化学的(分子レベルの)なものも検討されつつある。たとえば、**peptide** を用いた例が抗菌剤 (**alafosfalin**), 利尿剤 (**γ -Glu-Dopa**), 抗悪性腫瘍剤 (**Leu-Leu-daunorubicin**) などについて報告されている。⁴²⁾ これらの **peptide** 担体は細胞近傍あるいは細胞内で **peptidase** により分解を受け活性部分を放出することが期待されているものであるが、標的細胞表面に存在するレセプター、細胞膜の特殊輸送系を利用したものも検討されている。また高分子と薬物を結合させた形も考えられており、⁴³⁾ 高分子のままで作用を発現する **polymeric drug** と対応する形で **polymer-carried drug** とも呼ばれている。この種の薬物の活性は直接的には分子内の薬物部分によって発揮されるものであって、担体である高分子側はそれ自体不活性である。しかし、高分子部分あるいは分子全体として示される高分子的諸特性は主薬の安定性の改善、溶解性あるいは配合性といった製剤面ばかりでなく、生体に適用されたあとの速度論的側面すなわち吸収や安定性そして **targeting** の面で様々な特長を発揮することになる。このような高分子担体が具備すべき条件の主なもの Table IV に示したが、そこに示されている多くの制約を上回る可能性が存在することも確かである。⁴⁴⁾

一方、特異抗体をはじめとする生物学的認識機能の賦与という立場から見れば、物理的な担体の場合と同様に高分子担体への結合も可能である。この際薬物側の活性の保持; 生物学的認識能の保持; 抗体、高分子、薬物間の量的バランスが薬物の投与量や投与スケジュール、経済性からみて許容範囲におさまるかどうかなどが検討の対象となる。このような **targeting** がはたしてミクロレベルのそれとしての条件をどの程度満足し得るのかについては議論の分かれるところである。たとえば、細胞表面に迄うまく到達したとしても、細胞内にある標的に迄薬物の必要量が到達し得るかどうかとか、投与部位から細胞に到達する迄の物理的、化学的障壁があまりにも多過ぎる上に自走能力を持たないものについては標的部位での利用率は極めて小さくかつバラツキも大きいとの説もある。しかし、投与部位の選択、投与法の改良によって、また目的によっては今後の利用に期待が持てる場合もある。⁴⁵⁾

Targeting の中にはもっぱら薬物の分子設計、それも高分子以外の手法によるものが古くから行われている。いわゆる選択毒性の概念がそれである。この場合、一般に薬物は投与部位から全身に広く分布することになるが標的においてのみ活性が認められることになる。このような試みは Ehrlich 以来ある程度成功を収めてきた。最近の例では β -lactam 系抗生物質や **acyclovir** などがあげられる。**Targeting** を狭義に解釈すれば、作用の選択性はあっても作用部位あるいは標的への選択的な分布は見られないわけであり、**delivery** という点でもややニュアンスを異にする面がある。しかし選択毒性の高い β -lactam 系抗生物質でさえ、気道系への分布の向上など、一次レベルの **targeting** に解決すべき問題が少なくない。また、**site-specific** などの形容詞がつけられ、経口投与後消化管下部(作用部位)で活性型に変換される緩下剤⁴⁶⁾や潰瘍性大腸炎治療用 **prodrug**⁴⁷⁾ (**site-specific activation**) などの例も報告されている。

物理的担体において用いられた外部エネルギーの応用はこの場合にも見受けられる。たとえば、癌のレーザー光療法がそれである。すなわち、静脈注射によって投与された **hematoporphyrin** 誘導体の腫瘍内移行性とアルゴンレーザー光を照射してこれを活性化することの組み合わせにより癌細胞を破壊するわけである。

最近化学修飾による脳内分布増大の試みが **chemical delivery system** と称して報告されている。⁴⁸⁾ 薬物の脳内移行性の改良, 換言すれば脳内への **targeting** は極めて魅力ある研究対象であり, Table V に示すような試みが行われてきた。^{49,50)}

通常の投与方法によっては脳内のみ特異的に薬物を送り込むことは困難であり相対的な選択性の向上が当面の目標となっている。この際特殊な輸送系を介して薬物を送り込むことは, 病態や併用投与される薬物, 食餌成分などによって影響を受けるおそれのあるところから, 送り込みには **prodrug** の脂溶性を利用し, 脳内からの流出速度が遅いことを利用した試みが (**PAM**), **berberine** 等の薬物について報告されている。前者の場合, 4級塩基である **2-PAM** を一時的に対応する **dihydro-2-PAM** (**pro-2-PAM**) とするものである。**Pro-2-PAM** は, **PAM** に比して脂溶性に富み, 血液脳関門を通過したあと (**NADH**⇌**NAD**) 補酵素系により **PAM** に変換され脳内に滞留する。この方法を分子内に **pyridinium moiety** を有する薬物に迄拡大した例が抗悪性腫瘍アルカロイドである **berberine** に見られる。すなわち **berberine** を **dihydro** 体とすることによって分配係数が増大し, その脂溶性を利用して脳内に送り込み, 酸化還元系によって極性の強い **berberine** に変換し脳内への封じ込めを計ったものである (**Fig. 1**)。

一般に薬物を標的部位に到達させることに成功したとしても, **efflux** 機構によって, 必要とする量の薬物をそこに滞留させることが困難な場合が少なくない。**Berberine** の場合, 脳内からの汲み出し機構は必ずしも明らかではないが, ラットについて大量の **N-methylnicotinamide** を脳室内に投与し **berberine** を共存させても後者の **efflux** 半減期に変化が認められなかったことなどから, 脳内からの汲み出しに能動輸送系の関与する可能性は少ないとされている。一方, 脳以外の所に分布した **dihydroberberine** も全く同様の変換を受けて **berberine** とな

TABLE V. Strategies for Drug Delivery to Brain

1. Osmotic blood-brain barrier modification
2. Intrathecal administration
3. Chemical modification
4. Pharmaceutical manipulation

Fig. 1. Application of the Dihydropyridine⇌Pyridinium Redox System to the Delivery of Berberine to the Brain

るが、この方は有機カチオン輸送系により処理臓器から速やかに排泄され、脳内濃度/血中濃度比が時間と共に大きくなるわけである。さらに、dihydroberberine の静脈内への注入速度をコントロールする、すなわち先にも述べたように投与時の医療技術を加味することによって濃度比あるいは他の組織に対する脳内への分布の割合をさらに高め得ることが明らかにされている。⁵¹⁾ また、berberine のようなかなりの大きさの分子を脳内に送り込むことが可能となったため、このような試みをさらに進めて“pyridinium” carrier による薬物分子の脳内への送り込みが phenethylamine, dopamine, testosterone などについても試みられている。

そのほか、先に述べた抗体や lectin などの高分子担体を低分子に変えた場合でも、後者が特異的なレセプターや結合蛋白に結合する場合には化学修飾による targeting が可能であり、かなりの選択性を期待することができる。ホルモンは比較的容易に化学的純度の高いものを得ることができる。しかし、類似レセプターによる誤認やホルモン処理機能に与える長期的影響などについての考慮も必要である。最近前立腺癌の治療を目的として estradiol と nitrogen mustard とを結合させ、前者を担体として後者を癌細胞内に取り込ませる薬物 estracyt が開発された。この種の研究は医薬品化学領域のもので、いわば molecular targeting と呼ぶべきものであろうが、剤形との組み合わせによる適用の拡大の可能性も秘められている。

制癌剤への応用例

殺細胞効果を有する薬物の多くは副作用の発現もいちじるしく、DDS の対象としても魅力あるものといえる。事実癌学会等においても剤形面の工夫による様々な研究が発表されてきており、これ迄述べてきた各種の技術のいくつかが臨床の場においても活かされるようになってきた。ここでは、我々の研究を中心に紹介し、drug delivery についての考え方の一端を述べることにする。

癌の外科治療においてしばしば問題となるものに転移と進行癌に対する措置ということがある。前者に対する delivery の1つとして制癌剤 emulsion があるが、これは組織内に投与された emulsion がリンパ系を介して移行し転移を考える上で重要なリンパ節内に薬物が高濃度に送り込まれる一方、担体としての物理的大きさ及び emulsion 中の薬物の存在状態によって、血液を介しての全身的な分布に伴う副作用発現が大幅に抑えられることをねらったものである。高橋らによって始められたこの emulsion 療法⁵²⁾は、外科手術前、手術中、あるいは手術後の投与により効果を発揮している。これについては村西の総説⁵³⁾に詳しい。

Emulsion 自体はその後種々の改良が加えられ、油中水型 emulsion の分散相をゲル化したもの⁵⁴⁾あるいは脂溶性制癌剤に応用したものなどがあり術後遠隔成績でも良好な結果が得られている。この種の投与法はいわば局所投与によるリンパ指向性、所属リンパ節への targeting (lymphotropic delivery) をねらったものであるが、用いられる薬物及び emulsion 側双方の性質たとえば低分子脂溶性 prodrug の導入、高分子化など種々の修飾を加えることにより放出性、滞留性を多様にコントロールすることが可能である。

悪性腫瘍以外の例としてこの種の emulsion がリンパ管腫に用いられ良好な成績を収めている。⁵⁵⁾ リンパ管腫は良性腫瘍であるがしばしば神経や血管、近傍の筋肉・臓器に浸潤性に増殖する傾向があるため、手術的に完全摘出することが困難な場合が少なくない。リンパ管腫は主に幼少児期に発生し半数近くが頸部に発生することが知られている。我々は京都大学第二外科との協同研究により過去7年間にわたって bleomycin emulsion による治療を行ってきたが、臨床的に最も悪性像を示して呼吸障害や気道圧迫を招来する頸部を主体としたリンパ管腫に対し、emulsion 治療が外科療法に優位に優っていることが明らかとなった。投与法そのものは emulsion 0.3—0.5 ml を3ないし4週の間隔で腫瘍内に直接注入するものであるが、副作用も少なく本症に対する first choice の地位を確立するに至っている。

Liposome やいわゆる microsphere 等の微粒子担体は制癌剤の腫瘍移行性の修飾にとっても有用な手段の1つと考えられる。そこで前記 emulsion についても油中水型の分散相がゼラチンゲルからなる物を検討し、さらにゼラチン微粒子そのものを分離することにより薬物担体とすることを試みた。⁵⁶⁾ すなわち、mitomycin C (MMC) を溶かした 30% ゼラチン水溶液をゴマ油中に分散させた後冷却、油相除去、固化の過程を経て microsphere とした。Emulsion 調製時の乳化条件を変えることにより種々の大きさの物が得られるが、既にふれたように、280 nm 程度のものは網内系臓器に、より大きい 15 μ m 程度のものは肺に高濃度に分布した。また、比較的大きな 50 μ m 程度のものは動脈内カテーテル注入による肝癌の化学塞栓療法に対して優れた効果を示すことが明らかとなった。⁵⁷⁾

これ迄述べてきたように, **liposome** や **emulsion** は脂質分散系製剤として物理的担体にひろく用いられている. しかし脂溶性の大きい薬物の場合とはともかく, 親水性や両親媒性薬物の場合には包含効率の点で問題が起こり易い. 我々は **MMC** の脂溶性 **prodrug** を合成することにより脂質分散系製剤への適用を試みた.^{58,59)} 官能基の導入は, **MMC** の活性発現の中心部位であり不活性化を受け易い **aziridine** 基に対して行った. すなわち, はじめにベンゼン環を脂質官能基モデルとし結合様式を種々変化させた **prodrug** を合成したが, そのうち **alkoxy-carbonyl** 型の結合様式が化学的には安定でありながら生体内では酵素反応によって速やかに親化合物である **MMC** を放出するという優れた性質を持つことを認めた. これらの **prodrug** は, **MMC** とは異なり **liposome** や **emulsion** に適用しやすく, 前者の場合主として脂質二分子膜中に局在することが示唆された. **Prodrug** の1つである **nonyloxy-carbonyl MMC** の場合, これを含有した **liposome** あるいは **emulsion** を投与すると比較的速やかに **prodrug** が引き抜かれ **MMC** へと変換されることが明らかとなった. また, 筋肉内投与の場合は, 担体としての脂質成分が注射部位及び所属リンパ節に長時間滞留し, それに伴って **prodrug** が徐々に放出された. これに対し, **MMC** を包含した同種製剤では同じ部位に投与しても注射部位での滞留や所属リンパ節への移行が認められない.⁶⁰⁾ すなわち, 薬物の物性をコントロールすることにより, より多様な剤形への拡大並びに **targeting** による全身的な薬物濃度の低下ひいては副作用の軽減をはかることができるわけである (Fig. 2).

このような化学修飾の効果は, 経皮吸収においても認められた. すなわち原体である **MMC** 及び脂溶性 **prodrug** の透過性をラットのヒフを用いて *in vitro* での実験系により検討したところ, 脂溶性 **prodrug** の場合には **MMC** に比してより多くの薬物が透過し, しかもその大部分が **MMC** となっていることが認められた.⁶¹⁾ すなわち, 化学修飾によって **MMC** の物性をコントロールすることにより多様な処方化, 新剤形開発の可能性が与えられることになるわけである.

低分子 **prodrug** と併行して各種の高分子化 **MMC** についても検討を進めているが, ここでは水溶性高分子である **dextran** との共有結合型 **prodrug** (**MMCD**) について述べる. 一般に高分子を薬物の担体とする際には, Table IV に示すような条件が満たされることが必要である. また, 結合される薬物の側から見ても高分子担体に対して比較的少ない量で十分な殺細胞効果を発揮すること, 薬物が高分子担体に結合した状態では化学的に安定であること, 高分子担体との結合に必要な官能基を十分に備えているなどの条件が満足される必要がある. また, 活性発現の様式, たとえば細胞内に取り込まれることが必要かどうかとか, 濃度依存型か時間依存型かなどの情

Fig. 2. Combination of Lipophilic Prodrugs of Mitomycin C (MMC) with Liposomes as a Physical Drug Carrier

報も必要である。Dextran は臨床的には血漿増量剤として用いられて久しく、水溶性で種々の分子量のものを容易に得られること、Table IV に示すような条件をほぼ満足し得る物であるところから、はじめに平均分子量 1 万、7 万、50 万の 3 種について ϵ -aminocaproic acid をスペーサーとして結合させた後、MMC を水溶性 carbodiimide を用いて結合し MMCD (Fig. 3) を得た。⁶²⁾

ここに得られた MMCD は、分子量の如何にかかわらず pH 7.4, 37°C の条件では半減期約 24 時間で MMC を放出した。MMCD から MMC への変換は生体成分によっても影響されることがなく、化学的に加水分解されるところから、MMC の放出速度については変動が少なく、他の特性の解析が容易であるという利点がある。MMCD は、MMC に優る効果を示したが (*i.p.*-*i.p.* 系)、その効果は固型癌に対してより顕著であり、効果発現に腫瘍細胞との相互作用の変化と並んで生体内挙動の変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。⁶³⁾ 一般に高分子の担体を用いる研究はこれ迄にも数多く報告されているが、合成法と効果に関するものが大部分であり、その中間に存在する各種のステップ、すなわち高分子としての安定性、薬物の放出性、さらには体内に適用した際の挙動などについての情報は乏しく、結果の解釈にあたって多大の困難を伴うばかりでなく、ネガティブなデータの解析に基づく改良、普遍性の立証といった点でも見るべきものがなかった。我々はラットを用い高分子担体側、薬物である MMC 側の双方の生体内挙動をコンパートメントモデルを用いて速度論的に追跡した結果、生体内において、高分子化 prodrug からの MMC の遊離速度定数が *in vitro* のそれと一致することを認めた。⁶⁴⁾ また、肝臓、脾臓等網内系臓器への高い蓄積が見られた。一方 MMCD の尿中排泄は分子量依存性が大きく、静脈内投与後 3 種の MMCD とも比較的速やかに二相性を示して血中から消失したが、尿中排泄量としてはわずかであった。

一方、筋肉内投与の場合は大部分の MMCD はリンパ系に移行し、血中への移行は分子量の増大と共に減少した。また、分子量の影響はリンパ節への滞留、胸管リンパへの移行性にも反映し、分子量の小さいものは MMCD としての移行が認められたのに対し、分子量 50 万のものでは高分子のままでの移行、MMC の移行ともにわずかであった。⁶⁵⁾ また、家兎の耳介に VX-2 腫瘍を移植し、腫瘍の直径が 10 mm に達したとき MMC または MMCD (分子量 50 万) を用いて治療実験を行ったところ、両者とも腫瘍はほぼ完全に認められなくなったが、MMC を用いた場合のみ耳介に穿孔を生じ高分子化による効果の保持と局所障害の軽減が確かめられた。この種の薬物の臨床応用に際しては腎障害の懸念が問題となる。また腫瘍内注入においては、注射部位より漏れ出してきた制癌剤による局所障害作用並びに全身への移行性が問題となる。MMCD のうち分子量の大きいものはこれらの点から見て望ましい性質を持っており腫瘍増殖の抑制やリンパ節転位の防止に優れた効果を発揮するものと考えられた。事実、消化器進行癌の患者 16 例を対象に腫瘍内注入療法を試みたところ、軽度の一過性発熱を見た例が見受けられたにとどまり、いちじるしい腫瘍の退縮あるいは腹水の消失が認められた。手術時の切除ヒト肝標本ホモジネートによる MMC の分解を検討したところ、転移癌の場合は分解が抑制されることが認められた。すなわち、MMCD は注射部位に滞留する時間が長いこと、滞留部位において徐々に非酵素的に MMC を放出すること、放出された MMC は腫瘍内での代謝速度が遅いため活性をより長く持続すること。また腫瘍部位より外に向かって正常肝組織に拡散した MMC はそこで速やかに代謝される結果となり、全身に移行して副作用を発現する割合がより小さくなるといった特長を有することが明らかとなった。Targeting において、標的に到

Fig. 3. Mitomycin C-Dextran Conjugates (MMCD) with Different Spacer Arms and Charges

TABLE VI. Physico-chemical Characteristics of Mitomycin C-Dextran Conjugates

	$\bar{M}_w$ ^{b)} (Carrier)	Mitomycin C content (Weight %)	<i>In vitro</i> release $T_{1/2}$ (h)	Adsorption % at pH 7.2	
				CM-Sephadex	DEAE-Sephadex
T- 10 (C6 ⁺) ^{a)}	9900	10.80	24.4	66.6	0
T- 70 (C6 ⁺)	64400	8.46	23.6	57.3	0
T-500 (C6 ⁺)	487000	10.10	23.8	70.8	0
T- 70 (C4 ⁺)	64400	3.15	11.0	37.6	0
T- 70 (C6 ⁺)	64400	8.46	23.6	57.3	0
T- 70 (C8 ⁺)	64400	7.20	42.2	61.7	0
T- 10 (C6 ⁻)	9900	9.43	35.0	0	0.3
T- 70 (C6 ⁻)	64400	8.15	35.4	0	38.3
T-500 (C6 ⁻)	487000	7.80	50.0	0	28.4

a) C4, C6, C8 denote the length of spacer arms.

b) Average molecular weight.

達したあとの薬物の漏れは案外忘れられ勝ちであるが、MMCD の場合、適用対象によってはこの点でも興味ある性質を有していることがわかる。また、高分子としての局所免疫の調節という間接的な効果も考えられる。

MMCD の characterization にはなお検討の余地が残されているが、結合体としては分子全体として見掛け上正電荷を帯びている。このことは、各種の腫瘍細胞への吸着性や chromatofocusing などの結果からも裏付けられる。そこでさらに他の誘導体についても検討を行うべく、 ω -ハロ脂肪酸をスペーサーとするもの (MMCD_{an}) やスペーサーの長さを C₆ 以外に C₄, C₈ に変えた物を合成し先にのべた正電荷を持った MMCD すなわち MMCD_{cat} との比較を行った。MMCD_{an} は見掛け上負電荷を帯び、血中からの消失は MMCD_{cat} に比してはるかにゆるやかであり分子量と共に分子全体の電荷が分布に大きく影響している。また Table VI にまとめられているように、スペーサーアームが長くなるに従って MMC 放出の半減期が長くなることなども明らかとなった。このように、同一高分子担体、同一薬物、同一分子量、同じスペーサーであっても薬物と高分子担体との結合様式によって体内滞留性を種々変え得ること。それら相互の組み合わせによってはより多様な放出特性が得られること。製剤化を組み合わせればさらに適用の範囲を拡大し得ることが明らかとなった。また、先に述べた腫瘍内注入という医療技術との組み合わせは MMCD の特性をさらに引き出し得る可能性を示しており各種技術の総合化という点でも興味深いものがある。

そのほか、薬物の高分子化は薬物耐性の克服などにも利用されている。⁴⁸⁾ また、本来細胞毒性を持たない制癌剤アナログを高分子化することにより効果を発現させた例⁶⁰⁾とか、高分子化による薬物の固定化をとおして制癌剤の作用機序を解明しようとする試み⁶⁷⁾など、delivery 技術の応用がここでも研究面にまで拡大されつつある。一方、正常組織、腫瘍組織間での高分子薬物の拡散性の違い⁶⁸⁾など、分子修飾の面でも興味ある基礎的知見が次第に蓄積されつつある。

以上、drug delivery に関する最近の動きについてその一部を紹介した。今後とも各種の疾患の診断、予防あるいは治療に対する新しい DDS の出現が予測される。また、本文中でもふれたように、研究面への利用もさらに拡大されるであろう。しかし、一読して明らかになようになお基礎的データの積み重ねが必要とされる面が少なくない。基礎データの積み重ねは DDS の内容の向上に役立つばかりでなく、DDS 適用後に予測される短期的な効果並びに情報の乏しい長期的な波及効果の解明に対しても有用な手懸かりを与えてくれるからである。一方、プライマリーケアのレベルでは、今後患者側の諸条件などに左右されにくい慢性疾患向けの delivery に目を向けた研究など、薬物治療の最適化へ向けてのなお一層の努力が望まれる。

引用文献

- 1) T. Higuchi, (永井恒司, 南部直樹共訳), ファルマシア・レビュー, No. 8, 1982, p. 1.
- 2) 南部直樹, 日薬誌, 36, 565 (1984).
- 3) J. Fara, J. Parent. Sci. Tech., 37, 20 (1983).

- 4) “高分子によるドラッグデリバリーシステム,” 第 20 回医用高分子研究会講演要旨集, 1984.
- 5) D. Arndts, K. Arndts, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **26**, 79 (1984).
- 6) *Pharmacopoeial Forum*, **9**, 2999 (1983).
- 7) *Pharmacopoeial Forum*, **10**, 4286 (1984).
- 8) W. I. Higuchi, N. F. H. Ho, H. P. Merkle, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **9**, 1227 (1983).
- 9) Y. W. Chien, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **9**, 1291 (1983).
- 10) K. Park, J. R. Robinson, *Int. J. Pharmaceut.*, **19**, 107 (1984).
- 11) J. D. Smart, I. W. Kellaway, H. E. C. Wothington, *J. Pharm. Pharmacol.*, **36**, 295 (1984).
- 12) P. R. Sheth, J. Tossounian, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **10**, 313 (1984).
- 13) R. A. Siegel, R. Langer, *Pharm. Res.*, **1**, 1 (1983).
- 14) J. Urquhart, J. W. Fara, K. L. Willis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **24**, 199 (1984).
- 15) T. Nabeshima, M. Amano, H. Furukawa, I. K. Ho, T. Kameyama, *J. Pharm. Dyn.*, **7**, 51 (1984).
- 16) R. Hori, F. Komada, K. Okumura, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 440 (1983).
- 17) E. Tomlinson, *Int. J. Pharm. Tech. Prod. Mfr.*, **4**, 49 (1983).
- 18) K. J. Widder, A. E. Senyei, D. F. Ranney, *Adv. Pharmacol. Chemotherap.*, **16**, 213 (1979).
- 19) C. Gardner, “Drug Targeting: Potentials and Limitations,” Topics in Pharmaceutical Sciences, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1983, pp. 291—303.
- 20) M. Hashida, H. Sezaki, “Specific Delivery of Mitomycin C: Combined Use of Prodrugs and Spherical Delivery Systems,” Microspheres and Drug Therapy, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984, in press.
- 21) H. Yoshikawa, S. Muranishi, C. Kato, H. Sezaki, *Int. J. Pharmaceut.*, **8**, 291 (1981).
- 22) J. Kreuter, *Int. J. Pharmaceut.*, **14**, 43 (1983).
- 23) J. Kreuter, *Pharm. Acta Helv.*, **58**, 242 (1983).
- 24) T. N. Palmer, H. M. Patel, L. E. Readings, *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 331 (1984).
- 25) T. Kato, “Encapsulated Drugs in Targeted Cancer Chemotherapy,” Controlled Drug Delivery, CRC Press Inc., Boca Raton, 1983, pp. 189—240.
- 26) T. Kawaguchi, M. Nakano, K. Juni, S. Inoue, Y. Yoshida, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1400 (1983).
- 27) L. S. Rao, *J. Parent. Sci. Tech.*, **37**, 72 (1983).
- 28) T. Ohsawa, H. Miura, K. Harada, M. Hashida, H. Sezaki, *J. Pharm. Dyn.*, **7**, s-36 (1984).
- 29) T. Wilson, L. Cave, *Biotechnology*, **April**, 149 (1983).
- 30) 水島 裕, 医学の歩み, **125**, 159 (1983).
- 31) Y. Mizushima, A. Yanagawa, K. Hoshi, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 666 (1983).
- 32) L. Illum, S. S. Davis, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1086 (1983).
- 33) J. N. Weinstein, *Cancer Treat. Rep.*, **68**, 127 (1984).
- 34) C. R. Alving, *Pharmac. Ther.*, **22**, 407 (1983).
- 35) Y. Hashimoto, M. Sugawara, T. Masuko, H. Hojo, *Cancer Res.*, **43**, 5328 (1983).
- 36) S. L. Regen, K. Yamaguchi, N. K. P. Samuel, M. Singh, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6354 (1983).
- 37) K. J. Widder, A. E. Senyei, B. Sears, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 379 (1982).
- 38) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, M. Akimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 279 (1983).
- 39) F. Ishii, A. Takamura, S. Noro, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 678 (1984).
- 40) J. N. Weinstein, R. L. Magin, M. B. Yatvin, D. S. Zaharko, *Science*, **204**, 188 (1979).
- 41) E. Pitt, C. M. Johnson, D. A. Lewis, *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 3359 (1983).
- 42) P. S. Ringrose, *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 804 (1983).
- 43) 加藤喜規, 原 健, 有機合成化学, **41**, 1135 (1983).
- 44) H. Sezaki, M. Hashida, *CRC Critical Reviews Series*, 1984, in press.
- 45) J. N. Weinstein, M. A. Steller, A. M. Keenan, D. G. Covell, M. E. Key, S. M. Sieber, R. K. Oldman, K. M. Hwang, R. J. Parker, *Science*, **222**, 423 (1983).
- 46) Yoshinori Nao, *ファルマシア*, **16**, 217 (1980).
- 47) D. R. Friend, G. W. Chang, *J. Med. Chem.*, **27**, 261 (1984).

- 48) N. Bodor, M. E. Brewster, *Pharmacol. Ther.*, **19**, 337 (1983).
- 49) W. M. Pardridge, *Ann. Rev. Physiol.*, **45**, 73 (1983).
- 50) E. A. Newwelt, P. A. Barnett, M. Glasberg, E. P. Frenkel, *Cancer Res.*, **43**, 5278 (1983).
- 51) M. Brewster, N. Bodor, *J. Parent. Sci. Tech.*, **37**, 159 (1983).
- 52) 高橋俊雄, 藤田佳宏, 西岡文三, 間島 進, *医学の歩み*, **80**, 810 (1972).
- 53) 村西昌三, *薬誌*, **100**, 687 (1980).
- 54) T. Yoshioka, K. Ikeguchi, M. Hashida, S. Muranishi, H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 1408 (1982).
- 55) 谷川允彦, 猪股裕紀洋, 田中紘一, 里村紀作, 日笠頼則, 橋田 充, 瀬崎 仁, *外科治療*, **49**, 696 (1983).
- 56) T. Yoshioka, M. Hashida, S. Muranishi, H. Sezaki, *Int. J. Pharmaceut.*, **81**, 131 (1981).
- 57) 藤井正博, 白石友邦, 橋田 充, 瀬崎 仁, *臨床成人病*, **14**, 697 (1984).
- 58) H. Sasaki, E. Mukai, M. Hashida, T. Kimura, H. Sezaki, *Int. J. Pharmaceut.*, **15**, 49 (1983).
- 59) H. Sasaki, E. Mukai, M. Hashida, T. Kimura, H. Sezaki, *Int. J. Pharmaceut.*, **15**, 61 (1983).
- 60) H. Sasaki, Y. Takakura, M. Hashida, T. Kimura, H. Sezaki, *J. Pharm. Dyn.*, **7**, 120 (1984).
- 61) 橋田 充, 向井栄治, 瀬崎 仁, *製薬工場*, **19** 号, 1 (1982).
- 62) A. Kato, Y. Takakura, M. Hashida, T. Kimura, H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2951 (1982).
- 63) M. Hashida, A. Kato, T. Kojima, S. Muranishi, H. Sezaki, N. Tanigawa, K. Satomura, Y. Hikasa, *Gann*, **72**, 226 (1981).
- 64) M. Hashida, A. Kato, Y. Takakura, H. Sezaki, *Drug Metab. Disposition*, **12**, 492 (1984).
- 65) Y. Takakura, S. Matsumoto, M. Hashida, H. Sezaki, *Cancer Res.*, **44**, 2505 (1984).
- 66) K. E. Rogers, Z. A. Tökés, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 605 (1984).
- 67) T. A. Tritton, G. Yee, L. B. Wingard, Jr., *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **42**, 284 (1983).
- 68) L. J. Nugent, R. K. Jain, *Cancer Res.*, **44**, 238 (1984).