肝細胞癌治療の化学塞栓物質の開発

京谷庄二郎, 西岡 豊

高知医科大学医学部附属病院薬剤部, 〒783-8505 南国市岡豊町小蓮

The Development of Embolizing Materials for Chemo-embolization Therapy of Hepatocellular Carcinoma

Shojiro KYOTANI and Yutaka NISHIOKA

Department of Pharmacy, Kochi Medical School Hospital, Okoho-cho, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan

(Received August 7, 2000)

We developed chitin-containing cisplatin (CDDP) albumin microspheres (MS). We also investigated physical properties of MS *in vitro*, anti-tumor effect of MS in VX2 tumor model rabbits *in vivo* and clinical evaluation of MS. The CDDP contents, specific surface areas and yield of MS increased with an increase in the concentration of chitin. These findings suggest that accumulation of chitin on the surface of microsphere was the cause of expansion of the coated area as the concentration of chitin increased. *In vitro* CDDP releases decreased as the concentration of chitin increased. The initial burst effect of the drug was to be controlled by the increase of concentration of chitin. The chitin-containing CDDP microspheres showed similar CDDP release patterns irrespective of the concentration of chitin between 1 and 6h after the administration of CDDP microspheres. After 6h, the blood Pt levels increased with an increase in the concentration of CDDP microspheres suggesting a significant effect of the concentration of chitin on microsphere decomposability *in vivo*. Tumor growth rate was increasingly suppressed as the concentration of chitin increased. Clinical findings indicated that antitumor activity of chitin-containing CDDP albumin microspheres would have a chemoembolic effect by embolizing the hepatic artery. In the tumor and necrosis portions phagocytosis of microspheres by macrophage-like giant cell was shown. Consequently, the biocompatibility and decomposable properties of chitin-containing CDDP albumin microspheres were demonstrated.

Key words—chitin; albumin microsphere; anticancer activity; chemo-embolization; hepatocellular carcinoma

はじめに

近年、癌化学療法において抗癌剤の腫瘍選択性を高め、かつ副作用を軽減させるため、種々の検討がなされている。その中でも薬物の体内動態を抑制し、薬物を作用部位へ有効に送達させ、薬物療法の最適化を図ることを目的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) の研究が盛んに行われている。¹⁻⁵⁾

肝細胞癌の治療においてもこの DDS の手法を用いて、病巣に薬物を直接送達させるターゲティング型 DDS が汎用されている。現在、臨床に用いられているものとしては、経カテーテル動脈塞栓療法 (TAE)、化学塞栓療法 (TCE)、油性化学塞栓療法 (TOCE) 及びエタノール注入療法がある。⁶⁻¹¹⁾

しかしながら、これら療法においては、製剤学的及び治療学的に種々の問題点が挙げられている。例えば、製剤学的な面として、調製した製剤の安定性、薬物包含効率、薬物放出初期のバースト現象及び薬物放出速度、塞栓物質の分解性等、治療学的な面として抗腫瘍効果、すなわち、多中心性あるいは

進行性肝細胞癌に対する効果が弱いこと、巨大腫瘍あるいは微小腫瘍には有効でない等の問題を残している。そのため、これらの問題点を解決するため、種々の検討がなされている。例えば、TCE に抗癌剤と高分子物質との結合体を利用する方法、あるいは TOCE に従来の O/W 型に代わり W/O あるいは W/O/W 型エマルジョンを利用する方法等が検討されている。^{12,13)} また、リンホカイン、インターロイキン 2 等の薬物を投与し、ヒト本来が有している免疫能を高め活性リンパ球 (LAK) 細胞を誘発し、抗腫瘍効果を高める LAK 療法が開発され、臨床応用されている。^{14,15)}

肝細胞癌の治療において、TAE、TCE 及び TOCE が汎用される理由は、肝臓の血流量が非腫瘍部組織においては約 25%、腫瘍部組織においてはその大部分が肝動脈より補給されており、その血流を遮断することにより、選択的に腫瘍部のみを虚血壊死させることができるためである。

TCE 及び TOCE に用いる塞栓物質としては、ゼ

ラチンスポンジ, エチルセルロースマイクロカプセル, デンプン, アルブミン及びポリ乳酸 MS が多用されている.¹⁶⁻²⁴⁾ しかしながら, これら塞栓物質においても, 上述の薬物放出初期のバースト現象, 薬物の包含効率及び薬物放出速度, 塞栓物質の分解性, 抗腫瘍効果等に改善すべき問題点を残している。また, これらの療法単独では, 治療に限界があるとされており, いくつかの療法を併用する集学的治療法が検討されつつある。その中でも LAK 療法を含んだ免疫療法との併用が盛んに行われている。

上記の観点より TCE に用いられる塞栓物質には, 単なる塞栓物質にとどまらず, そのもの自体に免疫能増強作用, 免疫アジュバント活性作用などを有し, かつ薬物包含効率, 放出速度及び生体内分解性を制御できる物質が切に望まれている。そこで著者らは, 肝細胞癌の治療における TCE の新しい塞栓物質として, 天然由来の生体内分解性素材として注目されているキチンを利用したシスプラチン (CDDP) 含有アルブミン MS の開発を企図した。なお, アルブミンをベースにしたのは, 生体適合性でかつ生体内分解性が確立されているからである。²⁵⁾

1. キチン添加シスプラチン含有アルブミンマイクロスフェアの調製と物性の評価

MS の調製法は, マトリックス物質を乳化した後, 架橋あるいは加熱変性させて固化させる方法が主として用いられている。この際, 攪拌速度などの条件を変えることにより, 粒子径は自由に制御できる。しかしながら, これら調製した塞栓物質としての MS には, 薬物包含効率の向上及び生体内分解性の制御などの改善が求められている。そのため, これら問題点を解決するため, 生体適合性及び生体内分解性を有し, 生物新素材として注目されている

天然由来キチンを用いて, キチン添加 CDDP アルブミン MS を調製し, 薬物包含効率, 表面構造などの物性に及ぼすキチン添加濃度の影響について検討した。Fig. 1 にキチンの構造式を示した。

a) MS の収率及び CDDP の包含効率に及ぼすキチン添加濃度の影響 一般に MS の調製法に用いられている液中乾燥法では, MS の薬物の収率及び包含効率は低いとされている。そこで, 収率及び薬物包含効率の増大を図るためキチン添加濃度を変えた各種キチン添加 CDDP アルブミン MS を調製した。MS の調製方法は, CDDP 原末及びキチンをメノウ乳鉢にとり, よく混和して微粉末とする。次にヒト血清アルブミン溶液を加え, よく混和し懸濁液とする。この懸濁液をエチルセルロースを溶解させたトルエン・クロロホルム混液に加え, W/O 型エマルジョンの調製法に準じて乳化し, グルタルアルデヒドにて硬化した。得られた MS をアセトンにて洗浄後, 50°C にて 2 時間通風乾燥した。これら MS をフルイにて分級し, その後, 135°C で 2 時間乾熱滅菌し製した。なお, エチルセルロースはエマルジョン滴の凝集防止のため添加した。

Table 1 に MS の収率及び薬物包含効率とキチン添加濃度の関係を示した。収率及び薬物包含効率はキチン添加濃度により差が認められ, キチン添加濃度の増加に伴い増大する傾向が認められた。これらのことより, MS の収率の向上及び薬物包含効率の増大には, キチン添加濃度の増加が有効であることが明らかになった。このことは, キチン添加濃度の増加に伴い MS の表面にキチンが集積し, MS 表面のマトリックス構造を緻密にしたためと考えられる。

b) MS の表面構造に及ぼすキチン添加濃度の影響 各種 MS 及び CDDP 原末を赤外分光分析 (IR) した結果, キチン添加濃度の増加とともに

Fig. 1. Chemical Structure of CDDP and Chitin

Table 1. Effect of Chitin Concentration on the CDDP Content and the Yield of Microsphere

Concentration of chitin (%)	Yield ^{a)} (%)	CDDP content ($\mu\text{g Pt/mg}$)
None	70.8 $\pm$ 1.2	92.1 $\pm$ 1.2
0.50	80.6 $\pm$ 1.8	120.8 $\pm$ 2.8
1.50	90.1 $\pm$ 1.2	162.4 $\pm$ 3.4
3.00	92.3 $\pm$ 2.3	185.6 $\pm$ 4.9
4.50	94.6 $\pm$ 2.5	209.4 $\pm$ 2.9
6.00	95.2 $\pm$ 1.9	238.8 $\pm$ 5.6

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=6$). ^{a)} Recovered weight of microspheres per total weight of CDDP, albumin and chitin employed.

1640⁻¹ cm 付近のアミド I バンド及び 1540⁻¹ cm 付近のアミド II バンドの吸収が増大した。一方、CDDP (Pt) の吸収と考えられる 3350⁻¹ cm 付近の吸収は、キチン添加濃度の増加とともに減少し、キチン添加濃度 6% の場合、吸収はほとんど認められなかった。このことは、キチンが MS の表面に集積し、その濃度が増すに従い被覆部分が厚くなり、その結果、Pt の IR 吸収が認められなかったものと考えられる。

c) 電子顕微鏡による検討 キチンが MS の表面に集積する傾向が明らかになったことより、Pt が MS 中にどのように分散しているかが問題となる。そこで、Pt の MS 表面及び内部における分散状態を調べるため、エネルギー分散型 X 線分析装置付透過型電子顕微鏡にて MS を観察した。その結果、MS 表面には、一部局所的に高濃度の Pt 部分が認められた。一方、MS 内部は、Pt が均一に分散していることが明らかになった。このことは、キチンが非溶解のため MS 表面に集積したためと考えられる。

d) MS の比表面積に及ぼすキチン添加濃度の影響 Table 2 に MS の比表面積とキチン添加濃度の関係を示した。MS の比表面積は、キチン添加濃度が増加するに従い増大することが明らかになった。このことは、前項の電子顕微鏡による検討で明らかになったように、キチンが MS の表面に集積し、表面粗度が増大するためである。また、その度合は、キチン添加濃度が増加するに従い増大した。

2. キチン添加シスプラチン含有アルブミンマイクロクロスフェアの *in vitro* における薬物の放出性評価

デバイスからの薬物放出性は、薬物の標的部位への到達性及び到達後の効果の発現を支配する重要な因子であり、*in vivo* 評価をする前に明らかにしておくべき物性の 1 つである。

MS からの薬物放出は、MS 表面からの溶媒の浸入、それに伴う MS 内での薬物の溶解、MS 表面への拡散により起こる。MS 表面への薬物の偏析及び MS の分解は、これら薬物の放出過程に大きな影響

Table 2. Effect of Chitin Concentration on the Specific Surface Area of Microsphere

Concentration of chitin (%)	Specific surface area (m^2/g)
None	80.5 $\pm$ 5.6
1.50	123.8 $\pm$ 7.3
3.00	147.1 $\pm$ 5.2
4.50	158.9 $\pm$ 6.8
6.00	184.3 $\pm$ 4.2

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=6$). Average diameter of MS: 20–37 μm .

(Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 1136–1139 (1993). Copyright 1993 Pharmaceutical Society of Japan)

を及ぼす。特に溶出初期に薬物の放出が急激に起こる現象、いわゆるバースト現象は、これらの要因と関係することが多い。

一般に MS からの薬物の放出は、MS の調製条件、MS の高分子基剤の種類、架橋、重合の程度、あるいは薬物の分子量、MS の粒子径等、種々の製剤学的要因の影響を受ける。

a) MS からのシスプラチンの放出性に及ぼすキチン添加濃度の影響 一般に MS からの薬物の放出速度は、比表面積、壁膜の細孔の大きさ、膜厚等に大きく影響される。MS の場合、内部からの薬物の放出は MS が溶出液によって、完全にぬれるまで起こらない。初期の薬物の放出は MS 表面からの放出が主となる。そのため、MS 表面になんらかの処理をするか、あるいは MS に他の物質を添加し、放出を制御することができる。MS からの内包薬物のバーストの原因は、内部のクラックに基づく水の浸透性の増加、急激な MS の崩壊、調製時における乾燥及び溶媒除去に伴う薬物の MS 表面への偏析などが考えられる。

そこで、キチンを添加することにより、放出初期のバースト現象の抑制を試みた。

Fig. 2 にキチン添加濃度と MS からの CDDP の放出性との関係を示した。CDDP の放出速度は、キチン添加濃度により異なり、キチン添加濃度の増加に従い CDDP の放出は、抑制される傾向が認められた。50% 放出時間は、キチン無添加の場合、1.5 時間、0.5% の場合、3.5 時間、1.0% の場合、10.0 時間、1.5% の場合、16.0 時間となった。また、放出初期のバースト現象もキチン添加濃度の増加に従い抑制されることが明らかになった。これらのことより、キチン添加濃度をコントロールすることにより、バースト現象の抑制及び放出速度の制御が可能であることが判明した。

b) MS からのシスプラチンの放出性に及ぼす粒子径の影響 MS を生体内に投与した場合、その粒子径が薬物の放出性及び臓器内分布に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、MS の粒子径と CDDP の放出性との関係について検討した。その

Fig. 2. Effect of Chitin on the Release Profiles of CDDP from Chitin-containing CDDP Albumin Microspheres

Chitin concentration: ○: 0%, △: 1.5%, □: 3.0%, ●: 4.5%, ▲: 6.0%. Average diameter of MS: 20–37 μ m. (Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 1136–1139 (1993). Copyright 1993 Pharmaceutical Society of Japan)

結果を Fig. 3 に示した。

CDDP の放出は、粒子径により大きく異なり、粒子径が小さくなるほど CDDP の放出速度は増大することが明らかになった。24 時間後の放出率は、粒子径 20 μ m 以下の場合 50%、20–37 μ m の場合 27%、37–74 μ m の場合 18% となった。このことは、粒子径が小さくなるほど MS の比表面積が増大し、MS 表面からの CDDP の放出が促進されるものと考えられる。このことより、MS の粒子径をコントロールすることにより、CDDP の放出を制御できることが明らかになった。放出初期のバースト現象は、粒子径に関係なく抑制される傾向が認められた。

3. キチン添加シスプラチン含有アルブミンマイクロスフェアの正常成犬における評価

肝細胞癌は血管支配の面から考えると肝動脈だけの血流支配を受けており、肝動脈と門脈からの二重支配を受ける正常肝組織とは明らかに異なっている。そのため、この性質を利用して肝動脈を抗癌剤含有塞栓物質にて塞栓し、抗腫瘍効果を増大させようとする TCE が試みられている。MS を塞栓物質として肝動脈塞栓を行う場合、第一段階として腫瘍近位の血管の塞栓、第二段階として塞栓部位からの抗癌剤の放出、第三段階として腫瘍部位への薬物の分布が重要となる。そのため、塞栓物質は単に抗癌剤を包含するだけでなく、塞栓効果により血流を停

Fig. 3. Release Profiles of CDDP from Chitin-containing CDDP Albumin Microsphere Having Various Particle Sizes

Particle size: ○: less than 20 μ m, △: 20–37 μ m, □: 37–74 μ m. Chitin concentration: 6.0%. (Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1251–1255 (1994). Copyright 1994 Pharmaceutical Society of Japan)

止するとともに、抗癌剤が持続的に一定量放出されるように、放出速度を制御できなければならない。前項で述べたように、*in vitro* における検討においてキチン添加 CDDP アルブミン MS は、分解性及び薬物放出制御性に優れていることが明らかになった。これら *in vitro* における実験結果をもとに、*in vivo* におけるキチン添加 CDDP アルブミン MS の有用性について、正常成犬の固有肝動脈に MS を投与し塞栓を行い、塞栓状態、CDDP の放出性 (CDDP の血中濃度の推移)、肝臓組織内濃度について検討した。

a) 肝動脈塞栓状態の評価 TCE は、腫瘍部では血流支配の大部分が動脈性であるのに対して、非腫瘍部では門脈支配であるという肝血流の二重支配を利用して行われている。しかしながら、非腫瘍部においては、酸素供給量の約 50% を肝動脈に頼っているため、完全な肝塞栓は肝壊死を招く。この壊死は肝動脈の末梢を閉塞した場合に起こりやすいとされている。そのため MS により腫瘍支配動脈を塞栓し、腫瘍への栄養供給路を物理的に遮断する場合には、塞栓部位及び塞栓状態が重要な因子となる。そこで MS による肝動脈塞栓の状態を確認するため、化学塞栓前後の肝動脈造影を行った。

その結果、肝動脈の形状は、塞栓前後で明らかな相違が認められた。塞栓後では、MS の塞栓による塞栓部位の血管の肥大、末梢血管の狭窄及び血管の蛇行が認められた。

b) シスプラチンの血中濃度の推移 一般に MS を血管内に投与した場合、血液成分と MS の間になんらかの相互作用が生じ、MS の凝集、崩壊等により MS からの薬物の放出がコントロールでき

ないことも考えられる。そこで、CDDP の放出への影響を調べるため、正常成犬の固有肝動脈を MS にて塞栓し、CDDP の血中濃度を経時的に測定した。CDDP 注射液を肝動脈より投与し、対照群とした。なお、投与量は MS, CDDP 注射薬とも CDDP として体重 1 kg 当り 1 mg とした。Fig. 4 にその結果を示した。

CDDP の血中濃度の推移は各 MS により異なり、CDDP アルブミン MS の場合、投与 1—2 時間で $0.4 \mu\text{g Pt/ml}$ となり、以後漸減し、1 週間以内で測定限界値以下となった。キチン添加 CDDP アルブミン MS の場合、投与後 1 時間で $0.6 \mu\text{g Pt/ml}$ となり、以後漸減し、2 週間以内で測定限界値以下になった。一方、CDDP 注射液の場合、投与後 1 時間で $1.4 \mu\text{g Pt/ml}$ となり、以後減少し、4 週間後において $0.1 \mu\text{g Pt/ml}$ となった。これらの結果より、キチン添加 CDDP アルブミン MS 投与群で徐放効果が認められ、その有用性が明らかになった。MS の分解に血液成分、特にタンパク質が関与することや、血液成分中の血小板が MS の表面に粘着し、MS の凝集を引き起こし分解され難くなることが問題となっている。²⁶⁾ しかしながら、本実験においては、キチン添加 CDDP アルブミン MS 投与群の CDDP の血中濃度は、投与後 2 週間で測定限界値以下になったことより、キチン添加 CDDP アルブミン MS と血液成分との相互作用はないものと考えられる。一方、MS 投与群に比べ、CDDP 注射液投与群では、投与 28 日においても $0.3 \mu\text{g Pt/ml}$ の白金が認められたことは、CDDP の α 相の半減期が動物の種類により異なり、これがアルブミンの代謝回転と一致していることを考え合わせると、 β 相の半減期も種差が著しいことが考えられる。また CDDP 濃度は、結合型 CDDP をも含んだ総 Pt 量

として測定しているため、CDDP 注射液投与群では、投与後 28 日においても高い値が認められたものと考えられる。

c) シスプラチンの肝臓組織内濃度 MS の塞栓部位からの薬物の放出は、治療効果に大きな影響を与える。また放出された薬物が標的部位でどのように分布しているかが問題となる。そこで MS 投与後の肝臓組織内の CDDP (Pt) の濃度を検討した。CDDP 注射液を肝動脈より投与し、対照群とした。なお、投与量は MS, 注射液とも CDDP として体重 1 kg 当り 1 mg とした。

Table 3 に MS 及び CDDP 注射液投与後の肝臓組織内の CDDP 濃度を示した。CDDP 濃度は、キチン添加の有無により異なり、CDDP アルブミン MS では、投与後 7 日で $1.23 \mu\text{g Pt/ml}$ と最大値を示し、以後漸減し 28 日後においては、 $0.05 \mu\text{g Pt/ml}$ となった。一方、キチン添加 CDDP アルブミン MS では、投与後 7 日で $1.48 \mu\text{g Pt/ml}$ と最大値を

Table 3. The Assay of CDDP in the Liver of Dogs

Day	CDDP Concentration ($\mu\text{g Pt/g}$)		
	Microsphere		CDDP solution
	A	B	
1	1.23 ± 0.12	0.23 ± 0.05	1.51 ± 0.36
7	0.57 ± 0.08	1.48 ± 0.17	0.85 ± 0.23
28	0.05 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.11 ± 0.08

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). A: CDDP albumin microsphere, B: chitin-containing CDDP albumin microsphere. Average diameter of MS: $74-177 \mu\text{m}$, CDDP dose: 1.0 mg/kg , Chitin concentration: 1.5% .

(Reprinted with permission from *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 267-268 (1992). Copyright 1992 Pharmaceutical Society of Japan)

Fig. 4. Time Courses of Plasma CDDP after Arterial Injection of CDDP Albumin Microsphere or CDDP Solution

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). ○: CDDP albumin microsphere, △: chitin-containing albumin microsphere, ●: CDDP solution. Chitin concentration: 1.5% . Average diameter of MS: $74-177 \mu\text{m}$. CDDP dose: 1 mg/kg . (Reprinted with permission from *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 267-268 (1992). Copyright 1992 Pharmaceutical Society of Japan)

示し、以後漸減し28日後においては、 $0.14 \mu\text{g Pt/ml}$ となった。CDDP注射液投与群では、投与後1日で $1.51 \mu\text{g Pt/ml}$ となり、以後漸減し28日後においては、 $0.11 \mu\text{g Pt/ml}$ となった。キチン添加CDDPアルブミンMSでは、CDDPアルブミンMSに比べて、投与後28日でも高い濃度のCDDPが認められたことより、MSにキチンを添加することが、肝臓組織内に高濃度のCDDPを持続させるのに有効であることが明らかになった。

4. キチン添加シスプラチン含有アルブミンマイクロスフェアのVX2腫瘍担癌家兎における評価

前項までに、キチン添加CDDPアルブミンMSが徐放性機能を有し、かつ正常成犬で化学塞栓物質としての必要条件を具備することを確認した。本項においては、これらMSの肝臓治療への応用として、担癌モデル家兎におけるMSの化学塞栓物質としての有用性を明らかにした。すなわち、VX2腫瘍担癌家兎の肝動脈にMSを投与し、塞栓を行いCDDPの血中濃度の推移、肝臓組織内濃度、腫瘍指向性及び抗腫瘍効果とキチン添加濃度、MSの粒子径及び投与量との関係について明らかにした。

a) CDDPの血中濃度の推移に及ぼすキチン添加濃度の影響 MSを固有肝動脈より投与し、塞栓を行う場合、塞栓状態、MSと血液成分との相互作用及び分解性等が問題となる。

そこでキチン添加CDDPアルブミンMSをVX2腫瘍担癌家兎の固有肝動脈に投与し塞栓を行い、キチン添加濃度とCDDPの血中濃度の推移との関係について検討した。その結果をFig. 5に示した。なおCDDP注射液を肝動脈より投与し、対照群とした。投与量は、MS、注射液ともCDDPとして体重1 kg当り1.0 mgとした。

CDDPの血中濃度の推移は、キチン添加濃度により異なり、キチン無添加MS投与群では、投与後1時間で $0.6 \mu\text{g Pt/ml}$ とピークを示し、以後漸減し6日以内に測定限界値以下となった。キチン添加MS投与群では、投与後1—6時間まではキチン添加濃度に関係なくほぼ同様の推移パターンを示した。6時間以降はキチン添加濃度により差が認められ、添加濃度の増加とともに高濃度のCDDPが持続的に維持された。特にキチン添加濃度6.0%の場合、投与後7日においても $0.45 \mu\text{g Pt/ml}$ の白金が認められた。

CDDP注射液投与群では、投与後1時間で $2.6 \mu\text{g Pt/ml}$ とピークを示し、以後減少し7日において $0.2 \mu\text{g Pt/ml}$ の白金が認められた。キチン添加MSの場合、投与後1—6時間のCDDPの血中濃度がキチン添加濃度に関係なくほぼ同様の推移パターンを示した理由は、生体内酵素リゾチームは本来、ペプチドグリカンのグリカン部の β -1,4-グリコシド結合を切断する酵素であり、 β -1,4-グリコシド結合を有するキチンも分解されるものの、ペプチドグリ

Fig. 5. Plasma Concentration-Time Profiles of Platinum after Arterial Injections of Chitin-containing CDDP Albumin Microsphere at a Chitin Concentration and CDDP Solution

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Chitin concentration: $\circ$: none, $\triangle$: 1.5%, $\square$: 3.0%, $\bullet$: 4.5%, $\blacktriangle$: 6.0%, $\blacksquare$: CDDP solution. Average diameter of MS: $20\text{--}37 \mu\text{m}$, CDDP dose: 1.0 mg/kg. (Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 1136-1139 (1993). Copyright 1993 Pharmaceutical Society of Japan)

カンとは構造が若干異なるため、分解速度が遅くなりほぼ同様の血中濃度パターンを示したものと考えられる。6時間以降のCDDPの血中濃度はキチン添加濃度の増加とともに増大した。これはキチン添加濃度により、MSの生体内での分解性に差が生じたためと考えられる。また、MSの門脈血流への暴露の程度、細動脈内での塞栓状態に相違が生じたものと考えられる。

b) CDDPの肝臓組織内濃度に及ぼすキチン添加濃度の影響 MSの血液中での分解性を検討するため、MS投与後の肝臓組織内の白金濃度とキチン添加濃度との関係について検討した。なおCDDP注射液を肝動脈より投与し、対照とした。MS、注射液投与群とも投与量は、CDDPとして体重1 kg当り1 mgとした。

Table 4にその結果を示した。肝臓組織内濃度はキチン添加濃度により差が認められ、キチン添加濃度1.5—6.0%の場合、組織内白金濃度は $2.0\text{--}2.5 \mu\text{g Pt/g}$ と無添加の場合の2倍の値を示した。CDDP注射液の場合は、 $2.9 \mu\text{g Pt/g}$ であった。すべての投与群とも腫瘍部及び非腫瘍部の白金濃度には有意な差は認められなかった ($p<0.05$)。

この結果より、MSにキチンを添加することにより、肝臓腫瘍部に高濃度のCDDPを滞留させることが可能であることが判明した。

Table 4. Effect of Concentration of Chitin on the CDDP Concentration in the Liver of Rabbits

Concentration of chitin (%)	CDDP concentration ($\mu\text{g Pt/g}$)		
	Tumor	Normal portion adjacent to tumor	Normal portion apart from tumor
None	1.09 ± 0.20	0.82 ± 0.06	0.85 ± 0.08
1.5	2.04 ± 0.11^a	1.80 ± 0.18	1.46 ± 0.11
3.0	2.29 ± 0.32^a	1.98 ± 0.25	1.77 ± 0.19
4.5	2.43 ± 0.47^a	2.03 ± 0.38	1.69 ± 0.31
6.0	2.54 ± 0.36^a	2.18 ± 0.22	1.88 ± 0.52
CDDP solution	2.91 ± 0.63^a	2.61 ± 0.57	2.72 ± 0.43

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Average diameter of MS: 20–37 μm , CDDP dose: 1.0 mg/kg. $a) p < 0.05$, significantly different from the result for the none chitin.

(Reprinted with permission from *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 267–268 (1992). Copyright 1992 Pharmaceutical Society of Japan)

c) シスプラチンの血中濃度の推移に及ぼす粒子径及び投与量の影響

1. 粒子径の影響 MS による塞栓を行う場合、塞栓部位及び塞栓状態は MS の粒子径の影響を受けることが予想される。そこで、MS の粒子径と CDDP の血中濃度の推移との関係について検討した。なお、CDDP 注射液を肝動脈より投与し、対照とした。注射液投与群とも投与量は、CDDP として体重 1 kg 当り 1 mg とした。

Fig. 6 にキチン添加 CDDP アルブミン MS の粒子径と CDDP の血中濃度の推移との関係を示した。CDDP の血中濃度の推移は、粒子径により異なり、粒子径 20 μm 以下の MS 投与群の場合、粒子径 20–37 μm 及び粒子径 37–74 μm の場合に比べ、投与初期から CDDP の高い血中濃度が得られた。このことは、粒子径が 20 μm 以下の場合、MS は肝臓の細動脈までも塞栓するものの、一部が肝臓の kupffer 細胞をはじめとする細網内皮系組織によって貪食され、速やかに血中に CDDP が放出されたためと考察した。また、血液中に投与された MS の粒子径が数 μm 程度になると食細胞によって貪食されやすくなり、貪食の程度は粒子表面の物理的性質の影響を受ける。食細胞の表面には、陰イオンよりも陽イオンを取り込み易い領域があり、MS 表面のイオンの分布状態が貪食能に大きく関与するものと考えられている。そのため陽イオンを持つキチンを含んだ MS の方が貪食され易いと考えられる。CDDP 注射液の場合、投与後 1 時間で $2.8 \mu\text{g/ml}$ となり、以後急激に減少した。以上の結果より、MS の粒子径が小さくなるほど、高濃度の CDDP が持続的に血中に維持されることが明らかになった。

2. 投与量の影響 前項において、MS の粒子径が CDDP の血中濃度の推移に影響を及ぼすことを明らかにした。抗癌剤の作用の強さは、その投与量に大きく左右される。一方、抗癌剤含有 MS の投与量は、塞栓状態や塞栓部位に大きな影響を及ぼすものと思われる。そこで、MS の投与量と CDDP の血中濃度の推移との関係について検討した。

Fig. 6. Plasma Concentration-Time Profiles of Platinum after Arterial Injections of Chitin-containing CDDP Albumin Microsphere and CDDP Solution

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Particle size: $\circ$: less than 20 μm , Δ : 20–37 μm , $\square$: 37–74 μm , $\bullet$: CDDP solution. Chitin concentration: 6.0%, CDDP dose: 1.0 mg/kg.

(Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1251–1255 (1994). Copyright 1994 Pharmaceutical Society of Japan)

Fig. 7 にその結果を示した。なお CDDP 注射液を肝動脈より投与し、対照とした。MS 投与群の場合、白金の血中濃度は投与量の増加とともに増大した。しかしながら、投与後 7 日における CDDP の血中濃度は、投与量に関係なく一定で有意の差は認められなかった ($p < 0.05$)。

一方、CDDP 注射液投与群の場合、投与後 7 日においては投与量に関係なく、 $0.2 \mu\text{g Pt/ml}$ と MS 投与群に比べ、低い値を示した。投与後 7 日における CDDP の血中濃度は、投与量に関係なく一定であった。このことは、CDDP の投与量の増加とともに MS としての投与量も著しく増大し、その結果、塞栓部分が増加するためと考えられる。

Fig. 7. Plasma Concentration-Time Profiles of Platinum after Arterial Injections of Chitin-containing CDDP Albumin Microsphere and CDDP Solution at a Dose

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Dose (CDDP mg/kg): (a) microsphere: $\circ$: 1.0 mg, $\triangle$: 2.0 mg, $\square$: 4.0 mg (b) CDDP solution: $\circ$: 1.0 mg, $\triangle$: 2.0 mg, $\square$: 4.0 mg.

(Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1251-1255 (1994). Copyright 1994 Pharmaceutical Society of Japan)

Table 5. Effect of Particle Size of Microsphere on the CDDP Concentration in the Liver of Rabbits

Microsphere	CDDP concentration ($\mu\text{g Pt/g}$)		
	Tumor	Normal portion adjacent to tumor	Normal portion apart from tumor
A	3.47 ± 0.52^a	3.01 ± 0.38	3.15 ± 0.47
B	2.54 ± 0.36^a	2.18 ± 0.22	1.88 ± 0.52
C	1.54 ± 0.22	1.36 ± 0.45	1.29 ± 0.39
CDDP solution	2.91 ± 0.63	2.61 ± 0.57	2.72 ± 0.43

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). A: less than $20 \mu\text{m}$, B: $20-37 \mu\text{m}$, and C: $37-74 \mu\text{m}$ in particle size. $a) p < 0.05$, significantly different from the result for the C.

(Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1251-1255 (1994). Copyright 1994 Pharmaceutical Society of Japan)

d) CDDP の肝臓組織内濃度に及ぼす粒子径及び投与量の影響

1. 粒子径の影響 Table 5 に MS の粒子径と CDDP の肝臓組織内濃度の推移との関係を示した。なお CDDP 注射液を肝動脈より投与し、対照とした。投与量は、CDDP として体重 1 kg 当り 1 mg とした。

CDDP の肝臓組織内濃度は、粒子径により異なり、粒子径が小さくなるほど肝臓組織内濃度は増大することが明らかになった。

2. 投与量の影響 Table 6 に MS の投与量と CDDP の肝臓組織内濃度との関係を示した。CDDP の肝臓組織内濃度は投与量の増加とともに増大したが、その増大率は投与量により異なった。一方、CDDP 注射液投与群の場合は、投与量による差は認められなかった。このことは、CDDP 注射液投与群の場合、投与量を増加させると非結合型 CDDP の排泄は増大するであろうが、結合型 CDDP の濃度は投与量と相関せず、ほぼ一定の量

Table 6. Effect of Dose of CDDP on the CDDP Concentration in the Liver of Rabbits

Dose CDDP (mg/kg)	CDDP concentration in tumor of liver ($\mu\text{g Pt/g}$)
Microsphere	
1.0	3.43 ± 0.52
2.0	4.84 ± 0.75^a
4.0	6.12 ± 0.45^a
CDDP solution	
1.0	2.91 ± 0.63
2.0	3.24 ± 0.71
4.0	3.15 ± 0.51

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Average diameter of MS: less than $20 \mu\text{m}$, Chitin concentration: 6.0%. $a) p < 0.05$, significantly different from the result for 1.0 mg eq CDDP/kg.

(Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1251-1255 (1994). Copyright 1994 Pharmaceutical Society of Japan)

が肝臓組織中に存在するためと考えられる。

e) 抗腫瘍効果に及ぼすキチン添加濃度の影響
キチン添加濃度の異なるキチン添加 CDDP アルブミン MS を VX2 腫瘍担癌家兎の固有肝動脈に投与し、塞栓を行い、抗腫瘍効果とキチン添加濃度の関係について検討した。なお CDDP 注射液を肝動脈より投与し、対照とした。投与量は、CDDP として体重 1 kg 当り 1 mg とした。

Table 7 にキチン添加濃度と VX2 肝細胞癌家兎における腫瘍の増殖率の関係を示した。腫瘍の増殖は、キチン添加濃度の増加とともに抑制される傾向が認められた。キチン添加濃度 6% の場合、増殖率は 102% と無添加の場合の 1/3 に抑制された。しかしながら、添加濃度 4.5% と 6% の間には有意の差は認められなかった ($p < 0.05$)。CDDP 注射液投与群では、腫瘍の増殖率は 246.3% とキチン無添加の場合とほぼ同様の値を示した。腫瘍増殖率は、キチン添加濃度の増大とともに抑制されることが明らかになった。これらのことより、VX2 腫瘍担癌家兎における抗腫瘍効果には、キチン添加濃度が大きく関与していることが明らかになった。また抗腫瘍効果の増大には、キチン添加濃度の増加が有効であることが判明した。

f) 抗腫瘍効果に及ぼす粒子径及び投与量の影響

1. 粒子径の影響 TCE における抗腫瘍効果に関与する因子としては、塞栓物質の粒子径が考えられる。塞栓物質の粒子径が大きすぎると塞栓が完全に行えない。一方、小さすぎると細動脈までも塞栓され、胆管炎や胆嚢炎などの合併症の併発も考えられる。そこで、VX2 腫瘍担癌家兎における腫瘍の増殖率と MS の粒子径との関係について検討した。その結果を Table 8 に示した。なお MS はキチン添加濃度 6% のものを用いた。

腫瘍の増殖率は粒子径により異なり、粒子径が小さくなる程増殖率が抑制される傾向が認められた。一方、未治療群の場合は、 $577.7 \pm 67.3\%$ と著しく

増大した。また CDDP 注射液投与群では、 $246.3 \pm 38.2\%$ であった。粒子径 20 μm 以下の MS 投与群と 20—37 μm の MS 投与群の間には、有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。このことは、塞栓が完全でなかったか、あるいは肝臓組織内では CDDP の代謝が速く、粒子径による差が十分に反映されなかったためと考えられる。これらの結果より、MS の粒子径が、抗腫瘍効果に大きく関与していることが明らかになった。また最近、肝細胞癌の患者においては、細胞表面に存在する糖タンパク質であるフィブロネクチンの値が低く、細網内皮系の貪食能が低下しているとの報告もあり、今後、これらとの関係についても考慮する必要があるものと考えられる。

2. 投与量の関係 MS の投与量は、抗癌剤の量だけでなく塞栓状態にも影響を及ぼす。そこで、MS の投与量が抗腫瘍効果にどのような影響を与えるかを、VX2 担癌家兎を用いて検討した。

Table 9 にその結果を示した。なお MS はキチン添加濃度 6%、粒子径 20 μm 以下のものを用いた。MS 群においては、腫瘍の増殖率は投与量により異なり、投与量の増加とともに増殖率は抑制される傾向が認められた。CDDP 注射液投与群の場合は、増殖率は 200—250% であり、投与量による差は認められなかった。このことより、MS の場合、投与量の増加とともに腫瘍の増殖率は抑制されることが明らかになった。しかしながら、投与量 2 mg と 4 mg (CDDP として) との間には、有意の差は認められなかった ($p < 0.05$)。このことは、CDDP の投与量の増加とともに MS としての投与量も増大し、その結果、塞栓部位が増加したため、抗腫瘍効果に及ぼす投与量の差が十分に反映されなかったためと考えられる。

通常、担癌動物の作成は発癌物質との接触、投与により作成され、発癌物質により誘発された癌は、ヒトの癌と組織学的に類似しているといわれている。しかし、本研究で使用した癌細胞移植モデルにおいても、製剤化した MS の抗腫瘍効果を簡便で

Table 7. Relationship between the Concentration of Chitin and the Mean Growth Rate VX-2 Tumor in the Liver of Rabbits

Concentration of chitin (%)	Growth rate (%)
None	275.5 ± 32.7
1.5	156.7 ± 19.4^a
3.0	136.5 ± 23.4^a
4.5	109.4 ± 14.6^a
6.0	101.8 ± 18.0^a
CDDP solution	246.3 ± 38.2

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$). Average diameter of MS: 20—37 μm , CDDP dose: 1.0 mg/kg, Chitin concentration: 1.5%. a) $p < 0.05$, significantly different from the result for the none chitin.

(Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 1136–1139 (1993). Copyright 1993 Pharmaceutical Society of Japan)

Table 8. The Relation between Particle Size of Microsphere and Mean Growth Rate VX-2 Tumor in the Liver of Rabbits

CDDP microsphere	Growth rate (%)
A	90.3 ± 11.8^a
B	101.8 ± 18.0^a
C	176.4 ± 25.8
CDDP solution	246.3 ± 38.2
Microsphere ^b	378.3 ± 32.5
Non-administration	577.7 ± 67.3

The data represent the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$). A: less than 20 μm , B: 20—37 μm , C: 37—74 μm , in particle size. a) $p < 0.05$, significantly different from the result for the C, b) average diameter of MS: less than 20 μm .

(Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1251–1255 (1994). Copyright 1994 Pharmaceutical Society of Japan)

Table 9. Relationship between Dose of CDDP and the Mean Growth Rate

CDDP (mg/kg)	Growth rate (%)
Microsphere	
1.0	90.3 ± 11.8
2.0	70.6 ± 9.7 ^{a)}
4.0	61.8 ± 10.8 ^{a)}
CDDP solution	
1.0	246.3 ± 38.2
2.0	220.5 ± 17.6
4.0	198.7 ± 20.3

The data represent the mean ± S.D. ($n=3$). Average diameter of MS: less than 20 μm , Chitin concentration: 6.0%. ^{a)} $p<0.05$, significantly different from the result for 1.0 mg eq CDDP/kg.

(Reprinted with permission from *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1251-1255 (1994). Copyright 1994 Pharmaceutical Society of Japan)

迅速に評価でき、その目的は十分に達成できるものと考えられる。

5. キチン添加シスプラチン含有アルブミンマイクロスフェアの臨床評価

前項の VX2 腫瘍肝細胞癌モデル家兎における検討において、キチン添加 CDDP 含有アルブミン MS が TCE の塞栓物質として有用であることを、CDDP の血中濃度の推移、肝臓組織内濃度及び抗腫瘍効果の面から種々の検討を加え確かめた。

本項においては、キチン添加 CDDP 含有アルブミン MS の臨床適応として、肝細胞癌患者における MS の塞栓物質としての有用性を検討した。すなわち、70 歳、男性、肝細胞癌 II b 期の患者の肝動脈に 6.0% キチン添加 CDDP アルブミン MS を投与し塞栓を行い、CDDP の放出性 (CDDP の血中濃度の推移)、肝臓組織内濃度、生体内での MS

の食食及び抗腫瘍効果について検討した。

a) CDDP の血中濃度の推移 6.0% キチン添加 CDDP アルブミン MS の投与後の CDDP の血中濃度の推移は、30 分後に 110 ng Pt/ml とピークを示し、以後漸減し 7 日後で 18 ng Pt/ml となった。また、生化学検査値は、GOT, GPT 及び LDH に一過性の上昇が認められた。

b) CDDP の肝臓組織内濃度 投与後 30 日の CDDP の肝臓組織内濃度は、腫瘍部においては、壊死部と非壊死部で差が認められ、腫瘍壊死部で 666.3 ng Pt/g、腫瘍非壊死部で 208.3 ng Pt/g であった。

c) CT による抗腫瘍効果の検討 Fig. 8 に MS 投与前及び投与後 30 日の肝臓の CT 像を示した。投与前においてははっきりと造影された腫瘍部が、MS 投与後 30 日においては、腫瘍部の造影は薄くなり、腫瘍の縮小が認められた。

d) 生体内での MS の食食 Fig. 9 に肝臓の病理像を示した (MS 投与後 30 日)。腫瘍部では、小円形の顆粒状物質 (MS) が腫瘍壊死部で多く認められた。壊死部では、MS のマクロファージ様の異物巨細胞による食食が認められた。残存する肝細胞腫瘍部でも MS は孤立性に散在して見られた。これらのことより、血管内に投与された MS は、肝臓の kupffer 細胞をはじめとする細網内皮系組織によって食食され、速やかに血中に CDDP が放出されたものと考えられる。また、その要因としては血液中に投与された MS の粒子径が数 μm 程度になると食細胞によって食食されやすくなり、食食の程度は粒子表面の物理的性質の影響を受ける。食細胞の表面には、陰イオンよりも陽イオンを取り込み易い領域があり、MS 表面のイオンの分布状態が食食能に大きく関与するものと考えられている。これら

Before embolization

After embolization

Fig. 8. Anti-tumor Effect of 1.5% Chitin-containing CDDP Albumin Microsphere
Average diameter of MS: 10–20 μm . CDDP dose: 9.0 mg/body.

Fig. 9. Phagocytosis of Chitin-containing CDDP Albumin Microspheres was by Foreign Body Giant Cell
The arrow was phagocytosis by foreign body giant cell of similar macrophage.

のことより、キチン添加シスプラチン含有アルブミン MS の生体適合性及び分解性が明らかになった。

おわりに

近年、医療材料として注目されている天然由来素材であるキチンを用いて、キチン添加シスプラチン (CDDP) 含有アルブミンマイクロスフェア (MS) を試作し、MS の収率、CDDP 包含効率、粒子物性、分解性及び *in vitro* における CDDP の放出性等、製剤学的検討を行った。さらに、正常成犬、VX2 腫瘍担癌家兎を用いた *in vivo* における治療学的検討及び肝細胞癌患者における臨床効果について検討を行い、キチン添加 CDDP 含有アルブミンマイクロスフェアの肝細胞癌の化学塞栓治療における新規塞栓物質としての有用性について検討した。以下、本研究で得られた結果を要約する。

1. キチン添加 CDDP 含有アルブミン MS の調製と物性及び分解性の評価

MS の収率及び CDDP の包含効率は、キチン添加濃度を増加させることにより向上させることができた。MS の表面構造は、キチン添加濃度により大きく異なることが判明した。MS の比表面積は、キチン添加濃度の増加に伴い増大することが明らかになった。

これらの結果より、キチン添加濃度が MS の収率、薬物包含効率、表面構造に関与する因子であることが判明した。

2. キチン添加 CDDP 含有アルブミン MS の *in vitro* における薬物の放出性評価

CDDP の放出は、キチン添加濃度をコントロールすることにより、制御できることが明らかになった。また、放出初期のバースト現象は、キチン添加濃度を増加させることにより抑制されることが明らかになった。

3. キチン添加 CDDP 含有アルブミン MS の正常成犬における評価

血管造影により、MS による血管の塞栓が確認さ

れた。また、CDDP の血中濃度の推移より、MS からの CDDP の放出がキチンを添加することにより抑制され、徐放性が増大された。CDDP の肝臓組織内濃度は、MS にキチンを添加することにより、投与後 28 日においても高い濃度が認められ、高濃度の CDDP を維持させるのにキチン添加が有効であることが明らかになった。

4. キチン添加 CDDP 含有アルブミン MS の VX2 腫瘍担癌家兎における評価

CDDP の血中濃度の推移はキチン添加濃度により異なり、添加濃度の増加と共に高濃度の CDDP が持続的に維持され、CDDP の放出のコントロールには、キチン添加濃度の制御が有効であることが判明した。CDDP の肝臓組織内濃度は、キチン添加濃度の増加とともに増大した。また、MS の粒子径が小さくなるほど、投与量が増加するほど組織内濃度が増大することが明らかになった。腫瘍増殖率はキチン添加濃度の増加、MS の粒子径を小さくするほど及び投与量を増大するほど抑制されることが明らかになった。すなわち、抗腫瘍効果を向上させる因子として、キチン添加濃度、MS の粒子径及び投与量が重要であることが判明した。

5. キチン添加 CDDP 含有アルブミン MS の臨床評価

キチン添加 CDDP 含有アルブミン MS を肝細胞癌患者に臨床適応した。その結果、CDDP の血中濃度は、持続的に維持された。CDDP の肝臓内濃度は、腫瘍部特に壊死部において高濃度であった。CT による検討の結果、MS 投与後において腫瘍の縮小が認められた。また、肝組織の病理学的検討により、MS のマクロファージ様の異物巨細胞による貪食が認められ、キチン添加 CDDP アルブミン MS の生体適合性及び分解性が明らかになった。

以上のように、キチンを利用することにより、薬物包含効率が高く、バースト現象が抑制された徐放性 MS を調製することができた。動物実験におい

では、キチン添加MSによる抗腫瘍効果が従来のMSよりも有意に高いことが認められた。また、臨床使用においては、キチン添加MS投与により腫瘍の縮小及びMSのマクロファージ様異物巨細胞による食食が認められ、キチンの塞栓物質としての有用性を製剤学的及び治療学的両面から証明することができた。このことは、肝細胞癌の治療に新しい道を開くとともに、その治療の向上を期待できるものと考察した。

REFERENCES

- 1) Hashida M., Kato A., Kojima T., Muranishi H., Sezaki H., Tanigawa N., Satomura K., Hikasa Y., *Gann*, **72**, 226-234 (1981).
- 2) Morimoto Y., Sugibayashi K., Akimoto M., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 279-285 (1983).
- 3) Gupta P. K., Hung C. T., Lam F. C., *J. Pharm. Sci.*, **79**, 634-637 (1990).
- 4) Kaneo Y., Tanaka T., Iguchi S., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2614-2616 (1990).
- 5) Song Y., Onishi H., Nagai T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2822-2825 (1992).
- 6) Iwai K., Maeda H., Konno T., *Cancer Res.*, **44**, 2115-2121 (1984).
- 7) Maki S., Konno T., Maeda H., *Cancer*, **56**, 751-757 (1985).
- 8) Spenlehauer G., Veillard M., Benoit J. P., *J. Pharm. Sci.*, **75**, 750-755 (1986).
- 9) Tabata Y., Ikada Y., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 698-704 (1987).
- 10) Laakso T., Edman P., Brunk U., *J. Pharm. Sci.*, **77**, 138-144 (1988).
- 11) Willmott N., Chen Y., Goldberg J., Mcardle C., Florence A. T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 433-438 (1989).
- 12) Hino T., Takeuchi H., Niwa T., Nagaya K., Kawashima Y., *Drug Delivery System*, **10**, 115-119 (1995).
- 13) Hino T., Isozaki M., Yamamoto K., Takeuchi H., Kawashima Y., *Drug Delivery System*, **12**, 161-165 (1997).
- 14) Onishi S., Saibara T., Fujikawa M., Sakaeda H., Matuura Y., Matsunaga Y., Yamamoto Y., *Hepatology*, **10**, 349-353 (1989).
- 15) Saibara T., Onishi S., Matsuura Y., Fujikawa M., Sakaeda H., Matsunaga Y., Yamamoto Y., *Biotherapy*, **2**, 1-12 (1990).
- 16) Artursson P., Edman P., Laakso T., Sjöholm I., *J. Pharm. Sci.*, **75**, 962-967 (1986).
- 17) Ensminger W. D., Gyver J. W., Stetson P., Andrews S. W., *Cancer Res.*, **46**, 1499-1506 (1986).
- 18) Teder H., Aronsen K. F., Bjorkman S., Lindell B., Ljungberg J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 939-941 (1986).
- 19) Chen Y., Willmott N., Anderson J., Florence A. T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 978-985 (1987).
- 20) Kawaguchi T., Tsugane A., Higashide K., Endoh H., Hasegawa T., Kanno H., Seki T., Juni K., Fukushima S., Nakano M., *J. Pharm. Sci.*, **81**, 508-512 (1992).
- 21) Nishioka Y., Kyotani S., Okamura M., Miyazaki M., Sakamoto Y., Morita M., Okazaki K., Onishi S., Yamamoto Y., Ito K., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 267-268 (1992).
- 22) Kyotani S., Nishioka Y., Okamura M., Tanaka T., Miyazaki M., Onishi S., Yamamoto Y., Ito K., Ogiso T., Tanada S., Terao M., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2814-2816 (1992).
- 23) Nishioka Y., Kyotani S., Okamura M., Onishi S., Yamamoto Y., Tanada S., Nakamura T., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1136-1139 (1993).
- 24) Nishioka Y., Kyotani S., Okamura M., Onishi S., Yamamoto Y., Kawashima Y., Tanada S., Nakamura T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1251-1255 (1994).
- 25) Gregoriadis G., *Nature*, **265**, 407-411 (1977).
- 26) Saito K., Yubiwa H., Saimoto H., Shigemasa Y., Chitin and Chitosan Symposium, Fukui, 67 (1993).