

## DDS と私

真弓 忠範<sup>1)</sup>

## DDS and Me

Tadanori MAYUMI<sup>1)</sup>

Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,  
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received March 19, 2004)

With the success of the human genome project, the focus of life science research has shifted to the functional and structural analyses of proteins, such as proteomics and structural genomics. These analyses of proteins including newly identified proteins are expected to contribute to the identification of therapeutically applicable proteins for various diseases. Thus, pharmaco-proteomic-based drug discovery and development for protein therapies, including gene therapy, cell therapy, and vaccine therapy, is attracting current attention. However, there is clinical difficulty in using almost all bioactive proteins, because of their very low stability and pleiotropic actions *in vivo*. To promote pharmaco-proteomic-based drug discovery and development, we have attempted to develop drug delivery systems (DDSs), such as the protein-drug innovation system and the optimal cell therapeutic system. In this review, we introduce our original DDSs.

**Key words**—DDS; mutein; bioconjugation; cell therapy; gene therapy; nanoparticle

### はじめに

ゲノム科学が爆発的進展を見せています。しかし、依然としていまだ人類は遺伝子から細胞を創る術を知りません。細胞に憧れ、細胞を敬い、そして細胞に恋する若者達が集まって、薬物治療の原理・原則を考究するために、DDS 研究を自由闊達に行っているところ、それがわれわれの研究室です。

これは従来からわれわれの薬剤学分野の公式ホームページの冒頭に掲げている文章である (<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/index.html>)。私の研究は、大阪大学薬学部学生・大学院修士・博士・助手時代・アメリカ留学中さらに神戸学院大学薬学部助教授・教授時代などすべて、一貫して生理化学・分子細胞生物学領域であった。薬剤学講座担当者として大阪大学に赴任したあとの研究も、テーマこそ全面的に薬剤学の DDS 研究に変えたが、研究哲学の基本的底流となったのは生理化学・分子細胞生物学であった。唯一の違いは、研究

の岐路で悩んだときに、以前ならば「より基礎の方向」へ進めたものを、薬剤学担当になってからは「より応用の方向」へ考えを進めるだけの違いであった。

さて、薬剤学は歴史的にみて、(1)薬物を優れた医薬品とする目的で、他薬との配合、加工などにより投与形態を整えた有効な「医薬品」にするための調剤、製剤研究、(2)有効性と安全性を担保するため、薬物をヒトに投与した場合の体内動態（吸収、分布、代謝、排泄）研究、(3)個々の患者に最適薬物治療を行う目的で、最適の投与形態、投与方法をいかに設定するか、などの研究を行ってきた。このように薬剤学は受け持つ領域が極めて広いために、物理薬剤学、生物薬剤学、製剤学（製剤工学）、調剤学、臨床薬剤学などに分類され、相互に関連した形で世界的に発展してきた。

一方、薬物の薬効は本来、1. 作用部位における薬物濃度と滞留時間、2. 薬物が物性的に有する薬理活性、3. レセプターを初めとした生体側の感受性、と言う3つの要因によって決定される。そのため私が志向した薬剤学は、薬物の薬理活性や生体側の感受性を総合的に考慮しつつ、優れた有効性を効率的に発揮させ、副作用を軽減するための諸技術を

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野（〒565-0871 吹田市山田丘 1-6）

e-mail: mayumi@pharm.kobegakuin.ac.jp

本総説は、平成15年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

駆使しながら、薬物治療の原理・原則を考究する学問分野であった。したがって、私の DDS 研究は、生理化学・分子細胞生物学の延長線上にある応用編と言えよう。

生命体は複雑多岐に渡る情報回路網の総体としてホメオスタシスを維持しつつ存在している。この中で特徴的なことは、蛋白質、遺伝子、糖質などの生体内高分子物質は、その高次構造の中に多くの情報を自ら内蔵し、生体内情報の受信・発信の担い手として重要な機能を営んでいることにある。薬物療法とは、生体内情報の質あるいは量を一部補充・変化させることにほかならない。

さて、20 世紀における有機化学の発展は、天然物化学や新しい合成法、分析法の進歩をもたらし、これを駆使した目覚ましい薬物開発を生み、人類の福祉と健康に寄与してきた。それを受けて、20 世紀型の創薬研究では、膜透過性が良好で、吸収・分布し易い低分子有機化合物が取り挙げられて医薬品化されてきた。しかし今や、「低分子有機化合物だけが薬である」と認識される時代は終わった。21 世紀型の疾病治療は「ゲノム情報」、「トランスクリプトーム情報」、「プロテオーム情報」、さらに生体組織の発生・分化を制御する科学の発展に基づく「細胞情報」などを縦横に駆使したものになっていくであろう。新たに台頭してきたゲノム創薬以外に、今後は、その高次構造の中に豊富な情報を内蔵している生体高分子物質、取り分け遺伝子や種々レセプター分子を含む生理活性蛋白質、さらに抗原分子の最適デリバリーによる効果的な免疫・ワクチン療法や抗体療法などが激増するであろう。「薬としての遺伝子」、「薬としての蛋白質」を疾病治療に適用するケースの台頭である。また、近年の分子細胞生物学の発展により、生体組織の発生・分化を制御する科学が飛躍的に進歩してきた。これらの細胞情報を基に、生きた細胞そのものをも「薬」とみなした細胞療法（再生医療）などが新たに台頭し、今まさに「薬物概念のパラダイムシフト」が起こっている。21 世紀医療の爆発的発展・変革が予測される現在、これらを踏まえた薬物治療の原理・原則を考究する DDS 研究をいかに推進させていくかが、私に与えられた本来のテーマであると思っている。

一方、薬物開発時における付加価値の付与により、薬物の体内動態を精密に制御し、薬物を「必要

な時に、必要な場所に、必要な量だけ作用させる」ことにより、副作用なく有効性を効率的に発揮させ、最適の治療効果を得ることを目的とする新しい理念及び技術（DDS: Drug Delivery System；薬物送達システム）が 20 世紀後半に誕生し注目されてきた。特に 1980 年代以後、1) 薬物吸収の改善（生体膜透過性促進）、2) 体内での薬物放出の制御（必要な量）、3) 標的指向性（ターゲティング）の付与（必要な場所）、4) センサー機能の付与（必要な時）などの分野を総合した DDS 研究が急速に発展してきた。DDS が可能となれば、切れ味鋭い作用を持ちながら副作用のために「医薬品」として日の目を見なかった莫大な数の捨てられた薬物を、次世代の新規医薬品として新たに再開発することが可能となる。DDS によって、薬物治療の最適化がもたらされるだけでなく、次世代に向けて DDS による新規医薬品の再開発、創薬科学への道が拓かれることに世界が熱い眼差しを寄せている。したがって、DDS は薬物開発・創薬における基本理念・技術を示しているとともに、薬物治療の最適化を目指した未来医療を支える基盤理念・技術としても位置付けられる。現在、第一世代的な DDS ではあるが、既に種々の DDS 製剤が世界的に実用化されており、将来的には DDS 技術を利用した医薬品製剤が医薬品の主流を占めるであろうと予測されている。

前述のように薬物療法とは、生体内情報の質あるいは量を一部補充・変化させることにほかならない。従来の創薬研究では、膜透過性が良好で、かつレセプター親和性の高い低分子物質が薬物として開発され、細胞内・外に存在するレセプターに送達させることにより薬理効果を期待してきた。しかしながら将来的には、その高次構造の中に多くの情報を自ら内蔵し、生体内情報の受信・発信の担い手として重要な機能を営んでいる遺伝子や体内生理活性高分子物質を医薬品として開発しようとする試みが必然となってこよう。ところが、生理活性蛋白質や遺伝子などの生体内高分子物質は、これまでの低分子有機化合物の薬物とは異なり膜透過性が悪く、吸収や組織移行性に乏しいばかりか、血中で速やかに分解されてしまう。取り分け遺伝子やワクチンなどは細胞内に導入されない限り作用の発現は皆無である。したがって、このような高分子物質を医薬品として開発するために必須の最重要基本戦略の第一

は、当該高分子を安定に効率よく標的組織の細胞表面レセプターに送達させること、基本戦略の第二は、それら高分子物質を効率よく細胞膜を移行させ、細胞質内に導入することにあると考えた。私は平成元年の大阪大学薬学部薬剤学講座赴任以来、これら2つを基本戦略として以下のようにDDS研究を推進してきた。

### 1. 第一の基本戦略：生理活性高分子物質を安定に効率よく標的細胞に送達する

ポストゲノム研究は、プロテオミクスや構造ゲノミクスへ集約されつつあり、今後は、医薬品シーズとなり得る蛋白質が急速に発掘されてくるものと思われる。疾病治療に有効な蛋白質を創製しようとするプロテオーム創薬にかかる期待は絶大なものがある。しかしながら、一般的に蛋白質は生体内安定性が極めて乏しいために臨床応用の際には大量頻回投与を余儀なくされ重篤な副作用を招いてしまう。したがって、現在までごく一部の比較的安定な蛋白質が実用化されているに過ぎない。そのなかで、鋭い作用を有しながら生体内安定性に乏しいサイトカインなどは、内蔵された豊富な情報量を反映して多様な *in vivo* 生理活性を示すことが判明している。このような生体内高分子物質は、目的とする治療作用のみならず副作用の原因となる作用までも同時に発現してしまうため、医薬品化はさらに困難となる。したがって、プロテオーム創薬を推進するためには、これら生理活性蛋白質固有の問題点を克服し得る手段、DDS基盤技術の確立が必須となる。

われわれは上記の観点から、堤 康央助手を中心とするグループによって、①医薬価値に優れた機能性人工蛋白質を創製できる分子進化戦略の構築、②蛋白質の体内安定性を向上させ、目的治療作用の選択的発現能を付与できるバイオコンジュゲーションの確立、③ターゲティング機能を有した新規キャリアの設計などに関する研究を、サイトカインをモデルとして研究を推進してきた。

**1-1. 機能性人工蛋白質を創製できる分子進化戦略の構築** 従来から、世界のバイオ研究機関がKunkel法などの点突然変異法による機能性人工蛋白質の作製を精力的に進めてきた。しかしながら、点突然変異法では蛋白質のアミノ酸を1つずつ別のアミノ酸に改変し、個々の構造変異体を作製したうえでその機能を評価しなければならないため、時間

と労力を費やすばかりか作製し得る構造変異体の種類にも限界があり、期待通りの成果は得られていない。この点われわれは、ファージ表面提示法を独自に改良することにより、 $10^8$ 種類以上もの多様性を有した構造変異蛋白質をCombinatorial Biosynthesisし、この中からレセプター親和性・特異性の高い医薬価値に優れた機能性人工蛋白質を迅速かつ効率よく創製できるプロテオーム創薬システムを確立した。<sup>2,3)</sup> 例えば、点突然変異法を用いた構造一活性相関研究により、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の Lys 11, Lys 65, Lys 90 は立体構造形成やレセプター結合に必須と言われてきた。しかしわれわれはこの概念を覆す知見、すなわち、TNF- $\alpha$  中の全6個のリジン残基を一挙に他のアミノ酸に置換した場合、wild型と同等若しくは10倍以上ものレセプター親和性や生物活性を示すリジン欠損TNF- $\alpha$ を創製することに初めて成功した (Fig. 1)。この知見はTNF- $\alpha$ の構造変異体を網羅的に作製し、これらの諸機能を高速解析することにより得られたものであり、レセプター指向性を有する抗腫瘍アゴニストや抗炎症アンタゴニストなどの機能性人工TNF- $\alpha$ をも創製している。以上の成果は、バイオ産業に新たな医薬品シーズやプロテオーム創薬のための基盤技術を提供するとともに、従来までの点突然変異法による知見では想像もでき得なかった新たな蛋白質の構造一活

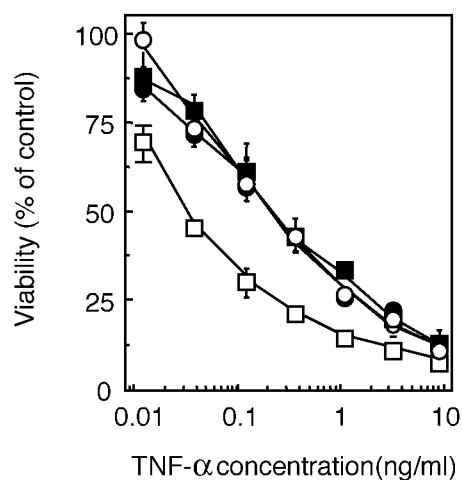


Fig. 1. *In vitro* Bioactivity of Wild-Type TNF- $\alpha$  and mTNF- $\alpha$ s

The specific activity of TNF- $\alpha$ s was measured by cytotoxicity assay using LM cells in the presence of actinomycin D. Each data value represents the mean  $\pm$  S.D. Recombinant human TNF- $\alpha$  purchased was used as a standard. ■: Recombinant human TNF- $\alpha$  standard, ●: wild-type TNF- $\alpha$  (wTNF- $\alpha$ ), □: mutant TNF- $\alpha$ -K90 derivative (mTNF- $\alpha$ -K90 derivative), ○: mutant TNF- $\alpha$ -Lys(-) (mTNF- $\alpha$ -Lys(-)).

性相関の概念を提唱するものと期待される。

一方でプロテオミクス及び構造ゲノミクスの進展と、これらの知見を統括したバイオインフォマティクスの確立は、蛋白質のアミノ酸配列と立体構造、機能との連関を理解可能とするため、近未来的にはアミノ酸配列が与えられれば、未知蛋白質の構造と機能が予測できるようになってこよう。これは逆に、欲する機能と立体構造を有したアミノ酸配列のデザインを可能とするだけでなく、アミノ酸配列が有する立体構造やその機能を模倣した有機化合物の合理的設計をも可能とするものである。このようなバイオインフォマティクスをシステムアップするためには、未知蛋白質の機能解明や構造解析に加え、種々蛋白質について構造変異体を網羅的に作製し、レセプターとの結合様式や生物活性などの機能情報を集積したうえで、その立体構造との連関を追求しなければならない。この点われわれが開発したプロテオーム創薬システムは、視点を変えればわずか1週間で $10^8$ 種類以上もの多様性を有する構造変異体ライブラリを作製し、その機能情報を高速集積し得る唯一の基盤技術である。本観点からわれわれは現在、機能性人工TNF- $\alpha$ を含む様々な蛋白質の構造変異体の機能評価とともに、そのX線結晶構造解析を進めており、近未来的なバイオインフォマティクスへの研究展開が期待される。

**1-2. ポストゲノム新時代に叶うバイオコンジュゲーションの確立** 前述の「②蛋白質の体内安定性を向上させ、目的治療作用の選択的発現能を付与できるバイオコンジュゲーションの確立」に関して

は、それまで酵素蛋白質への適用に限定されていたバイオコンジュゲーション法を、広く生理活性蛋白質一般に適用するためのグレードアップを図ってきた。<sup>2-53)</sup> その結果、(1)蛋白質の作用機構を考慮し最適の修飾高分子を選択し、(2)比活性-修飾率-分子サイズなどの相関をもとに最適条件を見出すことにより (Fig. 2), ①蛋白質の生体内安定性を向上させ、ひいては *in vivo* における活性を飛躍的に向上させ得ること、②多様な *in vivo* 作用の中から、目的治療作用のみを数100倍にも高め得ることを明らかにしている。この②の生理活性蛋白質への作用の選択性付与は、投与量の削減や副作用発現組織への移行性低下によることを明らかにし、PEG化 Interleukin-6 や PEG化 TNF- $\alpha$  の場合、副作用を増幅

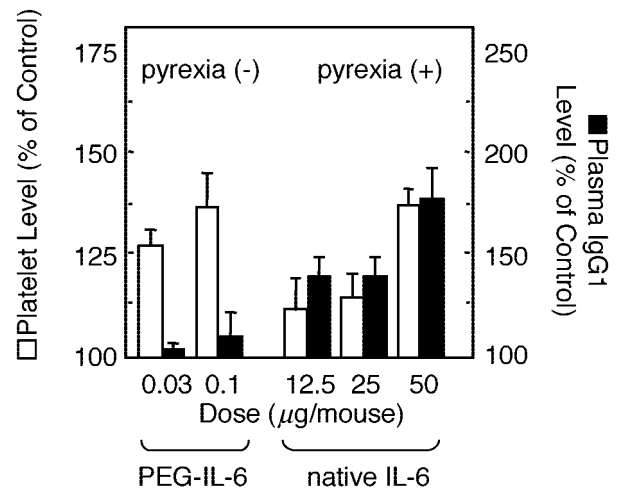


Fig. 3. PEGylation of IL-6 Effectively and Selectively Increases Its Thrombopoietic Potency

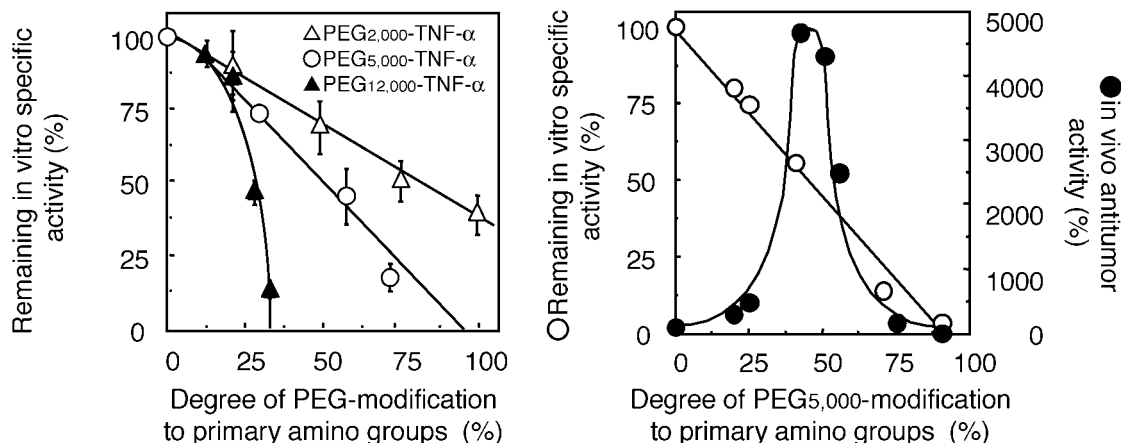


Fig. 2. Effects of Degree of PEG-Modification *In vitro* Bioactivity and *In vivo* Antitumor Activity of PEGylated TNF- $\alpha$ s

Table 1. Antitumor Effects of Native TNF- $\alpha$  and MPEG-TNF- $\alpha$  on Survival Days after Tumor Inoculation

	Injection dose (JRU/mouse/day)	Survival time (days)	Complete regression
Saline	0	32 $\pm$ 1.1 (29, 29, 31, 32, 33, 33, 37)	0/7
PEG	0	31 $\pm$ 1.2 (28, 28, 28, 32, 33, 34, 35)	0/7
Native TNF- $\alpha$	10000	67 $\pm$ 24.8 (7, 7, 7, 16, 50, 150<, 150<, 150<)	3/8
	5000	46 $\pm$ 1.1 (43, 43, 44, 48, 48, 48, 50)	0/7
	2000	43 $\pm$ 1.1 (40, 40, 42, 43, 44, 44, 48)	0/7
MPEG-TNF- $\alpha$	500	150< (150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<)	10/10
	200	150< (150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<, 150<)	10/10
	100	95 $\pm$ 19.5 (46, 48, 52, 59, 150<, 150<, 150<)	3/7

Native TNF- $\alpha$  and MPEG-TNF- $\alpha$  were *i.v.* injected on day 7, 10, 14, 17. Complete regression was defined when tumor was not regrown for more than 150 days.

することなく目的とする血小板産生促進効果や抗腫瘍効果が各々 500 倍 (Fig. 3) 及び 100 倍 (Table 1) にも選択増強されることを認めている.<sup>13,29)</sup> 近年上市された PEG 化サイトカインレセプターや PEG 化 IFN- $\alpha$  などはリウマチや C 型肝炎に対する特効薬として脚光を浴びているが、これらの開発研究には、われわれの研究成果が数多く引用されている。

このようにバイオコンジュゲーションは蛋白質の医薬品開発において、最適 DDS 技術の地位を確立しつつあるが、現在のところその成功例は極めて少ない。この最大の原因は、水溶性高分子を蛋白質にコンジュゲートさせる際に、水溶性高分子がリジン  $\epsilon$  アミノ基や N 末端  $\alpha$  アミノ基ヘランダムに結合してしまうことにある。そのため、生理活性蛋白質の活性発現部位への結合は致命的な比活性低下を来し、結合分子数の違いはバイオコンジュゲート体の分子的・機能的不均一性をもたらす結果となる。われわれはこれらの問題を解決するため、前述した①を応用して、生理活性蛋白質の活性を完全に保持したリジン欠損体を創製し、N 末端アミノ基のみを標的とした部位特異的バイオコンジュゲーション法を確立した。<sup>2,3)</sup> このリジン欠損体に対する部位特異的バイオコンジュゲーション法により、分子的均一性に優れたバイオコンジュゲート体がほぼ 100% の収率で得られる。また TNF- $\alpha$  の場合、従来までのランダムなバイオコンジュゲーションではわずか 1 分子の高分子導入により 10% 以下に活性低下してしまうが、リジン欠損 TNF- $\alpha$  に対する部位特異的バイオコンジュゲーションではほとんど活性低下を招かないなど、圧倒的な利点を有していることを証明した。Figure 4 に示したように、この分子的均一

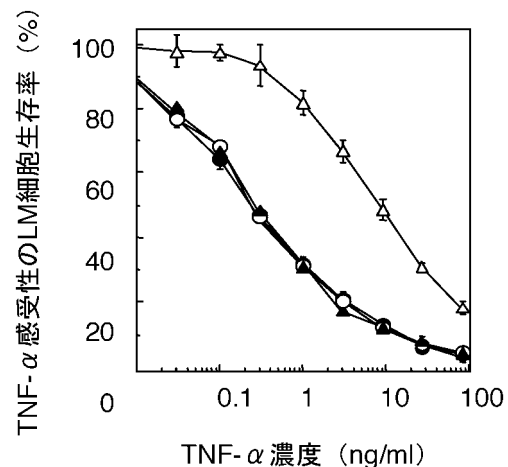


Fig. 4. *In vitro* Bioactivity of Mono-PEGylated TNF- $\alpha$ s

Each data value represents the mean  $\pm$  S.D.  $\circ$ : wTNF- $\alpha$ ,  $\Delta$ : ran-PEG-TNF- $\alpha$  (randomly mono-PEGylated wTNF- $\alpha$  with linear-type PEG5000),  $\bullet$ : mTNF- $\alpha$ -Lys(-),  $\blacktriangle$ : sp-PEG-mTNF- $\alpha$  (N-terminus specific mono-PEGylated mTNF- $\alpha$ -Lys(-)).

性や比活性に優れた部位特異的 PEG 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  (sp-PEG-mTNF- $\alpha$ ) は、血中滞留性や抗腫瘍作用の選択的発現能にも優れているうえ、従来法で作製したランダム PEG 化 TNF- $\alpha$  (ran-PEG-TNF- $\alpha$ ) よりも著しく強い *in vivo* 抗腫瘍効果を有していることも明らかにした。<sup>2,3)</sup> 以上の部位特異的バイオコンジュゲーション・システムは、現在様々なバイオ製薬産業界からの問い合わせや共同研究の申し込みを頂いている。またわれわれは既に、種々の生理活性蛋白質に関して医薬価値に優れた機能性リジン欠損体の創出に成功しており、今後の更なる研究の進展が注目される。

**1-3. 薬物の時空間的な体内挙動を制御できる新規デバイスの開発** 前述の「③ターゲティング機能を有した新規キャリアの設計」に関しては、われ

われは従来より、標的指向性を有するターゲティング素子の開発を行ってきた。既に、腫瘍血管を標的とする癌ミサイル療法に関する研究の一環として、異なった動物種や異なった癌種に対しても共通に、特異的に腫瘍血管を認識するモノクローナル抗体を得ることに成功している。<sup>54-77</sup> これをさらに進めて、体内生理活性高分子などの薬物を、目的とするいかなる標的組織・細胞へもターゲティングできるミサイル分子を簡便かつ迅速に創出するために、ファージ抗体・ペプチド・ディスプレイシステムの構築を進めている (Fig. 5)。本ファージディスプレイ法による抗体及びペプチドのライブラリー・サイズは  $10^9$  種類以上の独立クローンから成っており、理論的にはいかなる抗原 (細胞) に対する特異的結合抗体やペプチドをも含んだものと成っている。われわれは本システムを駆使し、遺伝子治療におけるアデノウイルスの PEG 化による次世代型標的指向ベクター開発、さらに生理機能蛋白質の標的指向型バイオコンジュゲーションのみならず、癌組織血管へのミサイル療法や再生療法への新たな方法論の構築を目指している。また、将来的に注目されるであろう細胞内動態研究の中で、個々の細胞内オルガネラに対するターゲティングをも実現したいと、夢はふくらむばかりである。

一方、従来よりバイオコンジュゲート体の生体内挙動や薬効発現強度が、蛋白質表面を覆う修飾高分子の諸性質によって運命付けられることに着目して、バイオコンジュゲーション法のさらなるグレー

ドアップを目的に、多数の機能化水溶性高分子キャリアの設計を図ってきた。<sup>22,28,30,33,35,36,39,41,42,48,49,51,52</sup> 例えば、われわれは腎臓への高度な薬物送達能と pH 応答性薬物徐放化能を併せ持った [Poly (vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride); PVD] を新規合成することに成功した (Fig. 6)。<sup>49,51,52</sup> この PVD は、pH8 以上で蛋白質のアミノ基と結合し、pH7 以下で蛋白質を徐々に解離する。一般に炎症

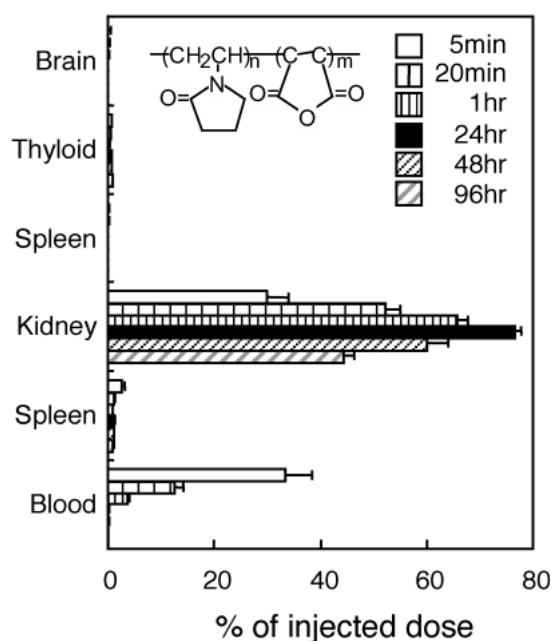


Fig. 6. Tissue Distribution of Poly (VP-co-DMMA) after *i.v.* Injection

<sup>125</sup>I-labelled PVD was injected into the tail vein of BALB/c mice and tissues were collected over different periods to measure radioactivity by  $\gamma$ -counter. Each point represents the mean  $\pm$  S.D.

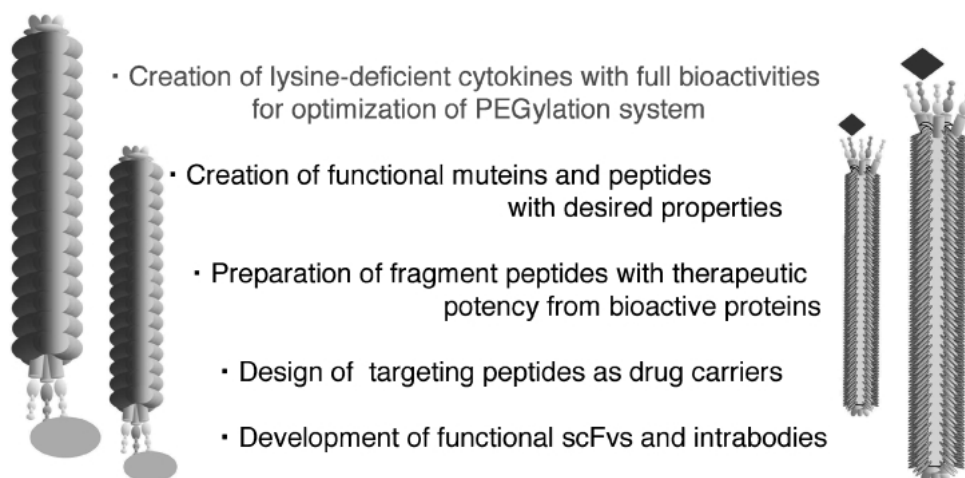


Fig. 5. Application of Phage Display System to Proteomic-Based Drug Discovery

組織などでは正常組織よりも低 pH であるため、病態組織でのみ蛋白質が徐放されることを意味している。この PVD をマウスに尾静脈内投与したところ、数時間後に投与量の約 80% が腎臓へ選択的に集積し、4 日後には 40% に減少していた。この PVD は腎尿細管上皮細胞へ選択的に取り込まれるが、細胞毒性を全く示さないうえ、大量投与しても腎臓などの各組織に傷害を及ぼさない。さらに PVD で修飾した Superoxide dismutase は体内安定性に優れ、かつ静脈内投与後、選択的に腎臓へ高集積し、著しい腎炎治療作用を発揮することを見出した。現在、前述したプロテオーム創薬システムによる機能性人工蛋白質の創製や部位特異的バイオコンジュゲーションシステムとの融合により、新たな腎疾患治療戦略の確立を目指した研究を推進している。

## 2. 第二の基本戦略：生理活性高分子物質を効率よく細胞膜を移行させ、細胞質内に導入する

第二の基本戦略に関しては、中川晋作助教授を中心とするグループによって研究が推進されてきた。細胞質内物質導入に関する研究は、これまで世界的にエンドサイトーシスを介した方法が試みられてきた。しかし、この方法はリソソーム酵素による分解を免れることができず、細胞質内導入効率が著しく低いと言う決定的な欠点を有している。また物理・化学的手法により細胞膜を一時破壊して導入する方法もあるが、細胞膜機能に傷害を与えることはこの分野においては致命的である。そこでわれわれは細胞工学センター教授、岡田善雄先生（当時）、中西真人助手（当時）との共同で、センダイウイルスの細胞膜融合能をリポソームに付与することにより、高い細胞質内導入効率と安全性を併せ持った膜融合リポソームの確立を計った。

**2-1. 遺伝子療法** 前述の膜融合リポソームを用いることにより、ほとんどすべての動物細胞に対して、わずか数分間で、リポソーム内に封入した物質（遺伝子・蛋白質・糖質など）をセンダイウイルスとほぼ同等の高い効率で、細胞膜との融合によって細胞質内に直接導入することが可能となった。<sup>77-89)</sup> この膜融合リポソームを血管内皮細胞への遺伝子導入ベクターとして *in vivo* に適用したところ、病原性、発癌性、細胞毒性などを示すことなく、現在、世界で一般に使用されているカチオニックリポソームの 1600 倍以上も高い遺伝子発現が得

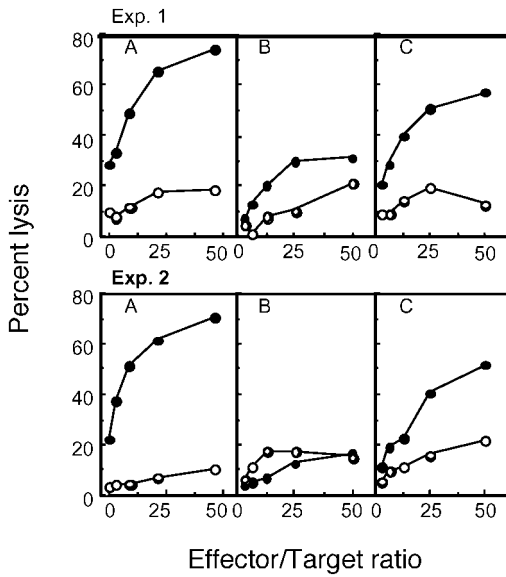
Table 2. Comparison of *In vivo* Gene Transfer Activity of Fusogenic Liposome and Cationic Lipid-DNA Complex

	DNA conc. ( $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )	Luciferase activity (RLU/ $10^7$ cells)
Fusogenic liposome	1.5	8013 $\pm$ 809
Cationic lipid-DNA complex <sup>a)</sup>	1.5	4.9 $\pm$ 0.7
	40.0	92.2 $\pm$ 18.5

a) DNA: Cationic lipid=1:5 (w/w).

られ (Table 2), 固形癌に対する *in vivo* 遺伝子治療に新しい方法論を提示することができた。<sup>90)</sup> さらに導入遺伝子の核移行を必要とせず、体内細胞のほとんどを占める休止期の細胞においても高い発現をもたらすことを目的とした細胞質内遺伝子発現系をも確立することができた。<sup>91-93)</sup> 現在は、アデノウイルスの PEG 化による次世代型標的指向性ベクター開発など、さらに有効な遺伝子治療ベクター開発に向けた検討を行っている。<sup>94-111)</sup>

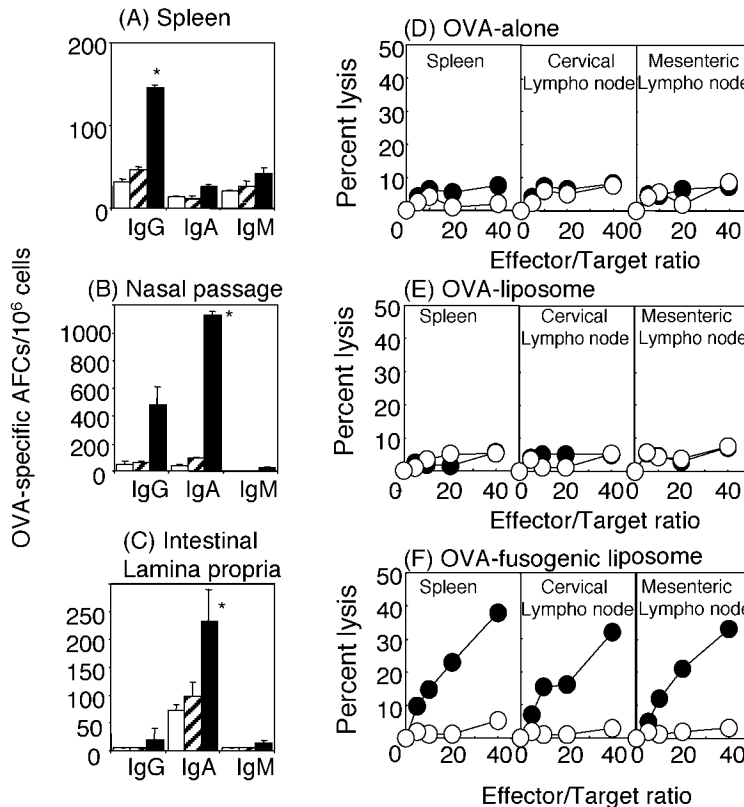
**2-2. 新規ワクチン開発** さて一方、O157, SARS などの突然の流行や AIDS などの致命的新興・再興感染症が地球規模で広がりつつあり、次世代型新規ワクチン療法の開発が待望されている。従来のワクチンでは、抗原がエンドサイトーシスを介して外来性抗原として抗原提示細胞内に取り込まれるため、液性抗体は誘導されるものの、感染細胞除去の主役であるキラー T 細胞 (CTL) はほとんど誘導されず、ウイルス感染症などに対して十分なワクチン効果を得ることができなかつた。CTL は抗原提示細胞質内の抗原が、内在性抗原として認識・処理されることによって誘導される。したがって、次世代ワクチン療法確立のためには、外来性抗原をエンドサイトーシスを介さずに細胞質内に直接導入して、内在性抗原として認識させ得る抗原キャリアーの開発が最重要課題であった。われわれは本課題に膜融合リポソームを適用して、外来性抗原を細胞質内に直接導入することにより、現在世界で最も強力と言われているフロイントの完全アジュバントをも凌ぐ、効果的な CTL の誘導に成功した (Fig. 7).<sup>84,86,112-116)</sup> さらに、膜融合リポソームの作製に用いるセンダイウイルスが、本来気道粘膜に感染するウイルスであることから、われわれは粘膜免疫を誘導する鼻腔関連リンパ組織に着目し、膜融合リポソームが鼻腔粘膜を介した抗原キャリアーとして有効に機能し得ると考えた。種々の検討を行った結



**Fig. 7. OVA-Specific CTL Response after *In vivo* Priming with Variousely Formulated OVA**  
 Spleen cells from C57BL/6 mice that had been immunized with 100  $\mu$ g of OVA in fusogenic liposome (A), simple liposome (B), or complete Freund's adjuvant were assayed for cytotoxic activity. ●EG7: OVA-transfectant, ○OEL4: Control.

果, 投与部位の鼻腔粘膜面だけでなく, 遠隔部の腸管粘膜などにおいても, 極めて著しい抗体産生と CTL が誘導されていることを明らかにした (Fig. 8).<sup>89,117,118</sup> さらに, 粘膜系の免疫システムだけでなく全身免疫システムにおいても著しい抗原特異的免疫応答を誘導しており, 粘膜免疫特有の二段構えの防御機構を, 膜融合リポソームが極めて効率的に行うことを示した.

**2-3. 細胞内動態制御を目指して** 21世紀における次世代の新規ワクチン療法を目指して, 抗原ペプチドの細胞内動態制御に基づく効果的な CTL 誘導システムを構築すべく, われわれはさらに CTL 誘導のグレードアップを図るべく検討を行った. 前述のように, 細胞内での抗原蛋白質は, 通常プロテオソームによりペプチドに断片化された後, TAP (Transporter associated with antigen processing) を介して小胞体内へ運ばれ MHC クラス I 分子と複合体を形成する. したがって細胞内に導入された外来性抗原ペプチドを, 小胞体へ効率的に送達させる細



**Fig. 8. Novel Hybrid Delivery System, Fusogenic Liposome, for the Induction of Mucosal and Systemic Immune Responses**  
 Antigen-specific antibody forming cells (AFCs) in spleen (A), nasal passage (B) and intestinal lamina propria (C) were determined by ELSPOT assay (open column, OVA-alone; hatched column, OVA-liposomes; closed column, OVA-fusogenic liposomes). Nasal immunization with OVA-alone (D), OVA-liposome (E) and OVA-fusogenic liposomes (F) induced OVA-specific CTL responses. CTL activity against EG7 (○) or OEL4 (●) were measured by <sup>51</sup>Cr-release assay.



胞内オルガネラ・ターゲティングを成功させれば、さらに一層効果的な CTL 誘導が可能となるはずである。われわれは、細胞外から細胞質内への外来性抗原の送達には膜融合リポソームを用い、細胞質から小胞体内への抗原送達にはアデノウイルスの E3/19K 糖蛋白質由来の小胞体移行配列 (Eris; ER insertion sequence) を利用した。ニワトリ卵白アルブミン (OVA) 由来の SL8 ペプチドをモデル抗原とし、その N 末端側に Eris を付加した ML26 ペプチドを用いて検討した。その結果、*in vitro*, *in vivo* ともに、ターゲティングしない群に比べてはるかに高い CTL 誘導を達成することに成功した (Fig. 9) (投稿中)。以上、抗原の細胞内動態を制御することにより、極めて効率よく効果的な抗腫瘍免疫反応が誘導できることが示された。現在これらの成果をもとに、CTL 誘導を必須とする癌ワクチン開発に向けて着々と研究を進めている。

以上の事実から明らかなように、細胞内の特定オルガネラに送達して初めて作用を発現する高分子薬物を次世代型新規療法に発展させていくためには、従来から行われてきた体内徐放や組織ターゲティングなどの個体レベルでの体内動態といった観点からのアプローチだけでは不十分である。まず、細胞質内への効率の良い送達法を開発したうえで、新たに細胞内における遺伝子や機能性核酸、抗原蛋白質などの徐放化やオルガネラ・ターゲティングなどの細胞内動態と言う新しい概念を導入し、それらを実現化するためのデバイス並びに技術などを開発してい

かなければならない。そのためには、水溶性の種々生理活性高分子物質を細胞質内に導入するだけでなく、細胞を傷つけることなく、ナノオーダーの機能性粒子などの細胞内動態制御物質を、インタクトな状態で、一挙に多数の細胞の細胞質内へ導入する技術が必須となる。20 世紀型の DDS 研究は、個体 (細胞外) レベルの体内動態制御が中心であったが、21 世紀においてはよりミクロな細胞レベルの細胞内動態制御が求められている (Fig. 10)。

**2-4. ライフサイエンスとナノサイエンスの架け橋：ナノ治療システムの構築に向けて** 薬物の生体内動態を精密に制御することにより、標的組織に選択的に送り込み、その薬物の治療効果を最大限に引き出すことを目指して、薬学・医学・工学的テクノロジーを駆使して様々な DDS 技術や薬物担体が開発されてきた。なかでも、リポソームやナノミセル、ナノスフェアなどの微粒子製剤は、物理的・化学的安定性が高く、多量の薬物を濃縮した状態で内部に含有することができる。そのうえ、薬物の放出制御機能と組織へのターゲティング機能の両方を付与することが可能であるため、生体内での薬物動態を制御する薬物担体として世界的に注目されており、一部は既に DDS 製剤として適応されている。

この生体内における薬物動態を制御するために開発されてきた機能性ナノ粒子の設計技術を駆使すれば、細胞内における薬物の徐放化やオルガネラ・ターゲティングなど、細胞内における薬物動態を時間的・空間的に制御する技術開発にも応用できるは

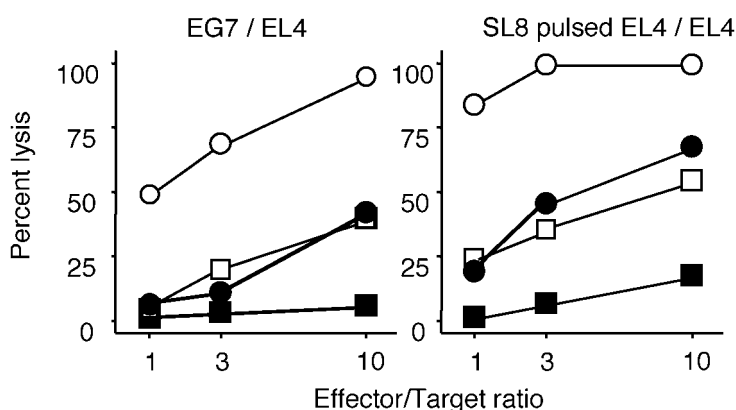


Fig. 9. The Combination Endoplasmic Reticulum Insertion Sequence with Fusogenic Liposome as an Antigen Carrier Can Enhance the Priming of Antigen-Specific CTL Responses

SL8: OVA peptide, ML26: Eris-SL8 fusion peptides, Eris: Endoplasmic reticulum insertion signal sequence

□: SL8 peptides encapsulated in FL: 25.0 µg, ■: SL8 peptides encapsulated in FL: 2.5 µg, ○: ML26 peptides encapsulated in FL: 25.0 µg, ●: ML26 peptides encapsulated in FL: 2.5 µg.

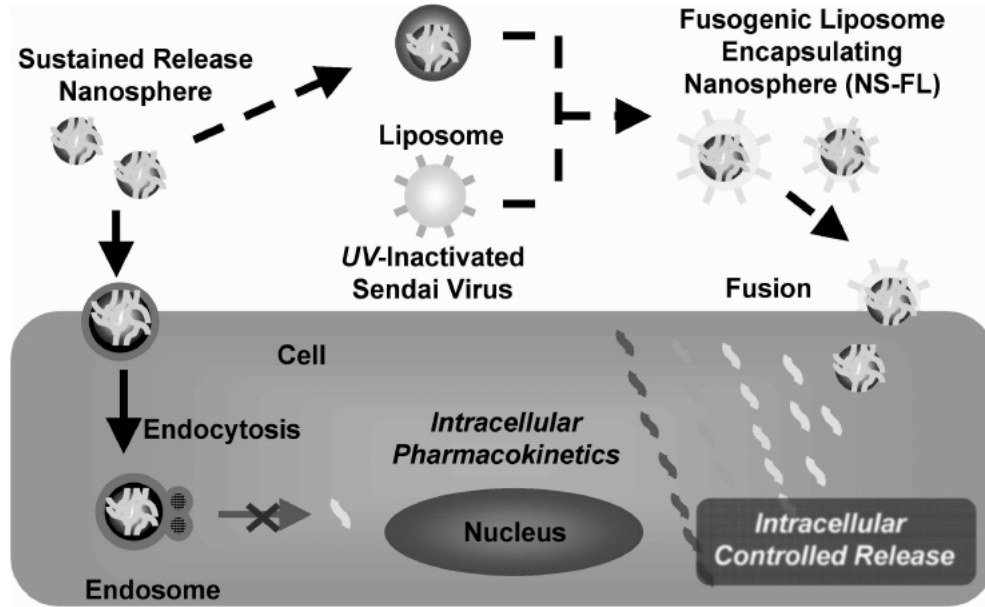


Fig. 10. Novel Hybrid Vector, Fusogenic Liposome, for the Delivery of Sustained Release Nanosphere

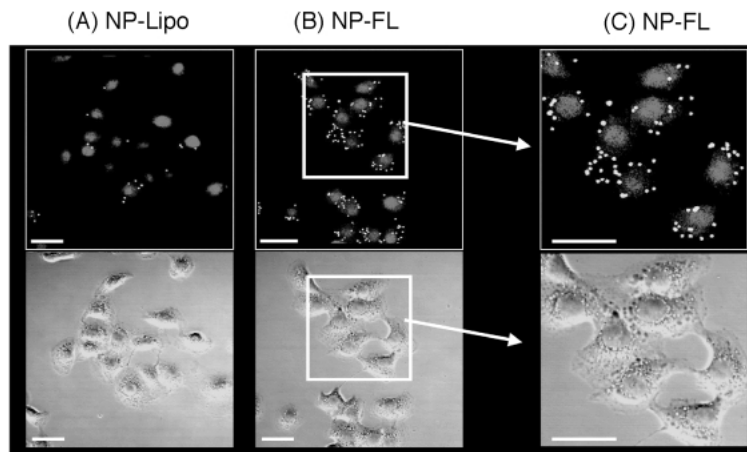


Fig. 11. Intracellular Distribution of Nanoparticles Introduced into Living Cells by Fusogenic Liposomes

LLCMK2 cells were incubated with FITC-labeled NP encapsulated in either Lipo (A, NP-Lipo) or FL (B and C, NP-FL) for 30 min. After staining of nucleus with SYTO 64 for 1 h, cells were observed by confocal microscopy (top). The same specimens were visualized by transmission microscopy. Bars indicate 50  $\mu$ m length at  $\times 400$  (A, B) or  $\times 800$  (C) magnification.

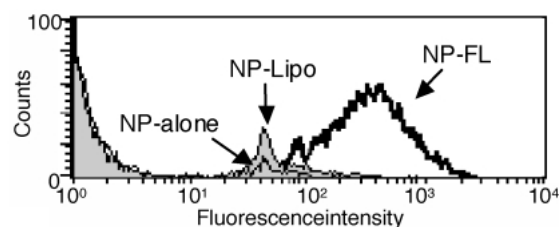
ずである。そのためには、機能性ナノ粒子を多数細胞の細胞質内に、簡便かつ一挙に送達できる技術の開発が必要不可欠である。しかしながら、粒子状物質は通常エンドサイトーシス経路で細胞に取り込まれるため、細胞内ではエンドソーム膜に包まれた状態で存在し、内封した薬物もリソソーム酵素により分解されてしまう。ナノ粒子製剤を簡便かつ効率的に細胞質内に導入し得る技術が開発できれば、それは細胞内薬物動態を制御する 21 世紀型 DDS 研究の本格的な幕開けを意味することとなる。

われわれは膜融合リポソームを応用することによ

り、これまでマイクロ・マニピュレーターによるマイクロ・インジェクション法でしか導入することのできなかつた粒子をも細胞質内へ直接導入することではないかと考えた。蛍光標識した直径 500 nm のポリスチレン・ナノ粒子を最大粒子モデルとして用い、この粒子を封入した膜融合リポソームを作製・精製することに成功した。ナノ粒子を封入した膜融合リポソーム (NP-FL) を細胞に作用させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、ナノ粒子由来の粒子状の緑色蛍光は、染色された核と同一断面上の細胞内に数多く観察された (Fig. 11)。一方、ナノ

粒子単独や通常のリポソーム (NP-Lipo) を作用させた細胞においては、ナノ粒子の取り込みはほとんど確認されなかった。また、細胞内へのナノ粒子の導入量を解析した結果、用いた  $10^5$  個の細胞のうち、95%以上の細胞にナノ粒子の導入が認められ、1細胞当たり平均約10個のナノ粒子が導入されていることが判明した (Fig. 12)。なお、粒子径500 nmの粒子が細胞質内に導入しても、細胞傷害性は全く認められなかった。

この細胞内導入技術を用い、細胞質内での薬物動態を制御する最初のアプローチとして、細胞質内における薬物徐放化システムの構築を試みた。モデル薬物として蛍光標識したオリゴヌクレオチドをポリビニルアミンナノスフェアーに吸着させ、膜融合リポソームを用いて細胞質内に導入し、細胞質内での



No. of NP	NP-alone	NP-Lipo	NP-FL
0	97.88%	85.77%	5.81%
1~5	2.09%	13.68%	29.88%
6~10	0.02%	0.49%	31.21%
11~25	0%	0.07%	28.90%
26~	0%	0%	5.26%

Fig. 12. Quantitative Analysis for the Introduction of Nanoparticles

オリゴヌクレオチドの徐放を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、ナノスフェアーから経日的にオリゴヌクレオチドが細胞質内へ徐々に放出されていることが確認された (Fig. 13)。現在は、この細胞質内徐放効果を作用面において評価するとともに、それらの情報を基に細胞内での薬物動態制御に基づく「ナノ治療システム」を構築すべく種々検討を行っている。

この方法は、マイクロマニピュレーターなどを用いることなく、またエンドサイトーシスを介することもなく、一挙に多数の細胞の細胞質内に固形粒子を直接導入できることを示した初めての報告である (Fig. 14)。将来この方法は、分子細胞生物学における基礎研究技術として、さらに応用面では21世紀に爆発的発展が予測されているナノサイエンスに基づいて作製される機能的ナノ粒子の生体への適用

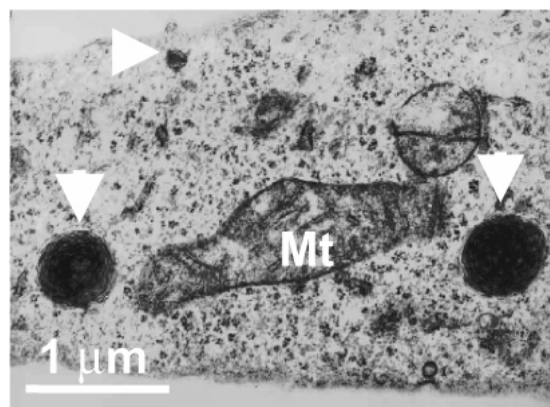


Fig. 14. Transmission Electron Micrographs of Intracellular Nanoparticles ( $\times 20000$ )

Arrow: nanoparticle, Mt: mitochondrion.

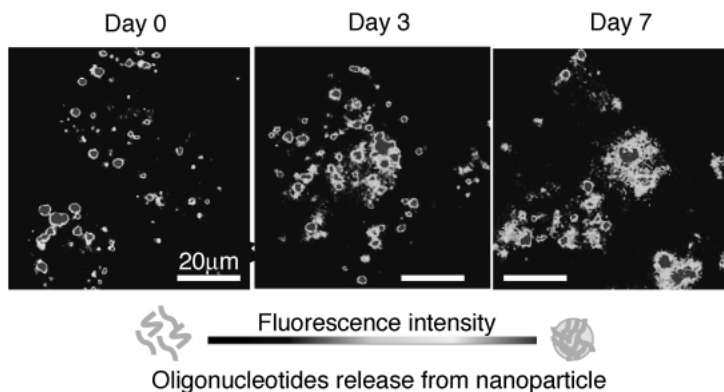


Fig. 13. Sustained Release of Oligonucleotides from Nanoparticle Introduced by Fusogenic Liposome  
Intracellular distribution of oligonucleotides were visualized by confocal microscopy on days 0, 3, and 7.

研究に、「ナノサイエンスとライフサイエンスを結ぶ架け橋」として決定的な貢献をもたらすものと期待している。また、個体レベルの薬物の体内動態研究から、さらにミクロな細胞内レベルの動態研究への道を拓くものとして重要な基盤テクノロジーを提示していると考ええる。

**2-5. 細胞性製剤の粒子設計** 元来、生命体は形態的・機能的に異なる様々な細胞から形成されており、これら細胞は巧妙な細胞間情報伝達機構を駆使して相互の調和を保っている。細胞は、生命体の内外環境の変化を察知するセンサー機能、この変化に適応するために必要な生理活性物質の生合成機能、生合成された生理活性物質の分泌・徐放機能及びこれら諸機能を調節する制御機能などを有し、必要な時に・必要な部位で・必要な量の生理活性物質を作用させるとともに、自らは機能性組織・臓器を構築しつつ生命体を維持している。この中で驚嘆すべきことは、様々な制御の中でいかにタイミングよく生理活性物質が細胞内で生合成され、細胞外に分泌・徐放されているかである。生理活性物質を薬物と見立てた場合、細胞は体内でまさしく DDS を実践している粒子であり、機能面から言えば細胞に勝る製剤素材はない。現在地球上に存在する最もインテリジェントな粒子は細胞である。細胞が種々の生理活性物質を、制御機能・センサー機能を介して生合成し細胞外へ分泌・徐放し疾病治療を行う、と言う観点からは、これを「細胞性医薬品」と呼ぶことができるし、DDS の観点からは、細胞そのものを製剤素材として捉え、「細胞性製剤」と呼ぶこともできる (Fig. 15)。

さて、遺伝子導入などの処置により人工的に修飾され、新たな機能が付与された機能性細胞を「細胞性製剤」として体内に適用した時、そのままの状態ですべての生体内環境に適応して安定に機能し、疾病治療に有効であれば問題はない。しかしながら、汎用性を高めるために、免疫不適合な非自己細胞をも含めた機能性細胞を「細胞性製剤」として疾病治療に適用するためには、宿主の免疫系から完全に隔離して拒絶反応を防ぎ、体内で安定に機能させる方法を開発する必要がある。もし、細胞を高分子膜で封入し、免疫担当細胞を始めとする生体防御因子の進入を防ぐことができれば、この機能性細胞は生体の拒絶反応を回避して生存することが可能となる。もしそうならば、自己細胞、非自己細胞を問わず、その機能性細胞が生存し続ける限り、センサー機能・制御機能などを維持したまま、生合成機能により薬物としての生理活性蛋白質を生産・徐放し、疾病治療を行ってくれるはずである。われわれは、実験的糖尿病マウスに対して、グルコース・センサー機能などを維持しつつ、必要な時に、必要な量のインスリンを放出する機能性細胞をカプセルに封入した「細胞性製剤」が、疾病治療に極めて有効に機能することを確認している (Fig. 16)。<sup>119-131)</sup>

ひるがえって、従来からの病態改善・治療を目的とした臓器移植や輸血は、薬学的観点からすると「細胞性製剤」の源流であったと言えよう。例えば輸血は、まさしく「生きた細胞の水性懸濁剤」以外の何物でもない。臓器移植や輸血の場合は、健康人の体内から取り出した細胞を元のままの状態、何ら機能変化させることなく製剤化し、患者の病態治

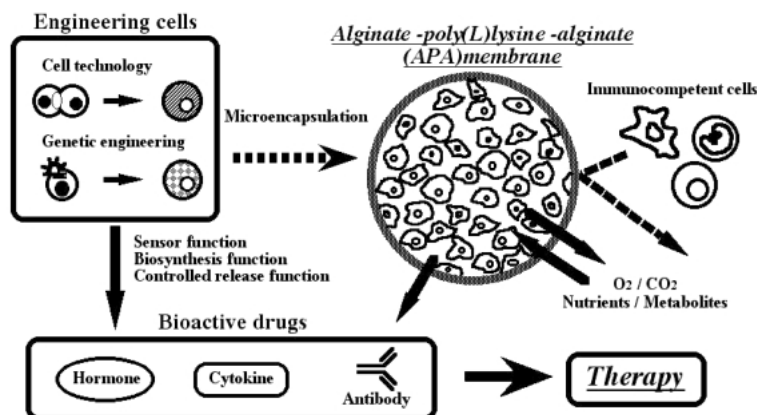


Fig. 15. Strategies of Medical Application Using Microencapsulated Cells “Cytomedicine”

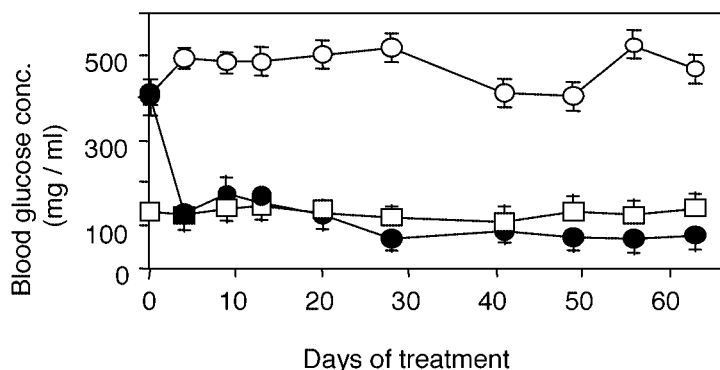


Fig. 16. Blood Glucose Concentration of Diabetic Mice Injected with Cytomedicine  
○: diabetic mice, □: normal mice, ●: diabetic mice injected with cytomedine.

療に適用したものである。これを「第一世代の細胞性製剤」と呼ぶならば、個々の病態に対応したセンサー機能、生合成機能、徐放機能、制御機能などを、遺伝子導入などの手段によって新たに付与した機能性細胞を創製したのち、この細胞を素材として製剤化したものは、DDSを体現した「次世代の細胞性製剤」と位置付けることができる。

従来からのエマルジョン、リポソームやマイクロスフェアなどのDDS研究に見られる粒子レベルの薬物開発の原理・原則は、すべて細胞を模倣したものであった。生命倫理上の問題はあるが、現在行われている臓器移植医療は、将来的には患者のものと同等な臓器を、細胞から人工育成して新たに作るという「臓器性製剤」の開発にすつつながっている。

#### おわりに

20世紀後半から「バイオテクノロジー」の重要性が世界的に認識されてきた。ところが「バイオテクノロジーは単なる技術である」との声も聞く。バイオテクノロジーそのものの本質は単に技術を指すものではない。バイオテクノロジーの哲学は「われわれが自然から何を学ぶか。学んだことをどのように応用するか」にある。バイオテクノロジーは言うまでもなくサイエンスの発展の根幹を成すものである。

次世代に開発されて来るであろう「考えるコンピューター」はヒトの脳をミミックしようとしているし、ITによる情報伝達は生体内情報回路網をミミックしている。われわれの水溶性高分子による蛋白のバイオコンジュゲーションは、自然界に存在する蛋白質の糖・脂質修飾をミミックしたものである。同様に薬学界で発展してきたエマルジョンやリ

ポソームは細胞膜をミミックしたものであり、薬物の徐放性の制御を始め「必要な時に、必要な場所に、必要な量の薬物を作用させる」DDSの基本理念などは、まさしく細胞機能をミミックしたものである。

現在、この地球上に存在する最もインテリジェントな粒子は細胞である。近年、ナノサイエンスが注目されているが、この本質は「バイオロジーの分野から人工的に細胞を創るのが早いのか、テクノロジーの分野から細胞と同等なインテリジェントな機能を持った微粒子マイクロマシンを作るのが早いのか」のせめぎ合いである、と敢えて言おう。「人工的に細胞を創る」とは、神をも恐れぬあまりにも大胆な言い方である。一方、現在のところ、超大型コンピューターを用いたとしても、細胞が有する複雑多岐に亘るすべての調節・制御機能を完全にコンピューター制御の元に行うことは到底できるものではない。それを細胞と同程度のサイズの微粒子マイクロマシンに行わせることは至難の業である。

21世紀はライフサイエンスの時代である。ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスなどの領域が爆発的に進展することは確かである。しかし、それだけでは人類は依然として人工的に細胞を創ることはできない。細胞を人工的に自由に創り得ないのであれば、せめてそれが成功するまでの永い永い期間は、「天から与えられた細胞」が隠し持つ潜在能力を最大限利用し、生きた細胞そのものを疾病治療に応用する「細胞性製剤」による疾病治療（細胞療法）の実現に向けて邁進するのが薬学を志す者の面目であろう。細胞の発生・分化・増殖を介して、機能を伴った臓器・組織の再構築をも可

能にする「再生科学」や、遺伝子などを導入することにより人工的に一部の修飾を施して創製した「病態治療に最適な機能性細胞」を応用した細胞・組織・臓器による疾病治療戦略は無限の可能性を秘めている。

21世紀が幕開けした。遺伝子そのものを「薬」として捉える遺伝子治療、種々リセプターを含む生理活性蛋白質はもちろん、抗原分子の最適デリバリーによる効果的な免疫・ワクチン療法や抗体療法、さらに、細胞機能を最大限に駆使して「生きている細胞」そのものをも「薬」と捉えて疾病治療を行おうとする細胞治療(細胞性製剤)などが加わり、まさに疾病治療を目指す医療の分野は激動の時代を迎えている。これら疾病治療に有効な「薬」の概念が急速に拡大・変革してきている現在、遺伝子、蛋白質、細胞をも含めた創薬研究は全く新たな視点が要求されるようになってきた。今まさに「薬物概念のパラダイムシフト」が起こりつつある。太古の昔から、幾多の新たな疾病治療法が浮かんでは空しく消えていったことであろうか。しかしながら、ライフサイエンス時代の幕開けとともに起こってきた今回の「薬物概念のパラダイムシフト」から新たに誕生する治療法は格別であろう。基礎的なバイオロジーを基盤として、次世代の臨床の現場に登場するのは、まさしく革新的疾病治療法としての生体内生理活性高分子物質の適用であり細胞・組織の適用であると思われる。そして、これらに共通する基本理念は、DDS そのもの以外のなにものでもない。

以上の「分子」と「生きている細胞」を、将来に向けて今後どのように融合させて、DDSを体現させた新たな「夢の薬」として、どのように「概念進化」させていくか。これは、薬学が次の世紀に進むべき道を暗示していると言えよう。

謝辞 恩師 濱 堯夫先生に衷心より感謝申し上げます。また、大阪大学薬学研究科薬剤学分野の中川晋作助教授、堤 康央助手をはじめ多くの大学院生諸君の激的な努力に敬意と感謝を申し上げます。

#### REFERENCES AND NOTES

1) Present address: Department of Cell Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical

- Sciences, Kobe Gakuin University, 518 Arise, Ikawadani, Nishi-ku, Kobe 651-2180, Japan.
- 2) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Natl. Biotechnol.*, **21**, 546-552 (2003).
  - 3) Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Yamamoto Y., Shibata H., Nishibata T., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Shimizu T., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press).
  - 4) Kawasaki K., Namikawa M., Murakami T., Mizuta T., Iwai Y., Hama T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**, 1159-1162 (1991).
  - 5) Kawasaki K., Namikawa M., Yamashiro Y., Hama T., Mayumi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 3373-3375 (1991).
  - 6) Kawasaki K., Maeda M., Yamashiro Y., Mayumi T., Takahashi M., Kaneto H., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2053-2054 (1993).
  - 7) Tsutsumi Y., Kihira T., Yamamoto S., Kubo K., Nakagawa S., Miyake M., Horisawa Y., Kanamori T., Ikegami H., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 9-12 (1994).
  - 8) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kubo K., Miyake M., Kanamori T., Nakagawa S., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 1185-1188 (1994).
  - 9) Yamamoto S., Kaneda Y., Okada N., Nakagawa S., Kubo K., Inoue S., Maeda M., Yamashiro Y., Kawasaki K., Mayumi T., *Anti-Cancer Drugs*, **5**, 424-428 (1994).
  - 10) Kawasaki K., Murakami T., Koshino K., Namikawa M., Maeda M., Hama T., Mayumi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 792-795 (1994).
  - 11) Kawasaki K., Murakami T., Namikawa M., Mizuta T., Iwai Y., Yamashiro Y., Hama T., Yamamoto S., Mayumi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 917-921 (1994).
  - 12) Maeda M., Kawasaki K., Mayumi T., Takahashi M., Kaneto H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 823-825 (1994).
  - 13) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kanamori T., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **71**, 963-968 (1995).
  - 14) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Okada N., Kaneda Y., Ohsugi Y., Miyake M.,

- Nakagawa S., Mayumi T., *J. Control Release*, **33**, 447–451 (1995).
- 15) Kaneda Y., Yamamoto S., Kihira T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Miyake M., Kawasaki K., Mayumi T., *Invasion Metastasis*, **15**, 156–162 (1995).
- 16) Kawasaki K., Namikawa M., Yamashiro Y., Iwai Y., Hama T., Tsutsumi Y., Yamamoto S., Nakagawa S., Mayumi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 2133–2138 (1995).
- 17) Kawasaki K., Namikawa M., Mizuta T., Inoue S., Maeda M., Kakiuchi M., Izuno Y., Yamamoto S., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1714–1717 (1995).
- 18) Tsunoda S., Kihira T., Kamada H., Okada N., Ohsugi Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **10**, 175–180 (1995).
- 19) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Kaneda Y., Kanamori T., Mayumi T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 1006–1011 (1996).
- 20) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kamada H., Kihira T., Nakagawa S., Kaneda Y., Kanamori T., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **74**, 1090–1095 (1996).
- 21) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kaneda Y., Kamada H., Kihira T., Nakagawa S., Yamamoto Y., Horisawa Y., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 1078–1085 (1996).
- 22) Kaneda Y., Yamamoto Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 160–165 (1997).
- 23) Maeda M., Izuno Y., Kawasaki K., Kaneda Y., Mu Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1788–1792 (1997).
- 24) Maeda M., Izuno Y., Kawasaki K., Kaneda Y., Mu Y., Tsutsumi Y., Lem K. W., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**, 595–598 (1997).
- 25) Kaneda Y., Yamamoto Y., Okada N., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kakiuchi M., Maeda M., Kawasaki K., Mayumi T., *Anti-Cancer Drugs*, **8**, 702–707 (1997).
- 26) Igarashi R., Tsutsumi Y., Fujii H., Tsunoda S., Ochiai A., Takenaga M., Morizawa Y., Mayumi T., Mizushima Y., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 113–118 (1997).
- 27) Motomura N., Lou H., Hong M., Tsutsumi Y., Mayumi T., Foegh M.L., *Transplant Proc.*, **29**, 1118–1120 (1997).
- 28) Kodaira H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Nanba T., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **12**, 431–437 (1997).
- 29) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kamada H., Kihira T., Kaneda Y., Ohsugi Y., Mayumi T., *Thromb. Haemostas.*, **77**, 168–173 (1997).
- 30) Kaneda Y., Yamamoto Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T., *Cancer Res.*, **58**, 290–295 (1998).
- 31) Maeda M., Kawasaki K., Mu Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Smith T. J., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 485–489 (1998).
- 32) Maeda M., Izuno Y., Kawasaki K., Kaneda Y., Mu Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 347–350 (1998).
- 33) Yamamoto Y., Kaneda Y., Tsunoda T., Kamada H., Kodaira H., Tsutsumi Y., Ito Y., Hirano T., Mayumi T., *J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.*, **58**, 37–45 (1998).
- 34) Tsunoda S., Ishikawa T., Yamamoto Y., Kamada H., Koizumi K., Matsui J., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 368–372 (1999).
- 35) Mu Y., Kamada H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Maeda M., Kawasaki K., Nomizu M., Yamada Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 75–79 (1999).
- 36) Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kihira T., Kaneda Y., Yamamoto Y., Nakagawa S., Horisawa Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 448–453 (1999).
- 37) Mu Y., Kamada H., Kodaira H., Sato K., Tsutsumi Y., Maeda M., Kawasaki K., Nomizu M., Yamada Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**, 763–767 (1999).
- 38) Nishiyama Y., Yoshikawa T., Kurita K., Hojo K., Kamada H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Kawasaki K., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 451–453 (1999).
- 39) Mu Y., Kamada H., Kaneda Y., Yamamoto

- Y., Kodaira H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Maeda M., Kawasaki K., Nomizu M., Yamada Y., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **14**, 129–135 (1999).
- 40) Hojo K., Maeda M., Mu Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Nishiyama Y., Yoshikawa T., Kurita K., Block L. H., Mayumi T., Kawasaki K., *Pharm. Pharmacol. Commun.*, **5**, 277–280 (1999).
- 41) Kamada H., Tsutsumi Y., Yamamoto Y., Kihira T., Kaneda Y., Mu Y., Kodaira H., Tsunoda S., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Res.*, **60**, 6416–6420 (2000).
- 42) Tsunoda S., Kamada H., Yamamoto Y., Ishikawa T., Matsui J., Koizumi K., Kaneda Y., Tsutsumi Y., Ohsugi Y., Hirano T., Mayumi T., *J. Control Release*, **68**, 335–341 (2000).
- 43) Hojo K., Maeda M., Mu Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Nishiyama Y., Yoshikawa T., Kurita K., Block L. H., Mayumi T., Kawasaki K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 67–73 (2000).
- 44) Nishiyama Y., Yoshikawa T., Ohara N., Kurita K., Hojo K., Kamada H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Kawasaki K., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 1161–1165 (2000).
- 45) Tsunoda S., Ishikawa T., Watanabe M., Kamada H., Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T., *Br. J. Haematol.*, **112**, 181–188 (2001).
- 46) Hojo K., Susuki Y., Maeda M., Okazaki I., Nomizu M., Kamada H., Yamamoto Y., Nakagawa S., Mayumi T., Kawasaki K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 1429–1432 (2001).
- 47) Maeda M., Kamada H., Hojo K., Yamamoto Y., Nakagawa S., Smith T. J., Mayumi T., Kawasaki K., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 488–491 (2001).
- 48) Kamada H., Tsutsumi Y., Sato-Kamada K., Yamamoto Y., Yoshioka Y., Okamoto T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Natl. Biotechnol.*, **21**, 399–404 (2003).
- 49) Kaneda Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T., *Biomaterials* (in press).
- 50) Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Kamada H., Kihira T., Tsunoda S., Yamamoto Y., Okamoto T., Shibata H., Mukai Y., Tani M., Shimizu T., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.* (in press).
- 51) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Sato-Kamada K., Okamoto T., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., *J. Control Release* (in press).
- 52) Kodaira H., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Kamada H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T., *Biomaterials* (in press).
- 53) Kamada H., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda Y., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T., *Clin. Cancer Res.* (in press).
- 54) Mizuguchi H., Hashioka Y., Fujii A., Utoguchi N., Kubo K., Nakagawa S., Baba A., Mayumi T., *Brain Res.*, **651**, 155–159 (1994).
- 55) Mizuguchi H., Hashioka Y., Utoguchi N., Kubo K., Nakagawa S., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1385–1390 (1994).
- 56) Utoguchi N., Ikeda K., Saeki K., Oka N., Mizuguchi H., Kubo K., Nakagawa S., Mayumi T., *J. Cell. Physiol.*, **163**, 393–399 (1995).
- 57) Utoguchi N., Dantakean A., Makimoto H., Wakai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 193–201 (1995).
- 58) Mizuguchi H., Fujii A., Utoguchi N., Nakagawa S., Mayumi T., *Microvasc. Res.*, **50**, 129–132 (1995).
- 59) Utoguchi N., Mizuguchi H., Saeki K., Ikeda K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Lett.*, **89**, 7–14 (1995).
- 60) Utoguchi N., Mizuguchi H., Dantakean A., Makimoto H., Wakai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **73**, 24–28 (1996).
- 61) Utoguchi N., Mizuguchi H., Saeki K., Ikeda K., Nakagawa S., Mayumi T., *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, **16**, 105–110 (1996).
- 62) Ohizumi I., Tsunoda S., Taniguchi K., Saito H., Esaki K., Makimoto H., Wakai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Utoguchi N., Kaiho S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys.*



- Res. Commun.*, **236**, 493–496 (1997).
- 63) Utoguchi N., Nakata T., Cheng H. H., Ikeda K., Makimoto H., Mu Y., Nakagawa S., Kobayashi M., Kitagawa I., Mayumi T., *Inflammation*, **21**, 223–233 (1997).
- 64) Ohizumi I., Tsunoda S., Taniguchi K., Saito H., Esaki K., Koizumi K., Makimoto H., Wakai Y., Matsui J., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Utoguchi N., Ohsugi Y., Mayumi T., *Int. J. Cancer*, **77**, 561–566 (1998).
- 65) Ohizumi I., Taniguchi K., Saito H., Kawata H., Tsunoda S., Makimoto H., Wakai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Utoguchi N., Kaiho S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Int. J. Cancer*, **82**, 853–859 (1999).
- 66) Tsunoda S., Ohizumi I., Matsui J., Koizumi K., Wakai Y., Makimoto H., Tsutsumi Y., Utoguchi N., Taniguchi K., Saito H., Harada N., Ohsugi Y., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **81**, 1155–1161 (1999).
- 67) Makimoto H., Koizumi K., Tsunoda S., Wakai Y., Matsui J., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Ohizumi I., Taniguchi K., Saito H., Utoguchi N., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 346–350 (1999).
- 68) Ikeda K., Utoguchi N., Makimoto H., Mizuguchi H., Nakagawa S., Mayumi T., *Inflammation*, **23**, 87–97 (1999).
- 69) Taniguchi K., Harada N., Ohizumi I., Kinoshita M., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kaiho S., Mayumi T., *Int. J. Cancer*, **86**, 799–805 (2000).
- 70) Kamada H., Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Yamamoto Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **268**, 809–813 (2000).
- 71) Taniguchi K., Harada N., Ohizumi I., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kaiho S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 671–675 (2000).
- 72) Ohizumi I., Harada N., Taniguchi K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kaiho S., Mayumi T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1497**, 197–203 (2000).
- 73) Kuroda K., Miyata K., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Nishimura K., Mitsuishi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**, 59–67 (2000).
- 74) Wakai Y., Matsui J., Koizumi K., Tsunoda S., Makimoto H., Ohizumi I., Taniguchi K., Kaiho S., Saito H., Utoguchi N., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**, 1319–1325 (2000).
- 75) Kennel S. J., Lankford T., Davern S., Foote L., Taniguchi K., Ohizumi I., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Mirzadeh S., *Eur. J. Cancer*, **38**, 1278–1287 (2002).
- 76) Koizumi K., Tsutsumi Y., Kamada H., Yoshioka Y., Watanabe M., Yamamoto Y., Okamoto T., Mukai Y., Nakagawa S., Tani Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 219–224 (2003).
- 77) Koizumi K., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Watanabe M., Okamoto T., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1295–1298 (2003).
- 78) Mizuguchi H., Nakanishi T., Nakanishi M., Nakagawa T., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **73**, 472–476 (1996).
- 79) Mizuguchi H., Nakagawa T., Nakanishi M., Imazu S., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 402–407 (1996).
- 80) Mizuguchi H., Nakanishi T., Nakanishi M., Nakagawa T., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Lett.*, **100**, 63–69 (1996).
- 81) Nakagawa T., Mizuguchi H., Imazu S., Nakanishi M., Nakagawa S., Hayakawa T., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **11**, 411–417 (1996).
- 82) Usui T., Kondoh M., Cui C. B., Mayumi T., Osada H., *Biochem. J.*, **333**, 543–548 (1998).
- 83) Imazu S., Nakagawa S., Nakanishi T., Hayakawa T., Uemura H., Yamada O., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **13**, 159–164 (1998).
- 84) Hayashi A., Nakanishi T., Kunisawa J., Kondoh M., Imazu S., Tsutsumi Y., Tanaka K., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 824–828 (1999).
- 85) Mizuguchi H., Nakanishi T., Kondoh M., Nakagawa T., Nakanishi M., Matsuyama T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Virus Res.*, **59**, 191–201 (1999).
- 86) Nakanishi T., Hayashi A., Kunisawa J., Tsutsumi Y., Tanaka K., Yashiro-Ohtani Y.,

- Nakanishi M., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T., *Eur. J. Immunol.*, **30**, 1740–1747 (2000).
- 87) Imazu S., Nakagawa S., Nakanishi T., Mizuguchi H., Uemura H., Yamada O., Mayumi T., *J. Control Release*, **68**, 187–194 (2000).
- 88) Kondoh M., Matsuyama T., Suzuki R., Mizuguchi H., Nakanishi T., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Nakanishi M., Sato M., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1011–1013 (2000).
- 89) Kunisawa J., Nakanishi T., Takahashi I., Okudaira A., Tsutsumi Y., Katayama K., Nakagawa S., Kiyono H., Mayumi T., *J. Immunol.*, **167**, 1406–1412 (2001).
- 90) Mizuguchi H., Nakagawa T., Toyosawa S., Nakanishi M., Imazu S., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Ijuhin N., Mayumi T., *Cancer Res.*, **58**, 5725–5730 (1998).
- 91) Mizuguchi H., Nakagawa T., Morioka Y., Imazu S., Nakanishi M., Kondoh T., Hayakawa T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 15–18 (1997).
- 92) Suzuki R., Nakagawa T., Mizuguchi H., Imazu S., Nakanishi T., Nakagawa S., Nakanishi M., Hayakawa T., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **13**, 87–93 (1998).
- 93) Nakano R., Nakagawa T., Imazu S., Katayama K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 974–978 (2003).
- 94) Okada N., Saito T., Masunaga Y., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Okada Y., Fujita T., Hayakawa T., Mayumi T., Yamamoto A., *Cancer Res.*, **61**, 7913–7919 (2001).
- 95) Okada N., Tsujino M., Hagiwara Y., Tada A., Tamura Y., Mori K., Saito T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Br. J. Cancer*, **84**, 1564–1570 (2001).
- 96) Okada N., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Saito T., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 173–179 (2001).
- 97) Okada N., Saito T., Mori K., Masunaga Y., Fujii Y., Fujita J., Fujimoto K., Nakanishi T., Tanaka K., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1527**, 97–101 (2001).
- 98) Xu Z. L., Mizuguchi H., Ishii-Watabe A., Uchida E., Mayumi T., Hayakawa T., *Gene*, **272**, 149–156 (2001).
- 99) Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Takahashi K., Mizuno N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 436–444 (2002).
- 100) Xu Z. L., Mizuguchi H., Ishii-Watabe A., Uchida E., Mayumi T., Hayakawa T., *J. Control Release*, **81**, 155–163 (2002).
- 101) Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Kanehira M., Nishino N., Takahashi K., Mizuno N., Hayakawa T., Mayumi T., *Cancer Lett.*, **177**, 57–63 (2002).
- 102) Katayama K., Wada K., Nakajima A., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Kadowaki T., Nagai R., Kamisaki Y., Blumberg R. S., Mayumi T., *Gastroenterology*, **124**, 1315–1324 (2003).
- 103) Gao J. Q., Tsuda Y., Katayama K., Nakayama T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Cancer Res.*, **63**, 4420–4425 (2003).
- 104) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mayumi T., Mizuno N., *Gene Ther.*, **10**, 700–705 (2003).
- 105) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Mizuguchi H., Iiyama S., Mori N., Sasaki A., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., *Gene Ther.*, **10**, 1891–1902 (2003).
- 106) Xu Z. L., Mizuguchi H., Mayumi T., Hayakawa T., *Gene*, **309**, 145–151 (2003).
- 107) Xu Z. L., Mizuguchi H., Mayumi T., Hayakawa T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1621**, 266–271 (2003).
- 108) Mizuguchi H., Xu Z. L., Sakurai F., Mayumi T., Hayakawa T., *Hum. Gene Ther.*, **14**, 1265–1277 (2003).
- 109) Gao J. Q., Alexandre L. S., Tsuda Y., Katayama K., Eto Y., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Pharmazie* (in press).

- 110) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Takahashi K., Hayakawa T., Mayumi T., Mizuno N., *Biochim. Biophys. Acta* (in press).
- 111) Katayama K., Wada K., Miyoshi H., Ohashi K., Tachibana M., Furuki R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakajima A., Kadowaki T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kamisaki Y., Mayumi T., *FEBS Lett.* (in press).
- 112) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 793–797 (1997).
- 113) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **13**, 27–33 (1998).
- 114) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **13**, 151–157 (1998).
- 115) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Hayakawa T., Mayumi T., *J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.*, **58**, 59–68 (1998).
- 116) Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Nakanishi M., Tanaka K., Mayumi T., *J. Control Release*, **61**, 233–240 (1999).
- 117) Kunisawa J., Okudaira A., Tsutsumi Y., Takahashi I., Nakanishi T., Kiyono H., Mayumi T., *Vaccine*, **19**, 589–594 (2001).
- 118) Kunisawa J., Takahashi I., Okudaira A., Hiroi T., Katayama K., Ariyama T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kiyono H., Mayumi T., *Eur. J. Immunol.*, **32**, 2347–2355 (2002).
- 119) Okada N., Fushimi M., Nagata Y., Fukunaga T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 1182–1188 (1995).
- 120) Okada N., Kaneda Y., Miyamoto H., Yamamoto Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 831–836 (1996).
- 121) Okada N., Fushimi M., Nagata Y., Fukunaga T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 952–957 (1996).
- 122) Okada N., Miyamoto H., Yoshioka T., Sakamoto K., Katsume A., Saito H., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**, 524–527 (1997).
- 123) Okada N., Miyamoto H., Yoshioka T., Katsume A., Saito H., Yorozu K., Ueda O., Itoh N., Mizuguchi H., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1360**, 53–63 (1997).
- 124) Okada N., Miyamoto H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Katsume A., Saito H., Yorozu K., Ueda O., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *J. Control Release*, **44**, 195–200 (1997).
- 125) Okada N., Miyamoto H., Yoshioka T., Katsume A., Saito H., Yorozu K., Ueda O., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 255–258 (1997).
- 126) Yoshioka T., Okada N., Miyamoto H., Sakamoto K., Katsume A., Saito H., Yorozu K., Ueda O., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **12**, 107–114 (1997).
- 127) Yoshioka T., Okada N., Miyamoto H., Sakamoto K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Miyazaki J., Mayumi T., *Drug Delivery System*, **13**, 95–100 (1998).
- 128) Miyamoto H., Okada N., Yoshioka T., Suzuki R., Sakamoto K., Katsume A., Saito H., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 295–297 (1999).
- 129) Suzuki R., Yoshioka Y., Kitano E., Yoshioka T., Oka H., Okamoto T., Okada N., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Miyazaki J., Kitamura H., Mayumi T., *Cell Transplant.*, **11**, 787–797 (2002).
- 130) Yoshioka Y., Suzuki R., Oka H., Okada N., Okamoto T., Yoshioka T., Mukai Y., Shibata H., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Miyazaki J., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 353–358 (2003).
- 131) Yoshioka Y., Suzuki R., Okamoto T., Okada N., Mukai Y., Shibata H., Tsutsumi Y., Dohi N., Okada N., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1624**, 54–59 (2003).