

高分子ナノ粒子を利用したアジュバント開発と抗 HIV 療法における有効性

赤木隆美,^{*,a,c} 馬場昌範,^{b,c} 明石 満^{a,c}

Development of Vaccine Adjuvants Using Polymeric Nanoparticles and Their Potential Applications for Anti-HIV Vaccine

Takami AKAGI,^{*,a,c} Masanori BABA,^{b,c} and Mitsuru AKASHI^{a,c}

^aDepartment of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan, ^bDivision of Antiviral Chemotherapy, Center for Chronic Viral Diseases, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima City 890-8544, Japan, and ^cCore Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), Kawaguchi Center Building, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi City 332-0012, Japan

(Received July 31, 2006)

The development of a prophylactic/therapeutic HIV-1 vaccine based on recombinant proteins is needed for the control of the worldwide AIDS epidemic. Subunit protein and peptide vaccines are generally very safe, with well-defined components. However, these antigens are often poorly immunogenic, and thus require the use of adjuvants to induce adequate immunity. Particulate adjuvants (*e.g.* micro/nanoparticles, emulsions, ISCOMS, liposomes, virosomes, and virus-like particles) have been widely investigated as HIV-1 vaccine delivery systems. Antigen uptake by antigen-presenting cells (APC) is enhanced by the association of the antigens with polymeric micro/nanoparticles. The adjuvant effect of micro/nanoparticles appears to largely be a consequence of their uptake into APC. More importantly, particulate antigens have been shown to be more efficient than soluble antigens for the induction of immune responses. Over the past two decades, we have studied the synthesis and clinical applications of core-corona polymeric nanospheres composed of hydrophobic polystyrene and hydrophilic macromonomers. Core-corona type polymeric nanospheres have applications in various technological and biomedical fields, because their chemical structures and particle size can be easily controlled. In this study, we focused on the development of a HIV-1 vaccine using polymeric nanoparticles. We evaluated the immunization strategies for HIV-1-capturing core-corona type polystyrene nanospheres that would efficiently induce HIV-1-specific IgA responses in female mice and the macaque genital tract. Moreover, based on this research, we attempted to develop novel biodegradable nanoparticles composed of poly (γ -glutamic acid) (γ -PGA) for protein-based vaccine delivery. These HIV-1-capturing nanospheres and protein-loaded γ -PGA nanoparticles have shown unique potential as vaccine carriers.

Key words—polymeric nanoparticles; vaccine; drug delivery system; HIV-1

1. はじめに

高分子ナノ粒子は多様な内部構造と表面構造を有し、粒径を広範囲かつ精密に調製できる利点を有している。そのため一般工業・情報・生化学分野で実

用化されており、近年では医療分野での応用研究が盛んに行われている。特に drug delivery system (DDS) としての微粒子製剤への関心が高まっており、遺伝子治療、がん治療、再生医療、ワクチン開発などのナノ医療への応用が期待されている。^{1,2)} ワクチン開発における DDS 技術は、組織及び細胞内における抗原の空間的・時間的制御を目的としており、高分子からなるマイクロ及びナノ粒子を用いたアプローチが試みられている。³⁾ そこで求められる機能としては、抗原の徐放化、粘膜付着性、局所滞留性、抗原分解抑制能等が挙げられる。さらに粒子状キャリアーを用いることで、免疫応答に重要な役

^a大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 (〒565-0871 吹田市山田丘 2-1), ^b鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属難治ウイルス病態制御研究センター抗ウイルス化学療法研究分野 (〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1), ^c独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 (CREST) (〒332-0012 川口市本町 4-1-8 川口センタービル)

*e-mail: akagit@chem.eng.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである。

割を果たしている樹状細胞に積極的に抗原を送達でき、効率のよい免疫誘導が可能となる。⁴⁾ 高分子ナノ粒子は、抗原の **controlled release** と **targeting** を可能とするキャリアーとして期待されている。中でもサブユニットワクチンに対して高分子ナノ粒子の果たす役割は非常に大きく、DDS 技術を応用することで高い安全性と効果が期待できる。現在のナノバイオテクノロジーの発展に伴い、高機能・高性能のキャリアーの開発が可能となり、このようなキャリアーを利用することで普遍性の高いワクチン担体の開発が期待される。本稿では、われわれが取り組んでいる高分子ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチンの開発について紹介する。

2. ワクチンによる免疫応答

ワクチンによる免疫療法は、抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージが免疫原となる抗原を貪食することで、抗体産生（液性免疫）や細胞傷害性 T 細胞（細胞性免疫）を誘導し、細菌やウイルス感染の防御及び感染細胞の殺傷により感染症を治療する方法である（Fig. 1）。現在、有効なワクチン開発が求められているものとしては、**human immunodeficiency virus (HIV)**, **hepatitis C virus (HCV)**, **severe acute respiratory syndrome (SARS)** コロナウイルス、（鳥）インフルエンザウイルス、結核、マラリアなどが挙げられる。HIV 感染によるエイズでは全世界で年間 300 万人が死亡し、新規感染者は 500 万人/年で増加し続けている。近年では炭そ菌、

SARS コロナウイルス、鳥インフルエンザなどの新興・再興感染症が問題視されており、その対策が求められている。これら以外にも、既存のポリオ、麻疹などの弱毒生ワクチンは効果が高い反面、その副作用も懸念されている。そのため、安全性の高いウイルスや細菌の一部（サブユニット）を用いたワクチン開発が試みられているが、免疫原性の低いサブユニットワクチンでは、高い効果は得られていない。^{5,6)}

サブユニットワクチンでは、初期の免疫応答に重要な役割を果たしている樹状細胞への抗原デリバリーが十分に達成されないために、有効な免疫応答が得られないと考えられる。このサブユニットワクチンの免疫原性を高めるための手段として、アジュバントの応用研究が活発に行われている。アジュバントとは、抗原と化学的・物理的に混合して免疫すると、その抗原に対する免疫応答が増強されるような物質の総称である。作用機序としては、エマルションによる免疫原の徐放化、免疫担当細胞の非特異的活性化及び集積化などが挙げられる。実験的によく用いられる Freund アジュバントは流動パラフィンと界面活性剤と混ぜたもので、結核死菌を加えたものが Freund 完全アジュバントと呼ばれている。これを注射すると抗原は徐々に放出され、持続的に免疫系を刺激し、強い免疫応答が得られる。アジュバント活性が認められている物質として、コレステロール、リン脂質などからなる immuno-stimulato-

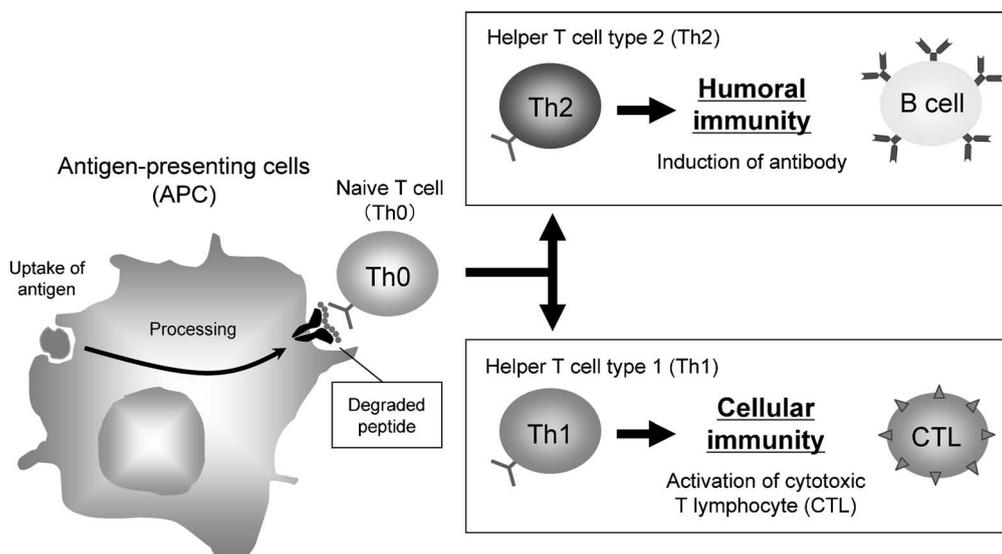


Fig. 1. Uptake of Antigen by Antigen-presenting Cells and Immune Response

ry complexe (ISCOM), 精製サポニンの主成分である QS-21, スクアレンと 2 種の界面活性剤よりなる O/W エマルジョンの MF59 等が知られている。⁷⁾しかし, これらのアジュバントは効果が高い反面, 毒性が問題となっている。そのため, 日本で現在認められているアジュバントはアルミ製剤のみであり, より効果の高いアジュバントの開発が期待されている。

3. 粒子状キャリアーによるワクチン開発

蛋白質や DNA などの生体高分子がその生理活性を示すには, 組織内の特定の細胞への導入に加え, 細胞内の特定のオルガネラへのデリバリーが必要とされている。粒子状キャリアーとしては高分子ナノスフェア, ミセル, ナノゲル粒子, リポソーム, デンドリマーなどが知られており, 遺伝子や薬物の細胞内デリバリーに関する研究が数多く展開されている。この細胞内デリバリーシステムの構築は, 感染症やがんなどの予防と治療効果を目指したワクチン開発においても重要な課題である。そのため抗原提示細胞に蛋白抗原を効率よくデリバリーし, 蛋白質の細胞内動態制御できるキャリアーの開発が期待されている。ワクチン開発に用いられる高分子ナノ粒子は大きく 2 種類に分けられる。1 つは非分解性ナノ粒子で, もう 1 つは生分解性ナノ粒子である。非分解性としては, ポリスチレンを主成分とする粒子が挙げられる。一方, 生分解性ナノ粒子では, 主にポリ乳酸やポリ乳酸とグリコール酸との共重合体を用いた研究が行われている。これらは, 非酵素及び酵素的に分解される高分子であり, 分解産物が生体に無害であり, 安全性の面で優れている。ポリ乳酸系の粒子は, その分解に伴う抗原の徐放化が可能であり, また共重合体の組成比を制御することで, 分解率をコントロールできる利点を有しており, ワクチン担体として幅広く研究が行われている。⁸⁻¹⁰⁾

4. コア-コロナ型高分子ナノ粒子の合成

ナノメートルオーダーで制御された微粒子には, デンドリマー, フラーレン, 金属・無機超微粒子, 高分子ナノ粒子などの様々な種類があり, 現在のナノテクノロジーの中核技術に位置付けられている。一般的な高分子ナノ粒子の調製方法としては, 乳化重合, 分散重合, シード重合, 懸濁重合が用いられ, 応用に適した性能や機能を有するナノ粒子の調製も可能になってきている。高分子ナノ粒子の性質

は, その表面の組成と粒径に大きく依存するため, 表面の分子設計と粒径の制御が重要な因子となる。筆者らは, 高分子ナノ粒子の表面に分子設計した高分子鎖を重合過程で導入でき, 粒径をナノからマイクロメートルオーダーで制御可能なマクロモノマー法を応用し, コア-コロナ型高分子ナノ粒子の合成, 構造及び機能発現について詳細な研究を行っている。このナノ粒子は, シェル部に溶媒に溶解するグラフト鎖 (コロナ層) が集積しており, 機能発現に最も有利な構造を持っている。Figure 2 にマクロモノマー法による高分子ナノ粒子の生成メカニズムを示す。マクロモノマーとスチレンのラジカル共重合は, 均一系で開始し, 重合の進行に伴い白濁する。重合初期には, 疎水性モノマー由来のオリゴマーがコアを形成し, やがてグラフト共重合体の疎水部もコアに取り込まれ, グラフト鎖の親水性により粒子が安定化される。生成するグラフト共重合体の主鎖 (ポリスチレン) は溶媒に溶解せず, 高分子の秩序化を駆動力に表面に親水性グラフト鎖, 内部にポリスチレンが集積したコア-コロナ型高分子ナノ粒子が得られる (Fig. 3)。¹¹⁾そのため, 様々な機能性表面を有するナノ粒子を調製することが可能であり, これまでに表面にポリエチレングリコール (ノニオン),¹²⁾ ポリビニルアミン (カチオン),¹³⁾ ポリメタクリル酸 (アニオン),¹⁴⁾ 感熱応答性ポリマーである, ポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド¹⁵⁾ やポリ *N*-ビニルイソブチルアミド¹⁶⁾ を有するナノ粒子を合成してきた。ESCA 解析及び超薄切片の TEM 観察から, 親水性マクロモノマー鎖がナノ粒子表面に集積していることが確認されている。¹⁷⁾このようにマクロモノマー法により調製されたナノ粒子は, モノマーレベルからグラフト鎖及びコアの分子設計が可能のため, 多様なモノマーの組み合わせにより, 異なる機能・特性を付与できるといった特徴を有している。

5. コア-コロナ型高分子ナノ粒子を用いたウイルス捕捉

粒子の比表面積は粒径に反比例するため, ナノメートルサイズで制御された高分子微粒子は, 単位重量当たりの表面積が大きく, 表面を反応場や吸着の場として利用する場合に非常に有利となる。さらに, 表面に反応性基を持つナノ粒子は, 粒子への生体分子等の固定化による機能性粒子を合成する上で

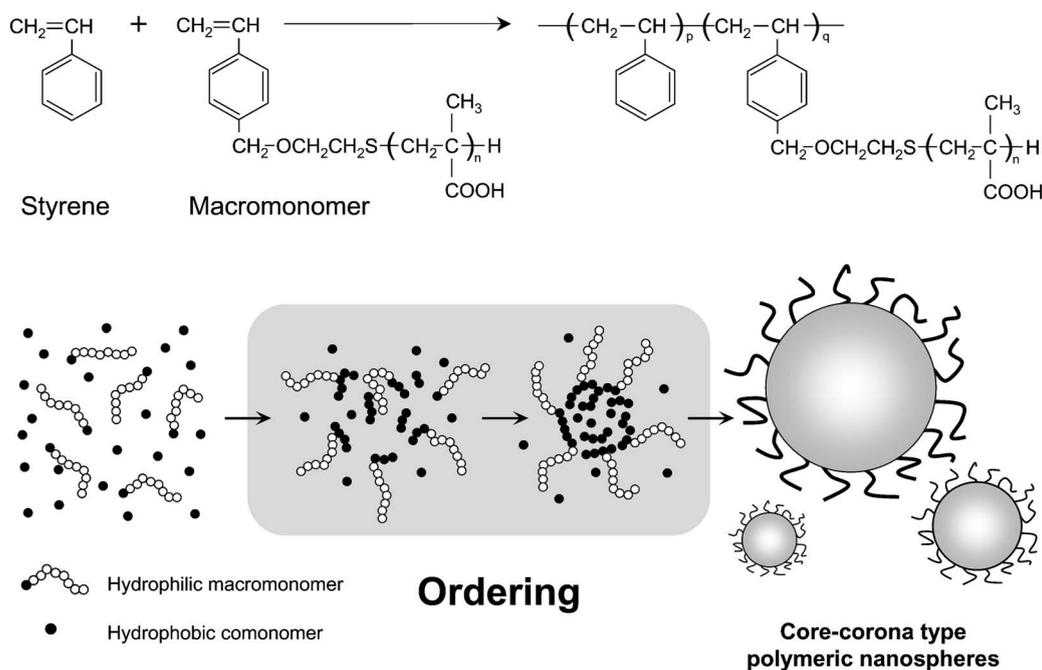


Fig. 2. Mechanism of Core-corona Type Polymeric Nanospheres Formation

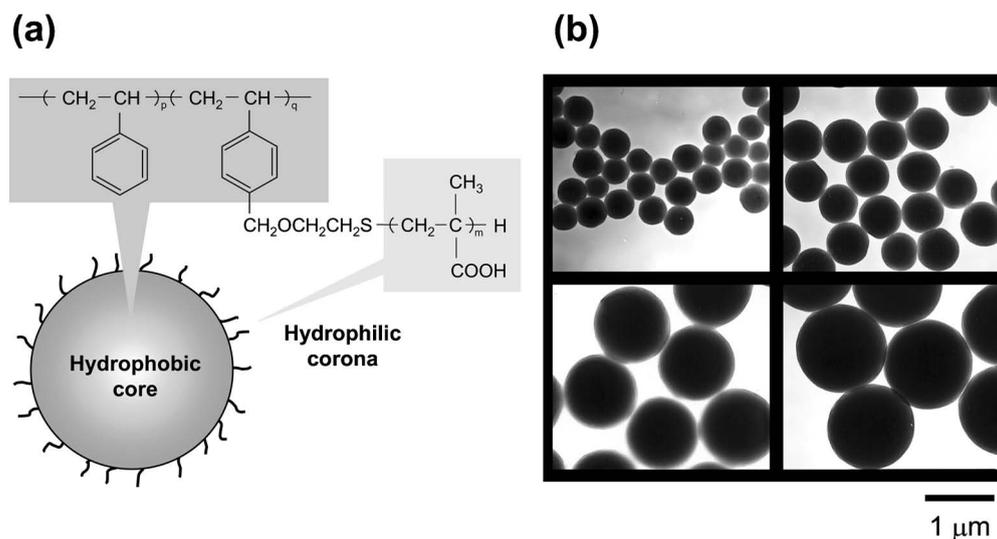


Fig. 3. (a) Structure of Core-corona Type Polymeric Nanospheres, (b) TEM Images of Nanospheres

重要である。筆者らが開発したコア-コロナ型高分子ナノ粒子は、合成条件により粒径を容易に制御することが可能であり、反応性官能基を有するマクロモノマー鎖を粒子表面に集積できる利点を持つ。筆者らは、このコア-コロナ型ナノ粒子の特徴を活かした HIV-1 捕捉システムの開発に取り組んできた。後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである HIV-1 は、直径が約 100 nm で、表面が gp120 と呼ばれる糖蛋白質で覆われた球状 RNA ウ

イルスである。gp120 の糖鎖部位にはマンノースが多く含まれているため、糖結合性蛋白質であるレクチンと強く相互作用することが知られている。¹⁸⁾ そこで、ナノ粒子による HIV-1 捕捉を目的に、糖結合性蛋白質であるレクチンをナノ粒子表面に固定化し、糖-レクチン相互作用により HIV-1 捕捉を試みた。まず、ポリメタクリル酸マクロモノマーとスチレンのラジカル共重合により、表面にカルボキシル基を有するポリスチレンコア-ポリメタクリル酸

コロナの高分子ナノ粒子を合成した。このナノ粒子はレクチンである Concanavalin A (Con A) を共有結合により容易に固定化することが可能であった (Figs. 4 and 5).¹⁹⁾ この Con A 固定化ナノ粒子 (Con A-NS) を HIV-1 浮遊液に加え、遠心分離後、上清中の gp120 量とウイルス感染価を測定することで、ウイルス捕捉能を評価した。その結果、Con A-NS 濃度依存的な HIV-1 捕捉が認められ (Fig. 6)、この捕捉能はウイルスの熱不活化処理及びウイルス株の種類による影響はみられなかった。^{20,21)} また、Con A と強く相互作用する単糖のマンノースを添加することで、捕捉能が低下することより、ナノ粒子表面に固定化された Con A が HIV-1 表面に存在する糖鎖を認識していることが確認された。¹⁹⁾

6. HIV-1 捕捉ナノ粒子を用いたワクチン開発

HIV-1 感染症に対するアプローチとしては、薬物治療、ワクチン、教育の3つが考えられる。ウイルスに対する逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤を用いた多剤併用療法 (highly active anti-retroviral therapy: HAART) の確立により、HIV-1 感染者の劇的な死亡率低下をもたらしたが、薬剤耐性・副作用・費用などの解決すべき問題が多数残されている。そのため、HIV-1 感染予防及び根絶につながり得るワクチン開発には大きな期待が寄せられている。これまでに HIV-1 ワクチン開発では、弱毒生ワクチンの有効性が指摘されてきたが、その安全性に問題があり、現時点では臨床応用の可能性は考えられていない。^{22,23)} また、安全性の高いウイルス抗原の一部を使用した、サブユニットワクチンの臨

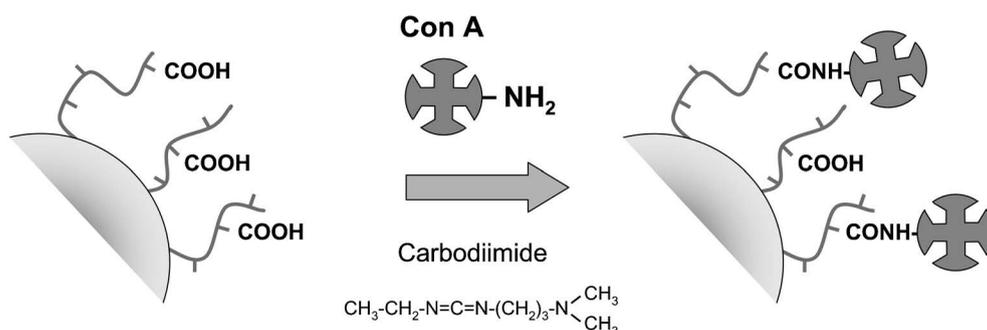


Fig. 4. Immobilization of Concanavalin A (Con A) onto the Surface of Nanospheres

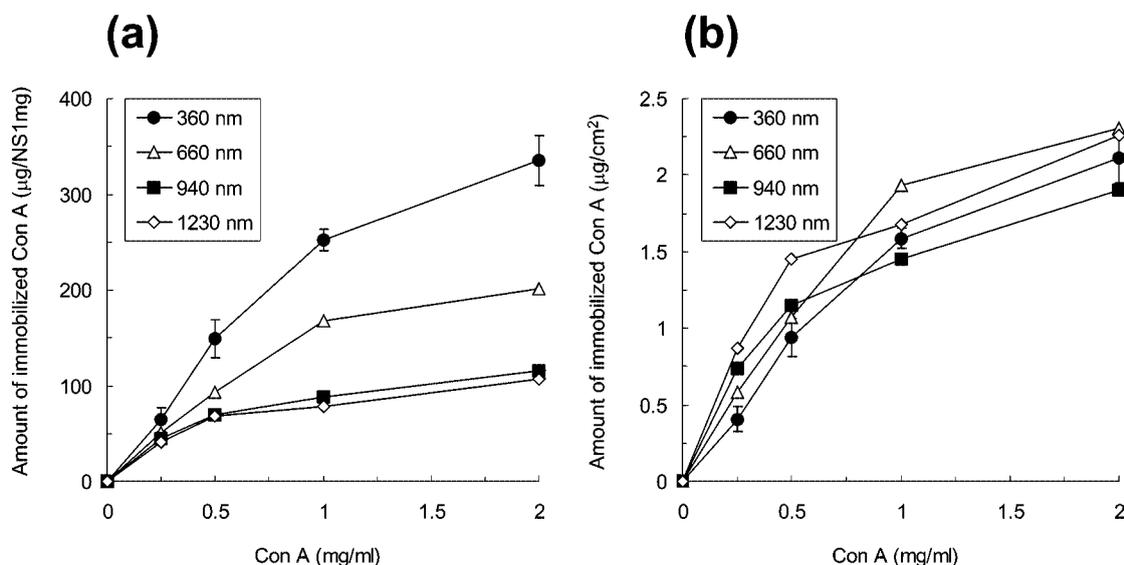


Fig. 5. Effect of the Particle Size on the Amount of Con A Immobilized onto Nanospheres (NS)

The amount of Con A immobilized was calculated by the immobilized Con A weight (μg)/NS weight (1 mg) (a), and the immobilized Con A weight (μg)/surface area of NS (cm^2) (b).

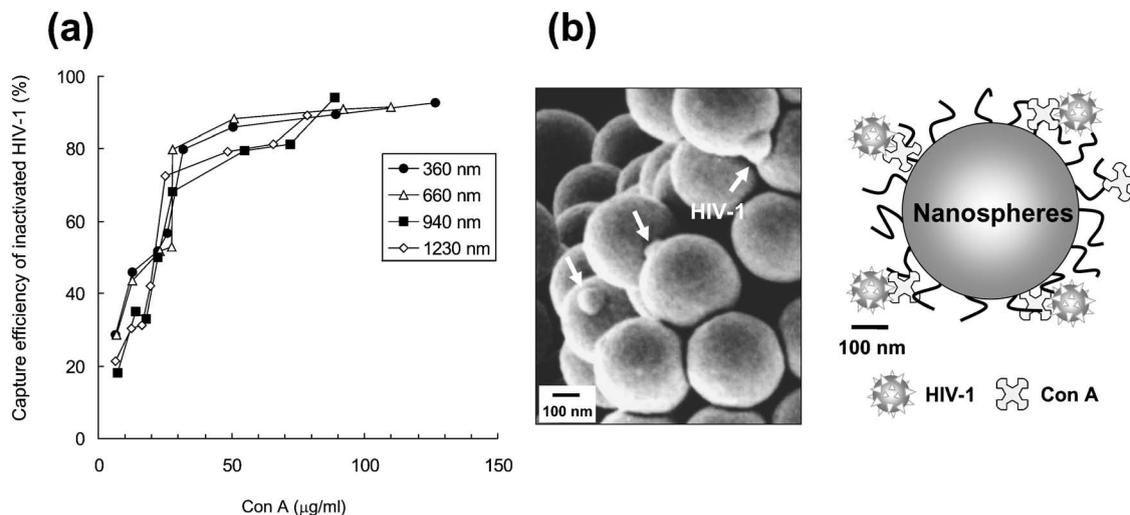


Fig. 6. (a) Effect of the Particle Size on the Capture Efficiency of HIV-1 with Con A-NS, (b) SEM Image and Illustration of HIV-1-capturing Nanospheres (HIV-NS)

床試験が行われたが、有効な感染防御効果は認められなかった。²⁴⁾ そのため、HIV-1 ワクチンはこれまでのワクチン開発と比べて困難を極めており、新しい概念に基づくワクチン開発の必要性が求められている。

Con A-NS は HIV-1 表面のマノースとレクチンとの相互作用を利用しているために、ウイルス種や変異にも影響されず、極めて簡便なウイルス捕捉システムである。また、HIV-1 捕捉ナノ粒子 (HIV-NS) は粒子表面に HIV-1 粒子及び gp120 抗原が濃縮された状態であり、ワクチンの免疫原としての利用が考えられ、HIV-NS の HIV-1 ワクチンへの応用展開を図った。始めに、ナノ粒子と樹状細胞との相互作用について解析を行った。樹状細胞によるナノ粒子の取り込みを詳細に検討したところ、期待通り、樹状細胞での効率的な取り込みが確認できた (Fig. 7)。²⁵⁾ さらに興味深いことに、DNA マイクロアレイを用いてナノ粒子を取り込んだ樹状細胞の遺伝子発現を解析した結果、免疫応答に関連する様々な遺伝子の発現増強が確認された。²⁶⁾ これにより、ナノ粒子自身に樹状細胞を活性化させる働きがあることが見出され、ナノ粒子のキャリアーとしての性質とアジュバントとしての有用性が明らかとなった。

7. HIV-1 捕捉ナノ粒子の免疫誘導効果

HIV-1 感染症を克服するためには、治療はもちろんのこと感染予防を目的としたワクチン開発が重要課題である。HIV-1 感染を防御する免疫機構と

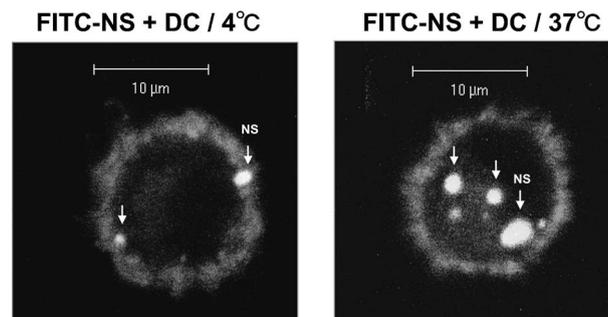


Fig. 7. Uptake of Nanospheres by Dendritic Cells (DC)

DC were cultured in the presence of 500 µg/ml FITC-labeled nanospheres (FITC-NS) for 1 h at 4°C or 37°C and stained with PE-conjugated anti-mouse CD11c. Intracellular localization of NS was determined by confocal fluorescence microscopy.

しては、未然に感染を防ぐ中和抗体などの液性免疫、ウイルスが感染した細胞を殺傷する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) などの細胞性免疫との両方の重要性が示唆されている。HIV-1 感染では、ウイルスに暴露されながらも感染しない感染抵抗性獲得者や感染後も長期間発症しない症例が報告されている。感染抵抗性獲得者においては、粘膜面に存在する HIV-1 特異的分泌型 IgA の重要性が指摘されている。²⁷⁾ また、双方に共通して認められた抑制因子が、HIV-1 特異的 CTL の誘導であることが明らかとなっている。^{28,29)} そのため、ウイルスの感染ルートである粘膜面への IgA 抗体及び CTL の誘導ができれば、HIV-1 感染予防及び治療ワクチンとしての有用性が期待される。

そこで筆者らは、HIV-NS の免疫応答性について

調べるため、熱処理により不活化した HIV-1 を用い、経膣投与でのマウス免疫実験を行った。その結果、HIV-NS 群で膣粘膜に HIV-1 特異的 IgA 抗体の誘導が確認された (Fig. 8)。また、HIV-NS の投与経路について検討したところ、経鼻免疫が最も効

率よく IgA 抗体を産生誘導することができ、誘導された抗体は HIV-1 に対する中和活性を有していることが明らかとなった (Fig. 9)。^{30,31)} HIV-NS の経鼻免疫では CTL の誘導も確認され、液性免疫及び細胞性免疫の両方の誘導効果が認められた (Fig. 10)。³²⁾

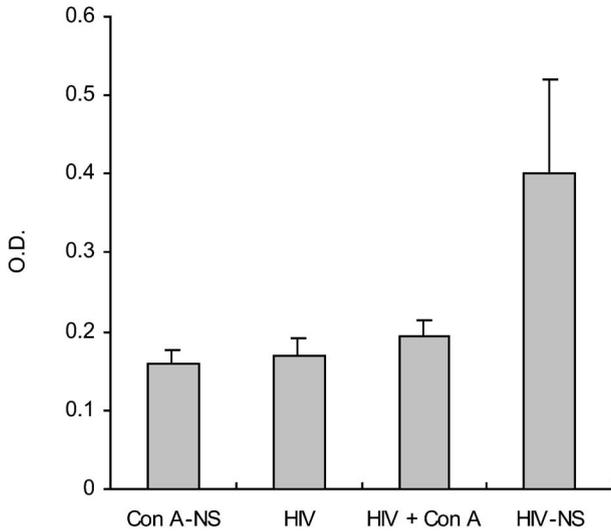


Fig. 8. Anti-HIV-1 gp120 IgA Antibody Levels in Vaginal Washes Following Intravaginal Immunization

Con A-immobilized nanospheres (Con A-NS), inactivated HIV-1 alone (HIV), HIV-1 mixed with Con A (HIV+Con A), or HIV-1-capturing nanospheres (HIV-NS) were administered intravaginally to female mice. Vaginal washes were collected after the fourth administration. The gp120 V3-specific IgA antibody was measured by ELISA.

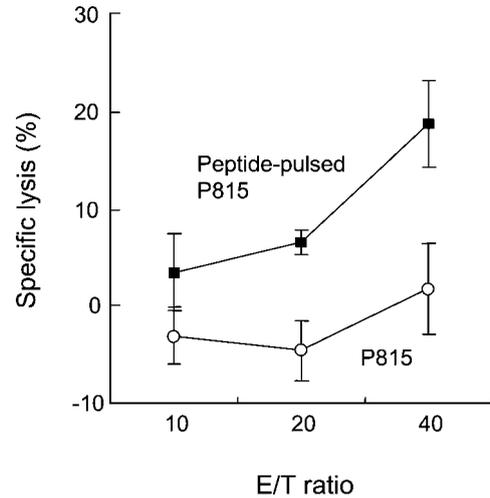


Fig. 10. Cytolytic Activity of Spleen Cells against the gp120 V3 Peptide-pulsed Target Cells in HIV-NS-immunized Mice

Mice were intranasally immunized four times with HIV-NS. The spleen cells were examined for their cytolytic activity against the V3 peptide-pulsed or unpulsed target cells (P815) at various effector/target (E/T) ratio.

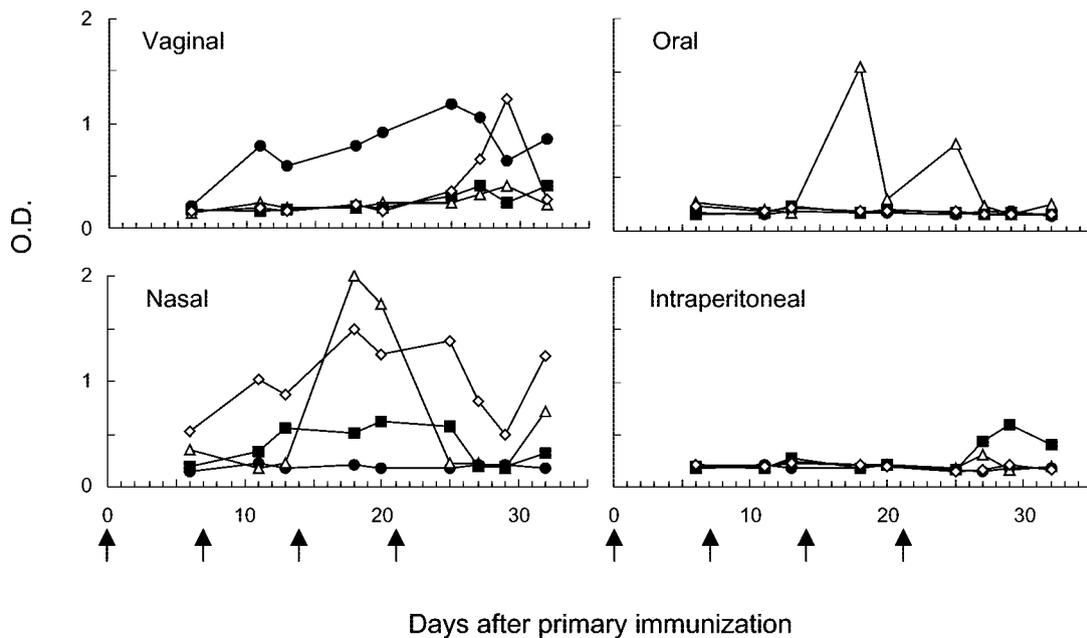


Fig. 9. Anti-HIV-1 gp120 IgA Antibody Levels in Vaginal Washes Following Intravaginal, Oral, Intranasal, or Intraperitoneal Immunization with HIV-NS

Results of four individual mice per group are shown. Arrows indicate the time of immunization.

8. サルを用いた感染防御効果

HIV-NS によって誘導される免疫応答が、実際の感染防御に有効であるかを検討するために、サルを用いた感染防御実験を行った。実験にはサル免疫不全ウイルス (SIV) と HIV-1 のキメラウイルスである SHIV を用いた。SHIV 捕捉ナノ粒子 (SHIV-NS) を経鼻免疫したサルに、感染性を有する SHIV を経膈若しくは経静脈より攻撃接種を行い、その感染防御能を評価した。その結果、SHIV-NS を経鼻免疫したサルでは、マウス同様に膈洗浄液中に HIV-1 特異的 IgA 及び IgG が検出された。また、経膈攻撃接種後、非免疫サルでは血中に持続的にウイルスが検出されたのに対して、SHIV-NS 免疫群では、攻撃接種 6 週目以降に血中のウイルス量が検出感度以下にまで低下していた (Fig. 11).³³⁾ さらに、経静脈攻撃接種に対する感染防御効果を調べた結果、SHIV-NS を免疫したサルでは感染を完全に防御することはできなかったが、血中のウイルス増殖を大幅に減少させる効果が認められた (Fig. 12)。これらの結果より、高分子ナノ粒子を用いた HIV-1 ワクチン開発の可能性が示唆された。

9. 生分解性ナノ粒子を用いたワクチン開発

上述のように、ポリスチレンを基盤としたコア-コロナ型高分子ナノ粒子を用いて HIV-1 ワクチンやペプチド医薬の経口ドラッグデリバリーへの応用

等について詳細な研究を進めてきた。筆者らは現在、これらの結果を基盤に生分解性ナノ粒子への応用展開を試みている。

両親媒性高分子は、水溶液中で自己集し多様な構造体を形成することが知られている。³⁴⁾ これらのナノ構造体のうち疎水性相互作用を駆動力としたコア-シェル型生分解性ナノ粒子は、生体分子等のデリバリー担体として幅広く応用されており、薬物の

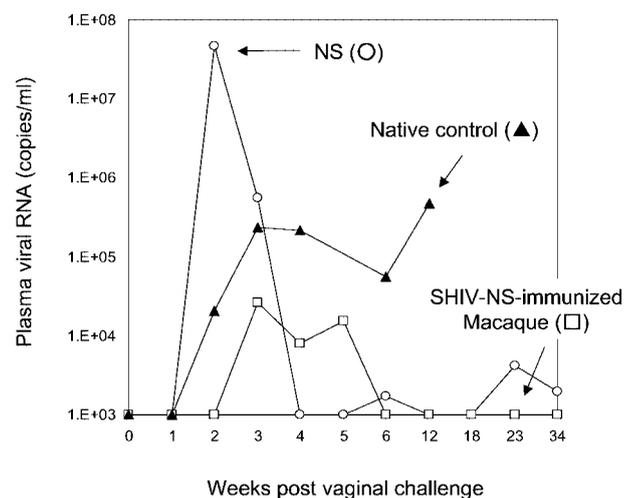


Fig. 11. Plasma Viral RNA Loads in Peripheral Blood of the Macaques Unimmunized (Control) and Intranasally Immunized with Con A-NS (NS) or SHIV-NS after Intravaginal SHIV KU-2 Challenge

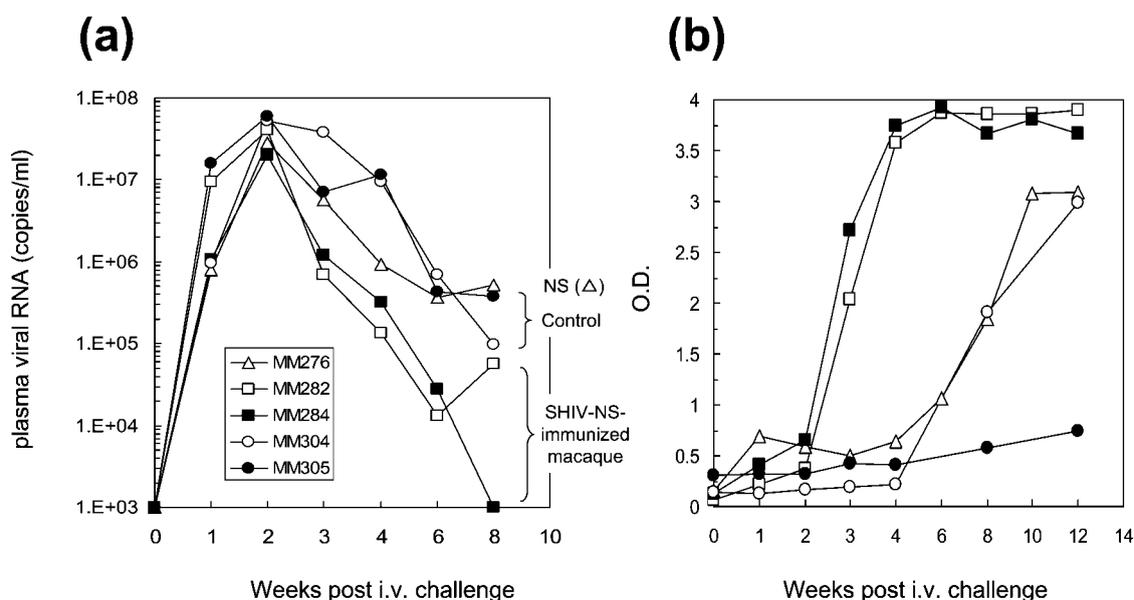


Fig. 12. (a) Plasma Viral RNA Loads in Peripheral Blood and (b) Anti-HIV-1 gp120 IgG Antibody Levels in Plasma of SHIV KU-2-infected Macaques after Intravenous Challenge

10. おわりに

本稿では、コア-コロナ型高分子ナノ粒子を応用した HIV-1 ワクチン開発について紹介した。ナノキャリアーシステムによるワクチン開発は、HIV-1 だけではなく、他の感染症やがんに対する効果的な免疫療法につながるであろう。ナノ粒子による免疫活性化メカニズムを解明に加え、粒子の性状を巧みに制御し、抗原キャリアーとして役割とアジュバントとして機能を付与することで、普遍性の高いワクチンデリバリーシステムの構築が期待される。高分子ナノ粒子を用いたナノメディシン開発は、工学、薬学、医学の融合領域であり、これらの分野が横断的に研究展開することで、革新的なナノ医療が実現できるものと期待される。

謝辞 本研究は大阪大学大学院薬学研究科の中川晋作教授、京都大学ウイルス研究所の速水正憲教授、三浦智行助教授、(株)JIMRO とともに科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 (CREST) の支援により行われているものである。

REFERENCES

- 1) Kakizawa Y., Kataoka K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 203–222 (2002).
- 2) Ikuta Y., Katayama N., Wang L., Okugawa T., Takahashi Y., Schmitt M., Gu X., Watanabe M., Akiyoshi K., Nakamura H., Kuribayashi K., Sunamoto J., Shiku H., *Blood*, **99**, 3717–3724 (2002).
- 3) Panyam J., Labhassetwar V., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 329–347 (2003).
- 4) Elamanchili P., Diwan M., Cao M., Samuel J., *Vaccine*, **22**, 2406–2412 (2004).
- 5) Zhao Z., Leong K. W., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 261–270 (1996).
- 6) Singh M., O'Hagan D. T., *Pharm. Res.*, **19**, 715–728 (2002).
- 7) O'Hagna D. T., Lavelle E., *AIDS*, **16**, 115–124 (2002).
- 8) Moore A., McGuirk P., Adams S., Jones W. C., McGee J. P., O'Hagan D. T., Mills K. H., *Vaccine*, **13**, 1741–1749 (1995).
- 9) Zhao Z., Leong K. W., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1261–1270 (1996).
- 10) Hanes J., Cleland J. L., Langer R., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 97–119 (1997).
- 11) Akashi M., Yanagi T., Yashima E., Miyauchi M., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **27**, 3521–3530 (1989).
- 12) Chen M.-Q., Serizawa T., Kishida A., Akashi M., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **37**, 2155–2166 (1999).
- 13) Serizawa T., Taniguchi T., Akashi M., *Colloids Surf.*, **169**, 95–105 (2000).
- 14) Riza M., Tokura S., Iwasaki M., Yashima E., Kishida A., Akashi M., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **33**, 1219–1225 (1995).
- 15) Chen M.-Q., Kishida A., Akashi M., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **34**, 2213–2220 (1996).
- 16) Serizawa T., Chen M.-Q., Akashi M., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **36**, 2581–2587 (1998).
- 17) Serizawa T., Takehara S., Akashi M., *Macromolecules*, **33**, 1759–1764 (2000).
- 18) Gattegno L., Ramdani A., Jouault T., Saffar L., Gluckman J. C., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **8**, 27–37 (1992).
- 19) Akashi M., Niikawa T., Serizawa T., Hayakawa T., Baba M., *Bioconjug. Chem.*, **9**, 50–53 (1998).
- 20) Hayakawa T., Kawamura M., Okamoto M., Baba M., Niikawa T., Takehara S., Serizawa T., Akashi M., *J. Med. Virol.*, **56**, 327–331 (1998).
- 21) Kawamura M., Naitou T., Ueno M., Akagi T., Hiraishi K., Takai I., Makino M., Serizawa T., Sugimura K., Akashi M., Baba M., *J. Med. Virol.*, **66**, 291–298 (2002).
- 22) Daniel M. D., Kirchhoff F., Czajak S. C., Sehgal P. K., Desrosiers R. C., *Science*, **258**, 1938–1941 (1992).
- 23) Baba T. W., Liska V., Khimani A. H., Ray N. B., Dailey P. J., Penninck D., Bronson R., Greene M. F., McClure H. M., Martin L. N., Ruprecht R. M., *Nat. Med.*, **5**, 194–203 (1999).
- 24) The rgp120 HIV Vaccine Study Group, *J. Infect. Dis.*, **191**, 654–665 (2005).
- 25) Wang X., Uto T., Sato K., Ide K., Akagi T., Okamoto M., Kaneko T., Akashi M., Baba M., *Immunol. Lett.*, **98**, 123–130 (2005).
- 26) Matsusaki M., Larsson K., Akagi T., Lindstedt M., Akashi M., Borrebaeck C. A., *Nano Lett.*, **5**, 2168–2173 (2005).

- 27) Mazzoli S., Trabattoni D., Lo Caputo S., Piconi S., Ble C., Meacci F., Ruzzante S., Salvi A., Semplici F., Longhi R., Fusi M. L., Tofani N., Biasin M., Villa M. L., Mazzotta F., Clerici M., *Nat. Med.*, **3**, 1250–1257 (1997).
- 28) Kaul R., Plummer F. A., Kimani J., Dong T., Kiama P., Rostron T., Njagi E., MacDonald K. S., Bwayo J. J., McMichael A. J., Rowland-Jones S. L., *J. Immunol.*, **164**, 1602–1611 (2000).
- 29) Greenough T. C., Brettler D. B., Kirchhoff F., Alexander L., Desrosiers R. C., O'Brien S. J., Somasundaran M., Luzuriaga K., Sullivan J. L., *J. Infect. Dis.*, **180**, 1790–1802 (1999).
- 30) Akagi T., Kawamura M., Ueno M., Hiraishi K., Adachi M., Serizawa T., Akashi M., Baba M., *J. Med. Virol.*, **69**, 163–172 (2003).
- 31) Akagi T., Ueno M., Hiraishi K., Baba M., Akashi M., *J. Controlled Release*, **109**, 49–61 (2005).
- 32) Kawamura M., Wang X., Uto T., Sato K., Ueno M., Akagi T., Hiraishi K., Matsuyama T., Akashi M., Baba M., *J. Med. Virol.*, **76**, 7–15 (2005).
- 33) Miyake A., Akagi T., Enose Y., Ueno M., Kawamura M., Horiuchi R., Hiraishi K., Adachi M., Serizawa T., Narayan O., Akashi M., Baba M., Hayami M., *J. Med. Virol.*, **73**, 368–377 (2004).
- 34) Zhang L., Yu K., Eisenberg A., *Science*, **272**, 1777–1779 (1996).
- 35) Matsusaki M., Hiwatari K., Higashi M., Kaneko T., Akashi M., *Chem. Lett.*, **33**, 398–399 (2004).
- 36) Kaneko T., Higashi M., Matsusaki M., Akagi T., Akashi M., *Chem. Mater.*, **17**, 2484–2486 (2005).
- 37) Akagi T., Higashi M., Kaneko T., Kida T., Akashi M., *Macromol. Biosci.*, **5**, 598–602 (2005).
- 38) Akagi T., Kaneko T., Kida T., Akashi M., *J. Controlled Release*, **108**, 226–236 (2005).
- 39) Akagi T., Kaneko T., Kida T., Akashi M., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **17**, 875–892 (2006).
- 40) Akagi T., Higashi M., Kaneko T., Kida T., Akashi M., *Biomacromolecules*, **7**, 297–303 (2006).