

コトナラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞株に対するハイブリッドリポソームの増殖抑制効果

松岡裕介,^a 永田未歩,^a 古水雄志,^a 市原英明,^a
川瀬史郎,^b 澤田幸治,^b 松本陽子,^a 上岡龍一*,^a

Inhibitory Effects of Hybrid Liposomes on the Growth of Gastric Tumor Cells Established from Cotton Rats

Yusuke MATSUOKA,^a Miho NAGATA,^a Yuji KOMIZU,^a Hideaki ICHIHARA,^a
Shiro KAWASE,^b Yukiharu SAWADA,^b Yoko MATSUMOTO,^a and Ryuichi UEOKA*,^a
^aDivision of Applied Life Science, Graduate School of Engineering, Sojo University, 4-22-1 Ikeda,
Kumamoto City 860-0082, Japan, and ^bHokkaido Institute of Public Health,
Kita-19, Nishi-12, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan

(Received May 14, 2008; Accepted July 16, 2008)

We established cell-line (CoRa 622 G6) of gastric carcinoma using cotton rats with spontaneous malignant gastric carcinoma with hypergastrinaemia. Inhibitory effects of hybrid liposomes (HL) composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and polyoxyethylene (*n*) dodecyl ether (C₁₂(EO)_{*n*}; *n*=21, 23, 25) on the growth of CoRa 622 G6 cells were clarified on the basis of WST-1 assay. Fusion and accumulation of HL including fluorescence probe into CoRa 622 G6 cell membrane were clarified using confocal laser microscopy and total internal reflection fluorescence microscopy. Induction of apoptosis of CoRa 622 G6 cells after the treatment with HL was observed in fluorescence micrographs on the basis of Annexin-V binding assay and TUNEL method using confocal laser microscopy. The results in this study could contribute to the chemotherapy for patients with gastric carcinoma.

Key words—hybrid liposome; gastric carcinoma; cotton rat; apoptosis

緒 言

胃がんは、粘膜内の分泌細胞や分泌物を胃の中に導く導管の細胞から発生し、胃がん検診などにより発見できる大きさになるまでには何年もかかるといわれている。腫瘍の増大に伴い、がん細胞は胃壁の中に入り込み、漿膜やさらにその外側まで広がり大腸や膵臓に浸潤していく。胃がんの治療は手術療法が最も有効で標準的であるが、進行した胃がんでは外科的治療は困難なため化学療法が用いられる。胃がんの治療に用いられる5-フルオロウラシルなどの抗がん剤は腫瘍縮小効果を示すが完全な治癒は困難であり、重篤な副作用が問題となっている。¹⁾ そのため、効果的で安全な制がん剤が切望されている。

小動物における自然発生の胃がんモデルとして、川瀬らは生後2ヵ月齢以上の雌に偏って胃腫瘍を自

然発生する自然発症胃腫瘍コトナラットを発見した。²⁾ Figure 1に自然発症胃腫瘍コトナラットの胃粘膜の写真を示す。コトナラットの胃腫瘍発症過程は、壁細胞に対する自己免疫性胃炎を発端とし、壁細胞は破壊され胃酸分泌の低下により胃内のpHは中性化に傾く。これに対する防衛反応として胃酸の分泌を促すガストリンが血液中に放出され、高ガストリン血症を呈する。胃粘膜内にはガストリンに反応し、増殖する内分泌細胞(ECL細胞)が存在し、増殖を繰り返すうちに、腸上皮化生や粘膜下への浸潤性の獲得といった悪性化が進む。³⁾ これらのコトナラットにおける胃腫瘍形成メカニズムは、内分泌性細胞由来のヒト胃腫瘍形成と類似することから、ヒト胃腫瘍モデルになりうると思われる。

一方、リポソームはリン脂質を水溶液中に低濃度で分散させることで形成される閉鎖型の小包体であり、抗がん剤、ホルモン及び免疫調節剤などのドラッグキャリアーとして用いられている。^{4,5)} 上岡らは、ベシクル分子とミセル分子からなる新しいナノ

^a崇城大学大学院、工学研究科、応用生命科学専攻、
^b北海道立衛生研究所

*e-mail: ueoka@life.sojo-u.ac.jp

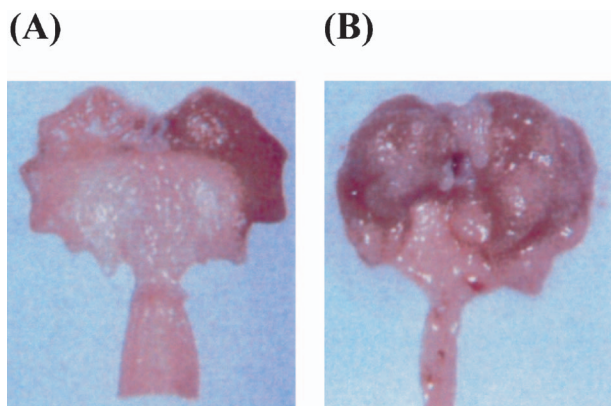


Fig. 1. Normal Gastric Mucosa (A) and Gastric Carcinoma (B) in a Female Cotton Rat

パーティクル、ハイブリッドリポソーム (HL) を開発した。⁶⁾ HL は、構成成分と組成比をえることによりサイズ、膜流動性、相転移温度などの膜物性を調節することができる。^{6,7)} HL にペプチド触媒を組み込んだ人工膜酵素モデルとして用い、L 体基質の天然酵素に匹敵する立体選択的加水分解の制御に成功した。^{8,9)} HL は、*in vitro* において薬物を含むせずに種々のがん細胞に対する顕著な増殖抑制効果を示し、¹⁰⁻¹²⁾ *in vivo* においては担がんモデル動物を用いた治療実験から延命効果が得られている。¹³⁻¹⁶⁾ HL はがん細胞膜に融合・蓄積し、¹⁷⁾ カスパーズの活性化を経てアポトーシスを誘導することが報告されている。^{18,19)} さらに、生命倫理委員会の承認後、悪性リンパ腫瘍の患者に対する臨床試験において、高い安全性及び固形リンパ腫瘍の顕著な縮小効果が明らかになっている。¹⁶⁾

本研究においては、自然発症胃腫瘍コトナラットから株化がん細胞 (コトナラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞株: CoRa 622 G6) の樹立を行った。次に、樹立した CoRa 622 G6 細胞に対する L- α -ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) 及びポリオキシエチレン (n) ドデシルエーテル ($C_{12}(EO)_n$: n=21, 23, 25) からなるハイブリッドリポソーム [90 mol% DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_n$: HL-n] の *in vitro* における増殖抑制効果及びアポトーシス誘導について検討した。

実験方法

1. 試料 L- α -ジミリスチルホスファチジル

コリン (DMPC) は市販品 (日本油脂) をそのまま使用した。ポリオキシエチレン (21) ドデシルエーテル [$C_{12}(EO)_{21}$] とポリオキシエチレン (25) ドデシルエーテル [$C_{12}(EO)_{25}$] は市販品 (日光ケミカルズ) をそのまま使用した。 $C_{12}(EO)_{21}$ 及び $C_{12}(EO)_{25}$ は日本薬局方の薬剤である。 $C_{12}(EO)_{23}$ は市販品 (Sigma) を、Elworthy らの方法に従い精製したものを使用した。²⁰⁾ 蛍光プローブの 1-パルミトイル-2-[12-(γ -ニトロ-2-1,3-ベンゾキシアジアゾール-4-イル)アミノ]ドデカノイル]-*sn*-グリセロ-3-ホスフォコリン (NBDPC) は市販品 (Avanti) をそのまま使用した。

2. 動物 コトナラットは 1971 年に田辺製薬より恵贈して頂き、任意交配で維持した。室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12 時間毎の照明サイクル、1 時間毎に 14 回の 100% 新鮮換気条件で飼育した。

3. 株化がん細胞の樹立 胃腫瘍を自然発生したコトナラットの中から病態末期と判定された個体の腹水を採取後、遠心により細胞を集め滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した。高ガストリン血症を示すコトナラットへ細胞を腹腔内接種により移植し、病態の悪性度が進行したコトナラットを屠殺・解剖し、腫瘍を回収した。さらに別の同系動物で細胞の継代を繰り返したのち、腹水に含まれる細胞を分離した。*In vitro* での培養は、10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI-1640 培地中で 37°C の 5% CO_2 インキュベータ内で行った。細胞の安定した増殖を確認後、クローニングした。

4. ハイブリッドリポソームの調製 ハイブリッドリポソームはリン脂質 (DMPC) と PEG 系界面活性剤 ($C_{12}(EO)_n$, n=21, 23, 25) を 5% グルコース溶液中に溶解後、 45°C 、窒素雰囲気下で超音波照射することにより調製した。孔径 $0.20 \mu\text{m}$ フィルターでろ過滅菌し試験溶液とした。

5. 膜直径の測定 ハイブリッドリポソームの膜直径 (d_{hy}) は、光散乱光度計 (ELS-8000, Otsuka Electronics Co., Ltd.) を用い、動的散乱法により測定した。光源として He-Ne レーザーの 633 nm の発振線を出力 35 mW で用い、散乱角 90° で測定し、得られた拡散係数 (D) から Eq. (1) (Stokes-Einstein 式) に従い d_{hy} を求めた。

$$d_{hy} = \kappa T / 3\pi\eta D \quad (1)$$

ここで、 κ は Boltzmann 定数、 T は絶対温度、 η は

溶媒の粘度である。

6. がん細胞増殖抑制効果 50%増殖抑制濃度 (IC_{50}) は WST-1 assay (Cell Counting Kit, Dojindo Laboratories) により測定した。²¹⁾ 0.1 ml の細胞懸濁液 (1.0×10^4 cells/ml) を 96-well プレート (Sumilon) に播種し, 24 時間 37°C で 5% CO_2 インキュベータ中で培養した。DMPC 単一リポソーム又は HL-n を添加し, 48 時間培養後, WST-1 溶液を添加し 2 時間培養後, 450 nm の吸光度を分光光度計 (Molecular Device) により測定した。生存率を $A_{\text{mean}}/A_{\text{control}} \times 100$ より算出し, 生存率の試料濃度依存性より IC_{50} を求めた。ここで, A_{mean} は HL 添加後の, A_{control} は HL 未添加の水溶性ホルマザンの吸光度を示す。

7. 共焦点レーザー顕微鏡観察 蛍光プローブとして NBDPC を用い, NBDPC を含有した HL-n/NBDPC の CoRa 622 G6 細胞への融合・蓄積を共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP, Leica) を用いて観察した。2 ml の細胞懸濁液 (2.0×10^4 cells/ml) を Glass Bottom Uncoated Dish (MatTek) に播種し, 24 時間 37°C で 5% CO_2 インキュベータ中で培養後, HL-n/NBDPC を添加し観察した。レーザーは, Ar (excitation/detection = 488/505-555 nm) を用いた。

8. 全反射顕微鏡観察 HL-23/NBDPC の CoRa 622 G6 細胞膜への融合・蓄積を全反射顕微鏡 (IX71, Olympus) を用いて観察した。2 ml の細胞懸濁液 (1.0×10^5 cells/ml) を Glass Bottom Uncoated Dish (MatTek) に播種し, 24 時間 37°C で 5% CO_2 インキュベータ中で培養後, HL-23/NBDPC を添加し観察した。レーザーは Ar (488 nm) を用いた。細胞膜に取り込まれた HL-23/NBDPC の蛍光強度は画像解析ソフト (Aquacosmos, Hamamatsu Photonics) を用い, 14 カ所の蛍光強度を測定し平均値を算出した。

9. Annexin-V binding assay HL の CoRa 622 G6 細胞に対するアポトーシス誘導を検討するために, Annexin-V-FLUOS staining kit (Roche Diagnostics) を用いて Annexin-V binding assay によりアポトーシス初期細胞を検出した。2 ml の細胞懸濁液 (1.0×10^4 cells/ml) を Glass Bottom Uncoated Dish (MatTek) に播種し, 24 時間 37°C で 5% CO_2 インキュベータ中で培養した。DMPC 単一リポソーム又は HL-n を添加後 25 分あるいは 45 分間培

養した。なお, 各 HL の最終濃度は細胞当たりの IC_{50} 値と同一である。試料添加後の細胞は, Annexin-V-Fluorescein, Propidium Iodide (PI) 混合液を暗化で室温, 10 分間反応させ, 共焦点レーザー顕微鏡により観察した。レーザーは Ar (excitation/detection, Annexin-V-Fluorescein = 488/500-530 nm, PI = 488/600-630 nm) を用いた。ここで, アポトーシスを誘導した細胞膜は, Annexin-V-Fluorescein (緑) のみに染色される。

10. TUNEL 法 アポトーシス誘導を TUNEL 法により *in situ* cell death detection kit (Roche Diagnostics) を用いて検討した。12 ml の細胞懸濁液 (1.0×10^4 cells/ml) を 100 mm dish (Falcon) に播種し, 24 時間 37°C で 5% CO_2 インキュベータ中で培養した。DMPC 単一リポソーム又は HL-n を添加後, 24 時間培養した。なお, 各 HL の最終濃度は細胞当たりの IC_{50} 値と同一である。遠心処理後細胞を回収し, 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド液 (4%ホルマリン含有) で固定した。Terminal deoxynucleotidyl transferase, fluorescein-dUTP 混合液を 60 分間, 37°C で, TOPRO-3 (Molecular probes) を暗化で 20 分間, 室温で反応し, 共焦点レーザー顕微鏡により観察した。Fluorescein-dUTP の光源には Ar レーザー (excitation/detection, 488/515-565 nm) を用いた。TOPRO-3 の光源には HeNe レーザー (excitation/detection, 633/640-700 nm) を用いた。ここで, すべての細胞は核が TOPRO-3 (赤) に, アポトーシスを誘導した細胞は DNA の 3'-OH 末端が fluorescein-dUTP (緑) に染色される。

結果と考察

1. 株化がん細胞の樹立 胃において自然発生した腫瘍は, 胃粘膜下へ浸潤して最外側部の漿膜に達する。最終的に漿膜を突き破り, 腹腔内に播種後腹水を貯留する。この腹水から採取した細胞は, 長期間の *in vitro* での継代がこれまで困難であった。そこで, コトナラットの腹腔内で腫瘍を継代したところ, 多臓器への転移性の獲得及び短期間でのがん死が認められた。この悪性度の高い細胞をコトナラットへ移植し, 末期症状を呈した病態例の腹水から細胞を採取し継代した。継代 3 代目のコトナラットに, 肝臓への転移が確認された。さらに, 継代 4 代目のコトナラットに大量の腹水を認めた。この腹水

から調製した細胞を *in vitro* 培養系に移し、細胞の安定した増殖を確認後、クローニングした。すなわち、細胞を培養液中に分散させ、倒立顕微鏡下で滅菌ガラス管を用いて細胞1個を採取し、細胞1個から増殖派生した細胞群を独立したクローンとした。その後、継代培養を繰り返し、その中から増殖が安定した1クローンのみを株化がん細胞（胃腫瘍由来腹水性がん細胞株：CoRa 622 G6）として選択し、以後の実験はこの1クローンのみを用いた。CoRa 622 G6細胞は、*in vivo*において高ガストリン血症を伴わない雌雄のコトナラットへの移植及び移植後比較的短期間でのがん死などが認められた。継代5代目以降はほぼ安定して大量の腹水の採取が可能となった。継代動物も高ガストリン血症の雌コトナラットのみならず、健康な雄でも移植可能であることが確認された。なお、CoRa 622 G6細胞は産業界技術総合研究所特許生物委託センターに受託番号 FERM P-18948 として委託済みである。

2. ハイブリッドリポソームの安定性 ハイブリッドリポソーム (HL-n, n=21, 23, 25) の膜直径 (d_{hy}) を動的光散乱法により測定した。結果を Fig. 2 に示す。HL-n の膜直径はいずれも調製3日後まで減少し約 30 nm となったが、その後は1ヵ月以上安定であった。一方、DMPC 単一リポソームは調製7日後に沈殿を生じた。HL は細網内皮系による排除を回避できる 100 nm 以下の直径であり、²²⁾ 静脈投与に適したナノパーティクルを得ることができた。

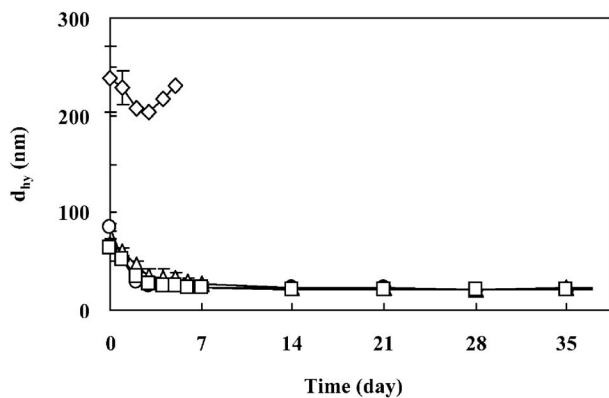


Fig. 2. Time Courses of d_{hy} Change for Hybrid Liposomes Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% $C_{12}(EO)_n$ (HL-n) at 25°C

◇: DMPC liposome, ○: HL-21, △: HL-23, □: HL-25, [DMPC] = 20 mM, in 5% glucose solution. Values are indicated as mean \pm S.D.

3. CoRa 622 G6 細胞に対するハイブリッドリポソームの増殖抑制効果 ハイブリッドリポソーム (HL-n) を CoRa 622 G6 細胞に添加した際の生存率の濃度依存性を Fig. 3 に示す。この図から求めた CoRa 622 G6 細胞に対する HL-n の 50% 増殖抑制濃度を Fig. 4 に示す。HL-21, HL-23 及び HL-25 の IC_{50} 値はそれぞれ、134.5 μ M, 136.5 μ M 及び 141.5 μ M であった。HL の IC_{50} 値は DMPC 単一リポソームの約 1/2 であり、DMPC 単一リポソームに比べ HL は抑制効果を示した。以上のことから、HL-n の CoRa 622 G6 細胞に対する増殖

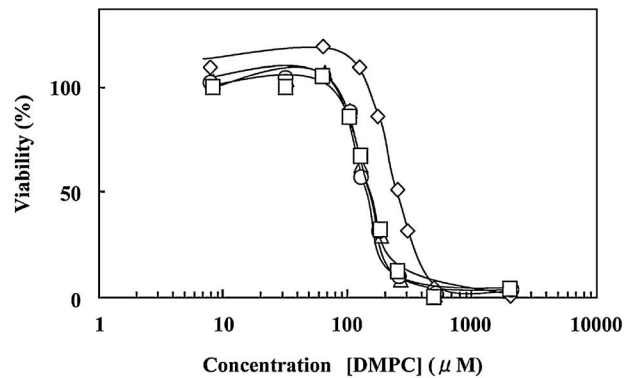


Fig. 3. Viability vs Concentration of Hybrid Liposomes on the Growth of CoRa 622 G6 Cells

◇: DMPC liposome, ○: HL-21, △: HL-23, □: HL-25.

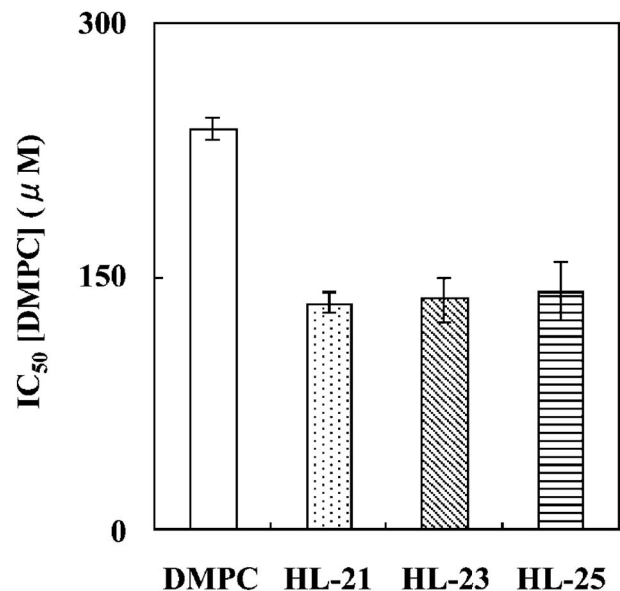


Fig. 4. 50% Inhibitory Concentration (IC_{50}) of Hybrid Liposomes Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% $C_{12}(EO)_n$ (HL-n) on the Growth of CoRa 622 G6 Cells for 48 h. Values are indicated as mean \pm S.D.

抑制効果が明らかになった。

4. CoRa 622 G6 細胞へのハイブリッドリポソームの融合・蓄積 蛍光脂質 (NBDPC) を含有した HL-n (HL-n/NBDPC) を用いて CoRa 622 G6 細胞への融合・蓄積を観察した。まず、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 3 時間観察した結果を Fig. 5 に示す。HL-n/NBDPC 処理 60 分後に細胞質全

体に蛍光蓄積が観察された。HL-n/NBDPC は、膜を透過し、細胞質へ蓄積することが示唆された。次に、全反射顕微鏡を用い、HL-23/NBDPC 処理 50 分後から 10 分間観察した。Fig. 6(A) から明らかのように、蛍光量の経時的な増大が観察された。蛍光強度の測定結果 [Fig. 6(B)] から蛍光強度の増大が観察され、全反射顕微鏡を用いて HL-23/

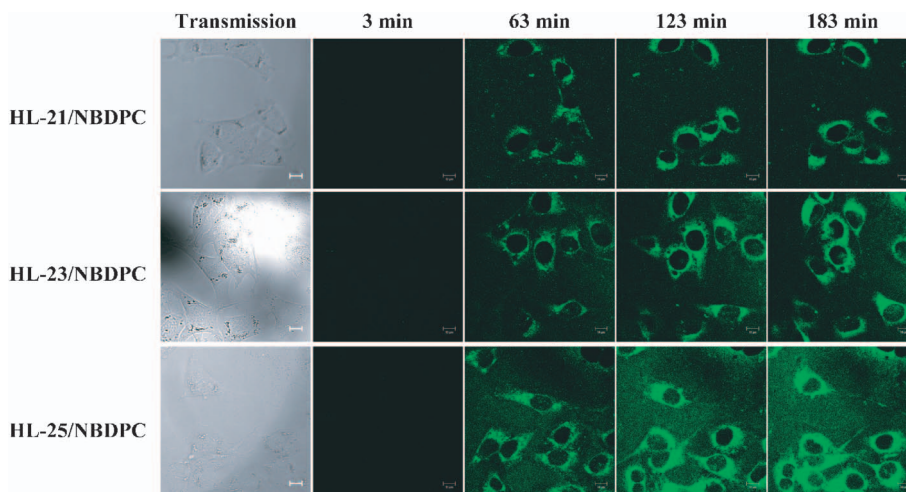


Fig. 5. Fluorescence Micrographs of CoRa 622 G6 Cells after the Treatment with Hybrid Liposomes Including NBDPC (HL-n/NBDPC)

HL-n: [DMPC]=0.10 mM, $[C_{12}(EO)_n]=0.011$ mM, [NBDPC]=0.0047 mM, Magnification: 80, Scale bar: 10 μ m.

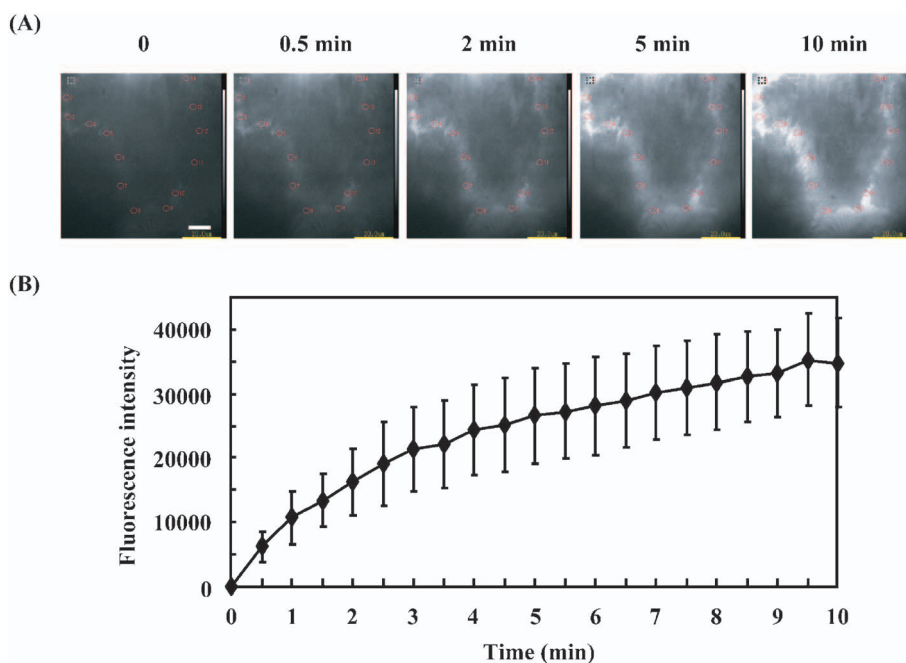


Fig. 6. Specific Accumulation of Hybrid Liposomes Including NBDPC (HL-23/NBDPC) in CoRa 622 G6 Cell Membrane

(A) Total internal reflection fluorescence micrographs of CoRa 622 G6 cells after the treatment with HL-23/NBDPC. (B) Fluorescent intensity of NBDPC incorporated into HL-23 in CoRa 622 G6 cells. HL-23: [DMPC]=0.10 mM, $[C_{12}(EO)_{23}]=0.011$ mM, [NBDPC]=0.0047 mM, Magnification: 100, Scale bar: 20 μ m. Values are indicated as mean \pm S.D.

NBDPC が CoRa 622 G6 細胞膜に融合・蓄積することを初めて明確にした。

5. CoRa 622 G6 細胞に対するハイブリッドリポソームのアポトーシス誘導 CoRa 622 G6 細胞に対するハイブリッドリポソームのアポトーシス誘導について検討した。HL-n で処理した CoRa 622 G6 細胞の蛍光写真を Fig. 7 に示す。写真から明らかなように、HL-21 は処理 25 分で [Fig. 7(A)], HL-23 及び HL-25 は処理 45 分で [Fig. 7(B)] ア

ポトーシスの初期を示す緑色蛍光が観察された。このことから、HL-21 が HL-23 及び HL-25 よりも早期にアポトーシスを誘導していることが明らかになった。これまでに、HL-21 は HL-23 及び HL-25 と比較して膜流動性が高いことを明らかにしている。¹⁹⁾ 膜流動性の高い HL-21 は、アポトーシスに関与する細胞膜タンパクの構造変化に影響を及ぼし易い可能性が考えられる。一方、DMPC 単一リポソームの場合は、45 分処理でも変化はなかった。

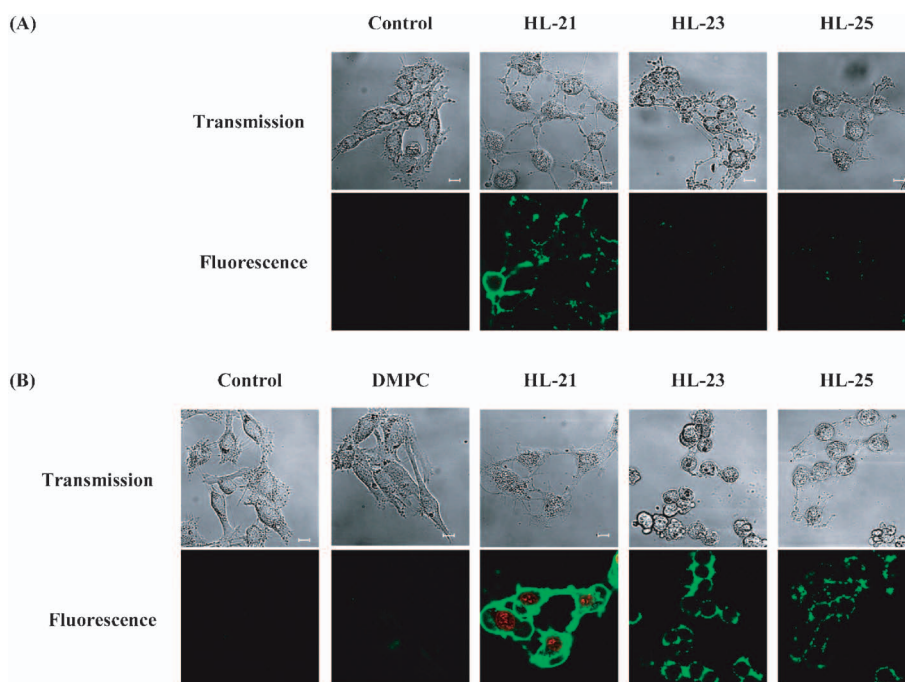


Fig. 7. Fluorescence Micrographs of CoRa 622 G6 Cells after the Treatment with DMPC Liposomes or Hybrid Liposomes Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% $C_{12}(EO)_n$ (HL-n) for 25 min (A) and 45 min (B) Using Annexin-V Binding Assay

DMPC liposome: [DMPC]=2.83 mM, HL-21: [DMPC]=2.69 mM, [$C_{12}(EO)_{21}$]=0.299 mM, HL-23: [DMPC]=2.73 mM, [$C_{12}(EO)_{23}$]=0.303 mM, HL-25: [DMPC]=2.83 mM, [$C_{12}(EO)_{25}$]=0.314 mM, Magnification: 80, Scale bar: 10 μ m.

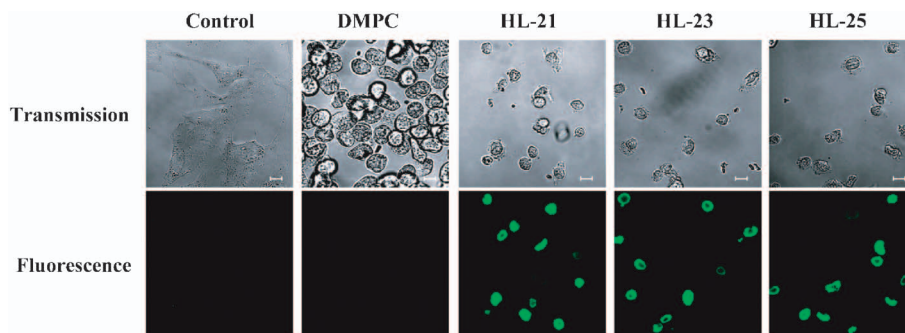


Fig. 8. Fluorescence Micrographs of CoRa 622 G6 Cells after the Treatment with DMPC Liposomes or Hybrid Liposomes Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% $C_{12}(EO)_n$ (HL-n) for 24 h Using TUNEL Method

DMPC liposome: [DMPC]=17.0 mM, HL-21: [DMPC]=16.1 mM, [$C_{12}(EO)_{21}$]=1.79 mM, HL-23: [DMPC]=16.4 mM, [$C_{12}(EO)_{23}$]=1.82 mM, HL-25: [DMPC]=17.0 mM, [$C_{12}(EO)_{25}$]=1.89 mM, Magnification: 80, Scale bar: 10 μ m.

HLは、ヒト正常肝細胞¹⁷⁾及びヒト正常大腸細胞¹⁹⁾に対して細胞毒性を示さないことが明らかであり、がん細胞選択的な抗腫瘍効果が、CoRa 622 G6細胞において今回初めて示されたと考えられる。

次に、CoRa 622 G6細胞にDMPC単一リポソームあるいはHL-nを添加後24時間培養し、TUNEL法により検討した。CoRa 622 G6細胞の蛍光写真をFig. 8に示す。HL-nで処理した細胞において緑色蛍光(Fluorescein-dUTP)が観察され、アポトーシスを誘導していることが明らかになった。一方、DMPC単一リポソームでは緑色蛍光は観察されなかった。以上の結果から、HLがCoRa 622 G6細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかになった。

結 言

自然発症胃腫瘍コトナラット由来の胃腫瘍細胞を高ガストリン血症動物内で維持する方法によりがん化を促進させ、株化がん細胞(コトナラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞株:CoRa 622 G6)を新しく樹立した。CoRa 622 G6細胞は高ガストリン血症を伴わない雌雄のコトナラットへの移植、及び移植した動物の比較的短期間でのがん死などが認められた。リン脂質とPEG系界面活性剤から構成されるハイブリッドリポソームHL-n(n=21, 23, 25)のCoRa 622 G6細胞に対する増殖抑制効果及びアポトーシスを誘導を検討したところ次のような興味深い知見が得られた。

(1) HL-nは直径約30 nmで、1ヵ月以上安定であった。

(2) HL-nは、コトナラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞株(CoRa 622 G6)に対し増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

(3) HL-nは、コトナラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞(CoRa 622 G6)膜に対し融合・蓄積することを明確にした。

(4) HL-nのコトナラット胃腫瘍由来腹水性がん細胞株(CoRa 622 G6)に対するアポトーシスを誘導を検討した。Annexin-V binding assay及びTUNEL法により、ハイブリッドリポソームは、CoRa 622 G6細胞に対してアポトーシスを誘導していることが明らかになった。

以上のように、DMPCとPEG系界面活性剤から

なるハイブリッドリポソームHL-nはCoRa 622 G6細胞に対して抗腫瘍効果を示すことを初めて明確にした。さらに、HL-nはCoRa 622 G6細胞膜に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することを見出した。HLは、*in vivo*での毒性試験から安全であることをすでに確認している。^{14,16)}今後、*in vivo*での胃がんモデルを用いた治療効果を明確にし、胃がんに対する新しいタイプのがん治療薬として期待できると考える。

REFERENCES

- 1) Fraile R. J., Baker L. H., Buroker T. R., Horwitz J., Vaitkevicius V. K., *Cancer Res.*, **40**, 2223-2228 (1980).
- 2) Kawase S., Ishikura H., *Lab. Anim. Sci.*, **45**, 244-248 (1995).
- 3) Martinsen T. C., Kawase S., Hakanson R., Torp S. H., Fossmark R., Qvigstad G., Sandvik A. K., Waldum H. L., *Carcinogenesis*, **24**, 1887-1896 (2003).
- 4) Papahadjopoulos D., Vail W. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **308**, 259-267 (1978).
- 5) Lopez-Berestein G., Fidler I., "Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer," Alan R. Liss, Inc., New York, 1989.
- 6) Ueoka R., Moss R. A., Swarup S., Matsumoto Y., Strauss G., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185-2186 (1985).
- 7) Ueoka R., Matsumoto Y., Moss R. A., Swarup S., Sugii A., Harada K., Kikuchi J., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988).
- 8) Ueoka R., Matsumoto Y., Yoshino T., Hirose T., Kikuchi J., Murakami Y., *Chem. Lett.*, **15**, 127-131 (1986).
- 9) Tanoue O., Baba M., Tokunaga Y., Goto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2129-2132 (1999).
- 10) Matsumoto Y., Imamura C., Ito T., Taniguchi C., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1456-1458 (1995).
- 11) Matsumoto Y., Kato T., Iseki S., Suzuki H., Nakano K., Iwahara M., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1937-1940 (1999).
- 12) Nagami H., Nakano K., Ichihara H., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 782-785 (2006).

- 13) Ueoka R., Matsumoto Y., Kanno A., Tsuzaki K., Ichihara H., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262–1263 (2000).
- 14) Ichihara H., Nagami H., Yamamoto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 25–34 (2003).
- 15) Negishi Y., Yoshizawa Y., Yamazaki Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *J. Jpn. Soc. Pediatr. Surg.*, **41**, 930–938 (2005).
- 16) Ichihara H., Nagami H., Kiyokawa T., Matsumoto Y., Ueoka R., *Anticancer Res.*, **28**, 1187–1196 (2008).
- 17) Nakano K., Iwamoto Y., Takata W., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251–3254 (2002).
- 18) Matsumoto Y., Iwamoto Y., Matsushita T., Ueoka R., *Int. J. Cancer*, **115**, 377–382 (2005).
- 19) Komizu Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131–6134 (2006).
- 20) Elworthy P.H., Macfarlane C. B., *J. Chem. Soc.*, **1962**, 537–541.
- 21) Ishiyama M., Shiga M., Sasamoto K., Mizoguchi M., Pin-gang H. E., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118–1122 (1993).
- 22) Huang S. K., Lee K. D., Hong K., Friend D. S., Papahadjopoulos D., *Cancer Res.*, **52**, 5135–5143 (1992).