

PEG化ナノキャリア頻回投与による accelerated blood clearance 現象の機構解明

小出裕之,^a 浅井知浩,^a 畑中剣太郎,^a 清水広介,^a
横山昌幸,^b 石田竜弘,^c 際田弘志,^c 奥 直人^{*,a}

**Elucidation of Accelerated Blood Clearance Phenomenon Caused
by Repeat Injection of PEGylated Nanocarriers**

Hiroyuki KOIDE,^a Tomohiro ASAI,^a Kentaro HATANAKA,^a Kosuke SHIMIZU,^a
Masayuki YOKOYAMA,^b Tatsuhiro ISHIDA,^c Hiroshi KIWADA,^c and Naoto OKU^{*,a}

^aDepartment of Medical Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan, ^bMedical Engineering Laboratory Research Center for Medical Science, Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan, and ^cInstitute of Health Biosciences, The University of Tokushima, 1-78-1 Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan

(Received July 30, 2009)

Liposomes modified with polyethylene glycol (PEG) can stably exist in the bloodstream because the PEG on the liposomes attracts a water shell to the liposomal surface. Since these liposomes are long circulating nanocarriers, they are used as drug and gene delivery tools. Repeat injection of PEGylated liposomes, however, is known to induce the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. In the ABC phenomenon, PEGylated liposomes that are injected subsequent to the first injection are cleared rapidly from the bloodstream and accumulate in the liver, resulting in loss of their long-circulating characteristics. The induction of ABC phenomenon is related to the production of anti-PEG IgM from splenic B cells. To elucidate the mechanism of the phenomenon, we firstly examined the relationship between the induction of ABC phenomenon and the concentration of PEGylated liposomes, and observed that the high dose of those did not induce the phenomenon. Next, we investigated whether polymeric micelles trigger ABC phenomenon or not. Finally, the size-dependency of ABC phenomenon was investigated by use of variously sized PEGylated liposomes and polymeric micelles having PEG chains. Our data suggest that the initiation of ABC phenomenon would be size-dependent, and particles smaller than 30 nm did not induce ABC phenomenon. We anticipate that the elucidation of the ABC phenomenon will be helpful for the development of DDS formulations.

Key words—polyethylene glycol; liposome; accelerated blood clearance; polymeric micelle; nanocarrier

1. はじめに

リポソームは、生体の細胞膜を構成しているリン脂質からなる人工細胞様微粒子である。したがって、生体適合性が高く、体内では薬物を分解酵素などから保護しながら運搬できるため、理想的なDDS運搬体と考えられている。薬物をリポソーム

内に封入することによって、副作用を軽減でき、通常の投与量以上の投与が可能となる。そこで期待されるのが、抗がん剤などの重篤な副作用を引き起こす治療薬の封入である。抗がん剤の多くは、細胞自体若しくはDNAに致命的な障害を引き起こすように設計されている。ところが、がん細胞以外の正常細胞でも、骨髄の造血細胞や口腔粘膜、消化管粘膜、毛根細胞など細胞分裂が盛んな部位では抗がん剤の作用を受け易い。しかし、リポソームなどのキャリアで薬物を包み込むことで、薬物の体内動態が劇的に変化し、副作用の軽減をはかることができる。また、がんは、自身の増殖のために既存の血管だけでは足りず、新たな血管(新生血管)を周辺につくる(血管新生)。¹⁾ その血管構造は既存の血管と

^a静岡県立大学大学院薬学研究科医薬生命化学講座(〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1), ^b東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター医用エンジニアリング研究室(〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8), ^c徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部(〒770-8505 徳島市庄町1-78-1)

*e-mail: oku@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS1で発表したものを中心に記述したものである。

は異なり、新生血管内皮細胞同士がまばらな間隙を形成しているため、100 nm 程度の粒子が間隙を通過できることから、リポソームなどのナノキャリアは、その間隙を通過し、がんへの集積性が高いことが知られている (enhanced permeability and retention effect: EPR 効果).²⁾ この EPR 効果を最大限に利用するためにリポソームに長期血中滞留性を持たせることは、がんへの集積性を高めることにつながる。ところが、生体には外来異物に対する排出機構があり、リポソームも例外ではなく、肝臓や脾臓を中心とする細網内皮系組織 (reticuloendothelial system, RES) の貪食細胞に捕捉されてしまう。この RES を回避し、長期血中滞留性を持たせるために最も汎用されているのが、ナノキャリア表面への polyethylene glycol (PEG) のコーティングである。PEG を修飾したリポソームは、立体的に安定であり、表面に固定水和相を形成することで補体や抗体によるオプソニン化を防ぎ、免疫細胞による貪食を回避するため RES に取り込まれ難く、血中に長時間循環滞留する特性を有している。^{3,4)} その結果、がんや炎症部位への薬物送達を可能にすることが知られている。⁵⁾ また、DDS ナノキャリアの 1 つである高分子ミセルは、内部にコアとなる疎水性部位、外側には PEG 鎖を施すことにより親水性部位を持つ構造をとっている。⁶⁾ この PEG 鎖の効果により、リポソームと同様に長時間の血中滞留性を得ることができる。高分子ミセルは、サイズ的设计が可能であるとともに、内部の疎水性部位に疎水性相互作用を利用することで薬物を封入することができる。⁷⁾ このほかにも、静電相互作用、水素結合などを利用して DNA やタンパク質などの高分子をミセルに封入することができる。⁸⁾

このように、PEG 修飾ナノキャリアが長期血中滞留性を有している事実は一般的に知られているが、近年、PEG 修飾リポソームの頻回投与時において、血中からの急速なクリアランスが起こる現象、accelerated blood clearance (ABC) 現象が報告された。^{9,10)} 筆者らは ABC 現象の機構解明を目的として、PEG 修飾ナノキャリアの投与濃度、投与間隔が及ぼす ABC 現象への影響、高分子ミセルによる ABC 現象誘導の有無を検討した。さらに、初回投与時に様々なサイズのナノキャリアを投与し、ABC 現象誘導におけるサイズ依存性の検討を行っ

た。本稿ではこれらの結果を中心に ABC 現象について概説する。

2. PEG 修飾リポソーム頻回投与による ABC 現象の誘導

PEG を修飾したリポソームは本来長期血中滞留型ナノキャリアとして開発されており、免疫原性、毒性が少ないといった多くの利点を有しているため、薬物のデリバリーツールとして汎用されている。ABC 現象の機構を解明するため、まずマウスを用い PEG 修飾リポソームの単回投与を行った。その結果、投与 24 時間後では血液中におよそ 10%、肝臓には 50% ほど移行していた (Fig. 1)。しかし、PEG 修飾リポソームの繰り返し投与を行った場合には、本来の長期血中滞留効果を失い、2 回目投与時から 24 時間後には血中から急速にクリアランスされ、投与したリポソームの血中での残存率が非常に低くなっていた。さらに、その血中から消失したリポソームの多くが肝臓への移行し、蓄積が増加していた (Fig. 1)。このように、繰り返し投与による血中からの急速な消失と、肝臓への蓄積が ABC 現象の特徴である。しかし、PEG 修飾リポソームに細胞障害性作用を持つドキシソルビシンを内封させた PEG-Dox をマウスに投与した場合、2 回目に投与したリポソームは ABC 現象を示さなかった。

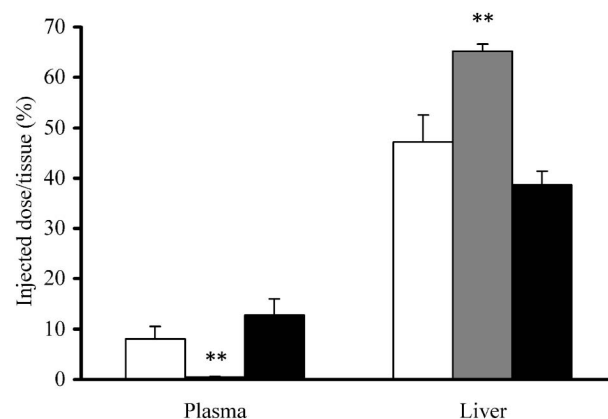


Fig. 1. Biodistribution of ³H-labeled PEGylated Liposomes in Mice

BALB/c mice were intravenously injected with PBS, PEGylated liposomes (2 μ mol phospholipids/kg), or PEG-Dox liposomes (2 μ mol phospholipids/kg). Three days after the pretreatment, ³H-labeled PEGylated liposomes were intravenously injected into these mice (5 μ mol phospholipids/kg). Twenty-four hours after the second injection, the mice were sacrificed, and the radioactivity in the plasma and each organ (only liver data shown) was determined. Data ($n=5$) are presented as a percentage of the injected dose per tissue and S.D. Data represent PBS (open bar), PEGylated liposomes (gray bar) and PEG-Dox liposomes (closed bar), respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: ** $p<0.01$.

ABC 現象は、初回投与時のリポソームが脾臓 B 細胞によって認識されることによって、IgM 抗体を産生し、誘導されることが示唆されている。¹¹⁾ そのため、PEG-Dox を前処理したことで、リポソームを認識した脾臓 B 細胞が殺傷され、抗体が産生されず、ABC 現象が誘導されなかったと考えられる。¹²⁾ 現在臨床使用されている Doxil[®]は、PEG-Dox と同じようにドキシソルビシンが内封してあるため ABC 現象を起こさないと考えられる。リポソーム製剤が開発された当初は、このような理由から ABC 現象が見落とされていたと考えられる。ドキシソルビシンのような細胞障害性の薬物を内封した場合には ABC 現象が起これないとしても、DDS キャリアに内封する薬物は細胞障害性の薬部のみでなく、近年 small interfering RNA (siRNA) を始めとする核酸医薬品のデリバリー手段としてもリポソームが用いられていることから、^{13,14)} ABC 現象の誘導は DDS 製剤開発において重大な問題となり得る。

3. PEG 修飾リポソーム投与濃度の ABC 現象への影響

ABC 現象について検討するにあたり、単回投与時において長時間血中に滞留するリポソームを調製した。PEG 修飾リポソームの構成脂質に飽和脂肪酸である Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を選択し、Cholesterol, Distearoylphosphatidylethanolamine-*N*-[methoxy (polyethylene glycol)-2000] (MPEG-DSPE) を 10 : 5 : 1 の割合にて混合、薄膜法によりリポソームを調製した。DPPC は、その構造の中に不飽和部分を有していないため、安定性が高いリポソームを調製することができる。また、DPPC を含有したリポソームは、その安定性ゆえ、体内に投与した場合においても分解される割合が低く、内封した薬物の保持能も高い。Figure 1 に示す実験においては、初回投与時における PEG 修飾リポソームはマウスに対して 2 μmol phospholipids/kg, 2 回目の投与時には、PEG 修飾リポソームを 5 μmol phospholipids/kg となるように投与を行った。一方、Fig. 2 にデータを示した実験においては投与濃度を上げた場合における ABC 現象誘導の有無を確認するため、1 回目、2 回目の両投与時において 100 μmol phospholipids/kg にて投与を行った。その結果、低濃度の場合において顕著に

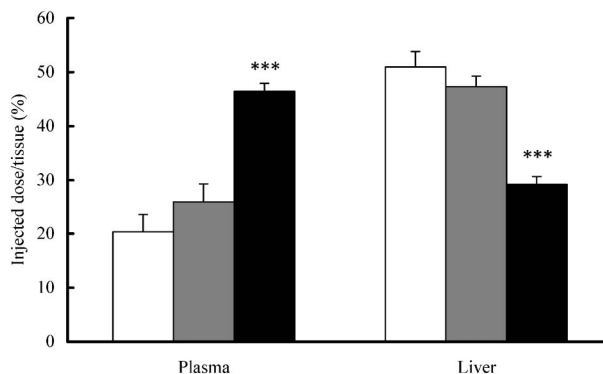


Fig. 2. No Induction of the ABC Phenomenon at High Dose Priming of PEGylated Liposomes

BALB/c mice were intravenously injected with PBS, PEGylated liposomes (100 μmol phospholipids/kg) or PEG-Dox (100 μmol phospholipids/kg). Three days later, ³H-labeled PEGylated liposomes were intravenously injected (100 μmol phospholipids/kg). Twenty-four hours after the second injection, the mice were sacrificed, and the radioactivity in the plasma and each organ (only liver data shown) was determined. Data in the graph represent percentage of the injected dose per tissue and S.D. Data ($n=5$) represent PBS (open bar) and PEGylated liposomes (gray bar) and PEG-Dox (closed bar) respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: *** $p<0.001$.

表れていた ABC 現象が、高濃度の場合においては誘導されておらず、コントロールとして用いた PBS 投与群と同等、若しくはそれ以上に 2 回目に投与したリポソームが血中に残っていた。さらに、ABC 現象の特徴の 1 つである肝臓への蓄積も増加していなかった。このように、高濃度のリポソームにおいて ABC 現象が誘導されなかった理由の 1 つとして考えられるのが、以下に示す免疫応答反応の変化である。PEG 修飾リポソームの繰り返し投与によって誘導される ABC 現象は、TI-2 antigen に対して働くとしてされている T 細胞非依存的な B 細胞の免疫応答によることが示唆されている。¹⁵⁾ 通常、体外から体内に異物が侵入した際、マクロファージが抗原提示を行い、その提示を B 細胞が認識し、T 細胞の助けを借りることによって B 細胞が抗体産生細胞となり、産生された抗体の反応を介して異物の排除を行う。^{16,17)} しかし、繰り返し構造を持つリポ多糖などの場合においては、T 細胞の助けを借りることなく、異物を認識した B 細胞が活性化し、抗体を産生して異物を排除する。¹⁸⁾ リポソーム膜表面に修飾した PEG 脂質も同じように ethylene 鎖の繰り返し構造を持っており、T 細胞非依存的な B 細胞の反応が惹起されている可能性が考えられている。この T 細胞非依存的な B 細胞の反応の特徴として、低濃度の場合においては B 細胞のみの働き

によって異物の排除が行われるが、高濃度、すなわちより多くの異物が侵入した場合には、B細胞のみでは異物の排除が困難となり、いわゆる免疫寛容を引き起こすことが知られている。同様に、高濃度のリポソームを投与した場合においても、免疫寛容が引き起こされ、低濃度のときに誘導されていたABC現象が誘導されなかったことが推測できる。したがって、ABC現象が誘導されないよう、適切な投与濃度設定し、治療を行うことは、ABC現象を回避する戦略として有用な手段の1つに挙げることができる。

4. PEG修飾リポソーム再投与後の体内動態

PEG修飾リポソーム再投与後の血中からの消失と肝臓への蓄積の経時変化を確認するために、2回目の投与から1, 3, 6時間後にマウスを解剖し、血中残量と、肝臓への蓄積変化を測定した (Fig. 3)。その結果、コントロール群においては、投与1時間後で約70%程度、投与6時間後においても血中での残存率が50%以上という高い値を維持していた。しかし、PEG修飾リポソームを繰り返し投与した群においては、血中からの消失が投与1時間後においても既にみられ、55%程度まで落ち込んでいた。さらに、投与6時間後では30%程度まで減少していた。また、肝臓への蓄積は、6時間後におい

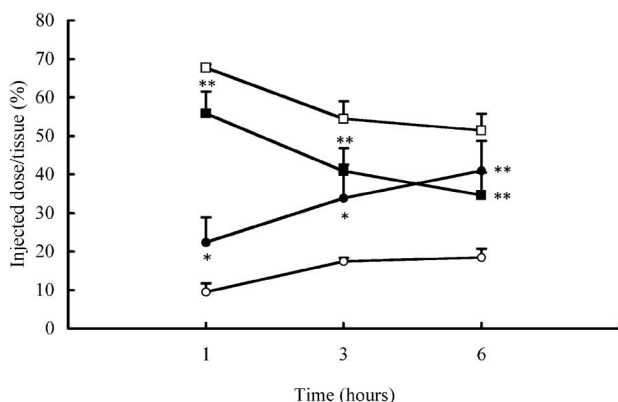


Fig. 3. Time-course of the Biodistribution of ^3H -labeled PEGylated Liposomes

BALB/c mice ($n=5$) were intravenously injected with PBS or PEGylated liposomes ($2 \mu\text{mol}$ phospholipids/kg). Three days after the pretreatment, ^3H -labeled PEGylated liposomes were intravenously injected into these mice ($5 \mu\text{mol}$ phospholipids/kg). At 1, 3 and 6 h after the injection, the mice were sacrificed, and the radioactivity in the plasma and each organ (only liver data shown) was determined. Data are presented as a percentage of the injected dose per plasma priming with PBS (opened square) or PEGylated liposomes (closed square), and that per liver priming with PBS (opened circle) or PEGylated liposomes (closed circle), respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

ては両投与群に20%以上の差がみられた。この結果より、ABC現象は2回目投与後1時間以内という早い時間帯で見られることが明らかとなった。投与量をさらに少なく設定した場合、投与6時間後には血中からすべてのリポソームが排除されている可能性が考えられる。がんなどの標的部位への送達など、薬物デリバリーキャリアとしての機能を発揮する前に血液から消失してしまうため、前項目でも示したように、キャリアの適切な投与量の設定が重要なファクターとなる。

5. PEG鎖を有した高分子ミセル初回投与によるABC現象への影響

高分子ミセルもリポソームと同様に有用なDDSキャリアの1つとして考えられている。しかし、高分子ミセルがABC現象の誘導に関与するかどうかは、明らかとなっていない。われわれは、PEG鎖を有した高分子ミセル Poly(ethylene glycol)-*b*-poly(β -benzyl L-aspartate) (PEG-PBLA) を用い、 2.9 mg/kg にてマウス尾静脈内に投与し、その3日後に約100 nmに調製したPEG修飾リポソームを投与することで、PEG鎖を有した高分子ミセルPEG-PBLAがABC現象を惹起するか否か、体内動態解析を行い検討した [Fig. 4(A)]。その結果、PEG-PBLAを投与した場合においても、PEG修飾リポソームを投与した時と同じように、2回目に投与したりポソームが血中から消失されており、肝臓への蓄積が増加していた。

ABC現象の誘導には、初回投与時のリポソームに対して、脾臓B細胞におけるIgM産生が深く関与していることが示唆されている。¹¹⁾そこでわれわれは、高分子ミセル投与から3日後、すなわち2回目のリポソーム投与日に該当する日にマウスの血液を採取し、血清中に存在するPEG鎖に対するIgM (抗PEG-IgM抗体)量を測定した [Fig. 4(B)]。その結果、コントロール群と比較して、IgM産生量が顕著に増加していることが明らかとなった。これまで、ABC現象はPEG修飾リポソームにおいてのみ観察されていたが、PEG鎖を有した高分子ミセルによってもPEG修飾リポソームと同様にABC現象が誘導されることを明らかにした。さらに、高分子ミセルの投与によって体内の免疫機構が応答することで抗PEG-IgM抗体が産生されることも確認された。このことは、リポソームやミセルに

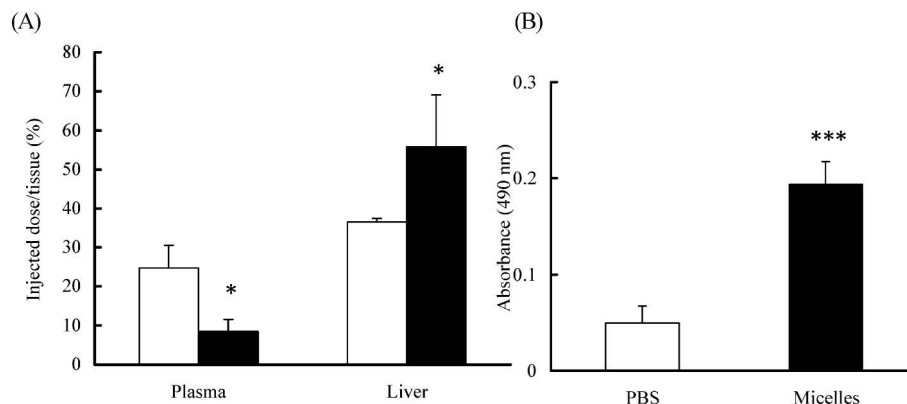


Fig. 4. Induction of the ABC Phenomenon Priming with Polymeric Micelles

BALB/c mice were intravenously injected with PBS or PEG-PBLA (2.9 mg/kg). (A) Biodistribution of the test-dose ³H-labeled PEGylated liposomes: Three days after the pretreatment, ³H-labeled PEGylated liposomes were intravenously injected into these mice (5 μ mol phospholipids/mouse). Twenty-four hours after the second injection, the mice were sacrificed, and the radioactivity in the plasma and each organ (only liver data shown) was determined. Data ($n=5$) are presented as a percentage of the injected dose per tissue and S.D. (B) Anti-PEG IgM in the serum collected at day 3 after the pretreatment with PBS (open bar) or PEG-PBLA (closed bar), respectively. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 separate experiments. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: * $p<0.05$ and *** $p<0.001$.

限らず、DDS技術としてナノキャリアを用いる場合にはPEG鎖によるABC現象の誘導に注意する必要があることを示している。

6. PEG修飾キャリアのサイズ違いによるABC現象誘導の有無

PEG鎖を有した高分子ミセルにおいてもABC現象が誘導されることから、ABC現象が様々なキャリアに対して誘導され得ることが示唆された。そこで様々なサイズのPEG修飾リポソーム、高分子ミセルを初回に投与し、サイズの違いによるABC現象誘導の有無について検討を行った。今回の検討では、まず100 nm以上の検討として約119 nm, 261 nm, 795 nmのPEG修飾リポソームを初回に投与し、2回目の投与には約100 nmに調製したPEG修飾リポソームを用いた (Fig. 5)。その結果、100 nm以上のPEG修飾リポソームを最初に投与した場合においては、2回目投与リポソームの体内動態に、初回投与リポソームのサイズの違いによる差はみられず、すべてのサイズにおいて2回目投与したPEG修飾リポソームが、投与後急速に血中から消失した。このことより100–800 nmサイズのリポソームでは、同様にABC現象が誘導されることが明らかになった。次に、Fig. 4で初回投与時に高分子ミセルを用いた場合においてもPEG修飾リポソームと同様にABC現象が誘導されることが明らかになったことから、100 nm以下のPEG修飾ナノキャリアとして、50.2 nm (PEG-PBLA), 31.5

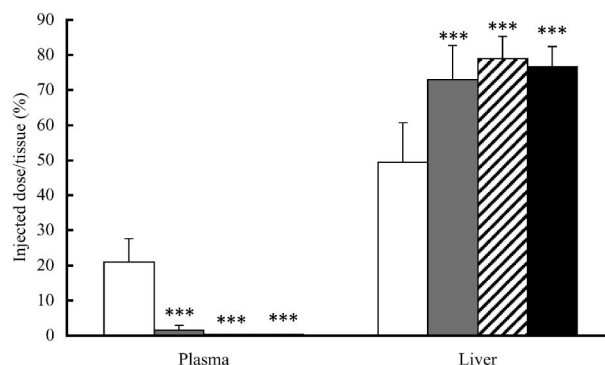


Fig. 5. Biodistribution of Test-dose PEGylated Liposomes after the Preadministration of Various Sized Ones

BALB/c mice ($n=5$) were intravenously injected with PEGylated liposomes (2.0 μ mol phospholipids/kg) with 119, 261 or 795 nm sizes. Three days later, ³H-labeled test-dose PEGylated liposomes (5.0 μ mol phospholipids/kg) were administered *via* a tail vein. Twenty-four hours later, the mice were sacrificed and the radioactivity in the plasma and liver was determined. Data are presented as a percentage of the injected dose per tissue and S.D. priming with PBS (open bar), 119 nm (gray bar), 261 nm (hatched bar), and 795 nm (closed bar) PEGylated liposomes, respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: *** $p<0.001$.

nm (PEG-P (Asp (pentyl))), 9.7 nm (PEG-P (Asp (nonyl))) の高分子ミセルを用いて検討を行った (Fig. 6)。高分子ミセルを用いることで、リポソームにおいては調製が困難な約50 nm以下の粒子を容易に調製することができる。上記したそれぞれのサイズの高分子ミセル (Fig. 7) を初回に投与した後、先ほどと同じように約100 nmに調製したPEG修飾リポソームを2回目に投与し、体内動態を調べた。その結果、初回に50.2 nmの高分子ミセ

ルを投与した群においては ABC 現象が観察されたのに対し、31.5 nm と 9.7 nm のサイズの高分子ミセルを前投与した群では ABC 現象は観察されなかった。これまで、生体内に入った異物の中で、サイズの大きいものほど、免疫細胞に認識されやすく、

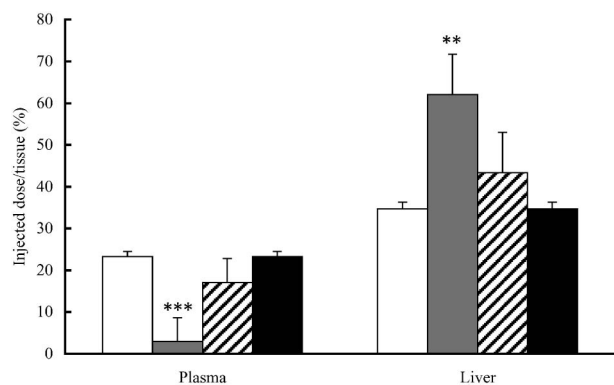


Fig. 6. Biodistribution of Test-dose PEGylated Liposomes after Preadministration of Polymeric Micelles with Various Sizes

BALB/c mice ($n=5$) were intravenously injected with polymeric micelles (2.9 mg/kg) having 9.7, 31.5 or 50.2 nm sizes. Three days later, ^3H -labeled PEGylated test-dose liposomes (5.0 μmol phospholipids/kg) were administered *via* a tail vein. Twenty-four hours later, the mice were sacrificed and the radioactivity in the plasma and each organ was determined. Data are presented as a percentage of the injected dose per tissue and S.D. priming with PBS (open bar), 9.7 nm (closed bar), 31.5 nm (hatched bar), and 50.2 nm (gray bar) polymeric micelles, respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$.

肝臓への移行が上昇するという報告がある。¹⁹⁻²¹⁾したがって、サイズの大きいリポソームは容易に免疫細胞に認識され、体内の免疫を活性化し ABC 現象が誘導されるが、サイズの小さい高分子ミセルでは、脾臓 B 細胞に認識され難く、免疫細胞の活性化が起こり難いため、ABC 現象が誘導され難いことが示唆された。キャリアのサイズを小さくすることは、ABC 現象回避の有用な手段の 1 つとして考えられる。

7. おわりに

以上述べたように、ABC 現象は PEG 修飾リポソームのみならず、PEG 鎖を有した高分子ミセルを初回に投与した場合によっても誘導され、PEG 鎖特異的な IgM が産生されることが明らかとなった。さらに、ABC 現象の誘導は初回投与のキャリアのサイズに依存し、より小さいものほど ABC 現象は誘導され難いことを明らかにした。核酸医薬品や細胞障害活性を持たない薬物のキャリアとしてリポソーム、高分子ミセルなどのナノキャリアを用いる場合、単回投与によって根治にたどり着くことは考え難く、繰り返し投与が必要不可欠となる。Doxil[®]のような DDS 抗がん剤の繰り返し投与の場合には、内封されている薬物の効果によって ABC 現象は誘導されないが、そのほかの薬物や核

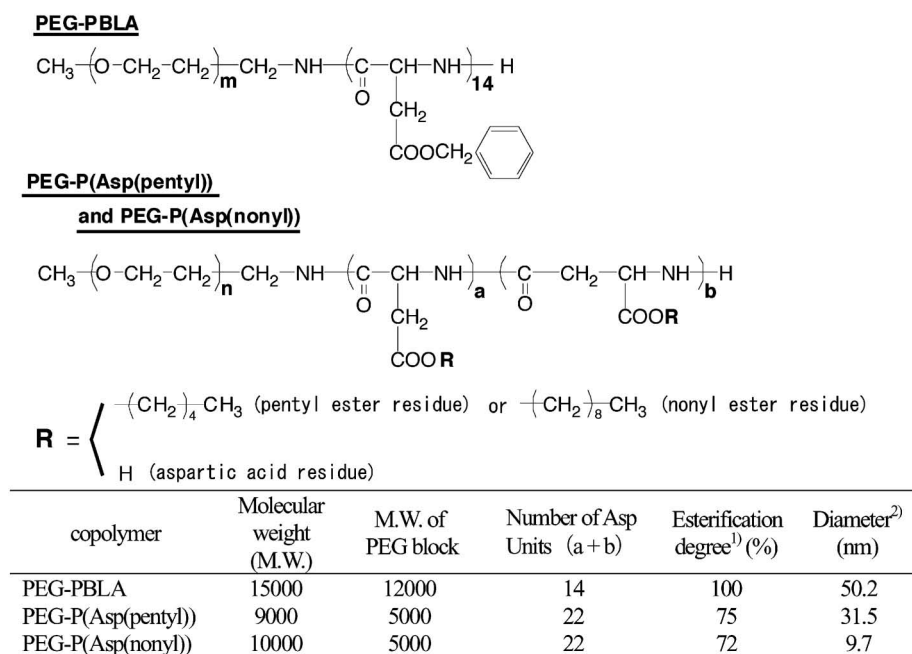


Fig. 7. Composition of Block Copolymers

1) Esterification degree = (number of ester residues) / (number of ester residues + number of aspartic acid residues) $\times 100$ (%). This degree was determined by ^1H -NMR measurement. 2) Weighed average diameter determined by dynamic light scattering.

酸医薬品の場合には、繰り返し投与によって誘導される ABC 現象を回避することは、解決しなければならない問題であると考えられる。今回紹介した ABC 現象の機構や、サイズや投与量の変化による ABC 現象回避の可能性はまだまだほんの一部であるに過ぎず、さらなる機構解明と回避方法の探索が望まれる。われわれは本機構の解明を通してさらなる回避方法を探ることにより、DDS 製剤開発の一助になることを期待している。

REFERENCES

- 1) Risau W., *Nature*, **386**, 671–674 (1997).
- 2) Muggia F. M., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 7–8 (1999).
- 3) Allen T. M., Hansen C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 133–141 (1991).
- 4) Lasic D. D., *Nature*, **380**, 561–562 (1996).
- 5) Sakakibara T., Chen F. A., Kida H., Kunieda K., Cuenca R. E., Martin F. J., Bankert R. B., *Cancer Res.*, **56**, 3743–3746 (1996).
- 6) Gaucher G., Dufresne M. H., Sant V. P., Kang N., Maysinger D., Leroux J.C., *J. Control. Release*, **109**, 169–188 (2005).
- 7) Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Ekimoto H., Shibasaki C., Kataoka K., *Cancer Res.*, **51**, 3229–3236 (1991).
- 8) Kataoka K., Itaka K., Nishiyama N., Yamasaki Y., Oishi M., Nagasaki Y., *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*, **49**, 17–18 (2005).
- 9) Laverman P., Brouwers A. H., Dams E. T., Oyen W. J., Storm G., Van Rooijen N., Corstens F. H., Boerman O. C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 996–1001 (2000).
- 10) Ishida T., Ichikawa T., Ichihara M., Sadzuka Y., Kiwada H., *J. Control. Release*, **95**, 403–412 (2004).
- 11) Ishida T., Ichihara M., Wang X., Kiwada H., *J. Control. Release*, **115**, 243–250 (2006).
- 12) Ishida T., Atobe K., Wang X., Kiwada H., *J. Control. Release*, **115**, 251–258 (2006).
- 13) Akita H., Harashima H., *Contrib. Nephrol.*, **159**, 13–29 (2008).
- 14) Asai T., Suzuki Y., Matsushita S., Yonezawa S., Yokota J., Katanasaka Y., Ishida T., Dewa T., Kiwada H., Nango M., Oku N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 243–248 (2008).
- 15) Ishida T., Wang X., Shimizu T., Nawata K., Kiwada H., *J. Control. Release*, **122**, 349–355 (2007).
- 16) Liu Y. J., Oldfield S., MacLennan I. C., *Eur. J. Immunol.*, **18**, 355–362 (1988).
- 17) Liu Y. J., Zhang J., Lane P. J., Chan E. Y., MacLennan I. C., *Eur. J. Immunol.*, **21**, 2951–2962 (1991).
- 18) Beringue V., Demoy M., Lasmezas C. I., Gouritin B., Weingarten C., Deslys J. P., Andreux J. P., Couvreur P., Dormont D., *J. Pathol.*, **190**, 495–502 (2000).
- 19) Senior J. H., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 123–193 (1987).
- 20) Patel H. M., Moghimi S. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 45–60 (1998).
- 21) Ishida T., Harashima H., Kiwada H., *Biosci. Rep.*, **22**, 197–224 (2002).