

ポリマーコーティングリポソームによるカルシトニンの経粘膜吸収

竹内洋文,* 杉原 光

**Absorption of Calcitonin in Oral and Pulmonary Administration
with Polymer-coated Liposomes**

Hirofumi TAKEUCHI* and Hikaru SUGIHARA

*Department of Drug Delivery Technology and Sciences, Laboratory of Pharmaceutical Engineering,
Gifu Pharmaceutical University, 1-25-4 Daigaku-Nishi, Gifu 501-1196, Japan*

(Received May 21, 2010)

We have developed polymer-coated liposomes for effective and non-invasive delivery of peptide drugs. Polymer-coated liposomes, which are liposomal particles coated with functional polymers, were designed in order to have suitable functions required for drug delivery. So far, we have reported prolonged retention in the gastro-intestinal tract owing to the mucoadhesive properties of the polymer-coated liposomes. This review shows outline of effectiveness of polymer-coated liposomes in absorption of calcitonin after oral administration. The main factors for absorption enhancing of calcitonin are mucoadhesion and penetration of polymer-coated liposomes into the mucus layer. Application of polymer-coated liposomes in pulmonal drug delivery and novel strategies for designing mucoadhesive particulate systems are also described.

Key words—Oral administration; pulmonary administration; calcitonin; polymer-coated liposome

1. はじめに

通常注射で投与される薬物を、経口投与に代表されるより低侵襲な、人に優しい形で投与することは製剤研究において最も重要な課題の1つである。今回のシンポジウムテーマとなった骨粗鬆症治療薬カルシトニンもその1つである。近年のバイオテクノロジーの進展に伴いペプチド、タンパクが医薬品として開発される割合も増えており、このような製剤研究への期待はますます大きくなっていると感じられる。

薬物単独の投与ではほとんど吸収が見込まれないようなペプチド性薬物の吸収を可能にする手段としては、微粒子キャリアーの利用が考えられる。実際、微粒子薬物キャリアーであるリポソームを用いてインスリンを経口投与しようという試みは、古くから行われており、後に述べるようにリポソームを用いたインスリンの経口投与実験報告は相当数に上

る。また、ポリマー微粒子を用いた同様な研究も散見される。

われわれも、リポソームを中心に微粒子製剤による薬物送達に関する研究を展開してきた。特にペプチド性薬物の経粘膜吸収の促進に焦点を当て、微粒子設計、動物実験によりその可能性を明らかにし、最適化を図ってきた。われわれの研究では、粒子の大きさとともに、表面特性改変を中心にした粒子設計を行い、微粒子キャリアーの特性を大きく改変させ、目的を達成することに注力している。粒子径としては1 μm以下(サブミクロンサイズ)のナノ粒子が適切であることがわかっており、ナノ粒子による薬物吸収改善と言える。さらに、微粒子表面の修飾により投与後の粒子の挙動を制御し、薬物吸収特性を向上させ得ることも明らかとなっている。本稿の中心主題であるエルカトニンに関しても、粒子径、表面特性による吸収性の違いが確認されている。また、経口投与に限らずほかの低侵襲薬物投与として肺からの薬物吸収へと研究を展開している。

本稿では、最も代表的な低侵襲投与である経口投与に関してナノ粒子を用いる過去の研究例を概観した後に、経口投与時の粘膜付着、浸入性とペプチド

岐阜薬科大学薬物送達学大講座製剤学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西 1-25-4)

*e-mail: takeuchi@gifu-pu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウム S15 で発表したものを中心に記述したものである。

性薬物吸収への影響について述べる。さらに、現在検討しているポリマーコーティングリポソームの経肺投与への適用、また、粘膜付着ポリマー製剤設計の新展開に関しても触れたい。

2. ペプチド性薬物の経口投与と微粒子製剤

ペプチド及びタンパクは、一般には安定性に乏しく生体膜透過性も低い。それを薬剤として体内に投与する場合には、これらのバリアーを克服するための製剤設計が必要である。リポソーム、高分子ナノスフェアなどの微粒子キャリアを用いる製剤化は、ペプチド及びタンパク性薬物の生体内での安定化をもたらすと同時に、膜透過に対しても促進効果が期待されている。以下にまず、これら微粒子を用いたペプチド性薬物の吸収改善に関するこれまでの研究を概観する。

2-1. ペプチド性薬物の吸収 ペプチド性薬物の経口投与を目的とした微粒子の利用として最も古く有名なものはインスリンのリポソーム製剤である。1960年代に Bangham によりリポソームの存在が明確にされると間もなく、その研究は開始され、血糖値低下を指標としてリポソームによるインスリン吸収の有無をラット、マウスで検討した結果が数多く報告された。Patel and Ryman,¹⁾あるいは Daper-golas and Gregoriadis²⁾のグループ等であり、各グループからは、リポソームは有効、無効の両者の結果が示された。両者のデータがかなり蓄積された1980年代には、統一的な見解を得るため脂質組成、調製法、バッファーなど実験条件を詳細にコントロールした系統的な実験も行われた。³⁾しかし、これらの研究を通して得られた結論は、リポソームによるインスリン経口投与の可能性は否定できないが個体差が大きく実用的には不可能というものであった。

一方、1980年代には、合成ポリマーからなるナノ粒子（ナノスフェア）の研究が進展し、経口製剤への応用研究もみられるようになった。特に、生分解性高分子の1つであるポリアルキルシアノアクリレート（PLGA）の研究が多く報告された。例えば、Damge ら⁴⁾は、ポリイソブチルシアノアクリレート（PIB-PLGA）のナノカプセル（平均粒子径 220 nm）にインスリンを封入し、高血糖モデルラットに経口投与して、投与量によっては 20 日近く血糖値を低下させ得ることが報告され、注目を集めた。

2-2. 薬物吸収のメカニズム このような薬理効果による評価に基づいて、分子量が数千のペプチドでも、粒子に封入して投与すると吸収が起こることが期待された。そのメカニズムの1つとして、粒子そのものが腸管膜を透過するのではないかと考えられ、消化管内での微粒子の挙動を明らかにしようという試みもいくつか行われた。

前述の Damge のグループは、ナノカプセルにリポドールを封入して腸管粘膜の透過性を検討している。⁵⁾ 100–200 nm のナノカプセルをイヌに投与したあと、血中のヨードの濃度を測定したところ、対照としたエマルジョンより高く持続的なプロファイルが観察されたことから粒子は透過していると考えた。さらに腸管組織の標本の X 線マイクロプローブによる観察において、粘膜近傍、細胞間隙にも粒子が観察されたことから、paracellular route の粒子の透過を推定している。

Jani ら⁶⁻⁸⁾はポリスチレンラテックス粒子を用いてその透過の可能性を示している。50 nm から 3000 nm の蛍光標識したポリスチレンラテックスをラットに経口投与し、蛍光顕微鏡による観察から、粒子径の小さな粒子ほど取り込まれ易いことを報告した。一方、Desai ら⁹⁾は粒子径が 100 nm から 10 μm のポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGA）の粒子を調製し、ラット腸管ループに灌流する *in situ* 法により取り込みを調べた。この場合も、検討した中では最も小さい 100 nm の粒子が圧倒的に取り込みが多く、また、腸管部位組織に関しては、Payer's patch からの取り込みが相対的に多かったことを報告している。しかし、100 nm の粒子に関しては、その部位差はあまり大きくなく、取り込みは Payer's patch に限ったものではないことも推定された。

リポソームに関しても同様にリポソーム粒子がインタクトな形で腸管を透過するかは議論となった。



竹内洋文

1979年京都大学薬学部卒業。1984年同大学大学院薬学研究科修了。薬学博士。1984～1988年岐阜薬科大学助手。1988～1991年同大学講師。この間1989年より1年カナダアルバータ大学客員研究員。助教を経て2005年より現職。専門はDDS、粒子設計、粉体工学。日本薬学会学術振興賞（2003年）、日本DDS学会永井賞（2008年）等を受賞。

Dapergolas and Gregoriadis²⁾ はインスリン封入りリポソームをラットに投与して血中インスリン濃度の増大を報告したことから、リポソームの吸収が期待された。しかし、Patel and Ryman¹⁰⁾ によって実験手技の問題点が指摘され、インスリンリポソームの腸管透過は否定された。また、Deshmukh ら¹¹⁾ も否定的な実験結果を報告した。

反転腸管を使った *in vitro* の実験では、Rowland and Woodley¹²⁻¹⁴⁾ が serosal 側へのリポソームの透過を支持するいくつかの実験結果を報告した。しかし、この *in vitro* の実験に関しても類似の実験を行いリポソームの透過を認めなかったという報告もある^{15,16)}。一方、Schwinke ら¹⁷⁾ は、*in situ* 法により DSPC/Chol リポソームに封入した PEG4000 及びリポソーム構成成分である標識した DSPC の灌流液中からの減少を報告している。リポソームが存在しない場合は PEG4000 の減少は観察されず、リポソームの取り込みを示唆している。また、Patel ら¹⁸⁾ はウサギの回腸での灌流実験により、DMPC:Chol:DCP リポソームに封入したイヌリンが吸収されていることを認めた。しかし、この場合、リポソームのマーカーである [³H]cholesterol の吸収はほとんど確認できずインタクトなリポソームの透過は否定された。微粒子の消化管粘膜での透過性を論じる文献はほかにもいくつかある。しかし、いずれも微粒子の透過を確認するには至っていない。

3. 経口投与時の粘膜付着、浸入性とペプチド性薬物吸収への影響

3-1. ポリマーコーティングによる粘膜付着リポソームの設計 薬物吸収性を増大させる手法として、薬物放出速度を制御した製剤の消化管内の滞留時間を増大させることが考えられている。その1つは胃内での滞留時間を増大させる浮遊性製剤である。これと並んで、1980年代後半から粘膜付着性製剤が注目され始めた。実用化はされていないが、粘膜付着性の錠剤、顆粒などの設計、評価など多くの研究が報告された。¹⁹⁾ われわれは、この概念を微粒子に適用することを企図し粘膜付着リポソームの設計に着手した。

リポソームは表面電荷を自由に制御できること、水溶性高分子に導入した疎水基がリン脂質二重膜に貫入することを利用して、いくつかのポリマーを用いてリポソーム表面を修飾する手法を確立した。²⁰⁾

この手法を適用して、リポソーム表面を粘膜付着性を有するキトサン、ポリアクリル酸などで修飾した。キトサン (poly(*N*-deacetylglucosamine)) は、カニなどの甲殻類の甲羅の構成成分であるキチンをアルカリ処理してアミノアセチル基を脱アセチル化したもので、天然由来のものとしては数少ないカチオン性ポリマーである (Fig. 1)。このキトサンを酢酸緩衝液に溶解し、あらかじめ調製したアニオン性リポソームと混合することによりリポソーム表面にイオンコンプレックスによるコーティング層を形成できることを明らかにした。²¹⁾

得られたキトサンコーティングリポソームに消化管粘膜付着性が付与されているか否かを摘出したラット腸管を用い、そこに封入したリポソーム懸濁液の粒子数を封入直後、一定時間インキュベート後にコールターカウンターで計数して比較する *in vitro* 評価法を確立し評価した。^{21,22)} 検討した中では、キトサンでコーティングしたリポソーム粒子が最もよく粘膜に付着することが明らかとなった。コーティングしない場合はほとんど付着が観察されなかったこと、キトサンのコーティング量が増大するにしたがって、付着の程度も増大したことからリポソーム表面のキトサン層が有効に働いていると考えられた。粘膜付着性が報告されているカーボポールについても、カチオン性リポソームを用いてコーティングができること、そして粒子が粘膜付着特性を有することも同様な手法で明らかにした。²³⁾

ポリマーの粘膜付着特性に関しては、凍結乾燥ム

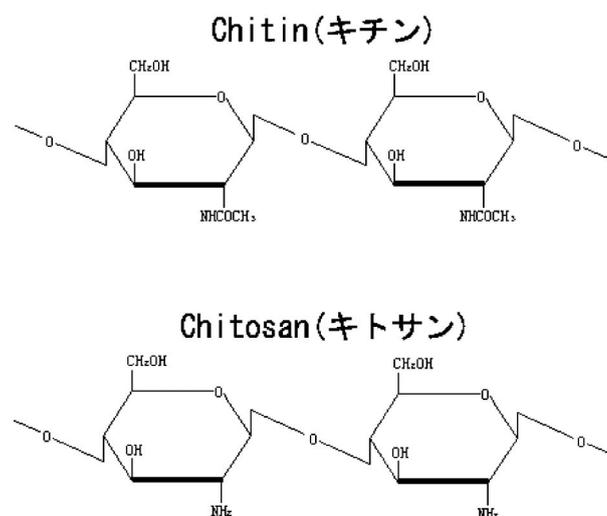


Fig. 1. Molecular Structure of Chitin and Chitosan

チン粒子を利用してキャラクタリゼーションする方法、さらに、ピアコアを活用して評価することも試み可能性を明らかにしている。^{24,25)}

3-2. 粘膜付着リポソームによるペプチド性薬物の吸収 粘膜付着特性が確認された CS-Lip を用い、インスリンを封入してラットに経口投与して、薬理効果（血糖値の変化）が持続的に低下することが確認されていたため、^{21,22)} カルシトニンを封入して、CS-Lip, CP-Lip の効果を調べた。ラットに経口投与後の薬理効果（血中カルシウム濃度の低下）を指標にして調べた結果、いずれの場合も効果の増大、延長が認められた。²³⁾ 初期のカルシウム濃度（100%）をベースとして、これからの低下分の面積（AAC）をコーティングしないリポソーム、CS-Lip, CP-Lip について求め、比較した結果が Fig. 2 である。薬理効果の経時変化は、CS-Lip は初期の効果が大きい、CP-Lip は持続性が大きいとそれぞれの特徴があるが、AAC として比較するとほぼ同程度となった。キトサンには粘膜での薬物の透過性促進効果も報告されており、^{26,27)} CS-Lip の初期の大きな薬理効果にはその効果も考えられる。また、いずれの場合も、ポリマー溶液に薬物を溶解して投与してもこのような効果は認められず、微粒子製剤化する必要性が確認された。

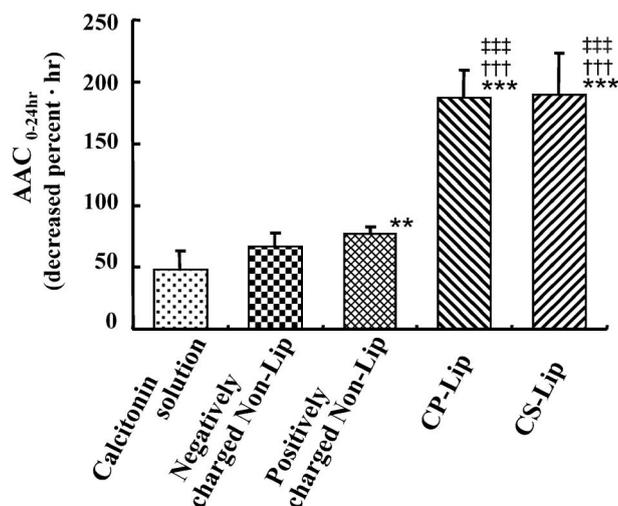


Fig. 2. Area above the Plasma Calcium Level Curve (AAC) after Intragastric Administration of Calcitonin Solution or Calcitonin Entrapped in Non-coated or Polymer Coated Liposomes

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: significantly of different from calcitonin solution. ††† $p < 0.001$: significantly of different from negatively charged MLVs. †††† $p < 0.001$: significantly of different from positively charged MLVs.

3-3. ナノ粒子化による吸収促進効果の増大と微粒子の消化管内挙動 カルシトニンを封入したりポソームをサブミクロンサイズまで小さくして (ssLip)、同様な評価を行ったところその効果は向上した。さらに、キトサンでコーティング (CS-Lip) したものをサブミクロン化したサンプル (ssCS-Lip) ではその薬理効果が極めて長時間に渡って持続することが明らかとなった (Fig. 3)。^{28,29)} 別途検討していたサブミクロンサイズのポリ乳酸グリコール酸 (PLGA) の粒子を用いた場合も同様なキトサンコーティングをすることにより数十時間の長期な薬理効果が確認された。³⁰⁾

これらの結果より、粒子のサイズは消化管内挙動に影響を与えていること、さらにサブミクロンサイズのリポソーム表面のキトサンは、単に粘膜表面での相互作用により滞留時間を増大させているだけではなさそうなことが示唆された。

上述の実験結果に基づいて、消化管内での微粒子の挙動を詳細に評価した。そのために、脂溶性蛍光マーカー DiI を封入したりポソームをラットに投与後、腸管を取り出し、部位毎に切片を作製して共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察した。^{28,29)} その一例として Fig. 4 に MLV リポソーム (Lip)、サブミクロン化リポソーム (ssLip)、それらをキトサンコーティングしたもの (CS-Lip 及び ssCS-Lip) の 4 種について、投与 2 時間後の同一な条件で、評価

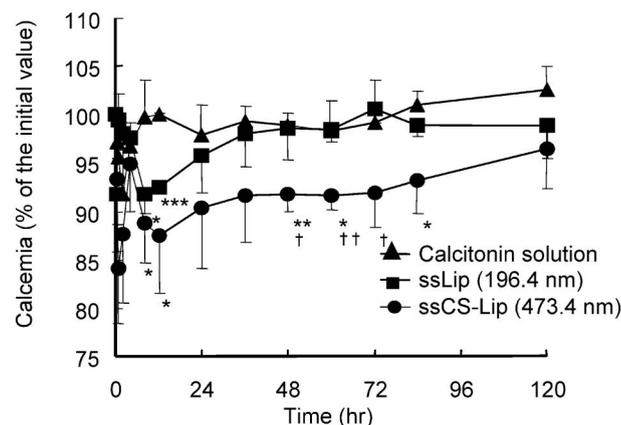


Fig. 3. Profiles of Plasma Calcium Levels after Intragastric Administration of Sub-micron Sized Liposomes, ssLip and ssCS-Lip, Containing Calcitonin

The formulation of liposomes is DSPC: Chol. = 8 : 2 : 1. The concentration of chitosan for coating is 0.3%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: significantly different from the level for calcitonin solution; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$: significantly different from the level for ssLip

した結果を示す。これらの、CLSM 写真を比較すると、キトサンコーティングすることにより粒子の滞留性が向上していることが分かる。同様な実験を経時的にまた消化管各部位に行い比較した結果、ssCS-Lip は、Lip はもとより、CS-Lip, ssLip と比較して、より消化管上部に滞留する傾向が強いことが明らかとなった。また、Fig. 4 から観察される特筆すべき点は、ssLip, ssCS-Lip に関しては粘膜内の basolateral side に粒子の存在が確認されたことである。これらの観察は、粘膜内に粒子が浸入していることを強く示唆している。

粒子径の効果を確認することを目的として、リポソームのマーカールとした色素 DiI を界面活性剤

Tween80 を用いて可溶化したミセルについて同様な検討を行った。動的光散乱法により測定したミセルのサイズは 10 nm 弱であったが、CLSM 写真による判断では消化管粘膜層への著しい浸入は観察されず、粒子径を微細化するだけでは粘膜浸入性を増大させることはできないことが確認された。また、腸管各部位での CLSM 写真の比較、滞留量の実測によって、ミセルはキトサンコーティングリポソームに比べて速やかに消化管下部へと移行することが明らかとなった。

一方、親水性高分子 FITC-デキストランをマーカールとして用いた場合もキトサンコーティングリポソームに封入することにより FITC-デキストランの

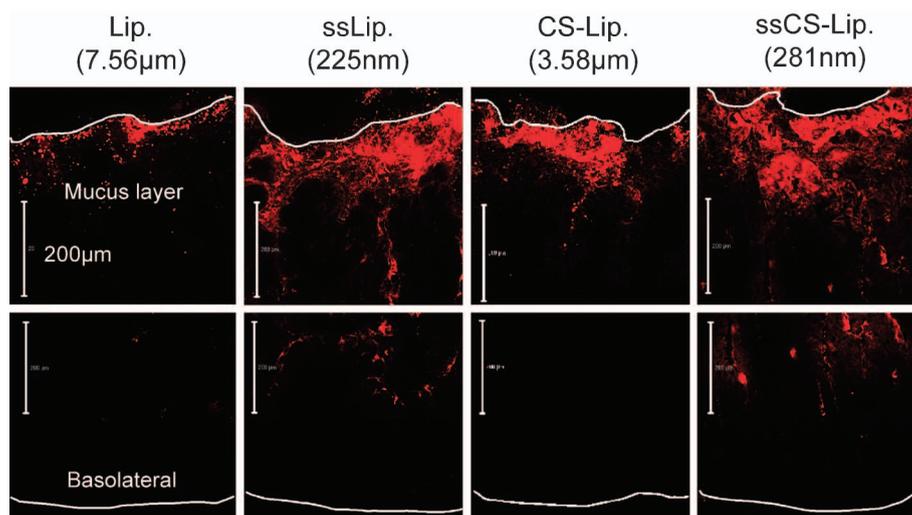


Fig. 4. Confocal Laser Scanning Microscopy Photographs of the Lower part of the Jejunum 2 h after Intragastric Administration of Various Types of Liposomes

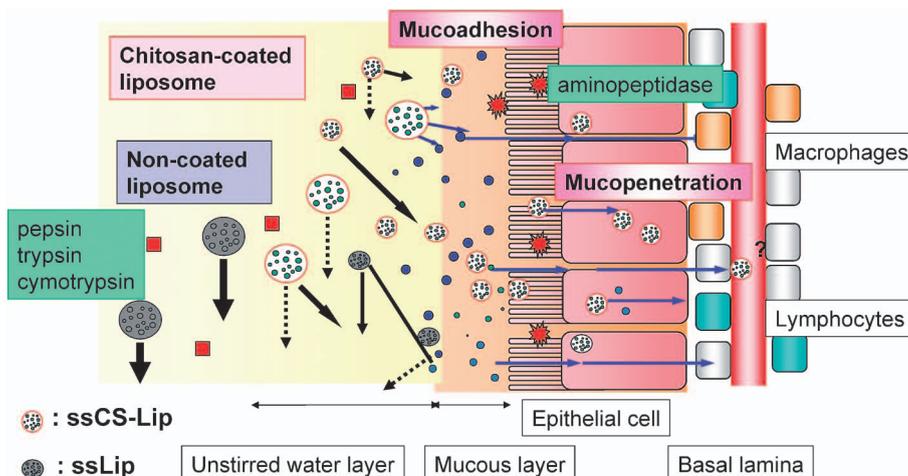


Fig. 5. Schematic Presentation of Behavior of Chitosan-coated Liposomes and Drug Absorption with Chitosan-coated Liposome

残存、粘膜層への侵入が観察された。また、FITC-デキストラン溶液を投与した場合は CLSM 写真上ではほとんどその消化管内の残存は確認できなかった。この結果は先に示した脂溶性色素 DiI を封入したリポソーム粒子での実験においても、脂溶性色素 DiI は単独で拡散するのではなく、リポソーム粒子として粘膜層深部へ到達していることを強く支持するものである。

消化管内で CS-Lip の形態が保たれているかどうかは、興味を持たれる重要な点である。この点に関しては、キトサンを別途蛍光標識し、同様な手法で CLSM を用いて観察したところ、投与後の蛍光発色部位がキトサンとリポソームで全く一致し、CS-Lip は形態を保ったまま消化管内を移動していることが強く支持された。³¹⁾

3-4. 消化管内の微粒子の挙動と薬物吸収

Figure 5 は腸管内の粘膜近傍を模式的に表したものである。前述の ssCS-Lip の腸管粘膜近傍での挙動の観察結果を踏まえると、微粒子製剤化によるペプチド性薬物の吸収改善機構は以下のように推定される。

腸管内において粘液層は異物粒子の大きなバリアーとなっていると考えられる。CS-Lip, ssCS-Lip では表面のキトサンが粘液ムチン層と相互作用を有するため、ムチンのマトリクス内に取り込まれ、滞留時間が延長する。内封されたカルシトニンは粒子の滞留中に放出され、粘膜近傍での薬物濃度が高まり、受動的に吸収されると推定される。CS-Lip, ssCS-Lip 両者を比較すると、ナノサイズの ssCS-Lip の効果が大きいのは、粘液層の比較的速いターンオーバーに関係があると考えられる。ssCS-Lip は、ムチンマトリクスに取り込まれた後、一部が enterocytes に取り込まれる。この効果により、より長時間にわたって吸収が持続すると考えている。

図にも示したようにリポソームのような微粒子キャリアーは、封入したペプチド性薬物を消化管内で分解酵素等による分解からも防御する機能が期待される。実際、カルシトニンをリポソーム表面のみに吸着させた場合と比較すると、封入した場合の方が薬理効果が大きいことも確認している。³²⁾ さらに、キトサンに疎水基をつけて、リポソーム脂質二重膜へのアンカーリング法によりコーティングを施し、同様な評価を行ったところ、初期において、通常の

キトサン以上の薬理効果が確認された。³³⁾ 既に述べたように、キトサンにはタイトジャンクション開口作用も知られており、上皮細胞近傍ではフリーの薬物分子がより効率よく吸収されることが期待される。この場合も、リポソーム粒子に薬物が封入されその近傍にキトサンが存在するキトサンコーティングリポソームは、この効果を最大限に発揮する形態と考えられる。疎水化キトサンを含め、粒子の粘膜付着挙動、粒子による分解抑制、タイトジャンクション開口作用のそれぞれのファクターの寄与度を評価するには、今後更なる検討が必要である。これらが解明されることによって、最適な粒子設計法を明らかにすることができると考える。

粘膜付着に関しては、キトサンに限らずいくつかの水溶性ポリマーでもその特性を付与できることが明らかとなっている。われわれの研究では、ペクチンにその作用があることが判明しており、キトサンコーティングリポソーム同様に、カルシトニンの薬理効果の持続を報告している。³⁴⁾ さらに、キトサン-アプロチニン、ポリアクリル酸チオール化なども特徴のあるリポソームの表面修飾を可能とし、類似の薬物送達機能があることも判明しつつある。³⁵⁻³⁷⁾

4. 経肺投与によるカルシトニンの吸収

現在では発売中止にはなったが、インスリンの粉末吸入剤が製品として世に出た。肺は、消化管と同様吸収面積が大きく、上皮細胞の厚みも薄いことからペプチド性薬物の投与、吸収部位として大きな期待が寄せられている。

われわれの研究室でも注射以外のペプチドの投与経路として肺粘膜は重要なものと考え、検討を進めている。既に、PLGA ナノ粒子を用いて表面をキトサンで修飾することによりカルシトニンの薬理効果が持続することを明らかにしている。³⁸⁾ また、リポソームを用いても同様な効果があることを明らかにしている。³⁹⁾ 消化管と比較すると、肺は閉鎖系であり、肺内に投与された粒子の運命はかならずしも粘膜付着特性が有利であるかどうかは検討を要するところである。われわれは、いくつかのポリマーコーティングリポソームの肺内挙動を評価し、キトサンコーティングリポソーム、部分疎水化 PVA がそれぞれ特色のある挙動を示し、カルシトニンの薬理効果もいずれの場合も持続することを明らかにしている。⁴⁰⁾

5. おわりに

われわれの実験結果に基づくと、微粒子はそのサイズ制御とともに、表面特性を制御することにより、粘膜内部に浸入させることができる。ペプチドの経粘膜吸収における、微粒子キャリアーの役割に関しては、本文中に述べたように様々な要因が考えられるが、その1つ1つを丁寧に解析していくことが、最適な粒子設計、製剤設計への近道と考える。

REFERENCES

- Patel H. M., Ryman B. E., *FEBS Lett.*, **62**, 60–63 (1976).
- Dapergolas G., Gregoriadis G., *Lancet*, **2**, 824–827 (1976).
- Shenfield M., Hill J., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **9**, 355–361 (1982).
- Damge C., Michel C., Aprahamian M., Couvreur P., *Diabetes*, **37**, 246–251 (1988).
- Aprahamian M., Michel C., Humbert W., Devissaguet J.-P., Damge C., *Biol. Cell*, **61**, 69–76 (1987).
- Jani P. U., Halbert G. W., Langridge J., Florence A. T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 821–826 (1990).
- Hillery A. M., Jani P. U., Florence A. T., *J. Drug Target.*, **2**, 151–156 (1994).
- Florence A. T., *Pharm. Res.*, **14**, 259–266 (1997).
- Desai M. P., Labhassetwar V., Amidon G. L., Levy R. J., *Pharm. Res.*, **13**, 1838–1845 (1996).
- Patel H. M., Ryman B. E., *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1739–1741 (1977).
- Deshmukh D. S., Bear W. D., Brockerhoff H., *Life Science*, **28**, 239–242 (1981).
- Rowland R. N., Woodley J. F., *FEBS Lett.*, **123**, 41–44 (1981).
- Rowland R. N., Woodley J. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **673**, 217–223 (1981).
- Rowland R. N., Woodley J. F., *Biosci. Rep.*, **1**, 345–352 (1981).
- Whitmore D. A., Wheeler K. P., *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 929–931 (1979).
- Seiden A., Lichtenberg D., *J. Pharm. Pharmacol.*, **31**, 414–415 (1979).
- Schwinke D. L., Ganesan M. G., Weiner N. D., *Pharm. Res.*, **1**, 256–259 (1984).
- Patel H. M., Tuzel N. S., Stevenson R. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **839**, 40–49 (1985).
- Gupta P. K., Leung S.-H. S., Robinson J. R., “Bioadhesives/Mucoadhesives in Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract, Bioadhesive Drug Delivery Systems,” eds. by Lenaerts V., Gurny R., CRC Press, Boca Raton, 1990, pp. 65–92.
- Takeuchi H., Kawashima Y., *Hyoumen*, **32**, 423–429 (1994).
- Takeuchi H., Yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1954–1956 (1994).
- Takeuchi H., Yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y., *Pharm. Res.*, **13**, 896–901 (1996).
- Takeuchi H., Matsui Y., Yamamoto H., Kawashima Y., *J. Control. Release*, **86**, 235–242 (2003).
- Takeuchi H., Thongborisute J., Matsui Y., Sugihara H., Yamamoto H., Kawashima Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 1583–1594 (2005).
- Thongborisute J., Takeuchi H., *Int. J. Pharm.*, **354**, 204–209 (2008).
- Schipper N. G. M., Varum K. M., Artursson P., *Pharm. Res.*, **13**, 1686–1692 (1996).
- Luessen H. L., Leeuw B. J., Langemeyer M. W. E., Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., *Pharm. Res.*, **13**, 1668–1672 (1996).
- Takeuchi H., Yamamoto H., Kawashima Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 39–54 (2001).
- Takeuchi H., Matsui Y., Sugihara H., Yamamoto H., Kawashima Y., *Int. J. Pharm.*, **303**, 160–170 (2005).
- Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Kuno Y., *Pharm. Develop. Technol.*, **5**, 77–85 (2000).
- Thongborisute J., Takeuchi H., Yamamoto H., Kawashima Y., *J. Liposome Res.*, **16**, 127–141 (2006).
- Thongborisute J., Tsuruta A., Kawabata Y., Takeuchi H., *J. Drug Target.*, **14**, 147–154 (2006).
- Thongborisute J., Takeuchi H., Yamamoto H., Kawashima Y., *Die Pharmazie*, **61**, 106–111 (2006).
- Thirawong N., Thongborisute J., Takeuchi H., Sriamornsak P., *J. Control. Release*, **125**, 236–245 (2008).

- 35) Werle M., Takeuchi H., *Int. J. Pharm.*, **370**, 26–32 (2009).
- 36) Werle M., Hironaka K., Takeuchi H., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **35**, 209–215 (2009).
- 37) Werle M., Takeuchi H., Bernkop-Schnürch A., *J. Pharm. Sci.*, **98**, 1643–1656 (2009).
- 38) Yamamoto H., Kuno Y., Sugimoto S., Takeuchi H., Kawashima Y., *J. Control. Release*, **102**, 373–381 (2005).
- 39) Takeuchi H., Yokoyama R., Tozuka Y., Werle M., Proceedings of the 129th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Kyoto, March 2009, No. 1, p. 148.
- 40) Murata M., Nakano K., Tozuka Y., Toyobuku H., Takeuchi H., Proceedings of the 26th Symposium on Particulate Preparation and Designs, Hiroshima, November 2009, pp. 166–167.