

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 10 月 11 日(11.10.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/137967 A1

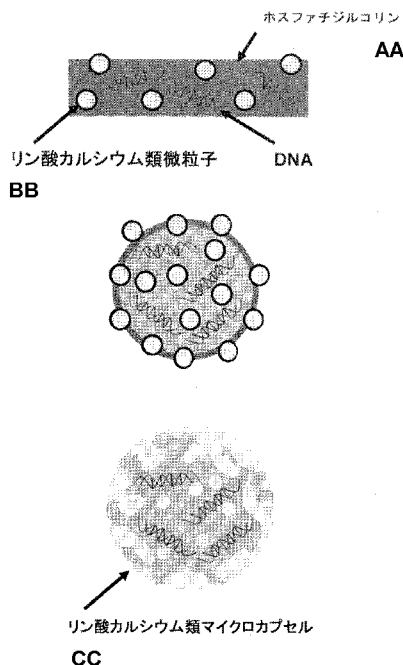
- (51) 国際特許分類:
A61K 47/44 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
A61K 47/24 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/059689
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 9 日(09.04.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-086639 2011 年 4 月 8 日(08.04.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP];
〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番
地 1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 八尾 健
(YAO, Takeshi) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左
京区吉田本町 国立大学法人京都大学大学院エ
ネルギー科学研究科内 Kyoto (JP). 薮塚 武史
(YABUTSUKA, Takeshi) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京
都市左京区吉田本町 国立大学法人京都大学大
学院エネルギー科学研究科内 Kyoto (JP). 島田
陽平(SHIMADA, Yohei) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京
都市左京区吉田本町 国立大学法人京都大学大
学院エネルギー科学研究科内 Kyoto (JP). 山根
史帆里(YAMANE, Shihori) [JP/JP]; 〒6068501 京都
府京都市左京区吉田本町 国立大学法人京都大
学大学院エネルギー科学研究科内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(Sae-
gusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区
道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

[続葉有]

(54) Title: CALCIUM PHOSPHATE MICROCAPSULE

(54) 発明の名称: リン酸カルシウム類マイクロカプセル

[図1]



AA Phosphatidylcholine
BB Calcium phosphate microparticle
CC Calcium phosphate microcapsule

(57) Abstract: Provided is a microcapsule having a core-shell struc-
ture, the core being an oily substance and the shell being configured
from calcium phosphate.

(57) 要約: コア-シェル構造を有するマイクロカプセルで
あって、コアが油性物質であり、シェルがリン酸カルシ
ウム類から構成される、マイクロカプセル。

WO 2012/137967 A1



BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：リン酸カルシウム類マイクロカプセル

技術分野

[0001] 本発明は、リン酸カルシウム類マイクロカプセルに関し、詳しくは内部に油性物質を封入したリン酸カルシウム類マイクロカプセルに関する。

背景技術

[0002] 細胞への遺伝子導入は遺伝子発現の解析、遺伝子治療等様々な用途があり重要であることは言うまでもないが、安全で効率的なものが依然確立されていないのが現状である。これまでの細胞への遺伝子導入は、ウイルス法、ジーンガン、エレクトロポレーション、リポソーム法、リン酸カルシウム法など種々の方法がある。高効率を誇るウイルス法は、感染症や癌化の危険性が避けられず、依然大きな問題を抱えている状態である。一方、次に効率が良くとされるジーンガンによる遺伝子導入方法は、細胞生存効率が悪く、さらに高価な装置が必要であるなどコスト面において問題があることが大きな欠点であり、手軽に遺伝子導入実験を行えるほどの汎用性はないのが現状である。エレクトロポレーション法は、細胞膜に高電圧の電場をかけることにより、一時的に細胞膜を不安定な状態にし、細胞膜上の発生した穴から遺伝子を導入するものであり、浮遊、付着細胞ともに利用可能であり、再現性は非常に高いシステムであるが、細胞へのダメージが大きく、また、大がかりな装置を使用するため汎用性の問題がある。リポソーム法は、リポソームにリポフェクチンなどのカチオン性合成脂質を混合し、得られたリポソーム表面に負電荷を有する遺伝子を結合させ、その後、細胞と相互作用させることで細胞への遺伝子導入を図るものである。この方法は比較的簡便に遺伝子導入を行うことが可能であるが、エンドサイトーシスによって取り込まれる際に起こる分解が激しく、遺伝子導入効率が低くなってしまう。リン酸カルシウム法は、リン酸とカルシウムの錯形成により形成される粒子に遺伝子を結合させ、エンドサイトーシスにより細胞への効果的な送達を行うものである。

通常エンドサイトーシスでは、遺伝子が破壊されがちであるが、リン酸カルシウム法では、キャリアーであるリン酸カルシウム自身がエンドソーム内での酸性化で優先的に分解されることにより、遺伝子の分解が起こりにくくなりリン酸カルシウムから離れた遺伝子が細胞内に移行しやすい特徴を有するが、これまで十分実用性のあるものが開発せられていなかった。

[0003] リン酸カルシウム類又はヒドロキシアパタイト類でポリマー等を被覆した粒子は知られている(特許文献1, 2)。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1: WO 2007-020928

特許文献2: 特許第4506067

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、やわらかい物質を封入ないし内包したリン酸カルシウム類マイクロカプセルを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、以下のマイクロカプセルを提供するものである。

項1. コア-シェル構造を有するマイクロカプセルであって、コアが油性物質を含み、シェルがリン酸カルシウム類から構成される、マイクロカプセル。

項2. コアに核酸物質、タンパク質又は薬物をさらに含む、項1に記載のマイクロカプセル。

項3. 核酸物質が、mRNA、DNA、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA、リポザイム、遺伝子、プラスミド、デコイオリゴヌクレオチド、DNAザイムからなる群から選ばれる、項2に記載のマイクロカプセル。

項4. 油性物質が油又はロウ様の物質である、項2に記載のマイクロカプセル。

セル。

項 5. 前記油性物質が植物油もしくはリン脂質である項 1～4 のいずれかに記載のマイクロカプセル。

項 6. コアーシェル構造を有し、コアが核酸物質、タンパク質及び薬物からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の物質並びに油性物質を含み、シェルがリン酸カルシウム類から構成されるマイクロカプセル、細胞への物質の導入剤。

項 7. 油性物質と種晶を混合し、この混合物をリン酸カルシウム類形成溶液に分散してリン酸カルシウム類から構成されるシェルを成長させることを特徴とする、項 1～5 のいずれかに記載のマイクロカプセルの製造方法。

項 8. 種晶がリン酸カルシウム類微粒子である、項 7 に記載のマイクロカプセルの製造方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、植物油、リン脂質などの液状又はロウ様のようなやわらかい物質をリン酸カルシウム類マイクロカプセルに封入することができる。金属粒子或いはポリマー粒子などの固体をリン酸カルシウム類で被覆することは容易であるが、リン脂質或いは植物油などの油状(液状)もしくはやわらかい性状の油性物質を被覆することは、油性物質の形状が定まっていなかったために困難であった。

[0008] 本発明では、微小な種晶(結晶の種)を油性物質と混合し、得られた混合物をリン酸とカルシウムを含む溶液中で分散させてリン酸カルシウム類を析出させることで、リン酸カルシウム類を含む殻(シェル)で油性物質(コア)を被覆することができる。リン酸カルシウム類微粒子を、種晶として用いることができる。

[0009] 本発明のマイクロカプセルは、細胞の中にコアの物質を導入するのに好適である。例えば DNA は、本発明のマイクロカプセルで細胞内に導入されると、細胞への毒性を発現することなく、非常に高い DNA の発現効率を示す。siRNA、shRNA、miRNA などの分解されやすいオリゴヌクレ

オチドを封入した場合には、細胞内に導入しやすいだけでなく、細胞に到達する前の血液中などでの分解を抑制することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] DNAを含むホスファチジルコリン小粒子をリン酸カルシウム類で封入した本発明のマイクロカプセル（DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル）を作製するときの模式図である。上段は、リン酸カルシウム類微粒子とDNAが油性物質（例えばホスファチジルコリン）と混合された状態を示す。中段は、この混合物を超音波などで処理して粒子としたときの図である。下段は、擬似体液中でリン酸カルシウム類を成長させて作製した本発明のDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルの模式図である。

[図2] (a) DNAを封入した本発明のマイクロカプセル（DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル）を示す。(b) (a)の1つのマイクロカプセルの拡大図である。(c) (b)のマイクロカプセルのEDX分析の結果を示すチャートである。

[図3] 本発明のマイクロカプセル（DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル）によりEGFP遺伝子を含むプラスミドを導入したHEK293細胞の導入24時間後の蛍光顕微鏡写真である。

[図4] 本発明のマイクロカプセル（DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル）によりEGFP遺伝子を含むプラスミドを導入したHEK293細胞の導入72時間後の蛍光顕微鏡写真である。

[図5] UV吸収剤（メトキシケイヒ酸エチルヘキシル）を封入したリン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM画像（15000倍）とEDXのデータを示す。

[図6] 大豆油を封入したリン酸カルシウム類コートサンプルのSEM画像（8000倍）とEDXのデータを示す。

[図7] ヒマシ油を封入したリン酸カルシウム類コートサンプルのSEM画像（20000倍）とEDXのデータを示す。

[図8] リン酸カルシウム類マイクロカプセルの(a)SEM写真と(b)EDX分析結果

[図9]大豆油をヒドロキシアパタイト類でコートしたヒドロキシアパタイト類マイクロカプセルの(a)SEM写真と(b)EDX分析結果

[図10](a)2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真。(b)(a)のマイクロカプセルの拡大図。(c)(b)のマイクロカプセルの拡大図。(d)(c)のマイクロカプセルのEDX分析の結果を示すチャート。

[図11]2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルによりpEGFP及びpmCherryを導入したHEK293細胞の導入24時間後の(a)光学顕微鏡写真。(b)(a)と同じ箇所の蛍光顕微鏡写真。

[図12]リン酸カルシウム類マイクロカプセルの(a)SEM写真と(b)EDX分析結果

[図13]徐放試験結果

[図14](a)DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真。(b)(a)のマイクロカプセルの拡大図。(c)(b)のマイクロカプセルの拡大図。(d)(c)のマイクロカプセルのEDX分析の結果を示すチャート。

[図15]DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルによりEGFP遺伝子を含むプラスミドを導入したHEK293細胞の導入24時間後の(a)光学顕微鏡写真。(b)(a)と同じ箇所の蛍光顕微鏡写真。

[図16](a) リン酸カルシウム類ナノ粒子のSEM写真。(b)(a)のナノ粒子のEDX分析結果。

[図17](a) リン酸カルシウム類ナノ粒子のSEM写真。(b)(a)のナノ粒子のEDX分析結果。

[図18](a)、(b)リン酸カルシウム類ナノ粒子のTEM写真。

[図19](a)リン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真。(b)(a)のマイクロカプセルのEDX分析の結果を示すチャート。

[図20](a)蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真。(b)マイクロカプセルの高倍率のSEM写真。(c)(b)のマイクロカプセルのEDX分析の結果を示すチャート。

[図21](a)3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真。(b)(a)のマイクロカプセルの拡大図。(c)(b)のマイクロカプセルの拡

大図。(d)(c)のマイクロカプセルのEDX分析の結果を示すチャート。

発明を実施するための形態

- [0011] 本明細書において、種晶であるリン酸カルシウム類微粒子は、アパタイト核ということもあり、リン酸カルシウム類の成長を促進する機能を有する。
- [0012] リン酸カルシウム類微粒子は、公知の方法により調製することができ、例えばW02007/020928、特許第4506067に記載される方法に従って製造することができる。
- [0013] 1つの実施形態において、本発明のリン酸カルシウム類マイクロカプセルは、コアに封入した物質を細胞内に導入する機能を有する。
- [0014] 別の実施形態において、本発明のリン酸カルシウム類マイクロカプセルは、コアの物質の徐放作用を有し、薬物のDDSなどに応用可能である。徐放作用に関しては、実施例4に示されるように、油性物質がリン脂質などの両親媒性物質であり、油性物質に徐放される物質（例えば薬物）を混合した後、カプセル化してコアを形成するのが好ましい。
- [0015] コアの油性物質が液体であっても、その液体はリン酸カルシウム類のシェルに覆われるため、固体粉末として扱うことができる、具体的には、皮膚外用剤に本発明のリン酸カルシウム類マイクロカプセルを配合することで、皮膚上に液体を固体粉末として担持することができる。コアに保持される液体としては、油性物質、紫外線吸収剤、保湿剤、精油などが挙げられる。本発明のリン酸カルシウム類マイクロカプセルは、細胞への物質導入のような医薬用途だけでなく、化粧品としても好ましいものである。
- [0016] 本発明のマイクロカプセルは、コア-シェル構造を有するものであり、コア(芯)は油性物質を含み、シェル(殻)はリン酸カルシウム類から構成される。コア部分にはリン酸カルシウム類微粒子をさらに含んでもよい。シェルを構成するリン酸カルシウム類としては、ヒドロキシアパタイト類が好ましい。
- [0017] (リン酸カルシウム類)
- リン酸カルシウム類としては、第一リン酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$)

）、第二リン酸カルシウム (CaHPO_4)、第三リン酸カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)、リン酸四カルシウム ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$)、リン酸八カルシウム ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$)、ヒドロキシアパタイト類を含むアパタイト類、アモルファスリン酸カルシウムなどがあり、いずれも結晶水をもつものも含む。リン酸カルシウム類は、ヒドロキシアパタイト類を包含する。

[0018] (ヒドロキシアパタイト類)

ヒドロキシアパタイトは、化学式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で表される化合物をいう。ヒドロキシアパタイト類とは、ヒドロキシアパタイト、または、その構成元素が置換および／または欠損しているものをいう。ヒドロキシアパタイト類は、例えば、ヒドロキシアパタイトを構成する元素または基の一部が、Na、Kなどの周期律表第Ⅰ族の元素、Mg、Znなどの周期律表第Ⅱ族の元素、F、Clなどの周期律表第Ⅶ族の元素； CO_3^{2-} 、 HPO_4^{2-} 、 SO_4^{2-} などの基で置換されていてよい。更に、希土類により置換されていてよい。このようなヒドロキシアパタイト類は、リン酸カルシウム類を形成するための溶液「リン酸カルシウム類形成溶液」中に含まれる種々の元素あるいは基に由来する。

[0019] 本発明のリン酸カルシウム類を含むシェル構造は、油性物質と種晶を混合し、この混合物を小さな粒子（小粒子）としてリン酸カルシウム類の成長が可能な水溶液中に分散し、種晶が成長することで形成可能である。小粒子は、液体あるいはコロイドあるいはロウ様物質であってもよく、ミセル粒子を含む。種晶は、リン酸カルシウム類の析出を促進するものであり、より具体的にはリン酸カルシウム類の成長を誘起および促進する微粒子である。種晶としてリン酸カルシウム類微粒子を用いることができ、特にWO2007/020928に記載される方法に従って製造するものを含み、これをアパタイト核と言うことがある。

[0020] 種晶は、例えばウォラストナイトのように、リン酸カルシウム類以外の物質でも、リン酸カルシウム類の成長の核となることができるものであればよい。種晶であるリン酸カルシウム類微粒子は、ヒドロキシアパタイト類以外

のリン酸カルシウム類を含んでいてもよく、リン酸カルシウム類の成長の核となることができるものであればよい。種晶の大きさおよび形状等も特に限定されない。

[0021] 種晶の平均粒径は、リン酸カルシウム類の成長を促進するという観点から、 $0.5\text{ nm} \sim 1\text{ mm}$ 、好ましくは $1\text{ nm} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 、より好ましくは $5\text{ nm} \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 、特に $10\text{ nm} \sim 0.5\text{ }\mu\text{m}$ である。種晶の平均粒径の測定法としては、レーザー散乱式粒度分布測定法、あるいはSEM、あるいはTEMが挙げられる。

[0022] リン酸カルシウム類の成長が可能な水溶液は、例えば、リン酸カルシウム類に対して過飽和な水溶液を調製し、そのpHを調整することによって、調製することができる。

[0023] リン酸カルシウム類の成長とリン酸カルシウム類微粒子の形成には、同じ溶液を用いることができる。

[0024] リン酸カルシウム類微粒子は、リン酸カルシウム類に対して過飽和な水溶液を調製し、そのpHをアルカリ性に調整し、析出した微粒子をろ過等により収集することにより得ることができる。あるいは、リン酸カルシウム類に対して過飽和な水溶液を調製し、そのpHをアルカリ性に調整し、同時に溶液の温度を上昇させることにより、析出した微粒子をろ過により収集することにより得ることができる。

[0025] 本明細書において、リン酸カルシウム類微粒子の形成及び／又はリン酸カルシウム類の成長が可能な溶液を「リン酸カルシウム類形成溶液」ということがある。

[0026] リン酸カルシウム類形成溶液におけるリン酸カルシウム類微粒子の形成／シェルにおけるリン酸カルシウム類の成長に関しては、リン酸カルシウム類微粒子を形成／リン酸カルシウム類を成長するには、リン酸カルシウム類形成溶液中のイオンの濃度、特にカルシウムイオン (Ca^{2+}) およびリン酸水素イオン濃度、さらにはpHが適切に設定されていることが重要である。pHが高くなると（より塩基性側になると）、溶液中のリン酸カルシウム類微

粒子は大きくなり、凝集沈殿が起きやすくなる／リン酸カルシウム類の成長が速くなる。一方、pHが低くなると（より酸性側になると）リン酸カルシウム類微粒子が小さく／リン酸カルシウム類の成長が遅くなり、さらにpHが低くなるとリン酸カルシウム類微粒子は形成されない／リン酸カルシウム類が成長しないか、形成したリン酸カルシウム類微粒子は溶解する／形成したリン酸カルシウム類は溶解する。このように、pHでリン酸カルシウム類微粒子の生成およびサイズ／リン酸カルシウム類の成長速度が調節される。つまり、リン酸カルシウム類微粒子の調製／リン酸カルシウム類マイクロカプセルのシェルの成長は、溶液のpHを調整することにより実施できる。

[0027] リン酸カルシウム類形成溶液は、具体的には、カルシウムイオンを0.02～25 mM、リン酸水素イオンを0.01～10 mM含有し、pHが4～9であることが好ましい。より好ましくはカルシウムイオンを0.2～20 mM、リン酸水素イオンを0.1～8 mM含み、pHは6.2～8.0である。さらに好ましくは、カルシウムイオンを1.2～5 mM、リン酸水素イオンを0.5～2 mM含み、pHは7.2～7.9である。pHは約7.4～7.8の間で調整されることが特に好ましい。

[0028] リン酸カルシウム類形成溶液の調製には、リン酸水素二カリウム・三水和物及び塩化カルシウムを用いることが好ましい。リン酸カルシウム類形成溶液のpHは、適切な緩衝液、例えば $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ を用い、更に塩酸のような酸を加えて調整することが好ましい。

[0029] 生体適合性に優れたリン酸カルシウム類微粒子の形成及びリン酸カルシウム類微粒子からリン酸カルシウム類の成長のための溶液としては、カルシウムイオンとリン酸水素イオンに加えて、例えば、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム・六水和物、硫酸ナトリウムなどをさらに含む溶液であって、その組成が人体の血漿中の無機イオン濃度に類似する、いわゆる擬似体液（SBF）とすることが好ましい。擬似体液を調製する場合、ナトリウムイオン（ Na^+ ）を1.4～1420 mM、カリウムイオン（ K^+ ）を0.05～50 mM、マグネシウムイオン（ Mg^{2+} ）を

0.01~15 mM、塩化物イオン (Cl^-) を 1.4~1500 mM、炭酸水素イオン (HCO_3^-) を 0.04~45 mM、硫酸イオン (SO_4^{2-}) を 5.0×10^{-3} ~5 mM 含有していてもよい。好ましくは、ナトリウムイオンを 14~1140 mM、カリウムイオンを 0.5~40 mM、マグネシウムイオンを 0.1~12 mM、塩化物イオンを 14.5~1200 mM、炭酸水素イオンを 0.4~36 mM、硫酸イオンを 0.05~4 mM 含む。より好ましくは、ナトリウムイオンを 70~290 mM、カリウムイオンを 2.5~10 mM、マグネシウムイオンを 0.7~3.0 mM、塩化物イオンを 70~300 mM、炭酸水素イオンを 2.0~9.0 mM、硫酸イオンを 0.2~1.0 mM 含有していてもよい。

[0030] なお、特に無機イオン濃度が体液に近い SBF を、1.0 SBF と呼ぶ。1.0 SBF は、無機成分の組成が、ナトリウムイオンを 142.0 mM、カリウムイオンを 5.0 mM、マグネシウムイオンを 1.5 mM、カルシウムイオンを 2.5 mM、塩化物イオンを 147.8 mM、炭酸水素イオンを 4.2 mM、リン酸水素イオンを 1.0 mM、硫酸イオンを 0.5 mM 含む。SBF の無機イオン濃度の x 倍の無機イオン濃度を有する水溶液を、xSBF と記述する。

[0031] リン酸カルシウム類微粒子を形成するための溶液としては、リン酸カルシウム類に対して過飽和な溶液であれば、溶液を調製するだけで、特に他の処理を施すことなくリン酸カルシウム類微粒子を形成することができる。なお、本発明における過飽和とは、pH の影響を鑑みた状態である。すなわち、同濃度、同温度でも、pH によって溶媒に対するリン酸カルシウム類の溶解度は異なってくる。ここでいう過飽和とは、単に溶質の濃度のみを規定する文言ではなく、このように pH を含めた条件が、リン酸カルシウム類微粒子を形成するのに十分な条件を満たしていることを示す。

[0032] 溶液の温度を上昇させることにより、リン酸カルシウム類微粒子の析出、成長を促進することもできる。例えば、そのままではリン酸カルシウム類微粒子が形成されない程度に pH の低いリン酸カルシウム類形成溶液を加熱す

ることによって、リン酸カルシウム類微粒子を形成／リン酸カルシウム類微粒子を成長することもできる。

[0033] リン酸カルシウム類微粒子と油性物質を含む混合物を分散させてリン酸カルシウム類微粒子を成長させてリン酸カルシウム類のシェル構造を得るための溶液として、上記の擬似体液などのリン酸カルシウム類形成溶液を用いることができる。

[0034] 種晶と油性物質を含む混合物の分散は、例えば該混合物を溶媒に溶解ないし分散させた溶液から溶媒を蒸発させて容器内壁にフィルム状に形成し、リン酸カルシウム類形成溶液を該容器に加えて超音波処理するなどの方法に従い、調製することができる。超音波処理により、フィルム状に形成した種晶と油性物質を含む混合物が、リン酸カルシウム類成長溶液中に小粒子となって分散する。種晶と該油状物質を含む混合物を含む容器にリン酸カルシウム類形成溶液を加え、ホモジナイザー、超音波粉碎機、ホモミキサー、ディスパーコロイドミルおよびマイクロブレイダイザーなどのエマルジョンの形成に使用される装置を用い、常法に従い、該混合物が小粒子として分散した液を得ることができる。また、種晶と油性物質を含む混合物を、リン酸カルシウム類形成溶液に加えながら、該溶液を攪拌し、あるいは該溶液に超音波振動を与え、該混合物を小粒子として、該溶液中に分散することができる。

[0035] リン酸カルシウム類を成長させる方法としては、特にバイオミメティック法が好ましい。バイオミメティック法は、体内の環境に近い状態でリン酸カルシウム類を成長させる方法である。体内の環境に近い状態とは、上述の擬似体液を用いると共に、温度条件を体温である36～37℃程度とすることを意味する。ただし、本発明ではこれに限定されるものではない。本発明のリン酸カルシウム類を成長させる方法では、擬似体液を用いることが特に好ましいが、温度は特に限定されない。

[0036] バイオミメティック法によって成長したリン酸カルシウム類は、生体アパタイトと呼ばれ、リン酸基の部分が一部炭酸イオンに置き換わっている等の特性をもつ。そのため、バイオミメティック法は、生体親和性および生体活

性の高いリン酸カルシウム類を形成することができるので、生体に用いるマイクロカプセルの製造に適している。

[0037] 種晶と油性物質を含む混合物の小粒子において、リン酸カルシウム類形成溶液中で、種晶からリン酸カルシウム類が成長し、リン酸カルシウム類から構成されるシェル(殻)を形成し、油性物質を含むコア(芯)をもつ、リン酸カルシウム類マイクロカプセルが形成される。

[0038] 本発明における油性物質は、油脂類並びに両親媒性物質を含み、これらは、水溶液に加えたときに水溶液と境界を持つ。例えば、脂溶性ビタミン類、リン脂質等の両親媒性物質、紫外線吸収剤、薬剤（例えば抗炎症剤、抗腫瘍剤）、植物油、動物油、香料、精油などが挙げられる。該油性物質は、一種類単独で、あるいは2種類以上混合して用いることができる。

[0039] 油性物質がリン脂質（例えばホスファチジルコリン）のように両親媒性の物質である場合には、油性物質に水溶性の物質（例えば薬物などの生理活性物質、タンパク質）を溶かし込んでカプセルを形成してもよく、このような実施形態も本発明に包含される。

[0040] 本明細書において使用する「リン酸カルシウム類微粒子」は、リン酸カルシウム類の成長を促進するものであり、「種晶」の機能を有するものである。

[0041] 脂溶性ビタミン類としては、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンKなどの脂溶性ビタミン、脂溶性ビタミンC誘導体（例えば、テトラヘキシルデカン酸アスコルビル）、コエンザイムQ10（ユビキノン又はビタミンQともいう。）、ドコサヘキサエン酸（DHA）、エイコサペンタエン酸（EPA）、共役リノール酸（CLA）トリグリセライド、CLA、スクワレン、セラミド、 γ -リノレン酸、 α -リノレン酸又は中鎖脂肪酸トリグリセライド（MCT）などが挙げられる。

[0042] リン脂質等の両親媒性物質としては、レシチン（大豆、卵黄）、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、界面活性剤などがあげら

れ、これらはミセルを形成可能である。

[0043] 紫外線吸収剤としては、パラアミノ安息香酸誘導体、サリチル酸誘導体、ケイ皮酸誘導体、 β ， β －ジフェニルアクリレート誘導体、ベンゾフェノン誘導体、ベンジリデンショウノウ誘導体、フェニルベンゾイミダゾール誘導体、トリアジン誘導体、フェニルベンゾトリアゾール誘導体、アントラニル誘導体、イミダゾリン誘導体、ベンザルマロナート誘導体、4，4－ジアリールブタジエン誘導体等が例示され、例えばフェニルベンズイミダゾールスルホン酸、2－ヒドロキシ4－メトキシベンゾフェノンスルホン酸、メトキシケイヒ酸エチルヘキシル、オクトクリレンなどが挙げられる。

[0044] 抗炎症剤としては、パラメタゾン脂肪酸エステルなどのステロイド系抗炎症剤、インドメタシン、もしくはその誘導体等の非ステロイド系抗炎症剤が挙げられる。

[0045] 抗腫瘍剤としては、アルキル化剤、各種代謝拮抗剤、抗腫瘍性植物成分、BRM（生物学的応答性制御物質）、血管新生阻害剤、細胞接着阻害剤、マトリックス・メタロプロテアーゼ阻害剤またはホルモンなどが挙げられる
植物油としては、例えば、なたね油、大豆油、サフラワー油、向日葵油、米糠油、コーン油、綿実油、ごま油、小麦胚芽油、月見草油又は紫蘇油等が挙げられる。

[0046] 動物油としては、例えば、バター、ラード、乳脂肪等が挙げられる。

[0047] 香料としては、例えば医薬品添加物又は食品添加物として許容されている天然の花、樹木、果実等の精油等が好ましい。

[0048] 精油としては、リモネン及びその類縁物質、ニーム油、ハッカ油、レモングラス油、クローブ油、オレガノ油、ティートリー油、ゼラニウム油、シソ油、ラベンダー油、さらにオレガノ、ガーリック、フェンネル、クミン、オールスパイス、ナツメグ、ジンジャー、パプリカ、タイム、ローズマリー、マジョラム、バジル、ローズヒップス、キャラウェイ、コリアンダー、ペッパー、スターアニス、レモンピール、ガムマサラ、セイジ、ローレル、シナモン、ターメリック、カルダモン、レモンバーム、ミント、ベルガモットな

どが挙げられる。

[0049] これらの油性物質は、単独で又は2種以上を混合して用いることができる。例えば水難溶性の脂溶性薬物は植物油などの液体の油性物質に溶解して、リン酸カルシウム類から構成される、マイクロカプセルに封入することができる。

[0050] 油性物質は他の材料を分散、溶解などにより共存させることができる。油性物質と共存できる材料としては、薬剤（例えば、制癌剤、抗癌剤など）、放射性物質、抗体、抗酸化剤、治療目的のための磁性体、骨形成促進剤などの他、タンパク質、核酸物質、酵素、栄養素、磁性体、金属、半導体、ガラス、セラミックス、カーボン材料（例えば、アモルファスカーボン）、ダイヤモンド、セッコウなどの塩、有機高分子、天然物、毒物、劇物、細胞、微生物などが挙げられる。これらの材料は、リン酸カルシウム類を使用することで、生体内への吸収が促進される。

[0051] 本発明の好ましい実施形態において、核酸物質は、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびDNAプラスミドなど核酸系薬物が挙げられ、具体的には、mRNA、DNA、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA、リボザイム、遺伝子、プラスミド、デコイオリゴヌクレオチド、DNAザイム、などが挙げられる。これらの薬物は、タンパク質、ポリペプチド、またはRNAのための1種または複数の特定配列をコードする核酸、ならびにタンパク質発現レベルを特異的に制御し、またはとりわけスプライシングおよび人為的切断との干渉によってタンパク質構造に影響を及ぼすことができるオリゴヌクレオチドに分類される。

[0052] 核酸物質は、脊椎動物細胞において1種または複数のRNAへと転写されることが可能な核酸を含んでもよく、これらのRNAは、mRNA、shRNA、miRNA、またはリボザイムとすることができ、このようなmRNAは1種または複数のタンパク質またはポリペプチドをコードする。このような核酸治療薬は、環状DNAプラスミド、WO 98/21322もしくはDE 19753182に開示されるMIDGEベクター (Minimalistic Immun

ogenically Defined Gene Expression) のような直鎖DNA構築物、または翻訳の準備ができているmRNA（例えば、EP 1392341）とすることができる。

[0053] 本発明の別の実施形態において、細胞内核酸またはタンパク質を標的にすることができるオリゴヌクレオチドを使用してもよい。前記核酸は、前記オリゴヌクレオチドが、転写を減衰もしくは調節し、転写物のプロセッシングを改変し、またはその他の方法でタンパク質の発現に干渉するように適合されるように、特定の遺伝子をコードすることができる。「標的核酸」という用語は、特定の遺伝子をコードするDNA、およびこのようなDNAに由来するすべてのRNA（mRNA前駆体またはmRNAである）を包含する。標的核酸と、このような配列に向けられた1種または複数のオリゴヌクレオチドとの特定のハイブリッド形成によって、タンパク質発現の抑制または調節をもたらすことができる。このような特定の標的化を実現するために、オリゴヌクレオチドは、好適には標的核酸の配列に実質的に相補である一続きのヌクレオチドを含むべきである。

[0054] 上記の基準を満たすオリゴヌクレオチドは、いくつかの異なる化学的性質および立体的配置で構築される可能性がある。オリゴヌクレオチドは、DNA、RNA、ロックト核酸（LNA）、2' O-メチルRNA（2' Ome）、2' O-メトキシエチルRNA（2' MOE）（それらのホスフェートもしくはホスホチオエートの形）、またはモルホリノもしくはペプチド核酸（PNA）を含む（ただし、これらに限定されるものではない）天然または修飾ヌクレオチドを含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、一本鎖でも、二本鎖でもよい。

[0055] オリゴヌクレオチドは、8～60個の電荷を有するポリアニオン性構造である。大部分の場合、これらの構造は、ヌクレオチドを含むポリマーである。本発明は、オリゴヌクレオチドの特定の作用機序に限定されず、機序の理解は本発明を実施するのに必要ではない。

[0056] オリゴヌクレオチドの作用機序は異なってもよく、とりわけスプライシン

グ、転写、核—細胞質輸送、および翻訳に及ぼす効果を含む可能性がある。

[0057] 本発明の好ましい実施形態において、一本鎖オリゴヌクレオチドを使用することができ、これには、一般的にアンチセンスオリゴヌクレオチドと呼ばれるDNA系オリゴヌクレオチド、ロックト核酸、2'—修飾オリゴヌクレオチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。主鎖または塩基または糖修飾としては、ホスホチオエートDNA (PTO)、2' O—メチルRNA (2' Ome)、2' フルオロRNA (2' F)、2' O—メトキシエチル—RNA (2' MOE)、ペプチド核酸 (PNA)、N3'—P5' ホスホアミデート (NP)、2' フルオロアラビノ核酸 (FANA)、ロックト核酸 (LNA)、モルホリンホスホアミデート (モルホリノ)、シクロヘキセン核酸 (CeNA)、トリシクロ—DNA (tcDNA)などを挙げることができるが、これらに限定されない。さらに、混成した化学的性質は当技術分野で知られており、コポリマー、ブロックコポリマー、もしくはギャップマーとして、または他の配置で2種以上のヌクレオチド種から構築される。

[0058] 上記のオリゴヌクレオチドに加えて、相補的配列モチーフを含む二本鎖RNA分子を使用して、タンパク質発現を抑制することもできる。このようなRNA分子は、当技術分野でsiRNA分子と呼ばれる（例えば、W0 99/32619またはW0 02/055693）。他のsiRNAは、一本鎖siRNA、または1本の非連続鎖を有する二本鎖siRNAを含む。この場合も、様々な化学的性質をこのクラスのオリゴヌクレオチドに適合させた。また、DNA/RNAハイブリッド系が当技術分野で知られている。

[0059] 本発明の別の実施形態において、デコイオリゴヌクレオチドを使用することができる。これらの二本鎖DNA分子およびその化学修飾体は、核酸ではなく転写因子を標的にする。これは、デコイオリゴヌクレオチドが、配列特異的DNA結合タンパク質と結合し、転写に干渉する（例えば、Cho-Chung, et al. in Curr. Opin. Mol. Ther., 1999）。

[0060] 本発明の別の実施形態において、遺伝子のプロモーター領域と生理的条件

下でハイブリッド形成することによって転写に影響を及ぼすことができるオリゴヌクレオチドを使用してもよい。この場合も、様々な化学的性質をこのクラスのオリゴヌクレオチドに適合させることができる。

[0061] 本発明のさらに別の代替形態において、DNAザイムを使用してもよい。DNAザイムは、一本鎖オリゴヌクレオチド、および酵素活性によるその化学修飾体である。「10-23」モデルと呼ばれる典型的なDNAザイムは、生理的条件下で一本鎖RNAを特定部位で切断することができる。DNAザイムの10-23モデルは、RNA上の標的配列に相補的な2個の基質認識ドメインで両側を挟まれた、15個の高度に保存されたデオキシリボヌクレオチドの触媒ドメインを有する。標的mRNAの切断は、その破壊をもたらす可能性があり、DNAザイムは複数の基質を再生利用および切断する。

[0062] さらに本発明の別の実施形態において、リボザイムを使用することができる。リボザイムは、一本鎖オリゴリボヌクレオチド、および酵素活性によるその化学修飾体である。これらは、触媒コアを形成する保存されたステムループ構造と、および所与のRNA転写物の標的部位を取り囲む配列に逆相補であるフランキング配列の2つの成分に分けることができる。フランキング配列は、特異性を付与することができ、一般に、選択される標的部位の両側に伸びる合計で14～16 ntを構成する。

[0063] 本発明のさらに別の実施形態において、タンパク質を標的にするために、アプタマーを使用してもよい。アプタマーは、RNAまたはDNAなどの核酸、および特定の分子標的に密接に結合するその化学修飾体から構成された巨大分子であり、典型的には15～60 ntの長さである。ヌクレオチド鎖は、分子を複雑な三次元形状に折り畳む分子内相互作用を形成することができる。アプタマーの形状によって、酸性タンパク質、塩基性タンパク質、膜タンパク質、転写因子、および酵素が挙げられるが、これらに限定されるものではない標的分子の表面への密接な結合が可能になる。アプタマー分子の結合は、標的分子の機能に影響を及ぼすことができる。

[0064] 上記のオリゴヌクレオチドはすべて、1本の鎖当たりのヌクレオチド長が

わずか5、好ましくは8～50の間で異なってもよい。より具体的には、オリゴヌクレオチドは、その標的配列のRNAseH媒介分解を触媒し、または翻訳を阻止し、またはスプライシングを再指示し、またはアントゴmir (antogomir) として作用する、8～50のヌクレオチド長を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドとすることができる。これらは、15～30の塩基対長を有するsiRNAとすることができる。これらは、さらに15～30の塩基対長を有するデコイオリゴヌクレオチドを表すことができ、15～30のヌクレオチド長を有するゲノムDNAの転写に影響を及ぼす相補的オリゴヌクレオチドとすることができる。これらは、さらに25～50のヌクレオチド長を有するDNAザイム、または25～50のヌクレオチド長を有するリボザイム、または15～60のヌクレオチド長を有するアプタマーを表すことができる。オリゴヌクレオチドのこのような下位クラスは、機能的に定義されることが多く、同一でも、異なってもよく、あるいは本発明の教示に実質的に影響を及ぼすことなく、それらの化学的性質または構造の一部ではあるが全部ではない特性を共有することができる。オリゴヌクレオチドと標的配列との適合は、一続きの上記のいくつかのオリゴヌクレオチド全体にわたって標的核酸上のその相補的塩基と塩基対を形成するオリゴヌクレオチドの各塩基では、完全であることが好ましい。あまり好ましくはないが、配列の対には、前記一続きの塩基対内に1個または複数のミスマッチが含まれている可能性がある。一般に、このような核酸のタイプおよび化学組成は、インビボであろうとインビトロであろうと、ビヒクルとしての本発明のリボソームの性能にほとんど影響を及ぼさず、当業者は、本発明の脂質集合体との組合せに適した他のタイプのオリゴヌクレオチドまたは核酸を見出すことができる。

[0065] さらに本発明の別の実施形態において、タンパク質を使用することができる。タンパク質としては、プロテアーゼ、リパーゼ、オキシゲナーゼ、カタラーゼ、ATP合成酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、ヌクレアーゼ、制限酵素、キナーゼ、フォスファターゼ、トランスフェラーゼ、イソメラー

ぜ、DNAメチラーゼなどの酵素、IgM、IgD、IgG、IgA、IgEなどの抗体又はその断片、花粉アレルギー、食物アレルギー、病原菌、ウイルスなどの抗原、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどの標識タンパク質、成長ホルモン、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチド、成長ホルモン放出ホルモン、プロラクチン（PRL）、メラトニン、オキシトシン、バソプレッシン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、甲状腺刺激ホルモンなどのホルモン類、インターフェロン、インターロイキン、ケモカイン、コロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチン、EGF、FGF、PDGF、HGF、TGF、TNF- α 、TNF- β 、アディポカイン、NGFなどのサイトカインなどが挙げられる。タンパク質にはペプチドホルモンなどの生理活性ペプチドが含まれる。

[0066] 薬物としては、例えば、抗高血圧剤、抗低血圧剤、抗精神病剤、鎮痛剤、抗鬱剤、抗躁剤、抗不安剤、鎮静剤、催眠剤、抗癲癇剤、オピオイドアゴニスト、喘息治療剤、麻酔剤、抗不整脈剤、関節炎治療剤、鎮痙剤、ACEインヒビター、鬱血除去剤、抗生物質、抗狭心症剤、利尿剤、抗パーキンソン病剤、気管支拡張剤、分娩促進剤、抗利尿剤、抗高脂血症剤、免疫抑制剤、免疫調節剤、制吐剤、抗感染症剤、抗新生物剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、抗糖尿病剤、抗アレルギー剤、解熱剤、抗腫瘍剤、抗痛風剤、抗ヒスタミン剤、止痒剤、骨調節剤、心血管剤、コレステロール低下剤、抗マラリア剤、喫煙を中止するための薬剤、鎮咳剤、去痰剤、粘液溶解剤、鼻詰り用薬剤、ドパミン作動剤、消化管用薬剤、筋弛緩剤、神経筋遮断剤、副交感神経作動剤、プロスタグランジン、興奮薬、食欲抑制剤、甲状腺剤又は抗甲状腺剤、ホルモン、抗偏頭痛剤、抗肥満剤、抗炎症剤などが挙げられる。

[0067] 本発明のリン酸カルシウム類マイクロカプセルの平均粒子径は0.01~20 μ m、好ましくは0.05~1 μ mである。リン酸カルシウム類マイクロカプセルは細胞に導入されるのに十分小さいサイズであるのがよい。

[0068] リン酸カルシウム類マイクロカプセルのうち、リン酸カルシウム類がヒドロキシアパタイト類であるものを、ヒドロキシアパタイト類マイクロカプセル

ルと称することがある。

実施例

[0069] 以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0070] 参考例1：擬似体液（SBF）の調製

1.0SBFを以下の手順で調製した。超純水に、NaCl（和光特級 純度99.5 %）、NaHCO₃（林純薬特級 純度99.5 %～）、KCl（林純薬特級 純度99.5 %）、K₂HPO₄・3H₂O（ナカライテスク特級 純度99.0 %）、MgCl₂・6H₂O（林純薬特級 純度98.0 %）、1 M-HCl（林純薬）、CaCl₂（林純薬特級 純度95.0 %）、Na₂SO₄（林純薬特級 純度 99.0 %）の順に表1に示した濃度になるように溶解した後、トリスヒドロキシメチルアミノメタン（トリスバッファー）を溶液中に徐々に加え、36.5 °CでpHを7.40に調整した。

[0071] [表1]

1.0SBF 及びヒト血漿における無機イオン濃度

	イオン濃度 (mmol・dm ⁻³)	
	1.0SBF	ヒト血漿
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Ca ²⁺	2.5	2.5
Mg ²⁺	1.5	1.5
Cl ⁻	147.8	103.0
HCO ₃ ⁻	4.2	27.0
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

[0072] 実施例1

(1) DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルの作製

(1-1) リン酸カルシウム類微粒子及びDNAを含むホスファチジルコリン小粒子の作製

1.0SBFにトリスヒドロキシメチルアミノメタンを加えて25.0°CでpH 8.60に

調整し、リン酸カルシウム類微粒子を析出した。析出したリン酸カルシウム類微粒子を、孔径50 nmのセルロース混合エステル製の濾紙(MF-ミリポア、Millipore, USA)を用いた吸引濾過によって回収した。超純水で洗浄後、濾紙を乾燥機で1日乾燥させたのちリン酸カルシウム類微粒子を回収した。100mlのエタノールにホスファチジルコリン20mg、リン酸カルシウム類微粒子0.2mg、DNAとしてpEGFP (EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) 遺伝子のプラスミド) 20 μ gを加え、超音波振動を加えて分散させた。これをナスフラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて減圧蒸留した。フラスコの底に薄膜層が生成した。この薄膜層にはリン酸カルシウム類微粒子、pEGFPが含まれている。これに1.0SBFを50ml加え超音波振動を加え分散させることにより、リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子を生成した。リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子は、本発明のマイクロカプセルのコア(芯)を形成するものである。

[0073] (1-2) 1.0SBF浸漬によるDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルの形成

リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子が分散された1.0SBF溶液をポリ瓶に移し、36.5℃のインキュベータ内で7日間振盪攪拌した。リン酸カルシウム類が微粒子表面及び内部へと成長し、これにより、リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子の表面を被覆した。この結果、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルが作製された。その後インキュベータ内から溶液を取り出し、超遠心分離器を用いてDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを回収し超純水を用いて洗浄を行った(5000rpm, 5min)。この洗浄操作を3回繰り返し行った。

[0074] 収集したマイクロカプセルについて、走査型電子顕微鏡(SEM) (SU6600, 日立ハイテクノロジーズ)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX) (Xflash 5010, BRUKER)を用いて観察した。

[0075] (1-3) 結果と考察

(i) 1.0SBF浸漬後の走査型電子顕微鏡観察、及びエネルギー分散型X線分析

図2に1.0SBF浸漬後に得られたDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真とEDX分析結果を示す。図2(a)はSEM写真である。図2(c)は同試料の高倍率のSEM写真であり、図2(b)はそのEDX測定結果である。

[0076] 図2(a), (b)より1.0SBFに7日間浸漬したリン酸カルシウム類微粒子及びDNAを含むホスファチジルコリン小粒子の表面が針状結晶で構成される薄膜で被覆されていることがわかった。また、図2(c)において、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルの表面のEDX結果においてCaとPのピークが検出された。これらの結果から、リン酸カルシウム類微粒子及びDNAを含む小粒子を1.0SBFに浸漬することにより、リン酸カルシウム類微粒子からリン酸カルシウム類が表面及び内部へと成長し、リン酸カルシウム類微粒子及びDNAを含むホスファチジルコリン小粒子を被覆したと考えられる。また、図2(a)において、観察した全てのリン酸カルシウム類微粒子及びDNAを含むホスファチジルコリン小粒子がリン酸カルシウム類で被覆されており、高い生産性が示された。再現実験においても同様の結果が得られたことから、今回の方法は再現性が高いと考えられる。

[0077] (2) HEK293細胞を用いた遺伝子導入実験

作製したDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを用い、HEK293細胞を用いた遺伝子導入実験を行った。以下に実験手順を記す。

[0078] DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを約 1.5×10^4 個/mlの濃度で含む溶液 20 mlを遠心分離機を用いて遠心分離し ($1,000 \times g$ 、10 min) (g は重力加速度)、沈殿したDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを10 mlのPBS (リン酸緩衝生理食塩水) に懸濁し再び遠心分離を行った ($1,000 \times g$ 、10 min)。

[0079] 上清を取り除き、10mlの70%エタノール溶液を加え30分間静置し滅菌した。遠心分離機を用いてDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを分離した ($1,000 \times g$ 、10 min)。その後DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルをPBSで2回洗浄した。最終的に、10 mlのPBSにDNA含有リン酸カルシウム

類マイクロカプセルを懸濁した。

[0080] 続いて、この溶液200 μ lを遠心分離し(8,000 $\times$ g、1 min)、500 μ lの培地に再懸濁した。4穴プレートにHEK293細胞を撒き、80%程度コンフルエントになったところで、本発明のDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した培地に交換した。

[0081] DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル添加24時間後、72時間後に蛍光顕微鏡(Zeiss Axiovert 200)を用いて観察し、EGFPの発現を調べた。

[0082] 以上の実験を2回実施した。

[0083] 図3にDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを用いた、HEK293細胞への1回目の遺伝子導入実験後の画像(24時間後の例)を示す。72時間後においても蛍光顕微鏡により、緑色の蛍光が観察された。

[0084] 図3より、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル添加後24時間後の観察において、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを取り込んだ細胞において緑色蛍光が見られ、EGFPが発現していることがわかった。

[0085] 図4において、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル添加72時間後のHEK293細胞の蛍光顕微鏡像を示す。図4より、72時間後においてもDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを取り込んだ細胞において緑色蛍光が見られ、EGFPが発現しているのが確認された。

[0086] これらの結果より、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを用いた遺伝子導入に成功、高い割合で遺伝子が発現させ得ることが明らかになった。

[0087] 実施例2：メトキシケイヒ酸エチルヘキシル(UV吸収剤)へのリン酸カルシウム類コート

1.0SBFにトリスヒドロキシメチルアミノメタンを加えて25.0 $^{\circ}$ CでpH 8.60に調整し、リン酸カルシウム類微粒子を析出した。析出したリン酸カルシウム類微粒子を、孔径50 nmの濾紙を用いた吸引濾過によって回収し、超純水で洗浄後、乾燥した。リン酸カルシウム類微粒子50mgにUV吸収剤(メトキシケイヒ酸エチルヘキシル)を1ml滴下しよく振り混ぜた。これを1.0SBF100mlに100

μl入れ、スポイトで攪拌した後超音波分散を5分かけ、36.5℃のインキュベータ内の振盪機で7日間保管した。7日後、この溶液を孔径0.1 μmのろ紙を用いてろ過し、得られたろ紙上の物をインキュベータ内で一晩乾燥させた。また、ろ紙上のものをSEMとEDXで観察した。図5に回収した後のろ紙上のSEM/EDXを示す。大量にリン酸カルシウム類マイクロカプセルができている様子が確認できた。作製したリン酸カルシウム類マイクロカプセルは、メトキシケイヒ酸エチルヘキシルを保持しながら、触感は乾燥した粉体状態であった。

[0088] 実施例3：植物油（大豆油、ヒマシ油、コーン油、オリーブ油）へのリン酸カルシウム類コート

リン酸カルシウム類微粒子の作製：1.0SBFにトリスバッファーを加えて25.0℃でpH 9.00に調整した後、高周波出力500 Wで1分間のマイクロ波加熱を行い、リン酸カルシウム類微粒子を析出した。孔径50 nmのろ紙でろ過した。超純水で洗浄後、このろ紙を一日36.5℃のインキュベータ内で乾燥させた後葉さじでかき集め保管した。

[0089] ヨウ素入り油の調製：大豆油、ヒマシ油それぞれ10mlに0.5mol/Lのヨウ素液0.5mlを入れてよく混ぜ、0.025mol/Lのヨウ素入り大豆油およびヨウ素入りヒマシ油を調製した。

[0090] 植物油へのリン酸カルシウム類コート：リン酸カルシウム類微粒子50mgにヨウ素入り大豆油、ヨウ素入りヒマシ油をそれぞれ0.25ml、0.05ml滴下しよくかき混ぜた試料を作製した。これを1.0SBF100mlに全て入れ、スポイトで攪拌した後超音波を5分かけ、36.5℃のインキュベータ内の振盪機で7日間保持した。7日後、この溶液を孔径0.1 μmのろ紙を用いてろ過し、得られたろ紙上の物をインキュベータ内で一晩乾燥させた後かき集め保管した。

[0091] 大豆油を封入したリン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM画像およびEDXデータを図6に示す。

[0092] ヒマシ油を封入したリン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM画像およびEDXデータを図7に示す。作製したリン酸カルシウム類マイクロカプセルは、植物油（大豆油、ヒマシ油、コーン油、オリーブ油）を保持しながら

、触感は乾燥した粉体状態であった。

[0093] 実施例4：インスリン水溶液へのリン酸カルシウム類コート

リン酸カルシウム類微粒子の作製：1.0SBFにトリスバッファーを加えて25.0℃でpH 9.00に調整した後、高周波出力500 Wで1分間のマイクロ波加熱を行い、リン酸カルシウム類微粒子を析出した。孔径50 nmのろ紙でろ過した。超純水で洗浄後、このろ紙を一日36.5℃のインキュベータ内で乾燥させた後葉さじでかき集め保管した。

インスリン水溶液のリン酸カルシウム類コート：超純水100mlにトリスバッファーを加えて36.5℃、pH10.7の溶液を調製した。これに35.4mgのインスリン（0.5wt%のZnを含む）を溶かし、インスリン水溶液を調製した。エタノール50mlにホスファチジルコリン500mgを溶かし、ホスファチジルコリン溶液を調製した。ホスファチジルコリン溶液1mlに、インスリン水溶液1mlを滴下し、超音波をかけてよく混合した。その後リン酸カルシウム類微粒子50mgを混合した。

[0094] 1.0SBFに、354mg/lの濃度になるようにインスリンを溶解し、インスリン含有SBFを調製した。上記の混合物をインスリン含有SBF 100ml中に浸漬し、再び超音波をかけて溶液中をよく分散し、36.5℃のインキュベータ内の回転培養器で7日間保持し、リン酸カルシウム類を成長させ、リン酸カルシウム類マイクロカプセルを作製した。これを孔径100 nmのろ紙を用いてろ過し、超純水で洗浄後、空气中、36.5℃のインキュベータ内で乾燥した。

[0095] リン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真とEDX分析結果を図8に示す。

[0096] 徐放実験：生理食塩水（0.01 mol/l リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2-7.4, 36.5℃、和光純薬）にトリスヒドロキシメチルアミノメタンを溶解し、36.5℃でpH 10.7に調整した。カプセル500mgをpH10.7に調整した生理食塩水50ml中に浸漬し、10分後、20分後、30分後、60分後、90分後、120分後にICP発光分光分析装置を用いて、Zn濃度を測定した。

測定結果を表2に示す。

[0097] [表2]

徐放試験結果 [単位: ppm]

10 分	20 分	30 分	60 分	90 分	120 分
0.162866	0.175245	0.18895	0.195766	0.197700	0.202343

[0098] ICPによる測定の結果、インスリンに含まれるZnの生理食塩水中での濃度が徐々に上昇し、インスリンを徐放していることが分かった。

[0099] 実施例 5 : 植物油へのヒドロキシアパタイト類コート

アパタイト核の作製 : 1.0SBFにトリスバッファーを加えて25.0℃でpH 9.00に調整した後、高周波出力500 Wで1分間のマイクロ波加熱を行い、アパタイト核を析出した。孔径50 nmのろ紙でろ過した。超純水で洗浄後、このろ紙を一日36.5℃のインキュベータ内で乾燥させた後薬さじでかき集め保管した。

[0100] ステアリン酸アルミニウム含有大豆油の調製 : 大豆油10mlにステアリン酸アルミニウム50mgを入れてよくまぜ、ステアリン酸アルミニウム含有大豆油を調製した。

[0101] 植物油へのヒドロキシアパタイト類コートの実施 : アパタイト核50mgに上記のステアリン酸アルミニウム含有油を0.5ml滴下し、よくかき混ぜた。これを1.0SBF100mlに全て入れ、スポイトで攪拌した後、5分間超音波をかけてよく混合した後、36.5℃のインキュベータ内の回転培養機で7日間保持し、ヒドロキシアパタイト類を成長させ、ヒドロキシアパタイト類マイクロカプセルを作製した。孔径100 nmのろ紙を用いてろ過し、ろ紙上のヒドロキシアパタイト類マイクロカプセルを空气中、36.5℃のインキュベータ内で乾燥した。

[0102] ヒドロキシアパタイト類マイクロカプセルのSEM写真およびEDX分析結果を図9に示す。EDX分析の結果、ヒドロキシアパタイト類の成分であるCa、Pのピークが見られることから、ヒドロキシアパタイト類で大豆油をコートしたマイクロカプセルを作製できたことが分かった。

[0103] 実施例 6 : 2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセル

(1) リン酸カルシウム類微粒子及び2種類のDNAを含むホスファチジルコリン小粒子の作製

1.0SBFにトリスヒドロキシメチルアミノメタンを加えて25.0℃でpH 8.60に調整し、リン酸カルシウム類微粒子を析出した。析出したリン酸カルシウム類微粒子を、孔径50 nmのセルロース混合エステル製の濾紙(MF-ミリポア、Millipore, USA)を用いた吸引濾過によって回収した。超純水で洗浄後、濾紙を乾燥機で1日乾燥させたのちリン酸カルシウム類微粒子を回収した。100 mlのエタノールにホスファチジルコリン20 mg、リン酸カルシウム類微粒子0.2 mg、DNAとしてpEGFP 20 μ gとpmCherry 20 μ gを加え、超音波振動を加えて分散させた。これをナスフラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて減圧蒸留した。フラスコの底に薄膜層が生成した。この薄膜層にはリン酸カルシウム類微粒子、pEGFP及びpmCherryが含まれている。これに1.0SBFを50 ml加え超音波振動を加え分散させることにより、リン酸カルシウム類微粒子、pEGFP及びpmCherryを含むホスファチジルコリン小粒子を生成した。リン酸カルシウム類微粒子、pEGFP及びpmCherryを含むホスファチジルコリン小粒子は、マイクロカプセルのコア(芯)を形成するものである。

[0104] (2) 1.0SBF浸漬による2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルの形成

リン酸カルシウム類微粒子、pEGFPおよびpmCherryを含むホスファチジルコリン小粒子が分散された1.0SBF溶液をポリ瓶に移し、36.5℃のインキュベータ内で7日間振盪攪拌した。リン酸カルシウム類が微粒子表面及び内部へと成長し、これにより、リン酸カルシウム類微粒子、pEGFP及びpmCherryを含むホスファチジルコリン小粒子の表面を被覆した。この結果、2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルが作製された。その後インキュベータ内から溶液を取り出し、超遠心分離器を用いて2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを回収し超純水を用いて洗浄を行った(5000 rpm, 5 min)。この洗浄操作を3回繰り返し行った。

[0105] 収集したマイクロカプセルについて、走査型電子顕微鏡(SEM) (SU6600, 日立ハイテクノロジーズ)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX) (Xflash 5010, BRUKER)を用いて観察した。

[0106] (3) 結果と考察

(i) 1.0SBF浸漬後の走査型電子顕微鏡観察、及びエネルギー分散型X線分析

図10に1.0SBF浸漬後に得られた2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真とEDX分析結果を示す。図10(a)はSEM写真である。図10(b)および図10(c)は同試料の高倍率のSEM写真であり、図10(d)はそのEDX測定結果である。

[0107] 図10(a), (b), (c)より1.0SBFに7日間浸漬したリン酸カルシウム類微粒子及び2種類のDNAを含むホスファチジルコリン小粒子の表面が針状結晶で構成される薄膜で被覆されていることがわかった。また、図10(c)において、2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルの表面のEDX結果においてCaとPのピークが検出された。これらの結果から、リン酸カルシウム類微粒子及び2種類のDNAを含む小粒子を1.0SBFに浸漬することにより、リン酸カルシウム類微粒子からリン酸カルシウム類が表面及び内部へと成長し、リン酸カルシウム類微粒子及びDNAを含むホスファチジルコリン小粒子を被覆したと考えられる。また、図10(a)および図10(b)において、観察した全てのリン酸カルシウム類微粒子及び2種類のDNAを含むホスファチジルコリン小粒子がリン酸カルシウム類で被覆されており、高い生産性が示された。再現実験においても同様の結果が得られたことから、今回の方法は再現性が高いと考えられる。

[0108] (4) HEK293細胞を用いた遺伝子導入実験

作製した2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを用い、HEK293細胞を用いた遺伝子導入実験を行った。以下に実験手順を記す。

[0109] 2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを約 1.5×10^4 個/mlの濃度で含む溶液 20 mlを遠心分離機を用いて遠心分離し ($1,000 \times g$ 、10 min) (g は重力加速度)、沈殿したDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを10 mlのPBS (リン酸緩衝生理食塩水) に懸濁し再び遠心分離を行った ($1,000 \times g$ 、10 min)。上清を取り除き、10mlの70%エタノール溶

液を加え30分間静置し滅菌した。その後遠心分離機を用いて2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルをPBSで2回洗浄した ($1,000 \times g$ 、10 min)。最終的に、10 mlのPBSに2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した。

[0110] 続いて、この溶液200 μl を遠心分離し ($8,000 \times g$ 、1 min)、500 μl の培地に再懸濁した。4穴プレートにHEK293細胞を撒き、80%程度コンフルエントになったところで、2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した培地に交換した。

[0111] 2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセル添加24時間後、72時間後に蛍光顕微鏡(Zeiss Axiovert 200)を用いて観察し、EGFP及びmCherryの発現を調べた。

[0112] 図11に2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを用いた、HEK293細胞へ遺伝子導入実験後の画像(24時間後の例)を示す。単一の細胞において、EGFPの緑色蛍光とmCherryの赤色蛍光が同時に発現していた。黄色蛍光は、緑色蛍光と赤色蛍光が重なったところである。EGFP及びmCherryの2種類が細胞に取り込まれ、同時に発現していることが分かった。

[0113] この結果より、2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを用いた2種類の遺伝子の同時導入に成功、高い割合で2種類の遺伝子を同時に発現させ得ることが明らかになった。

[0114] 実施例7：インスリン含有リン酸カルシウムカプセル

(1) インスリン含有リン酸カルシウムカプセルの作成

超純水1 Lにトリスバッファーを加えて36.5°C、pH 10.7の溶液を調製した。これに354 mgのインスリン(0.5 wt%のZnを含む)を溶かし、インスリン水溶液を調製した。エタノール200 mlにホスファチジルコリン40 mgを溶かし、ホスファチジルコリン溶液を調製した。ホスファチジルコリン溶液200 mlに、リン酸カルシウム類微粒子0.5mgを混合した。これをナスフラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて減圧蒸留した。フラスコの底に薄膜層が生成した。この薄膜層にはリン酸カルシウム類微粒子が含まれている。これに

インスリン水溶液を加え超音波振動を加え分散し、リン酸カルシウム類微粒子及びインスリンを含むホスファチジルコリン小粒子を生成した。小粒子を遠心分離（25000 rpm, 4 min）により回収した。

[0115] 1.0SBFに、354 mg/lの濃度になるようにインスリンを溶解し、インスリン含有SBFを調製した。上記の小粒子をインスリン含有SBF 2 L中に浸漬し、再び超音波をかけて溶液中をよく分散し、36.5℃のインキュベータ内の回転培養器で7日間保持し、リン酸カルシウム類を成長させ、リン酸カルシウム類マイクロカプセルを作製した。これを孔径1.0 μm のろ紙を用いてろ過し、超純水で洗浄した。

[0116] リン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真とEDX分析結果を図12に示す。

[0117] (2) 徐放実験

カプセルを生理食塩水50ml中に浸漬し、6時間後、12時間後、24時間後、48時間後にICP発光分光分析装置を用いて、Zn濃度を測定した。また、カプセルを1N塩酸に2日間浸漬してZnの全含有量を測定した。徐放試験結果を表3及び図13に示す。

[0118] [表3]

表3 徐放試験結果

時間/h	0	6	12	24	48
放出したインスリンの割合	0	0.002777	0.003926	0.004208	0.004229

[0119] 放出したインスリンの割合は、カプセルから放出したZnの量を、カプセルに入っている全Zn含有量で割って求めた。インスリン放出量が徐々に上昇し、インスリンを徐放していることが分かった。

[0120] 実施例8：短期間でのリン酸カルシウム類マイクロカプセルの形成

(1)pH7.60のSBFの調製

1.0SBFを参考例1に従い調製した。各成分を表1に示した濃度になるように溶解した後、トリスヒドロキシメチルアミノメタン（トリスバッファー）を溶液中に徐々に加え、36.5℃でpHを7.60に調整した。

[0121] (2)リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子の作製

1. 0SBFにトリスヒドロキシメチルアミノメタンを加えて25.0℃でpH 8.60に調整し、リン酸カルシウム類微粒子を析出した。析出したリン酸カルシウム類微粒子を、孔径50 nmのセルロース混合エステル製の濾紙(MF-ミリポア、Millipore, USA)を用いた吸引濾過によって回収した。超純水で洗浄後、濾紙を乾燥機で1日乾燥させたのちリン酸カルシウム類微粒子を回収した。100 mlのエタノールにホスファチジルコリン20 mg、リン酸カルシウム類微粒子0.2mg、DNAとしてpEGFP 20 μ gを加え、超音波振動を加えて分散させた。これをナスフラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて減圧蒸留した。フラスコの底に薄膜層が生成した。この薄膜層にはリン酸カルシウム類微粒子およびpEGFPが含まれている。これに(1)で調製したpH 7.60の1.0SBFを50 ml加え超音波振動を加え分散させることにより、リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子を生成した。リン酸カルシウム類微粒子およびpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子は、マイクロカプセルのコア(芯)を形成するものである。

[0122] (3)pH 7.60の1.0SBF浸漬によるDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルの形成

リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子が分散された1.0SBF溶液をポリ瓶に移し、36.5℃のインキュベータ内で1日間振盪攪拌した。リン酸カルシウム類が微粒子表面及び内部へと成長し、これにより、リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子の表面を被覆した。この結果、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルが作製された。その後インキュベータ内から溶液を取り出し、超遠心分離器を用いてDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを回収し超純水を用いて洗浄を行った(5000 rpm, 5 min)。この洗浄操作を3回繰り返し行った。

[0123] 収集したマイクロカプセルについて、走査型電子顕微鏡(SEM) (SU6600, 日

立ハイテクノロジーズ)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX)(Xflash 5010, BRUKER)を用いて観察した。

[0124] (4) 結果と考察

(i)pH 7.60の1.0SBF浸漬後の走査型電子顕微鏡観察、及びエネルギー分散型X線分析

図14にpH 7.60の1.0SBF浸漬後に得られたDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真とEDX分析結果を示す。図14(a)はSEM写真である。図14(b)及び図14(c)は同試料の高倍率のSEM写真であり、図14(d)はそのEDX測定結果である。

[0125] 図14(a), (b), (c)よりpH7.60の1.0SBFに1日間浸漬したDNA含有リン酸カルシウム類微粒子を含むホスファチジルコリン小粒子の表面が針状結晶で構成される薄膜で被覆されていることがわかった。また、図14(d)において、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルの表面のEDX結果においてCaとPのピークが検出された。これらの結果から、リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含む小粒子をpH 7.60の1.0SBFに浸漬することにより、リン酸カルシウム類微粒子からリン酸カルシウム類が表面及び内部へと成長し、リン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子を被覆したと考えられる。また、図14(a)および図14(b)において、観察した全てのリン酸カルシウム類微粒子及びpEGFPを含むホスファチジルコリン小粒子がリン酸カルシウム類で被覆されており、高い生産性が示された。再現実験においても同様の結果が得られたことから、今回の方法は再現性が高いと考えられる。

[0126] 実施例1と比べ、SBFのpHを高くすることにより、リン酸カルシウム類の析出速度が速まり、カプセルを形成するのに、実施例1では7日の浸漬を要したのに対し、実施例8では1日の浸漬を要するのみであった。

[0127] (5) HEK293細胞を用いた遺伝子導入実験

作製したDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを用い、HEK293細胞を用いた遺伝子導入実験を行った。以下に実験手順を記す。

[0128] DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを約 1.5×10^4 個/mlの濃度

で含む溶液 20 mlを遠心分離機を用いて遠心分離し ($1,000 \times g$ 、10 min) (gは重力加速度)、沈殿したDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを10 mlのPBS (リン酸緩衝生理食塩水) に懸濁し再び遠心分離を行った ($1,000 \times g$ 、10 min)。上清を取り除き、10mlの70%エタノール溶液を加え30分間静置し滅菌した。その後遠心分離機を用いてDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルをPBSで2回洗浄した ($1,000 \times g$ 、10 min)。最終的に、10 mlのPBSにDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した。

[0129] 続いて、この溶液200 μ lを遠心分離し ($8,000 \times g$ 、1 min)、500 μ lの培地に再懸濁した。4穴プレートにHEK293細胞を撒き、80%程度コンフルエントになったところで、本発明のDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した培地に交換した。

[0130] DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル添加24時間後に蛍光顕微鏡 (Zeiss Axiovert 200)を用いて観察し、EGFPの発現を調べた。

[0131] 以上の実験を2回実施した。

[0132] 図15にDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを用いた、HEK293細胞への遺伝子導入実験後の画像 (24時間後) を示す。DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを取り込んだ細胞において緑色蛍光が見られ、EGFPが発現していることがわかった。

[0133] これらの結果より、DNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを用いた遺伝子導入に成功、高い割合で遺伝子を発現させ得ることが明らかになった。

[0134] 実施例 9

(1) リン酸カルシウム類ナノ粒子の作製

参考例 1 で得られた1.0SBF 100 mlにフタル酸粒子10 mgを加え、超音波振動を加えて分散した。トリスヒドロキシメチルアミノメタンを加えて25.0℃でpH 8.60に調整し、リン酸カルシウム類ナノ粒子をフタル酸粒子表面に析出した。リン酸カルシウム類ナノ粒子が析出したフタル酸粒子を、孔径50 nmのセルロース混合エステル製の濾紙(MF-ミリポア、Millipore, USA)を用いた吸

引濾過によって回収した。超純水で洗浄後、濾紙を乾燥機で1日間乾燥させたのちリン酸カルシウム類ナノ粒子を回収した。

[0135] 回収したリン酸カルシウム類ナノ粒子について、走査型電子顕微鏡(SEM) (SU6600, 日立ハイテクノロジーズ)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX) (Xflash 5010, BRUKER) を用いて観察した。

[0136] (2) 結果

リン酸カルシウム類ナノ粒子の走査型電子顕微鏡観察、及びエネルギー分散型X線分析

図16に得られたリン酸カルシウム類ナノ粒子のSEM写真とEDX分析結果を示す。図16(a)はSEM写真である。図16(b)はそのEDX測定結果である。

[0137] 図16(a)より粒径約50 nmのリン酸カルシウム類ナノ粒子が得られたことがわかった。また、図16(b)において、リン酸カルシウム類ナノ粒子のEDX結果においてCaとPのピークが検出された。フタル酸粒子表面での不均一核形成により、微細なリン酸カルシウム類ナノ粒子を得ることができた。フタル酸は昇華により、取り除かれた。フタル酸が液体になることがなかったため、リン酸カルシウム類ナノ粒子は凝集することがなかった。

[0138] 実施例 10

(A) リン酸カルシウム類ナノ粒子の作製

(1) リン酸カルシウム類ナノ粒子の作製方法

参考例1で得られた1.0SBF 1000 mlにナフタレン粒子100 mgを加え、超音波振動を加えて分散した。トリスヒドロキシメチルアミノメタンを加えて25.0℃でpH 8.60に調整し、リン酸カルシウム類ナノ粒子をナフタレン粒子上に析出した。リン酸カルシウム類ナノ粒子が析出したナフタレン粒子を、孔径50 nmのセルロース混合エステル製の濾紙(MF-ミリポア、Millipore, USA)を用いた吸引濾過によって回収した。超純水で洗浄後、濾紙を乾燥機で4日間乾燥させたのちリン酸カルシウム類ナノ粒子を回収した。

[0139] 回収したリン酸カルシウム類ナノ粒子について、走査型電子顕微鏡(SEM) (SU6600, 日立ハイテクノロジーズ)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX)

(Xflash 5010, BRUKER) を用いて観察した。

[0140] (2) 結果

リン酸カルシウム類ナノ粒子の走査型電子顕微鏡観察、及びエネルギー分散型X線分析

図17に得られたリン酸カルシウム類ナノ粒子のSEM写真とEDX分析結果を示す。図17 (a)はSEM写真である。図17 (b)はそのEDX測定結果である。図18はTEM写真である。

[0141] 図17 (a)および図18より粒径約50 nm以下のリン酸カルシウム類ナノ粒子が得られたことがわかった。また、図17 (b)において、リン酸カルシウム類ナノ粒子のEDX結果においてCaとPのピークが検出された。ナフタレン粒子表面での不均一核形成により、微細なリン酸カルシウム類ナノ粒子を得ることができた。

ナフタレンは昇華により、取り除かれた。ナフタレンが液体になることがなかったため、リン酸カルシウム類ナノ粒子は凝集することがなかった。

[0142] (B) リン酸カルシウム類マイクロカプセルの作製

(1) リン酸カルシウム類ナノ粒子含むホスファチジルコリン小粒子の作製

リン酸カルシウム類ナノ粒子の作成 (1)で析出したリン酸カルシウム類ナノ粒子を、孔径50 nmのセルロース混合エステル製の濾紙(MF-ミリポア、Millipore, USA)を用いた吸引濾過によって回収した。超純水で洗浄後、濾紙を乾燥機で1日乾燥させたのちリン酸カルシウム類ナノ粒子を回収した。100 mlのエタノールにホスファチジルコリン20 mg、リン酸カルシウム類ナノ粒子0.2mgを加え、超音波振動を加えて分散させた。これをナスフラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて減圧蒸留した。フラスコの底に薄膜層が生成した。この薄膜層にはリン酸カルシウム類ナノ粒子が含まれている。これに実施例8(1)で調製したpH 7.60の1.0SBFを50 ml加え超音波振動を30分間加え分散させることにより、リン酸カルシウム類ナノ粒子を含むホスファチジルコリン小粒子を生成した。リン酸カルシウム類ナノ粒子を含むホスファチジルコリン小粒子は、マイクロカプセルのコア(芯)を形成するものである。

[0143] (2) pH 7.60の1.0SBF浸漬によるリン酸カルシウム類マイクロカプセルの形成

リン酸カルシウム類ナノ粒子を含むホスファチジルコリン小粒子が分散された1.0SBF溶液をポリ瓶に移し、36.5℃のインキュベータ内で1日間振盪撹拌した。リン酸カルシウム類が微粒子表面及び内部へと成長し、これにより、リン酸カルシウム類ナノ粒子を含むホスファチジルコリン小粒子の表面を被覆した。この結果、リン酸カルシウム類マイクロカプセルが作製された。その後インキュベータ内から溶液を取り出し、超遠心分離器を用いてリン酸カルシウム類マイクロカプセルを回収し超純水を用いて洗浄を行った(5000 rpm, 5 min)。この洗浄操作を3回繰り返し行った。

[0144] 収集したマイクロカプセルについて、走査型電子顕微鏡(SEM)(SU6600, 日立ハイテクノロジーズ)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX)(Xflash 5010, BRUKER)を用いて観察した。

[0145] (3) 結果と考察

pH 7.60の1.0SBF浸漬後の走査型電子顕微鏡観察、及びエネルギー分散型X線分析

図19にpH 7.60の1.0SBF浸漬後に得られたリン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真とEDX分析結果を示す。図19(a)はSEM写真であり、図19(b)はそのEDX測定結果である。

[0146] 図19(a)よりpH7.60の1.0SBFに1日間浸漬したリン酸カルシウム類ナノ粒子を含むホスファチジルコリン小粒子の表面が針状結晶で構成される薄膜で被覆されていることがわかった。図19(a)より、直径が1μmよりも小さいリン酸カルシウム類マイクロカプセルが得られたことが分かる。リン酸カルシウム類ナノ粒子を使用したことによる効果と考えられる。また、図19(b)において、リン酸カルシウム類マイクロカプセルの表面のEDX結果においてCaとPのピークが検出された。これらの結果から、リン酸カルシウム類ナノ粒子を含む小粒子をpH 7.60の1.0SBFに浸漬することにより、リン酸カルシウム類ナノ粒子からリン酸カルシウム類が表面及び内部へと成長し、リン酸カルシウ

ム類ナノ粒子を含むホスファチジルコリン小粒子を被覆したと考えられる。また、観察した全てのリン酸カルシウム類ナノ粒子を含むホスファチジルコリン小粒子がリン酸カルシウム類で被覆されており、高い生産性が示された。再現実験においても同様の結果が得られたことから、今回の方法は再現性が高いと考えられる。

[0147] 実施例 11：蛍光タンパク(オボアルブミンのフルオレセイン結合体)含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル

(1) pH7.60のSBFの調製

参考例1と同様にして1.0SBFを調製した。表1に示した濃度になるように各成分を溶解した後、トリスヒドロキシメチルアミノメタン（トリスバッファ）を溶液中に徐々に加え、36.5℃でpHを7.60に調整した。

[0148] (2) リン酸カルシウム類微粒子及びオボアルブミンのフルオレセイン結合体を含むホスファチジルコリン小粒子の作製

1.0SBFにトリスヒドロキシメチルアミノメタンを加えて25.0℃でpH 8.60に調整し、リン酸カルシウム類微粒子を析出した。析出したリン酸カルシウム類微粒子を、孔径50 nmのセルロース混合エステル製の濾紙(MF-ミリポア、Millipore, USA)を用いた吸引濾過によって回収した。超純水で洗浄後、濾紙を乾燥機で1日乾燥させたのちリン酸カルシウム類微粒子を回収した。500 mlビーカーに20 mlの超純水を入れ、これに蛍光タンパクとしてオボアルブミンのフルオレセイン結合体を2 mg溶解した。この溶液にホスファチジルコリン20 mg、リン酸カルシウム類微粒子1 mgを加え、超音波振動を10分間加えて分散させた。36.5℃のインキュベータ内で超純水を蒸発させた。ビーカーの底に薄膜層が生成した。この薄膜層にはリン酸カルシウム類微粒子およびオボアルブミンのフルオレセイン結合体が含まれている。これに(1-1)で調製したpH 7.60の1.0SBFを50 ml加え超音波振動を10分間加え分散させることにより、リン酸カルシウム類微粒子及びオボアルブミンのフルオレセイン結合体を含むホスファチジルコリン小粒子を生成した。リン酸カルシウム類微粒子およびオボアルブミンのフルオレセイン結合体を含むホスファチジルコリン小粒

子は、マイクロカプセルのコア(芯)を形成するものである。

[0149] (3) 蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルの形成

リン酸カルシウム類微粒子及びオボアルブミンのフルオレセイン結合体を含むホスファチジルコリン小粒子が分散されたpH7.60の1.0SBF溶液をポリ瓶に移し、36.5℃のインキュベータ内で1日間振盪攪拌した。リン酸カルシウム類が微粒子表面及び内部へと成長し、これにより、リン酸カルシウム類微粒子及びオボアルブミンのフルオレセイン結合体を含むホスファチジルコリン小粒子の表面を被覆した。この結果、蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルが作製された。その後インキュベータ内から溶液を取り出し、超遠心分離器を用いて蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを回収し超純水を用いて洗浄を行った(5000 rpm, 5 min)。この洗浄操作を3回繰り返し行った。

[0150] 収集したマイクロカプセルについて、走査型電子顕微鏡(SEM)(SU6600, 日立ハイテクノロジーズ)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX)(Xflash 5010, BRUKER)を用いて観察した。

[0151] (4) 結果と考察

図20にpH 7.60の1.0SBF浸漬後に得られた蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真とEDX分析結果を示す。図20(a)はSEM写真である。図20(b)は同試料の高倍率のSEM写真であり、図20(c)はそのEDX測定結果である。

[0152] 図20(a), (b)よりpH7.60の1.0SBFに1日間浸漬した蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類微粒子を含むホスファチジルコリン小粒子の表面が針状結晶で構成される薄膜で被覆されていることがわかった。また、図20(c)において、蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルの表面のEDX結果においてCaとPのピークが検出された。これらの結果から、リン酸カルシウム類微粒子及びオボアルブミンのフルオレセイン結合体を含む小粒子をpH 7.60の1.0SBFに浸漬することにより、リン酸カルシウム類微粒子からリン酸カルシウム類が表面及び内部へと成長し、リン酸カルシウム類微粒子及びオボア

ルブミンのフルオレセイン結合体を含むホスファチジルコリン小粒子を被覆したと考えられる。また、図20 (a)において、観察した全てのリン酸カルシウム類微粒子及びオボアルブミンのフルオレセイン結合体を含むホスファチジルコリン小粒子がリン酸カルシウム類で被覆されており、高い生産性が示された。再現実験においても同様の結果が得られたことから、今回の方法は再現性が高いと考えられる。

[0153] (5) HEK293細胞を用いたタンパク導入実験

上記で作製した蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを用い、HEK293細胞を用いたタンパク導入実験を行った。以下に実験手順を記す。

[0154] 蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを約 1.5×10^4 個/mlの濃度で含む溶液 20 mlを遠心分離機を用いて遠心分離し ($1,000 \times g$ 、10 min) (g は重力加速度)、沈殿した蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを10 mlのPBS (リン酸緩衝生理食塩水)に懸濁し再び遠心分離を行った ($1,000 \times g$ 、10 min)。上清を取り除き、10mlの70%エタノール溶液を加え30分間静置し滅菌した。遠心分離機を用いて蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを分離した ($1,000 \times g$ 、10 min)。その後蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルをPBSで2回洗浄した。最終的に、10 mlのPBSに蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した。

[0155] 続いて、この溶液200 μ lを遠心分離し ($8,000 \times g$ 、1 min)、500 μ lの培地に再懸濁した。4穴プレートにHEK293細胞を撒き、80%程度コンフルエントになったところで、本発明の蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した培地に交換した。

[0156] 蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル添加24時間後、72時間後に蛍光顕微鏡 (Zeiss Axiovert 200)を用いて観察した。

[0157] 蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセル添加後24時間後の観察において、蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを取

り込んだ細胞において緑色蛍光が見られた。72時間後においても蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを取り込んだ細胞において緑色蛍光が見られた。

[0158] これらの結果より、蛍光タンパク含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを用いたタンパク導入に成功した。

[0159] 実施例 1 2

3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセル

(1) リン酸カルシウム類微粒子及び3種類のDNAを含むホスファチジルコリン小粒子の作製

1. 0SBFにトリスヒドロキシメチルアミノメタンを加えて25.0℃でpH 8.60に調整し、リン酸カルシウム類微粒子を析出した。析出したリン酸カルシウム類微粒子を、孔径50 nmのセルロース混合エステル製の濾紙(MF-ミリポア、Millipore, USA)を用いた吸引濾過によって回収した。超純水で洗浄後、濾紙を乾燥機で1日乾燥させたのちリン酸カルシウム類微粒子を回収した。100 mlのエタノールにホスファチジルコリン20 mg、リン酸カルシウム類微粒子0.2mg、DNAとしてp-ECFP-N1 10 µg、pmCherry-Ncre 10 µg、phChRWR-Ve 10 µgを加え、超音波振動を加えて分散させた。これをナスフラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて減圧蒸留した。フラスコの底に薄膜層が生成した。この薄膜層にはリン酸カルシウム類微粒子、p-ECFP-N1、pmCherry-Ncre及びphChRWR-Veが含まれている。これに(1)で調製したpH 7.60の1.0SBFを50 ml加え超音波振動を加え分散させることにより、リン酸カルシウム類微粒子、p-ECFP-N1、pmCherry-Ncre及びphChRWR-Veを含むホスファチジルコリン小粒子を生成した。リン酸カルシウム類微粒子、p-ECFP-N1、pmCherry-Ncre及びphChRWR-Veを含むホスファチジルコリン小粒子は、マイクロカプセルのコア(芯)を形成するものである。

[0160] (2) pH 7.60の1.0SBF浸漬による3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルの形成

リン酸カルシウム類微粒子、p-ECFP-N1、pmCherry-Ncre及びphChRWR-Veを

含むホスファチジルコリン小粒子が分散された1.0SBF溶液をポリ瓶に移し、36.5℃のインキュベータ内で1日間振盪攪拌した。リン酸カルシウム類が微粒子表面及び内部へと成長し、これにより、リン酸カルシウム類微粒子、p-ECFP-N1、pmCherry-Ncre及びphChRWR-Veを含むホスファチジルコリン小粒子の表面を被覆した。この結果、3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルが作製された。その後インキュベータ内から溶液を取り出し、超遠心分離器を用いて3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを回収し超純水を用いて洗浄を行った（5000 rpm, 5 min）。この洗浄操作を3回繰り返し行った。

[0161] 収集したマイクロカプセルについて、走査型電子顕微鏡(SEM) (SU6600, 日立ハイテクノロジーズ)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX) (Xflash 5010, BRUKER)を用いて観察した。

[0162] (3) 結果と考察

pH 7.60の1.0SBF浸漬後の走査型電子顕微鏡観察、及びエネルギー分散型X線分析

図21にpH 7.60の1.0SBF浸漬後に得られた3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルのSEM写真とEDX分析結果を示す。図21 (a)はSEM写真である。図21 (b)及び図21 (c)は同試料の高倍率のSEM写真であり、図21 (d)はそのEDX測定結果である。

[0163] 図21 (a), (b), (c)よりpH7.60の1.0SBFに1日間浸漬したリン酸カルシウム類微粒子および3種類のDNAを含むホスファチジルコリン小粒子の表面が針状結晶で構成される薄膜で被覆されていることがわかった。また、図21 (d)において、3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルの表面のEDX結果においてCaとPのピークが検出された。これらの結果から、リン酸カルシウム類微粒子、p-ECFP-N1、pmCherry-Ncre及びphChRWR-Veを含む小粒子をpH 7.60の1.0SBFに浸漬することにより、リン酸カルシウム類微粒子からリン酸カルシウム類が表面及び内部へと成長し、リン酸カルシウム類微粒子、p-ECFP-N1、pmCherry-Ncre及びphChRWR-Veを含むホスファチジルコリン小

粒子を被覆したと考えられる。また、図21 (a)および図21 (b)において、観察した全てのリン酸カルシウム類微粒子、p-ECFP-N1、pmCherry-Ncre及びpChRWR-Veを含むホスファチジルコリン小粒子がリン酸カルシウム類で被覆されており、高い生産性が示された。再現実験においても同様の結果が得られたことから、今回の方法は再現性が高いと考えられる。

[0164] (4) HEK293細胞を用いた遺伝子導入実験

作製した3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを用い、HEK293細胞を用いた遺伝子導入実験を行った。以下に実験手順を記す。

[0165] 3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを約 1.5×10^4 個/mlの濃度で含む溶液 20 mlを遠心分離機を用いて遠心分離し ($1,000 \times g$ 、10 min) (g は重力加速度)、沈殿したDNA含有リン酸カルシウム類マイクロカプセルを10 mlのPBS (リン酸緩衝生理食塩水) に懸濁し再び遠心分離を行った ($1,000 \times g$ 、10 min)。上清を取り除き、10mlの70%エタノール溶液を加え30分間静置し滅菌した。その後遠心分離機を用いて2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルをPBSで2回洗浄した ($1,000 \times g$ 、10 min)。最終的に、10 mlのPBSに2種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した。

[0166] 続いて、この溶液200 μ lを遠心分離し ($8,000 \times g$ 、1 min)、500 μ lの培地に再懸濁した。4穴プレートにHEK293細胞を撒き、80%程度コンフルエントになったところで、3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセルを懸濁した培地に交換した。

[0167] 3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセル添加24時間後、72時間後に蛍光顕微鏡(Zeiss Axiovert 200)を用いて観察し、ECFP、mCherry及びhChRWR-Veの発現を調べた。

[0168] 単一の細胞において、ECFP の青色蛍光、mCherryの赤色蛍光、及びhChRWR-Veの緑色蛍光の3種類が同時に発現していた。EGFP、mCherry及びhChRWR-Veの3種類が同時に細胞に取り込まれ、同時に発現していることが分かった。

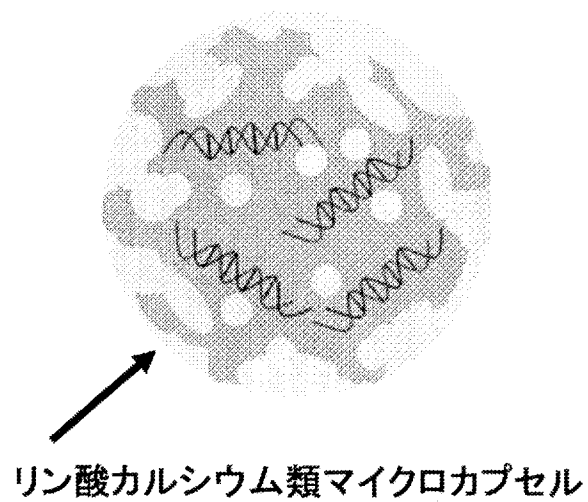
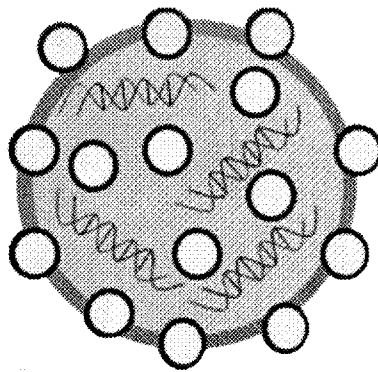
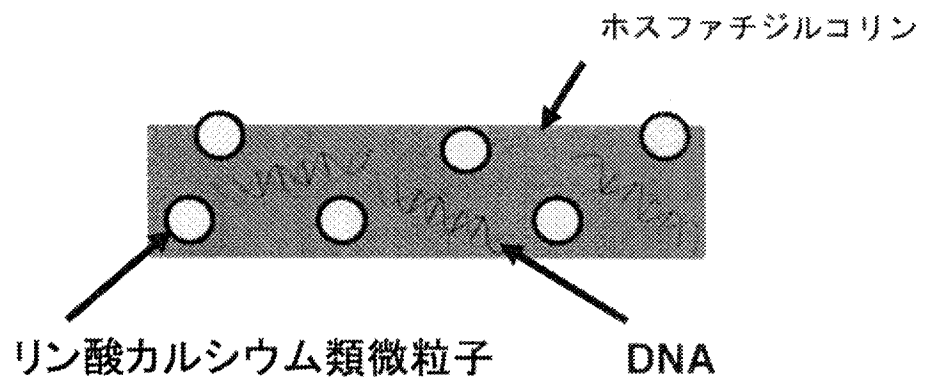
[0169] この結果より、3種類のDNAを含有するリン酸カルシウム類マイクロカプセ

ルを用いた3種類の遺伝子の同時導入に成功、高い割合で3種類の遺伝子を同時に発現させ得ることが明らかになった。

請求の範囲

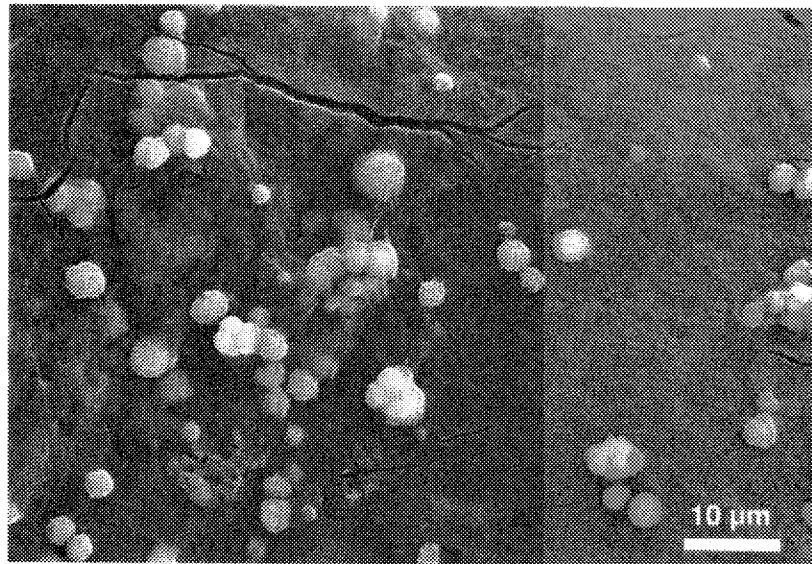
- [請求項1] コア-シェル構造を有するマイクロカプセルであって、コアが油性物質を含み、シェルがリン酸カルシウム類から構成される、マイクロカプセル。
- [請求項2] コアに核酸物質、タンパク質又は薬物をさらに含む、請求項1に記載のマイクロカプセル。
- [請求項3] 核酸物質が、mRNA、DNA、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA、リポザイム、遺伝子、プラスミド、デコイオリゴヌクレオチド、DNAザイムからなる群から選ばれる、請求項2に記載のマイクロカプセル。
- [請求項4] 油性物質が油又はロウ様の物質である、請求項2に記載のマイクロカプセル。
- [請求項5] 前記油性物質が植物油もしくはリン脂質である請求項1～4のいずれかに記載のマイクロカプセル。
- [請求項6] コア-シェル構造を有し、コアが核酸物質、タンパク質及び薬物からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質並びに油性物質を含み、シェルがリン酸カルシウム類から構成されるマイクロカプセル、細胞への物質の導入剤。
- [請求項7] 油性物質と種晶を混合し、この混合物をリン酸カルシウム類形成溶液に分散してリン酸カルシウム類から構成されるシェルを成長させることを特徴とする、請求項1～5のいずれかに記載のマイクロカプセルの製造方法。
- [請求項8] 種晶がリン酸カルシウム類微粒子である、請求項7に記載のマイクロカプセルの製造方法。

[図1]

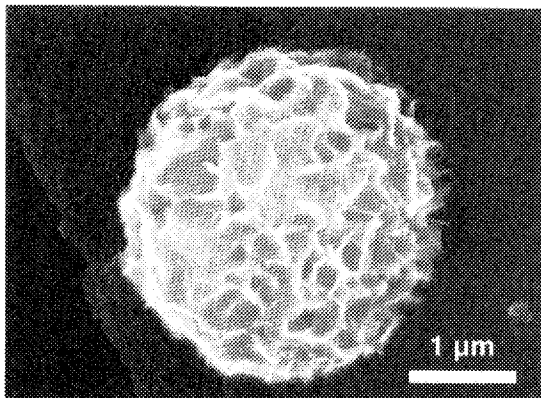


[図2]

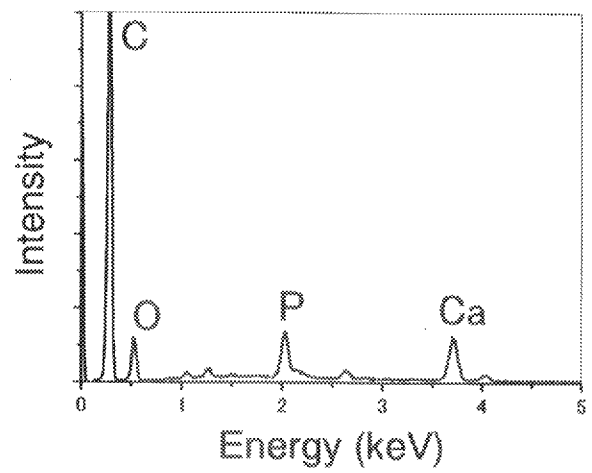
(a)



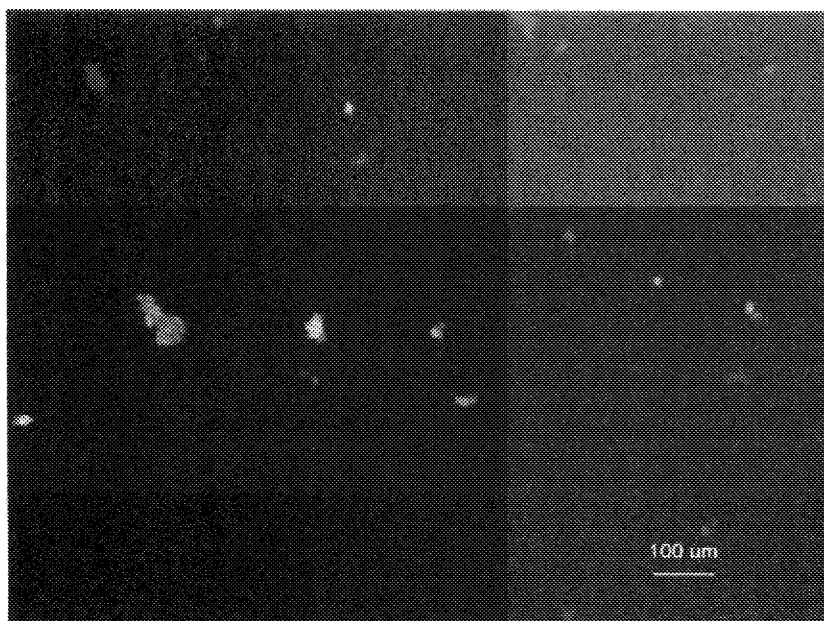
(b)



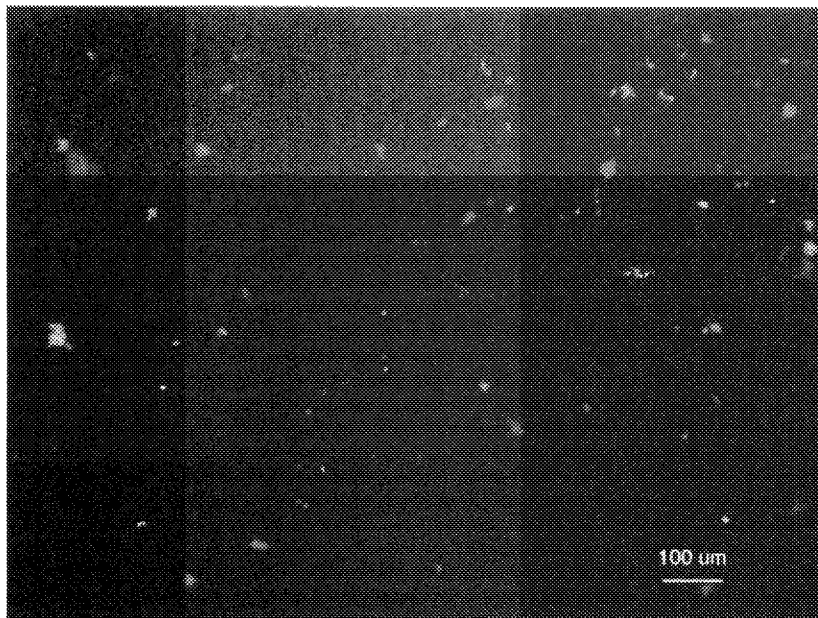
(c)



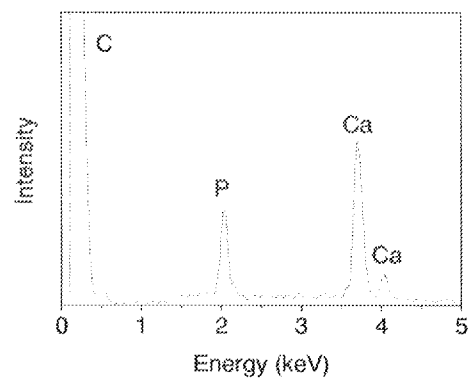
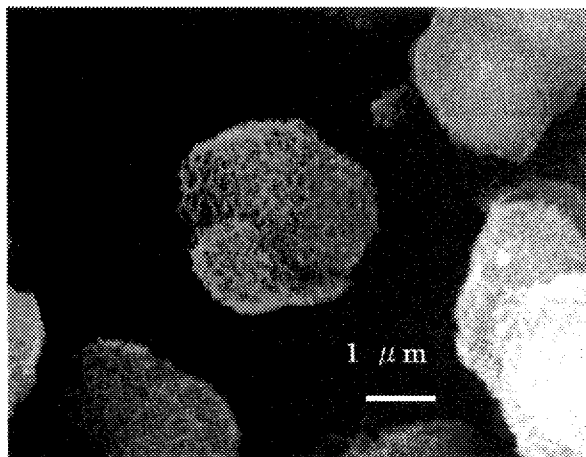
[図3]



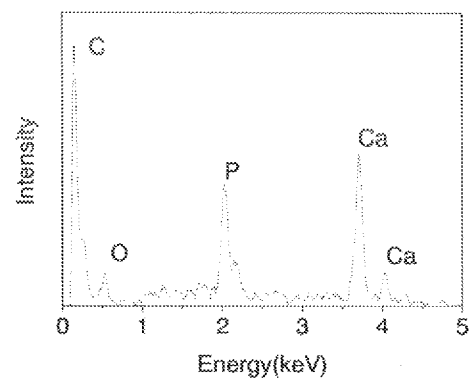
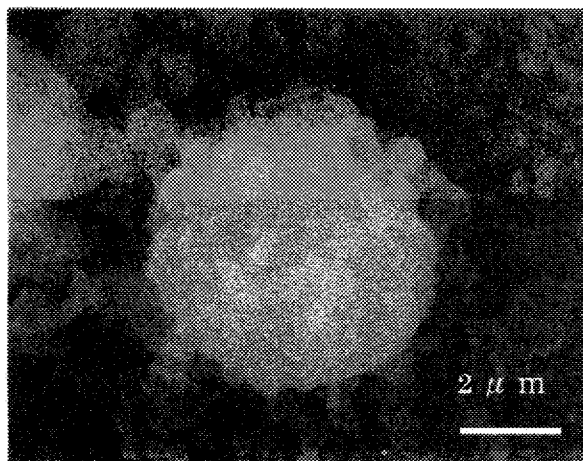
[図4]



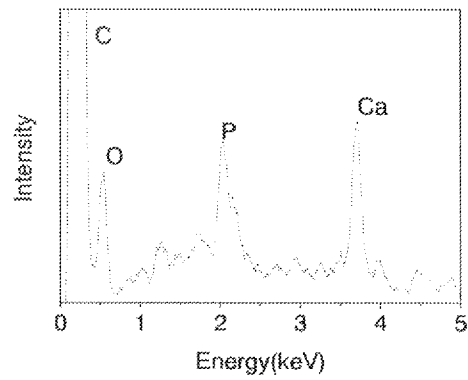
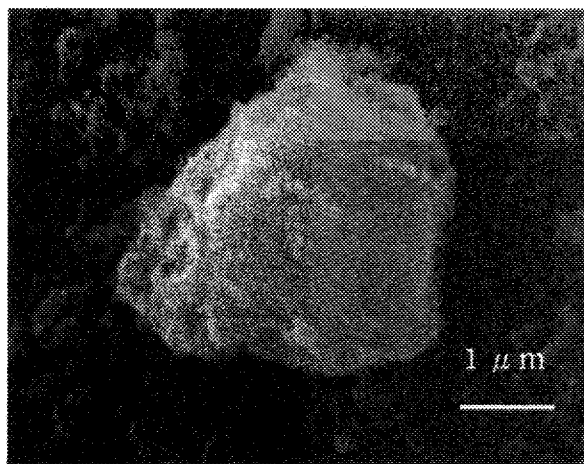
[図5]



[図6]

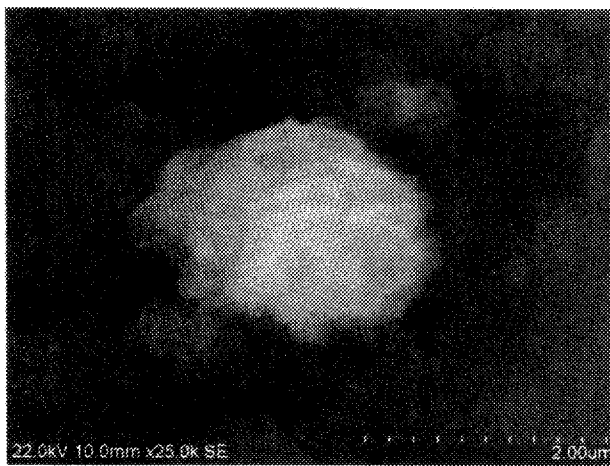


[図7]

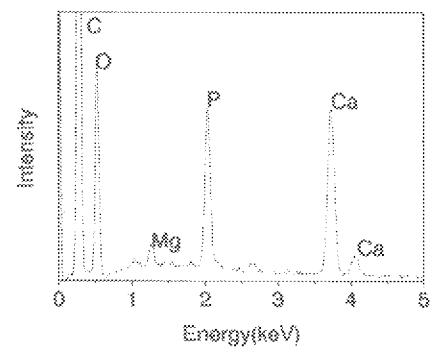


[図8]

(a)

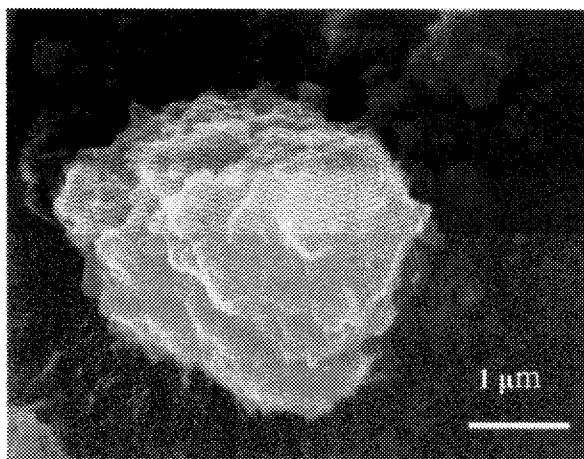


(b)

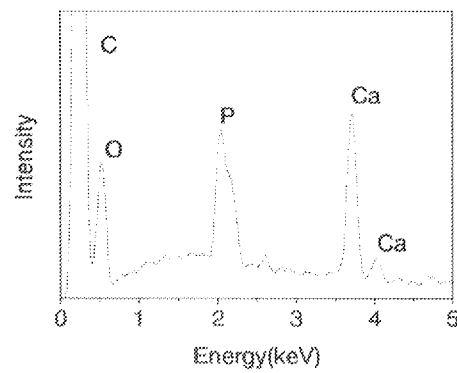


[図9]

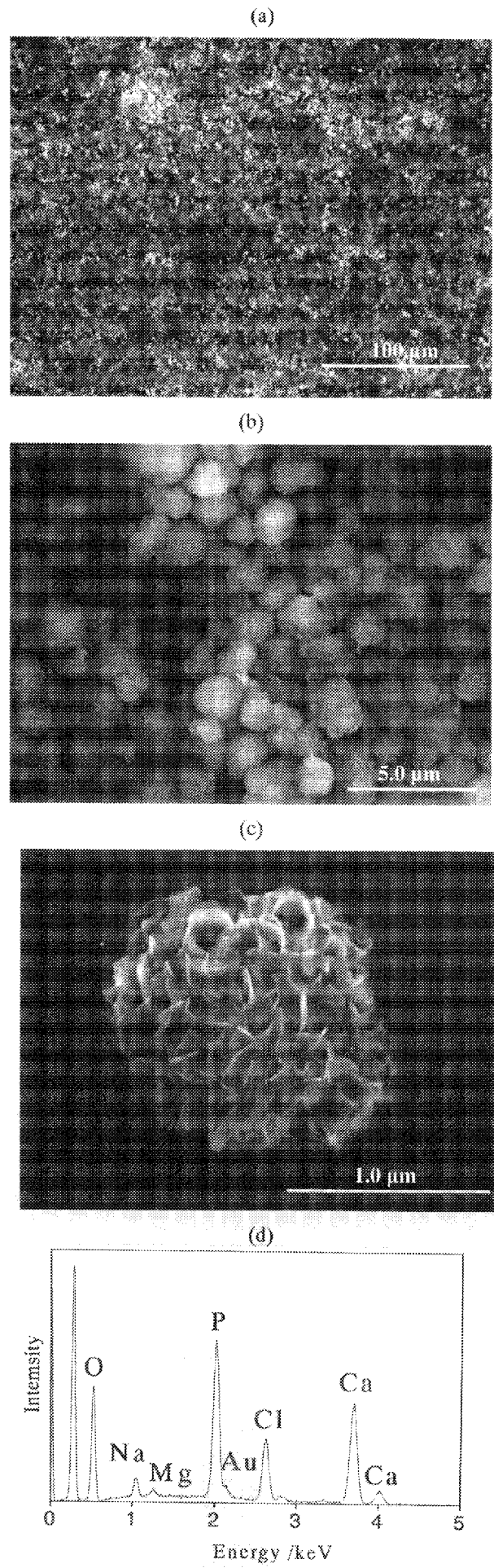
(a)



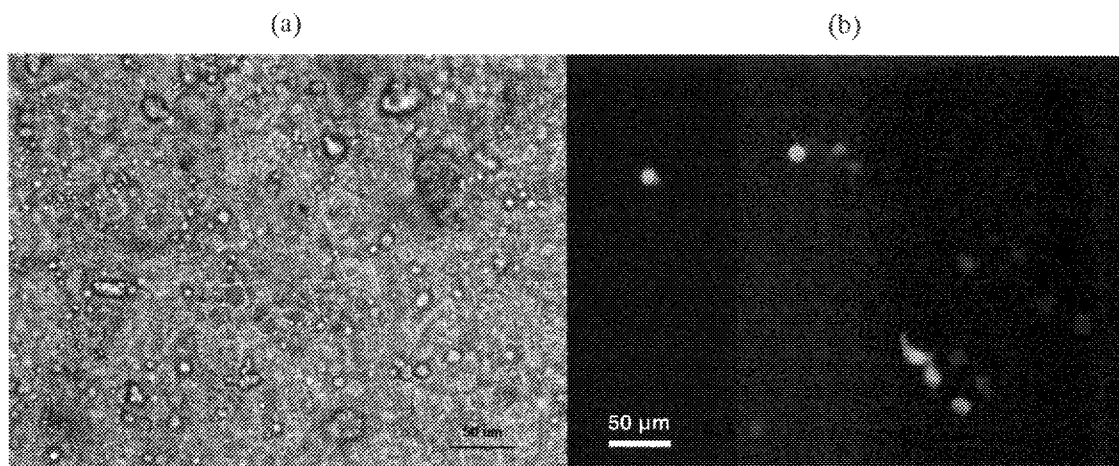
(b)



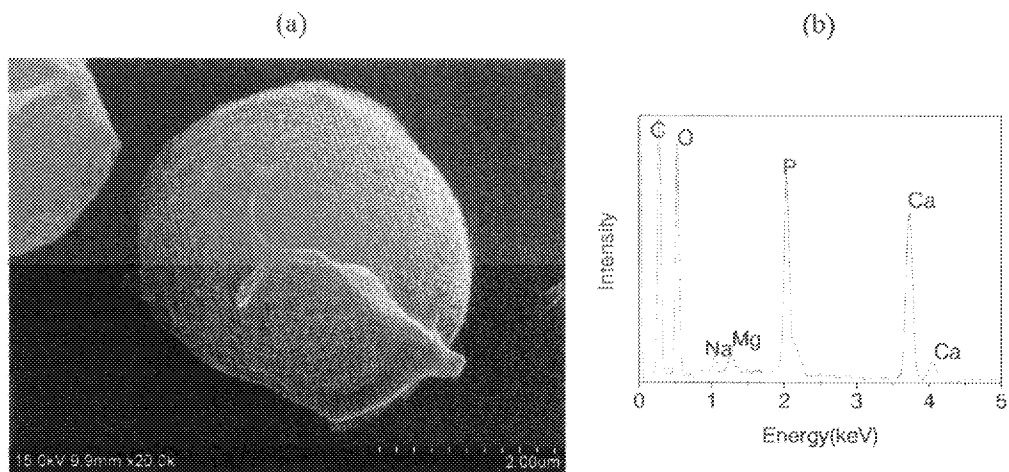
[図10]



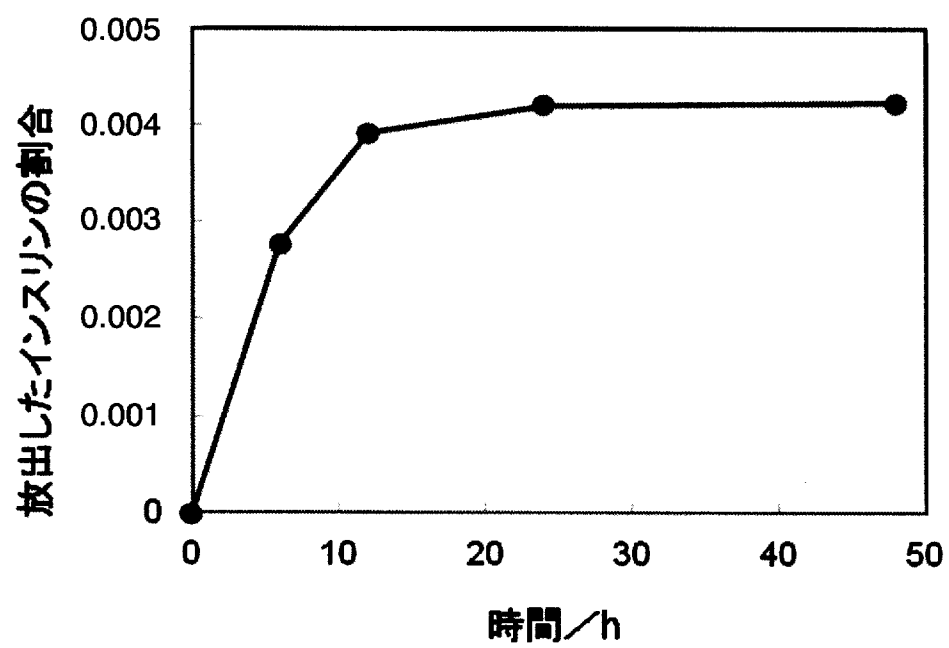
[図11]



[図12]

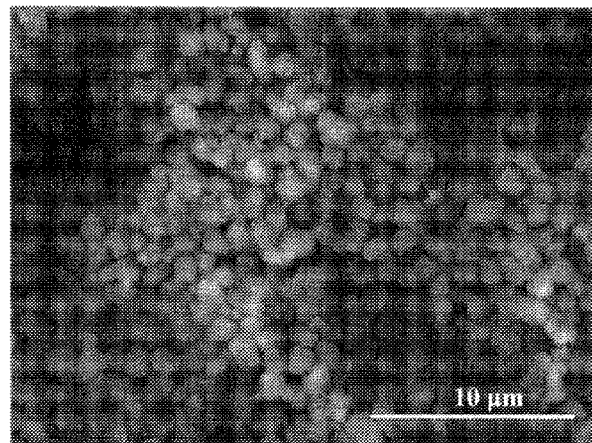


[図13]

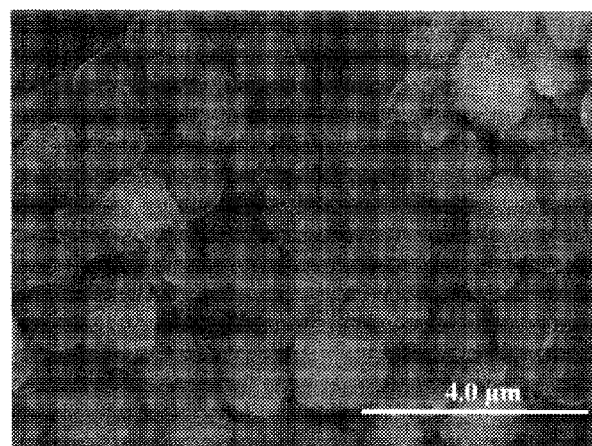


[図14]

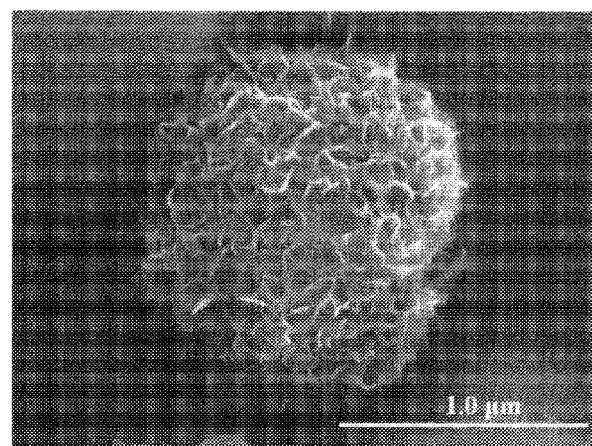
(a)



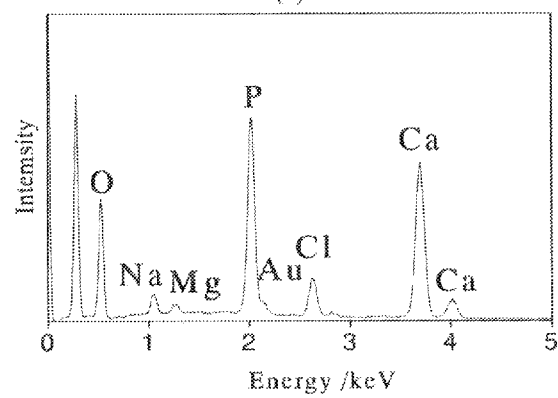
(b)



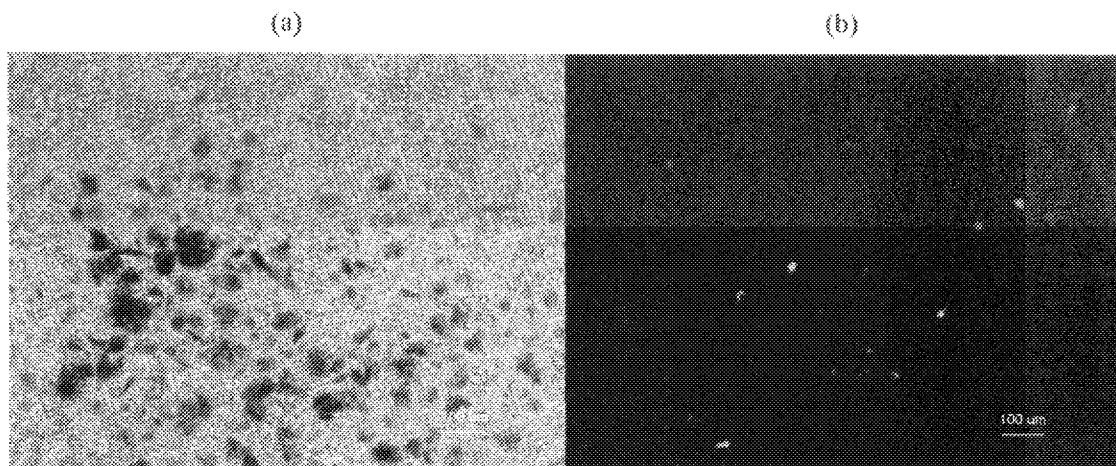
(c)



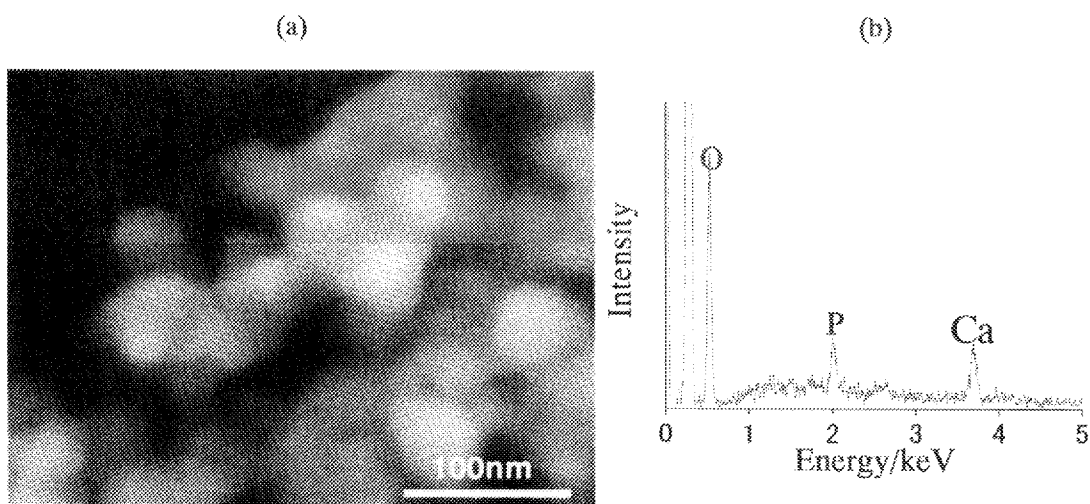
(d)



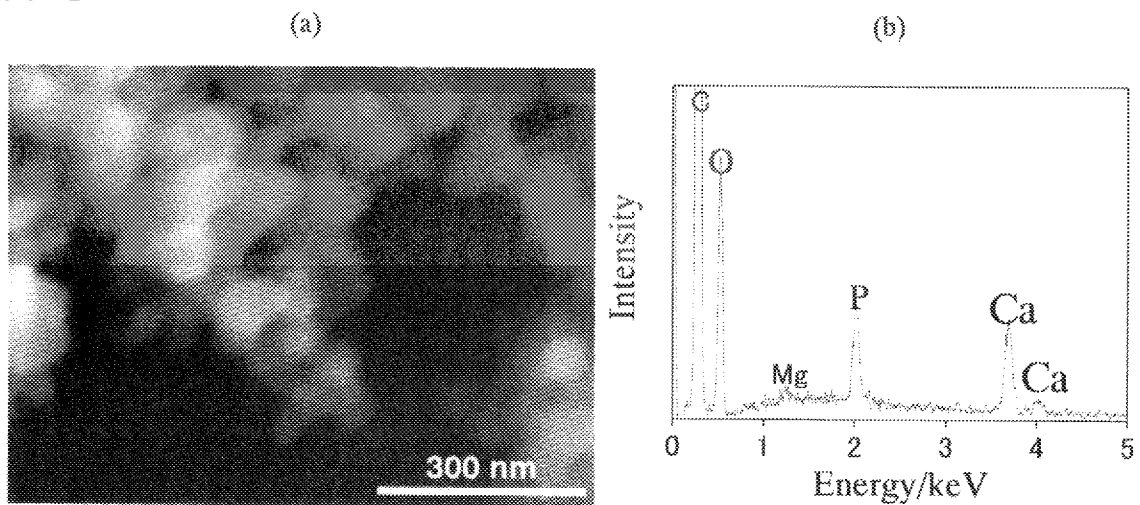
[図15]



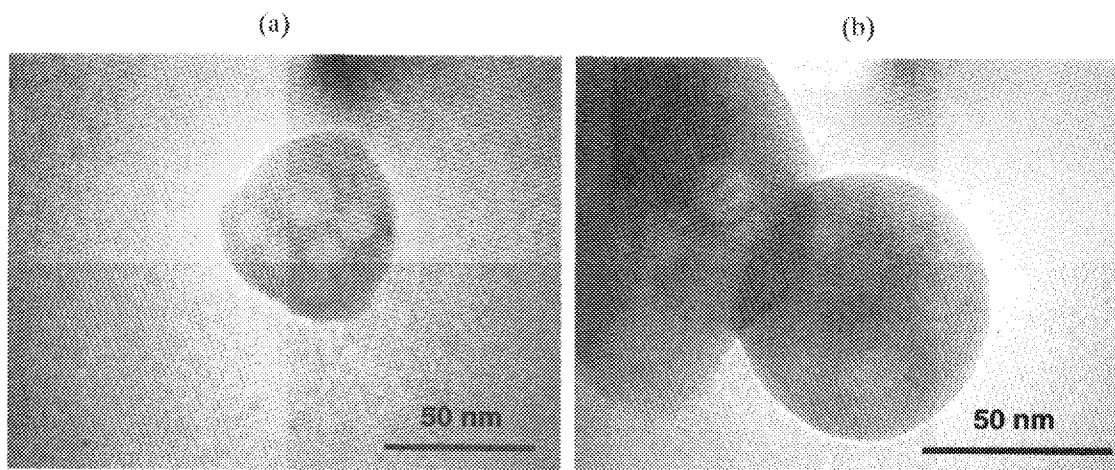
[図16]



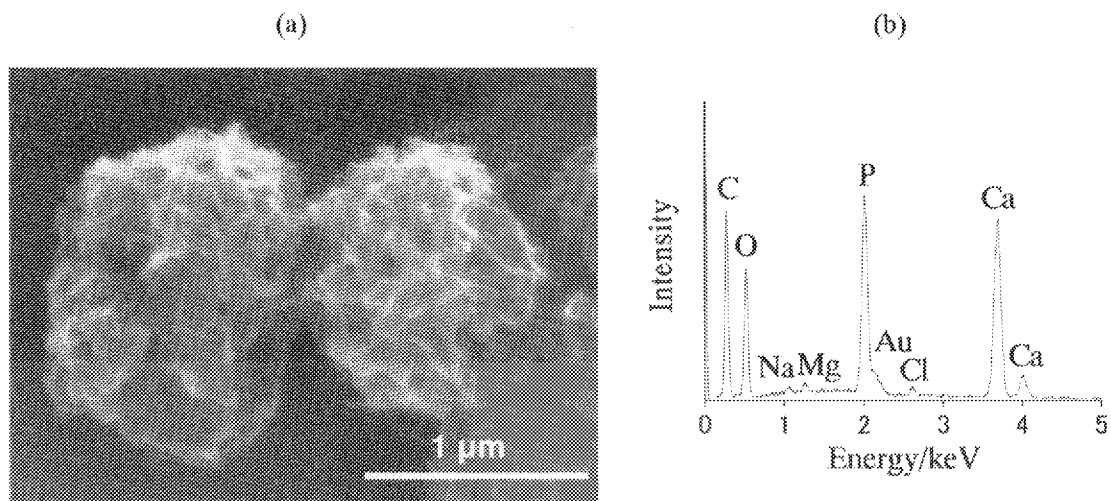
[図17]



[図18]

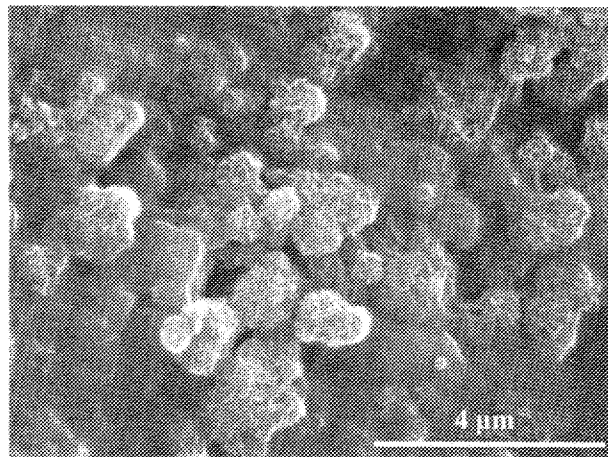


[図19]

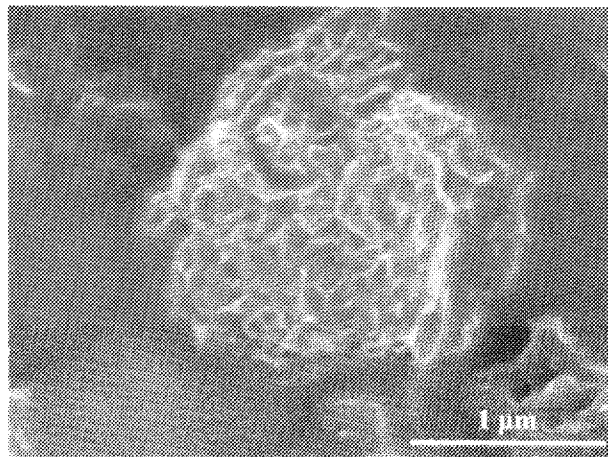


[図20]

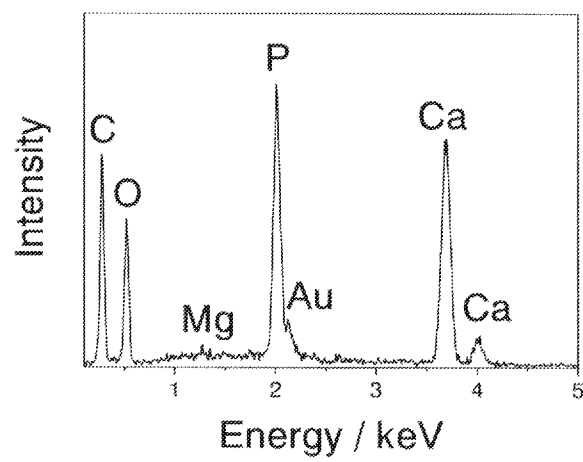
(a)



(b)

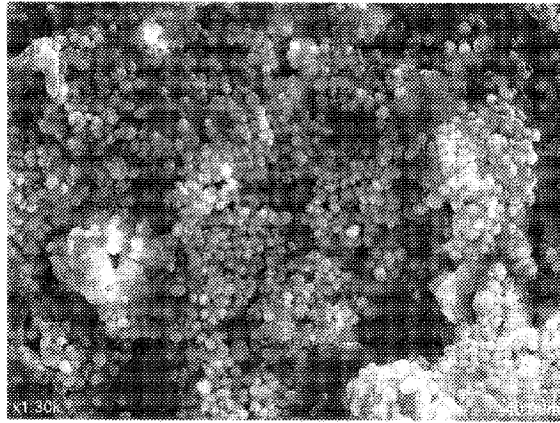


(c)

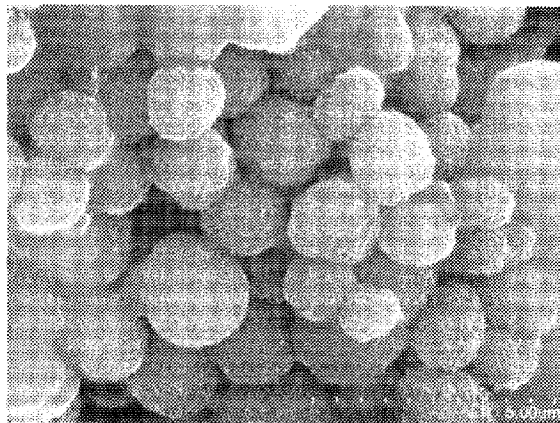


[図21]

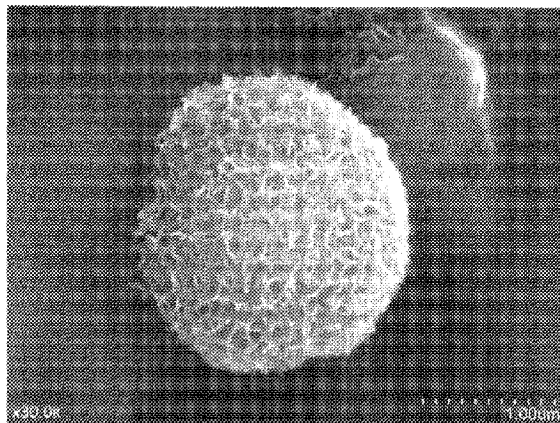
(a)



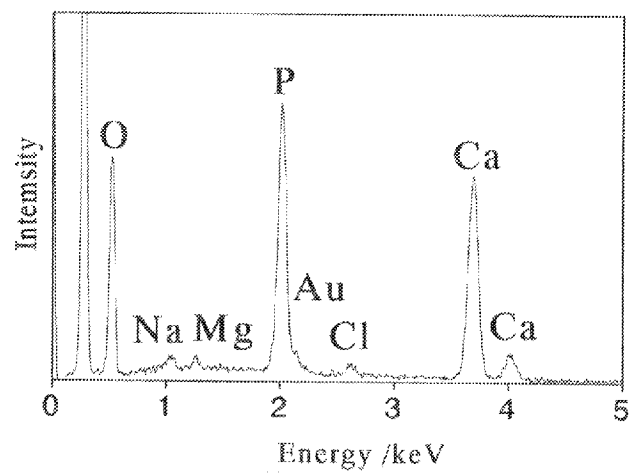
(b)



(c)



(d)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059689

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/44(2006.01)i, A61K9/50(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K47/44, A61K9/50, A61K31/7088, A61K47/24, A61K48/00, A61P43/00, C12N15/09, C12N15/113, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2006-43689 A (Lion Corp.), 16 February 2006 (16.02.2006), claims 1 to 12; examples 17 to 19 (Family: none)	1, 5 2-4, 6-8
X A	WO 2011/039952 A1 (Sangi Co., Ltd.), 07 April 2011 (07.04.2011), paragraphs [0033] to [0046]; tables 1 to 17; examples 1 to 49; claims 1 to 15 (Family: none)	1-3, 6 4, 5, 7, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 May, 2012 (11.05.12)

Date of mailing of the international search report
22 May, 2012 (22.05.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059689

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2004-81754 A (Cluster Technology Co., Ltd., Millennium Gate Technology Co., Ltd., Takeshi YAO), 18 March 2004 (18.03.2004), claims 1 to 9; paragraphs [0018], [0026], [0062], [0064] to [0066] (Family: none)	1-8
A	WO 2002/096396 A1 (Proteck Co., Ltd., LTT Institute Co., Ltd.), 05 December 2002 (05.12.2002), entire text & US 2004/0185113 A1 & EP 1398025 A1	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K47/44(2006.01)i, A61K9/50(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K47/44, A61K9/50, A61K31/7088, A61K47/24, A61K48/00, A61P43/00, C12N15/09, C12N15/113, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2006-43689 A (ライオン株式会社) 2006.02.16 請求項 1-12, 実施例 17-19 (ファミリーなし)	1, 5 2-4, 6-8
X A	WO 2011/039952 A1 (株式会社サンギ) 2011.04.07 [0033]-[0046], 表 1-17, 実施例 1-49, 請求項 1-15 (ファミリーなし)	1-3, 6 4, 5, 7, 8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 1 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高橋 樹理

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

4 4 9 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2004-81754 A (クラスターテクノロジー株式会社, 株式会社ミレニウムゲートテクノロジー, 八尾 健) 2004. 03. 18 請求項 1-9, [0018], [0026], [0062], [0064]-[0066] (ファミリーなし)	1-8
A	WO 2002/096396 A1 (株式会社プロテック, 株式会社エルティーティ ー研究所) 2002. 12. 05, 全文 & US 2004/0185113 A1 & EP 1398025 A1	1-8