

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-154282

(P2005-154282A)

(43) 公開日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 9/127	A 6 1 K 9/127	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/24	A 6 1 K 47/24	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/00 C	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-390506 (P2003-390506)	(71) 出願人	502189775 メビオファーム株式会社 東京都港区赤坂8-3-20
(22) 出願日	平成15年11月20日(2003.11.20)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100089048 弁理士 浅野 康隆
		(74) 代理人	100101317 弁理士 的場 ひろみ
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ガス封入りポソームの製造法

## (57) 【要約】

【課題】 超音波診断及び超音波を利用した治療に有用なガス封入りポソームの提供。

【解決手段】 内容積の20～80%リポソーム懸濁液を含有する密封容器の空隙部にフッ化物ガス又は窒素ガスを充填し、超音波処理することを特徴とするガス封入りポソームの製造法。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

内容積の 20 ~ 80 % リポソーム懸濁液を含有する密封容器の空隙部にフッ化物ガス又は窒素ガスを充填し、超音波処理することを特徴とするガス封入リポソームの製造法。

**【請求項 2】**

リポソームが、カチオン性脂質含有リポソームである請求項 1 記載の製造法。

**【請求項 3】**

リポソームが、標的細胞、標的組織又は標的病巣に対するリガンドを有するリポソームである請求項 1 又は 2 記載の製造法。

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の製造法により得られるガス封入リポソーム。

10

**【請求項 5】**

請求項 4 記載のガス封入リポソームを含有する超音波診断用剤。

**【請求項 6】**

請求項 4 記載のガス封入リポソームを含有することを特徴とする、投与後標的部位に低周波超音波照射することにより使用される超音波治療薬。

**【請求項 7】**

請求項 4 記載のガス封入リポソーム、及び遺伝子類を含有することを特徴とする、低周波超音波処理による細胞内遺伝子導入用組成物。

**【請求項 8】**

請求項 4 記載のガス封入リポソーム、及び遺伝子類を培養細胞に添加し、次いで低周波超音波照射することを特徴とする培養細胞への遺伝子類の導入方法。

20

**【請求項 9】**

請求項 4 記載のガス封入リポソーム、及び薬効成分を含有することを特徴とする、投与後標的部位に低周波超音波照射することにより使用される超音波治療薬。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、超音波診断用剤並びに超音波治療薬として有用なガス封入リポソーム及びその製造法に関する。

30

**【背景技術】****【0002】**

超音波診断装置は、産婦人科、循環器科、泌尿器科などの広い範囲で使用されている。これに対し、超音波イメージング剤として、気体含有微小粒子（マイクロバブル）を投与した後に超音波照射により影像して診断する方法が開発されている（特許文献 1 ~ 5 参照）。

**【0003】**

しかしながら、従来のマイクロバブルは、アルブミンで形成された巨大粒子中に気体を含有させるものであることから、粒子径が 2 ~ 6  $\mu\text{m}$  と大きく、深部組織への移行性は低かった。

40

**【特許文献 1】** 米国特許第 4 5 7 2 2 0 5 号

**【特許文献 2】** 米国特許第 4 7 1 8 4 3 3 号

**【特許文献 3】** 米国特許第 4 7 7 4 9 5 8 号

**【特許文献 4】** 米国特許第 4 8 4 4 8 5 2 号

**【特許文献 5】** 米国特許第 4 9 5 7 6 5 6 号

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

従って、本発明の目的は、粒子径が小さく、安定したマイクロバブルを簡便な操作で製造する方法、かくして得られたマイクロバブル及びその利用方法を提供することにある。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

そこで本発明者は、種々検討したところ、予め作成したリポソームを懸濁液とし、これを一定の空隙率を有する密封容器に添加し、この空隙部にフッ化物ガス又は窒素ガスを充填し、次いで超音波処理を行えば、粒子径の小さなガス封入リポソームが安定して調製できることを見出した。また、かくして得られたガス封入リポソームの粒子径は、予め作成したリポソームの粒子径に依存するので、粒子径が小さなガス封入リポソームが安定して得られるため、超音波診断剤として有用であることを見出した。またこのガス封入リポソームは、低周波超音波照射により容易に爆発するので、原料リポソームとして標的細胞等に対するリガンドを結合させたものを用いれば、当該細胞等に対するリガンドを有するガス封入リポソームが得られ、このリポソームは標的部位で選択的に爆発させることができ、超音波治療薬や遺伝子導入用組成物として有用であることを見出した。

10

## 【0006】

すなわち、本発明は、内容積の20～80%リポソーム懸濁液を含有する密封容器の空隙部にフッ化物ガス又は窒素ガスを充填し、超音波処理することを特徴とするガス封入リポソームの製造法、及びかくして得られるガス封入リポソームを提供するものである。

## 【0007】

また本発明は、当該ガス封入リポソームを含有する超音波診断用剤を提供するものである。

また本発明は、当該ガス封入リポソームを含有することを特徴とする、投与後標的部位に低周波超音波照射することにより使用される超音波治療薬を提供するものである。

20

さらに本発明は、当該ガス封入リポソーム、及び遺伝子類を含有することを特徴とする、低周波超音波処理による細胞内遺伝子導入用組成物を提供するものである。

さらにまた、本発明は、当該ガス封入リポソーム、及び遺伝子類を培養細胞に添加し、次いで低周波超音波照射することを特徴とする培養細胞への遺伝子類の導入方法を提供するものである。

さらにまた、本発明は、当該ガス封入リポソーム、及び薬効成分を含有することを特徴とする、投与後標的部位に低周波超音波照射することにより使用される超音波治療薬を提供するものである。

## 【発明の効果】

30

## 【0008】

本発明方法によれば、粒子径が原料リポソームに依存するので、小さく、かつ一定の粒子径を有するガス封入リポソームが簡便かつ安定して調製できる。また、小さい粒子径を有することから、細動脈等の血栓や動脈硬化巣へも大量のガス封入リポソームを移行させることができ、従来診断できなかった病巣部の画像化も可能となるとともに、微小血管の血栓や動脈硬化巣の治療が可能となる。

また、本発明のガス封入リポソームは、投与後標的部位に低周波超音波照射することにより、当該部位で内封されたガスの微小気泡によるキャビテーションを生じ爆発作用を有する。従って、血栓や動脈硬化巣等の破壊による治療が可能となる。また、リポソームに病巣部位に対するリガンドを結合させておけば、その治療はより部位特異的になる。in vivo又はin vitroにおいて、ガス封入リポソームと遺伝子類とを同時に標的細胞に作用させ、低周波超音波照射すれば、ガスの微小気泡が生じキャビテーションによって標的細胞に極めて効率良く遺伝子類を導入できる。

40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0009】

本発明においては、予めリポソームを調製しておくことに特徴がある。本発明に用いられるリポソームとは、基本的に膜構成成分として脂質類を含有するリポソームであり、その内部には薬物、遺伝子類等を有していてもよい。ここでリポソームの膜構成成分として用いられる脂質類としては、リン脂質、グリセロ糖脂質及びスフィンゴ糖脂質の他、これらの脂質に、1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基又は第4級アンモニウム基が導

50

入されたカチオン性脂質、これらの脂質にポリアルキレングリコールが導入された脂質、さらに各種細胞、組織等に対するリガンドが結合した脂質類が挙げられる。

【0010】

リン脂質としては、例えばホスファチジルコリン（大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン等）、ホスファチジエタノールアミン（ジステアロイルホスファチジエタノールアミン等）、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、水素添加リン脂質等の天然又は合成のリン脂質等が挙げられる。

10

【0011】

グリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリド等が挙げられる。スフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシド等が挙げられる。

【0012】

カチオン性脂質としては、上記リン脂質、グリセロ糖脂質又はスフィンゴ糖脂質に、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、トリアルキルアンモニウム基、モノアルキルオキシアルキル - ジアルキルアンモニウム基、ジアシルオキシアルキル - モノアルキルアンモニウム基等の第4級アンモニウム基が導入された脂質が挙げられる。また、ポリアルキレングリコール修飾脂質としては、上記リン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質に、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等が修飾した脂質、例えばジ - C<sub>12-24</sub>アシル - グリセロール - ホスファチジエタノールアミン - N - P E G等が挙げられる。

20

【0013】

また必要に応じて膜安定化剤としてコレステロール類、抗酸化剤としてトコフェロール類、ステアリルアミン、ジセチルホスフェート、ガレグリオシドを用いてもよい。

【0014】

また、標的細胞、標的組織、標的病巣に対するリガンドとしては、トランスフェリン、葉酸、ヒアルロン酸、ガラクトース、マンノースなどの癌細胞に対するリガンド；R G Dペプチド、sigma proteinなどの血栓に対するリガンド等が挙げられる。また、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体もリガンドとして使用できる。

30

【0015】

また、予め作成されるリポソームの内部には、水相であればよく特に薬効成分、遺伝子類等を含みなくてもよいが、前記治療薬や遺伝子導入用組成物として使用する場合には、含有していてもよい。このような薬効成分としては、例えばドキソルビシン、5 - F U、シスプラチン、オギザリプラチン等の白金誘導体、タキソール、カンプトテシン等の癌治療薬；t - P A、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ等の血栓治療薬；プロスタグランジン等の動脈硬化症治療薬；動脈閉塞症、パーチャ病に対するNFカッパーB、デコイ等が挙げられる。また、遺伝子類としては、DNA、RNA、アンチセンスDNA、siRNA、デコイ、治療用オリゴヌクレオチド等が挙げられる。

40

【0016】

リポソームの製造には、公知のリポソームの調製法を適用することができ、例えばバンガム（Bangham）らのリポソーム調製法 [ ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 13, 238(1965) ]、エタノール注入法 [ ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J. Cell. Biol.), 66, 621(1975) ]、フレンチプレス法 [ フェブス・レター (FEBS Lett.), 99, 210(1979) ]、凍結融解法 [ アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (Arch. Biochem. Biophys.), 212, 186(1981) ]、逆相蒸発法 [ プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユース・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 4194(1978) ] 等が挙げられる。例え

50

ば、脂質類等を有機溶媒に溶解し、これに水性溶液を加え、次いで、超音波処理してリポソーム懸濁液を得る。次いで必要によりこれをエクストルーダー及び/又はメンブランフィルターを用いて、整粒する。このとき、粒子径は、 $1\ \mu\text{m}$ 以下、さらに $100\sim 800\ \text{nm}$ 、特に $100\sim 600\ \text{nm}$ に整粒するのが好ましい。

#### 【0017】

得られたリポソーム懸濁液は密封容器に注入する。このとき、容器の空隙率は内容積の $20\sim 80\%$ 、さらに $30\sim 80\%$ 、特に $50\sim 80\%$ にするのが好ましい。 $20\%$ 未満では、得られるリポソームのガス導入率が低すぎる。一方、 $80\%$ を超えると経済的でない。

#### 【0018】

この空隙部にフッ化物ガス又は窒素ガスを充填する。フッ化物ガスとしては、硫化ヘキサフルオライド、パーフルオロ炭化水素ガス、例えば、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{C}_2\text{F}_6$ 、 $\text{C}_3\text{F}_8$ 、 $\text{C}_4\text{F}_{10}$ 、 $\text{C}_5\text{F}_{12}$ 、 $\text{C}_6\text{F}_{14}$ 等が挙げられ、 $\text{C}_3\text{F}_8$ 、 $\text{C}_4\text{F}_{10}$ 、 $\text{C}_5\text{F}_{12}$ が特に好ましい。また、窒素ガスも使用できる。充填した後の圧力は1気圧(ゲージ圧)以上、特に $1\sim 1.5$ 気圧が好ましい。充填手段としては、ゴム栓等から注射器等により、注入するのが簡便であるが、注入用シリンダーを用いてもよい。

10

#### 【0019】

次いで超音波処理する。超音波処理は、例えば、 $20\sim 50\ \text{kHz}$ の超音波を $1\sim 5$ 分照射すればよい。当該超音波処理により、リポソーム内部の水溶液とフッ化物ガス又は窒素ガスとが置換し、ガス封入リポソームが得られる。得られたガス封入リポソームの粒子径は、原料リポソームのそれとほぼ同じである。従って、リポソーム調整時に整粒しておけば、粒子径が一定範囲、例えば $1\ \mu\text{m}$ 以下、さらに $50\sim 800\ \text{nm}$ 、特に $100\sim 600\ \text{nm}$ のガス封入リポソームが簡便に得られる。

20

#### 【0020】

なお、フッ化物ガス又は窒素ガスを充填したリポソーム懸濁液含有密封容器を調製しておき、これを病院等に供給すれば、現場で超音波処理するだけで容易にガス封入リポソームを得ることができる。

#### 【0021】

かくして得られたガス封入リポソームは、粒子径が小さく、その粒度分布も一定にすることができるので、微小血管、深部組織等への移行が可能である。従って、ガス封入リポソームを用いれば、従来のマイクロバブルを用いた超音波診断画像よりも、微小血管、深部組織等の画像化が可能になるばかりでなく、その画像もより鮮明になる。本発明のガス封入リポソームを用いた超音波診断は、通常の方法に従って行えばよい。すなわち、本発明のガス封入リポソームを投与後、診断用超音波( $2\sim 6\ \text{MHz}$ )を照射することにより、組織の画像が得られる。このときの投与方法としては、静脈内投与等が挙げられる。

30

#### 【0022】

また、本発明のガス封入リポソームは、 $0.5\sim 2\ \text{MHz}$ の共振周波数を含む低周波超音波を照射すると、リポソームの崩壊とガスの微小気泡によるキャビテーションを生じる。このキャビテーションが血栓部位でおこれば血栓が破壊される。従って、リポソームが、標的病巣、例えば血栓や動脈硬化巣に対するリガンドを有する場合には、投与された本発明のガス封入リポソームは、血栓や動脈硬化巣に結合する。この様子は、診断用超音波照射により追跡可能である。ガス封入リポソームが血栓や動脈硬化巣に結合した時点で、その部位に低周波超音波を照射すれば、当該ガス封入リポソームを爆発させ、血栓等を破壊し、治療することができる。このようなガス封入リポソームの爆発により治療できる疾患としては、血栓、動脈硬化症、血管炎、癌組織等が挙げられる。

40

#### 【0023】

また、前述の如く、本発明のガス封入リポソームには、種々の薬効成分、遺伝子類を内包させることができるので、これらの薬効成分又は遺伝子内包リポソームを用いれば、ガス封入リポソームを投与後、標的部位に到達するのを診断用超音波により追跡し、標的部位に到達した時点で低周波超音波を照射すれば、リポソームに内封されたガスの微小気泡

50

から生じるキャピテーションにより、標的部位で薬効成分又は遺伝子類を放出させ、標的細胞に導入することができる。このとき、薬効成分又は遺伝子類は、本発明のガス封入リポソームに内包されている必要はなく、同時に投与すればよい。ここで遺伝子類導入用リポソームとしては、カチオン性脂質を用いたリポソームを用いるのが好ましい。また、このときプロタミン、ポリリジン等も遺伝子類と同時に投与すると、遺伝子の導入効率はさらに向上する。

#### 【0024】

ここで遺伝子類は、ガス封入リポソームの爆発により標的細胞への導入効率が向上する。従って、本発明ガス封入リポソームと遺伝子類を投与後、標的部位に低周波超音波照射すれば、標的細胞へ遺伝子類を効率良く導入することができる。また、この遺伝子類の細胞への導入は、*in vitro*、すなわち、培養細胞に対しても行うことができる。この場合には、本発明のガス封入リポソームと遺伝子類を培養細胞に添加し、次いで低周波超音波照射すればよい。

10

#### 【0025】

なお、薬効成分や遺伝子類を標的細胞、標的組織、標的病巣等に効率良く到達させるには、本発明ガス封入リポソームとして、これらの標的部位に対するリガンドが結合したリポソームを用いるのが好ましい。

#### 【実施例】

#### 【0026】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

20

以下、実施例で用いる略語は次のとおりである。

D P P C : ジバルミトイルホスファチジルコリン

D P P E : ジバルミトイルホスファチジルエタノールアミン

P E G : ポリエチレングリコール

M a l : マルトース

D C - C h o l : 3 - [ N - ( N , N - ジメチルアミノエタン ) カルバモイル ] コレステロール

D O P E : ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン

D O T A P : 1 , 2 - ジオレオイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン

30

D P T M A : N - [ 1 - ( 2 , 3 - ジオレオイルオキシ ) プロピル ] - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド

D D A B : ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド

#### 【0027】

#### 実施例 1

#### (1) 血栓ターゲティング用リポソームの調製方法

D P P C : コレステロール : D P P E - P E G : D P P E - P E G - M a l ( 1 : 1 : 0 . 1 1 : 0 . 0 2 ( m / m ) ) の脂質をクロロホルム : イソプロピルエーテル ( 1 : 1 v / v ) の有機溶媒に溶解し、生理食塩水などの水溶液 ( 又は薬物を含む水溶液 ) を有機溶媒の 1 / 2 容量を加えて ( このとき、クロロホルム : イソプロピルエーテル : 水溶液 = 1 : 1 : 1 v / v ) 混和しエマルジョンとした。これを用いて逆相蒸発法 ( R E V 法 ) でリポソームを調製した。エクストルーダーで 4 0 0 nm、2 0 0 nm、1 0 0 nm のポリカーボネート膜を通過させて粒径を揃える。P E G - リポソームとすることで、長期間 ( 2 年間 ) 分散状態で保つことが可能となる。ただし、ガス封入時には、超音波で封入するので、どのようなリポソームでも分散状態が得られるので、ガス封入には脂質組成は関係しない。

40

C G G R G D F ペプチドをこのリポソーム溶液に加えて 1 時間室温で反応させた。その後、超遠心分離で R G D 修飾 P E G - リポソームを得た。

#### 【0028】

#### (2) 遺伝子導入用カチオニックリポソームの調製

#### i) D C - C h o l リポソーム

50

DOPE : DC - Chol = 2 : 3 m / m をクロロホルムに溶解し、梨型フラスコ中に入れ、ロータリーエバポレータで回転しながら有機溶媒をエバポレータして脂質の薄い膜を壁に作製した (lipid film の作製)。生理食塩水などの溶媒で水和 (hydration) して、リポソームを作製した。超音波処理によってサイズを小さくする。又は、エクストルーダーで 400 nm、200 nm、100 nm のポリカーボネート膜を通過させて粒径を揃える。

【0029】

ii) DOTAP リポソーム

DOTAP : DOPE = 1 : 1 w / w をクロロホルムに溶解し、梨型フラスコ中に入れ、ロータリーエバポレータで回転しながら有機溶媒をエバポレータして脂質の薄い膜を壁に作製した (lipid film の作製)。生理食塩水などの溶媒で水和 (hydration) して、リポソームを作製した。超音波処理によってサイズを小さくする。又は、エクストルーダーで 400 nm、200 nm、100 nm のポリカーボネート膜を通過させて粒径を揃える。

10

【0030】

市販のカチオニックリポソームからなる遺伝子導入用の試薬として、以下の試薬を用いた。

Lipofectin<sup>TM</sup> (DOTMA:DOPE=1:1 w/w)

LipofectACE<sup>TM</sup> (DDAB:DOPE=1:1.25 w/w)

【0031】

(3) 各種リポソームに対するガスの封入法

バイアル瓶 (5 mL、10 mL、20 mL など) に容量の 30% (1.5 mL、3 mL、6 mL) に相当するリポソーム水溶液 (脂質濃度は 5 mg / mL) を入れ、パーフルオロプロパンを空気と置換するように入れた。ゴム栓をしてシールしゴム栓を通じて注射器でさらにパーフルオロプロパンを加えた。パーフルオロプロパンは全量で内容積の 1.5 倍で 1.5 気圧程度の加圧状態にした。パス型超音波装置 (42 kHz) に水を張り静置し、1 分間照射処理した。

20

【0032】

(4) 血栓の造影

ウサギ腸骨動脈にバルーンカテーテルを導入し、内皮に擦る刺激を与えて人工的に血栓を作製する。RGD-PEG-リポソームを静注し、診察用超音波装置 (3.5 MHz) で血栓部位を観測すると輝度が上昇し血栓部位が確認できた。

30

【0033】

(5) 血栓の破碎

試験管内に血栓を作製し上記 (3) で得たガス封入 RGD-PEG-リポソームを添加後 30 分放置した。リポソーム溶液を除去し、生理食塩水を加えて、1 MHz の治療用超音波を照射したところ、表面の破碎が観測された。一方、ガス封入 PEG-リポソームで同様の操作をした場合、破碎が観測されなかった。この違いは、RGD ペプチドによるガス封入リポソームの血栓への結合が生じたため、ターゲティングが出来た。

【0034】

(6) 48 穴のプレートにヒト膀胱癌 AsPC-1 細胞 (4 × 10<sup>4</sup> 細胞 / well) を培養し、FITC 標識オリゴヌクレオチド (18 核酸残基) と上記 (3) で得たガス封入 PEG-リポソームを添加し、1 MHz の超音波を 3 秒間パルス照射し、直ちに培養液を 3 ~ 4 回繰り返し洗浄した。その後、蛍光顕微鏡で細胞内の蛍光強度を観測した。低周波照射により細胞内の蛍光が観測され、その結果、ガス封入リポソームと遺伝子を細胞に添加し、次いで低周波照射すれば標的細胞に目的遺伝子を導入できることが判明した。

40

【0035】

(7) ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA とプロタミンを混合し、DNA-プロタミン複合体を作製し、コンパクトなサイズにする。48 穴のプレートに AsPC-1 細胞 (4 × 10<sup>4</sup> 細胞 / well) を培養し、DNA-プロタミン複合体 (1 マイクロ g DNA、lipid : DNA = 12:1 w/w) とガス封入 PEG-リポソームを添加し、1 MHz の超音波を 3 秒間パルス照射し、直ちに培養液を 3 ~ 4 回繰り返し洗浄し、培養液を加えて 2 日間培養した。そ

50

の後、ルシフェラーゼ活性を常法により測定した。得られた結果を表 1 に示す。

【 0 0 3 6 】

【 表 1 】

リポソーム	超音波処理の有無	発現量 (RLU/mg protein)
DPPC LP		ND
DPPC LP	+ SONIC	$8 \times 10^6$
DC-Chol LP		ND
DC-Chol LP	+ SONIC	$66 \times 10^6$
DOTAP LP		ND
DOTAP LP	+ SONIC	$140 \times 10^6$
Lipofectin™		$1 \times 10^2$
Lipofectin™	+ SONIC	$80 \times 10^6$
LipofectACE™		ND
LipofectACE™	+ SONIC	$78 \times 10^6$

ND：発現なし。

10

【 0 0 3 7 】

表 1 から明らかのようにガス封入リポソームと遺伝子を細胞に添加し、次いで低周波超音波照射することにより、遺伝子が効率良く細胞に導入できることがわかった。

20



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/14	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 丸山 一雄

神奈川県相模原市相原 5 - 1 5 - 1 2

(72)発明者 滝澤 知子

神奈川県津久井郡津久井町太井 2 5 8 - 5

(72)発明者 萩沢 康介

埼玉県所沢市緑町 2 - 1 6 - 5 - 2 0 2

(72)発明者 西岡 利彦

東京都世田谷区三軒茶屋 1 - 2 6 - 4

(72)発明者 柳衛 宏宣

東京都港区六本木 1 - 9 - 3 5 六本木ビュウタワー 1 2 0 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA11 GA13

4C076 AA19 BB13 CC11 CC14 CC27 CC47 DD63 FF11 FF43 FF68

4C084 AA02 AA03 AA13 AA19 AA27 MA05 MA24 MA66 NA10 NA14

NA15 ZA441 ZA451 ZA541 ZB261

4C085 HH09 JJ05 KA36 KA40 KB37 KB91 LL01 LL18