



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

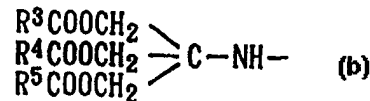
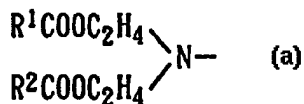
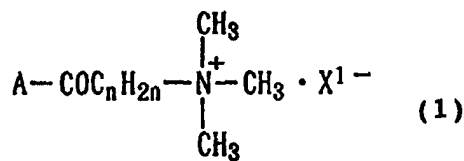
(51) 国際特許分類 C12N 15/88, A61K 9/127, 47/18, 48/00		A1	(11) 国際公開番号 WO98/45463
			(43) 国際公開日 1998年10月15日(15.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00685 (22) 国際出願日 1998年2月19日(19.02.98) (30) 優先権データ 特願平9/88546 1997年4月7日(07.04.97) JP 特願平9/88547 1997年4月7日(07.04.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 田中憲一(TANAKA, Kenichi)[JP/JP] 〒951-8144 新潟県新潟市関南町10-7 Niigata, (JP) 菊池 寛(KIKUCHI, Hiroshi)[JP/JP] 鈴木則男(SUZUKI, Norio)[JP/JP] 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16-13 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: COMPOSITION FOR GENE INTRODUCTION INTO CELL

(54)発明の名称 細胞への遺伝子導入用組成物

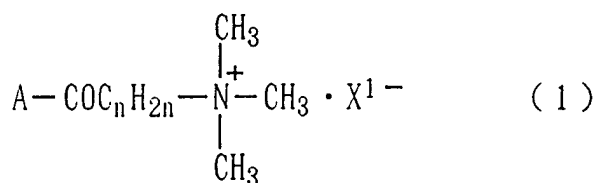
(57) Abstract

A composition for gene introduction into a cell which contains a quaternary ammonium salt represented by general formula (1): [wherein A represents (a) and (b), (wherein R¹, R², R³, R⁴, and R⁵ are the same or different and each represents a C₉₋₁₇ aliphatic group); X¹ represents halogeno; and n is an integer of 1 to 10]; and a method for gene introduction into a cell by using the composition. Since this composition can efficiently introduce a gene into a cell and cause gene expression, it is useful as a reagent for gene introduction or a drug.



(57)要約

本発明は、一般式 (1)



〔式中、Aは、 $\text{R}^1\text{COOC}_2\text{H}_4$ $\text{R}^2\text{COOC}_2\text{H}_4$ $\text{N}-$ 又は $\begin{array}{c}\text{R}^3\text{COOCH}_2 \\ \text{R}^4\text{COOCH}_2 \\ \text{R}^5\text{COOCH}_2\end{array} \text{C}-\text{NH}-$ を示し；

(ここで R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は同一又は異なって炭素数9～17の脂肪族基を示す)

X^1 はハロゲン原子を示し；

n は1～10の整数を示す)

で表される第4級アンモニウム塩を含有する細胞への遺伝子導入用組成物及びこれを用いた細胞への遺伝子導入方法に関する。

この組成物は遺伝子を効率的に細胞内へ導入させ、かつ発現させることができるため、遺伝子導入用試薬や医薬として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ヴィエトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノールウェー		
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		

明 細 書

細胞への遺伝子導入用組成物

技術分野

本発明は遺伝子を細胞内へ導入するための組成物及び該組成物を用いた細胞内への遺伝子の導入方法に関する。

背景技術

従来より薬物として利用されている化合物の中には、細胞膜透過性が低く、細胞内での薬理効果が十分得られない例がある。細胞膜透過性が低い例としては、薬物の脂溶性が低い場合や薬物の分子量が大きい場合などが挙げられるが、その代表例が遺伝子である。

これらの細胞膜透過性が低い薬物、特に遺伝子による治療は、現在も注射剤投与等により行われてはいるが、本来その薬物に期待されている細胞内への到達性が低いために、満足のいく治療効果は得られていない。

これらの問題点を解決するため、従来からさまざまな方法、すなわち薬物送達システム（Drug Delivery System；DDS）の技術が提案されている。例えば、主にリン脂質等で構成されるリポソーム、大豆油などの油と界面活性剤で構成されるエマルジョン、脂質と界面活性剤で構成される混合ミセル、生分解性あるいは非分解性高分子で構成されるマイクロカプセルやマイクロスフェアなどが提案されてはいるが、従来技術では、薬物の細胞膜透過性上昇は得られていない。むしろ、従来の薬物送達システムを用いてイン・ビトロで薬物の細胞内への移行性を評価すると、細胞内移行性はかえって抑制されてしまう場合が多い。理由は、薬物自身が薬物送達システムの中に封入されており、これからの薬物放出が律速となっているからである。にもかかわらず、これら薬物送達システムが注目され、

多くの薬物に適用されているのは、薬物を封入することにより、薬物の生体内での分解を抑制したり、薬物の体内動態を制御したりすることにより、結果的にイン・ビボでは標的とする組織や細胞近傍での薬物濃度を上昇させることが可能となるからである。薬物送達システムの代表例であるリポソームの場合でも、薬物を封入することにより、薬物の分解を抑制したり体内動態を制御したりすることは比較的容易であるが、最終的には、標的とする組織あるいは細胞の近傍に高濃度に分布したリポソームが薬物を放出し、あとは薬物自身の細胞膜透過性に依存してしまうのである。つまり、細胞近傍への分布量を増大させているのであり、薬物の細胞膜透過性には何ら影響を与えてはいないわけである。

イン・ビトロでも、薬物送達システムを用いることにより、薬物の細胞内移行性が上昇する例もある。細胞としてマクロファージや単球などの貪食細胞を用いた場合である。これら貪食細胞はエンドサイトーシスによりリポソームなどの微粒子を取り込みやすく、そのために、薬物単独の場合よりも薬物送達システムに封入した場合の方が、薬物の細胞内移行性が高まる例がある。この場合には、薬物の細胞膜透過性が上昇したわけではないが、薬物送達システムとともに細胞内小胞であるエンドソームやライソゾームに一時的に取り込まれた薬物が、これら環境の中で運良く安定であった場合には、さらに細胞質内に入り込むことも可能であり、結果的に細胞内移行性が高まることにもなる。

また近年は、カチオン性脂質単独やそれを含むリポソームが、遺伝子と複合体を形成することにより、あるいは遺伝子を内封することにより、遺伝子を非貪食系の細胞内に導入することができ、さらにその遺伝子が細胞内で遺伝子発現することができるという研究が盛んに行われている。遺伝子を細胞内に導入するメカニズムはほとんど不明ではあるが、実際にこれらは試薬としても広く販売され（例えば、リポフェクトアミン、リポフェクトエース、リポフェクチン、トランスフェクタム、ジーントランスファー等）、生物系研究者達はウイルス法あるいはマイクロインジェクション法に代わる便利な遺伝子の細胞内導入用手段として

日々用いている。しかしながら、これら市販の遺伝子導入用試薬には多くの欠点がある。まずは、a) 製剤としての保存安定性が悪いという点が挙げられる。市販品の多くは、脂質が既に水に分散した形で販売されているが、水系溶媒のpHが非常に低く設定されているため（例えば、リポフェクトアミンとリポフェクトエースはpH 3.5、リポフェクチンはpH 4.3である）、保存中に脂質が分解しやすい。リポソーム等を用いた遺伝子の細胞内導入・発現において再現性の無いことがよく指摘されるが、その一因としてこの製剤としての不安定さが挙げられる。さらにb) 細胞培養のため培地中に添加する血清（Fetal Bovine Serum）中で非常に不安定であるという欠点も挙げられる。実際に、市販品では、遺伝子導入する場合には、細胞を培養している血清入り培地をいったん無血清培地に置き換え、導入後また血清入り培地に戻すという手順が用いられている。また最近では、これら市販の遺伝子導入用試薬は血液中あるいは体内においても非常に不安定であることが明らかになりつつある。また更なる欠点としては、c) 使い勝手が悪いという点が挙げられる。市販品の多く（例えば、リポフェクトアミン、リポフェクトエース、リポフェクチン）は既に脂質が水に分散した形で提供されており、ここに外から遺伝子水溶液を添加する手順となっているが、これでは、リポソームの外側に遺伝子が結合した複合体は製造することができても、遺伝子を内封したリポソームを製造することは不可能である。またd) 細胞毒性が非常に強いという点も欠点として挙げられる。これは衆知の事象であるが、そもそも市販の遺伝子導入用試薬は、生物系研究者が遺伝子の導入・発現された細胞を取得して、それを次の実験に用いることが目的の場合が多く、遺伝子導入の段階で余分の細胞が多少死に至ったとしても問題にならないことが多い。以上、遺伝子のような本来細胞膜透過をしにくい薬物をカチオン性脂質単独あるいはリポソームを用いて細胞内に移行させる試薬はいくつか販売されてはいるが、多くの問題をかかえており、例えばこれを遺伝子治療のようなヒトへの応用を行うことは不可能であるといっても過言ではない（遺伝子治療にも、エクス・ビボ法とイン・ビ

ボ法があり、ヒトの身体から細胞を外に取り出して試験管レベルで治療し、細胞をまた身体に戻す前者の場合でも、細胞毒性の問題が非常なネックとなっている)。

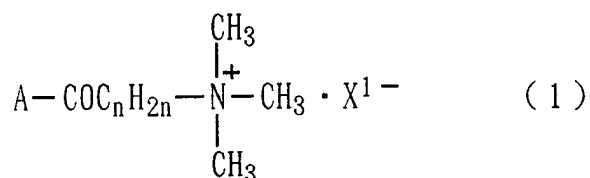
上記したように、貪食細胞の場合や市販の遺伝子導入用試薬の場合のような特殊な例を除けば、細胞膜を透過しにくい、細胞内に導入されにくい、あるいは細胞内で活性を発現しにくい遺伝子を効率的に細胞内に送達させ、薬理効果を発現させる方法は従来技術では得られていないといっても過言ではない。

従って、本発明の目的は、細胞膜を透過しにくい、細胞内に導入されにくい、あるいは細胞内で活性を発現しにくい遺伝子の細胞膜透過性、細胞内導入性及び細胞内での発現を改善することである。

発明の開示

そこで、本発明者らは、細胞膜を透過しにくい遺伝子の細胞内導入性、ひいては細胞内での発現を改善する解決策について鋭意検討した結果、下記一般式(1)で表される第4級アンモニウム塩を遺伝子とともに投与又は細胞に供給することにより、イン・ビトロだけでなくイン・ビボにおいても、該遺伝子が効率良く発現することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、一般式(1)



{式中、Aは、 $\begin{matrix} \text{R}^1\text{COOC}_2\text{H}_4 \\ \text{R}^2\text{COOC}_2\text{H}_4 \end{matrix} \text{N}-$ 又は $\begin{matrix} \text{R}^3\text{COOCH}_2 \\ \text{R}^4\text{COOCH}_2 \\ \text{R}^5\text{COOCH}_2 \end{matrix} \text{C}-\text{NH}-$ を示し；

(ここで R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は同一又は異なって炭素数9～17

の脂肪族基を示す)

X^1 はハロゲン原子を示し;

n は 1 ~ 10 の整数を示す)

で表される第 4 級アンモニウム塩を含有する細胞への遺伝子導入用組成物を提供するものである。

また、本発明は、上記一般式 (1) で表される第 4 級アンモニウム塩及び遺伝子を含有する細胞への遺伝子導入用組成物を提供するものである。

また、本発明は、上記一般式 (1) で表される第 4 級アンモニウム塩及び遺伝子を含有する組成物をイン・ビトロ又はイン・ビボで細胞に適用することの特徴とする細胞への遺伝子導入方法を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の組成物に用いられる第 4 級アンモニウム塩を示す一般式 (1) 中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 で示される炭素数 9 ~ 17 の脂肪族基としては、直鎖又は分岐鎖の飽和又は不飽和の脂肪族基が挙げられるが、炭素数 9 ~ 17 の直鎖又は分岐鎖のアルキル基が好ましく、炭素数 11 ~ 15 の直鎖又は分岐鎖のアルキル基がより好ましい。また、炭素数 9 ~ 17 の直鎖アルキル基がより好ましく、炭素数 11 ~ 15 の直鎖アルキル基が特に好ましく、ウンデシル基、トリデシル基又はペンタデシル基がさらに好ましい。また、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は同一の基でも異なる基でもよいが、製造上の観点から同一の基が好ましい。

一般式 (1) 中、 X^1 で示されるハロゲン原子としては、特に制限されないが塩素原子又は臭素原子が好ましい。

一般式 (1) 中、 n は 1 ~ 10 の整数を示すが、1 又は 10 であることが特に好ましい。 n が 1 である場合、 A は
$$\begin{array}{c} R^1COOC_2H_4 \\ R^2COOC_2H_4 \end{array} > N -$$
 であるのが好ましい。また、

nが10である場合、Aは
$$\begin{array}{c} \text{R}^3\text{COOCH}_2 \\ \text{R}^4\text{COOCH}_2 \\ \text{R}^5\text{COOCH}_2 \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \diagdown \end{array} \text{C}-\text{NH}-$$
であるのが好ましい。

本発明の遺伝子導入用組成物における第4級アンモニウム塩(1)の配合量は、用いる遺伝子、用途、組成物の形態等により異なるが、基本的には遺伝子を細胞内に導入するのに十分な量であり、例えば遺伝子に対して重量比で1:1~1:1000が好ましく、特に1:1~1:100が好ましい。

ここで、本発明組成物に適用される遺伝子としては、オリゴヌクレオチド、DNA及びRNAのいずれでもよく、特に形質転換等のイン・ビトロにおける導入用遺伝子、イン・ビボで発現することにより作用する遺伝子、例えば遺伝子治療用遺伝子、実験動物や家畜等の産業用動物の品種改良に用いられる遺伝子が好ましい。ここで、遺伝子治療用遺伝子を配合した場合には、本発明組成物は医薬組成物となる。遺伝子治療用遺伝子としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、酵素、サイトカイン等の生理活性物質をコードする遺伝子等が挙げられる。ここで、ある種の酵素等をコードする遺伝子を用いた場合には、さらに該酵素の作用により薬理作用を発揮する物質を併用することもできる。例えば、本願発明の組成物を用いて、チミジンキナーゼ遺伝子をあらかじめ、生体(腫瘍)内で発現させ、次いでガンアシクロビルを投与することで、腫瘍の治療を行うことができる。

本発明組成物には、遺伝子の導入効率を向上させる目的でさらにリン脂質及び/又はコレステロールを配合することができる。ここで、リン脂質としては、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、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、プラスマロゲン、ホスファチジン酸等が挙げられ、これらは1種又は2種以上を組み合わせて用いることができる。このうち、ホスファチジ

ルエタノールアミン及びホスファチジルコリンを単独で又は２種以上組み合わせて用いるのがより好ましく、ホスファチジルエタノールアミンを用いるのが特に好ましい。なお、これらリン脂質の脂肪酸残基としては、特に限定されるものではないが、炭素数１２～１８の飽和又は不飽和脂肪酸残基が挙げられ、パルミトイル基、オレオイル基、ステアロイル基、リノレイル基等が特に好ましい。これらリン脂質の本発明組成物への配合量は、モル分率で０～８０％が好ましく、１０～７０％がより好ましく、２５～７０％が特に好ましい。またコレステロールの配合量は、モル分率で０～７０％が好ましく、１０～６０％がより好ましく、２０～５０％が特に好ましい。

一般式（１）の第４級アンモニウム塩は、これを単独で用いた場合に比べ、リン脂質及び／又はコレステロールと併用することにより、細胞への遺伝子導入効率が向上するが、特に一般式（１）の第４級アンモニウム塩とリン脂質とを併用した場合の遺伝子導入効率の向上は顕著である。また、一般式（１）において、

Aが
$$\begin{array}{l} R^1COOC_2H_4 \\ R^2COOC_2H_4 \end{array} \bigg\} N^-$$
 である第４級アンモニウム塩の場合には、リン脂質との併

用による遺伝子導入効率の向上は特に顕著である。

第４級アンモニウム塩の本発明組成物への配合量は、モル分率で５～１００％が好ましく、１０～７５％がより好ましく、１５～５０％が特に好ましい。

本発明組成物が第４級アンモニウム塩とリン脂質又はコレステロールとを含んでいる場合、第４級アンモニウム塩：リン脂質又はコレステロールは、モル比で、１：９～９：１が好ましく、２：８～８：２がより好ましく、３：７～７：３が特に好ましい。この場合のリン脂質は、１種類でも、２種類以上の混合物でもよい。

本発明組成物が第４級アンモニウム塩とリン脂質とコレステロールとを含んでいる場合、第４級アンモニウム塩とリン脂質との混合物：コレステロールは、モ

ル比で、3 : 7 ~ 9 : 1 が好ましく、4 : 6 ~ 9 : 1 がより好ましく、5 : 5 ~ 8 : 2 が特に好ましい。この場合のリン脂質は、1 種類でも、2 種類以上の混合物でもよい。

さらに、本発明組成物には、ビタミンE等の脂溶性ビタミン類等を配合することができる。

本発明組成物の形態としては、第4級アンモニウム塩(1)だけが存在していてもよいし、第4級アンモニウム塩(1)とリン脂質及び／又はコレステロールとが単に混合物として存在していてもよいし、第4級アンモニウム塩(1)単独、又はこれとリン脂質及び／又はコレステロールとの組み合わせで脂質膜構造体を形成した形態でもよい。該脂質膜構造体の存在形態及びその製造方法は特に限定されないが、例えば、存在形態としては、乾燥した脂質混合物形態、水系溶媒に分散した形態、さらにこれを乾燥させた形態や凍結させた形態等が挙げられる。

乾燥した脂質混合物の製造は、例えば、使用する脂質成分をいったんクロロホルム等の有機溶媒で溶解させ、次にこれをエバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥を行えばよい。

脂質膜構造体が水系溶媒に分散した形態としては、多重層リポソーム、一枚膜リポソーム、O/W型エマルジョン、W/O/W型エマルジョン、球状ミセル、ヒモ状ミセル、又は不定形の層状構造物などが挙げられるが、特に限定はされない。水系溶媒に分散した脂質膜構造体の粒子径も特に限定されないが、通常リポソームやエマルジョンの場合には50 nmから数 μ m、球状ミセルの場合には5 nmから50 nmである。粒子径という概念があてはまらないヒモ状ミセルや不定形の層状構造物の場合には、その1層あたりの厚みが5 nmから10 nmで、これが層を形成していると考えればよい。

この時の水系溶媒の組成も特に限定はされないが、水のほか、グルコース、乳糖、ショ糖などの糖水溶液；グリセリン、プロピレングリコールなどの多価アルコール水溶液；生理食塩液；リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝化生理

食塩液等の緩衝液；細胞培養用の培地などが挙げられる。この水系溶媒に分散したまま脂質膜構造体を安定に長期間保存させるためには、凝集などの物理的安定性からは水系溶媒中の電解質をなるべくなくすこと、脂質の化学的安定性からは、水系溶媒のpHを弱酸性から中性付近（pH 3.0～8.0）に設定したり、窒素バブリングにより溶存酸素を無くしたりすることが重要である。さらに凍結乾燥保存や噴霧乾燥保存をする場合には糖水溶液を、凍結保存をする場合には糖水溶液や多価アルコール水溶液をそれぞれ用いると効果的な保存が可能となる。

これらの水系溶媒の濃度は特に制限されないが、例えば糖水溶液においては、好ましくは2～20%（W/V）、さらに好ましくは5～10%（W/V）であり；多価アルコール水溶液においては、好ましくは1～5%（W/V）、さらに好ましくは2～2.5%（W/V）であり；緩衝液においては、好ましくは5～50mM、さらに好ましくは10～20mMである。

本発明における脂質膜構造体の水系溶媒における濃度も特に限定はされないが、脂質膜構造体として用いる第4級アンモニウム塩（1）、リン脂質、コレステロールを含む全脂質の濃度は0.001mMから100mM、さらに好ましくは0.01mMから20mMが適している。

脂質膜構造体が水系溶媒に分散した形態の製造は、上記の乾燥した脂質混合物に水系溶媒を添加し、さらにホモジナイザー等の乳化機、超音波乳化機、高圧噴射乳化機等による乳化を行えばよい。また、このような乾燥した脂質混合物を用いた方法を経なくても、リポソームを製造する方法としてよく知られる方法、例えば逆相蒸発法などを別途用いてもよく、特に製造方法も限定はされない。粒子径を制御したい場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力でエクストルージョン（押し出し濾過）を行ってもよい。

また、上記の水系溶媒に分散した脂質膜構造体をさらに乾燥させる方法としては、通常の凍結乾燥や噴霧乾燥が挙げられる。この時の水系溶媒としては、上記したように糖水溶液、好ましくはショ糖水溶液や乳糖水溶液を用いるとよい。こ

ここで、水系溶媒に分散した脂質膜構造体をいったん製造した上でさらに乾燥させるメリットとしては、脂質膜構造体の長期保存が可能となることの他、この乾燥物に遺伝子水溶液を添加すると効率良く脂質混合物が水和されるために遺伝子自身も効率よくリポソーム等の脂質膜構造体に保持されることが挙げられる。

上記の水系溶媒に分散した脂質膜構造体をさらに凍結させる方法としては、通常の凍結方法が挙げられるが、この時の水系溶媒としては、上記したように糖水溶液や多価アルコール水溶液を用いるとよい。ここで、水系溶媒に分散した脂質膜構造体をいったん製造した上でさらに凍結させるメリットとしては、脂質膜構造体の長期保存が可能となることを挙げることができる。

次に、本発明における遺伝子を含有する組成物（遺伝子含有組成物）について説明する。

遺伝子含有組成物の形態としては、第4級アンモニウム塩（1）と遺伝子の混合物、第4級アンモニウム塩（1）とリン脂質及び／又はコレステロールと遺伝子の混合物でもよいし、第4級アンモニウム塩（1）単独又はこれとリン脂質及び／又はコレステロールとの組み合わせで形成された脂質膜構造体と遺伝子とが混合した形態でもよいし、さらに該脂質膜構造体に遺伝子が保持された形態でもよい。ここで保持とは、遺伝子が脂質膜の中、表面又は内部、脂質層中又は脂質層の表面に存在することを意味する。

また、遺伝子含有組成物の存在形態及びその製造方法は、脂質膜構造体と同様特に限定されないが、例えば、存在形態としては、混合乾燥物形態、水系溶媒に分散した形態、さらにこれを乾燥させた形態や凍結させた形態が挙げられる。

脂質類と遺伝子との混合乾燥物の製造は、例えば、使用する脂質類成分と遺伝子とをいったんクロロホルム等の有機溶媒で溶解させ、次にこれをエバポレータによる減圧乾固や噴霧乾燥機による噴霧乾燥を行えばよい。

脂質膜構造体と遺伝子との混合物が水系溶媒に分散した形態としては、多重層リポソーム、一枚膜リポソーム、O/W型エマルジョン、W/O/W型エマルシ

ョン、球状ミセル、ヒモ状ミセル、又は不定形の層状構造物などが挙げられるが、特に限定はされない。混合物としての粒子径も、水系溶媒の組成も、特に限定されることはない。混合物としての水系溶媒における濃度も特に限定はされない。

なお、脂質膜構造体と遺伝子との混合物が水系溶媒に分散した形態の製造方法にはいくつかの種類があり、それぞれに特徴があって、できあがりの脂質膜構造体と遺伝子との混合物の存在様式が異なるので注意を要する。

まず第一の製造方法が、上記の脂質類と遺伝子との混合乾燥物に水系溶媒を添加し、さらにホモジナイザー等の乳化機、超音波乳化機、高圧噴射乳化機等による乳化を行う方法である。粒子径を制御したい場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でエクストルージョン（押し出し濾過）を行えばよい。この方法の場合には、まず脂質類と遺伝子との混合乾燥物を作るために、遺伝子は有機溶媒に溶解せねばならないが、遺伝子と脂質膜構造体との相互作用を最大限に利用できるメリットがある。すなわち、脂質膜構造体が層状構造を有する場合にも、遺伝子は多重層の内部にまで入り込むことが可能であり、一般的にこの製造方法を用いると遺伝子の脂質膜構造体への保持率は高くすることができる。

第二の製造方法は、脂質類成分を有機溶媒でいったん溶解後、有機溶媒を留去した乾燥物に、さらに遺伝子を含む水系溶媒を添加して乳化する方法である。粒子径を制御したい場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でエクストルージョン（押し出し濾過）を行えばよい。有機溶媒には溶解しにくいですが、水系溶媒には溶解する遺伝子に適用できる。メリットとしては、リポソームの場合に内水相部分にも遺伝子を保持できる点が挙げられる。

第三の製造方法は、水系溶媒に既に分散したリポソーム、エマルション、ミセル、層状構造物などの脂質膜構造体に、さらに遺伝子を含む水系溶媒を添加する方法である。したがって、この場合には水溶性の遺伝子に限定される。既にできあがっている脂質膜構造体に外から遺伝子を添加する方法であるため、遺伝子が

高分子の場合には、遺伝子は脂質膜構造体内部には入り込まず、脂質膜構造体の表面に結合した存在様式をとる。脂質膜構造体としてリポソームを用いた場合、この第三の製造方法を用いると、遺伝子がリポソーム粒子同士の間挟まったサンドイッチ構造（一般的には複合体あるいはコンプレックスと呼ばれている）をとることが知られている。この第三の方法のメリットとしては、一度水系溶媒に既に分散したリポソーム、エマルション、ミセル、層状構造物などの脂質膜構造体を製造保管しておくことにより、一種の遺伝子ばかりでなく、共通して他の遺伝子への適用も可能となることが挙げられる。また、脂質膜構造体単独の水分散液をあらかじめ製造するため、乳化時の薬物の分解を考慮する必要がなく、粒子径制御もたやすいので、第一の製造方法や第二の製造方法に比べて比較的製造が容易であるといえる。

第四の製造方法は、水系溶媒に分散した脂質膜構造体をいったん製造した上でさらに乾燥させた乾燥物に、さらに遺伝子を含む水系溶媒を添加する方法である。したがって、この場合にも第三の製造方法と同様に水溶性の遺伝子に限定されるが、上記第三の製造方法と大きく違う点は、脂質膜構造体と遺伝子との存在様式にある。すなわち、この第四の製造方法では、水系溶媒に分散した脂質膜構造体をいったん製造した上でさらに乾燥させた乾燥物を製造するために、この段階で脂質膜構造体は脂質膜の断片として固体状態で存在する。この脂質膜の断片として固体状態に存在させるために、前に記したように水系溶媒として糖水溶液、好ましくはショ糖水溶液や乳糖水溶液を用いる必要がある。ここで、遺伝子を含む水系溶媒を添加すると、固体状態で存在していた脂質膜の断片は水の侵入とともに水和を速やかに始め、脂質膜構造体を再構成することができる。この時に、遺伝子が脂質膜構造体内部に保持された組成物が製造できることになる。第三の製造方法では、遺伝子が高分子の場合には、遺伝子は脂質膜構造体内部には入り込まず、脂質膜構造体の表面に結合した存在様式をとるのとの点で大きく異なっている。この第四の製造方法のメリットとしては、一度製造してしまえば、一つ

の遺伝子ばかりでなく共通して他の遺伝子への適用も可能となること、並びに脂質膜構造体単独の水分散液をあらかじめ製造するため、乳化時の薬物の分解を考慮する必要がなく、粒子径制御もたやすいので、第一の製造方法や第二の製造方法に比べて比較的製造が容易であることが挙げられる。また、この他に、凍結乾燥あるいは噴霧乾燥なので製剤としての保存安定性を保証しやすいこと、乾燥製剤を遺伝子水溶液で復水しても粒子径を元にもどせること、高分子遺伝子の場合でも脂質膜構造体内部に遺伝子を保持させやすいことなどが挙げられる。

脂質膜構造体と遺伝子との混合物が水系溶媒に分散した形態のその他の製造方法としては、リポソームを製造する方法としてよく知られる方法、例えば逆相蒸発法などを別途用いてもよい。粒子径を制御したい場合には、さらに孔径のそろったメンブランフィルターを用いて、高圧力下でエクストルージョン（押し出し濾過）を行えばよい。

また、上記の脂質膜構造体と遺伝子との混合物が水系溶媒に分散した分散液をさらに乾燥させる方法としては、凍結乾燥や噴霧乾燥が挙げられる。この時の水系溶媒としては、脂質膜構造体単独の場合と同様に糖水溶液、好ましくはショ糖水溶液や乳糖水溶液を用いるとよい。

上記の脂質膜構造体と遺伝子との混合物が水系溶媒に分散した分散液をさらに凍結させる方法としては、通常の凍結方法が挙げられるが、この時の水系溶媒としては、脂質膜構造体単独の場合と同様に、糖水溶液や多価アルコール水溶液を用いるとよい。

また、本発明組成物は、遺伝子だけでなく、脂溶性の非常に低い薬物、分子量の大きい生理活性ペプチド類、蛋白質類などの細胞内に導入されにくい薬物にも適用できる。

本発明組成物を用いれば、イン・ビトロ及びイン・ビボのいずれにおいても細胞内に遺伝子を効率良く導入することができる。すなわち、イン・ビトロの場合には、標的細胞を含む懸濁液に本発明組成物を添加したり、本発明組成物を含有

する培地で標的細胞を培養する等の手段により、当該標的細胞に遺伝子を導入できる。また、イン・ビボの場合には、本発明組成物を宿主に投与すればよい。投与手段としては、経口投与でも、非経口投与でもよく、経口投与の剤形としては、通常知られているものでよく、例えば、錠剤、散剤、顆粒剤等を挙げることができる。非経口投与の剤形としては、通常知られているものでよく、例えば、注射剤、点眼剤、軟膏剤、坐剤等を挙げることができる。好ましくは、非経口投与である。中でも、注射剤が好ましく、投与方法としては、静脈注射、標的とする細胞や臓器に対しての局所注射が好ましい。

実施例

以下に実施例を示すが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例 1 遺伝子を含まない空のリポソームの製造

1-1. 空のリポソーム分散液の製造

所定量の第4級アンモニウム塩、リン脂質、コレステロールをいったんクロロホルムに溶解させ、次にこれをエバポレーターにより減圧乾固させて脂質混合物とした。この脂質混合物に、等張のショ糖又は乳糖水溶液を所定量加え、加温しながらホモミキサーによる乳化を行ってリポソーム粗分散液を得た。次に、リポソームの粒子径をそろえるために、孔径0.22 μm のメンブランフィルターを用いて、高圧下でエクストルージョン（押し出し濾過）を行い、これを空のリポソーム分散液とした。

1-2. 凍結乾燥空リポソームの製造

1-1. で製造した空のリポソーム分散液をバイアルに所定量分注し、凍結乾燥を行って凍結乾燥空リポソームとした。

実施例 2 遺伝子を含有するリポソーム分散液の製造

2-1. 遺伝子を含有するリポソーム分散液（タイプ1）の製造

1-1. で製造した空のリポソーム分散液（全脂質濃度として $2 \mu\text{mol}/\text{ml}$ ）を、第4級アンモニウム塩として $100 \text{ nmol}/\text{ml}$ となるように、無血清培地（D-MEM）で希釈した。次に、このリポソーム分散液 $100 \mu\text{l}$ （第4級アンモニウム塩として 10 nmol 含有）とDNA（PGV-C〔ルシフェラーゼ遺伝子〕又はpCAG-1acZ〔 β ガラクトシダーゼ遺伝子〕）を $1 \mu\text{g}$ 含む無血清培地（D-MEM） $100 \mu\text{l}$ とを混和し、15分間放置した。さらに 0.8 ml のFBS 12.5%添加D-MEM（最終FBS濃度は10%）を加えて 1 ml とし試料とした。

2-2. 遺伝子を含有するリポソーム分散液（タイプ2）の製造

1-2. で製造した凍結乾燥空リポソーム（全脂質濃度として $2 \mu\text{mol}/\text{ml}$ 相当）に注射用蒸留水を加えて復水させ元に戻した（全脂質濃度として $2 \mu\text{mol}/\text{ml}$ ）後、さらに、第4級アンモニウム塩として $100 \text{ nmol}/\text{ml}$ となるように、無血清培地（D-MEM）で希釈した。次に、このリポソーム分散液 $100 \mu\text{l}$ （第4級アンモニウム塩として 10 nmol 含有）とDNA（PGV-C又はpCAG-1acZ）を $1 \mu\text{g}$ 含む無血清培地（D-MEM） $100 \mu\text{l}$ とを混和し、15分間放置した。さらに 0.8 ml のFBS 12.5%添加D-MEM（最終FBS濃度は10%）を加えて 1 ml とし試料とした。

2-3. 遺伝子を含有するリポソーム分散液（タイプ3）の製造

1-2. で製造した凍結乾燥空リポソーム（全脂質濃度として $2 \mu\text{mol}/\text{ml}$ 相当）にDNA（PGV-C又はpCAG-1acZ）含有注射用蒸留水（第4級アンモニウム塩 10 nmol 当りDNA量として $1 \mu\text{g}$ ）を加えて復水させ、15分間放置した。さらに最終DNA濃度が $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、このリポソーム分散液をFBS 10%添加D-MEMで希釈して試料とした。

2-4. 遺伝子を含有するリポソーム分散液（タイプ4）の製造

1-1. で製造した空のリポソーム分散液（全脂質濃度として $2 \mu\text{mol}/\text{ml}$ ）を、第4級アンモニウム塩として $400 \text{ nmol}/\text{ml}$ となるように、無血清培地

(D-MEM)で希釈した。次に、このリポソーム分散液 $500\mu\ell$ (第4級アンモニウム塩として 200nmol 含有)とDNA (pCAG-1acZ)を $20\mu\text{g}$ 含む無血清培地 (D-MEM) $500\mu\ell$ とを混和し、5分間放置し、これを試料とした。

2-5. 遺伝子を含有するリポソーム分散液 (タイプ5) の製造

1-2. で製造した凍結乾燥空リポソーム (全脂質濃度として $2\mu\text{mol}/\text{ml}$ 相当)に注射用蒸留水を加えて復水させ元に戻した (全脂質濃度として $2\mu\text{mol}/\text{ml}$)後、さらに、第4級アンモニウム塩として $400\text{nmol}/\text{ml}$ となるように、無血清培地 (D-MEM)で希釈した。次に、このリポソーム分散液 $500\mu\ell$ (第4級アンモニウム塩として 200nmol 含有)とDNA (pCAG-1acZ)を $20\mu\text{g}$ 含む無血清培地 (D-MEM) $500\mu\ell$ とを混和し、5分間放置し、これを試料とした。

2-6. 遺伝子を含有するリポソーム分散液 (タイプ6) の製造

1-2. で製造した凍結乾燥空リポソーム (全脂質濃度として $2\mu\text{mol}/\text{ml}$ 相当)にDNA (pCAG-1acZ) 含有注射用蒸留水 (第4級アンモニウム塩 10nmol 当りDNA量として $1\mu\text{g}$)を加えて復水させ、15分間放置した。さらに最終DNA濃度が $20\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、このリポソーム分散液を無血清培地 (D-MEM)で希釈して試料とした。

2-7. 遺伝子を含有するリポソーム分散液 (タイプ7) の製造

2-5. で製造した遺伝子を含有するリポソーム分散液 (タイプ5) のDNAをpCAG-1acZからpCAG-TK [チミジンキナーゼ遺伝子]に変更した以外は全て同じように製造した。

試験例1 ルシフェラーゼ活性の測定

各種腫瘍細胞を6穴プレートに $1\times 10^5\sim 8\times 10^5$ 個播種し、FBS 10%添加培地で24時間培養後、無血清培地で1回洗浄した。次に実施例2で製造した遺伝子 (PGV-C) を含有するリポソーム分散液 (2-1. 2-2. 並びに

2-3. : 最終DNA濃度として $1\ \mu\text{g}/10\ \text{nmol}$ 第4級アンモニウム塩/ ml)を各ウェルに $1\ \text{ml}$ 加え、 37°C で5時間反応させた。5時間後、ウェルを無血清培地で1回洗浄し、FBS 10%添加培地を加えて2日間培養した後、ルシフェラーゼ・アッセイを行った。

ルシフェラーゼ・アッセイは以下の通り実施した。すなわち、リン酸緩衝化生理食液(-)〔PBS(-)〕で2回洗浄後、細胞溶解液(LCβ) $150\ \mu\text{l}$ を添加して室温で15分間放置し、セルスクレーパーにてプレート表面を削り落とした。次に、このライセートを $12,000\ \text{rpm}$ で2分間遠心分離し、その上清 $20\ \mu\text{l}$ と発光試薬 $100\ \mu\text{l}$ を混合した時の発光量をルミフォトメーター(TD-4000、Laboscience)を用いて測定した。また蛋白量はBCA Protein Assay Reagentを用いて測定し、蛋白 $1\ \text{mg}$ 当りの発光量としてルシフェラーゼ活性を求めた。結果を表1及び表2に示す。

表1 各種リポソームによるin vitroリシフェラーゼ活性 (FBS 10%添加D-MEM培地中)

	リポソーム膜組成 (先頭がカチオン脂質) 〔実施例の膜組成はモル比〕	備 考	遺伝子を含む有する リポソーム分散液 の調製方法	リシフェラーゼ活性(light units/mg protein sec)				
				Colo320 (結腸癌)	mE11L (子宮癌)	HEC-1A (子宮癌)	HRA (卵巣癌)	ES-2 (卵巣癌)
対照例1	市販Genetran (和光純薬)	膜組成比は1) 膜組成比は2) 膜組成比は3) 膜組成比は4) 膜組成比は5) 膜組成比は6) カチオン脂質単独	lipid film ⁷⁾ コンプレックス ⁸⁾ コンプレックス コンプレックス コンプレックス コンプレックス コンプレックス タイプ3 タイプ1	489	838	3185	643	245
対照例2	市販LipofectACE (Life Technologies社)			176		3933	944	
対照例3	市販LipofectAMINE (Life Technologies社)						429	
対照例4	市販LipofectIN (Life Technologies社)						70	
対照例5	市販DMRIE-C (Life Technologies社)			8		6	143	
対照例6	Leaf Huang ^{a)}			8		194	0	0
対照例7	SA ^{b)} /DOPE ^{c)} /DLPC ^{d)} =2/4/4						0	
対照例8	DC-6-14 ^{e)} のみ						4	
実施例1	DC-6-12/DOPE=5/5		タイプ1 タイプ1 タイプ3 タイプ3 タイプ1 タイプ1 タイプ2 タイプ1 タイプ1 タイプ1 タイプ1 タイプ1 タイプ2 タイプ2 タイプ2 タイプ2	929	2671	103503 71029	4877 11823 1244 71498 11930 6141 10776 3161 3532 629 1923	869 1237 1423 323 1682 1094 1070 421 261
実施例2	DC-6-14/DOPE=5/5							
実施例3	DC-6-16/DOPE=5/5							
実施例4	DC-6-16/DOPE=4/6							
実施例5	DC-6-12/DOPE/Chol ^{f)} =4/3/3							
実施例6	DC-6-14/DOPE/Chol=4/3/3							
実施例7	DC-6-14/DOPE/Chol=4/3/3							
実施例8	DC-6-16/DOPE/DLPC=4/2/4							
実施例9	DC-6-14/DOPE/Chol=2.9/4.2/2.9							
実施例10	DC-6-14/DOPE/Chol=3.6/3.6/2.8							
実施例11	DC-6-14/DOPE/Chol=4.6/1.8/3.6							
実施例12	DC-6-14/DOPE/Chol=5/2/3							
実施例13	DC-6-16/DOPE/DLPC=3/4/3			469 423 785 2951	466 2455 1607 1111			
実施例14	DC-6-16/DOPE/DLPC=4/4/2							
実施例15	DC-6-18:1/DOPE/DLPC=2/4/4							
実施例16	DC-6-18:1/DOPE/Chol=2/4/4							

a) Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 179, No.1, 280-285(1991)参照

b) SA : ステアリルアミン (代表的カチオン脂質)

c) DOPE : ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン

d) DLPC : ジラウロイルホスファチジルコリン

e) DC-6-12 : O, O' -N-ジドデカノイル-N- (α-トリメチルアンモニオアセチル) -ジエタノールアミンクロリド

DC-6-14 : O, O' -N-ジテトラデカノイル-N- (α-トリメチルアンモニオアセチル) -ジエタノールアミンクロリド

DC-6-16 : O, O' -N-ジヘキサデカノイル-N- (α-トリメチルアンモニオアセチル) -ジエタノールアミンクロリド

DC-6-18 : 1 : O, O' -N-ジオクタデセノイル-N- (α-トリメチルアンモニオアセチル) -ジエタノールアミンクロリド

f) Chol : コレステロール

1) N- [α-トリメチルアンモニオアセチル] -ジドデシル-D-グルタメート/DOPE/DLPC = 2/4/4 (モル比)

2) ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド/DOPE = 2.9/7.1 (重量比)

3) 2, 3-ジオレイルオキシ-N- [2- (スぺルミンカルボキサミド) エチル] -N, N-ジメチル-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート/DOPE = 3/1 (重量比)

4) N- [1- (2, 3-ジオレイルオキシ) プロピル] -n, n, n-トリメチルアンモニウムクロリド/DOPE = 5/5 (重量比)

5) 1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチル

アンモニウムブロミド／コレステロール＝１／１（モル比）

- 6) 3- β -[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／DOPE＝６／４（モル比）
- 7) 市販品は、lipid film（リピドフィルム）であり、ここに成分中のカチオン脂質 10 nmol 当たり DNA として 1 μ g となるように、遺伝子を含む水溶液（水性溶媒）を添加したのち、ボルテックスミキサーによる攪拌を行って、遺伝子含有リポソーム水分散液を得る。
- 8) 市販品及び文献の方法は、空のリポソーム（あるいは脂質膜構造体）の水分散液であり、ここに成分中のカチオン脂質 10 nmol 当たり DNA として 1 μ g となるように、遺伝子を含む水溶液（水性溶媒）を外部から添加して、遺伝子とリポソームとのコンプレックス分散液を得る。

表2 各種リポソームによるin vitroシラフェラーゼ活性 (FBS 10%添加D-MEM培地中)

	リポソーム膜組成 (先端がカチオン脂質) (実施例の膜組成はモル比)	備 考	遺伝子を含む リポソーム分散液 の調製方法	シラフェラーゼ活性(light units/mg protein sec)			
				Colo320 (結腸癌)	HEC-1A (子宮癌)	HRA (卵巣癌)	KF (卵巣癌)
対照例 1	市販GeneTransfer (和光純薬)	膜組成比は1) 膜組成比は2) 膜組成比は3) 膜組成比は4) 膜組成比は5) 膜組成比は6)	lipid film ⁷⁾	489	3185	643	23
対照例 2	市販LipofectACE (Life Technologies社)		コンプレックス ⁸⁾	176	3933	944	
対照例 3	市販LipofectAMINE (Life Technologies社)		コンプレックス			429	
対照例 4	市販LipofectIN (Life Technologies社)		コンプレックス			70	
対照例 5	市販DMRIE-C (Life Technologies社)		コンプレックス	8	6	143	
対照例 6	Leaf Huang ⁹⁾		コンプレックス	8	194	0	
対照例 7	SA ^{b)} /DOPE ^{c)} /DLPC ^{d)} =2/4/4		タイプ3			0	
実施例17	TC-1-12 ^{e)} /DOPE=5/5		タイプ3	2887		342	
実施例18	TC-1-12/DOPE/DLPC=2/4/4		タイプ1	8325		6245	
実施例19	TC-1-12/DOPE/DLPC=3/4/3		タイプ2			5429	40
実施例20	TC-1-12/DOPE/DLPC=3/4/3		タイプ3	3459		1204	
実施例21	TC-1-12/DOPE/LysoPC ^{b)} =2/4/4		タイプ3	1598			
実施例22	TC-1-12/DOPE/Chol=5/2.5/2.5		タイプ3	2176			
実施例23	TC-1-12/DOPE/Chol/DLPC=2/4/2/2		タイプ3		3909		89
実施例24	TC-1-12/DOPE=4/6		タイプ2	1378			
実施例25	TC-1-12/DOPE/DLPC=4/4/2		タイプ2	3355	446	648	
実施例26	TC-1-12/DOPE/DLPC=5/4/1		タイプ2	2897	414	488	
実施例27	TC-1-12/DOPE/Lyso-LPC ^{d)} =2/4/4		タイプ2	4499			
実施例28	TC-1-12/DOPE/Lyso-MPC ^{d)} =2/4/4		タイプ2	3258			
実施例29	TC-1-12/DOPE/Chol=2.5/2.5/5		タイプ2	1680	223		
実施例30	TC-1-12/DOPE/Chol=2.5/5/2.5		タイプ2	1606	287		
実施例31	TC-1-12/DOPE/Chol=5/4.5/0.5		タイプ2	1221			

a) ~ f) 及び 1) ~ 8) は表 1 と同じ。

g) TC-1-12 : O, O', O'' -トリドデカノイル-N-(ω -トリメチルアンモニオデカノイル)-トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンブロミド

h) LysoPC : リゾホスファチジルコリン

i) Lyso-LPC : リゾラウロイルホスファチジルコリン

j) Lyso-MPC : リゾミリストイルホスファチジルコリン

表 1 及び表 2 から明らかなように、本発明の遺伝子導入用組成物は、市販の遺伝子導入用試薬と比べて、高い遺伝子導入性を示した。

試験例 2 X-gal 染色

各種腫瘍細胞を 6 穴プレートに $1 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 個播種し、FBS 10% 添加培地で 24 時間培養後、無血清培地で 1 回洗浄した。次に、実施例 2 で製造した遺伝子 (pCAG-lacZ) を含有するリポソーム分散液 (2-1, 2-2, 並びに 2-3 : 最終 DNA 濃度として $1 \mu\text{g} / 10 \text{ nmol}$ 第 4 級アンモニウム塩/ ml) を各ウェルに 1 ml 加え、 37°C で 5 時間反応させた。5 時間後、ウェルを無血清培地で 1 回洗浄し、FBS 10% 添加培地を加えて 2 日間培養し、X-gal 染色を行った。

X-gal 染色は以下の通り実施した。すなわち、PBS (-) で 1 回洗浄後、1%ホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド並びに 0.02% NP40 を含む PBS (-) で 3~4 分間固定した後、さらに PBS (-) で 10 分間ずつ 3 回洗浄した。最終的に、5mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、5mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、0.01%デオキシコール酸ナトリウム、0.02%NP40、2mM MgCl_2 、0.1%X-gal 混液にて 37°C で 5~8 時間染色させた後、顕微鏡下で細胞を最低 1000 個以上数えて、lacZ 陽性細胞の割合を求めた。結果を表 3~5 に示す。

表3 各種リポソームによるin vitro LacZ陽性細胞の割合 (FBS10%添加培地中)

	リポソーム膜組成 [先頭がカチオン脂質] [実施例の膜組成はモル比]	備 考	遺伝子を含む リポソーム分散液 の調製方法	LacZ陽性細胞率、% (細胞100個あたりの陽性細胞数)						
				HEC-1A (子宮癌)	meIII (子宮癌)	HRA (卵巣癌)	ES-2 (卵巣癌)	SW626 (卵巣癌)	KF (卵巣癌)	KOC-3S (卵巣癌)
対照例1	市販Gene transfer	膜組成比は1)	lipid film ⁴⁾	2.6	7.6	10.1	8.6	9.2	3.3	6.0
対照例3	市販LipofectAMINE	膜組成比は2)	コンプレックス ⁵⁾		0.6	4.7	3.3		0	2.4
対照例5	市販DMRIE-C	膜組成比は3)	コンプレックス		4.0	1.3	10.1		0.6	0.5
実施例5	DC-6-12a ^{a)} /DOPE ^{b)} /Chol ^{c)} =4/3/3		タイプ1	21.2	10.6	38.9	24.7	14.8	14.5	4.8
実施例6	DC-6-14/DOPE/Chol=4/3/3		タイプ1			42.1	23.7		16.0	5.9
実施例32	DC-6-12/DOPE/Chol=4/3/3		タイプ3	8.7		8.4		9.3	13.7	
実施例33	DC-6-14/DOPE/Chol=1.8/5.4/2.8		タイプ1			14.9	21.4		7.4	4.8

表4 各種リポソームによるin vitro LacZ陽性細胞の割合 (FBS10%添加培地中)

	リポソーム膜組成 [先頭がカチオン脂質] [実施例の膜組成はモル比]	備 考	遺伝子を含む リポソーム分散液 の調製方法	LacZ陽性細胞率、% (細胞100個あたりの陽性細胞数)						
				Naka jima (卵巣癌)	Naka jima S2 (卵巣癌)	OVHS-1 (卵巣癌)	SKOV-3 (卵巣癌)	KK (卵巣癌)	OVCAR-3 (卵巣癌)	HNOA (卵巣癌)
対照例1	市販Gene transfer	膜組成比は1)	lipid film	6.0	5.4	0.9	6.6	31.3	8.5	1.4
対照例3	市販LipofectAMINE	膜組成比は2)	コンプレックス	0.1	0.6	1.0	0.2	0	0.4	0
対照例5	市販DMRIE-C	膜組成比は3)	コンプレックス	0.1	1.0	0	0.2	0	4.5	0
実施例5	DC-6-12a ^{a)} /DOPE ^{b)} /Chol ^{c)} =4/3/3		タイプ1	7.4	8.6		8.3			
実施例6	DC-6-14/DOPE/Chol=4/3/3		タイプ1		6.5		11.5		12.3	
実施例32	DC-6-12/DOPE/Chol=4/3/3		タイプ3							4.6
実施例33	DC-6-14/DOPE/Chol=1.8/5.4/2.8		タイプ1			4.4	9.1	22.2	7.5	

表5 各種リポソームによるin vitro LacZ陽性細胞の割合 (FBS 10%添加培地中)

	リポソーム膜組成 〔先頭がカチオン脂質〕 〔実施例の膜組成はモル比〕	備 考	遺伝子を含有する リポソーム分散液 の調製方法	LacZ陽性細胞率、% (細胞100個あたりの陽性細胞数)	
				HEC-1A (子宮癌)	COS-1 (線維芽細胞)
対照例1	市販Genetransfer (和光純薬)	膜組成比は1)	lipid film	2.6	
対照例3	市販LipofectAMINE(Life Technologies社製)	膜組成比は2)	コンプレックス		0
実施例20	TC-1-12 ^{a)} /DOPE ^{b)} /DLPC ^{d)} =3/4/3		タイプ3	11.5	
実施例23	TC-1-12/DOPE/Chol ^{c)} /DLPC=2/4/2/2		タイプ3	18.0	
実施例34	TC-1-12/DOPE/DLPC=2/4/4		タイプ3	14.1	
実施例35	TC-1-12/DOPE/Chol=3/4/3		タイプ1		3.7
実施例36	TC-1-12/DOPE/Chol=3/4/3		タイプ3	11.6	
実施例37	TC-1-12/DOPE/Chol/DLPC=2/4/3/1		タイプ3	15.3	

- a) DC-6-12 : O, O' -N-ジドデカノイル-N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド
- DC-6-14 : O, O' -N-ジテトラデカノイル-N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド
- DC-6-16 : O, O' -N-ジヘキサデカノイル-N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド
- TC-1-12 : O, O', O'' -トリドデカノイル-N-(ω -トリメチルアンモニオデカノイル)-トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンブロミド
- b) DOPE : ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン
- c) Chol : コレステロール
- d) DLPC : ジラウロイルホスファチジルコリン
- 1) N-[α -トリメチルアンモニオアセチル]-ジドデシル-D-グルタメート/DOPE/DLPC = 2/4/4 (モル比)
- 2) 2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート/DOPE = 3/1 (重量比)
- 3) 1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド/コレステロール = 1/1 (モル比)
- 4) 市販品は、lipid film (リピドフィルム) であり、ここに成分中のカチオン脂質 10 nmol 当たり DNA として 1 μ g となるように、遺伝子を含む水溶液 (水性溶媒) を添加したのち、ボルテックスミキサーによる攪拌を行って、遺伝子含有リポソーム水分散液を得る。
- 5) 市販品及び文献の方法は、空のリポソーム (あるいは脂質膜構造体) の水

分散液であり、ここに成分中のカチオン脂質 10 nmol 当たり DNA とし
て、 $1 \mu\text{g}$ となるように、遺伝子を含む水溶液（水性溶媒）を外部から添
加して、遺伝子とリポソームとのコンプレックス分散液を得る。

表 3～5 から明らかなように、本発明の遺伝子導入用組成物は、市販の遺伝子
導入用試薬と比べて、高い遺伝子導入性を示した。

試験例 3 X-gal 染色（2）

各種腫瘍細胞をヌードマウス腹腔内に 5×10^6 個（mE I I L、E S - 2）
～ 6×10^7 個（H R A）接種し、1 日（H R A）、10 日前後（E S - 2）あ
るいは 3 週間前後（mE I I L）経過した後、上に示した遺伝子（p C A G -
l a c Z）を含有するリポソーム分散液（2 - 4、2 - 5、並びに 2 - 6、：最
終 DNA 濃度として $20 \mu\text{g} / 200 \text{ nmol}$ 第 4 級アンモニウム塩 / ml ）を 1 ml
マウス腹腔内に投与した。mE I I L、H R A 腫瘍細胞の場合には 1 日後、
E S - 2 腫瘍細胞の場合には 2 日後にそれぞれ腫瘍細胞を回収し、 $3 \times 10^5 \sim$
 5×10^5 個を 6 穴プレートに播種し、F B S 10 % 添加培地で 24 時間培養し
て細胞が付着したところで X - g a l 染色を行った。X - g a l 染色は試験例 2
と同様に行った。結果を表 6 に示す。

表 6 各種リポソームによるin vivo LacZ陽性細胞の割合

	リポソーム膜組成 〔実施例の膜組成はモル比〕	備 考	遺伝子を含有する リポソーム分散液 の調製方法	LacZ陽性細胞率、% (細胞100個あたりの陽性細胞数)		
				HRA (卵巣癌)	mE11L (子宮癌)	ES-2 (卵巣癌)
対照例 1	市販Gene transfer	膜組成比は 1)	lipid film ⁶⁾	0.95	0.25	0.25
対照例 2	市販LipofectACE	膜組成比は 2)	コンプレックス ⁷⁾		0.62	
対照例 3	市販LipofectAMINE	膜組成比は 3)	コンプレックス		0.23	
対照例 4	市販LIPOFECTIN	膜組成比は 4)	コンプレックス		0.38	
対照例 5	市販DMRIE-C	膜組成比は 5)	コンプレックス		1.52	
実施例 38	DC-6-12 ^{a)} /DOPE ^{b)} =5/5		タイプ 4	5.50		
実施例 39	DC-6-14/DOPE=5/5		タイプ 5		1.08	
実施例 40	DC-6-14/DOPE=5/5		タイプ 6		1.04	
実施例 41	DC-6-12/DOPE/Chol ^{c)} =4/3/3		タイプ 4	4.71	1.29	2.43
実施例 42	DC-6-14/DOPE/Chol=4/3/3		タイプ 4		1.32	
実施例 43	DC-6-14/DOPE/Chol=4/3/3		タイプ 6		0.96	
実施例 44	DC-6-14/DOPE/Chol=1.8/5.4/2.8		タイプ 4	4.32		
実施例 45	DC-6-14/DOPE=4/6		タイプ 4	6.30		

- a) DC-6-12: O, O'-N-ジドデカノイル-N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジェタノールアミンクロリド
 DC-6-14: O, O'-N-ジテトラデカノイル-N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジェタノールアミンクロリド
- b) DOPE: ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン
- c) Chol: コレステロール
- 1) N-[α -トリメチルアンモニオアセチル]-ジドデシル-D-グルタメート/DOPE/DLPC=2/4/4 (モル比)
 - 2) ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド/DOPE=2.9/7.1 (重量比)
 - 3) 2,3-ジオレイルオキシ-N-[2-(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート/DOPE=3/1 (重量比)
 - 4) N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-n,n,n-トリメチルアンモニウムクロリド/DOPE=5/5 (重量比)
 - 5) 1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド/コレステロール=1/1 (モル比)
 - 6) 市販品は、lipid film (リピドフィルム) であり、ここに成分中のカチオン脂質 10 nmol 当たり DNA として 1 μ g となるように、遺伝子を含む水溶液 (水性溶媒) を添加したのち、ボルテックスミキサーによる攪拌を行って、遺伝子含有リポソーム水分散液を得る。
 - 7) 市販品及び文献の方法は、空のリポソーム (あるいは脂質膜構造体) の水分散液であり、ここに成分中のカチオン脂質 10 nmol 当たり DNA として、1 μ g となるように、遺伝子を含む水溶液 (水性溶媒) を外部から添加して、遺伝子とリポソームとのコンプレックス分散液を得る。

表 6 から明らかなように、本発明の遺伝子導入用組成物は、市販の遺伝子導入用試薬と比べて、高い遺伝子導入性を示した。

試験例 4 担癌マウスでの延命効果

各種腫瘍細胞をヌードマウス腹腔内に 3×10^5 個 (HRA)、 1×10^6 個 (mES-2) あるいは 5×10^6 個接種し (Day 0)、HRA、ES-2 の場合には 7 日目 (Day 7) から、mEILの場合には 10 日目 (Day 10) から、1 日おきに 7 回、上に示した遺伝子 (pCAG-TK) を含有するリポソーム分散液 (2-7. : 最終 DNA 濃度として $20 \mu\text{g} / 200 \text{nmol}$ 第 4 級アンモニウム塩 / ml) を 1ml マウス腹腔内に投与した。また HRA、ES-2 の場合には 9 日目 (Day 9) から毎日 13 日間 (Day 21 まで)、mEIL の場合には 12 日目 (Day 12) から毎日 13 日間 (Day 24 まで)、それぞれガンアシクロビルを 1 日 2 回、 $35 \text{mg} / \text{kg}$ マウス腹腔内に投与した。対照としては pCAG-TK 遺伝子の代わりに pCAG-lacZ 遺伝子を投与した群をおいたが、有意差の検定は Cox-Mantel 法により行った。結果を表 7 に示す。

表 7 腹膜播種モデルにおける各種リポソームによる延命効果

	リポソーム膜組成 〔モル比〕	遺伝子	腫瘍細胞	播種した 細胞数	マウス 匹数	観 察 日 数	50% 生存日数	観察終了日 の生存匹数	有意差 検定
実施例46 (対照群)	DC-6-14 ^{a)} /DOPE ^{b)} =5/2 DC-6-14/DOPE=5/2	pCAG-TK pCAG-lacZ	HRA HRA	3×10^5 3×10^5	12 12	70 日 70 日	40 日 34 日	5 1	p<0.05
実施例47 (対照群)	DC-6-14/DOPE=5/2 DC-6-14/DOPE=5/2	pCAG-TK pCAG-lacZ	mE1IL mE1IL	5×10^6 5×10^6	8 8	85 日 85 日	85 日以上 67 日	6 1	p<0.05
実施例48 (対照群)	DC-6-14/DOPE/Chol ^{c)} =1.8/5.4/2.8 DC-6-14/DOPE/Chol=1.8/5.4/2.8	pCAG-TK pCAG-lacZ	mE1IL mE1IL	5×10^6 5×10^6	8 8	85 日 85 日	85 日以上 60 日	5 2	p<0.05
実施例49 (対照群)	DC-6-12/DOPE/Chol=4/3/3 DC-6-12/DOPE/Chol=4/3/3	pCAG-TK pCAG-lacZ	ES-2 ES-2	1×10^6 1×10^6	12 12	77 日 77 日	50 日 37 日	3 0	p<0.05

a) DC-6-12 : O, O' -N-ジドデカノイル-N-(α -トリメチル
アンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリド

DC-6-14 : O, O' -N-ジテトラデカノイル-N-(α -トリメ
チルアンモニオアセチル)-ジエタノールアミンクロリ
ド

b) DOPE : ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン

c) Chol : コレステロール

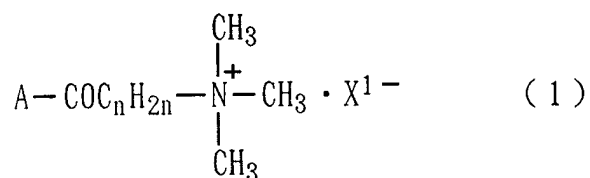
表7から明らかなように、本発明の遺伝子導入用組成物は良好な延命効果を示した。

産業上の利用可能性

本発明組成物を用いれば、従来細胞内への導入効率が低いため、細胞内での発現率の低かった遺伝子を効率的に細胞内へ導入させ、かつ発現させることができるため、遺伝子導入用試薬や医薬として有用である。

請求の範囲

1. 一般式 (1)



〔式中、Aは、 $R^1COOC_2H_4$ $\searrow$ $N-$ 又は $\begin{matrix} R^3COOCH_2 \\ R^4COOCH_2 \\ R^5COOCH_2 \end{matrix} \searrow C-NH-$ を示し；
 $R^2COOC_2H_4$ $\swarrow$

(ここで R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 は同一又は異なって炭素数9～17の脂肪族基を示す)

X^1 はハロゲン原子を示し；

n は1～10の整数を示す)

で表される第4級アンモニウム塩を含有する細胞への遺伝子導入用組成物。

2. 一般式(1)中、Aが $R^1COOC_2H_4$ $\searrow$ $N-$ であり(R^1 及び R^2 は前記と同
 $R^2COOC_2H_4$ $\swarrow$

じ)、 n が1である請求項1記載の組成物。

3. 一般式(1)中、Aが $\begin{matrix} R^3COOCH_2 \\ R^4COOCH_2 \\ R^5COOCH_2 \end{matrix} \searrow C-NH-$ (R^3 、 R^4 及び R^5 は前記
 $\swarrow$

と同じ)であり、 n が10である請求項1記載の組成物。

4. 一般式(1)中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 が同一又は異なって炭素数9～17の直鎖アルキル基である請求項1～3のいずれか1項記載の組成物。

5. 一般式(1)中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及び R^5 が同一又は異なって炭素数11～15の直鎖アルキル基である請求項1～3のいずれか1項記載の組成

物。

6. さらにリン脂質及び／又はコレステロールを含有するものである請求項1～5のいずれか1項記載の組成物。

7. リン脂質が、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、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、プラスマロゲン及びホスファチジン酸から選ばれる1種又は2種以上である請求項6記載の組成物。

8. リン脂質が、ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジルコリンから選ばれる1種又は2種以上である請求項6記載の組成物。

9. リポソームを形成しているものである請求項6～8のいずれか1項記載の組成物。

10. さらに遺伝子を含有するものである請求項1～9のいずれか1項記載の組成物。

11. 請求項10記載の組成物をイン・ビトロ又はイン・ビボで細胞に適用することを特徴とする細胞への遺伝子導入方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00685

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/88, A61K9/127, A61K47/18, A61K48/00

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)

Int.Cl⁶ C12N15/88, A61K9/127, A61K47/18, A61K48/00

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

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

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 2-135092, A (K.K. Bitamin Kenkyusho), May 23, 1990 (23. 05. 90) (Family: none)	1-2, 4-11
X	WO, 96/32102, A1 (PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS), October 17, 1996 (17. 10. 96) & FR, 2732895, A1 & AU, 9656517, A & EP, 769942, A1 & JP, 10-501822, A	1, 3-5, 9
A	WO, 95/17373, A1 (Life Technologies, Inc.), June 29, 1995 (29. 06. 95) & AU, 9514372, A & EP, 741689, A1 & US, 5674908, A & JP, 9-510435, A	1-11

☐ 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 document 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
 May 1, 1998 (01. 05. 98)

 Date of mailing of the international search report
 May 19, 1998 (19. 05. 98)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o C12N15/88, A61K9/127, A61K47/18, A61K48/00

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 (IPC))

Int. Cl^o C12N15/88, A61K9/127, A61K47/18, A61K48/00

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

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)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)

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 請求の範囲の番号
X	JP, 2-135092, A (株式会社ビタミン研究所) 23. 5月. 1990 (23. 05. 90) (ファミリーなし)	1-2, 4-11
X	WO, 96/32102, A1 (PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS) 17. 10月. 1996 (17. 10. 96) & FR, 2732895, A1 & AU, 9656517, A & EP, 769942, A1 & JP, 10-501822, A	1, 3-5, 9
A	WO, 95/17373, A1 (ライフテクノロジーズインコーポレイテッド) 29. 6月. 1995 (29. 06. 95) & AU, 9514372, A & EP, 741689, A1 & US, 5674908, A & JP, 9-510435, A	1-11

☐ 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」 先行文献ではあるが、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

01. 05. 98

国際調査報告の発送日

19.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

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)

富士 良宏

印

4 B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449