【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第３部門第２区分
【発行日】平成24年7月5日(2012.7.5)

【公表番号】特表2009-514806(P2009-514806A)
【公表日】平成21年4月9日(2009.4.9)
【年通号数】公開・登録公報2009-014
【出願番号】特願2008-535629(P2008-535629)
【国際特許分類】
Ａ６１Ｋ　31/164　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　 9/127　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　31/7028　(2006.01)
Ａ６１Ｋ　31/685　(2006.01)
Ａ６１Ｐ　13/10　(2006.01)
【ＦＩ】
Ａ６１Ｋ　31/164
Ａ６１Ｋ　 9/127
Ａ６１Ｋ　31/7028
Ａ６１Ｋ　31/685
Ａ６１Ｐ　13/10

【誤訳訂正書】
【提出日】平成24年5月21日(2012.5.21)
【誤訳訂正１】
【訂正対象書類名】特許請求の範囲
【訂正対象項目名】全文
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
a)非カチオン性リポソーム;および
b)生理的に受容される担体
を含み、
該非カチオン性リポソームがスフィンゴリピドを含み、且つボツリヌス毒素を担持する医薬組成物。
【請求項２】
前記非カチオン性リポソームがセラミドおよび少なくとも１つの脂質を含む請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
前記非カチオン性リポソームがスフィンゴシンおよび少なくとも１つの脂質を含む請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項４】
前記非カチオン性リポソームがスフィンゴシン１-リン酸および少なくとも１つの脂質を含む請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項５】
前記の少なくとも１つの脂質が、
リン脂質としてホスファチジルコリン(PC),ホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルセリン(PS), ホスファチジルイノシトール(PI), ホスファチジルグリセロールまたはカルジオリピン(CL); 糖脂質; スフィンゴリン脂質としてスフィンゴミエリン; スフィンゴ糖脂質(1- セラミジルグルコシド）としてセラミドガラクトピラノシド、ガング

リオシドおよびセレブロシド; コレステロール; 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC); および1,2-ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)よりなる基から選択される、請求項２～４のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項６】
前記非カチオン性リポソームがスフィンゴ糖脂質を含む請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項７】
前記スフィンゴ糖脂質がスフィンゴミエリン糖脂質である、請求項６に記載の医薬組成物。
【請求項８】
前記セラミドまたはスフィンゴシンが脂質中に約0.1 モル%～約10.0 モル%の濃度範囲で含まれる、請求項２または３に記載の医薬組成物。
【請求項９】
前記セラミドおよびスフィンゴシンが脂質中に約0.5 モル%～約2.0 モル%の濃度範囲で含まれる、請求項２または３に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
前記セラミドまたはスフィンゴシンが脂質中に約1モル%の濃度で含まれる、請求項２または３に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
前記スフィンゴシン 1-リン酸が合成脂質中に約2.0 モル%～約5モル%の濃度範囲で含まれる、請求項４に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
過活動膀胱障害に罹患した動物またはヒトにおいて、該疾患を予防、管理、改善および/または治療するために投与される、請求項１～４のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項１３】
前記過活動膀胱障害が間質性膀胱炎である、請求項１２に記載の医薬組成物。
【誤訳訂正２】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】００２３
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【００２３】
具体的には本発明は、非カチオン性リポソーム（少なくとも1個の脂質を含む）および生理的に受容できる担体を含む医薬組成物を提供する。
本発明のリポソームを調製するのに使用される適当な脂質は、例えば、これらに限定されないが、リン脂質、例えばホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルグリセロールまたはカルジオリピン(CL)など；糖脂質；スフィンゴミエリンなどのスフィンゴリン脂質；スフィンゴ糖脂質（1-セラミジルグルコシドとして知られている）、例えばセラミドガラクトピラノシド、ガングリオシドやセレブロシド； コレステロール； 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)；または1,2-ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)などが挙げられる。しかし、それらの様々な天然の(例えば、組織由来のL-アルファ-ホスファチジル:卵黄、心臓、脳、肝臓、大豆)、および/または合成の(例えば、飽和および不飽和の1,2-ジアシル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン、1-アシル-2-アシル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジヘプタノイル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン)誘導体も含む。そのような脂質は、単独または補助の脂質と組み合わせて用いることができる。 好ましい補助脂質は、非イオン性、または生理的ｐＨで非荷電である。非イオン性脂質として、コレステロールとDOPE(1,2-ジオレオイルグリセリルホスファチジルエタノールアミン)が挙げられるが、これらに限定されない。コレステロールと用いるのが最も好ましい。補助脂質に対するリン脂質のモル比は、およそ3:1から1:1であり、好ましくは1.5:1から1:1であり、最も好ましいモル比は、1:1である。

【誤訳訂正３】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】００３４
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【００３４】
一態様における本発明は、非カチオン性リポソームおよび生理的に受容できるキャリヤーを含有する医薬組成物を提供し、該リポソームは少なくとも1個の脂質を含む。
本発明のリポソームを調製するのに使用される適当な脂質は、例えば、これらに限定されないが、リン脂質、例えばホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルグリセロールまたはカルジオリピン(CL)など；糖脂質；スフィンゴミエリンなどのスフィンゴリン脂質；スフィンゴ糖脂質（1-セラミジルグルコシドとして知られている）、例えばセラミドガラクトピラノシド、ガングリオシドやセレブロシド； コレステロール； 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)；または1,2-ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)が挙げられる。しかし、それらの様々な天然の(例えば、組織由来のL-アルファ-ホスファチジル: 卵黄、心臓、脳、肝臓、大豆)、および/または合成の(例えば、飽和および不飽和の1,2-ジアシル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン、1-アシル-2-アシル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジヘプタノイル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン)誘導体も含む。そのような脂質は、単独または補助の脂質と組み合わせて用いることができる。 好ましい補助的脂質は、非イオン性であるか、生理的ｐＨで非荷電である。そうした非イオン性脂質は、コレステロールとDOPE(1,2-ジオレオイルグリセリルホスファチジルエタノールアミン)を含むが、これらに限定されない。コレステロールと用いるのが最も好ましい。補助脂質に対するリン脂質のモル比は、およそ3:1から1:1であり、好ましくは約1.5:1から約1:1であり、最も好ましくは、約1:1である。
【誤訳訂正４】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】００４５
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【００４５】
本発明の1つの態様は、非カチオン性リポソームおよび生理的に受容できるキャリヤーを含む医薬組成物を包含し、該リポソームは少なくとも1個の脂質を含む。
本発明のリポソームを調製するのに使用される適当な脂質は、例えば、これらに限定されないが、リン脂質、例えばホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルグリセロールまたはカルジオリピン(CL)など；糖脂質；スフィンゴミエリンなどのスフィンゴリン脂質；スフィンゴ糖脂質（1-セラミジルグルコシドとして知られている）、例えばセラミドガラクトピラノシド、ガングリオシドやセレブロシド； コレステロール； 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)；または1,2-ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)が挙げられる。しかし、それらの様々な天然の(例えば、組織由来のL-アルファ-ホスファチジル: 卵黄、心臓、脳、肝臓、大豆)、および/または合成の(例えば、飽和および不飽和の1,2-ジアシル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン、1-アシル-2-アシル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン、1,2-ジヘプタノイル-SN-グリセロ-3-ホスホコリン)誘導体も含む。そのような脂質は、単独または補助の脂質と組み合わせて用いることができる。 好ましい補助的脂質は、非イオン性であるか、生理的ｐＨで非荷電である。そうした非イオン性脂質は、コレステロールとDOPE(1,2-ジオレオイルグリセリルホスファチジルエタノールアミン)を含むが、これらに限定されない。コレステロールと用いるのが最も好ましい。補助脂質に対するリン脂質のモル比は、およそ3:1から1:1であり、好ましくは約1.5:1から約1:1であり、最も好ましくは、約1:1である。

【誤訳訂正５】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１４８
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１４８】
DOPC、L-α-PC、POPCおよびDPPCと比較したときに、膀胱収縮頻度の減少において、スフィンゴミエリンが、PC頭部を有する脂質の中で最高であることがわかった（図2A）。結合したアシル鎖のうち１つだけが不飽和である場合に、最適の活性が現れることがわかった。すべてのリポソームは、500 mM KCl中で2 mg/mlの脂質濃度で調製された。これらの脂質の構造を、図2Bに示す。
［実施例2］
この実施例は、膀胱過活動の減少におけるスフィンゴミエリン・リポソームの効果を示す。
〔物質および方法〕
スフィンゴミエリンで調製した中性に荷電したリポソームは、ジヒドロスフィンゴミエリンと2つの純粋な合成脂質1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）および1-オレオイル-2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（OSPC）とから調製したリポソームと比較された。
【誤訳訂正６】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１４９
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１４９】
この研究の手法は、リポソームの調製を実施例1から変更したものであることを除いては、実施例1に上述したものと同じである。簡潔にいえば、リポソームを、生理食塩水中でスフィンゴミエリンとコレステロールとのモル比率2:1として構築し（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）、最終脂質濃度を1-2 mg/mlとした。クロロホルム中の脂質を、窒素下で適当な比率で一緒に乾燥させた。その残渣を、強い超音波処理により生理食塩水または500mMのKCl中でリポソームとして再構成した。この脂質組成物から、正味電荷のないスフィンゴミエリン・リポソームが得られた。
〔結果〕
図3に示したようにスフィンゴミエリン・リポソームは、リポソームの注入開始に続く膀胱収縮頻度の減少から立証されるように、ジヒドロスフィンゴミエリン、DSPCおよびOSPCより有意に著しく、KCl存在下で、膀胱過活動を減少させることができた。黒矢印は、500 mM KCl存在下でのリポソームの注入開始を表わす。
［実施例3］
この実施例は、スフィンゴミエリンまたはスフィンゴミエリン代謝物で製剤化されたDSPCリポソームの膀胱過活動に対する効果を示す。
〔物質および方法〕
ホスホリルコリン頭部のないスフィンゴミエリンは、セラミドという分子を生じる、すなわち、この分子は外部刺激に対して広範囲の細胞応答を仲介する、周知の脂質セカンドメッセンジャーを生成し、また、スフィンゴミエリンおよびグリコスフィンゴ脂質の生合成にも使われる。セラミドはそれ自体では安定なリポソームを形成することができない。そのため、膀胱過活動におけるセラミドの効果を、不活性の脂質、すなわち、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DSPC）中にセラミドを1 mol%含めることにより検証した。
リポソームの調製を実施例1から変更したものであることを除き、この研究の方法は、実施例1で記載したものと同じである。簡潔にいえば、リポソームを、生理食塩水でDSPC/

スフィンゴミエリンとコレステロール、DSPC/セラミドとコレステロール、DSPC/スフィンゴシンとコレステロール、またはDSPC/スフィンゴシン1-リン酸塩とコレステロールとのモル比2:1として構築し、最終脂質濃度を1-2 mg/mlとした。クロロホルム中の脂質を、窒素下で適当な比率で一緒に乾燥させた。その残渣を、強い超音波処理により生理食塩水または500mMのKCl中でリポソームとして再構成した。この脂質組成物から、正味電荷のないリポソームが得られた。

〔結果〕

図４に示すように、セラミドは膀胱収縮頻度の減少におけるDSPCの有効性を有意に増大させた。もう一つのスフィンゴミエリン代謝物であるスフィンゴシンをDSPCに1 mol%包含させた場合にも、類似の効果があった。スフィンゴミエリン代謝物であるスフィンゴシン1-リン酸塩をDSPCに1 mol%包含させた場合には、同様の有益な効果を示さなかったものの、DSPC中に例えば1-5 mol%といったより高いモル百分率で包含させたときには、セラミドおよびスフィンゴシンと同程度の膀胱収縮頻度の減少効果を示した（データは示さず）。興味深いことに、スフィンゴミエリンをDSPCに1 mol%包含させた場合には、DSPCリポソームの有効性が増大しなかった。

【誤訳訂正７】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１５０
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１５０】

このセットの実験からの結果から、スフィンゴミエリン（SPM）の代謝物は、1 mol%という低濃度でDSPCのような純粋な合成リポソームに包含させたときには、ラットにおける膀胱収縮頻度の減少について、その親化合物自体よりも有意に活性であることが示された。

［実施例4］

この実施例は、膀胱過活動におけるセレブロシドで製剤化されたリポソームの効果を示す。

〔物質および方法〕

セレブロシドは、スフィンゴ糖脂質であり、かつ、セラミド前駆体である。セレブロシドは、単糖類、例えばブドウ糖またはガラクトースからなる極性頭部を有する。図５は、β-ガラクトースの極性頭部を有するセレブロシド分子を示す。

【誤訳訂正８】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１５１
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１５１】

この研究の方法は、生理食塩水中でDSPC/セレブロシドとコレステロールとを2:1のモル比として最終脂質濃度 1-2 mg/mlとなるようにリポソームが構築されたことを除き、実施例３で記載したものと同じである。クロロホルム中の脂質を、窒素下で適当な比率で一緒に乾燥させた。その残渣を、生理食塩水または500 mM KCl中で強いの超音波処理によりリポソームとして再構成した。この脂質組成物から、正味電荷のないリポソームが得られた。

〔結果〕

図６で示すように、セレブロシドは、膀胱収縮頻度の減少におけるDSPCの有効性を有意に増大させた。DSPC/セレブロシド・リポソームの注入開始（トレース記録中の黒矢印で示す）の後、ピーク間の時間間隔が増加したが、これは膀胱収縮頻度の減少を示している。

［実施例1-4の要約］

実施例1-4からの結果から、スフィンゴミエリンで構成されるリポソーム、あるいは、セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン1-リン酸塩もしくはセレブロシドなどのスフィンゴミエリン代謝物で構成されるリポソームは、ジヒドロスフィンゴミエリンなどの他のリポソーム、またはスフィンゴミエリン代謝物を欠くリポソームと比較して、ラット・モデルで膀胱過活動を有意に減少させることが示された。スフィンゴミエリンは、純粋でない卵PCにおける中性脂質の13%を構成しているいくつかの脂質の１つである。卵PCに存在する脂質のすべてが膀胱過活動の減少に必ずしも効果的というわけではなかった。とりわけ、PCのエーテルエステル類似体である一つの脂質、1-アルキル-2-アセトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンは血小板活性化因子（PAF）であるが、それを単独で点滴注入した場合、あるいはDSPCリポソームに1-5 mol%包含させた場合には、膀胱反射活性（bladder reflex activity）を悪化させた。

【誤訳訂正９】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１５２
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１５２】

図７は、ラット・モデルでの膀胱過活動に対するスフィンゴミエリン・リポソームの活性について提案するメカニズムを表す。スフィンゴミエリン・リポソームまたはその代謝物を点滴注入した後に観察される膀胱収縮頻度の減少は、これらの化合物の抗炎症的作用に起因するかもしれない。セラミドとスフィンゴシンとはいずれも、抗炎症効果を有することが知られている細胞内酵素のプロテインキナーゼC（PKC）の既知ネガティブエフェクターである。さらに、セラミドは、PKCが介在するNF-κB活性化を阻害することにより、Jurkat細胞におけるIL-2産生を減少させることがあると信じられている。

［実施例5］

Sprague-Dawleyラットにおける過活動膀胱モデルを、KCl溶液中の酢酸またはプロタミン硫酸塩（PS）への曝露により確立した。この後、引き続いて生理食塩水中のリポソーム（LP）（前者の場合）またはLP/KClの点滴注入を行った。連続CMG変化を調べ、その結果を、対照（生理食塩水注入）、過活動膀胱（酢酸またはPS/KCl）およびLPでの処置と比較した。

〔物質および方法〕

膀胱内圧は、皮下注射（sc）によって投与されたウレタン（urethane）（1.2 g/kg）で麻酔を掛けられた成熟雌性Sprague-Dawleyラットにおいて、経尿道的カテーテルを通じて記録された。動物の一部は、実験の前に4日間、カプサイシンで前処置（125 mg/kg, sc）を行った。連続CMGは、膀胱を生理食塩水、酢酸（0.1%）、KCl（500mM）、プロタミン硫酸塩（PS）（10 mg/ml）、LP、PS/KCLまたはLP/KClを含む様々な組成物の溶液でゆっくり（0.04 ml/分）満たすことによって行った。測定したパラメータとして、排尿間隔（ICI）、膀胱収縮の振幅、コンプライアンスおよび排尿圧閾値（PT）を含んでいた。

【誤訳訂正１０】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１５５
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１５５】

過活動膀胱の誘導。生理食塩水注入で対照CMGを行った後、次の5つの膀胱内注入実験を並行して行った：(1) 上皮透過性を増やすための1時間のPS（Sigma Chemical Co. 10 mg/ml）注入（N=6）；(2) 1時間のKCl（500 mM）注入、次いで、もう1時間のPS/KClによる注入、その後、2時間のKCl注入（N=6）であるか、または2時間のLP/KCl注入（N=6）；(3) 1時間の酢酸（AA）（0.1%）注入、その後、2時間の生理食塩水の注入（N=6）またはLPの注入（N=6）；(4) 1時間のLP注入の後、1時間のAA注入（N=6）；ならびに(5) 実験の４日前

にカプサイシン（10%エタノール、10%TWEEN(R)80、80%生理食塩水中に125 mg/kg）を皮下注射した動物に2時間のAA注入（N=4）（C. L. Chengら, 1993, Am. J. Physiol. 265:R132-138）。実験のデザインを図８に図示する。使用したKCl濃度は、正常ラットの尿中に存在する濃度の範囲内であった（M. Ohnishi ら, 2001, Toxicol. Appl. Pharmacol. 174:122-129）。

【誤訳訂正１１】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１５８
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１５８】
表1A-1Cで示すように、PSだけの注入（10 mg/ml）またはKClだけの注入（500 mM）では、CMGの有意の変化はなかった。しかし、PS/KClの注入を行うと、30-40分の遅延の後に刺激性効果が生じた（図９Ｂ，９Ｄ）。ICIおよびコンプライアンスは、二組の実験において、75%-83%（15.8±1.4から2.7±1.0分にまで、または16.3±1.5から3.4±0.7分にまで）ならびに58%-75%（0.284±0.028から0.070±0.019 ml/cm H2Oにまで、または0.226±0.050から0.096±0.037 ml/cm H2Oにまで）まで有意に減少した。

【誤訳訂正１２】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１５９
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１５９】
膀胱収縮振幅は、1つの組（表1C）では有意に増加（23%）したが、他の組（表1B）では有意の増加はなかった。しかし、これら2つの組の平均をとると、膀胱収縮振幅は、有意の増加（16%）を示した。PTは有意の変化はなかった。10-20分の遅延後に注入液をLP/KClに切り替えたとき、ICIは有意に増加した（63%、2.7±1.0から4.4±1.2分にまで）。KCl単独に切り替えても、120分もの間はICIの変化はなかった（図９Ｅ，９Ｆ；表1B、1C）。PTは、LP/KClまたはKCl注入に移行した後に有意に増加した。コンプライアンスは、LP/KCl注入に移行した後には有意の変化はなかったが、KCl注入に移行した後にはさらに減少した（0.096±0.037から0.043±0.014 ml/cm H2Oにまで）。

【誤訳訂正１３】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１６５
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１６５】
パラメータとして、排尿間隔（ICI）、コンプライアンス、圧力閾値（PT）および振幅を挙げた。数値は、平均値±S.E.（N=6）である。* P<0.05、前処置と比較。
AA注入群におけるCMG。AAの刺激性効果は、注入後の20-30分ほどで顕在化した。ICIおよびコンプライアンスは、二組の実験において、75%－84%（15.3±2.2から2.4±0.5分まで、あるいは12.6±2.0から3.2±1.3分にまで）、および71-76%（0.296±0.040から0.071±0.016 ml/cm H2Oまで、あるいは0.275±0.048から0.079±0.026 ml/cm H2Oまで）まで有意に減少した（図１０Ａ－１０Ｆ；表2A-2B）。振幅への影響はより少なく、わずかに増加を示したにすぎなかった。またPTは有意の変化はなかった。次いでLPが注入されると、約10-20分後にICIおよびコンプライアンスが有意に増加した（179%、2.4±0.5から6.7±1.5分まで；ならびに38%、0.071±0.016 ml/cm H2Oから0.114±0.020 ml/cm H2Oまで）（図１０Ｅ，１０Ｆ；表2A-2B）。このような増加は、生理食塩水の注入に切り替えた後120分もの間、持続した。LP単独の注入を1時間行っても処置を行っていない動物での排尿反射に変化はなく（表2C）；また、M注入の効果は、前もってLPの膀胱内投与を行うこと

によっては減少しなかった。
【誤訳訂正１４】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１７７
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１７７】
移行細胞表面をおおう保護バリアとして、表面GAG層が提案されている（J. I. Bade ら, 1997, J. Urol 79:168-171; G. Hohlbrugger, 1995, J. Urol. 154:6 15; C. L. Parsons ら, 1980, Science 208:605-607）。GAG層の欠陥は、IC患者のサブセットにおいて示唆されてきた（C. L. Parsons ら, 1991, J. Urol. 145:732-735; C. L. Parsons ら, 1994, Br. J. Urol. 73:504-507）。リポソーム（LP）は、同心の閉鎖膜系にあるリン脂質を含み、薬物またはDNA構築物のキャリヤーとして使われる（K. Reimer ら, 1997, Dermatology 195(suppl. 2):93-99; M. Nishikawa ら, 2001, Human Gene Therapy 12:861-870; G. Gregoriadis, 1976, New Eng. J. Med. 295:704-710）。LPをベースとする組成物は外傷用の多湿フィルムを提供し、また、慢性的炎症反応なく新生皮層内での外傷治癒を仲介する（K. Reimer ら, 1997, Dermatology 195(suppl. 2):93-99; M. Schafer-Korting ら, 1989, J. Am. Acad. Dermatol. 21:1271-1275）。他の研究者は、LPが安定した吸収、エンドサイトーシス、脂質移送および融合によって細胞と相互作用することを示唆した（R. B. Egerdie ら, J. Urol. 142:390-398）。本明細書で示すように、傷害のある尿路上皮へのLPの投与は、過活動膀胱、ICまたは他の泌尿器系疾患を有する患者の治療のための新しい方法として使うことができる。
［実施例7］
ネズミにおいて急性過活動膀胱の動物モデルを、PSの膀胱内注入、尿路上皮のバリア機能を衰弱させるのに使用される薬剤および生理的濃度のKClを用いて開発した。
〔物質および方法〕
連続CMGを、ウレタン麻酔した雌性ラットに行った。膀胱を通常の生理食塩水で満たした（0.04 ml/分）後、KCl（100もしくは500mM）またはPS（10もしくは30 mg/ml）のいずれかを含む試験溶液で、60分間膀胱内注入を行った。この後、10 mg/mlのPSで処置した動物に、100、300または500mMのKClを膀胱腔内に注入した。一部の動物は、実験の４日前にカプサイシン（125 mg/ml, sc）で前処置を行った。
【誤訳訂正１５】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１８３
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１８３】
様々な注入グループ中のCMG。表4に示すように、100 mMまたは500 mM KCl単独の点滴注入の間におけるCMGパラメータは、生理食塩水投与の間のCMGパラメータとは有意の違いはなかった。これらの結果から、膀胱バリア機能が対照の条件による影響を受けないことが示された。10 mg/ml PSを1時間、点滴注入している間には、生理食塩水投与と比較して有意の変化はなかった（図１１Ａ－１１Ｄ; 表5）。これらの結果から、低用量PSはそれ自体では膀胱の刺激物でないことが示された。しかし、膀胱へ30 mg/ml PSを点滴注入したところ、40～45分の遅延の後に刺激的効果が表れる（ICIは80.6%減少し、コンプライアンスは63.6%減少し、かつPTは36.8%増加した）結果となった（図１１Ａ－１１Ｄ; 表5）。
【誤訳訂正１６】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１８７
【訂正方法】変更
【訂正の内容】

【０１８７】
それぞれのグループについてN=4。パラメータとしては、容積圧力閾値（PT）、振幅、コンプライアンスおよび排尿間隔（ICI）を挙げた。数値は、平均値±S.E.である。* P<0.05、前処置と比較。
低濃度PS（10 mg/ml）注入後のKClの効果
図１２Ａ－１２Ｆおよび表6に示されるように、300または500 mM KCl注入で実施されたCMGは、ICI（76.9または82.9%の減少）、コンプライアンス（60または63.4%の減少）および収縮振幅（23.7または21.4%の増加）を有意に変えるものであった。しかし、PTに有意の変化はなかった。300 mM KClが介在する該効果は20～30分の遅延後に起こったが、500 mM KClが介在する該効果は10～15分の遅延後に起こった。このことは、より高濃度のKClによって、より迅速な侵入が生じることを意味した。100 mM KClの注入を1時間おこなっても、CMGパラメータに有意の変化を起こさなかった。
【誤訳訂正１７】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１９３
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１９３】
排尿反射を抑制した動物におけるCMG。図１３Ａ－１３Ｂで示すように、通常の生理食塩水の注入は、排尿反射を誘導しなかった。このことから、排尿反射がヘキサメトニウム（hexamethonium）注射または骨盤神経切断によってブロックされることが示された。PS（10 mg/ml）点滴注入に引き続くKCl（500 mM）の注入により、コンプライアンスが55.9%（0.093±0.026から0.041±0.011 ml/cm H2Oにまで）減少した。このことから、カリウムが排尿筋の直接刺激に影響を及ぼし、コンプライアンス減少の原因となることが示された。
［実施例7-8の要約］
要するに、実施例7-8からの結果は、以下のことを示した：(1) 低用量PS（10 mg/ml）は膀胱刺激物でなく、尿路上皮バリア機能への非細胞毒性傷害（affront）であり；かつ、(2) 膀胱内圧測定に、通常の「生理的な」食塩水を、より生理的に適切である300または500 mM KCl（M. Ohnishiら, 2001, Toxicol. Appl. Pharmacol. 174:122-129; J. Morrisonら, 1999, Scand. J. Urol. Nephrol, suppl 201:73-75）に対して使用すると、過活動膀胱の動物モデルにおいて下部尿路の機能に影響が現れた。ICの重要な構成要素は漏れやすい尿路上皮であると想定されてきた（C. L. Parsonsら, 1991, J. Urol. 145:732-735; C. L. Parsonsら, 1994, Br. J. Urol. 73:504-507; S. Keayら, 1999, J. Urol. 162:1487-1489）。尿路バリアが感染しやすくなると、正常時には再吸収なく尿管を通過する高濃度の有害物質が流入することになると信じられている（G. Hohlbrugger, 1999, Br. J. Urol. 83:22-28; C. L. Parsonsら, 1998, J. Urol. 159:1862-1867）。尿路バリアが破綻すると、これらの物質は膀胱内に逆行する場合があり、そこで、該物質は常在C-線維求心路の活性を刺激する。このことにより痛覚の伝達が行われ、知覚症状が惹き起こされる（C. L. Parsonsら, 1998, J. Urol. 159:1862-1867）。1つの理論によると、尿からの濃縮カリウムの粘膜下組織領域への流入は、膀胱壁の感覚求心路を脱分極し、過活動膀胱を引き起こす（G. Hohlbrugger, 1999, Br. J. Urol. 83:22-28; C. L. Parsonsら, 1998, J. Urol. 159:1862-1867）。
【誤訳訂正１８】
【訂正対象書類名】明細書
【訂正対象項目名】０１９７
【訂正方法】変更
【訂正の内容】
【０１９７】
結論として、生理食塩水に対して膀胱内圧測定用の300または500 mM KClの使用は、過

活動膀胱の動物モデルにおける下部尿管の機能に影響を及ぼす。したがって、泌尿器系疾患の治療用医薬組成物として、ここで詳細に述べるように、生理食塩水を含む賦形剤、希釈剤または担体を含有することが好ましい。

［実施例9］

膀胱内バニロイド療法(intravesical vanilloid therapy)は、脊髄傷害（SCI）および多発性硬化症（MS）の患者において排尿反射亢進を治療するのに用いられてきた。カプサイシン（CAP）療法は、効果的な投与量を達成するためには高濃度（30%以上）のエタノールを必要とする。このレベルのエタノールは組織に有毒であり、かつ、それ自体で出血性膀胱炎の原因となる場合がある。リポソーム（LP）のリポイド相（lipoidal phase）、すなわち同心性リン脂質二重層は、高濃度エタノールの魅力的な代替となりうる。この可能性に取り組む試みにおいて、ウレタン麻酔されたラットにおいてCAPのリポソーム送達の試験を行った。

〔物質および方法〕

開放経尿道的膀胱内圧測定（Open transurethral cystometry）（0.04 ml/分）を、15匹の雌性S-Dネズミ（250-300 g）についてウレタン麻酔下（1.2 g/kg）で行った。2時間にわたる生理食塩水注入の対照期間の後に、注入液を、1mM CAPを有するLP（LP/CAP）あるいは30分間をLP単独でその後はLP/CAPの、いずれかに切り替えた。CAP送達効率を、膀胱刺激およびその後の脱感作が最初に明らかとなる開始時間と膀胱収縮頻度とによって決定した。LPを上記実施例5で記載したように構成した。すなわちCAPの有無にかかわらず、ホスファチジルコリンとコレステロールとを2:1のモル比率で合わせたものを窒素下でクロロホルム溶媒から乾燥させた。結果として生じる残渣を強度の超音波振動に掛けることにより、総脂質2 mg/mlの生理食塩水中の懸濁液とした。

〔結果〕

LP単独の場合では膀胱収縮頻度に何ら効果を有しなかった（対照およびLPのそれぞれについて膀胱収縮/分、0.13 ± 0.02対0.13 ± 0.01）（図１４）。しかし、LP/CAPの場合は、注入開始の数分以内に、膀胱収縮頻度（1.11±0.08 膀胱収縮/分, $p<0.0001$）が劇的に増加する結果となった（図１４）。膀胱収縮頻度はその後低下し、ついに124 ± 24分までに停止した。

〔結論〕

膀胱収縮頻度の劇的な増加およびその後の脱感作によって立証されたように、LPは、少なくとも1つの疎水性薬剤、すなわちCAPを極めて効果的に送達する能力がある。さらにLP単独では、刺激を加えない状態において排尿反射に何ら影響を及ぼさなかった。LPによる保護効果を示してきた他の実験と組合わせると、このことは、LP担体が、CAPのような刺激物質によって惹き起こされる神経性炎症（neuro-inflammatory）反応に基づく尿路上皮バリア機能の易感染化から部分的にも保護する場合があることを示唆した。この実験は、LPが、例えば抗生物質および癌治療薬といった他の薬剤のために用い得ることを示す。この実施例に記載の実験の説明は、参照により本明細書に組み込まれるY. C. Chuangらの100th Annual Meeting American Urological Association (AUA), Abstract; 2002, J. Urol. 167:41A にも記載されている。

［実施例10］

下部尿路の自律（膀胱）神経感応に対するボツリヌス毒素（Btx）およびリポソームの注入効果について以下のように調べた。

〔材料および方法〕

実施例5に記載したようにリポソームを調製した。雌性S-Dネズミ（250）は、ウレタン（1.2 g/kg）により麻酔を掛けられた。動物は、膀胱内リポソーム投与に加え、Btx D（5.7 ng/gm体重; Sigma, St Louis, MO）注射を受けた。対照動物は注射を受けなかった。すべての動物に気管切開を行い、処置した動物に人工呼吸を行った。経膀胱カテーテルを挿入し、Btx注射の6時間後に細片検査のために膀胱を採取した。