

資料 1

遺伝子導入に用いる正電荷リポソームの膜組成は、以下の3成分 N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-デドデシル-D-グルタメイト クロライド (TMAG)、デラウロイル-ホスファチジルコリン (DLPC)、デオレオイル-ホスファチジエタノールアミン (DOPE) からなる。この3成分をクロロホルムに溶解し、モル比がそれぞれ 1:2:2 で、総脂質量が 1  $\mu$ mol になるよう調製する。これを pyrex tube にとり、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮し、さらに真空ポンプを用いて減圧乾燥を行う。次にヒト  $\beta$  型インターフェロン遺伝子発現プラスミド pSV2IFN- $\beta$  あるいは pDRSV-IFN  $\beta$  を 20  $\mu$ g 含むリン酸塩緩衝液を加え、約 2 分間振盪させた後、リン酸塩緩衝液を加え、再分散させ、培養細胞を用いた実験に用いた。はじめに遺伝子を含まない空のリポソームを調製し、本研究で対象とするヒトグリオーマ細胞を始め、COS-1 細胞、ヒト線維芽細胞、肝初代培養細胞など種々の細胞について毒性に関する検討を行った。その結果、ヒトグリオーマ細胞の場合は培養液中のリポソームの総脂質濃度が 20  $\mu$ M 以下ではほとんど毒性が認められず、有意な細胞増殖抑制も観察されなかった。したがって以下のヒトグリオーマ細胞を用いた基礎実験においては原則として 15  $\mu$ M の濃度のリポソームが使用されている。一方リポソームの毒性は培養細胞の種類によっていくらかの違いを認めたが、総脂質濃度が 10  $\mu$ M 以下ではほとんど毒性が認められず、細胞増殖も抑制されなかった(表)。

表 IAB-1 による細胞毒性の評価 (%)

細胞名	種類	由来	脂質濃度 (nmol/ml)			
			7.5	15	30	60
U251MG	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	8	64
U251SP	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	10	52
U251nu/nu	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	8	66
U251NN	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	6	50
U87MG	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	12	81
SK-MG-1	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	14	65
SK-MG-4	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	7	60
SK-MG-6	グリオーマ細胞	ヒト	<5	6	12	46
SK-MG-15	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	8	44
T98	グリオーマ細胞	ヒト	<5	<5	7	54
FB-9	胎児グリア細胞	ヒト	<5	<5	9	27
Tera2	奇形腫細胞	ヒト	<5	<5	8	24
HepG2	肝癌細胞	ヒト	<5	<5	9	40
Calu-1	肺癌細胞	ヒト	<5	<5	14	49
Paca2	膵臓癌細胞	ヒト	<5	7	16	37
LAK	リンパ球	ヒト	<5	<5	13	27
	線維芽細胞	ヒト	<5	<5	14	57
GL261	グリオーマ細胞	マウス	<5	<5	<5	15
MBEC	血管内皮細胞	マウス	<5	<5	11	26
NIH3T3	線維芽細胞	マウス	<5	<5	<5	25
T9	グリオーマ細胞	ラット	<5	<5	17	48
C6	グリオーマ細胞	ラット	<5	<5	12	42
GMI-R1	ミクログリア細胞	ラット	<5	<5	6	14
肝初代培養細胞	肝細胞	ラット				
COS-1	腎細胞	サル	<5	9	38	39

(未発表データ)