バブルリポソームを用いた DDS

ダブルターゲティング：薬物と医療機器テクノロジーの融合

平田圭一・鈴木 亮・小田雄介・宇都口直樹・丸山一雄*

Drug delivery system utilized bubble liposome

Recently, ultrasound-mediated drug or gene delivery with microbubbles was developed as a novel DDS technology. However, an optimum carrier of this system is not yet established. So, we developed novel liposomes (Bubble liposome) containing an ultrasound imaging gas as ultrasound-sensitive carrier in the drug and gene delivery system.

We discuss about the feasibility of Bubble liposome in gene delivery system.

近年、超音波技術の進展に伴い、超音波エネルギーを利用した薬物・遺伝子送達システムが、新たな DDS 技術として注目されている。しかし、これら超音波を用いる DDS に適したキャリアーは確立されていない。筆者らは、長期血中滞留型のポリエチレングリコール修飾リポソーム内に超音波造影ガスを封入した、リポソーム型微小気泡であるバブルリポソームを開発した。

本稿では、バブルリポソームの超音波制御型 DDS キャリアーとしての有用性を見いだしたので、ここに紹介させていただく。

Keiichi Hirata・Ryo Suzuki・Yusuke Oda・Naoki Utoguchi・Kazuo Maruyama*

key words: liposome, ultrasound, nanobubbles, gene, DDS

リポソームは、生体膜の主要構成成分であるリン脂質からなり、内部に水相を有する脂質二重膜の閉鎖小胞を形成している。また、生体成分から構成されているため、毒性や抗原性が低く、薬物、蛋白質や核酸などを封入できることから、薬物送達システム(DDS)キャリアーとして利用されてきた。しかし、リポソームを血中に投与した場合、主に肝臓や脾臓の細網内皮系(RES)により捕捉されてしまうことが問題となり、この RES を回避することが DDS キャリアーとしての課題とされている。そこで、リポソーム表面を polyethylene glycol(PEG)で修飾した PEG 修飾リポソーム(PEG-リポソーム)が、RES 回避可能な長期血中滞留型リポソームとして開発された¹⁻³⁾。この PEG-リポソームに抗がん剤であるドキソルビシンを内封した DOXIL[®]は、医薬品として臨床で実用化されている。また、近年では PEG-リポソーム表面に蛋白質、抗体や糖などの特異的リガンドを結合させたアクティブターゲティング型リポソームが、DDS キャリアーとして盛んに

研究されている⁴⁻⁷⁾。

筆者らは、PEG-リポソームを利用した新たなアプローチとして、超音波造影ガスを封入したリポソーム(バブルリポソーム)を開発した⁸⁻¹⁷⁾。このバブルリポソームは超音波感受性であり、超音波照射によって封入されている気泡の圧壊が誘導される。このとき生じるジェット流を利用することで細胞内に薬物、蛋白質や遺伝子を効率よく送達可能である^{18,19)}。そこで本稿では、超音波を利用した DDS に関して、これまでに筆者らが得たバブルリポソームと超音波を併用した遺伝子導入に関する知見を中心に紹介する。

バブルリポソームの特性

筆者らは、薬物・遺伝子送達を目的としたサブミクロンサイズのバブル製剤として、PEG-リポソーム内に、パーフルオロプロパンガスを封入したリポソーム型微小気泡(バブルリポソーム)を開発した(図1)。パーフルオロプロパンガスは、既存の超音波造影剤のマイクロバブルにも使用されている高輝

* Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University 帝京大学薬学部生物薬理学教室

図1 バブルリポソーム

a: 模式図, b: バブルリポソームの透過型電子顕微鏡撮影画像 (×50,000)

図2

バブルリポソームとマイクロバブルの粒子径

a: バブルリポソーム(左)と Sonazoid(右)の光学顕微鏡観察 (×400)

b: バブルリポソームと Sonazoidの動的光散乱法による粒子径測定結果

度の超音波造影ガスである。このバブルリポソームは、リポソームの特徴である脂質二重膜構造の中にパーフルオロプロパンのナノバブルを封入したユニークな構造を有していた。また、このバブルリポソームの粒子径は400~950 nmであり、既存の超音波診断用マイクロバブル造影剤である Sonazoid[®]

の粒子径と比較しても小さいことがわかる(図2)。

過去の角田らの報告によると、マウスに多量のマイクロバブル(Optison)を単回静脈内投与すると、毛細血管に詰まりマウスが死亡することが知られている²⁰⁾。そこで筆者らは、バブルリポソームにおいても同様の影響があるかを確認したところ、バブル

図3
バブルリポソームによる
遺伝子導入メカニズム

リポソーム量として $500 \mu\text{g}$ /マウスの投与でも致死マウスは認められなかった。これは、バブルリポソームがマイクロバブルより小さいために毛細血管における塞栓を誘導しなかったためであると考えられた。それゆえ、バブルリポソームが既存のマイクロバブルより組織深部への到達性にすぐれたバブル製剤であると推察される。

超音波遺伝子デリバリーについて

超音波を利用した遺伝子導入研究は1987年にFechheimerらによる報告からはじまった²¹⁾。この超音波による遺伝子導入メカニズムとしてキャビテーション(空洞現象)が関与していると考えられている。キャビテーションとは、液体に超音波を照射したときの負の圧力が液体を維持するのに必要な圧力に打ち勝ったときに空洞を生じる現象である。

このキャビテーション気泡は最終的に圧壊するが、この圧壊時に気泡近傍にジェット流が生じ、このエネルギーにより細胞膜に一過性の小孔が開く²²⁾ことで、細胞外の物質が細胞内に送達されることが考えられている。しかし、超音波を利用した初期の遺伝子導入ではキャビテーションの誘導効率を高めるた

めに20~50 kHzの低い周波数の超音波が用いられ、細胞に対する傷害性が問題となっていた。この問題を解決するために考えられたのが、超音波によるキャビテーションを誘導しやすくするために、予めキャビテーションの核となる微小気泡を存在させておくことである^{23~25)}。すなわち、上述の超音波遺伝子導入において超音波造影剤であるマイクロバブルを添加することで、低い超音波照射強度および短時間で遺伝子導入可能であることが報告されるようになった^{26~28)}。

このような背景のもと、筆者らは、バブルリポソームにも既存のマイクロバブルと同様に超音波感受性があり、バブルリポソームへの超音波照射でリポソーム内のガスの振動や圧壊によるキャビテーションが誘導されることを確認していた。実際に、バブルリポソームへの超音波照射による圧壊現象を超高速カメラで撮像したところ、キャビテーション誘導時にジェット流が生じていることが判明した。このジェット流を利用することで細胞への遺伝子導入が可能になるものと考えられたため、筆者らはバブルリポソームと超音波照射の併用による遺伝子デリバリーに関する研究に着手した(図3)。さまざまな種類の細胞にルシフェラーゼ発現プラスミド

図4 バブルリポソームを用いた培養細胞への遺伝子導入
各種細胞にルシフェラーゼ発現プラスミド DNA (2 μ g/mL) とバブルリポソームを添加し、超音波照射 (Frequency : 2 MHz, Intensity : 2.5 W/cm², Time : 10 sec) を行った。その後、細胞を洗浄し2日間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。

S180 : mouse sarcoma. Colon26 : mouse colon adenocarcinoma. B16BL6 : mouse melanoma. Jurkat : human T cell line. HUVEC : human umbilical vein endothelial cell

DNA (pCMV-Luc) を超音波単独またはバブルリポソームと超音波照射の併用により遺伝子導入したところ、いずれの細胞種においてもバブルリポソームと超音波照射の併用により高いルシフェラーゼ発現が認められた (図4)。

このようにバブルリポソームと超音波の併用が細胞種を問わず遺伝子導入可能であったのは、キャビテーションによる物理的エネルギーを利用して細胞質内に遺伝子を直接導入できるためであると考えられた。また、このバブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入法は、超音波照射時間がたった1秒でも培養細胞に遺伝子導入可能であるうえ、血清存在下でも遺伝子導入効率の低下が認められないことも明らかとなっており、既存の非ウイルスベクターに代わる新たな遺伝子導入システムとして期待される。

バブルリポソームと超音波照射を利用した遺伝子導入システムの構築

遺伝子治療は、先天性の遺伝子疾患やがんの新しい治療法として期待されている。これまでに行われてきた遺伝子治療の症例は、アデノウイルスやレト

図5 バブルリポソームを用いたがん組織への遺伝子導入
バブルリポソームとルシフェラーゼ発現遺伝子をもつがん組織に局所投与し、がん組織へ超音波照射 (Frequency : 1 MHz, Duty : 10%, Burst Rate : 2.0 Hz, Intensity : 0.7 W/cm², Time : 60 sec) した場合のルシフェラーゼ活性を測定した。

ロウイルスのようなウイルスベクターが中心となり報告がなされている^{29,30)}。その主な理由は、非ウイルスベクターにくらべて遺伝子導入効率が高いことである。しかし、そのウイルスベクターにおいては、安全面を危惧する報告もなされている^{31,32)}。

一方、安全性が高いと考えられている非ウイルスベクターは、その遺伝子導入効率が一般的に低いため、導入効率の高いベクター開発が望まれている。前項でも述べたように、バブルリポソームと超音波照射を併用した遺伝子導入法は既存の非ウイルスベクターの問題を改善する遺伝子導入システムとして期待される。そこで、バブルリポソームと超音波の併用による *in vivo* 遺伝子導入効率について評価した。

筆者らは将来的にがん遺伝子治療の構築を行いたいと考えているため、固形がん組織への遺伝子導入を検討した。卵巣がん細胞 (OV-HM) を後背部皮内へ移植した担がんマウスのがん組織に pCMV-Luc とバブルリポソームを投与し、がん組織へ超音波照射することで遺伝子導入した。その結果、バブルリポソームと超音波を併用した群で高いルシフェラーゼ発現が観察された。また、このルシフェラーゼ発現効率は既存の遺伝子導入試薬である Lipo-

図6 バブルリポソームと超音波照射を用いた IL-12 がん遺伝子療法における生存率

OV-HM 細胞を背部皮内に移植した担がんマウス (B6C3F1 マウス, 雌, 6 週齢) のがん組織へ IL-12 発現プラスミド DNA (pCMV-IL12) (10 μ g) とバブルリポソーム (2.5 μ g) を局所投与 (25 μ L) し, 超音波照射 (Frequency : 1 MHz, Duty : 10%, Burst Rate : 2.0 Hz, Intensity : 0.7 W/cm², Time : 60 sec) を計 6 回 (7, 9, 12, 14, 16, 19 日目) 行った場合の生存率

fectamine 2000 を用いた時より高いことが明らかとなった (図 5). このように, バブルリポソームと超音波を用いた遺伝子導入効率は既存の非ウイルスベクターよりすぐれていることが示唆された.

バブルリポソームと超音波照射を利用したがん遺伝子療法

近年, 抗腫瘍免疫の活性化を目的とした新しいがん治療法としてサイトカイン療法が注目されている³³⁻³⁶). そのなかでも IL-12 は, NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞などを活性化することで強力な抗腫瘍効果を誘導するサイトカインとして, 臨床の場合においても期待されている³⁷⁻⁴⁰). しかし, IL-12 の全身投与は, 全身作用による副作用のリスクが懸念されており⁴¹), 副作用の影響なく治療効果を得るためには, がん組織特異的に IL-12 を作用させる必要がある.

前項で示したように, バブルリポソームと超音波照射の併用は, 固形がん組織に効率よく遺伝子導入できることが明らかとなっている. そこで筆者らは, バブルリポソームと超音波の併用による IL-12 発現プラスミド DNA (pCMV-IL12) の遺伝子導入によるがん遺伝子治療を試みた (図 6). その結果,

バブルリポソームと超音波の併用により pCMV-IL12 を導入した群で顕著な延命効果が認められた. 一方, Lipofectamine 2000 による遺伝子導入では, ほとんど延命効果は認められなかった. このような結果が得られたのは, バブルリポソームと超音波の併用により効率よく IL-12 遺伝子が発現し, 強力な抗腫瘍免疫が誘導されたためであると考えられた. このことから, バブルリポソームと超音波照射の併用法は IL-12 がん遺伝子治療において有用な非ウイルスベクターになることが示唆された.

バブルリポソームを用いた低侵襲的かつ組織特異的 *in vivo* 遺伝子デリバリー

前項でも示したように, バブルリポソームと超音波を利用した遺伝子導入法はバブルリポソームと超音波の両者が存在する空間でのみ細胞内への遺伝子導入に必要なドライビングフォースが発生する. すなわち, バブルリポソームを静脈内から全身投与し, 超音波照射部位をコントロールすることで超音波照射部位特異的な遺伝子導入が可能になると考えられる. そこで, バブルリポソームと超音波の併用による低侵襲的かつ組織特異的な *in vivo* 遺伝子導入システムの確立を試みた. pCMV-Luc を尾静脈から全身投与後, ただちに肝臓に向けて体外から経皮的に超音波照射した (図 7). その結果, 超音波照射部位である肝臓において高いルシフェラーゼ発現が認められた.

このようにバブルリポソームとプラスミド DNA が血流を介して流れていたにも関わらず肝臓に遺伝子導入できたのは, 超音波照射部位である肝臓でバブルリポソームがキャビテーションを誘導し, そのときに遺伝子を肝臓に導入したためであると考えられた. 今回は示していないが, 筆者らは同様の方法を用い超音波照射部位を変更することで脾臓や脳へも遺伝子導入できることを確認している. このように今回示した方法は, 超音波照射部位を変更するだけでさまざまな組織や部位に低侵襲的かつ特異的に遺伝子導入できる可能性を有しており, 他の遺伝子導入ベクターにはない非常に簡便でユニークな特性をもつ方法であるといえる.

図7 バブルリポソームの経静脈的投与による肝臓への遺伝子導入

a: バブルリポソームとルシフェラーゼ発現遺伝子を尾静脈より全身投与し、肝臓へ超音波照射 (Frequency: 1 MHz, Duty: 50%, Burst Rate: 2.0 Hz, Intensity: 1.0 W/cm², Time: 60 sec) した。超音波照射1日後にマウスから各臓器を採取し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

b: ルシフェラーゼ遺伝子発現のバイオイメージング

最近では、がんの温熱療法のための治療システムとして強力集束超音波 (HIFU) が臨床応用されている。この HIFU 技術は体外から超音波を照射し、生体内のある1点に超音波エネルギーを集束させることのできる非侵襲的治療システムであり、超音波照射部位を数 mm オーダーでコントロールできるようになっている。それゆえ、将来的にはバブルリポソームの体内動態制御と HIFU 技術をうまく組み合わせたダブルターゲティングにより、精密な遺伝子導入部位の制御が可能になると期待される。

おわりに

本稿では、バブルリポソームと超音波を利用した遺伝子導入について紹介した。特に、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入は、短時間の超音波照射で細胞内に遺伝子導入可能であるうえ、体外からの超音波照射により超音波照射部位のみに遺伝子を送達可能であった。本方法は既存の非ウイルスベクターシステムとは異なり、低侵襲的かつ部位特異的遺伝子導入を可能とする有望な遺伝子導入法として期待される。それゆえ、本稿で紹介した方法は、遺伝子治療分野で課題となっている部位特異的な遺伝子発現用ベクター開発において有望な

技術といえる。

冒頭でも述べたようにバブルリポソームはリポソーム技術を基盤としたバブル製剤であり、リポソーム表面に容易に標的指向性分子を修飾することができる。今回紹介しなかったが、これまでに筆者らの共同研究者はバブルリポソーム表面に血栓を認識するペプチドを修飾し、血栓モデル動物に静脈内投与することで、バブルリポソームの血栓部位への集積を超音波造影により確認している。さらに、この集積したバブルリポソームにキャビテーションを誘導するような周波数・強度の超音波を体外から照射することで血栓を破壊し血流を再開することが可能であることも確認している。このように、バブルリポソームと超音波の併用は、単に細胞に遺伝子を導入するだけでなく、これまで超音波造影では診断できなかった血栓の診断を可能にし、さらに治療用超音波照射により血栓治療も行えるような次世代型医療システムの構築を予感させる。

今後、バブルリポソームへのパッシブターゲティングやアクティブターゲティング能の付与による体内動態制御および集束超音波による超音波照射部位の空間的制御の両者を組み合わせたダブルターゲティングを利用することで、厳密な時間的・空間的制御を可能とする理想的な DDS が構築可能になる

ものと考えられる。

本稿で紹介したバブルリポソームによる研究は、帝京大学薬学部生物薬剤学教室で行われた研究であり、本研究の遂行にあたり多大なご協力を賜りました東京薬科大学薬学部・根岸洋一先生、陸上自衛隊研究本部開発実験団・萩沢康介先生、大阪大学大学院薬学研究科・中川晋作先生、北海道大学工学部・工藤信樹先生に深謝するとともに、研究にご協力いただいた学生諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Maruyama K, Holmberg E, Kennel SJ, Klivanov A, Torchilin VP et al. : Characterization of in vivo immunoliposome targeting to pulmonary endothelium. *J Pharm Sci* 79 : 978-984, 1990.
- 2) Maruyama K, Kennel SJ, Huang L : Lipid composition is important for highly efficient target binding and retention of immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 : 5744-5748, 1990.
- 3) Maruyama K, Ishida O, Kasaoka S, Takizawa T, Utoguchi N et al. : Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT). *J Control Release* 98 : 195-207, 2004.
- 4) Ishida O, Maruyama K, Tanahashi H, Iwatsuru M, Sasaki K et al. : Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharm Res* 18 : 1042-1048, 2001.
- 5) Maruyama K, Ishida O, Takizawa T, Moribe K : Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Adv Drug Deliv Rev* 40 : 89-102, 1999.
- 6) Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Maruyama K : Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology. *Int J Pharm* 354 : 49-55, 2008.
- 7) Inuma H, Maruyama K, Okinaga K, Sasaki K, Sekine T et al. : Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Int J Cancer* 99 : 130-137, 2002.
- 8) Suzuki R, Maruyama K : Effective in vitro and in vivo gene delivery by the combination of liposomal bubbles (bubble liposomes) and ultrasound exposure. *Methods Mol Biol* 605 : 473-486, 2010.
- 9) Suzuki R, Namai E, Oda Y, Nishiie N, Otake S et al. : Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J Control Release* 142 : 245-250, 2010.
- 10) Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Namai E, Taira Y et al. : A novel strategy utilizing ultrasound for antigen delivery in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *J Control Release* 133 : 198-205, 2009.
- 11) Suzuki R, Takizawa T, Kuwata Y, Mutoh M, Ishiguro N et al. : Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome. *Int J Pharm* 346 : 143-150, 2008.
- 12) Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Utoguchi N, Maruyama K : Effective gene delivery with liposomal bubbles and ultrasound as novel non-viral system. *J Drug Target* 15 : 531-537, 2007.
- 13) Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F et al. : Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannoseylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure. *Hum Gene Ther* 21 : 65-74, 2010.
- 14) Negishi Y, Endo Y, Fukuyama T, Suzuki R, Takizawa T et al. : Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound. *J Control Release* 132 : 124-130, 2008.
- 15) Negishi Y, Omata D, Iijima H, Takabayashi Y, Suzuki K et al. : Enhanced laminin-derived peptide AG73-mediated liposomal gene transfer by bubble liposomes and ultrasound. *Mol Pharm* 7 : 217-226, 2010.
- 16) Yamashita T, Sonoda S, Suzuki R, Arimura N, Tachibana K et al. : A novel bubble liposome and ultrasound-mediated gene transfer to ocular surface : RC-1 cells in vitro and conjunctiva in vivo. *Exp Eye Res* 85 : 741-748, 2007.
- 17) Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, Hagsawa K, Tanaka K et al. : Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound. *J Control Release* 117 : 130-136, 2007.
- 18) van Wamel A, Kooiman K, Hartevelde M, Emmer M, ten Cate FJ et al. : Vibrating microbubbles poking individual cells : drug transfer into cells via sonoporation. *J Control Release* 112 : 149-155, 2006.
- 19) Greenleaf WJ, Bolander ME, Sarkar G, Goldring MB, Greenleaf JF et al. : Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol* 24 : 587-595, 1998.
- 20) Tsunoda S, Mazda O, Oda Y, Iida Y, Akabame S et al. : Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. *Biochem Biophys Res Commun* 336 : 118-127, 2005.
- 21) Fechtmeier M, Boylan JF, Parker S, Siskin JE, Patel GL et al. : Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 : 8463-8467, 1987.
- 22) Shen ZP, Brayman AA, Chen L, Miao CH : Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the liver via intraportal delivery. *Gene Ther* 15 : 1147-1155, 2008.
- 23) Feril LB Jr, Ogawa R, Tachibana K, Kondo T et al. : Optimized ultrasound-mediated gene transfection in cancer cells. *Cancer Sci* 97 : 1111-1114, 2006.
- 24) Pislaru SV, Pislaru C, Kinnick RR, Singh R, Gulati R et al. : Optimization of ultrasound-mediated gene transfer : comparison of contrast agents and ultrasound modalities. *Eur Heart J* 24 : 1690-1698, 2003.
- 25) Miller MW, Miller DL, Brayman AA : A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med Biol* 22 : 1131-1154, 1996.
- 26) Shohet RV, Chen S, Zhou YT, Wang Z, Meidell RS et al. : Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation* 101 : 2554-2556, 2000.
- 27) Duvshani-Eshet M, Baruch L, Kesselman E, Shimoni E, Machluf M et al. : Therapeutic ultrasound-mediated DNA to cell and nucleus : bioeffects revealed by confocal and atomic force microscopy. *Gene Ther* 13 : 163-172, 2006.
- 28) Duvshani-Eshet M, Adam D, Machluf M : The effects of albumin-coated microbubbles in DNA delivery mediated by therapeutic ultrasound. *J Control Release* 112 : 156-166, 2006.
- 29) Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T et al. : T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-

- SCID : initial trial results after 4 years. *Science* 270 : 475-480, 1995.
- 30) Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, Blackburn A, Edelman G et al. : Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients : safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther* 8 : 746-759, 2001.
 - 31) Connor J, Bannerji R, Saito S, Heston W, Fair W et al. : Regression of bladder tumors in mice treated with interleukin 2 gene-modified tumor cells. *J Exp Med* 177 : 1127-1134, 1993.
 - 32) Porgador A, Gansbacher B, Bannerji R, Tzehoval E, Gilboa E et al. : Anti-metastatic vaccination of tumor-bearing mice with IL-2-gene-inserted tumor cells. *Int J Cancer* 53 : 471-477, 1993.
 - 33) Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR et al. : Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 178 : 1223-1230, 1993.
 - 34) Porgador A, Bannerji R, Watanabe Y, Feldman M, Gilboa E et al. : Antimetastatic vaccination of tumor-bearing mice with two types of IFN-gamma gene-inserted tumor cells. *J Immunol* 150 : 1458-1470, 1993.
 - 35) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N et al. : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003.
 - 36) Marshall E : Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286 : 2244-2245, 1999.
 - 37) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC et al. : Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170 : 827-845, 1989.
 - 38) Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M et al. : Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor : characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 173 : 869-879, 1991.
 - 39) Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Diczig M et al. : Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 146 : 3074-3081, 1991.
 - 40) Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E et al. : Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177 : 1199-1204, 1993.
 - 41) Car BD, Eng VM, Lipman JM, Anderson TD : The toxicology of interleukin-12 : a review. *Toxicol Pathol* 27 : 58-63, 1999.