

厚生科学研究費補助金研究報告書
(平成12年度研究および総合研究報告書)

研究事業名：ヒトゲノム・再生医学等研究事業

研究課題名：サルモデルにおけるベクターの安全性・
有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

平成13年 4月

主任研究者 中村 伸
(京都大学霊長類研究所)

厚生科学研究費補助金研究報告書
(平成12年度研究および総合研究報告書)

研究事業名：ヒトゲノム・再生医学等研究事業

主任研究者：中村 伸（京都大学霊長類研究所）

研究課題：サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性の評価実験系
の開発（H10-ゲノム-016）

報告書もくじ

I. 総括研究報告

サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性の評価実験系の開発----- 1～4

中村 伸、清水慶子、今村隆寿、恵美宣彦、安倍明弘、木村 宏、植田昌宏

II. 分担研究報告

サル培養細胞におけるベクターの安全性、有効性に関する研究----- 5～8

植田昌宏、中村 伸

遺伝子銃（Gene gun）での遺伝子導入条件の検討----- 9～12

恵美宣彦、安倍明弘

サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性に関する分子病理学的評価系
の開発----- 13～14

今村隆寿、中村 伸、清水慶子

サイトメガロウイルス遺伝子ワクチンの開発----- 15～17

木村 宏

サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性の評価実験系の開発----- 18～23

中村 伸、清水慶子、植田昌宏、今村隆寿、

III. 研究報告書追補（主な関連発表論文）----- 24以降

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
平成 12 年度総括研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

主任研究者：中村 伸（京都大学霊長類研究所助手）
分担研究者：清水慶子（京都大学霊長類研究所助手）
今村隆寿（熊本大学医学部助教授）
恵美宣彦（名古屋大学医学部助手）
安部明弘（名古屋大学医学部医員）
木村 宏（名古屋大学医学部助手）
植田昌宏（エスアールエル検査本部担当部長）

研究要旨：サル類は生物進化的位置から遺伝子構造、免疫系、感染感受性、代謝系ならびに胎盤構造などはヒトに類似し、ヒトの疾病とその治療に関わる biomedical な研究において極めて重要な実験モデルである。本研究ではサル類のこうした医生物学的特質に着目し、遺伝子治療・遺伝子ワクチン用ベクターの安全性、有効性を評価・解析するための、in vitro および in vivo でのサルモデル実験系を確立し、より安全で有効な遺伝子治療・遺伝子ワクチンの開発を目指した。

研究目的：

遺伝子治療において目的遺伝子の担体となるベクターの安全性と有効性を検証するための評価実験系の確立は極めて重要である。しかしながら、国内ではベクターの安全性と有効性を十分に評価・試験するための実験系の確立が遅れ、遺伝子治療推進の大きな障害となっている。また、欧米ではこれまでの遺伝子治療の臨床成績が良くないことから、遺伝子治療に係わる基礎研究が重視され、ベクターの有効性など関連研究の推進が強く望まれている。

サル類は進化的位置から、免疫など生体防御系、ウイルス感染感受性ならびに解毒・代謝系などの医生物学的特

性がヒトに類似し、ヒトの疾病治療や薬剤の安全性、有効性評価に係わるバイオメディカルな研究において他の実験動物にない希有な実験モデルである。

本研究ではこうしたサル類の医生物学的特質に着目し、これまでの霊長類研究、臨床医学研究ならびに遺伝子免疫治療研究の実績を基に、ベクターの安全性と有効性を検討するための、サルモデルを用いた in vitro, in vivo 実験系を開発し、より安全で効率的な遺伝子治療や遺伝子ワクチンの発展を目指す。

この目的に沿って、実験用サルの特選、ベクターの作成およびサルモデル実験の環境整備を図った。また、サル

モデル系での、ウイルス性ベクター（ワクシニアウイルス、Semliki Forest virus など）ならびに非ウイルス性ベクター（リポソーム、遺伝子銃、アテロコラーゲン）の安全性や導入条件について、in vitro（サル培養細胞）および in vivo で比較検討した。加えて、ユニークな安全性試験法として妊娠サルモデルでの導入遺伝子の母体→胎児移行を検討した。さらに、ベクターの有効性についてはウイルスの遺伝子治療・遺伝子ワクチンを評価系にした実験を進め、ベクターの安全性、有効性についてサルモデル系での新たな評価・試験系を確立を試みた。

研究成果：

1) In vitro 系での検討：

培養細胞を用いて、GFP 遺伝子およびサルBウイルス gD 遺伝子の導入効率、発現量、細胞増殖、細胞障害の推移など細胞レベルでの、有効性、安全性の評価実験系を検討した。サル由来 MA 104 細胞を用いて上記の検討を進めた結果、カチオニックリポソームを用いた遺伝子導入の効率が高いこと、gD 遺伝子発現は導入後 24~48 時間で最も多いこと、遺伝子発現細胞では細胞発育阻止が認められることなどが確認できた。

2) 遺伝子銃での導入条件の検討：

遺伝子銃による遺伝子免疫治療(DNA ワクチン)を確立する目的で、マウスモデルを用いヒト白血病への悪性腫瘍の DNA ワクチン療法を試みた。DNA プラスミドを金粒子でコートし Gene gun を用いた in vivo の遺伝子導入実験にて導入部位に LacZ の発色が観察された。このことから Gene gun での遺伝子導入が安定して行わ

れていることが確認できた。さらに、腫瘍のチャレンジテストは DNA ワクチンで 3 免疫後に行ったが、FLT3/NEODNA で免疫したマウスでは全く腫瘍の生着、増殖が認められなかった。また、これらには 32D/FLT3 細胞に対する液性抗体が認められた。

3) サルモデルでのベクター・導入条件の安全性、有効性の評価試験：

遺伝子導入ベクター・条件の比較検討のために、ハイブリッドカチオニックリポソーム (VSVG/リポソーム/ポリブレン混合ミセル；リポソームと略)、アテロコラーゲンを基材にしたミニペレットおよび遺伝子銃を用い、レポーター遺伝子 (GFP; pC-EGFP plasmid) をマカクサルに投与した。3 者の内、リポソームが調製の簡便性に加え GFP 遺伝子の効果的な導入を示し、投与部位周辺細胞での GFP タンパク質の発現は、免疫染色で調べると 14 日まで続いた。この時、樹状細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、および繊維芽細胞で GFP タンパク質の発現が認められ、特に、表皮下の基底膜に沿った細胞に強い発現性が見られた。

興味深いのは、投与部位から離れた部位の細胞にも弱いながら GFP タンパク質の発現が観察され、リポソームベクターではリンパ液や血液を介して、導入遺伝子が遠位輸送されていることが示唆された。一方、リポソームベクター投与した周辺組織の細胞障害やそこへの白血球浸潤は見られなかった。また、炎症サイトカインの TNF および CRP の血中上昇、血小板や白血球の変動および組織因子発現なども認められず、炎症や細胞・組織

障害の無いことが確認された。

4) 妊娠サルモデルでの安全性(母体→胎児移行)試験:

妊娠母体に導入した遺伝子の胎盤通過性を検討するために、小型サルのコモンマーモセットをペア飼育で妊娠させ、リポソームベクターでGFP遺伝子を母ザルの背部皮内に投与し、20時間後に胎児の血液、組織中のGFP DNAをPCR分析すると共に、主要組織でのGFPタンパク質発現を解析した。3例の実験ともGFP DNAが胎児血および組織で検出され、特に肺の血管内皮細胞にGFPタンパク質の強発現を認めた。この結果から、安全性が高いと思われたリポソームベクターでも投与遺伝子が母体胎盤を通過して胎児移行する事が明らかになった。一方、この知見は、胎児レベルでの遺伝子導入・遺伝子治療の可能性を示す点で興味深い。

5) サルモデルでの遺伝子治療・遺伝子ワクチンの有効性の評価試験:

抗ウイルス遺伝子ワクチンの開発目的で、ヘルペス系ウイルスのサイトメガロウイルス(CMV)およびパイオハザードレベル-4のBウイルスに(BV)ついて、それぞれの主要抗原(CMV-gB/p65およびBVgD)をプラスミドベクターに組み込んだDNAワクチンを構築した。

BVDNAワクチン(pCI-BVgD)については、リポソームベクターでニホンザル(6頭)に一定間隔で投与した。遺伝子ワクチン投与群に、液性免疫(抗gD抗体産生)、細胞性免疫、Bウイルス増殖阻害活性の顕著な誘導が認められた。一方、PCIプラスミドのみを投与したコントロール群(3頭

)では、こうした免疫・感染防御の誘導は見られず、今回用いたBウイルス遺伝子ワクチンの有効性がサルモデルで実証された。

3. 研究発表:

1. S.Nakamura, F.Mitsunaga, K.Shimizu, et al: Assessment of Gene Transfer Using A Non-Viral Liposome Vector in Monkey Model, Nature Biotechnonogy, 17: 39 (1999).
2. Mitsunaga, S.Nakamura, K.Shimizu, et al: Studies on a Gene Transfer Vector in Non-Human Primates, Primate Res., 15:365 (1999).
3. M. Hirano, S. Nakamura, M. Okada, et al: Rapid Discrimination of Monkey B Virus from Human Herpes Simplex Viruses by PCR in the Presence of Betaine, J. Clin. Microbiol., 38: 1255-1257 (2000).
1. H. Todoroki, S. Nakamura, A. Higure, K. Okamoto, S. Takeda, N. Nagata, H. Itoh, K. Ohsato: Tissue Factor Expression in Monkey and Human Neutrophils, Surgery, 127: 209-216 (2000).
2. K. Abe, T. Inami, S. Nakamura, S. Goto: TT Virus Infection in Non-human Primates and Characterization of Virus Genome: Identification of Simian TT Virus Isolates, J. Virol., 74: 1549-1533 (2000).
3. 中村 伸, 平野 真, 光永総子, 清水慶子: 霊長類モデルでの遺伝子治療研究—特に遺伝子ワクチン研究を中心に, ファルマシア, 36: 127-130 (2000). F. Mitsunaga, M. Hrano, K Shimizu, S. Nakamura: Biomedical characteristics of primate placenta: Transfer of gene-therapeutic materials to fetuses, Primate Res., (in press).
4. F.Mitsunaga, S.Nakamura, M.Hrano, et al: Transfer Efficiency of GFP-Gene Using VSV-G Liposome Vector in Monkey Model, Gene Therapy

- (submitted).
5. Emi, N., Abe, A., Kasai, M., Kohno, A., Tanimoto, M., Kimura, H., Kawashima, K., Ito, M., Mori, N. and Saito, H.: CD4- and C56-positive T-cell line, MTA, established from natural killer-like T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Hematol* 69:180-185 (1999).
 6. Miyawaki, S., Kobayashi, T., Tanimoto, M., Kuriyama, K., Murakami, H., Yoshida, M., Minami, S., Minato, Tsubaki, K., Omoto, E., Oh, H., Jinnai, I., Sakamaki, H., Hiraoka, A., Kanamaru, A., Takahashi, I., Saito, K., Naoe, T., Yamada, O., Asou, N., Kageyama, S., Emi, N., Ueda, T., Tomonaga, M., Saito, H., Ueda, R. and Ohno, R.: Comparison of leukopenia between cytarabine and behenoyl cytarabine in JALSG AML-89 consolidation therapy. *Int J Hematol* 70:56-57 (1999).
 7. Kasai M, Akatsuka Y, Emi N, Taji H, Kohno A, Abe A, Tanimoto M, Kodera Y, Saito H. Immune response of post-transplant peripheral lymphocytes against the patient pre-B cell line, NAGL-1. *Int J Hematol.* , 69:112-8 (1999).
 8. H. Mizuno, N. Emi, A. Abe, I. Takahashi, T. Kojima, H. Saito, Y. Sumi, M. Ueda : Successful Culture and Sustainability In Vivo of Gene-modified Human Oral Mucosal Epithelium. *Hum Gene Ther* 10: 825-830 (1999).
 9. S. Mizuno, N. Emi , M. Kasai, A. Ishitani , H. Saito: Aberrant expression of HLA-G antigen in IFN- γ stimulated acute myelogenous leukemia. *Brit J. Haematol.*, 111: 280-282 (2000).
 10. M Murata, N Emi, N Hirabayashi, M Hamaguchi, S Goto, A Wakita, M Tanimoto, H Saito, Y Kodera, Y Morishita for the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group: No significant association between HA-1 incompatibility and developing acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in a Japanese HLA-identical sibling setting., *Int J Hematol* 69: 112-118 (2000).
 11. Kuno Y, Abe A, Emi N, Iida M, Yokozawa T, Towatari M, Tanimoto M, and Saito H: Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12). *Blood*, (in press)
 12. Tanaka N, Kimura H, Iida K, Saito Y, Tsuge I, Yoshimi A, Matsuyama T, Morishima T. Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *J Med Virol*, 60:455-462 (2000).
 13. 木村 宏: α ヘルペスウイルス感染症の予防・治療-ワクチン. *日本臨床*, 58(4): 172~176(2000).
 14. Tanaka N, Kimura H, Hoshino Y, Nishikawa K, Kojima S, Morishima T. Expression of tegument protein pp65 of human cytomegalovirus (CMV) and its application to the analysis of viral-specific cellular immunity in CMV-infected individuals (submitted).

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
平成12年度分担研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性 有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

サル培養細胞におけるベクターの安全性、有効性に関する研究

分担研究者：植田昌宏（エスアールエル 検査本部担当部長）
主任研究者：中村 伸（京都大学霊長類研究所助手）

研究要旨：培養細胞を用いて、GFP 遺伝子およびサルBウイルス gD 遺伝子の導入効率、発現量、細胞増殖、細胞障害の推移など細胞レベルでの、有効性、安全性の評価実験系を検討した。サル由来MA104細胞を用いて上記の検討を進めた結果、カチオニックリポソームを用いた遺伝子導入の効率が高いこと、gD 遺伝子発現は導入後24～48時間で最も多いこと、遺伝子発現細胞では細胞発育阻止が認められることなどが確認できた。

研究目的：

遺伝子治療において目的遺伝子の担体となるベクターの有効性と安全性を検証するための評価実験系の確立はきわめて重要である。

初年度に作成したベクターを用い、サル培養細胞を利用した *in vitro* での有効性、安全性を評価する系の開発を目的とした。具体的には、ベクターによる遺伝子導入効率、細胞内での分布、細胞障害性などを細胞生物学的に精査し、*in vitro* での有効性、安全性の評価試験法の確立のため基礎データの蓄積を図る。

研究方法：

1. ベクター：

GFP (Green fluorescence protein) 発現系として pEGFP-C1 を、VSV-G (vesicular stomatitis virus glycoprotein G) 発現系として pCM V-VSVG を、サルBウイルス gD (glycoprotein D) 発現系として pCI-BVgD を用いた

2. 細胞：

MA104 (アカゲザル腎由来継代細胞) を用いた。10%ウシ胎児血清加イーグルMEMを、継代用およびベクター導入後の維持用培地として用いた。

3. ベクターの導入：

リン酸カルシウム法

ベクター導入1日前に、60mm プラスチックディッシュに 5×10^5 個の MA104 を撒き、炭酸ガス培養器内で培養した。翌日、ディッシュあたり、10 μ g のベクターをリン酸カルシウム法の定法に従い導入した。

リポソーム法

ベクター導入1日前に、24穴培養プレートに各穴 5×10^4 個の MA104 細胞を撒き準備した。翌日、6 μ g のベクターをカチオニックリポソーム (DOTAP liposomal transfection reagent; Boehringer Mannheim) を用いて導入した。ベクターは DOTAP リポソーム溶液と混合後、室温で15分間反応し、MA104に37

℃、12 時間で導入した。なお、経時的な gD の細胞内発現状況および gD 発現が細胞の生物学的性状に与える影響を知る際には、MA104 に 4℃、3 時間で導入後、24 穴培養プレートの各穴に約 2×10^2 個を再播種した。

4. GFP の検出：

GFP 発現は、リン酸カルシウム法にて遺伝子導入した細胞が発する蛍光を経時的に、落射式蛍光顕微鏡で直接観察した。

5. VSV-G の検出：

VSV-G の発現は、リン酸カルシウム法にて遺伝子導入した細胞を、パラホルムアルデヒド固定またはアセトン固定後に抗 VSVG モノクローナル抗体 (Cy3 標識) を用いた免疫組織染色法により検出した。Cy3 の蛍光を指標として、経時的に落射式蛍光顕微鏡で観察した。

6. BV-gD の検出：

BV-gD の発現は、リン酸カルシウム法またはリポソーム法にて遺伝子導入した細胞を、抗 gD 抗体を用いた免疫組織染色法により検出した。すなわち細胞をパラホルムアルデヒド固定またはアセトン固定後に抗 gD タンパクウサギ抗体を反応させた。更にアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体反応後に基質として BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate/ Nitro blue tetrazolium chloride) を加えて発色させ、顕微鏡下で観察した。または FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体に反応させて、落射式蛍光顕微鏡で観察した。

7. BVgD mRNA の検出：

pCI-BVgD を導入した細胞を一定期間培養後に、RNA 抽出キット (Isogen ; ニッポンジーン社) にて総 RNA を抽出し、更に mRNA 単離システム (

PolyAtract system ; Promega 社) で mRNA を精製した。得られた mRNA は、特異的プライマーを用いた RT-PCR 法にて増幅し、アガロースゲル電気泳動で検出した。

研究結果：

1. GFP 発現系

遺伝子導入翌日で 5% 程度の細胞で GFP の蛍光が観察された。その後個々の発現細胞における蛍光強度は徐々に減少した。

2. VSV-G 発現系

GFP 遺伝子導入と同様に、遺伝子の場合も導入翌日で約 5% の細胞で VSVG 発現を示す蛍光が観察され、16 時間から 24 時間後に最大に達し、以後減少した。遺伝子導入 4 時間後にアセトン固定群で、核の周辺特に RER (粗面小胞体) と考えられる部位に蛍光が確認された。また、パラホルムアルデヒド固定群では、細胞膜にフェイントな蛍光を認めた。

3. gD 発現系

pEGFP-CI を用いた GFP 発現実験に準じた方法で、サル B ウイルスの gD 遺伝子を同様にリン酸カルシウムで導入した結果、やはり 5% 程度の細胞で、gD の発現が観察された。しかし、細胞の変形や脱落など細胞毒性を示唆する異常(異常形態)は、GFP 発現系の時よりも顕著に観察された。

さらに、遺伝子導入効率の向上を目的として、遺伝子導入方法を、カチオンリポソーム法に変更した結果、この導入効率は 20-50% にまで改善した。経時的な gD の細胞内発現状況、および発現が細胞の生物学的性状に与える影響を知るため、4℃ で遺伝子導入(吸着)後、再播種した後に温度を 37℃ にして経時的に観察した。gD 発

現細胞は3時間後までには認められなかったが、8時間後には出現し24時間後に最も多く観察され、その後徐々に発現細胞数の減少が続いた。このgD発現細胞数の減少は、24時間から48時間後に細胞形態の異常の増加とともに著明となり、細胞の機能の異常が示唆された。

gD発現細胞は8時間後から96時間までコロニー内細胞数に大きな変化はなかった。これに比して同じ培養容器内のgD非発現細胞は正常に発育分裂しており、8時間後から48時間後でおおよそ10倍以上に増加していた。このことからgD発現細胞では、明らかに何らかの原因で発育阻止が起こっていると考えられた。さらにgD発現細胞のうち異常形態を呈するものは、8時間後に約8割に達し、16時間後以降減少した。

なお、導入24時間後、細胞をアセトン固定後に染色した群では、核周辺部とくにRERと見られる部位が強く染まっていた。これに対して、細胞をパラホルムアルデヒドで固定した群では、細胞膜で広範囲に反応しており、抗原が細胞膜に分布していることが確認された。

4. gD mRNA の定量

gD発現の指標として、gD mRNAの定量的検出を試みた。遺伝子導入細胞からmRNAを精製し、特異的プライマーによりRT-PCR法を施行した結果、この精製mRNAからはDNA由来の増幅産物は検出されず、gD mRNAが特異的に検出された。このgD mRNAは増幅産物の電気泳動像から、遺伝子導入後12時間から24時間後に最大量となり、以後減少していると考えられた。

考察及び結論：

pEGFP-C1、pCMV-VSVG およびgDによるMA104への遺伝子発現効率は、リン酸カルシウムを用いた場合、ともに5%程度であったが、カチオニックリポソームを用いたの発現は20-50%に改善した。

gD遺伝子導入後の経時的な観察では、24時間前後で最も多くの細胞で導入遺伝子の発現が認められた。これはRT-PCR法によるmRNA検出結果とも一致していた。しかし、gD発現系ではGFP発現系よりも、細胞の異常形態が多く認められ、その割合は遺伝子導入8時間後にもっとも多い8割に達した。さらにgD発現細胞には、24~48時間で発育阻止がおきていることも観察された。これらが、そのままin vivoでの細胞毒性を示すか否かは、さらに比較検討が必要となるが、安全性を評価する上で何らかの指標となる可能性がある。

細胞内での分布は、アセトン固定群で核周辺の粗面小胞体と推測される付近に、またパラホルムアルデヒド固定群で細胞膜に発現が認められたことから、細胞内に導入された遺伝子がRERで翻訳され、合成された蛋白質はその後に細胞膜に移行したと考えられる。

また、今回導入遺伝子の発現を定量的に解析するために用いたRT-PCR法によるgD mRNAの検出は、免疫組織染色と同様の結果が得られたが、その発現量の差は顕著ではなかった。より客観的な指標のためには、遺伝子増幅産物のリアルタイム解析等による定量化が必要かもしれない。

本研究により、培養細胞での遺伝子導入効率の測定、細胞内分布の確認、細胞毒性の指標となり得る形態異常

細胞数の測定などが可能になり、生体への遺伝子導入前の有効性、安全性評価系として使えることが確認できた。しかし、より効率的で安全なベクター評価のためには、さらに客観的な指標となる検出系の確立も必要と思われた。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
平成 12 年度分担研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性 有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)
遺伝子銃 (Gene gun) での遺伝子導入条件の検討

分担研究者：恵美宣彦（名古屋大学医学部助手）
安部明弘（名古屋大学医学部医員）

研究要旨：遺伝子銃による遺伝子免疫治療 (DNA ワクチン) を確立する目的で、マウスモデルを用いヒト白血病への悪性腫瘍の DNA ワクチン療法を試みた。DNA プラスミドを金粒子でコートし Gene gun を用いた in vivo の遺伝子導入実験にて導入部位に LacZ の発色が観察された。このことから Gene gun での遺伝子導入が安定して行われていることが確認できた。さらに、腫瘍のチャレンジテストは DNA ワクチンで 3 回免疫後に行ったが、FLT3/NEODNA で免疫したマウスでは全く腫瘍の生着、増殖が認められなかった。また、これらには 32D/FLT3 細胞に対する液性抗体が認められた。

研究成果：

1) .ターゲット遺伝子の検索
1.1VSV-G 使ったレトロウイルスによる発現クローニング系：
私たちは VSV と MLV が両方向にシールドタイプをつくることに着目し、レトロウイルスベクターを VSV の外殻蛋白でくるんで発芽させる実験を考案した。gag-pol、VSV の外殻蛋白である G 蛋白の遺伝子の発現ベクターと、レトロウイルスベクターとをトランスフェクトすることにより、gag, pol, VSVG の各蛋白の合成が起こり、これら蛋白にゲノムであるベクター RNA がパッケージングされ発芽する。この系が新しい点は、レトロウイルスの gag-pol とエンベロープを 1 つのプラスミド上で、それぞれ CMV プロモーターの下流に挿入し効率良く発現させたこととウイルスエンベロープとして VSV (vesicular stomatitis virus) のエ

ンベロープ蛋白 (VSVG) を用いたことにある。この方法を用いて新しい遺伝子のクローニングをおこなった。

ヒト白血病細胞由来の細胞でヌードマウスの皮下腫瘍として継代できるが、培養系では継代できない細胞株、Namo-2 を樹立した。皮下腫瘍から得た細胞を培養するとフラスコに付着する feeder 細胞 (NamoF 細胞、マウス由来) に接着して Namo-2 の増殖が見られる。Namo-2 の増殖を維持する因子に興味を持ち VSVG シールドタイプ発現クローニングを行なった。

材料と方法：

cDNA ライブラリー：Namo-2 と NamoF 細胞から cDNA ライブラリーを作製し pCLNRL ベクターに挿入。ウイルス産生系：VSV-G と gag-pol を同時に発現する pCGCGP プラスミドと pCLNRXL を 293 細胞にリン酸カルシウム法で co-transfection しウイルス

を産生する。

遺伝子クローニング: NamoF 細胞上に接着して増殖する、遺伝子導入 32D 細胞から RNA を抽出し、T3, T7 プライマーにて RT-PCR を施行した。バンドを切り出して塩基配列を決定したところマウス由来 SDF3 であった。SDF3 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて 32D 細胞に導入し、G418 で選択することにより 32D/SDF3 を樹立した。32D/SDF3 を NamoF 細胞上で培養すると一週間ほどで、数石上のコロニーとして接着して増殖する 32D/SDF3 を確認した。

2) . SEREX 法

癌患者の血清中の抗体と同一患者由来の癌細胞との反応を検索し、癌抗原を同定しようという試み (Autologous Typing 法) が、1970 年代半ばより癌患者の産生する抗体の癌細胞に対する反応の検索としておこなわれている。Autologous Typing 法に遺伝子発現クローニングを取り入れ開発されたのが SEREX 法である。癌抗原同定における SEREX 法 (serological analysis of antigens by recombinant cDNA expression cloning) の最大の利点は、その簡便性にある。

同種幹細胞移植を受けた造血器悪性腫瘍患者の移植後の血清 (抗体) を用いて、SEREX 法による GVL 効果および GVHD の標的抗原の検索を行った。白血病細胞株 (K562, MEG-A2) およびヒト精巣より cDNA フェージライブラリーを作成し、移植後の患者血清 (抗体) による発現スクリーニングを繰り返した。抗体に陽性となるクローンを単離した後、塩基配列を決定し、GenBank による解析を行った。作成した cDNA ライブラリーを移植後の患者

25 人分の血清でスクリーニングしたところ、25 個の陽性クローンを得た。各クローンの塩基配列を決定し、15 種の遺伝子を同定した。このうち 14 種は既知の遺伝子であった。

3) 免疫療法

遺伝子免疫法

遺伝子ワクチン療法は、悪性腫瘍をはじめとする種々の疾患の新たな治療法として有望視されている。私達は *in vivo* にて、Bio-Rad 社の遺伝子銃: Helios Gene Gun を用いた DNA ワクチン接種を行い、悪性腫瘍における遺伝子ワクチン療法の可能性について検討した。遺伝子銃は、遺伝子導入のさいウイルスベクターを用いなくてよい、細胞の周期を問わない、核内のみならずミトコンドリアなどの細胞内小器官へも導入できるといった特性を持ち、局所へ効率よく遺伝子導入することが可能といわれている。Helios Gene gun は DNA プラスミドを微小な金粒子にコートさせ、ヘリウムガス圧を用いて粒子とともに外来遺伝子を細胞や組織に物理的に導入する装置で、Helios Gene Gun の弾となる金粒子と DNA の複合体は LacZ/NEO と FLT3R/NEO の DNA プラスミドを用いて 2 種類のものを作った。弾 1 個当たりには約 0.8~1.0 μ g の DNA がふくまれている。

<実験 1>

in vitro, *in vivo* において Gene gun を用いて LacZ 遺伝子を導入しその際 Gene gun の遺伝子導入効率および細胞や組織に及ぼす傷害を評価し、金粒子/DNA 複合体の作成条件や至適条件圧などを検討した。

In vitro での実験は、6well プレートで約 2 週間培養したヒト培養口腔粘膜

シートおよび BHK 細胞に Gene gun のヘリウム圧を 150psi~450psi の 50psi 間隔で変化させ LacZ 遺伝子導入を試みた。導入の際には培地を除去し gene gun のノズルを可及的に細胞に近づけて撃ち込み、その後速やかに培地を加え 37 度 10%CO₂ インキュベータで培養した。24 時間後細胞を固定、染色を行い観察した。In vivo では C3H/HeJ 8 週、メスのマウス背部表皮にヘリウム圧 350psi に設定下 gene gun で LacZ 遺伝子導入を行った。遺伝子導入する部位はあらかじめ剃毛したうえで除毛クリームを塗布して表皮を露出させた。Gene gun はノズルを背部に接触させて撃ち、遺伝子導入から 24 時間後に、マウスより表皮を採取し、組織の固定及び染色を行った。

<実験 2>

Gene gun を用いて 8 週メス C3H/HeJ マウス背部に FLT3/NEO または LacZ/NEO の DNA ワクチンを接種した。各群 3 匹ずつにし、gene gun をうつ前に実験 1 と同様マウスの背部の毛を除き表皮上に直接ワクチン接種した。これを スライドに示したスケジュールに従い、2 週に 1 回の間隔で合計 3 回施行した。最終接種日から 1 週間後、FLT3/NEO, LacZ/NEO DNA ワクチン接種マウスおよびワクチン非接種マウス計 9 匹の腹部に、mutant FLT3 遺伝子にて自律増殖能を獲得した 1.0×10^7 の 32D 細胞（マウス白血病由来細胞株）を皮内注射した。その後各マウスについて腫瘍の生着の有無を確認し、1 週間に 1 度腫瘍径の計測を行った。また腫瘍細胞接種から 7 日目に採血し FACS にて腫瘍細胞に対する抗体を調べた。

研究成果：

<結果 1>

in vitro で Gene gun を用いる際、ヘリウム圧が高くなるにつれて遺伝子導入効率もたかくなるが、細胞が剥がれたり穴があくといった大きなダメージが加わるようになる。これらダメージのため撃ち込んだ部位よりもその周辺部がよく発色しており、より多くの遺伝子が導入されているのが観察された。細胞への傷害が比較的少なく、かつ遺伝子導入効率が高い He 圧は金粒子 $1 \mu\text{m}$ の場合 300~350psi であった。In vivo において 350psi のヘリウム圧で gene gun を撃ったとき、中心部はかひ化して染色されず、その周囲が強く発色した。

<結果 2>

FLT3/NEO DNA ワクチン接種マウスでは腫瘍が生着せず、LacZ/NEO DNA ワクチン接種マウスでは一旦生着したものの 2~3 週間で縮小していき最終的に消退した。ワクチン非接種マウスは腫瘍が生着し経時的に増大した。

まとめ：

遺伝子銃による DNA ワクチンは、ウイルス抗原などの遺伝子を用いて既に多くの実験が行われている。私達はヒト白血病において異常の見られる mutant FLT3 遺伝子によって自律増殖能を獲得した 32D 細胞をもちいて、悪性腫瘍の DNA ワクチン療法をおこなった。DNA プラスミドを金粒子でコートし金粒子と DNA の複合体を作製するにあたっては Helios Gene gun のマニュアルに従っておこなったが、多少のばらつきが生じるのは避けがたく、均一な弾を作ることは困難だった。LacZ DNA を用いた in vivo の遺伝子導入実験にて導入部位に強く発色が観察された。このことから Helios Gene

gun での遺伝子導入が安定して行われていることが確認できた。腫瘍のチャレンジテストはDNAワクチンで3回免疫後に行ったが、FLT3/NEODNA で免疫したマウスでは全く腫瘍の生着、増殖が認められなかった。これらのマウスから 32D/FLT3 細胞に対する液性抗体が認められた。

研究発表：

1. Kasai M, Akatsuka Y, Emi N, Taji H, Kohno A, Abe A, Tanimoto M, Koderu Y, Saito H. Immune response of post-transplant peripheral lymphocytes against the patient pre-B cell line, NAGL-1. **Int J Hematol.**;69(2):112-8,1999.
2. Kuno Y, Abe A, Emi N, Iida M, Yamamori T, Tanimoto M, Saito H. An atypical myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12) and TEL gene rearrangement. **Br. J Haematol.**;106(2): 570-1,1999.
3. H. Mizuno, N. Emi, A. Abe, I. Takahashi, T. Kojima, H. Saito, Y. Sumi, M. Ueda : Successful Culture and Sustainability In Vivo of Gene-modified Human Oral Mucosal Epithelium. **Hum Gene Ther** 10: 825-830, 1999.
4. S. Mizuno, N. Emi, M. Kasai, A. Ishitani, H. Saito: Aberrant expression of HLA-G antigen in IFN- γ stimulated acute myelogenous leukemia. **Brit J. Haematol** 111: 280-282, 2000.
5. M Murata, N Emi, N Hirabayashi, M Hamaguchi, S Goto, A Wakita, M Tanimoto, H Saito, Y Koderu, Y Morishita for the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group: No significant association between HA-1 incompatibility and developing acute

graft-versus-host disease after marrow transplantation in a Japanese HLA-identical sibling setting. **Int J Hematol** 69: 112-118, 2000.

6. Kuno Y, Abe A, Emi N, Iida M, Yokozawa T, Towatari M, Tanimoto M, and Saito H: Constitutive kinase activation of the TEL-Syk fusion in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12). **Blood**, (in press)2000.
- 7.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
平成 12 年度分担研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性に関する分子病理学的評価系の
開発

分担研究者：今村隆寿（熊本大学医学部助教授）

主任研究者：中村 伸（京都大学霊長類研究所助手）

分担研究者：清水慶子（京都大学霊長類研究所助手）

研究要旨：遺伝子治療薬剤の胎児移行性を調べるために、妊娠終期の母ザル背部皮下に pEGFP-C1/リポゾームベクターを注射し、胎児での GFP 蛋白質の発現を蛍光と免疫組織染色で解析した。胎児の肺血管に蛍光が検出され、さらに抗 GFP 抗体でも肺血管内皮細胞は陽性に染色された。これらの結果から、リポゾームベクターでの投与遺伝子は母体から胎盤を通過して胎児に移行する事が明らかとなった。

研究目的：

本研究ではこれまで見落とされがちであった導入遺伝子の胎盤通過性に注目し、サルモデルでの投与遺伝子導入の母子間移行を分子病理学的に解析・評価することにより、遺伝子療法の安全性を検討する。

研究方法：

今回はトレーサー遺伝子(GFP 今回はトレーサー遺伝子として、蛍光強度は野生型の 35 倍で細胞内で大量のタンパク質が産生されるように改良してある pEGFP-C1 を用いた。妊娠終期の新世界ザル（コモンマーモセット）の母ザルの背部に pEGFP-C1/Lipofectin-VSVG ベクター 25 ug/頭を皮下注射で投与し、24 時間後に注射部皮膚および胎児臓器を採取して凍結標本を作製した。GFP タンパク質の発現を、

共焦点レーザー顕微鏡による薄切切片の蛍光を観察することによって解析し、さらに同じ切片で抗 GFP 単クローン抗体を使った APAAP 法による免疫染色で確認した。

研究結果：

蛍光は、母ザルの肺血管および胎盤内血管、胎児肺血管に検出されたが、胎児脳、腎臓、脾臓、肝臓の胎児血管では認められず、血管以外の組織では検出されなかった。血管の中でも、大型の血管に蛍光がみられ、細血管では認められなかった。免疫染色によって、GFP は蛍光と一致して母ザルの肺および胎盤、胎児肺の大型の血管の内皮細胞に検出されたが、内皮細胞以外の細胞では検出されなかった。マーモセットは双胎であるが、GFP タンパク質の発現の程度には胎児間での差がみられた。

D. 考察

PCRによっても、胎盤や胎児血液、肺に GFP の DNA が検出されていることは、蛍光や免疫染色で確認した GFP タンパク質が同じ臓器に検出されていることを支持している。注射した遺伝子は皮膚からリンパ流を介して血流に入ってまず希釈され、血流から実

質臓器の細胞への拡散によって濃度がさらに低下すると考えられる。したがって、遺伝子が比較的高濃度である血流と接する血管内皮細胞には取り込まれる頻度が高く、その後の段階では細胞に取り込まれる頻度は極端に低いであろう。そのうえ、胎盤を通過したあとの胎児血流での濃度は相当低下するので、血管内皮細胞にしか発現がなく他の細胞では発現されていないのは妥当な結果と考えられる。ただ、胎児肺の比較的大型の血管の内皮細胞にしか発現がみられなかった理由は不明であるが、肺動脈になんらかの特殊性があってリポソームや遺伝子を取り込みやすいのかもしれない。

結論:

母ザルに皮下注射で導入された遺伝子は、胎盤を通過して胎児で発現する。これは、遺伝子療法において導入遺伝子の胎児移行の可能性を示しており、今後の臨床応用に警告を発するものであるが、同時に胎児に対する遺伝子療法の糸口になる可能性も秘めている。

研究発表:

1. Imamura, T., Potempa, J., & Travis, J. Comparison of pathogenic properties between two types of arginine-specific

cysteine proteinases (Gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. *Microb. Pathog.* 29:155-163, 2000.

2. Imamura, T., Tanase, S., Hamamoto, T., Potempa, J., & Travis, J. Activation of blood coagulation factor IX by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-R) from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem. J.* 353: 325-331, 2001.

3. Imamura, T., *Banbula, A. T.*, Pereira, P. J. B., Travis, J., & Potempa, J. Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-R) from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.*, in press

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
平成 12 年度総括研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)
サイトメガロウイルス遺伝子ワクチンの開発

分担研究者：木村 宏（名古屋大学医学部助手）

研究要旨：

ヒトサイトメガロウイルス（CMV）免疫の主要な抗原である glycoprotein B (gB) と p65 をプラスミドベクターに組み込んだ DNA ワクチンを構築し、このプラスミドベクターを真核細胞に導入し、抗原蛋白が発現されたのを確認した。CMV 特異的細胞性免疫を評価するために、FACS を用いたヒトの p65-specific CD4+ T 細胞の定量法を確立した。この方法により迅速かつ簡便にウイルス特異的細胞性免疫を測定でき、ヒトと免疫学的に相似しているサルにも応用可能と考えられる。

研究目的：

ヒトサイトメガロウイルス（CMV）は、胎内感染により新生児に先天感染症を、免疫不全宿主には間質性肺炎、網膜炎、肝炎、腸炎などの重篤な疾患をもたらす。CMV に対する抗ウイルス剤は開発されているものの、必ずしも効果は充分でないこと、副作用が激しいことなどから、これらの疾患を予防するための CMV ワクチンの開発が望まれている。我々はサルモデル系を用いたヒトサイトメガロウイルス（CMV）遺伝子ワクチンの安全性、有効性の検討するために以下のごとく基礎的研究を行った。

研究方法：

1. CMV の液性/細胞性免疫の主要な標的である glycoprotein B (gB), p65 を CMV IE promoter 下流に組み込ん

だ prismsid vector を構築する。

2. このプラスミドベクターを真核細胞の 293 T, BHK 細胞に導入し monoclonal 抗体を用いた Western blot 法により抗原蛋白が発現されたのを確認する。

3. 発現・精製したプラスミドベクターを微小な金粒子にコートさせた後に遺伝子銃を用いてマウスに接種する。3回免疫したマウスが液性抗体を獲得したかを、ELISA 法および Western blot 法で評価する。

4. CMV 特異的細胞性免疫を評価するために、p65 をバキュロウイルス発現系で大量発現、得られた精製蛋白を抗原としヒトにおいてリンパ球幼弱化反応、intracellular cytokine assay/ FACS による抗原特異的 CD4 T 細胞を検出した。これらがヒトで応用できるかどうか、健常人、患者から得た末梢血リンパ球を用い検討する

。

研究成果：

1. gB, p65をそれぞれ導入したプラスミドベクターを真核細胞に導入し、Western blot 法により抗原蛋白が発現されたのを確認した。
2. このベクターを遺伝子銃によりマウスに接種し免疫原性をみたが、十分な抗体産生は得られなかった。
3. 大量発現した p65 に対して、CMV 既感染のヒトではリンパ球幼弱化反応、FACS 法いずれにも測定可能な特異的細胞性免疫が検出された。CMV 未感染のヒトではこれらの反応は認められなかった。造血幹細胞移植を受け、移植後症候性の CMV 感染を生じた患者に対して、経時的に p65 細胞性免疫を測定したところ、ウイルス量に反比例するように CMV 特異的細胞性免疫が変化することが確認された。

考察：

CMV 関連疾患を予防するための CMV ワクチンの開発が望まれている。しかし、CMV はヒト以外には感染しないため、小動物を用いたワクチンモデルの研究に制限があり、CMV に対する有効なワクチンは得られていない。サルはヒトにほぼ等しい免疫応答が見られるため、ワクチンの安全性、免疫原性を確認するには最も適したモデルと考えられる。

今回、我々は CMV の主要な抗原である gB, p65 を組み込んだプラスミドベクターを構築し、その免疫原性を確認した。サルでの投与に先立って、遺伝子銃でマウスに接種したが、十分な免疫原性は認められなかった。マウスの系で十分な免疫原性が認められなかった原因は不明であるが、今後 promotor を変化させる、あるいは接

種/投与方法を変更する (nakid DNA を筋注する、リポソーム性ベクターとし皮下注する) などにより、免疫原性を高める工夫が必要と考えられる。また、我々は CMV 特異的細胞性免疫を評価するために、FACS を用いたヒトの p65-specific CD4+ T 細胞の定量法を確立した。この方法により迅速かつ簡便にウイルス特異的細胞性免疫を測定でき、ヒトと免疫学的に相似しているサルにも応用可能と考えている。

結論：

1. CMV の液性免疫の主要な標的であり中和抗体を誘導できる gB と細胞性免疫の標的である p65 をプラスミドベクターに組み込んだ DNA ワクチンを構築した。
2. このプラスミドベクターを真核細胞に導入し、monoclonal 抗体を用いた Western blot 法により抗原蛋白が発現されたのを確認した。
3. CMV 特異的細胞性免疫を評価するために、FACS を用いたヒトの p65-specific CD4+ T 細胞の定量法を確立した。

研究発表：

1. Naoko Tanaka, Hiroshi Kimura, Yo Hoshino, Koji Kato, Tetsushi Yoshikawa, Yosizo Asano, Keizo Horibe, Seiji Kojima, and Tsuneo Morishima. Monitoring four herpesviruses in unrelated cord blood transplantation. Bone Marrow Transplantation 26:1193-1197, 2000.
2. Kuzushima K, Kimura H, Hoshino Y, Yoshimi A, Tsuge I, Horibe K, Morishima T, Tsurumi T, Kojima S.

- Longitudinal Kimura H, Nishikawa K, Hoshino Y, Sofue A, Nishiyama Y, and Morishima T. Monitoring of Cell-Free Viral DNA in Primary Epstein-Barr virus infection. *Med Microbiol Immunol* 188:197-202, 2000.
3. Kimura H, Kido S, Ozaki T, Tanaka N, Ito Y, Williams RK, Morishima T. Comparison of quantitations of viral load in varicella and zoster. *J Clin Microbiol* 38:2447-9, 2000.
 4. Kimura H, Morita M, Tsuge I, Hoshino Y, Tanaka N, Ito Y, Morishima T. Vidarabine Therapy for Severe Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* in press.
 5. Kimura H, Hoshino Y, Kanegane H, Tsuge I, Okamura T, Kawa K, Morishim T. Clinical and Virological Characteristics of Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *Blood* in press.
 6. Hoshino Y, Kimura H, Kuzushima K, Tsurumi T, Nemoto K, Kikuta A, Nishiyama Y, Kojima S, Matsuyama T, Morishima T. Early intervention in post-transplant lymphoproliferative disorders based on epstein-barr viral load. *Bone Marrow Transplant* 26: 199-201, 2000 .
 7. Naoko Tanaka, Hiroshi Kimura, Keiji Iida, Yumiko Saito, Ikuya Tsuge, Ayami Yoshimi, Takaharu Matsuyama, and Tsuneo Morishima. Quantitative analysis of cytomegalovirus load using real-time PCR assay. *Jornal of Medical Virology*, 60:455-462, 2000.
 8. Kuzushima K, Kimura H, Hoshino Y, Yoshimi A, Tsuge I, Horibe K, Morishima T, Tsurumi T, Kojima S. Longitudinal Dynamics of Epstein-Barr Virus-Specific Dynamics of Epstein-Barr Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes during Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *J Infect, Dis* 182:937-940, 2000.
 9. Naoko Tanaka, Hiroshi Kimura, Yo Hoshino, Kazuo Nishikawa, Seiji Kojima, Yukihiro Nishiyama, and Tsuneo Morishima. Expression of Tegument Protein, pp65 of Human Cytomegalovirus (CMV) and its Application to the Analysis of Viral-Specific Cellular Immunity in CMV-Infected Individuals, submitted.
 10. 木村 宏. α ヘルペスウイルス感染症の予防・治療-ワクチン. *日本臨床*, 58(4):172~176, 2000.
 11. 田中直子, 木村 宏. ウイルスの母子感染- CMV の母子感染-, *小児科*, 41:1556-62, 2000.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
平成 12 年度分担研究報告書

サルモデルにおけるベクターの安全性・有効性の評価実験系の開発
(H10-ゲノム-016)

主任研究者：中村 伸（京都大学霊長類研究所助手）
分担研究者：清水慶子（京都大学霊長類研究所助手）
：植田昌宏（エスアールエル検査本部担当部長）
：今村隆寿（熊本大学医学部助教授）

研究要旨：本研究ではベクター・遺伝子導入法の安全性と有効性を評価・試験するためのサルモデルでの実験系の確立を図った。この研究目的に沿って、*in vitro* レベルならびにラット・マウスでの基礎実験結果を基に、種々サル類について、それらの医生物学的特質や飼育・実験条件、利用限界などを検討し、遺伝子治療実験・研究用のサルモデルを選定・特定した。さらに、サルモデルでの非ウイルス性ベクター・遺伝子導入法の安全性、有効性の新たな評価・試験系を確立した。また、リポソームベクターでの導入遺伝子の胎盤通過性（母体→胎児移行・発現）を新たに見出し、その遺伝子治療面での応用を考察した。加えて、ウイルス感染防御を目指した遺伝子免疫療法(DNA ワクチン)を開発し、その臨床応用を目指した。

研究目的：

サル類は生物進化的位置から遺伝子構造、免疫系、感染感受性、代謝系ならびに胎盤構造などはヒトに類似し、ヒトの疾病と治療に関わる biomedical な研究において極めて重要な実験モデルである。本研究ではサル類の医生物学的特質に着目し、遺伝子治療・遺伝子ワクチン用ベクターの安全性、有効性を評価・解析するためのサルモデル実験系を確立し、より安全で有効な遺伝子治療・遺伝子ワクチンの開発を目指す。

この目的に沿ってサルモデルを用い、非ウイルス性のベクター・遺伝子導入法としてのリポソームベクター、アテロ

コラーゲンおよび遺伝子銃について、レポーター遺伝子（GFP）の発現性を指標にして有効性を比較解析した。同時に、これらベクター・遺伝子導入法の安全性について、炎症応答、Th1/Th2 バランス、血球動態、組織・細胞障害性、胎盤通過性などをモニターする試験法を確立した。さらに、投与遺伝子の母体→胎児移行の結果から、胎児への遺伝子導入の可能性が示唆された。加えて、サルヘルペスウイルス（B ウイルス）に対する遺伝子ワクチンを開発し、細胞性・液性免疫の誘導および抗ウイルス活性など B ウイルス遺伝子ワクチンの有効性を検証した。