特集 遺伝子治療用ウイルスベクターの開発と展望：最近の話題

2. レトロウイルスベクターの大量生産技術開発

小谷 均

(大量生産技術開発部, ジェネティックスセラピューティクス)

遺伝子治療が開始されて以来、8年間の経過し、現在、数多くの臨床試験が、アメリカを初め、ヨーロッパで展開されている。そこで、将来のレトロウイルスベクターの品質の高い、しかも高ベクター価の商業的大量生産技術が重要となってきた。

はじめに

遺伝子治療が実際にアメリカで1989年に実施されて以来、8年が経過している。現在までに、200以上の臨床用プロトコルがアメリカのRACから承認されている。その中で、7割以上がレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療プロトコルである。対象疾患は腫瘍が最も多く、先天性代謝異常、HIVおよび血管障害やリウマチなどの慢性疾患にまで及んでいる。臨床試験段階もほとんどが依然として初期段階であり、その安全性には言及するのみで、ADA欠損症に対する治療以外は^{2,3,6,11)}、有意義な治療効果を発表するに至っていないのが現状である。しかしながら、数多くの研究論文の発表にみられるように、当分野の基礎から臨床に至るまでの研究は極めてさかんである。

この10年間に次々と出てきた遺伝子治療を目指したベンチャー企業の様相も過去1、2年の間に変化が見られてきた。現時点で、本治療法が新しい将来の医療技術の中心となりうるかが不明の状態、ヨーロッパを初め、アメリカの製薬企業が、有望なベンチャー企業を自社の傘下に入れたり、あるいは協同研究に組み

入れ将来のビジネス構造の一部としようとしている。Genetic Therapy, Inc (GTI) もまさにその1つで、Novartisの子会社として出発し始めた段階である。

本論文では、レトロウイルスベクターの基礎研究は他の論文にゆずり、将来の大量生産時代に備えるべく、その商業生産技術の展開の一部を紹介する。

1. レトロウイルスベクターの特性

レトロウイルスベクター系の中心は、モロニーマウス白血病ウイルス (Molony murine leukemia virus: Mo-MuLV) を骨格としたベクターシステムである。当ウイルスはC型オンコウイルスに属するレトロウイルスである。約100nmの大きさで、エンベロープを持つRNAウイルスである。野生型ウイルス粒子の生活環は、まず、ウイルスエンベロープ糖蛋白質と細胞表面のレセプターとの結合から始まり、エンベロープと細胞膜が融合した後、ウイルスRNAが細胞内に侵入する。そのRNAはウイルスの持つ逆転写酵素により、2本鎖DNAになり、宿主細胞のゲノム内に組み込まれ、プロウイルスとなる。その後、プロウイルスから宿主細胞の複製メカニズムを利用し、ウイルス蛋白質が作られ、パッケージングシグナルにより、ウイルスRNAがカプシドの中にパッケージングされ、細胞から出芽する。このような野生型ウイルスを利用したレトロウイルスベクターの特徴は、外来性遺伝子を宿主細胞ゲノム内に組み込ませることにある。その結果、長期間の遺伝子発現が期待され、先天性疾患等の治療に応用されてきた。Amphotropicベクターを用いる事により、ヒトを初めとした広範囲な宿主域に利用できる。さらに、現在まで最も臨床応用の経験が豊富なベクターシステムであり、安全性においても高い評価を受けている。

レトロウイルスベクターシステムは、ベクターパッケージング細胞の開発改良に始まっている。パッケー

Process development for large scale production of retroviral vectors

Hitoshi Kotani

Department of Bioprocessing Genetic Therapy, Inc

938 Clopper Road, Gaithersburg, Maryland 20878

TEL 301-258-4755

FAX 301-258-4757

E-mail Toshi. Kotani@ pharm. novartis

図1 パッケージング細胞およびベクタープロデューサー細胞の作製

パッケージング細胞は、ウイルスの構造遺伝子である *gag*, *pol*, *env* 遺伝子が組み込まれた細胞であり、感染性ウイルス粒子を産生しない。目的遺伝子を持つベクタープラスミドをパッケージング細胞にトランスフェクションすることにより、組み換えウイルスベクターを産生する細胞、すなわちプロデューサー細胞が作製される(図1)。この細胞由来のレトロウイルスベクターは、標的細胞ゲノムに組み込まれて遺伝子を発現するのみで、感染性ウイルス粒子として複製されない複製不能ウイルスである。レトロウイルスベクター開発における重要課題は、ベクター遺伝子とウイルス構造遺伝子間の組み換えで生ずるとされる複製可能ウイルス、すなわち RCR (Replication Competent Virus) の発生しない安全性の高い細胞株の樹立であった。

2. レトロウイルスベクターの作製

レトロウイルスベクター生産の基本的概念は、感染力のあるウイルスを細胞を使って生産するという点で、ウイルス生ワクチンの生産と類似している。しかしながら、生ワクチンは野生型ウイルスとして、投与後、細胞内で複製増殖能を持ち、その抗原性により、

宿主体内での免疫反応を期待する。そのため、少量のウイルス価で、その効果が期待できる。これに反して、遺伝子治療用ウイルスベクターは、現時点では、細胞内に目的遺伝子を運ぶためのみの複製不能ウイルスである。ベクタープロデューサー細胞から産生されるベクター価は一般に $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml と低い。また、レトロウイルスベクターの遺伝子発現には増殖細胞が必要であることから、遺伝子導入効率は比較的低い。それゆえ、治療効果を期待するためには、*Ex-Vivo* および *In-Vivo* 法においても大量の感染力のある高ベクター価を必要とする。例えば、腫瘍への直接投与には 10^{11} CFU 以上の投与が必要とされている。治療対象により違いがあるが、頻回投与を可能にするために、体内で抗原性のない、さらに毒性のないベクターである必要がある。そこで、おのずと大量生産技術の開発が重要課題となる。その生産技術は大きく2つに分けられる。1つは細胞の大量培養技術であり、もう1つは濃縮、精製および保存法である。

3. 大量細胞培養法

現在、臨床応用されているほとんどのベクタープロデューサー細胞は、NIH-3T3細胞を親細胞とした PA317 および GP+*env* AM12 細胞である(表1)。我々の実験室では、PA317 パッケージング細胞で、RCR 発現頻度が極めて低くなるように考案された G1 ベクターシステム¹²⁾を中心にした培養法を研究開発してきた。レトロウイルスベクタープロデューサー細胞システムの大きな特性は、単層細胞であることと、レトロウイルスベクターが培地上清中に出芽し、細胞障害性を持たない点にある。基礎的な T-フラスコやローラボトル等の細胞培養器が多くの研究室で使用され、培養法にはほとんど注意が払われていなかった。ベクター価の高い上清をいかにして収集することができるかが研究の中心であった。我々が報告したように⁷⁾、レトロウイルスベクターの 37°C での半減期は 4～6 時間と短いため、通常の培養方法では高ベクター価は得られない。そこで、フラスコやローラボトルのような単一ユニットシステムでは、その半減期の長い 32°C で 48 時間培養で上清を集めることにより、高いベクター価を数回得ることができた。Nunc Factory, Hollow Fiber, マイクロキャリアを用いたバイオリクター、CellCube バイオリクター等でのベクターの生産が試みられてきた。我々の研究室でも、様々な培養方法を検討してきたが、どの方法にも長所と短所がある。実際にどの方法においても、研究用ベクターの生

表1 遺伝子治療臨床研究に用いられるパッケージング細胞

宿主	パッケージング細胞	親細胞	ヘルパーゲノム
マウス	PA317	NIH-3T3	シングルゲノム
マウス	ΨCRIP	NIH-3T3	<i>gag-pol-env</i> splitゲノム
マウス	GP+ <i>env</i> AM12	NIH-3T3	<i>gag-pol/env</i> splitゲノム
イヌ	DA	D17	splitゲノム
ヒト	ProPak	293	splitゲノム

図2 AL-2バイオリアクターの概略図
リアクター内の矢印は培地の流動方向

産は可能である。しかし、前述したように、そのままではベクター価が低く、濃縮精製技術の開発によりベクター価を高め、品質の高いベクターを生産する必要がある。

1) GTI/AL (Packed-Bed, Air Lift) バイオリアクターの開発

高ベクター価のベクターを得るために、パッケージング細胞やベクターのプロモーターの研究がなされてきたが、我々の経験から、最も大切なことは、クローン選択、すなわち、高力価を産生する細胞クローンを樹立することが大切な出発点である。同じベクターデ

ザインであっても、クローンにより、 10^7 - 10^8 CFU/ml というような差が見られた。これらのクローンが単一遺伝子コピー由来であったことからわかるように、その原因は不明ながら、遺伝子の組み込まれた部位等による細胞増殖能の違いによる現象かもしれない。一般に、クローン選択後、ベクター価は細胞数、使用培地および培養条件に大きく依存している。そこで高細胞密度システムの開発に重点が置かれ高ベクター価、長期間連続培養法による大量上清回収技術、さらに、経済的で自動化できる方法を目指した。その上、上清ができる限りクリーンであり、濃縮精製を含む Downstream プロセスの段階を容易にする必要がある。それ

図3 AL-2バイオリアクターによるG1Na・40ベクターの生産
(a)ベクターの日産量(b)ベクタータイター価(○)とグルコース(+)およびラクテート(■)測定結果

表2 GTI/ALバイオリアクターによるG1TK1SvNa・7ベクターの生産性

GTI/AL バイオリアクター	ガラスビーズ 容量	培養器 容量	培養上清 収集容量(L/日)	実験回数	日数	平均 ベクター価
GTI/AL-2	0.8L	2L	7L	28	25-35	$1\sim3\times10^7$ CFU/ml
GTI/AL-3	2.4L	9.5L	20L	3	21	$1\sim3\times10^7$ CFU/ml
GTI/AL-4	11.5L	30L	72L	1	10	$1\sim3\times10^7$ CFU/ml

らの結果、独自のバイオリアクターの考案に至った。図2に示すように、Shott から出ている多孔性のボロシリケート（直径4-5 mm）のガラスビーズを用いた⁹⁾Packed-bed 法による GTI/AL バイオリアクターを考案した。ガラスビーズが中央のバスケット内に収められ、細胞はビーズ表面上で数層になって増殖する。培地の還流とガス供給は、エアリフトメカニズムを利用し、容器底部に位置するスパージャ（4 穴）からバイオリアクター内に送り込まれる。酸素(DO)、pH および温度は各々のプローブで測定され、コントロール装置で一定にコントロールされる。

図3にネオマイシン耐性マーカー遺伝子を持つベクターを産生する PA317/GINa・40細胞を用いた GTI/AL-2 バイオリアクターでの成績を示した。 2×10^8 の細胞がバイオリアクター内に接種され、10%牛胎児血清加培地により37℃で28日間の長期培養実験を試み

た。ベクター価は、培養後8～9日後に約 10^7 CFU/mlに達し、その後約3週間ピークを維持した。培地の Perfusion Rateはグルコース消費量とラクテート蓄積量の測定結果により、ラクテート量を200mg/dl以下に保つことにより決定された。その結果、13日目に日産7Lの上清量に達し、実験最後までその量を保持した。日産 10^{11} CFUのベクター産生が安定して得られた。

将来の規模拡大可能性を知るために、3段階の大きさの GTI/AL バイオリアクターが作製され、レトロウイルスベクターの産生能を検討した(表2)。GTI/AL-2(0.8L)、GTI/AL-3(2.4L)および GTI/AL-4(11.5L)の3段階のサイズにより、牛胎児血清加培地での実験をくり返し試みた。GTI/AL-2バイオリアクターで計28回におよぶ実験成績が示すように、平均ベクター価は常に $1\sim3\times10^7$ CFU/ml と安定し、日産7Lの上清が得られ、本バイオリアクターの再現性を示した。さ

表3 異なる技術でのレトロウイルスベクター生産能

	ローラボトル	Cell Cube	GTI/AL-2
単位	100	4	1
全細胞数	4×10^{10}	4×10^{10}	4×10^{10}
日産上清量	15L	10L	7L
ベクター価 (CFU/ml)	$1-3 \times 10^7$	$1-3 \times 10^7$	$1-3 \times 10^7$
生産方法	単一	連続	連続
培養日数	3	>20	>30
総上清収集量	80	210	280
労働力	大	小	小

図4 AL-3バイオリアクターによるG1TK1SvNa・7ベクターの牛血清および無血清培地下における生産性の比較

らに、AL-2の3倍のサイズであるGTI/AL-3バイオリアクターにおいても平均ベクター価は $1-3 \times 10^7$ CFU/mlであり、日産20Lの上清が回収された。さらに約3倍のサイズのGTI/AL-4バイオリアクターでもほぼ同等のタイター価を得るとともに、日産72Lの上清が得られた。これらの実験において一度もRCRの発生は観察されなかった。以上の結果より、GTI/ALバイオリアクターでのレトロウイルスベクターの安定した産生能が確認された。

表3に、ローラボトル、CellCubeおよびGTI/AL-2バイオリアクターによるG1Na・40ベクター産生能を比較した成績を示した。最終細胞数を一定として比較した結果、ほぼ同等のベクター価が得られたが、労

働力の面で比較すると、もちろんローラボトルのようなユニット操作法では多大な時間が要求された上に少量の上清収集しか得られなかった。その反面、CellCubeとGTI/AL-2バイオリアクターにおいては労働力は極めて少なく、また長期間での大量の上清収集ができた。しかし、2つのバイオリアクターの差は、上清のクリーン度に表われ、AL-2由来上清はCellCube由来上清に比べ極めてクリーンであり、Downstreamプロセスを容易にさせた。また、4℃でのベクター価の安定度が、AL-2ベクターがはるかに優れていた。さらにNIHガイドラインによる基準がレトロウイルスベクターの10L以上の生産をBL2-LSと定めたため、その取り扱いのためには、完全な閉鎖方式による安全

図5 ガラスビーズ表面で増殖しているPA317/G1TK1SvNa・7ベクタープロデューサー細胞の位相差電顕 (A: $\times 22,4$, B: $\times 210$) およびG1TK1SvNa・7ベクターの透過電顕 (C: $\times 12,500$, D: $\times 50,000$)。無血清培地でGTI/AL-3バイオリアクターにより培養された。多くのレトロウイルスベクターが観察される(C)。出芽時のベクター(D)

性を考慮に入れねばならない。

2) 無血清培養条件におけるレトロウイルスベクターの生産

モノクローナル抗体および種々の蛋白質生産を目指すバイオテクノロジー産業は、すでに無血清培地および無蛋白培地による大量細胞培養技術がほぼ完成している。しかしながら、ウイルスワクチンならびに遺伝子治療用ウイルスベクター分野でのそれらの技術はさほど進歩していない。生物学的に困難さがあることと、

もちろんビジネス方針に起因することは言うまでもない。

ほとんどのレトロウイルスベクターによる遺伝子治療プロトコールは、一部 HIV プロトコール以外、*Ex-Vivo* 法である。その大部分は、直接培養上清をベクター源として用い、様々な標的細胞を、その上清中で培養して遺伝子導入を実施してきた(IおよびI/II相試験)。しかし、牛血清を使用することの弊害が実際表われてきた。ヒト治療への安全性および経済性の面も当然ながら、生物学的に問題となってきた。例えば、T細胞ならびに骨髓幹細胞等での*Ex-Vivo* 遺伝子治療成績がADA欠損症以外ではうまくいかない1つの理由は、ベクター価が低いことと、さらに、標的細胞を培地上清で培養することにより、細胞表面に牛血清蛋白が吸着し、これが体内で抗原となり、細胞自体が排除されたり、さらに免疫反応を引き起こしている^{5,14)}。このような現象をまず乗り越えなければ、遺伝子治療の成果は期待できず、無血清培地で生産されたベクターからさらに精製されたベクターの開発を進め、II, III相の臨床試験に望む必要がある。

近年、我々も無血清培地によるレトロウイルスベクターの大量生産技術の開発に重点を置いてきた。無血清培地を考案する上で重要なことは、全培地成分の判明はもちろんのことであるが、ベクタープロデューサー細胞の増殖、ベクター生産能、ベクターの安定性および細胞の無血清培地での凍結保存技術である。それらの点を満たすためには、現時点では、無蛋白質培地での生産は困難が多く、ヒトアルブミンおよびインシュリンを含む無血清培地に依存せざるを得ない。無血清培地でのマスターおよびワーキング細胞バンクをまず樹立した。GTI/AL-3バイオリアクターによるHSV-TK遺伝子を持つベクターを生産するPA317/G1TK1SvNa・7細胞の増殖とベクター生産の血清加および無血清培地での21日間の培養成績を図4に示した。血清加培地では 1×10^9 細胞数で開始し、無血清培地ではその5倍の 5×10^9 細胞数で開始した。その結果、培養後約1週間でPerfusion Rateが両者とも日産20Lに達し、タイター価も平均 10^7 CFU/mlとほぼ同等の成績を得た。以上のことより、マスターバンクからバイオリアクターの全過程を無血清培地で生産する方法を確立した。図5にガラスビーズ表面で増殖する細胞とレトロウイルスベクターの電顕写真を示したが、細胞が極めて均等にどのビーズ表面上でも増殖し、本技術の安定性を確認した。

無血清培地での最大の利点は、牛血清由来の微生物

図6 無血清培地GTI/AL-3バイオリアクター由来G1TK1SvNa・7ベクターの4℃での安定性

図7 無血清培養条件下におけるレトロウイルスベクター生産過程

図 8 A/G Hollow Fiber (300,000MWCO) によるG1TK1SvNa・7ベクターの濃縮

図 9 QセルロースカラムクロマトグラフィーによるG1TK1SvNa・7ベクターの分離精製

を初めとする多くの不明蛋白質が存在しないことと、さらに、高ベクター価の4℃における安定性であった。図6に示すように、血清加培地では数日でベクター価の低下が見られたのに反し、無血清培地では1週間後では、ほとんどベクター価の変化がなく、47日後においても、わずかな低下しか生じなかった。このことは、

以下の Downstream プロセスを考案する上に非常に便利であり、大量上清を数日間収集した後、上清を凍結せずに以下の操作に移行できる。凍結融解によるベクター価の急激な低下はよく認められている。図7に無血清培地条件下におけるレトロウイルスベクター生産の全過程を示した。

3) 濃縮精製過程

レトロウイルスベクター価を上げるためには培養条件が重要なことは述べてきたが、以下の濃縮精製プロセスの技術開発による所が大きい。従来、レトロウイルスベクターは、極めて物理化学的処理に不安定であるとされてきたが、我々の実験成績からもわかるようになり安定していることが判明した。ある程度の物理的処置にも耐え、pH5.0～pH8.0、浸透圧0.2M から2M までの範囲内ではベクター価の低下はほとんど認められなかった。これらの観察は極めて重要で以下のプロセスを考案する上で利点となった。様々な実験の結果、他のバイオテクノロジー分野で応用されている技術が使用できることが判明した。

バイオリアクターより回収された大量の上清は、0.22 μ m のフィルターでろ過された後、4℃で保存される。その後、濃縮段階に移る。上清は A/G Technology 社の Hollow Fiber (500,000MWCO) による Tan-

gential Flow Concentration (TFF) により濃縮され、引き続き透析される。90%以上のベクターが回収され、10倍から60倍までに短時間で濃縮される(図8)。カートリッジの拡大によっても高回収率が得られた。この段階で80～90%の不純物が除かれる。

その後、宿主細胞由来 DNA を除去するために、DNase (Benzonase) 処理がなされ、DNA は150bp 以下の断片となる。引き続き、カラムクロマトグラフィーによる精製段階に移る。従来は、ショ糖密度勾配超遠沈法による精製を試みたが、精製度も低い上に、回収率が10%以下であり実用的ではなかった^{7,8)}。そこで多くの異なるレジンを検討した結果、レトロウイルスベクターの陰性荷電の性質から、Q セルロースのような陽性イオン交換体を用いたカラムクロマトグラフィーで優れた成績を得た。図9に示すように90%近い高回収率の精製分画が得られた。カラムサイズの拡大による大量の濃縮液で平均60%以上で10⁸CFU/ml を持つ分

表4 レトロウイルスベクターの最終精製度

	上 清	ショ糖遠沈	カラムクロマトグラフィー
ベクター価 (CFU/ml)	1~2 $\times 10^7$	2~4 $\times 10^8$	1~3 $\times 10^8$
回収率	ND	7 $\pm$ 3%	60 $\pm$ 30%
Specific activity CFU/mg	5~10 $\times 10^6$	4~8 $\times 10^8$	2~4 $\times 10^9$
DNA/用量 (ng)	400~10,000	50~500	0.05~0.5

注：回収率のバラツキは、3T3細胞を用いたタイターアッセイが大きなバラツキを持つことによる。

表5 各生産過程における安全性試験

Upstream バイオリアクター	Downstream 濃縮精製過程	最終ベクター
LDH	生物学的タイター	生物学タイター
グルコース	RNAタイター	RNAタイター
ラクテート	全蛋白質量	遺伝子導入率
生物学的タイター(3T3細胞)	精製度(specific activity)	(標的細胞)
RNAタイター	DNAスロットプロットアッセイ	精製度(specific activity)
サザンアッセイ(遺伝子コピー数)	宿主細胞蛋白質	SDS-PAGE/シルバー染色
全蛋白質量	(ウエスタンブロットアッセイ)	DNAスロットプロットアッセイ
RCR	培地蛋白質	サザンブロットアッセイ
一般微生物	(ELISA)	一般微生物
	一般微生物	エンドトキシン

画を得ることが可能となった。この操作により、99%の精製度を持つベクターが得られる。より高い精製度を得るために再度のカラムクロマトグラフィを試みた所、ベクター回収率は10%以下と低下し実用には向かなかった。次に、精製分画を再度 A/G Hollow Fiber により濃縮透析した後、最終的に凍結乾燥用溶液で調整され分注後、凍結乾燥される。表4に最終ベクターの品質を示した。以上のようなプロセスにより99%以上の純度と50pg~500pgのDNA断片(150bp以下)の少なくとも $2 \sim 3 \times 10^8$ CFU/mlのベクター価を持つベクターを生産できるようになった。本法を用いることにより、患者体内に直接接種する *In-Vivo* 遺伝子治療への適応も可能な技術であることが認められた。

4) 全生産過程における安全性および一定性試験

Upstream および Downstream プロセスでの再現性、一定性および安全性を示すため、我々は、表5に示す試験項目を実施し、最終ベクターの品質管理を実施しようと考えている。

それらの試験項目の中で、最も大切な RCR 法について述べる。Donahue⁴⁾らによる RCR のサルにおける腫瘍発生報告により、RCR 検出には特別の注意が払われてきた。RCR 検出法のうち、最も一般的に使用されている方法は S⁺/L⁻法であり、またベクターレスキュー法、PCR 法も使用されている。RCR 発生を防ぐように考案されたパッケージング細胞においても RCR の発生が生じることから^{10,15)}、従来の少量を用いたサンプルでの直接法では検出度が低いものと思われる。現在、FDA の推奨している 5%上清量と 10^8 細胞をサンプルとして RCR を検出する方法が考案されている¹⁵⁾。ベクター上清と精製ベクターは、*Mus dunni* 細胞での RCR 増幅法(3代継代)とベクターレスキュー法により最終判定をしている。細胞サンプル(10^8)は、*Mus dunni* 細胞由来の D/Bg-3A 細胞 (*Lac Z* 遺伝子を含む)で共培養を3代継代した後、その上清をベクターレスキュー法で判定している。大量培養法によるベクター産生では、RCR テストサンプルはすべて大量であるため、すべての試験はローラーボトルによる増幅法と共培養を実施しなければならず、RCR 検出法も

大量培養時代に備え、大規模になってきている。残念ながら、RCR の発生 0%というシステムが存在しない以上、さらに感度の高い方法を検討してゆく必要がある。293細胞を親細胞とした ProPak パッケージング細胞システムにより、RCR の発生を極めて低くすることができたという報告もあり¹³⁾、期待されている。

おわりに

現在の遺伝子治療の大部分が腫瘍をはじめ HIV 等の後天性疾患への応用に走り、その成果を早急にあげることが他の分野と同様大変困難であると思われる。しかしながら、多くの研究者による極めてさかんな研究から想像されるように、将来の重要な治療法となることを望む。そこで、多くの対象疾患の遺伝子治療に用いられる品質の高いレトロウイルスベクターの大量生産技術の開発は、多くのチャレンジを予想しながらも重要な我々の仕事である。

文 献

- 1) Chong, H and Vile, R. G. *Gene Ther.* **3**, 624-629, 1997
- 2) Blaese, R. M. et al. *Science*, **270**, 475-480, 1995
- 3) Bordignon, C. et al. *Science*, **270**, 470-475, 1995
- 4) Donahue, R. E. et al. *J. Exp. Med.* **176**, 1125-1135, 1992
- 5) Malech, H. L. et al. *Proc. Natl. Sci. USA*, **194**, 12133-12138, 1997
- 6) Kohn, D. B. et al. *Nat. Med.* **1**, 1017-1023, 1995
- 7) Kotani, H. et al. *Hum. Gene. Ther.* **5**, 19-28, 1994
- 8) Kotani, H. *実験医学*, **12**, 308-315, 1994
- 9) Kratje, R. B. et al. *Biotechnol. Prog.* **10**, 410-420, 1994
- 10) Kruse, C. A. et al. *Cancer Gene. Ther.* **4**, 118-1218, 1997
- 11) Onodera, M. et al. *Blood* (in press)
- 12) Otto, E. et al. *Hum. Gene Ther.* **5**, 567-575, 1994
- 13) Rigg, R. J. et al. *Virology*, **218**, 290-295, 1996
- 14) Selvaggi, T. A. et al. *Blood*, **89**, 776-779, 1997
- 15) Smiley, W. R. et al. *Hum. Gene. Ther.* **20**, 965-977, 1997