

# 実験的自己免疫性心筋炎における CTLA-4 IgG の効果

阿 部 暁

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
循環器学分野（主任：相澤義房教授）

## Effect of Naked Plasmid DNA Encoding CTLA-4 IgG on Experimental Autoimmune Myocarditis.

Satoru ABE

Division of Cardiology, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Science  
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

### 要 旨

【目的】抗原特異的な T 細胞の活性化には、抗原提示細胞の B7 ファミリーと T 細胞の CD28 とを介する副シグナルの存在が必要であるが、可溶性 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4) は副シグナルをブロックすることにより免疫反応を抑制することが知られている。CTLA-4 組み替え蛋白の投与あるいはアデノウイルスによる遺伝子導入治療によって自己免疫性疾患モデルや臓器移植時の免疫反応を有意に抑えることが報告されている。実験的自己免疫性心筋炎（以下 EAM）モデルは、その発症に抗原特異的な T 細胞活性が関与しており、アデノウイルスベクターによる CTLA-4 遺伝子治療は劇的な効果が最近報告された。我々は同モデルに対し、より簡便な方法であるプラスミドを用いた遺伝子導入治療を行ない、その効果を検討した。

【方法】Lewis ラットに対し EAM を発症させ、可溶性 CTLA-4 にラット IgG1 の Fc 部分を結合させた CTLA-4 Ig キメラ遺伝子を導入させた pCAGGS ベクター (pCAGGS CTLA-4 IgG) を投与した治療群 (n = 9)、対照プラスミドを投与した対照群 (n = 9) の 2 群に分けた。ブタ心筋ミオシンで感作させ、同日に尾静脈内プラスミド急速静注投与を行ない、感作 17 日目に心体重比、組織所見および血行動態を検討した。

【結果】対照群に比し治療群では心体重比は有意に小さかった。組織学的には炎症領域の縮小を認め ( $12.2 \pm 13.9\%$  vs.  $37.4 \pm 12.2\%$ )、治療群のいくつかは殆ど炎症所見が認められなかった。血行動態では dP/dTmax ( $8833 \pm 1969$  vs.  $6034 \pm 1344$ ) は有意に治療群で高く、中心静脈圧 ( $2.9 \pm 1.1$  mmHg vs.  $5.8 \pm 3.0$  mmHg)、左室拡張末期圧 ( $7.4 \pm 3.3$  mmHg vs.  $11.4 \pm 2.5$  mmHg)、dP/dTmin ( $-8069 \pm 2366$  vs.  $-5727 \pm 1084$ ) は治療群で有意に低かった。また、ANP の mRNA 量は治療群で有意に低かった ( $0.40 \times 10^5 \pm 0.48 \times 10^5$  分子数/ $\mu$ g total mRNA)。

Reprint requests to: Satoru ABE MD  
First Department of Internal Medicine  
Niigata University School of Medicine  
1-754 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り 1-754  
新潟大学医学部第一内科 阿 部 暁

vs.  $3.85 \times 10^5 \pm 2.21 \times 10^5$  分子数/ $\mu$ g total mRNA).

【結論】急速静注による pCAGGS-CTLA4Ig による治療は、心筋炎の発症を強く抑制した。

キーワード：実験的自己免疫性心筋炎、遺伝子治療、CTLA-4

## はじめに

T細胞の活性化には、抗原提示細胞の MHC class II による抗原提示と T細胞 TCR を介した抗原特異的な主シグナルに加え、抗原提示細胞の B7-1, B7-2 の B7 ファミリーと T細胞側の CD28 との結合経路を主とする抗原非特異的な副シグナル (costimulatory signal) の存在が必要である<sup>1)2)</sup>。副シグナルの欠如した状態で、主シグナルのみで T細胞を刺激した場合、T細胞はそれ以降その抗原に対して不応答または anergy と呼ばれる状態になり、それ以降その抗原に対して正常な増殖・活性化が生じない状態となる<sup>3)</sup>。

可溶性 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4) は B7 ファミリー に対し CD28 より強い親和性を持つリガンドであり、CTLA-4-B7 ファミリー結合は副シグナルを遮断し、T細胞活性に対して抑制的に作用することが認められている。

実験的自己免疫性心筋炎 (Experimental Autoimmune myocarditis, EAM) モデルは、巨細胞性心筋炎に類似した実験動物モデルであり、その発症に抗原特異的 T細胞活性が関与しており、免疫経路を抑制するような治療法が検討されてきた。抗  $\alpha\beta$  TCR 抗体の長期投与による心筋炎の抑制効果が認められており<sup>4)-6)</sup>、また、アデノウイルスベクターによる CTLA-4 遺伝子治療は劇的な効果が最近報告された<sup>7)</sup>。しかし、ウイルスベクターは免疫反応や副作用を惹起することがあり<sup>8)9)</sup>、アデノウイルスはウイルス性心筋炎の原因の一つと考えられており<sup>10)</sup>、心機能に影響を与える危険性を内包しているため、心筋炎の治療手段としては難点がある。一方、プラスミドを用いた遺伝子治療は、上記のような感染性がなく<sup>11)12)</sup>、かつ、様々な遺伝子を短時間かつ低コストで導入することができる利便性も持っている。近年、プラ

スミドの急速静注による遺伝子導入で、発現蛋白を長期にわたり高レベルで維持できることが報告された<sup>13)-15)</sup>。この手法では主に肝細胞で遺伝子発現が認められており<sup>15)</sup>、エンコードされた蛋白のみが分泌されるため、発現蛋白の作用以外の免疫反応は考慮する必要がない。

今回我々は、EAM モデルに対し、プラスミドを用いた CTLA-4 遺伝子導入治療を行ない、その効果を検討した。

## 対象と方法

### 1. EAM の作成

9 週齢の Lewis ラット (オス) に対し、既報<sup>4)</sup>の如く精製したブタ心筋ミオシンを PBS に溶解し 10mg/ml に調製する。これを等量等濃度の結核菌アジュバントと混和し、0.2ml を下肢に皮下注することでミオシンに感作させ、約 14 日頃より EAM を発症させた。

### 2. プラスミドの作成 (図 1)

ラット脾臓の cDNA より KOD-plus DNA polymerase (東洋紡, 大阪) とプライマー (5'-gaGAATTCATTTAAATgagaGCGGCCGCcgtgcccagaaactgtg-3', 5'-gagagagaGAATTCactctgggggtcatttaccgagagtgaggag-3') を用いて IgG-cDNA を精製し、これと発現プラスミド pCAGGS を制限酵素 EcoRI で処理した後に組み込み、pCAGGS-IgG を作成した。これを大腸菌 JM109 に導入し、培養後 Quantum Prep Plasmid Maxiprep kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて精製した。次いで EAM ラット心筋の cDNA より、プライマー (5'-gaGAATTCATTTAAATggctgtcttgactccagagg-3', 5'-gcagcatcGCGGCCGCgtctgaatctgggcatgttctgg-3') を用いて同様の手法でラット CTLA-4 を精製し、これと pCAGGS-IgG を制限酵素 Sma-I と Not-I とで処理した後

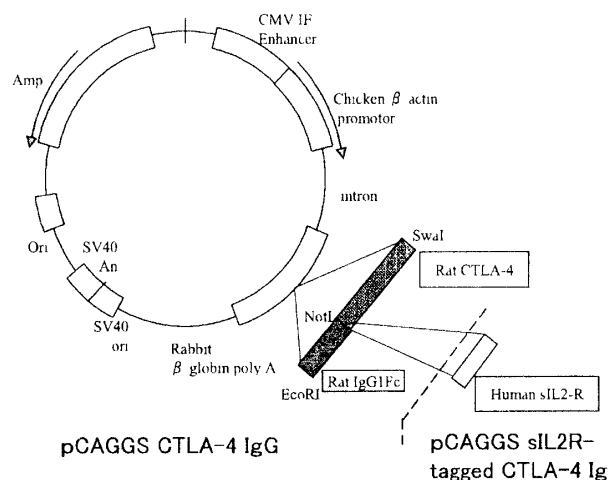


図1 pCAGGS CTLA-4 IgG 構造図

に組み込んだ。これを治療用プラスミド pCAGGS CTLA-4 IgG とし、上記と同様の手法で精製した。

また、血中濃度測定のため、pCAGGS CTLA-4 IgG にヒト可溶性インターロイキン2受容体 (sIL-2R) を組み込んだプラスミドを作成した。プライマー (5'-gcagcataGCGGCCGCactctgtgac gatgacccgccagag-3', 5'-gcagcataGCGGCCGC gtactctgttgaatatggacgt-3') を用い同様の手法で sIL-2R を精製し、これと pCAGGS CTLA-4 IgG を制限酵素 Not-I で処理した後に組み込んだ (pCAGGS sIL2R-tagged CTLA-4 IgG)。

### 3. 投与方法

治療用プラスミド pCAGGS CTLA-4 IgG (治療群, n=9) と、対照として何も組み込んでいない pCAGGS (対照群, n=9) をラット一匹に対し 800 μg 用意し、リンゲル液 20ml (約 80ml/kg) に混和し、ミオシン感作当日に尾静脈より約 10 秒で急速静注した。

### 4. 血中濃度測定

正常ラットに上記の手法で pCAGGS sIL2R-tagged CTLA-4 IgG を投与し、経時的に採血した。sIL-2R の測定には Human IL-2 sR alpha ELISA Kit (Genzyme Techno, Minneapolis, MN) を用いた。

### 5. 治療効果判定

EAM 急性期と推察される感作 17 日目に血行動

態測定、心体重比計測および心筋採取を施行した。ラットは 2 % イソフルレンにて麻酔し、その後血行動態への影響を考慮し 0.5 % まで減量した。右大腿動脈から挿入したカテーテルにて平均血圧 (meanBP) を、右総頸静脈から挿入したカテーテルにより中心静脈圧 (CVP) を測定し、右内頸動脈から左室に挿入した圧トランスデューサーカテーテルにより左室圧 (LVP)、左室拡張末期圧 (LVEDP)、および dP/dT を測定した。心電図により心拍数 (HR) を計測した。

血行動態測定後、下大静脈より脱血したのち心臓を摘出、周囲組織と心房を除去したのち心重量 (HW) を測定し、体重との比 (HW/BW) を算出した。

心筋は 3 つに横断し、中間部を 10 % ホルマリン液にて固定後、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。炎症部位と非炎症部位とを標本の色調の差を利用して選別し、横断面における炎症部位の面積比率を Lumina Vision および Mac Scope (三谷商事, 福井) にて算出した。

### 6. 定量的 RT-PCR 法

心尖部をトリゾル試薬 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) にて処理し RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて 5 μg の RNA から cDNA を作成した。心機能評価のため、定量的 RT-PCR 法にてラット心房利尿ペプチド (ANP) mRNA を測定した。心筋での ANP-mRNA 発現は心筋病変の重症度を鋭敏に反映する指標である<sup>16)</sup>。定量的 RT-PCR 法については既報のとおりであり<sup>17)</sup>、検体の濃度を算出した後、分子量とアボガドロ数を用いて総 RNA 1 μg 中の ANP-mRNA のコピー数を求めた。

### 7. 統計学的検討

数値は平均±標準偏差で記載した。2 群間の平均値の差の検定は unpaired t 検定を行ない、p < 0.05 を有意差ありと判定した。

## 結 果

pCAGGS sIL2R-tagged CTLA-4 IgG の静注投与後の血中濃度を図 2 に示す。投与翌日が最も高

く ( $354 \pm 16 \text{ ng/ml}$ ), その後は漸減した (7 日目:  $11 \pm 10 \text{ ng/ml}$ ).

治療群と対照群との比較結果を示す (表 1). 体重は治療群で有意に高く, 心重量および心体重

比は治療群で有意に低かった. 組織学的には, 対照群では心筋に広範な炎症細胞の浸潤と浮腫, 壊死像が全例で認められたが, 治療群のいくつかは殆ど炎症所見が認められず, 炎症部位の面積比率は治療群が有意に低かった (図 3). 血行動態指標では, 右房圧, 左室拡張末期圧,  $dP/dt \text{ min}$  は治療群で有意に低く, 平均血圧, 左室圧,  $dP/dt \text{ max}$  は治療群で有意に高かった (表 1).

心尖部における ANP の mRNA 量は, 治療群で有意に低かった (表 1).

## 考 察

プラスミドを用いた CTLA-4 IgG 遺伝子導入療法は, EAM に対し組織学的所見および心機能を著しく改善させた. かつてわれわれは EAM に対し, 抗 T 細胞抗体やサイトカインの効果について報告してきた<sup>18)19)</sup>. CTLA-4 を用いた治療法は, T 細胞活性化における副シグナルの遮断による強い免疫抑制作用を誘導し, かつ, これは特異的な免疫抑制を期待できるにも拘わらず, 自己抗

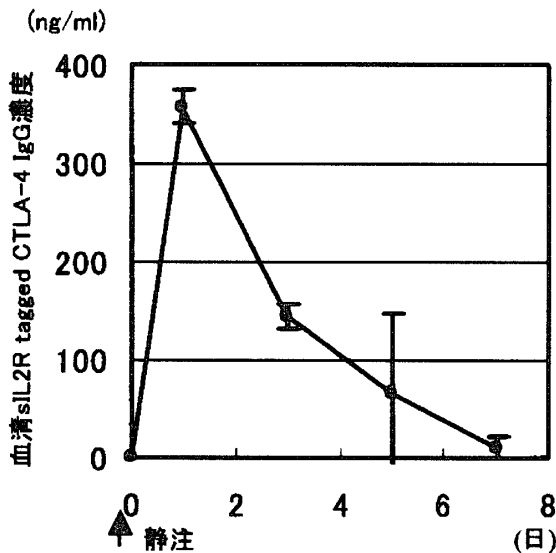


図 2 pCAGGS sIL2R-tagged CTLA-4 IgG 急速静注後の血清 sIL2R-tagged CTLA-4 IgG 濃度の推移.

表 1 対照群, 治療群の比較結果

	対照群 (n=9)		治療群 (n=9)		p value
心重量 (g)	1.11	$\pm 0.07$	0.86	$\pm 0.18$	$p < 0.01$
体重 (g)	218	$\pm 5.36$	236	$\pm 14.1$	$p < 0.01$
心体重比 ( $\times 1000$ )	5.08	$\pm 0.42$	3.73	$\pm 0.95$	$p < 0.01$
炎症領域 (%)	38.6	$\pm 12.3$	12.1	$\pm 13.91$	$p < 0.05$
血行動態指標					
HR (bpm)	377	$\pm 27.8$	402	$\pm 25.3$	n.p.
CVP (mmHg)	5.93	$\pm 3.08$	2.87	$\pm 1.12$	$p < 0.05$
AP (mmHg)	76.8	$\pm 5.74$	94.6	$\pm 11.6$	$p < 0.01$
LVP (mmHg)	95.1	$\pm 7.73$	117	$\pm 14.5$	$p < 0.01$
LVEDP (mmHg)	11.7	$\pm 2.62$	7.38	$\pm 3.28$	$p < 0.05$
dP/dT max	6034	$\pm 1344$	8833	$\pm 1969$	$p < 0.01$
dP/dT min	-5654	$\pm 1147$	-8069	$\pm 1266$	$p < 0.01$
mRNA of ANP (分子数/ $\mu\text{g}$ of total RNA)	$3.85 \times 10^5$	$\pm 2.21 \times 10^5$	$0.40 \times 10^5$	$\pm 0.48 \times 10^5$	$p < 0.01$

HR=心拍数; CVP=中心静脈圧; AP=動脈圧; LVP=左室圧; LVEDP=左室拡張末期圧;  
ANP=心房利尿ペプチド

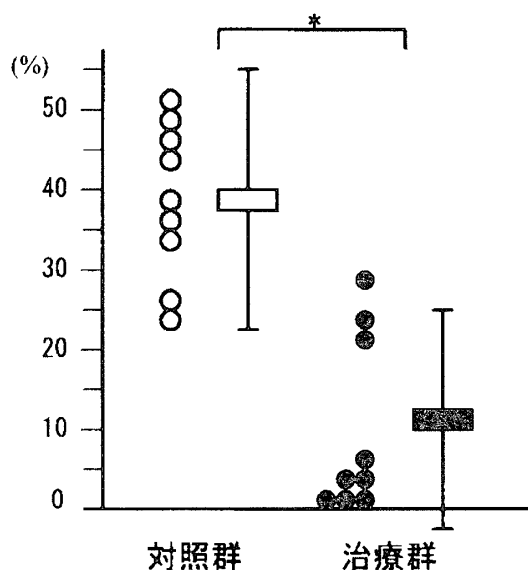


図3 心筋炎感作17日目のラット心横断面炎症領域の比較.

\*  $p < 0.01$

原に関する知見を必ずしも必要としないという利点を持つ。CTLA-4による副シグナル遮断は、自己免疫疾患においてきわめて有効な治療法であるといえる<sup>20) - 23)</sup>。

また、抗原感作とほぼ同時期の単回投与できわめて有効な結果を得た。これには、静注法での投与直後に高い血中濃度が得られ、かつ数日間はある一定濃度を保ったことで、CTLA4による副シグナル遮断と抗原感作によるT細胞刺激がほぼ同時期に生じ、ミオシン抗原に対しT細胞の応答が得られたためと考えられた。

CTLA-4 IgGは、ラットCTLA-4とラットIgGのFc領域からなるキメラ蛋白である。IgG Fc成分の大量投与がEAMに対し奏功するという報告がある<sup>24)</sup>が、今回の我々の実験ではCTLA-4 IgGの血中濃度はラット本来の免疫グロブリン血中濃度よりはるかに低く、病態に影響を与える可能性は極めて低いと考えられた。

ウイルスベクターを用いたCTLA-4 IgG遺伝子導入療法は、EAMも含め多くの自己免疫疾患モデルに用いられ、有効性が高く評価されている<sup>7), 25) - 28)</sup>。今回の実験で、プラスミドベクターによる治療は、それとほぼ同等の効果を得ること

が確認された。さらに、プラスミドによる遺伝子導入治療はウイルスベクターよりいくつかの点で有利である。DNA合成は容易に行うことが可能で、化学的・生物学的に安定しており保存が簡便である。遺伝子治療には大量のベクターを必要とするが、大量のプラスミド精製も低コストで行うことが可能である。

今回、我々は尾静脈からの急速静注によるプラスミド導入を試みた。Aiharaらはプラスミドの筋肉内投与に加えelectroporationを施行することで高い遺伝子発現を得られると報告しており<sup>29)</sup>、当初我々も筋肉内投与によるCTLA-4 IgGの治療実験を行った。しかしその効果は微弱であり、血行動態にはほとんど差が認められなかった。急速静注によるCTLA-4 IgG治療は高い効果が得られており、急速静注法は筋肉内投与に比してより効果的な遺伝子治療手段であると言える。

体重の10%近いリンゲル液を急速に静注するため、容量負荷が血行動態に及ぼす影響も懸念された。しかし、無治療の感作17日目のEAMラットの血行動態と比較したところ、対照群と有意差がなく、一時的な容量負荷はEAMの血行動態には影響しないと思われた。

MatsuiらはEAMに対し、アデノウイルスベクターによるCTLA-4 IgG治療を行ない、心体重比や組織学的所見、細胞性および液性免疫反応においてEAMの進展・発症を劇的に抑制することに成功した<sup>7)</sup>。今回、我々の研究において、プラスミドによるCTLA-4 IgG治療はEAMの発症を強く抑制し、組織学的所見のみならず血行動態においても改善が認められた。治療群のうち5例は組織学的に全く炎症が認められず、アデノウイルスベクターと同等の効果を持つ可能性が示唆された。

## 結 語

EAMに対するプラスミドベクターの急速静注法によるCTLA-4 IgG遺伝子治療は、組織学的所見および血行動態指標を大きく改善し、その発症を強く抑制した。

## 引用文献

- 1) Schwartz RH: A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248: 1349-1356 1990.
- 2) Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB and Mak TW: Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261: 609-612 1993.
- 3) Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH and Allison JP: CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356: 607-609 1992.
- 4) Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T and Shibata A: A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 57: 250-262 1990.
- 5) Kodama M, Matsumoto Y and Fujiwara M: In vivo lymphocyte-mediated myocardial injuries demonstrated by adoptive transfer of experimental autoimmune myocarditis. *Circulation* 85: 1918-1926 1992.
- 6) Hanawa H, Kodama M, Inomata T, Izumi T, Shibata A, Tachida M, Matsumoto Y and Abo T: Anti-alpha beta T cell receptor antibody prevents the progression of experimental autoimmune myocarditis. *Clin Exp Immunol* 96: 470-475, 1994.
- 7) Matsui Y, Inobe M, Okamoto H, Chiba S, Shimizu T, Kitabatake A and Uede T: Blockade of T cell Costimulatory Signals using Adenovirus Vectors Prevents both the Induction and the Progression of Experimental Autoimmune Myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 34: 279-295, 2002.
- 8) Barr D, Tubb J, Ferguson D, Scaria A, Lieber A, Wilson C, Perkins J and Kay MA: Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse hepatocytes in vivo: comparisons between immunocompetent and immunodeficient inbred strains. *Gene Ther* 2: 151-155 1995.
- 9) Yang Y, Li Q, Ertl EH and Wilson JM: Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 69: 2004-2015 1995.
- 10) Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kuhl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP and Towbin JA: Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 99: 1348-1354 1999.
- 11) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A and Felgner PL: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468 1990.
- 12) Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, Sih TR, Knoell D, Szoka FC, Walzem R, Carlson DM and Powell JS: Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 5: 1477-1483 1994.
- 13) Liu F, Song Y and Liu D: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 6: 1258-1466, 1999.
- 14) Jiang J, Yamato E and Miyazaki J: Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 1088-1092 2001.
- 15) Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazama JJ, Takahashi N, Sugawa M, Hanawa H, Tada N, Miyazaki J and Gejyo F: High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J Gene Med* 4: 333-341 2002.
- 16) Ationu A, Sorensen K, Whitehead B, Singer D, Burch M and Carter ND: Ventricular expression of brain natriuretic peptide gene following orthotopic cardiac transplantation in children - a three year follow up. *Cardiovasc Res* 27: 2135-2139 1993.
- 17) Hanawa H, Abe S, Hayashi M, Yoshida T, Yoshida K, Shiono T, Fuse K, Ito M, Tachikawa H, Kashimura T, Okura Y, Kato K, Kodama M,

- Maruyama S, Yamamoto T and Aizawa Y: Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. *Clin Sci* 103: 623 - 632 2002.
- 18) Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y, Ohnuki T, Gejyo F, Maruyama H and Miyazaki J: Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin - 10 by electroporation. *Circulation* 104: 1098 - 1100 2001.
- 19) Inomata T, Watanabe T, Haga M, Hirahara H, Abo T, Okura Y, Hanawa H, Kodama M and Izumi T: Anti - CD2 monoclonal antibodies prevent the induction of experimental autoimmune myocarditis. *Jpn Heart J* 41: 507 - 517 2000.
- 20) Arima T, Rehman A, Hickey WF and Flye MW: Inhibition by CTLA4Ig of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 156: 4916 - 4924 1996.
- 21) Takiguchi M, Murakami M, Nakagawa I, Yamada A, Chikuma S, Kawaguchi Y, Hashimoto A and Uede T: Blockade of CD28/CTLA4 - B7 pathway prevented autoantibody - related diseases but not lung disease in MRL/lpr mice. *Lab Invest* 79: 317 - 326 1999.
- 22) Perrin PJ, Scott D, Davis TA, Gray GS, Doggett MJ, Abe R, June CH and Racke MK: Opposing effects of CTLA4 - Ig and anti - CD80 (B7 - 1) plus anti - CD86 (B7 - 2) on experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 65: 31 - 39 1996.
- 23) Reynolds J, Tam FW, Chandraker A, Smith J, Karkar AM, Cross J, Peach R, Sayegh MH and Pusey CD: CD28 - B7 blockade prevents the development of experimental autoimmune glomerulonephritis. *J Clin Invest* 105: 643 - 651 2000.
- 24) Shioji K, Kishimoto C and Sasayama S: Fc receptor - mediated inhibitory effect of immunoglobulin therapy on autoimmune giant cell myocarditis: concomitant suppression of the expression of dendritic cells. *Circ Res* 89: 540 - 546 2001.
- 25) Kawaguchi Y: A gene therapy or purified CTLA4IgG treatment of experimental allergic encephalomyelitis. *Hokkaido Igaku Zasshi* 74: 467 - 475 1999.
- 26) Mihara M., Tan I, Chuzhin Y, Reddy B, Budhai L, Holzer A, Gu Y and Davidson A: CTLA4Ig inhibits T cell - dependent B - cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 106: 91 - 101 2000.
- 27) Quattrocchi E, Dallman MJ and Feldmann M: Adenovirus - mediated gene transfer of CTLA4Ig fusion protein in the suppression of experimental autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 1688 - 2697 2000.
- 28) Takiguchi M, Murakami M, Nakagawa I, Saito I, Hashimoto A and Uede T: CTLA4IgG gene delivery prevents autoantibody production and lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Life Sci* 66: 991 - 1001 2000.
- 29) Aihara H and Miyazaki J: Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol* 16: 867 - 870 1998

(平成15年1月21日受付)