

厚生省  
平成11年度

ワクチニアウイルス等の安全性と  
ワクチン接種に関する研究班

研究報告書

平成12年3月

主任研究者 倉田 毅  
(国立感染症研究所副所長)

## ワクチニアウイルス等の安全性とワクチン接種に関する研究班員名簿

研究者名	分 担	所 属	役 職
倉田 毅	班 長	国立感染症研究所	副所長
森川 茂	分担研究者	国立感染症研究所ウイルス 1 部	室長
杉山 和良	分担研究者	国立感染症研究所バイオセーフティ管理室	室長
小島 朝人	分担研究者	国立感染症研究所感染病理部	室長
宮村 達男	分担研究者	国立感染症研究所ウイルス 2 部	部長
橋爪 壮	分担研究者	日本ポリオ研究所	理事長
神谷 齊	分担研究者	国立療養所三重病院	院長
橋本 雄之	分担研究者	国立感染症研究所遺伝子資源室	室長

## 目 次

1. ワクチニアウイルス等の安全性とワクチン接種に関する研究班 総合研究報告書（平成 10～11 年度）	1
主任研究者：倉田 毅（国立感染症研究所副所長）	
2. ワクチニアウイルス等の安全性とワクチン接種に関する研究班 総括研究報告書（平成 11 年度）	5
主任研究者：倉田 毅（国立感染症研究所副所長）	
3. ワクシニアウイルスを用いた組換え DNA 実験における安全性に関する研究	9
分担研究者：橋本 雄之（国立感染症研究所遺伝子資源室長）	
4. DNA 組換えワクシニアウイルスのウイルス学的、感染病理学的検討	11
分担研究者：小島 朝人（国立感染症研究所感染病理部室長） 共同研究者：倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部）	
5. 単層細胞を用いた痘瘡ワクチン感染価の測定	14
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室長） 協力研究者：西條 政幸（国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室） 緒方 もも子（国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室）	
6. モンキーボックスウイルス（MPV）の研究	19
分担研究者：宮村 達男（国立感染症研究所ウイルス第 2 部長） 協力研究者：加藤 賢三（国立感染症研究所ウイルス第 2 部） 田中 幸江（国立感染症研究所ウイルス第 2 部） 市橋 康夫（新潟大学医学部ウイルス学教室） 大家 正泰（新潟大学医学部ウイルス学教室）	
7. 弱毒ワクチニアウイルス株 LC16m8 接種後の中和抗体の測定	22
分担研究者：宮村 達男（国立感染症研究所ウイルス第 2 部長） 協力研究者：加藤 賢三（国立感染症研究所ウイルス第 2 部） 田中 幸江（国立感染症研究所ウイルス第 2 部） 市橋 康夫（新潟大学医学部ウイルス学教室） 大家 正泰（新潟大学医学部ウイルス学教室）	
8. ワクチニアウイルス株に関する研究（2）	23
分担研究者：橋爪 壮（財団法人日本ポリオ研究所長）	
9. バイオセーフティ上の問題に関する研究：ワクチニアウイルス等の安全な 取り扱いに関する研究	25
分担研究者：杉山 和良（国立感染症研究所バイオセーフティ管理室長）	
10. ワクチニアウイルス取扱者に対する予防接種に関する研究	31
分担研究者：神谷 齊（国立療養所三重病院院長）	
11. 弱毒ワクチニアウイルスワクチン株（LC16m8）接種後の反応	33
分担研究者：倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部長） 研究協力者：岩崎 琢也（国立感染症研究所感染病理部） 小島 朝人（国立感染症研究所感染病理部）	
12. 海外出張報告書：ワクチニアウイルス、ボックスウイルスの実験室内感染 予防のためのワクチン接種に関する施策の考え方と実施方法に関する討議 （平成 12 年 3 月 26 日～30 日 米国 CDC）	37
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第 1 部外来性ウイルス室長）	
論文発表	39

# I. 総合研究報告

# 1. ワクチニアウイルス等の安全性とワクチン接種に関する研究班 総合研究報告書（平成10～11年度）

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

**研究要旨** 天然痘が根絶されて既に22年が経過した。種痘も同時に廃止され現在に至っている。わか国においても22～23歳以下の世代はいわゆる種痘を受けてはいない。一方近年盛んになった組換えDNA実験において、ワクチニアウイルスの強毒株をベクターとして用いることが多くなり、その領域にワクチン未接種者（種痘を受けていない人）が入ってきて、実験に携わることが出始めた。他方アフリカ中央部（旧ザイール、現コンゴ民主共和国）では未接種者にサル痘の発生が多数見られるようになった。このような状況下において必要に応じワクチンを接種できる体制を目指し、製造承認を受けている弱毒株（LC16m8）ワクチンを委託製造し、希望者に接種し臨床反応等を検討した。

## 分担研究者

森川 茂 国立感染研ウイルス第1部  
杉山 和良 国立感染研バイオセーフティ管理室  
小島 朝人 国立感染研感染病理部  
宮村 達男 国立感染研ウイルス第2部  
橋爪 壯 日本ポリオ研究所  
神谷 齊 国立療養所三重病院小児感染症  
橋本 雄之 国立感染研遺伝子資源室

## 研究協力者（平成10年度）

吉倉 廣 国立感染症研究所  
田代 真人 国立感染研ウイルス製剤部  
梅田 珠実 国立感染研国際協力室  
山西 弘一 大阪大学医学部微生物学  
十守 猛夫 日赤医療センター血液センター  
山田 竜雄 国立感染研筑波医学実験用  
等長類センター

## 研究協力者（平成11年度）

岩崎 琢也 国立感染研感染病理部

（池田、リスター等株）のワクチンも既に有効期限切れとなっており、上記ワクチニアウイルス等の事故に対する対応手段はない。この研究では、ワクチニアウイルスをベクターとする組換えDNA実験に携わるワクチン未接種世代の研究者に対する①ワクチン（LC-16弱毒株）の接種の必要性、②免疫グロブリン（ワクチニアウイルスに特異的）の必要性和効力等について、弱毒株ワクチンを作製する（千葉県血清研究所に依頼）とともに、既ワクチン接種者から、免疫グロブリンを採取し、有効グロブリンの入手が可能かどうかを検討することを目的とする。最近ワクチニアウイルス（カナリアボックス等を含む）をベクターとして組換えDNA実験に携わる人も増加しており、アトピー性皮膚炎の若年層の増加も目立ち、実験室感染を防ぎ、サル痘の流行地へ入る人々、あるいは医療関係者への接種を含めて、さらに感染者の発症を抑制する方法を開発検討し、あるいは流行地への国際協力等の基礎資料を作り、わか国の対応等について早急に検討する必要がある。

## A 研究目的

ワクチニアウイルス等のボックス系ウイルスを扱う者、患者を扱う医療関係者に、WHOおよび米国ではワクチニアのワクチン接種を勧めているかあるいは義務化している。また米国では、実験事故あるいは思わぬ接触（患者等）の際に、免疫グロブリンの投与も勧めている。またそれら（ワクチン、免疫グロブリン）の用意がされている。わか国には、それらの用意は現在全く無い。国家備蓄とされていたワクチニア

## B 研究方法

過去の種痘による免疫持続の判定とワクチニアウイルス弱毒株 LC16m8 の作成（委託）、免疫性の検討さらに若手既種痘者でのワクチンの有効性を検討し、（このワクチンによる副反応はほとんどはない点で旧来の株による種痘とは大きく異なる）血清を得て、免疫グロブリン分画を作成し、その *in vitro*、*in vivo* でのウイルス増殖抑制効果を検討する。

1 既種痘を受けたヒトの現在の抗体保有調

- 査（中和抗体）（実験室関係者）
- 2) LC16m8 株のワクチンの小動物、既種動物者における抗体誘導効果の検討
  - 3) LC16m8 接種小動物における通常ヘクターとして用いられている WR 株等の感染力の感染病理学的基礎検討と共に神経侵襲性について検討する
  - 4) 抗 LC16m8 抗体（免疫グロブリン）の小動物とヒトにおける誘導と精製、またその精製抗体のワクチニアウイルス感染防御効果の検討
  - 5) ワクチニアウイルス等のホックスウイルスの扱いに関するハイオセーフティ上の問題点とその解決法の検討
  - 6) 世界のホックスウイルス感染の現状の調査と世界各国の対応の調査を行なう。
  - 7) 2 年後には若年研究者世代へのワクチン対応、免疫グロブリン投与等の有効性、安全性、必要性等につき研究班としての判断を出す。
  - 8) 今回のザイル株でモノクローナル抗体と反応しない株についての生物学的性状の解析を行なう。
  - 9) MPV 分離株の簡易鑑別法の開発を行なう。

## C&D 研究結果と考察

- 1) ワクチンについて この研究に最も重要なのが接種用ワクチンの備蓄である。わか国には世界で最も秀れているとされる、中枢神経病原性が知られていない弱毒株（LC16m8）が製造承認を受けて存在している。天然痘根絶寸前に完成されたこともあり、一般接種に使用されることなく現存に至ったものである。現在ワクチニアについてはワクチン株も含めてレベル 2 扱いとなっており、近年の GMP 1 の対応（製造施設として）上の問題から、千葉県血清研究所に依頼し、試験研究用として用いることとした。メーカーの目録検査に加え、力価、安全性等のチェックを実施した。また接種用針を用いた
- 2) ワクチン接種（種痘）について 研究班員（神谷）の協力で、ワクチン接種にともなう同意書等のフォームを完成した。そのうえでボランティアに種痘を実施した。既被接種者（25 年以上）、未被接種者及びワクチニアウイルス取り扱いの有無等を因子として群に分け種痘を行った。その結果若い研究者でワクチニアウイルスに近い過去に曝露されているような傾向はみられず、未被接種者においては臨時的反応（膿疹の

- 程度、リンパ節腫脹、微熱等）か他に比べ強く出た。このようなリンパ節腫脹をきたす場合はアラセナー A 等の薬剤使用も考慮しておく方が良いかもしれない。頭痛、潰瘍形成等の症状は出現しなかった。
- 3) 抗体測定 単層培養細胞系（GMK, Vero-RK-13）を用いウイルスのフラック減少法等により力価、あるいは中和抗体を測定する系を確立し、一部種痘を受けたヒトの抗体を測定した。他の大部分は 2000 年 3 月末日、測定中である
  - 4) ワクチニアウイルス株に関する研究 弱毒のワクチニアウイルス株としてわか国で開発された DI-1 株、Kemp が弱毒株として米国で用い、わか国でも導入が検討された CV 1-78 株、及び橋爪らにより開発された LC16m8 株の中枢神経系に対する病原性の検討の結果、（増殖性と）皮膚での増殖性は中枢神経病原性とは異なる遺伝子群が関与していることが明らかになった。
  - 5) サル天然痘 (Monkeypox) 野外分離株の性状比較をしたところ、塩基配列、制限酵素切断像、モノクローナル抗体との反応性を見ると、1980 年代初と 1996-1997 年にかけてザイル北部及び中部で流行をおこした株との間には大きな差異は見られなかった。
  - 6) DNA 組換えワクチニアウイルスのウイルス学的、感染病理学的検討 世界各国でヘクターに汎用されている WR 実験室株、日本で第 2 世代ワクチンとして認可された LC16m8 株の原株 (m0 株) 由来組換えウイルスの動物接種実験を実施した。その結果①WR 由来組換えウイルスはマウスに対して高い病原性を示した。臨床症状には系統 A が見られた。②初回接種から回復したマウスは 2 次接種に抵抗性を示した。③m0 由来組換えウイルスは高感受性のウサギでも臨床症状を示さず、弱毒性を保持していた。④接種動物では、抗体産生、細胞性免疫が誘導され、追加接種で 2 次免疫応答を示した。
  - 7) ワクチニアウイルスを用いた組換え DNA 実験の安全性 平成 8-11 年の組換え DNA 実験計画で、ヘクターとして用いられている株は弱毒株 LC16m8 と、向神経性の弱毒株 WR であった。ウイルスの封し込めレベルは 2 である。実験に用いられるワクチニアウイルスと、組換えにより産生されるワクチニアウイルスを調査し、ウイルスそのものを増幅する段階を経ずにヘクターとして組換え実験に用いる例、及び増幅が制限されている株を用いてのワクチンの試み

- について調査した。
- 8) ワクチニアウイルスを取り扱う際のハイオセーフティ上の問題 ワクチニアウイルスを取り扱う際の実験室の物理的封し込めと、P1～P3 の実験室の空調システムについて検討した。
- 9) 海外調査報告 2000年3月26-30日にかけて米国ジョージア州アトランタ市の米国厚生省疾病管理センター（Centers for Disease Control and Prevention）へ森川班員を派遣し、「ワクチニアウイルス、ボックスウイルスの実験室感染予防のためのワクチン接種に関する施策の考え方と実施方法」に関する討議を行った。米国ではCDCの方針では、ワクチニアウイルスの実験従事者は10年ごと、モンキーボックスの実験従事者は3年ごと、治療ウイルス実験者は毎年次々接種を受けることになっている。CDCは大学及び民間研究所に対して、ワクチニアウイルスを実験室で取り扱うものに対しては10年ごとに種痘を受けることを勧告している。現在米全国で約700名がこの適応で接種を受けている。なお米国政府は現在1540万人分の備蓄があるか、天然痘ウイルスを用いてのハイオテロあるいは生物兵器対策に4000万人分の備蓄を用意すべく対応を開始した。

## E 結論

ワクチニアウイルスをヘクターとして用いる実験系に種痘を受けたことか無い世代の若手研究者が増加してきたことに伴い、WHOやCDCのワクチニア取扱者への種痘の勧告も考慮し、わが国においても研究者への種痘実施の必要性がでてきた。世界に存在するワクチニアウイルスワクチンの中で最も神経病原性が低い（あるいはない）とされるLC16m8（橋爪博士が研究開発したもの）を再度製造していたたき、実用に供するべき検討を行い、ウイルス取扱者への周知等を含め体制を確立した。また天然痘根絶以後そのままになっていた培養細胞系でのブラック形成、中和抗体測定法等を開発した。さらに強毒株と弱毒株の病原性の差異等の検討に加え、ワクチン株間の皮膚や中枢神経への病原性を調べた。さらにこのウイルスを取り扱ううえでのハイオセーフティの安全性の問題について、空調、設備面からも調査研究を実施した。天然痘ウイルスによるハイオテロも想定されており、今回の研究は今後の対応に役立つと考える。

## F 研究発表

- 1 論文発表（別紙の通り）

## II. 総括研究報告



## 2. ワクチニアウイルス等の安全性とワクチン接種に関する研究班 総括研究報告書（平成11年度）

主任研究者 倉田 毅 国立感染症研究所副所長

**研究要旨** 種痘を受けていない世代（24歳以下）がワクチニアウイルスを組換え実験等に用いる機会が増えてきており、実験を安全に行うために予防接種（種痘）を受けられるように対策をとった。既承認で、神経毒性の低い国産の LC16m8 を委託製造しボランティアに接種し臨床反応と抗体反応を検討した。その他ワクチニアウイルスの性状、ワクチン株の性状（皮膚と中枢神経病原性）、抗体測定法及び組換えワクチニア株のウイルス学的病原性と感染病理学的検討を行った。さらに組換え DNA 実験における安全性と、施設、設備等の検討を実施した。海外調査においては米国 CDC でワクチン接種（種痘）の対応（組換えワクチニアウイルス、マンキーポックスウイルス及びひ痘ウイルスの取り扱いに対して）につき検討した。

### 分担研究者

森川 茂 国立感染研ウイルス第1部  
杉山 和良 国立感染研バイオセーフティ管理室  
小島 朝人 国立感染研感染病理部  
宮村 達男 国立感染研ウイルス第2部  
橋爪 非 日本ポリオ研究所  
神谷 齊 国立療養所三重病院小児感染症科  
橋本 雄之 国立感染研遺伝子資源室  
以上7名

### 研究協力者

岩崎 琢也 国立感染研感染病理部  
以上1名

### A 研究目的

ワクチニアウイルス等のホックス系ウイルスを扱う者、患者を扱う医療関係者に、WHO および米国ではワクチニアのワクチン接種を勧めているかあるいは義務化している。また米国では、実験事故あるいは思わぬ接触（患者等）の際に、免疫グロブリンの投与も勧めている。またそれら（ワクチン、免疫グロブリン）の用意がされている。わか国には、それらの用意は現在全く無い。国家備蓄とされていたワクチニア（池田、リスター等株）のワクチンも既に有効期限切れとなっており、上記ワクチニアウイルス等の事故に対する対応手段はない。この研究では、ワクチニアウイルスをベクターとする組換え DNA 実験に携わるワクチン株接種世代の研究者に対する①ワクチン(LC-16 弱毒株)の接種の必要性、②免疫グロブリン（ワクチニアウイ

ルスに特異的)の必要性と効力等について、弱毒生ワクチンを作製する（千葉県血清研究所に依頼）とともに、既ワクチン接種者から、免疫グロブリンを採取し、有効グロブリンの入手が可能かどうかを検討することを目的とする。最近ワクチニアウイルス（カナリアボックス等を含む）をヘクターとして組換え DNA 実験に携わる人も増加しており、アトピー性皮膚炎の若年層の増加も目立ち、実験室感染を防ぎ、サル痘の流行地へ入る人々、あるいは医療関係者への接種を含めて、さらに感染者の発症を抑制する方法を開発検討し、あるいは流行地への国際協力等の基礎資料を作り、わか国の対応等について早急に検討する必要がある。

### B 研究方法

過去の種痘による免疫持続の判定とワクチニアウイルス弱毒株 LC16m8 の作成（委託）、免疫性の検討さらに若手未種痘者でのワクチンの有効性を検討する。（このワクチンによる副反応はほとんどはない点で旧来の株による種痘とは大きく異なる）。さらにこのウイルスを取り扱ううえでの安全性について検討する。

- 1 既種痘を受けたヒトの現在の抗体保有調査（中和抗体）（実験室関係者）。
- 2 LC16m8 株のワクチンの小動物、既種痘者における抗体誘導効果の検討。
- 3 LC16m8 接種小動物における通常ヘクターとして用いられている WR 株等の感染力の感染病理学的基礎検討と共に神経侵襲性について検討する。
- 4 抗 LC16m8 抗体（免疫グロブリン）の小

- 動物とヒトにおける誘導と精製、またその精製抗体のワクチニアウイルス感染防御効果の検討。
- 5) ワクチニアウイルス等のポックスウイルスの扱いに関するハイオセーフティの問題点とその解決法の検討。
  - 6) 世界のポックスウイルス感染の現状の調査と世界各国の対応の調査を行なう
  - 7) 今回のサイール株でモノクローナル抗体と反応しない株についての生物学的性状の解析を行なう。
  - 8) MPV 分離株の簡易鑑別法の開発を行なう。

## C&D 研究結果と考察

1999年度においては

- 1) ワクチン この研究に最も重要なワクチニアワクチン(弱毒生1C16m8)については、既に25年以上前に製造承認されており、千葉県血清研究所に依頼して1万人分の製造を行った。このワクチンの特徴は神経病原性かないことであり、現存するワクチニア系ワクチンとしては最も弱毒と考えられている。天然痘根絶(1977年10月)間際に完成したこともあり、実用化されることはなかったものである。メーカー側において力価、安全性等のチェックは検定同様に実施され、検定時と同様の項目についても国立感染症研究所ウイルス1部外来性ウイルス室で試験された。1ハイアル50人分が入っており、WHOの天然痘根絶計画で用いられた二叉針を用いて皮内接種するものである。
- 2) 予防接種(種痘)に際しての間診と同意 神谷班員と検討を加え日本ウイルス学会全員に学会誌「ウイルス」に刷り込みいつても使用しようように配慮した。様式は分担研究報告書参照。
- 3) ワクチニアウイルス取扱者に対する予防接種 種痘を受けたことのない世代がワクチニアウイルスをヘクターとするDNA組換え実験に用いるようになってきている。そこで今回作成したワクチンを用い24名の実験室研究者を種痘歴の有無と、ワクチニアウイルスを過去10年以内に接種していることの有無に分けて、接種を行った実験にワクチニアウイルス使用に無関係に種痘歴の無い人で接種部位(前腕内側または上腕外側部)の反応(発疹膿疱形成強くみられ、腋トリンパ節の腫脹(小指頭大)が1名に見られた。種痘歴のある人では一般に紅斑も小さくscarも小さく経過した。

3週後にはいずれの人でもscarも消失した。既種痘者では全く痕跡を残さなかった。これらの被接種者全員の抗体は3月31日現在測定中である。一方かつて種痘を受けて30年以上を経過した研究者に再種痘を実施した。2週後の血清を採取し、中和抗体を測定した。臨床的に水疱、膿疱、発赤腫脹の強弱には個人差があった。特に50年以上経過した例では強く反応が見られた。中和抗体には4人で180~11600を示されたが、1例では116未満であった。

- 4) ワクチニアウイルス株に関する研究(2) 弱毒ワクチニアウイルス株としてわか国で開発されたDis株、Kempらから弱毒株として米国で用い、わか国でも検討されたCV1-78株及び橋爪らにより開発されたLC16m8株の中枢神経系に対する病原性(増殖性)と皮膚増殖性につき比較検討した結果、皮膚での増殖性は中枢神経病原性とは異なる独立した遺伝子群が関与していることが明らかになった。
- 5) 単層細胞系での痘疹ワクチン感染価の測定法の開発 Vero及びRK-13細胞を用い痘疹ワクチン4種を用い簡便なブラック中和法の開発を検討したところ、Re1-4(Lister株)が適していると考えられた。また千葉血清に委託製造された1C16m8の力価は検定基準を満たす力価を有していた。この中和法は組換えワクチニアウイルス実験従事者等オルソポックスウイルスに対する免疫能を測定するのに簡便、適切な方法である。
- 6) DNA組換えワクチニアウイルスのウイルス学的、感染病理学的検討 世界各国でヘクターに汎用されているWR実験室株、日本で第2世代ワクチンとして認可されたLC16m8株の原株(m0株)由来組換えウイルスの動物接種実験を実施した。その結果①WR由来組換えウイルスはマウスに対して高い病原性を示した。臨床症状には系統差が見られた。②初回接種から回復したマウスは2次接種に抵抗性を示した。③m0由来組換えウイルスは高感受性のウサキでも臨床症状を示さず、弱毒性を保持していた。④接種動物では、抗体産生、細胞性免疫が誘導され、追加接種で2次免疫応答を示した。
- 7) ワクチニアウイルスを用いた組換えDNA実験に関する安全性の研究 国立感染症研究所における平成10-11年度の計画でワクチニアウイルスをヘクターとして用いる実験を拾い出し、用いられるワクチニアウイルスと、組換えにより産生されるワクチ

ニアウイルスを調べた。またワクチニアウイルスそのものを増幅する段階を解すにヘクターとして組換え実験に用いる例を文献にまとめ、又増幅が制限されている株を用いたワクチンの試みについて調査した。

- 8) ワクチニアウイルスを取り扱う際のハイオセーフティ上の問題 ワクチニアウイルス等の病原体を取り扱う実験室の物理的封し込めと、P1～P3 の実験室の空調システムについて検討した。
- 9) 海外出張報告 2000年3月26-30日にかけて米国ジョージア州アトランタ市の米国厚生省疾病管理センター（Centers for Disease Control and Prevention）へ森川班員を派遣し、「ワクチニアウイルス、ポックスウイルスの実験室感染予防のためのワクチン接種に関する施策の考え方と実施方法」に関する討議を行った。米国ではCDCの方針では、ワクチニアウイルスの実験従事者は10年ごと、モンキーポックスの実験従事者は3年ごと、痘瘡ウイルス実験者は毎年夫々接種を受けることになっている。CDCは大学及び民間研究所に対して、ワクチニアウイルスを実験室で取り扱うものに対しては10年ごとに種痘を受けることを勧告している。現在米全国で約700名がこの適応で接種を受けている。なお米国政府は現在1540万人分の備蓄があるか、天然痘ウイルスを用いてのハイオテロあるいは生物兵器対策に4000万人分の備蓄を用意すべく対応を開始した。

## E 結論

ワクチニアウイルスを組換え実験の材料として用いる種痘未接種者の感染防止のためワクチン接種をすべく神経毒性の無いとされる弱毒生ワクチン LC16m8 を製造委託し、ボランティアに接種した。接種歴の無い若い人で、膿疱が大きく、所属リンパ節が腫脹した例が3名あった。又それに伴うワクチン接種への同意規則等を作成し、全ウイルス学会員に送付した。その他ワクチニア株の病原性検索から皮膚増殖性は中枢神経病原性と異なる遺伝子群が関与していることが判明した。さらに感染細胞系での感染価測定法を開発した。組換えワクチニアウイルスの検討を行い、本来の株（弱毒 WR あるいは弱毒 LC16）に相応する病原性発現がみられた。弱毒株由来組換えウイルスは高感受性ウサギにおいても極めて明瞭な弱毒性を示していた。加えて用いた組換えウイルスの実験における安全性とハイオセーフティ上の問題点を検討した。海外

調査においては最も痘瘡に対しての対応策のとれている米国 CDC を訪問し、施策について調べた。ヒト免疫血清からグロブリンを分画して用いる方法は製剤作成等の基準その他から少数の接種者から得ることは不可能であり、実施を見送った。

## F 研究発表

- 1 論文発表（別紙のとおり）

### III. 分担研究報告

### 3. ワクシニアウイルスを用いた組換え DNA 実験における安全性に関する研究

分担研究者 橋本 雄之（国立感染症研究所遺伝子資源室長）

- 研究要旨**
- 1 国立感染症研究所における平成 10-11 年度の計画で、ワクシニアウイルスをベクターとして用いる実験を抜き出し、用いられるワクシニアウイルスの株及びどのような形の組み換えワクシニアウイルスが産生されるか調べた。
  - 2 ワクシニアウイルスそのものを増幅する段階を経ずにベクターとして、組換え実験に用いる例を文献にもとめた。また、ヒトではその増殖が制限されている株を用いたワクチンの試みについて調べた。

#### A 研究目的

我が国の生物・医学系の大学および国立研究機関等において、組換え DNA 実験のベクターとして DNA インサートサイズが大きく、増殖が早く効率がよいことから、ワクシニアウイルスをベクターとして用いることがひきつづき多用されている。一方、天然痘根絶以来 20 年以上が経過し、実験従事者として多数を占めるようになってきた 20 歳代の人たちは種痘を受けていない年齢層にあたる。従って、ワクシニアウイルスを用いる組換え DNA 実験を実施するにあたって、従来の封じ込めだけで妥当かどうか検討を要するようになってきた。そこで、本研究ではその実施の状況を把握するとともに、目的とする実験を安全に遂行する手だてを検討することを目的とする。

#### B 研究方法

当研究所および科学技術庁に提出されて実施が承認された実験計画書に基づいて、ワクシニアウイルスをどのような形でベクターとして用いているか等、実施の状況を把握する。

ベクターとして使われているワクシニア株およびそのベクターとしての使用方法を計画、文献等で調べ、より安全な使用方法はないか、検討する。

#### C&D 研究結果と考察

- 1 平成 11 年度において感染研からワクシニアウイルスをベクターとして使用する組換え DNA 実験は新規で 3 件申請されており、6 件が継続中である。多くはワクシニアウイルスベクターに他のウイルス蛋白遺伝子を組み込んで、大量発現、免疫原性の解析、遺伝子導入をする実験でワクシニアウイルス粒子が生じることから基準外申請されたものである（1 件は文部省の科研費申請にともなって申請されたもので、文部省の場合、ベクターとしてウイルス産生がある場合は機関内審査となっているが、この場合は動物に接種する計画が含まれていたため大臣申請とした）。科学技術庁での審査では封じ込めレベルとしては P2 (BSL2) で承認され、「種痘が行われていない現在においては、実験従事者はワクチン株であってもワクシニアウイルスの取り扱いには注意を要する」との意見が付されているものである。具体的には既に他機関等で作製されたものの分与を受けて用いるケースが多く、その場合はワクシニアウイルス原株 (WR) を取り扱う段階はなく、ワクシニアウイルスとの相同組換えにより、ウイルスチミジンキナーゼ遺伝子中にプラスミドベクターにクローニングされた異種遺伝子を挿入したもので、ウイルスとしての病原性は弱くなっていると考えられる。ただし、ワクチンとしての効果をみるためにサル、ハムスターなど動物個体に接種する例（今年度は

3 件) が増えており、病原性の程度かとうか慎重に調べる必要がある。感染研で新たに作製する場合はワクチン株 LC16m8 を用いており、その点の問題はかなり軽減されるものと考えられる。2 件はワクシニアウイルスに T7 ホリメラーゼを組み込んだヘクター (VH7-3, 温度感受性変異株由来) を用いるものである。感染細胞内で T7 ホリメラーゼを発現させて、同時接種した、他のウイルス蛋白 cDNA を組み込んだ T7 プロモーターをもつプラスミドヘクターから、その蛋白を効率よく産生する目的のものであり、ワクシニアウイルス粒子は生しない株 (modified vaccinia virus Ankara, MVA, 宿主域変異株) が用いられている場合はウイルス粒子産生の問題は解消される。

実験従事者は計 19 人で天然痘予防ワクチン接種を経験しない年齢層 (26 歳以下) の人は 3 人であった。

- 2 既に構築した異種遺伝子を組み込んだワクシニアウイルスヘクターの異種遺伝子部分を必要なものに置き換える方式で、ワクシニアウイルスそのものを増幅する段階を経ずに必要な組換えウイルスを得る試みかされているかどうか調べた。インフルエンザウイルス HA 遺伝子を組み込んだワクシニアウイルスに、HIV-1 env 蛋白のエピトープ配列 DNA を HA 遺伝子のカセットとして設定した部分に組み入れるという報告<sup>1)</sup>がみられたか、オリゴペプチドで抗原としての効果のある部分を組み込むには有用である。一方、最近の文献でワクチンとして接種してから粒子産生がみられない MVA をワクチンヘクターとして用いて、RS ウイルス<sup>2)</sup>、EHV-1<sup>3)</sup>、あるいはヒト腫瘍メラノーマ特異的チロシナーゼ<sup>4)</sup>を抗原としてワクチン効果をみる実験報告がされていたが、いずれも有効で MVA 株の有用性を主張するものであった。さらに、それに DNA ワクチンを併用すると効果が増すという報告<sup>2)</sup>があった。日本で用いられているワクチン株 LC16m8 に比べてどうか、検討する価値はあると思われる。

1) Chiba M et al, Arch Virol 144 1469-1485, 1999

2) Wyatt LS et al, Vaccine 18 392-397 1999

3) Huemer HP et al, Vaccine 18 1320-1326, 2000

4) Drexler I et al, Cancer Res 59 4955-4963 1999

## E 結論

組換え DNA 実験により作製した異種遺伝子を持つワクシニアウイルスは一般的にはワクシニアウイルス遺伝子部分を欠失しているため、元のウイルスより病原性はさらに減弱しているとみられるが、動物実験においては培養細胞系の結果とは異なることもありうることを考慮して慎重に行う必要がある。既製の組換えウイルスを出発材料として用いる例では原株ウイルスを増殖させる段階はないか、ワクチンとして粒子を集めることは必要なので、ワクチンウイルスとしての病原性の減弱と有効性の兼ね合いを今後とも検討する必要がある。

## 4. DNA 組換えワクシニアウイルスのウイルス学的、 感染病理学的検討

分担研究者 小島 朝人 (国立感染症研究所感染病理部室長)  
共同研究者 倉田 毅 (国立感染症研究所感染病理部長)

**研究要旨** 世界各国でベクターに汎用されている WR 実験室株、日本で第 2 世代ワクチンに認可された LC16m8 株の原株(mO 株)由来組換えウイルスの動物接種実験を実施した。その結果、(H)WR 由来組換えウイルスはマウスに対しても高い病原性を示し、臨床症状には系統差が認められること、(I)初回接種から回復したマウスは 2 次接種に対して抵抗性を示すこと、(K)mO 由来組換えウイルスは高感受性のウサギでも臨床症状を示さず、弱毒性を保持していること、(L)接種動物には抗体産生・細胞性免疫が誘導され、追加接種で 2 次免疫応答を示すこと、(M)他の大量発現系では不首尾な cDNA の発現が可能であること、が示された。

### A 研究目的

WHO 痘瘡根絶計画の成功で生ワクチンの役割を終えたワクシニアウイルスは、現在 DNA 組換え実験のベクターとして多くは WR 実験室株が汎用されている。一方、天然痘を根絶しようとするワクチン効力を活用して、弱毒 LC16 株、アンカラ株、コペンハーゲン株、NYBH 株等各国で使用されたワクチン株をベクターに、DNA 組換え生ワクチン開発研究が各国で推進されている。

そこで本研究は、(H)WR 実験室株、WHO/日本/英国で種痘に用いられた LISTER 原株(LO)、日本で開発された LO 株由来の温度感受性弱毒 LC16 変異原株(mO)、第 2 世代痘瘡ワクチンに認可された mO 株由来の LC16m8 株(m8)、及び、(I)それらの DNA 組換えウイルスを用いてウイルス学的・ウイルス感染病理学的検討を加え、(K)ワクシニアウイルス株とこれをベクターにした組換えウイルスの性状を明らかにし、(L)ベクター使用あるいはワクチン接種における安全性の検討に資するものとする。

### B 研究方法

DNA 組換えワクシニアウイルス株 ワクシニアウイルス野生株、及び、異種遺伝子をチミジ

ンキナーゼ(TK)遺伝子 EcoRI サイトに導入された組換えワクシニアウイルスは、既に作製・保管されていたものより、昨年度調整したウイルスストックを用いた。また、MUC1 ムチン cDNA がワクシニアウイルス TK 遺伝子の同一サイトに導入された組み換え WR 株については、同一の標準作製法に従った相同性組換えにより作製し、純化のステップを経ずにウイルスストックを調製した。導入遺伝子の発現 ワクシニアウイルス中に挿入された遺伝子は、感染 RK-13 細胞から粗精製した組換えウイルス DNA のサザンブロットで解析した。挿入遺伝子産物の発現は、組換えウイルスを  $moi=2$  で感染させ、24 時間後の細胞抽出液および培養上清について、それぞれに特異的な抗体を用いた ELISA 法、あるいはウエスタンブロット法で解析した。動物接種実験 マウスは BALB/c、C3H/He、C57BL/6 を、ウサギはニュージーランドホワイトを用いた。マウス尾静脈、ウサギ耳静脈に野生株あるいは組換えウイルスを、WR 株由来ウイルスは  $1-2 \times 10^7$ 、mO 株由来ウイルスでは  $5 \times 10^7-2 \times 10^8$  接種し、経過を観察しつつ経時的に血清を採取した。追加接種は初回接種と同様に行った。血清中の抗体レベルは、MUC1 ペプチドを用いた ELISA、あるいは組換え p24 を用いた ELISA で測定した。MUC1 特異的 CTL は、MUC1 持続発現細胞をターゲット細胞に用いた  $^{51}\text{Cr}$ -release assay で測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験ガイドラインに従って、保定器の使用等実験動物の苦痛を軽減できる方法で実施し、実験終了後は安楽死の処置を行った。

## C 研究結果

WR 株由来ウイルスのマウス接種実験 MUC1 ムチンを発現する組換え WR 株ウイルスを複製した。挿入された MUC1 cDNA(3.4kb)のサイズをサザンブロットで検討したところ、長さの短くなった種々の cDNA が検出され、3.4kb の全長 cDNA を持つ組換えウイルスは 10 プラーク中 1 プラークのみであった。このウイルスをプラーク純化すると、再度、種々のサイズの cDNA を持つ組換えウイルスが分離された。初回に単離した全長 cDNA の組換えウイルスを接種用に調整したストックでも、cDNA はブロードなバンドとして観察され、発現された MUC1 ムチンもブロードなバンドとして抗-MUC1 抗体で検出された。

このストックウイルス  $1.8 \times 10^7$  pfu を BALB/c マウス尾静脈に接種したところ、二次発病と体重減少が認められたか、その後回復した。同量の WR 野生株接種 BALB/c マウスでは体重減少の程度が大で、回復までの期間は長くなった。次に、 $10^7$  pfu を BALB/c, C3H/He, C57BL/6 マウスに接種した。C3H/He, C57BL/6 マウスでは BALB/c マウスより強い症状を呈し、体重減少・削瘡とも著しく、接種部位尾部より先端は発痘による壊死で脱落した。いずれの系統のマウスも回復後の 2 次 3 次接種に対しては抵抗性を獲得し、臨床症状を示さなかった。

mO 株由来ウイルスの接種実験 HIV Gag 粒子抗原を発現する組換え mO 株  $2 \times 10^8$  pfu を BALB/c, C57BL/6 マウス尾静脈に接種した。いずれのマウスにも臨床症状は観察されず、2 次発症も認められなかった。2 週後の再接種に対しても何ら臨床症状は認められなかった。そこで、マウスよりもワクシニアウイルス感染に対して感受性の高いウサギに、 $\beta$ -Gal, あるいは Gag を発現する組換え mO 株  $2 \times 10^8$  pfu を耳静脈から接種した。これらのウサギにはマウスと同様臨床症状は観察されず、13 週後の 2 次接種でも同様にウイルス感染に伴う変化は観察されなかった。

組換えウイルス接種動物の免疫応答 MUC1 発現 WR 株接種マウスには抗-MUC1 抗体が誘導されていた。また、Gag 発現 mO 株接種マウス及びウサギにも高いレベルの抗-Gag 抗体が長期間誘導されていた。この抗体免疫応答は組換えウイ

ルスの追加接種により明瞭な 2 次応答を示した。一方、組換え MUC1-WR 株接種マウス脾臓中には低いレベルながら MUC1 特異的な CTL 活性が検出された。この CTL 活性は抗原プロセッシング (TAP) 欠損細胞 RMA-S-MUC-1 を標的細胞に用いた場合にも観察されることから、MHC 非拘束性 CTL であることが示唆された。

## D 考察

世界各国で組換え実験のヘクターに使用されているワクシニアウイルス実験室株 WR のヒトに対する感染性 病原性は定かでない。本実験のマウス接種実験では、これまでの報告と同様に、TK 遺伝子の破壊による病原性の低性は認められるものの、組換え WR 株の高い病原性が示された。WR 株はマウス脳で数百代継代され、マウスに対して親和性の高くなっている株であることから、ヒトに対する病原性を反映していないとの議論も以前から提示されていた。しかし、既に我々が報告しているように、WR 株はウサギ等マウス以外の動物に対しても高い病原性を示す。また、本実験で示したように、日本で第 2 世代の弱毒ワクチンに認可された m8 株の原株である mO 株は、WR 株の 10 倍量以上を接種しても、マウスは勿論、ワクシニアウイルスに感受性の高いウサギにおいても何ら臨床症状を示さなかった。この結果は、これまで我々が行ってきたウサギ脳内接種による神経病原性試験 ウサギ皮内接種による皮膚反応試験の結果と一致するものであった。従って、マウスでも十分ワクシニアウイルスの病原性を判定できるものと考えられ、上記の結果はヒトにおける WR 株由来組換えウイルスの病原性を示唆すると共に、弱毒 LC16 株由来組換えウイルスの安全性も示唆している。

結果の項に示したように、組換え mO 株の場合はマウスでもウサギでも何ら臨床症状を示さなかったため見い出せなかったか、組換え WR 株を種々の系統マウスに接種した場合には臨床症状の程度に系統差が認められた。このことは、ワクシニアウイルスに対する感受性に遺伝的要因が関与している可能性を示唆しており、雑種であるヒトの場合個々人で反応性が大きく変動する可能性が考えられる。

組換え mO 株接種マウス ウサギにおいて挿入遺伝子産物に対する抗体免疫応答の上昇が観察された。このことは、初回接種で実験動物は垂感していたことを示している。しかも、追加接種で明瞭な 2 次免疫応答が観察されたことは、追加接種



のウイルスも"take"していたことを示している。ヒトの種痘を受けた世代では"take"しないため、組換えワクシニアワクチンは無効であろうとの推論か一部では取り上げられていたが、本実験の結果はこれか単なる推論にしか過ぎないことを示している。しかも、MUC1 組換えウイルスの例では細胞性免疫の誘導も示され、組換えワクシニアウイルスは安全性さえ満足できれば、依然として有望な組換え生ワクチン開発の一方策と考えられる。

ワクシニアウイルスは挿入遺伝子を安定に維持できる変異の少ないベクターとして知られている。しかし本実験では、挿入 MUC1 cDNA の欠失が観察された。MUC1 ムチンは糖鎖結合部位を含む 20 アミノ酸の繰り返し(30~90 タンデムリピート)からなる特殊な構造をもっている。このような cDNA 側の性質により欠失が生じたものと思われる。にも拘らず、全長 cDNA を持つ組換えウイルスも分離された。他の大量発現系では成功していない遺伝子等の発現系として、有用性は保持していよう。

## E 結論

- 1) WR 由来組換えウイルスはマウスに対しても高い病原性を示し、臨床症状には系統差が認められた。
- 2) 初回接種から回復したマウスは 2 次接種に対して抵抗性を示した。
- 3) mO 由来組換えウイルスは高感受性のウサギでも臨床症状を示さず、弱毒性を保持していた。
- 4) 動物には抗体産生・細胞性免疫が誘導され、追加接種で 2 次免疫応答が観察された。
- 5) 他の大量発現系では不首尾な cDNA の発現かワクシニアウイルスでは可能であった。

## F 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Tokunaga, K, Ikuta, K, Adachi, A, Matsuda, M, Kurata, T and Kojima, A The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry *Virology*, 257, 285-289, 1999
- 2) Mochizuki, N, Otsuka, N, Matsuo, K, Shiino, T, Kojima, A, Kurata, T, Sakai, K, Yamamoto, N, Isomura, S, Dhole, T N,

Takebe, Y, Matsuda, M and Tatsumi, M An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C *AIDS Res Human Retroviruses*, 15, 1321-1324 1999

### 2 学会発表

- 1) 大場浩美、寺尾圭一、稲葉麻記、寺田 知絵子、岩澤恵理子、小島朝人、倉田毅、千葉丈 逆転写酵素に対する細胞内免疫による HIV-1 複製の阻害 第 47 回日本ウイルス学会総会、1999 年 10 月、横浜
- 2) 北川善紀、吉原清美、柚原純子、千葉丈、倉田毅、小島朝人 組換えワクシニアウイルス、バキュロウイルス、plasmid ベクターにより発現されるキメラ HIV-1 Gag VLP の抗原性・免疫原性 第 3 回日本ワクチン学会総会、1999 年 11 月、名古屋

## 5. 単層細胞を用いた痘瘡ワクチン感染価の測定

分担研究者 森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第1部  
外来性ウイルス室長）

協力研究者 西條 政幸、緒方 もも子  
（国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室）

**研究要旨** 組み換えワクチニアウイルス実験従事者などの、オルソポックスウイルスに対する免疫能を測定する為の、簡便なプラーク中和法を行う場合 Ref-4 (Lister 株)が適していると考えられた。また、千葉血清に委託生産された Lc16m8 の力価は、検定基準を満たす力価を有していた。

### A 研究目的

これまで、組み換えワクチニアウイルス実験は、既種痘者が主に行ってきたが、既にお瘡ワクチン接種停止後約 20 年が経過し、未種痘者が組み換えワクチニアウイルス実験に従事するようになってきた。また、サル痘の近年の流行、痘瘡ウイルスのバイオテロへの利用の危険性が指摘されるなど、痘瘡ワクチンの必要性が当面無くなることはないと考えられる。既種痘者においても、いまだ有効な免疫能を有しているか測定するには、ウイルス中和抗体の測定が必要である。これまで痘瘡ワクチンの感染価は、発育鶏卵のしょう尿膜 (CAM) を用いてポック形成により測定されてきた。この方法で中和試験を行うのは、非常に煩雑である。今回各種痘瘡ワクチン由来ワクチニアウイルスを用い、細胞培養によるプラーク試験で最も優れた株を選択し、中和試験に用いる候補株を選択することを目的とした。

### B 研究方法

- 1) 細胞 Vero 細胞および RK-13 細胞を用いた。
- 2) 痘瘡ワクチン 国立感染症研究所参照痘瘡ワクチンロット No 4 (Ref-4 Lister 株)、Lc16m8 (千葉県血清研究所)、

T-1 (Lister 株) と T-2 (Lister 株) (A 社)、D-1 (Lister 株) と D-2 (Lister 株) (B 社)、H (池田株) (C 社)、K (池田株) (D 社) を用いた。

- 3) Vero 細胞株および RK-13 細胞株に用いたワクチニアウイルスの感染価の測定 24 穴マイクロプレート (Falcon 社製) の各ウエルに、70,000 個の Vero 細胞および 10,000 個の RK-13 細胞を増殖培地 [10% 牛胎児血清含有 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM-10FBS)] を用いて、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターでそれぞれ 4 日間培養し、それぞれの単層細胞を作製した。単層細胞作製後、増殖培地を取り除き、リン酸緩衝液で 2 回洗浄した。維持培地 [2% 牛胎児血清含有 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM-2FBS)] で 10 倍階段希釈されたウイルス液 0.2ml を各ウエルに加え、37°C、1 時間細胞に吸着させた。1 時間の吸着反応後、ウイルス液を取り除き、0.5% メチルセルロース含有 MEM-2FBS を各ウエルに加え、培養した。使用した細胞が Vero 細胞の場合 5 日間、RK-13 細胞の場合 4 日間培養した。その後、その 0.5% メチルセルロース含有 MEM-2FBS を取り除き、それぞれの細胞をホルマリンで固定し、さらに染色液 (クリスタルハイオレット) で染色した。
- 4) 発育鶏卵を用いたワクチニアウイルス感

染価の測定、 $0.5 \log_{10}$  刻みに階段希釈して1 希釈あたり 10 個以上の発育鶏卵しよう尿膜 (CAM) に、CAM 1 枚あたり 0.1 ml を接種して、37°C に静置培養し 48 時間後に開卵して、ウイルスにより特異的に形成されたポック (白斑) を算定して、力価を計算した。

## C 研究結果と考察

- 1) 細胞変性効果 (CPE) の出現 Lc16m8 株を除いたワクチニアウイルスは、Vero 細胞および RK-13 細胞において CPE を呈した。Vero 細胞では 5 日間、RK-13 細胞では 4 日間培養することで、プラークをきれいに作製することができた。千葉 Lc16m8 株は、両細胞において 37°C で培養した場合、CPE を全く呈さなかった。北研 38 株は RK-13 細胞においてプラークを形成したが、他の痘瘡ワクチン株と比較して、小さなプラークであった。
- 2) ワクチニアウイルスの単層細胞を用いた力価と CAM を用いた力価の比較 Lc16m8 株以外の検討された痘瘡ワクチンのワクチニアウイルスは、RK-13 細胞においてプラークを形成することが確認された。つまり、Vero 細胞や RK-13 細胞を用いた組織培養法を用いて、痘瘡ワクチンの感染価を検討することが可能であった。Lc16m8 株は、もともと Lister 株をオリジンとした ts-変異株で、Vero 細胞での増殖がきわめて弱い。今回の検討により、Lc16m8 株の Vero 細胞、RK-13 細胞による組織培養を用いた感染価の測定はこの方法では出来ず、Neutral Red による染色法によらなければならないことが確認された。今回検討したワクチニアウイルスのプラーク (ポック) 形成数は、CAM で最も多く、次いで Vero 細胞、そして、RK-13 細胞の順に多かった。Vero 細胞における感染価と CAM における感染価の相関のグラフを図 1 に示す。相関係数 (r) は 0.92 となり、有意な相関が認められた。つまり、Lc16m8 株以外の痘瘡ワクチン株の感染価を測定する方法として、CAM を

用いてポックを形成させて感染価を測定する方法を、Vero 細胞を用いた組織培養法によるプラーク形成法による感染価の測定に代用できる可能性が示唆された。ただし、池田株について今後検討する必要がある。

RK-13 細胞を用いた組織培養法による感染価の測定において、D-1、D-2 および K は RK-13 細胞でのプラーク形成能は低かった。特に K の RK-13 細胞でのプラーク形成能は弱く、プラークのサイズも小さかった。D-1、D-2 の Vero 細胞における感染価は、CAM における感染価と比較して 2-4 分の 1 であったのに対し、RK-13 細胞における感染価は CAM における感染価と比較して 10-30 分の 1 であった。つまり、用いる細胞の種類によって、同一の株を用いた痘瘡ワクチンであっても、その感染価にばらつきが出るのが明らかになった。

今回用いた、Lc16m8 株は、当研究班により委託生産されたものであるが、検定基準に合格する力価を有していることが明らかになった。また、この細胞培養によるプラーク形成により、他のワクチニアウイルス株と簡便に識別できることがわかった。今後、既種痘者の中和抗体価を測定するのには、本プラーク法は簡便であるが、特に Ref-4 (Lister 株) を用いるのが良いと考えられる。

## D 結論

千葉血清に委託生産された Lc16m8 の力価は、検定基準を満たす力価を有していた。プラーク中和試験に用いる株は、国立感染症研究所 Ref-4 (Lister 株) が適していると考えられた。

## F 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Sayo, M, Suzutani, T, Itoh, K, Hirano, Y, Muron, K, Nukura, M, and Morikawa, S (1999) Nucleotide

- sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *J Med Virol*, 387-393
- 2) Amano, H, Morikawa, S, Shimizu, H, Shoji, I, Kurosawa, D, Matsuura, Y, Miyamura, T, and Ueda, Y (1999) Identification of the canarypox virus thymidine kinase gene and insertion of foreign genes. *Virology*, 256, 280-290
  - 3) 森川 茂、倉根 一郎 (1999) ウイルス性出血熱、職場の感染症を防ぐ、食中毒・結核から海外赴任者の健康管理まで (中央労働災害防止協会) 103-104
  - 4) Utama A, Shimizu H, Morikawa S, Hasebe F, Morita K, Igarashi A, Hatsu M, Takamizawa K, Miyamura T (2000) Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *FEBS Lett* 7, 465(1) 74-78
  - 5) Saijo, M, Nukura, M, Morikawa, S, Ogata, M, Ksiazek, T G, Mayer, R, Peters, C J, and Kurane, I (2000) Development of enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. submitted for publication
- sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *J Med Virol*, 387-393
- 3) E型肝炎ウイルス様粒子への外来エヒトープの挿入と終口ワクチンピークルとしての可能性 新倉昌浩、金義宣、西條政幸、森川茂、保富康弘  
第47回日本ウイルス学会 1999 11
  - 4) エボラウイルス(EBO)とマールブルウイルス(MBG)の組換え核蛋白を用いた抗体測定システム 西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、森川茂、倉根一郎  
第47回日本ウイルス学会 1999 11
  - 5) ラッサウイルスの組換えN蛋白を用いた血清診断法の開発 森川茂、西條政幸、新倉昌浩、緒方もも子、倉根一郎  
第47回日本ウイルス学会 1999 11

## 2 学会発表

- 1) Detection of Ebola virus (EBO) and Marburg virus (MBG) antibodies using respective nucleoproteins (NPs) M Saijo, M Nukura, M Ogata, S Morikawa, I Kurane, R Meyer, TG Ksiazek, CJ Peters US-Japan Cooperative Medical Science Program, 32nd Joint Working Conference on Viral Diseases (Washington), 1999 (Jun 29-July 1)
- 2) Establishment of Lassa virus antibody detection system using its recombinant nucleoprotein S