

20020086

厚生労働科学研究費補助金

平成14年度

厚生労働科学特別研究事業

細胞培養痘そうワクチンの有効性等に関する研究

(H14-特別-015)

研究報告書

平成15年3月

主任研究者 倉根一郎

(国立感染症研究所)

## 目 次

細胞培養痘そうワクチンの有効性等に関する研究	1
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
弱毒痘瘡ワクチンウイルス株の分子遺伝学的・感染免疫学的検討	7
分担研究者：小島朝人（国立感染症研究所感染病理部）	
ウイルス遺伝子配列の決定に関する研究	9
分担研究者：吉田輝彦（国立がんセンター研究所）	
細胞培養痘瘡ワクチンの B5R 欠損と有効性に関する研究	13
分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
細胞培養痘瘡ワクチンの有効性等に関する研究	22
分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所感染病理部）	
痘瘡ワクチンの抗ウイルス剤に対する感受性：痘瘡ワクチンの副作用に対する化学療法に関する再評価	25
分担研究者：西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
グロブリン製剤のワクチニアウイルス中和抗体に関する研究	32
分担研究者：前田秋彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）	
LC16mO 株ゲノムの塩基配列（確定分）	36
分担研究者：吉田輝彦（国立がんセンター研究所）	
Lister 株ゲノムの塩基配列（途中分）	95
分担研究者：吉田輝彦（国立がんセンター研究所）	

総括研究報告書

細胞培養痘そうワクチンの有効性等に関する研究

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部部長）

研究要旨：

我が国においては、天然痘ウイルスによるバイオテロ対策の一環として、LC16m8株を用いた乾燥細胞培養痘そうワクチン 250 万分のワクチンを製造・備蓄した。本ワクチンは、過去に約 10 万人に接種され、WHO の Lister 株と同レベルの免疫誘導能を示し、さらに重篤な副反応もないことから、非常に安全性の高い痘そうワクチンと考えられる。本研究においては、痘そうワクチン LC16m8 株を Lister 株、LC16m0 株との比較においてウイルス学、分子生物学的、免疫学的に解析することにより以下の結果を得た。1) LC16m8 株との比較を目的として、Lister 株、LC16m0 株の塩基配列をほぼ決定した。2) EEV 関連 6 蛋白（A33R、A34R、A36R、A56R、B5R、F13L）遺伝子の塩基配列を Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株で比較した。LC16m8 株では既に報告されている通り、B5R 遺伝子の 274 塩基の G の欠失が見られ、このため本来 317 アミノ酸から成る蛋白が 92 アミノ酸になることが確認された。3) Lister 株、LC16m8 株の B5R-ect は 35kDa、LC16m8 株の欠失型 B5R 蛋白は 14kDa の蛋白として検出できた。4) Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株の B5R 遺伝子のシグナルペプチドを除いた ectodomain 領域（B5R-ect）をウサギに免疫し、4 回免疫後 1 週目で B5R 抗体が検出できた。しかし、いずれの免疫血清も IHD-J 株による comet 抑制効果は見られなかった。5) 抗ウイルス剤であるシドフォビル、ビダラビン、S2242 が Lister 株の増殖を選択的に抑制した。6) 市販されている人免疫グロブリン製剤のワクシニアウイルス中和抗体価は 40 倍から 80 倍であった。

分担研究者：

小島朝人（国立感染症研究所感染病理部  
室長）

西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一  
部 主任研究官）

長谷川秀樹（国立感染症研究所感染病理部

主任研究官）

前田秋彦（国立感染症研究所ウイルス第一  
部 研究員）

森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一  
部 室長）

吉田輝彦（国立がんセンター研究所 部長）

## A. 研究目的

天然痘ウイルスによる生物テロ対策については、世界各国がその重要性及び緊急性を認識し、ワクチンの確保・接種をどのように行うべきか検討している。我が国においては、天然痘ウイルスによるバイオテロ対策の一環として、平成13年度には乾燥細胞培養痘そうワクチン 250 万分のワクチンを製造・備蓄した。我が国で製造・備蓄している LC16m8 株を用いた痘そうワクチンは、Lister 株と同レベルの免疫誘導能を示し、さらに重篤な副反応もないことから、非常に安全性の高い痘そうワクチンと考えられる。

本研究の目的は、痘そうワクチン LC16m8 株を Lister 株、LC16m0 株との比較においてウイルス学、分子生物学的、免疫学的に解析することにより、LC16m8 株を用いた乾燥細胞培養痘そうワクチンの有効性に関する科学的根拠を得ることである。LC16m8 株を用いた乾燥細胞培養痘そうワクチンは、過去に約 10 万人に接種され、WHO の Lister 株と同レベルの免疫誘導能を示し、さらに重篤な副反応もないことから、非常に安全性の高い痘そうワクチンと考えられる。しかし、本ワクチンが認可された時点では、痘そうが根絶されつつあったため、痘そう流行地での種痘には用いられなかった。また、痘そうの根絶に伴い、LC16m8 株に関するウイルス学、分子生物学的、免疫学的な解析は十分には実施されていない。

近年、ウイルス遺伝子機能の解析から、細胞外エンベロープウイルス (EEV) 表面蛋白として同定されている 6 種類のウイルス蛋白のうち、B5R, A33R 蛋白に対する抗体

がウイルス中和能を有することが明らかになっているが、欠失型の B5R 蛋白が産生されることが予想されている。LC16m8 株の有効性を再確認するためには、特に B5R 等の EEV 蛋白に関する解析が必要である。本研究の目的は、痘そうワクチン LC16m8 株を Lister 株、LC16m0 株との比較においてウイルス学、分子生物学的、免疫学的に解析することにより、LC16m8 株を用いた乾燥細胞培養痘そうワクチンの有効性に関する科学的根拠を得ることである。また、比較対象となる Lister 株、LC16m0 株に関して情報を得るため、これらの株の全塩基配列を明らかにする。

## B. 研究方法

### 1. ウイルスゲノムの塩基配列の決定

1) ワクシニアウイルスの精製: Lister 株、LC16m0 株を、RK13 細胞で増殖させて用いた。これらの種ウイルスを RK13 細胞に接種し大量培養を行った。2~3 回の感染 RK13 細胞をプールし、蔗糖クッション超遠心法で精製したウイルスを粗ウイルス画分とし、更に蔗糖密度勾配遠心法で分画したウイルスを精製ウイルスとした。

2) ウイルス DNA の精製: 粗或いは精製ウイルスから 0.5% SDS-10mM 2ME-1mM EDTA 存在下で proteinase K 消化し、phenol/chloroform 抽出を行なった。精製度を OD260/280 で検定し、塩基配列決定用に提供した。

3) 塩基配列の決定: Lister 株について部分精製ビリオンと精製ビリオン由来の DNA をそれぞれ約 20  $\mu$ g、LC16m0 株については部分精製ビリオン及び精製ビリオン由来の DNA としてそれぞれ約 30  $\mu$ g、10  $\mu$ g を用い

た。Reference となりうる公開されている配列としては、長さや配列データの信頼性の点から、Copenhagen 株を用いた。Copenhagen 株と、Lister 株、LC16m0 株との homology は 99.9%以上と予測されたが、大きな差異がある場合でも対応ができるよう、精製された DNA を template にしたホールゲノムショットガン法を用いた。さらに gap を埋める contig の方向や順番を決めるために primer walking を行い、その template には部分精製 DNA を用いた。

#### 2. B5R 等細胞外エンベロープウイルス (EEV) 表面蛋白の解析：

Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株、IHD-J 株の EEV 関連蛋白の遺伝子 A33R, A34R, A36R, A56R, B5R, F13L の遺伝子配列を決定し、Copenhagen 株、WR 株、MVA 株および他のオルソポックスウイルスの配列と比較した。

#### 3. 痘そうワクチンの抗ウイルス剤に対する感受性：

薬剤感受性試験により作用機序の異なるいくつかの抗ウイルス剤（臨床応用されている薬剤から近年開発された薬剤）による痘そうワクチン（Lister 株）の増殖抑制効果を調べた。また、RK-13 細胞および Vero 細胞に対する抗ウイルス剤の細胞毒性も調べた。

#### 4. グロブリン製剤のワクチニアウイルス中和抗体：

献血由来ヒト免疫グロブリン製剤と輸入人免疫グロブリン製剤を用いた。細胞として HeLa 細胞を用いてワクチニアウイルスの細胞内感染性ウイルス (IMV) の 50% 中和抗体価を測定した。ウイルスには Lister 株を用い、100 ブラック形成単位 (PFU) のウイル

スと検体希釈液を 37℃、1 時間反応後 4℃で一晩反応させ、HeLa 細胞に接種した。4 日後に形成されるブラックを測定し、50% ブラック形成阻止する検体の希釈度を求めた。国立感染症研究所が保有するワクチニアウイルス高度免疫ウサギ血清（国際単位 4000 IU）を対照として用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験においては動物実験ガイドラインに従い、実験動物の苦痛を軽減する方法で実施し、実験終了後は安楽死等の処置を行なう。

### C. 研究結果

#### 1. Lister 株、LC16m0 株のゲノムの塩基配列：

2 株の一次シーケンシングが終了し、配列のアセンブルおよびエディット作業によって、内側 170kb の配列はそれぞれ一本のコンセンサス配列に繋げることができた。両端各 4kb の LTR 配列の内側にそれぞれ 10kb ずつの相同な配列が存在することがわかった。この 10kb の相同配列の塩基配列は決定したが、それぞれゲノムのどちらの端に位置するのかを確定するために、内側のユニークな配列を含むクローンを作成し、サザンハイブリダイゼーション法を用いて位置特定を行っている。LC16m0 株は homogeneity が高く、特に問題もなく単一の塩基配列への assembly 作業が進められたが、Lister 株は heterogeneous な DNA の集合であることがわかったため、LC16m0 株との相同性を利用して塩基配列データのスクリーニングを行った。この結果、LC16m0 株に最も近いであろうと思われるコンセンサス配列を再現することができた。

## 2. B5R 等細胞外エンベロープウイルス (EEV) 表面蛋白の解析

### 1) EEV 関連 6 蛋白の遺伝子配列:

① A33R 遺伝子: LC16m0 と LC16m8 株では、親株の Lister 株の 165 番目のアミノ酸 Asn が Asp へ変異していた。

② A34R 遺伝子: Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株の A34R 蛋白のアミノ酸配列は同一であった。

③ A36R 遺伝子: LC16m0 と LC16m8 は、104 番目のアミノ酸が Lister 株の Met から Ile へ変異しているが、いずれも疎水性アミノ酸で、また痘そうウイルスなどでも、この部位のアミノ酸は Ile であることから、蛋白の機能に変化があるとは考えにくい。

④ A56R 遺伝子: A56R 遺伝子は、HA 蛋白をコードしている。LC16m0, LC16m8 株の配列は一致するが、Copenhagen 株と比べると、5 アミノ酸の欠失が認められる。一方、Lister 株は、Copenhagen 株型のものと同型欠失型のもの混在していた。

⑤ B5R 遺伝子: LC16m8 株では既に報告されている通り、B5R 遺伝子の 274 塩基の G の欠失が見られ、このため 317 アミノ酸から成る蛋白が 92 アミノ酸に大きく欠失することが確認された。ワクチニアウイルス株によりアミノ酸配列に 1~数アミノ酸の相違が認められるが他の株では欠失はなく全て 317 アミノ酸からなる蛋白をコードしていた。

⑥ F13L 遺伝子: アミノ酸 6 番目と 291 番目がワクチニアウイルス株により配列が異なるが、全てに欠失は見られなかった。

2) B5R 蛋白の発現: 昆虫細胞 Tn5 に組換えバキュロウイルスを感染させることにより、シグナルペプチドを除いた ectodomain

領域 (B5R-ect) を Lister 株、LC16m8 株の B5R 遺伝子に関しては 35kDa の蛋白、LC16m8 株の欠失型 B5R 蛋白は 14kDa の蛋白として検出できた。これらを Ni カラムで精製してウサギを免疫した。B5R 遺伝子全長を pKS336 ベクターに挿入し、HeLa 細胞に導入し stable line を作製した。これを抗原としてワクチニア高度免疫ウサギ血清で免疫蛍光抗体法を行ったところ、細胞質に顆粒状に B5R 抗原が検出された。

3) B5R-ect 免疫ウサギ血清: Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株の B5R-ect をウサギに免疫した。2 回免疫後 1 週目では抗体が検出できなかった。4 回免疫後 1 週目で B5R 抗体が検出できた。しかし、いずれの免疫血清も IHD-J 株による comet 抑制効果は見られなかった。

### 3. 感染防御能の検討:

Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株の精製全長ゲノム DNA を Hind III で切断しその断片をクローニングベクターにサブクローニングを行った結果、現在までに Lister 株については 0.2, 0.7, 1.5, 1.7, 2, 2.1, 4 kbp の 7 つのクローンが得られ LC16m0 株については 0.4, 0.7, 0.8, 0.9, 0.95, 1.5, 1.6, 2.2, 4, 4.5, 5 kbp の 11 クローンのゲノム断片を得ることができた。それぞれをマウスの皮下接種し WR 株による感染防御能の検討は現在進行中である。

### 4. 痘そうワクチンの抗ウイルス剤に対する感受性:

シドフォビル, ビダラビン, S2242 が痘そうワクチン Lister 株の増殖を選択的に抑制した。DNA ポリメラーゼ阻害剤であるフォスカルネットとグアノシンアナログであるガンシクロビルは同ウイルスの増殖を

全く抑制しなかった。また、carbocyclic oxetanocin-G, carbocyclic oxetanocin-A、リバビリンは同ウイルスの増殖を中等度に抑制をした。

5. グロブリン製剤のワクチニアウイルス中和抗体：

現在市販されている人免疫グロブリン製剤のワクチニアウイルス中和抗体価を求めた結果、40 倍から 80 倍であった。国際単位では 50 から 100 IU であった。また、献血由来人免疫グロブリン製剤と輸入人免疫グロブリン製剤で中和力価に差は認められなかった。

#### D. 考察

天然痘が根絶されて 20 年以上経過するため、痘そうワクチンは昭和 55 年度を最後に製造されていなかった。このため、痘そうワクチンに関する研究もあまり行われていない。本研究では、ワクチニアウイルス Lister 株と LC16m0 株ゲノムの塩基配列の解析を行った。LC16m0 株の内側 170kb については、現在 10kb の領域が増幅できるプライマーを複数箇所設計し、増幅された DNA のサイズを測定することにより、コンセンサス配列に間違いがないか確認を進めている。両端各 4kb の LTR 配列については、当初から塩基配列を完全に確定することは極めて困難であると考えられ、その取扱を今後検討する必要がある。今後、LC16m8 株のシーケンシングを行う際には、LC16m0 株の配列がテンプレートとして使用できると予想されるため、部分精製 DNA とプライマー・ウォーキングの組み合わせで解決できるものと考えられる。

近年、LC16m8 株に欠失変異が見られるこ

とが明らかとなった。本研究では、これ以外の EEV 関連蛋白の遺伝子配列をいくつかのワクチニアウイルス株で決定し比較したが、LC16m8 株には B5R 以外には欠失変異がなかった。B5R 遺伝子を発現、精製しウサギを免疫した。現在までに 4 回免疫して初めて抗体が上昇した。一方、ワクチニアウイルス高度免疫ウサギ血清（細胞内感染性ウイルス (IMV) 中和力価 4,000 IU、ワクチニアウイルスに対する ELISA 抗体 20 万倍以上) の B5R に対する抗体価は、蛍光抗体法で 640 倍、B5R-ELISA で 800 倍と極めて低かった。種痘歴のあるヒト血清 5 検体中のワクチニアウイルスに対する ELISA 抗体は 800 から 12,800 倍で、B5R 抗体は検出限界以下であった。これらを総合すると、B5R の免疫原性は極めて低く、高度免疫血清で初めて抗体が上昇すると思われる。

抗ウイルス剤として本年度の検討に用いられた 8 種類の抗ウイルス剤のうちで、実際に臨床応用されているのは、vidarabine、GCV、foscarnet、CDV、ribavirin である。種痘後脳炎などの副作用に対する抗ウイルス剤による治療の有効性は、臨床場においては確認されていない。しかし、今回の検討で示されたようにヘルペスウイルス感染症に臨床応用されている vidarabine および CDV が高い抗痘そうワクチン (Lister 株) 活性を示したことから、今後再び痘そうワクチン接種が広く行われることにより出現する可能性のある副作用に対して用いうるかもしれない。

痘そうワクチンは昭和 55 年度を最後に製造されていない。このため種痘の副反応対策や天然痘患者が出現した場合の対策として製造されていたワクチニア免疫ヒトグ

ロブリン (VIG) の製造もなされていない。現在入手できる人免疫グロブリン製剤のウイルス中和力価を VIG の基準と比較した。現在入手できる人免疫グロブリン製剤は、50 から 100 国際単位での中和能があることが判明した。VIG の基準は 500 国際単位以上であるため、非常時には人免疫グロブリン製剤を VIG 投与基準の 10 倍量投与すれば同等の効果が期待できる可能性がある。VIG 製剤は筋注用であったが、現在の人免疫グロブリン製剤は静注製剤であるため 10 倍投与も可能である。

#### E. 結論

1) LC16m 8 株との比較を目的として、Lister 株、LC16m0 株の塩基配列をほぼ決定した。LC16m0 株は homogeneity が高く、単一の塩基配列への assembly 作業が進められた。Lister 株は heterogeneous な DNA の集合であることがわかったため、LC16m0 株との相同性を利用して塩基配列データのスクリーニングを行った。この結果、LC16m0 株に最も近いであろうと思われるコンセンサス配列を再現することができた。2) EEV 関連 6 蛋白 (A33R、A34R、A36R、A56R、B5R、F13L) 遺伝子の塩基配列を Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株で比較した。LC16m8

株では既に報告されている通り、B5R 遺伝子の 274 塩基の G の欠失が見られ、このため本来 317 アミノ酸から成る蛋白が 92 アミノ酸になることが確認された。3) Lister 株、LC16m8 株の B5R-ect は 35kDa、LC16m8 株の欠失型 B5R 蛋白は 14kDa の蛋白として検出できた。4) Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株の B5R 遺伝子のシグナルペプチドを除いた ectodomain 領域 (B5R-ect) をウサギに免疫し、4 回免疫後 1 週目で B5R 抗体が検出できた。しかし、いずれの免疫血清も IHD-J 株による comet 抑制効果は見られなかった。5) 抗ウイルス剤であるシドフォビル、ビダラビン、S2242 が Lister 株の増殖を選択的に抑制した。6) 市販されている人免疫グロブリン製剤のワクシニアウイルス中和抗体価は 40 倍から 80 倍であった。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表  
現在準備中であるが、現在はなし。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



弱毒痘瘡ワクチンウイルス株の分子遺伝学的・感染免疫学的検討

分担研究者 小島 朝人 国立感染症研究所感染病理部  
共同研究者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部  
尾崎 泰子 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨：我国で第2世代ワクチンに認可された組織培養弱毒 LC16m8 ワクチン株の有効性を、分子遺伝学的及び感染免疫学的に検討する事を目的にした。即ち、①LC16m8 株が、痘瘡根絶に実績を示した WHO 採用 Lister 株から温度感受性弱毒 LC16mO 株を経て開発された樹立過程をウイルスゲノム塩基配列の面から解析するため、大量のウイルス培養・精製・ゲノム DNA 抽出を行い塩基配列解析チームに提供した。②これら Lister 関連株のワクチン効果を検討するため強毒・向神経性ワクシニア株に対するマウス感染防御比較実験を開始した。③巨大ウイルス全ゲノム DNA を部分化して安定にプラスミドに保存する事を試み、Lister、LC16mO 株各々 7、11 の Hind III クローンを回収した。

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、DNA 組換え実験のベクターとして汎用されてきた。しかし、再度ワクチンとして使用する緊急性が全世界で生じている。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基により安全性の高い新ワクチン開発研究が各国で急遽進められている。

本研究は、過去に WHO/日本/英国で採用され痘瘡根絶に高い実績を持つ Lister 原株(LO)；我国で LO 株から温度感受性弱毒株として開発された LC16mO 変異原株(mO)；mO 株からさらに選別され、現在各国開発のワクチンを含めても最高の安全性評価を得ている第2世代痘瘡ワクチン LC16m8 株(m8)、の有効性を、①分子遺伝学的・感染免疫学的に比較検討し、②これらワクチン株ウイルスゲノム DNA を安定にプラスミドに保存する事を目的とした。

B. 研究方法

ワクシニアウイルスの精製：LO 株、mO 株は橋爪博士より分与を受けたウイルスを、m8 株は厚生科学研究費により試験製造されたワクチンロットを、RK13 細胞で増殖させて用いた。これらの種ウイルスを RK13 細胞に接種し 1 回に 15cm ディッシュ 10 枚の規模で大量培養を行った。2～3 回の感染 RK13 細胞をプールし、Joklik の方法に従って蔗糖クッション超遠心法で精製したウイルスを粗ウイルス画分とし、更に蔗糖密度勾配遠心法で分画したウイルスを精製ウイルスとした。ウイルス DNA の精製：粗或いは精製ウイルスから Rice らの方法に準じて、0.5%SDS・10mM 2ME・1mM EDTA 存在下で proteinase K 消化し、phenol/chloroform 抽出を行なった。精製度を OD260/280 で検定し、塩基配列決定用に提供した。Hind III DNA ライブラリーの作製：粗精製ウイルス全長 DNA を Hind III で切断した各フラグメントを、pUC18 又は pBR322 由来 pMT2 の Hind III ユニークサイトにサブクローニングした。クローンは Hind III 制限酵素

解析でスクリーニングした。動物接種実験：マウスは6週齢・雌 BALB/c を用いた。LO、mO、m8 各ウイルス株の  $1 \times 10^7$  及び  $1 \times 10^5$  PFU をマウス背部皮下2箇所に分けて接種した。3週後に抗体測定用の採血と、強毒ワクシニアウイルス WR 株の感染攻撃を行い、ワクチン効果を判定する。

(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なう。

### C. 研究結果及び考察

本研究全体の緊急性に鑑み、千葉県血清研究所がライセンスを持つ我国ワクチン m8 株の塩基配列決定は当該研究所で進行していたことから、本分担研究では LO 及び mO ウイルス株について解明する事を目指した。

塩基配列決定を担当する分担研究者・吉田博士との検討の結果、プライマーシークエンス法の読み誤りを避けるための複数クローン解析による時間の消費を避け、複製過程を最小にすることで変異導入可能性を最小に抑え、迅速かつ正確な解明が期待できるショットガン法で実施し、確認をプライマー法で行う方策の採用を決定した。

従って、ウイルス DNA の調整は細胞 DNA の混入が少ない精製法が求められた。DNA の抽出過程では、混入した細胞 DNA の除去が不可能なため、用いるウイルス自体を高純度に精製することが必須である。ワクシニアウイルスは 1mM 程度の塩濃度でも容易に他の蛋白や核酸等を巻き込んだ凝集塊を形成するため、塩を含まない 1mM Tris-0.1 mM EDTA 緩衝液を用い、回収率は低いものの精製度の高い Joklik のウイルス精製法に準拠して、ウイルスを調整した。弱毒 mO 株についてはウイルス増殖が LO 株より低いため収量が低かったものの、最低限の精製 DNA 及び粗 DNA を、LO 株

DNA と共に提供した。一方、当初の計画で予定していた m8 株塩基配列の開示が得られなかったため、m8 株についても mO 株の2倍のスケールでウイルスを培養・精製し、DNA 抽出を実施している。

ワクシニアウイルスは2重鎖 DNA ゲノムを持つ極めて安定なウイルスである。しかし、ゲノムサイズは約 200 kbp と動物ウイルスでは最大であるため、複製過程での変異は少ない頻度ながら宿命である。従って、原株に近い状態でゲノム DNA を安定にプラスミドに保存する事は重要と考えられる。そこで、調整したウイルス DNA を Hind III で切断して pUC18 或いは pBR322 由来プラスミドの Hind III サイトにサブクローニングした。現在、LO 株で7クローン、mO 株で11クローンを回収している。pBR 系のプラスミドで大サイズフラグメントの回収効率が高い事は無かったため、今後は pUC で残りのゲノム部位を回収する予定である。

我国の m8 ワクチン株は B5R エンベロープ遺伝子に欠失を生じていることが明らかにされている。B5R は弱毒性に関与しているものの、中和抗体誘導抗原の1つでもある。痘瘡ウイルスに対する感染防御は非特異免疫、細胞性免疫、液性抗体免疫等種々の生体防御機構が関与し、中和抗原も B5R のみでなく複数存在する。しかし、B5R 欠失の影響を判定するため、m8 株のワクチン効果を検討する事は肝要である。そこで、B5R の免疫能を報告した文献に準じて、BALB/c マウスの経鼻から最も致死性の高い WR 株の感染防御実験を実施している。既に、 $10^5$  と  $10^7$  PFU の LO、mO、m8 各株を皮下免疫し、今後、抗体価の測定と感染による生存率を調査する予定である。

### D. 研究発表

該当なし。

分担研究報告書

ウイルス遺伝子配列の決定に関する研究

分担研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所 部長

研究要旨 我が国で天然痘ワクチンとして製造・備蓄しているVaccinia virus LC16m8株の有効性等を確認するための基礎的情報として、同株のクローニング過程における原株に当たるLister株と中間株のLC16m0株のゲノムの塩基配列を決定することが本研究の目的である。国立感染症研究所・感染病理部の小島朝人先生より、Lister株及びLCm0株について、それぞれ部分精製ビリオン及び精製したビリオン由来のDNAの提供を受けた。精製されたDNAをtemplateにしたホールゲノムショットガン法を実施し、さらにgapを埋めるcontigの方向や順番を決めるために部分精製DNAをtemplateにしたprimer walkingを行った。いずれの株についても内側のユニーク配列部分約170kbについては一本のコンセンサス配列が得られた。

A. 研究の目的

本班研究の目的は、我が国で天然痘ワクチンとして製造・備蓄しているVaccinia virus LC16m8株の有効性等を確認する事にある。当分担研究では、LC16m8株解析の基礎的情報として、同株のクローニング過程における原株に当たるLister株と中間株のLC16m0株のゲノムの塩基配列を決定することを目的とする。

B. 研究の方法

国立感染症研究所・感染病理部の小島朝人博士より、Lister株について36%(w/v)のsucrose cushionによる部分精製ビリオンと、引き続き20-40%(w/v)のsucrose gradientにより精製したビリオン由来のDNAをそれぞれ約20 $\mu$ g、LC16m0株については部分精製ビリオン及び精製ビリオン由来のDNAとしてそれぞれ約30 $\mu$ g、10 $\mu$ gの提供を受けた。Referenceとなりうる公開されている配列としては、長さや配列データ

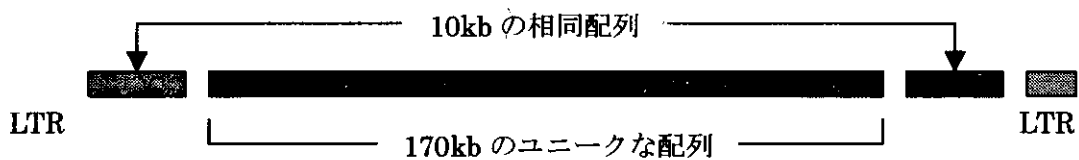
の信頼性の点から、Copenhagen株が良いと考えられた。Copenhagen株と、今回解析するLister株、LC16m0株とのhomologyは99.9%以上と予測されたが、大きな差異がある場合でも対応ができるよう、精製されたDNAをtemplateにしたホールゲノムショットガン法を用いた。さらにgapを埋めるcontigの方向や順番を決めるためにprimer walkingを行い、そのtemplateには部分精製DNAを用いた。

（倫理面への配慮）本研究においてはヒト由来試料を用いないので、倫理面の問題は生じない。

C. 研究結果

①二株の一次シーケンシングが終了し、配列のアセンブルおよびエディット作業によって、図1に表された内側170kbの配列はそれぞれ一本のコンセンサス配列に繋げることができた。②両端各4kbのLTR配列の内側にそれぞれ10kbずつの相同な配列

## LC16m0 株



## Lister 株

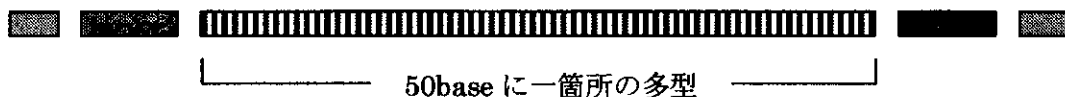


図1. LC16m0 株と Lister 株の構造

が存在することがわかった。この10kbの相同配列の塩基配列は決定したが、それぞれゲノムのどちらの端に位置するのかを確定するために、内側のユニークな配列を含むクローンを作成し、サザンハイブリダイゼーション法を用いて位置特定を行っている。③LC16m0株はhomogeneityが高く、特に問題もなく単一の塩基配列へのassembly作業が進められたが、Lister株はheterogeneousなDNAの集合であることがわかったため、結局はLC16m0株を先に配列決定し、Lister株についてはLC16m0株との相同性を利用して塩基配列データのスクリーニングを行った。この結果、LC16m0株に最も近いであろうと思われるコンセンサス配列を再現することができたが、約50baseに一箇所の頻度で特定の塩基を決定できない、多型（真核生物におけるSNPs, insertion, deletionと似たような塩基配列パターン）を示す部位を含んでいる。これはもともとのウィルスゲノムが複数のウィルスの混合物である事を示している。

なお、確定した塩基配列は別途、電子媒体で主任研究者に送付する。

## D. 考察

LC16m0株の内側170kbについては、10kbの領域が増幅できるプライマーを複数箇所で設計し、増幅されたDNAのサイズを測定することにより、コンセンサス配列に間違いがないか、現在確認を進めている。

しかし、両端各4kbのLTR配列については、当初から塩基配列を完全に確定することは極めて困難であると考えられ、その取扱を今後検討する必要がある。

LC16m0株のシーケンシングにおいては、ショットガン法によるシーケンス用のサブクロンの作成に精製DNAを用い、それ以外のプライマー・ウォーキングには全て小島博士による部分精製DNAを用いた。PCRプライマーのテストやコンセンサス配列の確認その他においては部分精製DNAで十分解析可能であると思われる。今後、LC16m8株のシーケンシングを行う際には、LC16m0株の配列がテンプレートとして使用できると予想されるため、部分精製DNAとプライマー・ウォーキングの組み合わせで解決できるものと考えられる。

## E. 結論

Vaccinia virus Lister株とLC16m0株のゲノムについて、約90%以上のゲノムを一つながりのcontigとしてその塩基配列を決定した。これに加えて両端のLTRの内側10kbずつの相同配列については、その配置を決定中である。現在、全体の塩基配列の確認作業を進めている。しかし、両端各4kbずつのLTRについては、高度な反復配列を含んでおり、その完全解読は極めて困難であると考えられた。なお、LC16m0株は単一のクローンと考えられたが、Lister株は複数のウィルスの混合株であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

該当するもの無し。

## G. 研究 (論文) 発表

Yamamoto H, Ochiya T, Takeshita F, Toriyama-Baba H, Hirai K, Sasaki H, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saito I and Terada M. Enhanced Skin Carcinogenesis in Cyclin D1 Conditional Transgenic Mice: Cyclin D1 Altered Keratinocyte Response to Calcium-induced Terminal Differentiation. *Cancer Res*, 2002, 62(6):1641-7.

Nezu M, Nishigaki M, Ishizuka T, Kuwahara Y, Tanabe C, Aoyagi K, Sakamoto H, Saito Y, Yoshida T, Sasaki H and Terada M. Identification of the CAB2/hCOS16 gene required for the repair of DNA double-strand breaks on a core amplified region of the 17q12 locus in breast and gastric cancer. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93:1183-6.

Ishizuka T, Tanabe C, Sakamoto H, Aoyagi K, Maekawa M, Matsukura N, Tokunaga A, Tajiri T, Yoshida T, Terada M and Sasaki H. Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296:152-5.

Shirakawa K, Furuhashi S, Watanabe I, Hayase H, Shimizu A, Ikarashi Y, Yoshida T, Terada M, Hashimoto D and Wakasugi H. Induction of vasculogenesis in breast cancer models. *British J Cancer*, 2002, 87:1454-1461.

Suzuki K, Aoki K, Ohnami S, Yoshida K, Kazui T, Kato N, Inoue K, Kohara M, Yoshida T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon  $\alpha$  improves dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther*, 2003, in press.

Furuhashi S, Ide H, Miura Y, Yoshida T, Aoki K. Development of prostate specific promoter for gene therapy against androgen-independent prostate cancer. *Mol Ther*, 2003, in press.

Jinno H, Saeki M, Hanioka N, Tanaka-Kagawa T, Saito Y, Ozawa S, Ando M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N and Sawada J. Functional characterization of wild-type and variant (T202I and M59I) human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A10. *Drug Metabolism and Disposition*, 2003, in press.

Yoshida T and Yoshimura K. Outline of disease gene hunting approaches in the Millennium Genome Project of Japan. *Proc Japan Acad*, 2003, 79, Ser. B, in press.

Kazuhiko Aoyagi, Takeshi Tatsuta, Michiko Nishigaki, Shingo Akimoto, Chikako Tanabe, Yoko Omoto, Shin-ichi Hayashi, Hiromi Sakamoto, Michie Sakamoto, Teruhiko Yoshida, Masaaki Terada and Hiroki Sasaki. A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300:915-920.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当するもの無し。

6. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamamoto H, Ochiya T, Takeshita F, Toriyama-Baba H, Hirai K, Sasaki H, Sasaki H, Sakamoto H, <u>Yoshida T</u> , Saito I and Terada M	Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation.	Cancer Res	62	1641-1647	2002
M. Nezu, M. Nishigaki, T. Ishizuka, Y. Kuwahara, C. Tanabe, K. Aoyagi, H. Sakamoto, Y. Saito, <u>T. Yoshida</u> , H. Sasaki and M. Terada.	Identification of the CAB2/hCOS16 Gene Required for the Repair of DNA Double-strand Breaks on a Core Amplified Region of the 17q12 locus in Breast and Gastric Cancer	Jpn J Cancer Res	93	1183-1186	2002
T. Ishizuka, C. Tanabe, H. Sakamoto, K. Aoyagi, M. Maekawa, N. Matsukura, A. Tokunaga, T. Tajiri, <u>T. Yoshida</u> , M. Terada and H. Sasaki.	Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH.	Biochem. Biophys. Res. Commun	296	152-155	2002
K. Shirakawa, S. Furuhashi, I. Watanabe, H. Hayase, A. Shimizu, Y. Ikarashi, <u>T. Yoshida</u> , M. Terada, D. Hashimoto and H. Wakasugi.	Induction of vasculogenesis in breast cancer models.	British J Cancer	87	1454-1461	2002
K. Aoyagi, T. Tatsuta, M. Nishigaki, S. Akimoto, C. Tanabe, Y. Omoto, S. Hayashi, H. Sakamoto, M. Sakamoto, <u>T. Yoshida</u> , M. Terada and H. Sasaki.	A faithful method for PCR-mediated global mRNA amplification and its integration into microarray analysis on laser-captured cells	Biochem. Biophys. Res. Commun	300	915-920	2003
K. Suzuki, K. Aoki, S. Ohnami, N. Kato, Tanaka, M. Kohara, <u>T. Yoshida</u> .	Adenovirus-mediated gene transfer of interferon $\alpha$ inhibits the hepatitis C virus replication and improves experimental liver cirrhosis.	Gene Therapy			in press
S. Furuhashi, H. Ide, Y. Miura, <u>T. Yoshida</u> , K. Aoki.	Development of prostate specific promoter for gene therapy against androgen-independent prostate cancer.	Molecular Therapy			in press
H. Jinno, M. Saeki, N. Hanioka, T. Tanaka-Kagawa, Y. Saito, S. Ozawa, M. Ando, K. Shirao, H. Minami, A. Ohtsu, <u>T. Yoshida</u> , N. Saijo and J. Sawada.	Functional characterization of wild-type and variant (T202I and M59I) human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A10.	Drug Metabolism and Disposition			in press
<u>T. Yoshida</u> and K. Yoshimura	Outline of disease gene hunting approaches in the Millennium Genome Project of Japan.	Proc Japan Acad			in press

厚生労働科学特別研究事業（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告書

細胞培養痘そうワクチンの B5R 欠損と有効性に関する研究

分担研究者：森川 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部第一室長）

協力研究者：前田秋彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部）

倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：天然痘（痘そう）は、バイオテロに用いられた場合の危険度等から米国で category A に分類される。このため、日本でも痘そうワクチンの製造が平成 13 年に再開された。このワクチンに使用される LC16m8 株は、副反応の極めて低いワクチン株であるが、B5R 遺伝子に G の欠失があるため欠失型の B5R 蛋白がコードされる。細胞外エンベロープウイルス(EEV)表面蛋白の他の 5 種類に関しては、問題となるような欠失変異はなかった。B5R に関しては、組換え蛋白を免疫したところ、免疫原性が弱いことが明らかとなった。また、通常の種痘者には B5R 抗体は検出できなかった。ワクチニアウイルス高度免疫ウサギ血清では B5R 抗体が検出されたが、抗体価は低かった。

A. 研究目的

痘そう（天然痘）は、バイオテロ対策の中で最優先と考えられる感染症のひとつである。痘そうによるバイオテロ対策の一環として、平成 13 年度には乾燥細胞培養痘そうワクチン 250 万ドーズが作製されている。本ワクチンはワクチニアウイルスの LC16m8 株を用いており、最も副反応が弱い痘そうワクチンと考えられている。

一方、近年のワクチニアウイルス遺伝子機能の解析から、細胞外エンベロープウイルス(EEV)表面蛋白として同定されている

6 種類のウイルス蛋白のうち、B5R、A33R 蛋白に対する抗体がウイルス中和能を有することが明らかになってきた。LC16m8 株は、このうち B5R 遺伝子の 274 番目の G 残基が欠失しているために、欠失型の B5R 蛋白が産生されることが予想される。従って、LC16m8 株による痘そうウイルスに対する防御免疫誘導を理解するためには、B5R 蛋白に関する解析が必要である。本研究では、LC16m8 株の欠失型 B5R 蛋白を発現して、その免疫原性に関して明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株、IHD-J 株の EEV 関連蛋白の遺伝子 A33R, A34R, A36R, A56R, B5R, F13L の遺伝子配列を決定し、Copenhagen 株、WR 株、MVA 株および他のオルソポックスウイルスの配列と比較した。

## C. 研究結果

### EEV 関連 6 蛋白の遺伝子配列：

- 1) A33R 遺伝子：LC16m0 と LC16m8 株では、親株の Lister 株の 165 番目のアミノ酸 Asn が Asp へ変異していた（図 1）。
- 2) A34R 遺伝子：Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株の A34R 蛋白のアミノ酸配列は同一であった。いずれも、EEV 高産生型の IHD-J 株に見られる 151 番目の Lys から Glu への変異は見られなかった（図 2）。
- 3) A36R 遺伝子：LC16m0 と LC16m8 は、104 番目のアミノ酸が Lister 株の Met から Ile へ変異しているが、いずれも疎水性アミノ酸で、また痘そうウイルスなどでも、この部位のアミノ酸は Ile であることから、蛋白の機能に変化があるとは考えにくい（図 3）。
- 4) A56R 遺伝子：A56R 遺伝子は、HA 蛋白をコードしている。LC16m0, LC16m8 株の配列は一致するが、Copenhagen 株と比べると、5 アミノ酸の欠失が認められる。一方、Lister 株は、Copenhagen 株型のものと同様に欠失型のもので混在していた。
- 5) B5R 遺伝子：LC16m8 株では既に報告されている通り、B5R 遺伝子の 274 塩基の G

の欠失が見られ、このため 317 アミノ酸から成る蛋白が 92 アミノ酸に大きく欠失することが確認された。ワクチニアウイルス株によりアミノ酸配列に 1- 数アミノ酸の相違が認められるが他の株では欠失はなく全て 317 アミノ酸からなる蛋白をコードしていた（図 4）。

6) F13L 遺伝子：アミノ酸 6 番目と 291 番目がワクチニアウイルス株により配列が異なるが、全てに欠失は見られなかった。

### B5R 蛋白の発現：

- 1) B5R 遺伝子のシグナルペプチドを除いた ectodomain 領域 (B5R-ect) の 5'-側にメリチン蛋白のシグナルペプチドと His タグを付加したキメラ遺伝子を作製し、組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞 Tn5 に組換えバキュロウイルスを感染させると、Lister 株、LC16m8 株の B5R-ect は 35kDa、LC16m8 株の欠失型 B5R 蛋白は 14kDa の蛋白として検出できた。これらを Ni カラムで精製してウサギを免疫した。
- 2) B5R 遺伝子全長を pKS336 ベクターに挿入し、HeLa 細胞に導入し stable line を作製した。これを抗原としてワクチニア高度免疫ウサギ血清で免疫蛍光抗体法を行ったところ、細胞質に顆粒状に B5R 抗原が検出された。

### B5R-ect 免疫ウサギ血清

Lister 株、LC16m0 株、LC16m8 株の B5R-ect をウサギに免疫した。2 回免疫後 1 週目では抗体が検出できなかった。4 回免



疫後1週目でB5R抗体が検出できた。しかし、いずれの免疫血清もIHD-J株によるcomet抑制効果は見られなかった。

#### D. 考察

天然痘が根絶されて20年以上経過するため、痘そうワクチンは昭和55年度を最後に製造されていなかった。このため、痘そうワクチンに関する研究も行われていない。しかし、バイオテロの脅威が現実のものとなったことを受けて、平成13年度に細胞培養痘そうワクチンが製造再開された。このワクチンに使用されるLC16m8株は、橋爪らがLister株を親株として弱毒化に成功したものであり、当時の臨床試験、動物実験から副反応の極めて低いことが確認されている。しかし、このワクチンの承認時には、痘そうの根絶事業が進んでいたために痘そう流行地で使用されることがない。一方、ワクチニアウイルスの研究がこの間進展し、LC16m8株に欠失変異の見られるB5R蛋白がEEV中和抗原になりうる事が明らかとなった。本研究では、これ以外のEEV関連蛋白の遺伝子配列をいくつかのワクチニアウイルス株で決定し比較したが、LC16m8株には、欠失変異はB5R以外にはなかった。B5R遺伝子を発現、精製しウサギを免疫した。現在まで3か月間に4回免疫して初めて抗体が上昇した。現時点の免疫血清では、Lister株、LC16m0株、LC16m8株いずれのB5R-ect免疫ウサギ血清にもIHD-J株によるcomet形成抑制効果は検出できていない。一方、ワクチニアウ

イルス高度免疫ウサギ血清（細胞内感染性ウイルス(IMV)中和力価4,000IU、ワクチニアウイルスに対するELISA抗体20万倍以上)のB5Rに対する抗体価は、蛍光抗体法で640倍、B5R-ELISAで800倍と極めて低かった。種痘歴のあるヒト血清5検体中のワクチニアウイルスに対するELISA抗体は800から12,800倍で、B5R抗体は検出限界以下であった。これらを総合すると、B5Rの免疫原性は極めて低く、高度免疫血清で初めて抗体が上昇すると思われる。ウサギに関しては、今後さらに追加免疫を行いcomet抑制効果が見られるのに必要な条件を明らかにする必要がある。最近、DNAワクチンによりA27L、A33R、L1R、B5Rの4遺伝子を免疫すると強い免疫防御能が得られることが明らかにされた(Virology, 2003; 306: 181-95)。B5RがEEV中和能を有することは明らかだが、十分な免疫には通常の種痘ではなく、DNAワクチン等による追加免疫が必要かもしれない。

#### E. 結論

痘そうウイルスによるバイオテロ等に対応すべく細胞培養痘そうワクチンの製造が再開されたが、このワクチンに使用されるLC16m8株のEEV関連遺伝子の配列を他のワクチニアウイルス株と比較したところ、B5Rの欠失変異以外には問題となるような変異は見られなかった。B5R蛋白を発現し、ウサギを免疫したが、B5Rの免疫原性は弱かった。高度免疫によりLC16m8株の欠失B5R、Lister、LC16m0株のB5Rいずれを免

疫しても抗体が得られたが、現在のところ comet 抑制抗体は検出できていない。EEV に対する免疫には DNA ワクチンなどによる追加免疫が必要かもしれないと思われる。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Sakai, K., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. (2002): Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G Antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 372 – 375
2. Saijo M, Suzutani T, Niikura M, Morikawa S, Kurane I.(2002): Importance of C-terminus of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for maintaining thymidine kinase and acyclovir-phosphorylation activities. *J. Med. Virol.*, 6(3): 388-93.
3. Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. (2002): Recombinant Nucleoprotein based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for detection of Immunoglobulin G to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 1587-1591
4. Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.(2002): Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV(r)) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACV(r) virus. *J Med Virol.* 68: 99-104.
5. Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Li, T-C., Takeda, N., and Yasutomi, Y. (2002): Chimeric recombinant Hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology*, 293, 273-280
6. Morikawa, S., Qing, T., Xinqin, Z., Saijo, M., and Kurane, I. (2002): Genetic Diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. *Virology*, 296: 159-164
7. Ikegami, T., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Manalo, D.L., Miranda, N.J., Niikura, M., Saijo, M., Une, Y., Nomura, Y., Kurane, I., Ksiazek, T.G., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2002): Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in cynomolgus macaques during the Philippine outbreak in 1996. *Exp. Anim.*, 51: 447-55.
8. Saijo M, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Morikawa S, Kurane I.(2002): Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain. *Antiviral Res.* 56: 253-62.
9. 森川 茂 (2002) :天然痘 化学療法の領域 ( Antibiotics & chemotherapy) 18 (3):343 – 346
10. Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and

Morikawa, S. (2002): Development of an immunofluorescence Method for the Detection of Antibodies to Ebola Virus Subtype Reston by Use of Recombinant Nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiol. Immunol.*, 46: 633-638.

11. Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. (2003): Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jan;10(1):83-7.

12. Tang, Q., Saijo, M., Han, L., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Xinjung, W., Kurane, I., and Morikawa, S. (2003) Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *J. Virol. Metho.*, 108: 111-116.

13. Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S. (2003): Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiology and Infection*, in press.

14. Maeda, A., Lee, B-H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, Arikawa, J. and Morikawa, S. (2003): The Intracellular Association of the Nucleocapsid Protein (NP) of HantaanVirus (HTNV) with Small Ubiquitin-Like Modifier-1 (SUMO-1) Conjugating Enzyme 9 (Ubc9). *Virology*, 305: 288-297.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得：

1) 特願 2001-111478 (平成 13 年 4 月 10 日出願)：エボラウイルスを認識するモノクローナル抗体

2) 特願 2001-314854 (平成 13 年 10 月 12 日出願)：クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを認識するモノクローナル抗体

3) 出願委託中：レストンエボラウイルスを認識するモノクローナル抗体

図 1. A33R のアミノ酸配列の比較

		10	20	30	40	50	
A33R.ami	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
WR-A33R.ami	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
MVA-A33R.ami	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
IHD-A33R.ami	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
Lister-A33R.	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
LC16m8-A33R.	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
Cowpox-A33R.	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
Variola-A33R	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
MKZaire-A33R	1	MMTPENDEEQ	TSVFSATVYG	DKIQGKNKRK	RVIGLCIRIS	MVISLLSMIT	50
		60	70	80	90	100	
A33R.ami	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
WR-A33R.ami	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
MVA-A33R.ami	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
IHD-A33R.ami	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
Lister-A33R.	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
LC16m8-A33R.	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
Cowpox-A33R.	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
Variola-A33R	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
MKZaire-A33R	51	MSAFLIVRLN	QCMSANEAAI	TDAAVAVAAA	SS-THRKVA	SSTQYDHKE	100
		110	120	130	140	150	
A33R.ami	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYQL	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
WR-A33R.ami	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYQL	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
MVA-A33R.ami	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYQL	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
IHD-A33R.ami	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYQL	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
Lister-A33R.	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYQL	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
LC16m8-A33R.	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYQL	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
Cowpox-A33R.	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYKS	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
Variola-A33R	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYQL	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
MKZaire-A33R	101	SCNGLYYQGS	CYILHSDYKS	FSDAKANCTA	ESSTLPNKSD	VLTTLWIDYV	150
		160	170	180	190	200	
A33R.ami	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200
WR-A33R.ami	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200
MVA-A33R.ami	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200
IHD-A33R.ami	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200
Lister-A33R.	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200
LC16m8-A33R.	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200
Cowpox-A33R.	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200
Variola-A33R	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200
MKZaire-A33R	151	EDTWGSDGNP	ITKTTSDYQD	SDVSQEVRY	FCVKTMN...	.....	200