

図2. A34R のアミノ酸配列の比較

		10	20	30	40	50	
A34R.ami	1	MKSLNRQTVS	MFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50
WR-A34R.ami	1	MKSLNRQTVS	RFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50
MVA-A34R.ami	1	MKSLNRQTVS	RFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50
IHD-A34R.ami	1	MKSLNRQTVS	RFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50
Lister-A34R.	1	MKSLNRQTVS	RFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50
LC16m8-A34R.	1	MKSLNRQTVS	RFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50
Cowpox-A34R.	1	MKSLNRQTVS	RFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50
Variola-A34R	1	MKSLNRQTVS	RFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50
MKZaire-A34R	1	MKSLNRQTVS	RFKKLSVPAA	IMMILSTIIS	GIGTFLHYKE	ELMPSACANG	50

		60	70	80	90	100	
A34R.ami	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100
WR-A34R.ami	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100
MVA-A34R.ami	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100
IHD-A34R.ami	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100
Lister-A34R.	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100
LC16m8-A34R.	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100
Cowpox-A34R.	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100
Variola-A34R	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100
MKZaire-A34R	51	WIQYDKHCYL	DTNIK MSTN	AVYQCRK LRA	RLPRPDTRHL	RVLF SIF YKD	100

		110	120	130	140	150	
A34R.ami	101	YWVSLKKTNN	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150
WR-A34R.ami	101	YWVSLKKTND	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150
MVA-A34R.ami	101	YWVSLKKTND	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150
IHD-A34R.ami	101	YWVSLKKTNN	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150
Lister-A34R.	101	YWVSLKKTNN	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150
LC16m8-A34R.	101	YWVSLKKTNN	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150
Cowpox-A34R.	101	YWVSLKKTND	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150
Variola-A34R	101	YWVSLKKTNN	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150
MKZaire-A34R	101	YWVSLKKTND	KWLDINNDKD	IDISKLTNFK	QLNSTTDAEA	CYIYKSGKLV	150

		160	170	180	190	200	
A34R.ami	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200
WR-A34R.ami	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200
MVA-A34R.ami	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200
IHD-A34R.ami	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200
Lister-A34R.	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200
LC16m8-A34R.	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200
Cowpox-A34R.	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200
Variola-A34R	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200
MKZaire-A34R	151	KTVCKSTQSV	LCVKKFFYK	200

図3. A36Rのアミノ酸配列の比較

		10	20	30	40	50	
A36R.ami	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50
WR-A36R.ami	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50
MVA-A36R.ami	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50
IHD-J-A36R.a	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50
Lister-A36R.	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50
LC16m8-A36R.	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50
Cowpox-A36R.	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50
Variola-A36R	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50
MKZaire-A36R	1	M	LVPLITVTVV	AGTILVCYIL	YICRKKIRTV	YNDNKIIMTK	50

		60	70	80	90	100	
A36R.ami	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100
WR-A36R.ami	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100
MVA-A36R.ami	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100
IHD-J-A36R.a	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100
Lister-A36R.	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100
LC16m8-A36R.	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100
Cowpox-A36R.	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100
Variola-A36R	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100
MKZaire-A36R	51	LKKIKSSNSS	KSSKSTDSES	DWEDHCSAME	QNNDVDNISR	NEILDDDSFA	100

		110	120	130	140	150	
A36R.ami	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVVINET	150
WR-A36R.ami	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVVINET	150
MVA-A36R.ami	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVV----	150
IHD-J-A36R.a	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVVINET	150
Lister-A36R.	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVVINET	150
LC16m8-A36R.	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVVINET	150
Cowpox-A36R.	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVVINET	150
Variola-A36R	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVVINET	150
MKZaire-A36R	101	GSLIWDNESN	VMAPSTEHY	DSVAGSTLLI	NDRNEQTIY	QNTTVVINET	150

		160	170	180	190	200	
A36R.ami	151	ETVEVLNEDT	KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200
WR-A36R.ami	151	ETVEVLNEDT	KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200
MVA-A36R.ami	151	-----L	NEDT KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200
IHD-J-A36R.a	151	ETVEVLNEDT	KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200
Lister-A36R.	151	ETVEVLNEDT	KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200
LC16m8-A36R.	151	ETVEVLNEDT	KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200
Cowpox-A36R.	151	ETVEVLNEDT	KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200
Variola-A36R	151	ETVEVLNEDT	KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200
MKZaire-A36R	151	ETVEVLNEDT	KQNPYSSNP	FVNYNKTSIC	SKSNPFITEL	NNKFSENNPF	200

		210	220	230	240	250	
A36R.ami	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250
WR-A36R.ami	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250
MVA-A36R.ami	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250
IHD-J-A36R.a	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250
Lister-A36R.	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250
LC16m8-A36R.	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250
Cowpox-A36R.	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250
Variola-A36R	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250
MKZaire-A36R	201	RRAHSDDYLN	KQEQDHEHDD	---I	ESSVV SLV	250

図 4. B5R のアミノ酸配列の比較

B5R.am1	1	MKTISVV	TLL	CVLPAVV	YST	CTVPTM	NNAK	LTSTETS	FENV	N	KQKVT	FTCDQ	50
WR-B5R.am1	1	MKTISVV	TLL	CVLPAVV	YST	CTVPTM	NNAK	LTSTETS	FEND	K	QKVT	FTCDQ	50
MVA-B5R.am1	1	MKTISVV	TLL	CVLPAVV	YST	CTVPTM	NNAK	LTSTETS	FENV	N	KQKVT	FTCDQ	50
Listr-B5R.am	1	MKTISVV	TLL	CVLPAVV	YST	CTVPTM	NNAK	LTSTETS	FEND	K	QKVT	FTCDQ	50
LC16m8-B5R.N	1	MKTISVV	TLL	CVLPAVV	YST	CTVPTM	NNAK	LTSTETS	FEND	K	QKVT	FTCDQ	50
LC16m8-B5R.C	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	50	
IHD-J-B5R.am	1	MKTISVV	TLL	CVLPAVV	YST	CTVPTM	NNAK	LTSTETS	FEND	K	QKVT	FTCDQ	50
Cowpox-B5R.a	1	MKTISVV	TLL	CVLPAVV	YST	CTVPTM	NNAK	LTSTETS	FEND	K	QKVT	FTCD	50
Variola-B5R.	1	MKTISVV	TLL	CVLPAVV	YST	CTVPTM	NNAK	LTSTETS	FEND	K	QKVT	FTCD	50
B5R.am1	51	GYHSS	DPNAV	CETDKW	KYEN	PCKKM	CTVSD	YVSELY	NKPL	YEVN	STMTLS	100	
WR-B5R.am1	51	GYHSS	DPNAV	CETDKW	KYEN	PCKKM	CTVSD	YVSELY	NKPL	YEVN	STMTLS	100	
MVA-B5R.am1	51	GYHSS	DPNAV	CETDKW	KYEN	PCKKM	CTVSD	YVSELY	NKPL	YEVN	STMTLS	100	
Listr-B5R.am	51	GYHSS	DPNAV	CETDKW	KYEN	PCKKM	CTVSD	YVSELY	NKPL	YEVN	STMTLS	100	
LC16m8-B5R.N	51	GYHSL	DPNAV	CETDKW	KYEN	PCKKM	CTVSD	YVSELY	NKPL	YK	-----	100	
LC16m8-B5R.C	51	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100	
IHD-J-B5R.am	51	GYHSL	DPNAV	CETDKW	KYEN	PCKKM	CTVSD	YVSELY	NKPL	YEVN	STMTLS	100	
Cowpox-B5R.a	51	GYHSL	DPNAV	CETDKW	KYEN	PCKKM	CTVSD	YVSELY	NKPL	YEVN	STMT	100	
Variola-B5R.	51	GYHSL	DPNAV	CETDKW	KYEN	PCKKM	CTVSD	YVSELY	NKPL	YEVN	STMT	100	
B5R.am1	101	CNGETK	YFRC	EEKNG	NTSWN	DTVTC	PNAC	QPLQL	EHGSC	QPVKE	KYSFG	150	
WR-B5R.am1	101	CNGETK	YFRC	EEKNG	NTSWN	DTVTC	PNAC	QPLQL	EHGSC	QPVKE	KYSFG	150	
MVA-B5R.am1	101	CNGETK	YFRC	EEKNG	NTSWN	DTVTC	PNAC	QPLQL	EHGSC	QPVKE	KYSFG	150	
Listr-B5R.am	101	CNGETK	YFRC	EEKNG	NTSWN	DTVTC	PNAC	QPLQL	EHGSC	QPVKE	KYSFG	150	
LC16m8-B5R.N	101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	150	
LC16m8-B5R.C	101	CNGETK	YFRC	EEKNG	NTSWN	DTVTC	PNAC	QPLQL	EHGSC	QPVKE	KYSFG	150	
IHD-J-B5R.am	101	CNGETK	YFRC	EEKNG	NTSWN	DTVTC	PNAC	QPLQL	EHGSC	QPVKE	KYSFG	150	
Cowpox-B5R.a	101	CKDET	KYFRC	EEKNG	NTSWN	DTVTC	PNAC	QPLQL	EHGSC	QPVKE	KYSFG	150	
Variola-B5R.	101	CKDET	KYFRC	EEKNG	NTSWN	DTVTC	PNAC	QPLQL	EHGSC	QPVKE	KYSFG	150	
B5R.am1	151	EYMTIN	CDVG	YEVIG	ASYIS	CTANS	WNVIP	SCQOK	CDIPS	LSNGL	ISGST	200	
WR-B5R.am1	151	EYMTIN	CDVG	YEVIG	ASYIS	CTANS	WNVIP	SCQOK	CDIPS	LSNGL	ISGST	200	
MVA-B5R.am1	151	EYMTIN	CDVG	YEVIG	ASYIS	CTANS	WNVIP	SCQOK	CDIPS	LSNGL	ISGST	200	
Listr-B5R.am	151	EYMTIN	CDVG	YEVIG	ASYIS	CTANS	WNVIP	SCQOK	CDIPS	LSNGL	ISGST	200	
LC16m8-B5R.N	151	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	200	
LC16m8-B5R.C	151	EYMTIN	CDVG	YEVIG	ASYIS	CTANS	WNVIP	SCQOK	CDIPS	LSNGL	ISGST	200	
IHD-J-B5R.am	151	EYMTIN	CDVG	YEVIG	ASYIS	CTANS	WNVIP	SCQOK	CDIPS	LSNGL	ISGST	200	
Cowpox-B5R.a	151	PHITIN	CDVG	YEVIG	ASYIS	CTANS	WNVIP	SCQOK	CDIPS	LSNGL	ISGST	200	
Variola-B5R.	151	PHITIN	CDVG	YEVIG	ASYIS	CTANS	WNVIP	SCQOK	CDIPS	LSNGL	ISGST	200	
B5R.am1	201	FSIGGV	IHLS	CKSGE	FILTGS	PSSTC	IDGKW	NPILP	TCVRS	NEEF	DPVDDG	250	
WR-B5R.am1	201	FSIGGV	IHLS	CKSGE	FILTGS	PSSTC	IDGKW	NPILP	TCVRS	NEEF	DPVDDG	250	
MVA-B5R.am1	201	FSIGGV	IHLS	CKSGE	FILTGS	PSSTC	IDGKW	NPILP	TCVRS	NEEF	DPVDDG	250	
Listr-B5R.am	201	FSIGGV	IHLS	CKSGE	FILTGS	PSSTC	IDGKW	NPILP	TCVRS	NEEF	DPVDDG	250	
LC16m8-B5R.N	201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	250	
LC16m8-B5R.C	201	FSIGGV	IHLS	CKSGE	FILTGS	PSSTC	IDGKW	NPILP	TCVRS	NEEF	DPVDDG	250	
IHD-J-B5R.am	201	FSIGGV	IHLS	CKSGE	FILTGS	PSSTC	IDGKW	NPILP	TCVRS	NEEF	DPVDDG	250	
Cowpox-B5R.a	201	FSIGGV	IHLS	CKSGE	FILTGS	PSSTC	IDGKW	NPILP	TCVRS	NEEF	DPVDDG	250	
Variola-B5R.	201	FSIGGV	IHLS	CKSGE	FILTGS	PSSTC	IDGKW	NPILP	TCVRS	NEEF	DPVDDG	250	
B5R.am1	251	PDETD	LSKL	SKDVV	QYEQE	IESLE	ATYHI	IIVAL	TIMGV	IFLIS	SVIVLV	300	
WR-B5R.am1	251	PDETD	LSKL	SKDVV	QYEQE	IESLE	ATYHI	IIVAL	TIMGV	IFLIS	SVIVLV	300	
MVA-B5R.am1	251	PDETD	LSKL	SKDVV	QYEQE	IESLE	ATYHI	IIVAL	TIMGV	IFLIS	SVIVLV	300	
Listr-B5R.am	251	PDETD	LSKL	SKDVV	QYEQE	IESLE	ATYHI	IIVAL	TIMGV	IFLIS	SVIVLV	300	
LC16m8-B5R.N	251	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	300	
LC16m8-B5R.C	251	PDETD	LSKL	SKDVV	QYEQE	IESLE	ATYHI	IIVAL	TIMGV	IFLIS	SVIVLV	300	
IHD-J-B5R.am	251	PDETD	LSKL	SKDVV	QYEQE	IESLE	ATYHI	IIVAL	TIMGV	IFLIS	SVIVLV	300	
Cowpox-B5R.a	251	PDETD	LSKL	SKDVV	QYEQE	IESLE	ATYHI	IIVAL	TIMGV	IFLIS	SVIVLV	300	
Variola-B5R.	251	PDETD	LSKL	SKDVV	QYEQE	IESLE	ATYHI	IIVAL	TIMGV	IFLIS	SVIVLV	300	
B5R.am1	301	CSCDK	NNDOY	KFHKL	LLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	
WR-B5R.am1	301	CSCDK	NNDOY	KFHKL	LLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	
MVA-B5R.am1	301	CSCDK	NNDOY	KFHKL	LLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	
Listr-B5R.am	301	CSCDK	NNDOY	KFHKL	LLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	
LC16m8-B5R.N	301	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	
LC16m8-B5R.C	301	CSCDK	NNDOY	KFHKL	LLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	
IHD-J-B5R.am	301	CSCDK	NNDOY	KFHKL	LLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	
Cowpox-B5R.a	301	CSCDK	NNDOY	KFHKL	LLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	
Variola-B5R.	301	CSCDK	NNDOY	KFHKL	LLE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	350	

分担研究報告書

細胞培養痘そうワクチンの有効性等に関する研究

分担研究者：長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理部主任研究官

研究要旨 我が国の痘そうワクチンのワクチン株である LC16m8 はその細胞外エンベロープウイルス(EEV)表面蛋白のうち B5R 遺伝子に変異がある為に欠失型の B5R が産生される事が予想される。B5R 蛋白に対する抗体がウイルス中和能を有する事が明らかとなり、変異型 B5R を持つ LC16m8 のワクチンとしての有効性についての確認が急務でありその有効性の解析を行った。WHO 採用株であり Variola V の eradication の実績株である Lister 株及び LC16mO 株との比較において DNA シークエンスの違いの検討とマウスでの免疫応答と WR 株チャレンジに対する防御能について解析した。ゲノム解析のため又ワクチン株のゲノムの安定した保存の為に Lister 株、LC16mO ウイルスを大量培養しゲノム DNA を抽出し HindIII で切断後種々のフラグメントをベクターにサブクローニングを行った。

A. 研究目的

現在の世界情勢において天然痘による生物テロ対策の重要性、緊急性が高まっている。我が国で製造、備蓄している痘そうワクチンのワクチン株である LC16m8 は他国のワクチン株と比較し最も安全性が高く世界的に高い評価を得ているがワクチンとしての有効成分である細胞外エンベロープウイルス(EEV)表面蛋白である B5R に変異がある為その有効性についての検討が急務である。そこで我々は LC16m8 の性状を分子遺伝学的に明らかにし WHO の採用株であり Variola V の eradication の実績株である Lister 株及びそこから得られたクローンである LC16mO との比較によりワクチンとしての有効性を分子遺伝学的に解析し、有効であるワクチン株のゲノムの安定した保存をすることを目的とする。また in vivo でのワクチンに対する免疫応答と WR 株チャレンジに対する防御能の検討をマウスを用いて行う。

B. 研究方法

a) 痘そうワクチン株の大量培養とウイルス

の精製

LCm8 株, Lister 株、及び LCmO それぞれのウイルスのゲノム DNA を得るために種ウイルスを RK13 細胞に接種し大量培養を行った。得られた感染 RK13 細胞を回収し Joklik の方法に従ってウイルスの精製を行った。

b) 痘そうウイルスの全長 DNA の精製

大量培養で得られ精製を行った LCm8 株、LCmO 株、Lister 株の精製ウイルスを Proteinase K 処理し Phenol/Chloroform 抽出を 3 回行い Chloroform 抽出を 2 回行った後に Ethanol 沈殿をし各株の全長 DNA の精製を行った。精製 DNA の一部をゲノムシークエンス用に提供した。

c) 制限酵素切断 DNA ライブラリーの作製

HindIII ライブラリーの作製を行った。得られた LCm8 株、LCmO 株、Lister 株の精製 DNA を制限酵素 HindIII で切断しそのフラグメントをクローニングベクター-puc18 と pBR の ori を持つベクター-pMT2 にサブクローニングを行った。

d) マウスを用いた痘そうワクチンの有効性の検討

Balb/c マウスを用い LCm8 株、LCmO 株、Lister 株のウイルスを皮下接種し 3 週間後の抗体応答と WR 株に対する感染防御能を検討している。

C. 研究結果

- a) わが国の痘そうワクチン株である LCm8 株と WHO の採用株である Lister 株、そこからえらた LCmO 株の 3 種類のワクチン株を培養細胞 RK13 細胞で大量培養し、その後 Jolkik の方法に従い精製ウイルスが得られた。一部はワクチン株保存に用いた。
- b) 精製ウイルスより上記の方法で LCm8 株、LCmO 株、Lister 株の全長ゲノム DNA を精製した。一部をシーケンス用に提供した。
- c) 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 LCmO 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。これらは安定したゲノム保存用に用いた。また、さらに他の断片についても回収中である。
- d) LCm8 株、LCmO 株、Lister 株のそれぞれを Balb/c マウスの皮下接種しその抗体応答と WR 株による感染防御能の検討は現在進行中である。

D. 考察

今回サブクローニングを行ったウイルスのゲノム DNA フラグメントには全シーケンスが明らかになっている Copenhagen 株の Hind III フラグメントと異なるサイズのフラグメントが含まれており全シーケンスが終了した段階で分子遺伝的性状の比較が必要である。

また Lister 株などのワクチン株が単一クローンではない可能性も示唆されている。

E. 結論

わが国の痘そうワクチン株である LCm8 株、WHO の採用株である Lister 株、及び LCmO 株について大量培養し、ウイルス株の保存、ウイルスゲノムシーケンス用のゲノム DNA の精製、及びワクチン株の DNA の安定した保存の為に HindIII フラグメント DNA のサブクローニングと安定した保存を行った。動物モデルでのワクチン効果の検討については現在行っている。

F. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Hasegawa H, Kadowaki S, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T: Persistent influenza virus infection of irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. **Vaccine** 2002, 20: 1050-1057.
- 2) Ogawa-Goto K, Irie S, Omori A, Hasegawa H, Sata T, Kurata T, Arao Y: An endoplasmic reticulum protein, p180, binds to human cytomegalovirus through an interaction with a tegment protein encoded by UL48. **J Virol** 2002, 76: 2350-62.
- 3) Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S: Protection against influenza virus infection in poly-Ig receptor-knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. **J Immunol** 2002, 168: 2930-2938.
- 4) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T: Topoisomerase I and ATP activate cDNA synthesis of human immunodeficiency virus type 1. **Biochem Biophys Res Commun** 2002, 294: 509-517.
- 5) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T: Reconstitution of cleavage of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)

- RNAs. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002, 293: 1084-1091.
- 6) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, Hall W, Kurata T: Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002, 297: 593-599.
- 7) Hasegawa H, Tatsumi M, Ogawa-Goto K, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T, Takeuchi T, Sheehy N, Sawa H, Nagashima K and Hall WW: Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein, gp63 by furin is essential for cell fusion activity. **AIDS Res Hum Retrovir** 2002, 18: 1253-1260.

厚生科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告書

痘そうワクチンの抗ウイルス剤に対する感受性
—痘そうワクチンの副作用に対する化学療法に関する再評価—

分担研究者 西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官）

協力研究者 森川茂（国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長）
前田秋彦（国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官）

研究要旨

2001年9月11日にニューヨーク市で発生した世界貿易センターへの旅客機激突によるテロリズム事件、そして、それに引き続くかのように米国で発生した炭疽菌によるバイオテロリズム事件により、無差別テロリズムの危険性がこれまでよりも増して強く叫ばれている。天然痘ウイルスによるバイオテロリズムに備えて、我が国においても痘そうワクチンの生産が再開され、世界中から根絶されたはずの天然痘の再来に備えている。痘そうワクチン接種による副作用として、特に致死率の高い脳炎、播種性痘瘡疹などが挙げられる。この副作用に対する治療法は確立されていない。そこで、作用機序の異なるいくつかの抗ウイルス剤の痘そうワクチン(Lister株)に対する増殖抑制効果を検討した。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、一方、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。米国で使用が認可されているシドフォビル、我が国で抗ヘルペス剤として広く用いられているビダラビンは、痘そうワクチンの副作用に有用である可能性がある。また、S2242も有望な薬剤である。

A. 研究目的

天然痘が世界中から根絶されてからほぼ25年が経つ。いまから約200年前にジェンナーにより開発された牛痘種痘法の恩恵による。残念なことに、根絶されたはずの天然痘ウイルスによるバイオテロリズムの危険性が近年盛んに叫ばれ、米国においてはその危険性に備えて痘そうワクチンの生産が再開された。しかも、

軍人や医療関係者には痘そうワクチン接種を勧め、さらに希望者へのワクチン接種をも認めている。我が国でも、世界的に高まっている天然痘ウイルスによるバイオテロリズムの危険性に備えて、痘そうワクチン(LC16m8株)の生産が再開され、その危険性に備えている。

いくつかの痘そうワクチンの中でも、橋爪博士らにより我が国で開発されたLC16m8株は、

神経増殖性が弱く、脳炎などの神経系の副作用が発生する頻度が比較的低いと考えられている。しかし、このワクチンが我が国において臨床応用が認可された時には、すでに、天然痘患者数が激減していた。そのため、このワクチンの天然痘発症予防効果、ヒトにおける副作用発生 の程度等は調べられていない。今後、再び痘そうワクチンが広く日本の国民に接種されるような状況になるとすれば、痘そうワクチンによる副作用の被害が生じる可能性がある。

そこで、私たちは既存の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)に対する痘そうワクチン(Lister 株)の増殖抑制効果を調べ、痘そうワクチン接種による副作用の抗ウイルス剤による治療の可能性を考察した。

B. 研究方法

ウイルスと細胞. 用いられたウイルスは、痘そうワクチン(Lister 株)と単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1) TAS 株である。また、RK-13 細胞と Vero 細胞を用いた。HSV-1 TAS 株は、痘そうワクチンの薬剤感受性試験における比較対照として用いられた。

抗ウイルス剤. ガンシクロビル { [9-(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ganciclovir, GCV }, ビダラビン (adenine arabinoside, vidarabine), フォスカルネット (trisodium phosphonoformate, foscarnet), carbocyclic oxetanocin-G (cOXT-G), carbocyclic oxetanocin-A (cOXT-A), compound S2242 [2-amino-7-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)purine, S2242], リバビリン (α - β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide, ribavirin), シドフォビル

[(S)-1(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, cidofovir, CDV]の8種類の抗ウイルス剤を用いた。尚、GCV, vidarabine, foscarnet は Sigma-Aldrich 社から購入した。また、cOXT-A と cOXT-G は丸山徳見博士(徳島文理大学薬学部, 徳島市)から、ribavirin は 町田治彦博士(ヤマサ醤油株式会社, 銚子市)から、CDV は De Clercq E 博士(Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit, Belgium)より供与を受けた。

薬剤感受性試験. 上記の抗ウイルス剤のウイルス増殖抑制活性は、プラーク減少法により測定した。痘そうワクチンの薬剤感受性試験には RK-13 細胞を、HSV-1 の薬剤感受性試験には Vero 細胞を用いた。簡単に説明すると、24 穴マイクロプレートにそれぞれの細胞を 10%胎児仔牛血清(FBS)含有 MEM 培地(MEM-10FBS)で 37°C 4 日間培養し、単層細胞を形成させた。PBS 液で 1 回洗浄後、約 50 PFU/0.2ml のウイルス液 0.2ml を各穴に 37°C で 2 時間吸着させた。2 時間の吸着反応後にウイルス液を除去した。次いで、ウイルスが吸着された細胞を、痘そうワクチンの感受性試験では各濃度の抗ウイルス剤が含まれる 2%FBS 含有 MEM 液(MEM-2FBS)で、HSV-1 の感受性試験では各濃度の抗ウイルス剤と 0.5%メチルセルロースが含まれる MEM-2FBS で 37°C で 4 日間培養した。その後、培養液を除去し、細胞をホルマリン固定し、固定された細胞をクリスタルバイオレット染色液で染めた。尚、各抗ウイルス剤の各濃度のプラーク形成には、それぞれ3つの穴を用い、形成されたプラークを数えた。抗ウイルス剤が含まれない培地で形成されたプラーク数の50%を形成させる抗ウイルス剤の濃度を 50% inhibitory concentration (IC₅₀)とした。

抗ウイルス剤の細胞毒性. RK-13 細胞および Vero 細胞に対する抗ウイルス剤の毒性は, Cell Proliferation Reagent (WST-1, Roche Diagnostics 社)を用いて, 測定した. 簡単に説明すると, 96 穴マイクロプレート(Falcon 社)の各ウエルに, 約 5000 個/穴の細胞数になるようにおのおの細胞を MEM-10FBS 中で 2 時間培養した. 次いで, 各穴の底に接着している細胞を残して, 培養液を取り除き, 各濃度に調整された抗ウイルス剤を含む MEM-10FBS を加えて, 細胞を 72 時間培養した. 各穴に適量の WST-1 を加え 37°C で 2 時間反応させた. そして, 細胞の発現する mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system 活性により WST-1 から形成された formazan を 650nm のフィルターを使用した ELISA リーダーで測定した. 抗ウイルス剤が含まれないコントロール細胞の同酵素活性に比較して, 50% の活性(形成された formazan が半分になった)を呈した抗ウイルス剤の濃度を, 50% effective concentration(EC_{50})とした.

C. 結果

各薬剤の IC_{50} と EC_{50} の値を表 1 に示した. EC_{50}/IC_{50} の値を antiviral index とした. Vidarabine, CDV, S2242 が, 痘そうワクチン Lister 株に対して高い選択的抗ウイルス活性を示した. また, それらの抗ウイルス剤は, HSV-1 に対しても同様の効果を示した. 一方, GCV, foscarnet は HSV-1 に対して強い抗ウイルス活性を示すものの, 痘そうワクチンの増殖を全く抑制しなかった. Ribavirin と cOXT-A, cOXT-G は, 痘そうワクチンに対して中等度の抗ウイルス活性を示した.

特に vidarabine は HSV-1 に対する増殖抑制よりも強く, 痘そうワクチン Lister 株の増殖を抑

制し, antiviral index も高い値を示した.

D. 考察

今回の検討に用いられた 8 種類の抗ウイルス剤の中で, 実際に臨床応用されているのは, vidarabine, GCV, foscarnet, CDV, ribavirin である. ただし, CDV は我が国においては認可されていない. その他の薬剤(cOXT-G, cOXT-A, S2242)は, 現在, 臨床応用に向けて開発途中の薬剤である. この 8 種類の抗ウイルス剤は, 作用機序の違いにより次の 3 種類に分類される: 1) ウイルス性リン酸化酵素(thymidine kinase, TK)によりリン酸化され, 抗ウイルス活性を発揮する GCV(ウイルス性 TK 関連薬剤), 2) 細胞性のリン酸化酵素によりリン酸化され抗ウイルス活性を発揮する vidarabine, CDV, S2242, cOXT-G, cOXT-A (ただし, cOXT-G は細胞性リン酸化酵素のみではなく, ウイルス性 TK によってもリン酸化され抗ウイルス活性を呈する), 3) ウイルス性 DNA ポリメラーゼを直接阻害する foscarnet である. Ribavirin は, respiratory syncytial virus, hepatitis C virus をはじめとする広い RNA ウイルスに抗ウイルス活性を示す薬剤で, 現在のところ, その抗ウイルス活性の詳細な作用機序は解明されていない. 今回の検討では, ribavirin が DNA ウイルスである痘そうウイルスの増殖をも抑制したことは興味深い.

痘そうワクチン接種に際して, 一定の割合で重篤な副作用が出現することが確かめられている. その合併症の代表的なものが, 種痘後脳炎, 脳症, 進行性種痘疹, 種痘性湿疹, 自己接種による皮膚病変などである. Vidarabine が, 今回の検討において高い抗ウイルス活性を示した. Vidarabine は長く臨床応用されている薬剤の一つで, その副作用等が明らかに

されていることを鑑みれば、今後、痘そうワクチン接種の再開で現れる痘そうワクチン接種による副作用の治療薬として、vidarabine は用いられるべき抗ウイルス剤の一つと考えられる。

近年、De Clercqらにより開発された、ヘルペスウイルスやポックスウイルスなどの広い DNA ウイルスに抗ウイルス活性を有する CDV が注目されている。特にこの薬剤は、アシクロビル耐性ヘルペスウイルスやサイトメガロウイルス感染症に用いられ、効果が確認されている。また、この薬剤は、ポックスウイルスに分類されるウイルスにより引き起こされる伝染性軟属腫やヒトでの orf の治療に有効であると報告されている。このように、CDV は天然痘や痘そうワクチンの副作用の治療に第 1 選択薬と考えられ始めている。しかし、この薬剤は非常に高価であること、日本ではまだその使用が認可されていないこと、入手に時間がかかることなどの解決されるべき問題点がある。

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、臨床の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その副作用に用いられるべき薬剤と考えられる。

我が国で天然痘によるバイオテロリズムに備えて、生産・備蓄されている痘そうワクチンは LC16m8 株であり、このワクチンの親株は Lister 株である。LC16m8 株は比較的副作用が少ないと考えられているが、その実態は明らかにされていない。LC16m8 株による副作用にも、CDV および vidarabine が用いられるべきであると考えられる。

E. 結論

痘そうワクチン接種の広範な再開により出現する可能性のある痘そうワクチン接種による副作用(種痘後脳炎、進行性種痘疹、自己接種など)には、vidarabine および CDV が用いられるべきであると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Prehaud C, Morikawa S. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Clinical Microbiology* 40:372-375, 2002.
- 2) 西條政幸. ウイルス性出血熱. 化学療法の領域 18:354-358, 2002
- 3) Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1587-1591, 2002
- 4) Morikawa S, Qing T, Xinqin Z, Saijo M, Kurane, I. (2002): Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. *Virology* 296:159-164, 2002
- 5) Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda MEG, Calaor AB, Hernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. Development of an immunofluorescence

- method for detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells. *Microbiology and Immunology* 46:633-638, 2002
- 6) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Linear B cell epitopes on the nucleoprotein of Ebola virus that distinguish Ebola subtypes. *Clinical and Diagnostic Laboratory and Immunology Clinical and Diagnostics Laboratory Immunology* 10:83-87, 2002
- 7) Ikegami T, Miranda ME, Calaor AB, Manalo DL, Miranda NJ, Niikura M, Saijo M, Une Y, Nomura Y, Kurane I, Ksiazek TG, Yoshikawa Y, Morikawa S. Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in Cynomolgus Macaques during the Philippine outbreak in 1996. *Experimental Animals* 51: 447-455, 2002
- 8) Han L, Tang Q, Zhao X, Saijo M, Tao X. Serologic studies of Xinjiang hemorrhagic fever in Bachu county [in Chinese], 2001. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 3:179-181, 2002
- 9) Maeda A, Hee LB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of Hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1). *Virology* 305, 288-297, 2003
- 10) Tang Q, Saijo M, Lei H, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, Morikawa S. Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. *Journal of Virological Methods* 108:111-116, 2003
- 11) Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology* (in press)
- 12) Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda ME, Calaor AB, Fernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiology and Infection* (in press)
- 13) Saijo M, Suzutani T, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Importance of C-terminus of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for maintaining thymidine kinase and acyclovir-phosphorylation activities. *Journal of Medical Virology* 66:388-393, 2002
- 14) Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, E de Clercq, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACVr) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACVr virus. *Journal of Medical*

Virology 68:99-104, 2002

- 15) Saijo M, Suzutani T, De Clercq E, Maeda A, Morikawa S, Kurane I. 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 Research 56:253-262, 2002

2. 学会発表

- 1) 西條政幸、錫谷達夫、前田秋彦、森川茂、倉根一郎。アシクロビル耐性 HSV-1 のチミジンリン酸化酵素の特徴とシドフォビルに対する感受性。第 12 回抗ウイルス化学療法研究会, 2002 年 3 月, 東京
- 2) Maeda A, Hee LB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The intercellular association of the nucleocapsid protein (NP) of Hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (UBC9). 36th Joint working conference on viral diseases, June, 2002, Matsumoto
- 3) Saijo M, Tang Q, Morikawa S, Maeda A, Kurane I. Recent outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in China. 36th Joint working conference on viral diseases, June, 2002, Matsumoto
- 4) Morikawa S, Tang Q, Xinqin Z, Saijo M, Kurane I. Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolates in China. 12th International Congress of Virology, July, 2002, Paris
- 5) Saijo M, Tang Q, Hay L, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a recombinant viral nucleoprotein. 12th International Congress of Virology, July, 2002, Paris.
- 6) Maeda A, Lee HB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) integrated with small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 conjugating enzyme (UBC9). 12th International Congress of Virology, July, 2002, Paris.
- 7) 池上徹郎, 新倉昌浩, 西條政幸, 前田秋彦, 緒方もも子, 倉根一郎, 吉川泰弘, 森川茂. エボラウイルスレストン株を特異的に検出する抗原捕捉 ELISA の開発. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.
- 8) 前田秋彦, Lee Byoung-Hee, 吉松組子, 西條政幸, 緒方もも子, 有川二郎, 倉根一郎, 森川茂. ハンタウイルスの核蛋白質 (NP) と small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) 結合酵素 (Ubc9) との結合. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.
- 9) 西條政幸, 森川茂, 前田秋彦, 緒方もも子, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱の抗原検出 ELISA による診断の有用性と問題点. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.
- 10) 西條政幸, 森川茂, 前田秋彦, 緒方もも子, 倉根一郎. 中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱の分子疫学的解析. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2002 年 10 月, 札幌.

- 11) 錫谷達夫, 西條政幸, 石岡賢, 石橋啓, 金子久俊, 森修一, 大橋一孝, 吉良俊彦. アシクロビル, ペンシクロビルは単純ヘルペスウイルスの突然変異を誘導するか? 2002年10月札幌.
- 12) 西條政幸, 唐青, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験. 第13回抗ウイルス化学療法研究会, 2003年1月, 津田沼

- 13) 西條政幸, 錫谷達夫, 森川茂, 前田秋彦, 倉根一郎. 2番目のメチオニンから翻訳されるチミジンリン酸化酵素を発現する単純ヘルペスウイルス1型の薬剤感受性. 第13回抗ウイルス化学療法研究会, 2003年1月, 津田沼

H. 知的財産権の出願・登録状況
現在のところない.

表1. 各薬剤のウイルスおよび細胞に対する増殖抑制効果と antiviral index.

抗ウイルス 剤	IC ₅₀ (μg/ml) * ¹		EC ₅₀ (μg/ml) * ¹		Antiviral index	
	痘そう ワクチン (Lister 株)	HSV-1 TAS 株	RK-13 細胞	Vero 細胞	痘そう ワクチン (Lister 株)	HSV-1 TAS 株
Vidarabine	0.75	9.0	45	60	60	6.7
CDV	3.6	1.2	16	>100	19	>83
S2242	2.6	1.7	>100	>100	>38	>59
Ribavirin	16	>100	40	97	2.4	<1
cOXT-G	20	0.56	24	64	1.2	77
cOXT-A	21	33	>100	75	>4.8	2.3
GCV	>100	0.45	>100	>100	N.D. * ²	>222
Foscarnet	>100	6	>100	>100	N.D.	>17

*1: IC₅₀とEC₅₀は, 独立した実験を2回行い, それぞれの実験で得られた成績の平均値で表示した.

*2: N.D.は, 決定されないことを示す.

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者：前田 秋彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

協力研究者：森川 茂（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）

岡田 義昭（国立感染症研究所血液安全性研究部）

研究要旨：天然痘（痘そう）のバイオテロ対策として、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。しかし、実際に使用されて副反応が少数でも出た場合、また天然痘患者が出現した場合を考慮すると、かつて用いられたワクチニア免疫ヒトグロブリン（VIG）が日本では入手できないことが問題となる。このため、現在入手可能な通常のヒトグロブリン製剤中に含まれるワクチニアウイルス中和抗体を測定した。その結果、50 から 100 国際単位 of 中和抗体が検出された。VIG の中和抗体価は 500 国際単位であるため、この代用としてはヒトグロブリン製剤を 10 倍量使用する必要がある。

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。このため、平成 13 年度には乾燥細胞培養痘そうワクチン 250 万人分が製造され保管されている。乾燥細胞培養痘そう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、種痘による副反応対策として、あるいは天然痘患者に接触したヒトに対する

対策として、以前はワクチニア免疫ヒトグロブリン製剤（VIG）が製造されていた。

これは、ワクチニアウイルス中和抗体価が 500 倍以上あるグロブリン製剤である。現在では、生物学的製剤基準からもはずれて製造されていない。そこで、現在製造されているヒトグロブリン製剤中のワクチニアウイルス中和抗体価を調べ VIG の代用としての可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

ワクチニアウイルス中和抗体の測定：

VIG が製造されていた当時のワクチニアウイルス中和抗体価の測定法に従い、HeLa細胞を用いた、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プラック形成単位(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日後に形成されるプラックを測定し、50%プ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4000IU)を対照として用いた。

検体：

1) 献血由来ヒト免疫グロブリン製剤5検体と輸入人免疫グロブリン製剤2検体を用いた。

C. 成績：

1) ワクチニアウイルス高度免疫ウサギ血清(国際単位4000IU)のIMV中和抗体価：国立感染症研究所でVIG製剤のワクチニアウイルス中和抗体測定の標準品として約30年前に製造されたワクチニアウイルス高度免疫ウサギ血清(凍結乾燥品IRS70)の中和抗体価を、HeLa細胞とワクチニアウイルスLister株を用いて測定した結果、3,200倍であった。製造当時のウイルス中和力価と同程度であった。

2) 人免疫グロブリン製剤のIMV中和抗体

価：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。IRS70との比較から、国際単位では50から100IU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)の製造されていない。日本にはVIGの備蓄はなく、現在VIGは米国以外では入手できず、WHOにもストックはない。

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、VIGは種痘した人のうちワクチニアウイルス中和抗体価の高い人の血清を原材料として製造するため、定期種痘が行われていない現在では、新たにVIGを製造することは不可能である。また、生物学的製剤基準からも対象外になっている。

国立感染症研究所に保存されているワク

チニアウイルス高度免疫ウサギ血清は、当時のウイルス中和力価を維持していることが判明したため、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の基準と比較することが可能であった。その結果、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と考えられる。VIG 製剤は筋注用であるが、現在の製剤は静注製剤であるため、10 倍投与は可能である。

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、ワクチニア免疫ヒトグロブリン (VIG) が日本では入手できないことが問題となる。このため、現在入手可能な通常のヒト免疫グロブリン製剤中に含まれるワクチニアウイルス中和抗体を測定した。その結果、50 から 100 倍の中和抗体 (国際単位) が検出された。VIG の中和抗体価は 500 倍 (国際単位) であるため、この代用としてはヒトグロブリン製剤を 10 倍量使用する必要がある。

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. 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.
5. 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

図1. LC16m0株ゲノムの塩基配列 (確定分)

CTGAATCGTTCGATTAACCCTACTCATCCAATTTAGATGAATAGAGTTA
TCGATTTCAGACACACGCTTTGAGTTTTGTTGAATCGATGAGTGAAGTATC
ATCGGTTGCACCTTCAGATGCCGATCCGTCGACATACTTGAATCCATCCT
TGACCTCAAGTTCAGATGATTCCCTTGCACATGTCTCCGATACGAACGCTA
AACTCTAGATTCTTGACACATTTTGTATCGACGATCGTTGAACCGATGAT
ATCTTCGTAACCTCACTTTCTTATGAGAGATGTTAGACCCGAGTACTGGAT
GGGTCTTGATGTGCTGTCTTTCTCTTCTCGCTACATCTGATGTGATA
GACACCTCACAGTCTTTGATCATAGCAAGAGCTTCTTCATGAGTGTGCGC
GGGAGAGTCTTACCTTGTCTGGGGACACGCTGGACAATCTAGCATTCA
CTGTGTTCCATCAGCGGATTCTGAGATGGATTTAATCTGAGGACATTTG
GTGAATCCAAAGTTCATTCTCAGACCTCCACCGATGATGGAGTAATAAGT
GGTAGGAGGATCTACATCCTCGACTGATGTGGAATCATCTTCTGATTCCA
CCTCGGGATCTGGATCTGACTCGGACTCTGTAATTTCCGTTACGGATTGG
CAAATCTTATCATTGGTGGTGTGTTGGTCTTGGCTTTGTGACTTTGATAAT
AACATCGATTCCCATATGATGTTTGTGTTTCTTCTCCGTACACGAGGAGG
AGGATGAGGATGATTGCTGAAGACTGGCAGGCATAGCAGCTGCCGCCAGG
CACATGCATGCCAGTACGATATATTGTTTATAAATTGCTATTGATTGAGT
ACTGTTCTTTATGATTCTACTTCTTACCGTGCAATAAATTAGAATATAT
TTTCTACTTTTACGAGAAATTAATTATTGATTTTATTTATGGGTGAA
AACTTACTATAAAAAAGTGGGTGGGTTTGAATTAGTGATCAGTTTATGT
ATATCGCAACTACCGGCATATGGCTATCGACATCGAGAACATTACCCAC
ATGATAAGAGATTGTATCAGTTTCGTAGTCTTGAGTATTGGTATTACTAT
ATAGTATATAGATGTGCGCCACTAGAGTACTGTCTCCGAATGCGGCATG
ATAGTATCATTCTTTGCTTTTCGTTAACTGTTTGGAGGAAGAATCTTTGTT
ATTGCATTTAATCTCGAAATTCAGAGTGCACACCTTTCTCCTGTAAAGAA
ACCTGAAGTCGCTACCTTATTAAGGACGGAGAAGTATCCATCACGAAAGA
CGGGATCGCAGTCTTTATGATTATAGTAATAGTTAGTCCGACGTTGAG
ATGGATTGCTGAGACCGGTAGTGGTCGTCGAGTACACGACGTGTCGTT
AACTGGATACAGATTAATTTCCACATCGATATAGTTAAAGGTATTACTGG
GTACGGGTTCCGATTTATCTGCGGAAGAGACGGTGTGAGAATATGTTCCG
AGACCACACGGAGAACAGATGACGTCTCCGGATACTCCGTATCCTATTCC
ACATTTTGTGTTGGGAAACACATGCCTTGCATCCGGATGATCCTTTGAGAA
GACAATAATATCCGGGAGAGCATTACAGATTCTATTGTGAGTCGTGTTA
CACGATCGCGTCTTCCGTTACAACCTAGACAAGCGGGTAAATGATTATTG
CGAGATGTGAAGGTACCCGAACCACACGGCGTACATTGTGTGTTAGTCTT
GCTATCGCATAATCTGGAAGCGTATGTTCCCGACACAAATATGGCGTT
TGTATTGTTGCTTTACACTTTCCATCGGATGGTGCATGCCGTTGCTATA
TCTCTTCCGTTTATTATTATACATGAGAGAAACAATATATACGAGTATAA
TACGGACTTTCATGATTTAATAATGTAGTAATCGTCGTCTTGTCTCTGTT
CCTACTTCTCCAATCATATAGATATTTCTTTCTATCATGGATAATATTT
GTAATTGGTTCTTTCCGTACAACATACTGTTTATGATGATTTGCGCATAAT
TTCCGGAGGCAAAATACGATAGTCTAGATTGACCGATGGTAGACTCTAATT
TATTGAGTGTCTTGTGCGACGAGTTTACTTTTACGCTCCATCGATAGATGG
CACTGTTCTATGAGATCGTCGTACATGGGAAATGAAATGTGACTGTCTGA
ATGTATGGCTTTAAGATAGCTGTGATACCGTATACAGGTCCGGTGTGCGGAG
ATTCGAATCTCTTAAAGGCGACTTATGTCACGATGATGGAATCTATCTTA
TCGAATGATATATTTTTATAAATACACTTTTATAGTCCCTCGTTTAAACA
GAATTTACTATGTAGTTCCGCGAATGACTCGTCCCTTAAAGGCAGTAGG
CTAGTATCTTTTTACGTAGTAATCGTCGTAGGGAGAGACATCTTGTAGA
ACAACGATTTAATCATAGGTAGAGATACTTTCAGTCTGTGGTGGATGATG
TCATTACAACATCCGCCCTTGTATATGATGTTTCTGTTTTCAAACACCAA
GTGCAATACCGTCTTTAGTCCGAAAGGTTGATGTCGTATCCGATGTATGAG
GCAACATTGTTGTTACAATTTGAAAGGCGGTATTATAGTATTCGTCTTT
CTGAATGTGCAACCTATCTAATAGATACCGTAGTATATTGAGAGTGTATC
CTTGATTATGTTTTATGAATAGATAAAGTAGATGTTGTCTTCTTCTTT
TGTTCTGTCGAATTTGAGTAACATTAAGAGAATATGACCTGTTGCACAATC
GTTCCATGATGGGTGTACAATCAAGATTATTACGTATCCTCGAGATAAAA
GAGCATACACCACAGGACTATGTTTGGTATACTGTTGAAGGTAAGTG
TGTAACCGGTTAATGTTTGTCCATAATCTATTATCGCGTAGATGAATC
GCTTCTCGGCTCGCATCTTAGTGTGACTTGACTTGAATAATTGCTTTCCG
TAGAACGTGGATATGTGTTTACAGTAGTAATGAAGAGAAGTGAGTTTATC
CTCGTCCGCGCAATTAGGGTCCGATCCTTTGTACAGAACGTAATAGTTTA

AGCTCCCATTTGAATTTATATCTAAGATAACACAGCAATAGATCGGATGAT
TACTAAAGTCATCAATGGTGTCCGTTAGTATATCAAAGATCTTGTATC
GATTGATAGTGGTCACTCTTGTCTCAAAGTTACGCATGCCGTGGTGAA
CAATATCTTTAATACAGATGGATTAAATCGTGTATTCATCGTATAGCAAT
GTAATGGAGAGTTACCTCGTTTATTCAGATCGCAGTGTTTAATAACTAGC
TTAAACAGATGAGACGATGTATTCACATCAAAGAACGTGAAATACATATG
ACAGACATTGTTGACAGAAAACGTGACCTTCATTCTTACCGTCGTCCATAA
ATACGTTAGGTATGTACCACATACTGTCGCGAACGATGCGTACAATCTCG
TCCATCTCATAATGATTTACTTTTTTATAAATAAGATGTGAAAGAAAAA
CAGAAACAATATATTTTTTTAGTAATGTTTATGCGAGACATATAAAAATAA
CTCCGTGTTTATGATGCCGTAATGTTTTATCATCTTGGACGGAATCG
ATTTTGTAAATATGTCATGGAACAAATGAAACAGGACATTATCGCTCCAT
GATAAATATTTAATGGAGTAATAAAGTATCTCCATGGGTAATTTGAAA
TCAAGTTATCGTCTGTATTAATGTTGTCCACTATGGAGTCGATCCTCTCA
TTGTTCTTTACAGTTTCTGTAATGATGGACGTTAGTTCTTTTTTGTACCA
TTTGATGTCGGATTCTTTGCGTATCTCAGTCTGTGGCGTTTGTCTTTGTT
AAATAATATATCAAACATGGAGACGCTGATATGTAGGCATTCTTCATTC
TATTAATGTCTGCTCTATAGCGCTTAGTTCCTTATGACGACCGGCGATA
TCATACTTTACTTTAGAAAGGAAAAATCATCATCTATGATTAAGGCGTATCT
GATACAGGCGAATAATGGTTCAGGATATAGATAGCGTATATCTCTATTA
ATGCGTCAATCATAGTCTCTAGAGTGGGATGGTAGCTAAGTAATAAATCA
ACTATCCTCGTTTTGTTTTCTCTTTGGTAACTGCTTTCTGGATGGCCGT
ATTGATTATCGAGCGTGATGTTGTAACACTCGCTCCATATTCGAATAACC
GCTTTGCAAATTTGATATTTATTGACATCGACCGCGTAATATAGTAGAGTT
ATCGATCATATCTATATCATCCATGTACTTGTCTTAGTATATCAAATACAT
CTATTAGTATGGTTTCATAACAGTGATACCCGCAATTATTAATCTCGAT
AATATCAGACCGTACATACATAGACGGCATTGTTGATACGTGATTTAC
AGCCGCGTGTCCATATTTCCACGATAAACCTTACGACGTTACATCGAC
GAGATTATTAACAAGTAGTCGTGTAGAGGATAGTTGTTGTCCGTCG
TCTTATCCATGGTTGCTCCGTTATCCAACATGCATTGAATGATAGGTATA
CTTACCATATCGCCGTAATGTAAGTAGTTTATCAACATGGCTTGTACATC
CTGTTGTCTAAATCTCTTTAGAATGTTATCGATGATGTAGTGGTTATATT
CTCTGGAATCGTACGAAGTAATACTACGCATTACGTGCAACAAGAGTATGA
CGTCTCTCAATAAGAAGATTAACGATTTCCATGTCTACATTATATGGGGT
TACTCTAAATCGCTTGTTTAGATAAATACGCCTCTAATATAGGGCTGACGT
CGTATACTCTACACGTGTCCACATCCTTTATTAATAATAATTTAACAATC
TCTATATCTATGGTTGAGCAAGACCAGTAGTATTGGATGGGTAAGATCC
TCCTTCGTCTCTGCCATGGATGGAAACATTGTTATCGATCAAACATTTAA
TTACATCCTTTGGATAGAGATTGAGATTCCTATGAGACGATATATAGTAA
TGAAGAGAGTTCTTACACATATCACTGTCGTACATACAGGTACGAAATAC
GTAACCGGTGCTGTAACATTCTGATTTAAGAAGCCATAGCAATACTTCTG
GTCTCGGATTAGGCGTCGTTACGTATATATCCACCAATCCGAGACCATTG
ATTGCATAATTCGTATTTGACGCGACGTATCCGTTTATCCACAATTAG
GTATTTTAGCAGACGTAAGTCGATATTATCCGAATACAGATCGAAATCAT
TTATATTCGACTTGAGTTGTTAGAGGAATTTGAATAGCTGGATATCAGT
AGATGCACAATCTGAGATTTTACGTATCTATGCTTACTGTATACTCCTAG
CGGAGTTAATCCTTCGTTGTTTCTACAAAGTCTCTCGACTCCGCGAGAGA
GTAACAGCCGAACAATCTTAATGTCTGTATCGCATTTATTGGAGACGTAA
CAATGTAGCGCATTGTTTCTCGTCTATCTATATGTTTTGATAAGTTGTG
ACACGTTTCAATTTCTAGTTTTTTTTTTGTACGTCACATCTTCATCCA
GTAGACGACATAGAATAGTGCACTCTCTACCACAATAATCCATAGCTATT
CTGGTGCTAATTATTCCTATTTACGAAAAATGATAAAGGCAATCATTCC
TCATAAGATGATAAAAAGTGTAGTGAGAGAGCATGAAGGAGATTTAGTAT
TTAGCAGTGCAGATATGATCCAAGAGGGTGAAGATAGTCGTTCTCGTTCCAG
AATCTTTGCGACGATAAAGTAGTATGTCGATATACTTATCGTTGAAGACTC
TTCCAGAGACGATAGCTGATTGAGTACAAAGTCCAATGATTGCACGAAGT
TCTTCGGCGGTTTTTCTGAGGATCATTTCTGATGAAACATTTAATGATCTC
CACGCAATTTGCCACGGAAGTGAACTCTTCAACTCACCACCAAGAGCT
CCGTTGCATCAGTTCTGAAAGAGATGAGAAGCCTGTAGAGAGACCCTGCG
CTTTCTCTATGGGTCCATCTATGAGAAACCCACAGGATGATTCAGTCAG
ACAATGTCTGACCTCGGCCACGGTATTCAGGGAGTCTTAGTAGCGTGGC
AATGACAGGGTCTGAAGCTGGGCACAAGGAAAGGCCATTGTGAAGGTAGAC
CTGTAGCCGTCTATGCTAATAGAGGGCTTTAATTTCCATTTTTAATGGG
GTTGTGGATGAGGAATGAGAGTGTCTTATCTCGTCTTGGTTTACATGGA
TCAGAGTGAGAAAAATATCTTGTATATTATTAACAAACCTTGGTGT

TACCCATGGGTGGATGATGTGAAAAAATATATCTTGTGTGTATTA
ACTACCTTGGTTTCCAATCCATGTTTAAAAAATGACCTATATGTTTT
TAATTCTATTTTAACTTTATTTCTTATTAGATACTTCCAAAAGCTG
CAGATGCAAGAACAGATTGATGATATCCAAGTAGAGATTGATAGAG
ACACATACTCTTCAGGCGAGAGCTTATGTATTAGTGAGTGCGTGT
ATAATGAATCCACAGAATACAAGGGCCCCAAAAGCAGACAGGACC
CACTGTCTCATTGTCACAAAATATCCCCAAGAGTCCTGACAAAAT
TCCACAAAGCAGCAACAATCTGCTCCAAGTTTACTGAAATCTCTCT
GATTGTAGAGTATATGTAGTCAGAGCAAGAAACGCTGCAGTAGTC
GAAAGCTTGCATAACGACATGCACATCATAGAAAGTAACAACAGAG
GCGTTAGAGATTCCGACAGTGTAATCCACAAAAGCAGGTACAGATT
GGATGTTTATGTCTGTGTAAAGTCAATGCGAAAATCAAGCCTATAG
GAACATTGATGCCAATATTAGAACAGGACTCCCTTGTATAAATGTC
TGCAGTCAAAGTATAAAAAACTGCAGTTGTTGCCGTTGTTAAAAG
TGTAGACAAAGGATACCGTAGACTTTTCTTAGAAATGCCATTCGTAT
CACGCTGGCAGACGCCACCGAGCTGCCATAGTTGAAGTCGTCCTCG
AGGAGCACGCGGAGAGGCTCGGCATGGCCATGGCGGCGACGCAGACC
ACGCGCTTTGGGACGGAACCCAAAAGGGATTTAAAAATGACCTATA
AATACTCGATTGTTATTGATATTAATAATTAGTGATATTTATATTT
TATTACGAGGAGGATATTTTATGTCTATCCAGTAGATGCGAGTAAG
ATCTTGTCAATTGGTTTACATTGATCAGAGTCAGATACAATATCTGA
GTACCCCTCCGACATTTCTTACAAATGGTATTACCCATTTTCACTCT
TTCTTTCCATACCCACGACCACATTTTGTGTTTAGGAGCACATGTA
AGTTACCATCAGAAGCTTTAAGGAGACAATAACTATTTCGAGTCACA
CAGATTCTATTTGTGGTAGGTGTACAAGGTGTGACCTCTACTCGATT
ACCACATGGACCTCTACAACATATGACACCAAGGAGAACGATTATAT
ACGTGAATGTGTCACTCGGACAATGTCCACAAATGGTATCGCTGTAT
TCACATCGATGATCTGAATATGTTCTGGCTTACATAGTTTACAACCT
TAATCTTGTGAATTATAATATGAGACACCTTGTTCACATTTTATAG
ATGAATTTGTATTAATAATCAAGAATCCTAAGATGATGATAACTTT
ATCGTTAAGTCAATAATGATTAATTTATTTATTTATATGTTAATG
AACTAATTGTTTGTAGACGATTTAATCTCAATCTCTTTCACAATCA
TGGTGAATATGATCAACATTTAGGATATGACTAGTATGATAAGCGAC
AAGATAGGTAGAGATGGAAGTTGATCCACCAACGATCTTATCACATT
ATCTACAATATATCTAAGTATATACAGTAAACAATTAATGGTATAT
AATTTCTTTGTTATCTATAATGAGTTGTGTAGCGTGTGTTGTTAT
GTTAACGCATTTATATCTCCGTTGATACGTATAAGATAATCTATTCT
TGTATTATATATTTACATGCTACGTGTAATAATGTCTTTCCTTCAT
GGTATAAAATATTTATATTTTAAACCTATTCATCAAATAAGTTATCG
TCTGCCGGACGTGTAGAATATGTTTTGATAAACTCGAATACGATCAT
ACGCTCATCTATCGGCATTTCTCCAACATTTGTTTCATAGTGATGAT
ACATAACAAGAATATCGTGTGATGTAGTCGGAAGTTATATAACATAG
ATAGGCGTTAATCCATGATTATTACATATTTGAAATTCGGATTTAA
CAACAGCATTTTAGTCATATGAATATTATTACACATTTCAATACTA
ACAAAATGGAATGGTGTATTACCACAATTATCTAACGCGTTTAGATT
CCATGTTGTATAAAACAAGAAATAATTCGCTTGGCCTTTTTTATCG
CGTTTTCTACACTCACCTGGTTTATAAACGTTGCGGAGACACAAATA
AATAATGTAACGCTGTATATCCGTCTTGTGTTAAAGTTAGGATCGAT
TTATCTAATAAAGTGGATACTATGTTCTCATCGATATCCTCTTCTTCA
TAACATGTAACGAGATTTTATATACTCTAGTAATAGGTTGGAATAGT
TATGTAATAAGTGGTTTTTATCTTTGTCTATCATATCTACTACATCA
TGTGAAATATTACAACATCTAGTAAGCAATATATAAACAGGCATACG
GCTACTGGTTTTTCACTGTTACATCCACTCCATGATTTAATAATATCT
GTACATCGTTTGTAAAGTAATTTATATACAAATAGCAGTGTAGTGCAG
TACCCAGTTACATGTTGTCGTCTGTTTAGATCATAGTTTTTAACTACA
ATCAAGTTCTGTAGAAGTATGGTCTATATTGCAATGACTAAAATATGT
ATATTTCAATCTCTTGTATTTTATGAGTTGATTCGCGGTTGATTTAA
ACATAAATCAGACGACGACTCATTTTTATGATGCTTTGTGGTAAAAGT
TCATATAAATGTTTAAATATTTCAATTTATAGACGATTTCCATTAAC
CTAACATCTTTGATATACCCGTAATATGTAATATGATCCTAAAATAAC
ACGGATTGTAAGATGTCTAGAAAGTTTATGCAGGTGTATGAATATGAC
AGAGCAATATCTCGATGAGTTCATTGAAGATAGATATAACGATAGTTT
TCACTAGTCCAGAATACTATAGTGCAGAAAATACATGTGTAGATATA
ACACTAAATCACAATTGTATAAACGTCAGACGATGCGCGTTAGACTCCA
GTTATTACATGATATCATAACCAATTGTAATAATATAACAATATAGAAT