組換え水痘ウイルスを用いた多価生ワクチン開発の研究

特集 組換えウイルスキャリア—遺伝子治療・ワクチン応用への新展開—

腰塚哲朗^{*1)}, 森 康子^{*1,2)}

The research for development of polyvalent live vaccine based on current varicella vaccine

Varicella-zoster virus (VZV) infection is a causative agent of varicella and zoster. Varicella vaccine has been developed to reduce the morbidity of varicella. The Oka vaccine is the only attenuated live varicella vaccine permitted for use by WHO.

Recently we have generated a recombinant virus expressing mumps virus (MuV) HN protein based on the varicella vaccine. The recombinant virus could induce neutralizing antibodies against both VZV and MuV in guinea pig, thus indicating that the virus may be a candidate for polyvalent live vaccine against MuV and VZV infection.

Here we have summarized about the Oka vaccine, the recombinant virus and the application for a polyvalent live vaccine of the recombinant virus.

水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus : VZV) は宿主(ヒト)に初感染すると水痘を引き起こし、その後、知覚神経節に潜伏するが、再活性化すると今度は宿主に帯状疱疹を発症させる。水痘発症予防のための水痘生ワクチンが開発されているが、現行の Oka ワクチンは、WHO で唯一認められた水痘弱毒生ワクチンである。

最近、筆者らは、本 Oka ワクチンをベースとしてムンプスウイルス HN 遺伝子を保有する組換えウイルスを作成した。本組換えウイルスはモルモットにおいて VZV およびムンプスウイルスに対する中和抗体を誘導し、VZV およびムンプスウイルスに対する多価生ワクチンの候補となることが示された。

本稿では、現行の水痘ワクチンおよびその組換えウイルスについて概説し、さらに多価生ワクチンとしての応用に関しても概説する。

Tetsuo Koshizuka^{*1)}, Yasuko Mori^{*1,2)}

key words : Varicella vaccine, varicella-zoster virus, polyvalent vaccine, mumps virus, recombinant virus

水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus : VZV) は、水痘と帯状疱疹の原因ウイルスである。大多数のヒトは小児期に VZV に感染し、水痘を発症する。いったん体内に入ったウイルスは宿主の神経節内に潜伏感染し、宿主の免疫能低下に伴い再活性化し帯状疱疹を引き起こす。水痘は小児に対し発熱、発疹、水疱形成を伴う疾患である。水痘の予後は良好であるが、まれに重症化する場合がある。帯状疱疹は頭頸部や胸部に帯状の発疹を形成するもので、強い痛みを伴う。成人の初感染、免疫抑制剤や抗がん剤の使用による免疫不全患者などでは重篤化することが多い。

VZV は、ヒトを自然宿主とするヘルペスウイルスのなかで唯一、効果的なワクチンが開発されている。1974 年、高橋らのグループが開発した水痘生ワクチンは、現在、全世界で用いられている¹⁾。米国では小児に対する定期接種の対象となってから 10 年以上が経過しているが、その高い効果が示されている。水痘生ワクチンの導入以降、水痘による死者数は急激に減少した²⁾。さらに、近年では帯状疱疹に対する防御効果もあることが示されている³⁾。この水痘生ワクチンは病気発症を予防するワクチンとしての効果が高いことに加え、安全性が高いという特徴がある。

本稿では、水痘ワクチン株である Oka 株 (vOka) の高い安全性を基盤とした組換え多価弱毒生ワクチン開発の試みについて紹介する。

^{*1)} Laboratory of Virology and Vaccinology, Division of Biomedical Research, National Institute of Biomedical Innovation 独立行政法人医薬基盤研究所感染制御プロジェクト

^{*2)} Division of Clinical Virology, Kobe University Graduate School of Medicine 神戸大学大学院医学研究科臨床ウイルス学分野

図1 ヘルペスウイルス粒子の基本構造

a: ヘルペスウイルス粒子の基本構造

ヘルペスウイルスの粒子は、コア、カプシド、テグメント、エンベロープから構成される。コアにはウイルスゲノムDNAが含まれている。エンベロープ上には、宿主細胞への吸着、侵入に重要な糖蛋白質が存在している。

b: VZV ゲノムの構造

VZV ゲノムはUL(Unique Long), US(Unique Short)とよばれる領域にわけられる。それぞれの末端には繰り返し配列TRL, IRL, IRS, TRSが存在する。

ヘルペスウイルスの構造

VZV はヒトを自然宿主とする α ヘルペスウイルスの一つである。ヘルペスウイルスの粒子は球形で、直径 150~200 nm であり、内側からコア、カプシド、テグメント、エンベロープの基本構造をとる(図 1a)。ゲノム DNA はコア蛋白質とともにコアを形成している。コアとカプシドは一体となりヌクレオカプシドを形成する。テグメントはヌクレオカプシドとエンベロープの間にあり、さまざまな蛋白質などを含む。エンベロープは脂質二重膜と主にウイルス特異的な糖蛋白質から構成されている。ウイルス粒子表面の糖蛋白質は宿主細胞上に存在するレセプターと結合することで感染細胞宿主域を決定する重要なリガンドとして機能している。

VZV のゲノムは全長で 125 kb であり、大きく UL と US の領域にわけられる(図 1b)。UL と US の両端にはそれぞれ繰り返し配列(TRL, IRL, IRS, TRS)が存在している。VZV は全体で 74 個の open reading frame (ORF) を持っている。これらの ORF は、ウイルス増殖に与える影響から、大きく必須遺伝子と非必須遺伝子にわけることができる。必須遺伝子は、欠損させるとウイルスの複製が不可

能になる遺伝子群であり、ウイルス感染初期に働く転写調節因子、カプシド蛋白質、ウイルスゲノム複製に関わる酵素などがあげられる。非必須遺伝子は、これを欠損させてもウイルスの培養細胞中での増殖に変化を与えない遺伝子群である。したがって、非必須遺伝子を欠損させ、代わりに大きなサイズの外来遺伝子発現カセットを挿入した組換えウイルスを作成することも可能である。

水痘生ワクチンの開発

水痘ワクチンは臨床分離株(Oka 株)由来の弱毒化生ワクチンとして、免疫不全児に対しても安全かつ有効に免疫を誘導させることを目的として開発された。ワクチン株(vOka 株)は Oka 原株(pOka 株)を 34℃でヒト細胞に 11 代、モルモット胎児細胞で 12 代の継代を行うことにより弱毒化されている¹⁾。これまでに全世界で 46 カ国、5,000 万人を超える人に接種されている⁴⁾。

水痘生ワクチンの安全性と弱毒化変異

水痘ワクチンは健康児への接種時にはほとんど副反応がない。米国では認可されたワクチン接種がはじまってから 10 年以上が経過しているが、水痘ワクチンの弱毒化と安全性が示されている⁴⁾。白血病患者やネフローゼ患者などの患者に対するワクチン接種が可能である点も、水痘ワクチン株の弱毒化と安全性を示しているといえる^{1,5~7)}。

pOka 株と vOka 株の全ゲノム配列が 2002 年に解読されている⁸⁾。両者のゲノム配列を比較すると、全体で 42 個所の塩基配列の置換があり、そのうち 21 個所に既知の ORF に対するアミノ酸置換がある。21 個所のうち 8 個所はウイルス側の転写調節因子をコードする IE62 という遺伝子に集積している。

また、vOka 株は複数のクローンの mixture であることもわかっており、これら 21 個所のうち、6 個所がすべてのワクチン株クローンに共通に存在している変異である。IE62 における点変異がワクチン株の弱毒化に重要である可能性が示唆されてい

る⁸⁾ものの、一方ではIE62における単独の変異だけでは弱毒化の証明は難しいとの報告もある⁹⁾。すなわち、ワクチン株の弱毒化には複数のORFに対する変異が関与している可能性が高いと考えられる。

vOka 株を用いる利点

外来遺伝子を挿入した組換え vOka を多価生ワクチンとして投与する場合、vOka 株はいくつかの利点を有している。

① vOka 株は時期を選べば免疫抑制者にも投与可能な程度に弱毒化されており、副反応もほとんどない。このため骨格として用いる vOka 株ゲノムはそれ自体の安全性が高いといえる。

② ヘルペスウイルスは大きなサイズの DNA をゲノムとしており、比較的大きなサイズの DNA を外来遺伝子発現カセットとして挿入できる。VZV のゲノムは全長で 125 kbp であるが、非必須遺伝子を欠損させることにより、組み込むことの出来る DNA のサイズを増加させることも可能と考えられる。

③ 組換え多価ワクチンは、生ワクチンであることより、宿主生体内における液性免疫と細胞性免疫の両方の免疫能を誘導できる可能性がある。ある病原体の表面に存在する蛋白質をコードする遺伝子を外来遺伝子として vOka ゲノムに組み込み、宿主細胞内で発現させることにより、中和抗体産生を誘導できる可能性がある。さらに、組換えウイルス感染細胞内で発現された外来蛋白質は、プロテアソームにより部分消化される。細胞内で部分消化されたペプチドは小胞体内へ輸送され、MHC クラス I 分子と結合することで細胞表面へ提示され、細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導する。これにより外来遺伝子産物特異的な CTL の誘導が期待される。

④ 組換えウイルスの増殖をアシクロビルなどの抗ウイルス薬によりコントロールすることが可能である。 α ヘルペスウイルス感染症の治療にはアシクロビルなどの抗ウイルス薬が効果的である。アシクロビルはウイルス感染細胞内でウイルスチミジンキナーゼ(tk)の働きによりリン酸化され、複製中のウ

イルスゲノム DNA に取り込まれることでウイルスの DNA 複製を阻害する。仮に、組換えウイルスが患者体内で異常に増殖したとしても、抗ウイルス薬の投与によりウイルス増殖を抑制することが可能であると考えられる。

外来遺伝子組換え法

ヘルペスウイルスの組換えは、従来、培養細胞内における相同組換え法によって行われていた。この方法では、外来遺伝子発現カセットと感染性のあるウイルスゲノム DNA を同時にトランスフェクションし、形成されたプラークを単離し組換えの有無を判定することになる。しかしながら、感染性のある VZV ゲノム DNA を精製する方法に熟練を要する。加えて tk 遺伝子をターゲットに組換えが行われている場合、tk 遺伝子を除去された組換えウイルスはアシクロビル感受性を失う。組換えウイルスの生体内での増殖を抗ウイルス薬によりコントロールできるという点から考えると、tk 遺伝子をターゲットに外来遺伝子を挿入することは大きな欠点となる。

VZV ゲノムを分割してコスミドに組み込み、組換えウイルスを作成する方法も確立されている¹⁰⁾。この方法では VZV ゲノムをいくつかの断片に分割し、別々のコスミドにクローニングしたものをを用いる。大腸菌内で外来遺伝子を挿入し組換えたコスミドと、他の断片を持つコスミドを同時に培養細胞へ導入することで組換えウイルスを作成する。

近年、Bacterial artificial chromosome (BAC) 配列をヘルペスウイルスゲノムに挿入することにより、ヘルペスウイルスの完全長ゲノムを大腸菌内で安定的に保持することが可能となった¹¹⁾。大腸菌における DNA 組換え機構を利用することで、現在では欠失、挿入、点変異といったさまざまな変異体を自由自在に作出することが可能となっている。大腸菌内で組換えた vOka ゲノムを培養細胞へ導入することでウイルスの再構成を行う (reconstituted vOka : rvOka)。

BAC 配列内には GFP 遺伝子が組み込まれており、rvOka-BAC 感染細胞は GFP を発現する

表 1 これまでに作制された外来遺伝子組換え vOka 株

外来遺伝子名	由 来	挿入箇所	外来遺伝子産物のウイルス粒子への取り込み	モルモットにおける中和抗体産生	モルモットにおける皮内反応	参考文献
gp350/220	EBV	tk (ORF36)	+			Lowe et al., 1987 ¹⁴⁾
HBs	B 型肝炎ウイルス	tk	—			Shiraki et al., 1991 ¹⁵⁾
HIV env	HIV	tk	+		+	Shiraki et al., 2001 ¹⁶⁾
gD	HSV-2	ORF65-66 間領域	+	+		Heineman et al., 1995 ¹⁷⁾
MuV-HN	ムンプスウイルス	ORF13	—	+		Somboonthum et al., 2007 ¹³⁾

図 2 rvOka-BAC 感染細胞における GFP の発現
vOka-BAC ゲノムをヒトメラノーマ細胞に導入し、ウイルスを再構成させた。トランスフェクション 5 日後に GFP を発現しているブランクを撮影した。

(図 2)。筆者らは vOka ゲノムに BAC 配列を組み込んだ vOka-BAC を開発し¹²⁾、これを利用した多価ワクチン開発を試みている¹³⁾。

これまでに報告された組換え VZV

vOka を利用した組換えウイルスは、これまでに Epstein-Barr virus (EBV) の糖蛋白質 gp350/220, B 型肝炎ウイルス表面抗原, HIV env, 単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) 糖蛋白質 gD, ムンプスウイルス (Mumps virus : MuV) hemagglutinin-neuraminidase (HN) などが報告されている (表 1)。中和抗体と CTL の両方を誘導するために、ウイルスの表面に存在する蛋白質をターゲットとして組換え VZV が作成されている。

1. EBV 糖蛋白質 (gp350/220)¹⁴⁾

はじめて vOka 株に外来遺伝子を挿入した報告

は、EBV の糖蛋白質 gp350/220 を発現する組換えウイルスであった。EBV gp350/220 をコードする配列を VZV tk 遺伝子領域に挿入した、という報告である。

得られた組換えウイルスを MRC5 細胞に感染することで、EBV gp350/220 の発現が確認され、組換えウイルス感染細胞における gp350/220 は EBV 感染時と同様の翻訳後修飾を受けていることが示されている。また gp350/220 は組換え VZV ウイルス粒子表面にも存在していることが確認されている。

2. B 型肝炎ウイルス表面抗原¹⁵⁾

B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs) 遺伝子を vOka tk 領域に組み込んだ場合、発現された HBs は VZV ウイルス粒子には取り込まれず、HBs 抗原粒子を形成し培養上清中に分泌されていた。

モルモットを用いた免疫反応試験では、組換えウイルスは、VZV に対する免疫誘導能に加え、HBs に対して HBs サブユニットワクチンと同程度の免疫誘導能が確認されている。

3. HIV env¹⁶⁾

HIV env 遺伝子を VZV tk 遺伝子領域に挿入した例も報告されている。組換えウイルスをモルモットに投与することにより、モルモット血清中に VZV および HIV に対する特異抗体の産生が確認された。皮内反応試験において、組換えウイルスを投与したモルモットは VZV 抗原および HIV 抗原に対して強い反応を示した。このことは組換えウイルスが VZV と HIV に対する細胞性免疫を誘導していることを示している。

4. HSV-2 glycoprotein D (gD)¹⁷⁾

これまでの三例は VZV ゲノムの tk 領域に外来

図3 vOka-BACを用いた組換えウイルス作成の一例

a: vOka-Bac ゲノム, b: Insertion sequence

c: vOka-BAC-HN ゲノム, d: rvOka-HN ゲノム.

BAC 配列は vOka ゲノムの ORF11-12 間領域に挿入されている(a). CMV プロモーターの下流に MuV-HN 遺伝子を挿入した発現カセットを, ORF12, 14 の配列で挟んだプラスミドを用意する(b). これを相同組換えにより vOka-BAC ゲノムに挿入する(c). 組換えた vOka-BAC ゲノムを培養細胞内へ導入し, 増殖能のあるウイルスを再構築する. 得られた組換えウイルスを Cre 発現細胞に感染させることにより loxP で挟まれた BAC 配列を除去できる(d).

遺伝子を挿入した組換えウイルスである. このほかに, コスミドを利用し, HSV-2 糖タンパク質 gD を vOka ORF65 と ORF66 の間に挿入した例が報告されている. HSV-2 gD は HSV-2 の宿主細胞への吸着, 侵入に関わる分子である.

組換えウイルス感染細胞内における HSV-2 gD の発現が確認され, HSV-2 gD は組換え VZV ウィルス粒子表面にも検出された. 組換えウイルス感染細胞をモルモットに免疫し, HSV-2 に対する中和抗体が産生された. また, 組換えウイルス感染細胞で免疫されたモルモットは経膈感染させた HSV-2 に対して抵抗性を示した.

5. MuV-HN¹³⁾

著者らは, おたふくかぜの原因ウイルスである MuV の粒子構成タンパク質 HN を外来遺伝子とし

て vOka-BAC に保持させた組換えウイルスについて報告している. HN は MuV の宿主細胞への吸着侵入に関わる分子であり, MuV のウイルス粒子表面に存在している. このため HN は中和抗体のターゲットとなりうる.

大腸菌内で MuV HN 遺伝子発現カセットを vOka-BAC ゲノム上の ORF13 と入れ替え(vOka-BAC-HN: 図 3c), 培養細胞内で Cre-loxP 組換えにより BAC 配列を除去した感染性のある組換えウイルスを作成した(rvOka-HN: 図 3d). 組換えウイルス rvOka-HN 感染細胞内では VZV 遺伝子産物のほかに MuV HN の発現が確認できた. 免疫電顕による解析により MuV-HN 分子は rvOka-HN ウィルス粒子表面には存在していなかった.

この組換えウイルスをモルモットに経鼻接種することで, 血清中に VZV に加え, MuV に対する中和抗体活性を誘導できた. また, vOka と rvOka-HN のアシクロビルに対する感受性は, vOka と同等であることを示している.

以上のように, vOka ゲノムを骨格とした外来遺伝子組換えウイルスにより, 実験動物レベルで外来遺伝子に対する免疫が誘導されることが確認されている.

問題点と今後の課題

組換えウイルス粒子上に外来糖蛋白質が存在する場合, 組換えウイルスの宿主親和性が変化する可能性がある. 仮に, 組換えウイルスの宿主域が拡がり, 本来増殖できない細胞内においてウイルス増殖が起こったとしても, TK 遺伝子を温存させておけば, アシクロビルやそのアナログの抗ウイルス薬で組換えウイルスの増殖を抑制することが出来ると考えられる. また, vOka 株の持つ高い安全性を考慮すると, 組換えウイルスによる重篤な副反応が起こる可能性は低いと考えられる.

以上の点を考慮すると, 筆者らが作成した HN 遺伝子を保持した組換え水痘ウイルスは, HN 遺伝子がウイルス粒子中には存在せず, また TK 遺伝子も温存されていることから, 多価生ワクチンとしての

候補としてより適しているのではないかと考えられる。

VZV が感染可能な実験動物が霊長類以外ではモルモットのみであることも、VZV を用いた多価ワクチン研究の発展を抑制している点である。モルモットは、マウスと比較し免疫学のバックグラウンドが構築されていないために解析手法に乏しい。VZV の病原性評価には免疫不全マウスにヒトの組織を保持させた SCID-hu マウスも利用されている。しかしながら、ヒト組織を使うために倫理的問題やサンプル供給の面で困難な点も多い。以上の点から、多価ワクチンの *in vivo* での詳細な免疫誘導能の評価系が必要である。

vOka-BAC を用いた組換えウイルス利用の将来性

vOka-BAC を用い複数の外来遺伝子を単一の vOka ゲノムに挿入、発現させることで、多価ワクチンを開発できる可能性がある。無菌性髄膜炎などの臨床反応の問題で日本では使用中止となっている MMR ワクチン(麻疹、ムンプス、風疹の混合ワクチン)を再構成することも可能であると考えられる。麻疹ウイルス、ムンプスウイルスおよび風疹ウイルスの免疫原性のあるウイルス表面蛋白質をコードする遺伝子を単一の vOka-BAC ゲノムに挿入した組換え水痘ウイルスを作成することで、そういった副反応を抑えた、そして一度の接種で可能な4価の生ワクチンを開発できる可能性がある。

また、vOka-BAC を利用することで、いまだ効果的なワクチンの開発されていない危険なウイルス感染症に対しても、組換えワクチンを作成することが可能である。原因ウイルスのゲノム配列から中和抗体のターゲットとなる遺伝子を選び、vOka-BAC ゲノムに保持させることにより、安全なワクチンを開発することが出来る可能性がある。

vOka-BAC を用いた遺伝子治療用のベクターの開発も可能である。ヘルペスウイルスベクターは比較的大きなサイズの外来遺伝子発現カセットを挿入可能である。また VZV は神経細胞に感染することも知られている。部位特異的プロモーターを組み合

わせることにより、特定の組織内でのみ治療用遺伝子を発現させることが可能であると考えられる。

ヘルペスウイルスの特徴の一つとして、宿主に一生にわたり潜伏感染していることがあげられる。潜伏感染の成立、維持の具体的な分子メカニズムは明らかとなっていないが、潜伏感染機構を利用することで治療用遺伝子の持続的な発現を実現できる可能性がある。特に VZV を含む α ヘルペスウイルスは神経細胞に潜伏感染しており、この潜伏感染機構を利用することが出来れば、患者にかかる負担を最小限に治療を実施することも可能と考えられる。

このように、vOka をベースとし外来遺伝子を挿入した組換え水痘ウイルスは、生体内への感染によって保持する外来遺伝子に対する免疫を誘導できることが明らかとなった。またすでに認可されている弱毒生ワクチンであることから、vOka は組換え多価ワクチンを作成するための骨格として理想的であると考えられる。

また、vOka-BAC はウイルスベクターとしても応用できる可能性を秘めている。本組換えワクチンの実用化に向けて、さらなる解析が必要である。

文 献

- 1) Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T : Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet* 2 : 1288-1290, 1974.
- 2) Nguyen HQ, Jumaan AO, Seward JF : Decline in mortality due to varicella after implementation of varicella vaccination in the United States. *N Engl J Med* 352 : 450-458, 2005.
- 3) Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE et al. : A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med* 352 : 2271-2284, 2005.
- 4) Galea SA, Sweet A, Beninger P, Steinberg SP, Larussa PS et al. : The safety profile of varicella vaccine : a 10-year review. *J Infect Dis* 197 Suppl 2 : S165-169, 2008.
- 5) Gershon AA, LaRussa P, Steinberg S : The varicella vaccine. *Clinical trials in immunocompromised individuals*. *Infect Dis Clin North Am* 10 : 583-594, 1996.
- 6) Hattori A, Ihara T, Iwasa T, Kamiya H, Sakurai M et al. : Use of live varicella vaccine in children with acute leukaemia or other malignancies. *Lancet* 2 : 210, 1976.
- 7) LaRussa P, Steinberg S, Gershon AA : Varicella vaccine for immunocompromised children : results of collaborative studies in the United States and Canada. *J Infect Dis* 174 Suppl 3 : S320-323, 1996.
- 8) Gomi Y, Sunamachi H, Mori Y, Nagaike K, Takahashi M et al. : Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. *J Virol* 76 : 11447-11459, 2002.
- 9) Cohrs RJ, Gilden DH, Gomi Y, Yamanishi K, Cohen JI :

- Comparison of virus transcription during lytic infection of the Oka parental and vaccine strains of Varicella-Zoster virus. *J Virol* 80 : 2076-2082, 2006.
- 10) Cohen JI, Seidel KE : Generation of varicella-zoster virus (VZV) and viral mutants from cosmid DNAs : VZV thymidylate synthetase is not essential for replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 : 7376-7380, 1993.
 - 11) Wagner M, Ruzsics Z, Koszinowski UH : Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol* 10 : 318-324, 2002.
 - 12) Yoshii H, Somboonthum P, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y : Cloning of full length genome of varicella-zoster virus vaccine strain into a bacterial artificial chromosome and reconstitution of infectious virus. *Vaccine* 25 : 5006-5012, 2007.
 - 13) Somboonthum P, Yoshii H, Okamoto S, Koike M, Gomi Y et al. : Generation of a recombinant Oka varicella vaccine expressing mumps virus hemagglutinin-neuraminidase protein as a polyvalent live vaccine. *Vaccine* 25 : 8741-8755, 2007.
 - 14) Lowe RS, Keller PM, Keech BJ, Davison AJ, Whang Y et al. : Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 : 3896-3900, 1987.
 - 15) Shiraki K, Hayakawa Y, Mori H, Namazue J, Takamizawa A et al. : Development of immunogenic recombinant Oka varicella vaccine expressing hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol* 72 (Pt 6) : 1393-1399, 1991.
 - 16) Shiraki K, Sato H, Yoshida Y, Yamamura JI, Tsurita M et al. : Construction of Oka varicella vaccine expressing human immunodeficiency virus env antigen. *J Med Virol* 64 : 89-95, 2001.
 - 17) Heineman TC, Connelly BL, Bourne N, Stanberry LR, Cohen J : Immunization with recombinant varicella-zoster virus expressing herpes simplex virus type 2 glycoprotein D reduces the severity of genital herpes in guinea pigs. *J Virol* 69 : 8109-8113, 1995.