

## 【第42回 小島三郎記念文化賞】

# ヘルペスウイルスに関する基盤研究とその応用

## Fundamental research on human herpesviruses and its clinical application

にし やま ゆき ひろ  
西山 幸 廣  
Yukihiro NISHIYAMA

### はじめに

私は、四半世紀にわたりヘルペスウイルスの基礎研究に従事してきましたが、一方でヘルペスウイルス感染症の制御を目的とした応用研究、臨床研究にも取り組んでまいりました。今回の受賞はこれまでの仕事を総合的に評価していただいたものと理解し、私が米国留学以来行ってきたヘルペスウイルス研究の概略を紹介させていただきます。

### I. ヘルペスウイルス

ヘルペスウイルスは2本鎖DNAをゲノムとする大型の動物ウイルスで、現在までにさまざまな動物から150種以上のウイルスが分離されている。哺乳類はもちろん、鳥類、両生類、爬虫類、魚類などから多種類のヘルペスウイルスが発見されており、精査すればすべての脊椎動物に種固有のヘルペスウイルスが存在するのではないかと推定されている。ヒトを固有の宿主とするヘルペスウイルスには単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2)、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、Epstein-Barrウイルス (EBV) の5種に、AIDSの登場以降相次いで発見されたヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス7 (HHV-7)、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV、HHV-8) を加えて計8種類が知られている (表1)。

ヘルペスウイルスに共通するのは正20面体のカプシドとエンベロープを有したその特徴ある形態に

加え、宿主に持続感染することで、一旦感染すればその個体は生涯にわたりウイルスを保有することになる。初感染時の活発なウイルス産生期を除けば、感染ウイルスの排泄はほとんど検出されない程度であるが、宿主の免疫状態やさまざまな刺激によって時に活性化される。ヒトのヘルペスウイルスは、進化的にもヒトを固有の宿主として常在してきたもので、インフルエンザウイルスや麻疹のように大流行を起こすことはない。また、健常人に対して致命的になることもほとんどない。しかし、8種のヒトヘルペスウイルスはいずれも初感染あるいは再活性化に伴い多彩な疾患を起こす。EBVやHHV-8のように悪性腫瘍の発生と深い関わりをもつものもある。一方、1977年にHSVやVZVに対する特効薬としてアシクロビルが開発され、致命的なヘルペス脳炎に対しても効果的な治療が可能となった。また、VZVに対してはワクチンが開発され、水痘の制御に対しては抗ウイルス剤とワクチンの2つの選択肢をもつことになった。しかし、VZV以外のヘルペスウイルス感染症に対しては有効なワクチンはまだ開発されていない。ヘルペスウイルス感染症は老人やAIDS患者の増加、臓器移植や抗がん剤などの医療技術の進展などに伴う感染性宿主の増大によって、重症化、難治化することが予想される。また、性器ヘルペス、先天性CMV感染症、難治性のEBV感染症、HHV-6による中枢神経系障害など先進諸国においては今後しばらくはヘルペスウイルス感染症の重要性は減じることはないであろう。したがって、新規な治療法あるいはワクチンの開発のためにもヘルペスウイルスについての基盤研究は欠くことはできないといえる。

## II. ヘルペスウイルスに関する基盤研究

HSVはヘルペスウイルスの中で最も早くに分離され、ウサギやマウスなどの実験動物などに対してもヒトとよく似た病変を作る。この点、宿主依存性が強く動物実験が困難な他の多くのヘルペスウイルスとは異なる。また、培養細胞での増殖も速く、感染価の定量が容易である。このような理由から、HSVはヘルペスウイルス科のプロトタイプとして集中して研究が行われ、分子生物学的な理解が最も進んでいる。とはいっても、小型、中型DNAウイルスであるSV40やアデノウイルスなどに比べればまだまだ分かっていないことが多い。

### 1. DNAポリメラーゼを中心としたDNA複製関連蛋白質についての研究

1980年代初めは、遺伝子工学的な技術が急速に進化した時期ではあったが、ヘルペスウイルスのような大きなゲノムをもつウイルスのヘルペスウイルス遺伝子構成はほとんど分かっておらず、まだblack boxの状態といえた。私はウイルス増殖の要であり、また抗ヘルペス剤の標的としてのウイルスDNA複製関連蛋白質（酵素）に着目し、まずはウイルスDNAポリメラーゼを研究対象とすることにした。当面の目標は、ウイルスDNAポリメラーゼ

の生化学的性状の決定とDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニングとした。前者に関しては、それまではほとんど研究されていなかったCMV DNAポリメラーゼの精製と生化学的性状決定を行うとともに、HSVポリメラーゼに付随する3'-5'エキソヌクレアーゼが校正機能（proof reading）をもつこと、高い読み取り忠実度（fidelity）をもつことを明らかにした。またDNAポリメラーゼ阻害剤アフィジコリン（Aph）、ホスホノ酢酸（PAA）に耐性のHSVを分離し、耐性DNAポリメラーゼの性状を明らかにした。面白いことにAph<sup>r</sup>変異株は、野生株に比べ突然変異の頻度が高いミューテーター（mutator）の、PAA<sup>r</sup>株はアンチミューテーター（antimutator）の形質を示した。原核生物のDNAポリメラーゼでは、付随する3'-5'エキソヌクレアーゼの活性がDNAポリメラーゼ活性に比し相対的に減少するとミューテーターになる例が知られているが、この系ではこのような変化はなく、基質となるdNTPに対するKm値に変化が認められた。これらの観察は、自然界で存在するHSV DNAポリメラーゼが必ずしも最もfidelityの高いものが選択されているわけではないことを意味している。

Aph<sup>r</sup>株の変異はDNAポリメラーゼ遺伝子上にあることが生化学的解析から明らかになったので、DNA断片によるmarker transfer実験により遺伝子地図上での位置決定を試みた。その間に、HSV

表1 ヒトヘルペスウイルスの特徴

ウイルス名	亜科	ゲノムサイズ / 遺伝子数	主な潜伏感染部位	疾病
HSV-1	$\alpha$	152kb/74以上	知覚神経節 (三叉神経節など)	口唇ヘルペス、性器ヘルペス、カポジ水痘様発疹症、ヘルペス脳炎、角膜ヘルペス、ベル麻痺
HSV-2	$\alpha$	155kb/74以上	知覚神経節 (仙髄神経節など)	性器ヘルペス、新生児ヘルペス、脊髄炎、無菌性髄膜炎、急性網膜壊死
VZV	$\alpha$	125kb/70以上	知覚神経節 (脊髄後根神経節など)	水痘、帯状疱疹、ラムゼー・ハント症候群
EBV	$\gamma$	180kb/約84	Bリンパ球	伝染性単核球症、慢性活動性EBV感染症、上咽頭癌、バーキットリンパ腫、EBV関連胃癌
HCMV	$\beta$	230-240kb/200以上	顆粒球、マクロファージ前駆細胞	間質性肺炎、CMV網膜症、CMV単核球症、先天性巨細胞封入体症
HHV-6	$\beta$	162kb/約120	マクロファージリンパ球	突発性発疹症、脳炎・脳症
HHV-7	$\beta$	145kb/約110	唾液腺?	突発性発疹症
HHV-8	$\gamma$	165kb/約80	Bリンパ球	カポジ肉腫 (エイズ関連型・古典型・アフリカ型) キャスルマン病、悪性Bリンパ腫 (body cavity)

DNAポリメラーゼ遺伝子の全塩基配列が欧米のグループから報告されてしまったが、われわれは1240個のアミノ酸のたった1つのアミノ酸置換によってDNAポリメラーゼの性状に大きな変化が誘導されることを明確にした。

1980年代半ばから後半にかけて、この領域での大きな進展はChalleberg, McGeochらによってHSV DNA複製に必須となる遺伝子(領域)の同定がなされたことである。また、1988年にはHSVゲノムの全塩基配列が決定されたことにより、どのレベルの実験においてもアプローチは“現象(蛋白質)から遺伝子(DNA)へ”から、“遺伝子から現象へ”と大きく転換されることになった。その後、ウイルスDNA複製関連蛋白質の性状と蛋白質間の相互作用についての研究は、主にEBVを対象として鶴見達也君(現愛知県がんセンター研究所部長)らによって展開されることになった。

## 2. 病原性発現機構についての研究

全塩基配列が決定されたことにより、HSVは少なくとも70数個の遺伝子を保有することが明らかになったが、1988年の時点ではカプシド構成蛋白質、エンベロープ糖蛋白質、ウイルスDNA複製に関わる酵素群、転写制御因子などを除き、その機能、役割は全く不明であった。しかし、全遺伝子構成が明らかにされ、また一方で特定の遺伝子を不活化した欠損ウイルスをpositive selectionで拾い上げる技術が確立されたことにより、個々の遺伝子の役割を明らかにしていく道が開かれた。

上述したようにHSVはヒト以外の動物にも感染し、病変を形成する。都合の良いことにマウスはHSVに対して感受性が高く、分子生物学的なアプローチが可能になる以前から、潜伏感染、神経病原性などの研究によく用いられてきた。われわれはリボヌクレオチド還元酵素(RR)、チミジンキナーゼ(TK)欠損ウイルスを用いて検討し、HSVの神経病原性における両酵素の役割を明らかにした。また、中枢神経系に到達できない2種の弱毒株の混合感染により、極めて効率よく中枢に侵入しうること、その機構はrecombinationによるものではなくむしろcomplementationによるものであることを明らかにした。これらの動物実験において、HSV2型は1型に比べマウスに対する神経病原性が強く、毒力の測

定が容易であること、1型は野生株といえども培養細胞での継代により比較的容易に病原性を失うのに対し、2型は維持されることを確認した。したがって、病原性の分子基盤を明らかにするためには2型の方が解析系としてより適していると判断した。

HSVは3種類(US3, UL13, UL39)の蛋白質キナーゼ(PK)をコードしている。われわれは、US3 PK, UL13 PKを感染細胞から精製し、その生化学的性状を明らかにするとともに、US3欠損ウイルス(US3Δ)を神経病原性の強い野生株HSV-2 186を親株として作製した。US3ΔはVero細胞での増殖性は野生株と比べほとんど変わらないにもかかわらず、成熟マウスの末梢部(腹腔内、足、角膜など)への接種による病原性は著しく低下(約1万分の1)した。しかし、脳内接種では10分の1以下の低下しか認められなかった。すなわちUS3の欠損によって、神経病原性(脳内での増殖性)は維持されるものの、末梢から中枢神経系への侵襲性はほとんど喪失した。臍感染系においても親株、US2欠損株(US2Δ)、US3Δの病原性を比較した。US2Δの病原性や挙動は親株と比べ有意な差は認められなかった。一方、US3Δは他の末梢接種系と同様、病変形成が認められなかったにもかかわらず、局所へのマクロファージ、T細胞の浸潤が強く誘導されていた。臍局所におけるサイトカインの濃度も、US3Δ感染マウスではIL-12, IFN-γなどのTh1タイプが有意に高かった。この観察はUS3Δが性器ヘルペスにおける再発抑制のための生ワクチンとして応用しうる可能性を示唆しており興味深い。

一方、US3PKは抗アポトーシス作用をもっていることが判明し、その機構についても研究を行った。抗アポトーシス作用の誘導にはUS3PK単独の発現で十分であること、ストレス負荷によるJNKの活性化を抑制することを示したが、未だアポトーシス抑制に関わるUS3PKの宿主側標的分子は同定されていない。US3PKは、その他にもウイルス側の蛋白質としてUL34, UL31, US9, UL12, UL46などをリン酸化し、カプシドの核からの脱出、テグメント蛋白質の安定化にも関与している。また、US3PKの単独発現はアクチンフィラメントの崩壊を誘導するなど、極めて多彩な機能・役割を担っている。

野生株をマウスの末梢に接種するとウイルスは神経細胞より侵入し軸索を通過して上行し、知覚神経節

さらには脊髄、脳幹部に達して脳炎を惹起する。その過程における神経細胞との相互作用をアポトーシス誘導の有無を中心に検討した。その結果、中枢神経系の多くの神経細胞は野生株の感染によってアポトーシスを起こすが、三叉神経節神経細胞や嗅神経細胞ではHSVの感染によってアポトーシスを起こさない。しかし、US3 Δの感染ではいずれもアポトーシスが誘導される。三叉神経節での潜伏感染と増殖はHSVのライフサイクルに必須であり、一方、嗅神経経路の侵入は脳炎の発症に関わっている可能性がある。これらの観察は、US3PKがHSVの病原性発現制御において重要な役割を担っていることを示している。

### 3. ウイルス遺伝子機能の解析

1994年に研究室を主宰することになり、長期的な展望の中で研究室として総合的な力を蓄積していくことのできるテーマを考えた。欧米には、HSVの基礎研究だけを目的に数十年続いた大きな研究室

がいくつもあり、こうした所と対等にわたりあえるだけの材料をそろえていくことも必要であった。上述したようにHSVはヘルペスウイルスのプロトタイプとして、かつてのT4ファージのように徹底的な解析の対象とされていくだろう。われわれはすでにその時点でHSV-2ゲノムのライブラリーを保有しており、また変異ウイルスもいくつか作製していたので、まずは機能が全く分かっていない遺伝子を対象に網羅的に産物の同定、機能解析を行うことにした。その過程で個々の遺伝子産物に対する特異的抗体や変異ウイルスも揃えていけるだろう。このようにして約10年間、他の研究と並行してこのテーマを動かしてきた。その結果、現在では欧米からの情報ともあわせ、全く手つかずの遺伝子産物はほとんどなくなった。培養細胞での増殖に必須ではない、アクセサリ遺伝子を中心に30種以上の遺伝子産物を手がけたが、すでに述べたUS3を始め、UL34, UL13, UL14, UL21, UL56, US2の機能解析では欧米に先駆けた成果を挙げることができた(表2)。

表2 われわれが基本的性状、機能などを決定したHSV遺伝子産物

遺伝子産物	分子量	性状、機能など
UL3	31 ~ 34K	リン酸化蛋白質；主に核内に分布；単独発現で核小体に分布
UL4	27K	核に分布；粒子構成蛋白質
UL13	57K	セリン/スレオニンキナーゼ；リン酸化テグメント蛋白質；細胞プロテインキナーゼcdc2を模倣？
UL14	32 ~ 34K	リン酸化テグメント蛋白質；熱ショック蛋白質によく似た挙動を示す；分子シャペロン機能をもつ；ウイルス粒子の成熟と細胞内輸送に関与？
UL16	41K	核内に顆粒状に分布；後期蛋白質でCカプシドを相互作用するが完成粒子中には検出されない
UL17	78K	細胞内カプシドと相互作用；核内に分布
UL21	62K	リン酸化テグメント蛋白質；単独発現で細胞に突起形成を促す；微小管と相互作用
UL24	31 ~ 32K	粒子構成蛋白質；主に核周辺に分布する後期蛋白質
UL34	31 ~ 33K	C末端アンカー型膜蛋白質；UL31と複合体を形成し核内膜に分布；単独発現ではERに分布；カプシドの核からの脱出に重要
UL37	120K	主として細胞質に分布するテグメント蛋白質；核外輸送シグナルを有する
UL46	82 ~ 86K	リン酸化テグメント蛋白質；US3PKのリン酸化により安定化される
UL51	27 ~ 30K	リン酸化テグメント蛋白質；パルチミン酸化される；ゴルジ装置に分布する；粒子の成熟過程に重要
UL55	23K	核内に顆粒状に分布する後期蛋白質；粒子非構成蛋白質
UL56	32K ~ 35K	C末端アンカー型膜蛋白質；リン酸化テグメント蛋白質；ゴルジ装置、細胞内小胞に分布；ウイルス蛋白質UL11, 細胞蛋白質KIFIAと相互作用；小胞輸送に関与？
US2	39K	粒子構成蛋白質；核内に顆粒状に分布；サイトケラチンと相互作用
US3	66K	セリン/スレオニンキナーゼ；自己リン酸化能をもつ；抗アポトーシス作用をもつ；ウイルス蛋白質(UL34, US9, UL12, UL31, UL46)をリン酸化する；テグメント蛋白質UL46の安定化に関与；高発現によりアクチンフィラメント崩壊を誘導
US10	34 ~ 36K	リン酸化蛋白質；主に核内に分布；カプシドに強く結合
US11	20 ~ 21K	RNA結合性をもつテグメント蛋白質；intercellular trafficking能を有する

### Ⅲ. ヘルペスウイルスに関する応用研究

#### 1. 抗ヘルペス剤の開発

1978年に渡米した時、最初に行った実験がHSV TK発現細胞に対するアシクロビルの細胞増殖抑制作用についての検討であった。この実験の背景には当時、HSVが子宮頸癌の原因ウイルスと推定されていたことがあり、開発されたばかりの抗ヘルペス剤をがんの選択的な治療剤として使えるのではないかという発想であった。この発想は、その後TK/ガンシクロビル(GCV)の組み合わせとしてがんに対する遺伝子治療実験において頻繁に用いられることになった。

アシクロビルが大きな成功を収めつつあるのを見て、わが国でも抗ウイルス剤の開発を手がける製薬企業が出始め、共同研究の提案を申し込まれることが多くなった。HCMVに対する化学療法剤としてオキセタノシンG (oxetanocin G)、カルボサイクリックオキセタノシンG (carbocyclic oxetanocin G)、HSVとVZVを標的としたA-5021 ((1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis (hydroxymethyl) cycloprop-1'-yl] methyl] guanine) はいずれもわが国で開発されたもので、独特の糖部を有するヌクレオシドアナログであった。A-5021は、マウスを用いた感染治療実験ではアシクロビルをはるかに上回る治療指数を示し治験まで至ったが、その後の開発が諸事情により断念されたのは残念であった。

#### 2. ヘルペスウイルス感染症の病態解析、診断への応用

ヘルペスウイルス感染症はほとんどすべての臨床科と関係するといっても良い。とくにウイルス感染症に興味をもつ小児科医・研究者との共同研究は実りある結果をもたらした。木村宏君（現当教室助教授、前名古屋大学医学部小児科講師）、吉川哲史君（藤田保健衛生大学小児科助教授、前当教室助教授）は、HSV、VZV、HCMV、EBV、HHV-6感染症の早期診断、病態解析などにいち早くPCR法、Real-time PCR法、LAMP法を導入し、臨床ウイルス学分野において優れた成果を挙げた。米国で行われているJoint-appointmentのような制度がわが国にも導入され、基礎と臨床の交流がもっと深まれば、感染症

領域の研究はより活発化するのではなからうか？

#### 3. がんに対するウイルス療法の開発

ウイルス研究もさまざまな立場、切り口があり、ウイルスそのものに焦点をあてた基礎研究から、病原体としてのウイルスを重視した臨床研究、疫学研究に至るまで幅広い。ワクチンや抗ウイルス剤の開発が成功し、そしてポストゲノム時代に入りすべての医学現象が分子レベルで語れるようになると、ウイルス各論的な基礎研究の重要性は変わらないとしても医学研究の中での相対的位置が低下するのは止むを得ないだろう。そうした流れの中で、ウイルスやウイルス蛋白質をさまざまな形で利用、応用するための研究が盛んになっている。

がんの治療にウイルスを利用するという発想は以前からあり、1950年代に米国NIHで当時分離されたばかりのヒトアデノウイルス野生株を用いて子宮頸癌に対する臨床試験が実施されている。同様な試みがさまざまなウイルスを用いて散発的に試みられてきたが、本格的に研究が行われるようになったのは1990年代に入ってからである。これはウイルスに対する理解が進んだことと、遺伝子工学技術の進展によるものである。HSVの応用では、1716、G207などが英国、米国で開発され、動物モデルでの検討や臨床試験が進められてきた。これらのウイルスは主に脳腫瘍に対する使用を目的に開発が進められ、高い安全性と有効性が確認されてきたが、臨床試験での結果は必ずしも期待に沿うものとはなっていない。われわれは、躯幹部の癌に対しては、G207や1716とは異なる弱毒化機序を有した変異HSVの中に、より有効性が高く、安全性についても十分に確保しうるものが存在すると考えた。そこで着目したのが自然発生的に選択されたウイルス株から分離したHF10である。HF10はヒト由来癌細胞での増殖性が高いにもかかわらず病原性は極めて低い。また、ゲノム構造では5種のアクセサリ-遺伝子(UL56, UL55, UL49.5, UL43, LAT)の欠損、エンベロープ糖蛋白質における高頻度のアミノ酸置換などがあり、変異(表現型)の安全性も高い。さらにマウスを胆がん動物とした種々のモデル系(腹膜播種腫瘍、皮下固形腫瘍、膀胱癌など)においても、HF10は癌治療ウイルスとして優れた特性を示した。これらの結果をふまえ、数年前から再発性乳

痛、今年には頭頸部癌に対する研究的臨床試験を実施し、予想を上回る癌細胞死滅作用と安全性を確認した。現在、HF10を用いたウイルス療法は本格的な臨床試験へ向けての準備が進められており、英国企業にてGMP基準の製剤化がほぼ終了した段階にある。来年度には、頭頸部癌を対象に米国での臨床試験が予定されている。一方、われわれはHF10の抗腫瘍作用を増殖するための動物実験も並行して行っており、GM-CSF発現アンプリコンとの併用では有望な結果が得られている。

### おわりに

ヘルペスウイルスの基礎研究は、依然として重要であり、新しい事実も次々に見つかっている。こうした基礎研究があってこそ新しい治療法の開発や臨床応用も期待できるといえよう。申し上げるまでもなく、ここで述べた一連の研究は多くの大学院生、研究者の方々と共同研究の結果であり、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

### 謝 辞

このたび、伝統ある小島三郎記念文化賞を戴くことになり大変喜んでおります。選考にあられた先生方、また推薦の労をとっていただきました永井美之先生に深く感謝申し上げます。今後とも、なおいっそう研究に精進していきたいと存じます。

### 文 献

- 1) Nishiyama, Y., and Rapp, F.: Anticellular effects of 9-(2-hydroxymethyl) guanine against herpes simplex virus-transformed cells. *J. Gen. Virol.* **45** : 227-230, 1979.
- 2) Nishiyama, Y., and Rapp, F.: Enhanced capacity of DNA repair in human cytomegalovirus infected cells. *J. Virol.* **38** : 164-172, 1981.
- 3) Nishiyama, Y., and Rapp, F.: Repair replication of viral and cellular DNA in herpes simplex virus type 2-infected human embryonic and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Virology* **110** : 466-475, 1981.
- 4) Nishiyama, Y., Maeno, K., and Yoshida, S.: Characterization of human cytomegalovirus-induced DNA polymerase and the associated 3'-to-5' exonuclease. *Virology* **124** : 221-231, 1983.
- 5) Nishiyama, Y., Suzuki, S., et al.: Characterization of an aphidicolin-resistant mutant of herpes simplex virus type 2 which induces an altered viral DNA polymerase. *Virology* **135** : 87-96, 1984.
- 6) Tsurumi, T., Maeno, K., and Nishiyama, Y.: A single-base change within the DNA polymerase locus of herpes simplex virus type 2 can confer resistance to aphidicolin. *J. Virol.* **61** : 388-394, 1987.
- 7) Abbotts, J., Nishiyama, Y., et al.: On the fidelity of DNA replication: Herpes DNA polymerase and its associated exonuclease. *Nucleic Acids Res.* **15** : 1185-1198, 1987.
- 8) Nishiyama, Y., Yamamoto, N., et al.: Selective inhibition of human cytomegalovirus replication by a novel nucleoside, Oxetanocin G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32** : 1053-1056, 1988.
- 9) Nishiyama, Y., Kimura, H., and Daikoku, T.: Complementary lethal invasion of the central nervous system by non-neuroinvasive herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Virol.* **65** : 4520-4524, 1991.
- 10) Yamada, Y., Kimura, H., et al.: The pathogenicity of ribonucleotide reductase null mutants of herpes simplex virus type 1 in mice. *J. Infect. Dis.* **164** : 1091-1097, 1991.
- 11) Nishiyama, Y., Yamada, Y., et al.: Construction of a US3 lacZ insertion mutant of herpes simplex virus type 2 and characterization of its phenotype in vitro and in vivo. *Virology* **190** : 256-268, 1992.
- 12) Nishiyama, Y., Kurachi, R., et al.: The US9,10,11, and 12 genes of herpes simplex virus type 1 are of no importance for its neurovirulence and latency in mice. *Virology* **194** : 419-423, 1993.
- 13) Daikoku, T., Yamashita, Y., et al.: Purification and biochemical characterization of the protein kinase encoded by the US3 gene of herpes simplex virus type 2. *Virology* **197** : 685-694, 1993.
- 14) Yamashita, Y., Shimokata, K., et al.: Rapid degradation of the heavy chain of class I major histocompatibility antigens in the endoplasmic reticulum of human cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* **68** : 7933-7943, 1994.
- 15) Tsurumi, T., Daikoku, T., and Nishiyama, Y.: Further characterization of the interaction between Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit with regard to the 3'-to-5' exonucleotic activity and stability of initiation complex at primer termini. *J. Virol.* **68** : 3354-3363, 1994.
- 16) Yamashita, Y., Shimokata, K., et al.: Calnexin acts as a molecular chaperone during the folding of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **70** : 2237-2246, 1996.
- 17) Daikoku, T., Shibata, S., et al.: Purification and characterization of the protein kinase encoded by the UL13 gene of herpes simplex virus type 2. *Virology* **235** : 82-93, 1997.
- 18) Ono, N., Iwayama, S., et al.: Mode of action of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis (hydroxymethyl) cycloprop-1'-yl] methyl] guanine (A-5021) against herpes simplex virus type 1 and type 2 and varicella-zoster virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42** : 2095-2102, 1998.

- 19) Yamada, H., Jiang, Y. -M., et al.: Characterization of the UL55 gene product of herpes simplex virus type 2. *J. Gen. Virol.* **79** : 1985-1995, 1998.
- 20) Asano, S., Honda, T., et al.: US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 plays a role in protecting corneal epithelial cells from apoptosis in infected mice. *J. Gen. Virol.* **80** : 51-56, 1999.
- 21) Wada, K., Goshima, F., et al.: Identification and characterization of the UL14 gene product of herpes simplex virus type 2. *J. Gen. Virol.* **80** : 2423-2431, 1999.
- 22) Murata, T., Goshima, F., et al.: Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc/Rac pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation. *Genes Cells* **5** : 1017-1027, 2000.
- 23) Shiba, C., Daikoku, T., et al.: The UL34 gene product of herpes simplex virus type II is a tail-anchored type II membrane protein. *J. Gen. Virol.* **81** : 2397-2405, 2000.
- 24) Hasegawa, Y., Nishiyama, Y., et al.: Avoidance of bone marrow suppression using A-5021 as a nucleoside analog for retrovirus-mediated herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **7** : 557-562, 2000.
- 25) Tsunobuchi, H., Nishimura, H., et al.: Memory type CD8+ T cells protect IL-2R  $\alpha$ -deficient mice from systemic infection with HSV type 2. *J. Immunol.* **165** : 4552-4560, 2000.
- 26) Inagaki-Ohara, K., Iwasaki, T., et al.: Effect of the deletion of US2 and US3 from herpes simplex virus type 2 on immune responses in the murine vagina following intravaginal infection. *Vaccine* **20** : 98-104, 2001.
- 27) Takakuwa, H., Goshima, F., et al.: Herpes simplex virus encodes a virion-associated protein which promotes long cellular processes in overexpressing cells. *Genes to Cells* **6** : 955-966, 2001.
- 28) Goshima, F., Watanabe, D., et al.: The US2 gene product of herpes simplex virus Type 2 interacts with cytokeratin 18. *Arch. Virol.* **146** : 2201-2209, 2001.
- 29) Yamauchi, Y., Shiba, C., et al.: Herpes simplex virus type 2 UL34 protein requires UL31 protein for its relocation to the internal nuclear membrane in transfected cells. *J. Gen. Virol.* **82** : 1423-1428, 2001.
- 30) Yamauchi, Y., Wada, K., et al.: Herpes simplex virus type 2 UL14 gene product has heat shock protein (HSP)-like functions. *J. Cell Sci.* **115** : 2517-2527, 2002.
- 31) Koshizuka, T., Goshima, F., et al.: Identification and characterization of the UL56 gene product of herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* **76** : 6718-6728, 2002.
- 32) Nishiyama, Y., and Murata, T.: Antiapoptotic protein kinase of herpes simplex virus. *Trends Microbiol.* **10** : 105-107, 2002.
- 33) Kimura, H., Ito, Y., et al.: Quantitation of viral load in neonatal herpes simplex virus infection and comparison between type 1 and type 2. *J. Med. Virol.* **67** : 349-353, 2002.
- 34) Yoshikawa, T., Goshima, F., et al.: Human herpesvirus 6 infection of human epidermal cell line; pathogenesis of skin manifestations. *J. Med. Virol.* **71** : 62-68, 2003.
- 35) Takakuwa, T., Goshima, F., et al.: Oncolytic viral therapy for peritoneally disseminated tumor using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant in immunocompetent mice. *Arch. Virol.* **148** : 813-825, 2003.
- 36) Nozawa, N., Daikoku, T., et al.: Subcellular localization of UL51 protein of herpes simplex virus type 1 and role of palmitoylation in Golgi targeting. *J. Virol.* **77** : 3204-3216, 2003.
- 37) Nawa, A., Nozawa, N., et al.: Oncolytic viral therapy for human ovarian cancer using a novel replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant in a mouse model. *Gynecol. Oncol.* **91** : 81-88, 2003.
- 38) Nakao, A., Kimata, H., et al.: Intratumoral injection of herpes simplex HF10 in recurrent breast cancer. *Annals Oncol.* **15** : 988-989, 2004.
- 39) Nishiyama, Y.: Herpes simplex virus gene products : the accessories reflect her lifestyle well. *Rev. Med. Virol.* **14** : 33-46, 2004.
- 40) Koshizuka, T., Kawaguchi, Y., and Nishiyama, Y.: Herpes simplex virus type 2 membrane protein UL56 associates with the kinesin motor protein KIF1A. *J. Gen. Virol.* **86** : 527-533, 2005.
- 41) Nozawa, N., Kawaguchi, Y., et al.: Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles. *J. Virol.* **79** : 6947-6956, 2005.
- 42) Kato, A., Yamamoto, M., et al.: Identification of proteins phosphorylated directly by the US3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **79** : 9325-9331, 2005.
- 43) Matsuzaki, A., Yamauchi, Y., et al.: The US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 is required for the stability of the UL46-encoded tegument protein and its association with virus particles. *J. Gen. Virol.* **86** : 1979-1985, 2005.
- 44) Mori, I., Liu, B., et al.: HF10, an attenuated herpes simplex virus (HSV) type 1 clone, lacks neuroinvasiveness and protects mice against lethal challenge with HSV types 1 and 2. *Microb. Infect.* **7** : 1492-1500, 2005.
- 45) Kohno, S., Luo, C., et al.: Herpes simplex virus type 1 mutant HF10 oncolytic viruthery for bladder cancer. *Urology* **66** : 1116-1121, 2005.
- 46) Fujimoto, Y., Mizuno, T., et al.: Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Oto-Laryngologia* **126** : 1115-1117, 2006.