

5. ヘルペスウイルス感染症の克服

西山 幸廣

はじめに

“ある病気が克服された”とは、病因が明らかにされ、治療法が開発され、かつ予防ができるという状態をさすのだろう。現在、数あるウイルス感染症の中で克服されたといえるのは、恐らく、ワクチンによって根絶にまで至った天然痘だけであろう。しかし、この克服も思わぬ方向からの挑戦にさらされてはいる。では、ヘルペスウイルス感染症はどの程度まで克服されたのだろうか？この四半世紀を振り返ってみると、いずれの点でも確かに大きな進展があったといえる。抗ヘルペス剤アシクロビアの開発とその臨床応用、新たなヒトヘルペスウイルス（HHV-6, HHV-7, HHV-8）の発見、水痘ワクチンの有効性の確立などが直ちに想起される。胃癌とEBV、カポジ肉腫とHHV-8などヒトの悪性腫瘍と γ -ヘルペスウイルスとの関係、また易感染性宿主における β -ヘルペスウイルス感染症の病態についての理解も大いに進み、予防や治療に有用な情報が提供されつつある。25年前と比べると、ヒトヘルペスウイルス8種の間で差はあるものの総体的には、克服されつつあるとの印象をもつ。

私達の研究室では、現在、単純ヘルペスウイルスの遺伝子機能の解明を中心課題としており、ウイルス感染症の克服に対してはいわば側面援護の形だが、ワクチンや抗ウイルス剤の開発に参考となる知見も得られている²¹⁾。シンポジウムを機会に下記の3点について考察してみたい。1) 病因：単純ヘルペスウイルスと疾患との関連はすべて明らかになっているのだろうか？2) 治療：現在使用されている薬を上回る抗ヘルペス剤の開発は可能か？標的となりう

るウイルス蛋白質は？3) 予防：単純ヘルペスウイルス感染症に対して有効なワクチンは開発できるのか？また、最近では病原ウイルスやその遺伝子産物をベクターや癌の治療に利用しようとする試みも盛んに模索されている。ヘルペスウイルス感染症の克服を越えた今後の展望についても触れてみたい。

単純ヘルペスウイルスによる疾病

HSV-1による初感染は、ほとんどが症状をあらわすことなく不顕性感染に終わるが、時に歯肉口内炎などを起こす。いずれにしても感染したウイルスは、感染部位の皮膚、粘膜を支配する知覚神経節の神経細胞内に、その個体の生涯にわたって潜伏感染し、様々なストレス（紫外線、外傷、風邪など）によって再活性化し、回帰発症を起こす（表1）。よく知られ、頻度的にも高い口唇ヘルペスは回帰発症の代表的なものだが、臨床的な重要性には乏しい。一方、稀ではあるが致命的なヘルペス脳炎なども、成人のケースではほとんどが回帰発症の一形態であると考えられる。また、ヘルペス性角膜炎では再発を繰り返すうちに細胞性免疫を主体とする宿主反応が加わり、いわゆる実質型角膜炎となり失明の原因ともなる。その他、眼科領域のHSV感染症としてはぶどう膜炎、網膜炎も存在し、視力障害などの後遺症を残す。顔面神経麻痺と第8脳神経症状（めまい、難聴、耳鳴）を伴うRamsay Hunt症候群が同じ α -ヘルペスウイルスに属するVZVによって起こることは古くから知られているが、原因不明の末梢性顔面神経麻痺、すなわちBell麻痺がHSV-1の再活性化によって生ずることが明らかになったのは比較的最近のことである^{5,19)}。Bell麻痺は人口10万人当たり20人～30人の発症率で稀な疾患とは言えない。

本邦成人におけるHSV-1抗体の保有率は下降しつつあるとはいえ60～80%を維持している。一方、HSV-2抗体の保有率は上昇しつつあるもののまだ10%以下であり、欧米（米国では30～70%）と比べるとかなり低い⁷⁾。HSV-2は、主に性行為による接触感染によって伝播し、性器ヘルペスを起こす。性器ヘルペスはHSV-1でも多く、本邦では初感染の約半数が1型だが、再発するもののほとんどは2型である。HSV-1による初感染が急速に思春期以降

名古屋大学大学院医学系研究科・ウイルス学
(〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65)
Toward the control of herpes simplex virus infections
Yukihiro Nishiyama
Department of Virology, Graduate School of Medicine,
Nagoya University
65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, JAPAN
電話：052-744-2450
FAX：052-744-2452
e-mail：ynishiya@med.nagoya-u.ac.jp

表1 単純ヘルペスウイルスによって生ずる病気

ウイルス	軽症・中等症	重症
HSV-1	ヘルペス性歯肉口内炎 口唇ヘルペス 顔面神経麻痺 (Bell 麻痺) カポジ水痘様疹症 性器ヘルペス (急性型>再発型) 角膜ヘルペス ヘルペス性ひょう疽 網膜炎	ヘルペス脳炎 髄膜炎 新生児ヘルペス 汎発性ヘルペス
HSV-2	性器ヘルペス (再発型>急性型) 殿部ヘルペス ヘルペス性ひょう疽 網膜炎	新生児ヘルペス 髄膜炎 (2型>1型) 壊死性脊髄炎
VZV	水痘 带状疱疹 顔面神経麻痺 (Ramsay Hunt 症候群)	新生児水痘 髄膜炎

にシフトしている現状を考えると、本邦でも2型による初感染を性器ヘルペスとして経験する例が増加し、HSV-2の臨床的重要性が今後増すものと予想される。女性性器のHSV感染は、新生児ヘルペスの感染源としても重要である。無症候性にHSVを排出している女性が感染源となることも多い。HSV-2による新生児ヘルペスはHSV-1に起因するものより、中枢神経系をまきこむことが多く、重症になりやすいことが知られている。また、最近、網膜炎の一部がHSV-2感染に起因することが明らかになったが、どのような伝播経路で網膜に至ったのか、興味ある問題といえる⁹⁾。

以上のように、HSV-1、-2による感染は、小児科、皮膚科、産婦人科、眼科、耳鼻科、神経内科、など臨床各科にわたる多彩な疾患を起こす。が、HSVに起因する疾患はこれだけにとどまらず原因のわからない疾患（自己免疫疾患や中枢神経系の変性疾患など）の一部の病因として、HSVの関与が浮上してくる可能性は今後も十分にあらう^{10,25)}。

新たな抗ヘルペス剤の開発

HSVやVZVに対する抗ウイルス剤としてアシクロピア (ACV) が開発され、臨床的に用いられてからほぼ20年が経過し、その治療効果、安全性に関しては評価が定まったといえよう。安全性については発癌性、突然変異原性なども少なからず懸念されてはいたが、長期連続投与の臨床試験、20年間の観察結果からみて払拭されたといつて良いだろう。しかし、抗ヘルペス剤の臨床への導入の過程でソリブジン事件のような不幸な出来事もあったことは記憶にとどめておく必要があるだろう。耐性ウイルスの出現に関しても色々な不安があったが、実際にはACV耐性HSVの病原性が低く、抗生物質に対する耐性菌のような深刻な事

態にはならずすんでいる。しかし、ヘルペス脳炎や新生児ヘルペスのような致命的疾患に対する治療薬としては、効力の点でまだ不十分であることも認識されており、ACVを上回る抗ヘルペス剤の開発が望まれている²⁴⁾。

ACVが開発されて以来、様々なスクレオチドアナログが合成され動物モデルを用いて抗ウイルス療法が比較検討されてきた。その中には治療係数においてACVを10倍以上上回る化合物も少なからず存在する。3員環の糖部をもつグアノシチンアナログA-5021もその一つで、培養細胞、動物モデルにおいてACVを上回る成績を示す^{11,12,22)}。これらの化合物がヒトのヘルペス脳炎などに対して実際にACVより優れた作用を示しうる可能性は高いと思われるが、経済的な制約も強く市場に出る見通しは暗い。ACVとは異なる作用機序を有する化合物の探索も続けられている。HSVはスクレオチド代謝、DNA代謝、DNA合成に関わる酵素群、プロテアーゼ、プロテインキナーゼなど10種以上のウイルス独自の酵素を保有する²⁰⁾ (表2)。これらの酵素を標的とした選択的阻害剤が合成され報告されている。最近、ウイルスのヘリカーゼ/プライマーゼに対する選択的阻害剤 (aminothiazolylphenyl 化合物) が合成され、それらに優れた抗HSV作用があることが報告され注目されている^{3,15)}。それらの一つBAY57-1293は動物モデルにおいてHSV-2に対して1型と同等の抗ウイルス活性を示し、かつACV耐性株をも強く阻害する。慢性毒性など検討すべき点は残されていると思うが、今後の展開が期待される。

ワクチン開発の現状

ワクチンがウイルス感染症の制御における第一手段であることは論ずるまでもないだろう。HSVに対しても様々な観点からワクチンの開発が試みられてきた¹⁾。米国では

STDとしての重要性が大きく、主にHSV-2に対するワクチン開発が進められている。ホルマリンや紫外線などで感染性を失わせた不活化ワクチン、精製したエンベロップ蛋白質 gB, gDなどを抗原として用いたサブユニットワクチン、必須遺伝子を欠損させ細胞内で一度だけ増殖できるようにしたDISCワクチン、エンベロップ蛋白質遺伝子を組み込んだDNAワクチンなど色々な工夫がなされてきた^{4,26)} (表3)。いずれもマウスモデルでは感染防御効果が認められるが、臨床応用されているものは現在の所まだない。同じ α ヘルペスウイルスのVZVには有効な生ワクチンが開発されているが、これはVZVがHSVとは異なり、主に飛沫感染で伝染し、またウイルス血症が発病に至る過程に必須なため中和抗体が感染防御、発症阻止に効果的であるからと考えられる。HSVワクチン開発の問題点、困難さは次のようにまとめられるだろう。まず1) 中和抗体が誘導されたとしても密な接触による感染防御や回帰発症

の予防には効果が乏しいと考えられること、2) 不顕性感染が多く、致命的な疾患は極めて稀なので、安全性が高いことがまず重視されること、が挙げられる。性感染の場合には、中和抗体や細胞性免疫がある程度あったとしても粘膜・皮膚の直接的な接触による感染の成立は避けられないだろうし、特に免疫異常のない成人が何度も回帰発症を繰り返すことを考えれば、野生株の感染によって誘導される以上の強力な免疫の賦与が回帰発症の抑制には必要であることになる。それでは野生株での感染を上回る免疫の賦与は可能なのだろうか。1つにはアジュバンドの使用やサ

表2 抗ヘルペス剤の標的となりうるウイルス酵素

ウイルス酵素	遺伝子
DNAポリメラーゼ複合体	UL30+UL42
チミジンキナーゼ	UL23
リボヌクレオチドリダクターゼ複合体	UL39+UL40
DNAヘリカーゼ/プライマーゼ複合体	UL5 + UL8 + UL52
DNAヘリカーゼ	UL9
アルカリヌクレアーゼ	UL12
プロテアーゼ	UL26
プロテインキナーゼ	US3
	UL13
	UL39

表3 HSVワクチン

・不活化ワクチン	ホルマリン不活化 紫外線不活化
・サブユニットワクチン	gB蛋白質 gD蛋白質 gD蛋白質+アジュバンド
・DISC (Disabled infectious single cycle) ワクチン	gH欠損ウイルス
・弱毒生ワクチン	TK欠損ウイルス γ 34.5欠損ウイルス US3欠損ウイルス
・DNAワクチン	gD発現プラスミド
・組換えウイルスワクチン	VZV アデノウイルス ワクシニア

表4 HSVベクターの種類

分類	欠損遺伝子/変異部位及び特徴
非増殖型ベクター	
α 群遺伝子欠損ベクター	単独 RS1 (ICP4)欠損 複数 RS1, UL54 (ICP27)欠損 RS1, RS2 (ICP0)欠損 RS1, RL2, UL54欠損
α 群, γ 群遺伝子欠損ベクター	RS1, UL54, UL41 (vhs)欠損 RS1欠損, UL48 (VP16)変異
増殖型ベクター	
hrR3	UL39 (RR)欠損
G207	UL39, RL1 (ICP34.5)欠損
NV1020	L-S結合部位を含む15kbp及びUL24の欠損
HF10	UL56欠損, gK変異, syn
Hh101	UL39, UL56欠損, syn
HLA12	UL56, US3欠損, syn
HN1038	UL56, US9-US12欠損, syn
アンプリコンベクター	HSV ori, pac シグナルを含むプラスミド

イトカインの投与が考えられるだろう。マウスの腫瘍感染モデルを用いた研究では、特定のアクセサリ遺伝子を欠損した弱毒化変異株が野生株より有意に高いIL-12及びIFN- γ の産生とCD8陽性T細胞の集積が誘導されることが示された⁸⁾。こうした変異ウイルスは回帰発症を抑制しうるワクチンとして期待できるかもしれない。

HSV を利用したベクター開発

HSV をベースとしたベクターは、二つの方向で利用が考えられている。一つはHSVが神経向性を持ち神経細胞内で潜伏感染する性質を利用するもので、各種外来性の遺伝子を搭載して遺伝子導入を目的とするもの、他の一つは悪性腫瘍の治療を目的とするもので、この場合には、主に弱毒化した増殖型のHSVが用いられる(表4)。

潜伏感染状態では、HSV DNAは神経細胞核内にエピゾームの状態に安定に保持される。また、特定の遺伝子(LAT; latency associated transcripts)の転写もこの状態のHSVゲノムから長期にわたり持続することが知られている。加えて、HSVは1)ゲノムサイズが大きく、外来性の遺伝子を搭載できる許容量が大きい、2)宿主細胞域が広くほとんどの細胞に感染する、などの特徴をもつ。マウスでの実験では、中枢神経系において数カ月以上にわたり持続的に外来性遺伝子が発現しうることが確認されている。特定の細胞への選択的な遺伝子導入、選択的な遺伝子発現をめざして、レトロウイルスやアデノウイルスと同様、HSVベクターの開発においても厳しい競争が行われている。

ウイルスを用いて悪性腫瘍を治療するというアイデアは古くからのものだが²⁹⁾、弱毒化HSVをそうした目的に使用しうることを示し、'Oncolytic viral therapy'の可能性を開いたのはMartuzaの論文である¹⁸⁾。そこでは、TK欠損株を用いてgliomaの治療実験が報告されていた。当時、我々もRR欠損株の中枢神経内での病原性を検討していたので²⁸⁾、TK欠損株より適性があると考え追試的な実験を行ったが、モデル系の作製がうまくいかず断念した経緯がある。その後、米国、英国のグループでいくつかの改変ウイルスが作製され、その抗腫瘍活性が報告されてきた^{2,16,17)}。HSV1716, G207, NV1020などが代表的なものだが、前2者は脳腫瘍に対して臨床試験も行われており、HSV1716では期待をもたせる結果が報告されている²³⁾。G207では安全性を高めるためにUL39(リボスクレオチドリクターゼ)、RL1(ICP34.5)の2つの遺伝子が不活化されており、抗腫瘍活性も減弱しすぎた可能性がある。

我々は躯幹部の悪性腫瘍も oncolytic viral therapy 対象となると考え、主に腹膜播種モデルにて検討を行ってきた¹³⁾。その結果、中枢神経系への侵襲性を欠く弱毒化HSV(HF10)が優れた抗腫瘍性を示すことが判明した^{14,27)}。このウイルスは、UL56の欠損、gKの変異及びUL領域の両

端にgene rearrangementをもち、Immunocompetentマウスの腹腔内接種では 10^7 pfuでもマウスを殺さない。しかし、脳内に接種すると 10^6 pfuでほぼすべてのマウスを脳炎死させる。弱毒化HSVを用いた悪性腫瘍の排除には、1)ウイルスによる直接的な細胞傷害作用、2)NK細胞の活性化、3)CTLの誘導が関与していると推定される。HSVではTK遺伝子を本来保有しているため、抗ヘルペス剤ACVやGCVの使用により増殖を制御できるという利点もある。また、GCVやA-5021のTKを介した活性化によりbystander effectによる抗腫瘍作用も期待しうる⁹⁾。検討すべき点も多く残されているが、動物モデルでの結果からみて悪性腫瘍に対する新しい治療法として確立される可能性は十分にあるだろう。

文 献

- 1) Bernstein, D. I. and Stanberry, L. R. (1999) Herpes simplex virus vaccines. *Vaccine* **17**, 1681-1689.
- 2) Cozzi, P. J., Malhotra, S., McAuliffe, P., Kooby, D. A., Federoff, H. J., Huryk, B., Johnson, P., Scardino, P. T., Heston, W. D. W. and Fong, Y. (2001) Intravesical oncolytic viral therapy using attenuated, replication-competent herpes simplex viruses G207 and NV1020 is effective in the treatment of bladder cancer in an orthotopic syngeneic model. *FASEB J.* **15**, 1306-1308.
- 3) Crute, J. J., Grygon, C. A., Hargrave, K. D., Simoneau, B., Faucher, A. M., Bolger, G., Kibler, P., Liuzzi, M. and Cordingly, M. G. (2002) Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease. *Nature Med.* **8**, 386-391.
- 4) Franchini, M., Abril, C., Schwerdel, C., Ruedl, C., Ackermann, M. and Suter, M. (2001) Protective T-cell-based immunity induced in neonatal mice by a single replicative cycle of herpes simplex virus. *J. Virol.* **75**, 83-89.
- 5) Furuta, Y., Fukuda, S., Chida, E., Takasu, T., Ohtani, F., Inuyama, Y. and Nagashima, K. (1998) Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy. *J. Med. Virol.* **54**, 162-166.
- 6) Hasegawa, Y., Nishiyama, Y., Imaizumi, K., Ono, N., Kinoshita, T., Hatano, S., Saito, H. and Shimokata, K. (2000) Prevention of bone marrow suppression using A-5021 as nucleoside analog for retrovirus-mediated herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **7**, 557-562.
- 7) Hashido, M., Lee, F. K., Nahmias, A. J., Tsugami, H., Isomura, S., Nagata, Y., Sonoda, S. and Kawana, T. (1998) An epidemiologic study of herpes simplex virus type 1 and 2 infections in Japan based on type-specific serological assay. *Epidemiol. Infect.* **120**, 179-186.
- 8) Inagaki-Ohara, K., Iwasaki, T., Watanabe, D., Kurata, T. and Nishiyama, Y. (2001) Effect of the deletion of US 2 and US 3 from herpes simplex virus type 2 on immune responses in the murine vagina following intravaginal infection. *Vaccine* **20**, 98-104.
- 9) Itoh, N., Matsumura, N., Ogi, A., Nishide, T., Imai, Y.,

- Kanai, H. and Ohno, S. (2000) High prevalence of herpes simplex virus type 2 in acute retinal necrosis syndrome associated with herpes simplex virus in Japan. *Am. J. Ophthalmol.* **129**, 404–405.
- 10) Itzhaki, R. F., Lin, W. R., Shang, D., Wilcock, G. K., Faragher, B. and Jamieson, G. A. (1997) Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 241–244.
 - 11) Iwayama, S., Ohmura, Y., Suzuki, K., Ono, N., Nakazawa, H., Aoki, M., Sekiyama, T., Tsuji, T., Okunishi, M., Yamanishi, K. and Nishiyama, Y. (1999) Evaluation of antiherpesvirus activity of (1'S, 2'R)-9-[[1', 2'-bis (hydroxymethyl) cycloprop-1'-yl] methyl] guanine (A-5021) in mice. *Antivir. Res.* **42**, 139–148.
 - 12) Iwayama, S., Ono, N., Ohmura, Y., Suzuki, K., Aoki, M., Nakazawa, H., Oikawa, M., Kato, T., Okunishi, M., Nishiyama, Y. and Yamanishi, K. (1998) Antiherpesvirus activity of (1'S, 2'R)-9-[[1', 2'-bis (hydroxymethyl) cycloprop-1'-yl] methyl] guanine (A-5021) in cell culture. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **42**, 1666–1670.
 - 13) Kasuya, H., Nishiyama, Y., Nomoto, S., Hosono, J., Takeda, S. and Nakao, A. (1999) Intraperitoneal delivery of hrR 3 and ganciclovir prolongs survival in mice with disseminated pancreatic cancer. *J. Surg. Oncol.* **72**, 136–141.
 - 14) Kimata, H., Takakuwa, H., Goshima, F., Teshigahara, O., Nakao, A., Kurata, T., Sata, T. and Nishiyama, Y. (2003) Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex viruses. *Hepato-Gastroenterology* **50**, 961–966.
 - 15) Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U. A., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., Handke, G., Eckenberg, P., Hewlett, G., Pevzner, V., Baumeister, J., Weber, O., Henninger, K., Keldenich, J., Jensen, A., Kolb, J., Bach, U., Popp, A., Maben, J., Frappa, I., Haebich, D., Lockhoff, O. and Rubsamen-Waigmann, H. (2002) New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nature Med.* **8**, 392–398.
 - 16) Kucharczuk, J. C., Randazzo, B., Chang, M. Y., Amin, K. M., Elshami, A. A., Serman, D. H., Rizk, N. P., Molnar-Kimber, K. L., Brown, S. M., MacLean, A. R., Litzky, L. A., Fraser, N. W., Albelda, S. M. and Kaiser, L. R. (1997) Use of a "Replication-restricted" herpes virus to treat experimental human malignant mesothelioma. *Cancer Res.* **57**, 466–471.
 - 17) Martuza, R. L. (2000) Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* **105**, 841–846.
 - 18) Martuza, R. L., Malick, A., Markert, J. M., Ruffner, K. L. and Coen, D. M. (1991) Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* **252**, 854–856.
 - 19) Murakami, S., Mizobuchi, M., Nakashiro, Y., Doi, T., Hato, N. and Yanagihara, N. (1996) Bell palsy and herpes simplex virus: identification of viral DNA in endoneurial fluid and muscle. *Ann. Intern. Med.* **124**, 27–30.
 - 20) 西山幸廣. (1987) ヘルペスウイルス特異酵素とその阻害剤 ウイルス**37**, 55–70.
 - 21) 西山幸廣, 村田貴之, 山内洋平. (2001) 単純ヘルペスウイルス遺伝子産物の機能 ウイルス**51**, 29–36.
 - 22) Ono, N., Iwayama, S., Suzuki, K., Sekiyama, T., Tsuji, T., Okunishi, M., Daikoku, T. and Nishiyama, Y. (1998) 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 varicella-zoster virus. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **42**, 2095–2102.
 - 23) Papanastassiou, V., Rampling, R., Fraser, M., Petty, R., Hadley, D., Nicoll, J., Harland, J., Mabbs, R. and Brown, M. (2002) The potential for efficacy of the modified (ICP34.5(-)) herpes simplex virus HSV 1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene Ther.* **9**, 398–406.
 - 24) Snoeck, R. and De Clercq, E. (2000) New treatments for genital herpes. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**, 49–55.
 - 25) Sohn, S., Lee, E. S., Bang, D. and Lee, S. (1998) Behcet's disease-like symptoms induced by the Herpes simplex virus in ICR mice. *Eur. J. Dermatol.* **8**, 21–23.
 - 26) Stanberry, L. R., Spruance, S. L., Cunningham, A. L., Bernstein, D. I., Mindel, A., Sacks, S., Tyring, S., Aoki, F. Y., Slaoui, M., Denis, M., Vandepapeliere, P. and Dubin, G. (2002) Glycoprotein-D-adjunct vaccine to prevent genital herpes. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1652–1661.
 - 27) Takakuwa, T., Goshima, F., Nozawa, N., Yoshikawa, T., Kimura, H., Nakao, A., Nawa, A., Kurata, T., Sata, T. and Nishiyama, Y. (2003) 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.
 - 28) Yamada, Y., Kimura, H., Morishima, T., Daikoku, T., Maeno, K. and Nishiyama, Y. (1991) The pathogenicity of ribonucleotide reductase null mutants of herpes simplex virus type 1 in mice. *J. Infect. Dis.* **164**, 1091–1097.
 - 29) Wildner, O. (2001) Oncolytic viruses as therapeutic agents. *Ann. Med.* **33**, 291–304.