

オーエスキー病ウイルス糖蛋白の免疫学的研究

津 岡 知 幸

1

オーエスキー病ウイルス糖蛋白の免疫学的研究

津田 知幸

## 目次

緒言	1
第1章：モノクローナル抗体によるオーエスキー病ウイルス糖蛋白の 中和エピトープの解析	5
1. 要旨	5
2. 序文	6
3. 材料と方法	6
4. 実験結果	9
モノクローナル抗体の性状	9
抗原可溶化条件によるMabの反応性の変化	10
中和エピトープの同定	10
5. 考察	10
第2章：糖蛋白gIIの単離とその免疫原性	13
1. 要旨	13
2. 序文	15
3. 材料と方法	15
4. 実験結果	18
ISCOMの性状	18
gII/ISCOM免疫によるマウスの感染防御	19
gII/ISCOM免疫によるブタの発病防止	19
gII/ISCOM免疫豚と感染豚の抗体識別	20
5. 考察	20
第3章：糖蛋白gp50の単離とその免疫原性	24
1. 要旨	24
2. 序文	25
3. 材料と方法	25
4. 実験結果	28
gp50/ISCOMの作製とその性状	28
gp50/ISCOMのマウスにおける免疫原性と感染防御効果	28

gp50/ISCOMによる中和抗体の誘導	29
5. 考察	30
第4章 糖蛋白に対する抗イデオタイプ抗体の作製と免疫原性	32
1. 要旨	32
2. 序文	33
3. 材料と方法	33
4. 実験結果	35
抗イデオタイプ抗体の性状	35
抗イデオタイプ抗体による中和抗体の誘導	37
抗イデオタイプ抗体によるマウスの感染防御	37
5. 考察	37
総括	41
謝辞	43
参考文献	44
表および図	58

## 緒 言

オーエスキー病はヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科のバリセロウイルス属に属するブタヘルペスウイルス1 (pseudorabies virus, PrV) (91)の感染によっておこるブタの急性伝染病である。PrV はほ乳類や鳥類などの多くの動物種に感染し広い宿主域を保有する。しかし、ブタ以外の動物種におけるPrV の感染はほとんどが致死的で、ウイルスの排泄も見られないことから、これらの動物種は終末宿主であると考えられている。これに対して、ブタはPrV の感染によりウイルスを排泄し個体間の伝播が成立することから、PrV の自然宿主であると考えられている。

PrV はDNAと蛋白からなるコアを中心に正20面体のカプシッドと、さらにそれをとりまくエンベロープから構成されている。ウイルス粒子は少なくとも20種以上の蛋白を持っているが(97)、ウイルス構成糖蛋白はすべてウイルスエンベロープに存在する(29)。現在まで、ウイルス構成糖蛋白のうち、g IIとg IIIの2つの主要糖蛋白(22)とg I(22)、gp50(114) およびgp63(83)の3つの少量の糖蛋白が同定されている。また、ウイルス粒子は構成しないが感染細胞表面に発現し、蛋白分解酵素により解裂を受けて培養液中に出現する糖蛋白g Xも同定されている(88)。g Iとgp63は複合体を形成しており(121)、g IIは3つの糖蛋白がS-S結合によって結合した複合体である(22)。PrV 遺伝子は約150 Kbの線状2本鎖DNAで、short unique(US)領域とlong unique (UL)領域に分けられ、US領域をはさんで一對の倒置反復配列が存在する。糖蛋白はすべてウイルス遺伝子にコードされ、その遺伝子地図も明らかにされている。糖蛋白g II(90)とg III(115)はUL領域に、g I(55,82)、gp63(83)、gp50(114)およびg X(88)はUS領域にコードされている。弱毒継代ワクチン株ではUS領域の遺伝子欠失があること(40,42)、あるいは糖蛋白をコードする遺伝子を欠失させてg I、g III、gp63およびg Xの発現を失わせてもウイルスは増殖できることから、これらの糖蛋白はウイルス増殖には必須ではなく(54)、g II とgp50のみがウイルス増殖に必須の糖蛋白と考えられている(87)。ウイルス糖蛋白はPrV の病原性にも関与し、非必須糖蛋白であるg I、g IIIおよびgp63を1つあるいは複数で除去することにより病原性が低下する(56,59,60,82)。しかし、もう1つの非必須糖蛋白であるg Xは病原性には

関与していない(101)。糖蛋白の病原性への関与はg IIIがウイルスの細胞への吸着(61,94)や増殖(116)に関係することや、g Iとg IIIが感染細胞からのウイルス放出に関係する(58,94)ことによると考えられている。糖蛋白以外にも、チミジンキナーゼ(TK)をコードする遺伝子(37,41,101)やBamHI断片4(43)も病原性に関与している。このようにPrV遺伝子の構造や遺伝子産物である糖蛋白の機能についての検討が行われているが、現在もなお未解明の部分が多く残されており、PrVのブタにおける複雑な感染形態を解明するには至っていない。

オーエスキー病によるブタの症状はその日齢によって大きく異なっている。新生豚は高率に発病し、神経症状を呈して死亡するが、ブタの日齢がすすむに従って死亡率は低下する。肥育豚や成豚は軽度の発熱や食欲減退に伴う体重減少あるいは呼吸器症状を示すものの、ほとんどは回復する。妊娠豚が感染した場合は症状は軽微であるが、高率に死産が発生する。このようにブタにおけるPrV感染は急性の経過をとり若齢豚では死亡する症例もあるが、感染から耐過したブタでは潜伏感染となり、通常はウイルスは検出されなくなる。潜伏感染を起こしたブタは抗体を保有しているにもかかわらず、種々のストレスによって体内のウイルスが再活性化され感染性ウイルスを排泄する(8,93)ことから、ウイルスの存続と伝播に大きな役割をはたしている。しかし、PrVによる潜伏感染とウイルスの再活性化の機構は今だ解明されておらず、潜伏感染豚でのウイルスの再排泄を抑えることは困難である。一方、PrV感染では液性免疫や細胞性免疫といった特異的生体防御機構が誘導されるが、その免疫機構は複雑であり現在のところ感染防御に関与する免疫機構は明らかにされていない。

オーエスキー病の清浄化には潜伏感染豚の摘発と淘汰が最も有効であるが、本病が蔓延し汚染が拡大した地域ではすべての潜伏感染豚の摘発は困難であることから、多くの国でワクチンを使用した清浄化計画が検討あるいは実施されている(100,109,118)。本病に対するワクチンの使用はウイルスの感染やブタの発病を予防すると同時に、感染豚からのウイルスの再排泄を抑えることによって汚染の拡大を防ぐことを目的としている。同時に、本病のワクチンにはウイルスに感染して潜伏感染を起こしたブタの移動によるウイルスの蔓延を防ぐため、感染豚とワクチン接種豚を血清学的検査によって識別できることも要求される。現在、多くの国で用いられているワクチンは病原性関連遺伝子が欠損した弱毒ウイルスか

らさらに非必須糖蛋白 g I (62,108)、g III (38)あるいは g X (6,50,57)をコードする遺伝子を欠損させた生ウイルスワクチンである。こうしたワクチンを接種されたブタでは、感染が成立するのに多量のウイルスを必要とする、感染があっても症状が軽減される、飼料効率や体重の低下が抑えられる、あるいは感染後のウイルス排泄量が減少するなどの効果が認められている。さらに、特定の糖蛋白を欠損させた生ウイルスワクチンを接種されたブタは、その糖蛋白に対する抗体を産生しないことから、その抗体の有無によって野外株に感染したブタとワクチンを接種されたブタの識別が可能であるとされる(36,111)。しかし、現在の生ウイルスワクチンには感染防御効果はみられないことから、ワクチン接種豚が野外株に再感染した場合、遺伝子欠損ワクチン株と野外株が遺伝子組換えをおこし、ウイルスの病原性の回復やワクチンウイルスとしてのマーカーが消失した新しいウイルスの出現の可能性が危惧されている(23,24,30,31)。

こうした生ウイルスワクチンの問題を解決し、より安全で有効な予防法を確立するため、サブユニットワクチンやイデオタイプワクチンなどの新しいワクチンの検討が必要である。そのためには、まず宿主に感染防御免疫を誘導させるウイルス蛋白の同定とその宿主に対する免疫学的機能を明らかにすることが重要であると考えられる。近年の研究によって、PrV に感染したブタの免疫応答がウイルス糖蛋白に対して起こること(84,102)やPrV に対する中和モノクローナル抗体(MAb)が g II、g III および gp50 に反応すること(4,16,22,71,113)、あるいは g I、g II、g III および gp50 に対する MAb の移入がマウスやブタで感染防御を起こすことが明らかにされている(16,48,113)。また、g I、g III、gp63 及び g X を欠損させたウイルスを用いた細胞障害性試験から、g III が細胞障害性 T リンパ球の主要ターゲットであることも明らかにされている(122)。こうした報告は糖蛋白がオーエスキー病のサブユニットワクチンの有力な候補であることを示唆するものであるが、ワクチンとして有効な糖蛋白はいまだ特定されていない。さらに、糖蛋白はこれを単離することが困難でその免疫原性も低いため、単独でのワクチンとしての使用には問題が残されている。最近、ウイルス蛋白とグリコシドとの相互作用によって形成される免疫刺激複合体(Immunostimulating complex, ISCOM)が高い免疫原性を持つことが Morein ら(67)によって報告され、これがサブユニットワクチンの開発に有効な手段を与えると期待されている。しかし、ISCOM のオ

ーエスキー病ワクチンへの応用の事例は少なく、特定の糖蛋白のみを構築した ISCOM ワクチンの作出に成功した報告は現在までみられていない。また近年、従来のワクチンと異なり生体のイデオタイプネットワークを利用したイデオタイプワクチンが新しい概念に基づく予防法として注目されている。イデオタイプワクチンはいくつかの感染症に対してはその可能性が検討されているが、その評価はいまだ定着していない。

そこで著者はオーエスキー病の予防法の確立を目的として、上記の諸問題を解決するため PrV 糖蛋白の免疫学的機能に関する研究を企画した。まず、動物に対して感染防御に有効な免疫応答を惹起するウイルス糖蛋白の特定と感染防御に関与するエピトープの解析を行った。ついで、糖蛋白の単離と免疫原性を高める方法について検討し動物における感染防御効果を調べた。さらに、オーエスキー病に対するイデオタイプワクチンの可能性についても検討した。

本論文は次の4章から構成される。第1章はサブユニットワクチンとして有効な糖蛋白を特定する目的で PrV 糖蛋白に対するモノクローナル抗体を作出して中和抗体産生に重要な糖蛋白とその中和エピトープの同定を行った成績を記載した。第2章は g II の免疫原性を調べる目的で g II を構築した ISCOM のマウスやブタに対する感染防御効果を記載した。第3章は gp50 の免疫原性を調べる目的で gp50 を ISCOM に構築する方法とそのマウスに対する感染防御効果を記載した。第4章はイデオタイプワクチンの可能性を調べる目的で糖蛋白に対する抗イデオタイプ抗体を作製し、そのマウスにおける中和抗体と感染防御免疫の誘導について記載した。

## 第1章：モノクローナル抗体によるオーエスキー病ウイルス糖蛋白の 中和エピトープの解析

### 1. 要旨

PrV のわが国の分離株である山形S-81株に対するモノクローナル抗体 (MAb) を作出し、中和活性を有するMAb の認識するウイルス糖蛋白を同定するとともに、中和エピトープの性状を明らかにすることを試み、以下の結果を得た。

界面活性剤を用いて可溶化したウイルスをマウスに免疫し、中和MAb を作出した。得られたMAb は、中和活性の発現に補体の存在を必要とするもの (補体要求性MAb) と、必要としないもの (補体非要求性MAb) に分けられた。これらのMAb の多くはウイルス糖蛋白を認識していたが、g IIあるいはg IIIを認識するMAb の中和活性は低いかまたは補体要求性であった。これに対して、補体非要求性で強い中和活性を持つ2つのMAb はいずれもgp50を認識しており、gp50が強い中和抗体産生能を持つことが明らかとなった。

gp50を認識するMAb は非イオン性の界面活性剤であるNonidet P-40で可溶化したウイルス抗原とは反応したが、蛋白変性効果の強いドデシル硫酸ナトリウムで可溶化したウイルス抗原とは反応しなかったことから、MAb の認識するgp50分子上の中和エピトープが立体構造に依存していることが示唆された。

さらに、このMAb のエピトープへの結合は競合結合試験において互いに競合的に抑制されなかったことから、gp50分子上に2つの独立した補体非要求性の中和エピトープが存在することが明らかとなった。

## 2. 序文

PrV エンベロープやPrV 感染細胞表面に存在するウイルス糖蛋白は感染した動物の免疫応答の主要標的抗原であることが知られている(84,102)。こうした糖蛋白はウイルス粒子あるいは感染細胞を界面活性剤で処理することにより、可溶性抗原として得ることが出来る(22)。可溶性抗原や可溶性抗原中のレクチン結合分画を接種されたブタやマウスはウイルスの感染に抵抗性を示すことから、これをワクチンとして用いる試みが行われている(47,85,106)。しかし、サブユニットワクチンの開発には糖蛋白のサブユニット化をさらにすすめ、感染防御に有効な糖蛋白のみをワクチンとして用いるために、免疫原として最も有効なウイルス蛋白の同定とそれらのエピトープの構造を明らかにすることが不可欠である。本章では、以上の目的でわが国のPrV 分離株である山形S-81株に対するモノクローナル抗体(MAb)を作出し、中和活性を持ったMAb の認識する糖蛋白を特定するとともに、その中和エピトープの性状を明らかにすることを試みた。

## 3. 材料と方法

ウイルスと細胞： ウイルスは、わが国最初のオーエスキー病発生時に豚から分離された山形S-81(YS-81)株を用いた(18,76)。マウス免疫用の抗原の作製にはハムスター腎臓代(BHK<sub>21</sub>C<sub>13</sub>)細胞を、中和抗体価の測定と分析用抗原の作製には豚腎臓代(PK-15)細胞を使用してウイルスを増殖させた。細胞増殖用培養液には10%牛血清、10%トリプトース・ホスフェート・ブロス液、0.03%L-グルタミン、0.15%炭酸水素ナトリウムおよび100  $\mu$ g/mlの硫酸カナマイシンを含むイーグルMEM(日水製薬)を用いた。また、細胞維持用培養液(維持培養液)には細胞増殖用培養液の牛血清を2%に減じたものを使用した。

ウイルスの精製とウイルス抗原の調製： ウイルス抗原は精製ウイルス粒子を界面活性剤で可溶化して得た。即ち、ウイルス培養上清を排除限界分子量100キロダルトン(KD)のホローファイバー(Amicon DC-2,アミコン社、米国)を用いて

限外濾過し、20倍に濃縮した。この濃縮液を20/50%の蔗糖密度勾配上に重層し、Beckman SW28ローターで25,000 rpmで1時間遠心した。蔗糖密度勾配の20と50%の中間層を採集し、0.15 MのNaClを含む20 mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で透析して精製ウイルス液を得た。この精製ウイルス液に最終濃度が1%になるようにNonidet P-40 (NP-40)あるいはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を加え40℃で20分間処理して可溶化した後、Beckman SW60ローターで32,000 rpmで1時間遠心し、その上清をウイルス抗原とした。

モノクローナル抗体の作製：モノクローナル抗体(MAb)の作製には、NP-40で可溶化したウイルス抗原を免疫原として用いた。BALB/cマウスに等量のフロイントの完全アジュバント(FCA)と混合したウイルス抗原を皮下接種により免疫し、さらにウイルス抗原のみを腹腔内接種により2週間間隔で3回追加免疫した。最終免疫3日後にマウスの脾細胞を採取し、これを50%のポリエチレングリコールを用いてマウスのみエローマ細胞(P3-X63-Ag8-U1)と融合させ、HAT培地(シグマ社、米国)でハイブリドーマを選択した。中和試験と間接酵素免疫ブランク染色法(IIPS)(92)を用いて抗体産生ハイブリドーマを選択し、限界希釈法によりクローニングした。さらに、このハイブリドーマをプリスタン(シグマ社、米国)で前処置したマウスの腹腔内に移植して腹水を得た。MAbのアイソタイプは市販のタイピングキット(ICN Immunobiological, 英国)を用いた二元免疫拡散法により決定した。

また、ハイブリドーマを無血清培地(コージン社)で培養し、その培養上清を排除限界分子量20 KDの限外濾過により濃縮した後、イオン交換クロマトグラフィー(Mono Q HR 5/5 column, FPLC system, ファルマシア社、スウェーデン)を行って精製MAbを得た。

中和試験：中和試験はブランク減少法を用いて、補体の存在あるいは不在で以下の通り実施した。即ち、維持培養液で2倍階段希釈したマウス血清または腹水の各希釈1容量を半容量のウイルス液(3,000 pfu/ml)と混合し、さらに半容量の5倍に希釈した新鮮モルモット血清または維持培養液を加えて37℃で2時間反応させた。この混合液50  $\mu$ lをあらかじめ24ウェルプレートに培養したPK-15細胞

胞に接種し37°Cで1時間吸着させた後、1.5%のメチルセルロースを含む維持培養液を加えて37°Cで2日間培養した。培養終了後に0.05%のメチレンブルーを含む10%のホルマリン液で固定・染色し、出現ブラック数が対照ウェルの50%以下を示した最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。また、補体の存在下で50% CPE抑制法による中和試験をハイブリドーマの選択に用いた。即ち、96ウェルプレート内の各ウェルに50 $\mu$ lのハイブリドーマ培養上清、25 $\mu$ lのウイルス液(200 TCID<sub>50</sub>)および25 $\mu$ lの5倍希釈新鮮モルモット血清をそれぞれ加えて37°Cで1時間反応させた。この混合液に10<sup>4</sup>個のPK-15細胞、100 $\mu$ lを加えて37°Cで2日間培養した。培養終了後に0.05%のメチレンブルーを含む10%のホルマリン液で固定・染色し、CPEの面積がウイルス対照ウェルのCPE面積の50%以下を示したハイブリドーマを選択した。

ドットプロット法：精製ウイルスと界面活性剤で可溶化したウイルス抗原を用いてドットプロットを行った。精製ウイルス液及び可溶化ウイルス抗原を2倍階段希釈し、転写膜(Polyvinylidene difluoride: PVDF膜、Immobilon-P、ミリポア社、米国)上に濾過法により固相化した。この膜を2%の馬血清と0.15 MのNaClを含む20 mMのトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)に浸した後、Mabあるいは感染耐過豚血清で室温で1時間反応させた。さらに、上記トリス-塩酸緩衝液で充分洗浄した後、ペルオキシダーゼ(HRP)標識抗血清と同様に反応させ、四塩酸3,3'-ジアミノベンジジンで発色させた。また、固相化後の膜をクーマシーブリリアントブルー R-250で染色し、固相化ウイルス抗原量を測定した。

免疫沈降反応：免疫沈降反応は基本的にWathenらの方法(113)に準じて行った。<sup>35</sup>Sメチオニンで標識したPrV感染PK-15細胞を0.5%のNP-40、0.1MのNaClおよび1mMのふつ化フェニルメチルスルホン(PMSF)を加えた0.1Mのトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で可溶化した後、Beckman SW60ローターで32,000 rpmで1時間遠心して上清を得た。この上清にMabを加えて4°Cで1晩反応させた後、Protein A-Sepharose 4Bを加えて沈澱させた。沈澱物を充分洗浄した後、10%ゲルを用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、ゲルを乾燥した後X線フィルム(X-OMAT、コダック社、米国)でオートラジオグラフィーを行った。

競合結合試験：NP-40 で可溶化したウイルス抗原を0.05 Mの炭酸緩衝液(pH 9.6)で至適濃度に希釈し、ポリスチレン製のウェル(Immulon 2 Removawell, ダイナテック社、米国)に加えて4℃で1晩静置して固相化した。濃度100 μg/mlの精製Mabを2%の馬血清を含む磷酸緩衝液(pH 7.4)で3倍階段希釈して、その各希釈25 μlを抗原を固相化したウェルに加えて室温で1時間反応させた。また対照としてMabを含まない液を同様に反応させた。このMabを除去した後、ヨードゲン法を用いて<sup>125</sup>Iで標識したMab(50,000 cpm, 25 μl)を加えて室温で1時間反応させた。最後に0.05%のTween 20を含む磷酸緩衝食塩液(pH 7.4)で各ウェルを十分に洗浄した後、ガンマカウンター(Clinigamma, LKB、スウェーデン)でウイルス抗原に結合した<sup>125</sup>I標識Mabの量(cpm)を測定し、ウイルス抗原を固相化していないウェルのcpmを減じて正味のcpmを求めた。各希釈について対照のcpmに対する非標識Mabを加えたときのcpmの減少率を結合抑制率とした。

#### 4. 実験結果

##### モノクローナル抗体の性状

間接酵素免疫ブロッカ法で陽性を示したハイブリドーマのうち、補体を添加した中和試験で陽性のハイブリドーマ8株を選び、マウスの腹腔に移植して腹水を得た。腹水化したMabの中和活性とアイソタイプを表1-1に示した。これらのMabはPrV YS-81株に対して種々の程度に中和活性を示したが、その中和活性は補体の影響を受けるものと受けないものが認められた。Mabのうち1B6、4G6および6G11は補体を添加した中和試験でそれぞれ2,560倍、10,240倍および5,120倍の高い中和抗体価を示した。Mab 1B6と4G6の中和抗体価は補体を添加しない場合でもほとんど低下は認められなかったが、Mab 6G11の中和抗体価は補体を添加しない場合には著しく低下した。その他のMabの中和抗体価は低く、Mab 14D8と8C4は補体添加の有無にかかわらず、それぞれ320倍および10倍の中和抗体価を示したが、Mab 9A3、19B11および2C4は補体添加時のみ80倍の中和抗体価を示した。

#### 抗原可溶化条件によるMabの反応性の変化

Mab 1B6 と 4G6 は補体非要求性で高い中和活性を持っていたことからこれらのMabの認識するウイルス蛋白を同定を試みた。まず、精製ウイルス粒子を用いてウェスタンブロットを行ったところ、これらのMabの反応はウェスタンブロットでは認められなかった(結果は示さない)。そこで、精製ウイルス粒子をSDSとNP-40で可溶化し、ドットブロット法によりPVDF膜上に固相化した後、これらのMabとの反応性を調べた。その結果、ウイルスを可溶化することによりウイルス抗原の膜への固相化効率は低下し、その程度はNP-40を可溶化剤に用いた場合に著しかった(図1-1A)。しかし、Mabとの反応はNP-40で可溶化したウイルス抗原では固相化した量と同程度に認められたが、SDSで可溶化したウイルス抗原ではその反応は認められなかった(図1-1B、C)。次いで、NP-40で可溶化した標識ウイルス抗原を用いた免疫沈降を行ったところ、Mab 1B6 と 4G6 はいずれも分子量50キログルトン(KD)を示す蛋白を沈降した(図1-2)。また、Mab 8G11、19B11および2C4は分子量97KDの蛋白を、Mab 14D8は分子量約120、70および55KDの複数の蛋白をそれぞれ沈降した(結果は示さない)。Mab 8C4と9A3では蛋白は検出されなかった。

#### 中和エピトープの同定

前項の成績で補体非要求性で高い中和活性を持つMab 1B6 と 4G6 はいずれも同じウイルス蛋白を認識することが判明した。そこで両Mabを用いて交差競合結合試験を行ったところ、<sup>125</sup>I標識Mab 1B6 と 4G6 のウイルス抗原への結合は同一の非標識Mabの前処置によって抑制されたが、相互に異なる非標識Mabの前処置ではまったく抑制されなかった(図1-3)。この結果から、Mab 1B6 と 4G6 が相互に異なるエピトープが明らかとなった。

#### 5. 考察

PrVの病原性(52)や制限酵素によるウイルスDNAの切断型はウイルスの分離株によって異なることが報告されている(3)。しかし、わが国で分離されたウイルスはいずれの方法でもYS-81株と基本的に同一とされている(74)。そこで本章では、わが国の代表株であるYS-81株のウイルス糖蛋白の抗原性を解析することを

試みた。ウイルスエンベロープに含まれる糖蛋白は、ウイルス粒子を界面活性剤で可溶化することによりウイルス粒子から分離される(22)ことから、本実験では可溶化ウイルス抗原をマウスに免疫して、Mabの作製を行った。PrVに対する抗体はIIPSと中和試験により選択したが、免疫マウスの血清中和抗体価は低く、また中和Mabの数はIIPS反応陽性のMabの数に比べて少なかった(結果は示さない)。同様の結果はTurnerら(106)の報告でも指摘されており、可溶化ウイルス抗原で免疫したマウスの血清中和抗体価は一般に低い傾向を示している。しかしながら、ここで得られた中和Mabの中には中和活性の非常に高いものがあることから、マウスの血清中和抗体価が低いことや中和Mabの作出率が低いことは、可溶化ウイルス抗原中の中和を誘導する抗原量が全抗原に比べて相対的に少ないことによるものと考えられる。

補体の不在下でも高い中和活性を示すMab 1B6と4G6は、ウイルスの感染に最も重要な役割をもつウイルス蛋白質上での中和エピトープを認識していると推察された。しかし、これらのMabのエピトープに対する反応はウイルス抗原を陰イオン界面活性剤であるSDSで可溶化することによって消失した。SDSは蛋白質に対する変性作用が強いとされており、可溶化によって反応が消失したことから、中和エピトープの構造がウイルス抗原のポリペプチド鎖の立体構造に依存していることが推察される。このことはこれらのMabがドットプロットにおいて精製ウイルス粒子に対して強く反応したこと、およびIIPSにおいて細胞変性効果を示した細胞と反応したことからも支持される。

免疫沈降によって検出されたMabの認識するウイルス抗原はSDS-PAGEにおいて幅の広い特徴的な泳動形態を示したことからいずれも糖蛋白であり、その分子量から補体非要求性中和Mab 1B6と4G6がgp50を、補体要求性中和Mab 6G11、19B11および2C4がgIIIを、そしてMab 14D8がgIIを認識すると考えられた。最近、Elloitら(18)は生ウイルスを免疫したマウスから中和Mabを作製し、これがgp50とgIIIを認識すること、およびウイルス粒子上でgp50が中和Mabの主要標的抗原であることを報告している。本実験の結果は温和な可溶化を行ったウイルス抗原においてもgp50が依然高い中和抗体産生能を構造的に保持していることを示すものである。一方、中和Mabの中にはgIIあるいはgIIIを認識するものも認められたが、gIIIを認識するMabの中和活性は補体要求性であったこと、あるいはgII

を認識するMAbの中和活性が低かったことから、中和抗体を誘導する抗原としてのこれらの抗原の重要性は低いと思われる。これらの結果は、gp50が中和抗体の誘導を目的としたサブユニットワクチンの有力な候補であり、ウイルス粒子あるいはウイルス感染細胞を温和な条件で可溶化することにより、gp50の抗原構造を保持したまま単離できることを示唆するものである。

競合結合試験において、MAb 1B6と4G6が互いに異なる独立したエピトープを認識することから、YS-81株のgp50分子上に2つの中和エピトープが存在することが明らかとなった。Wathenら(113)やCoeら(4)はPrV Indiana-Funkhauser株においてもgp50分子に複数の中和エピトープが存在することを報告しており、ここで明らかにされたようにgp50分子上に複数の中和エピトープが存在することはPrV株間に共通の事象であると考えられる。PrVのgp50は単純ヘルペスウイルス(HSV)1の糖蛋白gDとアミノ酸配列において相同性がみられること(81)やgDが中和抗体産生を誘導する(5,14,80)ことから両者はその機能も類似していると考えられている。さらに、gDに対する中和MAbはウイルスの細胞への侵入と融合を阻止することが明らかにされ(19,26)、その中和エピトープの同定が進められている。それによると、gDの中和エピトープはMAbの反応性によって7つのグループに分けられ、そのうち3つは変性したgDでも反応性をもつ連続エピトープであるが、残り4つはgDを変性させることによって反応性を失う不連続エピトープであること(13)、さらに、不連続エピトープのうちsite 1は立体構造依存性の最も強い補体非要求性の中和エピトープであり(88)、ウイルスの侵入に必須の部位であることなどが示されている(69)。MAb 1B6と4G6の認識するgp50の中和エピトープはHSVのgDの不連続エピトープと同様に立体構造依存性であったことから、これらのエピトープがHSVのgD分子上の中和エピトープと同様にウイルスの感染過程に重要な役割を演じていると推察される。最近、Eloitら(15)はPrVのgp50にウイルスの侵入に関与する抗原部位が存在すること示唆している。今後、PrV感染におけるgp50の機能を明らかにする上で、MAb 1B6あるいは4G6の中和機構の解析が必要であろう。

## 第2章：糖蛋白g IIの単離とその免疫原性

### 1. 要旨

可溶性PrV粒子からウイルス糖蛋白固有の疎水性結合能を利用してグリコシドと結合させた免疫刺激複合体(immunostimulating complex, ISCOM)を作製し、ウイルス糖蛋白の単離を試みた。さらに、作製した抗原提示構造であるISCOMのマウスとブタにおける免疫原性を調べ、サブユニットワクチンとしての可能性を検討し、以下の結果を得た。

Triton X-100を用いて可溶化したPrV粒子をQuil Aを含む蔗糖密度勾配上に重層した後、これを遠心することにより直径約40 nmの蜂巢状構造を持つISCOMを作製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロットの結果、ISCOMはPrVのウイルス構成蛋白のうち糖蛋白であるg IIのみを含んでいることが明らかになり、本ISCOMをg II/ISCOMと称することとした。

このg II/ISCOMの感染防御効果をマウスを用いて調べたところ、g II/ISCOMを免疫したマウスは中和抗体を産生するとともに、致死量のウイルス感染に対しても耐過・生存する個体が認められたことから、g II/ISCOMがマウスにおいて感染防御効果を持つことが判明した。

次いで、PrVの自然宿主であるブタを用いた感染防御試験を企画した。まず、4頭の1カ月齢のブタに1頭あたり170  $\mu$ gのg II/ISCOMを2週間間隔で2回免疫した。最終免疫後10日目に $10^{6.0}$  pfuのウイルスで鼻腔内に噴霧接種を行って攻撃し、その後のブタの臨床症状の観察を行うとともに、鼻汁からの排泄ウイルス量を測定した。その結果、無処置対照群のブタは発熱、嘔吐および神経症状などの典型的な症状を示して8日目までにすべて死亡したが、ISCOM免疫群のブタは軽度の症状を示したのみで全頭が耐過・生存した。また、ウイルス攻撃後のg II/ISCOM免疫群のウイルス排泄量は対照群に比較して1/100以下であり、有意差が認められた。

g II/ISCOM免疫後とウイルス攻撃後にそれぞれ採取した血清を免疫沈降によって比較したところ、g II/ISCOM免疫後の血清はg IIを含む2種類の蛋白と反応し

たが、ウイルス攻撃後の血清はほとんどすべてのウイルス蛋白と反応し、両血清は明瞭に区別された。

## 2. 序文

PrV 粒子のエンベロープや感染細胞表面に発現されるウイルス糖蛋白は、宿主に液性免疫や細胞性免疫を惹起させることから、これまでこれらの糖蛋白を界面活性剤で可溶化したもの(47,84,106)や、アフィニティークロマトグラフィーによって精製したもの(27,85)を、サブユニットワクチンとして用いる試みが行われている。また、遺伝子組換えによって発現させた糖蛋白をサブユニットワクチンとして用いる試みも行われている(49)。しかし、このようなサブユニットワクチンは調製産物の中に多種類のウイルス成分や細胞成分が含まれているため、ワクチンを接種されたブタはこうした含有物質によって特定の糖蛋白以外のウイルス抗原に対する抗体を産生し、抗体検査によるワクチン接種豚と感染豚の識別を困難にしている。また、単離された抗原単独での免疫原性は低く、高い免疫応答を得るためにはアジュバントの併用が不可欠である。近年、オーエスキー病に対するサブユニットワクチンの開発が各国でおこなわれているが、高い免疫原性を持ち、しかもワクチン接種豚と感染豚を血清学的検査によって明確に区別し得る有効なワクチンは未だ開発されていない。

1984年、Moreinら(67)は、ウイルス蛋白とグリコシドとの複合体を形成することによって免疫効果を高めることができると報告し、この抗原提示構造体を免疫刺激複合体(Immunostimulating complex, ISCOM)と称した。ISCOMは液性免疫(12, 17, 66, 98)のみならず細胞性免疫(12, 99, 112, 107)も増強させる効果があることが示されている。さらに、両親媒性を持つ糖蛋白はそれ自身の極性によって複合体に組み込まれる(63)ことから、同時にウイルス抗原のサブユニット化も図れることが期待できる。そこで、本章ではPrVの糖蛋白を構築したISCOMを作製し、そのサブユニットワクチンとしての可能性を検討した。

## 3. 材料と方法

ウイルスと細胞： ウイルスは第1章と同様にPrV VS-81株を用いた。ISCOM作製用ウイルスの増殖にはBHK<sub>21</sub>C<sub>12</sub>細胞を、またウイルス量の測定、中和試験およ

び分析用のウイルス抗原の作製にはPK-15細胞を用いた。なお、ウイルスの培養、精製およびウイルス抗原の作製は第1章に記載した方法で行った。

ISCOMの作製： ISCOMは精製ウイルスを用いてMoreinらの方法(67)に準じて、遠心法により作製した。精製ウイルスを1%のTriton X-100を含む20 mM トリシュー塩酸緩衝液(pH7.4)を用いて室温で20分間可溶化した後、Beckman SW60ローターで32,000 rpmで1時間遠心し上清を得た。この上清1 mgを10-30%の分画に0.2%のQuil A (Superfos, デンマーク)を含む、10%刻みで上記緩衝液を用いて作製した10-60%濃度の不連続蔗糖密度勾配上に重層し、Beckman SW60ローターを用いて50,000 rpmで20℃で4時間遠心した。遠心終了後、蔗糖密度勾配各分画を電子顕微鏡により観察し、ISCOMの形成を確認した。

ISCOMの性状分析： ISCOMに含まれる蛋白を同定するため、SDS-PAGEとウェスタンブロットを行った。SDS-PAGEには8-16%の濃度勾配ゲル(SDS-PAGE mini, テフコ社、日本)を用い、泳動終了後、市販の試薬(Silver-stain kit, バイオラッド社、米国)を用いて銀染色を行って蛋白の同定を試みた。また、ウェスタンブロットでは10%ゲルを用いたSDS-PAGEを行い、泳動終了後、転写膜(Polyvinylidene difluoride: PVDF膜, Immobilon-P, ミリポア社、米国)上に電氣的に転写した。この膜を2%の馬血清と0.15 MのNaClを含む20 mMのトリシュー塩酸緩衝液(pH7.4)に浸した後、感染耐過豚血清と室温で1時間反応させた。さらに、このPVDF膜を上記トリシュー塩酸緩衝液で充分洗浄した後、HRPO標識抗ブタIgGと室温で1時間反応させ、結合した標識抗体を四塩酸3,3'ジアミノベンジンで発色させた。

感染防御試験： マウスにおける感染防御試験には各群5匹の4週齢BALB/cマウスを用いた。1匹あたりそれぞれ1、0.2 および0.04  $\mu$ gのISCOMを筋肉内接種で免疫し、さらに2週後に同量のISCOMを腹腔内接種により追加免疫した。最終免疫後10日目に100 LD<sub>50</sub>のYS-81株を皮下接種で攻撃し、その後2週間マウスの生存を観察した。また、最終免疫後7日目に眼窩静脈叢より採血を行い、各群ごとに血清をプールして抗体価を測定した。

ブタにおける感染防御試験には1カ月齢の中ヨークシャー豚8頭を用い、これを4頭づつ2群に分けて1群を免疫群、残りを対照群とした。免疫群の豚に1頭あたり170 $\mu$ gのISCOMを2週間間隔で2回筋肉内接種により免疫した。最終免疫後10日目に、両群の豚に $10^{5.0}$  pfuのYS-81株をネブライザーを用いた鼻腔内噴霧接種により攻撃した。ウイルス攻撃後2週間ブタの臨床症状の観察を行うとともに、鼻汁からの排泄ウイルス量を測定した。また、免疫前、ウイルス攻撃時およびウイルス攻撃後2週目に血清を採取し抗体価の測定を行った。

排泄ウイルス量の測定：ウイルス攻撃後の豚からの排泄ウイルス量は鼻腔ぬぐい液を用いて、ブラック法により測定した。豚の鼻汁を採取した綿棒は、40 $\mu$ g/mlの硫酸ゲンタマイシンと2.5 $\mu$ g/mlのファンギゾンを加えた維持培養液2mlを分注した試験管に入れ、-80 $^{\circ}$ Cでウイルス量の測定時まで保存した。採取材料を解凍したあと綿棒を除き、維持培養液で10倍階段希釈した。各希釈50 $\mu$ lをあらかじめ24ウェルプレートに培養したPK-15細胞に接種し、37 $^{\circ}$ Cで1時間吸着させた。細胞を維持培養液で2回洗浄した後、1.5%のメチルセルロースを含む維持培養液を重層し37 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。培養終了後に0.05%のメチレンブルーを含む10%のホルマリン液で固定・染色し、ブラック数を計数してウイルス量を求めた。

抗体の測定：中和抗体価は補体の存在あるいは不在下で、96ウェルプレートを用いた50% CPE抑制法(49)により測定した。マウス血清またはブタ血清を維持培養液で2倍階段希釈した。1ウェルあたり50 $\mu$ lの各血清希釈に25 $\mu$ lのウイルス液(200 TCID<sub>50</sub>)と25 $\mu$ lの5倍希釈新鮮モルモット血清または維持培養液をそれぞれ加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。この混合液に10<sup>+</sup>個のPK-15細胞、100 $\mu$ lを加えて37 $^{\circ}$ Cで2日間培養した。培養終了後に0.05%のメチレンブルーを含む10%のホルマリン液で固定・染色し、CPEの面積がウイルス対照ウェルのCPE面積の50%以下を示した最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。

可溶性ウイルス抗原に対する抗体価は酵素免疫測定法(ELISA)により測定した。96ウェルポリスチレンプレート(Immunlon 2、ダイナテック社、米国)に1ウェルあたり2 $\mu$ gのNP-40で可溶性したウイルス抗原を0.05 Mの炭酸緩衝液

(pH 9.8)で希釈して加え、4℃で1晩静置してウイルス抗原を固相化した。次いで、5%の馬血清を含む燐酸緩衝液(pH 7.4)を加えて抗原未結合部分をブロックした後、0.05%のTween 20を含む燐酸緩衝食塩液(pH 7.4)を洗浄液として抗原固相化プレートを洗浄した。マウス血清は2%の馬血清を加えた洗浄液で2倍階段希釈し、1ウェルあたり50 $\mu$ lの各希釈を重複して抗原固相化プレートに加えて室温で1時間反応させた。ブタ血清は100倍に希釈し、その50 $\mu$ lを抗原固相化プレートに加えて室温で1時間反応させた。プレートを洗浄液で3回洗浄した後、マウス抗体の測定にはHRPO標識抗マウスガンマグロブリンを、ブタ抗体の測定にはHRPO標識抗ブタIgGまたはHRPO標識抗ブタIgMをそれぞれ至適濃度に希釈して加えて室温で1時間反応させた。最後に、このプレートを洗浄液で5回洗浄し、0.4 mgのo-フェニレンジアミン二塩酸塩を加えて発色させ、6 Nの硫酸を加えて反応を停止した。492 nmの波長で吸光度を測定し、ブタ血清ではその吸光度を、マウス血清では0.2以上の吸光度を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とした。

免疫沈降反応は第1章の記載と同様の方法で行った。ただし、SDS-PAGEには材料を2-メルカプトエタノールを加えない非還元状態で用いた。

#### 4. 実験結果

##### ISCOM の性状

精製ウイルスをTriton X-100で可溶化し、グリコシドQuil Aを含む蔗糖密度勾配遠心を行ってISCOMの作製を試みた。遠心終了後の電子顕微鏡観察の結果、蔗糖濃度50%の分画位置にISCOMが形成されていることが確認された。形成されたISCOMは図2-1に示すように直径35-40nmの特徴的な蜂巢状構造を持っていた。精製ウイルス粒子とISCOMに含まれる蛋白をSDS-PAGEによって調べたところ、ウイルス粒子では非還元、還元にかかわらず多数の蛋白が検出されたが、ISCOMでは還元状態で3本、非還元状態で2本の蛋白が検出されたのみであった(図2-2A)。次いで、ISCOMに含まれる蛋白がウイルスに由来するものか否かを調べるため、ウェスタンブロットを行い感染耐過ブタ血清を用いた酵素免疫染色を行

った(図2-2B)。その結果、ウイルス粒子では非還元、還元にかかわらず SDS-PAGEで観察されたとはほぼ同数のウイルス蛋白が染色された。一方、ISCOM では非還元状態で分子量150 KD以上の1つのウイルス蛋白のみが染色されたが、その分子量は正確には決定できなかった。しかし、このISCOM に含まれるウイルス蛋白は2-メルカプトエタノールを加えて還元したとき、分子量約115、88および55KDの3本のバンドに分離されたことから、これがウイルス糖蛋白gIIであることが判明し、以後このISCOM をgII/ISCOM と称することとした。

#### gII/ISCOM 免疫によるマウスの感染防御

gII/ISCOM のマウスにおける免疫原性と感染防御効果の最少有効量を調べる目的でマウスを用いた免疫試験を実施した。マウスをそれぞれ1、0.2 および0.04  $\mu$ g のgII/ISCOM で免疫し、最終免疫10日後に致死量のPrV で攻撃した。その結果、表2-1に示したようにそれぞれ5匹のgII/ISCOM を免疫したマウスのうち1  $\mu$ g 免疫群で3匹、0.2  $\mu$ g 免疫群で1匹が生残し、ウイルスの感染を防御した。しかし、0.04  $\mu$ g 免疫群のマウスは無処置対照群のマウスと同様にウイルス攻撃後10日目までにすべてが死亡した。ウイルス攻撃時のウイルス抗原に対するELISA 抗体価は、1、0.2 および0.04  $\mu$ g 免疫群でそれぞれ160、40および10倍であり、gII/ISCOM の免疫量に依存した抗体価を示した。また中和抗体は補体を添加した中和試験でのみ検出され、その抗体価は1  $\mu$ g 免疫群で64倍、0.2 および0.04  $\mu$ g 免疫群で16倍であった。

#### gII/ISCOM 免疫によるブタの発病防止

gII/ISCOM のブタにおける免疫原性と感染防御効果あるいは発病防止効果を調べるため、1カ月齢のブタを用いて感染防御試験を実施した。ISCOM 接種とウイルス攻撃後のブタの体重の変化を表2-2に示した。ISCOM 免疫前(0日)とウイルス攻撃時(24日)のブタの平均体重は免疫群と対照群の間には有意の差はみられなかったが、ウイルス攻撃後両群の間には著明な差が認められた。ウイルス攻撃によって対照群のブタはすべて攻撃後8日目までに発熱、くしゃみ、嘔吐および神経症状などの典型的なオーエスキー病症状を示して死亡し、死亡時体重はウイルス攻撃時のそれに比較して著しく減少した。これに対して、免疫群のブタ

は軽度の発熱を示したのみですべて生残し、ウイルス攻撃後1週目までに一過性の増体量の停滞がみられたが1週以後は回復した。

ウイルス攻撃後の両群のブタからのウイルス排泄量を表2-3に示した。両群のブタともウイルス攻撃後2、3日から鼻汁へのウイルスの排泄が認められ、対照群では死亡するまで、免疫群では7日目まで続いた。その平均ウイルス量は両群とも5日目に最高値を示し、対照群で $10^{2.35}$ pfu/50 $\mu$ l、免疫群で $10^{2.35}$ pfu/50 $\mu$ lとなった。対照群のウイルス量は免疫群のそれより多く、ウイルス攻撃後3日から5日までの間の両群のウイルス量には5%の危険率で有意の差がみられた。

対照群のブタのgII/ISCOM接種後の抗体価の推移を表2-4に示した。gII/ISCOMの追加免疫後に補体要求性中和抗体価は平均値で45倍を示したが補体非要求性中和抗体は検出されなかった。しかし、ウイルス攻撃後は両抗体価は大きく上昇し、攻撃後2週目に補体要求性中和抗体は平均値で1722倍、補体非要求性中和抗体は同様に181倍となった。一方、ウイルス抗原に対するIgG抗体はgII/ISCOM免疫で0.18上昇したのみであったが、ウイルス攻撃後は0.85と著しく上昇した。なお、IgM抗体には大きな変化は認められなかった。

#### gII/ISCOM免疫豚と感染豚の抗体識別

gII/ISCOM免疫豚と感染豚の血清学的検査による識別の可能性を調べる目的で、免疫群のブタの免疫前、ISCOM免疫後、PrV攻撃後および自然感染豚の血清を用いて免疫沈降反応を行った。各血清と反応して沈降したウイルス蛋白の非還元状態でのSDS-PAGE像を図2-3に示した。ISCOM免疫後のブタ血清は分子量約200と130KDの2つの蛋白のみを沈降したが、PrV攻撃耐過後の血清は自然感染豚の血清と同様に分子量約200、140、130、100、84、55および31KDの蛋白を沈降し、両血清は明瞭に区別された。

#### 5. 考察

ISCOMは動物において高い液性免疫応答や細胞性免疫応答を惹起することから、

最近になって多くのウイルス(44, 67, 77, 78, 86, 103, 105)や原虫感染症(79, 95)に対する有望なサブユニットワクチンの候補として注目されている。特にヘルペスウイルスはそのエンベロープに感染防御あるいは発病防御に関与する重要な抗原を持つことから、これをISCOMに構築することによってサブユニットワクチンを作製する試みが行われている(7, 53, 65, 66, 103, 104)。Trudelら(103)はウシヘルペスウイルス1ウイルスで作製したISCOMが子牛で感染防御を起こすことを、またMoreinら(65)はPrVのISCOMがヒツジで感染防御を起こすことを報告している。しかし、彼らの作製したISCOMはウイルスの蛋白とともに多くの細胞由来の蛋白を含んでいるため(7, 53, 65, 103)、血清学的検査によるワクチン抗体と感染抗体の識別が困難である。このように、ISCOMはすでにヘルペスウイルス感染症をはじめ多種類の感染症に対するサブユニットワクチンとしてその開発が検討されているが、オーエスキー病への応用の事例は少なく、しかも免疫学的に重要な糖蛋白のみを構築したオーエスキー病のISCOMサブユニットワクチンの作出に成功した報告は現在まで見られていない。

本章で作製したISCOMはSDS-PAGEと銀染色で明らかになったように、精製ウイルス粒子に比較してもわずかの蛋白のみを含んでいたことから、ISCOMを作製する過程で細胞成分やウイルス成分が除去されたものと考えられる。また、ウェスタンブロットで検出されたウイルス蛋白は、非還元状態では1つであったが、これを還元することにより分子量115、88および55KDの3つの蛋白に解裂した。この結果は、これらのウイルス蛋白が相互にS-S結合によって結合していることを示すものである。PrVの糖蛋白のうちgIIはgIIa(125KD)、gIIb(74KD)およびgIIc(58KD)の3つの糖蛋白がS-S結合によって結合した複合体であることが明らかにされている(22)。このgIIの性状と分子量は今回作製されたISCOMに構築された蛋白のそれと一致しており、作製されたISCOMはウイルス糖蛋白gIIのみを含んでいたと結論される。

Moreinら(65)は、PrVを界面活性剤のMega-10で可溶化してISCOMを作製した場合、作製されたISCOMにはgp50やgIIIをはじめ多種類のウイルス蛋白が含まれることを報告している。糖蛋白はそれ自身の疎水性によってISCOMに構築されるが(35, 63)、可溶化に用いた界面活性剤によってもISCOMへ構築される効率が影響を受ける(11)。イヌジステンパーウイルスを用いたISCOMの作製実験では、ウ

イルスのF蛋白はTriton X-100を用いて遠心法を使った場合にはH蛋白に比較してより効率的にISCOM に構築されることが報告されている(11)。本章の実験でg IIのみがISCOM に構築されたことは、用いた界面活性剤によってg IIの疎水性領域のグリコシドとの結合性が高められたことにより、他の糖蛋白に比較してより効率よくISCOM に構築されたものと考えられる。このようにISCOM に構築する過程でウイルスの構成蛋白の一部のみが精製されることは、ISCOM 作製技術が他のウイルスや細菌などの感染症に対するサブユニットワクチンの開発に応用できることを示唆するものである。

PrV 糖蛋白g II、g IIIおよびgp50が中和Mab の標的抗原であることはすでに報告されている(4,16,71)。また、これらの中和Mab の受身免疫がマウスで感染防御を起こすことも報告されている(16,48,113)。しかし、これまでにg IIそのものを用いてその免疫学的機能を明らかにした報告はない。本章では、まずg II/ISCOM をマウスに免疫し、その抗体産生能と感染防御能を調べた。g II/ISCOM を免疫したマウスは補体要求性の中和抗体を産生し、その抗体産生は0.04 $\mu$ gという微量投与によっても起こることからISCOM が十分な免疫原性を持つことが明らかにされた。g II/ISCOM の免疫によって産生された中和抗体は補体要求性であり、補体を加えないときはその活性は検出されなかった。このことはg IIが補体要求性中和Mab の標的抗原であるという報告(71)と矛盾しない。g II/ISCOM を免疫したマウスのうち1 および0.2  $\mu$ g免疫群ではウイルス攻撃に対して生残した。マウスはPrV 感染が成立すればすべて死亡するため、マウスがPrV の感染から耐過したことはg II/ISCOM がマウスにおいて感染防御効果を持つことを示している。

本章ではさらに、PrV の自然宿主であるブタを用いて感染防御試験を行い、g II/ISCOMの感染防御効果とウイルスの再排泄抑制効果について検討した。g II/ISCOM を免疫したブタはマウスと同様に補体要求性中和抗体を産生し、致死性の感染から免れることが明らかとなった。さらにウイルス攻撃後のg II/ISCOM 免疫群のブタからのウイルスの排泄量は対照群のブタに比較して100倍低く、g II/ISCOM の免疫がウイルスの再排泄を抑制する効果があることが明らかとなった。これらの結果は、g IIがオーエスキー病ワクチンの有力な候補であることを示唆するものである。

しかしながら、ウイルス攻撃後にg II/ISCOM を免疫したブタが軽度の発熱と食

欲不振を示したこと、鼻汁からのウイルス排泄が認められたこと、および抗体価の上昇が認められたことから、このgII/ISCOMのウイルスに対する感染阻止効果は不十分であると思われる。現在までに開発されたオーエスキー病に対するワクチンには、発症防止効果は認められるものの感染防御効果は認められていない。このためにワクチンを接種されたブタが流行株に再感染し潜伏感染を引き起こすことが野外の症例でしばしば観察されている。こうした潜伏感染豚は、やがて体内で潜伏状態のウイルスが再活性化され感染性ウイルスを排泄するようになり、新たなウイルスの感染源となる。そこで、オーエスキー病ワクチンに感染防御効果が期待できない現状から、ワクチン接種豚と潜伏感染豚を血清学的検査によって識別し、潜伏感染豚を効果的に摘発・淘汰することがオーエスキー病の清浄化対策を進める上で最も重要とされ、オーエスキー病のワクチンにはワクチン接種豚と感染豚との抗体識別が可能であることが要求されている。ここで作製されたISCOMはgIIのみを含むため、その免疫血清のウイルス抗原に対する反応は感染豚のそれと異なっていることが予想された。そこで、gII/ISCOM免疫後のブタ血清とウイルス感染後のブタ血清を用いて免疫沈降反応を行った。ウイルス攻撃後の血清は自然感染豚の血清と同様、ウイルス糖蛋白をはじめとするほとんどのウイルス蛋白と反応したが、gII/ISCOM免疫豚血清は2つのウイルス蛋白とのみ反応した。gII/ISCOM免疫豚血清が反応するウイルス蛋白のうち、200KDの蛋白はその分子量からgIIであると思われる。またもうひとつの130KDの蛋白はgIIの前駆体蛋白(117,119)であると思われるが、他にもPrVに少量存在するウイルス蛋白である可能性も考えられる。いずれにしても、免疫沈降においてgII/ISCOM免疫豚血清と感染豚血清の反応性が明瞭に区別されたことは、gII/ISCOMをワクチンとして使用した場合、血清学的検査によってワクチンによる抗体とウイルス感染による抗体とを明確に区別できることを示すものである。本章の成績は、gII/ISCOMがオーエスキー病の発病阻止と疾病蔓延防止に有効であるばかりでなく、潜伏感染豚の摘発に必要な抗体識別機能を合わせ持つ効果的なオーエスキー病サブユニットワクチンとして使用可能なことを示すものである。

### 第3章：糖蛋白gp50の単離とその免疫原性

#### 1. 要旨

PrV 糖蛋白のうちウイルスの増殖に必須の糖蛋白であるgp50を精製し、これを免疫刺激複合体 (ISCOM) に構築してマウスにおける抗体産生と感染防御効果を調べた。さらに、種々のウイルス糖蛋白を構築したISCOMを用いて、PrV 糖蛋白の免疫機能の比較を行って、以下の結果を得た。

PrV 感染細胞からgp50に対するMABを用いたアフィニティークロマトグラフィーによってgp50を精製した。この精製gp50をコレステロールとフォスファチジルコリンとともにISCOMに構築することを試みたところ、gp50を *Klebsiella pneumoniae* のリポ多糖 (LPS) と結合させた場合に gp50がISCOMに構築され (gp50/ISCOM)、両親媒性を持つLPSを利用することで疎水性の弱い抗原をISCOMに構築できることが明らかになった。

作製したgp50/ISCOMはマウスに補体非要求性中和抗体の産生と感染防御を誘導した。さらにその免疫効果はフロイントの完全アジュバントを用いた場合のそれと同等かそれ以上であり、ISCOMに構築されたgp50が高い免疫原性を示すことが明らかにされた。

マウスにおけるgp50/ISCOM免疫による中和抗体の産生を、gIIおよびすべてのウイルス糖蛋白を含むISCOMの免疫による中和抗体産生と比較したところ、gp50/ISCOMを免疫したマウスでは1回の免疫で補体要求性および非要求性の中和抗体が産生されるのに対し、gIIおよびすべてのウイルス糖蛋白を含むISCOMを免疫したマウスでは追加免疫後にはじめて補体要求性中和抗体が産生されたのみで、gp50の中和抗体産生能がきわめて高いことが明らかとなった。

## 2. 序文

繁殖母豚に対するオーエスキー病ワクチンの使用は、流産を防止するとともに初乳中の移行抗体によって新生豚の感染を防ぐことを目的としている。液性抗体のPrV感染に対する防御効果には限界があるとの指摘もある(51)が、すでに中和Mabの受身免疫によってブタの症状が軽減されることが確認されている(48)。また、高いレベルの移行抗体を持ったブタでは生ワクチンウイルスを筋肉内に接種した場合のみならず、経鼻投与した場合にもワクチンウイルスの増殖が抑えられること(10,110)から、高い移行抗体がウイルスの感染を防ぐ、あるいは感染に必要なウイルス量をあげる効果があるものと考えられる。このことから、母豚に高い中和抗体を産生させ初乳中の移行抗体によって子豚の被害を防ぐことを目的とするワクチンの開発も、オーエスキー病による子豚の直接的な被害を軽減し、本病の清浄化を推進するために極めて重要と考えられる。

第2章で作製したgII/ISCOMはウイルス感染による子豚の死亡や症状の重篤化を抑えるとともに、ウイルス排泄量の低減化には予防効果がみられたが、gIIが補体要求性中和Mabを産生する抗原であるため(71)中和抗体の誘導能は比較的低かった。第1章で得られた成績でgp50が補体非要求性中和抗体を強力に誘導したことから、gp50は高力価の中和抗体の誘導に有効な抗原であると考えられる。そこで第2章と同様に水溶性で高いアジュバント活性を持つISCOMにgp50を構築することによって、gp50を用いたサブユニットワクチンを開発すれば、オーエスキー病ワクチンの有効性と安全性をさらに高め、しかも移行抗体を利用した子豚の免疫も期待できる。本章では単離したgp50をISCOMに構築する方法を検討するとともに、その免疫原性をマウスを用いて調べた。

## 3. 材料と方法

ウイルスと細胞：ウイルスは第1章と同様にPrV YS-81株を用いた。ISCOM作製用ウイルスの増殖にはBHK<sub>21</sub>C<sub>13</sub>細胞を、中和試験にはPK-15細胞を用いた。ウイルスの培養と精製は第1章に記載した方法で行った。

gp50の精製： gp50はPrV 感染細胞より第1章で作出したMAb 1B6 を用いてアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。即ち、BHK<sub>21</sub>C<sub>13</sub>細胞に1細胞あたり0.1 pfu (multiplicity of infection : m.o.i= 0.1)のウイルスを接種し、広範な細胞変性効果が認められたときに細胞を回収した。感染細胞を0.5%のTriton X-100、5 mMのヨードアセタミド、10 μg/mlのアプロチニンおよび1 mMのPMSFを含む20 mM トリシュー塩酸緩衝液(pH8.0)を用いて4℃で3時間可溶化した。次いで、この可溶化上清をMAb 1B6 をカップリングさせたSepharose 4B (ファルマシア社、スウェーデン)を充填したカラムに通した。カラムを0.1%のTriton X-100、0.5MのNaClを含む50mMの磷酸緩衝液(pH6.3)で充分洗浄した後、0.1%のTriton X-100と0.15 MのNaClを含む50mMのグリシン(pH2.5)で溶出した。溶出液に直ちに1/5量の1 Mのトリシュー塩酸緩衝液(pH9.0)を加えて中和し、20mMのトリシュー塩酸緩衝液(pH8.0)で透析を行った後、凍結乾燥し保存した。

リボ多糖とgp50の結合： *Klebsiella pneumoniae* から精製されたリボ多糖(LPS)は岐阜免疫研究所 児玉義勝博士より分与されたものを使用した。LPSとgp50の結合には中根らの方法(72)を用いた。4 mgの LPSを1 mlの蒸留水に溶解し、これに0.2 mlの0.1M過沃素酸ナトリウム液を加えて室温で20分間混和した後、1 mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.4)で1夜透析した。この活性化したLPS溶液に20 μlの0.2M炭酸ナトリウム液を加えてpHを9.0に調整した後、直ちに、あらかじめ1 mlの炭酸緩衝液(pH9.5)に溶解させた1 mgのgp50を加えて室温で2時間攪拌した。この混合液に0.1 mlの水素化ホウ素ナトリウム(4mg/ml)を加えて、4℃で2時間放置した。さらに磷酸緩衝食塩液で1晩透析し、gp50-LPS結合物を得た。

ISCOM の作製： gp50/ISCOM の作製はde Vriesらの方法(12)に従った。2容量のフوسفアチジルコリンと1容量のコレステロールをクロロホルムに溶解し、窒素ガスを当てて溶媒を蒸発させたのち、1%のオクチルグリコシドと0.15MのNaClを含む20mMトリシュー塩酸緩衝液(pH8.0)に最終脂質濃度が1 mg/mlになるように溶解させて脂質溶液を得た。1容量の1mg/mlのgp50-LPS結合物または精製gp50を1.5容量の脂質溶液と混合し、さらにこれに2容量の10 %Quil Aを加えて室温で

1時間攪拌した。次いで、この混合液を0.15 MのNaClを含む20mMトリスー塩酸緩衝液(pH8.0)で4℃で3日間透析した。最後に、20-60%の蔗糖密度勾配上に重層し、Beckman SW60ローターを用いて50,000 rpmで20℃で4時間遠心した。

gH/ISCOM は第2章に記載した方法で作製した。

PrV/ISCOM はMoreinらの方法(65)で作製した。すなわちgp50/ISCOMの作製に用いたと同様の脂質溶液にMega-10で可溶化した精製ウイルスとQuil Aを加えて0.15 MのNaClを含む20mMトリスー塩酸緩衝液(pH8.0)で4℃で3日間透析した。これを20-60%の蔗糖密度勾配上に重層し、Beckman SW60ローターを用いて50,000 rpmで20℃で4時間遠心しISCOMを精製した。

ISCOMの性状分析：遠心終了後の20-60%の蔗糖密度勾配を分画し、第1章に記載した方法でドットプロットとMab 1B6を用いた酵素免疫染色を行った。ISCOMの形成は電子顕微鏡観察により確認し、さらにgp50のISCOM上での局在を調べるためにMab 1B6と金コロイド標識抗マウスIgGを用いた免疫電子顕微鏡法を行った。ISCOM作製各段階の材料を用いて第2章に記載した方法によりウェスタンブロットと感染耐過豚血清を用いた酵素免疫染色を行った。ISCOMに含まれるLPSは市販のエンドトキシン測定用試薬(トキシカラーシステム、生化学工業)を用いて指示書の方法で測定した。

マウスでの免疫試験：各群5匹の4週齢BALB/cマウスに1匹あたりそれぞれ5、1および0.2 $\mu$ gのgp50/ISCOMを筋肉内接種で免疫し、さらに2週後に同量のgp50/ISCOMを腹腔内接種により追加免疫した。また、同じく各群5匹の4週齢BALB/cマウスに1匹あたりそれぞれ5および1 $\mu$ gの精製gp50を等量のプロイントの完全アジュバント(FCA)と混合して上記と同様に免疫した。免疫前、免疫後7日目、免疫後14日目およびウイルス攻撃時に眼窩静脈叢より採血を行い、各群ごとに血清をプールして中和抗体価を測定した。最終免疫後10日目に100LD<sub>50</sub>のYS-81株を皮下接種で攻撃し、その後2週間マウスの生存を観察した。

gp50、gHおよびPrVのすべての糖蛋白を組み込んだ3種類のISCOMの中和抗体誘導能もマウスを用いて調べた。各群5匹の4週齢BALB/cマウスに1匹あたりそれぞれ1 $\mu$ gの各ISCOMを筋肉内接種で免疫し、さらに2週後に同量のISCOM

を腹腔内接種により追加免疫した。免疫後7日間隔で眼窩静脈叢より採血を行い、各群ごとに血清をプールして中和抗体価を測定した。

中和試験：中和抗体価は第2章に記載した方法により補体の存在あるいは不在下で、96ウェルプレートを用いた50% CPE抑制法により測定した。

#### 4. 実験結果

##### gp50/ISCOMの作製とその性状

精製gp50とgp50-LPS結合物を用いてISCOMの作製を試みた。透析により界面活性剤を除いた後、遊離のQuil Aを除くため20-60%の蔗糖密度勾配遠心を行い、各分画についてドットプロットとgp50に対するMabで免疫染色を行って、ISCOMの沈降位置を調べた。図3-1に示すように、LPSと結合したgp50は蔗糖濃度約30%以上の分画まで沈降しMabと反応したが、gp50単独では蔗糖勾配のいずれの分画でもMabとの反応はみられず複合体を形成していないことがわかれた。各分画の電子顕微鏡観察でもgp50-LPS結合物を用いた場合には蔗糖濃度40-60%の位置に蜂巣状の構造が観察され、ISCOMが構築されていることが確認された。これに対してgp50を単独で用いた場合は蔗糖勾配中にはどのような構造物も観察されなかった。

ISCOMの作製過程におけるgp50の存在はウェスタンブロットと感染耐過豚血清による免疫染色により調べた。図3-2に示すようにLPSと結合させて作製したISCOMにはアフィニティークロマトグラフィーによって精製したときと同様にgp50が含まれていることが明らかとなった。またISCOMにgp50に対するMabと金コロイド標識抗マウスIgGを反応させた免疫電子顕微鏡法でも金粒子はISCOMに吸着していた(図3-3)。さらに、ISCOM中に含まれるLPSの量をエンドトキシン測定法によって調べた結果、51 $\mu$ gのgp50に対しLPSの量は82 $\mu$ gであり、gp50とLPSが同じ重量比で結合していることが明らかとなった。

##### gp50/ISCOMのマウスにおける免疫原性と感染防御効果

マウスにおけるgp50/ISCOMの免疫原性と感染防御効果を精製gp50をFCAとともに

に免疫した場合のそれと比較した。表 3-1 に示したように gp50/ISCOM をそれぞれ 5、1 および 0.2  $\mu$ g づつ 2 回免疫した群のマウスは補体要求性および非要求性の中和抗体を産生し、その抗体価は免疫量に依存していた。同様に精製 gp50 を FCA とともに免疫した群でも補体要求性および非要求性の中和抗体が産生された。それぞれの群の抗体価を比較すると、gp50/ISCOM を免疫した群の抗体価は同量の gp50 を FCA とともに免疫した群と比較して同等かそれ以上に高かった。また補体要求性中和抗体価はすべての群において補体非要求性中和抗体価に比べて高かった。最終免疫 10 日後に致死量の PrV で攻撃した結果、マウスの生存率は抗体価に比例しており gp50/ISCOM を 0.2  $\mu$ g 免疫した群でも 1 匹が生残し、ウイルスの感染を防御したことを示していた。gp50/ISCOM を免疫した群の生存率は同量の gp50 を FCA とともに免疫した群に比べほぼ同等であった。

#### gp50/ISCOM による中和抗体の誘導

感染防御試験における gp50/ISCOM を免疫した後の中和抗体の産生を調べ、その結果を図 3-4 に示した。5  $\mu$ g の gp50/ISCOM を免疫した群の中和抗体価の推移を 5  $\mu$ g の gp50 を FCA とともに免疫した群のそれと比較したところ、いずれの群でも初回免疫後 1 週目から補体要求性および非要求性の中和抗体の産生がみられ、その抗体価は追加免疫により大きく上昇した。補体非要求性中和抗体価の推移は両群で同じであったが、補体要求性中和抗体価は gp50/ISCOM 免疫群において 2-4 倍高かった。次いで、この gp50/ISCOM による中和抗体の誘導能を他のウイルス糖蛋白を組み込んだ ISCOM と比較した。Morein 等の方法で作製した ISCOM は PrV のほとんどすべての糖蛋白を含んでいたことから、これを PrV/ISCOM として使用した。また、第 2 章で作製したものを g II/ISCOM として使用した。その結果、図 3-5 に示すように gp50/ISCOM、g II/ISCOM および PrV/ISCOM をそれぞれ 1  $\mu$ g づつ免疫したマウスのうち、gp50/ISCOM を免疫したマウスでは 1 回の免疫で中和抗体が産生されるのに対し、g II/ISCOM と PrV/ISCOM を免疫したマウスでは追加免疫で補体要求性中和抗体が産生されたのみであった。

## 5. 考察

ISCOM はその構造の中にアジュバント活性を持ち (built-in-adjuvant)、それ自体が水溶性であることや組み込まれた抗原に対する強い免疫応答を誘導できることなどから、精製した抗原や小さなペプチドの免疫原性を高めるための有望な担体と考えられている(45,63,64,66,67)。コレステロールとQuil Aのみでも ISCOM の特有の構造をとることが示されているが、抗原の ISCOM への構築には抗原のもつ疎水性領域が必要であるとされている(35,46)。第2章で示したように ISCOM は蔗糖密度勾配遠心を行った場合、蔗糖密度50%付近にまで沈降する。本章の実験では、精製gp50を単独で用いた場合には図3-1で示したようにgp50を含む分画は蔗糖密度勾配中には検出されなかった。これはgp50が単独では ISCOM に構築されないことを示しており、おそらくgp50分子の疎水性領域が少ない、あるいはその領域の疎水性が弱いことに起因するものと思われる。このことは第2章の結果でもPrVの糖蛋白のうち ISCOM に構築されたのはgIIのみであり、それ以外の糖蛋白を ISCOM に組み込むことは出来なかったことから支持される。

本章では、gp50を効果的に ISCOM に構築するため、両親媒性を持つ LPSとgp50の結合物を作製した。LPSの多糖部分を介して過沃素酸によってgp50と結合させた結果、図3-1にみられるようにgp50は複合体を作って蔗糖勾配中に沈降することが確認された。このことはgp50が LPSの脂溶性部分を介して ISCOM に構築されたものと考えられる。こうした抗原の修飾はgp50の抗原性を変化させる可能性もあるが、作製された ISCOM には免疫電子顕微鏡法によりgp50に対して高い中和活性を持つMab が反応したことから、gp50の中和エピトープは ISCOM 上で保持されていることがうかがわれる。

マウスでの中和抗体産生能を指標にgp50の免疫増強効果を ISCOM とFCA とで比較したところ、ISCOM により免疫した場合は、gp50のいずれの投与量でも FCAをアジュバントとして用いた場合より高い中和抗体価を示し、ISCOM が FCAと同等以上の免疫増強作用があることが判明した。また致死量のウイルス感染に対する感染防御効果でも、ISCOM は FCAを併用した場合と同等かそれ以上の効果を持つことが明らかとなった。Klebsiella pneumoniae の LPSはマウスで免疫増強作用を持つことがすでに明らかにされている(73)が、マウスでのその作用発現には

200  $\mu$ g が必要である。ここで用いた ISCOM 中の LPS 量は gp50 の量とほぼ同じであることから、gp50/ISCOM による免疫増強効果は LPS によるものというよりは、むしろ抗原提示構造体である ISCOM 自体に存在するものと考えられる。

マウスの感染防御を誘導する gp50/ISCOM の最少量は第 2 章で述べた g II/ISCOM の量とほぼ同じであったが、gp50/ISCOM と g II/ISCOM によって誘導された中和抗体価とその性状は大きく異なっていた。すなわち、g II/ISCOM の免疫によって産生されるのは補体要求性中和抗体であるのに対し、gp50/ISCOM の免疫では補体非要求性中和抗体も産生され、その抗体価も著しく高かった。さらに、gp50/ISCOM を免疫したマウスは 1 週目から補体要求性と非要求性の中和抗体を産生した。そこで、gp50 の中和抗体産生能を PrV の他の糖蛋白のそれと比較するため g II あるいは PrV のほぼすべての糖蛋白を含む ISCOM をそれぞれ作製し、マウスにおける抗体応答を調べた。それぞれの ISCOM をマウスに 1  $\mu$ g 免疫したところ、gp50/ISCOM を免疫した群では 1 回の免疫で補体要求性および非要求性の中和抗体の産生がみられた。これに対して、g II/ISCOM および PrV/ISCOM では補体要求性の中和抗体が 2 回目の免疫ではじめて産生されたにとどまった。このことは gp50 の中和抗体産生能が他の PrV 糖蛋白に比較して高いことを示している。第 1 章の結果においても、gp50 は補体非要求性中和抗体の主要標的抗原であることを明らかにしているが、本章の結果は能動免疫によっても gp50 の中和抗体産生能が高いことを明らかにするものである。

最近、遺伝子組換え技術によって真核細胞で発現させた(49)、あるいは感染細胞から精製した gp50 をサブユニットワクチンとして用いる試み(27,70)が行われているが、その効果を高めるためにはアジュバントの併用を必要とする。しかし、現在用いられているアジュバントには局所における副反応がみられるという欠点があるため、実用化には至っていない。本実験で gp50 が LPS と結合させることにより効果的に ISCOM に構築され、さらに免疫増強効果が認められたことは、精製した抗原をサブユニットワクチンとして用いるのに有効な手段を与えると思われる。また、中和抗体産生能に優れた gp50/ISCOM は、母豚の血清中和抗体価を高め初乳中の移行抗体によって新生豚の感染を防止することを目的としたサブユニットワクチンの有力な候補であると考えられる。

#### 第4章 糖蛋白に対する抗イデオタイプ抗体の作製と免疫原性

##### 1. 要旨

PrV 糖蛋白に対する抗イデオタイプ抗体(抗-Id Ab)を作製し、この抗-Id Abのマウスにおける抗体産生能と感染防御効果を調べ、以下の結果を得た。

3種類の中和モノクローナル抗体(MAb)をウサギに免疫して得た抗血清から、アフィニティークロマトグラフィーによって抗-Id Abを作製した。得られた抗-Id Abは対応するMAbとのみ反応し、抗-Id AbがそれぞれMAbのイデオタイプを認識することが明らかとなった。さらに、抗-Id AbとMABとの結合はウイルス糖蛋白を含むウイルス抗原によって競合的に抑制され、抗-Id AbがMAbの抗原結合部位であるバラトープに対する抗体を含むことが示唆された。

3種類の抗-Id Abをそれぞれマウスに免疫して中和抗体の産生を調べたところ、gp50に対する1種類の抗-Id Abを免疫したマウスは中和抗体を産生し、この抗-Id AbがPrVの中和エピトープの内部イメージを持つことが明らかとなった。さらに、この抗-Id Abを免疫したマウスは致死量のウイルス感染を防御したことから、抗-Id Abがウイルス抗原を免疫した場合と同様にPrVに対する特異的免疫応答を起こすことが明らかとなった。

## 2. 序文

著者は第2章および第3章でPrV 糖蛋白g IIあるいはgp50を構築したISCOM を作製し、ブタとマウスでその免疫効果を実証した。しかし、このようなサブユニットワクチンによっても野外株の感染を阻止することはできず、潜伏感染が成立する可能性が残された。潜伏感染の成立とその後のウイルスの再活性化を阻止するためには、より強固で持続性の宿主の免疫応答を惹起することが必要である。抗イデオタイプ抗体(抗-Id Ab)を免疫原として用いるイデオタイプワクチンは、宿主のイデオタイプネットワークを利用する新しい概念に基づく免疫手法(9,25)であり、Jerne の理論(28)から持続的な免疫を誘導することができるものとして、種々の感染症の予防法として検討が加えられている(1,2,34,89)。さらに、イデオタイプワクチンの利点は、免疫原としても、その製造過程においてもウイルスを用いないことから安全性に優れていることである。このことから、本章では第1章で作出したPrV に対するMab を用いて抗-Id Abを作製しその免疫原性を調べることによって、イデオタイプワクチンがオーエスキー病の予防に有効であるかどうかを検討した。

## 3. 材料と方法

ウイルスと細胞： ウイルスは第1章と同様にYS-81 株を用いた。中和試験および分析用ウイルス抗原の作製にはPK-15 細胞を用いた。ウイルスの培養、精製は第1章に記載した方法で行った。また、ウイルス抗原は精製ウイルスを第1章に記載した方法に従ってNP-40 で可溶化して調整した。

モノクローナル抗体(Mab)： 本実験に使用したMab の性状は表4-1に示した。第1章で作出したMab のうち、ウイルス中和活性の高いMab 1B6、4G6および6G11を抗-Id Abの作製に使用した。また、抗-Id Abの作製に使用したMab と同一のアイソタイプで、ウイルス中和活性のないMab 6H6 と34B8を抗Mab ウサギ血清中の恒常領域に対する抗体の吸収に使用した。Mab の精製は第1章に記載した方法で行った。

抗イデオタイプ抗体 (抗-Id Ab) の作製: 抗-Id AbはそれぞれのMab に対するウサギ抗血清からアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。日本白色種のウサギにフロイントの完全アジュバント(FCA) と混合した300  $\mu$ gの精製Mab を皮下接種によって免疫し、さらに3週後に同量のMab をフロイントの不完全アジュバント(FICA)と混合して筋肉内接種により追加免疫した。Mab に対する抗体の産生を確認した上で、最終免疫後10日目に全採血を行い血清を分離した。56°Cで30分間非働化したウサギ血清を等量の磷酸緩衝食塩液(PBS) で希釈し、免疫に用いたMab と同一のアイソタイプをもつMab (Mab 6H6 または34B8) を結合させたSepharose 4Bカラムを通した。ついで、カラムに吸着されなかった分画を、免疫に用いたMab を結合させたSepharose 4Bカラムに通し、PBSで十分洗浄した後、0.2 Mのグリシン(pH 2.5)で溶出した。溶出した液に直ちにトリスヒドロキシアミノメタン粉末を加えてpH 7.4に調整し、PBSで透析した後-80°Cで使用時まで凍結保存した。

抗-Id Abの特異性の測定: 精製した抗-Id Abの純度とMab に対する特異性はMab を固相化した96ウェルポリスチレンプレートを用いてELISA によって調べた。ELISA は第2章に記載した方法と同様に行った。即ち、階段希釈したアフィニティークロマトグラフィーの各分画または精製した抗-Id Abを、あらかじめMab を固相化したウェルに加え反応させた。Mab と結合した抗体はHRPO標識抗ウサギIgG と、次いで基質としてOPD を加えて発色させ492 nmの波長でその吸光度を測定した。抗体価は0.2 以上の吸光度を示した血清の最大希釈倍数の逆数で示した。

ウイルス抗原のMab と抗-Id Abの反応に対する競合抑制はラジオイムノアッセイによる競合結合試験で調べた。競合結合試験には第1章の記載と同じ緩衝液を用いた。まず、一定量の<sup>125</sup>I 標識Mab (10,000 cpm/25 $\mu$ l)を2倍階段希釈したウイルス抗原と室温で1時間反応させた。また、対照には標識Mab をウイルス抗原を含まない希釈液と混合して同様の反応を行った。次いでこの液50 $\mu$ lを抗-Id Abを固相化したウェルに加えさらに室温で1時間反応させた。各ウェルを十分に洗浄した後、ガンマカウンターでウイルス抗原に結合した標識Mab の結合量(cpm)を測定し、抗-Id Abを固相化していないウェルのcpm を減じて正味のcpm を求めた。各希釈についてウイルス抗原を含まない場合のcpm に対するウイルス

抗原を含んだ場合のcpm を測定し、次式により結合抑制率を算出した。

$$\text{結合抑制率 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{ウイルス抗原を含んだ場合のcpm}}{\text{ウイルス抗原を含まない場合のcpm}} \right) \times 100$$

抗-Id Abによるマウスの免疫： 抗-Id Abの中和抗体誘導能を調べるため、精製した抗-Id Abをマウスに免疫した。各群5匹のBALB/cマウスにそれぞれ50 $\mu$ gの抗-Id AbをFCAと混合して筋肉内接種により免疫し、さらに同量の抗-Id AbをFICAと混合して3週間隔で3回、筋肉内接種により追加免疫した。対照としてウサギIgGを用いて同様に免疫した。それぞれの免疫の1日前および最終免疫後3週目に眼窩静脈叢より採血を行い、各群ごとに血清をプールして中和抗体価を測定した。

抗-Id Abによる感染防御効果はマウスを用いて致死量のウイルスで攻撃接種することにより調べた。各群5匹のBALB/cマウスに抗-Id AbをFCAと混合して筋肉内接種により免疫し、さらに14日目と21日目に同量の抗-Id AbをFICAと混合し筋肉内接種により追加免疫した。対照としてウサギIgGを用いて同様に免疫した。最終免疫後10日目に100 LD<sub>50</sub>のPrV YS-81株を皮下に攻撃し、その後10日間マウスの生死を観察した。また、ウイルス攻撃時に眼窩静脈叢より採血を行い、各群ごとに血清をプールして中和抗体価を測定した。

中和試験： 中和抗体価は第1章に記載した方法に従って、補体の存在および不在で50%ブラック減少法により測定した。

#### 4. 実験結果

##### 抗イデオタイプ抗体の性状

抗-Id Abの作製には第1章で作出した3種類のMab 1B6、4G6および6G11を用いた。表4-1に示したようにMab 1B6と4G6はいずれもIgG1のアイソタイプと補体非要求性の中和活性をもち、第1章で述べたようにそれぞれgp50上の異なったエ

ヒトープを認識していた。また、Mab 6G11はIgG2b のアイソタイプと補体要求性の中和活性をもち、g III を認識していた。アフィニティークロマトグラフィーによる恒常領域に対する抗体の吸収に用いたMab 6H6 と34B8は、それぞれIgG1とIgG2b のアイソタイプでいずれも中和活性がなくg II を認識していた。

それぞれのMab に対するウサギ抗Mab 血清を同じアイソタイプをもち特異性の異なるMab を結合させたSephrose 4B カラムに通して、抗体分子の恒常領域に対する抗体の吸収を行った後、免疫に用いたMab を結合させたアフィニティークラムにより抗-Id Abを精製した。この操作による抗-Id Abの精製度を確認するためにアフィニティークロマトグラフィー各分画のMab に対する反応をELISA により調べた。図4-1にMab 1B6 に対するウサギ抗血清の各分画のMab 1B6 と6H6 に対する反応性を示した。Mab 1B6 に対するウサギ血清とMab 6H6 を結合させたSephrose 4Bカラムに吸着した分画は、いずれもMab 1B6 とMab 6H6 に同程度に反応し、これらがMab 1B6 と6H6 の共通抗原決定基に対する抗体を含むことを示していた。一方、Mab 6H6 カラムに吸着しなかった分画から、さらにMab 1B6 を吸着したカラムを用いて精製した分画は、Mab 6H6 とは反応せずMab 1B6 とのみ反応した。

次に、抗-Id Abの作製に用いたMab の間に共通のイデオタイプが存在するかどうかを確認するため、それぞれの抗-Id Abの異種のMabに対する反応性をELISA によって調べた。表4-2に示すように、これら3種類の抗-Id Abはそれぞれ対応する同種のMab とは強く反応したが、異種のMab との反応は低く、またそれぞれのMab の間には抗原の交差はみられなかった。

さらに、抗-Id AbとMab の反応がウイルス糖蛋白によって競合的に抑制されるかどうかを調べるため、ウイルス抗原を用いた競合結合試験を行った。図4-2に示したようにgp50およびgIII を含むウイルス抗原の添加によって、抗-Id AbとMab の結合は最大で21-35%の範囲で抑制され、その抑制率はMab 4G6 を除いてウイルス抗原の希釈率の上昇にともなって減少した。抗-Id 4G6 とMab 4G6 の結合に対する抑制率は低希釈のウイルス抗原を加えた場合に逆に減少したが、ウイルス抗原希釈が4倍の時25%の抑制率を示し、ウイルス抗原の希釈率が上昇するにしたがって減少した。

#### 抗イデオタイプ抗体による中和抗体の誘導

抗-Id Abの中和抗体産生能をみるため、予備試験により十分に抗体産生を起こすことを確認した免疫量 $50\mu\text{g}$ を3週間間隔で4回マウスに免疫し、中和抗体の産生を調べた。抗-Id Abの免疫後のマウスの中和抗体価を50%ブラック減少法によって調べたところ、表4-3に示したように、抗-Id 1B6を免疫したマウスにのみ中和抗体の産生が認められ、抗-Id 4G6、6G11およびウサギIgGを免疫したマウスには、いずれも中和抗体の産生は認められなかった。抗-Id 1B6を免疫したマウスでは、2回の免疫で補体要求性の中和抗体価が16倍となり、最終免疫後の抗体価は128倍に上昇した。しかし、補体要求性中和抗体はこれに遅れて出現し、しかもその抗体価は最終免疫後でも4倍を示すにとどまった。

#### 抗イデオタイプ抗体によるマウスの感染防御

抗-Id Abによるマウスの感染防御試験では、ワクチンとしての応用を考慮して抗-Id Abの免疫を抗体産生を起こす最少回数である3回実施した。また、中和抗体の産生がみられた抗-Id 1B6はその最少有効量を調べるため、抗-Id Abを階段希釈して免疫した。感染防御試験におけるウイルス攻撃時の中和抗体価とマウスの生存率を表4-4に示した。ウイルス攻撃時の中和抗体価は抗-Id 1B6を50および $10\mu\text{g}$ 免疫したマウスではそれぞれ8倍であったが、他の抗-Id Abを免疫したマウスでは中和抗体は検出されなかった。致死量のウイルス攻撃に対して抗-Id 1B6を50および $10\mu\text{g}$ 免疫した群ではそれぞれ5匹中3匹および5匹中1匹が生存し感染防御が認められたが、他の抗-Id Abを免疫された群のマウスはすべて死亡した。

#### 5. 考察

抗-Id Abはその反応性によって、抗体のイデオタイプの抗原結合部位（パラトープ）を認識する抗-Id Abと、枠組み領域を認識する抗-Id Abに大別される。理論的には、これらの2種類の抗-Id Abはいずれもイデオタイプネットワークによって、元になった抗体と同様の反応性を持った抗体の産生を誘導する。しかし、パラトープを認識する抗-Id Abは抗原と類似の構造（内部イメージ）をもつ

ことから、抗原エピトープがその立体構造に依存しているような抗原の代替抗原(89)として、あるいはエピトープの機能を調べるためのプローブとして(32,75)も用いられている。このため、パラトープを認識する抗-Id Abをワクチンとして使用した場合には、より直接的に抗原に対する免疫応答を誘導すると考えられる。

第1章に記載したように、抗-Id Abの作製に用いた3種類のMabはいずれも高いウイルス中和活性を持つため、ウイルスの感染に重要なエピトープを認識していると考えられた。したがって、これらのMabに対する抗-Id AbがMabのパラトープを認識していれば、抗-Id Abはより直接的に中和抗体の産生や感染防御免疫を誘導する可能性が推察される。

本章では、まずMabに対するウサギ血清から抗-Id Abを精製し、Mabを用いたELISAと競合結合試験により抗-Id Abの性状を調べた。抗-Id Abの精製過程における各分画の反応性を調べた結果、特異性の異なる同じアイソタイプのMabを用いてアフィニティクロマトグラフィーを行うことにより抗血清中の恒常領域に対する抗体を効果的に吸収できることが確認された。さらに、精製した抗-Id Abはそれぞれ対応するMabとのみ反応し、3種類のMabと異種の抗-Id Abの間には交差反応はみられなかった。これは3種類のMabがそれぞれ明確に異なるエピトープを認識しているため、パラトープ以外のイデオタイプも相互に異なっていることに起因すると考えられる。この結果は、抗-Id AbがそれぞれのMab分子のイデオタイプを認識していることを示すものであるが、抗-Id AbがMab分子のパラトープを認識しているか否かは明らかでなかった。競合結合試験の結果、gp50やgⅢを含むウイルス抗原によって3つの抗-Id Abとそれぞれが対応するMabの反応は抑制され、その最大抑制率は21-35%であった。抗-Id AbのうちMabのパラトープを認識する抗体は抗原と類似の構造をもつと考えられ、抗-Id AbとMabの結合はウイルス抗原によって競合的に抑制されると推察される。競合結合試験の結果から、すべての抗-Id AbにMabのパラトープに対する抗体が含まれていることがうかがわれた。しかし、このウイルス抗原による抗-Id AbとMabの結合の競合抑制は、抗-Id Abとウイルス抗原の相同性ばかりでなく、Mabに対するウイルス抗原の結合によるMabのパラトープの立体障害もその要因と考えられる(89, 96)。

抗-Id Abをマウスに免疫しその中和抗体産生能を調べた結果、抗-Id 1B6を免

疫したマウスのみが中和抗体を産生した。もし抗-Id Abがウイルス抗原の中和エピトープをその内部イメージとして保有するならば、もとのMABと同じ中和活性をもった抗体の産生を起こすと推察される。マウスにおいて抗-Id 1B6が中和抗体産生を誘導したことは、抗-Id 1B6がPrVの中和エピトープの内部イメージを持つことを示すものである。抗-Id 1B6によって産生されたマウスの中和抗体価は補体を添加した場合に補体の不在下でのそれより高く、もとのMAB 1B6が持つ補体非依存性の中和活性とは異なっていた。著者は第3章において補体非要求性中和抗体産生能をもつgp50をマウスに免疫したが、産生された補体要求性中和抗体価は補体非要求性中和抗体価より高かった。また、他のヘルペスウイルス感染においても産生される中和抗体の中和活性が補体の添加により増強されることが知られている(120)。したがって、本実験で抗-Id 1B6により誘導された抗体の中和活性が補体の添加によって増強されたことは、MAB 1B6とマウスの中和抗体が認識するエピトープが異なっているためではなく、マウスの抗体がポリクローナルであるためと考えられる。

PrVはマウスに致死性の感染を起こすため、マウスを用いた感染防御試験は、オーエスキ病に対するワクチンの効果判定のモデルとして一般的に使用されている(27,49)。マウスにおける感染防御は必ずしも中和抗体に依存しないが、前章の実験で著者は、g IIやgp50を免疫したマウスが感染防御能を示すと同時に中和抗体も産生することを明らかにした。このことから、抗-Id 1B6を免疫したマウスがPrVに対する中和抗体を産生したことは、抗-Id Abの免疫によってもマウスに感染防御免疫を誘導できると期待される。マウスを用いた感染防御試験の結果、抗-Id 1B6を免疫したマウスは中和抗体を産生し、致死量のPrV感染を防御すること、さらにその感染防御効果は免疫した抗-Id 1B6の量に依存することが判明した。現在まで、他の感染症でも抗-Id Abの免疫が病原体に対する感染防御免疫や抗体産生を誘導したという報告があるが、これらは十分な免疫応答を誘導するのに多量の免疫原や頻回の免疫を必要とする(1,2,20,34,96)ため、ワクチンとしての実用性には問題が残されている。本章の実験では抗-Id Abが実際的なワクチンとして使用できるかどうかをみるため、抗体産生を起こす最少回数である3回の免疫を行い、さらに抗-Id 1B6ではその免疫量を変えて感染防御効果を調べた。結果に示したように、抗-Id 1B6は微量の免疫量で中和抗体の産生と感染

防御免疫を誘導し、抗-Id Abがワクチンとして実用可能な免疫量と免疫回数で有効な免疫応答を惹起できることが明らかとなったことから、イデオタイプワクチン開発の基礎的知見を得たものと考えられる。

抗-Id 1B6 の免疫による中和抗体の産生と感染防御免疫の誘導は、抗-Id 1B6 がウイルス抗原と同様にマウスにおいてPrV に対する特異的な免疫応答を惹起できることを示すと同時に、抗-Id 1B6 が内部イメージとして持つ中和エピトープが感染防御を起こすエピトープであることを示している。この点に関して、Gurishら(21)は、PrV のgIIIを認識する中和MAb から抗-Id Abを作製し、これを免疫することによってマウスで感染防御免疫を誘導したと報告している。しかし、その感染防御効果は低くまた多量の免疫原を必要としていた。本実験で用いた抗-Id 1B6 がマウスに中和抗体の産生させるとともに感染防御免疫を誘導したことは、もとのMAb 1B6 が中和抗体誘導能がgIIIより高いとされているgp50を認識していたことに起因すると考えられる。一方、gp50に対する抗-Id 4G6 を免疫したマウスとgIIIに対する抗-Id 6G11を免疫したマウスでは、中和抗体の産生も感染防御免疫も誘導されなかった。第1章において、MAb 4G6 はMAb 1B6 と同様にgp50を認識しており、エピトープは異なるものの高い中和活性を示していた。しかし、MAb 4G6 で作製した抗-Id Abに中和抗体産生能がみられなかったことは、抗-Id 4G6 に含まれるパラトープに対する抗体の量が免疫応答を起こすのに不十分であるか、あるいは抗体誘導とは逆にサブプレッサーT細胞を刺激したこと(39)に起因すると思われる。

現在まで、種々のヘルペスウイルス感染症に対してイデオタイプワクチンの検討が行われているが、抗-Id Abの免疫は感染防御免疫(21)や中和抗体の産生(20,95)を誘導する一方で病原性を増強させたという報告(33)もありワクチンとしての評価は未だ定着していない。本章で、著者は抗-Id 1B6 の持つ内部イメージによってウイルスに対する抗体産生や感染防御免疫などの特異的な免疫応答を惹起できることを明らかにした。このことは、抗-Id Abをワクチンとして用いる可能性を示唆するものである。今後、PrV の感染に関与するエピトープの解析や、イデオタイプワクチンの評価を進めるためには、モノクローナル抗-Id Abを作製しその免疫効果を調べることが必要となろう。

## 総 括

オーエスキー病に対するワクチン開発の基礎知見を得ることを目的として、PrV 糖蛋白の免疫学的機能について検討し、以下の成績を得た。

PrV 糖蛋白に対する中和モノクローナル抗体(MAb)を作出し、その認識する糖蛋白の同定を行った結果、補体非要求性で強い中和活性を持つMAb はgp50を認識していたが、g IIあるいはg IIIを認識するMAb の中和活性は低いかまたは補体要求性であり、gp50が強い中和抗体産生能を持つことを明らかにした。

gp50を認識するMAb のgp50への結合は競合結合試験において互いに競合的な抑制を示さなかったことから、gp50分子上に複数の独立した中和エピトープが存在することを明らかにした。さらに、MAb のこのエピトープへの結合はウイルスをドデシル硫酸ナトリウムで可溶化した場合に消失したことから、このエピトープが立体構造に依存していることを示唆した。

可溶化したPrV のエンベロープを用いてグリコシドQuil Aを含む蔗糖密度勾配遠心を行うことにより、ウイルス糖蛋白gII のみを直径約40 nm の蜂巢状構造をもつISCOM に構築した。このgII/ISCOM はマウスに補体依存性中和抗体を産生させるとともに、感染防御を誘導した。

PrV の自然宿主であるブタを用いた感染防御試験を行い、gII/ISCOM の免疫はウイルスの感染を阻止しないが感染後の発病と死亡を防ぐとともに、ウイルス感染後のウイルス排泄を減少させる効果があることを明らかにした。さらに、gII/ISCOM 免疫豚と自然感染豚の血清を免疫沈降によって比較し、両血清が明瞭に識別できることを明らかにし、gII/ISCOM がオーエスキー病に対するサブユニットワクチンとして有望であることを示した。

精製したgp50を*Klebsiella pneumoniae* のリボ多糖と結合させgp50に脂溶性部分を導入することによって、gp50を水溶性でアジュバント活性をもつISCOM に構築できることを明らかにした。このgp50/ISCOMのマウスにおける中和抗体産生能はフロイントの完全アジュバントより高く、強いアジュバント活性を示した。さらに、gp50/ISCOMの中和抗体産生能を、PrV の他の糖蛋白を構築したISCOM と比較し、gp50/ISCOMの中和抗体の誘導が極めて強いことを明らかにした。この結果から、gp50/ISCOMが母豚の血清中和抗体価を高め初乳中の移行抗体によって新生

豚の感染を防止することを目的としたサブユニットワクチンの候補となることを示唆した。

PrV 糖蛋白gp50に対するMab をウサギに免疫して得た血清からアフィニティークロマトグラフィーにより抗イデオタイプ抗体 (抗-Id Ab) を精製した。この抗-Id AbとMab との結合はgp50を含むウイルス抗原によって競合的に抑制されたことから、この抗-Id AbがMab の抗原結合部位であるパラトープに対する抗体を含むことが確認され、PrV 糖蛋白の中和エピトープの内部イメージを持つことが示唆された。この抗-Id Abを免疫したマウスは中和抗体を産生するとともに致死量のウイルス感染を防御した。以上の結果から、オーエスキー病に対するイデオタイプワクチンの可能性について考察した。

## 謝 辞

本研究を終わるにあたり、終始実験の指導と助言を賜った農林水産省家畜衛生試験場海外病研究部の村上洋介博士ならびに杉村崇明博士（現同場九州支場）に深甚の謝意を表するとともに、本研究の開始にあたり有益な助言を賜った東京大学農学部の小野寺節教授（元家畜衛生試験場）に謝意を表します。

本論文の校閲と有益な助言を賜った東京大学農学部の高橋英司教授に謝意を表します。

参 考 文 献

1. Anders, E.M., Deliyannis, G.P.K., and White, D.O. 1989. Induction of immune response to influenza virus with anti-idiotypic antibodies. J. Immunol. 63:2758-2767.
2. Beauclair, K.D., and Khansari, D.N. 1990. Protection of mice against *Bruceella abortus* by immunization with polyclonal anti-idiotypic antibodies. Immunobiol. 180:208-220.
3. Christensen, L.S., and Sorensen, K.J. 1991. The genomic diversity and stability of field strains of suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus). Vet. Microbiol. 26:1-10.
4. Coe, N.E., and Mengeling, W.L. 1990. Mapping and characterization of neutralizing epitopes of glycoproteins gIII and gp50 of the Indiana-Funkhauser strain of pseudorabies virus. Arch. Virol. 110:137-142.
5. Cohen, G.H., Dietzschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Pereira, L., and Eisenberg, R.J. 1984. Localization and synthesis of an antigenic determinant of herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody. J. Virol. 49:102-108.
6. Cook, D.R., Hill, H.T., and Kinker, D.R. 1990. Efficacy of a killed gpX deleted pseudorabies virus vaccine. Can. J. Vet. Res. 54:438-445.
7. Cook, R.F., O'Neill, T., Strachan, E., Sundquist, B., and Mumford, J.A. 1990. Protection against lethal equine herpes virus type 1 (subtype 1) infection in hamster by immune stimulating complexes (ISCOMs) containing the major viral glycoproteins. Vaccine 8:491-496.
8. Cowen, P., Li, S., Guy, J.S., Erickson, G.A., and Blanchard, D. 1990. Reactivation of latent pseudorabies virus infection in vaccinated commercial sows. Am. J. Vet. Res. 51:354-358.
9. Dalgleish, A.G., and Kennedy, R.C. 1988. Anti-idiotypic antibodies as immunogens: idiotypic-based vaccines. Vaccine 6:215-220.

10. De Leeuw, P.W., and Van Oirschot, J.T. 1985. Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease : comparison with inactivated vaccines in pigs with low maternal antibody titres. Res.Vet.Sci. 39:34-38.
11. De Vries, P., Uytdehaag, F.G.C.M., and Osterhaus, A.D.M.E. 1988. Canine distemper virus (CDV) immune-stimulating complexes (iscoms), but not measles virus iscoms, protect dogs against CDV infection. J.Gen.Virol. 69:2071-2083.
12. De Vries, P., Van Binnendijk, R.S., Van Der Marel, P., Van Hezel, A.L., Voorma, H.O., Sundquist, B., Uytdehaag, F.G.C.M., and Osterhaus, A.D.M.E. 1988. Measles virus fusion protein presented in an immune-stimulating complex (iscom) induces haemolysis-inhibiting and fusion-inhibiting antibodies, virus-specific T cells and protection in mice. J.Gen.Virol. 69:549-559.
13. Eisenberg, R.J., Long, D., Ponce de Leon, M., Matthews, J.T., Spear, P.G., Gibson, M.G., Lasky, L.A., Berman, P., Golub, E., and Cohen, G.H. 1985. Localization of epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. J.Virol. 53:634-644.
14. Eisenberg, R.J., Ponce de Leon, M., and Cohen, G.H. 1980. Comparative structural analysis of glycoprotein gD of herpes simplex virus types 1 and 2. J.Virol. 35:428-435.
15. Eloit, M., Bouzghaia, H., and Toma, B. 1990. Identification of antigenic sites on pseudorabies virus glycoprotein gp50 implicated in virus penetration of the host cell. J.Gen.Virol. 71:2179-2183.
16. Eloit, M., Fargeaud, D., L'Haridon, R., and Toma, B. 1988. Identification of the pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a major target of neutralizing antibodies. Arch.Virol. 99:45-56.
17. Fossum, C., Bergstrom, M., Lovgren, K., Watson, D.L., and Morein, B. 1990. Effect of iscoms and their adjuvant moiety (matrix) on the initial proliferation and IL-2 responses: comparison of spleen cells from

- mice inoculated with iscoms and /or matrix. Cell.Immunol. 129:414-425.
18. Fukusho, A., Shimizu, M., Kubo, M., Nanba, K., Ahimizu, Y., Konno, S., Suzuki, K., and Otaki, T. 1981. The first outbreak of Aujeszky's disease in swine in Japan. II. Virus isolation. Bull. Natl. Inst. Anim. Health. 82:5-11.
19. Fuller, A.O., and Spear, P.G. 1985. Specificities of monoclonal and polyclonal antibodies that inhibit adsorption of herpes simplex virus to cells and lack of inhibition by potent neutralizing antibodies. J. Virol. 55:475-482.
20. Gell, P.G.H., and Moss, P.A.H. 1985. Production of cell-mediated immune response to herpes simplex virus by immunization with anti-idiotypic heteroantisera. J. Gen. Virol. 66:1801-1804.
21. Gurish, M.F., Ben-Porat, T., and Nisonoff, A. 1988. Induction of antibodies to pseudorabies virus by immunization with anti-idiotypic antibodies. Ann. Inst. Pasteur. Immunol. 139:677-687.
22. Hampl, H., Ben-Porat, T., Ehrlicher, L., Habermehl, K., and Kaplan, A. 1984. Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. J. Virol. 52:583-590.
23. Henderson, L.M., Katz, J.B., Erickson, G.A., and Mayfield, J.E. 1990. In vivo and in vitro genetic recombination between conventional and gene-deleted vaccine strains of pseudorabies virus. Am. J. Vet. Res. 51:1656-1662.
24. Henderson, L.M., Levings, R.L., Davis, A.J., and Sturtz, D.R. 1991. Recombination of pseudorabies virus vaccine strains in swine. Am. J. Vet. Res. 52:820-825.
25. Hiernaux, J.R. 1988. Idiotypic vaccines and infectious diseases. Infect. Immun. 56:1407-1413.
26. Highlander, S.L., Sutherland, S.L., Gage, P.J., Johnson, D.C., Levine, M., and Glorioso, J.C. 1987. Neutralizing monoclonal antibodies specific

- for herpes simplex virus glycoprotein D inhibit virus penetration. J.Virol. 61:3356-3364.
27. Ishii, H., Kobayashi, Y., Kuroki, M., and Kodama, Y. 1988. Protection of mice from lethal infection with Aujeszky's disease virus by immunization with purified gVI. J.Gen.Virol. 69:1411-1414.
28. Jerne, N.K. 1974. Towards a network theory of the immune system. Ann.Inst.Pasteur.Immunol. 125C:373-389.
29. Kaplan, A.S., and Ben-Porat, T. 1970. Synthesis of proteins in cells infected with herpesvirus. VI. Characterization of the proteins of the viral membrane. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 66:799-806.
30. Katz, J.B., Henderson, L.M., and Erickson, G.A. 1990. Recombination in vivo of pseudorabies vaccine strains to produce new virus strains. Vaccine 8:286-288.
31. Katz, J.B., Henderson, L.M., Erickson, G.A., and Osorio, F.A. 1990. Exposure of pigs to a pseudorabies virus formed by in vivo recombination of two vaccine strains in sheep. J.Vet.Diagn.Invest. 2:135-136.
32. Kauffman, R.S., Noseworthy, J.H., Nepom, J.T., Finberg, R., Fields, B.N., and Greene, M.I. 1983. Cell receptors for the mammalian reovirus. II. Monoclonal anti-idiotypic antibody blocks viral binding to cells. J.Immunol. 131:2539-2541.
33. Kennedy, R.C., Adler-Storthz, K., Burns, J.W., Henkel, R.D., and Dreesman, G.R. 1984. Antiidiotypic modulation of herpes simplex virus infection leading to increased pathogenicity. J.Virol. 50:951-953.
34. Kennedy, R.C., Eichberg, J.W., Lanford, R.E., and Dreesman, G.R. 1986. Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. Science 232:220-223.
35. Kersten, G.F.A., Spiekstra, A., Beuvery, E.C., and Crommelin, D.J.A. 1991. On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscom). Biochem.Biophys.Acta. 1062:165-171.

36. Kit, S. 1990. Genetically engineered vaccines for control of Aujeszky's disease (pseudorabies). Vaccine 8:420-424.
37. Kit, S., Kit, M., Pirtle, E.C. 1985. Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. Am.J.Vet.Res. 46:1359-1367.
38. Kit, S., Sheppard, M., Ichimura, H., and Kit, M. 1987. Second-generation pseudorabies virus vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein genes. Am.J.Vet.Res. 48:780-793.
39. Lathey, J.L., Martin, S., and Rouse, B.T. 1987. Suppression of delayed type hypersensitivity to herpes simplex virus type 1 following immunization with anti-idiotypic antibody: an example of split tolerance. J.Gen.Virol. 68:1093-1102.
40. Lomniczi, B., Blankenship, M.L., and Ben-Porat, T. 1984. Deletion in the genomes of pseudorabies virus vaccine strains and existence of four isomers of the genomes. J.Virol. 49:970-979.
41. Lomniczi, B., Kaplan, A.S., and Ben-Porat, T. 1987. Multiple defects in the genome of pseudorabies virus can affect virulence without detectably affecting replication in cell culture. Virol. 161:181-189.
42. Lomniczi, B., Watanabe, S., Ben-Porat, T., and Kaplan, A.S. 1984. Genetic basis of the neurovirulence of pseudorabies virus. J.Virol. 52:198-205.
43. Lomniczi, B., Watanabe, S., Ben-Porat, T., and Kaplan, A.S. 1987. Genome location and identification of functions defective in the Bartha vaccine strain of pseudorabies virus. J.Virol. 61:796-801.
44. Lovgren, K., Kaberg, H., and Morein, B. 1990. An experimental influenza subunit vaccine (iscom): induction of protective immunity to challenge infection in mice after intranasal or subcutaneous administration. Clin.Exp.Immunol. 82:435-439.
45. Lovgren, K., Lindmark, J., Pipkorn, R., and Morein, B. 1987. Antigenic presentation of small molecules and peptides conjugated to a

- performed iscom as carrier. J.Immunol.Methods. 98:137-143.
- 46.Lovgren,K., and Morein,B. 1988. The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms). Biotechnol.Appl. Biochem. 10:161-172.
- 47.Maes,R.K., and Schutz,J.C. 1983. Evaluation in swine of a subunit vaccine against pseudorabies. Am.J.Vet.Res. 44:123-125.
- 48.Marchioli,C.C., Yancey,Jr.R.J., Timmins,J.G., Post,L.E., Young,B.R., and Povendo,D.A. 1988. Protection of mice and swine from pseudorabies virus-induced mortality by administration of pseudorabies virus-specific mouse monoclonal antibodies. Am.J.Vet.Res. 49:860-864.
- 49.Marchioli,C.C., Yancey,Jr.R.J., Petrovskis,E.A., Timmins,J.G., and Post,L.E. 1987. Evaluation of pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a vaccine for Aujeszky's disease in mice and swine: expression by vaccinia virus and chinese hamster ovary cells. J.Virol. 61:3977-3982.
- 50.Marchioli,C.C., Yancey,Jr.R.J., Warley,R.C., Thomsen,D.R., and Post,L.E. 1987. A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein X genes. Am.J.Vet. Res. 48:1577-1583.
- 51.Martin,S., Wardley,R.C., and Donaldson,A.I. 1986. Functional antibody responses in pigs vaccinated with live and inactivated Aujeszky's disease virus. Res.Vet.Sci. 41:331-335.
- 52.McCullough,S.J., and Todd,D. 1988. Subclinical Aujeszky's disease virus infection in a pig herd and the characterisation of the strain of virus isolated. Vet.Rec. 23:77-81.
- 53.Merza,M., Belak,S., and Morein,B. 1988. Characterization of an iscom prepared with envelope glycoproteins of bovine herpesvirus type 1. J.Vet.Med. B35:695-703.
- 54.Mettenleiter,T.C., Kern,H., and Rauh,I. 1990. Isolation of a

- viable herpesvirus (pseudorabies virus) mutant specifically lacking all four known nonessential glycoproteins. Virology, 179:498-503.
55. Mettenleiter, T.C., Lukacs, N., and Rziha, H.-J. 1985. Mapping of the structural gene of pseudorabies virus glycoprotein A and identification of two non-glycosylated precursor polypeptides. J. Virol. 53:52-57.
56. Mettenleiter, T.C., Lukacs, N., and Rziha, H.-J. 1985. Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. J. Virol. 56:307-311.
57. Mettenleiter, T.C., and Rauh, J. 1990. A glycoprotein gX- $\beta$ -galactosidase fusion gene as insertional marker for rapid identification of pseudorabies virus mutants. J. Virol. Methods 30:55-66.
58. Mettenleiter, T.C., Schreurs, C., Zuckermann, F., and Ben-Porat, T. 1987. Role of pseudorabies virus glycoprotein gI in virus release from infected cells. J. Virol. 61:2764-2769.
59. Mettenleiter, T.C., Schreurs, C., Zuckermann, F., Ben-Porat, T., and Kaplan, A.S. 1988. Role of glycoprotein gIII of pseudorabies virus in virulence. J. Virol. 62:2712-2717.
60. Mettenleiter, T.C., Zsak, L., Kaplan, A.S., Ben-Porat, T., and Lomniczi, B. 1987. Role of a structural glycoprotein of pseudorabies in virus virulence. J. Virol. 61:4030-4032.
61. Mettenleiter, T.C., Zsak, L., Zuckermann, F., Sugg, N., Kern, H., and Ben-Porat, T. 1990. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. J. Virol. 64:278-286.
62. Noormann, R.J.M., De Rover, T., Briaire, J., Peeters, B.P.H., Gielkens, A.L.J., and Van Oirschot, J.T. 1990. Inactivation of the thymidine kinase gene of a gI deletion mutant of pseudorabies virus generates a safe but still highly immunogenic vaccine strain. J. Gen. Virol. 71:1591-1595.

63. Morein, B. 1990. Iscoms. Vet. Microbiol. 23:79-84.
64. Morein, B. 1990. The iscom: an immunostimulating system. Immunol. Letters. 25:281-284.
65. Morein, B., Belak, S., Soos, T., Rusvai, M., McGwire, B.S., and Bogнар, K. 1989. Iscom of viral envelope proteins protects against Aujeszky's disease. Vet. Microbiol. 20:143-154.
66. Morein, B., and Simons, K. 1985. Subunit vaccine against enveloped viruses: virosomes, micelles and other protein complexes. Vaccine 3: 83-93.
67. Morein, B., Sundquist, B., Hoglund, S., Dalsgaard, K., and Osterhaus, A. 1984. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. Nature 308:457-460.
68. Muggeridge, M.I., Isola, V.J., Byrn, R.A., Tucker, T.J., Minson, A.C., Glorioso, J.C., Cohen, G.H., and Eisenberg, R.J. 1988. Antigenic analysis of a major neutralization site of herpes simplex virus glycoprotein D, using deletion mutants and monoclonal antibody-resistant mutants. J. Virol. 62:3274-3280.
69. Muggeridge, M.I., Wilcox, W.C., Cohen, G.H., and Eisenberg, R.J. 1990. Identification of a site on herpes simplex virus type 1 glycoprotein D that is essential for infectivity. J. Virol. 64:3617-3626.
70. Mukamoto, M., Watanabe, I., Kobayashi, Y., Icotlo Jr., F.C., Ishii, H., and Kodama, Y. 1991. Immunogenicity in Aujeszky's disease virus structural glycoprotein gVI (gp50) in swine. Vet. Microbiol. 29:109-121.
71. Nakamura, T., Ihara, T., Nagata, T., Ishihama, A., and Ueda, S. 1990. A complement-dependent neutralizing monoclonal antibody against glycoprotein II of pseudorabies virus. Vet. Microbiol. 24:193-198.
72. Nakane, P.K., and Kawaoi, A. 1974. Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. J. Histchem. Cytochem. 22:1084-1091.
73. Nakashima, I. 1972. Adjuvant action of capsular polysaccharide of

- Klebsiella pneumoniae on antibody response I.Intensity of its action. J.Immunol. 108:1009-1016.
- 74.Nishimori,T., Imada,T., Sakurai,M., Kitabayashi,T., Kawamura,H., and Nakajima,H. 1987. Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease viruses isolated in Japan. Jpn.J.Vet.Sci. 49:365-367.
- 75.Noseworthy,J.N., Fields,B.N., Dichter,M.A., Sobotka,C., Pizer,E., Perry,L.L., Nepom,J.T., and Greene,M.I. 1983. Cell receptors for the mammalian reovirus. I.Syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibody identifies a cell surface receptor for reovirus. J.Immunol. 131: 2533-2538.
- 76.Onodera,M., Tsuruta,M., Suto,S., Niizeki,H., Saito,F., and Taneichi, A. 1981. The first outbreak of Aujeszky's disease in swine in Japan. I.Clinical observation. Bull.Natl.Inst.Anim.Health. 82:1-4.
- 77.Osterhaus,A., Weijer,K., Uytdehaag,F., Jarrett,O., Sundquist,B., and Morein,B. 1985. Induction of protective immune response in cats by vaccination with feline leukemia virus iscom. J.Immunol. 135:591-596.
- 78.Osterhaus,A., Weijer,K., Uytdehaag,F., Knell,P., Jarrett,O., Akerblom,L., and Morein,B. 1989. Serological response in cats vaccinated with FeLV ISCOM and an inactivated FeLV vaccine. Vaccine 7:137-141.
- 79.Overnes,G., Nesse,L.L., Waldeland,H., Lovgren,K., and Gudding,R. 1991. Immune response after immunization with an experiment Toxoplasma gondii ISCOM vaccine. Vaccine 9:25-28.
- 80.Para,M.F., Parish,M.L., Noble,G., and Spear,P.G. 1985. Potent neutralizing activity associated with anti-glycoprotein D specificity among monoclonal antibodies selected for binding to herpes simplex virions. J.Virol. 55:483-488.
- 81.Petrovskis,E.A., Timmins,J.G., Armentrout,M.A., Marchioli,C.C., Yancey,R.J., and Post,L.E. 1986. DNA sequence of the gene for pseudorabies virus gp50, a glycoprotein without N-linked

- glycosylation. J.Virol. 59:216-223.
82. Petrovskis, E.A., Timmins, J.G., Gierman, T.M., and Post, L.E. 1986. Deletions in vaccine strains of pseudorabies virus and their effect on synthesis of glycoprotein gp63. J.Virol. 60:1166-1169.
83. Petrovskis, E.A., Timmins, J.G., and Post, L.E. 1986. Use of  $\lambda$ gt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simplex virus and Varicella-zoster virus glycoproteins. J.Virol. 60:185-193.
84. Platt, K.B. 1982. The porcine humoral response to detergent extracted Aujeszky's disease (pseudorabies) virus antigen. Vet.Microbiol. 7:515-534.
85. Platt, K.B. 1984. The evaluation of a lectin-agarose based subunit vaccine and complementary diagnostic antigen for Aujeszky's disease (pseudorabies) in the pig. Vet.Microbiol. 9:35-51.
86. Pyle, S.W., Morein, B., Bess, Jr. J.W., Akerblom, L., Nara, P.L., Nigida, Jr. S.M., Lerche, N.W., Robey, W.G., Fischinger, P.J., and Arthur, L.O. 1989. Immune response to immunostimulatory complexes (ISCOMs) prepared from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) or the HIV-1 external envelope glycoprotein (gp120). Vaccine 7:465-473.
87. Rauh, I., and Mettenleiter, T.C. 1991. Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration. J.Virol. 65:5348-5356.
88. Rea, T.J., Timmins, J.G., Long, G.W., and Post, L.E. 1985. Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. J.Virol. 54:21-29.
89. Reagan, K.J., Wunner, W.H., Wiktor, T.J., and Koprowski, H. 1983. Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to rabies virus glycoprotein. J.Virol. 48:660-666.
90. Robbins, A.K., Dorney, D.J., Wathen, M.W., Whealy, M.E., Gold, C., Watson, R.J., Holland, L.E., Weed, S.D., Levine, M., Glorioso, J.C., and Enquist,

- L.W. 1987. The pseudorabies virus gII gene is closely related to the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus. J.Virol. 61:2691-2701.
91. Roizman, B. 1991. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Arch. Virol. sup.2:103-110.
92. Sato, K., Tanaka, Y., Kurogi, H., Tokuhisa, S., Namba, K., Inaba, Y., and Matsumoto, M. 1988. Detection of antibody to pseudorabies virus in swine sera by indirect immunoperoxidase plaque staining. J.Clin. Microbiol. 26:79-81.
93. Schoenbaum, M.A., Beran, G.W., and Murphy, D.P. 1990. Pseudorabies virus latency and reactivation in vaccinated swine. Am.J.Vet.Res. 51:334-338.
94. Schreurs, C., Mettenleiter, T.C., Zuckermann, F., Sugg, N., and Ben-Porat, T. 1988. Glycoprotein gIII of pseudorabies virus is multifunctional. J.Virol. 62:2251-2257.
95. Sjolander, A., Lovgren, K., Stahl, S., Aslund, L., Hansson, M., Nygren, P.-A., Larsson, M., Hagstedt, M., Wahlin, B., Berzins, K., Uhlen, M., Morein, B., and Perlmann, P. 1991. High antibody responses in rabbits immunized with influenza virus ISCOMs containing a repeated sequence of the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA. Vaccine 9:443-450.
96. Srikumaran, S., Onisk, D.V., Borca, M.V., Nataraj, C., and Zamb, T.J. 1990. Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to bovine herpesvirus 1. Immunol. 70:284-289.
97. Stevely, W.S. 1975. Virus-induced proteins in pseudorabies-infected cells. II. Proteins of the virion and nucleocapsid. J.Virol. 16:944-950.
98. Sundquist, B., Lovgren, K., and Morein, B. 1988. Influenza virus iscoms: antibody response in animals. Vaccine 6:49-53.
99. Takahashi, H., Takeshita, T., Morein, B., Putney, S., Germain, R.N., and Berzofsky, J.A. 1990. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by

- immunization with purified HIV-1 envelope protein in iscoms. Nature 344:873-875.
100. Thawley, D.G., and Moorison, R. 1989. Current thinking on the role of vaccines in eradication strategies for Aujeszky's disease in the USA. pp.197-208. In: Vaccination and control of Aujeszky's disease. (Van Oirschot, J.T. ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
101. Thomsen, D.R., Marchioli, C.C., Yancey, Jr. R.J., and Post, L.E. 1987. Replication and virulence of pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX. J.Virol. 61:229-232.
102. Todd, D., Hull, J., and McNair, J. 1987. Antigenically important proteins of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus identified by immunoblotting. Arch.Virol. 96:215-224.
103. Trudel, M., Boulay, G., Seguin, C., Nadon, F., and Lussier, G. 1988. Control of infectious bovine rhinotracheitis in calves with a BHV-1 subunit-ISCOM vaccine. Vaccine 6:525-529.
104. Trudel, M., Nadon, F., Seguin, C., Boulay, G., and Lussier, G. 1987. Vaccination of rabbits with bovine herpesvirus type 1 subunit vaccine: adjuvant effect of ISCOMs. Vaccine 5:239-243.
105. Trudel, M., Nadon, F., Seguin, C., Simard, C., and Lussier, G. 1989. Experimental polyvalent ISCOMs subunit vaccine induces antibodies that neutralize human and bovine respiratory syncytial virus. Vaccine 7:12-16.
106. Turner, S.P., Hartley, C.E., Buchan, A., and Skinner, G.R.B. 1981. Preparation and efficacy of an inactivated subunit vaccine against Aujeszky's disease virus infection. Res.Vet.Sci. 31:261-263.
107. Ulaeto, D., Wallace, L., Morgan, A., Morein, B., and Rickinson, A.B. 1988. In vitro T cell responses to a candidate Epstein-Barr virus vaccine: human CD4+ T cell clones specific for the major envelope glycoprotein gp340. Eur.J.Immunol. 18:1689-1697.
108. Vandeputte, J., Chappuis, G., Fargeaud, d., Precausta, P., Guillemin, F.,

- Brun, A., Desmettre, P., and Stellmann, C. 1990. Vaccination against pseudorabies with glycoprotein gI+ or glycoprotein gI- vaccine. Am. J. Vet. Res. 51:1100-1106.
109. Vannier, P. 1989. The control programme of Aujeszky's disease in France: Main results and difficulties. pp.215-226. In: Vaccination and control of Aujeszky's disease. (Van Oirschot, J.T. ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
110. Van Oirschot, J.T. 1986. Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: comparison with one or two doses of attenuated vaccines in pigs with high maternal antibody titres. Res. Vet. Sci. 42:12-16.
111. Van Oirschot, J.T., Gielkens, A.L.J., Moormann, R.J.M., and Berns, A.J.M. 1990. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. Vet. Microbiol. 23:85-101.
112. Wahren, B., Nordlund, S., Akesson, A., Sundquist, V.A., and Morein, B. 1987. Monocyte and iscom enhancement of cell-mediated response to cytomegalovirus. Med. Microbiol. Immunol. 176:13-19.
113. Wathen, L.M.K., Platt, K.B., Wathen, M.W., Van Deusen, R.A., Whetstone, C. A., and Pirtle, E.C. 1985. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against pseudorabies virus. Virus Res. 4:19-29.
114. Wathen, M.W., and Wathen, L.M.K. 1984. Isolation, characterization, and physical mapping of a pseudorabies virus mutant containing antigenically altered gp50. J. Virol. 51:57-62.
115. Wathen, M.W., and Wathen, L.M.K. 1986. Characterization and mapping of a nonessential pseudorabies virus glycoprotein. J. Virol. 58:173-178.
116. Whealy, M.E., Robbins, A.K., and Enquist, L.W. 1988. Pseudorabies virus glycoprotein gIII is required for efficient virus growth in tissue culture. J. Virol. 62:2512-2515.
117. Whealy, M.E., Robbins, A.K., and Enquist, L.W. 1990. The export pathway

- of the pseudorabies virus gB homolog gII involves oligomer formation in the endoplasmic reticulum and protease processing in the golgi apparatus. J.Virol. 64:1946-1955.
118. Wittmann, G. 1989. Present and future control of Aujeszky's disease in the Federal Republic of Germany. pp.209-213. In: Vaccination and control of Aujeszky's disease. (Van Oirschot, J.T. ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
119. Wolfer, U., Kruff, V., Sawitzky, D., Hampl, H., Wittmann-Liebold, B., and Habermehl, K.-O. 1990. Processing of pseudorabies virus glycoprotein gII. J.Virol. 64:3122-3125.
120. Yoshino, K., and Taniguchi, S., 1964. The appearance of complement-requiring neutralizing antibodies by immunization and infection with herpes simplex virus. Virology. 22:193-201.
121. Zuckermann, F.A., Mettenleiter, T.C., Schreurs, C., Sugg, N., and Ben-Porat, T. 1988. Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: Its effect on virus replication. J.Virol. 62:4622-4626.
122. Zuckermann, F.A., Zsak, L., Mettenleiter, T.C., and Ben-Porat, T. 1990. Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes. J.Virol. 64:802-812.



表1-1 PrVに対するモノクローナル抗体の性状

MAb	アイソタイプ	中和抗体価	
		+補体	-補体
1B 6	IgG1	2,560	1,280
4G 6	IgG1	10,240	10,240
14D 8	IgG1	320	320
8C 4	IgM	10	10
9A 3	IgG2b	80	< 10
6G11	IgG2b	5,120	80
19B11	IgG1	80	< 10
2C 4	IgG1	80	< 10

表2-1 gII/ISCOM免疫によるマウスの抗体産生と感染防御

免疫量 ( $\mu$ g)	抗体価 <sup>1)</sup>			感染防御 <sup>2)</sup>
	ELISA	中和(+補体)	中和(-補体)	(生存数/試験数)
1.0	160	64	< 2	3 / 5
0.2	40	16	< 2	1 / 5
0.04	10	16	< 2	0 / 5
-	< 10	< 2	< 2	0 / 5

1) : ウイルス攻撃時

2) : ウイルス攻撃2週後

表2-2 gII/ISCOM免疫後のブタの体重の増加と発病防止

群	gII/ISCOM免疫後日数				生存頭数/試験頭数
	0	24	31	38	
免疫群	5.83±0.68 <sup>1)</sup>	13.5±1.3	13.5±2.8	18.65±3.1	4/4
対照群	4.6±0.57	11.7±1.3	8.68±1.2 <sup>2)</sup>		0/4

1) : 平均体重±S.D (kg)  
2) : 死亡時体重

表2-3 鼻汁からのウイルス排泄量

群	ウイルス攻撃後日数									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
免疫群	- <sup>1)</sup>	-	0.35 <sup>2)</sup>	1.71	2.31	2.35	1.51	0.17	-	-
	0/4 <sup>3)</sup>	0/4	±0.92 4/4	±0.76 4/4	±0.71 4/4	±0.84 4/4	±0.90 4/4	±0.44 1/4	0/4	0/4
対照群	-	-	1.82	3.41	3.84	3.93	3.25			
	0/4	0/4	±1.63 4/4	±0.75 4/4	±1.35 4/4	±0.47 3/3				1/1

1) : 検出せず  
2) : 平均ウイルス量(log 10 pfu ±S.D /50μl)  
3) : 陽性頭数/試験頭数

表2-4

gII/ISCOM免疫後の抗体の推移

		gII/ISCOM免疫後日数			
		0	14	24	38
中和抗体 <sup>1)</sup>	+補体	< 2	< 2	45	1722
	-補体	< 2	< 2	< 2	181
ELISA <sup>2)</sup>	IgG	0.04	0.05	0.22	0.89
	IgM	0.24	0.36	0.36	0.41

1) : 幾何平均

2) : 平均吸光度

表3-1

gp50/ISCOM免疫によるマウスの抗体産生と感染防御

免疫原	免疫量 ( $\mu$ g)	中和抗体価 <sup>1)</sup>		感染防御 (生存数/試験数)
		+補体	-補体	
gp50/ISCOM	5	1,024	256	5 / 5
gp50/ISCOM	1	256	64	4 / 5
gp50/ISCOM	0.2	64	16	1 / 5
gp50-FCA	5	256	256	4 / 5
gp50-FCA	1	128	32	3 / 5
-	-	< 2	< 2	0 / 5

1) : ウイルス攻撃時

表4-1 抗-Id Ab作製に用いたMabの性状

Mab	アイソタイプ	認識 タンパク質	中和抗体価	
			+補体	-補体
1B 6	IgG1	gp50	2,560	1,280
4G 6	IgG1	gp50	10,240	10,240
6G11	IgG2b	g III	5,120	80
6H 6	IgG1	g II	< 10	< 10
34B 8	IgG2b	g II	< 10	< 10

表4-2 抗-Id AbのMabに対するELISA抗体価

	抗-Id 1B6	抗-Id 4G6	抗-Id 6G11
Mab 1B6	36,450	50	150
Mab 4G6	150	12,150	450
Mab 6G11	450	450	109,350

表4-3 抗-I d Abの免疫によるマウスの中和抗体産生

免疫原	補体添加	免疫後週数				
		0	3	6	9	12
抗-I d 1B6	+	- <sup>1)</sup>	-	16	32	128
	-	-	-	-	-	4
抗-I d 4G6	+	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
抗-I d 6G11	+	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-

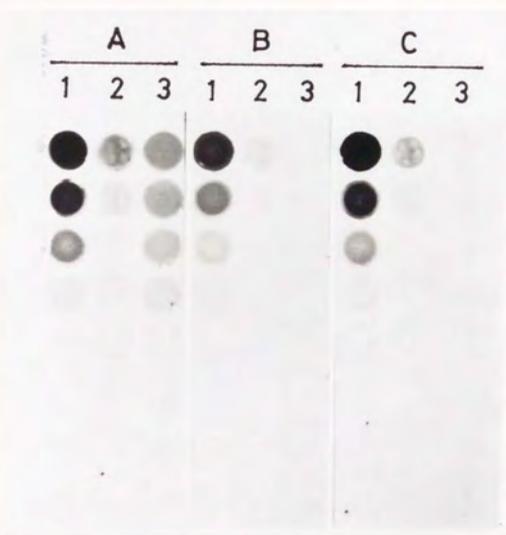
1) : < 2

表4-4 抗-I d Abの免疫によるマウスの感染防御

免疫原	免疫量 ( $\mu$ g)	中和抗体価 <sup>1)</sup>	感染防御 (生存数/試験数)
抗-I d 1B6	50	8	3 / 5
//	10	8	1 / 5
//	1	< 2	0 / 5
抗-I d 4G6	50	< 2	0 / 5
抗-I d 6G11	50	< 2	0 / 5
ウサギIgG	50	< 2	0 / 5

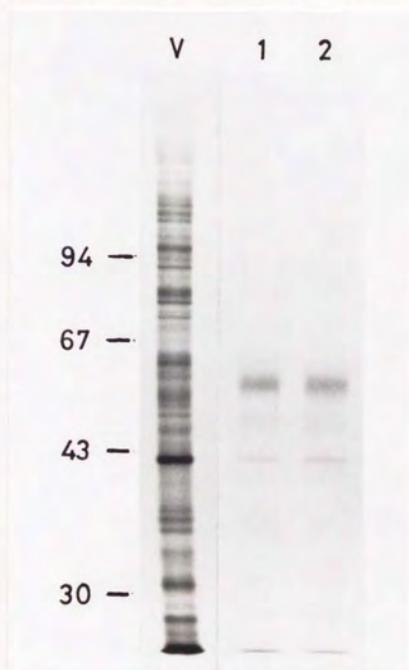
1) : 補体要求性中和抗体価

図1-1 可溶化ウイルス抗原に対するMabの反応



A : ケーソン染色    B : Mab 1B6    C : Mab 4G6  
 1 : 精製ウイルスの2倍階段希釈  
 2 : NP-40可溶化ウイルス抗原の2倍階段希釈  
 3 : SDS可溶化ウイルス抗原の2倍階段希釈

図1-2 Mab 1B6とMab 4G6によるウイルス抗原の免疫沈降



V : ウイルス抗原 1 : Mab 1B6 2 : Mab 4G6  
数字は分子量(KD)を表す。

図1-3 MAb 1B6とMAb 4G6のウイルス抗原に対する競合結合

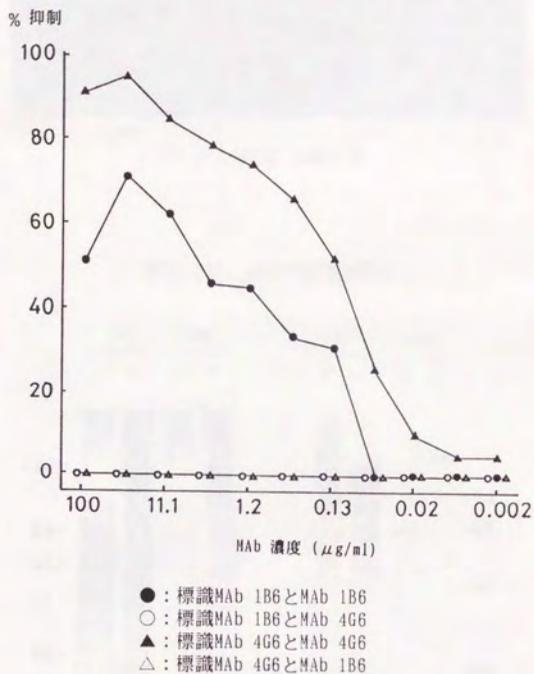
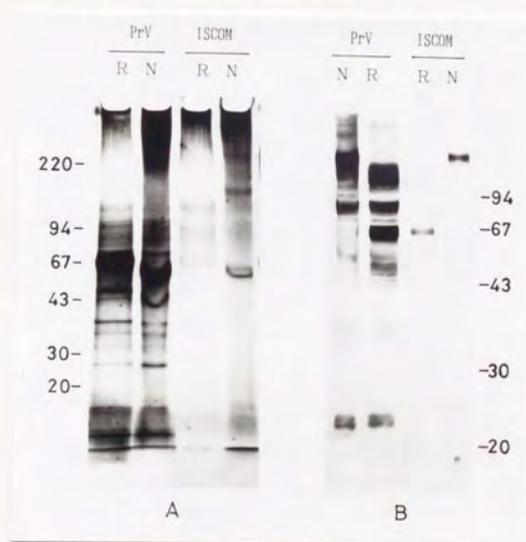


図2-1 gII/ISCOMの電子顕微鏡像



スケールは100 nmを示す

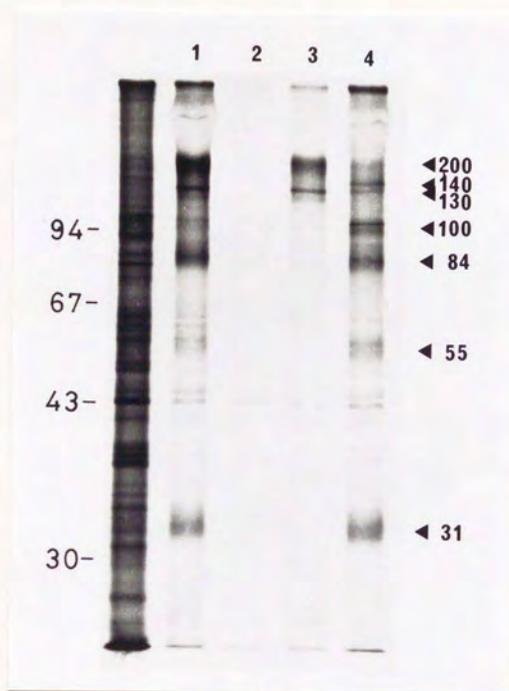
図2-2 gII/ISCOMの性状



A : 8-16%SDS-PAGEの銀染色

B : 10%SDS-PAGEとウェスタンブロット後の感染耐過ブタ血清による免疫染色  
 試料は還元 (R) あるいは非還元 (N) 処理した。  
 数字は分子量(KD)を表す。

図2-3 免疫沈降によるgII/ISCOM 免疫豚と感染豚の血清の比較



1. 自然感染豚血清      2. 免疫前血清  
 3. ISCOM免疫豚血清      4. 感染耐過後血清

左端はウイルス抗原を泳動した。

数字は分子量(kD)を表す。

図3-1 蔗糖密度勾配中のgp50/ISCOMの分布

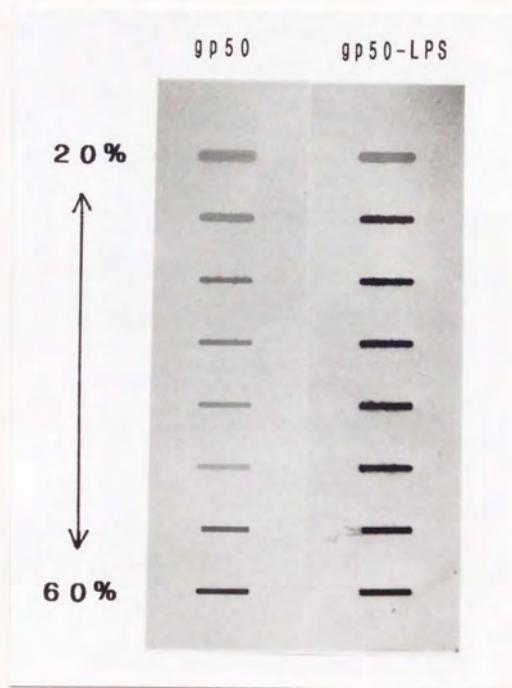


図3-2 ウェスタンブロットによるgp50/ISCOM作製過程でのgp50の確認

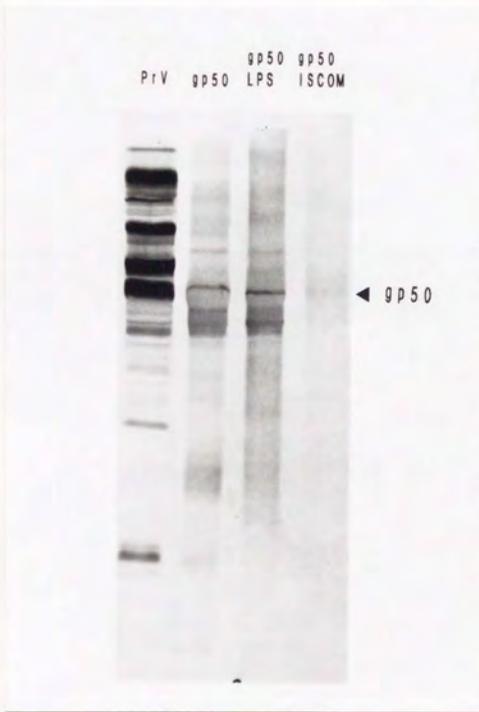
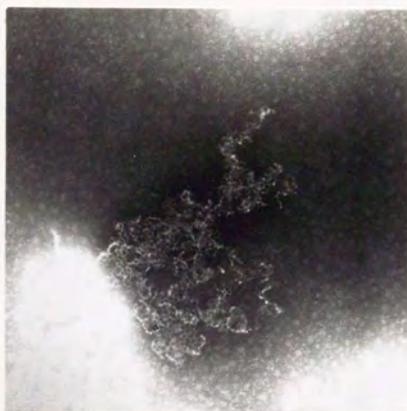


図3-3

金コロイド標識抗体を用いたgp50/ISCOMの免疫電顕像



スケールは100 nmを示す。

図3-4

gp50/ISCOMとgp50-FCA免疫によるマウスの中和抗体価の推移

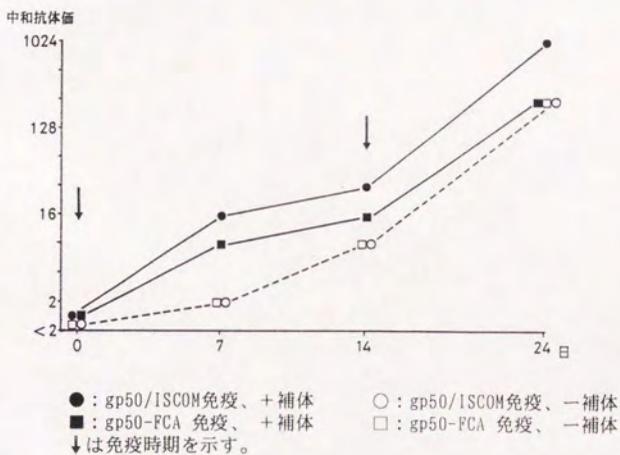


図3-5 マウスにおけるgp50, gIIおよびPrV各ISCOMの免疫による中和抗体の産生

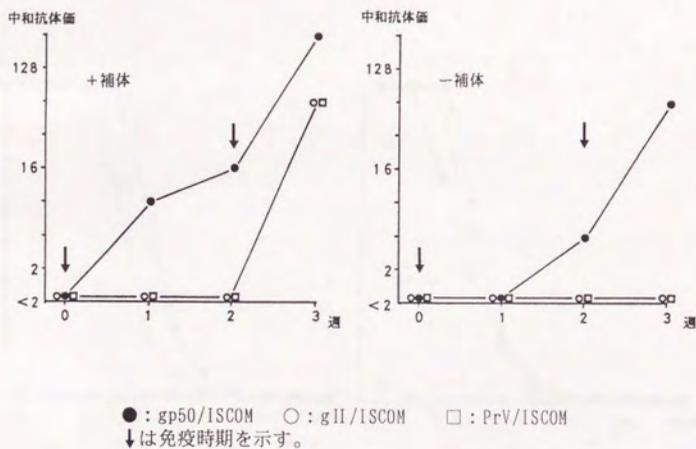
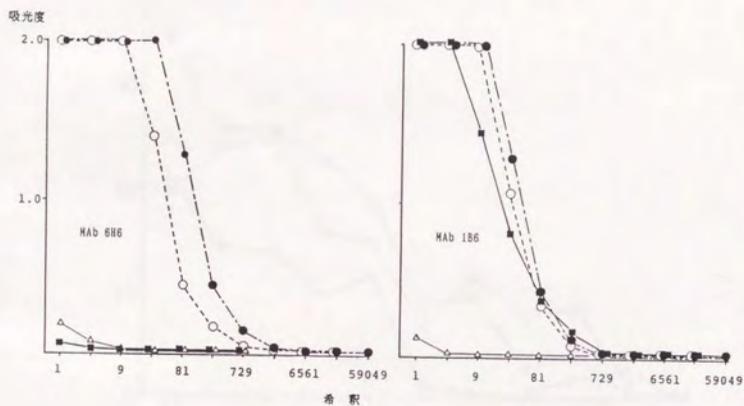


図4-1 フリニチクロマトグラフィーによる抗Mab 1B6ウサギ血清各分画のMab 1B6とMab 6H6に対する反応



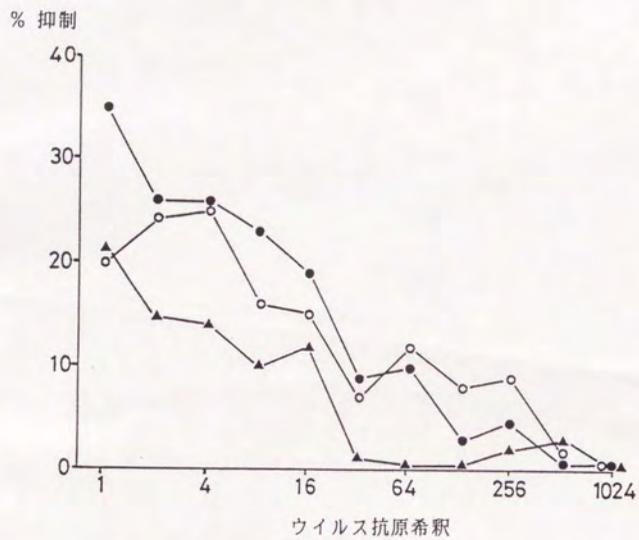
△: 免疫前ウサギ血清

●: Mab 6H6-Sepharose 4B吸着分画

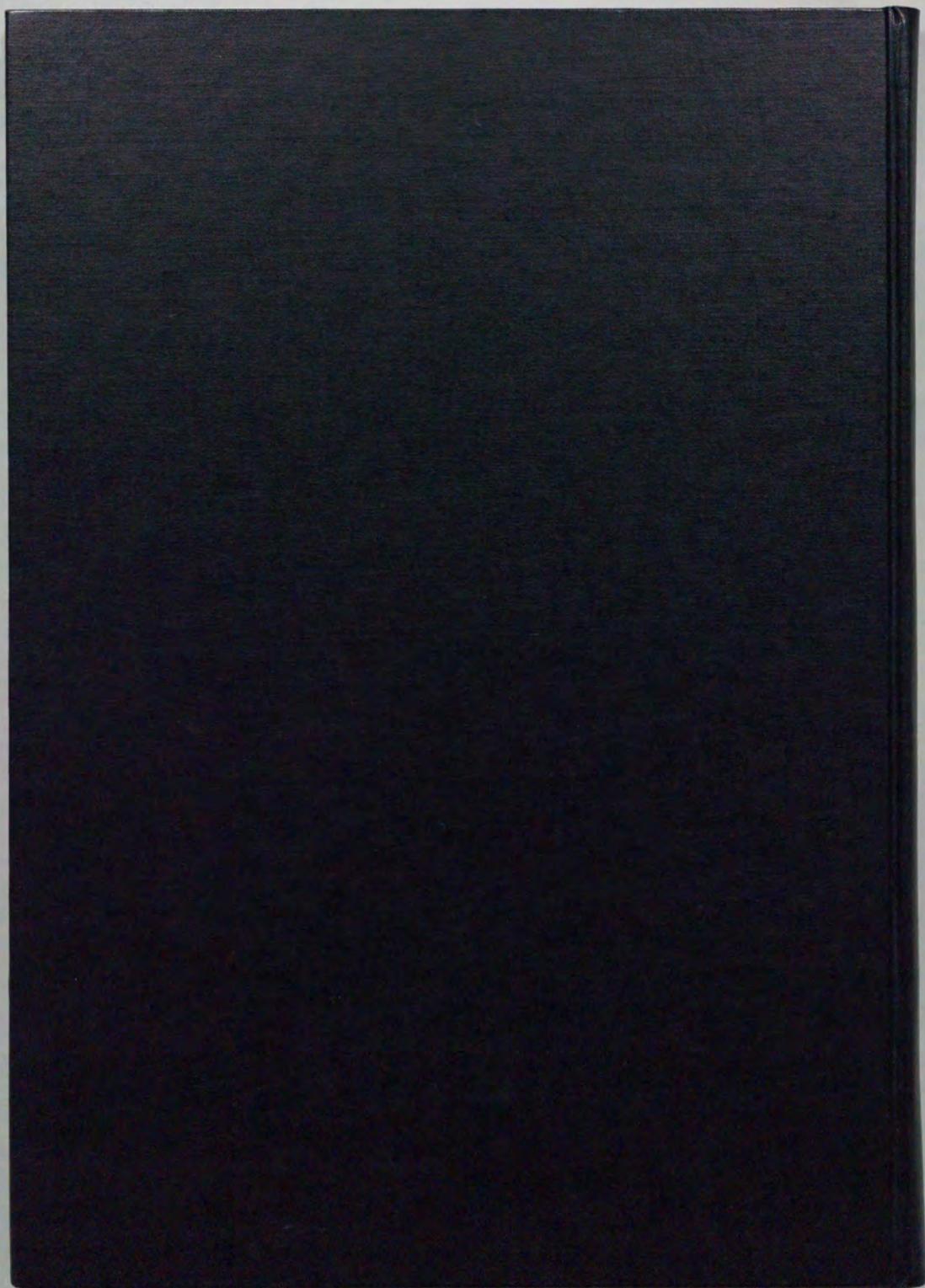
○: 抗Mab 1B6ウサギ血清

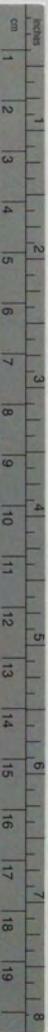
■: Mab 1B6-Sepharose 4B吸着分画

図4-2 ウイルス抗原による抗-Ig AbとMAbの結合の競合抑制



● : 抗-Ig 1B6とMAb 1B6    ○ : 抗-Ig 4G6とMAb 4G6    ▲ : 抗-Ig 6G11とMAb 6G11





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

