
研究報文

抗狂犬病ウイルス核タンパク質 IgY の調製 ～アジュバント前投与 DNA 免疫法と タンパク質免疫法との比較～

久保 七彩¹, 上羽 智恵美², 門間 敬子¹, 井上 智³, 野口 章³, 八田 一^{1*}

Preparation of specific IgY against Rabies virus nucleoprotein
— Comparative study of adjuvant pre-injected DNA immunization
and protein immunization methods —

Nanase Kubo¹, Chiemi Ueba², Keiko Momma¹, Satoshi Inoue³, Akira Noguchi³,
Hajime Hatta^{1*}

Summary

Rabies is one of the zoonoses which is prevalent mainly in developing countries. Specific antibodies against the rabies virus are needed for rabies research, diagnosis, and treatments in those areas; however, these tended to be in short supply. This study compared protein immunization and DNA immunization effects for the more straightforward preparation of the anti-rabies virus Nucleoprotein IgY from chicken eggs. As the result of ELISA with diluted egg yolks, most of the protein-immunized hens and some DNA-immunized hens induced high ELISA values. Then, adjuvant injection before DNA immunization (Pre-immune stimulation) was more effective in obtaining higher ELISA values of IgY than without Pre-immune stimulation. Commonly, it takes a long time and tedious work to prepare purified protein for use as antigens. Therefore, this DNA immunization method with Pre-immune stimulation would efficiently supply specific IgY antibodies to endemic countries.

(Received 13 September, 2021, Accepted 17 November)

I. 緒言

狂犬病は現在でもアジア・アフリカにおける発展途上国で流行している人獣共通感染症である。WHO は感染の疑いがある動物（主にイヌ）の体液に暴露され、ウイルス感染の危険性がある場合には、直ちに狂犬病ウイルスワクチンに加え、咬傷部位に精製されたヒトまたはウマ由来の抗狂犬病免疫グロブリン

を注射することを推奨している¹⁾。しかし、この狂犬病ウイルスに特異性を持つ IgG 抗体は供給が不足している²⁾のが現状である。一方、近年、免疫組織化学の手法を利用した狂犬病ウイルス抗原の検査³⁾が可能となっているが、この際に用いられる抗体についても供給が不安定であることが問題とされており⁴⁾、これらの特異的抗体に代替しうるものとしてニワトリ IgY 抗体が注目されている^{5,6)}。

IgY 抗体は哺乳動物における IgG 抗体に相当するものであり、産卵鶏に対して抗原となる細菌やウイルス、および精製タンパク質などを免疫注射することでそれらの抗原に特異性を持つ IgY 抗体を鶏卵卵黄から得ることができる。また、卵黄 100 g 中には

¹ 京都女子大学大学院 家政学研究科

² 京都府農林水産技術センター畜産センター

³ 国立感染症研究所 獣医科学部

*連絡先 hatta@kyoto-wu.ac.jp

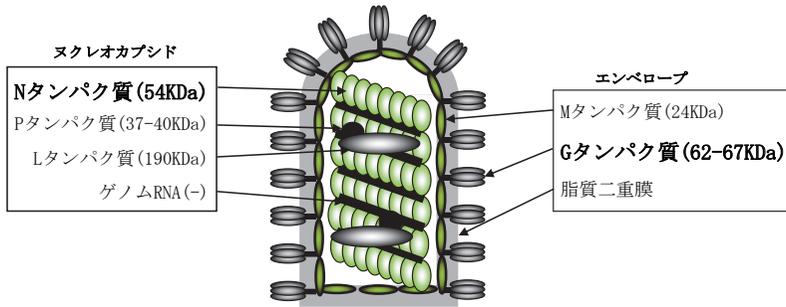


図1 狂犬病ウイルスの構造

出典：日本臨床 63巻 増刊号5 臨床免疫学（下）—基礎研究の進歩と最新の臨床—臨床編 IX. ワクチンによる免疫療法 狂犬病ワクチン 森本金次郎 伊藤（高山）睦代 日本臨床社 2005年

約1gのIgY抗体が含まれており、リポタンパク質凝集沈殿剤として食品用増粘多糖類のカラギーナンを用いる方法（λ-カラギーナン法）⁷⁾で容易に高純度のIgYを精製することが可能であるため、各種感染症の病原体抗原に対する検査用抗体や中和抗体としての利用が期待されている。

狂犬病ウイルスは核タンパク質（RV-N）、糖タンパク質（RV-G）、リン酸化タンパク質（RV-P）などから構成されており⁸⁾（図1）、我々はまず、狂犬病の検査試薬となり得るRV-N特異的IgY抗体調製法の確立を目標としている。

現在までに、従来法である遺伝子組換えタンパク質を抗原として注射する手法（タンパク質免疫法）⁶⁾、および遺伝子組換えプラスミドDNAを注射しRV-Nをニワトリ筋肉中で発現させる手法（DNA免疫法）⁹⁾でRV-Nに特異性を有するIgY抗体の調製に成功し報告している。本研究では、DNA免疫法において既に使用実績のあるアジュバント（λ-カラギーナン・FCA）を事前に免疫賦活剤として注射することによりその注射局所に各種免疫担当細胞を集め（免疫前刺激）、プラスミドDNAから発現したタンパク質抗原に対してより強い免疫応答を誘導することが可能かを検討した。また、同じロットで日齢が同じ産卵鶏を用いDNA免疫法とタンパク質免疫法による免疫実験を行い、それぞれの卵黄中に誘導される特異的IgY抗体を精製し、RV-N抗原に対する特異的抗体価を比較した。

II. 材料および方法

1. 試料および試薬

食品添加物グレードのλ-カラギーナンは、太陽化学（株）より入手した。フロイントの完全アジュバ

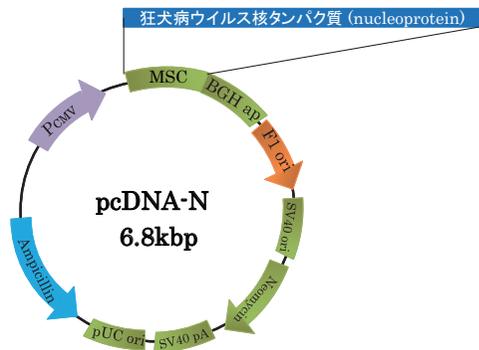


図2 組換えプラスミドDNA(pcDNA-N)の構造

ント（FCA: Freund's complete adjuvant）および不完全アジュバント（FIA: Freund's incomplete adjuvant）は、Becton, Dickinson and Company から入手した。DNA purification NucleoBond Xtra Midi は Macherey-nagel 社から入手した。狂犬病ウイルス組織培養不活化ワクチン（シード）は、KM バイオロジクス社から入手した。他の試薬については、特級試薬を使用した。

2. 組換えプラスミドの調製

狂犬病ウイルスの challenge-virus-standard (CVS) 株由来のRV-N 遺伝子（アクセッション番号：AB069973）をpcDNA 3.1（Thermo Fisher science 社）にライゲートした（図2）。組換えプラスミドDNA（pcDNA-N）を大腸菌 DH5α コンピテントセル（タカラバイオ株式会社）で増幅し、プラスミドDNA 精製キット NucleoBond Xtra Midi のプロトコールに従って精製した。この組換えプラスミドDNA を PBS 溶液（pH 7.4）で1 μg/μl に調整し、-30℃で保存した。なお、本研究における遺伝子組換え実験に関し

ては、京都女子大学の組換え DNA 実験安全委員会により承認を得た（承認番号：20-2-03）。

3. 遺伝子組換え RV-N の精製

CVS 株由来の RV-N の全遺伝子を、In-Fusion HD Cloning（タカラバイオ㈱）を用いて pET-42a プラスミドベクター（Merck 社）に挿入した。組換えベクターを Rosetta-gami B（DE3）pLysS Competent Cells（Merck 社）に形質転換し、産生させた組換え RV-N（rRV-N）を His-trap FF crud（Cytiva 社）を用いて 8M 尿素による変性条件下で精製した。さらに透析により尿素を除去したが、尿素濃度が低下すると組換えタンパク質が不溶化した。そこで、完全に脱尿素し

不溶化凝集した状態（rRV-N in 0M Urea）と 4 M 尿素中で可溶化した状態（rRV-N in 4M Urea）の 2 種類を調製した。

4. 産卵鶏への免疫注射と炎症の目視検査

免疫注射のスケジュールや各群に対する処置について表 1・図 3 に示した。計 24 羽の産卵鶏（ボリスブラウン：356 日齢）を 3 羽ずつ 8 群に分けた。1～5 群に対しては pcDNA-N を針なし圧力注射器 Twin-Jector®Ez（JCR ファーマシューティカルズ社）を用いて翼下筋に注射した（400 μg/羽）。このうち、1～4 群については注射箇所周囲にアジュバントとしてそれぞれ FCA もしくは 2% λ-カラギーナン 1 ml を

表 1 各群の免疫条件

	n	プラスミド DNA または 組換えタンパク質	アジュバント	アジュバントによる 免疫前刺激
1 群：pcDNA-N with λ-Carra	3	pcDNA-N	2%λ-カラギーナン	-
2 群：pcDNA-N with λ-Carra (+ 免疫前刺激)	3	pcDNA-N	2%λ-カラギーナン	有り
3 群：pcDNA-N with FCA	3	pcDNA-N	FCA	-
4 群：pcDNA-N with FCA (+ 免疫前刺激)	3	pcDNA-N	FCA	有り
5 群：pcDNA-N	3	pcDNA-N	-	-
6 群：Control	3	-	-	-
7 群：rRV-N in 0M Urea	3	rRV-N (in 0M Urea)	FCA/FIA	-
8 群：rRV-N in 4M Urea	3	rRV-N (in 4M Urea)	FCA/FIA	-

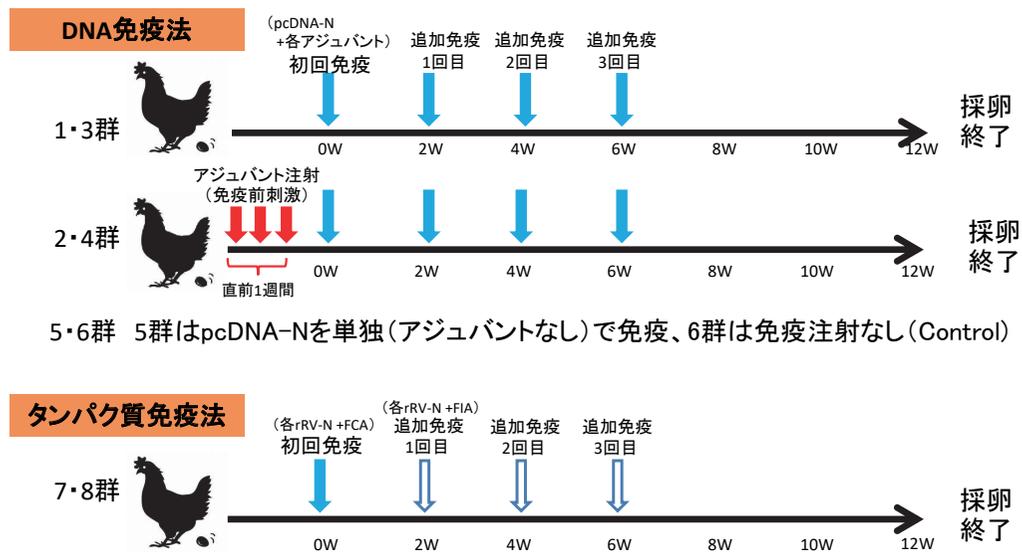


図 3 免疫スケジュール

注射した。なお、2・4群については初回のpcDNA-N注射の直前1週間に、各アジュバント1mlの注射を3回行った(免疫前刺激)(図3)。5群はpcDNA-N単独の注射を行った。初回免疫後、2週毎に同じ内容で追加免疫を3回実施した。6群は免疫注射なしのコントロール群とした。7・8群については、各1mlのrRV-N in 0M UreaとrRV-N in 4M Urea(0.5mg/ml)をそれぞれ等量のFCAで乳化し、免疫注射を実施した。追加免疫は各抗原液0.5mlを等量のFIAと乳化し、2週毎に3回実施した。

4・6週目の免疫注射の直前には注射箇所(炎症)の程度を目視で確認し、数値化した。この際「炎症なし」を0点、「わずかに変異あり」を1点、「炎症あり」を2点、「強い炎症あり」を3点として評価を行った。この評価は2名により行われ、代表的な個体については炎症部分の撮影を行った。

採卵は毎日行い、割卵まで4°Cで保存した。初回免疫(DNA免疫・タンパク質免疫)を行った日を0週目の初日とし、各個体ごとに2週間毎の卵1個から分離した卵黄を0.1%アジ化ナトリウム液で2倍希釈し、4°Cで保存した。これを2倍希釈卵黄保存液とする。それ以外の卵黄は2週間毎に割卵・卵白分離・均質化し、-30°Cで凍結保存してIgYの精製に使用した。

本研究は、京都女子大学の動物委員会の承認を得た(認証番号2020-12)。また、動物とその飼育に関わるすべての手順は、「動物実験の適切な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、2006年)に準拠して行った。

5. 希釈卵黄を用いたELISA

ELISAは、Kuboら⁹⁾が報告した手順に従って実施した。すなわち、狂犬病ウイルスワクチンをELISAコーティングバッファー(pH9.6)で10倍希釈し、96ウェルELISAプレート(住友ベークライト社)に固相化した。2倍希釈卵黄保存液はTween20を0.05%添加したトリス緩衝液(pH7.4, TBS-T)でさらに2,000倍希釈し、一次抗体として各ウェルに添加した(50µl/well)。次いで、TBS-Tで3回洗浄後、ALP標識抗IgY(H+L)抗体(Abnova社)を二次抗体として使用し(100µl/well)、TBS-Tで3回洗浄後、基質(1mg/ml p-ニトロフェニルリン酸2Na水溶液[pH9.5])で発色させ、波長405nmの吸光度を測定した。なお酵素反応は、37°Cで、DNA免疫を実施した1~5群および6群(コントロール)では20分、タンパク質免疫を実施した7・8群では15

分とした。

6. IgYの精製

卵黄からのIgY精製は、先行研究^{9,10)}と同じくλ-カラギーナン改良法で実施した。2・4・7・8群で高い抗体価を示した各1羽と6群(コントロール群)の1羽の卵黄(図5の点線囲み)をそれぞれまとめ、-30°Cで2週間以上保存したものをIgY精製に用いた。精製したIgYの濃度は、1%IgY溶液の波長280nmにおける吸光度が15.8である¹¹⁾ことを用いて計算した。各IgYの純度は、SDS-PAGEに供した後、ポリアクリルアミドゲルをLuminoGraph II(ATTO社)で撮影しCsAnalyser4(ATTO社)で解析することで、各レーン中の全てのタンパク質分画におけるH鎖・L鎖が占める比率として推定した。精製IgYは凍結乾燥により粉末化し、-30°Cで保存した。

7. 精製IgYを用いたELISA

狂犬病ウイルスワクチンに対する各精製IgYの抗体価を比較する目的で、ELISAを実施した。各IgYはTBS-Tで100µg/mlに希釈し一次抗体として用いた。ELISAの手順は上記に記した方法と同様に行った。統計処理は、Excel統計(社会情報サービス(株))を用いて行い、データは平均値±標準偏差で示した。また、対応の無い5群間の比較には一元配置分散分析を行い有意差が認められた場合Tukey検定を行った。危険率5%で有意差ありとした。

Ⅲ. 結果

1. 産卵率および炎症

コントロール群(6群)の産卵率を100%とした各群の産卵率は、3・4群でのみ低下がみられた。これらの群では2~3週目で産卵率が最も低く、50%前後まで低下したが、その後徐々に回復した(データ未掲載)。

4・6週目の時点における炎症の程度の評価結果を表2に示し、0点から3点までの代表的な個体の注射箇所の写真を図4A-Dに示す。1~4群においては、pcDNA-Nのみを注射した5群よりも強い炎症反応がみられた。1・2群(λ-カラギーナン併用)よりも3・4群(FCA併用)で炎症が強くなる傾向がみられ、同じアジュバントを使用した場合には特に免疫前刺激を行った2群・4群で炎症が強くなる傾向がみられた。7・8群間では7群で炎症がやや強い傾向があった。

表2 各個体における炎症の程度*

個体識別番号	1群			2群			3群			4群			5群			6群			7群			8群		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
4 week	0	0	0	1	1	2	1	3	3	2	3	3+	1	1	0	0	0	0	2	3	2	1	2	2
6 week	0+	1	1	0+	1	2	2	3	3	2	3+	3+	0	0	0	0	0	0	1	2	3	1	2	2+

*「炎症なし」は0点、「わずかに変異あり」は1点、「炎症あり」は2点、「強い炎症あり」は3点として評価を行った。

各評価点の中間点とする場合は「+」を付加して区別した。評価は注射直前に、2名で実施した。

A. 0点/炎症なし



B. 1点/わずかに変異あり



C. 2点/炎症あり



D. 3点/強い炎症あり



図4 炎症度の評価における代表的な個体

4・6週目の免疫注射直前に各個体の炎症の程度を観察した。代表的な個体の写真を示す。炎症の程度は、発赤・発熱・怒張・皮膚の荒れ具合の程度や、水泡の有無により総合的に判断を行った。

2. 卵黄中のIgY抗体価の推移

卵黄中のIgY抗体価の推移を図5に示す。pcDNA-Nの単独注射を実施した5群および初回免疫と同時にアジュバント注射を始めた1・3群では、ELISA値（抗体価）の最大値は0.5～0.8であった（図5-I・III・V）。一方、アジュバントによる免疫前刺激を実施した2・4群においては、各群1羽ではあるが高いELISA値を有する個体がみられた（図5-II・IV）。組換えタンパク質を免疫注射した7・8群においてはすべての個体でELISA値が上昇した（図5-VII・VIII）。

DNA免疫法とタンパク質免疫法の2つの手法による卵黄中のELISA値の推移に着目すると、それぞれ最高値となる時期に違いがみられた。タンパク質免疫ではELISA値は6～8週目に最高値となった後、速やかに低下し、12週目時点では最高値の約2/3となった（図5-VII・VIII）。一方、DNA免疫を行った2・4群中の高いELISA値を示した個体においては、最高値に到達したのはおよそ8～10週目であり、少なくとも12週目まではELISA値の大きな低下は見

られなかった（図5-II・IV）。

3. IgYの精製

2・4・6・7・8群（図5）の各1個体のプール卵黄より精製したIgY抗体の名称は、それぞれpcDNA-N with λ-Carra IgY, pcDNA-N with FCA IgY, Cont IgY, rRV-N in 0M Urea IgY, rRV-N in 4M Urea IgYとし、各IgY抗体の収量はプール卵黄100gあたり0.338～0.682gであった。また、各精製抗体の推定純度は86.7%～90.1%であった（データ未掲載）。

4. 精製IgYによるELISA

精製した各種IgYの狂犬病ウイルスワクチンに対する抗体価をELISAで比較した結果を図6に示す。Cont IgYと比較して、DNA免疫法で調製したpcDNA-N with λ-Carra IgYとpcDNA-N with FCA IgY、およびタンパク質免疫法で調製したrRV-N in 0M Urea IgYとrRV-N in 4M Urea IgYはそれぞれ十分な抗体価を示し、統計学的に有意であった（ $P < 0.01$ ）。また、pcDNA-N with λ-Carra IgYとrRV-N in 0M Urea

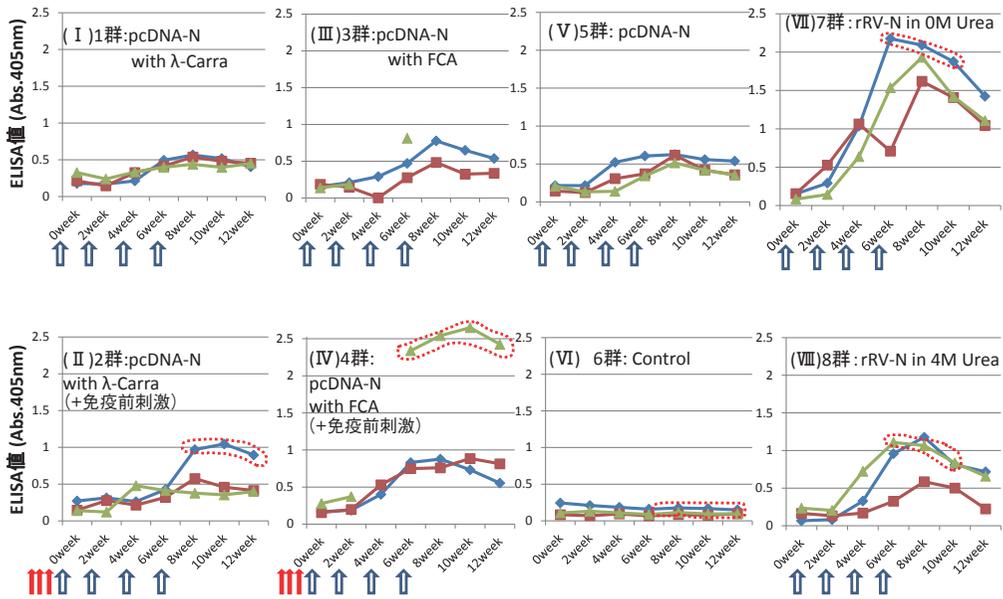


図5 卵黄中のIgY抗体価の推移

初回注射の週を0週目とし、1～8群における各個体別のIgY抗体価の変化をI～VIIIに示す。なお、酵素反応時間はI～VIでは20分、VII～VIIIでは15分とした。↑は各アジュバントによる免疫前刺激を示し、↑はpcDNA-NもしくはrRV-Nの注射を示している。⊙で囲んだ期間の凍結卵黄を用いてIgY精製を実施した。

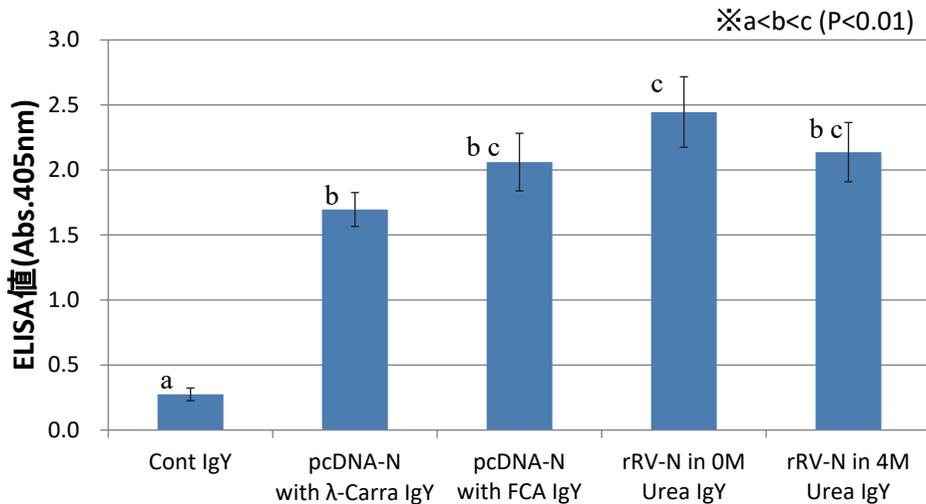


図6 精製IgYの抗体価（ELISA値）の比較

狂犬病ウイルスワクチンを固相化抗原とした場合の各精製IgYの抗体価を示す。各精製IgY（一次抗体）は、図5の各群産卵鶏の卵黄ELISA値で最も高値を示した1羽の⊙で囲んだ期間の凍結卵黄から精製したIgYであり、濃度は100 μg/mlとして用いた。なお、図中の異なる文字は統計学的に有意な差（P < 0.01）であることを示す（n = 3）。

IgY 間には有意な差 ($p < 0.01$) が認められたが、その他の群間には差はみられなかった。

IV. 考察

1. DNA 免疫におけるアジュバントを用いた免疫前刺激の有用性

アジュバントとは、抗原となる物質と共に注射することでその抗原性を補助する役割を持つものである。種々のアジュバントが現在開発されているが、本研究で用いた FCA は結核菌の死菌を含み強い免疫賦活作用を有する¹²⁾。また、 α -カラギーナンは高濃度で炎症作用を有し動物実験における浮腫誘発剤としても用いられている (カラギーナン浮腫)¹³⁾。我々は産卵鶏に DNA 免疫を 8 回繰り返し、これらのアジュバント効果を既に報告している⁹⁾。本研究においてはアジュバントを用いた免疫前刺激を行い、かつ pcDNA-N を 4 回注射することで、抗原特異的 IgY 抗体の調製に成功した。すなわち免疫前刺激として、初回の DNA 注射の前週に α -カラギーナンまたは FCA 単独注射を 3 回実施すると、目視で観察される炎症が強く起こり (表 2)、それらの個体の内 1 羽ずつではあるが、卵黄中に含まれる IgY 抗体価が高くなった (図 5)。DNA 免疫法でより高い免疫応答を誘導するためには、各細胞内で発現した抗原タンパク質が動物体内の抗原提示細胞に効率的に認識される必要がある¹⁴⁾。本研究で免疫前刺激と DNA 免疫で抗体価が上昇した個体については、アジュバントを事前に注射することで炎症を起こし、これにより各種免疫担当細胞を局所に遊走させた後、さらにその炎症箇所には DNA 免疫注射を行った。これにより、プラスミド DNA にライゲートした遺伝子から発現した抗原タンパク質に対する免疫応答が効率よく起きたと考えられる。

2. タンパク質免疫法における尿素濃度の影響

通常、尿素を完全に除いたものを抗原とする手法が一般的であるが、本研究において 4M 尿素を含んだ可溶性精製タンパク質と完全に脱尿素 (0M) を行い不溶性凝集した精製タンパク質を抗原として免疫実験を行った結果、いずれの抗原でも抗原特異性を有する抗体が誘導された (図 5-VIII・VII)。脱尿素条件下では不溶性凝集したタンパク質がウイルス粒子本来の構造とは著しく異なる変性状態であると考えられる。一方、4M 尿素変性条件下ではタンパク質は可溶性状態で、尿素によりタンパク質分子内水素結合や疎水結合が抑制された立体構造になっている

と考えられる。これらの抗原タンパク質の立体構造の差が、産生される IgY の抗原特異性に影響する可能性があり、今後、それぞれの IgY 抗体の変性 RV-N との反応性を調べる必要がある。なお、本研究では 4M 尿素変性条件下でタンパク質免疫注射を実施した 8 群では、脱尿素 (0M) 状態で免疫注射を実施した 7 群と比べると卵黄中の抗体価は低くなった (図 5-VII・VIII)。これは抗原タンパク質の立体構造の差異に起因するだけでなく、抗原液に含まれる高濃度の尿素が免疫応答に影響し、抗体産生を妨げた可能性も考えられる。

3. DNA 免疫法とタンパク質免疫法の比較

従来法のタンパク質免疫法として、0M (脱尿素) または 4M 尿素存在下の rRV-N を免疫源とした 7・8 群では、一部の個体で強い炎症が起こったものの、FCA で免疫前刺激を行った 3・4 群のような産卵率の低下はなかった。これは、従来法であるタンパク質免疫法では、追加免疫において結核菌の死菌を含まない FIA をアジュバントとして用いているためであると考えられる。過剰な免疫反応により起きる産卵率の低下は、IgY 抗体を卵黄から得る本手法においては大きな問題となる。産卵率の低下が起きず、かつ高い抗体価の IgY を安定的に誘導できる点はタンパク質免疫法の利点であると言える。

なお、抗体価が最高値となる時期とその持続期間が DNA 免疫法とタンパク質免疫法により異なる傾向がみられたが、これは抗原を直接接種する従来法と、一度体内で抗原となるタンパク質を発現させる DNA 免疫法の作用機序の違いによるものであると思われる。筋肉内に注射したプラスミド DNA からのタンパク質発現は一年半に亘って維持されることがマウスで確認されており¹⁵⁾、近年開発が進められている DNA ワクチンでは、非ヒト霊長類の血中特異的抗体価を 1 年間維持したという報告もある¹⁶⁾。本研究においても、DNA 免疫法で最も抗体価が上昇した個体 (図 5-IV) については、タンパク質免疫法と比較すると免疫持続効果が比較的長く維持されることが示唆され、これは DNA 免疫法の利点の一つであると考えられる。一方、本研究においては DNA 免疫法で最も抗体価が上昇した 2・4 群 (図 5-II・IV) であっても、高い抗体価が誘導されたのは各 1 羽ずつであり、個体ごとの差が大きかった。従って、確実な抗体産生を行うには複数の個体に対する免疫注射が必要である。この点は飼育コストの面において DNA 免疫法の不利な点であり、今後の改良が望まれ

る。

タンパク質免疫法・DNA免疫法で調製した各精製IgY抗体は100 µg/mlの濃度で、コントロールIgYより、それぞれ有意に高いELISA値(特異的抗体価)を有することが示された(図6)。特に、プラスミドDNAの単独免疫注射に加えFCAを活用(免疫前刺激およびDNAとの同時注射)することにより、従来の一般的なタンパク質免疫と有意差なく同程度の抗体価を示す特異的IgYが調製可能で、今後、狂犬病ウイルスの検出に用いられることが期待される。

結語

本研究において、産卵鶏にDNA免疫法を実施する際にアジュバントで免疫前刺激を行うことでより高い抗体価を有するIgY抗体を得られることが明らかとなった。また、特異的抗体が誘導される個体の割合は従来法であるタンパク質免疫法に劣るものの、高純度に精製したIgY抗体ではELISAを用いた評価で、DNA免疫法でもタンパク質免疫法と同様に十分な抗体価を示した(図6)。今後、抗体の特異性や結合力に関する比較は必要であるが、組換えタンパク質は調製が困難であることを加味すると、比較的調製が容易で保存もしやすいプラスミドDNAを用いるという点はDNA免疫法の大きな利点である。また、免疫動物として産卵鶏を用いる点は動物福祉の観点からも好ましく、筋肉も大きいため免疫注射が実施しやすいというメリットも挙げられる。

なお、本手法ではプラスミドDNAに挿入する遺伝子を変更することで、多様な抗原タンパク質に対するIgY抗体を調製することが可能である。例えば、現在世界的に不足している狂犬病ウイルス中和抗体(抗RV-G IgG抗体)の代替として、DNA免疫法で抗RV-G IgY抗体を大量に得ることも可能であると考えられる。狂犬病は主に発展途上国で流行しており、それらの地域では利用可能な研究資源が限られている。このような状況において、本研究で実施したアジュバントによる免疫前刺激の後にDNA免疫を行うIgY抗体調製法は、不足する検査試薬やウイルス中和抗

体の生産に利用できる可能性があると思われる。

謝辞

本研究を実施するにあたり、免疫実験を行う際にご協力いただきました京都府農林水産技術センター畜産センターの職員の皆様に深謝申し上げます。

利益相反

利益相反に該当する事項はない。

引用文献

- 1) World Health Organization: *Rabies vaccines and immunoglobulins: WHO position: Summary of 2017 updates* (2018)
- 2) H. Wilde, et al.: *Clin. Infect. Dis.*, **34**, 477–840 (2002)
- 3) L.T. Stein, et al.: *Vet. Pathol.*, **47**, 630–636 (2010)
- 4) S. N. Madhusudana, et al.: *Virolog. Sin.*, **27**, 299–302 (2012)
- 5) Y. Motoi, et al.: *Vaccine*, **23**, 3026–3032 (2005)
- 6) Y. Motoi, et al.: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **58**, 115–118 (2005)
- 7) H. Hatta, et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2531–2535 (1990)
- 8) 森本金次郎, 伊藤(高山)睦代, *日本臨床*, **63**, 増刊号5, 654–658 (2005)
- 9) N. Kubo, et al.: *J. Poult Sci.*, 0210053 (印刷中)
- 10) N. Kubo, et al.: *J. Poult Sci.*, **58**, 192–199 (2021)
- 11) J. S. Gallagher, E. W. Voss Jr.: *Immunochemistry*, **6**, 199–206 (1969)
- 12) H. F. Stills Jr.: *ILAR Journal*, **46**, 280–293 (2005)
- 13) J. Necas, L. Bartosikova: *Veterinari Medicina*, **58**, 187–205 (2013)
- 14) M. Lim, et al.: *Pharmaceutics*, **12**, 30 (2020)
- 15) J. A. Wolff, et al.: *Hum. Mol. Genet.*, **1**, 363–369 (1992)
- 16) A. Patel, et al.: *J. Infect. Dis.*, **219**, 544–555 (2019)