総 説

ポリオウイルスの構造蛋白と抗原性

谷口 孝喜, 浦沢 正三

札幌医科大学衛生学教室

(受付: 昭和60年2月1日)

はじめに

ポリオウイルスは、中枢神経を侵す神経毒力の強いウイルスであり、1961年までは、日本においても年間1,000～5,000名のポリオ麻痺患者が発生していたが、Salk 不活化ワクチンおよび Sabin 生ワクチンの開発により、現在では先進諸国でのポリオ患者発生例はきわめて稀となっている。しかしながら、ポリオウイルスの根絶へ到る道は、まだ程遠いと言わざるを得ない。ワクチン接種の行き渡らない発展途上国では、WHO に報告されているだけでも今なお年間4,000名以上の麻痺患者が発生している。また、ワクチン投与を行っている先進諸国では、ワクチン関連の麻痺例がきわめて少数ではあるが、報告されている。さらに、近年の予防接種率の低下も見過ごすことのできない事実であり、台湾における1982年の患者162名の大流行例は、ポリオウイルスの脅威を再認識させる事件であった。加えて、Sabin 株の種ウイルスの枯渇が真近いという現状もある。こういった背景のもと、より安定で、免疫効果の高い、経済性のあるワクチンの開発が要望されており、これに関連してポリオウイルスの抗原性の研究が、再びクローズアップされている。

ポリオウイルスは、分子量 8.4×10^6 ダルトン、直径30nm のエンベロープをもたない RNA ウイルスで、4種の構造蛋白 (VP1, VP2, VP3 および VP4) 各60分子と、3' 末端に poly A、5' 末端に VPg をもつ単鎖 RNA (プラスの極性をもつ) から構成されており、分類学上 Picornaviridae 科の Enterovirus 属に含まれている。ポリオウイルスには、中和試験にもとづく3つの血清型

(type 1, 2, 3) が知られており、感染性をもつ完全粒子であるビリオンが有する N (あるいは D) 抗原性は、血清型特異的であり、熱処理などして得られる empty 粒子が有する H (あるいは C) 抗原性は、血清型間の交叉反応を呈する。

ポリオウイルスは、構造が単純で、ウイルス収量がよく、精製が容易なことから、生化学的、分子生物学的な研究が精力的に進められてきたものの、その抗原構造の詳細に関する情報はきわめて乏しかった。しかし、この数年モノクローン抗体の利用によりポリオウイルスの抗原構造の解明が進み、従来一般に認められていた見解が覆された例も少なくない。さらに、遺伝子工学的技法の駆使によりポリオウイルスの抗原部位はアミノ酸配列のレベルで論じられるまでになり、サブユニットワクチン、リコンビナントワクチン、あるいは合成ペプチドワクチンの開発といった新しい vaccinology が進行している。ここでは、ポリオウイルスの構造蛋白を含めた様々な抗原蛋白とその抗原性についてまとめるとともに、それに関連して、ポリオウイルスの抗原変異および、モノクローン抗体を用いて再検討されている中和反応の機構の概略にも触れてみたい。

1. 構造蛋白

ポリオウイルス粒子を SDS、塩酸グアニジンあるいは尿素で処理すると4種のウイルス蛋白 VP1 (分子量34,000; 以下34K とする)、VP2 (30K)、VP3 (26K)、および VP4 (7K) に分解される¹⁻³⁾(表1)。VP1、VP2 および VP3 のアミノ酸組成は、VP2 でリジンの含量が低いこと、VP3 でメチオニン含量が高いことを除いては互によく似ているが、VP4 ではアラニン含量が高くスレオニン、プロリン含量が低いことやシステインを含まないなど VP1～VP3 のアミノ酸組成とはかなり異なっている⁴⁾。いずれの蛋白にもシステインは含まれず、

Structural polypeptides and antigenicity of poliovirus by Koki TANIGUCHI and Shozo URASAWA (Department of Hygiene, Sapporo Medical College, Sapporo 060, Japan).

〒060 札幌市中央区南1条西17丁目

表1 構造蛋白の性状*

構造蛋白	分子量 (ダルトン)	等電点	総アミノ酸数	N 末端 アミノ酸	C 末端 アミノ酸	粒子上での 存在	中和エピト ープの存在
VP1	34,000	8.1	302	グリシン	チロシン	最も外側 (頂点?)	有 (最も dominant)
VP2	30,000	6.4	271	セリン	グルタミン	外側	有
VP3	26,000	6.0	238	グリシン	グルタミン	外側	有
VP4	7,000	7.3	69	メチオニン	アスパラギン	内部	無?

* type 1 Mahoney 株で調べられた結果を示す。

従ってジスルフィド結合は粒子中にみられない。各構造蛋白の 9M 尿素存在下での等電点は, type 1 Mahoney 株で VP1: 8.1, VP2: 6.4, VP3: 6.0 および VP4: 7.3 と測定されている⁵⁾。この値は株によりやや変動するが, いずれの株においてもアルカリ性: VP1 > VP4 > VP2 > VP3; 酸性の順序は一定である。ウイルス 1 粒子は VP1~VP4 各 60 分子で構成されているが, 1 ないし 2 分子の VP0 (41K; VP4-VP2 の解裂していない蛋白) を含むとの報告もある⁶⁾。さらに, ウイルス RNA の 5' 末端に共有結合している等電点 9.4 以上の塩基性蛋白である VPg (5K) もウイルス粒子を構成する蛋白といえよう。VPg は, RNA 複製のためのプライマーとして, RNA 分子の粒子内への取り込みを左右する蛋白として, あるいは 5' 末端を核酸分解酵素から保護する蛋白としての役割などが考えられている。その詳細は発見者である野本氏らの総説^{7,8)}を参照していただきたい。

2. 粒子構造

VP1~VP4 は互いに疎水結合で連結しており, ピリオンの疎水性は比較的高く, Bull と Breese の方法で測定すると 1.18 と算定される⁹⁾。さて VP1~VP4 の構造蛋白は, どのように粒子上に配置されているのだろうか。従来, VP4 が粒子のもっとも外側に露出していると考えられていた。その根拠として, 細胞に吸着後離れてきたウイルスは VP4 を失っておりもはや吸着能力を失っている¹⁰⁾こと, さまざまな物理化学的処理(熱, アルカリ, 紫外線あるいは尿素)で VP4 が次いで VP2 が解離する¹⁰⁾こと, および中和抗体を含めた抗ビリオン抗体が, VP4 と特異的に反応する¹¹⁾ことなどの結果があげられる。そこで, コクサッキー B 3 ウイルスの段階的分解の実験結果から想定された, VP4 の 5 量体が正 20 面体の 12 の頂点に位置し, そのまわりを VP2 が囲んでいる粒子モデル¹²⁾がポリオウイルスにも通用すると考えられていた。しかし, その後, VP1 がもっとも外側に露出し, 次いで VP1 そして VP2 の順で外側に位置

し, VP4 は粒子のもっとも内部に存在することを支持するデータが蓄積しており, 上述の VP4 の選択的・優先的な解離は, 細胞吸着, 物理化学的処理後生じた粒子のコンホメーションの大きな変化の結果, VP4 が粒子内部から突出したものと解釈されている。

ウイルス粒子を, 遊離のアミノ基に反応する [³H] acetic anhydride や N-succinimidyl 2, 3-[³H]-propionate で標識すると, VP1 がもっとも効率よく, 次いで VP3, VP2 が標識され, VP4 はまったく標識されない¹³⁾。チロシンのベンゼン環と反応する ¹²⁵I を用いた標識実験でも同様の結果が得られている¹⁴⁾。またポリクロナールな抗ビリオン抗体や中和モノクローン抗体の多くが VP1 と反応し^{15~19)}, 単離した VP1 が中和抗体を惹起した^{20,21)}。このような, VP1 が粒子の最も外側に位置するということを示唆する結果は, 他のピコルナウイルス群でも得られている。メングウイルス, 口蹄疫ウイルス (FMDV) では VP1 が細胞吸着に関与しており²²⁾, FMDV では VP1 のトリプシンによる解裂が感染性を低下させる²³⁾。

VP1 は dimethyl suberimide や dimethyl adipinate を用いた cross-link 実験で VP3 と連結して VP1-VP3 の複合蛋白を生成する²⁴⁾ことや, ウイルス粒子をアルカリ処理で段階的に分解すると VP1-VP3 の安定な複合体が形成される²⁵⁾ことから, VP1 と VP3 は粒子中で隣接していると思われる。類似の結果は, メングウイルスでも得られており, VP1 を頂点に配した粒子モデルが提出されている^{8,26)}。ポリオウイルス粒子の構築もこのモデルに沿うものと思われる。

粒子内部のウイルス RNA が相互作用をなす構造蛋白は, 以下の実験結果により, VP4 (そして VP2) であることが示されている²⁷⁾。ポリオウイルス粒子を, ウイルスの構造, 抗原性を変えない程度に短時間の紫外線を施すと, ウイルス RNA と構造蛋白の cross-link した RNA-蛋白質複合体 (35S) が得られた。その複合体を RNase 処理後, RNA に結合している蛋白を分析すると, 量的に VP4 がもっとも多く, 次いで VP2 が結合して

いた。この結果は、VP4 が次いで VP2 がもっとも粒子内部に存在するという前述の考え方と矛盾しない。現在、ポリオウイルス^{28,29)}、メングウイルス³⁰⁾、ライノウイルス²⁹⁾の結晶がX線回折により解析されており、この方面からの情報もまたピコルナウイルスの粒子構造の解明に貢献するものと期待されている。

3. 形態形成

ポリオウイルス RNA はまず 1 本の polyprotein NC-VP00 (247K) を合成し、その後少なくとも 12 の主要なポリペプチドに解裂される³¹⁻³³⁾。NCVP00 はまず NC-VP1a, NCVP3b と NCVP1b の 3 つのポリペプチドに解裂されるが、構造蛋白である VP1~VP4 は、NCVP1a の最終産物である³⁴⁾。NCVP1a は 5 個集合し、13S 粒子 [NCVP1a]₅ を形成し、そこで、VP0, VP3 および VP1 に解裂し 14S 粒子 [VP0, VP3, VP1]₅ となる。つまり VP0 と VP3 および VP3 と VP1 の間で切断される。その切断点はともにグルタミン-グリシンであり^{35,36)}、単一のプロテアーゼの関与が考えられる。このプロテアーゼは、細胞側の蛋白を切断しないことや、NCVP00 中の他のグルタミン-グリシン部分には作用しないことから、何らかの因子の作用も加って VP0-VP3 と VP3-VP1 の部位のみに作用しているらしい。次いで 14S 粒子は 12 個集合し、沈降定数が 75S、塩化セシウム中の密度が 1.31g/cm³ のプロカプシド [[VP0, VP3, VP1]₅]₁₂ を形成する。この構造体に RNA が加わると 150S のビリオンが形成されるが、粒子内への RNA の侵入のメカニズムはまったく解明されていない。RNA が粒子中に取り込まれると、粒子のコンホメーションが変化し、そこではじめて作動するプロテアーゼの作用で粒子中の VP0 がアスパラギン-セリンを切断点として、VP4 と VP2 に切断される³⁴⁾(実際に、高度に精製されたポリオウイルス粒子中にプロテアーゼ活性が検出されている³⁷⁾)。こうして生じたビリオン (150S, 1.34g/cm³) には、この解裂を受けない 1~2 分子の VP0 の存在が報告されているが、その意義は不明である³⁾。ポリオウイルス感染細胞抽出液には、他に塩化セシウム中の密度が 1.44g/cm³ と大きい dense particle が検出される^{38,39)}。この粒子は、構造蛋白も RNA も、通常のビリオンと同じであるが、構造蛋白間の結合がゆるんで Cs⁺ イオンが侵入しやすくなっており、RNA と蛋白間の相互作用も異なっている。その感染性は低く、通常のビリオンが 50~150 粒子あたり 1 感染価であるのに対し 10⁴ 粒子で 1 感染価を示す。

In vitro の系でも、14S 粒子はポリオウイルス感染細胞抽出液の存在下で集合し、プロカプシド (pI 6.8, 浮

上密度 1.31) にきわめて類似した pI 6.8, 浮上密度 1.29 の empty 粒子 E.C._{1.29} を形成する^{40,41)}。プロカプシドと E.C._{1.29} はともに、キモトリプシン・トリプシンに抵抗性を示すがアルカリ処理には不安定である。

¹²⁵I の化学修飾では VP1 が主としてヨウ素化される。14S 粒子の濃度が十分高い条件下では、14S 粒子は自己集合し pI 5.0, 浮上密度 1.29 の empty 粒子 E.C._{1.29} を形成するが、この粒子はプロカプシド、E.C._{1.29} と異なり、アルカリ処理には安定であるがキモトリプシン、トリプシンに感受性を示し、VP0 および VP1 がその作用を受ける。¹²⁵I の化学修飾では VP0 がヨウ素化される。このように、E.C._{1.29} および E.C._{1.29} はともに単位構造体である 14S 粒子が 12 個集合した empty 粒子であるにもかかわらずそのコンホメーションはかなり異なっている。そこで、14S 粒子からプロカプシドが形成される際には、ウイルス RNA にコードされているか、ウイルス感染で誘導される、empty 粒子のコンホメーションに影響を与える morphopoietic factor の関与が考えられている⁴⁰⁾。

4. 構造蛋白の免疫原性

VP1~VP4 の各構造蛋白に対する抗血清はそれぞれ VP1~VP4 の各構造蛋白と特異的に結合する。それらの抗血清は、プロセスされる以前の蛋白とも結合し、polyprotein からの解裂経路を探る試薬としても利用できる^{42,43)}。さらに、抗VP1 および抗VP2 血清は H 抗原およびプロカプシドとの反応性も有する⁴⁴⁾。ところが、中和抗体を含め、ビリオンとの反応性を有する抗体は、VP1~VP4 のいずれを免疫しても得られていなかった⁴⁴⁾。こうして、ポリオウイルスではビリオンのもつコンホメーションが重要であり、構造蛋白にまで分解されると、ビリオン上に本来存在するエピトープの免疫原性は失われるか大幅に減弱されてしまうと考えられていた。ところが最近になり、ポリオウイルスの VP1, VP2 および VP3 が中和抗体を惹起することが明らかになっている。Blondel ら²⁰⁾ および Chow and Baltimore²¹⁾ が抗 VP1 血清に、そして Wieger ら⁴³⁾ が抗 VP3 血清に中和活性を見いだした。Emini ら⁴⁵⁾ は VP4 をウサギに免疫し、中和活性を有する抗血清を得たが、この抗血清は VP3 を免疫沈降するという奇妙な反応を呈した。この抗血清を VP3 で吸収すると中和活性は失われ、また VP3 をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーにこの抗血清を流して吸着後遊離した抗体が中和反応を示したことから、VP4 を免疫して得た抗体は、実は VP3 に存在する中和エピトープに対して生成されたのであり、このエピトープは変性した VP4 のある部位と

交差反応すると解釈されている(以後この抗体を抗VP 3/4 抗体と記す). Dernick ら⁴⁶⁾は, 3つの異なる方法つまり i) ウイルス粒子をギ酸で分解し, 高速液体クロマトグラフィー(各構造蛋白の疎水性の違いを利用)で ii) 尿素で分解し, 尿素-蔗糖濃度勾配の等電点電気泳動(等電点の違いを利用)であるいは iii) SDS で分解し, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(分子量の違いを利用)で VP1, VP2 および VP3 を分離し, 得られた VP1~VP3 をウサギに免疫して作成した抗血清の中和能を比較検討した. その結果, VP1 は i), ii) の方法, VP2 は i), iii) の方法そして VP3 は i), ii) の方法を採用して分離した場合, 3.2~32 倍と低値ながら中和活性を有する抗血清が得られた. そのうち i) の方法で得たウイルス蛋白を免疫原とした場合, もっとも効率よくしかも中和価の高い抗血清が作成された. このように, 各構造蛋白の分離の方法により, 各構造蛋白上の中和エピトープのコンホメーションが変わり, その部位を免疫動物の免疫系が認識したり, しなかったりするようである. さらに, 構造蛋白の免疫原性は, 免疫動物種や個体による違い, あるいは免疫方法(接種部位, 免疫回数, 接種量, アジュバントの使用)の違いによっても微妙に影響を受けている可能性がある.

5. ビリオンと empty 粒子との抗原性の関係

N 抗原性を有するビリオンにさまざまな物理化学的処理を施すと, RNA および VP4 の欠失した empty 粒子が形成されるが, この粒子は N 抗原性を失い代わりに H 抗原性を発現する. N 抗原と H 抗原は, ゲル内沈降反応⁴⁷⁾, 免疫電顕法⁴⁸⁾や補体結合反応⁴⁹⁾などにより明確に区別され, ビリオンと H 粒子の間には共通抗原は存在しないと考えられてきた. 実際, ビリオンあるいは H 粒子とのみ特異的に反応する, ポリクロナールおよびモノクロナールな抗体が多く得られている^{18, 50, 51)}. 一方, 抗ビリオン血清がビリオンと H 粒子双方に反応することも知られていたが, この反応は, ビリオンを免疫した場合, ビリオンが生体内で一部崩壊して生じた empty 粒子に対して産生された H 抗体が混入するためと解釈されていた. その後, 日沼ら⁵²⁾はアルカリ処理で得た H 粒子を, 著者ら⁵³⁾は熱処理して得た H 粒子を免疫原として作成した抗血清が N および H 抗原双方に反応し, しかも中和活性を有することを見だし, N および H 抗原の間に共通抗原が存在することを指摘した. われわれがインヒビター抵抗性変異株(後述)を用いて作成した抗体成分の解析の結果から, この共通抗原を認識する抗体は, 特定の特異性を有する抗体(HN31 抗体)であり, 粒子の頂点に結合することも判明している^{53, 54)}. 現在では, ビリ

オンあるいは H 粒子を免疫原として, N および H 抗原を共通に認識するモノクローン抗体が, 多数得られている^{18, 50, 51, 54)}. しかも N 特異的な抗体よりも N および H 抗原双方に結合する抗体がより高力価の中和能を呈するという意外な結果が見いだされている¹⁸⁾. われわれは, ビリオンと H 粒子双方に結合する 3 種のモノクローン抗体を作成したが, そのうちの 1 種(4C4 抗体)は中和能をもち, ビリオンおよび H 粒子の頂点に付着した⁵⁵⁾. 図 1 に示す通り, 4C4 IgG 分子はビリオンおよび H 粒子の 6 個の頂点に放射状に結合し, かつビリオンと H 粒子を架橋していた. また残り 2 種(6H8 と 2A12 抗体)は中和能はなくビリオンおよび H 粒子の表面全体にランダムに結合した. こうして, ビリオンと H 粒子には, 性状を異にする複数の共通抗原が存在することが明らかとなっている. Blondel ら¹⁶⁾は H 粒子を免疫原として, 同様に, ビリオンおよび H 粒子双方に結合する中和モノクローン抗体を作成したが, この抗体は, VP1 をも免疫沈降した. これらの結果は, VP1 をビリオンの頂点に配した粒子モデルを想定すると興味深い.

ビリオン前駆体の empty 粒子であるプロカプシドの抗原性については従来見解の一致がなく, プロカプシドは N 抗原性をもつ⁵⁶⁾, H 抗原性をもつ⁵⁷⁾あるいは N および H 抗原性の双方をもつ⁵⁸⁾と三様の考え方が提出されていた. この問題に対し, Rombaut ら⁵⁹⁾は N 抗原特異的なモノクローン抗体と H 抗原特異的なモノクローン抗体を使用して, これらの異なる結果は, プロカプシドを抽出する際の pH の違いにもとづくものであるとの明確なデータを示した. すなわち, プロカプシドは低 pH (pH6.0) で抽出すると N 抗原性を示し, 高 pH (pH8.0) で抽出すると H 抗原性を示すこと, さらに, pH6.0 で抽出し N 抗原性を示すプロカプシドをより pH の高い緩衝液と反応させると, pH の上昇とともに H 抗原性が発現することを明らかにした.

ビリオン, H 粒子とプロカプシドそれに 14S 粒子と 14S 粒子から in vitro で形成された 3 種の empty 粒子という同じ蛋白組成をもつ粒子間の抗原性の関連も, ビリオンに存在する互いに異なる 2 種のエピトープ(N1, N2)を特異的に認識する 2 種の中和モノクローン抗体と, H 粒子に存在するエピトープ(H)を特異的に認識する中和能をもたない 1 種のモノクローン抗体を用いて検討されている^{60, 61)}. 14S 粒子は, N1, H エピトープをもち, 14S 粒子が自己集合した E.C.₁¹/₂ は N1 エピトープを失い H エピトープのみをもつ. また, ポリオウイルス感染細胞抽出液存在下で集合した E.C.₁¹/₂ はプロカプシドと同じく N1, N2 エピトープをもち, 非感染細胞抽出液存在下で集合した E.C.₁¹/₂ は N1, H

図1 ビリオンとH粒子に共通に存在するエピトープを認識する中和モノクローン抗体の結合様式⁶⁵⁾
 4C4抗体とビリオン (a), H粒子 (b-e) およびビリオンとH粒子の混合物 (f) との反応では, 4C4抗体は各粒子の頂点に結合している. 一方6H8抗体とビリオン (g) およびH粒子 (h) との反応では, 6H8抗体は各粒子の表面全体にランダムに結合している. 倍率はb-eでは24万倍その他では12万倍.

表2 形態形成段階にみられる前駆体 (in vitro で形成される粒子も含めて) およびビリオンの性状

粒 子	蛋 白 組 成	RNA の有無	沈降定数	CsCl 中の密 度 (g/cm ³)	等 電 点	抗原性** (N1, N2 とHエпитープの存在)
13S 粒子	[NCVP1a] ₅	無	13S	—***	—	—
14S 粒子	[VP0, VP3, VP1] ₅	無	14S	—	—	N1, H
プロカプシド	[[VP0, VP3, VP1] ₅] ₁₂	無	75S	1.31	6.8	N1, N2
プロビリオン	[[VP0, VP3, VP1] ₅] ₁₂	有	150S	—	—	—
ビリオン	[[VP4, VP2, VP3, VP1] ₅] ₁₂	有	150S	1.34	7.0, 4.5	N1, N2
dense partscle	[[VP4, VP2, VP3, VP1] ₅] ₁₂	有	150S	1.44	—	—
14S 粒子から in vitro で形成される粒子*						
E. C. $\frac{5}{1.29}$	[[VP0, VP3, VP1] ₅] ₁₂	無	71S	1.29	5.0	H
E. C. $\frac{6}{1.29}$	[[VP0, VP3, VP1] ₅] ₁₂	無	75S	1.29	6.8	N1, N2
E. C. $\frac{6}{1.31}$	[[VP0, VP3, VP1] ₅] ₁₂	無	75S	1.31	6.8	N1, HあるいはN

* E. C. $\frac{5}{1.29}$ は, 14S 粒子が自己集合した粒子, E. C. $\frac{6}{1.29}$ と E. C. $\frac{6}{1.31}$ は, 14S 粒子がそれぞれポリオウイルス感染あるいは非感染細胞抽出液存在下で生成された粒子をさす。

** ビリオンに特異的で互いに異なるエピトープ (N1, N2) を認識する2種の中和モノクローン抗体およびH粒子に特異的に反応する1種のモノクローン抗体と, 各粒子との反応性を調べた結果をもとに, 各粒子に存在するエピトープを示す。

*** 未検討

エピトープをもつものとHエピトープのみもつものが共存している。このようにN1, N2およびHエピトープは, 粒子のコンホメーションの変化に伴って出現したり消失したりする。これらの結果を表2にまとめた。

6. ビリオンおよび empty 粒子と構造蛋白の抗原性の関係

Thorpe ら¹⁵⁾は, ポリクロナールな抗ビリオン抗体がVP1 および VP2 と強く反応し, VP3 と弱いながら反応することを Western blotting 法により確認した。一方, 現在までに多数得られているビリオンと反応するモノクローン抗体 (そのほとんどは中和抗体である) は分離した構造蛋白とは直接反応することは稀で, 前項で述べた, ビリオンおよびH粒子双方に結合する中和モノクローン抗体がVP1 を免疫沈降する例¹⁶⁾や, Osterhaus ら¹⁹⁾が2種の中和モノクローン抗体できわめて低い率ながらVP1 の有意な免疫沈降を見いだした例などはむしろ例外的である。分離した構造蛋白のコンホメーションが, 粒子上に配置されている場合とはかなり異なってしまうのがその原因といえる。しかし, いろいろな方法で, 他の抗ビリオン抗体の多くがVP1 と反応することが示されている。Emini ら⁶²⁾は, toluene-2, 4-diisocyanate を用いて, 中和モノクローン抗体の Fab フラグメントとビリオン上の結合部位の間をcross-linkさせ, この抗体がVP1 と反応していることを推定した。その後 Minor ら⁶³⁾は, 中和モノクローン抗体存在下で

得た抵抗性の変異株の, VP1 をコードするRNA部位に塩基の変化が検出されることから, かなりの数の中和モノクローン抗体はVP1 に対して生成されたものであると結論づけている。さらに, Emini ら⁶⁴⁾は, VP1 の一部のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドが中和モノクローン抗体と反応することを固相酵素抗体法で証明した。このように, VP1 がもっともimmunodominantな構造蛋白であるらしい。この結果は, 4の項で述べた, VP1 が中和抗体を惹起しやすいという結果とも矛盾しない。

抗H粒子抗体と構造蛋白の反応性については, ポリクロナールな抗H粒子抗体がVP1 に強く, そしてVP2 にはきわめて弱く結合することが報告されている¹⁵⁾。また得られている抗H粒子モノクローン抗体のほとんどはVP1, VP2 およびVP3 のいずれかと反応するが, やはりVP1 と反応する抗体が得られる頻度は高い¹⁶⁾。

7. 中和エピトープの数

ここで用いる中和エピトープと抗原部位という語句については, エピトープとは, 個々の抗体が認識し結合する個々のアミノ酸配列 (隣接するしないにかかわらず) のコンホメーションをさし, 一方抗原部位とは, 個々のエピトープあるいは複数のエピトープ群の, トポロジカルに部分的にでも重複しない領域をさし, 一般に競合結合試験や抵抗性変異株を用いた解析で規定されるものと定義することにする^{55, 66)}。こうした定義にもとづいて,

表3 Mahoney 株抗血清より分画した6種の抗体成分とインヒビター抵抗性変異株との交差中和試験

親株とインヒビター抵抗性変異株	各 抗 体 成 分 の 中 和 価					
	HN31 抗体**	HN11 抗 体	H33 抗 体	HS77 抗 体	H520 抗 体	B1826 抗 体
Mahoney	128***	64	128	64	16	128
M-HN31*	<4	64	128	64	16	128
M-HN11	64	<4	128	64	16	128
M-H33	128	32	<4	16	8	256
M-HS77	128	64	128	<4	16	256
M-H520	128	64	128	32	<4	128
M-B1826	128	64	256	64	16	<4

* Mahoney 株をHN31インヒビター存在下で増殖後得た。当該インヒビターに中和されないHN31インヒビター抵抗性変異株をさす。他の変異株についても同様。

** Mahoney 株抗血清をM-HN31で吸収し、残存した抗体を蔗糖密度勾配遠心で分画後得た抗体成分をさす。

*** 50%ブランク減少法による中和価。

いくつかの異なる手段で推定されているポリオウイルス粒子上の中和エピトープおよび抗原部位の数についてまとめる。

a) 動物血清インヒビター抵抗性変異株を用いた解析から正常動物血清のあるものはポリオウイルス抗原の一部と反応し、しかも中和能を有していることが知られており、この活性物質(以下インヒビターと記す)の大部分は免疫グロブリンと考えられている⁶⁷⁾。著者ら^{68,69)}は、インヒビターを含む動物血清(ウマおよびウシ)の存在下でポリオウイルス type 1 Mahoney 株を増殖させ、用いたインヒビターによって中和されない株(インヒビター抵抗性株)を多数作成した。これら一連の変異株とその作成に用いたインヒビターとの交差中和試験の結果、特異性の異なる6種のインヒビター(HN11, HN31, H33, HS77, H520, および B1826)を選出した。次いで、これら6種のインヒビターの各々に、抵抗性の変異株(M-HN11, M-HN31, M-H33, M-HS77, M-H520, および M-B1826)で抗ポリオン血清を吸収することにより、互いに異なる特異性を有する6種の抗体(HN11, HN31, H33, HS77, H520 および B1826 抗体)を分画し、同じく交差中和試験を行なった結果、ポリオウイルスにはこれらの抗体のそれぞれに対応する少なくとも6種の中和エピトープが存在する(表3)こと、および6種の抗体のうち3種の抗体(H33, HS77 および H520 抗体)が互いに部分的に交差することから、4種の抗原部位が存在することを示した⁶⁸⁻⁷⁰⁾。この方法は、パイブリドーマの技術が開発されるまでは、ポリオウイルス抗原を構成する中和エピトープおよび抗原部位を互いに区別する唯一の有力な方法であった。現在、こうして調

製された6種の抗体と、中和モノクローン抗体との対応関係を検討中であるが、すでに述べた4C4モノクローン抗体が、HN31抗体と同様M-HN31株と反応せず、しかもH粒子の頂点に結合することから、少なくとも4C4モノクローン抗体とHN31抗体との対応が明らかとなっている^{54,55)}。

b) 中和モノクローン抵抗性変異株を用いた解析から Emini ら⁷¹⁾は、上記インヒビターのかわりに中和モノクローン抗体および抗VP3/4抗体を用いて、これら抗体の存在下で抵抗性変異株(type 3由来)を作成し、これら変異株と抗体との反応性から7種そしてVP2に存在する1種を加え計8種の中和エピトープの存在を示した。彼らはこれらのエピトープそれぞれがすべて抗原部位であると考えている。Minor ら⁵⁹⁾も同様に6種の中和モノクローン抗体(これらはVP1上のエピトープを認識する)に対する抵抗性変異株(type 3由来)を作成し、16種の抗体との反応パターンの結果および各抗体の吸着阻害能の有無、そして株特異性を総合的に判断して少なくとも13の中和エピトープが存在することを示したが(彼らは、その後さらに実験系を拡大し、16種の中和エピトープの存在を報告している⁷²⁾)、これらの中和エピトープは、すべて互いにコンホメーションに関連しあっており、ただ1つの抗原部位に収まると結論づけている。

c) 多数のウイルス株との反応性から

Humphrey ら⁷³⁾は、15株のtype 1ウイルス株と4種のモノクローン抗体との反応性を検討した結果、各モノクローン抗体が、i) すべてのウイルス株と反応する、ii) すべての野生株と一部のSabinワクチン由来株と

VP1のN末端からのアミノ酸の位置		90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101
塩基配列とアミノ酸配列		GUG Val	GAC Asp	AAU Asn	GAA Glu	CAA Gln	CCA Pro	ACC Thr	ACG Thr	CGG Arg	GCA Ala	CAG Gln	AAA Lys
変異株グループ*	1							AUC Ile					
	2							GCC Ala					
	3								AAC Asn				
	4									CAG Gln			
	5											CUG Leu	
	6											CCG Pro	
	7										ACA Thr		
	8								UCC Ser				
	9				GGA Gly								
	10												
	11										GUA Val		
	12											CGG Arg	
	13											CAC His	
	14						AAC Asn						
	15									UGG Trp			
	16							AUC Ile					

図2 中和モノクローン抗体に対し抵抗性を獲得した変異株にみられる塩基変異とそれに伴うアミノ酸変異⁷²⁾.

*ポリオウイルス type 3 株 (P3-Leon-USA-1937) を各種中和モノクローン抗体存在下で増殖させることにより得た多数の抵抗性変異株を, 11種の中和モノクローン抗体との反応パターンにより分類した16の変異株グループをさす. 変異株グループ10では, 図に示す領域には塩基の変異はみられない.

反応する, iii) すべてのワクチン株と野生株の一部と反応する, および iv) 免疫に用いた株とのみ反応するという4つのグループに分類されたことにより, ワクチン株, 野生株のそれぞれに少なくとも3つずつの中和エピトープの存在を示唆している, 同様の手法で, type 1, 2, 3 の野生株にそれぞれに少なくとも4つの中和エピトープ, ワクチン株にそれぞれ少なくとも2, 4, 5つの中和エピトープの存在も報告されている⁷⁴⁾.

d) 構造蛋白あるいは empty 粒子との反応性から. 構造蛋白との反応性の点では, 得られている中和モノクローン抗体は, VP1 を免疫沈降する抗体, 沈降はしないが VP1 と反応することが明らかな抗体, そしていずれの構造蛋白をも沈降せずその反応性が不明な抗体の3種に分けられる. empty 粒子との反応性では, 11種の中和モノクローン抗体がプロカプシド, 熱処理して得られたH粒子, そしてホルムアルデヒド処理して得られたH粒子との反応パターンの違いから, 4種に分類されている⁵¹⁾. これらの結果もまた, ポリオウイルスには中

和エピトープが少なくとも3~4種存在することを示している.

こうして, 現在のところポリオウイルス粒子上の中和エピトープおよび抗原部位の数について統一された見解を得るには到っていない. 今後, 異なる方法で検討されているこれら抗体の性状を相互に比較することにより, またより多くの抗体を用いて検討することにより, ポリオウイルス粒子上の中和エピトープおよび抗原部位の数が把握されてくるものと思われる.

8. 中和エピトープのアミノ酸配列レベルでの構造

上述の 7-b で得られた抵抗性変異株と親株 (type 3) の RNA をオリゴヌクレオチドマッピングにより比較検討した結果, ある特定のオリゴヌクレオチドが失われ代わりに新たなオリゴヌクレオチドが現われるという特徴的な変化が見いだされた⁶³⁾. この新たに生じたオリゴヌクレオチドの塩基配列を決定すると, これらの抵抗性変異株の RNA には, VP1 をコードする RNA 部分のは

じまりから 278~293 塩基 (VP1 の N 末端側から 93~98 番目のアミノ酸に相当する) に変異が集中していた。

この研究は、さらに多数の変異株を用いて拡大され、図 2 に示されるように、16 の変異株グループのうち 15 のグループで検出された塩基変化はいずれも点変異であり、しかも連続する 8 つのコドン (VP1 の 93~100 番目のアミノ酸に相当する) に限定されていた⁷²⁾。たとえばグループ 9 では 93 番目のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンへ、グループ 5, 6 では 100 番目のアミノ酸がグルタミンからそれぞれロイシン、プロリンへといった具合である。これら 8 個のアミノ酸のうち、93 番目と 98 番目のアミノ酸が、中和反応にもっとも影響を与えていることが、11 種のモノクローン抗体と 15 の変異株グループとの反応パターンから判明している。

異なる手法を用いて、type 1 の株でも中和エпитオプの構造が解析されている。van der Werf ら⁷⁵⁾は、VP1 をコードする RNA に対応する cDNA を、大腸菌プラスミドの β -ラクタマーゼ部位に挿入し、大腸菌で VP1- β -ラクタマーゼの融合蛋白 (49K) を合成させた。この蛋白は中和モノクローン抗体 (C 3 抗体; ビリオンと H 粒子双方に結合する) と反応した。続いて、VP1 をコードする塩基配列内からさまざまな長さの欠失した cDNA を作成し、同様に大腸菌内で生成されるそれぞれの cDNA に対応する融合蛋白と C 3 抗体との反応性を検討し、VP1 の N 末端側から 95~110 番目の位置に中和エピトープが存在することを推定した。

Emini ら⁶⁴⁾は、type 1 ウイルス株の VP1 のアミノ酸配列の中で、親水性の高い領域でしかも血清型間でアミノ酸変異の検出される頻度の高い領域を選びだし、これら領域に相当する 5 つのペプチド (VP1 の N 末端側より 11~17, 70~75, 70~80, 93~103 および 97~103 番目

のアミノ酸に対応する) を合成した。この合成ペプチドにキャリアー蛋白として牛血清アルブミンを結合しウサギに接種したところ、93~103 番目のアミノ酸に対応する合成ペプチドが中和抗体を産生した。残り 4 種の合成ペプチドについては、これらのペプチドを接種後、単独接種では免疫効果が現われない程度の少量のビリオンを接種すると中和抗体が生じたことから、これらのペプチドも免疫系に記憶させるプライミング効果を有していることが見いだされた。以上の結果から、VP1 の 11~17, 70~80 および 93~103 番目のアミノ酸領域に中和エピトープの存在することが理解される。同様に、VP2 (type 1) の 162~173 番目のアミノ酸領域に対応する合成ペプチドもプライミング効果を有していることから、この領域にもまた中和エピトープが存在するらしい⁷⁶⁾。しかし、上述の 5 種のペプチドが、抗ビリオン抗体と反応するのに対して、このペプチドは、反応しないことから VP2 の 162~173 番目のアミノ酸領域に存在する中和エピトープは immunorecessive であることが推測される。

9. 中和エピトープの免疫原性の強さ (Immunodominancy)

ウイルス粒子のように多様なエピトープをもつ複雑な抗原に対する免疫反応においては、すべてのエピトープに対して一斉に免疫応答が起こるのではなく、そのうちの若干のエピトープに対して起こるいわゆる immunodominancy⁷⁷⁾の存在することが知られている。著者らのインヒビター抵抗性変異株を用いて識別される 6 種の抗体の中でも HN31 抗体や H33 抗体は産生されやすく、これらの抗体に対応するエピトープは dominant であるといえる (表 4)。また VP1 の 93~103 番目に存在するエピトープが dominant であることは、その部位に対す

表 4 7 つの抗ポリオウイルス抗血清にみられる抗体成分の組成

ウサギ No.	接 種 ウイルス量	抗血清の 中 和 価	吸収操作 に使用し た血清量	100% 回収 されたと仮 定した場合 の中和価*	各抗体成分の Mahoney 株に対する中和価						
					HN31 抗 体	HN11 抗 体	H33 抗 体	H77 抗 体	H 抗 体	520 抗 体	B1826 抗 体
No. 1	6×10 ⁸ PFU	80,000**	0.03ml	4,800	832	88	896	56	8	<8	
No. 2	6×10 ⁸	80,000	0.03	4,800	384	<4	800	<4	<4	40	
No. 3	6×10 ⁸	40,000	0.03	2,400	192	24	136	<8	<8	20	
No. 4	6×10 ⁸	80,000	0.03	4,800	1586	416	1056	678	24	448	
No. 5	6×10 ⁸	40,000	0.03	2,400	512	<4	128	32	<4	48	
No. 6	2×10 ⁹	160,000	0.03	9,600	56	<4	800	88	12	96	
No. 7	2×10 ⁹	160,000	0.03	9,600	776	384	20	32	<4	20	

* 各抗血清 0.03ml を各インヒビター抵抗性変異株での吸収操作に使用したが、その際すべての抗体活性が回収されたと仮定した場合の中和価を示す。

** 中和価はすべて 50% プラーク減少法により測定

表5 免疫後の経過に伴うウサギ血清中の抗体成分組成の変化*

接種後 の日数	血清の 中和価	吸収操作 に使用し た血清量	100% 回収 されたと仮 定した場合 の中和価	各抗体成分の Mahoney 株に対する中和価					
				HN31 抗 体	HN11 抗 体	H33 抗 体	HS77 抗 体	H520 抗 体	B1826 抗 体
5	512	0.15ml	154	<4	<4	56	<4	<4	<4
15	4,096	0.1 ml	820	16	<8	448	<8	<8	<8
60	80,000	0.03ml	4,800	832	88	896	56	8	<8

* 表4におけるウサギ No.1 で調べられた結果を示す。

る中和モノクローン抗体が得られやすいことから理解できることは前述した通りである。Dominant なエピトープに対する宿主側の選択的な免疫応答は、ウイルス側にとってある意味では好都合なことであり、このエピトープの構造を変えることで容易に抵抗性を獲得して宿主側の免疫学的監視を逃れることができる。一方、通常は認識されない immunorecessive な中和エピトープ（たとえば VP2 の 162~173 番目のアミノ酸領域）がもしウイルスの感染性の発現にとってきわめて重要でかつ変異しにくいとすれば、このエピトープに対する免疫応答はウイルス側にとって致命的となりうるのではなからうか？ ペプチドワクチンの候補を考えるうえで、こういった考え方が、Emini ら⁷⁰⁾により提出されている。

ウイルス免疫後の経過に伴う免疫反応において、概して株特異性を規定する“specific”なエピトープのうちのあるものが、抗体産生能のすぐれた dominant なエピトープであり免疫早期から検出され、“common”なエピトープの免疫原性は低く免疫後のより後期に検出される場合が多いようである。著者らの解析でも Mahoney 株と特異的に反応する HN31 および H33 抗体は免疫後早期から、免疫したすべてのウサギで産出され、広く他の 1 型ウイルス株と反応する HN11 抗体は免疫後比較の後期にしかも一部のウサギに検出された⁷⁸⁾（表5）（未発表データを含む）。

10. 血清型間にみられる構造蛋白および抗原性の異同

ポリオウイルスは、1949年にサルを用いた再感染防御試験にもとづいて3つの血清型に分類されており⁷⁹⁾、プロトタイプは type 1 が Brunhilde 株、type 2 が Lansing 株そして type 3 が Leon 株である⁸⁰⁾。現在までに分離されているウイルス株はすべていずれかの血清型に属している。抗 type 1 ビリオン血清が type 2 ビリオンを免疫沈降するなど、型間に共通抗原が存在することは知られているが、中和反応でみる限り、型間での交差反応は一般にはみられず、現在までに得られている中和

モノクローン抗体もすべて血清型特異的である。ところが、type 1 のウイルス株を接種すると type 2 の株に対し中和能を示し、交差防御試験が成立する例も知られている（type 2 と type 3 の間にもわずかながら交差中和反応がみられることもある⁸¹⁾。ごく最近のデータでも、type 1 である Mahoney 株の VP1 中で高い親水性を示すアミノ酸領域に対応する合成ペプチド（VP1 の N 末端側から 11~17 および 97~103 番目のアミノ酸）が、type 2, type 3 のウイルスに対する中和抗体の産生にもプライミング効果を現わすことが示されている⁸⁴⁾。

H 粒子および構造蛋白のレベルでは、型間での交差反応が強く現われる。ビリオン(type 1)を免疫原として得た抗血清のあるものは、すべての血清型の H 粒子と反応する⁸²⁾。抗 VP1 (type 1) 血清は、すべての血清型の H 粒子および VP1 と反応し、抗 VP2 (type 1) および抗 VP3 (type 1) 血清も type 1, 3 の H 粒子および VP2, VP3 とそれぞれ反応する。また、すべての血清型の VP1 と H 粒子あるいは VP3 と H 粒子とそれぞれ反応するモノクローン抗体が得られている⁸³⁾。

血清型間にみられる抗原性の異同に関連して、RNA の塩基配列レベルでの詳細な比較検討もなされている。血清型間のウイルス RNA を、cDNA を用いたハイブリダイゼーションで比較すると 70~80% の相同性がある⁸⁴⁾。また最近決定された全塩基配列の比較^{85~89)}でも、71%の塩基が同一であることが示されている。しかも型間で生じている塩基の違いは、トリプレットのうちの3番目の塩基にみられる場合が80%以上で、アミノ酸の変異につながる塩基変異は少なく、ポリオウイルスの3つの血清型が1つのプロトタイプから派生したことが示唆されている。一方、型間の RNA を、ヘテロデュプレックス RNA の電顕観察で比較検討すると、構造蛋白をコードする 5' 末端側半分で相同性が低い⁹⁰⁾。また、塩基配列から推定されるアミノ酸の比較でも、構造蛋白を含む P1-la 領域で、とりわけ VP1 に相当する部分でアミノ酸の違いが多く見いだされる（polyprotein 領域で 88%のアミノ酸が同一であるのに対し、P1-la 領域で、77

%,そして VP1 部分では69%が同一であった)。

ちなみに同じく type 1 である Mahoney 株と Sabin 株の塩基配列の比較では、56個の塩基の相違がみられるが、そのうちの21個がアミノ酸の変化を伴ない、その多くが構造蛋白とくに VP1 のN末端側に集中していた。VP1~VP4 の電気泳動上の移動度の比較でも、Mahoney 株からの弱毒化の過程で VP1 の移動度に大きな変化がみられ、約 100 代継代後では、VP1 と VP2 がほぼ同位置に移動するようになる^{91,92)}。

11. 中和反応メカニズム

ウイルスに抗体が結合したからといって、必ずしもウイルスの中和が成立するものではなく、中和反応は2相性であり、抗体の結合に続いて何らかのウイルスへの働きかけがあってはじめて中和が成立するらしい⁹³⁾。中和反応が抗体の avidity に依存すること、粒子上に中和反応にまったく関与しないエピトープが存在すること、ある株は中和するが別の株には結合はしても中和しない中和モノクローン抗体が得られていること、そして補体結合性の中和抗体が存在することなどは、ウイルス中和反応における2相性の考え方を支持する。では、抗体の結合に続いて、いったいいかなるウイルスへの働きかけが起きているのであろうか。

ポリオウイルスには、pI 7.0 のA粒子と pI 4.5 のB粒子が存在し、その比は pH の変化に伴い可逆的に変動する^{94,95)}。ところが中和抗体が結合すると、すべての粒子がB粒子となり非可逆的に固定され中和が成立する^{95,96)}。¹²⁵I での標識実験でも、抗体付着後に VP2 の標識効率が高まることから粒子の構造変化の起ることが確認されている。こうして、抗体の付着により粒子表面全体のコンホメーションが、そして荷電性質が変わることが理解される(しかし前述した抗VP3/4 抗体は粒子の pI を変えることなくウイルスを中和することから、この場合、異なる中和メカニズムが作用しているらしい⁷¹⁾)。こうした粒子の構造変化は、ウイルス感染のどの段階を阻害するのであろうか? 細胞吸着後のウイルス粒子への抗体の結合はウイルスを不活化し、また、抗体の付着した粒子でも細胞への吸着および侵入が可能なることから、吸着・侵入の過程での阻害ではないらしい^{96,97)}(1粒子あたりの結合抗体数が大きくなると吸着阻害が現われる場合がある。また、ある特定の中和エピトープに対する抗体が吸着を阻止する可能性は十分ある)。一般的には、中和反応は、細胞内での脱殻過程ないしはウイルスRNA、蛋白合成の初期段階での阻害によるらしいことが、ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体を用いた研究で確認されている^{96,98)}。

図3 ある中和モノクローン抗体の結合様式モデル⁹⁶⁾

2 価の抗体が、ウイルス粒子の 2 回対称軸を横切って 2 つの 5 量体に結合することを示す。

ポリオウイルスは Kinetic 中和試験で一次減衰曲線をとることから、1 個の抗体の結合で中和が成立するという、いわゆる“one-hit”理論が従来一般的に認められてきた⁹⁹⁾。Icenogle ら¹⁰⁰⁾は中和モノクローン抗体を用いて再検討し、彼らの実験結果も同じく、反応の初期段階に肩の現われない一次減衰曲線を示したが、抗体分子と粒子の比を変えて反応させ生残ウイルス数をプロットした multiplicity curve を作成すると、1 粒子あたり 4 個の抗体の結合が中和の成立に必要なことを見いだした(その後、他の研究者によっても 1 粒子あたり 2~4 個の抗体結合の必要性が確認されている^{96,101)})。この結果を説明するには i) 粒子上のエピトープのうち 1/4 がウイルス中和に critical なエピトープであるか、ii) 粒子に抗体が 1, 2, ……と結合すると、相対的な感染性が 3/4, 9/16, ……と減じていくとの 2 通りの考え方があるが、粒子表面上で同じ構造を有するエピトープでも、粒子内部においては RNA との相互作用もからんで、機能的には heterogeneous である可能性が大きいことから、i) の考え方が支持されるように思われる。ポリオウイルス粒子では、60 個のサブユニットが 30 の 2 回対称軸にそって配置しており、このモノクローン抗体がウイルス 1 粒子あたり最大 30 分子結合しうることから、図 3 のような抗体の結合モデルが提唱されている。しかしこのモデルはあくまで 1 種の中和モノクローン抗体の結合様式例であり、実際にはかなり多様な結合様式が存在することは、われわれの実験結果からも明らかであ

る⁶⁹⁾。すなわち6種のポリオウイルス抗血清からインヒビター抵抗性変異株での吸収操作で分画した6種の抗体のうち、3種(H33, HS77, および B1826 抗体)はゲル内沈降反応でウイルスと沈降線を形成するが他の3種(HN11, HN31 および H520 抗体)は形成しない。また HN31 抗体と同じ特異性を有する4C4 モノクローン抗体は、粒子の頂点に結合し、その結合数は少なくゲル内沈降反応でも沈降線を形成しない。一方、粒子表面にランダムにしかもきわめて多分子結合する4F2 モノクローン抗体(H粒子とは反応しない)は、明瞭な沈降線を作成する^{55,101)}。現在、これらの抗体による中和反応の解析を進めている。

ウイルス粒子に抗体が結合し、中和された状態にある粒子-抗体複合物(pI 値 3.5)をパパイン処理すると、ウイルス粒子は感染性を取り戻す(pI 値が 7.0 となる)ことから、中和には抗体がウイルスと bivalent に結合する必要があることが、ポリクロナールおよびモノクロナール抗体を用いて示されている^{102,103)}。粒子上の抗体分子を, monovalent (Fab) にすると、粒子のコンホメーションは元の状態に復帰してしまい感染性を取り戻すらしい。この際に例外があり、粒子に結合しても粒子の pI を変えずに中和する抗VP3/4 抗体は、パパイン処理を受けても中和は成立したままである⁴⁵⁾。

12. 抗原変異

ポリオウイルスの抗原性は比較的安定であると考えられて来たが、現在の知識によるとこれは互いに異なる中和エピトープが多数存在するため全体としての抗原性が安定性を示すためであり、個々の抗原部位の安定性を示すものではないと考えられる。事実、ポリオウイルスがヒトの腸管で継代されるとその抗原性の変化することがあり、とくに、無あるいは低ガンマグロブリン血症などの免疫不全の患者に投与されたワクチン株は、長期間にわたり腸管で増殖をくりかえすと、ワクチン株本来の抗原性を失い強毒株にみられる抗原性を発現する場合もある^{74,104,105)}。Crainic ら⁷⁴⁾が Mahoney 株および Sabin 株が共有するエピトープ、Sabin 株にのみ存在するエピトープそして野生株にのみ存在する4種のエピトープに対して特異的に反応する計6種の中和モノクローン抗体を用いて、腸管での増殖を経た Sabin 株の抗原性の変化を調べた結果を図4に示す。Sabin 株特有のエピトープの構造が変化し、抗体は結合できるが中和できなくなったり、Mahoney 株特有のはずのエピトープが腸管での増殖を経た Sabin 株に徐々に出現してきたりする。

In vitro の系でも、抗 Mahoney 株抗体に抵抗性になった変異株が、Sabin 株に特有の中和エピトープをも

Reference	VIRUS	EPI TOPE					
		K	S	V			
				W			
				a	b	c	d
Reference	LSc 2ab	★	★	○	○	○	●
	Mahoney	★	●	★	★	★	★
INFANT 1	day 4, A4	★	★	○	○	○	●
	day 10, A10	★	●	●	●	●	●
	day 28, A28	★	●	★	★	★	★
INFANT 3	day 2, C2	★	★	○	○	○	●
	day 8, C8	★	●	●	●	●	●
	day 21, C21	★	●	●	★	★	●

図4 ヒト腸管での増殖に伴う中和エピトープの構造および機能の継時的変化⁷⁴⁾。

K, S, W はそれぞれ K: Mahoney 株と Sabin 株 (LSc 2ab) など type 1 ウイルス株に共通に存在するエピトープ, S: Sabin 株に特異的に存在するエピトープ, W: Mahoney 株など野生株に特異的に存在する4種のエピトープ (a, b, c, d) をさす。これらの各エピトープを認識する中和モノクローン抗体が、各ウイルス株を免疫沈降する (●) かしない (○) か、そして中和する (☆) かしないかを判定した結果を示す。

つようになるという現象がみられている¹⁰⁶⁾。また Hashimoto¹⁰⁷⁾も特定のインヒビターに抵抗性になった変異株に、親株には存在しなかった新たな中和エピトープが出現することを報告している。こうした抗原変異の解析は診断上、および疫学上きわめて重要な問題であるが、現在までに type 1, 2 および 3 それぞれにおいてワクチン株と強毒株の間の抗原性の違いを鑑別できるモノクローン抗体が多数調製され、その有用性が確認されている^{108~110)}。

ある特定の中和エピトープに対する抗体の存在下でウイルスの増殖を行うと、約 10^4 個の粒子あたり1個の割合で存在するその抗体に対し抵抗性の変異株が選択され増殖して来る。こうして得られた変異株が同様の操作によって次々と異なる抗体に対する重複抵抗性を獲得するに伴い、図5のごとくその抗原性が次第に変化していくことが、in vitro の系で確かめられている¹¹¹⁾。このような機序が、自然界におけるポリオウイルスの抗原変異株の出現に果す考え得る可能性については、本誌において既に論じたことがある¹¹²⁾。またポリオウイルスに

図5 各種抗体成分抵抗性 Mahoney 株および野外分離株（湯殿株，湯谷株）の Mahoney 株抗血清による不活化（Kinetic 中和試験）。Mahoney 株が，HN31抗体，H33抗体，H520抗体，HS77抗体，HN11抗体，そしてB1826抗体に対し次々と抵抗性となった変異株の抗原性が，徐々に原株から変化し野外分離株の抗原性に近づく傾向が認められる。

においてはリコンビネーションの頻度は高く（ $1:10^4$ ）^{113, 114}，in vivo でもワクチン投与者から，type 1 Sabin 株と type 2 Sabin 株間のリコンビナントが分離されており¹¹⁵，リコンビネーションもまた抗原変異の生ずる一つの機序といえるかも知れない。

おわりに

ポリオウイルスのさまざまな抗原蛋白それぞれに，多数のエピトープが存在する。それぞれのエピトープを認識する monospecific なあるいはモノクローナルな抗体は，これらのエピトープ間の相互関係をそして個々のエピトープの構造・機能を知る上で大きな役割を演じてきた。しかも，ウイルス RNA の塩基配列の決定は，いくつかのエピトープのアミノ酸レベルでの構造を明らかにしている。今後，こうした個々のエピトープに関する情報は，さらに蓄積するであろう。一方，生体は，多数のエピトープに対し免疫応答しており，感染防御もまた多数のエピトープに対して生じた heterogeneous な抗体

の作用で成立する。ポリオウイルスの抗原性を把握する上で，polyclonal な heterogeneous な抗体混合物の機能に関する情報の蓄積もまた，不可欠なことは論をまたない。

なお，細胞性免疫については，ポリオウイルス感染においてその関与はないとの一般的見解があるので，ここでは取り上げなかった。

- 1) Maizel, J. V. (1963): Evidence for multiple components in the structural protein of type 1 poliovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**: 483-489.
- 2) Scarff, M. D., Maizel, J. V. and Levintow, L. (1964): Physical and immunological properties of a soluble precursor of the poliovirus capsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**: 329-337.
- 3) Yamaguchi-Koll, Wieggers, K. J. and Dernick, R. (1977): Dissociation and reassociation of

- poliovirus. II. Protein components obtained by urea treatment of the virus particles. *Zeitschr. für Naturforsch.*, **32c**: 632-636.
- 4) Wouters, M. and Vandekerckhove, J. (1976): Amino acid composition of the poliovirus capsid polypeptides isolated as fluorescamine conjugates. *J. Gen. Virol.*, **33**: 529-533.
 - 5) Hamann, A., Reichel, C., Wiegers, K. J. and Dernick, R. (1978): Isoelectric points of polypeptides of standard poliovirus particles of different serological types and of empty capsids and dense particles of poliovirus type 1. *J. Gen. Virol.*, **38**: 567-570.
 - 6) Jacobson, M. F., Asso, J. and Baltimore, D. (1970): Further evidence on the formation of poliovirus proteins. *J. Mol. Biol.*, **49**: 657-669.
 - 7) 野本明男 (1978): ポリオウイルスゲノム RNA に結合した蛋白 (VPg) のウイルス複製における役割. 蛋白質・核酸・酵素, **23**: 20-32.
 - 8) Putnak, J. R. and Phillips, B. A. (1981): Picornaviral structure and assembly. *Microbiol. Rev.*, **45**: 287-315.
 - 9) Dernick, R. (1981): Antigenic structure of poliovirus. *Dev. Biol. Standard.*, **47**: 319-333.
 - 10) Rueckert, R. R. (1976): On the structure and morphogenesis of picornaviruses. In *Comprehensive Virology* (ed. Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.) pp. 131-213. Plenum Press, New York and London.
 - 11) Breindl, M. (1971): VP4, the D-reactive part of poliovirus. *Virology*, **46**: 962-964.
 - 12) Philipson, L., Beatrice, S. T. and Crowell, R. L. (1973): A structural model for picornaviruses as suggested from an analysis of urea-degraded virions and procapsids of coxsackievirus B3. *Virology*, **54**: 69-79.
 - 13) Longberg-Holm, K. and Butterworth, B. E. (1976): Investigation of the structure of polio- and human-rhinovirions through the use of selective chemical reactivity. *Virology*, **71**: 201-216.
 - 14) Beneke, T. W., Habermehl, K. -O., Diefenthal, W. and Buchholz, M. (1977): Iodination of poliovirus capsid proteins. *J. Gen. Virol.*, **34**: 387-390.
 - 15) Thorpe, R., Minor, P. D., Mackay, A., Schild, G. C. and Spitz, M. (1982): Immunochemical studies of polioviruses: Identification of immunoreactive virus capsid polypeptides. *J. Gen. Virol.*, **63**: 487-492.
 - 16) Blondel, B., Akacem, O., Crainic, R., Couillin, P. and Horodniceanu, F. (1983): Detection by monoclonal antibodies of an antigenic determinant critical for poliovirus neutralization present in VP1 and on heat-inactivated virions. *Virology*, **126**: 707-710.
 - 17) Emini, E. A., Jameson, B. A., Lewis, A. J., Larsen, G. R. and Wimmer, E. (1982): Poliovirus neutralization epitopes: Analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.*, **43**: 997-1005.
 - 18) Ferguson, M., Minor, P. D., Magrath, D. I., Yi-Hua, Q., Spitz, M. and Schild, G. C. (1984): Neutralization epitopes on poliovirus type 3 particles: An analysis using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **65**: 197-201.
 - 19) Osterhaus, A. D. M. E., van Wezel, A. L., van Steenis, G., Hazendonk, A. G. and Drost, G. (1982): Production and potential use of monoclonal antibodies against polio viruses. *Develop. Biol. Standard.*, **50**: 221-228.
 - 20) Blondel, B., Crainic, R. and Horodniceanu, F. (1982): The structural polypeptide VP1 of poliovirus type 1 elicits neutralizing antibodies. *C. R. Acad. Sci (Paris)*, **294**: 91-94.
 - 21) Chow, M. and Baltimore, D. (1982): Isolated poliovirus capsid protein VP1 induces a neutralizing response in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7518-7521.
 - 22) Baxt, B., Morgan, D. O., Robertson, B. H. Timpone, C. A. (1984): Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *J. Virol.*, **51**: 298-305.
 - 23) Robertson, B. H., Moore, D. M., Grubmann, M. J. and Kleid, D. G. (1983): Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, **46**: 311-316.
 - 24) Wetz, K. and Habermehl, K. O. (1979): Topographical studies on poliovirus capsid proteins by chemical modification and cross-linking with bifunctional reagents. *J. Gen. Virol.*, **44**: 525-534.
 - 25) Katagiri, S., Aikawa, S. and Hinuma, Y. (1971): Stepwise degradation of poliovirus capsid at alkaline treatment. *J. Gen. Virol.*, **13**: 101-109.
 - 26) Dunker, A. K. (1979): The structure of picornaviruses: classification of the bonding networks. *Virology*, **97**: 141-150.
 - 27) Wetz, K. and Habermehl, K. O. (1982): Specific cross-linking of capsid proteins to virus RNA by ultraviolet irradiation of poliovirus. *J. Gen. Virol.*, **59**: 397-401.
 - 28) Hogle, J. M. (1982): Preliminary studies of crystals of poliovirus type 1. *J. Mol. Biol.*, **160**: 663-668.
 - 29) Erickson, J. W., Frankenberger, E. A., Rossmann, M. G., Fout, G. S., Medappa, K. C. and Rueckert, R. R. (1983): Crystallization of a common cold virus, human rhinovirus 14: "isomorphism" with poliovirus crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 931-934.
 - 30) Boege, U., Scraba, D. G., Hayakawa, K., Ja-

- mes, M. N. G. and Erickson, J. W. (1984): Structure of the mengo virion. VII. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis. *Virology*, **138**: 162-167.
- 31) Holland, J. J. and Kiehn, E. D. (1968): Specific cleavage of viral proteins as steps in the synthesis and maturation of enteroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**: 1015-1022.
 - 32) Jacobson, M. F. and Baltimore, D. (1968): Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**: 77-84.
 - 33) Summers, D. F. and Maizel, J. V. (1968): Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**: 966-971.
 - 34) Larsen, G. R., Anderson, C. W., Dorner, A. J., Semler, B. L. and Wimmer, E. (1982): Cleavage sites within the poliovirus capsid protein precursors. *J. Virol.*, **41**: 340-344.
 - 35) Semler, B. L., Anderson, C. W., Kitamura, N., Rothberg, P. G., Wishart, W. L. and Wimmer, E. (1981): Poliovirus replication proteins: RNA sequence encoding P3-1b and the sites of proteolytic processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3464-3468.
 - 36) Semler, B. L., Hanecak, R., Anderson, C. W. and Wimmer, E. (1981): Cleavage sites in the polypeptide precursors of poliovirus protein P2-X. *Virology*, **114**: 589-594.
 - 37) Holland, J. J., Doyle, M., Perrault, J., Kingsbury, D. T. and Etchison, J. (1972): Proteinase activity in purified animal viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 634-639.
 - 38) Yamaguchi-Koll, U., Wieggers, K. J. and Drzeniek, R. (1975): Isolation and characterization of 'dense particles' from poliovirus-infected HeLa cells. *J. Gen. Virol.*, **26**: 307-319.
 - 39) Wieggers, K. J., Yamaguchi-Koll, U. and Drzeniek, R. (1977): Differences in the physical properties of dense and standard poliovirus particles. *J. Gen. Virol.*, **34**: 465-473.
 - 40) Putnak, J. R. and Phillips, B. A. (1981): Differences between poliovirus empty capsids formed in vivo and those formed in vitro: a role for the morphopoietic factor. *J. Virol.*, **40**: 173-183.
 - 41) Putnak, J. R. and Phillips, B. A. (1982): Poliovirus empty capsid morphogenesis: evidence for conformational differences between self- and extract-assembled capsids. *J. Virol.*, **41**: 792-800.
 - 42) Vrijnsen, R., Brioen, P. and Boeye, A. (1980): Identification of poliovirus precursor proteins by immunoprecipitation. *Virology*, **107**: 567-569.
 - 43) Wieggers, K. J. and Dernick, R. (1983): Monospecific antisera against capsid polypeptides of poliovirus type 1 distinguish antigenic structures of poliovirus proteins. *J. Gen. Virol.*, **64**: 777-785.
 - 44) Meloen, R. H., Rowlands, D. J. and Brown, F. (1979): Comparison of the antibodies elicited by the individual structural polypeptides of foot-and-mouth disease and polioviruses. *J. Gen. Virol.*, **45**: 761-763.
 - 45) Emini, E. A., Dorner, A. J., Dorner, L. F., Jameson, B. A. and Wimmer, E. (1983): Identification of a poliovirus neutralization epitope through use of neutralizing antiserum raised against a purified viral structural protein. *Virology*, **124**: 144-151.
 - 46) Dernick, R., Heukeshoven, J. and Hilbrig, M. (1983): Induction of neutralizing antibodies by all three structural poliovirus polypeptides. *Virology*, **130**: 243-246.
 - 47) LeBouvier, G. L. (1959): Poliovirus D and C antigens: their differentiation and measurement by precipitation in agar. *Brit. J. Exp. Path.*, **40**: 452-463.
 - 48) Hummeler, K., Anderson, T. F. and Brown, R. A. (1962): Identification of poliovirus particles of different antigenicity by specific agglutination as seen in the electron microscope. *Virology*, **16**: 84-90.
 - 49) Hummeler, K. and Tumilowicz, J. J. (1960): Studies on the complement-fixing antigens of poliomyelitis. II. Preparation of type-specific anti-N and anti-H indicator sera. *J. Immunol.*, **84**: 630-634.
 - 50) Brioen, P., Sijens, R. J., Vrijnsen, R., Rombaut, B., Thomas, A. A. M., Jackers, A. and Boeye, A. (1982): Hybridoma antibodies to poliovirus N and H antigen. *Arch. Virol.*, **74**: 325-330.
 - 51) Uhlig, H., Rutter, G. and Dernick, R. (1983): Evidence for several unrelated neutralization epitopes of poliovirus, type 1, strain Mahoney, provided by neutralization tests and quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.*, **64**: 2809-2812.
 - 52) Hinuma Y., Katagiri, S. and Aikawa, S. (1971): Immune responses to H particles of poliovirus. *Virology*, **40**: 773-776.
 - 53) Urasawa, T., Urasawa, S. and Taniguchi, K. (1979): Reactivity of neutralizing antibodies with different specificities to H particles of poliovirus. *Microbiol. Immunol.*, **23**: 651-657.
 - 54) Taniguchi, K., Urasawa, S. and Urasawa, T. (1983): Electron microscopic examination of the reactivity of three kinds of neutralizing antibodies with H particles of poliovirus. *Microbiol. Immunol.*, **27**: 645-648.
 - 55) Taniguchi, K., Urasawa, S. and Urasawa, T. (1983): Monoclonal antibodies reactive with different sites of N and H antigenic particles of poliovirus. *J. Gen. Virol.*, **64**: 2803-2808.

- 56) Icenogle, J., Gilbert, S. F., Grieves, J., Andereg, J. and Rueckert, R. (1981): A neutralizing monoclonal antibody against poliovirus and its reaction with related antigens. *Virology*, **115**: 211-215.
- 57) Roizman, B., Mayer, M. M. and Roane, P. R. (1959): Immunochemical studies of poliovirus. IV. Alteration of immunologic specificity of purified poliomyelitis virus by heat and ultraviolet. *J. Immunol.*, **82**: 19-25.
- 58) Ferguson, M., Schild, G. C., Minor, P. D., Yates, P. J. and Spitz, M. (1981): A hybridoma cell line secreting antibody to poliovirus type 3 D-antigen: detection in virus harvest of two D-antigen populations. *J. Gen. Virol.*, **54**: 437-442.
- 59) Rombaut, B., Vrijssen, R., Brioen, P. and Boeye, A. (1982): Ap H-dependent antigenic conversion of empty capsids of poliovirus studied with the aid of monoclonal antibodies to N and H antigen. *Virology*, **122**: 215-218.
- 60) Rombaut, B., Vrijssen, R. and Boeye, A. (1983): Epitope evolution in poliovirus maturation. *Arch. Virol.*, **76**: 289-298.
- 61) Rombaut, B., Vrijssen, R. and Boeye, A. (1984): In vitro assembly of poliovirus empty capsids: antigenic consequences and immunological assay of the morphopoietic factor. *Virology*, **135**: 546-550.
- 62) Emini, E. A., Jameson, B. A., Lewis, A. J., Larsen, G. R. and Wimmer, E. (1982): Poliovirus neutralization epitopes: analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.*, **43**: 997-1005.
- 63) Minor, P. D., Schild, G. C., Bootman, J., Evans, D. M. A., Ferguson, M., Reeves, P., Spitz, M., Stanway, G., Cann, A. J., Hauptmann, R., Clarke, L. D., Mountford, R. C. and Almond, J. W. (1983): Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization. *Nature*, **301**: 674-679.
- 64) Emini, E. A., Jameson, B. A. Wimmer, E. (1983): Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature*, **304**: 699-703.
- 65) Yewdell, J. W. and Gerhard, W. (1981): Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**: 185-206.
- 66) Wimmer, E., Jameson, B. A. and Emini, E. A. (1984): Poliovirus antigenic sites and vaccines. *Nature*, **308**: 19.
- 67) Urasawa, S., Urasawa, T. and Kanamitsu, M. (1971): Radioimmuno-electrophoretic identification of poliovirus inhibitors and their characteristic mode of action. *Arch. ges. Virusforsch.*, **33**: 113-125.
- 68) Urasawa, S., Urasawa, T. Kanamitsu, M. (1974): Analysis of specificity of antibodies contained in antiserum against poliovirus with mutants resistant to inhibitors in equine serum. *J. Immunol.*, **113**: 537-542.
- 69) Urasawa, S., Urasawa, T., Ishizawa, F. Taniguchi, K.: Nature of naturally occurring poliovirus-reactive immunoglobulins (PRIGs) in animal serum and analysis of antibody composition of poliovirus immune serum by the use of PRIG-resistant mutants. (投稿中)
- 70) Urasawa, S., Urasawa, T. and Kanamitsu, M. (1976): Further studies of specificity of antibodies contained in antiserum against poliovirus. *Jap. J. Microbiol.*, **20**: 11-16.
- 71) Emini, E. A., Kao, S. Y., Lewis, A. J., Crainic, R. and Wimmer, E. (1983): Functional basis of poliovirus neutralization determined with monospecific neutralizing antibodies. *J. Virol.*, **46**: 466-474.
- 72) Evans, D. M. A., Minor, P. D., Schild, G. S. and, Almond J. W. (1983): Critical role of an eight amino acid sequence of VP1 in neutralization of poliovirus type 3. *Nature*, **304**: 459-462.
- 73) Humphrey, D. D., Kew, O. M. and Feorino, P. M. (1982): Monoclonal antibodies of four different specificities for neutralization of type 1 polioviruses. *Infect. Immun.*, **36**: 841-843.
- 74) Crainic, R., Couillin, P., Blondel, B., Cabau, N., Boue, A. and Horodniceanu, F. (1983): Natural variation of poliovirus neutralization epitopes. *Infect. Immun.*, **41**: 1217-1225.
- 75) van der Werf, S., Wychowski, C., Bruneau, P., Blondel, B., Crainic, R., Horodniceanu, F. and Girard, M. (1983): Localization of a poliovirus type 1 neutralization epitope in viral capsid polypeptide VP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 5080-5084.
- 76) Emini, E. A., Jameson, B. A. and Wimmer, E. (1984): Identification of a new neutralization antigenic site on poliovirus coat protein VP2. *J. Virol.*, **52**: 719-721.
- 77) Sela, M. (1969): Antigenicity: Some molecular aspects. Synthetic antigens help our understanding of immunological phenomena on a molecular level., *Science*, **166**: 1365-1376.
- 78) 石沢文彦(1978): ポリオウイルス抗血清の特異性の解析と抗血清存在下の継代によるウイルス抗原変異の誘起 第II編 抗血清存在下の継代によるウイルス抗原・・・の誘起, *札幌医誌*, **47**: 269-278.
- 79) Bodian, D., Morgan, I. M. and Howe, H. A. (1949): Differentiation of types of poliomyelitis virus. III. The grouping of fourteen strains into three basic immunologic types. *Am. J. Hyg.*, **49**: 234-245.
- 80) Committee on typing of the national foundation of infantile paralysis. (1951): Immunologic classification of poliomyelitis viruses. I. A

- co-operative program for the typing of one hundred strains. *Am. J. Hyg.*, **54**: 191-204.
- 81) Ogra, P. L. and Karzon, D. T. (1971): Formation and function of poliovirus antibody in different tissues. *Progr. Med. Virol.*, **13**: 156-193.
 - 82) Vrijzen, R., Rombaut, B. and Boeye, A. (1984): Intertypic cross-reactions of nonneutralizing, monoclonal poliovirus antibodies. *J. Virol.*, **49**: 1002-1004.
 - 83) Blondel, B., Crainic, R., Akacem, O., Bruneau, P., Girard, M. and Horodniceanu, F. (1982): Evidence for common, intertypic antigenic determinants on poliovirus capsid polypeptides. *Virology*, **123**: 461-463.
 - 84) Tracy, S. and Smith, R. A. (1981): A comparison of the genomes of polioviruses by cDNA: RNA hybridization. *J. Gen. Virol.*, **55**: 193-199.
 - 85) Adler, C. J., Dorner, A. J., Emini, E. A., Hanecak, R., Lee, J. J., van der Werf, S., Anderson, C. W. and Wimmer, E. (1981): Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, **291**: 547-553.
 - 86) Racaniello, V. R. and Baltimore, D. (1981): Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 4887-4891.
 - 87) Nomoto, A., Omata, T., Toyoda, H., Kuge, S., Horie, H., Kataoka, Y., Genba, Y., Nakano, Y. and Imura, N. (1982): Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 5793-5797.
 - 88) Stanway, G., Cann, A. J., Hauptmann, R., Hughes, P., Clarke, D. C., Mountford, R. C., Minor, P. D., Schild, G. C. and Almond, J. W. (1983): The nucleotide sequence of poliovirus type 3 Leon 12 a₁b: comparison with poliovirus type 1. *Nucleic Acids Res.*, **11**: 5629-5643.
 - 89) Toyoda, H., Kohara, M., Kataoka, Y., Suganuma, T., Omata, T., Imura, N. and Nomoto, A. (1984): Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants. *J. Mol. Biol.*, **174**: 561-585.
 - 90) Cumakov, I., Lipskaya, G. and Agol, V. (1979): Comparative studies on the genomes of some picornaviruses: denaturation mapping of the replicative form RNA and electron microscopy of heteroduplex RNA. *Virology*, **92**: 259-270.
 - 91) Milstien, J. B., Walker, J. R. and Eron, L. J. (1977): Correlation of virus polypeptide structure with attenuation of poliovirus type 1. *J. Virol.*, **23**: 811-815.
 - 92) Kew, O. M., Pallansch, M. A., Omilianowski, D. R. and Rueckert, R. R. (1980): Changes in three of the four coat proteins of oral polio vaccine strain derived from type 1 poliovirus. *J. Virol.*, **33**: 256-263.
 - 93) 吉野亀三郎 (1974): ウィルス中和抗体とその作用機構. 蛋白質・核酸・酵素: 特集「免疫の分子論」, 220-228.
 - 94) Mandel, B. (1971): Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis. *Virology*, **44**: 554-568.
 - 95) Mandel, B. (1976): Neutralization of poliovirus: A hypothesis to explain the mechanism and the one-hit character of the neutralization reaction. *Virology*, **69**: 550-510.
 - 96) Emini, E. A., Kao, S. Y., Lewis, A. J., Crainic, R. and Wimmer, E. (1983): Functional basis of poliovirus neutralization determined with monospecific neutralizing antibodies. *J. Virol.*, **46**: 466-474.
 - 97) Mandel, B. (1967): The interaction of neutralized poliovirus with HeLa cells. I. Adsorption. *Virology*, **31**: 238-247.
 - 98) Mandel, B. (1967): The interaction of neutralized poliovirus with HeLa cells. II. Elution, penetration, uncoating. *Virology*, **31**: 248-259.
 - 99) Dulbecco, R., Vogt, M. and Strickland, A. G. R. (1956): A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, Western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Virology*, **2**: 162-205.
 - 100) Icenogle, J., Shiwen, H., Duke, G., Gilbert, S., Rueckert, R. and Andereg, J. (1983): Neutralization of poliovirus by a monoclonal antibody: kinetics and stoichiometry. *Virology*, **127**: 412-425.
 - 101) Taniguchi, K., Urasawa, S. Urasawa, T. (1984) Neutralizing monoclonal antibodies which recognize different sites of poliovirus. Abstracts of Sixth International Congress of Virology, P22-18.
 - 102) Keller, R. (1968): Studies on the mechanism of the enzymatic reactivation of antibody-neutralized poliovirus. *J. Immunol.*, **100**: 1071-1079.
 - 103) Emini, E. A., Ostapchuk, P. and Wimmer, E. (1983): Bivalent attachment of antibody and poliovirus leads to conformational alteration and neutralization. *J. Virol.*, **48**: 547-550.
 - 104) Hara, M., Saito, Y., Komatsu, T., Kodama, H., Abo, W., Chiba, S. Nakao, T. (1981): Antigenic analysis of polioviruses isolated from a child with agammaglobulinemia and paralytic poliomyelitis after Sabin vaccine administration. *Microbiol. Immunol.*, **25**: 905-913.
 - 103) Wright, P. F., Hatch, M. H., Kasselberg, A. G., Lowry, S. P., Wadlington, W. B. Karzon,

- D. T. (1977): Vaccinè-associated poliomyelitis in a child with sex-linked agammaglobulinemia. *J. Pediatr.*, **91**: 408-412.
- 106) Wimmer, E., Emini, E. A., Jameson, B. A., Diamond, D. C., Bonin, J. and Semler, B. L. (1985): Neutralization antigenic sites, attenuation markers and peptide induction of neutralizing antibodies of poliovirus. Abstracts of Sixth International Congress of Virology, S4-5.
- 107) Hashimoto, N. (1975): Analysis of specificity of poliovirus inhibitors with inhibitor-resistant mutants of a strain of type 1 poliovirus. *J. Immunol.*, **115**: 569-574.
- 108) Osterhaus, D. M. E., van Wezel, A. L., van Steenis, B., Drost, G. A. and Hazendonk, T. G. (1981): Monoclonal antibodies to polioviruses. Production of specific monoclonal antibodies to the Sabin vaccine strains. *Intervirology*, **16**: 218-224.
- 109) Crainic, R., Coullin, P., Cabau, N., Boue, A. and Horodniceanu, F. (1982): Determination of type 1 poliovirus subtype classes with neutralizing monoclonal antibodies. *Develop. Biol. Standard.*, **50**: 229-234.
- 110) Ferguson, M., Yi-Hua, Q., Minor, P. D., McGrath, D. I., Spitz, M. and Schild, G. C. (1982): Monoclonal antibodies specific for the Sabin vaccine strain of poliovirus 3. *Lancet*, **II**: 122-124.
- 111) Urasawa, S., Ishizawa, F. and Urasawa, T. (1977): Antigenic variation of poliovirus caused by antibody components with different specificities. *Microbiol. Immunol.*, **21**: 299-307.
- 112) 浦沢正三 (1975): エンテロウイルスの伝ばと抗体による抗原変異. *ウイルス*: **25**: 213-219.
- 113) Tolskaya, E. A., Romanova, L. A., Kolesnikova, M. S. and Agol, V. I. (1983): Intertypic recombination in poliovirus: genetic and biochemical studies. *Virology*, **124**: 121-132.
- 114) Emini, E. A., Leibowitz, J., Diamond, D. C., Bonin, J. and Wimmer, E. (1984): Recombinants of Mahoney and Sabin strain poliovirus type 1: Analysis of in vitro phenotypic markers and evidence that resistance to guanidine maps in the nonstructural proteins. *Virology*, **137**: 74-85.
- 115) Kew, O. M. and Nottay, B. K. (1984): Evolution of the oral polio vaccine strains in humans occurs by both mutation and intramolecular recombination. In *Modern Approaches to Vaccines* (eds. Chanok, R. and Lerner, R.) pp. 357-362. Cold Spring Harbor, N. Y.