

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6449325号
(P6449325)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/569	(2006.01)	GO 1 N 33/569	J
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5
GO 1 N 21/64	(2006.01)	GO 1 N 21/64	F

請求項の数 15 (全 68 頁)

(21) 出願番号	特願2016-560632 (P2016-560632)	(73) 特許権者	516181619
(86) (22) 出願日	平成26年12月17日 (2014.12.17)		ボード・オブ・トラスティーズ、サザン・イリノイ・ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2017-502314 (P2017-502314A)		アメリカ合衆国、イリノイ・62794-9616、スプリングフィールド、ピー・オー・ボックス・19616、ノース・ラトリッジ・ストリート・801
(43) 公表日	平成29年1月19日 (2017.1.19)	(74) 代理人	110001173
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/070915		特許業務法人川口国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W02015/095366	(72) 発明者	ハルフォード、ウィリアム・ピー
(87) 国際公開日	平成27年6月25日 (2015.6.25)		アメリカ合衆国、イリノイ・62704、スプリングフィールド、サウス・フェルド
審査請求日	平成29年12月15日 (2017.12.15)		キャンプ・ストリート・912
(31) 優先権主張番号	61/917,584		
(32) 優先日	平成25年12月18日 (2013.12.18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		審査官	西浦 昌哉
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者が単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) および/または2型 (HSV-2) に感染しているか否かを決定するための迅速で高感度な血清学的アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象が、単純ヘルペスウイルス1型および2型の一方に感染しているか、両方に感染しているか、またはいずれにも感染していないかを決定するための血清学的アッセイ方法であって、

a) アッセイされる前記対象からの抗体含有血清試料を、少なくとも3つの血清サブ試料に分割するステップ；

b) 前記各サブ試料を、

i) 物理的マトリクスにおける非感染細胞からの細胞抗原、

(ii) 同じまたは異なる物理的マトリクスにおけるHSV-1感染細胞からの細胞抗原、および

(iii) 同じまたは異なる物理的マトリクスにおけるHSV-2感染細胞からの細胞抗原

の1つまたは別の1つと別々に混合して少なくとも3つの血清サブ試料-細胞抗原混合物を形成するステップ、および前記各サブ試料中に存在する抗体が、前記列挙した細胞抗原に免疫反応および結合して、マトリクスに結合している抗体および少なくとも3つの予吸着された血清サブ試料ポーションを含むインキュベート混合物を形成するのに十分な期間、前記各混合物を維持するステップ；

c) マトリクスに結合している抗体を、少なくとも3つの予吸着された血清サブ試料ポーションから分離するステップ；

10

20

d) 前記分離した予吸着された各血清サブ試料ポーションを、HSV-1またはHSV-2のいずれによっても非感染の細胞からの試験細胞抗原、HSV-1により感染されている細胞からの試験細胞抗原、およびHSV-2により感染されている細胞からの試験細胞抗原の混合物と別々に混合するステップであって、前記各試験細胞抗原は第2のマトリクスに連結している、ステップ、ならびに予吸着された各血清サブ試料内に存在する抗体が、存在する試験細胞抗原と免疫反応して、第2のマトリクスに結合している3つの別々の免疫反応物を形成することを可能とするのに十分な時間、前記混合物を維持するステップであって、前記第2のマトリクスは第1に命名した前記マトリクスと同じ、または異なる、ステップ；ならびに

e) どの試験細胞抗原と、予吸着されたサブ試料からの抗体が免疫反応したかを決定するために、第2のマトリクスに結合している各免疫反応物中の抗体の免疫反応の量を決定し、それによって、血清試料が得られた対象が、単純ヘルペスウイルス1型および単純ヘルペスウイルス2型の一方により感染されていたか、両方により感染されていたか、いずれにも感染していなかったかを決定するステップを含む血清学的アッセイ方法。

【請求項2】

ステップb)の(i)、(ii)および(iii)の物理的マトリクスにおける細胞抗原が、固定された非感染細胞、固定されたHSV-1感染細胞、および固定されたHSV-2感染細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ステップd)およびe)の第2のマトリクスが、正しい励起波長で照射された場合、蛍光発光により相互に識別可能である、固定された非感染細胞、固定されたHSV-1感染細胞、および固定されたHSV-2感染細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

外部から導入された蛍光着色剤を励起する光の波長で照射された場合、第2のマトリクスの、固定された細胞が蛍光発光する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

外部から導入された蛍光着色剤が、固定された細胞と共有結合による連結を形成し、または細胞内で発現された蛍光タンパク質である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記外部から導入された蛍光着色剤が、細胞内で発現された蛍光タンパク質である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記外部から導入された蛍光着色剤が、固定された細胞と共有結合による連結を形成する、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

予吸着されたサブ試料からの抗体が免疫反応した試験細胞抗原が、第2のマトリクスに結合している免疫反応物を標識抗ヒト抗体と免疫反応させて、抗体標識された免疫反応物を形成させることにより決定される、請求項4に記載の方法。

【請求項9】

前記標識抗ヒト抗体が、その蛍光発光スペクトルが、アッセイにおいて利用されるあらゆる他のフルオロフォアの蛍光発光スペクトルと識別可能である化合物で標識されている、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記標識抗ヒト抗体の標識が、抗体に連結している蛍光分子またはフルオロフォアである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

対象が、単純ヘルペスウイルス1型および単純ヘルペスウイルス2型の一方に感染しているか、両方に感染しているか、またはいずれにも感染していないかを決定するための血清学的アッセイキットであって、

10

20

30

40

50

a)

i) 物理的マトリクスにおける非感染細胞からの細胞抗原、

(ii) 同じまたは異なる物理的マトリクスにおけるHSV-1感染細胞からの細胞抗原、および

(iii) (i) または (ii) と、同じまたは異なる物理的マトリクスにおけるHSV-2感染細胞からの細胞抗原

を別々に含む3個の別々の容器；ならびに

b) HSV-1またはHSV-2のいずれによっても非感染の細胞からの試験細胞抗原、HSV-1により感染されている細胞からの抗原、およびHSV-2により感染されている細胞からの抗原の混合物を含む第4の容器であって、前記各細胞抗原は、前記第1に命名したマトリクスと同じ、または異なる第2のマトリクスに連結している、第4の容器を含み、前記各容器は、列挙した成分を、少なくとも1つのアッセイを行うのに十分な量含む、血清学的アッセイキット。

10

【請求項12】

少なくとも1つのアッセイを行うのに十分量の標識抗ヒト抗体を含む第5の容器をさらに含む、請求項11に記載の血清学的アッセイキット。

【請求項13】

前記標識抗ヒト抗体の標識が、照射された場合、アッセイにおいて利用されるあらゆる他のフルオロフォアの蛍光発光スペクトルと識別可能である蛍光発光スペクトルを生ずる化合物である、請求項12に記載の血清学的アッセイキット。

20

【請求項14】

前記第1および前記第2のマトリクスが、同じ属および種の、固定された細胞である、請求項11に記載の血清学的アッセイキット。

【請求項15】

前記第4の容器の、固定された細胞が、規定された発光スペクトルにおける蛍光の強度によって、列挙した3つの各試験細胞抗原を含む細胞が相互に識別可能である、外部から導入された蛍光着色剤をさらに含み、規定された発光スペクトルは、アッセイにおいて利用されるあらゆる他のフルオロフォアの蛍光発光スペクトルと識別可能であり、重複しない、請求項14に記載の血清学的アッセイキット。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本出願は、その開示を参照により本明細書に組み込む、2013年12月18日出願の出願第61/917584号の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

5000万人の米国人が単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)に感染しているが、感染者のうち80-90%は、自分がHSV-2を有することに気付いていない[CDC、2010年；Paz-Baileyら、2007年；Xuら、2006年]。患者が目に見える症状を有するか否かに関係なく、患者は感染性のウイルスを放ち、HSV-2を性交渉のパートナーに伝播させ得る[Rattrayら、1978年；Tronsteinら、2011年；Waldら、2000年]。抗ウイルス薬はHSV-2伝播のリスクを低減するが、排除しない[Sperlingら、2008年；Handsfiedら、2007年；Coreyら、2004年；DeJesusら、2003年]。自分がHSV-2を保有することを知っている患者は、抗ウイルス薬、コンドーム、パートナーへの公表、および些細な症状に気付くなど、伝播のリスクを低減するための事前措置をとることができ、これらは全て、伝播を減らす効果的な手段である[Guptaら、2007年；Ranaら、2006年；Warren、2002年；Waldら、2001年]。

40

【0003】

HSV-2感染の診断を確認するのに用いられる血清学的試験は不完全である。最も重

50

大な問題は以下を含む：(1) HerpeSelect (登録商標) HSV型特異的血清学的ELISAアッセイ (Quest Diagnostics, Inc.の完全所有子会社である、Focus Diagnostics) は、偽陽性結果を返すことがあり、(2) 確証的なHSVウエスタンブロット試験 (すなわち、HSV血清学的試験の黄金律 [Warrenら、2011年]) は「不確定」という結果を返すことがある。

【0004】

HSV-2 ELISA上で偽陽性の可能性がある患者はしばしば、指標値が1.1から3.5である「低陽性」というスコアを有し、このような患者のうち50%は、確証的なHSVウエスタンブロット上で偽陽性であることを証明する。しかし、確証的なウエスタンブロット試験は、HerpeSelect (登録商標) ELISA試験からHSV-2「低陽性」の結果を得た患者のうちの約50%の血清学的状態を明らかにすることができない。むしろ、ウエスタンブロット試験は、これらの患者に対する不確定の結果を返すのが典型的である。よって、現在のHSV-2血清学的試験では、患者の2-4%は結果があいまいなままであり [Ng'ayoら、2011年; Goldenら、2005年]、本明細書の目的で、これは「HSV-2不確定」診断と呼ばれる。

10

【0005】

不確定な診断を有することは、患者に、患者がHSV-2に感染しているのか否かの迷いを残し、感染していない患者に不要な苦痛をもたらす [Warren、2002年; WarrenおよびEbel、2005年]。不確定の診断を有する患者は、真のHSV-2感染における派生問題に対処することが強いられる。具体的に述べると、患者は、潜在的な性交渉のパートナーに、拒絶され得るというリスクを冒して、自身の「HSV-2状態」を公開しなければいけない気分になり、他人に感染させるリスクを減らすために抗ウイルス治療を毎日受けることもあり、HSV-2のない者よりHIV感染を獲得する可能性が3倍高いと信じ込んでいる [Vergidisら、2009年; LingappaおよびCelum、2007年]。繰返し試験を受けても、自身の診断を明らかにすることができないことがしばしばあり、よって患者は数か月または数年間、自身のHSV-2感染状態を知らないことがあり、これは患者の自己認識および患者の生活の質に対して、深刻な負の影響があり得る。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0006】

- 【非特許文献1】CDC、2010年
- 【非特許文献2】Paz-Baileyら、2007年
- 【非特許文献3】Xuら、2006年
- 【非特許文献4】Rattrayら、1978年
- 【非特許文献5】Tronsteinら、2011年
- 【非特許文献6】Waldら、2000年
- 【非特許文献7】Sperlingら、2008年
- 【非特許文献8】Handsfeldら、2007年
- 【非特許文献9】Coreyら、2004年
- 【非特許文献10】DeJesusら、2003年
- 【非特許文献11】Guptaら、2007年
- 【非特許文献12】Ranaら、2006年
- 【非特許文献13】Warren、2002年
- 【非特許文献14】Waldら、2001年
- 【非特許文献15】Warrenら、2011年
- 【非特許文献16】Ng'ayoら、2011年
- 【非特許文献17】Goldenら、2005年
- 【非特許文献18】WarrenおよびEbel、2005年
- 【非特許文献19】Vergidisら、2009年

40

50

【非特許文献20】LingappaおよびCelum、2007年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

よって、HSV-2の不確定診断を最小にし、または排除する、HSV-2感染を診断するための改善された血清学的アッセイが必要とされており、対処されていない。本発明は、ウイルス感染細胞に対する血清抗体結合(ABVIC)の親和性を測定する、新規なフローサイトメトリーベースの血清学的アッセイであり、より決定的なHSV-2血清学的試験であると考えられる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、対象が、単純ヘルペスウイルス1型または2型の、一方もしくは他方に感染している、またはいずれにも感染していないかを決定するための血清学的アッセイを提供する。広範には、アッセイは、アッセイされる対象からの、抗体含有血清または血漿(集成的に「血清」)試料を提供するステップを含む。血清試料は、HSV-1感染(HSV-1⁺)細胞、またはHSV-2感染(HSV-2⁺)細胞、またはHSV-1およびHSV-2の両方に感染している細胞、またはHSV-1にもHSV-2にも感染していない細胞の上に存在する細胞抗原と免疫反応する抗体を含む。

【0009】

血清試料は、少なくとも3つのサブ試料ポーションに分割される。別々の血清サブ試料ポーションは、(a)HSV-1またはHSV-2のいずれにも非感染の細胞の抗原(HSV-1⁻またはHSV-2⁻)、(b)HSV-1感染細胞の抗原および(c)HSV-2感染細胞の抗原の各々と接触され、接触は維持され(インキュベートされ)、それによって、各サブ試料中に存在する抗体を、列挙した細胞抗原の1つ以上に結合させる。このようなインキュベートされた各サブ試料ポーションは、抗体が結合している抗原から分離されて、少なくとも3つの予吸着された血清試料を形成し、この場合、非感染細胞の抗原とインキュベートされた予吸着された血清サブ試料は、(a)非感染細胞と免疫反応する抗体の含有量が低減されており、HSV-1感染細胞の抗原とインキュベートされた予吸着された血清サブ試料は、(b)HSV-1感染細胞と免疫反応する抗体が、提供される血清試料中に存在する場合、その含有量が低減されており、HSV-2感染細胞の抗原とインキュベートされた予吸着された血清サブ試料は、(c)HSV-2感染細胞と免疫反応する抗体が、提供される血清試料中に存在する場合、その含有量が低減されている。予吸着された各サブ試料ポーションは、HSV-1またはHSV-2のいずれによっても非感染の細胞、HSV-1により感染されている細胞、およびHSV-2により感染されている細胞からの抗原の混合物と混合され、インキュベートされ、どの1つ以上の抗原に対して、各サブ試料ポーション中に存在する抗体が結合したかを決定し、それによって、対象がHSV-1に感染していたか、HSV-2に感染していたか、両方に感染していたか、またはいずれにも感染していなかったかを決定する。

【0010】

一実施形態におけるアッセイは、血清または血漿(集成的に「血清」)試料をアッセイされる対象から提供するステップ、血清試料を、少なくとも3つの血清サブ試料に分割するステップ、血清サブ試料を、少なくとも3つの抗原の集団に、好ましくは固定された細胞の形態において予吸着させるステップ、血清サブ試料を、少なくとも3つの遊離細胞の集団とインキュベートするステップ、血清サブ試料を検出抗体とインキュベートするステップ、および血清サブ試料を細胞ソーティング装置またはフローサイトメーターで分析するステップを含む。

【0011】

対象が、単純ヘルペスウイルス1型および2型ウイルスの一方に感染しているか、両方に感染しているか、またはいずれにも感染していないかを決定するための血清学的アッセ

10

20

30

40

50

イキットも企図される。キットは、a) i) 物理的マトリクスにおける非感染細胞からの抗原、(ii) 同じもしくは異なる物理的マトリクスにおけるHSV-1感染細胞からの抗原、または(iii) (i) もしくは(ii) の物理的マトリクスと、同じまたは異なる物理的マトリクスにおけるHSV-2感染細胞からの抗原を別々に含む、血清の予吸着のための3個の別々の容器を含む。キットの第4の成分は、様々な形態において提供され得る試験抗原である。一実施形態において、(1) 固定および透過処理され、ならびに(2) 細胞ソーティング装置またはフローサイトメーターが各3集団を区別できるようにフルオロフォアで示差的に標識された、非感染細胞、HSV-1感染細胞およびHSV-2感染細胞の3集団の混合物を含む第4の容器がキットに含まれる。この実施形態において、キット容器1、2および3の中に提供される抗原含有マトリクスから分離された、予吸着された血清は、各マトリクスから分離され、キット容器4の中に提供される試験細胞と合わされて、細胞ソーティング装置またはフローサイトメーターにおいてHSV-1特異的抗体および/またはHSV-2特異的抗体の比存在度を決定する。これら4つの各容器は、少なくとも1つのアッセイを行うのに十分な量の、列挙された成分を含む。アッセイを行うための指示もキット中に存在するのが好ましい。

10

【0012】

上記に記載した血清学的アッセイキットが、少なくとも1つのアッセイを行うのに十分な量の、標識抗ヒト抗体を含む第5の容器を含むのがさらに好ましい。抗ヒト抗体の標識は、その蛍光が、存在するあらゆる他の材料の蛍光と識別可能である蛍光材料であるのが好ましい。第4の容器の固定された試験細胞の混合物が、非感染の、HSV-1またはHSV-2抗原を含む細胞が蛍光によって相互に識別可能であり、アッセイにおいて利用されるあらゆる他の蛍光種からやはり識別可能である、外部から導入された蛍光着色剤をさらに含むのも好ましい。

20

【0013】

本発明にはいくつかの利益および利点がある。

【0014】

一利益は、多くの抗体アッセイは、HSV血清陰性試料をHSV血清陽性試料と識別するのに十分であるが、あるヒトがHSV-1に感染しているか、HSV-2に感染しているか、または両方に感染しているかを区別しないことである。

【0015】

本発明の利点は、本発明のHSV-1に特異的な抗体アッセイポーションは、あるヒトがHSV-1に感染しているか否かを区別し、ヘルペスウエスタンブロットの結果を裏付けることである。

30

【0016】

本発明の別の利益は、HSV-2に特異的な抗体アッセイポーションは、あるヒトがHSV-2に感染しているか否かを区別し、ヘルペスウエスタンブロットの結果を裏付けることである。

【0017】

本発明の別の利点は、好ましい型特異的なABVICアッセイは、(i) 非感染の対照アッセイ、(ii) HSV-1特異的な抗体アッセイ、および(iii) HSV-2特異的な抗体アッセイを組み合わせることである。

40

【0018】

本発明のさらなる一利益は、好ましい型特異的ABVICアッセイは高度に定量的であり、あるヒトがHSV-1および/またはHSV-2血清陽性である確率の統計学的解釈を可能にすることである。

【0019】

さらなる一利点は、好ましい型特異的ABVICアッセイの定量的および統計学的な力は、アッセイが、ヘルペスウエスタンブロット試験の不確定試験結果を分離するのを可能にすることである。

【0020】

50

本発明の付加的な一利益は、ヘルペスウエスタンブロットに対する型特異的 A B V I C アッセイの感受性および定量的な力の増大は、H S V - 1 による感染を H S V - 2 による感染と識別する能力を維持しながら、好ましい型特異的 A B V I C アッセイを、通常 of ウエスタンブロット様式のアッセイよりも迅速に行えるようにできることである。

【 0 0 2 1 】

本発明の付加的な一利点は、好ましい型特異的 A B V I C アッセイは、上記に記載した固定および透過処理された試験細胞中に存在し得る、最高 7 5 個の H S V - 1 または H S V - 2 タンパク質に対する抗体の存在をスクリーニングするため、本発明は、市販の H e r p e S e l e c t (登録商標) 試験 E L I S A アッセイよりも高感度な結果を提供できることである。対照的に、H e r p e S e l e c t (登録商標) E L I S A は、H S V - 1 または H S V - 2 タンパク質 7 5 個のうちたった 1 つ、すなわち G 糖タンパク質に対する抗体に対して試験する。

10

【 0 0 2 2 】

その上さらなる利益および利点は、当業者であれば以下の記述から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

【図 1 - 1】汎 H S V - 2 I g G 抗体レベルのフローサイトメトリーベースの測定を示す図である。A は、1 : 6 , 0 0 0 希釈の無処置マウス血清で免疫化したマウスから得た H S V - 2 抗血清の、固定された H S V - 2 プラークの免疫蛍光標識化を示す図である [H a l f o r d ら、2 0 1 0]。マウス I g G 結合を、A l e x a F l u o r 5 9 4 標識ヤギ抗マウス I g G (H + L) で可視化した。B は、H S V - 2 0 N L S で免疫化したマウスから得た H S V - 2 抗血清の、固定された H S V - 2 プラークの免疫蛍光標識化を示す図である [H a l f o r d ら、2 0 1 0]。マウス I g G 結合を、A l e x a F l u o r 5 9 4 標識ヤギ抗マウス I g G (H + L) で可視化した。C は、非感染 (U I) ペロ細胞と混合した、C F S E 標識した H S V - 2 感染 (H S V - 2 +) ペロ細胞の、固定された単一細胞懸濁液の 2 色フローサイトメトリー分析を示す図である。固定された細胞を、1 : 6 , 0 0 0 希釈の無処置マウス血清とインキュベートし、C F S E (F L 1) および A P C (F L 4) の蛍光強度に対して分析した。

20

【図 1 - 2】D は、非感染 (U I) ペロ細胞と混合した、C F S E 標識した H S V - 2 感染 (H S V - 2 +) ペロ細胞の、固定された単一細胞懸濁液の 2 色フローサイトメトリー分析を示す図である。固定された細胞を、1 : 6 , 0 0 0 希釈のマウス H S V - 2 抗血清および A P C 標識ヤギ抗マウス I g G とインキュベートし、C F S E (F L 1) および A P C (F L 4) の蛍光強度に対して分析した。E は、H S V - 2 + と U I 細胞との間の M F I によって決定した、無処置マウス n = 6 対 H S V - 2 0 N L S 免疫化マウス n = 6 の、血清中の汎 H S V - 2 I g G レベルを示す図である。

30

【図 2 - 1】汎 H S V - 2 I g G レベルは、マウスにおける目の H S V - 2 誘発に対する保護と相関することを示す図である。A は、マウスにおけるワクチン - 目の H S V - 2 誘発実験のデザインを示す図である。0 日目、マウスの右目に培養培地、または示したウイルス 5 つのうち 1 つを片目あたり 10^5 プラーク形成単位 (p f u)、マウスに初回接種した (1 群あたり n = 8)。H S V - 2 M S を接種したマウスを、免疫化後 0 から 2 0 日にアシクロビルで処置してウイルスの病原性を制限した。6 0 日目に血液を収集し、7 0 日目にマウスの左目を野生型 H S V - 2 M S 10^5 p f u で誘発した。

40

【図 2 - 2】B は、フローサイトメトリーベースのアッセイによって決定した、誘発前血清中の汎 H S V - 2 I g G レベルの平均値 \pm s e m を示す図である。C は、各マウスに対して (マウス 1 匹あたり記号 1 つ) 同じマウスに観察された誘発前 H S V - 2 I g G レベル (x 軸) の関数としてプロットした、目の誘発後 1、2 および 3 日目に排出された感染性 H S V - 2 の平均量 (y 軸) を示す図である。黒実線は、4 8 個のマッチさせたデータ対に対する、 $y = 3 . 3 5 - 0 . 5 6 x$ の最良適合の直線回帰モデルを表す。

【図 2 - 3】D は、x 軸上に各免疫化群における \log (汎 H S V - 2 I g G) の平均値 \pm s e m をプロットし、それに対して y 軸上に目の H S V - 2 排出の平均値 \pm s e m を

50

ロットしたものを示す図である。黒実線は、これらの6個のマッチさせた平均に対する、 $y = 3.44 - 0.64x$ の最良適合の直線回帰モデルを表す($r^2 = 0.86$)。目のHSV-2排出において無処置マウスに対して有意な低減を表した免疫化マウスの群が、一元配置のANOVAおよびTukeyの事後t検定によって決定した通り、アスタリスク1個(* $p < 0.05$)またはアスタリスク2個(** $p < 0.001$)により示される。Eは、各群において観察される汎HSV-2 IgG抗体レベルの平均値 \pm semの関数としてプロットした、各群における生存頻度を示す図である。生存頻度において、無処置のマウスに対して有意差を表す免疫化したマウスの群が、フィッシャーの正確確率検定によって決定される通り、アスタリスク1個(* $p < 0.05$)またはアスタリスク2個(** $p < 0.0001$)により示される。

10

【図3-1】汎HSV-2 IgGレベルは、マウスにおける膣のHSV-2誘発に対する保護に相関することを示す図である。Aは、マウスのワクチン誘発実験のデザインを示す図である。結果に記載する通り、0日目、マウスの右後足の足蹠に、gD-2、GFP、培養培地(偽)、HSV-20 NLSまたはHSV-2MSで免疫化した(1群あたり $n = 10$)。HSV-2MSで免疫化したマウスに、免疫化後0日目から20日目まで飲料水中アシクロビル1mg/mlを投与して、野生型HSV-2に対する一次曝露(primary exposure)の病原性を制限した。30日目、全マウスの左後足の足蹠に等量の追加免疫を行ったが、MSで免疫化したマウスは追加免疫の間アシクロビルを必要としなかった点が異なった。60日目、血液を収集し、90日目または100日目、マウスを、膣あたり500,000 pfuの野生型HSV-2MSで誘発した。HSV-2MS誘発7日前および3日前、各マウスにDepoProvera(登録商標)(メドキシプロゲステロン)2mgを皮下注射してマウスの膣をHSV-2誘発に対して感受性にした。Bは、フローサイトメトリーベースのアッセイにより決定した、誘発前の血清中の汎HSV-2 IgGレベルの平均値 \pm semを示す図である。マウスが誘発後30日まで生存した頻度が示される。

20

【図3-2】Cは、同じマウスにおいて観察された誘発前の汎HSV-2 IgGレベル(x軸)の関数としてプロットした各マウス(1匹あたり記号1つ; y軸)に対する膣の誘発後1、3、5および7日目に排出された感染性HSV-2の平均量を示す図である。黒実線は、50個のマッチさせたデータ対に対する、 $y = 3.85 - 0.76x$ の最良適合の直線回帰モデルを表す。Dは、各免疫化群における \log (汎HSV-2 IgG)の平均値 \pm semをx軸上にプロットし、それに対して膣のHSV-2の排出の平均値 \pm semを、y軸上にプロットしたものを示す図である。黒実線は、これら5個のマッチさせた平均値に対する最良適合の直線回帰モデル、 $y = 3.89 - 0.79x$ を表す($r^2 = 0.98$)。膣のHSV-2排出において、無処置マウスに対して有意な低減を表した免疫化マウスの群が、一元配置のANOVAおよびTukeyの事後t検定によって決定される通り、アスタリスク1個(* $p < 0.05$)またはアスタリスク2個(** $p < 0.001$)により示される。

30

【図4-1】汎HSV-2 IgGレベルは、モルモットにおける膣のHSV-2誘発に対する保護と相関することを示す図である。Aは、モルモットのワクチン誘発実験のデザインを示す図である。0日目、モルモットの右後足の足蹠に、gD-2、培養培地(偽)、HSV-20 NLSまたはHSV-2MSで免疫化した(1群あたり $n = 5$)。HSV-2MSで免疫化したモルモットに、免疫化後0日目から20日目まで飲料水中アシクロビル1mg/mlを投与して、野生型HSV-2に対する一次曝露の病原性を制限した。30日目、全モルモットの左後足の足蹠に等量の追加免疫を行った。第2の追加免疫の間、MS免疫化マウスにはアシクロビルを投与しなかった。75日目、血液を収集し、90日目、モルモットを野生型HSV-2MSを膣あたり 2×10^6 pfuで誘発した。

40

【図4-2】Bは、無処置($n = 5$)、またはgD-2 + ミヨウバン/MPL($n = 4$)、HSV-20 NLS($n = 5$)、もしくはアシクロビル(ACV)で抑制したHSV-2MS感染($n = 5$)で免疫化したモルモットにおける誘発後1日目から8日目の間の、膣あたりに排出されたHSV-2の平均値 \pm semのpfuを示す図である。一元配置

50

のANOVAおよびTukeyの事後t検定によって決定される通り、アスタリスク1個(*)は $p < 0.05$ を意味し、アスタリスク2個(**)は、HSV-2MSの膈排出がその日の無処置モルモットに等しかった、 $p < 0.00001$ を意味する。Cは、各モルモットに対して(1匹あたり記号1つ)、同じモルモットにおいて観察された誘発前の汎HSV-2IgGレベル(x軸)の関数としてプロットした、膈の誘発後1、2、3、4、6および8日目に排出された感染性HSV-2の平均量(y軸)を示す図である。黒実線は、これら19個のマッチさせたデータ対に対する、最良適合の直線回帰モデル、 $y = 3.77 - 0.95x$ を表す。

【図4-3】Dは、各免疫化群における \log (汎HSV-2IgG)の平均値 \pm semをx軸上に対してプロットし、それに対して膈のHSV-2の排出の平均値 \pm semをy軸上にプロットしたものを示す図である。黒実線は、これら4個のマッチさせた平均に対する、最良適合の直線回帰モデル、 $y = 3.77 - 0.95x$ を表す($r^2 = 0.98$)。膈のHSV-2排出において、無処置モルモットに対して有意な低減を表した免疫化モルモットの群が、一元配置のANOVAおよびTukeyの事後t検定によって決定される通り、アスタリスク1個(* $p < 0.05$)またはアスタリスク2個(** $p < 0.001$)により示される。Eは、誘発後7日目、無処置または免疫化したモルモットの各群における、膈周囲疾患の最悪の症例を示す図である。生存頻度は、各免疫化群における動物が誘発後30日目まで生存した頻度を意味する。

【図5-1】HSV-2抗血清の養子移入は、目のHSV-2MS誘発に対する限定された保護を提供することを示す図である。Aは、年齢をマッチさせた129系統メスマウスに、1)誘発前に無処置血清0.25mlの養子移入、2)誘発直前にHSV-2抗血清0.25mlの養子移入、または3)誘発90日前および60日前にHSV-20NLS生ウイルスでの能動免疫のいずれかを投与した。マウスの両目に、片目あたり100,000pfuのHSV-2MSで誘発し、誘発ウイルスの排出および疾患の発症を記録した。誘発後1日目のマウスの目からのHSV-2排出の平均値 \pm semを示す図である(1群あたり $n = 5$)。Bは、年齢をマッチさせた129系統メスマウスに、1)誘発前に無処置血清0.25mlの養子移入、2)誘発直前にHSV-2抗血清0.25mlの養子移入、または3)誘発90日前および60日前にHSV-20NLS生ウイルスでの能動免疫のいずれかを投与した。マウスの両目に、片目あたり100,000pfuのHSV-2MSで誘発し、誘発ウイルスの排出および疾患の発症を記録した。誘発後3日目のマウスの目からのHSV-2排出の平均値 \pm semを示す図である(1群あたり $n = 5$)。

【図5-2】Cは、年齢をマッチさせた129系統メスマウスに、1)誘発前に無処置血清0.25mlの養子移入、2)誘発直前にHSV-2抗血清0.25mlの養子移入、または3)誘発90日前および60日前にHSV-20NLS生ウイルスでの能動免疫のいずれかを投与した。マウスの両目に、片目あたり100,000pfuのHSV-2MSで誘発し、誘発ウイルスの排出および疾患の発症を記録した。各群のマウスの生存期間の平均値 \pm semを示す図である。各バーの上の数字は、各群のマウスにおける「生存」および「疾患の発生頻度」の頻度を報告するものである。生存の期間における、無処置マウスに対する有意な上昇が、一元配置のANOVAおよびTukeyの事後t検定により決定される通り、アスタリスク1個(* $p < 0.05$)またはアスタリスク2個(** $p < 0.001$)により示される。

【図6】HSV-2特異的抗体の血清レベルを測定するために用いられる3方法の比較を示す図である。^a抗HSV-2抗体の存在量を推定するHSV-2抗血清希釈の範囲は、血清希釈における変化に対して直線関係で変化する。^b各アッセイの直線範囲における各血清希釈に対する3回反復測定の平均値 \pm semの変動係数。各血清希釈を考慮して、変動係数 = $100 \times \text{標準偏差} \div \text{平均値}$ 。^c直線範囲内で回帰モデルにより予想される値に対して、観察されるデータの適合度(r^2)。p値は、各アッセイにより測定される量(すなわち、中和力価、OD₄₀₅またはMFI)は、HSV-2抗血清の希釈の関数として変動しなかった確率を意味する。

10

20

30

40

50

【図7】汎HSV-2 IgG抗体レベルは、マウスおよびモルモットにおける膣のHSV-2 MS誘発に対する保護と相関することを示す図である。^a動物を、図3Aおよび4Aに記載した通り、各免疫源で免疫化した。^b無処置および免疫化マウスは、図3に表される動物に対応する。モルモットは図4に表される動物に対応する。^clog(汎HSV-2 IgG)の平均値±semは、マウスに対して図3のCにおけるx変数に対応し、モルモットに対して図4のCにおけるx変数に対応する。^dlog(膣のHSV-2排出における低減)の平均値±semは、マウスに対して図3のCに表すy変数に由来し、モルモットに対して図4のCに表すy変数に由来した。^eHSV-2膣誘発後30日目まで生存した動物の頻度。^f決定せず。同じ種の免疫化対無処置の動物を比べる、一元配置のANOVAおよびTukeyの事後t検定により決定される通り、* p < 0.05。同じ種の免疫化対無処置の動物を比べる、一元配置のANOVAおよびTukeyの事後t検定により決定される通り、** p < 0.001。同じ種の免疫化対無処置の動物の生存の頻度を比べる、フィッシャーの正確確率検定により決定される通り、† p = 0.01。同じ種の免疫化対無処置の動物の生存の頻度を比べる、フィッシャーの正確確率検定により決定される通り、†† p = 0.00001。

10

【図8-1】抗HSV-2抗体レベルを測定するための3方法の比較を示す図である。Aは、マウスHSV-2抗血清のlog0.33の希釈段階におけるHSV-2中和活性を示す図である。中和抗体の力価は、1希釈あたりn=3反復の平均値±semとして報告される。点線は、各アッセイの検出の低限を表す。Bは、HSV-2抗血清のlog0.33の希釈段階における汎HSV-2 IgG抗体レベルの抗体捕捉ELISAベースの測定を示す図である(1希釈あたりn=3反復の平均値±sem)。点線は、各アッセイの検出の低限を表す。

20

【図8-2】Cは、HSV-2抗血清のlog0.33の希釈段階における汎HSV-2 IgG抗体レベルのフローサイトメトリーベースの測定を示す図である(1希釈あたりn=3反復の平均値±sem)。点線は、各アッセイの検出の低限を表す。

【図9-1】マウス血清における汎HSV-2 IgGレベルの抗体捕捉ELISA対フローサイトメトリー測定を示す図である。Aは、抗体捕捉ELISAの検量線を示す。白丸はHSV-2抗血清のlog0.33希釈をされたELISAウエルにおいて観察された比色分析の発色(OD₄₀₅)を示す図である(平均値±sd; 1希釈あたりn=4)。OD₄₀₅とlog(汎HSV-2 IgG)との間のS字形の関係は、示した双曲線正接の等式($r^2 = 1.00$)を用いて正確に記載され、逆数の双曲線逆正接の等式(方法において規定される)を用いて、ELISAにおいて観察されるOD₄₀₅値から試験血清試料中の汎HSV-2 IgGレベルを引き出した。Bは、各マウスに対して(1匹あたり記号1つ)、目の誘発後1、2および3日目に排出された感染性HSV-2の平均量(y軸)を、ELISAによって推定した、誘発前の汎HSV-2 IgGレベル(x軸)の関数としてプロットしたものを示す図である。黒実線は、48個のマッチさせたデータ対に対する、最良適合の直線回帰モデル、 $y = 3.05 - 0.57x$ を表す。

30

【図9-2】Cは、log0の「等価線」に対してx、yデータ対としてプロットした、log(汎HSV-2 IgG)のELISA対フローサイトメトリー推定値を示す図である。「log+1」の基準線を超えたデータ点は、汎HSV-2 IgGレベルのフローサイトメトリーの推定が、同じ血清試料に対する汎HSV-2 IgGのELISA推定値よりlog1大きい血清試料を示す。

40

【図10-1】2つの細胞集団のABVICアッセイは、「HSV-2不確定」患者4人中2人が血清陰性であることを確立することを示す図である。Aは、CFSE標識したHSV-2⁺細胞および非感染の(UI)ペロ細胞の固定された懸濁液に対するヒトIgG抗体結合を、血清抗体で染色した。血清陰性の個体を示す図である。試験細胞に対するヒトIgGの結合(y軸)が、APCコンジュゲートした抗ヒト鎖で検出された。Bは、CFSE標識したHSV-2⁺細胞および非感染の(UI)ペロ細胞の固定された懸濁液に対するヒトIgG抗体結合を、血清抗体で染色した。HSV-2性器ヘルペス患者を示す図である。試験細胞に対するヒトIgGの結合(y軸)が、APCコンジュゲートした

50

抗ヒト 鎖で検出された。

【図10-2】Cは、CFSE標識したHSV-2⁺細胞および非感染の(UI)ペロ細胞の固定された懸濁液に対するヒトIgG抗体結合を、血清抗体で染色した。不確定血清試料1を示す図である。試験細胞に対するヒトIgGの結合(y軸)が、APCコンジュゲートした抗ヒト 鎖で検出された。Dは、CFSE標識したHSV-2⁺細胞および非感染の(UI)ペロ細胞の固定された懸濁液に対するヒトIgG抗体結合を、血清抗体で染色した。不確定血清試料3を示す図である。試験細胞に対するヒトIgGの結合(y軸)が、APCコンジュゲートした抗ヒト 鎖で検出された。

【図11】血清の予吸着は、HSV型特異的抗体が濃縮された集団を生じることを示す図である。血清陽性の患者の血清は、HSV型共通、HSV-1特異的、またはHSV-2特異的である、3集団の抗体を含み得る。UIペロ細胞に対する血清の予吸着は、HSV抗体を除去しない(左の縦列)。HSV-1⁺細胞に対する予吸着は、HSV-2特異的抗体に対して濃縮する(中央の縦列)。HSV-2⁺細胞に対する予吸着は、HSV-1特異的抗体に対して濃縮する(右の縦列)。

【図12-1】3つの細胞集団の型特異的ABVICアッセイは、「HSV-2不確定」患者4人中2人はHSV-2血清陰性であるが、HSV-1血清陽性であることを実証することを示す図である。Aは、CFSE標識した非感染(UI)対HSV-1⁺対HSV-2⁺細胞に対する、ヒトIgG抗体結合が示される。血清陰性の血清で染色した細胞を示す図である。患者の血清試料を、UIペロ細胞(左)、HSV-1⁺細胞(中央)およびHSV-2⁺細胞(右)に対して予吸着させた。中央の縦列における囲み枠は、血清がHSV-2特異的抗体を含む場合、HSV-2⁺細胞の予想される位置を示す。右の縦列における囲み枠は、血清がHSV-1特異的抗体を含む場合、HSV-1⁺細胞の予想される位置を示す。

【図12-2】Bは、CFSE標識した非感染(UI)対HSV-1⁺対HSV-2⁺細胞に対する、ヒトIgG抗体結合が示される。HSV-2血清陽性の血清で染色した細胞を示す図である。患者の血清試料を、UIペロ細胞(左)、HSV-1⁺細胞(中央)およびHSV-2⁺細胞(右)に対して予吸着させた。中央の縦列における囲み枠は、血清がHSV-2特異的抗体を含む場合、HSV-2⁺細胞の予想される位置を示す。右の縦列における囲み枠は、血清がHSV-1特異的抗体を含む場合、HSV-1⁺細胞の予想される位置を示す。

【図12-3】Cは、CFSE標識した非感染(UI)対HSV-1⁺対HSV-2⁺細胞に対する、ヒトIgG抗体結合が示される。不確定血清試料3で染色した細胞を示す図である。患者の血清試料を、UIペロ細胞(左)、HSV-1⁺細胞(中央)およびHSV-2⁺細胞(右)に対して予吸着させた。中央の縦列における囲み枠は、血清がHSV-2特異的抗体を含む場合、HSV-2⁺細胞の予想される位置を示す。右の縦列における囲み枠は、血清がHSV-1特異的抗体を含む場合、HSV-1⁺細胞の予想される位置を示す。

【図13】gG特異的ELISAは、全てのHSV-2特異的抗体のうち3-10%に対して試験するにすぎないことを示す図である。Aは、HSV-1および/またはHSV-2に感染しているヒトにおける可能な全てのHSV特異的抗体を表す円グラフである。Bは、gG特異的抗体に対するHerpeSelect(登録商標)ELISA試験を説明する図である。Cは、gG特異的抗体は、患者のHSV血清学的状態を測定するのに用いられ得るHSV-1またはHSV-2特異的抗体の全レパートリーのうち3-10%に対応するにすぎないことを説明する図である。

【図14-1】Aは、CFSE(カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル)は、フローサイトメーターが、CFSE(-)非感染細胞の純粋な集団を容易に識別可能にする示差的な標識を提供することを示す図である。Bは、CFSE(カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル)は、フローサイトメーターが、CFSE(lo)HSV-1⁺細胞の純粋な集団と容易に識別可能にする示差的な標識を提供することを示す図である。

10

20

30

40

50

【図14-2】Cは、CFSE（カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル）は、フローサイトメーターが、CFSE（hi）HSV-2⁺細胞の純粋な集団と容易に識別可能にする示差的な標識を提供することを示す図である。

【図15-1】A、B、CおよびDの4パネルにおいて、4人の異なるHSV血清陰性患者からの、3つの集団の試験細胞に結合する抗体のバックグラウンドレベルを確立することを示す図である。各患者の血清に対して、フローサイトメトリーのプロットが3つ存在し、これらは：（1）一番左のプロット：非感染の（UI）抗原マトリクスに対して予吸着、（2）中央のプロット：HSV-1に感染している（HSV-1⁺）抗原マトリクスに対して予吸着、および（3）一番右のプロット：HSV-2に感染している（HSV-2⁺）抗原マトリクスに対して予吸着であった血清試料からである。

10

【図15-2】A、B、CおよびDの4パネルにおいて、4人の異なるHSV血清陰性患者からの、3つの集団の試験細胞に結合する抗体のバックグラウンドレベルを確立することを示す図である。各患者の血清に対して、フローサイトメトリーのプロットが3つ存在し、これらは：（1）一番左のプロット：非感染の（UI）抗原マトリクスに対して予吸着、（2）中央のプロット：HSV-1に感染している（HSV-1⁺）抗原マトリクスに対して予吸着、および（3）一番右のプロット：HSV-2に感染している（HSV-2⁺）抗原マトリクスに対して予吸着であった血清試料からである。

【図15-3】A、B、CおよびDの4パネルにおいて、4人の異なるHSV血清陰性患者からの、3つの集団の試験細胞に結合する抗体のバックグラウンドレベルを確立することを示す図である。各患者の血清に対して、フローサイトメトリーのプロットが3つ存在し、これらは：（1）一番左のプロット：非感染の（UI）抗原マトリクスに対して予吸着、（2）中央のプロット：HSV-1に感染している（HSV-1⁺）抗原マトリクスに対して予吸着、および（3）一番右のプロット：HSV-2に感染している（HSV-2⁺）抗原マトリクスに対して予吸着であった血清試料からである。

20

【図15-4】A、B、CおよびDの4パネルにおいて、4人の異なるHSV血清陰性患者からの、3つの集団の試験細胞に結合する抗体のバックグラウンドレベルを確立することを示す図である。各患者の血清に対して、フローサイトメトリーのプロットが3つ存在し、これらは：（1）一番左のプロット：非感染の（UI）抗原マトリクスに対して予吸着、（2）中央のプロット：HSV-1に感染している（HSV-1⁺）抗原マトリクスに対して予吸着、および（3）一番右のプロット：HSV-2に感染している（HSV-2⁺）抗原マトリクスに対して予吸着であった血清試料からである。

30

【図16-1】Aは、図15において記載した通り、示した患者試料以外は強力にHSV-1⁺の患者であることを示す図である。

【図16-2】Bは、図15において記載した通り、示した患者試料以外は弱くHSV-2⁺の患者であることを示す図である。

【図16-3】Cは、図15において記載した通り、示した患者試料以外は強力にHSV-2⁺の患者であることを示す図である。

【図16-4】Dは、図15において記載した通り、示した患者試料以外は強力にHSV-1⁺およびHSV-2⁺の患者であることを示す図である。

【図17-1】Aのパネルにおいて、図15および16において記載した通り、患者試料以外は、ヘルペスウエスタンプロット試験により「HSV-2不確定」と分類された不確定患者からであることを示す図である。この患者はHSV-2を有していない。

40

【図17-2】Bのパネルにおいて、図15および16において記載した通り、患者試料以外は、ヘルペスウエスタンプロット試験により「HSV-2不確定」と分類された不確定患者からであることを示す図である。この患者はHSV-2を有していない。

【図17-3】Cのパネルにおいて、図15および16において記載した通り、患者試料以外は、ヘルペスウエスタンプロット試験により「HSV-2不確定」と分類された不確定患者からであることを示す図である。この患者はHSV-2を有していない。

【図18-1】Aパネルにおいて、図15-17に記載した通り、患者試料以外は、ヘルペスウエスタンプロット試験により「HSV-2不確定」と分類された患者からであるこ

50

とを示す図である。この患者はHSV-2を有していない。

【図18-2】Bのパネルにおいて、図15-17に記載した通り、患者試料以外は、ヘルペスウエスタンプロット試験により「HSV-2不確定」と分類された患者からであることを示す図である。この患者はHSV-2を有していない。

【図18-3】Cのパネルにおいて、図15-17に記載した通り、患者試料以外は、ヘルペスウエスタンプロット試験により「HSV-2不確定」と分類された患者からであることを示す図である。この患者はHSV-2を有していない。

【図19-1】A、BおよびCの3パネルにおいて、対照群の3人、すなわちHSV血清陰性患者 $n = 5$ (A)、HSV-1⁺患者 $n = 2$ (B) および HSV-2⁺患者 $n = 2$ (C) の結果のグラフによる概要を示す図である。各図において下方を指す黒色矢印は、患者が実際にHSV-2に感染していた場合、赤色バーの予想される高さ(すなわち、HSV-2⁺細胞に結合している抗体)を示す。これらの条件はHSV-2⁺患者において満たされるが、型特異的ABVIC試験は、(A)血清陰性または(B)HSV-1⁺であるヒトを容易に判別する。点線は、統計学的有意性($p < 0.05$)に対するカットオフを示し、これらのグラフにおいて陽性であるバーは高度な有意差を表す($p < 0.0001$)ことが重要である。

10

【図19-2】A、BおよびCの3パネルにおいて、対照群の3人、すなわちHSV血清陰性患者 $n = 5$ (A)、HSV-1⁺患者 $n = 2$ (B) および HSV-2⁺患者 $n = 2$ (C) の結果のグラフによる概要を示す図である。各図において下方を指す黒色矢印は、患者が実際にHSV-2に感染していた場合、赤色バーの予想される高さ(すなわち、HSV-2⁺細胞に結合している抗体)を示す。これらの条件はHSV-2⁺患者において満たされるが、型特異的ABVIC試験は、(A)血清陰性または(B)HSV-1⁺であるヒトを容易に判別する。点線は、統計学的有意性($p < 0.05$)に対するカットオフを示し、これらのグラフにおいて陽性であるバーは高度な有意差を表す($p < 0.0001$)ことが重要である。

20

【図20】AおよびBの2パネルにおいて、図17および18において示した型特異的ABVICアッセイ結果により決定された2人の代表的な「不確定患者」の結果のグラフによる概要を示す図である。この試験においてスクリーニングされた不確定患者 $n = 7$ 中、 $n = 3$ がAに示す患者#2同様、HSV血清陰性であり、 $n = 4$ がBに示す患者#6同様、HSV-1血清陽性であった。各パネルにおいて下方を指す黒色矢印は、患者が実際にHSV-2に感染していた場合、赤色バーの予想される高さ(すなわち、HSV-2⁺細胞に結合している抗体)を示す。点線は、統計学的有意性($p < 0.05$)に対するカットオフを示し、したがって試験データは、これらの個体がHSV-2血清陰性である可能性が非常に低いことを示す(例えば、 $p < 0.0001$)。

30

【図21】AおよびBの2パネルにおいて、本発明のアッセイにより提供される高度に定量的なデータは、患者がHSV-2⁺であるリスクに対する可能性を割り当てるためにいかに統計学的に分析され得るかを示す図である。Aは、計算された「標準化された細胞が結合した抗体」の値の正規分布を示し、横軸の値が約3.6以上のとき確率 p は0.05未満であり、試験される抗体の特定の集団に対して患者がHSV血清陰性であることを示す図である(すなわち、総HSV抗体に対するUI予吸着試験; HSV-2特異的抗体に対するHSV-1予吸着試験; およびHSV-1特異的抗体に対するHSV-2予吸着試験)。Bは、「標準化された細胞が結合している抗体」が正規分布であるため、所与の試料が血清陰性試料の平均を X 倍上回る確率を計算することができることを示す図であり、この計算に用いる定義により、「標準化された細胞が結合している抗体」の平均値は常に1.0である。このグラフおよび基礎となる数学により、「標準化された細胞が結合している抗体」の値 = 5.0である試料だけが、無作為抽出変動のため、高値をもたらす血清陰性試料である確率 $p = 0.05$ を有する。 $p < 0.05$ のカットオフは点線で示される。

40

【図22-1】Aパネルにおいて、多様な患者試料の「細胞が結合している抗体」のレベルが、この試料が血清陰性試料である確率 p を逆算するために、図21BにおけるS字曲

50

線を記述する等式において用いられ得る方法を示す図である。Aは、HSV-1抗原マトリクスに予吸着され、したがってこれらが患者試料中にもともと存在すればHSV-2特異的抗体を含んでいる血清を説明する。試験した7つの「不確定」試料のうちどれも、知られているHSV血清陰性試料(すなわち、 $p > 0.05$)の正規分布と有意差がなく、知られている全てのHSV-2⁺は高度に有意であった($p < 0.0001$)。Aはまた、予吸着が良好に働き、したがってHSV-1⁺患者の血清は、HSV-1細胞抗原マトリクスに予吸着された後、HSV-2特異的抗体に陰性である(血清陰性と同じ)ことを説明する。

【図22-2】Bは、HSV-1特異的抗体に対するデータよりむしろ、HSV-2特異的抗体に対するデータがプロットされる場合、Aの結果と類似の結果を説明する。

【図23】縦方向の2本の列における各々4枚の免疫蛍光顕微鏡写真の一連の8部分を示す図である。ペロ細胞の単層に、HSV-1およびHSV-2の一方もしくは他方を感染させてプラークを形成させ、または何もしなかった(非感染-UI)。患者血清をこれらの試験細胞(すなわち、固定し、浸透化した細胞の単層におけるHSV-1またはHSV-2プラーク)に加える前、患者血清を、予吸着、ならびにHSV型共通抗体およびHSV-1またはHSV-2特異的抗体の除去に対するベースを提供するために、非感染(UI)ペロ細胞、HSV-1+ペロ細胞またはHSV-2+ペロ細胞の抗原でコーティングした、臭化シアン(CNBr)で活性化したSephacrose(登録商標)4Bのマトリクスに予吸着させた。一番上の顕微鏡写真は、希釈したが予吸着させなかった血清は、(i)左に示すHSV-1プラークおよび(ii)右に示すHSV-2プラークの両方に集合的に結合する、HSV型共通抗体およびHSV-2特異的抗体の混合物を含んでいたことを示す。よって、非吸着の患者血清は、この個体がHSV-1および/またはHSV-2に感染していたか否かを決定するのに不十分であった。血清を同じく希釈し、引き続き非感染(UI)の抗原マトリクスに予吸着させたものは、2段目の(i)左に示すHSV-1プラークおよび(ii)右に示すHSV-2プラークの両方に集合的に結合する、HSV型共通抗体およびHSV-2特異的抗体の混合物を依然として含んでいた。よって、UI細胞抗原を予吸着させた患者血清は、この個体がHSV-1および/またはHSV-2に感染していたか否かを決定するのに不十分であった。希釈した血清をHSV-1に感染している(HSV-1⁺)抗原のマトリクスと予吸着させた後、HSV型共通抗体を枯渇させたが、HSV-2特異的抗体は残留させた。よって、HSV-2特異的抗体が濃縮された集団は、3段目の左のHSV-1プラークに不十分に結合したにすぎなかったが(ほとんど完全に暗い。)、右のより明るい顕微鏡写真において示されるHSV-2プラークに強力に結合した。よって、HSV-1細胞抗原を予吸着させた患者血清は、この個体がHSV-2血清陽性であったことを決定するのに十分であり、これは基礎となるHSV-2感染に対する予測を示す。希釈した血清を、HSV-2感染(HSV-2⁺)抗原のマトリクスに予吸着させ、HSV型共通抗体およびHSV-2特異的抗体を枯渇させた。この患者がHSV-1に感染しており、よってこの患者がHSV-1血清陽性であれば、HSV-1特異的抗体は残留する。しかし、一番下の2枚の顕微鏡写真は、HSV-2を予吸着させた血清は、左のHSV-1プラークに結合している抗体を、右に示すHSV-2プラークより高いレベルまで有していなかったことを示す(両方とも依然として暗い。)。よって、このHSV-2抗原を予吸着させた患者血清は、この個体がHSV-1血清陰性であったことを決定するのに十分であった。抗体結合は、顕微鏡写真において捕捉された赤色を生成する、Alexa Fluor(登録商標)(Life Technologies)594がコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG抗体を用いて検出された。

【図24】同じ試薬であるが、HSV-1血清陽性およびHSV-2血清陽性の両方であることが分かっている患者からの異なる血清を用いて得られた、図23の蛍光顕微鏡写真同様の配列を示す図である。図23に提供したのと同じ根拠を用いて、患者のHSV-1抗原を予吸着された血清で得たデータは、個体がHSV-2血清陽性であることを示す(3段目、左の顕微鏡写真は暗いが、右の顕微鏡写真は明るい。)。同様に、患者のHSV-2抗原を予吸着された血清から得られたデータは、個体がHSV-1血清陽性であるこ

10

20

30

40

50

とを示す（４段目、左の顕微鏡写真は明るい、右の顕微鏡写真は暗い。）。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

本発明は、対象の血清試料から疾患を診断する目的で、HSV-1およびHSV-2の一方に感染、または両方に感染、またはいずれにも感染していないことを検出し、それらを区別することができるアッセイを企図する。好ましい例示的な一実施形態は、本明細書においてフローサイトメトリーベースの血清学的アッセイと呼ぶ、ウイルス感染細胞に対する血清の抗体の結合（ABVIC）のウイルスの型特異的親和性を測定する、3つの細胞集団のアッセイを企図する。

【００２５】

本発明は、HSV-1およびHSV-2の一方に感染状態、他方に感染状態、両方に感染状態、またはどちらにも非感染状態を決定しようとする患者からの、抗体含有試料の使用を企図する。通常、この試料は、採血試料からの血清または血漿の形態である。試料はまた、よく知られている通り、血液または他の試料からの硫酸沈澱などの抗体濃縮試料でも、または乾燥された、例えば凍結乾燥された血清もしくは血漿試料でもよい。便宜上、およびこれらは類似であるため、血清および血漿は本明細書において集合的に血清と呼ばれる。

【００２６】

患者（対象）試料は、少なくとも3つのポーションまたはサブ試料に分割される。各ポーション（サブ試料）は、（a）非感染細胞からの抗原と、（b）HSV-1感染細胞からの抗原と、および（c）HSV-2感染細胞からの抗原と、別々に混合され、接触される。

【００２７】

この接触は、列挙した抗原と免疫反応するサブ試料内の抗体が、抗原と免疫反応（結合）するのに十分な期間維持される。この接触および維持は、本明細書においてインキュベーションとも呼ばれる。維持時間は数分から約96時間までの範囲であってよい。通常、維持時間は約1時間から約8時間であり、より好ましくは約2時間から約6時間である。

【００２８】

上記に言及した細胞抗原は、それ自体物理的マトリクスの一部であり、そのため反応した抗体は、物理的マトリクスに結合している抗体（マトリクスに結合している抗体とも呼ばれる。）を形成する。例示的な物理的マトリクスは、例えば、1）タンパク質でコーティングされた固体マトリクス（例えば、ELISAプレート）；2）細胞でコーティングされた固体マトリクス（例えば、固定された細胞でコーティングされた培養プレート）；3）浮動性（free-floating）粒子（例えば、液体懸濁液中の生存細胞もしくは固定された細胞）；4）粒子のカラム（例えば、キャピラリ管中の生存細胞もしくは固定された細胞）；5）タンパク質でコーティングされた磁性ビーズ；6）液体中に懸濁された、または流動カラム中に充填された、タンパク質でコーティングされたマトリクスのスラリー（例えば、抗原が反応したCNBrで活性化されたSephrose（登録商標）4B）を含む。

【００２９】

固定および透過処理された非感染（UI）細胞、HSV-1⁺細胞およびHSV-2⁺細胞のスラリーは、本明細書において例示的に用いられた。生物学の技術分野でよく知られている通り、細胞の固定は、それだけには限定されないが、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、メタノール、エタノールおよびアセトンの1つ以上での処理を含めた、広範囲の化学物質により実現され得る。各物理的マトリクスとして用いられる細胞が、同じタイプであるのが好ましい。例示的な細胞型は、1）ヒトSK-N-SH神経芽腫細胞；2）ヒトU2OS骨肉腫細胞；3）ヒト293胎生腎細胞；4）サルCV-1腎細胞（ベロ細胞）；5）サルCOS細胞；6）マウス3T3細胞；7）ハムスターBHK-21細胞；8）ウシBIEC細胞；9）ウシBUVEC細胞；10）ヒトCaco-2細胞；11）ヒトHeLa細胞；12）サルMA104細胞；13）イヌMDCK細胞；14）

10

20

30

40

50

ブタPK-15細胞；および15)ヒトWiDr細胞を含む。

【0030】

HSV ICPO-ウイルスが、今日まで試験された15個の他の細胞系のうち11個において、ペロ細胞と見分けのつかないほどの効率でプラークを形成することは注目値する。具体的に述べると、本発明者らによる研究は、HSV ICPO-ウイルスの0.5-2%は、ヒト293細胞、マウス3T3細胞、ハムスターBHK-21細胞、ウシBIEC細胞、ウシBUVEC細胞、ヒトCaco-2細胞、ヒトHeLa細胞、サルA104細胞、イヌMDCK細胞、ブタPK-15細胞およびヒトWiDr細胞の単層においてプラークを形成することを示している。よって、このリストにおけるあらゆる細胞系が、定義上、野生型HSV-1およびHSV-2、ならびにテキストにおいて特に論じられる変異HSV-1ウイルスの複製を支持する。ペロ細胞は、1つの好ましい細胞型であり、本明細書では以降、例示的に用いられている。

10

【0031】

用いられる細胞は、それ自体、固体の物理的マトリクス(例えば、プラスチック製ディッシュ、磁性ビーズ、アガロースなど)に付着してよく、またはPBSなどのバッファー溶液のような水性媒体などの液体溶液中に懸濁され得る。物理的マトリクスに結合している(免疫反応した)抗体は、その後、反応したサブ試料中に存在するあらゆる未反応の抗体から分離される。この分離は、遠心分離およびデカンテーションにより行われ、または上清の液体をピペットで取り出してもよく、抗原が結合した抗体が培養プレートの壁にある場合はピペット除去、溶出などでもよい。

20

【0032】

上記で論じた、3つの各血清試料の、異なる細胞抗原マトリクスの1つとの混合およびインキュベーションも、本明細書において予吸着と呼ばれる。この予吸着は、固定された細胞で行われるのが好ましい。可能な様々な交差反応性を最小にするために、同じ細胞型が各予吸着に用いられるのが好ましい。

【0033】

非感染の細胞抗原マトリクスの目的は、いかなる特異的な型の非感染の細胞抗原マトリクスが用いられる場合でも、患者がHSV-1および/またはHSV-2に感染しているか否かを決定しようと求める患者から採取した試験試料中で、ヒト血清抗体の集団に対する効果が殆ど乃至全くない「予吸着処置対照」として働くことである(図15-18における生データの一番左のパネル、ならびに図19および20におけるグラフによる概要)。

30

【0034】

同様に、HSV-1+細胞抗原マトリクスの目的は、いかなる特異的な型のHSV-1+細胞抗原マトリクスが用いられる場合でも、(1)HSV型共通抗体および(2)HSV-1特異的抗体を、患者の血清試料から除去することである。よって、HSV-1+細胞抗原マトリクスとのインキュベーション後に除去される非結合画分(effluent)は、HSV-2特異的抗体が高度に濃縮された集団を生じ、これは、患者がHSV-2ウイルスに感染していたか否かを決定するのに用いられ得る(図15-18における生データの中央のパネル、ならびに図19および20におけるグラフによる概要)。

40

【0035】

同様に、HSV-2+細胞抗原マトリクスの目的は、いかなる特異的な型のHSV-2+細胞抗原マトリクスが用いられる場合でも、(1)HSV型共通抗体および(2)HSV-2特異的抗体を、患者の血清試料から除去することである。よって、HSV-2+抗原マトリクスとのインキュベーション後に取り出される非結合画分は、HSV-1特異的抗体が高度に濃縮された集団となり、これは、患者がHSV-1ウイルスに感染していたか否かを決定するのに用いられ得る(図15-18における生データの一番右のパネル、ならびに図19および20におけるグラフによる概要)。

【0036】

予吸着の結果、少なくとも3つの予吸着された血清サブ試料が形成される。よって、非

50

感染の細胞の抗原とインキュベートした予吸着された血清サブ試料は、(a)非感染細胞と免疫反応する抗体の含有量が低減されている。HSV-1感染細胞の抗原とインキュベートした予吸着された血清サブ試料は、(b)HSV-1感染細胞と免疫反応する抗体が、提供される血清試料中に存在する場合、その含有量が低減されており、そのため、HSV-2と免疫反応する抗体が、提供される血清試料中に存在する場合、その含有量が比較的上昇している。同様に、HSV-2感染細胞の抗原とインキュベートした予吸着された血清サブ試料は、(c)HSV-2感染細胞と免疫反応する抗体が、提供される血清試料中に存在する場合、その含有量が低減されており、HSV-1と免疫反応する抗体が、提供される血清試料中に存在する場合、その含有量が比較的上昇している。

【0037】

予吸着された各サブ試料ポーションを、HSV-1またはHSV-2のいずれによっても非感染の細胞からの第2のマトリクスに連結している試験抗原、HSV-1により感染されている細胞からの試験抗原、およびHSV-2により感染されている細胞からの試験抗原の混合物とインキュベートして(上記に論じた通り)、各サブ試料内に存在する抗体を、存在する試験抗原と免疫反応させる。次いで、免疫反応が殆どまたは全くないものを含めた免疫反応の量を、試験抗原混合物を含む各サブ試料に対して決定して、どの試験抗原が、あるとすれば、予吸着されたサブ試料からの抗体に免疫反応したかを決定する。

【0038】

アッセイのこの部分において利用される、第2のマトリクスに連結している試験抗原は、以前に論じたのと同じ試験抗原-物理的マトリクス構築物でも、または異なる構築物でもよい。好ましい一実施形態において、3つの試験抗原-物理的マトリクスの混合物は、試験細胞の各集団が、色素の色または蛍光の相対的な量に基づいて相互に識別され得るように、(a)非染色の、(b)細胞の色素、フルオロフォア、または着色料で弱く染色されている、ならびに(c)外部から供給された同じ、細胞の色素、フルオロフォア、または着色料で強力に染色されている、固定および透過処理された細胞からなる。

【0039】

特に好ましい、外部から供給される(通常、細胞の一部として存在しない)細胞の着色料は、典型的に紫外、可視、または赤外の範囲における規定された光の波長で(200-800nm)照射すると蛍光であり、その蛍光はフローサイトメーターによって検出され得る。例示的な、外部から供給される化学反応性の(共有結合により連結可能な)有用な蛍光着色料は、それだけには限定されないが、5-(および6-)カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル(CFSE)、(CellTrace(商標)バイオレット)、およびリジン残基のイプシロンアミノ基などのアミノ基にN-ヒドロキシスクシンイミドエステル交換によりカップリングする、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル-7-(2-((IE, 3E, 4E)-1,5-ジクロロ-6-オキソヘキサ-1,4-ジエン-3-イリデン)アミノ)-5-ヒドロキシフェニル)オクタノエート(CellTrace(商標)近赤外DDAO-SE)、ならびに細胞のチオール基との反応により細胞を染色する、(2,3,6,7-テトラヒドロ-9-プロモメチル-1H,5H-キノリジノ(9,1-gh)-クマリン(CellTracker(商標)バイオレットBMQC)、7-アミノ-4-クロロメチル-クマリン(CellTracker(商標)ブルーCMAC)、5-クロロメチル-フルオレセインジアセテート(CellTracker(商標)グリーン)および5-クロロメチルローダミン(CellTracker(商標)レッド)などのクロロメチル反応性着色料(全てLife Technologies, Thermo Fisher Scientificから入手可能)を含む。細胞はまた、GFPに対してChalfieら、(1994)Science、263巻:802-805頁において論じられる通り、それだけには限定されないが、緑色蛍光タンパク質(GFP)、mCherry、tdTomato、KeimaRed、黄色蛍光タンパク質(YFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)を含めた、細胞内で発現される蛍光タンパク質の1つまたはそれ以上で示差的に標識され得る。

【0040】

10

20

30

40

50

外部から導入される蛍光着色料は、それにより試験細胞抗原の各集団が蛍光により相互に識別可能である手段を提供する。試験細胞抗原含有マトリクスの、外部から供給される細胞着色料からの蛍光発光は、本明細書以降で論じられる2次抗体の蛍光発光、およびアッセイ中に存在するあらゆる他の材料の蛍光と識別可能である。

【0041】

好ましい一実施形態において、免疫反応の量は、試験細胞と組み合わされる予吸着された各血清サブ試料に対して決定され、試験細胞の各集団に対するヒト抗体の結合は、試験細胞と混合される抗ヒト抗体での2次標識により検出される。抗ヒト抗体に好ましい標識は、その蛍光発光スペクトルが、(i)非感染の、(ii)HSV-1に感染している、および(iii)HSV-2に感染している抗原マトリクスを示差的に標識するのに用いられる着色料の蛍光発光スペクトルと重複しない、共有結合により連結されている蛍光化合物である。2次抗ヒト抗体にコンジュゲートすることができる、例示的な、共有結合により連結可能な蛍光色素は、それだけには限定されないが、アロフィコシアニン(APC)、フィコエリスリン(PE)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)およびペリジニククロフィルタンパク質(PerCP)を含む。

10

【0042】

予吸着されたサブ試料からのあらゆる未反応の抗体が、以前に論じられている通り、免疫反応生成物から分離されるのが好ましい。

【0043】

抗ヒト(2次)抗体に対する蛍光標識を用いることに加えて、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼおよびグルコースオキシダーゼなどの酵素標識は、よく知られている通り、好適な色素産生性の基質とのELISAアッセイにおいてしばしば利用される、2次抗体に共有結合によりコンジュゲートされ得る。

20

【0044】

抗ヒト(2次)抗体はそれ自体、ヒト以外の動物において産生される。例示的な2次抗体は、ヤギ、ロバ、ウマ、ウサギ、マウスおよびラットにおいて産生されたものを含む。これらの抗ヒト抗体が、ヒトFc抗体ポーションと反応するのが好ましい。

【0045】

どの試験細胞抗原に、予吸着された各サブ試料ポーション中に存在する抗体が結合したかを決定する際、それにより患者がHSV-1に感染していたか、HSV-2に感染していたか、両方に感染していたか、またはいずれにも感染していなかったかを確認することができる。

30

【0046】

それだけには限定されないが、蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダー、フローサイトメーターまたは蛍光活性化細胞ソーターを含めた、免疫蛍光を検出するあらゆる方法を用いて、あるとすれば、どの予吸着されたサブ試料が、試験細胞抗原に結合したかを決定することができる。好ましくは、フローサイトメーターまたはFACSは、このような機械が(1)試験細胞抗原含有マトリクスが、非感染であったか、HSV-1⁺またはHSV-2⁺であったかを示す示差的な蛍光色の両方を測定することができ、機器は同時に(2)試験下で主要変数であることを示す第2の蛍光色、すなわち非感染対HSV-1⁺対HSV-2⁺試験細胞抗原に結合しているヒト抗体の量を測定するため、利用される。

40

【0047】

以降の考察は、試験細胞抗原含有マトリクスとして、固定された細胞を利用する、特に好ましいアッセイを記載する。

【0048】

本発明は、先に記載したアッセイを行うための血清学的アッセイキットも企図する。例示的なキットは、a) i) 物理的マトリクスにおける非感染細胞からの細胞抗原、(ii) 同じまたは異なる物理的マトリクスにおけるHSV-1感染細胞からの細胞抗原、または(iii) (i) もしくは(ii)の物理的マトリクスと同じもしくは異なる物理的マトリクスにおけるHSV-2感染細胞からの細胞抗原のうちの1つを別々に含む、3つの

50

別々の容器を含む。

【 0 0 4 9 】

第 4 の容器も含まれる。第 4 の容器は、H S V - 1 または H S V - 2 のいずれによっても非感染の細胞からの試験細胞抗原、H S V - 1 により感染している細胞からの抗原、および H S V - 2 により感染している細胞からの抗原の混合物を含み、これらの各細胞抗原は、第 1 に命名したマトリクスと同じまたは異なる第 2 のマトリクスに連結している。これら 4 つの各容器は、少なくとも 1 つのアッセイを行うのに十分な量の列挙した成分を含む。

【 0 0 5 0 】

アッセイを行うための指示も、キット中に存在する。企図されるキットが、列挙した成分を保持する入れ物として提供されるのが好ましい。

10

【 0 0 5 1 】

企図されるアッセイキットの容器は、それに対して列挙した試薬が十分に接着しない、例えばポリエチレングリコール (P E G) コーティングおよびポリテトラフルオロエチレン (P T F E) のコーティングに対して、ガラスまたはプラスチックで作成されるのが典型的である。

【 0 0 5 2 】

上記に記載した血清学的アッセイキットは、少なくとも 1 つのアッセイを行うのに十分な量の標識抗ヒト抗体を含む第 5 の容器を含むのがさらに好ましい。抗ヒト抗体の標識は、その蛍光が、存在するあらゆる他の材料の蛍光と識別可能である蛍光材料であるのが好ましい。第 4 の容器の、固定された細胞の混合物が、それにより試験細胞抗原マトリクスの各集団が、規定された波長における蛍光発光の強度によって他から識別可能であり、アッセイにおいて利用されるあらゆる他の蛍光種とも識別可能である、外部から導入される蛍光着色料をさらに含むのも好ましい。

20

【 0 0 5 3 】

例示的な 3 つの細胞集団の型特異的 A B V I C アッセイ

【 0 0 5 4 】

好ましい一実施形態において、本発明は、対象が、H S V - 1 に感染しているか、H S V - 2 に感染しているか、両方に感染しているか、またはいずれにも感染していないかを決定するための血清学的アッセイである。アッセイは、対象から得た血清試料を、少なくとも 3 つの血清サブ試料に分割するステップ、血清サブ試料を、固定および透過処理された試験細胞の少なくとも 3 つの集団に予吸着させるステップ、予吸着した血清サブ試料を、懸濁液中の少なくとも 3 つの集団の試験細胞の混合物とインキュベートするステップ、血清サブ試料を検出抗体とインキュベートするステップ、ならびに細胞 - 血清サブ試料の混合物をフローサイトメーターで分析するステップを含む。

30

【 0 0 5 5 】

1 つまたはそれ以上の単純ヘルペスウイルスが、単純ヘルペスウイルス 1 型 (H S V - 1) および単純ヘルペスウイルス 2 型 (H S V - 2) を含む群から選択されるのが好ましい。

【 0 0 5 6 】

固定および透過処理された細胞の少なくとも 3 つの集団がペロ細胞であるのが好ましく、この場合、第 1 の集団は非感染であり、第 2 の集団は H S V - 1 に感染しており、第 3 の集団は H S V - 2 に感染している。

40

【 0 0 5 7 】

懸濁液中の試験細胞の少なくとも 3 つの集団がペロ細胞であるのが好ましく、この場合、第 1 の集団は非感染で非標識であり、第 2 の集団は H S V - 1 に感染しており、低濃度の第 1 の蛍光分子で標識され、第 3 の集団は H S V - 2 に感染しており、高濃度の第 1 に記載した蛍光分子で標識されている。第 1 の蛍光分子が、カルボキシフルオレセインジアセテート、スクシンイミジルエステル (C F S E) であるのが好ましい。

【 0 0 5 8 】

50

検出抗体が抗 I g G 抗体であるのが好ましく、血清がアッセイされる対象がヒトである場合は抗ヒト I g G が好ましい。検出抗体が第 2 の蛍光分子で標識されているのも好ましい。第 2 の蛍光分子は、試験細胞の各集団を標識するのに用いられる第 1 の蛍光分子の蛍光発光スペクトルと重複しない、蛍光発光スペクトルを有していなければならない。適切な第 2 の蛍光分子は、アロフィコシアニン (A P C) であるが、本明細書に記載する他のフルオロフォアの多くも適切である。

【 0 0 5 9 】

フローサイトメトリー装置は、約 1 ミクロンから約 2 0 ミクロンの、装置に好適な直径の、個々の抗原含有試験マトリクスに関連する蛍光を定量的に測定することができるあらゆる装置であってよい。このような好適なサイズに作られている抗原含有試験マトリクスの例は、それだけには限定されないが、(1) 非感染の生ペロ細胞、(2) 固定および透過処理された非感染のペロ細胞、(3) H S V - 1 に感染している生ペロ細胞、(4) 固定および透過処理された H S V - 1 に感染しているペロ細胞、(5) H S V - 2 に感染している生ペロ細胞、または(6) 固定および透過処理された H S V - 2 に感染しているペロ細胞を含む。細胞ソーティング装置がフローサイトメーターであるのが好ましいが、蛍光活性化セルソーター (F A C S) が同じ目的で用いられ得るものの、一般的にこのような装置は約 2 0 倍高価であり、よって細胞に関連する蛍光強度を測定するより初歩的な作業 (フローサイトメーターで一般的に行われる) と対照的に、蛍光強度に基づいて「細胞を選別する (s o r t i n g c e l l s) 」(ゆえに装置の名称である) 行為のために確保される。

【 0 0 6 0 】

ウイルス感染細胞に対する抗体結合 (A B V I C) : 汎 H S V - 2 I g G 抗体を測定するための E L I S A より高感度な方法 - 2 つの細胞試験

【 0 0 6 1 】

本明細書で論じる通り、全ての H S V - 2 抗原に結合する血清 I g G 抗体 (汎 H S V - 2 I g G) の存在は、ペロ細胞の単層における H S V - 2 プラークの赤色蛍光免疫染色によって可視化され得る (図 1 A および B) 。無処置血清には H S V - 2 抗体がなく、よって H S V - 2 + 細胞の赤色免疫蛍光染色は生じない (図 1 A) 。 H S V - 2 免疫動物からの血清は H S V - 2 抗体を含んでおり、この試験において赤色免疫蛍光染色を生じる (図 1 B) 。新規な A B V I C アッセイはこの同じ原理に頼るが、このアッセイははるかに定量的である、というのは、抗体試験は、フローサイトメーターにおける赤色免疫蛍光染色に対して分析され得る、懸濁液中の単一細胞の集団に対して行われるからである (図 1 C および 1 D における y 軸) 。

【 0 0 6 2 】

このアッセイは、ウイルス感染細胞に対する抗体結合を測定するため、「 A B V I C アッセイ」と呼ばれる。 H S V - 2 感染 (H S V - 2 +) 細胞は緑色フルオロフォアである C F S E で標識されるが、非感染 (U I) 細胞にはこの標識がなく、これが 2 つの細胞集団がフローサイトメーターにおいて区別されるのを可能にする (図 1 C および 1 D の x 軸) 。

【 0 0 6 3 】

試験細胞懸濁液を、無処置マウスまたは免疫化マウスからの血清とインキュベートし、 U I または H S V - 2 + 細胞に結合している I g G 抗体の量を、赤色蛍光標識 (アロフィコシアニン ; A P C) を保有する抗マウス I g G 2 次抗体によって検出した (図 1 C および D の y 軸) 。細胞を無処置マウスの血清とインキュベートした場合、同様のレベルの I g G 抗体が H S V - 2 + および U I 細胞に結合した。具体的に述べると、平均蛍光強度 (M F I) は、両集団において約 7 , 0 0 0 であった (図 1 C) 。対照的に、細胞懸濁液を、 H S V - 2 ワクチン接種したマウスからの血清とインキュベートした場合、 H S V - 2 + 細胞に対する抗体結合 (M F I 約 6 0 0 , 0 0 0) は U I 細胞より約 2 0 倍高かった (図 1 D) 。

【 0 0 6 4 】

抗体捕捉 E L I S A および A B V I C を並べて比較して、これらの相対感度を比較した (図 9 C) 。マウス $n = 48$ における $\log (\text{汎 HSV - 2 I g G})$ の E L I S A 推定値を x 軸上にプロットし、同じマウスからの A B V I C 推定値を y 軸上にプロットした (図 9 C) 。 2 つの方法が等しく高感度であれば、データ点は「 $\log 0$ 」の等価線の周りに点在しなければならない。しかし、陽性試料 36 個のうち 35 個は等価線より上にあり、A B V I C アッセイは、E L I S A よりも 5 ± 1 倍高い汎 HSV - 2 I g G 抗体の存在量の推定値を生じた (図 9 C) 。これは、A B V I C アッセイは、E L I S A ベースの、H S V 特異的抗体の存在量の推定値より高感度で正確であったという結果を支持したいくつかの分析のうちの 1 つである。

【 0 0 6 5 】

2 つの細胞集団 A B V I C アッセイは、「 HSV - 2 不確定」患者 4 人中 2 人が血清陰性であることを実証する

【 0 0 6 6 】

臨床血清試料は、2011 年以來、Terri Warren (Westover Heights Clinic) から周期的に入手した。Quorum IRB (Seattle, WA) および SIU School of Medicine の Springfield Committee for Research on Human Subjects は両方とも、脱同定した (de - identified) 血清だけが評価されたため、研究は「除外 (exempt) 」であったと結論を下した。A B V I C アッセイを用いたヒト血清の分析は、以下の通り記載される。

【 0 0 6 7 】

血清陰性個体 $n = 3$ からの血清が、HSV - 2⁺ 細胞および UI 細胞に対する抗体結合のバックグラウンドレベルを規定した (図 10 A) 。 HSV - 2 性器ヘルペス患者 $n = 3$ からの血清は、UI 細胞よりも 10 倍から 20 倍高いレベルで HSV - 2⁺ 細胞に結合する抗体を所有していた (図 10 B) 。血清学的状態が HerpeSelect (登録商標) E L I S A および HSV ウエスタンブロットにより不確定であった患者 4 人からの血清が、A B V I C アッセイにおいて試験された。A B V I C アッセイは、不確定血清試料 1 および 2 が実際に HSV - 2 血清陰性であったことを実証した (図 10 C) 。不確定血清試料 3 および 4 からの血清は HSV 陽性結果を生じた (図 10 D) が、A B V I C アッセイは、これらの個体が HSV - 1 に感染していたか、HSV - 2 に感染していたか、または両方のウイルスに感染していたかを識別できなかった。この限界を克服し、HSV 型特異的 A B V I C アッセイを開発するためにさらなるステップをとった。

【 0 0 6 8 】

例示的な 3 つの細胞集団の型特異的 A B V I C アッセイ

【 0 0 6 9 】

2 つの修飾によって、2 つの細胞集団 A B V I C アッセイを、3 つの細胞集団の HSV 型特異的 A B V I C アッセイに変換した。これらの変更は、1) UI 細胞、HSV - 1⁺ 細胞または HSV - 2⁺ 細胞に対する血清の予吸着 (図 11) ; および 2) UI 細胞対 HSV - 1⁺ 感染細胞対 HSV - 2⁺ 感染細胞の 3 つの集団に対する予吸着された血清の試験であった (図 12) 。

【 0 0 7 0 】

血清の予吸着に関して、HSV - 1 および / または HSV - 2 に感染している患者は、以下の最高 3 つの集団の HSV 抗体を有する : 1) HSV - 1 および HSV - 2 抗原タンパク質に結合する型共通抗体 (図 11 における Z) ; 2) HSV - 1 抗原タンパク質だけに結合する HSV - 1 特異的抗体 (図 11 における X) ; および 3) HSV - 2 抗原タンパク質だけに結合する HSV - 2 特異的抗体 (図 11 における Y) 。

【 0 0 7 1 】

HSV - 2 特異的抗体が濃縮された集団は、HSV に感染している対象 (ヒトまたは他の動物) からの血清を、型共通および HSV - 1 特異的抗体を枯渇する固定 HSV - 1⁺ 細胞に予吸着させ (図 11、中央の縦列) 、存在するあらゆる抗 HSV - 2 抗体の相対的

10

20

30

40

50

濃度を増強することにより得ることができる。同様に、HSV-1特異的抗体が濃縮された集団は、血清をHSV-2⁺細胞に予吸着することにより得ることができる(図11、右の縦列)。UI細胞に対する予吸着(図11、左の縦列)は、手順のあらゆる効果に対する対照として働く。

【0072】

3つの細胞集団のアッセイに関して、フローサイトメーターにおいて分離され得る、UI細胞(CFSEなし)、HSV-1⁺細胞(CFSE^{low})およびHSV-2⁺細胞(CFSE^{high})の集団を生じる最適化されたCFSE標識プロトコールが開発された(図12)。UI細胞は2色プロットの左側に出現し、HSV-1⁺細胞およびHSV-2⁺細胞は、低(low)および高(high)CFSEレベルで標識され、よってそれぞれ中央および右側の集団として出現する(図12A)。血清予吸着およびこの3つの細胞集団のアッセイを組み合わせることにより、HSV型特異的なウイルス感染細胞に対する抗体の結合(ABVIC)アッセイが実現された。代表的な結果が、以下の通り表される。

10

【0073】

血清陰性の血清試料を、各細胞集団に対する予吸着後、試験細胞とインキュベートした。UI細胞に対する予吸着の後、細胞に対する無視できる抗体結合が認められた(図12A、左グラフ)。HSV-1⁺細胞またはHSV-2⁺細胞に対する予吸着の後、同様の結果が得られた(図12A、中央および右のグラフ)。

【0074】

既知のHSV-2血清陽性個体の血清を、各細胞集団に対する予吸着の後、試験細胞とインキュベートした。UI細胞に対する予吸着の後、HSV特異的抗体は、HSV-1⁺およびHSV-2⁺細胞に、それぞれ10倍および15倍UI細胞より高いレベルで結合した(図12B、左グラフ)。血清がHSV-1⁺細胞に予吸着された場合、高レベルのHSV-2特異的抗体が残存し、HSV-2⁺細胞に結合し(図12B、中央のグラフ、囲み)、よってこの患者はHSV-2血清陽性であった。この患者の血清がHSV-2⁺細胞に予吸着された場合、HSV-1⁺細胞に対する抗体結合が消失し(図12B、右のグラフ、囲み)、よってこの患者はHSV-1血清陰性であった。これらの結果は、先のウエスタンブロット試験と一致した。

20

【0075】

先に論じた不確定血清試料3を、3つの各細胞集団に対する別々のサブ試料の予吸着の後、試験細胞とインキュベートした。UI細胞に対する予吸着の後、HSV特異的抗体は、HSV-1⁺およびHSV-2⁺細胞に、それぞれ100倍および20倍UI細胞より高いレベルで結合した(図12C、左グラフ)。血清がHSV-1⁺細胞に予吸着されると、HSV-2⁺細胞に対する抗体結合は消失し(図12C、中央グラフ、囲み)、よってこの患者はHSV-2血清陰性であった。血清がHSV-2⁺細胞に対して予吸着された場合、高レベルのHSV-1特異的抗体が残存し(図12C、右グラフ、囲み)、よってこの患者はHSV-1血清陽性であった。

30

【0076】

これらの所見は、不確定血清試料3を提供した患者はHSV-1に感染していたが、血清試料を得た時点でHSV-2には感染していなかったことを示した。不確定血清試料4は、等価な結果を生じた(示さず)。したがって、3つの細胞集団の型特異的ABVICアッセイは、不確定血清試料3および4は両方とも、HSV-2血清陰性であり、HSV-1血清陽性であったことを実証した。

40

【0077】

HSV-2不確定血清試料1、2、3および4は、患者がHSV-2に感染しておらず、よっていかなる性的接触に対してHSV-2性器ヘルペスを伝播し得ないことを正しく知らせるためのより良好なHSV血清学的アッセイが入手可能であれば、多くの不安および悩みを節約できる4人の患者を表す。

【0078】

例示的な3つの細胞集団の型特異的ABVICアッセイはHerpeSelect(登録

50

商標)よりも高感度である

【0079】

HerpeSelect (登録商標) アッセイ (Quest Diagnostics, Inc.) は、HSV-1 (gG-1) または HSV-2 (gG-2) の G 糖タンパク質に特異的な抗体の存在に対して試験する抗体捕捉 ELISA である [Whittington ら、2001 年]。これらは、知られている中で最も多岐にわたる 2 つの HSV タンパク質である [Sanchez-Martinez ら、1991 年; Roizman ら、1984 年]。HSV-1 に感染している患者は、gG-1 を含めた 30 個の HSV-1 タンパク質に対して抗体応答を開始することができ、同様に HSV-2 感染は、gG-2 を含めた 30 個の HSV-2 タンパク質に対する抗体応答を駆動することができる [Norriild ら、1981 年; Gilman ら、1981 年] (図 13A および 13C)。

10

【0080】

HSV-2 HerpeSelect (登録商標) アッセイの決定的な弱点は、このアッセイは、感染しているヒトの HSV-2 特異的抗体の全レパートリーの 3 - 10% を表す、gG-2 に対する抗体しか試験しないことである (図 13B 対 13C)。HerpeSelect (登録商標) 試験は、他の 90 - 97% の gB、gC、gE、gH に対する HSV-2 特異的抗体、および HSV-2 の他の主要な 25 個の抗原を考慮していない。HSV-2 特異的抗体を全て検出する潜在性のある試験は、HerpeSelect (登録商標) 試験に比べて、感受性の 10 倍から 30 倍の増大をもたらさなければならない (図 13B 対 13C)。例示的な 3 つの細胞集団の型特異的 ABVIC アッセイは、約 75 個全ての HSV-2 タンパク質を含み、よって HSV-2 特異的抗体全てに結合することができる、固定および透過処理された HSV-2⁺ 細胞からの細胞抗原を試験試薬として用いることにより、この目標を実現する。

20

【0081】

例示的な 3 つの細胞集団の型特異的 ABVIC アッセイはウエスタンブロットよりも高感度である

【0082】

例示的な 3 つの細胞集団の型特異的 ABVIC アッセイは、汎 HSV 型特異的抗体に対して試験し、内部コントロールされ、数千の反復測定に基づくという点で、HSV の血清学的アッセイの中でも独特である。ABVIC アッセイでは、数千の HSV-2⁺ 細胞対 UI 細胞に結合する患者の IgG 抗体のレベルが測定され、これらの量が、血清陰性および HSV-2 血清陽性の対照血清のパネルによって生成される量と比較される。

30

【0083】

よって、「血清陰性」と「血清陽性」との間のカットオフは、好適とみなされる任意のレベルの統計学的有意性に設定することができる (例えば、不確定の血清試料 3 を提供した患者が HSV-2 である確率は 100 万分の 1 未満であった; 図 12C; $p < 0.00001$)。対照的に、ウエスタンブロット分析は定性的なアッセイであり、それ自体、統計的に決定された確率を、「HSV-2 血清陰性」の診断に対して割り当てるものではない。

40

【0084】

(i) 非感染の、(ii) HSV-1⁺、および/または (iii) HSV-2⁺ の試験細胞に対するヒト抗体結合の検出

【0085】

A. 免疫蛍光顕微鏡検査

感染の小型病巣 (別名「ブランク」) を形成させる、少量の HSV-1 または HSV-2 ウイルスに感染している単層のペロ細胞の状況において、非感染細胞対ウイルス感染細胞に結合する患者血清試料の能力を比べることにより、患者血清試料が HSV-2 抗体を含んでいるか否かを決定することが可能である。型特異的 ABVIC 試験のこの実施形態において、ウイルス感染細胞に対するヒト抗体の結合は、蛍光顕微鏡で可視化され得る (

50

図 23 - 24)。このような実験系の、「HSV - 2 特異的抗体」に対する試験への変換は、以下などの 3 エLEMENT で実現され得る：

- 1 . 単層の哺乳動物細胞における HSV - 1 プラーク；
- 2 . 単層の哺乳動物細胞における HSV - 2 プラーク；
- 3 . 非感染 (UI) 抗原マトリクス、HSV - 1⁺ 抗原マトリクス、および HSV - 2⁺ 抗原マトリクス。

【0086】

このような試験の特定の例は、図 23 において説明され、この場合、用いられる哺乳動物細胞系は「ベロ細胞」として知られるアフリカミドリザル腎細胞系であり、予吸着のために抗原を固定化するのに用いられたマトリクスは臭化シアン (CNBr) 活性化セファロース 4B (GE Healthcare Life Sciences) であった。HSV - 1 プラークおよび HSV - 2 プラークの両方 (すなわち、ウイルス感染細胞の領域) が、細胞の収集および固定時にウイルスが未だ到達していない、非感染 (UI) 細胞の「黒色領域」によって取り囲まれていることに留意されたい。

【0087】

よって、「平均赤色蛍光強度」(MFI) における差は、ある人の目が、この個体が「HSV 特異的抗体」を有するにちがいないことをある人に告げることを留意するものであり、これは型特異的 ABVIC 試験の、より定量的なフローサイトメトリーベースの変形形態において比較されるのと正確に同じ量である。図 23 の画像において、抗体結合は、顕微鏡写真において捕捉される赤色を生成する「AlexaFluor 594 コンジュゲートヤギ抗ヒト IgG」抗体で可視化された。

【0088】

具体的に述べると、HSV - 2 血清陽性であることが分かっていた患者の血清を用いて、これら 3 セットの試薬が HSV - 2 特異的抗体の存在を試験するのに有用であったことを確認した。図 23 A に示した一番上のパネルで始め、この患者の血清試料を 1 : 2, 000 希釈し、いかなる抗原マトリクスに対して予吸着させなかった場合、これは、(i) 左に示す HSV - 1 プラークおよび (ii) 右に示す HSV - 2 プラークの両方に集合的に結合する、HSV 型共通抗体および HSV - 2 特異的抗体の混合物を含んでいた。よって、非吸着の患者血清は、この個体が HSV - 1 および / または HSV - 2 に感染していたか否かを決定するのに不十分であった。

【0089】

この患者の血清試料を 1 : 2, 000 希釈し、非感染 (UI) 細胞抗原のマトリクスに予吸着させた場合、これは (i) 左に示す HSV - 1 プラークおよび (ii) 右に示す HSV - 2 プラークの両方に集合的に結合する、HSV 型共通抗体および HSV - 2 特異的抗体の混合物を依然として含んでいた。よって、UI 細胞抗原を予吸着された患者血清は、この個体が HSV - 1 および / または HSV - 2 に感染していたか否かを決定するのに不十分であった (図 23 B)。

【0090】

この患者の血清試料を 1 : 2, 000 希釈し、HSV - 1 感染 (HSV - 1⁺) 細胞抗原のマトリクスに予吸着させた場合、HSV 型共通抗体は枯渇されたが、HSV - 2 特異的抗体は残存した。よって、HSV - 2 特異的抗体が濃縮された集団は、左の HSV - 1 プラークに不十分にしか結合しなかったが、右に示す HSV - 2 プラークに強力に結合した。HSV - 1 細胞抗原を予吸着させた患者血清は、この個体が HSV - 2 血清陽性であったことを決定するのに十分であり、これは基礎となる HSV - 2 感染に関する予測を示す (図 23 C)。

【0091】

最後に、この患者の血清試料を 1 : 2, 000 希釈し、HSV - 2 感染 (HSV - 2⁺) 細胞抗原のマトリクスに予吸着させた場合、HSV 型共通抗体および HSV - 2 特異的抗体が枯渇された。この患者が HSV - 1 に感染しており、よって HSV - 1 血清陽性であれば、存在する HSV - 1 特異的抗体は残存する。しかし、最後のパネルに観察される

10

20

30

40

50

のは、HSV-2を予吸着させた血清は、左のHSV-1プラークに結合している抗体を、右に示すHSV-2プラークより高いレベルまで有していなかったことである。よって、このHSV-2細胞抗原を予吸着させた患者血清は、この個体がHSV-1血清陰性であったことを決定するのに十分であった(図23D)。

【0092】

図24において、HSV-1およびHSV-2の両方に血清陽性であることが分かっていた患者の血清を用いた、同一の試験の結果を示す。図23に提供したのと同じ原理を用いて、患者のHSV-1細胞抗原を予吸着させた血清で得たデータは、個体がHSV-2血清陽性であることを示す(図24C)。同様に、患者のHSV-2細胞抗原を予吸着させた血清で得たデータは、個体がHSV-1血清陽性であることを示す(図24D)。

10

【0093】

B. フローサイトメトリー

非感染の、HSV-1に感染している、およびHSV-2に感染している哺乳動物細胞の懸濁液の状況において、非感染細胞対ウイルス感染細胞に結合する患者の血清試料の能力を比較することにより、患者の血清試料がHSV-2特異的抗体を含むか否かを決定することができる。型特異的ABVICアッセイのこの実施形態において、ウイルス感染細胞に対するヒト抗体の結合は、フローサイトメーターを用いて定量的に測定することができる(図15-18)。

【0094】

このような実験系は、以下の3つのエレメントを用いて「HSV-2特異的抗体」を測定するのに用いることができる：

20

1. HSV-1に感染している哺乳動物細胞；
2. HSV-2に感染している哺乳動物細胞；ならびに
3. 非感染(UI)の試験細胞抗原マトリクス、HSV-1に感染している試験細胞の抗原マトリクス、およびHSV-2に感染している試験細胞の抗原マトリクスの3つの集団。

【0095】

このような試験の具体的な例は図15-18において説明され、この場合、用いられた哺乳動物細胞系はペロ細胞であり、用いられた抗原マトリクスは、非感染の、HSV-1に感染している、またはHSV-2に感染している、ペロ細胞の、ホルムアルデヒド固定およびメタノール固定および透過処理された懸濁液であった。

30

【0096】

ABVICアッセイのこの特定の実施形態において、固定および透過処理されたUI細胞、HSV-1⁺細胞およびHSV-2⁺細胞を含む試験細胞懸濁液に対する患者の抗体の結合は、フローサイトメーターのFL4チャンネルにおいて測定される近赤外色を生成する、「アロフィコシアニン(APC)コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG」抗体を用いて測定された(図15-18における各サブパネルのy軸)。具体的に述べると、各パネルにおいて示す比較は、バックグラウンド対照として働く非感染(UI)細胞に結合しているヒト抗体の量、対、HSV-1⁺細胞またはHSV-2⁺細胞に対する抗体の結合である。型特異的ABVICアッセイのこの特定の実施形態において、試験細胞の3つの集団は、緑色フルオロフォアであるカルボキシフルオレセインN-スクシンイミジルエステル(CFSE)で示差的に標識することにより、フローサイトメーターのFL1チャンネルにおいて区別されている。

40

【0097】

図14におけるデータは、CFSEで示差的に標識したUI細胞(図14A)、HSV-1⁺細胞(図14B)またはHSV-2⁺細胞(図14C)の純粋な集団は、フローサイトメーターで>99.7%の信頼度のレベルで容易に区別されることを確認する。同様に、図15-18におけるデータは、試験細胞の3つの集団全ての混合物は、依然としてFL1チャンネルにおいて容易に区別されることを直接的に実証し、このためFL4チャンネル(近赤外色)は、HSV細胞対UI細胞間の「平均蛍光強度における差」(MF

50

I) を測定するようにフリーにされ、MFI は HSV 感染細胞対 UI バックグラウンド対照細胞のサブ集団に結合している HSV 特異的抗体の量と直接相関する (Halford ら、2013 年)。

【0098】

図 15 は、試験細胞のこれらの集団が、HSV 血清陰性であることが分かっている 4 個体の血清と組み合わせられた場合、HSV-1⁺細胞および HSV-2⁺細胞対非感染 (UI) のバックグラウンドの対照細胞に対する、抗体結合のバックグラウンドの量を説明する (図 15A - 15D)。

【0099】

型特異的 ABVIC 試験のフローサイトメトリーベースの実施形態に独特である、3 つの重要な定量上の特徴が存在し、これらは以下の通りである：

1. 「HSV 特異的抗体」レベルの推定値は、n が約 20,000 個の UI 細胞対 n が約 20,000 個の HSV-1⁺細胞対 n が約 20,000 個の HSV-2⁺細胞の間の FL4 チャンネル (y 軸) における平均蛍光強度 (MFI) における差に基づいており、これは患者の血液中の HSV 特異的抗体の存在量の定量的推定値における高度の信頼度を提供する；

2. UI 細胞は、アッセイのバックグラウンドを規定する内部標準を提供し、よってアッセイは、血液がより高いバックグラウンドのシグナルを引き起こす抗体を有する患者に対して非感受性であり、この高いバックグラウンドのシグナルは、HerpeSelect (登録商標) アッセイおよびヘルペスウエスタンプロットを混乱させる主要な変数であり、患者が HSV-2 感染 / HSV-2 血清陽性であるという誤った結果に多くの人を誤解させる「不確定」結果の少なくとも 50% の根拠となる可能性がある；

3. 患者自身の MFI_{HSV-1} または MFI_{HSV-2} 値が、対照の HSV 血清陰性試料に対する MFI_{HSV-1} または MFI_{HSV-2} 値の正規分布になる場合に基づいて、HSV-1⁺細胞に関連する MFI_{HSV-1} ($MFI_{HSV-1} - MFI_{UI}$) の平均値および標準偏差、ならびに HSV-2⁺細胞に関連する MFI_{HSV-2} ($MFI_{HSV-2} - MFI_{UI}$) の平均値および標準偏差を規定することは、所与の患者が HSV-1 血清陰性または HSV-2 血清陰性である確率を統計学的に分析する機会を作り出す (図 21 および 22)。これらの考察に基づき、1 × バックグラウンドは、HSV 血清陰性対照における全ての MFI_{HSV-1} および MFI_{HSV-2} 値の平均に等しく設定される。

【0100】

図 16 は、HSV-1 血清陽性 (図 16A)、弱く HSV-2 血清陽性 (図 16B)、強く HSV-2 血清陽性 (図 16C)、または HSV-1 / HSV-2 二重血清陽性 (図 16D) であることが分かっている (ヘルペスウエスタンプロットに基づき) 個体での、型特異的 ABVIC 試験のフローサイトメトリーベースの実施形態により生成されたデータを説明する。各タイプの個体は、以下の通りに考えられる。

【0101】

HSV-1 血清陽性である個体に対して、対照の「UI 予吸着」血清試料 (図 16A における左パネル) は、バックグラウンドを 63 倍超える MFI_{HSV-1} 、およびバックグラウンドを 11 倍超える MFI_{HSV-2} を示す。同じ血清試料が HSV-1 抗原マトリクスに予吸着される場合、型共通抗体および HSV-1 特異的抗体が除去される。よって、図 16A の中央パネルにおいて、 MFI_{HSV-1} はバックグラウンドを超えて 1.0 倍まで低減し、 MFI_{HSV-2} はバックグラウンドを超えて約 1.4 倍まで低減し、これは、この個体が HSV-2 特異的抗体を保有しないことを示す。最後に、同じ血漿試料が HSV-2 抗原マトリクスに予吸着される場合、型共通抗体および HSV-2 特異的抗体が除去される。よって、図 16A の一番右のパネルにおいて、 MFI_{HSV-1} はバックグラウンドを超えて 41 倍まで回復し、よってこのヒトは高力価の HSV-1 特異的抗体を有することを示す。

【0102】

10

20

30

40

50

後続の統計学的考察に基づいて(図21-22)、図16Aに表す分析用に採血された個体について以下の数学的結論に到達することができる(「患者16A」として血清試料を提供した患者に関して)。

- HSV-1: 患者16AがHSV-1血清陰性である確率は0.01%未満である。
- HSV-2: 患者16AがHSV-2血清陰性である確率は55%である。
- 結論: 患者16AはHSV-1血清陽性であり、HSV-2血清陰性である。

【0103】

HSV-2血清陽性である個体に対して、対照の「UI予吸着」血清試料(図16Bおよび図16Cにおける左パネル)はそれぞれ、バックグラウンドを7倍および30倍超える $MF I_{HSV-1}$ を示し、バックグラウンドを8倍および47倍超える $MF I_{HSV-2}$ を示す。これらの血清試料がHSV-1抗原マトリクスに予吸着された場合(図16Bおよび図16Cの中央パネル)、 $MF I_{HSV-1}$ はそれぞれ、バックグラウンドを超えて約0.2倍および0.9倍まで低減し、 $MF I_{HSV-2}$ は、バックグラウンドを超えて4倍および29倍まで低減するにすぎず、これは、両方の個体がHSV-2特異的抗体を有すると思われることを示す。最後に、これら同じ血清試料がHSV-2抗原マトリクスに予吸着された場合(一番右のパネル)、患者#1の $MF I_{HSV-1}$ は0.3まで低減し、患者は明らかにHSV-1血清陰性であることを示すが(図16B)、患者#2の $MF I_{HSV-1}$ はバックグラウンドを4.2倍超えたままである(図16C)。後続の統計学的考察に基づいて(図21-22)、図16Bおよび図16Cにおいて分析したこれらの個体について以下の数学的結論に到達することができる(「患者16B」は「患者#1」でもあり、「患者16C」は「患者#2」でもある):

- HSV-1: 患者16BがHSV-1血清陰性である確率は87%である。
- HSV-2: 患者16BがHSV-2血清陰性である確率は0.1%である。
- 結論: 患者16BはHSV-1血清陰性であり、HSV-2血清陽性である。
- HSV-1: 患者16CがHSV-1血清陰性である確率は3%である。
- HSV-2: 患者16CがHSV-2血清陰性である確率は0.01%未満である。
- 結論: 患者16CはHSV-1不定(equivocal)であり、HSV-2血清陽性である。

【0104】

HSV-1血清陽性であり、HSV-2血清陽性である個体に対して、対照の「UI予吸着」血清試料(図16Dにおける左パネル)は、バックグラウンドを290倍超える $MF I_{HSV-1}$ 、およびバックグラウンドを100倍超える $MF I_{HSV-2}$ を示す。この血清試料がHSV-1抗原マトリクスに予吸着された場合(図16Dの中央パネル)、 $MF I_{HSV-1}$ はバックグラウンドを超えて2倍まで低減するが、 $MF I_{HSV-2}$ はバックグラウンドを超えて52倍まで低減するにすぎず、この個体はHSV-2特異的抗体を有することを示す。この血清試料がHSV-2抗原マトリクスに予吸着された場合(一番右のパネル) $MF I_{HSV-1}$ はバックグラウンドを超えて95倍まで低減するにすぎず、これらは明らかにHSV-1血清陰性であることを示す(図16D)。後続の統計学的考察に基づいて(図21-22)、この個体について以下の数学的結論に到達することができる:

- HSV-1: 患者16DがHSV-1血清陰性である確率は0.01%未満である。
- HSV-2: 患者16DがHSV-2血清陰性である確率は0.01%未満である。
- 結論: 患者16DはHSV-1血清陽性であり、HSV-2血清陽性である。

【0105】

非感染、HSV-1⁺またはHSV-2⁺抗原マトリクスに対するヒト抗体の予吸着

【0106】

A.CNBr活性化したセファロース(登録商標)4Bマトリクスに対する予吸着

型特異的ABVIC試験における、予吸着ステップのための、UI、HSV-1またはHSV-2細胞抗原マトリクスとしての、臭化シアン(CNBr)で活性化したSepharose(登録商標)4B(GE Healthcare Life Science

10

20

30

40

50

s)の使用例を、図23および24に示す。

【0107】

B. 固体マトリクスに付着させた固定ペロ細胞に対する予吸着

型特異的ABVIC試験における、予吸着ステップのための、UI、HSV-1またはHSV-2細胞抗原マトリクスとしての、固定および透過処理されたペロ細胞の使用例を、図15、16、17および18に示す。この特定の試験において、UI、HSV-1⁺またはHSV-2⁺ペロ細胞を、プラスチック製ディッシュの基質に固定し、ディッシュ中でこれらを培養し、培養したものはヒト血清が予吸着された細胞抗原マトリクスとして作用した。同様に、UI、HSV-1⁺またはHSV-2⁺ペロ細胞の懸濁液は、試験細胞に対するヒト抗体結合のフローサイトメトリー分析前に、ヒト血清の予吸着のための細胞抗原マトリクスとして用いた。

10

【0108】

(i)非感染の、(ii)HSV-1⁺、および/または(iii)HSV-2⁺である、固定試験細胞または細胞抗原マトリクスは、長時間安定である。固定の概念は、この語が意味するように、生物学的組織を、崩壊せず、よって長時間安定である形態に「固定」することを伴う。これは、人間を葬式の準備用にエンバーミングする基本であり、古代エジプトにおいて保存されるミイラを生成するために実践された。ホルムアルデヒド、メタノール、エタノール、アセトンなどの固定液の使用は、生物学では19世紀以来、通常のことである。本発明者らの実験室における試験では、(1)固定された、非感染の、HSV-1⁺、もしくはHSV-2⁺ペロ試験細胞の懸濁液、または(2)非感染の、HSV-1⁺、または(iii)HSV-2⁺細胞抗原マトリクスは、4で少なくとも1か月間安定である。

20

【0109】

非感染(UI)対照の抗体試験は、HSV血清陰性をHSV血清陽性と識別するのに十分であるが、ある個体がHSV-1に感染しているか、HSV-2に感染しているか、または両方に感染しているかを識別しない。図16Dにおけるパネルの一番左の縦列は、HSV-1血清陽性およびHSV-2血清陽性の個体全てが、HSV-1⁺およびHSV-2⁺両方のペロ試験細胞と交差反応する、両方の型共通抗体を有することを説明する。よって、予吸着の非存在下、またはUI細胞に対する予吸着後、患者がHSV-1および/またはHSV-2に感染しているか否かを明らかに区別するのは不可能である。

30

【0110】

対象の血清中にHSV-1特異的抗体が存在することは、対象がHSV-1血清陰性であった確率の計算を可能にし、よって、対象がHSV-1血清陰性である確率が0.5%未満であれば、対象はHSV-1血清陽性であると推測することができる。これらの点を支持するデータは図16(一番右の縦列)、図19-20(HSV-2予吸着)および図22Aに表される。

【0111】

HSV-2特異的抗体の存在は、対象がHSV-2血清陰性である確率を計算できるようにし、よって、対象がHSV-2血清陰性である確率が0.5%未満であれば、対象はHSV-2血清陽性であると推測することができる。これらの点を支持するデータは、図16(中央の縦列)、図19-20(HSV-1予吸着)および図22Bに表される。

40

【0112】

型特異的ABVICアッセイは、(i)非感染の対照試験、(ii)HSV-1特異的抗体試験および(iii)HSV-2特異的抗体試験を組み合わせる。これらの点を支持するデータは、図15-18および図23-24に表される。

【0113】

型特異的ABVICアッセイは高度に定量的であり、対象がHSV-1および/またはHSV-2血清陽性である確率の統計学的な解釈を可能にする。これらの点を支持するデータは図21-22において表される。

【0114】

50

型特異的 A B V I C アッセイの定量的および統計学的検出力は、試験が、ヘルペスウエスタンプロットの不確定試験結果を分離できるようにする。これらの点を支持するデータは図 17、18、20 および 22 に表される。試験下での不確定患者は全員、以前のヘルペスウエスタンプロットに基づいて、HSV - 2 に感染している可能性があることを知らされた。不確定患者 n = 7 の血清を、型特異的 A B V I C アッセイにおいて分析し (図 21 - 22 による)、これら 7 人中 6 人からの生データは図 17 および 18 に表され、以下の通り「患者 17 A - 17 C」および「患者 18 A - 18 C」に対して統計学的に概要される：

- HSV - 1 : 患者 17 A が HSV - 1 血清陰性である確率は 61 % である。
- HSV - 2 : 患者 17 A が HSV - 2 血清陰性である確率は 79 % である。 10
- 結論 : 患者 17 A は HSV - 1 血清陰性であり、HSV - 2 血清陰性である。
- HSV - 1 : 患者 17 B が HSV - 1 血清陰性である確率は 77 % である。
- HSV - 2 : 患者 17 B が HSV - 2 血清陰性である確率は 41 % である。
- 結論 : 患者 17 B は HSV - 1 血清陰性であり、HSV - 2 血清陰性である。
- HSV - 1 : 患者 17 C が HSV - 1 血清陰性である確率は 3 % である。
- HSV - 2 : 患者 17 C が HSV - 2 血清陰性である確率は 85 % である。
- 結論 : 患者 17 C は HSV - 1 不定であり、HSV - 2 血清陰性である。
- HSV - 1 : 患者 18 A が HSV - 1 血清陰性である確率は 0.4 % である。
- HSV - 2 : 患者 18 A が HSV - 2 血清陰性である確率は 45 % である。
- 結論 : 患者 18 A は弱く HSV - 1 血清陰性であり、HSV - 2 血清陰性である。 20
- HSV - 1 : 患者 18 B が HSV - 1 血清陰性である確率は 0.01 % 未満である。
- HSV - 2 : 患者 18 B が HSV - 2 血清陰性である確率は 8 % である。
- 結論 : 患者 18 B は HSV - 1 血清陽性であり、HSV - 2 血清陰性である。
- HSV - 1 : 患者 18 C が HSV - 1 血清陰性である確率は 0.01 % 未満である。
- HSV - 2 : 患者 18 C が HSV - 2 血清陰性である確率は 30 % である。
- 結論 : 患者 18 C は HSV - 1 血清陽性であり、HSV - 2 血清陰性である。

【実施例】

【0115】

全般的な展開 (General Development)

【0116】

2つの細胞集団 A B V I C (ウイルス感染細胞に対する抗体結合) アッセイの開発

【0117】

序論

単純ヘルペスウイルス 2 (HSV - 2) ワクチンが、性器ヘルペスに対して強い保護を誘発するか、または弱々しい保護を誘発するかを区別するのに用いられ得る、HSV - 2 に対する免疫性の相関が必要とされる。

【0118】

HSV - 2 に対する免疫の臨床的に有用な相関を同定する上での以前の障害は、インビボで HSV - 2 を制御する T 細胞の応答の正しいパラメータを同定することができないことから生じ得たことが示唆されていた [Rouse および Kaistha、2006 年] 40
。しかし、第 2 の可能性が存在する。HSV - 2 に対する免疫性の相関を同定しようとする試みの殆どは、アミノ酸 40,000 個の HSV - 2 のプロテオームの 3 % 未満を免疫系に対して提示する、1 価 (gD - 2) または 2 価 (gB - 2 + gD - 2) のサブユニットワクチンに注目していた [Shlapobersky ら、2012 年; Bernstein ら、2010 年; Bourne ら、2005 年; Bernstein、2005 年; Bourne ら、2003 年; Khodai ら、2011 年; Bernstein ら、2011 年; Allen ら、1990 年; Weir ら、1989 年; Kuklin ら、1997 年; Manickan ら、1995 年; Eo ら、2001 年; Natuk ら、2006 年; Orr ら、2007 年; Kareem ら、1997 年; Brans および Yao、2010 年; Meigner ら、1988 年]。この取組みは、HSV - 2 における抗原の 50

総体を考慮していない。少なくとも20個のウイルスタンパク質が、HSV-2に対するヒトB細胞およびT細胞応答の知られている標的なのである [Hoskenら、2006年; Laingら、2010年; Gilmanら、1981]。したがって、1) 動物が、生ウイルスなどの多価免疫源で免疫されれば; および/または2) ワクチン誘発性免疫応答の規模が、全てのHSV-2の抗原に対するIgG抗体(汎HSV-2 IgG)の応答に関して測定されれば、免疫の相関がもっと容易に同定され得ることが想定された。

【0119】

本試験は、これらの予測を試験するために始められた。汎HSV-2 IgGレベルを測定するために、新規な、フローサイトメトリーベースのアッセイが開発された。このアッセイを用い、無処置動物および免疫化された動物117匹を分析して、汎HSV-2 IgGの誘発前血清レベルを、HSV-2に対する保護の2つの尺度と比べた。誘発前の汎HSV-2 IgGレベルおよびHSV-2に対する保護を、gD-2サブユニットワクチン、野生型HSV-2、またはいくつかのHSV-2 ICP0-弱毒化ウイルス(0254、0810、0RING、もしくは0NLS)のうち1つで免疫化したマウスおよび/またはモルモットにおいて比較した。これら6個のHSV-2の免疫源は、約500倍の範囲にまたがる広範な汎HSV-2 IgGレベルを誘発した。試験した免疫源6個のうち5個に対して、汎HSV-2 IgGの誘発前レベルは、HSV-2誘発ウイルス排出における低減に定量的に相関し、HSV-2誘発後の生存頻度を増大した。まとめると、結果は、汎HSV-2 IgGレベルは、HSV-2ワクチンの候補がHSV-2性器ヘルペスに対する保護を誘発する潜在性を評価するための、単純で有用なスクリーニングツールを提供し得る。

【0120】

材料と方法

【0121】

倫理的配慮 (Ethics Statement)

マウスおよびモルモットは、実験動物のケアおよび使用のための国立衛生研究所ガイド (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) に従って取り扱われた。この試験は、南イリノイ大学医学部実験動物ケアおよび使用委員会 (Southern Illinois University School of Medicine Laboratory Animal Care and Use Committee) により認可され、認可されたプロトコール205-08-019の下に記載される通りに行われた。

【0122】

細胞およびウイルス

ベロ細胞およびU20S細胞はアメリカ培養細胞系統保存機関 (Manassas, VA) から得られ、ICP0相補的 (complementing) L7細胞はNeal Deluca (University of Pittsburgh; Samaniegoら、1998年) の好意により提供された。細胞は全て、本明細書以後「完全DMEM」と呼ぶ、ウシ胎児血清 (FBS) 5%、ペニシリンG100U/mlおよびストレptomycin 100mg/mlを補ったダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で増殖させた。野生型HSV-2 MS (ATCC) はベロ細胞上で増殖させ、滴定した。この試験で用いたHSV-2 ICP0-変異ウイルス (HSV-20810、0254および0RING; Halfordら、2010年) は、U20S細胞中で増殖させ、ICP0相補的L7細胞において滴定した。

【0123】

HSV-2誘発試験

2年前に得た血清の遡及分析を、本試験において実施した (図2Aおよび3A)。これらの試験の詳細は、他所に記載されている [Halfordら、2011年; Halfordら、2010年]。モルモットにおける、ワクチン誘発の前向き研究を、以下の通り

、詳しく記載する。

【0124】

平均体重250gのHartleyメスモルモットを、Charles River (Wilmington, MA) から得た。0日目、モルモットを、キシラジン(5mg/kg)およびケタミン(30mg/kg)の腹腔内投与により麻酔し、1)完全DMEM(無処置); 2)HSV-20 NLS 2×10^6 pfu; 3)HSV-2MS 2×10^6 pfu; または4)組換え糖タンパク質D-2 (gD-2) 抗原5 μ g + モノホスホリル脂質A (Avanti Polar Biolipids) 20 μ g + Inject (登録商標) ミヨウバンアジュバント (Thermo Scientific) を含む100 μ l を右後足の足蹠に注射することにより免疫化した。gD-2 抗原はバキュロウイルススペクターから発現されたものであり [Nicolaら、1996年]、多数の試験においてワクチン抗原として用いられていた [Bernsteinら、2010年; Bernsteinら、2011年; Halfordら、2011年]。このHisタグ付けしたgD-2 タンパク質の精製の詳細は、他所に記載されている [Halfordら、2011年]。免疫化後0日目から20日目の間、HSV-2MSで免疫化したモルモットの飲料水中にアシクロビル1mg/mlを経口投与してウイルスの病原性を制限し、100%のモルモットが、明白な疾患の徴候を発症せずにHSV-2MSに対する一次曝露後も生存した。30日目、モルモットの左後足の足蹠に等量の免疫化を与えた(図4に示す1デザインあたり)。HSV-2MSで免疫化したモルモットは、第2の追加免疫化時、アシクロビルで処置しなかった。免疫化後75日目に、25gニードルで伏在静脈穿刺することによりモルモットを出血させ、血液を、ヘパリン添加したNateison採血管に収集した。血清分画を収集し、-80 で貯蔵した。

10

20

【0125】

90日目、全てのモルモットを、以下の通りHSV-2MSで誘発した。ウイルス接種前、モルモットにキシラジン(5mg/kg)およびケタミン(30mg/kg)を腹腔内投与することにより麻酔した。無処置モルモットおよび免疫化モルモットを、1)最初に、膈からの粘液栓をコットンスワブで正常にし; 2)膈円蓋内部で第2のコットンスワブをくるくる回して、膈の壁をさらに乾燥させ; および3) 2×10^6 pfuのHSV-2MSを含む完全DMEM40 μ lを膈円蓋に注入することにより、野生型HSV-2MSで膈内誘発した。

30

【0126】

誘発したモルモットの膈円蓋におけるウイルス力価を、誘発8時間後(暗黒期)、ならびに誘発後1、2、3、4、6および8日目、スワブをモルモットの膈円蓋に挿入し、くるくる回し、チップを完全DMEM0.4ml中に移すことにより決定した。ウイルス力価を、上記に記載した通り決定した。モルモットを毎日モニタリングし、重篤な膈周囲の潰瘍形成を表した動物を、できるだけ早い時期に安楽死させた。全てのモルモットの膈周囲領域を、誘発後7日目に写真撮影した。生存するモルモットを、誘発後30日目に安楽死させた。

【0127】

近交系129マウスに対するHSV-2抗血清の養子移植

40

6週齢から8週齢の129系統メスマウスを、Charles River (Wilmington, MA) から得た。0日目および30日目、マウスn=10に、キシラジン(7mg/kg)およびケタミン(100mg/kg)を腹腔内投与することにより麻酔し、 10^6 pfuのHSV-20 NLSを含む50 μ lを、右足および左足の足蹠にそれぞれ注射することにより免疫化した。85日目、HSV-20 NLSで免疫化したマウスn=5を屠殺してHSV-2抗血清を収集し、年齢をマッチさせた無処置マウスn=5を屠殺して無処置血清を収集した。90日目、無処置マウスに、プールしたHSV-2抗血清0.25ml、またはプールした無処置血清0.25mlの養子移植を与えた。養子移植直後、これらの無処置マウスn=10に、キシラジン(7mg/kg)およびケタミン(100mg/kg)を腹腔内投与することにより麻酔し、片目あたり100, 0

50

00 p f u の H S V - 2 M S で誘発した。同様に、H S V - 2 0 N L S で免疫化したマウス $n = 5$ に (0 日目および 3 0 日目) 麻酔し、同時に片目あたり 1 0 0 , 0 0 0 p f u の H S V - 2 M S で誘発した。H S V - 2 M S 排出を、他所に記載されている通り、これらのマウスにおいてモニタリングした [H a l f o r d ら、2 0 1 1 年]。

【 0 1 2 8 】

血清中の汎 H S V - 2 I g G 抗体レベルを計数するための抗体捕捉 E L I S A

高結合性 E I A 9 6 ウエルプレート (C o s t a r , C o r n i n g , N Y) を、総 H S V - 2 抗原 1 m l あたり 0 . 2 μ g を含む、1 ウエルあたり 1 0 0 μ l の炭酸ナトリウムバッファー (p H 9 . 6) で、4 $^{\circ}$ で一夜 (約 1 8 時間) コーティングした。総 H S V - 2 抗原を、H S V - 2 に感染しているベロ細胞から、以下の通り単離した：1 0 0 m m ディッシュ 5 枚のベロ細胞 (ディッシュ 1 枚あたり細胞 8 0 0 万個) に、細胞 1 個あたり 3 p f u の H S V - 2 M S を接種し、3 7 $^{\circ}$ で 1 6 時間インキュベートした。培養培地をディッシュから吸引し、細胞を 1 枚あたり 5 m l の P B S ですすぎ、細胞を 1 枚あたり 2 m l の炭酸ナトリウムバッファー (p H 9 . 6) 中に覆い、- 8 0 $^{\circ}$ で凍結させた。H S V - 2 細胞可溶化物を解凍し、低速遠心分離により澄清にして細胞デブリを除いた。澄清にした上清のタンパク質濃度は 1 0 μ g / m l であり、アリコート 0 . 2 m l において凍結させた。各 9 6 ウエルプレートを H S V - 2 抗原でコーティングするために、単一アリコートの総 H S V - 2 抗原を 1 : 5 0 希釈し (1 m l あたり 0 . 2 μ g)、高結合性 E I A プレートをコーティングするのに用いた。総 H S V - 2 抗原で一夜 (約 1 8 時間) コーティングした後、ウエルを、本明細書以後 P B S - T バッファーと呼ぶ、2 % 乾燥ミルクをリン酸緩衝食塩水 (P B S) + T w e e n - 2 0 (モノラウリン酸ポリオキシエチレン - 2 0 - ソルビタン) 0 . 0 2 % 中に溶解したもの 4 0 0 μ l で、2 時間ブロックした。

【 0 1 2 9 】

試験しようとする各血清試料を、P B S + 1 % ウシ胎児血清 + 0 . 0 2 % T w e e n - 2 0 中、2 . 5 : 2 5 0 希釈した。ブロッキングバッファーを E L I S A プレートから廃棄した後、希釈した血清試料 1 0 0 μ l を 2 つずつ、総 H S V - 2 抗原でコーティングしたウエルに加え、2 時間インキュベートした。

【 0 1 3 0 】

E L I S A プレートを、過剰の P B S - T バッファーで 3 回すすいだ後、P B S - T バッファー中 1 : 1 5 0 0 希釈した 2 次抗体 1 0 0 μ l を加え、2 次抗体はアルカリホスファターゼコンジュゲートヤギ抗マウス I g G F c フラグメントであった (R o c k l a n d I m m u n o c h e m i c a l s , G i l b e r t s v i l l e , P A) 。1 時間放置後、2 次抗体を P B S - T バッファーで 7 回、プレートからすすぎ、p - ニトロフェニルリン酸基質 2 0 0 μ l (S i g m a C h e m i c a l C o . , S t . L o u i s , M O) を各ウエルに加え、室温で 3 0 分インキュベートした後、比色分析の発色 (O D _{4 0 5}) を測定した。log (汎 H S V - 2 I g G) の存在量 (x) と O D _{4 0 5} (y) との間の定量的関係を、log 0 . 3 3 希釈段階の H S V - 2 抗血清および双曲線正接ベースの標準曲線を用いて規定した (図 9 A) 。各血清試料中の log (汎 H S V - 2 I g G) の存在量を、他所に記載される通り、

【 0 1 3 1 】

【 数 1 】

$$x = x_{50} + \Delta X \cdot \arctan \left(\frac{OD_{405} - y_{50}}{\Delta Y} \right)$$

の形の、逆数の双曲線逆正接の等式を用いて O D _{4 0 5} 値から引き出した [H a l f o r d ら、2 0 1 0 年 ; H a l f o r d ら、2 0 0 5 年 a] 。

【 0 1 3 2 】

マウスおよびモルモット血清中の汎 H S V - 2 I g G レベルを計数するためのフローサイトメトリーアッセイ

H S V - 2 ⁺ 細胞および非感染 (U I) 細胞の混合物の単一細胞懸濁液を、以下の通り

産生した。100mmディッシュ12枚に、1枚あたり完全DMEM中ベロ細胞 7×10^6 個を接種し、6時間後、ディッシュ6枚に細胞1個あたり3pfuのHSV-2MSを接種した。HSV-2⁺ベロ細胞を接種12時間後に収集し、UIベロ細胞を同時に並行して収集した。

【0133】

培養培地を吸引し、各ディッシュをPBS5mlですすぎ、PBS2ml+5mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)pH8.0を加えることにより両方の細胞集団を分散させた。PBS+5mMEDTAは、ベロ細胞を持ち上げ、トリプシンを使用せずに相互に剥離させるのに十分であったことに留意されたい。HSV-2⁺細胞の場合、PBS+5mMEDTA溶液に、1 μ Mカルボキシフルオレセインジアセテート、スクシニミ
10
ジルエステル(CFSE; Anaspec, Fremont, CA)を補充して、HSV-2⁺細胞を緑色フルオロフォアで標識した。

【0134】

細胞を持ち上がり始めるまで、細胞を、浸透機(rocking platform)上で10分間、室温でインキュベートし、次いでP-1000ピペッターの助けで粉碎することにより分散させた。分散させた全てのUI細胞を、単一の50ml円錐中に配置し、分散させた全てのHSV-2⁺細胞を第2の50ml円錐中に配置し、両方とも200
20
 \times gで5分間遠心分離して細胞をペレット状にした。上清をデカントし、細胞ペレットをPBS12ml中に再懸濁し、等体積の2 \times 固定液(7.4%ホルムアルデヒド+4%シヨ糖)を加えた。

【0135】

細胞を1 \times 固定液中、20分間インキュベートし、遠心分離し、90%メタノール24ml中に再懸濁して細胞を透過処理した。インキュベート10分後、細胞を遠心分離し、PBS+3%ウシ胎児血清(PBS-F)中に再懸濁し、40 μ M、ナイロンメッシュ細胞こし器(BD Biosciences, San Jose, CA)を通過させ、引き続き25ゲージニードルを通過させることにより細胞クランプを除去した。

【0136】

UIベロ細胞およびCFSE標識したHSV-2⁺細胞の単一細胞懸濁液中の細胞密度を決定し、UI細胞およびHSV-2⁺細胞をおよそ2:1の比率で合わせた。細胞を遠心分離し、PBS-F-Igブロック溶液(すなわち、ロバ グロブリン、ヤギ グロブリンおよびヒト グロブリン各々20 μ g/mlを補ったPBS-F; Jackson
30
ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)中、1mlあたり 1.25×10^6 細胞の濃度で再懸濁した。

【0137】

UIおよびHSV-2⁺細胞のアリコート(400 μ l; 細胞500,000個)を1.7ml微量遠心管中に配置し、1:30希釈した血清2 μ lを各細胞懸濁液に加えて、正味の血清希釈1:6,000を実現した。細胞を、LabQuake(登録商標)rotisserieハイブリダイゼーションローテータ上、室温で4時間インキュベートして、回転により細胞を懸濁液中に維持し(Barnstead International, Dubuque, IA)、1次抗体をPBS-F1.25mlで逐次的に2回すすぐことにより除去し、この際スイングバケット遠心分離機(swinging bucket centrifuge)を用いて細胞をペレット状にし、すすぎの上清を吸引した。
40

【0138】

HSV-2⁺対UI細胞に結合しているIgG抗体の量を計数するために、細胞を1:1,000希釈のAPCコンジュゲートヤギ抗マウスIgGFcフラグメントまたはAPCコンジュゲートロバ抗モルモットIgG(H+L)とインキュベートした(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)。1時間インキュベートした後、過剰の2次抗体を、PBS-F1.25mlで逐次的に3回すすぐことにより除去した。
50

【0139】

細胞を総体積0.2mlのPBS-F中に再懸濁し、Accuri(商標)C6フローサイトメーターのFL1およびFL4チャンネルにおいて、CFIowソフトウェア(Accuri Cytometers, Inc., Ann Arbor, MI)を用いて、2色フローサイトメトリーにより分析した。1試料あたり平均125,000イベントが記録されたが、具体的に述べると、単一のHSV-2⁺細胞25,000個がデータセットに含まれるまでイベントを記録するよう、フローサイトメーターを設定した。平均蛍光強度における差(MFI)、HSV-2⁺細胞25,000個対UI細胞およそ50,000個に基づいて、各血清試料中の汎HSV-2 Ig Gレベルを計算した(図1)。バックグラウンドの蛍光を、無処置血清とインキュベートした細胞懸濁液中に観察された平均MFI値と規定した。

10

【0140】

結果の数学的分析および統計学的分析

別段の記載がなければ、表される値は全て、反復試料の平均値±平均値の標準誤差(sem)である。ウイルス力価は、マイクロタイターブランクアッセイにより決定され、対数スケール上で(例えば、 $\log[pfu/腫]$)統計学的に分析された。感染性ウイルスは、十分に免疫化した動物の目または腫のスワブのいくつかでは検出できなかった。このような場合、全ての試料が対数スケール上で分析され得るように、試料に、スワブ1個あたり8pfuの値(すなわち、アッセイの検出の下限)を割り当てた。複数の群の比較における差の有意性を、一元配置の分散分析(ANOVA)、引き続きTukeyの事後t検定により、GraphPad Instat(商標)v3.10ソフトウェア(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)を用いて比較した。2群間の差の有意性は、マイクロソフトエクセルの「等分散を推定するt検定」の機能を用いて行った。生存頻度における差の有意性を、フィッシャーの直接確率検定により、自由に利用できるオンラインソフトウェアを用いて決定した(PreacherおよびBriggs, 2001年)。

20

【0141】

全てのデータを、対数値を用いて統計学的に分析した。直線回帰分析を、最小二乗法によりマイクロソフトエクセルにおける「回帰」分析機能を用いて行い、適合度(r^2 値)、およびy変数がx変数の関数として変化しなかった確率(p)を計算するのに用いた。

30

【0142】

図6に報告する変動係数の値を、式、 $100 \times (3 \text{ 回反復試料の標準偏差} \div 3 \text{ 回反復試料の平均値})$ により、各HSV-2抗血清の希釈に対して計算した。図6に報告する値は、アッセイの直線範囲における全てのHSV-2抗血清の希釈に対する、平均値±semの変動係数を表す(すなわち、中和アッセイに対して1:21-1:1,000希釈;抗体捕捉ELISAに対して1:100-1:100,000希釈;およびフローサイトメトリーアッセイに対して1:6,000-1:6,000,000希釈)。

【0143】

結果

【0144】

汎HSV-2 Ig G抗体レベルを測定するためのフローサイトメトリーベースのアッセイ
 総HSV-2抗原に結合する血清Ig G抗体(汎HSV-2 Ig G)の存在は、固定ペロ細胞の単層におけるHSV-2ブランクの免疫蛍光染色によって定量的に試験され得る(図1Aおよび1B)。このアッセイのより定量的な、フローサイトメトリーベースの変形形態が開発された。HSV-2感染(HSV-2⁺)ペロ細胞および非感染(UI)ペロ細胞の単一細胞の懸濁液を、培養物の単層を分散させ、細胞を固定し、透過処理し、40μmメッシュおよび25gニードルを通して濾過して細胞クランプを除去することにより得た。単一の反応におけるHSV-2⁺細胞対UI細胞の抗体染色を可能にするために、HSV-2⁺細胞を、緑色フルオロフォアであるカルボキシフルオレセインジアセテート、スクシンイミジルエステル(CFSE)で標識した。

40

50

【0145】

HSV-2⁺細胞約30%およびUI細胞約70%の懸濁液を、無処置マウスまたはHSV-2免疫化マウスからの血清とインキュベートし、アロフィコシアニン(APC)抗マウスIgG Fcフラグメント2次抗体で蛍光的に標識した。抗体標識した細胞を、2色フローサイトメトリーにより分析した(図1Cおよび1D)。細胞懸濁液を1:6,000希釈の無処置マウス血清とインキュベートした場合、同様のレベルのIgG抗体がHSV-2⁺細胞およびUI細胞に結合した($HSV_{MFI} = 6,510$; $UI_{MFI} = 7,970$; 図1C)。対照的に、細胞懸濁液を1:6,000希釈のHSV-2抗血清とインキュベートした場合、HSV-2⁺細胞に結合している抗体のレベルはUI細胞よりはるかに高かった($HSV_{MFI} = 608,180$; $UI_{MFI} = 29,420$; 図1D)。

10

【0146】

「汎HSV-2 IgG」抗体のマウスの血清レベルを、HSV-2⁺細胞対UI細胞間の平均蛍光強度における差(MFI)に基づいて推定した。各血清試料に関連する、得られたMFI値を、以下の計算式により「バックグラウンドを超えた倍数増大」に対して標準化した： $MFI_{試験試料} \div 平均 MFI_{無処置血清}$ 。この取組みが適用される場合、無処置マウスn=6からの血清は、バックグラウンドの 1.0 ± 0.2 倍である汎HSV-2 IgGレベルを有すると推定された(図1E)。対照的に、HSV-20 NLS弱毒化生ウイルスで免疫化したマウスn=6は[Halfordら、2011年]、バックグラウンドの 940 ± 240 倍である汎HSV-2 IgGレベルを有した(図1E)。したがって、抗体染色したHSV-2⁺対UI細胞のフローサイトメトリーは、ワクチン接種した動物の血清中の汎HSV-2 IgGの存在量を測定する潜在的な手段を提供した。

20

【0147】

HSV-2特異的抗体の血清レベルを計数するための方法の比較

汎HSV-2 IgGの存在量のフローサイトメトリーベースの測定法を、より伝統的な2つのアッセイ、すなわちHSV-2中和アッセイおよび抗体捕捉ELISAに対して比較した。この比較では、マウスHSV-2抗血清を無処置血清中、4640倍の範囲にまたがって $\log 0.33$ の増大で希釈することにより、抗血清の希釈段階を構築した。無処置マウスの血清を希釈液として使用することで、確実に、血清タンパク質濃度(例えば、IgG)は一定のままであり、HSV-2特異的抗体は $\log 0.33$ の増大で選択的に希釈された。

30

【0148】

HSV-2抗血清は、HSV-2の感染力を、1:21から1:1,000の希釈の間で中和し、1:2,150またはこれを超える希釈では中和活性を殆どから全く表さなかった(図8A)。よって、HSV-2中和アッセイのダイナミックレンジは1:21から1:1,000であり、測定の変動係数は、この範囲内で $16 \pm 8\%$ であった(図6)。

【0149】

抗血清の希釈段階におけるHSV-2抗体の存在量を、HSV-2に感染しているペロ細胞の可溶化液をコーティング抗原として用いて、抗体捕捉ELISAにより評価した。抗体捕捉ELISAは、1:100から1:100,000の間の血清希釈で、パラニトロフェニルホスフェート基質(OD_{405})の著しい変換を生じた(図8B)。この直線範囲において、汎HSV-2 IgGレベルのELISAベースの測定の変動係数は $13 \pm 3\%$ であった(図6)。

40

【0150】

抗血清の希釈段階におけるHSV-2抗体の存在量を、新規なフローサイトメトリーベースのアッセイにより評価した(図1)。血清染色した試験細胞のフローサイトメトリーは、抗血清の1:6,000から1:6,000,000の希釈間の、HSV-2⁺細胞対UI細胞に対するIgG抗体結合の著しいMFIを生じた(図8C)。この直線範囲において、汎HSV-2 IgGレベルのフローサイトメトリーベースの測定の変動係数は

50

、 $5 \pm 1\%$ であった(図6)。

【0151】

3つのアッセイは全て、汎HSV-2抗体の存在量について同傾向の推定値を生じたが、フローサイトメトリーベースのアッセイが最も高感度であった。具体的に述べると、フローアッセイの検出の下限は、HSV-2抗血清に対して1:6,000,000であったが、HSV-2中和アッセイおよび抗体捕捉ELISAの下限はそれぞれ、1:2,100および1:100,000であった(図6)。加えて、フローサイトメトリーベースのアッセイは最も正確であり、他のアッセイに比べて2分の1から3分の1の低さの変動係数を表した(図6)。最後に、フローサイトメトリーベースのアッセイは、一次測定基準(primary metric)であるMFIが、HSV-2⁺細胞25,000個対バックグラウンドの対照細胞約50,000個に対するIgG抗体の平均の結合を表す点で独特であった。測定におけるこの広範囲の反復が、フローサイトメトリーベースの方法の正確さの増大の説明となった。

10

【0152】

汎HSV-2 IgGは、マウスにおける目のHSV-2誘発に対する保護と関連する

以前に公開された目のHSV-2誘発実験において用いたマウスに由来する血清試料n=48に対して遡及分析を行った(Halfordら、2010年における図5および6)。この分析の目標は、保存されていた血清中の汎HSV-2 IgGレベルが、HSV-2で目を誘発したマウスに観察された保護に比例して変動したか否かを決定することであった。

20

【0153】

オリジナルの実験のデザインを概説する。マウス6群中5群の右目に、培養培地(無処置対照)または右目に片目あたり100,000 pfuのHSV-2 ICP0⁻変異体ウイルスである、HSV-2 0 NLS、0 810、0 254もしくは0 RINGを接種した(図2A)。6番目の群に野生型HSV-2 MSを同様に接種したが、マウスをアシクロビルで処置することにより感染の病原性を抑制した(図2A)。60日目に血液を抜き、70日目、マウスの左目に片目あたり100,000 pfuのHSV-2 MSで誘発した(図2A)。これらのマウスの左目を、誘発後1日目から3日目の間毎日、スワブで拭ってウイルスの複製をモニタリングし、30日の期間にわたり疾患の発症を観察した(図2A)。

30

【0154】

免疫化群における汎HSV-2 IgGの誘発前のレベルを決定し、順位付けした(図2B)。HSV-2 0 810、0 254または0 RINGウイルスで免疫化したマウスは、バックグラウンドを平均5倍から23倍上回る、低から中レベルの汎HSV-2 IgGを有していた(図2B)。対照的に、HSV-2 0 NLSまたはアシクロビルで制限したHSV-2 MSで免疫化したマウスは、バックグラウンドをそれぞれ平均110倍および290倍上回る、汎HSV-2 IgGレベルを有していた(図2B)。

【0155】

回帰分析を適用して、誘発前の汎HSV-2 IgGレベルは、目の誘発後のHSV-2排出の低減に相関したか否かを決定した。帰無仮説は、これら48個のマッチさせたデータ対に対する最良適合の直線回帰モデル($y = b + mx$)のスロープ(m)は0であると予想した(図2C)。この帰無仮説が正しい確率は $p < 10^{-11}$ であった。むしろHSV-2誘発ウイルスの排出(y変数)は、汎HSV-2 IgGレベル(x変数)が増大する対数1毎に、平均で対数0.56低下した(図2Cにおける黒線)。

40

【0156】

最良適合の直線回帰モデルに対する適合度(r^2)値は0.65であり、これは多くのマウスにおけるHSV-2排出の観察されるレベルは、等式、 $y = 3.35 - 0.56x$ により予想される量に完全に一致しなかったという事実を反映した(図2Cにおける黒線)。しかし、目のHSV-2排出の平均レベルは、測定の標準誤差内で、免疫化群6群中5群における汎HSV-2 IgGレベルに直接比例して低下した(図2D; $r^2 = 0.8$

50

6)。この傾向に対する例外は、HSV-2 0 254ウイルスで免疫化したマウスであり、HSV-2 0 254ウイルスは、HSV-2に対する極めて可変的な保護を誘発し、よって生存性のHSV-2生ワクチンの候補として考慮から速やかに排除された [Hallfordら、2010年]。

【0157】

免疫化マウスが目のHSV-2誘発後も生存した頻度を、誘発前の汎HSV-2 IgGレベルの関数としてプロットした(図2E)。無処置マウスの汎HSV-2 IgGは検出不可能なレベルであり、HSV-2誘発後も生存したものはなかった(図2E)。HSV-2 0 810またはHSV-2 0 254で免疫化したマウスの汎HSV-2 IgGは最低レベルであり、1群あたり8匹中3匹(43%)だけがHSV-2誘発後も生存した(図2E)。HSV-2 0 RINGで免疫化したマウスの汎HSV-2 IgGレベルは中度であり、8匹中5匹がHSV-2誘発後も生存した(図2E)。HSV-2 0 NLSまたはアシクロビルで抑制したMSで免疫化したマウスの誘発前汎HSV-2 IgGレベルは最高であり、100%が目のHSV-2誘発後も生存した(図2E)。まとめると、これらの結果は、誘発前の汎HSV-2 IgGレベルは、1) HSV-2誘発ウイルスの目の排出の低減; および2) 生存頻度の増大に関して、HSV-2に対するワクチン誘発性の保護に related した。

【0158】

ELISA対フローサイトメトリーの、汎HSV-2 IgGレベルの推定値

汎HSV-2 IgGレベルのフローサイトメトリー測定が、抗体捕捉ELISAに比べてあらゆる実際的な利点をもたらしたか否かを決定するために試験を行った。この目的で、上記で考慮したのと同じマウス血清試料を、抗体捕捉ELISAにより、HSV-2感染細胞の可溶化液をコーティング抗原として用いて再分析した。HSV-2抗血清のlog 0.33希釈段階を用いて、双曲線正接の等式を用いて、D₄₀₅吸光度値とlog(汎HSV-2 IgG)レベルとの間のS字状の関係を正確に規定した(図9A; $r^2 = 1.00$)。各血清試料に対するlog(汎HSV-2 IgG)レベルの推定値を、各血清試料のOD₄₀₅吸光度値をこの検量線に適合させることにより、数学的に引き出した。

【0159】

log(汎HSV-2 IgG)のELISAベースの推定値は、目のHSV-2排出の低減に related した(図9Bにおける黒線; $r^2 = 0.54$)。しかし、汎HSV-2 IgGのELISA推定値の適合度は、汎HSV-2 IgGのフローサイトメトリーの推定値との等価の related ほど強くなかった(図2C; $r^2 = 0.65$)。一部には、これは、汎HSV-2 IgGの、ELISAベースの推定値対フローサイトメトリーベースの推定値の分散が2.5倍高いためであった(図6)。

【0160】

汎HSV-2 IgGのELISA対フローサイトメトリーの推定値の相対感度を、図表により分析した。log(汎HSV-2 IgG)のELISA推定値をx軸上にプロットし、対応するフローサイトメトリーの推定値をy軸上にプロットした(図9C)。ELISA対フローサイトメトリーの推定値が等しく高感度であれば、これらn=48のデータ点は、「log 0」の等価線の周囲に図形的に分散していなければならない(図9C)。しかし、血清陽性試料36個中35個は等価線より上にあり、フローサイトメトリーがELISAよりも高いlog(汎HSV-2 IgG)の推定値を生じたことを示唆した。血清陽性試料36個中6個では、フローサイトメトリーは、ELISAに比べてlog+1を超えて高い、汎HSV-2 IgGの推定値を生じた(図9C)。これらn=36の血清陽性試料では、フローサイトメトリーは、ELISAに比べて平均5±1倍高い、汎HSV-2 IgGレベルの推定値を生じた。汎HSV-2 IgGレベルの2つの極値では、データ点は等価線付近に密集していた(図9C)。しかし、低範囲から中範囲の感度では、フローサイトメトリーアッセイは、ELISAよりも高感度であった(HSV-2 0 NLS、0 810、0 254、または0 RINGに対して $p < 0.01$; 両側t検定)。この分析および先の分析に基づいて(図6)、フローサイトメトリーおよびELI

10

20

30

40

50

SAは、汎HSV-2 IgGレベルについて同傾向の推定値を生じたが、フローサイトメトリー法は正確さおよび感度の改善をもたらしたことが結論付けられた。

【0161】

汎HSV-2 IgGは、マウスにおける膣のHSV-2誘発に対する保護に相関する

以前に公開された実験に由来するマウス血清に対して、第2の遡及分析を行った(Halfordら、2011年における図4)。この分析の目的は、保存されていた血清における汎HSV-2 IgGレベルが、HSV-2で膣に誘発したマウスに観察される保護に比例して変動するか否かを決定することであった。

【0162】

オリジナルの実験のデザインを概説する。マウスを、0日目および30日目、右後足および左後足の足蹠にそれぞれ、1)培養培地(無処置対照);2)ミョウバンおよびMPL 10 μgをアジュバント追加した(adjubanted)緑色蛍光タンパク質(GFP) 2.5 μg;3)ミョウバンおよびMPL 10 μgをアジュバント追加したgD-2_{306t} 2.5 μg[Nicolaら、1996年];4)HSV-2 0 NLS 10⁶ pfu;または5)野生型HSV-2 MS 10⁶ pfu(アシクロビルを用いて、MSに対する一次曝露の病原性を制限した。)で免疫化した(図3A、1群あたりn=10)。60日目に血液を抜き、90日目または100日目、マウスを、膣あたり500,000 pfuのHSV-2 MSで誘発した。誘発後1日目から7日目の間に、マウスn=50全てをスワブで拭って、膣のHSV-2排出を測定し、30日の期間にわたって疾患の発症を観察した(図3A)。

【0163】

免疫化群における汎HSV-2 IgGレベルを決定し、順位付けした(図3B)。無処置マウスおよびGFP免疫化マウスは、検出可能な汎HSV-2 IgGを有しておらず、これらのマウスのどれも膣のHSV-2誘発後は生存しなかった(図3B)。gD-2で免疫化したマウスは、バックグラウンドを平均10倍超えた汎HSV-2 IgGを有し、10匹中1匹が膣のHSV-2誘発後も生存した(図3B)。重要なことに、gD-2免疫化マウスにおける抗gD-2力価はおよそ200,000であったが(Halfordら、2011年の図3C)、これは他の公開されている試験に匹敵する[Bernsteinら、2010年; Bourneら、2005年; Bourneら、2003年]。HSV-2 MSまたは0 NLSの生ウイルスで免疫化したマウスはそれぞれ、バックグラウンドを平均390倍および650倍上回る誘発前汎HSV-2 IgGレベルを有し、これらのマウスの100%が、目に見える疾患の症状なく、膣のHSV-2誘発後も生存した(図3B)。

【0164】

回帰分析を適用して、誘発前の汎HSV-2 IgGレベルが、膣誘発後のHSV-2排出の低減に相関したか否かを決定した。帰無仮説は、これら50個のマッチさせたデータに対する最良適合の直線回帰モデルのスロップ(m)は0であると予想した(図3C)。この帰無仮説が正しい確率は、 $p < 10^{-14}$ であった。むしろ、HSV-2誘発ウイルスの排出(y)は、汎HSV-2 IgGレベル(x)が増大する対数1ごとに平均で対数0.76低減した(図3Cにおける黒線)。この回帰直線に対する適合度(r^2)は0.73であり、これは、多くのマウスにおいて観察されるHSV-2排出のレベルは、等式、 $y = 3.85 - 0.76x$ によって予想される量に完全に一致しなかったという事実を反映した(図3Cにおける黒線)。しかし、膣のHSV-2排出の平均レベルは、免疫化群5群全てにおける汎HSV-2 IgGレベルに直接比例して、測定の標準誤差以内で低減した(図3D; $r^2 = 0.98$)。したがって、誘発前の汎HSV-2 IgGレベルは、1)HSV-2誘発ウイルスの膣の排出の低減、および2)生存頻度の増大に関して、マウスにおけるHSV-2に対するワクチン誘発性の保護と相関した。

【0165】

汎HSV-2 IgGは、モルモットにおける膣のHSV-2誘発に対する保護と相関する
誘発前の汎HSV-2 IgGレベルが、マウス以外の種におけるHSV-2に対する保

10

20

30

40

50

護に比例して変動したか否かを決定するために、第3の遡及分析を行った。この疑問に取り組むために、モルモット $n = 5$ の群を、0日目および30日目、右後足および左後足の足跡にそれぞれ、1) 培養培地(無処置); 2) ミヨウバンおよびMPL $20 \mu\text{g}$ でアジュバント追加した $\text{gD} - 2 \quad 5 \mu\text{g}$; 3) $\text{HSV} - 2 \quad \text{NLS} \times 10^6 \text{ pfu}$; または4) 野生型 $\text{HSV} - 2 \text{ MS} \times 10^6 \text{ pfu}$ (アシクロビルを用いてMSに対する一次曝露の病原性を制限した。) で免疫化した(図4A)。75日目にモルモットを出血させ、90日目に膣あたり $2 \times 10^6 \text{ pfu}$ の $\text{HSV} - 2 \text{ MS}$ で誘発した(図4A)。残念なことに、 $\text{gD} - 2$ で免疫化したモルモットの1匹が麻酔薬の過剰投与で死亡し、よって $\text{gD} - 2$ で免疫化したモルモットの $n = 4$ だけが、 $\text{HSV} - 2$ の膣誘発後に利用できた。無処置のモルモットは、誘発後2日目、膣あたりピーク力価約 $200,000 \text{ pfu}$ を排出した(図4B)。 $\text{gD} - 2$ で免疫化したモルモットは、誘発後1日目から8日目の間に、無処置のモルモットに比べて平均5倍少ない $\text{HSV} - 2$ を排出した(図4B)。対照的に、 $\text{HSV} - 2 \text{ MS}$ または $0 \quad \text{NLS}$ で免疫化したモルモットは、無処置のモルモットに比べて、それぞれ平均150倍および200倍少ない $\text{HSV} - 2$ を排出した(図4B)。

【0166】

回帰分析を適用して、モルモットにおける誘発前の汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ レベルが、膣誘発後の $\text{HSV} - 2$ 排出の低減に相関したか否かを決定した。帰無仮説は、これら $n = 19$ のマッチさせたデータ対に対する最良適合の直線回帰モデルのスロープ (m) は0であると予想した(図4C)。この帰無仮説が正しい確率は $p < 10^{-7}$ であった。むしろ、 $\text{HSV} - 2$ 誘発ウイルスの排出 (y) は、汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ レベル (x) が増大する対数1ごとに平均対数0.95低減した(図4Cにおける黒線)。この回帰直線に対する適合度 (r^2) は0.85であり、これは多くのモルモットに観察された $\text{HSV} - 2$ 排出のレベルは、等式、 $y = 3.77 - 0.95x$ によって予想される量に完全に一致しなかったという事実を反映した(図4C)。しかし、膣の $\text{HSV} - 2$ 排出の平均レベルは、免疫化群4群全てにおける汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ レベルに直接比例して、測定の標準誤差以内で低減した(図4D; $r^2 = 0.98$)。

【0167】

疾患の進行に関して、無処置のモルモットは鮮紅色の膣周囲疾患を一様に発症し、誘発後11日目または11日目前に屠殺しなければならなかった(図4E)。 $\text{gD} - 2$ で免疫化したモルモットは、低レベルの汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ を有し、4匹中3匹が鮮紅色の膣周囲疾患を発症し、そのため、誘発後11日目または11日目前に屠殺する必要があった(図4E)。対照的に、生 $\text{HSV} - 2$ ウイルスMSまたは $0 \quad \text{NLS}$ で免疫化したモルモットは、高レベルの誘発前汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ を有し、これらのモルモットの100%が、疾患のいかなる目に見える徴候も発症せずに、膣の $\text{HSV} - 2$ 誘発後も生存した(図4E)。

【0168】

マウスおよびモルモットにおける膣の $\text{HSV} - 2$ 誘発実験の結果を比較した(図7)。両方の種において、 $\text{gD} - 2$ での免疫化は、バックグラウンドを平均10倍から20倍上回る汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ における著しい増大を誘発し、これは膣の $\text{HSV} - 2$ 誘発に対する部分的な保護と相関した(図7)。対照的に、 $\text{HSV} - 2 \text{ MS}$ または $0 \quad \text{NLS}$ の生ウイルスで免疫化したマウスまたはモルモットは、 $\text{gD} - 2$ で免疫化した動物より30倍から40倍高い、汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ 抗体の応答を開始した(図7)。同様に、MSまたは $0 \quad \text{NLS}$ で免疫化したマウスまたはモルモットは、 $\text{gD} - 2$ で免疫化した動物に比べて、膣あたり平均20倍から35倍少ない $\text{HSV} - 2$ を排出した(図7)。まとめると、これらの結果は、免疫化マウスおよびモルモットにおける汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ レベルの増大は、1) $\text{HSV} - 2$ 誘発ウイルスの膣排出の低減、および2) 生存頻度の増大に関して、 $\text{HSV} - 2$ に対するワクチン誘発性の保護の増大と相関した。

【0169】

$\text{HSV} - 2$ 抗血清単独は、 $\text{HSV} - 2 \text{ MS}$ 誘発に対して弱い保護をもたらす

高レベルの汎 $\text{HSV} - 2 \text{ IgG}$ 抗体は、いくつかの $\text{HSV} - 2$ 生ワクチンで免疫化した

10

20

30

40

50

マウスにおける、HSV-2MS誘発に対する強い保護に相関した。最終的な実験を行って、HSV-2抗血清の養子移植は、HSV-2 NLSウイルスで免疫化したマウスに観察されるHSV-2に対する保護のレベルを繰り返したか否かを決定した。

【0170】

この目的で、129系統マウス(n=10)の右後足および左後足の足蹠においてそれぞれ、0日目および30日目、 10^6 pfuのHSV-2 NLSで免疫化した。85日目、免疫化マウス5匹を屠殺してHSV-2抗血清を収集し、この時、年齢をマッチさせた対照から無処置血清を収集した。90日目、無処置マウスに、無処置血清またはHSV-2抗血清をプールしたものを0.25mlの養子移植を与え(1群あたりn=5)、次いで、片目あたり100,000 pfuのHSV-2MSで誘発した。同様に、HSV-2 NLSで免疫化したマウスn=5も、片目あたり100,000 pfuのHSV-2MSで誘発した。

10

【0171】

HSV-2MSの目の排出を比較した。誘発後1日目、無処置血清で処置したマウスは片目あたり平均3,000個のHSV-2MSを排出し、HSV-2抗血清で処置したマウスは平均16倍少ないHSV-2を排出し、この差は有意であった(図5A)。しかし、HSV-2抗血清処置マウスおよび無処置血清処置マウスは、目の誘発後3日目、高い、同等のレベルのHSV-2を排出した(図5B)。対照的に、HSV-2 NLSで免疫化したマウスは、無処置血清処置マウスに比べて、それぞれ1日目および3日目に、平均300倍および60倍少ないHSV-2MSを排出した(図5Aおよび5B)。

20

【0172】

HSV-2抗血清の養子移植は、HSV-2誘発性の病原性の進行を遅らせたが、防ぐことはなかった。具体的に述べると、無処置血清で処置したマウスは100%が、誘発後7日目または8日目、目のHSV-2誘発で死亡した(図5C)。

【0173】

HSV-2抗血清で処置したマウス5匹中2匹は目のHSV-2誘発後も生存し、1群として、これらのマウスは誘発後 19 ± 5 日間生存した(図5C)。HSV-2抗血清で処置したマウスは有意に長く生存したが、これらの動物は十分に保護されなかった。

【0174】

具体的に述べると、HSV-2抗血清で処置したマウスの100%が、明白な眼窩周囲の毛の喪失および疾患を誘発後10日目から14日目の間に発症し、これらのマウスの60%が誘発で死亡した(図5C)。対照的に、HSV-2 NLSで免疫化したマウスの100%が、誘発後30日間、疾患のいかなる明白な徴候なく生存した(図5C)。したがって、汎HSV-2 IgG抗体レベルは、HSV-2に対するワクチン誘発性の保護に相関したが(図2、3および4)、抗HSV-2抗体単独が、HSV-2誘発に対するワクチン誘発性の保護の唯一のメディエータであった見込みはない。

30

【0175】

考察

【0176】

全体的な考察

40

本試験は、ワクチン接種したマウスおよびモルモットにおける汎HSV-2 IgG抗体の血流中レベルは、HSV-2に対する保護と相関したことを実証するものである。この試験では、養子免疫応答の他の成分も、HSV-2に対するワクチン誘発性の保護と相関するか否かは決定されていない。例えば、HSV-2特異的T細胞の頻度[Laingrら、2010年; Stiegerら、2011年; Posavadら、2010年]または腔粘膜における抗HSV-2 IgAの存在量[Tirabassiら、2011年]は、HSV-2ワクチンに対する免疫の、より良好な相関をもたらし得る。しかし、免疫の相関の有用性は、保護の媒介におけるワクチンの役割によるものではないことに留意されたい。むしろ、免疫の相関は、その用性が、もっぱら微生物の病原に対するワクチン誘発性の保護の規模を測る能力にある、スクリーニングツールである。汎HSV-2 IgGレ

50

ベルが、ヒトの臨床試験においてHSV-2のワクチンの効力を測る上で有用であるか否かは未だ決定されていない。

【0177】

HSV-2に対するワクチン誘発性の保護における体液性免疫対細胞免疫の関連性

HSV-2に対するワクチン誘発性の保護における体液性免疫対細胞免疫の関連性は、未だ不完全にしか規定されていない。Oakes、1975年に遡り、数十年の試験から明らかであるのは、養子移植された抗HSV抗体またはB細胞単独は、免疫不全のヌードマウスまたはSCIDマウスにおける末梢のHSV-1感染の致死性疾患への進行を防ぐのに十分ではないが[Nagafuchira、1979年; Halfordら、2005年b]、養子移植したT細胞は、免疫不全動物を、HSV-1の低病原性株での末梢感染後も生存させるのに十分であることである[Nagafuchira、1979年; Halfordら、2005年b]。さらに、T細胞は、感覚神経節におけるHSV-1およびHSV-2感染を制御する上で直接的な役割を果たす[Divitora、2006年; Khannara、2003年; Knickelbeinら、2008年; Theilら、2003年; Liura、2000年; SimmonsおよびTscharke、1992年; Zhura、2007年]。よって、HSV-2に対するワクチン誘発性の保護は、HSV-2抗原に対するT細胞の応答に、殆ど確実に依存する[KoelleおよびCorey、2008年; Johnstonら、2012年; Laingら、2012年; DudekおよびKnipe、2006年; Morrison、2002年]。

【0178】

HSV-2性器ヘルペス病変に対する、完全な、ワクチン誘発性の保護は、HSV-2の抗原に対するB細胞(抗体)およびT細胞のバランスのとれた応答に依存する可能性が高い。2系統の証拠がこの仮説を支持している。第1に、B細胞およびT細胞の両方で再構成されたSCIDマウスは、T細胞単独で再構成されたSCIDマウスより有意に速やかにHSV-1感染を制御し(Halfordら、2005bにおける図1C)、多くの研究者が、HSV-1またはHSV-2での同様の所見を報告している[Morrisonら、2001年; Chura、2008年; Staatsら、1991年]。第2に、ケモカイン[ShinおよびIwasaki、2012年]または炎症刺激[Mackayら、2012年]を用いてT細胞動員の速度を人工的に増大させなければ、T細胞単独は、HSV-1またはHSV-2の誘発の部位に浸潤するのが遅い。対照的に、抗体はT細胞よりおよそ1000億倍小さく、ウイルスが感染している組織に速やかに侵入し得、よって抗体は最初の24時間の間に、HSV-2の複製および/または伝播を制限するように働き得る(図5A)。

【0179】

このバックグラウンドに反して、抗HSV-2抗体の論理的な機能は、HSV-2が侵入する入口(例えば、膣)で、ウイルスが感染している組織中に速やかにT細胞を動員するのを促進する、炎症促進性のイベント(例えば、補体カスケード)を誘発する適応免疫防御の第一線として作用することである。

【0180】

HSV-2に対する免疫の相関: 本試験対以前の所見

HSV-2に対する免疫の相関を同定するための以前の試みは、試験下の免疫源、すなわちgBおよび/またはgDに対する免疫応答に注目していた[Shlapoberskyら、2012年; Bernsteinら、2010年; Bourneら、2005年; Bernstein、2005年; Bourneら、2003年; Khodaira、2011年; Bernsteinら、2011年; Natukら、2006年; Chentoufira、2010年]。これらの取組みは、HSV-2における抗原の総体を考慮していない。少なくとも20個のウイルスタンパク質が、HSV-2に対するヒトB細胞およびT細胞応答の知られている標的なのである[Hoskenら、2006年; Laingら、2010年; Gilmanら、1981年]。このような糖タンパク質に注目した試験は、gB-2およびgD-2以外のウイルス抗原もHSV-2に対する免疫に寄与し得

10

20

30

40

50

ることを十分に考慮していなかった。

【0181】

糖タンパク質中心の免疫の相関は、gB-2および/またはgD-2サブユニットワクチンが、ヒトにおけるHSV-2性器ヘルペスを防ぐのに十分であることを示唆する[Bernsteinら、2010年; Bourneら、2005年; Bernstein、2005年; Bourneら、2003年]。この予測は、過去23年にまたがるヒトの臨床試験からのデータによって裏付けられていない[Belsheraら、2012年; Stanberryら、2002年; Strausら、1997年; Coreyら、1999年; Strausら、1994年; Mertzら、1990年]。汎HSV-2IgGの計測は、HSV-2の全ての抗原に対するIgG抗体の比存在度を比較検討するため、より現実的な免疫の相関であり、よって1つまたは2つの特異的なタンパク質に対する免疫応答が、HSV-2に対する免疫の正確な測定を必ず提供するという仮定に左右されない。

10

【0182】

この2つの細胞試験の結果は、gD-2ワクチンでの免疫化は、有意な汎HSV-2IgG抗体応答、および膣のHSV-2排出における有意な低減を誘発することを実証するものである(図7)。しかし、多価HSV-2ウイルスで免疫化した動物は、gD-2で免疫化した動物よりも約30倍大きい汎HSV-2IgG応答を開始し、誘発後、約25分の1の低さの膣のHSV-2排出を同様に表す(図7)。これらの結果は、gD-2に加えて、HSV-2の他の20個の抗原に対する免疫応答もHSV-2生ワクチンの保護効力に寄与し得る可能性を提起する。

20

【0183】

HSV-2に対する免疫の相関を検出するための回帰分析の使用

HSV-2ワクチン誘発試験をいくつか試みて、HSV-2誘発後の疾患スコア、生存、または体重増加に関して、HSV-2に対する保護を測定した[Khodaiら、2011年; McClementsら、1996年; Pylesら、2002年]。ノンパラメトリック統計(すなわち、疾患および生存の)、または接線のパラメータ(すなわち、体重増加)は、試験下で主要変数であるHSV-2に対する保護の弱い尺度である可能性がある。対照的に、HSV-2誘発ウイルスの排出における低減は、HSV-2に対する保護の正確な尺度であり、約500倍の範囲を超えて変動する。保護のこの頑強な尺度の使用により、目または膣のHSV-2排出における低減により測定される通り、汎HSV-2IgGレベル(x)の増大がHSV-2に対する保護(y)に相関するか否かを決定するための本試験において、直線回帰分析が適用できるようになる(図2C、3Cおよび4C)。

30

【0184】

直線回帰分析は、2変数間に相関が存在するか否かを決定するのに利用可能な、最も強力な統計上のツールの1つである。本試験は、適応免疫応答のパラメータとHSV-2に対する保護との間の相関を検出するために、回帰分析に第一に適用されると考えられている。この技術革新は、本試験の成功に決定的であった。回帰分析により2つのパラメータ間の相関を検出する能力は、3つの変数に依存する。変数1は、データセットにおける、マッチさせたx、yデータ対の数である。変数2は、x変数およびy変数の測定の精度である。変数3は、それにわたって相関が観察され得る、xおよびyの範囲である。

40

【0185】

変数2に関して、本明細書で紹介したフローサイトメトリーアッセイは、汎HSV-2IgGレベルの推定値の精度および感度を改善し(図6および9C)、よって、抗体捕捉ELISAに比べた相関の r^2 値を改善した。この技術革新は、汎HSV-2IgG(x変数)とHSV-2誘発ウイルスの排出における低減(y変数)との間の相関を検出する能力を増強した。

【0186】

変数3に関して、本試験がHSV-20 NLSワクチンなど1ワクチンのモダリティ

50

にもっぱら注目した場合、汎HSV-2 IgGレベルの観察された範囲（x）は非常に狭かったため（約5倍）、意味のある相関を検出することができなかった（図3Cおよび4C）。しかし、独立した3つの誘発実験において6つのHSV-2免疫源を使用したことにより、試験は、観察される汎HSV-2 IgGレベルの範囲を約500倍の範囲に拡張することができた（図2C、3Cおよび4C）。よって、本試験の成功は、それにわたって試験がHSV-2誘発ウイルスの排出（y）における比例的な低減に対して試験することができた、500倍の範囲の汎HSV-2 IgGレベル（x）を集合的に提供した、合計n = 117の動物の使用に大いに依存するものであった。

【0187】

結論

本試験は、本開示が、ワクチン接種したマウスおよびモルモットにおいて、いくつかのワクチンに対する汎HSV-2 IgG抗体の応答は、HSV-2に対する保護に比例して変動することを実証することを説明するものである。この同じ仕組みが、HSV-2ワクチンのヒト臨床試験における有用なスクリーニングツールを提供し得る可能性がある。結果に基づくと、最も強力な耐久性のある汎HSV-2 IgG抗体のヒトにおける応答を誘発するHSV-2ワクチン製剤は、HSV-2性器ヘルペスに対して最大の保護を誘発しなければならない。しかし、HSV-2に対するワクチン誘発性の保護の潜在的な相関として提唱される汎HSV-2 IgGの有用性は、ヒトでは未だ試験されていない。したがって、数年のうちにこの予測を試験し、汎HSV-2 IgGレベルが、ヒトにおいてHSV-2に対するワクチン誘発性の保護の有用な相関を提供するか否かを決定すれことに興味を持たれる。

【0188】

【表1】

参考文献

Allen et al., (1990). Role of coexpression of IL-2 and herpes simplex virus proteins in recombinant vaccinia virus vectors on levels of induced immunity. *Viral Immunol* **3**:207-215.

Belshe et al. (2012). Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med* **366**:34-43.

Bernstein (2005). Glycoprotein D adjuvant herpes simplex virus vaccine. *Expert Rev Vaccines* **4**:615-627.

Bernstein et al. (2010). The adjuvant CLDC increases protection of a herpes simplex type 2 glycoprotein D vaccine in guinea pigs. *Vaccine* **28**:3748-3753.

Bernstein et al. (2011). Effects of herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines and CLDC adjuvant on genital herpes infection in the guinea pig. *Vaccine* **29**:2071-2078.

10

Bourne et al. (2003). Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J Infect Dis* **187**:542-549.

20

Bourne et al. (2005). Impact of immunization with glycoprotein D2/AS04 on herpes simplex virus type 2 shedding into the genital tract in guinea pigs that become infected. *J Infect Dis* **192**:2117-2123.

Brans et al. (2010). Immunization with a dominant-negative recombinant Herpes Simplex Virus (HSV) type 1 protects against HSV-2 genital disease in guinea pigs. *BMC Microbiology* **10**:163.

30

CDC (2010). Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among persons aged 14-49 years--United States, 2005-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **59**:456-459.

Chentoufi et al. (2010). A novel HLA (HLA-A*0201) transgenic rabbit model for preclinical evaluation of human CD8+ T cell epitope-based

40

vaccines against ocular herpes. *J Immunol* **184**:2561-2571.

Chu et al. (2008). Antibody-mediated protection against genital herpes simplex virus type 2 disease in mice by Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Reprod Immunol* **78**:58-67.

10

Corey et al. (1999). Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA* **282**:331-340.

Corey et al. (2004). Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *N Engl J Med* **350**:11-20.

20

DeJesus et al. (2003). Valacyclovir for the suppression of recurrent genital herpes in human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis* **188**:1009-1016.

Divito et al. (2006). A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunol Res* **36**:119-126.

30

Dudek et al. (2006). Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* **344**:230-239.

Eo et al. (2001). Prime-boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. *J Immunol* **166**:5473-5479.

40

Gilman et al. (1981). Antibody responses in humans to individual proteins of herpes simplex viruses. *Infect Immun* **34**:880-887.

Golden et al. (2005). HSV-2 Western blot confirmatory testing among men testing positive for HSV-2 using the focus enzyme-linked immunosorbent assay in a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis* **32**:771-777.

10

Gupta et al. (2007). Genital herpes. *Lancet* **370**:2127-2137.

Halford et al. (2005a). Mathematical analysis demonstrates that interferons-beta and -gamma interact in a multiplicative manner to disrupt herpes simplex virus replication. *J Theor Biol* **235**:439-454.

20

Halford et al. (2005b). Re-evaluating the role of natural killer cells in innate resistance to herpes simplex virus type 1. *Virology* **2**:56.

Halford et al. (2010). Herpes simplex virus 2 ICPO mutant viruses are avirulent and immunogenic: implications for a genital herpes vaccine. *PLoS ONE* **5**:e12251.

30

Halford et al. (2011). A live-attenuated HSV-2 ICPO virus elicits 10 to 100 times greater protection against genital herpes than a glycoprotein D subunit vaccine. *PLoS ONE* **6**:e17748.

40

Halford et al. (2013). Pan-HSV-2 IgG antibody in vaccinated mice and guinea pigs correlates with

protection against herpes simplex virus 2. *PLoS ONE*.
8:e65523.

Handsfield et al. (2007). Suppressive therapy
with valacyclovir in early genital herpes: a pilot
study of clinical efficacy and herpes-related quality
of life. *Sex Transm Dis* **34**:339-343.

10

Hoskin et al. (2006). Diversity of the CD8+ T-
cell response to herpes simplex virus type 2 proteins
among persons with genital herpes. *J Virol* **80**:5509-
5515.

Johnston et al. (2012). HSV-2: in pursuit of a
vaccine. *J Clin Invest* **121**:4600-4609.

20

Karem et al. (1997). Protective immunity
against herpes simplex virus (HSV) type 1 following
oral administration of recombinant *Salmonella*
typhimurium vaccine strains expressing HSV antigens.
J Gen Virol **78 (Pt 2)**:427-434.

Khanna et al. (2003). Herpes simplex virus-
specific memory CD8(+) T cells are selectively
activated and retained in latently infected sensory
ganglia. *Immunity* **18**:593-603.

30

Khodai et al. (2011). Single and combination
herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines
adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides or
monophosphoryl lipid A exhibit differential immunity
that is not correlated to protection in animal
models. *Clin Vaccine Immunol* **18**:1702-1709.

40

Knickelbein et al. (2008). Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* **322**:268-271.

Koelle et al. (2008). Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annu Rev Med* **59**:381-395.

10

Kuklin et al. (1997). Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J Virol* **71**:3138-3145.

Laing et al. (2010). Diversity in CD8(+) T cell function and epitope breadth among persons with genital herpes. *J Clin Immunol* **30**:703-722.

20

Laing et al. (2012). Immunology in the Clinic Review Series; focus on host responses: T cell responses to herpes simplex viruses. *Clin Exp Immunol* **167**:47-58.

Lingappa et al. (2007). Clinical and therapeutic issues for herpes simplex virus-2 and HIV co-infection. *Drugs* **67**:155-174.

30

Liu et al. (2000). CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med* **191**:1459-1466.

Mackay et al. (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:7037-7042.

40

Manickan et al. (1995). Vaccination with recombinant vaccinia viruses expressing ICP27 induces protective immunity against herpes simplex virus through CD4+ Th1+ T cells. *J Virol* **69**:4711-4716.

McClements et al. (1996). Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11414-11420.

10

Maignier et al. (1988). In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. *J Infect Dis* **158**:602-614.

20

Mertz et al. (1990). Double-blind, placebo-controlled trial of a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in persons at high risk for genital herpes infection. *J Infect Dis* **161**:653-660.

Morrison (2002). Vaccines against genital herpes: progress and limitations. *Drugs* **62**:1119-1129.

30

Morrison et al. (2001). Vaccine-induced serum immunoglobulin contributes to protection from herpes simplex virus type 2 genital infection in the presence of immune T cells. *J Virol* **75**:1195-1204.

40

Nagafuchi et al. (1979). Mechanism of acquired resistance to herpes simplex virus infection as studied in nude mice. *J Gen Virol* **44**:715-723.

Natuk et al. (2006). Recombinant vesicular stomatitis virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 gD elicit robust CD4+ Th1 immune responses and are protective in mouse and guinea pig models of vaginal challenge. *J Virol* **80**:4447-4457.

Ng'ayo et al. (2011). Performance of HSV-2 type specific serological tests in men in Kenya. *J Virol Methods* **163**:276-281. 10

Nicola et al. (1996). Structure-function analysis of soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol* **70**:3815-3822.

Norrild et al. (1981). Immunological reactivity of herpes simplex virus 1 and 2 polypeptides electrophoretically separated and transferred to diazobenzyloxymethyl paper. *Infect Immun* **31**:660-667. 20

Oakes (1975). Role for cell-mediated immunity in the resistance of mice to subcutaneous herpes simplex virus infection. *Infect Immun* **12**:166-172. 30

Orr et al. (2007). Cutting Edge: Recombinant *Listeria monocytogenes* expressing a single immune-dominant peptide confers protective immunity to herpes simplex virus-1 infection. *J Immunol* **178**:4731-4735.

Paz-Bailey et al. (2007). Herpes simplex virus type 2: epidemiology and management options in developing countries. *Sex Transm Infect* **83**:16-22. 40

Posavad et al. (2010). Detailed characterization of T cell responses to herpes simplex virus-2 in immune seronegative persons. *J Immunol* **184**:3250-3259.

Preacher et al. (2001). Calculation for Fisher's Exact Test: An interactive calculation tool for Fisher's exact probability test for 2x2 tables. [Computer software]. Available from <http://quantpsy.org>.

10

Pyles et al. (2002). Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* **76**:11387-11396.

20

Rana et al. (2006). Sexual behaviour and condom use among individuals with a history of symptomatic genital herpes. *Sex Transm Infect* **82**:69-74.

Rattray et al. (1978). Recurrent genital herpes among women: symptomatic v. asymptomatic viral shedding. *Br J Vener Dis* **54**:262-265.

30

Roizman et al. (1984). Identification and preliminary mapping with monoclonal antibodies of a herpes simplex virus 2 glycoprotein lacking a known type 1 counterpart. *Virology* **133**:242-247.

Rouse et al. (2006). A tale of 2 alpha-herpesviruses: lessons for vaccinologists. *Clin Infect Dis* **42**:810-817.

40

Samaniego et al. (1998). Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins. *J Virol* **72**:3307-3320.

Sanchez-Martinez et al. (1991). Evaluation of a test based on baculovirus-expressed glycoprotein G for detection of herpes simplex virus type-specific antibodies. *J Infect Dis* **164**:1196-1199.

10

Shin et al. (2012). A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* **491**:463-467.

Shlapobersky et al. (2012). Vaxfectin(R)-adjuvanted plasmid DNA vaccine improves protection and immunogenicity in a murine model of genital herpes infection. *J Gen Virol* **93**:1305-1315.

20

Simmons et al. (1992). Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J Exp Med* **175**:1337-1344.

30

Sperling et al. (2008). The effect of daily valacyclovir suppression on herpes simplex virus type 2 viral shedding in HSV-2 seropositive subjects without a history of genital herpes. *Sex Transm Dis* **35**:286-290.

St Leger et al. (2011). Defining the herpes simplex virus-specific CD8+ T cell repertoire in C57BL/6 mice. *J Immunol* **186**:3927-3933.

40

Staats et al. (1991). Anti-glycoprotein D monoclonal antibody protects against herpes simplex virus type 1-induced diseases in mice functionally depleted of selected T-cell subsets or asialo GM1+ cells. *J Virol* **65**:6008-6014.

Stanberry et al. (2002). Glycoprotein-D-
adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* **347**:1652-1661.

10

Straus et al. (1994). Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet* **343**:1460-1463.

20

Straus et al. (1997). Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virus type 2 glycoprotein D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial. *J Infect Dis* **176**:1129-1134.

Theil et al. (2003). Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* **163**:2179-2184.

30

Tirabassi et al. (2011). A mucosal vaccination approach for herpes simplex virus type 2. *Vaccine* **29**:1090-1098.

Tronstein et al. (2011). Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. *JAMA* **305**:1441-1449.

40

Vergidis et al. (2009). Meta-analytical studies on the epidemiology, prevention, and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Infect Dis Clin North Am* **23**:295-308.

Wald et al. (2000). Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *N Engl J Med* **342**:844-850.

10

Wald et al. (2001). Effect of condoms on reducing the transmission of herpes simplex virus type 2 from men to women. *JAMA* **285**:3100-3106.

Warren (2002). Getting tested for herpes. *FDA Consum* **36**:40.

20

Warren et al. (2005). Counseling the patient who has genital herpes or genital human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am* **19**:459-476.

Warren et al. (2011). Availability of serologic and virologic testing for herpes simplex virus in the largest sexually transmitted disease clinics in the United States. *Sex Transm Dis* **38**:267-269.

30

Weir et al. (1989). Recombinant vaccinia virus expressing the herpes simplex virus type 1 glycoprotein C protects mice against herpes simplex virus challenge. *J Gen Virol* **70 (Pt 10)**:2587-2594.

40

Whittington et al. (2001). Use of a glycoprotein G-based type-specific assay to detect antibodies to herpes simplex virus type 2 among

persons attending sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis* **28**:99-104.

Xu et al. (2006). Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA* **296**:964-973.

Zhu et al. (2007). Virus-specific CD8+ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *J Exp Med* **204**:595-603.

10

【0189】

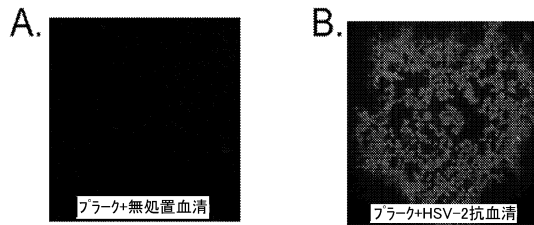
本明細書に引用する特許、特許出願および文献は各々、参照により組み込まれる。冠詞の「一つの(a)」または「一つの(an)」の使用は、1つ以上を含むものとされる。

【0190】

本発明の血清学的アッセイのいくつかの特定の実施形態が本明細書に記載されているが、当業者であれば、より広い態様における本発明から逸脱せずに、および以下の特許請求の範囲に記載する通り、本明細書に対して変更および修飾を行うことができることが理解されよう。

20

【図1-1】



【図1-2】

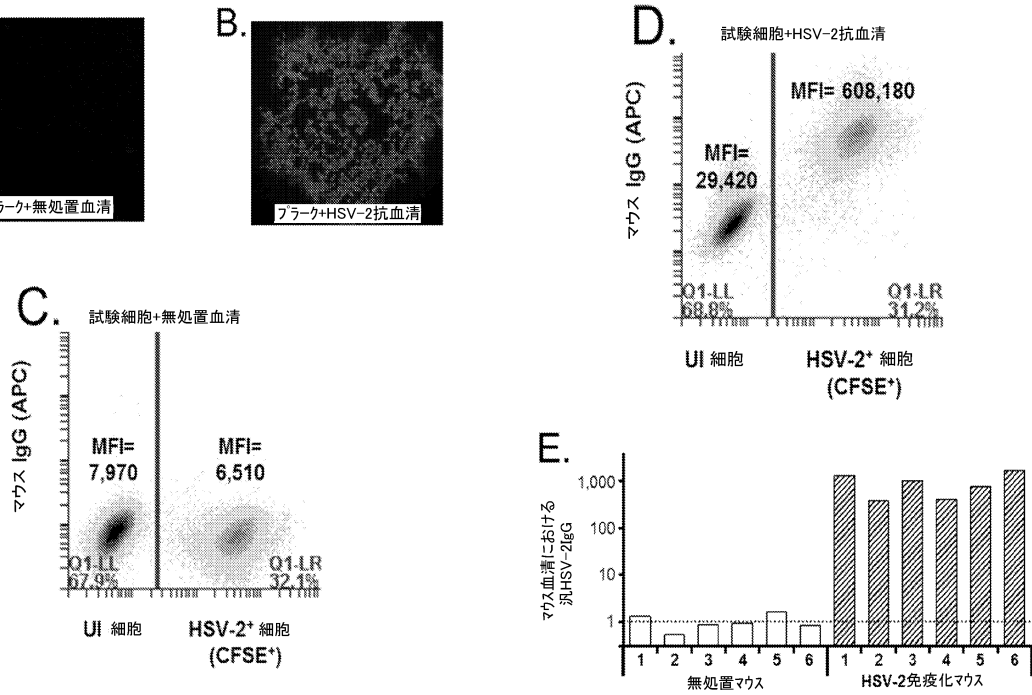


FIG. 1

FIG. 1 続き

【 図 2 - 1 】

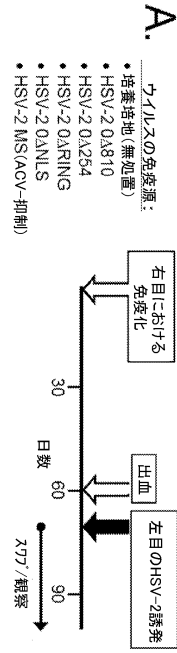


FIG. 2

【 図 2 - 2 】

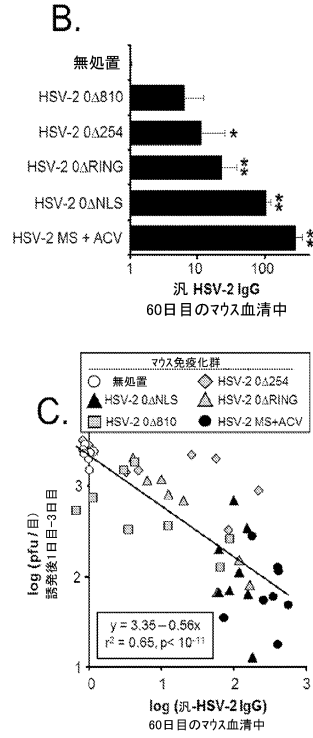


FIG. 2 続き

【 図 2 - 3 】

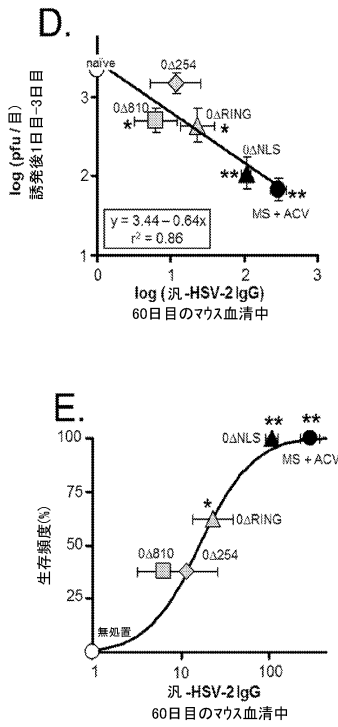


FIG. 2 続き

【 図 3 - 1 】

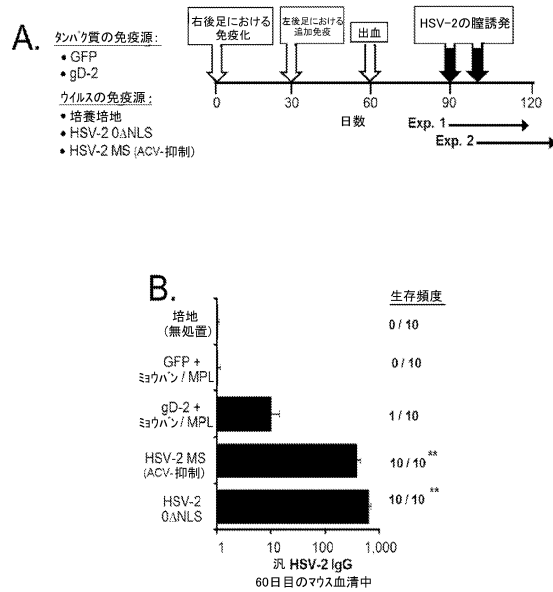


FIG. 3

【 図 3 - 2 】

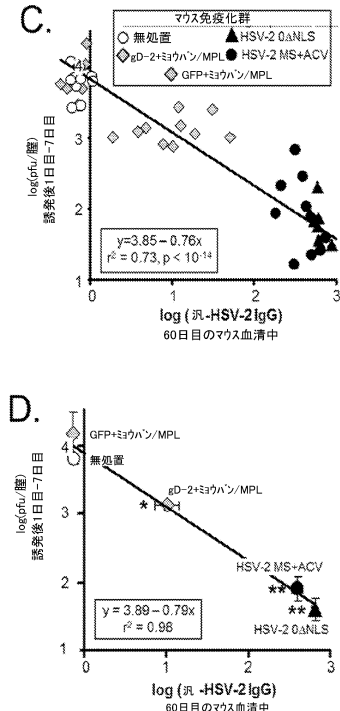


FIG. 3 続き

【 図 4 - 1 】

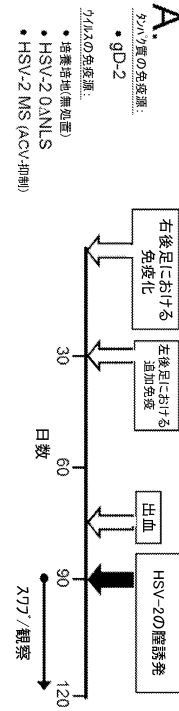


FIG. 4

【 図 4 - 2 】

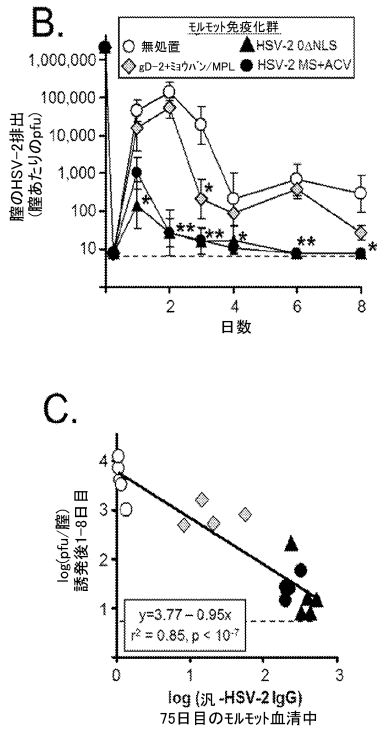


FIG. 4 続き

【 図 4 - 3 】

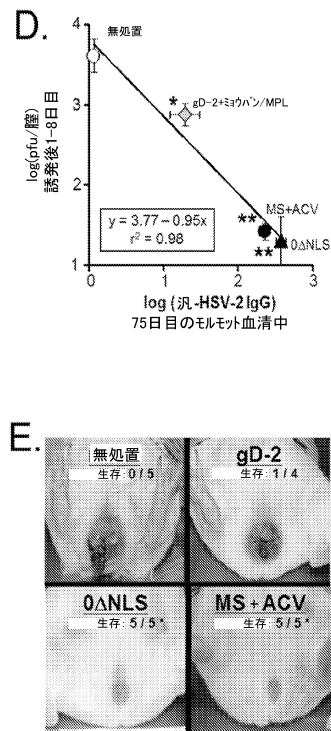


FIG. 4 続き

【図 5 - 1】

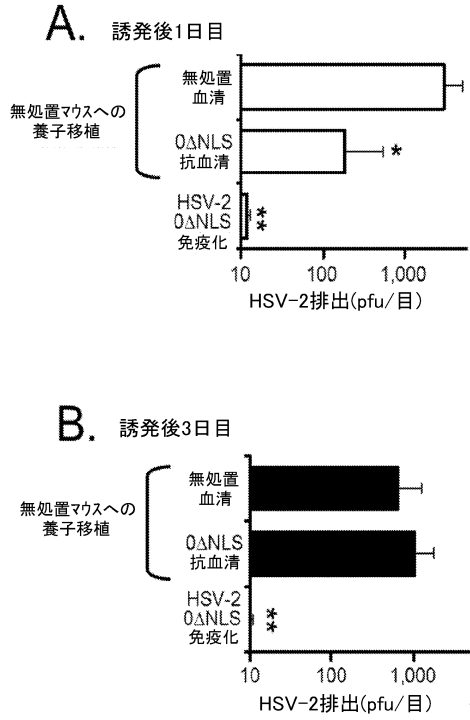


FIG. 5

【図 5 - 2】

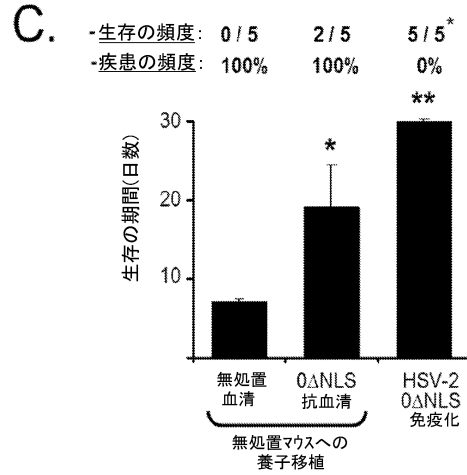


FIG. 5 続き

【図 6】

直線範囲 ^a	中和Titer		ELISA (総HSV-2 Ag)		IgG-抗体滴度	
	1:21-1:1,000	1:100-1:100,000	1:6,000-1:6,000,000	1:6,000-1:6,000,000	1:6,000-1:6,000,000	1:6,000-1:6,000,000
変動係数 ^b	16 ± 8%	13 ± 3%	5 ± 1%			
適合度 ^c (直線回帰)	$r^2 = 1.00$ ($p < 10^{-5}$)	$r^2 = 1.00$ ($p < 10^{-10}$)	$r^2 = 1.00$ ($p < 10^{-12}$)			

FIG. 6

【図 7】

免疫源 ^a	種 ^b	log ₁₀ HSV-2Ag ^c	眼のHSV-2排出に 対する感染の回数 ^d	生存頻度 ^e
接種 (無処置)	7/2X	-0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0/10
	1E1E7b	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.2	0/5
GFP+ 3Dp/ΔNLS	7/2X	-0.1 ± 0.1	-0.4 ± 0.3	0/10
	1E1E7b	ND ^f	ND	ND
gD ⁺ 3Dp/ΔNLS	7/2X	1.0 ± 0.1**	0.7 ± 0.1*	1/10
	1E1E7b	1.3 ± 0.2**	0.7 ± 0.1*	1/4
HSV-2 NIS (ΔCV-100)	7/2X	2.6 ± 0.1**	1.9 ± 0.2**	10/10 ^{††}
	1E1E7b	2.4 ± 0.1**	2.2 ± 0.1**	5/5 [†]
HSV-2 0ΔNLS	7/2X	2.8 ± 0.1**	2.2 ± 0.2**	10/10 ^{††}
	1E1E7b	2.6 ± 0.1**	2.3 ± 0.3**	5/5 [†]

FIG. 7

【 図 8 - 1 】

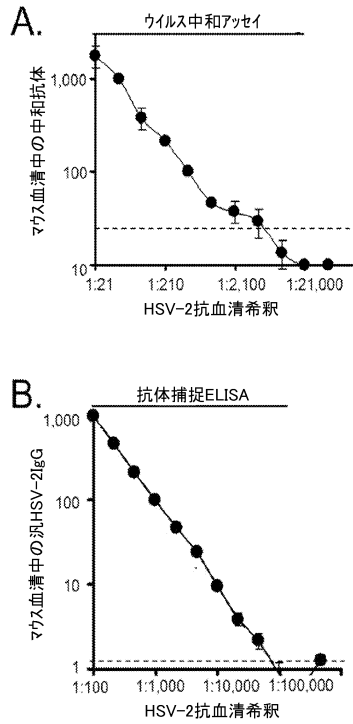


FIG. 8

【 図 8 - 2 】

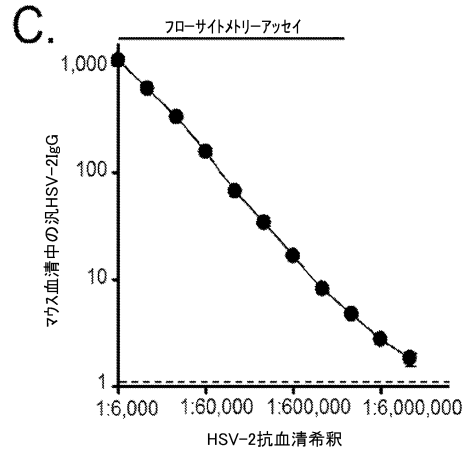


FIG. 8 続き

【 図 9 - 1 】

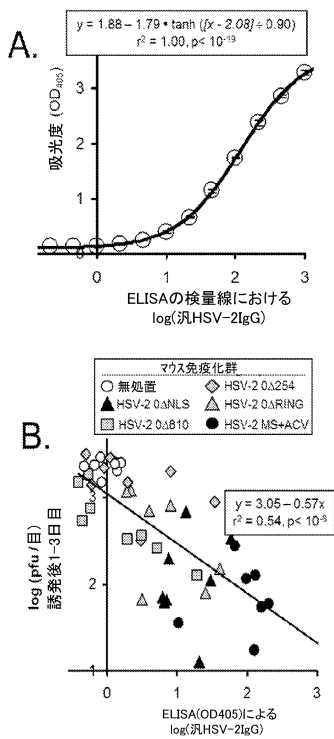


FIG. 9

【 図 9 - 2 】

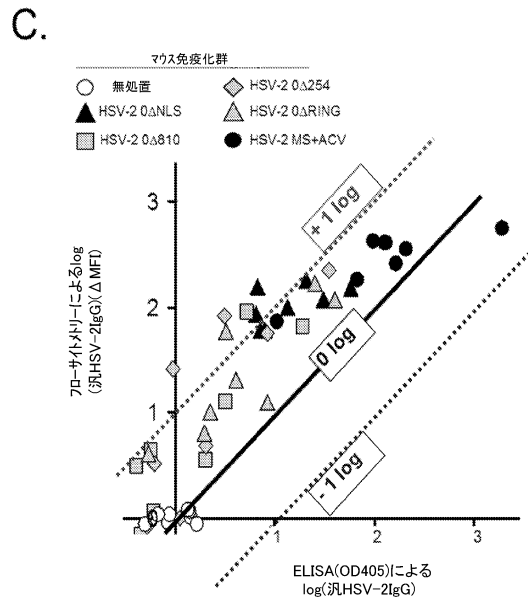


FIG. 9 続き

【 図 1 0 - 1 】

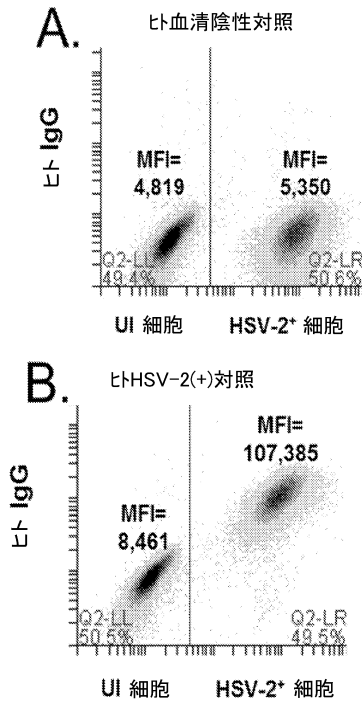


FIG. 10

【 図 1 0 - 2 】

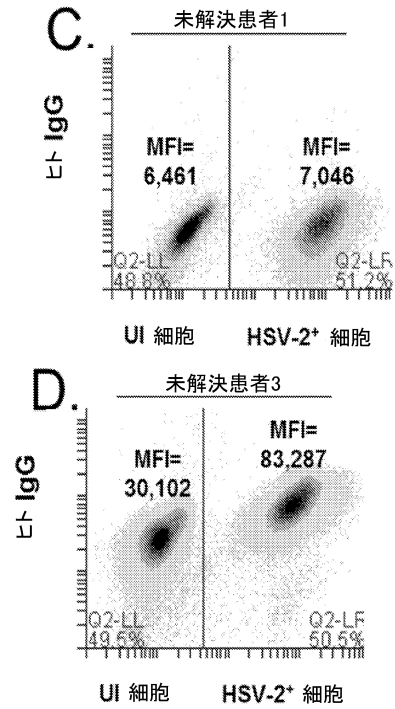


FIG. 10 続き

【 図 1 1 】

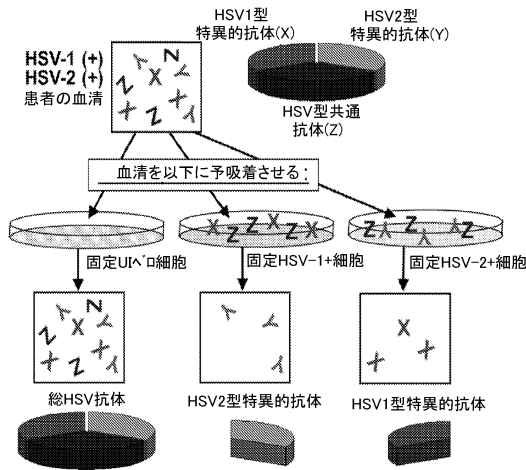


FIG. 11

【 図 1 2 - 1 】

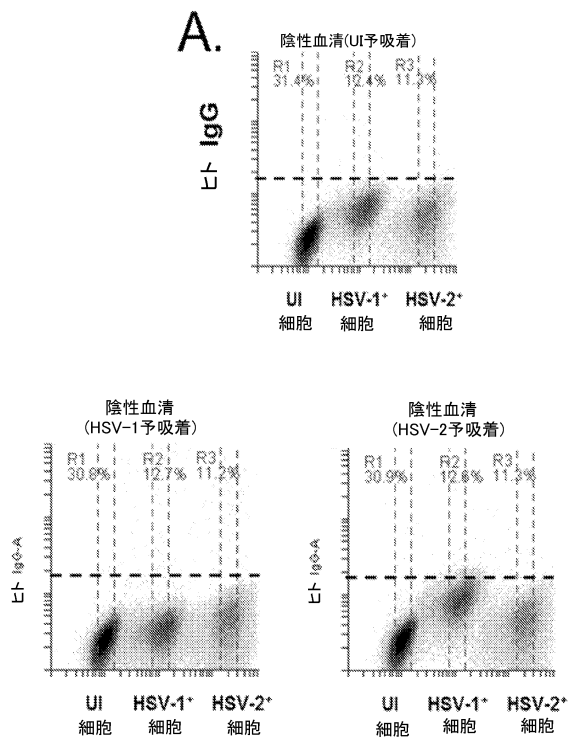


FIG. 12

【 図 1 2 - 2 】

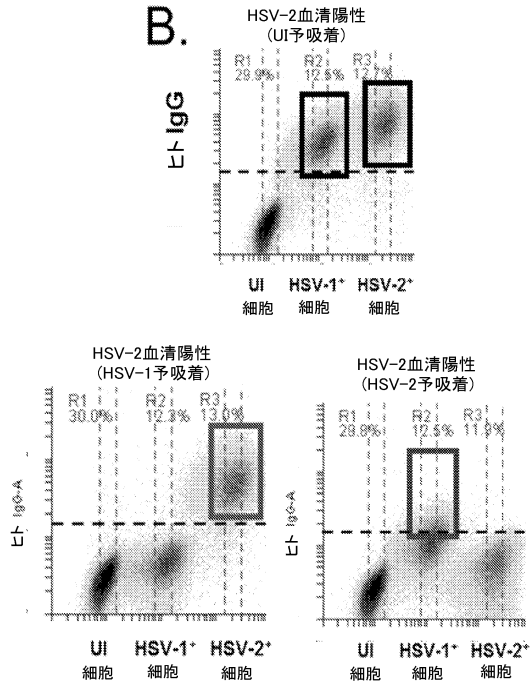


FIG. 12 続き

【 図 1 2 - 3 】

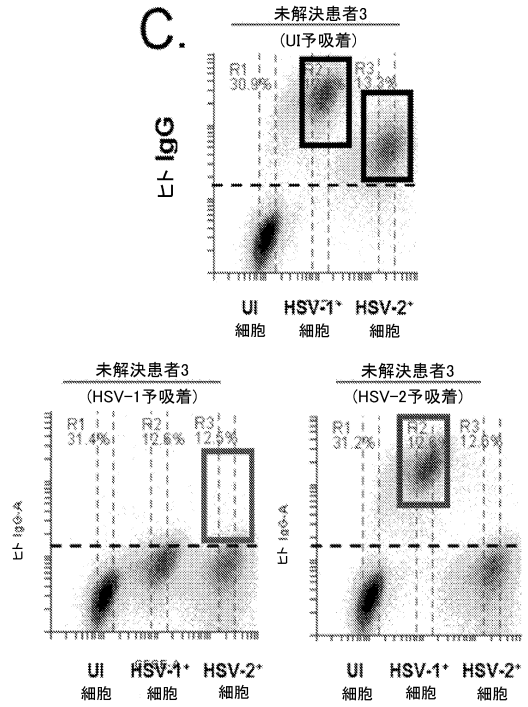


FIG. 12 続き

【 図 1 3 】

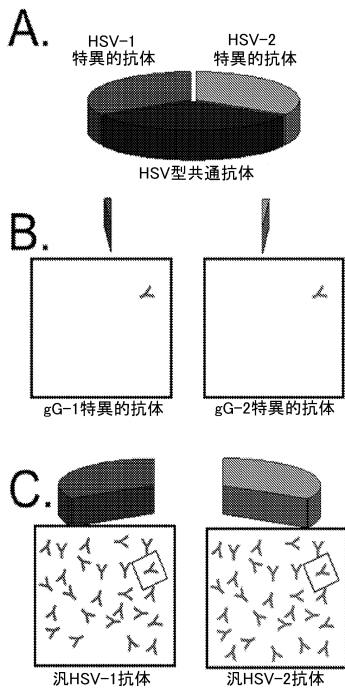


FIG. 13

【 図 1 4 - 1 】

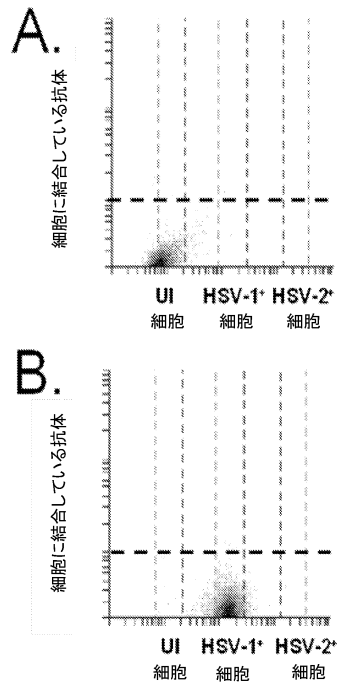


FIG. 14

【 図 1 4 - 2 】

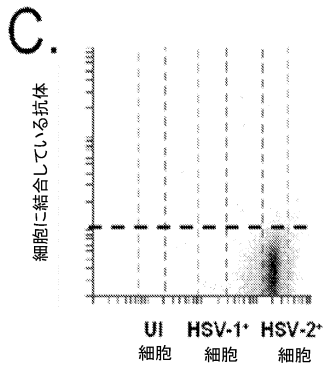


FIG. 14 続き

【 図 1 5 - 1 】

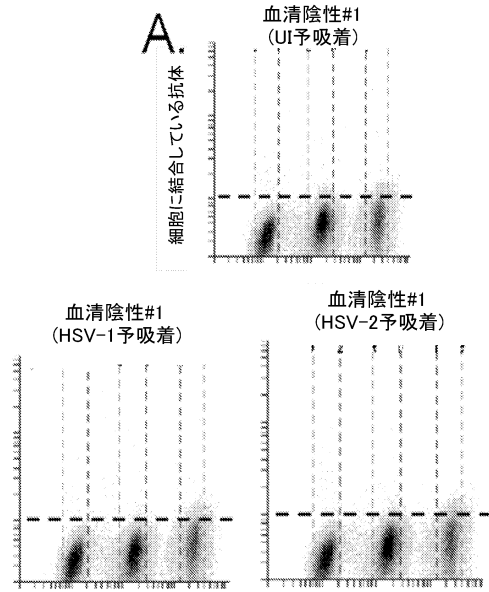


FIG. 15

【 図 1 5 - 2 】

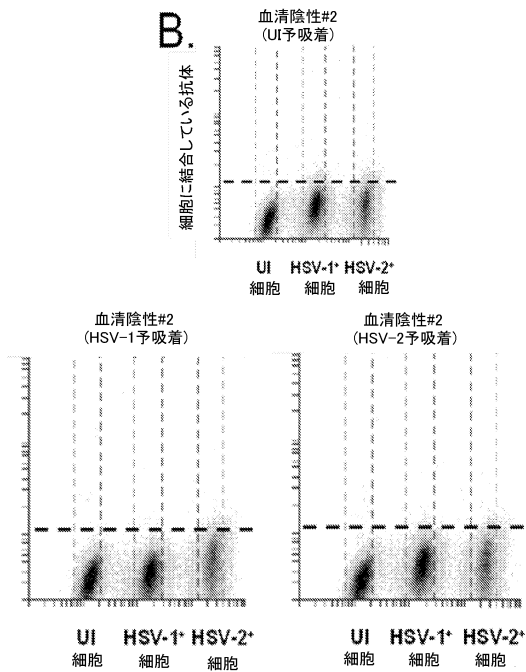


FIG. 15 続き

【 図 1 5 - 3 】

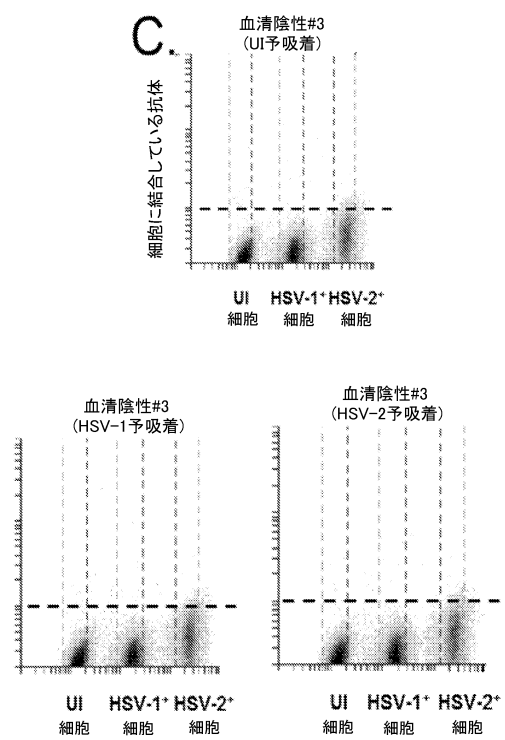


FIG. 15 続き

【図15-4】

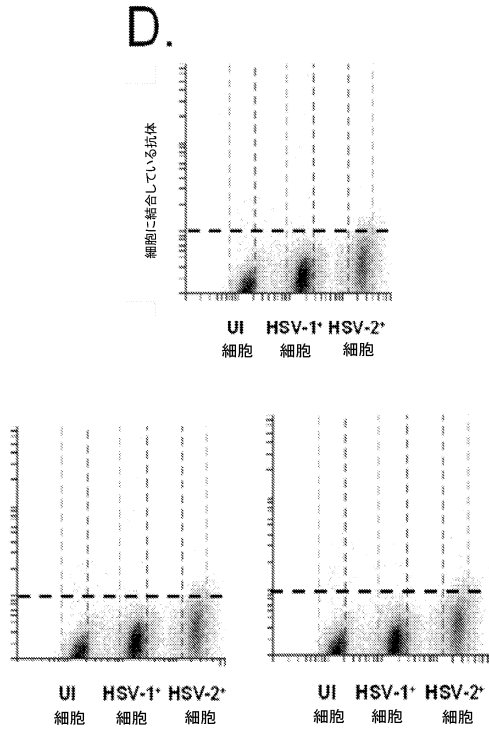


FIG. 15 続き

【図16-1】

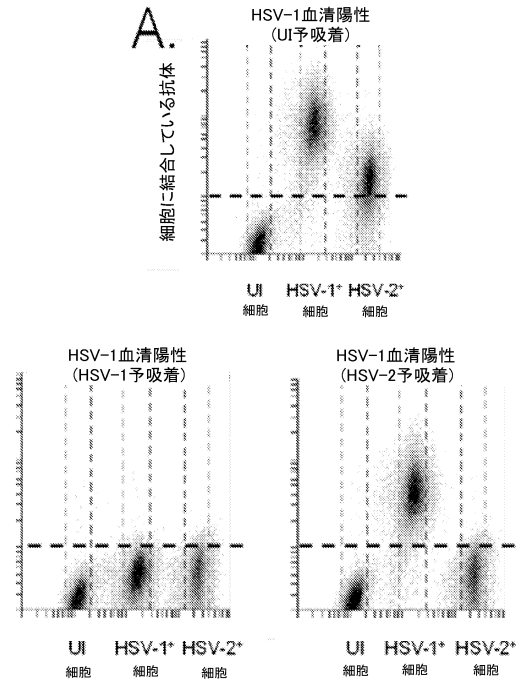


FIG. 16

【図16-2】

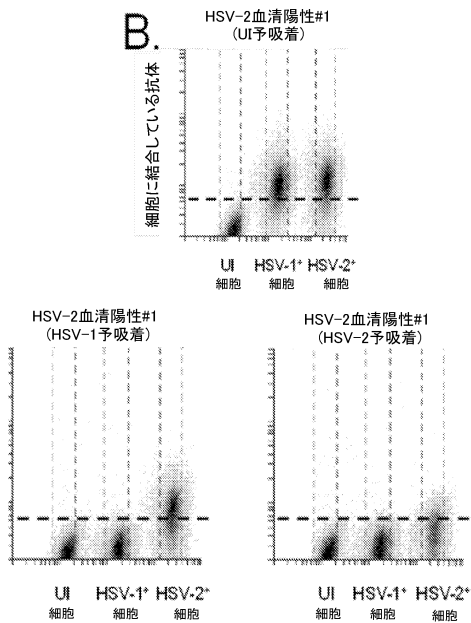


FIG. 16 続き

【図16-3】

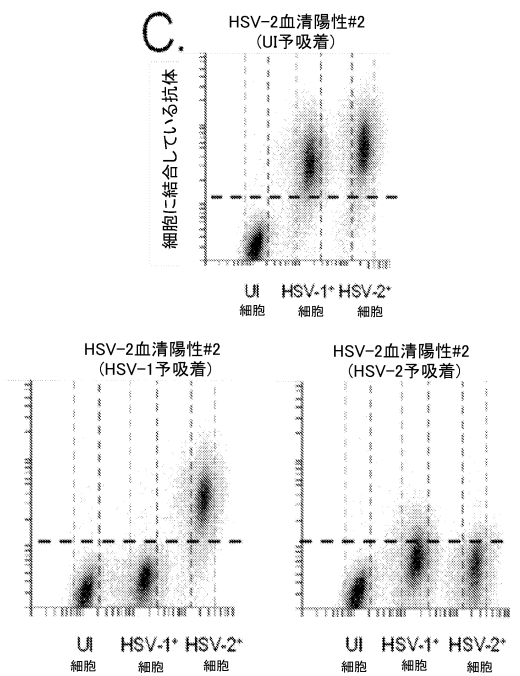


FIG. 16 続き

【 図 1 6 - 4 】

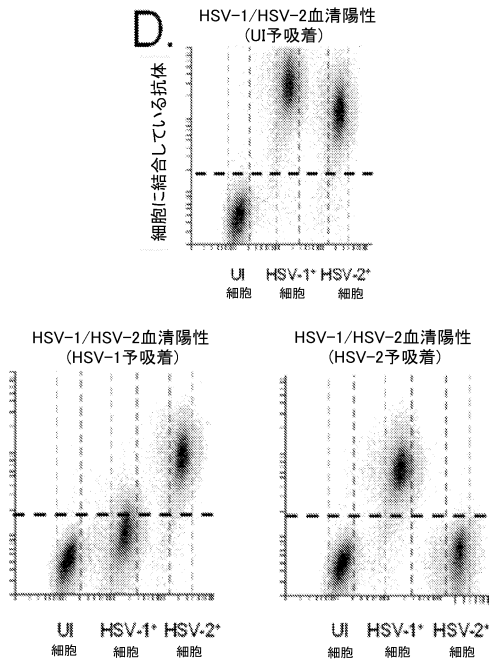


FIG. 16 続き

【 図 1 7 - 1 】

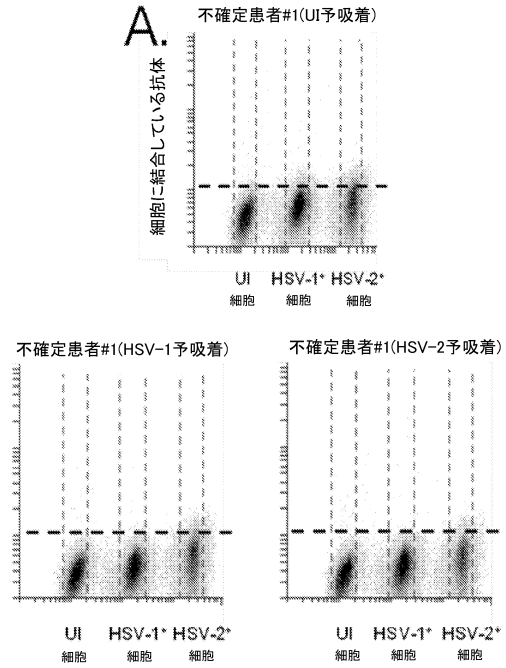


FIG. 17

【 図 1 7 - 2 】

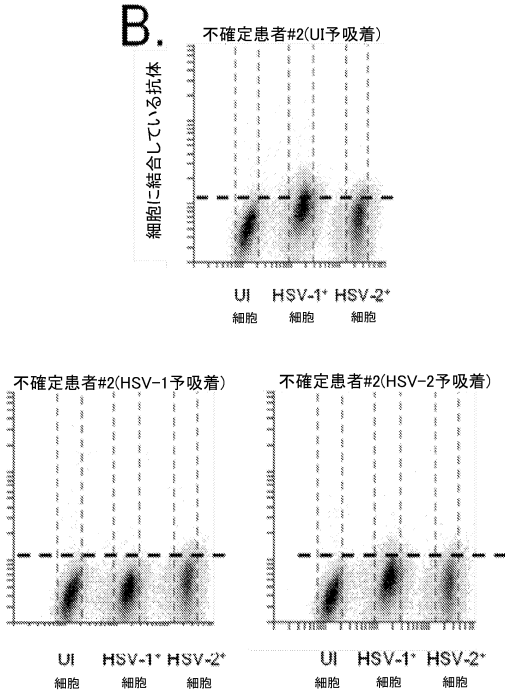


FIG. 17 続き

【 図 1 7 - 3 】

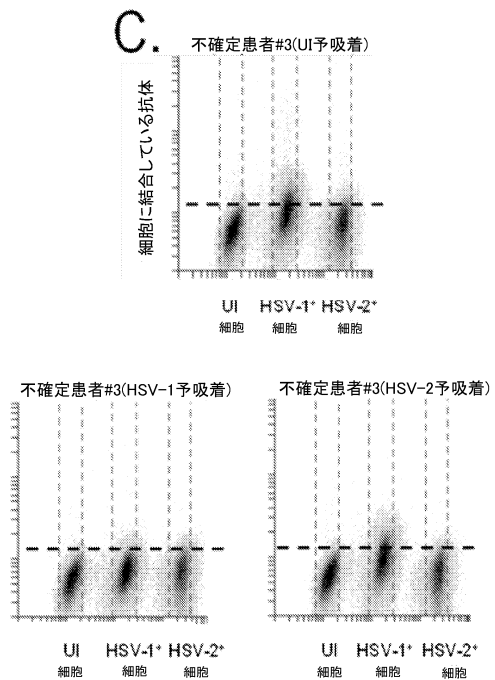


FIG. 17 続き

【図18-1】

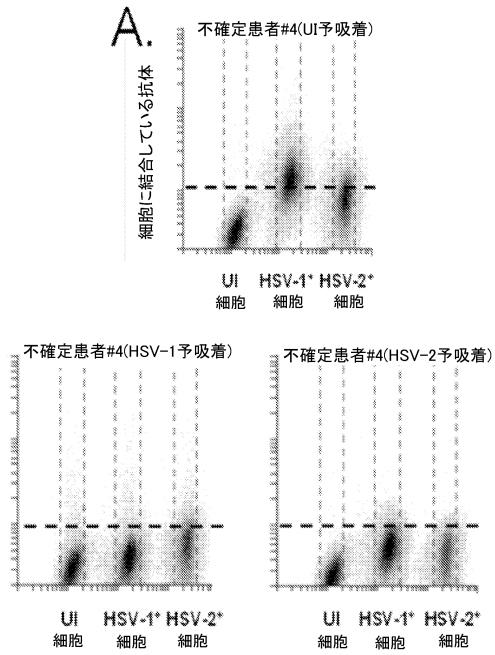


FIG. 18

【図18-2】

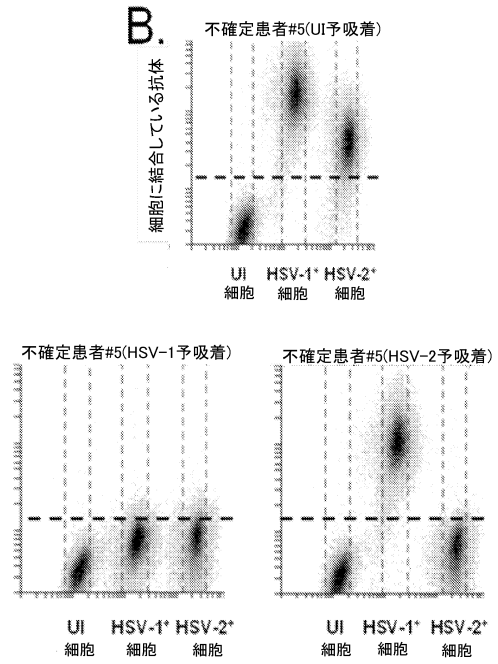


FIG. 18 続き

【図18-3】

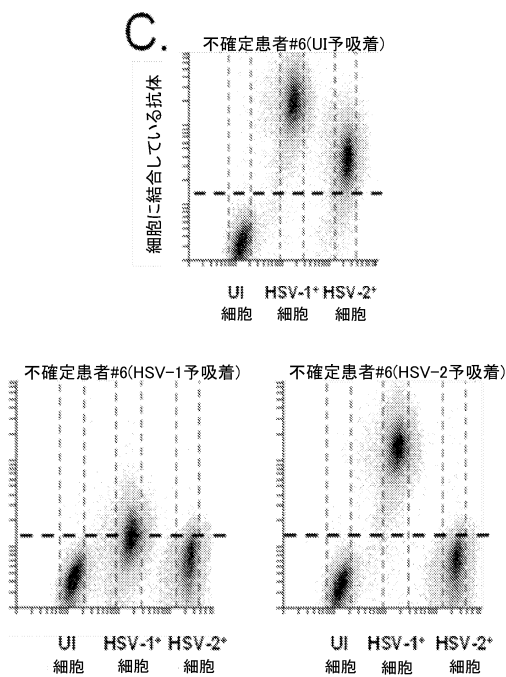


FIG. 18 続き

【図19-1】

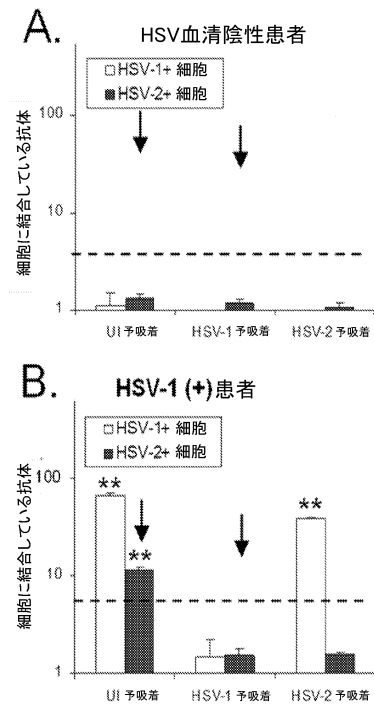


FIG. 19

【 図 19 - 2 】

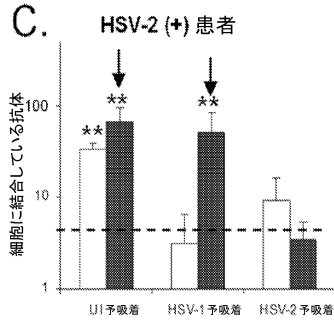


FIG. 19 続き

【 図 20 】

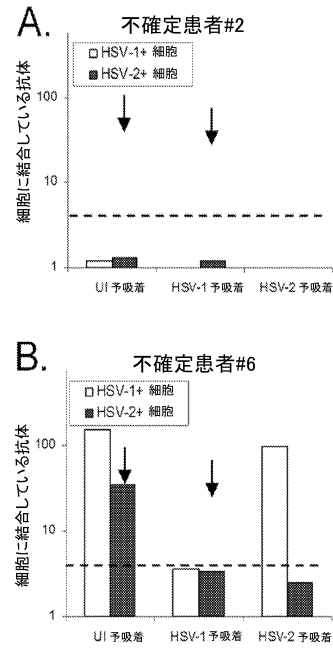


FIG. 20

【 図 21 】

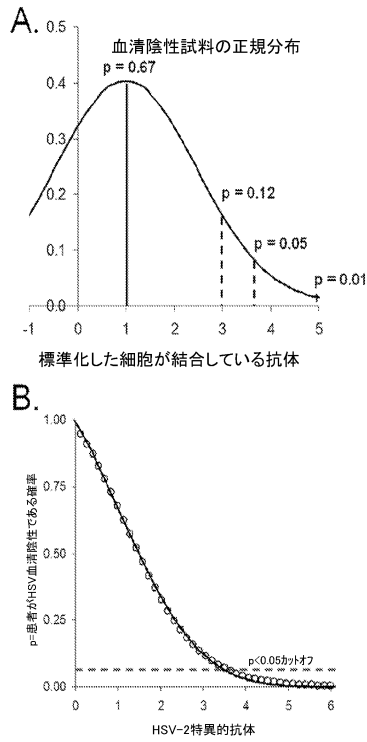


FIG. 21

【 図 22 - 1 】

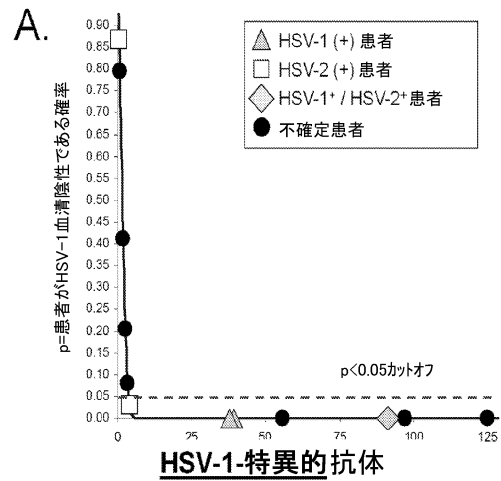


FIG. 22

【 図 2 2 - 2 】

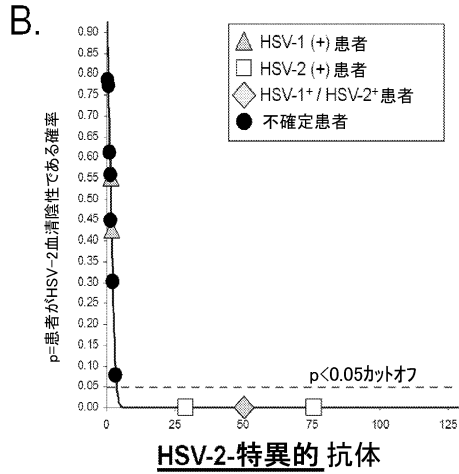


FIG. 22 続き

【 図 2 3 】

非感染の、HSV-1またはHSV-2+抗原マトリクスに予吸着された、1:2,000希釈のHSV-2+血清試料で染色した単一のHSV-1またはHSV-2プラーク

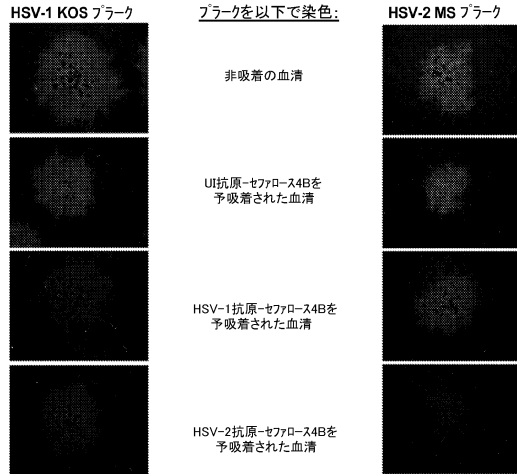


FIG. 23

【 図 2 4 】

非感染の、HSV-1またはHSV-2+抗原マトリクスに予吸着された、1:2,000希釈のHSV-1+およびHSV-2+血清試料で染色した単一のHSV-1またはHSV-2プラーク

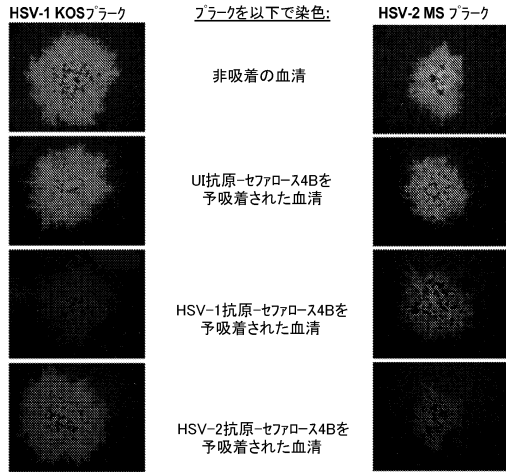


FIG. 24

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表平11-510893(JP,A)
特表2009-501900(JP,A)
特表2007-526919(JP,A)
米国特許第04764459(US,A)
EING, B.R. et al. , Evaluation of Confirmatory Strategies for Detection of Type-Specific Antibodies against Herpes Simplex Virus Type 2, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, American Society for Microbiology, 2002年, Vol.40/No.2, pp.407-413
ASHLEY, R.L. et al. , Comparison of Western Blot (Immunoblot) and Glycoprotein G-Specific Immunodot Enzyme Assay for Detecting Antibodies to Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 in Human Sera, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, American Society for Microbiology, 1988年 4月, Vol.26/No.4, pp.662-667
SHERLOCK, C.H. et al. , Type Specificity of Complement-Fixing Antibody against Herpes Simplex Virus Type 2 AG-4 Early Antigen in Patients with Asymptomatic Infection, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, American Society for Microbiology, 1986年12月, Vol.24/No.6, pp.1093-1097
BERNSTEIN, D.I. et al. , Serologic Analysis of First-Episode Nonprimary Genital Herpes Simplex Virus Infection, The American Journal of Medicine, 1984年12月, Vol.77, pp.1055-1060
HALFORD, W.P. et al. , Pan-HSV-2 IgG Antibody in Vaccinated Mice and Guinea Pigs Correlates with Protection against Herpes Simplex Virus 2, PLOS ONE, 2013年 6月, Vol.8/No.6, e65523
JANI, I.V. et al. , Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings, The LANCET INFECTIOUS DISEASES, 2002年 4月, Vol.2, pp.243-250
HAMPAR, B. et al. , Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Antibodies Against Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 in Human Sera, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, American Society for Microbiology, 1985年 4月, Vol.24/No.4, pp.496-500
CARUSO, A. et al. , FLOW CYTOMETRIC INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY WITH HIGH SENSITIVITY AND SPECIFICITY FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO HSV-1 AND HSV-2, EUROPEAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY, 1993年 9月, Vol.9/No.5, pp.547-552
JORDAN, J. & RYTEL, M.W. , Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) Type-1 IgG and IgM Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, American Society of Clinical Pathologists, 1981年10月, Vol.76/No.4, pp.467-471

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

PubMed

专利名称(译)	用于确定患者是否感染单纯疱疹病毒1型 (HSV-1) 和/或2型 (HSV-2) 的快速且灵敏的血清学检测		
公开(公告)号	JP6449325B2	公开(公告)日	2019-01-09
申请号	JP2016560632	申请日	2014-12-17
[标]发明人	ハルフォードウィリアムピー		
发明人	ハルフォード,ウィリアム・ピー		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/56994 G01N2333/035 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/569.J G01N33/53.N G01N33/543.575 G01N21/64.F		
优先权	61/917584 2013-12-18 US		
其他公开文献	JP2017502314A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

的一个)的含有抗体的血清样品,将至少三个血清子样品的步骤,和b) i) 非感染细胞, (ii) HSV-1感染的细胞或 (iii) 从HSV-2感染的细胞的细胞抗原,每个物理矩阵,然后温育单独地,以形成至少三个血清样品分混合物,其结果是,存在于各混合物的抗体是免疫反应性,抗体和至少3被结合到基质用于感染一种或多种单纯疱疹病毒的测定法,包括使其形成预吸附的血清亚样品部分。每个血清子样本药水被予吸磨损,未感染由HSV-1或HSV-2,从已感染由每个HSV-1和HSV-2的用抗体中温育的细胞结合到基质用存在的抗原对抗体进行免疫反应,以形成与基质结合的三种免疫反应物。确定每个免疫反应物,反应体积的量,血清测试受试者,或已经感染了HSV-1和HSV-2的一个或二者都被感染,或感染了它是否是预测。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6449325号 (P6449325)
(45) 発行日 平成31年1月9日 (2019.1.9)	(24) 登録日 平成30年12月14日 (2018.12.14)	
(51) Int. Cl.	F 1	
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	J
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	F
請求項の数 15 (全 68 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-560632 (P2016-560632)	(73) 特許権者 516181619	
(86) (22) 出願日 平成26年12月17日 (2014.12.17)	ボード・オブ・トラスティーズ、サザン・	
(65) 公表番号 特表2017-502314 (P2017-502314A)	イリノイ・ユニバーシティ	
(43) 公表日 平成29年1月19日 (2017.1.19)	アメリカ合衆国、イリノイ・62794-	
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/070915	9616、スプリングフィールド、ビー-	
(87) 国際公開番号 W02015/095366	オー・ボックス・19616、ノース・ラ	
(87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)	トリッジ・ストリート・801	
審査請求日 平成29年12月15日 (2017.12.15)	110001173	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号 61/917,584	特許業務法人川口国際特許事務所	
(32) 優先日 平成25年12月18日 (2013.12.18)	ハルフォード、ウィリアム・ピー	(72) 発明者
(33) 優先権主張国 米国 (US)	アメリカ合衆国、イリノイ・62704、	スプリングフィールド、サウス・フェルド
	カンブ・ストリート・912	
	審査官 西浦 昌哉	
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者が単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) および/または2型 (HSV-2) に感染しているか否かを決定するための迅速で高感度な血清学的アッセイ