

インターロイキン-2 融合単純ヘルペスウイルス glycoprotein D によるマウスヘルペス角膜炎の予防効果

井上 智之¹⁾, 井上 幸次¹⁾, 中村 孝夫¹⁾, 吉田 篤史¹⁾, 井上由美子¹⁾
 田野 保雄¹⁾, 下村 嘉一²⁾, 藤沢 幸夫³⁾, 青野 亜紀³⁾, 林 皓三郎⁴⁾

¹⁾大阪大学医学部眼科学教室, ²⁾近畿大学医学部眼科学教室

³⁾武田薬品工業株式会社, ⁴⁾神戸市環境保健研究所

要 約

目 的 : 単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) の glycoprotein D (gD) とヒトインターロイキン-2 (IL-2) を融合させた gD-IL-2 の蛋白ワクチンおよびプラスミド DNA ワクチンのヘルペス角膜炎に対する感染防御効果の評価を行った。

方 法 : 遺伝子工学的に gD-IL-2 発現プラスミドおよび gD-IL-2 蛋白を作製した。BALB/c マウスを用いて、皮下もしくは結膜下注射で gD-IL-2 蛋白を 1 μ g/0.1 ml を 3 週おきに 2 回ワクチン投与し、gD-IL-2 プラスミドの場合は結膜下に 90 μ g/0.05 ml を 2 回投与した。gD-IL-2 蛋白ワクチン後の感染防御効果の検討のため、ワクチン後のマウスに HSV-1 の CHR 3

株を経角膜感染させ角膜炎の程度 (上皮型, 実質型) をスコア化した。gD-IL-2 DNA ワクチンにおいても同様の臨床病変のスコア化を行った。

結 果 : gD-IL-2 蛋白免疫群および gD-IL-2 DNA 免疫群は実質病変の進展を有意に抑制していたが、上皮病変は抑制されなかった。

結 論 : gD-IL-2 ワクチンはヘルペス角膜炎予防に有効である。(日眼会誌 105 : 223-229, 2001)

キーワード : ヘルペス角膜炎, gD-IL-2, 蛋白ワクチン, DNA ワクチン

The Effect of Immunization with Herpes Simplex Virus Glycoprotein D fused with Interleukin-2 against Murine Herpetic Keratitis

Tomoyuki Inoue¹⁾, Yoshitsugu Inoue¹⁾, Takao Nakamura¹⁾, Atsushi Yoshida¹⁾
 Yumiko Inoue¹⁾, Yasuo Tano¹⁾, Yoshikazu Shimomura²⁾, Yukio Fujisawa³⁾
 Aki Aono³⁾ and Kozaburo Hayashi⁴⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

²⁾Department of Ophthalmology, Kinki University School of Medicine

³⁾Biotechnology Research Laboratories, Research and Development Division, Takeda Chemical Industries

⁴⁾Kobe Institute of Health

Abstract

Purpose : To evaluate the effect of vaccination with fusion protein (gD-IL-2) consisting of herpes simplex type 1 (HSV-1) glycoprotein D (gD) and human interleukin-2 (IL-2), and the effect of plasmid DNA vaccine encoding gD-IL-2 against murine herpetic keratitis.

Methods : Plasmid containing gD-IL-2 (pHDL-neol) was constructed, and gD-IL-2 peptide was purified. BALB/c mice were injected twice hypodermally or subconjunctivally with 1 μ g/0.1 ml of gD-IL-2 peptide, or twice subconjunctivally with 90 μ g/0.05 ml of gD-IL-2 plasmid DNA. Neutralizing antibody titer and delayed-type hypersensitivity (DTH) against HSV-1 were measured. Immunized

mice were challenged with CHR 3 strain of HSV-1 via the cornea. The clinical picture of epithelial and stromal keratitis was scored.

Results : Stromal keratitis was inhibited in gD-IL-2 peptide- or gD-IL-2 DNA-immunized mice, but epithelial keratitis was not. It was confirmed that plasmid gD-IL-2 elicited significant serum virus neutralizing titer and DTH response.

Conclusion : Vaccination with gD-IL-2 was effective against herpetic keratitis. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 223-229, 2001)

Key words : Herpetic keratitis, gD-IL-2, Peptide vaccination, DNA vaccination

別刷請求先 : 565-0871 吹田市山田丘 2-2 大阪大学医学部眼科学教室 井上 智之
 (平成 12 年 4 月 3 日受付, 平成 12 年 10 月 5 日改訂受理)

Reprint requests to : Tomoyuki Inoue, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School,
 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

(Received April 3, 2000 and accepted in revised form October 5, 2000)

I 緒 言

単純ヘルペスウイルス(HSV)によるヘルペス角膜炎は三叉神経節に HSV が潜伏し、何らかの刺激により再活性化することで上皮型角膜ヘルペスとして樹枝状および地図状角膜炎を、実質型角膜ヘルペスとして角膜実質内の浮腫と混濁を呈する。管理上の大きな問題として再発を繰り返すうちに、実質内への瘢痕や血管侵入が生じ著明な視力低下を惹き起こすことがあげられる。主な治療は、抗ウイルス剤によるウイルス増殖抑制とステロイド薬による炎症の軽減である。このように現在の治療は対症的で、上皮型は治癒するが、実質型の根本的治療は非常に困難であり、本病態の基幹をなしている再発に対する予防的治療法は確立されていない。

HSV による疾患をワクチンによりコントロールすることが以前から考えられており、他の感染症のワクチンと同様に、1940年代から1970年代にかけて、発育鶏卵や培養細胞で増殖させた HSV を熱、紫外線、ホルマリンなどで不活化したワクチンが数多く検討された。それらにより、かなりの効果が示されたが、プラセボ効果も強いことがわかった。さらに、潜伏感染の問題や発癌の可能性などの潜在的懸念から HSV ワクチン開発の方向性は、生ワクチンよりもサブユニットワクチンへと向けられた¹⁾。近年、HSV 特異的な膜抗原である glycoprotein はビリオンや感染細胞表面に発現し、中和反応、cytotoxic T lymphocytes(CTL), delayed type hypersensitivity(DTH)などの感染防御免疫の主要なターゲットとなっていることが示されているため、HSV に対する免疫賦活能が高いと考えられ、ワクチンの成分として研究がなされてきた^{2)~6)}。中でも glycoprotein D(gD)は HSV 1 型および 2 型の共通抗原で、ウイルス中和の主要な標的であり、細胞性免疫との関与も深い。このため、gD 蛋白は HSV ワクチンの研究対象となり、HSV 致死感染の予防効果があり⁷⁾、さらに、角膜炎に対する効果についても Inoue ら⁸⁾によって、上皮病変の抑制効果はないが、実質病変は抑制可能であることが示されている。しかし、蛋白ワクチンの場合、摂取量か回数を多く必要とし、アジュバントの併用がないと十分な効果が得られないなどの問題がある⁹⁾。Hinuma ら¹⁰⁾¹¹⁾は免疫反応促進性サイトカインであるインターロイキン-2(IL-2)を gD に遺伝子工学的に融合させた gD-IL-2 蛋白を作製し、ワクチンとしても高い免疫誘導能を示すと同時に HSV 致死感染予防効果があることを報告した。そこで今回、我々は gD-IL-2 蛋白のヘルペス角膜炎に対する予防効果をマウスの初感染角膜 HSV モデルを用いて検討した。

一方近年、膜抗原の代わりにプラスミド DNA を投与方法(DNA ワクチネーション)が開発され¹²⁾¹³⁾、インフルエンザ⁹⁾やヒト免疫不全ウイルス(HIV)¹⁴⁾におい

て多くの研究がなされている。その利点として、頻回免疫が可能、細胞性免疫(CTL)の誘導がある、ワクチンのコストが安価であるなどがあげられ、新しい有効な手段として注目されている¹⁵⁾。そこで、gD-IL-2 についても、その蛋白を生成するため gD-IL-2 発現ベクターを直接局所免疫することによって、gD-IL-2 DNA ワクチネーションとしての効果が得られないかを検討した。すなわち、ワクチン後の免疫活性を液性免疫(中和抗体価)と細胞性免疫(DTH)に分けて評価し、さらに、感染防御効果を gD-IL-2 蛋白と同様の方法で検討した。

II 実験方法

1. マウス

8週齢の雌の BALB/c マウスを用いた。

2. ウイルス

HSV-1 として CHR 3 株を用いた。Green monkey kidney(GMK)細胞に感染後、細胞変性効果(cytopathic effect)が最大の時点で細胞を凍結融解し、3,000 回転 10 分遠沈後の上清を回収し、 -80° で保存し、これを実験に用いた。ウイルス力価は 96 穴マイクロプレート上の GMK モノレイヤーにおいて antibody overlay 法で測定した。

3. DNA および蛋白の準備

HSV 抗原とアジュバント作用を有する IL-2 とを常に共存させるため、細胞性免疫のエピトープを含む gD と IL-2 から成る融合蛋白質 gD-IL-2 を以下のように作製した。HSV-1 深山株由来 gD 遺伝子の膜貫通コード領域の直前にある制限酵素 Hinf I の下流に成熟型 IL-2 コード領域を結合させ、融合抗原 gD-IL-2 の遺伝子を構築した。SV 40 初期プロモーターの支配下で gD-IL-2 の遺伝子を発現させるプラスミドを構築した(pHDLneo 1)。また、挿入遺伝子なしの pHSGneo をコントロールプラスミドとして用いた。さらに、pHDLneo 1 をマウスミエローマ細胞株 Sp 2/0-Ag 14 に導入し、gD-IL-2 を発現したマウスミエローマ細胞株の培養上清から、疎水性カラムクロマトグラフィ、イオン交換カラムクロマトグラフィおよびゲル濾過によって gD-IL-2 蛋白を精製単離した¹⁰⁾¹¹⁾。

4. ワクチネーションプロトコール

gD-IL-2 蛋白ワクチンについては、 $1\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ をアジュバントなしで腹部皮下注射あるいは両眼に結膜下注射し、初回免疫後 3 週目に同量を反復投与した。gD-IL-2 発現プラスミドによる DNA ワクチンについては、 $90\mu\text{g}/0.05\text{ml}$ を両眼の結膜下腔内に投与し、初回免疫後 1 週目に同量を反復投与した。さらに、挿入遺伝子なしの pHSGneo を同様のプロトコールで投与した一群を対照プラスミド投与群とした。

前処置を加えていない一群は無処置群とした。

5. マウスヘルペス角膜炎の作製とその臨床評価

最終免疫後 3 週目にマウスの両眼角膜を格子状に 10 回 27 ゲージ針で擦過し、HSV-1 (3×10^6 PFU/ml) を 10 μ l 感染させた。感染後経時的に細隙灯顕微鏡による観察を行い評価した。マウスヘルペス角膜炎の臨床スコアは、上皮病変と実質病変のそれぞれを次に示す 5 段階に分けて評価した⁸⁾。上皮性病変は、0：上皮病変なし、あるいは点状表層角膜炎、1：星芒状病変あるいは樹枝状角膜炎の遺残、2：角膜の 4 分の 1 以下を占める樹枝状角膜炎、3：角膜の 4 分の 1 から 2 分の 1 を占める樹枝状角膜炎、4：角膜の 2 分の 1 以上を占める樹枝状角膜炎、さらに、実質性病変は、0：正常、1：軽度浮腫あるいは軽度実質混濁、2：角膜径の 2 分の 1 以下を占める浮腫あるいは混濁、3：角膜径の 2 分の 1 以上を占める浮腫あるいは混濁、4：瞳孔透見不能の強い浮腫あるいは混濁、とした。

6. 中和抗体価の測定

初回免疫 3 週間後のマウスから採血し、血清を分離した。そのマウス血清を 4 段階希釈し、同量の HSV (2×10^8 PFU/ml) を混和して 37° で 1 時間反応させた後、96 ウェル内において生育させた Vero 細胞に吸着させ培養し、その 6 時間後にヘルペス特異抗体を加えた。2 日後に固定染色して各ウェルのプラーク数を算定し、コントロールウェルのプラーク数の 2 分の 1 以上になる最高希釈度を中和抗体価とした。

7. DTH の測定⁵⁾

紫外線で不活化したウイルス (10^7 PFU/ml) を抗原として用いた。対照抗原として GMK 細胞の上清を同様に処理したものを用いた。初回免疫 3 週間後に、マウスの

右耳背側に感染細胞から調整した抗原を、左耳背側に対照抗原を各々 10 μ l ずつマイクロシリンジで皮内注射し、24 時間後の両耳の厚さをマイクロメータで測定して左右差を求めた。

III 結 果

1. gD-IL-2 蛋白または gD-IL-2 プラスミド免疫のヘルペス角膜炎に対する影響

対照群 (無処置群) では上皮病変は感染後 1 日から存在し、2~4 日をピークとして 6~7 日目には自然消退していくが、実質病変はその頃から次第に悪化し、8~10 日目頃にはピークに達する。gD-IL-2 蛋白皮下投与免疫群における臨床病変を経時的に観察しスコア化すると、上皮病変は抑制されなかったが、実質病変は有意に抑制された。図 1 に両病変がピークの際の結果を示す。2 日目の上皮病変は無処置群と有意な差はなかった (Mann-Whitney の U 検定, p 値 > 0.05)、10 日目の実質病変の発生は有意に抑制されていた (Mann-Whitney の U 検定, p 値 < 0.05)。また、gD-IL-2 蛋白結膜下投与免疫群においても同様に、上皮病変は無処置群と変化がなかった (Mann-Whitney の U 検定, p 値 > 0.05)、10 日目の実質病変は抑制されていた (Mann-Whitney の U 検定, p 値 < 0.05) (図 3)。さらに、対照プラスミド投与群は無処置群と比較して上皮病変および実質病変に有意な差はなかった (一元配置分散分析 (ANOVA) on ranks, p 値 > 0.05) が、gD-IL-2 プラスミド免疫群においては対照プラスミド投与群、無処置群と比較して、10 日目の実質病変の発生が有意に抑制されていた (ANOVA on ranks. Tukey's method, p 値 < 0.05) (図 4)。ただし、2 日目の上皮病変はやはり対照プラスミド投与群、無処置

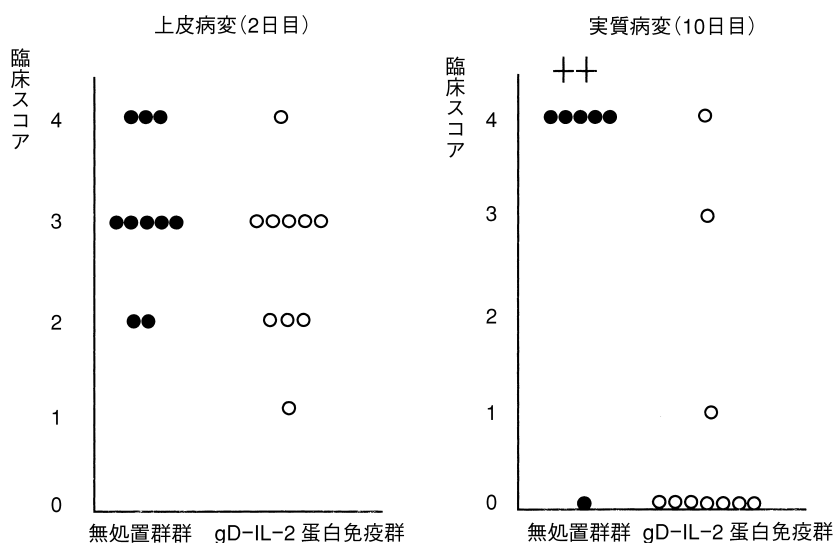


図 1 BALB/c マウスにおけるインターロイキン-2 融合 glycoprotein D (gD-IL-2) 蛋白皮下投与免疫効果。左：感染後 2 日目の上皮型角膜炎。右：感染後 10 日目の実質型角膜炎。+：死亡マウス。各群 5 匹 10 眼。10 日目の実質病変の発生は有意に抑制されていた (Mann-Whitney の U 検定, p 値 < 0.05)。

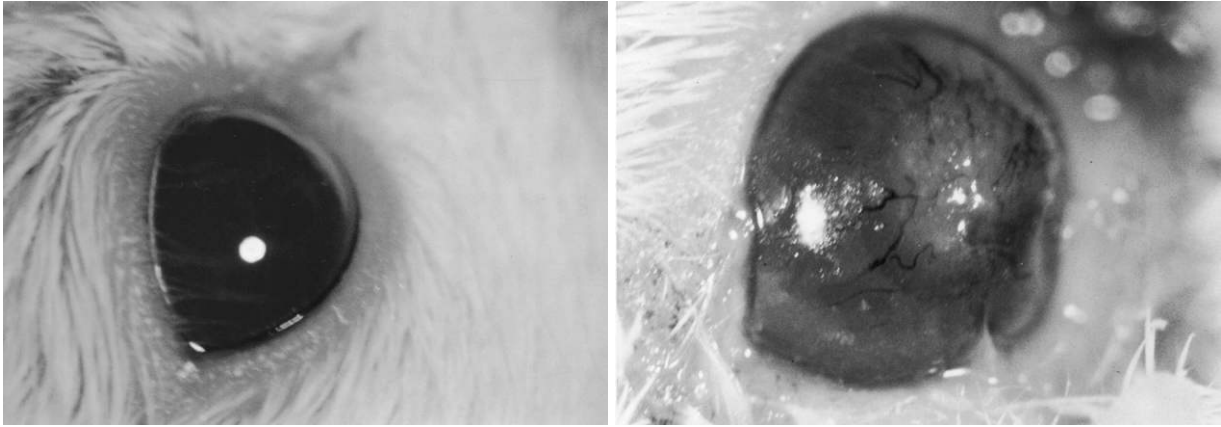


図 2 感染後 10 日目の gD-IL-2 蛋白皮下投与免疫群, 非免疫群の臨床病型。
 左: gD-IL-2 免疫群, 角膜は透明に保たれている。右: 非免疫群, 重篤な血管侵入を伴う角膜実質混濁と浮腫が存在する。

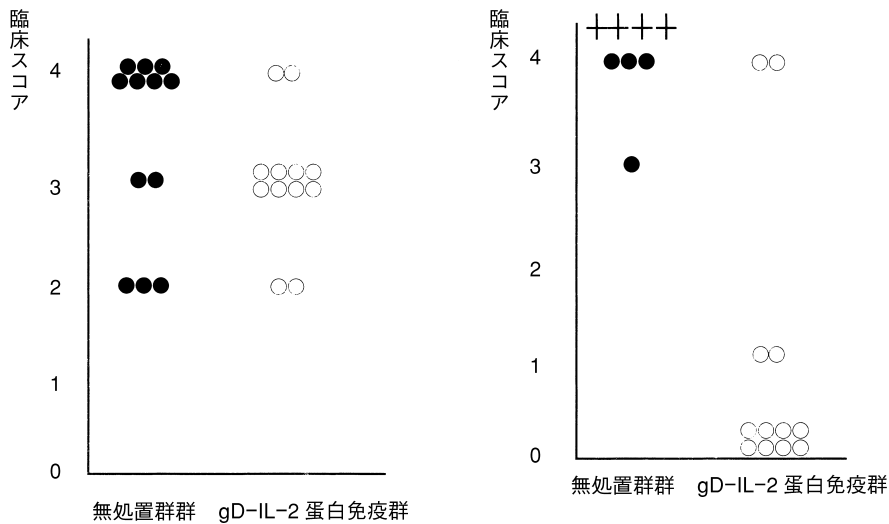


図 3 BALB/c マウスにおける gD-IL-2 蛋白結膜下投与免疫効果。
 左: 感染後 2 日目の上皮型角膜炎。右: 感染後 10 日目の実質型角膜炎。+: 死亡マウス。各群 6 匹 12 眼。10 日目の実質病変は抑制されていた (Mann-Whitney の U 検定, p 値 < 0.05)

群と有意差はなかった (ANOVA on ranks, p 値 > 0.05)。10 日目のコントロールプラスミド免疫群と gD-IL-2 プラスミド免疫群のマウス前眼部写真を図 4 に示す。

2. gD-IL-2 プラスミド免疫により誘導される免疫

液性免疫のパラメータである血清中の中和抗体価(図 5)は, 初回免疫 3 週後において, 免疫群では対照プラスミド投与群と比較し有意に上昇していた (Mann-Whitney の U 検定, p 値 < 0.01)。

細胞性免疫のパラメータである DTH(表 1)については, gD-IL-2 プラスミド免疫群は対照プラスミド投与群と比較し, DTH 反応が有意に上昇していた (One way ANOVA on ranks, Tukey's method, p 値 < 0.05)。

IV 考 按

蛋白ワクチンにおいて, 一般に液性免疫は誘導されるが, 細胞性免疫は得られにくいとされ, これは Inoue ら⁹⁾が gD 蛋白を能動免疫すると抗体を介したウイルス中和および補体依存性細胞障害が有意に誘導されるが, DTH や CTL という細胞性免疫の誘導はなかったという結果に一致していた。しかし, HSV は細胞内に持続感染することを考え併わせると, 理想的には細胞性免疫の誘導が望ましい。一般にサブユニットワクチンにおいては抗原性は通常弱いとされており, 免疫にあたってアジュバンドを必要とすることが多い。ヒトにおいてアジュバンドとして使われているのは水酸化アルミニウムのみであるが, 細胞性免疫をあまり誘導できず, また,

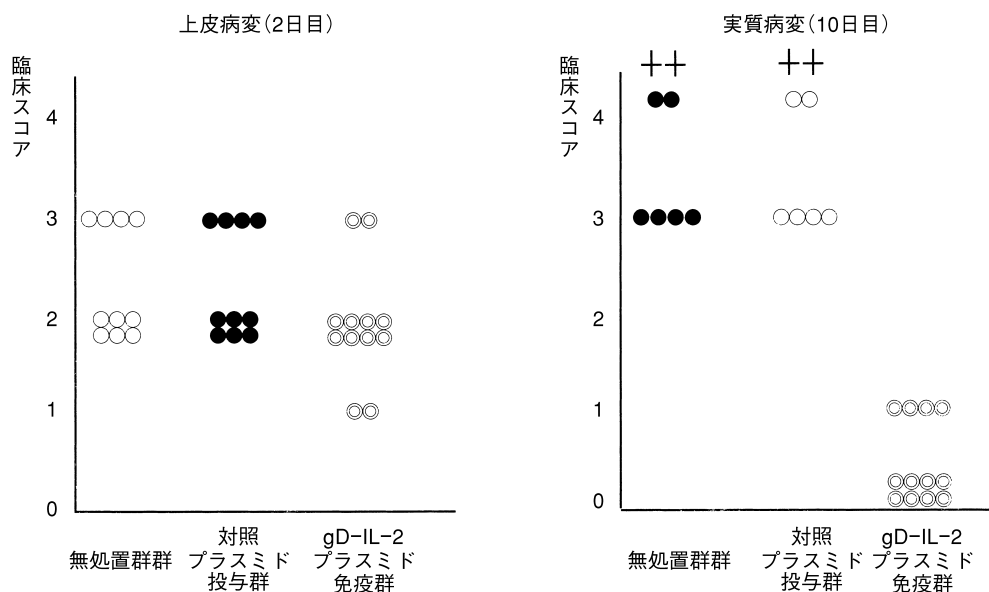


図 4 BALB/c マウスにおける gD-IL-2 プラスミド結膜下投与免疫効果.

左：感染後 2 日目の上皮型角膜炎。右：感染後 10 日目の実質型角膜炎。+：死亡マウス。無処置群，対照プラスミド投与群 5 匹 10 眼，gD-IL-2 プラスミド免疫群は 6 匹 12 眼，gD-IL-2 プラスミド免疫群においては対照プラスミド投与群，無処置群と比較して，10 日目の実質病変の発生が有意に抑制されていた〔一元配置分散分析(ANOVA) on ranks, Tukey’s method, p 値<0.05〕

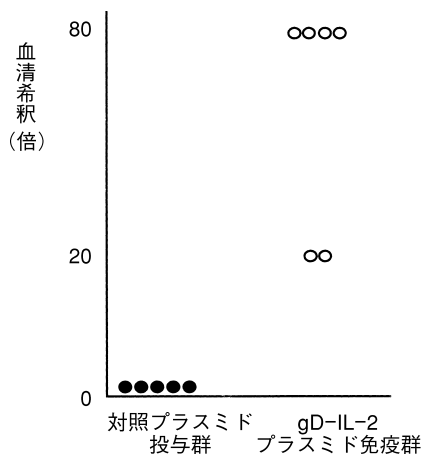


図 5 gD-IL-2 プラスミド免疫群 (n=6)，対照プラスミド投与群 (n=5) における中和抗体価.

初回免疫 3 週間後において gD-IL-2 免疫群では，対照プラスミド投与群と比較し有意に上昇していた (Mann-Whitney の U 検定, p 値<0.01).

凍結保存を要するなどの理想のアジュバントにはほど遠い¹⁰⁾。そのために安全で有効なアジュバントの研究がなされ，IL-2 が動物生体において，抗原とともに投与されると免疫反応が増強され得ることが示されてきた¹⁶⁾¹⁷⁾。我々の過去のデータから gD 皮下投与ではアジュバントを使用しない場合は，効果を得るのに 20 μ g で 3 回という反復大量投与を必要とした⁸⁾のに対し，今回の gD-IL-2 蛋白皮下投与においては 1 μ g 2 回で同様の効果が得られた。このことは，IL-2 付加により免疫原性が上昇したことを示している。また，以前に報告したように gD-IL-

表 1 インターロイキン-2 融合 glycoprotein D (gD-IL-2) 発現プラスミド免疫群，対照プラスミド投与群における遅延型過敏反応(delayed-type hypersensitivity, DTH)

単純ヘルペスウイルス感染群	# 0.495 \pm 0.105 (n=6)
gD-IL-2 プラスミド免疫群	# 0.294 \pm 0.037 (n=6)
対照プラスミド投与群	0.026 \pm 0.011 (n=5)

各値は平均値 \pm 標準偏差 (単位 mm) を示す。#：ネガティブコントロール群に対して統計学的有意な群。gD-IL-2 プラスミド免疫群は対照プラスミド免疫群と比較し，DTH 反応が有意に上昇していた (One way ANOVA on ranks, Tukey’s method, p 値<0.05)。

2 蛋白ワクチンを免疫すると中和抗体の誘導に加えて，DTH および CTL が誘導された¹⁰⁾。さらに，本研究の結果を併わせて，gD-IL-2 は蛋白でも DNA の形でも同様に液性および細胞性免疫を誘導可能であったといえる。今回の報告では gD-IL-2 蛋白の腹部皮内投与において実質病変がピークに達すると考えられる感染後 10 日目前後において明らかに実質病変の進展を抑制していた。そこで，さらに gD-IL-2 投与ルートに結膜下注射を使用し，効果を評価した。これは，抗原が定着する部位が問題となる病変に近い方が持続的な抗原刺激にとって有利であると考えたためである。さらに，Nesburn ら¹⁸⁾による全身投与よりも眼局所投与の方が感染防御において有効であったとの報告もある。gD-IL-2 結膜下投与においても同様に実質病変を抑制しており，gD-IL-2 蛋白は局所免疫でも有効であった。これから，初感染モデルにおいて gD-IL-2 蛋白ワクチンは全身投与ならびに局所投

与において有効な手段と考えられる。また、今回さらに検討した gD-IL-2 DNA ワクチネーションにおいては、有意に HSV に対する中和抗体、DTH 反応が誘導されており、液性免疫に加え細胞性免疫も誘導可能であることが示された。さらに、角膜炎に対する感染防御効果については、gD-IL-2 蛋白の効果と同様に上皮病変は抑制されなかったが、実質病変の進展を抑制していた。

このように、gD-IL-2 は蛋白自身でも発現プラスミドの形で投与しても角膜炎、特に実質炎の進展を阻止していた。理想的には上皮病変も押さえ込む方が望ましいが、初感染モデルでは角膜擦過後に高力価のウイルス感染を起こすので、その直後のウイルス増殖による上皮型角膜炎の発症は、いかに強い免疫力を賦与しても阻止できないように思われる。しかし、現実的には、ヒトヘルペス性角膜炎においては、上皮病変は現行の治療法で治癒可能で、治療上および視力予後的に問題になるのは実質病変の方である。今回のマウス初感染モデルにおける結果に加えて、今後、マウス再発モデルを用いてその抑制が示されれば、ヒトにおいてもこのワクチンによって高い抗 HSV 免疫を付与することによって三叉神経節からウイルスが再活性化してくるのを抑制し、延いては実質型への進展を阻むことができる可能性が出てくると考えられる。免疫活性の点においては gD 蛋白は細胞性免疫を誘導できなかったが、gD-IL-2 蛋白は誘導でき、さらに、gD-IL-2 DNA も誘導可能であることが確認できた。ヘルペスのようなウイルス血症を起こさず、細胞内持続感染が主たる問題となるウイルスのワクチンとしては、感染細胞に対する細胞性免疫が誘導できるものが望ましいという観点からも、液性免疫の他に強い細胞性免疫の賦与が期待される gD-IL-2 がヘルペス角膜炎の予防手段として非常に有望であるといえる。

今後、再発に対する抑制能についての検討を予定しており、それによってさらなる感染防御機構の解明および理想的なワクチンの獲得が期待できるであろう。

本研究は文部省科学研究費補助金基盤研究(B)(2)(課題番号 09470379)の助成を受けて行った。

文 献

- 1) Meignier B : Vaccination against herpes simplex virus infection. The human herpes viruses 4 : 265-296, ed. Roizman B, Plenum Press, New York, 1985.
- 2) Spear PG : Membrane proteins specified by herpes simplex viruses I. Identification of four glycoprotein precursors and their products in type 1-infected cells. J Virol 17 : 991-1008, 1976.
- 3) Chan WL : Protective immunization of mice with specific HSV-1 glycoproteins. Immunology 49 : 343-352, 1983.
- 4) Cohen GH, Dietzschold B, de Leon MP, Long D, Golub E, Varrichio A, et al : Localization and

- synthesis of an antigenic determinant of herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody. J Virol 49 : 102-108, 1984.
- 5) Schrier RD, Pizer LI, Moorhead JW : Type-specific delayed hypersensitivity and protective immunity induced by isolated herpes simplex virus glycoprotein. J Immunol 130 : 1413-1417, 1983.
- 6) Kino Y, Eto T, Nishiyama K, Ohtomo N, Mori R : Immunogenicity of purified glycoprotein gB of herpes simplex virus. Arch Virol 89 : 69-80, 1986.
- 7) Long D, Madara TJ, Ponce de Leon M, Cohen GH, Montgomery PC, Eisenberg RJ : Glycoprotein D protects mice against lethal change with herpes simplex virus type 1 and 2. Infect Immun 37 : 761-764, 1984.
- 8) Inoue Y, Ohashi Y, Shimomura Y, Manabe R, Yamada M, Ueda S, et al : Herpes simplex virus glycoprotein D : Protective immunity against murine herpetic keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 411-418, 1990.
- 9) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al : Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science 259 : 1745-1749, 1993.
- 10) Hinuma S, Hazama M, Mayumi A, Fujisawa Y : A novel strategy for converting recombinant viral protein into high immunogenic antigen. FEBS 288 : 138-142, 1991.
- 11) Hazama M, Mayumi-Aono A, Asakawa N, Kuroda S, Hinuma S, Fujisawa Y : Adjuvant-independent enhanced immune responses to recombinant herpes simplex virus type 1 glycoprotein D by fusion with biologically active interleukin-2. Vaccine 11 : 629-636, 1993.
- 12) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al : Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science 247 : 1465-1468, 1990.
- 13) Tang DC, DeVit M, Johnston SA : Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature 356 : 152-154, 1992.
- 14) Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dang K, Refaeli Y, et al : Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci 90 : 4156-4160.
- 15) McCarthy M : DNA vaccination : a direct line to the immune system. Lancet 348 : 1232, 1996.
- 16) Rouse BT, Miller LS, Turtinen L, Moore RN : Augmentation of immunity to herpes simplex virus by *in vivo* administration of interleukin 2. J Immunol 134 : 926-930, 1985.
- 17) Weingerg A, Konrad M, Merigan TC : Regula-

tion by recombinant interleukin-2 of protective immunity against recurrent herpes simplex virus type 2 genital infection in guinea pigs. *J Virol* 61 : 2120-2127, 1987.

18) **Nesburn AB, Slanina S, Burke RL, Ghiasi H,**

Bahri S, Wechsler SL : Local periocular vaccination protects against eye disease more effectively than systemic vaccination following primary ocular herpes simplex virus infection in rabbits. *J Virol* 72 : 7715-7721, 1998.
