

Canine Distemper Virus에 대한 단클론성 항체의 생산

김 태 종 · 김 세 영

건국대학교 축산대학 수의학과, 동물자원연구센터
(1997년 2월 13일 접수)

The production of monoclonal antibodies against canine distemper virus

Tae-jong Kim, Se-young Kim

*Department of Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry and
Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University*

(Received Feb 13, 1997)

Abstract : The purpose of the production of monoclonal antibodies against the Canine distemper virus(CDV) were perfect diagnosis and a new approach to treat canine distemper because the diagnosis and treatment of canine distemper were difficult.

Canine distemper virus(CDV) was purified using saturated ammonium sulfate, and injected into hind footpads of BALB/c mouse. 12~15 days later, popliteal lymph node(PN) cells were harvested and fused with SP2/O myeloma cells. Characteristics of monoclonal antibodies were analysed.

1. 9 hybridomas produce the specific antibody against CDV.
2. 6 monoclonal antibodies are against intranuclear and cytoplasmic component of CDV, and 3 monoclonal antibodies are against cytoplasmic inclusions.
3. All monoclonal antibodies did not react with other 5 different viruses (CAV-I, CAV-II, CCV, CPV and CPIV) and react with another CDV-FXNO strain.
4. 3 monoclonal antibodies have neutralizing activity against CDV.
5. Antigenic difference was observed between CDV by IFA.

Key words : CDV, MCA, Fusion, IFA, Neutralization test.

서 론

Canine distemper(CD)는 modified-live-virus(MLV) 백신의 사용에도 불구하고 전세계적으로 발생하며 전

염력과 치사율이 높은 질병으로서, 바이러스에 의한 질병으로 보고한 것은 1905년 Carre였으나 1926년 Dunkin과 Laidlow에 의해 바이러스성 질병으로 증명되었다¹. CD의 병원체인 canine distemper virus(CDV)는 Paramyxoviridae morbilivirus에 속하며 호흡기를 통

해 감염된다.

CDV는 폐대식세포에 탐식되어 임파절로 옮겨진 후 임파절 피사를 일으켜 임파구의 감소에 의한 면역 결핍상태를 유발하고¹, 신경계에 친화성이 있어서 demyelinating encephalitis를 일으키며^{2,3} 그로 인해 나타나는 epileptiform convulsion이 특징적인 신경증상으로서, Imagawa⁴는 성견이나 백신접종견에서 발생하는 old dog encephalitis(ODE)와 chronic dog encephalitis (CDE)로부터 바이러스를 분리하였다.

동일한 morbilivirus에 속하는 measles virus도 사람에서 신경계에 CD와 병변이 유사한 multiple sclerosis (MS)를 일으키므로 두 바이러스간의 항원적 유사성에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다⁵⁻⁷. 일본원숭이에서 CDV의 자연 감염 사례가 있으며⁸, 사람에서 Paget's disease의 원인체로서의 가능성이 제안되기도 하지만⁹ CDV와 MS는 관계가 없는 것으로 보고되고 있다^{10,11}.

CD의 증상은 다양하므로 감별진단 또는 확진을 위해 병원체의 증명이 필요하다. 병원체의 증명은 immunofluorescent antibody technique^{12,13}이 주로 이용된다.

1975년 Kohler와 Milstein은 지속적으로 항체를 분비하는 mouse myeloma cell과 lymphocyte의 잡종세포 생산에 대한 가능성을 기술한 이래 monoclonal antibody technique은 분자생물학, 복잡한 면역현상의 분석, 물질의 분석, 특히 바이러스를 비롯한 병원체의 증명에 유용하게 이용되어 왔다. 본 연구도 개에 치명적인 질병을 일으키는 CDV에 대한 항체를 분비하는 잡종세포를 생산하여 CD의 조기진단과 확진에 항체를 이용하며, 치료에 접근하기 위한 기초를 만드는 데 목적이 있다.

재료 및 방법

VIRUS : 본 실험에 사용된 CDV는 vero cell(African green monkey kidney cell)에서 잘 자라는 Onderstepoort (OND) strain으로서 미국 Cornell 대학교의 Appel MJG로부터 분양받았다.

CDV를 vero cell monolayer에 접종하고 2시간 동안 감각시킨 후 유지배지를 첨가하여 바이러스를 배양하였다. Vero cell은 α -minimum essential medium(α -MEM)에 sodium bicarbonate 2.2g/l, 5% FBS를 첨가하여 배양하였으며, 유지배지는 α -MEM에 sodium bi-

carbonate만 첨가하였다. Cytopathic effect(CPE)는 약 24시간 후 관찰되었으며, 80% 정도 CPE가 나타나면 배양액을 수집하여 동량의 saturated ammonium sulfate (SAS, pH 7.6)와 섞어서 1시간 동안 반응시키고 10,000g로 30분간 원심분리하였다. 침전물을 PBS에 부유시킨 후 SW28 rotor로 22,000rpm에서 1시간 동안 원심분리하였다. 침전물에 최소 용량의 1/100이 되도록 PBS를 첨가하고 ultrasonicater(Vibra & Cell, VCX-400)를 이용하여 침전물을 50W로 15초간 3회 sonication하였다. 부유액을 3,000rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 수집하여 -70℃에 보관하면서 면역용 항원으로 사용하였다.

잡종세포의 생산 :

1) Hybridoma : 면역용 항원의 단백질 농도가 1mg/ml이 되도록 PBS에 희석하여 Freund's complete adjuvant와 1:1의 비율로 균질하게 섞어서 7주령 BALB/c mouse의 footpad에 0.04ml씩 접종하였다. 12~15일 후 2~3마리로부터 popliteal lymph node(PN)를 무균적으로 채취하고 표준망(108 μ m)에서 마쇄하여 serum free media(SFM)로 PN cell을 회수하였다. SFM은 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)에 sodium bicarbonate 2g/l, L-glutamine 0.2g/l, HEPES 5.96g/l을 첨가하여 사용하였다.

Fusion partner로는 SP2/O myeloma cell을 사용하였다. SP2/O는 SFM에 mem non-essential amino acid solution(NEAA), 10% FBS를 첨가하였으며, 세포융합 2주전부터 8-azaguanine을 첨가하여 배양하였다.

세포융합을 위해 SP2/O를 SFM에 부유시키고, PN cell과 SP2/O의 세포수를 측정하여 5~10:1의 비율로 섞어서 50% PEG 1500으로 세포를 융합하였다. 융합 후 세포를 HAT media 300ml에 부유시켜 96 well microplate에 0.1ml/well을 분주하여 배양하였다. ICR mouse의 복강내 macrophage를 HAT media로 회수하여 Feeder cell로 사용하였으며, HAT media는 SFM에 NEAA, 20% FBS, HAT를 첨가하였다. 2주후 잡종세포가 증식한 배양상층액을 수집하여 indirect fluorescence assay(IFA)로 CDV에 대한 항체를 생산하는 잡종세포를 선발하였으며, 선발된 잡종세포는 SFM에 NEAA, 20% FBS를 첨가하여 배양하였다.

2) Ascites : 항체의 대량생산을 위해 BALB/c

mouse 복강에 Freund's incomplete adjuvant 0.5ml을 주사하고, 2주후 잠종세포를 PBS에 $1 \times 10^7/ml$ 이 되도록 희석하여 0.5ml씩 BALB/c mouse 복강에 접종하였다. 2~3주후 복수액을 회수하여 JA20 rotor로 10,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. SAS를 이용하여 상층액에서 IgG를 침전시킨 후 최소용량의 PBS에 용해시켜 4℃에서 72시간 동안 PBS를 12시간마다 교환하면서 투석하고 membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 -20℃에 보관하면서 중화시험에 사용하였다.

단클론성 항체의 특성분석 :

1) Indirect Fluorescence Assay (IFA) : Vero cell monolayer에 CDV를 접종하고 CPE가 약 20% 나타나면 -20℃ acetone으로 실온에서 10분간 고정된 후 건조시켜 -20℃에 보관하면서 IFA에 사용하였다. 2차항체는 fluorescence-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG(CAPPEL, Cat. No. 55493)를 사용하였으며, CDV를 접종하지 않은 vero cell monolayer를 대조로 하였다.

2) Isotyping of Monoclonal Antibodies : 생산된 단클론성 항체의 isotyping은 Immunoselect(Gibco, Cat. No. 9660SA, Monoclonal Antibody-based Isotyping System for Mouse Immunoglobulins)를 이용하였다.

3) Neutralization Test : CDV의 전파에 관여하는 단백질은 2종류로서 hemagglutination activity가 있는 H protein은 바이러스가 숙주세포에 감염되는 과정에 관여하며, fusion activity가 있는 F protein은 감염된 세포가 주위의 세포와 융합하여 바이러스를 전파하는데 관여한다. 따라서 중화시험도 CDV가 세포에 감염되기 전과 감염된 후로 구분하였다.

① 바이러스 감염전 중화시험 : 생산된 복수액을 계단희석하여 각 희석액을 96 well microplate에 50 μ l/well씩 분주하고, stock virus ($3 \times 10^2 TCID_{50}/50\mu$ l)을 50 μ l/well씩 첨가하여 37℃에서 반응시켰다. 2시간 후 vero cell($1.2 \times 10^4/50\mu$ l/well)을 첨가하여 3일간 배양한 후 Giemsa 염색하여 CPE 유무를 관찰하였다.

② 바이러스 감염후 중화시험 : 96 well microplate에 stock virus ($3 \times 10^2 TCID_{50}/50\mu$ l)을 각 well에 분주하고 vero cell($1.2 \times 10^4/50\mu$ l/well)을 첨가하여 37℃에서 9시간 동안 배양한 후 배지를 제거하였다. 복수액을 유지배지로 계단희석하여 200 μ l/well를 분주하고 3일간

배양한 후 Giemsa 염색으로 CPE 유무를 관찰하였다.

③ Giemsa stain : Well에 있는 배지를 제거하고 methanol로 세포를 20분간 고정하였다. Giemsa stain solution으로 20분 동안 염색하고 수돗물로 10회 세척하여 실온에서 건조시켰다.

4) 교차반응 : 개에 질병을 일으키는 다른 바이러스와의 교차반응을 관찰하기 위해 A72 cell과 vero cell을 각각 monolayer를 형성시켜, A72 cell에는 canine corona virus(CCV), canine parvo virus(CPV), canine adeno virus type I(CAV-I), canine adeno virus type II(CAV-II)를 각각 감염시키고, vero cell에는 canine parainfluenza virus(CPIV)와 CDV(FXNO strain)을 감염시켜서 48시간동안 배양하고 -20℃ acetone으로 10분간 고정된 후 잠종세포 배양액으로 IFA를 실시하여 교차반응을 관찰하였다.

A72 cell은 Leibovitz's L-15 medium에 NEAA, 5% FBS를 첨가하여 배양하였다.

결 과

Indirect Fluorescence Assay (IFA) : 잠종세포 배양 상층액으로 IFA를 실시하여 CDV에 대한 항체를 생산하는 9종류의 잠종세포를 선별하였다. Mab 99, 125, 129는 CDV가 감염된 세포의 세포질만 염색하였으며 Mab 9, 25, 49, 61, 75, 96은 세포질과 핵을 모두 염색하였다.

Isotyping of Monoclonal Antibodies : Immunoselect(Gibco, 9660SA)를 이용한 항체의 heavy chain subclass와 light chain type을 분석한 결과는 Table 1과 같다.

총 9종의 항체 중 heavy chain subclass는 IgG1이

Table 1. Isotyping of monoclonal antibodies against canine distemper virus

Mab No.	Heavy Chain	Light Chain
9	Ig G1	K
25	Ig G2b	K
49	Ig G1	K
61	Ig G1	K
75	Ig G2b	K
96	Ig G1	K
99	Ig G2a	K
125	Ig G2b	K
129	Ig G2b	K

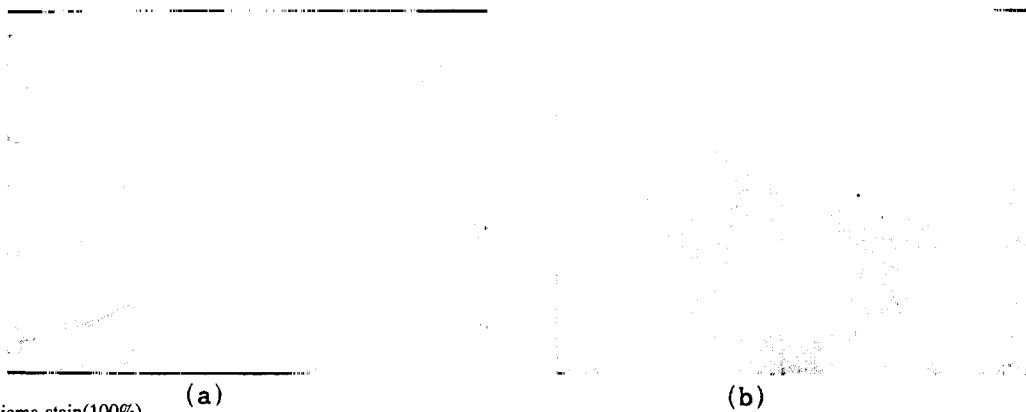


Fig 1. Giemsa stain(100%).
 (a): normal vero cel. (b): CDV- infected vero cell. Multinucleated cell was formed.

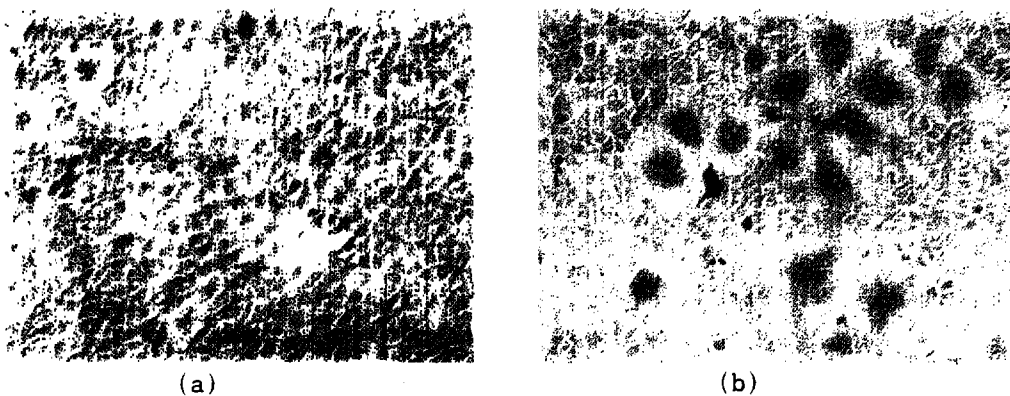
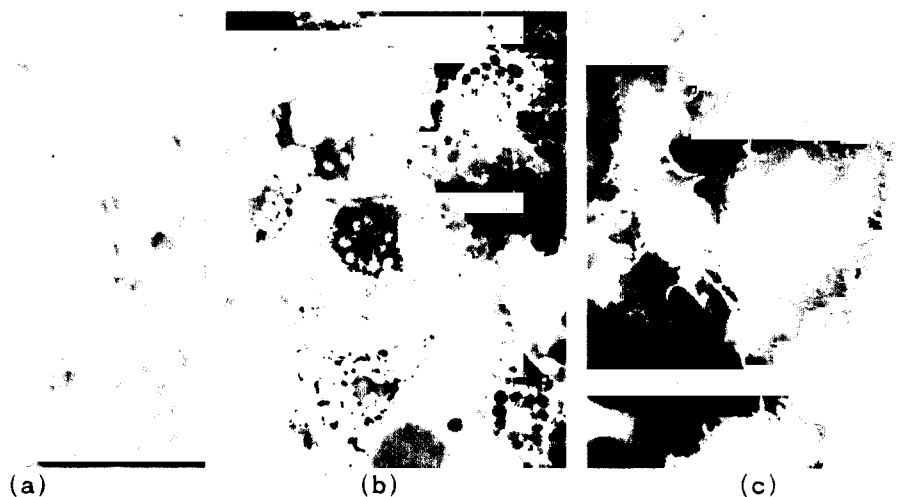


Fig 2. Immunocytochemical Stain(20x).
 (a): normal vero cell. (b): CDV-infected vero cell. Multinucleated cells were stained with dark brown color.



Fi 3. Detection of CDV by indirect immunofluorescent antibody technique with monoclonal antibody(33x).
 (a): normal vero cell. (b): CDV-infected vero cell. Cytoplasm is stained. (c): CDV-infected vero cell. Cytoplasm and nuclei are stained.

4개, IgG2a가 1개, IgG2b가 4개였고 light chain type은 모두 κ chain이었다.

Neutralization test : 단클론성 항체의 중화능력은 Table 2와 같다. 바이러스 감염전 중화시험결과 3종의 항체가 중화능력을 가지고 있었으며, 항체의 중화역가는 Mab 9가 80, Mab 49가 30 그리고 Mab 75가 960이었다. 바이러스 감염후 중화시험결과도 바이러스 감염전 중화시험과 동일한 항체가 중화능력이 인정되었으며, 중화역가는 Mab 9가 80, Mab 49가 60 그리고 Mab 75가 960이었다.

Table 2. Neutralizing Activity of Monoclonal Antibodies against CDV

Mab No.	Protein Conc. (mg/ml)	Neutralization titer	
		Pre-infection*	Post-infection**
9	1.8	80	80
25	NT	NT	NT
49	1.7	30	60
61	2.4	0	0
75	1.4	960	960
96	3.0	0	0
99	2.7	0	0
125	1.4	0	0
129	2.3	0	0

*: Vero cell were infected after neutralize the CDV with Mab.

** : Vero cells were infected with CDV. After 9 hours, culture media were replaced with media containing Mab.

NT : Not tested.

Table 3. Specification of Monoclonal Antibodies

Mab No.	Vero cell	CDV		A72 cell	CPV	CCV	CPV	CAV	
		OND	FXNO					I	II
9	-	+	+	-	-	-	-	-	-
25	-	+	+	-	-	-	-	-	-
49	-	+	+	-	-	-	-	-	-
61	-	+	+	-	-	-	-	-	-
75	-	+	+	-	-	-	-	-	-
96	-	+	+	-	-	-	-	-	-
99	-	+	+	-	-	-	-	-	-
125	-	+	+	-	-	-	-	-	-
129	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Anti-CDV MCA*	-	-	+	-	-	-	-	-	-

*: Commercial anti-CDV MCA(VMRD, Inc.)

교차반응 : CDV 감염시 나타나는 증상이 호흡계, 소화계 그리고 신경계 등 전신적으로 나타나므로 소화계 질병을 일으키는 CPV와 CCV, 호흡계 질병을 일으키는 CPIV와 CAV-II, 감염을 일으키는 CAV-I 그리고 다른 종류의 CDV(FXNO strain)를 IFA로 교차반응을 분석하였으며, 결과는 Table 3과 같다.

9종의 항체 중 5종류의 다른 바이러스와 반응하는 항체는 없었으며, 다른 종류의 CDV인 FXNO와는 모두 반응하였다. 대조를 위해 anti-CDV monoclonal antibody(VMRD, Inc.)를 PBS에 100배 희석하여 IFA를 실시한 결과 FXNO와는 반응하였으나 5종류의 다른 바이러스와 OND에는 반응하지 않았다.

고 찰

본 연구는 CDV에 대한 항체를 생산하는 잡종세포의 작성을 위해 Coyle¹⁴의 방법에 따라 popliteal node (PN)로부터 lymphocyte를 수확하여 SP2/0 myeloma cell과 융합하였다. 이 방법은 spleen cell을 융합에 이용하는 방법과 비교하여 면역에 소요되는 기간을 단축시킬 수 있으며, Rikard Holmdahl¹⁵은 PN cell로 세포융합을 하면 spleen cell보다 양성율이 높다고 보고하였다. 또한 세포융합후 300ml의 HAT media에 부유시켜 30개의 96 well microplate에 분주하여 배양함으로써 subcloning 단계를 생략하였으며, 2주간 배지를 교환하지 않아도 융합된 세포의 성장에는 지장이 없었다. 선발된 잡종세포를 HT media로 처리하지 않고 20% FBS가 첨가된 배지로 교환하여도 잡종세포의 성장에는 영향이 없었다.

Rikard Holmdahl¹⁵은 면역기간이 짧기 때문에 생산된 항체는 대체로 IgM일 것으로 추정하였으나 총 26종의 항체 중 IgM은 4개, 22개가 IgG였다고 보고하였다. 본 실험에서 생산된 항체는 모두 IgG였는데 IFA로 screen을 하는 과정에서 fluorescein-conjugated goat IgG anti-mouse IgG를 사용하였으므로 IgG만 검사되었다고 생각된다.

IFA로 나타난 염색상은 세포질만 염색되는 유형, 세포질과 핵에 모두 염색되는 유형으로 구분되었다. Orvell¹⁶은 NP, H, F, P protein에 대한 항체를 이용한 IF 염색상은 다양하며, 세포내 봉입체는 NP와 P에 대한 항체로 염색되었고, 핵내 봉입체는 NP에 대한 항

체로만 염색되었으나 이러한 항체는 염색력이 부족하여 세포내 봉입체는 핵내 봉입체에 없는 epitopes가 있다고 하였다.

CDV의 전파에는 H와 F protein이 중요한 역할을 하는데 hemagglutination activity를 가지는 H protein은 숙주세포에 부착하여 감염되는 과정에 관여하며 fusion activity를 가지는 F protein은 감염된 세포가 주위의 세포와 융합하여 바이러스를 전파하게 되어 그 결과로 다핵거대세포(multinucleated giant cell)가 만들어진다. 따라서 본 실험에서는 바이러스의 감염에 대한 중화능과 융합에 의한 바이러스의 전파에 대한 중화능을 구별하여 조사하기 위해 세포가 바이러스에 감염되기 전과 감염된 후로 구분하여 중화시험을 실시하였다. H protein에 대한 중화항체일 경우 감염 전에만 CPE가 나타나지 않고, F protein에 대한 중화항체일 경우 감염전과 감염후에 모두 CPE가 나타나지 않을 것으로 추정하였으며, 3종의 항체가 모두 감염전과 감염후에 모두 중화능력이 인정되어 F protein에 대한 항체일 것으로 추정된다.

개에 질병을 유발하는 5종류의 다른 바이러스와 9종류의 잠종세포 배양액으로 IFA를 실시한 결과 모두 교차반응은 없었고, 다른 종류의 CDV인 FXNO와는 모두 반응하였다. 이는 생산된 항체가 CDV의 진단에 이용될 가능성을 시사하며, commercial anti-CDV monoclonal antibody(VMRD)는 OND와 반응하지 않고 FXNO와는 반응하였으므로 CDV의 strain간에도 항원적인 차이가 있음을 알 수 있다. Hirayama¹⁷는 10종의 CDV로 특성을 분석하였는데 생물학적인 특성에는 차이가 있고 단백질과 RNA의 분자량에는 약간의 차이가 있으며, origin은 같지만 세포계대수가 다른 FXNO-5와 FXNO-83간에 차이가 없어 vero cell에 배양할 경우 대부분의 특성이 유지됨을 보고하였다. Confer¹⁸는 혈청을 이용한 중화시험을 하였으며 3종의 CDV간에 큰 차이가 없어 혈청형은 하나지만 생물학적인 특성에는 차이가 있다고 보고하였다.

CDV의 중화항체 형성에 관련된 단백질은 H와 F protein으로서 Norrby¹⁹는 H와 F를 정제하여 각각 면역시킨 후 강독주를 접종한 결과 대조군은 심한 증상, H 접종군은 약한 증상, F 접종군은 무증상이 나타나 면역에 중요한 단백질은 F임을 증명하였고, Hirayama²⁰는 Mab를 4~5일령 suckling mice의 복강에

주사후 강독바이러스 100LD50을 뇌내에 접종한 결과 anti-H Mab는 완전히 방어하였으며 anti-F Mab는 일부만 방어능력을 나타내 CDV의 방어에는 H에 대한 항체가 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 위의 실험으로부터 CD의 치료에 H나 F에 대한 항체가 이용될 수 있을 것으로 예견된다.

결 론

1. CDV에 대한 항체를 생산하는 잠종세포의 작성을 위해 lymphocyte를 popliteal node(PN)로부터 수확하여 SP2/0 myeloma cell과 융합하였으며, IFA로 검색하여 9종의 잠종세포를 선별하였다.
2. IFA를 실시하여 나타난 염색상은 세포질만 염색되는 유형, 세포질과 핵에 모두 염색되는 유형으로 구분되었다.
3. 생산된 항체의 heavy chain은 IgG1이 4개, IgG2a가 1개, IgG2b가 4개였으며, light chain은 모두 κ chain이었다.
4. 9종의 항체 중 중화능력이 인정되는 3종의 항체(Mab 9, 49, 75)는 모두 fusion activity를 중화하는 항체였다.
5. 개에 질병을 유발하는 5종류의 다른 virus와 선별된 9종의 항체로 IFA를 한 결과 모두 교차반응은 없었다.
6. 생산된 9종의 항체는 2종의 CDV-OND와 FXNO에 모두 반응하였으나 commercial anti-CDV monoclonal antibody는 FXNO에만 반응하여 CDV간에도 항원적인 차이가 있음을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Krakowka S, Higgins RJ, Koestner A. Canine distemper virus: Review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am J Vet Res*, 41: 284-292, 1980.
2. Gillespie JH, Rickard CG. Encephalitis in dogs produced by distemper virus. *Am J Vet Res*, 17: 103-108, 1956.
3. Cornwell HJC, Thompson H, McCandlish IAP, et al. Encephalitis in dogs associated with a batch of canine

- distemper(Rockborn) vaccine. *Vet Rec*, 112:54-59, 1988.
4. Imagawa DT, Howard EB, *et al.* Isolation of canine distemper virus from dogs with chronic neurological disease. *PSEBM*, 164:355-362, 1980.
 5. Adams JM, Imagawa DT. Immunological relationship between measles and distemper viruses. *PSEBM*, 96: 240-244, 1957.
 6. Orvell C, Norrby E. Immunological Relationships between homologous structural polypeptides of measles and canine distemper virus. *J Gen Virol*, 50:231-245, 1980.
 7. Stephenson JR, Meulen VT. Antigenic relationships between measles and canine distemper viruses: Comparison of immune response in animals and humans to individual virus-specific polypeptides. *Proc Natl Acad Sci*, 76:6601-6605, 1979.
 8. Yoshikawa Y, Ochikubo F, *et al.* Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet Microbiol*, 20:193-205, 1989.
 9. O'Driscoll JB, Buckler HM, Jeacock J, *et al.* Dogs, distemper and osteitis deformans: a further epidemiological study. *Bone Mineral*, 11:209-216, 1990.
 10. Kurtzke JF, Hyllested K, *et al.* Multiple sclerosis in the Faroe islands IV. The lack of a relationship between canine distemper and the epidemics of MS. *Acta Neurol Scand*, 78:484-500, 1988.
 11. Krakowka S, Miele JA, Mathers LE, *et al.* Antibody responses to measles virus and canine distemper virus in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 14:533-538, 1983.
 12. Moller MB. Detection of intracellular canine distemper virus antigen in mink inoculated with an attenuated or a virulent strain of canine distemper virus. *Am J Vet Res*, 50:1616-1620, 1989.
 13. Fairchild GA, Wyman M, Donovan EF. Fluorescent antibody technique as a diagnostic test for canine distemper infection: Detection of viral antigen in epithelial tissues of experimentally infected dogs. *Am J Vet Res*, 28:761-768, 1967.
 14. Coyle PV, Wyatt D, McCaughey C, *et al.* A simple standard protocol for the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. *J Immunol Methods*, 153:81-84, 1992.
 15. Holmdahl R, Moran T, Andersson M. A rapid and efficient immunization protocol for production of monoclonal antibodies reactive with autoantigens. *J Immunol Methods*, 83:379-384, 1985.
 16. Orvell C, Sheshberadaran H, Norrby E. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against structural components of canine distemper virus. *J Gen Virol*, 66:443-456, 1985.
 17. Hiratama N, Senda M, *et al.* Comparison of biological and molecular properties among canine distemper virus strains. *Jpn J Vet Sci*, 48(2):259-265, 1986.
 18. Confer AW, Kahn DE, Koestner A, *et al.* Biological properties of a canine distemper virus isolate associated with demyelinating encephalomyelitis. *Infect Immun*, 11:835-844, 1975.
 19. Norrby E, Utter G, Orvell C, *et al.* Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated fusion proteins. *J Virol*, 58:536-541, 1986.
 20. Hirayama N, Senda M, *et al.* Protective effects of monoclonal antibodies against lethal canine distemper virus infection in mice. *J Gen Virol*, 72:2827-2830, 1991.