

厚生科学研究研究費補助金

高度先端医療研究事業

各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成13（2001）年4月

目次

I. 総括研究報告

| | |
|---------------------------------|---|
| 各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製に関する研究----- | 1 |
| 黒澤良和 | |

II. 分担研究報告

| | | |
|------------------------|------------|----|
| 1. 各種毒素の調製と抗体の検定 | 高橋元秀 ----- | 8 |
| 2. B型肝炎ウイルス抗原の調製と抗体の検定 | 千葉 丈----- | 8 |
| 3. 水痘、CMV 抗原の調製と抗体の検定 | 白木公康----- | 12 |
| 4. インフルエンザ抗原の調製と抗体の検定 | 奥野良信----- | 14 |
| 5. ハブ毒の調製と抗体の検定 | 野崎真敏----- | 27 |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 33 |
|---------------------------|----|

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

総括研究報告書

各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製

主任研究者 黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所・免疫学研究部門教授

研究要旨

本研究は、平成 9-11 年度 3 年間主任研究者のグループで進められた「人工抗体ライブラリーの作製とその利用法の開発に関する研究」の続編として立案され、実施されている。第 I 期の研究では数 10 名のヒト臨床材料から調製した mRNA を用いて、1,000 億種類の独立したクローンからなる抗体ライブラリー (AIMS) を作製した。ライブラリーは、ファージディスプレイ系を用いて作製されているので、対象とする抗原物質に結合する抗体がファージ抗体の形で単離され、同時にその抗体をコードする遺伝子も得られる。昨年度にパイロット的に実施した研究によりジフテリア毒素（感染研・高橋博士との共同研究）及び水痘帯状疱疹ウイルス（富山医科薬科大・白木教授との共同研究）に対する中和抗体が単離できることがわかっていた。抗体の本来の生物機能から考えて抗体が様々な疾患の治療に役立つであろうことは、容易に推定される。しかし、従来の方法では完全にヒト型の抗体を単離調製することは技術的に困難であった。しかし、本研究で用いているファージディスプレイ法の開発、更にもう一つの方法として遺伝子操作を行いヒト抗体を産生するマウスが作製されたことにより、今後は多くのヒト抗体を単離—大量調製することが可能となった。本プロジェクトは治療に役立つヒト抗体を具体的に単離調製することを目指して立案された。抗体が治療に役立つ疾患の種類は、今後飛躍的に増大することが予想されるが、このプロジェクトでは、相対的に抗体単離が容易で、又、臨床に用いる（治療薬として血液中に注入する）際にその治療効果を期待できる（副作用等の危険が少ない）疾患を対象とすることにした。具体的には、各種病原菌の分泌する毒素に対する中和抗体、各種病原性ウイルスに対する中和抗体、ヘビ毒に対する中和抗体である。研究組織としては、抗体の単離調製を行う黒澤グループと各種疾患を研究対象としているグループの共同研究として実施する。まず、対象疾患の抗原を調製し、それに対して AIMS ライブラリーをスクリーニングしてその抗原に結合する抗体をなるべく多く単離する。それぞれの抗体 (Fab 型で得られる) について中和活性を測定する。中和活性を示す抗体については、IgG 型ヒト抗体として作製し直して必要量発現—精製する。その中和

活性を測定することにより実際に治療薬として使用する時に必要となる量の判断材料を提供できる段階まで研究を進めることをこのプロジェクトで達成すべき目標とする。具体的には、平成 12 年度末までに次のような性質を示す抗体が得られた。(1) ジフテリア毒素に対しては強い中和活性を示す抗体が単離された。(2) 破傷風毒素については数種のかかり強い中和活性を示す抗体が単離された。(3) ハブ毒に関して HR-1 に結合する 3 種の抗体を単離したが、毒素中和活性は認められなかった。(4) 水痘帯状疱疹ウイルスについては数種の強い中和活性を示す抗体が得られた。(5) サイトメガロウイルスについては弱い中和活性を示す抗体が得られた。(6) インフルエンザウイルスに対しては最初抗 NP 抗体のみが単離されたが、スクリーニング途中に抗 NP 抗体を除く操作を加えることにより中和活性を示す抗体が得られるようになった。(7) B 型肝炎ウイルスについては結合活性を示すものが得られたが、中和活性を示すものが得られなかった。そこで我々としては今後対象を、(1) AIMS ライブラリーから単離される抗体がそのまま臨床に役立つ性能を示す対象（ジフテリア毒素、破傷風毒素、水痘帯状疱疹ウイルス、インフルエンザウイルス）、(2) 中和活性を示す抗体が得られるが、結合活性が弱いので活性を高める操作を加えることが望ましい対象（サイトメガロウイルス）、(3) ワクチン接種や感染等で特別に中和抗体価の高い人がおり、その人達の B リンパ球画分を用いて AIMS ライブラリーとは別に抗体ライブラリーを作製した方が遙かに性能の良い抗体単離の予想される対象（B 型肝炎ウイルス、ハブ毒素）、(4) AIMS ライブラリースクリーニングに際して従来用いているパニング法以外により効率的な方法を開発する必要があると判断される対象（ペロ毒素）の 4 種に分類し、個別に対処することとした。

分担研究者

高橋元秀 国立感染症研・細菌血液製剤部・室長

千葉 丈 東京理科大・基礎工学部・教授

奥野良信 大阪府立公衆衛生研・課長

白木公康 富山医科薬科大医学部・教授

野崎真敏 沖縄衛生研ハブ研究室・室長

A. 研究目的

ワクチン接種により予防可能な各種感染症であることは、病原菌の分泌する毒素及びウイルスに対して中和能力のある抗体が

ヒトの体で産生されることを示している。

そこでその抗体を治療薬として準備しておけば、何らかの要因（抵抗力が弱っている、予防接種を受けていない、免疫抑制状態にある）で抗体を産生できず、その感染症にかかり発病した患者に投与することにより多大なる治療効果を期待できる。抗体はリウマチ等の自己免疫疾患の治療薬、一方で各種癌に対する治療薬等としても今後様々な形で開発されることが大いに期待されているが、その開発には様々な検討が必要である。本プロジェクトで対象としている疾

患の場合は、抗体の本来の生物学的機能そのものを反映した使用法を念頭に置いている。更に AIMS ライブラリーの作製原理（その詳細では平成 11 年度厚生科学研究補助金総合報告書参照）からみても単離される抗体は、ヒトの体の中で現実的に中和抗体として産生され機能していた抗体そのものを *in vitro* で再構築したと期待できる。そこで、ファージディスプレイ系を用いたヒト抗体ライブラリー作製という最近開発された方法の有効性を先ず証明し、そして得られた抗体が現実的に治療に用いられる一その事例をつくることを目指して本研究プロジェクトは立案された。

ファージディスプレイ系を用いて作製された抗体ライブラリーからいかなる方法で使用目的に合致した抗体を効率よく単離するかについては、現時点では様々な未解決の問題点を含んでいる。既に 20 年以上実績を持つ細胞融合によるモノクローン抗体作製技術と比較して、この技術の方は優れた性能を持つ抗体ライブラリー作製が報告されてから未だ数年しか経過していない。我々にとっても AIMS ライブラリー作製後、2 年半しか経っておらず、未だ多くの改良点、未開発部分を含む。スクリーニングする抗原としてどのような形状であることが好ましいか。スクリーニングはどのように行うのがよいか。単離した抗体について更に結合力を高める操作を加えるべきかどうか、そしてその具体的方法は。結合力と中和力の関係は。毒素を中和する、ウイルスを中和するのに必要な抗体の要件は。いかなる抗体大量生産系を用いるか。それぞれ様々な具体案が提起されているが、standard protocol として確立しているわ

けではない。更に、最終的に作製したヒト抗体を治療薬として使用する際の既存特許との関係を如何に扱うかという practical な問題も障壁として残っている。そのような状況下であって、治療に役立つヒト抗体単離に関する全ての問題を解決し、クリアしながら実際に治療薬としてのヒト抗体を作製する事例を作ることが本プロジェクトの最大目標である。その実績を第一歩としてより困難で、より価値が高い抗体調製へ進む足掛かりとすべく研究を進める。

B. 研究方法

本プロジェクトは、各疾患ごとに分担研究者と主任研究者が任務分担をして共同研究を進める形で研究は行われている。平成 12 年度の実績では、具体的にジフテリア毒素、破傷風毒素について高橋グループ、B 型肝炎ウイルスについて千葉グループ、水痘帯状疱疹ウイルス及びサイトメガロウイルスについて白木グループ、インフルエンザウイルスについて奥野グループ、ハブ毒について野崎グループが抗原の調製及び黒澤グループが単離した抗体の検定を担当している。研究方法について各分担研究者の報告にその詳細が記載されているので、ここでは黒澤グループで行われている研究を中心に報告する。

抗体ライブラリーのスクリーニング

平成 12 年度では AIMS ライブラリーを全ての抗体単離のソースとして用いた。スクリーニングはパニング法で行った。具体的には Immunotube に抗原を付着させた後、多数のファージ粒子からなる抗体ライブラリーを混ぜて、抗原-抗体（ファージ粒子）複合体を形成させ、複合体を形成しないファ

ージを洗い除いた後に抗原に結合したファージを回収する方法である。使用できる抗原量が少ない場合、抗原が混合物であり、その中で目的とする抗体に対応する抗原の相対量が少ない場合等、更なる工夫が必要となる。

単離した抗体の性格付け

panning を数回繰り返した後、ファージの回収率が高まる and/or 回収したファージ全体を用いて ELISA を行うと、その値が高まることをメルクマールにして抗原に結合するファージ粒子を十分に濃縮できたと判断すると、ファージをクローン化して、個々のファージ毎に ELISA 法で抗原結合能を測定する。最初、数 10 個の抗原結合能を示すファージ抗体を単離調製し、その次のステップとして直接塩基配列により抗体を分類する。又は、直接中和活性を測定する。どちらを先に行うかの選択は、活性測定の容易さによって判断している。いずれにしても中和活性を示す異なる抗体をそれぞれの対象毎に少なくとも数種、インフルエンザのような例ではなるべく多数得ることを目標としている。

ファージ抗体からヒト抗体

得られた抗体は最初 Fab 型抗体の形をしている。H鎖、L鎖遺伝子両方ともそれぞれ V_H領域もしくは V_L-C_L領域の両端にユニークな制限酵素切断部位を配しているため、完全なヒト抗体をコードできる形に遺伝子レベルで変換するのは容易である。そのためベクター構築を行った。

C. 研究結果

各毒素、ウイルス中和抗体の単離状況は以下の通りである。

ジフテリア毒素

昨年度単離した毒素中和活性を示す抗体をヒト IgG 抗体型に変換して発現したところ、中和活性が失われていた。これは、IgG 型抗体への変換、発現途上に起こった何らかの予期せぬ問題の反映とも考えられたが、念のため再度ライブラリーをスクリーニングして新しく数種の抗体を単離した。

破傷風毒素

6 種の中和活性を示す抗体を単離した。(高橋報告参照)

水痘帯状疱疹ウイルス

3 種の強い中和活性を示す抗体を単離した。(白木報告参照)

以上の例は精製抗原を充分量用いて、通常の panning 法で AIMS ライブラリーをスクリーニングすることにより使用目的に合致した性能の抗体が得られたと判断できる例である。

インフルエンザウイルス

奥野報告に詳細が記されているように、使用した抗原に多くの NP が含まれていた。更にこの NP の混入は通常のインフルエンザワクチンとして使用されているサンプルの中で起こっていることで、抗 NP 抗体が AIMS ライブラリーの中に多数入っているため、抗 NP 抗体の除去が大きな課題であった。現在までに 4 種の中和活性を示す抗体単離に成功したが、インフルエンザの場合は、ヒトの産生する抗インフルエンザ抗体レパートリーの全体像を明らかにすることを目指している。

サイトメガロウイルス

サイトメガロウイルスの場合は、水痘帯状疱疹ウイルスと似た状況（多くのヒトが中和抗体を持つ）にあると推定したが、現

在用いている抗原では混入物が多いために弱い中和活性を示す抗体しか得られていない。

B型肝炎ウイルス

AIMS ライブラリーを用いて行ったスクリーニングの結果、弱い抗原結合力を示すクローンしか得られず、中和活性も示さなかった。(千葉報告参照) 今後、方針の根本的変更も含めた工夫が必要と考えている。

ハブ毒

HR-1、HR-2 を抗原とする AIMS ライブラリーのスクリーニングにより HR-1 に結合する 3 種の抗体を得たが、全て中和活性を示さなかった。野崎報告にあるように強い中和活性を示す抗体を有するヒトに協力をお願いし、その末梢血から中和抗体を単離する方法の開発を計画している。

D. 考察

本プロジェクトは幾つかの素過程からなり、一つ一つを実証しつつ改訂を加えながら最終的に治療に役立つヒト抗体の単離調製を可能にする全行程を一般性の高いものとして確立することを目指している。現在、ヒト抗体を作製する方法は、ファージディスプレイ法を用いてヒトの体内で作られている、若しくは、作られる可能性がある抗体を *in vitro* で再構築する方法と、ヒト抗体を産生するマウスを利用する方法の 2 種類ある。我々は、前者の立場をとる。前者の場合も AIMS ライブラリーのような巨大レパートリーからなる単一のライブラリーをマスターソースとして用いる場合と、特定の抗原に対して強い結合(中和)活性を示す抗体を有しているヒトの末梢血を利用する場合がある。単離した抗体に遺伝子レ

ベルで更に操作を加えて性能の改良をはかる方法の導入も考えられる。平成 12 年度までの研究で、AIMS ライブラリーを抗体の単一ソースとして用いて、paning 法でスクリーニングする現在採用している方法の有効性と限界が明確になってきた。抗体ソースとして AIMS ライブラリー以外を利用することについては、ハブ毒と B 型肝炎ウイルスを例に高い中和活性を示す抗体保有者の協力をお願いし、何 ml の末梢血(量)を用いてどのような処理を行い、どのように抗体遺伝子ライブラリーを作製すれば血清中に含まれる抗体と同等のものを再構築—単離調製できるか、一般性の高い方法を確立する必要がある。

ライブラリーのスクリーニングの方法も改良する必要がある。ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングするためには、抗原—ファージ抗体複合体をフリーファージと分けることが必要である。Panning はそのための手段だが、抗原に biotin 結合させてアビジン—ビオチンの強い結合力を利用して抗原—抗体複合体を回収する方法を開発中である。これは結合力に応じたスクリーニングも可能にすると期待される。又、抗原の biotin 化を工夫すれば、目的とする抗原に結合する抗体のみを選択的に濃縮できるようになるかもしれない。現在の AIMS ライブラリー利用上の問題点は、目的とする性質をした抗体が AIMS ライブラリーに含まれていないから生じているというよりは、目的とした性質とは異なるが、使用する抗原にそれなりに結合する多くのファージ抗体が存在するために必要な抗体が埋もれてしまっていることに起因するらしい。スクリーニング法の改良は急務である。

弱い活性ではあるが、目的とする性質を示す抗体の扱いも次の解決すべき課題である。臨床目的の場合に、抗体を複数混ぜてその相乗効果を期待できる場合がある。結合力の高まったクローンの単離法の確立、エピトープマッピングをルーティンに行い、相乗効果の期待できる組み合わせの見つけ方の開発が求められている。更に単離される抗体は最初 Fab 型で一価であるが、IgG 型に変換すると二価になる。その中和活性に及ぼす影響を前もって見積もれると目標設定が容易になる。

最後の段階が IgG 型ヒト抗体の調製である。最初主任研究者のグループでは H鎖 L鎖別々のプラスミド上に遺伝子を構築したため、得られた抗体産生形質転換株が不安定であった。そこで両方の遺伝子を単一のプラスミド DNA 上で容易に構築できる形に作り直した。

以上列記したようにファージディスプレイ系を用いて臨床に用いるヒト抗体を作製する全行程に関して、一通り問題点は出尽くしている。易しい対象からより困難な対象へというのが我々の基本戦略である。

現在世界的にも様々なアプローチが提起されており、有効性の高いものと判断できる技術については取り入れることにしている。治療薬としてのヒト抗体の実用化という観点で最後に残る最大の障壁は、極めて体系的かつ包括的内容を持つ既存特許の存在である。動物（ヒトを含む）体内で発現されている抗体遺伝子を *in vitro* で PCR 法により増幅して再構築すること、及びファージディスプレイ系を用いて抗体ライブラリーを作製すること、この二つの技術に関して国際的に特許が成立している。この特

許の存在が世界的にヒト抗体開発の最大の障壁になっている。特許権所持グループが設定する特許への royalty が高すぎて余程商品価値の高い対象でない限り、治療薬としてのヒト抗体開発が最終的に pay しないと殆ど全ての製薬会社が判断している。我々の場合も最終段階で必ずこの制約を受けると予想される。そこで現時点から様々なステップに独自の工夫を導入していく必要があると思われる。我々としての独自特許獲得を目指し、そのことを通したクロスライセンスを目標としているので最初から手の内を見せることはあり得ないが、現在抗体単離を行っている対象の幾つかは世界的にも新規なものであり、その実施過程で独自の工夫が入ったことにより初めて抗体単離が可能になる場合にはそのプロセスに特許性がある。そこが我々の工夫すべき点と判断している。

本プロジェクトを通して治療に役立つヒト抗体単離調製の手順を確立した後は、抗原そのものが新規規制を持つ対象へと研究全体をシフトしていくことを計画している。その場合は特許問題のクリアーはより容易になる。

E. 結論

本プロジェクトは「臨床に役立つヒト抗体単離」を目標に進められている。平成 9-11 年度に厚生科学研究費として「人工抗体ライブラリーの作製とその利用法の開発に関する研究」が行われ、本研究で用いている AIMS ライブラリーが作製された。、平成 12-14 年度同じく厚生科学研究費として本プロジェクトが採用され、今回は 5 グループ（高橋、千葉、白木、奥野、野崎）の参

加を得て、具体的に様々な毒素、ウイルスに対する中和抗体を単離し、それを治療薬として使用可能にする IgG 型ヒト抗体の形で調製することを行うことになった。作製したヒト抗体が治療薬として認可されるためには、更に大規模な研究一試験が必要となるが、それは次の段階と考えている。平成 12 年度の研究で、既に確立している「精製抗原の調製—AIMS ライブラリーを panning 法でスクリーニング」という方法で目的とする性能の抗体が得られる疾患、スクリーニング法を工夫すべきだが基本的に AIMS ライブラリーを抗体のマスターソースとしてよい対象がどのようなものか判明してきた。そして更に改良もしくは開発すべき具体的内容及び課題の存在もわかった。平成 12 年度中に達成すべき重要課題と位置付けていたファージ抗体として得られる Fab 型抗体を IgG 型抗体に変換するステップは少し手間取ったが、数 mg/l オーダーの発現量ならルーティンに行うシステム作りをほぼ完了した。そこで平成 13 年度では以上の問題を解決し、本課題で対象としている全ての疾患に対するヒト抗体単離—調製にメドをつけられる段階まで本プロジェクトを進められると期待している。例えば、大腸菌 0157 のペロ毒素等の中和抗体については、AIMS ライブラリーをソースとしてよいのかという新たな疑問への解答が得られると思う。一方で B 型肝炎ウイルスやハブ毒中和抗体のように新たにライブラリーを作り直そうとする課題についてその困難性を含めて明確にし、なるべく性能のよい抗体単離を目指す。いずれにしても世界的にマウス/ヒトキメラ抗体やヒト化抗体の時代は間もなく終了し、完全なヒト型抗体

の時代に突入する。癌治療等での抗体への期待は高まったり低下したりを繰り返しているが、今後異種タンパク固有の問題が払拭されるわけで、抗体の治療薬としての価値は高まることはあっても低くなることはない。

F. 研究発表

1. 黒澤良和 抗体はポストゲノム時代に解析ツールの主役の一角を占めるか 実験医学「ゲノム医科学とこれからのゲノム医療」54-61, 2000 羊土社
2. 伊庭善孝 ファージ提示法を用いたモノクローナル抗体作製法 実験医学 18(4) 481-486, 2000 羊土社
3. 伊庭善孝, 黒澤良和 ファージ抗体ライブラリー 分子精神医学 1, 56-57, 2001 先端医学社
4. 廣野ゆかり, 柿田麻衣, 鈴木和宏 人工血液研究の進歩 血液・免疫・腫瘍 6(1) 57-63, 2001

G. 知的所有権の取得状況

特許取得

「抗体ライブラリー」

平成 12 年 2 月 22 日申請した特許を平成 13 年 2 月 1 日国際出願

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製

H12-血液-005

| | | |
|-------|-------|-------------------|
| 分担研究者 | 高橋元秀 | 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 |
| 分担研究者 | 千葉 丈 | 東京理科大学 基礎工学部 |
| 協力研究者 | 小宮貴子 | 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 |
| | 大場浩美 | 東京理科大学 基礎工学部 |
| | 柿田麻衣 | 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 |
| | 廣野ゆかり | 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 |

研究要旨

黒沢らにより作製されたヒト抗体発現ファージディスプレイライブラリー（AIMS）からジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドまたは B 型肝炎ウイルス表面抗原（HBs）を抗原として、それぞれの抗原に対するファージ抗体を調製した。ELISA 陽性の抗毒素抗体について、各々の毒素を特異的に中和する活性を検討した。Vero 細胞を用いた培養細胞法とウサギ皮内法でジフテリア毒素中和反応を試験したところ、3 検体が中程度の中和活性を示した。また、破傷風毒素に対する中和能をマウス法で試験したところ、単独の抗体では弱い中和活性であったが、数種の抗体を組み合わせることにより中和活性が増強された。HBs に対するファージ抗体は調製できなかった。

A. 研究目的

ジフテリア患者の治療に用いられるジフテリアウマ抗毒素製剤は、ヒトには異種な蛋白であるために使用に際して血清病の心配がある。また、破傷風患者に用いられる抗破傷風ヒト免疫グロブリン製剤は、人の血液を原料とするために原料確保に限度があり、また血液由来の未知のウイルスや病

原体の混入が問題となる。このような細菌毒素性疾患の治療や早期診断及び毒素の作用や解析の基礎研究のために、毒素の特定部位を認識する抗体をヒト抗体発現ファージディスプレイライブラリー（AIMS）から選択する。本ライブラリーは現行予防接種法で推奨されている沈降精製百日せきジフテリア破傷風三種混合ワクチンを接種した

年齢の個体から得られたリンパ球を用いて調製されているので、これら 3 種類の毒素抗原に対する中和抗体の単離は比較的容易に出来ると考えられる。一方、B 型肝炎ウイルスによる母子感染や針事故での感染を防止するための抗 HBs ヒト免疫グロブリン製剤についても、抗破傷風ヒト免疫グロブリン製剤と同様に、人の血液を原料とするために原料確保に限度があり、また血液由来の未知のウイルスや病原体の混入が問題となる。そこで、上記のヒト抗体ライブラリー (AIMS) を用いて抗 HBs ヒト抗体の調製を試みる。AIMS は健常人のリンパ球の mRNA を用いて作製されているので、抗 HBs ヒト抗体クローンはライブラリーに含まれるとしてもごく少数と予想される。ごく少数のクローンを巨大ライブラリーから選択できれば、ほとんど全てのタンパク質抗原に対するヒト抗体を調製することも夢ではなくなると考えられる。

B. 研究方法

ヒト抗体発現ファージの選択：それぞれの抗原に特異的な抗体を発現するファージの選択と ELISA による抗体活性の検討および抗体遺伝子の塩基配列決定は藤田保健衛生大学総合医科学研究所で行われた。

ジフテリア中和抗体活性の検出と定量：大腸菌で発現し ELISA 試験で陽性であった 37 抗体と陰性であった 6 抗体は、培養液を硫酸アンモニウムの 60%飽和で塩析後、PBS に透析、220 μ m のミリポアフィルターで濾過した。ジフテリア毒素は、ヒト、サル、ハムター等の感受性細胞を変性させる。培養細胞法は、ジフテリアの毒素と抗毒素混合液に細胞浮遊液を加えて培養し、抗毒素

により中和されなかった残存毒素活性による細胞変性の程度を測定する方法である。培養液に添加した pH 指示薬 (フェノールレッド) の色調変化を指標として簡便に判定する方法であり (カラーチェンジ法)、毒素により細胞変性を起こし死亡した細胞培養液は赤色を呈し、抗毒素により毒素が中和された細胞培養液は黄色を呈する。また、ウサギの皮内にジフテリア毒素を注射すると 48 時間後に発赤、壊死が観察される。この毒素活性も抗毒素により中和される。上記 Vero 細胞により中和活性が認められた抗体について、ウサギ皮内法による中和抗毒素価の定量を行った。任意に希釈した標準抗毒素または抗体にジフテリア毒素を混合した後、37 $^{\circ}$ C 30 分反応させた。その 0.2ml を脱毛したウサギの背中皮内に注射した。48 時間後に、抗毒素希釈系と同じ反応の発赤の見られるファージ抗体の希釈用量を相対力価として算出した。

破傷風中和活性：ELISA 試験で陽性であった抗体を含む 48 の大腸菌培養上清は上記のように塩析で濃縮した。破傷風毒素をマウスに皮下注射すると限局した筋肉の強直性の麻痺が観察され、毒素が強い場合は全身性麻痺に発展し、数日後に死亡する。この毒素のマウス致死活性を指標として、毒素を特異的に中和する抗毒素 (中和抗体) 活性を定量的に測定した。ELISA 陽性の抗体を含む大腸菌培養上清の 0.5ml をマウス腹腔内に注射し、60 分後に健康マウスが死亡する量の 10 倍量の破傷風毒素 (約 10 最小致死量) を後肢内股内に注射した。本法は微量の抗毒素を定性的に検出する方法である。この方法である程度の抗毒素価を検出した抗体について、以下の定量試験を実

施した。中和能の見られた抗体または標準破傷風抗毒素を対数等間隔で希釈し、一定量の破傷風毒素を添加して 30 分後に混合液の 0.4ml をマウス後肢内股内に皮下注射した。標準破傷風抗毒素による麻痺の軽減やマウス致死活性を指標として、ファージ抗体の破傷風中和活性を標準破傷風抗毒素に対する相対力価として算出した。なお、中和活性の認められた個々の抗体を各々組み合わせることにより中和活性が増強するかについても検討した。

(倫理面への配慮)

抗毒素価測定における実験動物の取り扱いについては、国立感染症研究所の規定に従い、年度ごとに実験計画書を提出・申請し、実験動物委員会の審査を経て実験を行った。実験に際しても動物愛護の精神を考慮し、使用動物数、安楽死処理等については適正に実施している。

C. 結果

ジフテリア中和抗体の検出：ELISA 試験で陽性となった 126(37+89)抗体について、培養細胞法によりジフテリア毒素に対する中和活性の検出を行った。その結果、3抗体について、それぞれ 0.052、0.005 及び 0.005 単位/ml の中和活性が認められた。また、3抗体に対して数種の抗体を添加・組み合わせることで中和活性が増強するか試験したが、顕著な増強効果は認められなかった。なお、培養細胞法で 0.05 単位を示した抗体について、ウサギ皮内試験法で測定した結果、0.02 単位/ml であった。

破傷風中和抗体の検出：ファージ抗体自身のマウスに対する毒性を試験するために、

調製した抗体の 0.2ml を直接、腹腔と尾静脈内に注射したが、いずれの投与方法でも体重減少、発熱及び立毛等の臨床的異常は認められなかった。2日後にマウスが死亡する量の破傷風毒素を用いたマウス法で、各抗体を前もって注射しておいたマウスでは、約半数の抗体に部分的中和活性が認められ、発症時間の遅延が観察されたが、4-7日ですべて死亡した。さらに、定量的に抗毒素価（中和抗体価）を試験した結果、6抗体に部分的な中和活性が認められた。なお、6抗体の組み合わせにより、中和活性は増強され、マウスの生存期間は延びたが完全中和には至らず、7日間の観察期間に死亡した。

抗 HBs 抗体の調製：ELISA で陽性のファージクローンを調製することはできなかった。

D. 考察

ジフテリア毒素を中和する 3抗体を単離し、1抗体はヒトの発症防御に必要と言われる 0.01 単位/ml を上回る 0.05 単位/ml であった。なお、細胞培養法で 0.05 単位を示した抗体について、ウサギ皮内試験法で測定した結果、0.02 単位/ml となったが、この値は試験法の違いによる誤差として許容される範囲と考えられる。

一方、破傷風毒素に対する中和活性を有する抗体はジフテリアに比べ多数確認できたが、総じて弱い活性であった。この弱い活性はファージ抗体が Fab 断片であることに拠るのかもしれないが、IgG 型のヒト破傷風モノクローナル抗体の実験でも単独での中和活性は弱い、組み合わせにより活性が十倍程度上昇することが報告されてい

る。今後得られた抗体遺伝子の塩基配列を考慮に入れて、抗体の組合わせにより中和活性が増強されるか検討することが必要である。また、試験管内でモノクローナル抗体を毒素と反応させて、その混合液をマウスに注射した場合、接種後数日して発症する報告があるため、効果判定には現行試験系以外の方法についても検討の余地がある。さらに、得られた数種の抗体について、毒素のどの部分を認識するものかを解析する必要がある。

抗 HBs 抗体のクローンをライブラリーから選択することができなかつたので、パンニングなどの過程をより効率よく、かつ確実に行えるような何らかの技術的な改良が必要と思われる。

E. 結論

ヒト抗体ライブラリーの中から破傷風毒素を部分的に中和する数種の抗体を単離した。個々の抗体を組み合わせることにより、中和活性は増強した。また、ジフテリア毒素を中和する 3 種の抗体を単離した。現在までの成績は Fab 型で試験であるが、今後 F(ab)2 型及び IgG 型への改変による中和活性の増強を試みる必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当無し

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

分担研究者 白木 公康 富山医科薬科大学医学部教授

研究要旨

本年度の研究事業においては、水痘带状疱疹ウイルス（VZV）感染症の予防や治療に使用できる VZV に対する中和活性を有する人型抗体を作製することを目的とした。そして、中和反応の標的となる糖蛋白を精製し、人工抗体ライブラリーからそれらに反応するクローンを中和法によってスクリーニングを行った。さらに、中和活性の強いクローンを選択して、人型抗体への変換を行っている。

A. 研究目的

抗体によって予防あるいは治療できる感染症として VZV 感染症がある。移行抗体による新生児の水痘の感染の防御と軽症化や ZIG（带状疱疹回復期血清より作製した IgG 製剤）による水痘感染の予防等から明らかのように、本研究事業において、VZV に対する中和抗体を作製することは重要な目的の一つである。

B. 研究方法

VZV 感染細胞より、3種の糖蛋白複合体（gB、gE:gI、gH:gL）を精製し、それら蛋白と反応する抗体クローンを人工抗体ライブラリーから、ELISA 法により一次スクリーニングを行う。そして、さらに、VZV ウイルスに対する中和反応を行い、中和反応による 2 次スクリーニングを行う。そして、弱いながら中和活性が認められたクローンについては濃縮後、さらに、中和活性について検討した。

C. 研究結果

GH:gL と ELISA 法で反応する 29 種のクローンについて、中和活性の検討を行い 3 種の強い中和活性を有するクローンをスクリーニングした。さらに、これらの抗体クローンは、感染拡大阻止能をも有していた。

D. 考察

VZV に対する中和活性を有する抗体クローンを選択した。中和活性の測定の単位として、感染性ウイルスの 50% を中和する 50% 中和法が一般的に使用されている。通常の带状疱疹回復期血清などでも、ウイルスの感染力を完全に中和することは困難である。しかし、驚くことに、スクリーニングに使用した抽出液で VZV を完全中和できた。このことは、この人工抗体ライブラリーの卓越性とそこから選択される抗体の有用性を示しているものと思われた。

E. 結論

人工抗体ライブラリーから VZV を中和できる有用なクローンが選択できた。

G.研究発表

1. 論文発表

Yokoyama, T., Ayabe, S., Miyagi, H., Sugano, T., Otsu, A., Sato, H., Kageyama, S., Fujii, T., Shiraki, K. Varicella-zoster virus gH:gL contains a structure reactive with the anti-human gamma chain of IgG near the glycosylation site. Journal of General Virology 82, 331-334, 2001.

2. 学会発表

鈴木和宏、柿田麻衣、廣野ゆかり、赤堀泰、黒澤良和、白木公康 「人工抗体ライブラリーからの水痘帯状疱疹ウイルス中和抗体の単離」 第23回日本分子生物学会年会 (2000)

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「抗体ライブラリー」

特原 2000-50543 号

PCT/JP01/01298

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

インフルエンザウイルスに対するヒト型モノクロナール抗体の作製

分担研究者 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課長

研究協力者 鈴木定彦 大阪府立公衆衛生研究所病理課主任研究員

研究要旨：インフルエンザワクチンを抗原として、ファージ抗体ライブラリーからインフルエンザウイルスの HA に対するヒト型モノクロナール抗体の作製を行った。ワクチン原液、あるいはレクチンカラム精製抗原を用いた場合、NP に対する抗体しか得られなかった。ファージ抗体ライブラリーを奥田株（H2N2）で前処理し、ワクチン株のニューカレドニア株（H1N1）、シドニー株（H3N2）を用いてクローニングしたところ、前者からは1種類、後者からは2種類の HA に対する抗体が得られた。これらの抗体は、株特異的な中和活性を示した。

A. 研究目的

インフルエンザは毎年、世界中で流行し、多くの患者と死亡者を出すため、最も重要な感染症の一つである。予防対策として明らかに有効と認められているのはインフルエンザワクチンの接種であるが、いまだその効果は確実なものでない。その理由の一つは、インフルエンザウイルスの表面にスパイクとして存在するヘマグルチニン（HA）蛋白が頻りに抗原変異を起こし、既存の抗体では感染を阻止できなくなるからである。

そこでわれわれは、多くのインフルエンザウイルスに共通し、しかも中和抗体を誘導するエピトープが HA 上に存在するか否かをモノクロナール抗体を作製して調べてみた。その結果、複数の亜型に含まれるすべてのウイルスを中和するマウスのモノクロナール抗体が得られた。ヒトでも同様の抗体が得られれば、インフルエンザの予防、治療に大きく貢献することが期待される。今回は、ファージディスプレイ法で中

和活性を有するヒトのインフルエンザウイルスに対する抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

ウイルス：本研究では、主にインフルエンザウイルスのワクチン株を用いた。1997/98～1999/2000シーズンのワクチン株である A/北京/262/95（H1N1）、1998/99～1999/2000シーズンのワクチン株である A/シドニー/5/97（H3N2）、2000/2001シーズンのワクチン株である A/ニューカレドニア/20/99（H1N1）と A/パナマ/2007/99（H3N2）を用いた。その他、A/奥田/57（H2N2）も使用した。

マウスモノクロナール抗体：抗原解析のため、A型インフルエンザウイルスの HA、NP、M 蛋白、それぞれに特異的に反応する C179、C43、C111（Okuno, Y., et al. J. Virol. 67:2552-2558, 1993）を使用した。

HA 抗原の精製：インフルエンザワクチンの原液をワクチンメーカーから入手し、レクチン

カラムにより HA 抗原を精製した。

濃縮、精製され、ホルマリン不活化後にエーテル処理されたワクチンを、4種のレクチンカラム (RCA、WGA、LAC、ConA) で HA 抗原の精製を行なった。RCA カラムの場合、RCA120-Agarose をカラムに充填し、20ml の PBS+0.02%NaN₃ で平衡化した。これに、液量 50ml のワクチン原液を重層し、流出液を採取した (pass)。次いで、20ml の PBS+0.02% NaN₃ でカラムを洗浄し、最後に 1 M lactose で溶出した (elute)。WGA では溶出のため N-Acetyl-D-glucosamine を、また LCA と ConA では Methyl- α -D-glucoside を用いた。

Immunoprecipitation による解析：

RCA のカラムで採取した pass と elute のサンプルとワクチン原液に biotin-7-NHS stock solution を添加し、次いで protein A-Agarose を加えて遠心した。遠心後、抗体 (C179、C43、C111) を反応させ、protein A-Agarose を添加した。これを遠心して上清を除き、loading buffer を加えてから 100°C で変性させ、SDS-PAGE を行なった。次に Western blotting を行い、メンブレンに Streptavidin-POD を反応させ、BM TETON POD 基質で染色させた。

ワクチンを用いたファージ抗体の単離：ワクチン原液そのもの、あるいは上述の精製 HA 抗原を用いて、AIMS 4 ファージライブラリーからインフルエンザウイルスに反応するファージ抗体の単離を行った。

ワクチン抗原、あるいは RCA カラムで精製した抗原を PBS で溶かし、イムノチューブに入れて穏やかに転倒混和し、抗原をイムノチューブ内表面に結合させた。次いで、抗原結合済みのイムノチューブに AIMS 4 ファージライブラリーを入れ、抗原と接触させた。反応後、緩衝液で洗浄して抗原と結合していないファージ

を除いた。次にトリエチルアミンをチューブに添加し、ファージをチューブから乖離させて別の新たなチューブに移し、直ちに 1 M Tris-HCl pH6.8 を加えて中和した。

亜型特異的に反応するファージ抗体の単離：

ワクチン原液や精製 HA 抗原を用いた場合、目的の中和活性を有する抗体が得られず、A 型インフルエンザウイルスの亜型に共通する NP 蛋白に対する抗体しか単離できなかった。そこで、前もって A/奥田/57 (H2N2) の抗原で吸収し、H1N1、H3N2 に特異的に反応するファージ抗体の単離を試みた。得られた抗体は HA に対する抗体であることが期待された。

吸収方法は、不活化した A/Okuda/57 を反应用チューブに入れ、4°C 18 時間反応させて抗原をチューブに吸着させた。次に AIMS 4 ライブラリーをチューブに加え、室温で 2 時間、攪拌しながら反応させた。反応終了後のライブラリーを NP 抗体吸収済ライブラリーとした。

HA に特異的に反応する抗体を単離するため、A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) あるいは A/シドニー/5/97 (H3N2) を反应用チューブに添加し、ウイルス抗原をチューブに吸着させた。次に NP 抗体吸収済 AIMS ライブラリーを加え、室温にて 2 時間攪拌しながら反応させた。反応後 PBS で洗浄し、次いでトリエチルアミンを加えてファージと抗原を乖離し、1 M Tris-HCl pH6.8 で中和して抗原結合ファージを回収した。

回収したファージの増幅：大腸菌 DH12S に、上記の過程で得た抗原結合ファージを加えて感染させた。次に感染した大腸菌にさらにヘルパーファージを感染させ、振とう培養することでヘルパーファージが感染した大腸菌を選択した。培養後、培養液を遠心分離して菌体を沈殿させ、上清を回収した。上清にポリエチレングリコール溶液を加え、遠心分離して沈殿させることに

よりファージを回収した。

ELISA : ファージ抗体の活性は、ELISA で測定した。Nunc Immuno module Polysorp プレートにウイルス抗原液を加え、4°Cで18時間感作した。2.5%のウシ血清アルブミン (BSA) で3時間ブロッキングし、ファージ抗体を含んだ大腸菌培養上清を60分間反応させた。次にPOD標識抗ヒトIgGを60分間反応させ、最後にOPDで発色させた。

中和試験 : フォーカス減少を指標としたマイクロ中和抗体価測定法 (Okuno, Y., et al. J. Clin. Microbiol. 28:1308-1313, 1990) を用いた。MDCK細胞を96穴平底マイクロプレートに分注し、モノレイヤーシートを形成するように培養した。次の日、96穴丸底マイクロプレートにMEM培地で希釈した抗体とウイルス液を混合し、37°Cで1時間反応させて中和した。この中和反応液を前日から用意した96穴中のMDCK細胞に感染させ、37°Cで30分間吸着させた。感染後、トリプシンを含んだ維持培地 (MEMと0.5%の tragacanth gum を混合したもの) を加え、37°Cで24時間培養した。培養後、100%エタノールで固定し、PAP法で感染細胞の集団 (フォーカス) を染色した。PAP法では、一次抗体にA型インフルエンザウイルスのNPに対するマウスモノクローナル抗体、二次抗体に抗マウスIgGウサギ抗体、三次抗体に抗ウサギIgGヤギ抗体、四次抗体にペルオキシダーゼ・ウサギ抗ペルオキシダーゼ (PAP) complex を順次反応させた後、H₂O₂ とベンチジンを用いて細胞内のウイルス抗原を発色させた。フォーカス数は実体顕微鏡下でカウントし、中和活性の強さは、コントロールのフォーカス数に対するフォーカス減少率で求めた。

蛍光抗体法 : インフルエンザウイルスの各株をMDCK細胞に感染させ、24時間後に固定し、

使用時まで-30°Cに保存した。感染細胞の染色は、ヒトの抗インフルエンザ抗体を一次抗体として反応させ、二次抗体には200倍希釈したFITCラベル抗ヒトIgG (H+L) を用いて行なった。染色価は、感染細胞の染色が確認できる一次抗体の最大希釈倍数で表した。

C. 研究結果

ワクチン抗原を用いた抗インフルエンザ抗体のクローニング : 北京株 (H1N1) のワクチン原液を抗原として、AIMS4ファージライブラリーから抗インフルエンザ抗体をクローニングした。ELISAで北京株に反応する36クローンが得られた (表1)。これらのクローンは、シドニー株 (H3N2) と同程度に反応した (表1、図1)。ウェスタンブロッティングを行なったところ、27クローンが2ME非存在下で泳動した北京株と55Kdの位置にバンドを形成した (data not shown)。

36クローンの反応性を、さらに赤血球凝集阻止反応 (HI)、中和試験、蛍光抗体法 (IF) で調べた (表2)。中和試験では、通常法だけでなく、活性を増幅させるために二次抗体としてanti-F(ab')₂やanti-cpIIIを加えた。anti-F(ab')₂としては、2社の製品を用いた。しかし、すべてのクローンがHI活性、中和活性とも陰性であった。一方IFでは、調べた10クローンすべてが北京株を感染させた細胞の核を染色した。

以上の結果より、得られたクローンはインフルエンザウイルスの抗原に特異的に反応する抗体であるが、中和抗体ではなかった。ELISAでH1N1とH3N2の両亜型に反応することより、NPかMに対する抗体であることが推測された。Western blottingの結果より、これらのクローンはNPに対する抗体であることを確認した (data not shown)。

レクチンカラム精製抗原を用いた抗インフルエンザ抗体のクローニング：4種のレクチンカラムでワクチン原液から HA の精製を試みた。それぞれのレクチンで得られた pass と elute を SDS-PAGE で解析した (図 2)。弱いながら RCA の elute に HA のバンドが確認された (lane 7)。

RCA カラムだけが HA をトラップすることが分かったので、このカラムで elute を繰り返した (図 3)。elute 2 と elute3 の 65kDa の位置に HA のバンドが確認されたが、M 蛋白も含まれていた。しかし、NP のバンドは確認できなかった。

Immunoprecipitation で RCA の pass と elute、それにコントロールとして 16 倍希釈したワクチン原液の解析を行った (図 4)。使用した抗体は 3 種類で、C179 は HA、C43 は NP、C111 は M に対するマウスモノクローナル抗体である。HA、NP、M のそれぞれの分子量は約 65、60、30 kDa であり、lane 2、5、8 はそれぞれ HA の存在が、また lane 4、7、10 にはそれぞれ M の存在が確認された。しかし、lane 3、6 に NP が確認されたが、lane 9 には NP の存在が確認できなかった。すなわち、溶出されたものには HA、M は存在するが NP は存在しないと考えられた。

RCA カラムで精製した抗原は主に HA を含んでいると考えられ、クローニングした抗体は HA に反応することが期待された。前述の方法で 23 個のクローンが得られたが、すべてのクローンがニューカレドニア株とパナマ株の両方に反応し、亜型特異性を示さなかった (表 3、図 5)。また、中和活性を示すクローンもなく、蛍光抗体法でも感染細胞の核を染色した (data not shown)。したがって、得られたクローンは NP に対する抗体であると考えられた。おそら

く、精製抗原の中に Immunoprecipitation で確認できない微量の NP が存在し、これがファージライブラリーの抗体と強い親和性を示したものと推測された。

吸収法による亜型特異的抗体のクローニング：ワクチン原液やレクチンカラム精製抗原を用いると、NP に対する抗体しか得られなかった。そこで AIMS4 ファージライブラリーを奥田株 (H2N2) で前処理し、NP に反応する抗体を除去したものをニューカレドニア株 (H1N1)、シドニー株 (H2N2)、それぞれと反応させ、株特異的な抗体を得ようとした。

それぞれの株に反応するファージを大腸菌に感染させ、48 個づつのコロニーを試験した (表 4)。最終的にニューカレドニア株に反応するクローンが 1 種類 (NC1)、シドニー株に反応するクローンが 2 種類 (SY39、SY47) 得られた。これらのクローンの反応性を ELISA で調べた (表 5)。NC1 はニューカレドニア株に、また SY39 と SY47 はシドニー株に特異的に反応した。

株特異的クローンの生物活性：ニューカレドニア株、シドニー株それぞれに感染した細胞を、株特異的クローンを一次抗体に用いて蛍光抗体法で染色した (表 6)。NC1 はニューカレドニア株を、また SY39 と SY47 はシドニー株を特異的に染色した。NC1 は原液でしか染色できなかったが、SY39、SY47 は 5 倍、20 倍希釈しても染色できた。これらのクローンは主に細胞質を染色し、HA に対するマウスモノクローナルで H1N1 に特異的に反応する C179 と、H3N2 に特異的に反応する F49 と同様の染色パターンを示した。NP に反応するクローン IF8 と、マウスモノクローナル抗体 C43 は、どちらの株の核も染色した。ワクチンをウサギに免疫して作製した AS1296 は核も細胞質も染色した。

各クローンの中和活性を調べるため、ウイルスとクローン抗体を反応させ、中和されずに残った残存ウイルスをフォーカス計数法で測定した（表7）。NC1 はニューカレドニア株を、また SY39 と SY47 はシドニー株を株特異的に中和した。NP に対するクローン抗体は、どちらの株に対しても中和活性がなかった。

D. 考察

インフルエンザウイルスが細胞に感染するためには、細胞への結合と、細胞膜とウイルスエンベロープの融合という2つのステップが必須である。この両方の機能を有しているのがエンベロープ上に存在する HA 蛋白である。また、HA だけが感染を阻止する中和抗体を誘導できる。したがって、主に HA に対する抗体だけが予防、治療に有効だと考えられる。

この研究では、HA に対するヒト型モノクローナルの作製を試みた。得られた抗体は、中和活性を有することが期待されたからである。最初は、抗原量の多いワクチン原液を用いたが、得られた抗体は予想に反し、すべて NP に対する抗体であった。調べてみると、ワクチン中にはかなり多量の NP が含まれており、ヒトの抗体はこれに強い親和性を示したものと考えられた。そこで、ワクチンからレクチンカラムで HA を精製することにした。RCA カラムを用いると HA を精製できることがわかり、この方法で大量の HA を調整した。しかし、この精製抗原によってクローニングしても、得られた抗体は NP に対するものであった。

A 型インフルエンザウイルスには多数の亜型が存在するが、NP はすべての亜型に共通している。一方、HA は亜型特異的で、一つの亜型の HA に対する抗体は、別の亜型の HA に反応することはない。そこで奥田株（H2N2）でフ

ァージライブラリーを吸収してニューカレドニア株（H1N1）あるいはパナマ株（H3N2）と反応させると、残るのは H1 と H3 の HA に対する抗体だけだと推測された。この方法を実施したところ、期待どおり3種類の HA に対するクローンが得られ、これらは中和活性を示すことが証明された。

HA は抗原変異が激しく起こり、ワクチンによる予防を困難なものにしている。そのため、多くのウイルス株を幅広く中和する抗体でなければ実用化できないと考えられる。今回作製された3種類の中和活性を示す抗体が、ワクチン株以外の流行株をどの程度中和するか、検討しなければならない。我々は複数の亜型のウイルスをすべて中和するマウスのモノクローナル抗体を得ている（Okuno, Y., et al.: J. Virol. 67:2552-2558, 1993）。最終的には、ヒトでも同様の抗体を作製することを目標に研究を進めたい。

E. 結論

ファージディスプレイ法を応用して、インフルエンザウイルスの HA に対するヒト型モノクローナル抗体が3種類得られた。これらは、株特異的な中和活性を示した。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Nakagawa, N., Kubota, R., Nakagawa, T., and Okuno, Y. Heterogeneity of influenza B virus strains in one epidemic season differentiated by monoclonal antibodies and nucleotide sequences. J. Clin. Microbiol. 38:3467-3469, 2000.
2. 奥野良信: インフルエンザワクチンの現況. 医学のあゆみ, 192: 1186-1187, 2000