

厚生労働科学研究研究費補助金
医薬安全総合研究事業

病原微生物の増殖を阻害する
人工ヒト免疫グロブリンの開発

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井原征治
平成15(2003)年4月

目次

| | |
|---|----|
| I. 総括研究報告 | |
| 病原微生物の増殖を阻害する人工ヒト免疫グロブリンの開発 井原征治 | 1 |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. HCMV の gB, gH に対するヒト抗体作製 井原征治 | 2 |
| 2. サイトメガロウイルス抗体療法に関する基礎研究 錫谷達夫 | 8 |
| 3. 抗体遺伝子のクローニングと解析 竹腰正隆 | 12 |
| 4. 寄生原虫症の予防と治療への応用をめざした人工ヒト 免疫グロブリンの開発 橘 裕司 | 15 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 19 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 21 |

病原微生物の増殖を阻害する人工ヒト免疫グロブリンの開発

主任研究者 井原征治 東海大学医学部 助教授

研究要旨 本研究はヒトサイトメガロウイルス（HCMV）および原虫感染症に対する抗体医療の確立を目指して、増殖に必須の分子を標的とした組み換えヒト抗体の作製を目的とする。その作製方法は、ヒト抗体遺伝子導入マウスの利用とファージディスプレイ法の、2法である。HCMV では目的の抗体遺伝子は2群で、第一群は HCMV の中和活性を持つ抗 gB と抗 gH 抗体である。また、第二群は、HCMV が持つヒトの免疫系を無力化する2種類の原因遺伝子（UL11, UL118-119）に対する抗体である。そこで、ヒト抗体産生マウス（キリンピールの KM マウス）を使用して、gB、gH、および UL11、UL118-119 の産物に対するヒト抗体の作製を開始した。まず、KM マウスを精製 HCMV 粒子で免疫し、ハイブリドーマ法で抗体産生細胞のスクリーニングをおこなった。その結果、HCMV Towne 株を中和する数株の IgM 抗体産生細胞、また、1株の IgG 産生細胞を分離した。これらの細胞が分泌する抗体の特異性を調べた結果、組み換え gB、gH タンパク質には反応しなかった。したがって、反応特異性は gB、gH とは異なる可能性が考えられるが、その分析は現在継続中である。UL11、UL118-119 に対しては、まずこれらの領域の DNA をクローニングした。そして、KM マウスを DNA で免疫し、抗体の産生を誘起させている。この実験は現在継続中である。

HCMV 陽性者の白血球から Fab 抗体ライブラリーを作製し、ファージディスプレイ法で抗 HCMV 抗体のスクリーニングを行った。その結果、gB および gH を認識する Fab 抗体の分離に成功した。なお、KM マウスの免疫は井原が、UL11 と UL118-119 のクローニングと免疫用抗原の調製は錫谷が、ファージディスプレイ法での抗体作製に関しては竹腰がそれぞれの報告書で詳述する。

熱帯熱マラリア原虫では、SE36、MSP-1、ABRA 等の蛋白質に対する抗体が赤血球内での虫体増殖を阻止できることが知られている。そこで、これらの因子に対する抗体の作製を患者の末梢リンパ球を材料としたファージディスプレイ法と、ヒト抗体産生マウス（Xeno マウス）を原虫タンパク質で免疫する方法で進め、抗体遺伝子を分離した。赤痢アメーバに対する中和抗体も同じ方法で分離した。これらに関しては、橘が報告する。

A. 研究目的

抗体医薬は、疾病を誘発する原因物質に特異的に結合して機能を失活させ、その結果、治療効果が発揮される。現在認可・販売されているヒト抗体医薬は世界で 10 種類ある。うちわけは、キメラ抗体（マウス抗体の Fv 領域とヒト抗体を融合したもの。ヒト抗体領域は全体の 66%）が 4 種、ヒト化抗体（マウス抗体の CDR 領域を切り出し、ヒト抗体の CDR 領域に組み込んだもの。同 90%）が 5 種である。また最近になり、抗 TNF α 完全ヒト抗体 1 種が認可を受けた。キメラ抗体とヒト化抗体にはマウス配列が含まれるが、ヒト抗マウス抗体が生ずる可能性は潜在的に存在すると思われる。次世代の抗体医薬は完全ヒト抗体が中心となるであろう。この観点に立って、我々は完全ヒト抗体の作製を目指している。

人工ヒト抗体の作製は、①目的抗体を高力価で産生するヒトの血液を材料にして目的抗体遺伝子をクローニングする方法、②ヒト染色体を持ち免疫でヒト抗体を作るマウスの利用等いくつかの方法がある。井原らは、②法のヒト染色体を持ち免疫でヒト抗体を作るマウスを利用して、抗 HCMV 抗体の作製も追求している。

HCMV 感染症は臓器移植やエイズ患者のような 極度の免疫不全状態で日和見感染症として発症し、致命的な経過をたどる。また、新生児では 300 人に一人、毎年 4000 人が母親から垂直感染しており、そのうちの 10% に中枢神経系の障害が進行し、後に聴覚障害や精神発達遅延をきたす。本研究は、HCMV の増殖に必須な蛋白質と強く結合し、

その増殖を阻害する完全ヒト抗体の開発を目的としており、抗体医薬による HCMV 感染症の克服が期待できる。また、HCMV の遺伝子産物のなかにはヒトの免疫系を攪乱し、かつ免疫系に感知されない物質があるが、この問題に対応するための新たな取り組みにも着手している。それは KM マウスを使用して抗体を作ることであり、そのためには DNA 免疫の手法も応用する。この研究が進展すれば、HCMV 感染症に、新たな抗体治療法をもたらすことが期待される。

B. 研究方法

KM マウス

6~10 週齢の KM マウス（キリンビールより提供を受けた）を使用した。

免疫抗原

精製した HCMV 粒子、および HCMV 感染細胞を免疫抗原とする。また、gB (AD169 株由来)、gH (Towne, AD169 の両株由来)、UL11 と UL118-119 (両方とも AD169 株由来) に関して DNA による免疫を行った。

- ① HCMV Towne 株 精製ウイルス粒子。
ヒト胎児肺細胞 (HEL) に HCMV Towne 株を moi 0.05 で感染し、Eagle MEM 2% FCS で置き換えた後に、5% CO₂ 培養器、37°C で培養を続ける。CPE が全面に広がった時点から 2 日目で培養上清を採取し、HCMV を蔗糖密度勾配遠心で精製する。この精製ウイルスで、KM マウスを免疫する。
- ② HEL に HCMV Towne 株を moi 10 で感染し、感染 7 日目に細胞を採取し、PBS に懸濁する。その後、超音波破碎機で細胞を処理し、これを免疫抗原とした。
- ③ gB, gH, UL11 および UL118-119 遺伝

子は完全遺伝子および膜貫通領域を欠損させたかたちにした後に pBud CE4 発現ベクターにクローニングした（この部分は錫谷が詳報する）。

免疫

抗原を Freund complete adjuvant と混合し、KM マウスの両肩に各 100 μ l、計 200 μ l、抗原量はウイルス粒子で 40 μ g/匹、感染細胞が 100 μ g/匹、2 週間に 1 回の間隔で免疫した。抗体価の測定は、免疫後 7~10 日後に採血し行った。抗体価が十分上昇したマウスは、最後の免疫として抗原のみで免疫し、最終免疫後 4~7 日後に sacrifice し、細胞融合に使用した。

DNA 免疫は、KM マウスの後肢に DNA 液 20~50 μ l (20~50 μ g)、2 週間に 1 回の間隔で注入し、electroporation で細胞内に浸透させた。抗体価の測定は、免疫後 10 日後に採血し行った。

抗体価の測定

採血した血液から血清を分取し、抗 HCMV 抗体価の上昇を ELISA 法で計測した。抗原としては、(1) HEL 非感染細胞抽出液、(2) HCMV 感染細胞抽出液、(3) 合成オリゴペプチド（中和エピトープとして同定されている領域；Towne 株 gB 64-84 アミノ酸(aas), 560-589aas, 600-630aas, また Towne 株および AD169 株の gH 28-48aas) を ELISA プレートに 1 μ g 塗布し使用した。

ハイブリドーマ細胞の作製

抗体価の上昇が確認された段階で、マウスから脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8.653 細胞と細胞融合しハイブリドーマ細胞を作製した。その他の培養条件とスクリーニングは常法に従って行った。スクリーニングの時は DMEM 15% FCS で培養を行い、モノクローナル細胞にしたあと

は、一部は無血清培地を使用した。

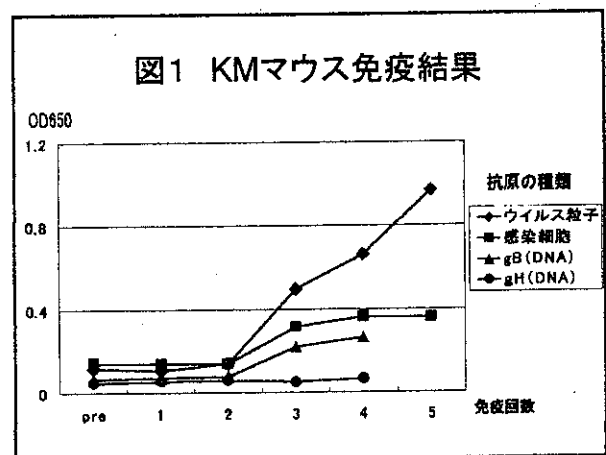
(倫理面への配慮)

血液提供者には人権に十分配慮し、研究内容を説明し、同意と承認を書面で得ている。本研究は、東海大学医学部倫理委員会の承認を得た。また部外者の委員による調査でも、「可」の判定を受けた。動物実験は、東海大学動物実験委員会の指針に基づいて実験計画書を提出し承認を得、また、動物の扱いは動物愛護の精神を理解し行っている。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守している。

C. 研究結果

抗 HCMV 抗体価の上昇

KM マウス 5 匹を 1 群として精製 HCMV あるいは HCMV 感染細胞で免疫した。抗 HCMV 抗体価の上昇を測定した結果、3 回目の免疫以後に 5 匹全てで抗体価の上昇がみられた。ウイルス粒子で免疫したマウスは 2 匹が免疫途中で死亡、感染細胞で免疫したマウスは 1 匹が死亡した。抗体価の上昇に関して代表例を図 1 に示す。



抗体価が十分に上昇したマウスは順次 sacrifice し、脾臓を摘出して常法に従いマウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8.653 と細

胞融合しハイブリドーマ細胞を作製した。融合した細胞は 1 穴あたり $2\sim 3 \times 10^5$ 細胞をまいた。ウイルス粒子由来の細胞早く 700 穴、感染細胞由来は 900 穴にまいた。その結果、全ての穴で 5~10 個の細胞コロニーが出現した。次にその上清をハーベストし、HCMV 感染細胞の抽出液を抗原にして ELISA を行った。抗 HCMV 陽性穴は以下の通りであった。

ウイルス粒子 700 穴 陽性穴 67
 感染細胞 900 穴 陽性穴 127

抗 HCMV 抗体陽性穴のうち ELISA 値の高いものをウイルス粒子細胞から 10 クローン、感染細胞由来から 10 クローンを選び、培養上清中の中和活性能を測定した。その結果、前者は 3 クローンが、後者は 1 クローンに中和活性が認められた。これらのクローンは、モノクローナル細胞を得るために limiting dilution をおこない、それぞれから目的とするモノクローナルハイブリドーマ細胞を得た。抗体のサブクラスは、IgM が 3 株、IgG が 1 株である。

ウイルス中和実験

次に、抗体の中和活性について分析した。分離した抗体クローンのうち 1 株 (IgM 抗体) の中和活性の有無および強さを Towne 株および AD169 株を使用して測定した (表 1)。

表 1. IgM 抗体の抗 HCMV 中和活性

(a) Towne 株

| 抗体濃度 | 非中和 プラーク数 | 抗体反応後の プラーク数 | プラーク 阻害率 (%) |
|---------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 10 μ g/ml | 106 | 4 | 96 |
| 1 μ g/ml | | 48 | 55 |

(b) AD169 株

| 抗体濃度 | 非中和 プラーク数 | 抗体反応後の プラーク数 | プラーク 阻害率 (%) |
|---------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 10 μ g/ml | 343 | 165 | 52 |
| 1 μ g/ml | | 302 | 12 |

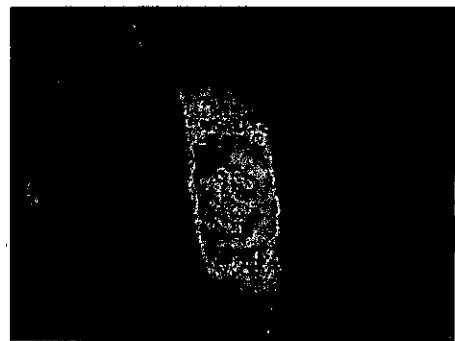
* プラークの数は 2 枚のプレートの平均値

表 1 に示したとおり、この抗体クローンは Towne 株をよく中和する。同時に AD169 株に対しても中和活性を有するが、Towne 株に比べて弱かった。他の 2 株も Towne 株を中和する。AD169 株に対する中和活性は現在検討中である。中和実験は数回繰り返しており、中和活性があることは確実である。

抗体の特異性

各抗体クローンの対 HCMV 特異性を蛍光抗体染色法で検討した。この検討には、HCMV Towne 株、および AD169 株を感染した細胞を準備し、培養上清を使用して行った。まず、非感染胎児肺細胞に反応させたが、3 クローンとも反応しなかった。それに対し、Towne 株および AD169 株感染細胞には反応し、図 2 に示す様に核外に特異的な蛍光を観察した。この反応は両ウイルス株で観察できた。つまり両株に共通な抗原を認識していることになる。

図 2. HCMV 感染細胞の蛍光抗体法による染色



また、図 2 に示した細胞は感染 3 日目のものであるが、感染 24 時間の細胞でも蛍光は観察できる。これらは感染後期となる。蛍光像は核外あるいは細胞膜付近が染色されているが、この染色像からも抗体が認識するタン

パク質は感染後期に発現するものと推測できる。次に、抗体が認識する HCMV タンパク質の同定を試みた。まず ELISA での検討をおこなった。その結果、非感染細胞には反応せず、Towne 株および AD169 株の感染 7 日目の抽出物とは明瞭に反応した。反応の強度は両株とも同程度である。しかし、[B. 研究方法] に記載した gB, gH 関連合成オリゴペプチドのいずれとも反応しなかった。この結果は、分離した抗体クローンは gB あるいは gH とは異なるタンパク質に特異性を持つ可能性を示しているが、しかし、この点に関してはさらなる分析が必要と考える。Westen blot 分析でも特異的に反応するタンパク質バンドは確認できなかった。

DNA 免疫

gB, gH, UL11, UL118-119 DNA で KM マウスを免疫している。8 回免疫した段階で、gB DNA で免疫したマウスのうち 1 匹でやや抗体価の上昇が見られるが、他のマウスでは抗体価の上昇は見られず、この方法は今後何らかの工夫をしなければならないと考えられる。

D. 考察

HCMV のウイルス粒子および感染細胞で KM マウスを免疫し抗 HCMV 抗体を誘導した。このマウスの脾臓細胞を材料にしてハイブリドーマ細胞を作製したが、その中から、スクリーニングにより中和抗体産生株の分離をおこなった。スクリーニングでは約 200 穴で HCMV に特異性を持つ抗体の産生が確認できたが、そのうち、現在まで 15 クローンの分析を行い、7 クローンに中和活性が確認された。残りのクローンに関しても今後順次分析を続ける予定でいる。現在までに 3 ク

ローンでプラークアッセイによる中和実験を行い、いずれも中和活性が確認されている。さらに、ELISA による分析、蛍光抗体法による分析を行った。本報告書では、その中の 1 クローンの分析結果を示した。DNA sequencing の結果、および抗体タンパク質の結果から我々が分離した抗体はヒト抗体である。

HCMV では中和エпитープは gB と gH タンパク質の 2 種にあり、約 10 アミノ酸からなる特定の領域も同定されている。しかし、我々が分離した抗体はこれらの中和エпитープとは反応しなかった。また、Westen blot 分析でも特定のタンパク質との反応は確認できなかった。

これに関してはいくつかの作業仮説が考えられる。

1. 分離した抗体は linear な蛋白質は認識できず、conformational な蛋白質と反応する。
2. KM マウスはヒトの MHC とは異なるため、従来知られている中和エピトープのみからなるオリゴペプチドで免疫しても、できてきた抗体はこのうちの一部しか認識せず、かつ中和活性が認められないという結果を得ている。この事実から考えると、今回得られた中和クローンは、gB あるいは gH の中和エピトープの近くのアミノ酸配列を認識している可能性があり、この場合 IgM 抗体は 5~6 量体を形成して巨大分子となり、その結果中和エピトープ部分をおおってしまう可能性が考えられる。この結果、中和活性が発揮される可能性があるとも考えられる。
3. この中和クローン細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で抗体遺伝子の Fab 領域をクローニングした。このプラスミッ

ドを大腸菌に導入して Fab 抗体を誘導したが、案に相違してこれには HCMV 感染細胞に対する反応性は見られなかった。クローニングした DNA 断片は PCR で増幅したものであるが、PCR ではしばしば変異が導入され停止コドンの生ずることを我々は経験している。現在 DNA sequencing を実施しているところである。他の考え方として、avidity の可能性があげられる。IgM は上記通り巨大分子を形成し、その結果、単一分子の 2 万倍もの活性を示すことがあるとされる。Fab で反応性を確認できなかったのは一量体であるからとすれば、上記の結果は解釈できる。

これらの問題点に関しては今後順次検討を加えていく。

今回、KM マウスを利用して、HCMV を中和するヒト抗体の作製に成功したが、抗体医薬の作製への第一歩を踏み出したと認識している。今後はより強い中和活性を持ち、臨床の現場で使用する抗体の作製を目指していく。

E. 結論

KM マウスを HCMV Towne 株のウイルス粒子および感染細胞で免疫しハイブリドーマ細胞を作製した。この中から、100 クローンを越す HCMV に特異的な抗体クローンを分離し、その中の約 15 クローンを分析した結果、HCMV を中和する活性を有するヒト IgM 抗体 2 クローン、IgG 抗体 1 クローンを分離した。これ以外に、予備実験で中和活性が確認された 4 クローンの IgM 産生細胞がある。これらの中和活性は、Towne 株に対しては強く、AD169 株に対しては弱かった。これらの抗体が認識するタンパク質の同定は

まだできていない。

以上、HCMV 感染症に対する抗体医薬の開発に第一歩を踏み出せたと考えている。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Zhou YH, Takekoshi M, Maeda F, Ihara S, Esumi M. Antiviral activity of gakkaihappyou recombinant antibody Fab against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 2002 56(1):51.

Nagatsuka Y, Hara-Yokoyama M, Kasama T, Takekoshi M, Maeda F, Ihara S, Fujiwara S, Ohshima E, Ishii K, Kobayashi T, Shimizu K and Hirabayashi Y. Carbohydrate-dependent signaling from the phosphatidylglucoside-based microdomain induces granulocytic differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* in press 2003.

井原征治 抗体医薬によるウイルス感染症の予防と治療 BO(バイオベンチャー) 2 巻 4 号

75-80 2002

井原征治、城戸勲、前田史子、坂本朋昭、竹腰正隆
ウイルス表面抗原に対する人工ヒト抗体の作製 人工血液 10 巻・4 号, 116-119, 2002

2. 学会発表

1. 竹腰 正隆、前田 史子、坂本 朋昭、井原 征治 ヒト健常人からのヒ

トサイトメガロウイルスに対する中和抗体の
分離 第17回ヘルペスウイルス研究会
新宿 2002 6/14

2. 井原 征治、竹腰 正隆 HBV, HCMV
に対するヒト中和抗体の作製 第9回日
本血液代替物学会年次大会 シンポジウム
熊本 2002 9/4-5

3. Yasuko Nagatsuka, Miki Hara-
Yokoyama, Takeshi Kasama, Masataka
Takekoshi, Fumiko Maeda, Seiji Ihara,
Shigeyoshi Fujiwara, Kazufumi Shimizu
and Yoshio Hirabayashi Roles of a
novel lipid, phosphatidylglucose in
membrane signaling: Stimulation of
phosphatidylglucose with recombinant
monovalent Fab antibody GL-7 induces
tyrosine phosphorylation and
differentiation in HL60 cells. 43rd.

International Conference on the

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Bioscience of Lipids Graz, Austria,
2002 9/11-14

4. 長塚 靖子、横山 三紀、笠間 健嗣、
竹腰 正隆、前田 史子、井原 征
治、藤原 成悦、清水 一史、平林 義雄 新
しいホスフォグリセロリピド、ホス
ファチジルグルコース(PG)による膜ドメイ
ン形成とシグナリング: 組み換え1価抗
PG Fab 抗体刺激によるHL60細胞のCD38
の発現誘導とcMycの抑制 第75回日本生
化学学会大会 京都 2002 10/14-17

5. 竹腰 正隆、前田 史子、井原 征治 ヒ
トサイトメガロウイルス中和ヒト
抗体の作製 第50回日本ウイルス学会学術
集会 札幌 2002 10/16-18

サイトメガロウイルス抗体療法に関する基礎研究

分担研究者 錫谷 達夫 福島県立医科大学 医学部 微生物学講座・教授

研究要旨

サイトメガロウイルスは健康成人に広く感染（70~80%）しているウイルスで、一般には人に疾患を起こすことはない。しかし、日和見感染症の主たる原因ウイルスとして、また300の出生に1人の割合で垂直感染することから、治療法の開発が待ち望まれているウイルスである。我々はこのウイルス感染症に対する抗体療法を開発することを目的に、その基礎研究を行った。サイトメガロウイルスの抗体療法を開発するうえで問題となる点として、1) 中和抗体のターゲットである糖蛋白B (glycoprotein B; gB)、糖蛋白H (gH) にはそれぞれ4種、2種の血清型があること、2) サイトメガロウイルスは抗体の作用を弱める2種のFc receptorを感染細胞の膜やウイルス粒子上に発現していることが考えられた。そこで、異なる血清型に対応できるようgB、gH遺伝子それぞれ2種を真核細胞発現系、Baculovirus発現系に組み込んだ。Fc receptor対策として、この機能を抑制するような抗体をヒトは産生できないので、動物で抗体産生を行う必要がある。そこで、2種のFc receptor遺伝子を真核細胞発現系、Baculovirus発現系に組み込み、動物の免疫を行っている。これらの動物のリンパ球を用い、モノクローナル抗体の作製を行う予定である。

A. 研究目的

ヘルペスウイルスの1種、ヒトサイトメガロウイルス (Human cytomegalovirus) は約70~80%の日本人成人に感染しているが、一般には何も疾患を引き起こさない病原性の低いウイルスである。しかし、免疫能が極度に低下した臓器移植患者やAIDS患者では致死的な日和見感染症を起こす。また、300の出生に1人の割合で垂直感染（胎児感染）が起こり（先天性サイトメガロウイルス感染症）、その10%の症例では奇形や聴覚障害を発症することから、今後解決すべき主要な感染症の1つと考えられている。これらの疾患の治療薬としてサイトメガロウイルスの増殖を抑制する

薬剤・ガンシクロビルが臨床で用いられているが、副作用が強く、長期投与した場合には骨髄抑制や耐性ウイルスの出現など多くの問題が生じている。こういった問題を起こさない安全な治療法の開発が待ち望まれているが、抗体療法は最も有力な候補と考えられる。

サイトメガロウイルスの抗体療法を開発するうえで解決すべき問題点として、1) 中和抗体の主要なターゲットであるウイルスの糖蛋白B (glycoprotein B; gB)、糖蛋白H (gH) に血清型ともいふべき多様性が存在し、1つの株に対する抗体が全ての株に有効とは限らないこと、2) サイトメガロウイルスは複数のFc receptorをウイルス粒子上や感染細胞

膜上に発現し、ウイルス抗原に結合した抗体の Fc をブロックすることによって補体の活性化や ADCC による細胞障害から逃れる。つまり、たとえ抗体が存在しても、その作用が充分発揮されない点が挙げられる。そこで本研究では、基礎研究からこれらの問題点の解決法を明らかにし、有効なヒト型抗体を作製することを目的とした。

B. 研究方法

1. ウイルス株：

サイトメガロウイルス業室株として AD-169 株、Town 株、Davis 株および当講座で分離した臨床分離株を用いた。

2. 遺伝子の解析とクローニング gB、gH 遺伝子を PCR 法で増幅し、これをテンプレートとして塩基配列を解析した。また、細胞外ドメイン部分の遺伝子を PCR 法で増幅したのち、その遺伝子を真核細胞発現プラスミド pBudCE4 にクローニングした。さらに、この遺伝子を pFAST Bac にクローニングしなおし、Bac to Bac システムを用いて Baculovirus の発現系に組み込んだ。
昨年、米国とドイツのグループによりサイトメガロウイルスの TRL11 と UL119-118 遺伝子が異なる性質を持つ Fc receptor をコードしていることが報告された。そこで、この receptor の細胞外ドメインの部分 TRL11 遺伝子については PCR 法で、UL119-118 遺伝子については RT-PCR 法で増幅後、gB、gH と同じ方法で真核細胞発現プラスミド pBudCE4 と Baculovirus 発現系に組み込んだ。

C. 研究結果と考察

1. gB 遺伝子の多形性：

これまで、gB には4種の subgroup があり、これらがそれぞれ違う抗原性を持つ可能性があることが報告されていた。そこで、実際に日本人に感染しているサイトメガロウイルスにも同様の多形性があるか否かを10株の臨床分離株について調べた。その結果 調べた中では4つのタイプのうち2つのもののみ (Type 1 と 2) が検出された。

- 1) いくつかのサンプルでは多形性のある部分のシーケンスが読めなかった。前者の結果は、多くの日本人に感染しているサイトメガロウイルスの gB 血清型は、欧米同様、type 1 と type 2 が主であり、type 3 と type 4 は頻度が低いことを示す。まだ解析数が少なく、今後更に多くの株を解析することが必要であるが、主たる2タイプに対する抗体でかなりの症例は治療できるものと考えられた。世界で広く研究に使われている AD-169 株と Town 株がそれぞれ type 1 と type 2 であることから、これらの株から gB 遺伝子をクローニングし、タンパクを発現することとした。
後者の結果は、複数の type が混合感染しているため、シーケンスが読めない可能性を示唆するものである。1度の感染で複数株に感染するのか、1つの株に感染しているヒトが後に別の株に再感染するのかは不明であるが、サイトメガロウイルスに対する免疫が感染をどの様に予防するのかを考える上で重要な問題であると思われる。今後、分離株から subclone を分離培養し、実際に複数の株が混合感染しているのか否かを明らかにしてゆきたい。

2. gB、gH、TRL11、UL119-118 遺伝子のクローニング：gB、gH 遺伝子それぞれを、抗原性が違うと考えられている AD-169 株、Town 株より transmembrane 領域を欠損させた形で真核細胞発現用 plasmid pBudCE4 と Baculovirus 発現系にクローニングした。同様に、AD-169 株の TRL11 遺伝子は PCR 法で、UL119-118 遺伝子は RT-PCR 法で、transmembrane 領域を欠損させた形で pBudCE4 と baculovirus pBudCE4 にクローニングして得た plasmid を 4 種のヒト培養細胞株に transfection し、Zeocine 耐性をマーカーに細胞株を樹立した。しかし、培養した培地中や細胞中にサイトメガロウイルスのものとと思われる糖蛋白は認められず、動物を免疫するための抗原を調製することは出来なかった。そこで、上記の plasmid そのものを使って、東海大学・井原らのグループで DNA ワクチンとしてマウスの免疫を行っているところである。Baculovirus 発現系については、目的遺伝子に組換わった baculovirus を分離することが出来たので、タンパク発現について解析中である。

D. 結論

日本人から分離されるサイトメガロウイルス gB の多形性のパターンは欧米でのデータとほぼ同一であった。抗体療法を確立するためには、gB をターゲットとする場合は 4 種、gH をターゲットとする場合は 2 種の抗体を作製し、混合して用いる必要性がありそうである。Fc receptor は抗体の作用を弱めるの

でこの機能を抑制するような抗体が作製できれば抗体療法をより有効に出来ると予想される。このような抗体はヒトでは出来ないので、マウス等、種の違う動物で作る必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

【原著】

Saijo M, Suzutani T, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Importance of C-terminus of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for maintaining thymidine kinase and acyclovir-phosphorylation activities. *J. Med. Virol.* **66**: 388-393 (2002)

Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Bone marrow transplantation in a child with Wiscott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV^r) herpes simplex virus type 1: Emergence of foscarnet resistant virus originating from the ACV^r virus. *J. Med. Virol.* **68**: 99-104 (2002)

Saijo M, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Morikawa S, Kurane I. Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain. *Antiviral. Res.* **56**: 253-262 (2002)

Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Azuma M, Knox YM. Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother. Res.* In press.

Suzutani T, Ishioka K, De Clercq E, Ishibashi K, Kaneko H, Kira T, Hashimoto K, Ogasawara M, Ohtani K, Wakamiya N, Saijo M. Differential mutation patterns in the thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* In press.

【総説】

錫谷 達夫. インフルエンザ治療薬. *Medical Science Digest* **28**: 126-127 (2002)

錫谷 達夫. アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス感染症. *日本性感染症学会誌* **13**: 34-39 (2002)

錫谷 達夫. 単純ヘルペスウイルス感染症にワクチンは必要か? *東北のコロニー* 印刷中

2. 学会発表

横出伸一、横沢紀子、岡林環樹、錫谷達夫、

三浦俊祐、神保孝一、藤井暢弘. 単純ヘルペスウイルス1型感染によるインターフェロン細胞内情報伝達系抑制. 第50回日本ウイルス学会学術集会 札幌 (2002)

錫谷達夫、西條政幸、石岡 賢、石橋 啓、金子久俊、森 修一、大橋一孝、吉良俊彦. アシクロビル、ペンシクロビルは単純ヘルペスウイルスの突然変異を誘導するか? 第50回日本ウイルス学会学術集会 札幌 (2002)

金子久俊、森 修一、茂田士郎、錫谷達夫、大神一浩、大野重昭、青木功喜. コットンラットによるアデノウイルス眼感染モデルの作製. 第50回日本ウイルス学会学術集会 札幌 (2002)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

抗体遺伝子のクローニングと解析

分担研究者 竹腰 正隆・東海大学医学部・講師

研究要旨 HCMV 抗体陽性者の末梢血よりリンパ球を分離して培養を行った。細胞より抗体遺伝子を分離し 3 種類の抗体遺伝子ライブラリーを作製した。スクリーニングによって中和抗体産生クローンを分離した。大腸菌で作製した抗体は中和活性を示した。また植物を用いたホール抗体の産生にも成功した。得られた抗体は親株である B 細胞産生抗体と比較しても差異が認められなかった。

A. 研究目的

大きく分けて 2 つの項目からなる。1 つは HCMV 中和抗体陽性者より得られたリンパ球より抗体遺伝子を分離し、大腸菌での中和抗体の産生を目的とする。スクリーニングは主として ELISA で評価し、最終的には HCMV と細胞を用いた中和実験で評価を行う。

もう 1 つは、抗体の生産が現時点では動物培養細胞を利用して行われているが、この方法の欠点として大量生産できないこと、また培養に用いた牛血清由来成分からの BSE 等の感染症の恐れがあることである。そこでこれらの欠点を回避できる植物での抗体生産を抗 HBs 抗体をモデルとして試みるものである。

B. 研究方法

1. HCMV 中和抗体陽性者より末梢血 10mL を採血し、リンパ球を分離する。これにエプスタイン・バーウイルス(EBV)を感染させ、培養を行う。培養を維持しながら、上清について HCMV 感染細胞抽出液を用いて ELISA を行い、陽性群については中和エピトープ領域をオリゴペプチドとして合成した物についてさらに ELISA を行う。これで

陽性を示したものについては、細胞よりトータル RNA を抽出し RT-PCR により抗体遺伝子を増幅する。遺伝子を抗体遺伝子発現用ベクター Fab1-His2 にクローニングしてライブラリーを作製する。ライブラリーを大腸菌に導入し、個々のクローンについて ELISA を用いてスクリーニングを行う。ELISA 陽性群については中和活性を測定する。中和抗体遺伝子についてはシーケンシングを行い抗体遺伝子の解析を行う。

2. 抗 HBs IgG 抗体遺伝子のプロモーター領域およびシグナルペプチド領域そしてターミネーター領域を植物のものに変えたものを構築する。アグロバクテリウムを介してタバコ培養細胞 BY-2 に導入する。タバコ細胞をカルス培養し、培地中および細胞内の抗 HBs 抗体についてその親抗体 (培養細胞産生 CL4 抗体) との比較検討を行う。

(倫理面への配慮)

血液提供者には人権に十分配慮し、研究内容を説明し、同意と承認を書面で得ている。本研究を説明し、同意と承認を書面で得ている。本研究は、東海大学医学部倫理委員会の承認を得た。また部外者の委員による調査でも、「可」の判定を受けた。動物実験は、東海大

学動物実験委員会の指針に基づいて実験計画書を提出し承認を得、また、動物の扱いは動物愛護の精神を理解し行っている。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守している。

C. 研究結果

1. HCMV 中和抗体

HCMV 抗体陽性者より3種の抗体遺伝子ライブラリー、TG, KM, MT を作製した。TG ライブラリーのクローンは中和エピトープのうち gB に強く反応する傾向を見せた。KM ライブラリーのクローンは逆に gH に強く反応する傾向を見せた。MT ライブラリーのクローンはその中間の傾向であった。いずれのライブラリーからも中和活性を示すクローンが分離でき総数は15種程度であった。プラークアッセイの結果、プラーク数を半減させるのに必要な抗体濃度は1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度であった。またシークエンシングの結果、得られたクローンはすべて独立したクローンであることが判明した。

2. 植物での抗体産生

抗体遺伝子を導入したタバコを得ることができた。カルス培養を行い、培地溶液にも細胞にも抗 HBs 抗体が確認された。1Lのカルス培養(1週間)から培養液中には約0.3mg、カルス細胞からは約0.1mgのIgGが精製された。これらの抗体を親株である培養細胞産生 CL4 抗体と比較を行った。ELISA、抗体のアフィニティー、FACS を用いた HBs 産生細胞との反応性、および培 HBs 産生細胞におけるキリング効果を用いた比較において、親株抗体と同等の反応を示した。

D. 考察

HCMV 抗体陽性者の末梢血より HCMV

中和抗体遺伝子をクローニングするという手法はうまく働くことが分かった。抗体遺伝子の解析から他種類の抗体が取れたことが判明した。今後はそのエピトープのファインマッピングが必要とされる。他種類抗体が取れるということは中和抗体のカクテルを作るのに有利である。一方、もっと中和抗体価の高いクローンを取ることも必要である。

また植物(カルス)でのホール抗体の産生は問題なくできることが判明した。特に培養液中に放出される抗体の回収精製は非常に簡便であるので、今後はさらに培地中への抗体の放出を積極的に推進する研究をすすめたい。また植物においてはFc領域への糖鎖の付加の形式が異なると言われているので、この点も改良を行いたい。

E. 結論

HCMV 抗体陽性者の末梢血より HCMV 中和抗体を遺伝子の形で取り出す事に成功した。今後はさらに実施例を増やしてより抗体価の強いクローンの分離につとめる。また多様な抗体を得ることによって、各種臨床分離株を中和できる抗体カクテルの作製につとめたい。また植物によるモデル抗体の作製がうまくいったことから、HCMV 中和抗体の植物での産生を検討したい。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Zhou YH, Takekoshi M, Maeda F, Ihara S, Esumi M. Antiviral activity of recombinant antibody Fab against the hypervariable region 1 of hepatitis C

virus. Antiviral Res. 56(1):51-59
2002.

Nagatsuka Y, Hara-Yokoyama M, Kasama T, Takekoshi M, Maeda F, Ihara S, Fujiwara S, Ohshima E, Ishii K, Kobayashi T, Shimizu K and Hirabayashi Y. Carbohydrate-dependent signaling from the phosphatidylglucoside-based microdomain induces granulocytic differentiation of HL60 cells. Proc Natl Acad Sci USA in press 2003.

2. 学会発表

矢野 明、竹腰 正隆、花田 信弘 タバコ培養細胞を用いた抗体産生 日本植物生理学会 2002年度年会 岡山 2002 3/30

竹腰 正隆、前田 史子、坂本 朋昭、井原 征治 ヒト健常人からのヒトサイトメガロウイルスに対する中和抗体の分離 第 17 回ヘルペスウイルス研究会 新宿 2002 6/14

矢野 明、前田 史子、竹腰 正隆 タバコ培養細胞を用いたヒト抗体生産 第 20 回日本植物分子生物学会大会 奈良 2002 7/30

井原 征治、竹腰 正隆 HBV, HCMV に対するヒト中和抗体の作製 第 9 回日本血液代替物学会年次大会 シンポジウム 熊本 2002 9/4-5

Yasuko Nagatsuka, Miki Hara-Yokoyama, Takeshi Kasama, Masataka Takekoshi, Fumiko Maeda, Seiji Ihara, Shigeyoshi Fujiwara, Kazufumi Shimizu

and Yoshio Hirabayashi Roles of a novel lipid, phosphatidylglucose in membrane signaling: Stimulation of phosphatidylglucose with recombinant monovalent Fab antibody GL-7 induces tyrosine phosphorylation and differentiation in HL60 cells. 43rd. International Conference on the Bioscience of Lipids Graz, Austria, 2002 9/11-14

長塚 靖子、横山 三紀、笠間 健嗣、竹腰 正隆、前田 史子、井原 征治、藤原 成悦、清水 一史、平林 義雄 新しいホスホグリセロリピド、ホスファチジルグルコース (PG) による膜ドメイン形成とシグナリング: 組み換え 1 価抗 PG Fab 抗体刺激による HL60 細胞の CD38 の発現誘導と cMyc の抑制 第 75 回日本生化学学会大会 京都 2002 10/14-17

竹腰 正隆、前田 史子、井原 征治 ヒトサイトメガロウイルス中和ヒト抗体の作製 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2002 10/16-18

戸田 美賀子、村井 篤嗣、竹腰 正隆、村松 達夫 SCID マウスにおける抗 B 型肝炎ウイルスモノクローナル抗体遺伝子の血液中への発現 第 25 回日本分子生物学会年会 横浜 2002 12/14

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)
分担研究報告書

寄生原虫症の予防と治療への応用をめざした人工ヒト免疫グロブリンの開発

分担研究者 橋 裕司 東海大学医学部 助教授

研究要旨 寄生原虫症の予防や治療に応用できるようなヒトモノクローナル抗体の作製を試みるとともに、抗体遺伝子の解析を行った。アメーバ性肝膿瘍患者と無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者のリンパ球に由来し、接着中和活性のある抗赤痢アメーバヒト抗体は、Gal/GalNAc レクチン heavy subunit のシステインリッチドメインを認識することが明らかになった。このような抗体を構成する 7 種類の H 鎖遺伝子は、V 領域がすべて VH3 ファミリーに属し、一方、15 種類の L 鎖遺伝子は V 領域がすべて V κ 1 ファミリーに属することが判明した。さらに、Gal/GalNAc レクチン intermediate subunit に対する抗体も作製するため、組換え型の抗原を調製した。また、熱帯熱マラリア患者の末梢リンパ球から作製した抗体遺伝子ライブラリーについて、3 種類の組換え型熱帯熱マラリア原虫抗原と粗抽出原虫抗原を用い、約 1.1×10^6 クローンのスクリーニングを行った。間接蛍光抗体法による 2 次スクリーニングにおいて 7 クローンが陽性であったが、他種虫体やヒト由来細胞にも交差反応が認められた。

A. 研究目的

細胞融合法によって作製されたマウスモノクローナル抗体は、病原微生物の抗原解析や感染症の診断に大きな役割を果たし、さらにモデル動物では受動免疫によって感染を阻止できることが報告されている。赤痢アメーバにおいても、虫体表面のガラクトース (Gal)・N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 特異的レクチンが宿主細胞への接着に重要な役割を果たしており、それに対するマウスモノクローナル抗体は肝膿瘍形成を阻止できる。しかし、マウス抗体はヒトにとって異種抗体であり、治療や予防のために投与することはできない。可変領域や超可変領域だけをマウス由来とするキメラ抗体やヒト化抗体においても、マウスのアミノ酸配列

が含まれているために繰り返しての使用は難しい。本分担研究は、特に寄生原虫症の治療や予防に応用できる純粋なヒトモノクローナル抗体を作製することを目的としている。

今年度は、これまでに作製したアメーバ性肝膿瘍患者と無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者由来の抗体クローンについて、そのエpiteープの局在を明らかにするとともに、抗体遺伝子の解析を行い、寄生虫感染における抗体産生の特性を明らかにする。さらに、別の中和エpiteープを含む抗原蛋白質の調製を行う。また、新たに作製した抗体遺伝子ライブラリーと組換え型熱帯熱マラリア原虫抗原を用い、抗マラリア原虫抗体の作製をめざす。

B. 研究方法

アメーバ性肝臓瘍患者と無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者に由来する抗 260-kDa Gal/GalNAc レクチン抗体遺伝子を含むプラスミド (pFabI-HisII) を大腸菌に導入し、Fab 抗体を産生させた。Heavy subunit のシステインリッチドメイン sLecA(TL)と糖鎖認識部位 (CRD) を含む組換え蛋白質をそれぞれニトロセルロース膜にプロットし、抗体の反応性をドットプロット法で調べた。これらの組換え蛋白質はバージニア大学の Dr. Petri より供与されたものを使用した。

抗レクチン抗体の H 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子をそれぞれクローニングベクター CV-1、CV-2 にサブクローニングし、塩基配列を決定した。塩基配列データを NCBI の IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), [international](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) ImMunoGeneTics database の V-QUEST (<http://imgt.cines.fr.8104/textes/vquest/>)を用いて解析した。

最近クローニングした赤痢アメーバ 150-kDa Gal/GalNAc レクチン (intermediate subunit) の遺伝子を発現ベクター pET19b に組み込み、大腸菌に導入した。IPTG で発現を誘導し、組換え蛋白質を調製した。マウスモノクローナル抗体との反応性をドットプロット法で調べた。

熱帯熱マラリア原虫の SE36 で免疫されたヒトの末梢リンパ球を分離し、RNA を精製した。ヒト抗体遺伝子用のプライマーセットを用いて、H 鎖 Fd 領域と L 鎖をコードする遺伝子を RT-PCR で増幅した。これらの遺伝子断片を発現ベクター pFabI-His2 に組み込んで大腸菌に導入し、抗体遺伝子ライブラリーを作製した。このライブラリーと昨年度作製した熱帯熱マラリア患者由来の抗体遺伝子ライブラリーについて、SE36、MSP-1、acidic basic repeat antigen (ABRA) の各組換え蛋白質、それに原虫の粗抽出抗原を用

い、コロニープロット、ELISA、間接蛍光抗体法 (IFA) による 1 次スクリーニングを行った。SE36 は大阪大学微生物病研究所の堀井教授より、MSP-1 は大阪工業大学の田辺教授より供与されたものを用いた。ABRA は maltose-binding protein との融合蛋白質として調製したものを用いた。2 次スクリーニングは IFA によって行った。特異性の検討には赤痢アメーバ栄養型虫体、HeLa 細胞を用い、IFA によって行った。

(倫理面への配慮) 本研究計画については東海大学医学部医の倫理委員会にて審査され、その承認の下に指針に従って実施された。

C. 研究結果

1. 赤痢アメーバ 260-kDa Gal/GalNAc レクチンに対するヒトモノクローナル抗体の解析

接着中和活性の強い 4 抗体クローン (CP33、CP33-H/L-CP17、CP33-H/L-CP26、CP33-H/L-LA22) はすべて sLecA(TL)と反応したが、CRD とは反応せず、エピトープは CRD 近傍のシステインリッチドメインに存在することが明らかになった。

抗 260-kDa Gal/GalNAc レクチン抗体を構成する 7 種類の H 鎖遺伝子は、V 領域がすべて VH3 ファミリーに属し、最も近い germ-line は VH3-21、VH3-30、VH3-48、VH3-53 で、DNA レベルの相同性は 85~95%、アミノ酸レベルでは 76~88%の相同性を示した。D 領域の germ-line は D1-26、D2-2 または D6-6、J 領域は JH4b、JH6b または JH6c であった。一方、15 種類の L 鎖遺伝子は、V 領域がすべて V κ 1 ファミリーに属しており、最も近い germ-line は 02/012 または L5 で、DNA の相同性は 93~99%、アミノ酸レベルでは 85~100%の

相同性を示した。J 領域は JK1、JK2、JK4 または JK5 であった。

2. 赤痢アメーバ 150-kDa Gal/GalNAc レクチンの組換え型蛋白質の調製

N 末端と C 末端の疎水性シグナル配列を除いた組換え蛋白質を大腸菌で作製した。inclusion body を形成したが、refolding 後の蛋白質は、接着中和活性のあるマウスモノクローナル抗体 EH3033 と反応することが確認された。

3. 熱帯熱マラリア原虫に対するヒト抗体の作製

熱帯熱マラリア患者のリンパ球に由来する抗体遺伝子ライブラリーについて、約 1.1×10^6 クローンをスクリーニングした。2 次スクリーニングの結果、粗抗原に対して 5 クローン、MSP-1 に対して 1 クローンが陽性であった。また、SE36 で免疫されたヒトリンパ球由来の抗体遺伝子ライブラリーからは、2 次スクリーニングで 1 陽性クローンが得られた。しかし、これらすべての抗体が赤痢アメーバにも反応し、特に強い反応性を示した 4 クローンは HeLa 細胞とも反応した。

D. 考察

抗赤痢アメーバ Gal/GalNAc レクチン抗体については、これまでに heavy subunit を認識していることが明らかになっている。今回の結果から、糖鎖認識部位そのものではないものの、極めて近傍に存在するエピトープを認識することで接着中和活性を発揮するらしいことが明らかになった。さらに、抗体遺伝子の解析から、これらの抗体は VH3 抗体であることが明らかになった。ウイルスや細菌に対して、VH3 抗体の重要性が報告されているが、寄生虫感染においても VH3 抗体が重要であることは、今回初めて明らかに

された。

また、接着中和には Gal/GalNAc レクチンの intermediate subunit に対する抗体が有用であることを、我々は既に報告している。今年度、組換え蛋白質を調製することができたので、今後この subunit に対する抗体のスクリーニングが容易になると考えられる。

熱帯熱マラリア原虫に関しては、ワクチン候補とされる 3 つの候補蛋白質に注目し、抗体遺伝子ライブラリーをスクリーニングした。熱帯熱マラリア原虫に反応する抗体が得られたが、残念ながら種特異性は認められず、ヒト由来の細胞とも反応した。マラリア患者では自己抗体が産生されることが知られており、得られた抗体は治療への応用は困難であるものの、この現象の解明に役立つと考えられる。

E. 結論

中和活性のある抗赤痢アメーバヒト抗体は Gal/GalNAc レクチン heavy subunit のシステインリッチドメインを認識していた。得られた抗レクチン抗体遺伝子の V 領域は、H 鎖がすべて VH3 ファミリー、L 鎖はすべて V κ 1 ファミリーに属していた。熱帯熱マラリア原虫に反応する抗体が得られたが、種特異性は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsutsumi, Y., Tachibana, H., Azuma, S. and Ariwa, R. Acanthamebic meningoencephalitis associated with alcoholic liver cirrhosis. *Pathol. Case Rev.*, 7 (6):273-277, 2002

Tachibana, H., Watanabe, K., Cheng, X.-J., Tsukamoto, H., Kaneda, Y., Takeuchi, T., Ihara, S. and Petri, W. A., Jr. Molecular characterization and expression of neutralizing human antibodies specific for the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin heavy subunit from peripheral lymphocytes of an cyst passer. Infect. Immun., 71, 2003 (in press)

2. 学会発表

橘 裕司、程 訓佳、金田良雅. 赤痢アメーバ150-kDa レクチン (Igl) の組換え蛋白質調製と性状解析. 第43回日本熱帯医学会

大会. 2002年11月

橘 裕司、程 訓佳、金田良雅. *Entamoeba dispar* 150-kDa レクチンの遺伝子クローニングと解析. 第72回日本寄生虫学会大会. 2003年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし