

インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究

所 属 東海大学・工学部・生命化学科

研究者 浅沼秀樹

研究要旨

インフルエンザの変異株をも防御できる治療型単鎖抗体の作製を目指し、ヒトおよびマウス単鎖抗体ライブラリーの作製とそれを用いたインフルエンザ結合型単鎖抗体の作製を行う。またマウスを用いた変異株に対する感染実験系の確立のため、ヒトウイルス株のマウスへ馴化を行う。

- ① 抗インフルエンザ(PR8株)抗体産生ハイブリドーマを作製し、抗体の可変領域部のDNAプローブの増幅に成功した。
- ② 正常マウスのリンパ球より抗体の可変領域部のDNAプローブの増幅に成功した。
- ③ 試験的に作製したヒトファージ提示型単鎖抗体ライブラリーを用いて、インフルエンザ結合型ファージ抗体の選別を行っている。
- ④ ヒトインフルエンザウイルスであるA/Peking/262/96株ならびにA/Wahan/37/95株のマウスへの馴化に成功した。現在他の株の馴化も行っている。

分担研究者

(1)東海大学・工学部・生命化学科 山口陽子

(2)北里大学研究所病院 橋口一弘

A. 研究目的

インフルエンザは表面抗原が変化するため、現行のワクチンでは防御が難しい。さらに近年、トリ由来の強毒株(H5型)のヒトへの致死感染も確認されている。そのため変異株が流行した場合には症状の軽減だけでなく、流行地域の縮小のためにも感染者の早期診断ならびに早期治療が必要となる。そして、人医療だけでなく畜産業にも応用できる検出技術や治療薬の開発が、流行の拡大阻止、患者数の減少、しいては経済的な損失も最小限に食い止めることができる。これには簡易に作製でき、かつ有効な治療型の薬剤の開発が必要とされる。そこで本研究では遺伝子技術を応用した蛋白創生技術であるファージディスプレイライブラリー法を用い、様々なイ

ンフルエンザウイルス抗原に対するファージ提示型単鎖抗体ライブラリーの作製、および単鎖抗体を用いた治療法の開発を目標として研究を行っている。

本計画における今年度の目標は、「マウスを用いたインフルエンザウイルス抗原に対するファージ提示型単鎖抗体ライブラリーの作製」である。様々な抗体の可変領域を持つ単鎖抗体のライブラリーを作製し、インフルエンザ抗原と結合性を有する単鎖抗体作製のベースにすることを目的とした。また同時に、作製された単鎖抗体の結合性を評価するための標準単鎖抗体の作製を目指し、インフルエンザ特異的ハイブリドーマ由来の単鎖抗体作製、ならびに交叉感染防御能判定のための動物実験系の確立のために、ヒトインフルエンザウイルスのマウスへの馴化も検討した。

B. 研究方法

a. マウスファージ提示型単鎖抗体ライブラリー

の作製 (山口)

BALB/c (6 週齢、メス) マウスの脾臓からリンパ球を分離し、それを用いて mRNA を抽出する。cDNA 化後、Table I および II に示した VH、V κ および V λ のミックスプライマーを用いて PCR を行い DNA プローブの増幅後、assembly PCR のより VH-V κ もしくは VH-V λ の組み合わせのリンカー結合型 DNA プローブを作製する。それを pCANTAB5E ファージミドベクターに挿入、コンピテントセル XL-1Blue にトランスフォーム後、KO7 ヘルパーファージを用いてファージ提示型単鎖抗体 (ファージ抗体) を作製する。

b. 抗インフルエンザ抗体産生ハイブリドーマ由来の単鎖抗体の作製 (浅沼)

従来行われている手法を用い、抗インフルエンザハイブリドーマを作製する。BALB/c マウスにインフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/34; PR8 株) 抗原を 2 週間毎に 3 回皮下接種し、最終免疫 2 週後に脾臓からリンパ球を回収する。それとミエローマ

(SP2O 細胞株) を PEG 存在下で融合させ、PR8 抗原と結合する抗体を産生するハイブリドーマを作製する。それを 2×10^6 個用意し、研究方法 a と同様の手法を用いて mRNA を抽出し、VH、V κ および V λ それぞれについて PCR を行う。DNA プローブを増幅後、assembly PCR のより VH-V κ もしくは VH-V λ の組み合わせのリンカー結合型 DNA プローブを作製する。それを pCANTAB5E ファージミドベクターに挿入、コンピテントセル XL-1Blue にトランスフォーム後、KO7 ヘルパーファージを用いてファージ提示型単鎖抗体 (ファージ抗体) を産生させる。ファージ抗体からの抗原特異的単鎖抗体の選別からクローニングはパニングにより行う。96-well マイクロプレートにインフルエンザ抗原をコートし産生されたファージ抗体を注入する。結合したファージ抗体を溶出しコンピテントセル (XL-1Blue) に感染させ、ヘルパーファージを用いてファージ抗体を産生させる。この操作を繰り返し行うことによりハイブリドーマ由来抗原特異的ファージ抗体を作製できる。

Table I Primer list for this experiments (V κ and V λ)

V κ sense	1	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C 3'
	2	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C 3'
	3	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C 3'
	4	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C 3'
	5	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C 3'
	6	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C 3'
	7	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTC AGA TGA UDC AGT C 3'
	8	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C 3'
	9	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C 3'
	10	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C 3'
	11	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTS TRA TGA CCC ART C 3'
	12	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C 3'
	13	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CBC AGK C 3'
	14	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A 3'
	15	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CCC AGW T 3'
	16	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C 3'
	17	5' GGG CCC AGG CCG AGC TCG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C 3'
V κ anti-sense (Long Linker)	1	5' CCA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT KAT TTC CAG YTT GGT CCC 3'
	2	5' CCA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC 3'
	3	5' CCA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT CAG CC CAG CTT GGT CCC 3'
V λ sense		5' CCC CCC AGG CGG CCG AGC TCG ATG CTG TTG TGA CTC AGG AAT C 3'
V λ anti-sense (Long Linker)		5' CCA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA GCC TAG GAC AGT CAG TTT GG 3'

Table II Primer list for this experiments (VH and overlap extension)

VH sense	1	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GIR MAG CTT CAG GAG TC 3'
	2	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GIB CAG CTB CAG CAG TC 3'
	3	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAG CTG AAG SAS TC 3'
	4	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC 3'
	5	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTY CAG CTB CAG CAR TC 3'
	6	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTY CAR CTG CAG CAG TC 3'
	7	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAC GTG AAG CAG TC 3'
	8	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAS STG GTG GAA TC 3'
	9	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AWG YTG GTG GAG TC 3'
	10	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAG SKG-GTG GAG TC 3'
	11	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAM CTG GTG GAG TC 3'
	12	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC 3'
	13	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG CAR CTT GTT GAG TC 3'
	14	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTR AAG CTT CTC GAG TC 3'
	15	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAR STT GAG GAG TC 3'
	16	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTT ACT CTR AAA GWG TST G 3'
	17	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTC CAA CTB CAG CAR CC 3'
	18	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAC TTG GAA GAG TC 3'
	19	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CTC GAG GTG AAG GTC ATC GAG TC 3'
VH anti-sense	1	5' CCT GGC CGG CGG CCG CAC TAG TGA CAG ATG GGG STG TYG TTT TGG C 3'
	2	5' CCT GGC CGG CGG CCG CAC TAG TGA CAG ATG GGG CTG TTG TTG T 3'
	3	5' CCT GGC CGG CGG CCG CAC TAG TGA CAT TTG GGA AGG ACT GAC TCT C 3'
Overlap extension sense		5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGC CGG CCG AGC TC 3'
		5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TG 3'

c. ヒトインフルエンザウイルス株のマウスへの馴化 (浅沼)

本研究で馴化に用いたヒトインフルエンザウイルス株を Table III に示す。ヒトインフルエンザウイルス株をマウスに経鼻接種 (20 μ l) し 3 日後、肺を摘出し 2ml の 0.1%BSA 混合 PBS を用いて洗浄したバッファを肺洗浄液とする。回収された肺洗浄液中のウイルス価をプラーク法により測定し、高いウイルス価を示した肺洗浄液を新たに用意したマウスに経鼻接種する (20 μ l)。接種 3 日後同様に肺洗浄液を回収し、ウイルス価を測定する。この操作を繰り返し、肺洗浄液中に安定して高いウイルス価を認めた場合にヒトインフルエンザウイルスのマウスへの馴化が成功したものとする。なお馴化後のウイル

Table III Virus strains of adaptation with mice

Strains	Type
A/Peking/262/95 (A/P)	H1N1
A/Wahan/37/95 (A/W)	H1N1
A/Fukushima/2/88 (A/F)	H1N1
A/Sydney/5/97 (A/S)	H3N2
B/Nagasaki/1/87 (B/N)	Type B

ス株は発育鶏卵を用いて増殖させ、初期感染に用いたウイルスの少量接種 (2 μ l) で免疫したマウスに感染させ防御効果を検討する。これにより完全な感染阻止を示した場合、初期感染に用いた株と馴化株と間に抗原性の大きな変化はないとする。

d. ヒト単鎖抗体ライブラリーの作製 (橋口、山口)

ヒト末梢単核球を比重遠心により分離後、mRNA を抽出する。cDNA 化後、VH、V κ および V λ のプライマーを用いて PCR を行い DNA プロブの増幅後、assembly PCR のより VH-V κ もしくは VH-V λ の組み合わせのリンカー結合型 DNA プロブを作製する。それを pCANTAB5E ファージミドベクターに挿入、XL-1Blue にトランスフォーム後、KO7 ヘルパーファージを用いてファージ提示型単鎖抗体 (ファージ抗体) を作製する。

e. ヒト単鎖抗体ライブラリーからの抗インフルエンザ単鎖抗体の作製 (浅沼)

大量に産生された様々なファージ抗体ライブラリーからのインフルエンザ抗原特異的単鎖抗体の選別

からクローニングは研究方法 b と同様にパニングにより行う。96-well マイクロプレートに抗原をコートし産生されたファージ抗体を注入する。結合したファージ抗体を溶出しコンピテントセル (XL-1Blue) に感染させ、ヘルパーファージを用いてファージ抗体を産生させる。この操作を繰り返し行うことにより、抗原特異的ファージ抗体を作製できる。

(倫理面への配慮)

本研究では実験動物を使用するため、取り扱いについては当大学の実験動物委員会の許可のもと、苦痛の軽減や、安楽死の方法など、動物愛護上の配慮を確実に行う。安楽死には高濃度ガス麻酔の長時間吸引法を用いる。また今回使用したヒト材料に関しては、提供者とのインフォームドコンセントを確実にっており、個人情報等の守秘義務を確実に果たす。

C. 研究結果

a. マウスを用いたインフルエンザウイルス抗原に対するファージ提示型単鎖抗体ライブラリーの作製 (山口)

マウスの脾臓リンパ球より mRNA を抽出し cDNA 化後、VH、V κ もしくは V λ のプライマーを用いて PCR を行った。本実験では Table I および II に示したプライマーを混合したものを用いた。その結果、およそ 350bp に VH、V κ および V λ の DNA プローブの増幅が認められた。引き続き VH-V κ もしくは VH-V λ の組み合わせによる assembly PCR を行った。しかしながら、リンカー結合型 DNA プローブの増幅は認められなかった。またこの時、アニーリングの温度による違いも認められなかった。次に Mouse ScFv Module (Amersham bioscience) を使い、VH および VL の PCR を行った。その結果、両 DNA プローブの増幅が確認できた。引き続きリンカーを用いた assembly PCR を行ったが、同様にリンカー結合型 DNA プローブの増幅は認められなかった。このことは assembly PCR における条件を詳細に検討する必要があることが示唆される。

b. 抗インフルエンザ抗体産生ハイブリドーマ由来の単鎖抗体の作製 (浅沼)

インフルエンザウイルス (PR8 株) に対するハイブリドーマを作製し、それを用いた単鎖抗体の作製を試みた。前述の手法と同様にハイブリドーマより mRNA を抽出し cDNA 化後、VH、V κ もしくは V λ に対するプライマーを用いて PCR を行った。その結果、およそ 350bp 付近に DNA プローブの増幅が認められた。続いて VH-LINKER-VL の組み合わせによる assembly PCR を行った。しかしながら、リンカー結合型 DNA プローブの増幅は認められなかった。このことはマウス脾臓リンパ球を用いた結果と同様に、assembly PCR の条件の詳細を検討する必要があることを示唆している。また、増幅した DNA 断片の sequence を行う必要があることも示唆している。

c. ヒトインフルエンザウイルス株のマウスへの馴化 (浅沼)

本研究では変異型のインフルエンザウイルス株の防御を目標としているが、その防御効果を実験動物で検討する場合のウイルス株は限られるため、マウスに馴化されたヒトウイルス株を作製する必要がある。そのためヒトインフルエンザウイルス株である A/P 株、A/W 株、A/F 株、A/S 株および B/N 株のマウスへの馴化を行った。その結果、A/P 株、A/F 株および B/N 株はヒト株であるにも関わらず、初期感染時より肺洗浄液中に高いウイルス価が認められた。一方 A/B 株および A/S 株では初感染後の肺洗浄液中に軽度のウイルス価が認められたものの、その洗浄液を新たに用意したマウスへの感染に用い、3 日後に回収した肺洗浄液中にはウイルス価が認められなかった。A/P 株および A/F 株は 2 世代目以降も高い肺内ウイルス価を示し、ともに 15 世代経過した現在でも高い肺内ウイルス価を維持している。なお、本実験の代表的データとして A/F の馴化過程におけるウイルス価のデータを Fig. 1 に示した。特に A/P 株では 15 世代目の肺洗浄液中のウイルスを発育鶏卵で増殖させ感染に用いたところ、初期株より

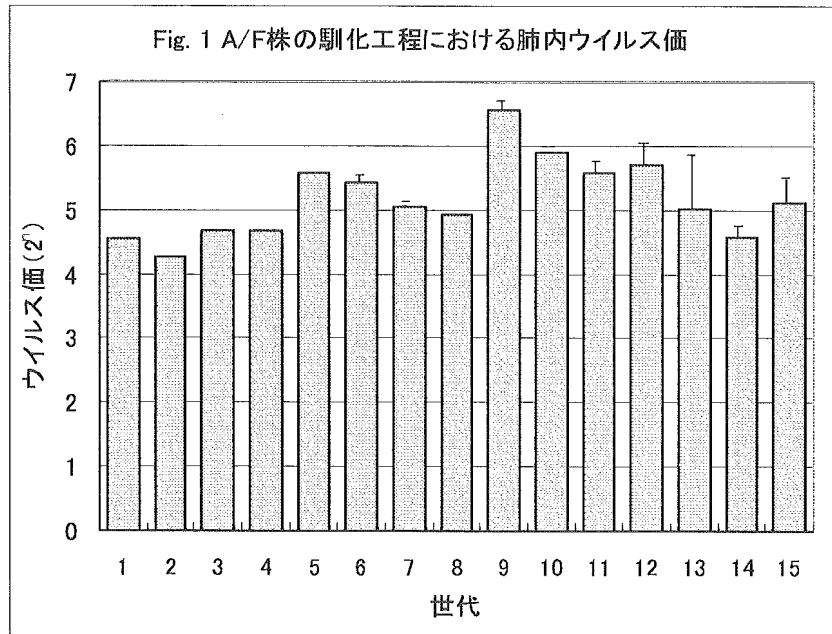
もマウスにおける高い LD50 値が得られた。また初期株の少量感染により免疫したマウスにこのウイルスを感染させたところ、完全な防御効果が認められた。A/F株でも現在、15 世代目の肺洗浄液を発育鶏卵で増殖させ、マウスにおける LD50 値の測定と初期株感染マウスにおける防御効果を検討している。一方 A/B 株は、2 世代目の肺洗浄液中にウイルス価が認められなかったため 1 世代目の肺洗浄液を発育鶏卵でウイルスを増殖させ、引き続き馴化の検討を行った。その結果、発育鶏卵増殖後は 20 世代まで高い肺内ウイルス価が認められた。この株も A/P 株と同様に、初期株で免疫したマウスに 20 世代目の肺洗浄液を発育鶏卵に接種して増殖させたウイルスを感染させたが、完全な防御が認められた。現在マウスにおける LD50 値を検討している。

d. ヒト単鎖抗体ライブラリーの作製(橋口、山口)

本研究ではヒト単鎖抗体ライブラリーの作製は平成 18 年度を予定していたが、分担研究者の共同研究者である高柳(慶応大)の技術協力の下、ヒト単鎖抗体ライブラリーの試験的な作製を行った。今回用いたヒト単鎖抗体ライブラリーは、ヒト PBMC および脾臓由来の抗体の可変領域 cDNA のシャッフリングによって、VH-LINKER-VL の DNA プローブが作製され、これをファージベクターに組み込み作製されたファージライブラリーである。本ライブラリーには 10^6 種類以上の VL および VH 遺伝子を含んでいるため、両者を組み合わせることにより、 10^{11} 種類以上の単鎖抗体ライブラリーを作製することが可能である。

e. ヒト単鎖抗体ライブラリーからの抗インフルエンザ単鎖抗体の作製(浅沼)

試験的にヒトファージ抗体ライブラリーを用いて、



インフルエンザに結合性を有するファージ抗体の選別を行った。ライブラリーから特異的なファージ抗体の選別は PR8 株抗原をコートした 96-well マイクロプレートを使用した。コートしたプレートにライブラリーファージ抗体を入れ、結合したファージ抗体を溶出し、予め準備しておいた XL-1Blue に感染させコロニーを形成させた。さらにヘルパーファージを加えファージ抗体を形成させ、PR8 抗原をコートした ELISA により結合したファージを回収、増殖させる作業を繰り返し行った。その結果、3 回パニングを施行し、ELISA でいくつかの陽性コロニーが認められている。現在、さらにパニングを繰り返し、より結合性の高いファージ抗体の選別を行っている。

D. 考察

本研究計画の最終目標は「あらゆるヒトインフルエンザに対して治療可能な単鎖抗体を作製する」である。この目標ではヒトに応用できる生物製剤としての単鎖抗体の作製が必須であるが、その前段階として、実験動物レベルでの効果の評価が必要となる。そのためヒト単鎖抗体の作製と同時に、マウス単鎖抗体ライブラリーの作製とインフルエンザ結合型ファージ抗体の作製、さらには作製された単鎖抗体の生体における効果を評価する必要がある。ここで本研究を遂行する過程で、新たに 2 つの問題点を見出

した。第一点が作製された単鎖抗体の結合力を判定するための陽性標準がないこと、第二点が、作製された単鎖抗体の実験動物レベルで交叉防御効果を評価する実験系がないことである。そこで新たに、本研究で計画した実験に加え、第一点の問題を解決するための実験として、抗インフルエンザ抗体産生ハイブリドーマを作製し、それより単鎖抗体を作製することを試みた（浅沼）。また第二点の問題を解決する実験として、ヒトインフルエンザウイルス株のマウスへの馴化を試みた（浅沼）。

マウス単鎖抗体の作製は、正常マウスの脾細胞を用いて行った。その結果、単鎖抗体作製の初期段階である抗体の VH および VL 領域の cDNA プロブの作製には成功したが、その両者をリンカーで結合させ VH-LINKER-VL にする assembly-PCR に増殖が認められなかった（山口）。一方、抗インフルエンザ抗体産生ハイブリドーマより単鎖抗体を試みる実験においても、ハイブリドーマの作製には成功したものの、それより単鎖抗体を作製する過程においてはマウス脾細胞を用いた場合と同様、VH-LINKER-VL にする assembly-PCR に増殖が認められなかった（浅沼）。本手法で使用するプライマーは本来、ライゲーションを行うファージミドとして pComb3HSS もしくは pComb3XSS を用いるために設計されており、そのための制限酵素部位を含んでいる。これは両端に SfiI により切断される部位を含んでいるが今回、ファージミドに pCANTAB5E を用いることを試みたため、片側を SfiI から NotI に置換し設計した。このことが assembly-PCR の条件を困難にしたことも考えられる。そのため assembly-PCR の条件を変えて検討を行っているが、温度条件による違いは認められていない。今後はさらなる温度条件および酵素の条件等を検討し、場合によってはプライマーの設計ならびにファージミドを変更して検討する必要性も生じる。

ヒト単鎖抗体ライブラリーの作製に関しては今回、高柳（慶応大）の技術協力もあり、ヒト単鎖抗体ファージライブラリーを試験的に作製した。そのファージ抗体を用いて現在、予備実験として抗インフルエンザファージ抗体の選別を行っている（浅沼）。ファ

ージライブラリーの作製により、様々なウイルス株に対し結合性を有するファージ抗体の選別が可能となったが、本ライブラリーにおける可変領域プールの詳細は不明であるため、場合によっては多くのヒトからリンパ球プールを作製し、それよりライブラリーを作ることによって可変領域の多様性をさらに作り出せると考えられる。このことは免疫したマウスより単鎖抗体ライブラリーを作製し、可変領域の多様性を繰り返し検討することにより明確となる。

先に挙げた第二点目の問題点を解決するために、ヒトインフルエンザウイルスのマウスへの馴化を行った（浅沼）。今回馴化を進めた株を Table III に示した。その結果、A/P 株、A/F 株および B/N 株は初期感染時より肺洗浄液中に高いウイルス価が認められたが、A/B 株および A/S 株では初感染後の肺洗浄液中に軽度のウイルス価が認められたものの、その洗浄液を新たに用意したマウスへの感染に用い、3 日後に回収した肺洗浄液中にはウイルス価が認められなかった。A/P 株および A/F 株は 2 世代目以降も高い肺内ウイルス価を示し、ともに 15 世代経過した現在でも高い肺内ウイルス価を維持している。特に A/P 株では 15 世代目の肺洗浄液中のウイルスを発育鶏卵で増殖させ感染に用いたところ、初期株よりもマウスにおける高い LD50 値が得られた。このことは初期株よりもマウスへの感染力が高まっていることを示唆している。また初期株の少量感染により免疫したマウスにこのウイルスを感染させたところ、完全な防御効果が認められた。このことは継代株が初期株と抗原性に違いがないことが示唆される。以上の結果から A/P 株では完全にヒト株からマウスへの馴化に成功したことを意味している。A/F 株でも現在、15 世代目の肺洗浄液を発育鶏卵で増殖させ、マウスにおける LD50 値の測定と初期株感染マウスにおける防御効果を検討している。一方 A/B 株は、2 世代目の肺洗浄液中にウイルス価が認められなかったため 1 世代目の肺洗浄液を発育鶏卵でウイルスを増殖させ、引き続き馴化の検討を行った。その結果、発育鶏卵増殖後は 20 世代まで高い肺内ウイルス価が認められた。この株も A/P 株と同様に、初期株で免疫したマウスに 20 世代目の肺洗浄液を発育

鶏卵に接種して増殖させたウイルスを感染させたが、完全な防御が認められた。現在マウスにおけるLD50値を検討している。これにより初期株よりも高い致死率を示した場合にA/B株の完全な馴化ができたことが示唆される。

E. 結論

抗インフルエンザヒト単鎖抗体および同マウス単鎖抗体の作製、それに加えて抗インフルエンザ抗体ハイブリドーマ由来単鎖抗体の作製と交叉防御効果検討のためのヒトウイルス株の馴化が同時に進んでいる。特に抗インフルエンザヒト単鎖抗体の作製はインフルエンザ抗原を用いたパニングに進んでいるため近い将来にはインフルエンザと結合性を有する単鎖抗体が完成する。一方マウス単鎖抗体はモノクローナル抗体産生ハイブリドーマと同様に遺伝子操作で困難を極めているものの、それをクリアすることにより完成に近づく。交叉感染実験系のためのヒトインフルエンザウイルス株の馴化は順調に進んでおり、単鎖抗体が完成した場合の動物実験系における評価が可能となる。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。