

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6288621号
(P6288621)

(45) 発行日 平成30年3月7日 (2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月16日 (2018.2.16)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 N

GO 1 N 33/569 (2006.01)

GO 1 N 33/569 L

CO 7 K 16/42 (2006.01)

CO 7 K 16/42 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 8 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2015-532853 (P2015-532853)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月18日 (2014.8.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/071591
 (87) 国際公開番号 W02015/025825
 (87) 国際公開日 平成27年2月26日 (2015.2.26)
 審査請求日 平成29年7月14日 (2017.7.14)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-172902 (P2013-172902)
 (32) 優先日 平成25年8月23日 (2013.8.23)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000125381
 学校法人藤田学園
 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98
 (74) 代理人 100114362
 弁理士 萩野 幹治
 (72) 発明者 黒澤 良和
 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98
 学校法人藤田学園 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所内
 (72) 発明者 大島 信子
 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98
 学校法人藤田学園 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所内

審査官 海野 佳子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルスに対する抵抗力の判定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検者由来の生体サンプル中における、VH1-69遺伝子を用いた抗体の存否を指標として、グループ1 A型インフルエンザウイルスの感染に対する抵抗力を判定するための方法であって、

以下のステップ(1)～(3)を含む、方法：

(1) インフルエンザワクチン接種後の被検者の生体サンプルと、VH1-69遺伝子を用いた抗体を認識する抗イディオタイプ抗体とを接触させるステップ；

(2) 生成する免疫複合体を検出するステップ；

(3) ステップ(2)の検出結果に基づきグループ1 A型インフルエンザウイルスの感染に対する抵抗力の強さを示すステップであって、検出された免疫複合体の量がグループ1 A型インフルエンザウイルスの感染に対する抵抗力の強さの指標となるステップ。

【請求項 2】

以下のステップを更に含む、請求項1に記載の方法：

(4) インフルエンザワクチン接種前の被検者の生体サンプルと、VH1-69遺伝子を用いた抗体を認識する抗イディオタイプ抗体とを接触させることにより生成する免疫複合体を検出し、該免疫複合体の量と、ステップ(2)で検出された免疫複合体の量を比較し、比較結果に基づき、抵抗力の強さを示すステップ。

【請求項 3】

生体サンプルが血液サンプルである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

グループ 1 A型インフルエンザウイルスが、H1N1型、H1N2型、H2N2型、H5N1型、H5N2型及びH6N1型からなる群より選択される一又は二以上のウイルスである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

グループ 1 A型インフルエンザウイルスが、H1N1型、H2N2型及びH5N1型からなる群より選択される一又は二以上のウイルスである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

グループ 1 A型インフルエンザウイルスが、H1N1型、H1N2型、H2N2型、H5N1型及びH5N2型からなる群より選択される一又は二以上のウイルスである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 7】

VH1-69遺伝子を用いた抗体を特異的に認識する抗イディオタイプ抗体を含む、グループ 1 A型インフルエンザウイルスの感染に対する抵抗力判定用キット。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法に用いられる、請求項 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗体を標的とした検査に関する。詳細には、特定の抗体を指標とした、インフルエンザウイルスに対する抵抗力の判定方法に関する。本発明はインフルエンザの大流行（パンデミック）対策として有用である。本出願は、2013年8月23日に出願された日本国特許出願第2013-172902号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

20

【背景技術】

【0002】

インフルエンザは毎年、数百万人が感染する呼吸器系の感染症である。インフルエンザに対する防御として抗体が重要な役割を果たすことから、インフルエンザをコントロールする最も効率的な手段としてワクチンが利用されてきた。ヘマグルチニン（HA）はウイルス中和抗体の主要な標的であり、ウイルスの細胞内への進入を2段階で介在する（非特許文献1）。第1段階では、HAは細胞側の受容体、即ちシアル酸に結合する。エンドサイトーシスでウイルスが取り込まれた後、pH低下に伴いHA分子の構造が大きく変化する。これまでの研究によって、中和抗体は以下のいずれかの活性、即ち、HAとシアル酸の結合を阻害する活性（非特許文献2）又はpH低下に伴うHA分子の構造変化を阻害する活性（非特許文献3）を示すことが判明している。前者の活性を示す中和抗体（以下では第1タイプの中和抗体と呼ぶ）はHA分子の球状頭部に位置するシアル酸結合ポケットの近郷に結合する。他方、後者の活性を示す中和抗体はHA分子の軸索部分に結合する。ドミナントな免疫反応は第1タイプの中和抗体が介在すること、及び標的部位が変異しやすいこと（結合活性の喪失を伴わない）から、第1タイプの中和抗体に対して耐性を獲得したウイルスがドミナントになり、毎年の大流行（エピデミック）を引き起こす。歴史的には、有効な中和抗体は全て第1タイプであると考えられてきたため、殆ど毎年、ワクチン用の株を変える必要があった。流行しているウイルスに対応している限りにおいて、このようなワクチンの方法は感染予防に有効である。

30

40

【0003】

インフルエンザウイルスの感染に対する応答は人によって異なる。例えば、幼少期に数度インフルエンザに感染したものの、その後は感染せず、ワクチンの接種も受けなかった人も多い。2009年にブタ由来H1N1型インフルエンザウイルス（S-OIV）が流行し、21世紀で初のパンデミックを引き起こした（非特許文献4）。一般に、新たに出現したインフルエンザウイルスに対してはナীবであるため、パンデミック発生時には、人は当該ウイルスに対して免疫がないと考えられている。しかしながら、S-OIVの場合、季節性H

50

1N1型ウイルスのみならず、S-OIVに対しても中和活性を示す、長期メモリーB細胞を多くの大人が保有していた（非特許文献5～7）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】 Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Ann. Rev. Biochem.* 69, 531-569 (2000).

【非特許文献2】 Knossow, M. et al. Mechanism of neutralization of influenza virus infectivity by antibodies. *Virology* 302, 294-298 (2002).

10

【非特許文献3】 Okuno, Y., Isegawa, Y., Sasao, F. & Ueda, S. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. *J. Virol.* 67, 2552-2558 (1993).

【非特許文献4】 Fraser, C. et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324, 1557-1561 (2009).

【非特許文献5】 Hancock, K. et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N. Engl. J. Med.* 361, 1945-1952 (2009).

【非特許文献6】 Wrammert, J. et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 208, 181-193 (2011).

20

【非特許文献7】 Li, G.M. et al. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 9047-9052 (2012).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

現在、日本では以下のパンデミック対策が講じられている。

(1) 大量の抗インフルエンザウイルス薬（ノイラミニダーゼ阻害剤）の備蓄

(2) 大量のプレパンデミックワクチンの備蓄

(3) パンデミックワクチンの生産体制の構築

30

【0006】

(1) については、感染・発病過程で抗インフルエンザウイルス薬が有効な時期が限られていること、及び薬剤抵抗性ウイルスの出現の問題がある。(2) についても、実際にパンデミックを起こすウイルスの型（その抗原性）を正確に予測できないという問題がある。(3) については、従来の鶏卵でのウイルスの増殖から培養細胞でのウイルスの増殖に切り替えが進められているものの、ワクチン製造時間の短縮には限度がある。

本発明は、以上の現状を打開すべく、インフルエンザウイルスのパンデミック対策に有効な手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

40

インフルエンザウイルスに対する中和抗体のレパートリーを網羅的に解析するため、本発明者らの研究グループは以下の実験手法を開発した（参考文献8）。まず、ドナーからアフエーシスでBリンパ球を回収し、ファージディスプレイ技術を用いて巨大な抗体ライブラリーを構築した。次に、抗体ライブラリーをホルマリン処理ウイルス粒子でスクリーニングし、結合活性及び中和活性を示すクローンを単離し、その特性を詳細に調べた。末梢血中のBリンパ球のみを利用して解析を行ったものの、その結果はドナーの体内に存在する中和抗体の全レパートリーを表していると判断できる（参考文献8）。以上の戦略を用い、インフルエンザワクチン（2009年に大流行したA型インフルエンザウイルス（H1N1型）株）接種後のヒト体内におけるヘマグルチニンに対する抗体レパートリーを詳細に調べた。その結果、一部の例外はあるものの、検出された抗体は二つの群、即ち、ワ

50

クチン接種によって新たに誘導されたB細胞が産生し、シアル酸結合ポケットの周囲に結合する抗体（第一群；タイプ1の抗体群）と、ワクチン接種の前からメモリー（記憶）細胞として存在していたB細胞が産生する抗体であってVH1-69遺伝子（VH1-69germline遺伝子）を用いており、ヘマグルチニン分子の軸索部分に結合する抗体（第二群；タイプ2の抗体群）に分類された。第二群の抗体の多くはワクチンとして使用したH1N1型ウイルスのみならず、H5N1型ウイルスに対しても中和活性を示した。また、第二群の抗体は変化し難いエピトープを認識している可能性が非常に高く、長期間にわたってウイルス感染に対応していることが示唆された。以上の結果を踏まえると、インフルエンザのパンデミックに備えるための戦略は個人の保有する抗体（有効な中和抗体、即ち第二群の抗体の保有の有無）を考慮してデザインされるべきであり、そのための指標として「VH1-69遺伝子を用いた抗体」が有用であるといえる。即ち、VH1-69遺伝子を用いた抗体を検出し、その結果を利用すれば、有効且つ効率的なパンデミック対策を実現できる。尚、本発明者らの検討によって、VH1-69遺伝子を用いた抗体を分泌型抗体として検出可能であることやワクチン接種によりVH1-69遺伝子を用いた抗体が増加すること等も明らかになるとともに、VH1-69遺伝子を用いた抗体とヘマグルチニンの結合を阻害するモノクローナル抗体（K1-18）がウイルス中和活性を阻害した事実より、VH1-69遺伝子を用いた抗体が中和抗体として機能していることが直接的に示された。

10

主として以上の成果に基づき、以下の発明が提供される。

〔1〕被検者由来の生体サンプル中における、VH1-69遺伝子を用いた抗体の存否を指標として、A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力を判定する方法。

20

〔2〕以下のステップ（1）～（3）を含む、〔1〕に記載の方法：

（1）インフルエンザワクチン接種後の被検者の生体サンプルと、VH1-69遺伝子を用いた抗体を認識する抗イディオタイプ抗体とを接触させるステップ；

（2）生成する免疫複合体を検出するステップ；

（3）ステップ（2）の検出結果に基づきA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力の強さを判定するステップであって、検出された免疫複合体の量がA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力の強さの指標となるステップ。

〔3〕以下のステップを更に含む、〔2〕に記載の方法：

（4）インフルエンザワクチン接種前の被検者の生体サンプルと、VH1-69遺伝子を用いた抗体を認識する抗イディオタイプ抗体とを接触させることにより生成する免疫複合体を検出し、該免疫複合体の量と、ステップ（2）で検出された免疫複合体の量を比較し、比較結果に基づき、抵抗力の強さを判定するステップ。

30

〔4〕生体サンプルが血液サンプルである、〔2〕又は〔3〕に記載の方法。

〔5〕A型インフルエンザウイルスが、H1N1型、H1N2型、H2N2型、H3N2型、H5N1型、H5N2型、H6N1型、H7N2型、H7N3型、H7N7型、H7N9型、H9N2型及びH9N1型からなる群より選択される一又は二以上のウイルスである、〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の方法。

〔6〕A型インフルエンザウイルスが、H1N1型、H2N2型、H3N2型及びH5N1型からなる群より選択される一又は二以上のウイルスである、〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の方法。

〔7〕A型インフルエンザウイルスが、H1N1型、H1N2型、H2N2型、H5N1型及びH5N2型らなる群より選択される一又は二以上のウイルスである、〔1〕～〔4〕のいずれか一項に記載の方法。

40

〔8〕VH1-69遺伝子を用いた抗体を特異的に認識する抗イディオタイプ抗体を含む、A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力判定用キット。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】63グループに分類された代表的なクローンの特徴。左端の3列の数字はスクリーニングで単離されたクローンのグループ番号と、各グループで単離されたクローンの種類及びクローンの単離数に対応する。代表的なクローンと全てのgermline VH遺伝子の間でアミノ酸配列を比較することにより、各クローンのgermline遺伝子を同定した。同一性（%

50

を示した。CDR3のアミノ酸配列も示した。4つのH1N1株 (NC99, SI06, Bri07及びCal09) 及びH3N2ウイルス粒子に対する結合活性をELISAで調べた。492nmの吸光度を以下のように表した。1.00 (赤)、0.50-0.99 (オレンジ)、0.10-0.49 (黄色)。H1N1、H5N1及びH3N2ウイルスに対する100又は250 µg/ml Fab-pp型抗体のウイルス中和活性をフォーカス減少法で調べた。減少率 (パーセント) を以下のように表した。60% (濃い青)、40-60% (青)、20-40% (薄い青)。二つのH1N1株 (Bri07及びCal09) を用い、Fab-pp型抗体のHI活性を測定した。ヘマグルチニン凝集をFab-pp型抗体が阻害する最低濃度 (µg/ml) を示した。図中に示したCDR3のアミノ酸配列は上から順にDTT VTNEE INFYYGMDV (配列番号1)、DTEVT NEE INFYYGMDV (配列番号2)、DTEVTSEE INFYYGMDV (配列番号3)、DTT VTSEE INFYQGM DV (配列番号4)、EFGANGEDIYFYHGMDV (配列番号5)、SIGGYDGEGIFYNHYGMDV (配列番号6)、DEWFGELGSSGMDV (配列番号7)、DFAGEGHGSGSVDY (配列番号8)、SATSYRDYLD R DFFYYAL DV (配列番号9)、SATSYRDYLD R DFFYYALDV (配列番号10)、DHLNSEIVATITGFLDY (配列番号11)、DKLNSEMVATITGFLDY (配列番号12)、DKLNSEMVATITGFMDY (配列番号13)、DKLNSEVTTITGFLDY (配列番号14)、DNLNSELVATITGFLDH (配列番号15)、DNLNSEV ATISGFLDY (配列番号16)、DYLNSEMVATITGFLDS (配列番号17)、EPSNTEDIRGIEGVFDY (配列番号18)、DAYSSGDTYYYGLDV (配列番号19)、DRGTGEQIAVVTALIDY (配列番号20)、HGYGDYVGYFDY (配列番号21)、VLRWLGEEDADAFDI (配列番号22)、GFGMVGD TVDD L YNGMDV (配列番号23)、VQRPYGDYAAGAFDI (配列番号24)、VQRPYGDYITGAFDI (配列番号25)、RTWYYDGSGPDPSRDAFDI (配列番号26)、DLGN GEDI AVQPGTIGVDY (配列番号27)、DLGN GEDI AVQPGTTGVDY (配列番号28)、DLGN GEDI VVQPATIGVDY (配列番号29)、GTEVTTEEIYFYGMDV (配列番号30)、GTEVTTEEIYFYGMDV (配列番号31)、AEKWLADYFY YFGMDV (配列番号32)、DREESLFAGAIYNYDDMDV (配列番号33)、KGGAKLLYFDWLASAFDI (配列番号34)、GPNYYENFFDY (配列番号35)、GPNYYESYFDY (配列番号36)、GPNY YENYFDF (配列番号37)、GPNYYESYLDY (配列番号38)、GPNYFESYFDN (配列番号39)、GPNYYETYLDN (配列番号40)、GPHYYESHLDY (配列番号41)、GPHYVVSFYDS (配列番号42)、GNTYYSSYFDQ (配列番号43)、GSTYYSSYFDQ (配列番号44)、SGTYVVSYFD S (配列番号45)、SGTYVVSYLDY (配列番号46)、SGTYVVSFFDY (配列番号47)、SGS YYPDYFYQY (配列番号48)、SPTYYPGALDM (配列番号49)、APLIYNWYFDL (配列番号50)、APLIYNWYFDL (配列番号51)、HPTYHYGSAMDY (配列番号52)、HPTYHYFGSAMEY (配列番号53)、HPTYHYGSPMDY (配列番号54)、HPMYHYGSAMDY (配列番号55)、HSGYHL IGYFDS (配列番号56)、EEGYYYGSGPLDS (配列番号57)、NSGYHISGFYLDY (配列番号58)、SLGYHTQYNGMDV (配列番号59)、HPTYHFDKSGYRFDS (配列番号60)、SRGYSFGYGT DYFDY (配列番号61)、NYYGSGTYFNDAFDI (配列番号62)、YQSSDYNNSEYFQH (配列番号63) である。

【図2】ワクチン接種により新たに誘導された抗体間における、HAに対する結合の競合阻害。Fab-cp3型抗体 (10倍濃縮、左側) の存在下、Cal09ウイルス粒子に対するFab-pp型抗体 (上側) の結合活性をELISAで測定した。抗HA抗体ではないF008-009及びF033-367をコントロールに使用した。結合阻害を以下の通り計算した。F008-009cp3の存在下での吸光度値を100%結合とし、各Fab-cp3型抗体の存在下による吸光度値の減少率を測定し、阻害率とした。阻害率を以下のように表した。70% (白)、50-70% (灰色)、0-50% (濃い灰色)。実験は二連で行い、少なくとも3回繰り返した。

【図3】本検討で単離されたタイプ2抗体による、C179のHAに対する結合の阻害。様々なFab-cp3型抗体の存在下 (10倍濃縮)、Bri07ウイルス粒子に対するC179の結合をELISAで調べた。抗HA抗体ではないF008-009及びF033-367をコントロールに使用した。各クローンの名前の下に、グループの番号を付した。実験は二連で行い、2回繰り返した。エラーバーは標準偏差を示す。

【図4】ワクチン接種及び採血のスケジュール。1947年生まれのドナーに対してA/California/7/2009pdm株を2回 (2009年11月2日、16日) ワクチン接種した。ワクチン接種前に2回 (2009年10月30日、11月2日)、1回目のワクチン接種後に1回 (2009年11月9日)、2回目のワクチン接種後に5回 (2009年の11月17日、23日、30日、12月7日、14日)、採

10

20

30

40

50

血した。10月30日（ワクチン接種前）と12月14日（ワクチン接種後）の血液からそれぞれ巨大な抗体ライブラリーを構築した。

【図5】各クローンのVH（FR1-CDR1-FR2-CDR3-FR4）のアミノ酸配列（上から順に配列番号64～126）。

【図6】H1N1株及びH5N1株に関する、血清のHI活性及びウイルス中和活性。血清のウイルス中和活性を測定するためVN法及びM-VN法を利用した。段階希釈した血清を用いて活性を測定し、HI活性は、ヘマグルチニン凝集阻害を示す血清の最大希釈倍率の逆数を、ウイルス中和活性は、50%フォーカス減少率を示したときの血清の希釈倍率の逆数を示した。ワクチン接種前の血清は2009年10月30日と同11月2日に採取したものである。NDは不検出を表す。

10

【図7】K1-18抗体存在下での血清のウイルス中和活性。段階希釈した血清を用いて活性を測定し、50%フォーカス減少率を示す、血清の希釈倍率の逆数を示した。ワクチン接種前の血清は2009年11月2日に採取したものである。

【図8】K1-18抗体の特徴。(a) VH1-69遺伝子を使用している抗体へのK1-18抗体の結合活性。VH1-69遺伝子を使用している抗体へのK1-18抗体の結合活性をELISAによって測定した。F004-122、F009-165、F021-112、F021-256、F035-095、F058-031はVH1-69遺伝子を使用していない。グループ番号は、クローン名の下に表記した。(b) 各抗体のK1-18抗体存在下におけるウイルス粒子への結合活性。VH1-69遺伝子を使用している抗体のBri07ウイルス粒子への結合活性を、K1-18抗体（100又は200 µg/ml）存在下でELISAにより測定した。F008-009は抗HA抗体ではなく、ネガティブコントロールとして使用した。グループ番号はクローン名の下に表記した。実験は、2連で行い、標準偏差をエラーバーで示した。

20

【発明を実施するための形態】

【0009】

1. A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力の判定方法

本発明の第1の局面は、A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力を判定する方法に関する。本発明によれば、A型インフルエンザウイルスに対する被検者の抵抗力を客観的な指標で判定することができる。本発明の方法は、将来起こり得るインフルエンザのパンデミック対策の手段として有効であり、その価値は極めて高い。本発明の方法では、VH1-69遺伝子を用いる抗体がA型インフルエンザウイルスに対して幅広く中和活性を示すという知見、及びVH1-69遺伝子を用いる抗体を産生するB細胞がメモリー細胞として残存し、A型インフルエンザに対する生体の防御に重要な役割を果たすという知見に基づき（詳細は後述の実施例を参照）、被検者由来の生体サンプル中における、VH1-69遺伝子を用いた抗体の存否を指標として、A型インフルエンザウイルスに対する被検者の抵抗力を判定する。

30

【0010】

A型インフルエンザウイルスはHA分子の型によって二つのグループ、即ち、H2、H5、H1、H6（以上、H1クラスター；H1a）、H13、H16及びH11（以上、H1クラスター；H1b）からなるグループ1と、H8、H12、H9（以上、H9クラスター）、H4、H14、H3（以上、H3クラスター）、H15、H7及びH10（以上、H7クラスター）からなるグループ2に大別される。本発明の方法は、これらA型インフルエンザウイルスを網羅的に対象とする。但し、一態様ではH1N1型、H1N2型、H2N2型、H3N2型、H5N1型、H5N2型、H6N1型、H7N2型、H7N3型、H7N7型、H7N9型、H9N2型及びH9N1型からなる群より選択される一又は二以上のウイルスを対象とする。別の態様では、特にパンデミック対策の必要性が高いとされる、H1N1型、H2N2型、H3N2型及びH5N1型からなる群より選択される一又は二以上のウイルスを対象とする。更に別の態様では、グループ1ウイルス間で共有されているエピトープをVH1-69遺伝子を用いた各抗体（実施例に示した実験において、被検者由来のサンプル中に見出されたもの）が認識していたという事実に基づき、グループ1ウイルスを対象とする。即ち、この態様では、H1N1型、H1N2型、H2N2型、H5N1型及びH5N2からなる群より選択される一又は二以上のウイルスが対象となる。

40

【0011】

50

本発明の判定方法では、VH1-69遺伝子を用いた抗体の存否が指標となる。換言すれば、VH1-69遺伝子を用いた抗体の存在、量、レパートリーなどによって、A型インフルエンザウイルスに対する抵抗性が判定される。

【0012】

VH1-69遺伝子はVLドメインがなくとも抗原結合サイトを形成して幅広く中和活性を示す抗体を作り出すことができる。「VH1-69遺伝子を用いた抗体」とは、Germline遺伝子であるVH1-69遺伝子が使用されたVH領域を備える抗体である。VH1-69遺伝子は、VH領域を構成するFR1、CDR1、FR2、CDR2及びFR3をコードする。従って、VH1-69遺伝子を用いた抗体」では、FR1～FR3のアミノ酸配列に高い相同性（共通性）が認められる。また、VH1-69遺伝子を用いた抗体では、53位のアミノ酸及び54位のアミノ酸が特徴的であり、この特徴が「VH1-69遺伝子を用いた抗体」の生理機能に重要であると考えられる。VH1-69遺伝子を用いた抗体では、通常、53位のアミノ酸残基は疎水性アミノ酸（イソロイシン、メチオニン、ロイシン、バリンなど）であり、54位のアミノ酸残基も疎水性アミノ酸（フェニルアラニン、ロイシンなど）である。典型的には、VH1-69遺伝子を用いた抗体の53位アミノ酸はイソロイシン、54位アミノ酸はフェニルアラニンである。尚、VH1-69遺伝子（FR1～FR3をコードする）の配列を配列番号127に示す。また、VH1-69遺伝子がコードするアミノ酸配列（FR1～FR3）を配列番号128に示す。

10

【0013】

被検者は特に限定されず、全ての年齢層のヒトが被検者となり得る。生体サンプルも特に限定されないが、抗体を検出できる生体サンプルが用いられる。生体サンプルの例を示すと、血液、血漿、血清、鼻汁、唾液である。好ましくは、調製が容易であることや侵襲性が低いことなどの理由から、血液サンプルを用いる。血液サンプルの中でも特に血清又は血漿をサンプルとして採用することが好ましい。尚、生体サンプルの調製は常法に従えばよい。

20

【0014】

本発明の方法では、典型的には以下のステップ（1）～（3）が行われる。

（1）インフルエンザワクチン接種後の被検者の生体サンプルと、VH1-69遺伝子を用いた抗体を認識する抗イディオタイプ抗体とを接触させるステップ

（2）生成する免疫複合体を検出するステップ

（3）ステップ（2）の検出結果に基づきA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力の強さを判定するステップであって、検出された免疫複合体の量がA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力の強さの指標となるステップ

30

【0015】

ステップ（1）では、予め用意した、インフルエンザワクチン接種後の被検者の生体サンプルと、VH1-69遺伝子を用いた抗体を認識する抗イディオタイプ抗体とを接触させる。ステップ（1）は、in vitroにおける抗原抗体反応であり、生体サンプル中にVH1-69遺伝子を用いた抗体が存在すれば、抗イディオタイプ抗体との間で免疫複合体が形成される。

【0016】

インフルエンザワクチンには、様々なウイルス株を利用できる。例えばH1N1型インフルエンザ（例えばA/California/7/2009pdm株、A/Suita/1/2009pdm株、A/New Caledonia/20/1999株、A/Solomon Islands/3/2006株、A/Brisbane/59/2007(Bri07)株）、H3N2型インフルエンザ（例えばA/Panama/2007/1999株）、H5N1型インフルエンザ（例えばA/Indonesia/5/2005/PR8-IBCDC-RG2株）の不活化ワクチン又は生ワクチンを用いることができる。

40

【0017】

ワクチン接種によって誘導された抗体が生体サンプルに十分含まれるように、ワクチン接種から5日～3週間経過した時点で採取した生体サンプルを用いるとよい。複数回（例えば2回）のワクチン接種後の生体サンプルを用いてもよく、その場合には、通常、最終のワクチン接種から5日～3週間経過した時点で採取した生体サンプルを用いることにする。

【0018】

50

ステップ(1)には、検出用抗体として、VH1-69遺伝子を用いた抗体を認識する抗イディオタイプ抗体が使用される。抗イディオタイプ抗体とは、抗体の超可変領域(CDR)を特異的に認識する抗体であり、VH1-69遺伝子を用いた抗体に特異的なものを本発明では使用する。上記の通り、VH1-69遺伝子を用いた抗体では53位のアミノ酸(典型的にはイソロイシン)及び54位のアミノ酸(典型的にはフェニルアラニン)が特徴的である。従って、これらのアミノ酸を含む領域を特異的に認識する抗イディオタイプ抗体を使用するとよい。本発明で使用する抗イディオタイプ抗体は公知の方法、例えば免疫学的手法、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法などを利用して調製すればよい。抗体の受託作製のサービスを提供する企業(例えば免疫生物研究所、株式会社アプロサイエンス)や機関もあり、当該サービスを利用して抗イディオタイプ抗体を用意することにしてもよい。抗イディオタイプ抗体はポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体(数種~数十種の抗体の混合物)、及びモノクローナル抗体のいずれでもよいが、好ましくはモノクローナル抗イディオタイプ抗体を用いる。

10

【0019】

生体サンプルと抗イディオタイプ抗体との接触は、生体サンプルに対して抗イディオタイプ抗体を添加することや、抗イディオタイプ抗体が固相化された部材(例えばウェル)に対して生体サンプルを添加することなどによって行われる。接触の具体的な態様や接触の条件などは、採用する測定法に応じて適宜設定すればよい。

【0020】

ステップ(2)では、ステップ(1)によって生成する免疫複合体を検出する。検出法(測定法)としてラテックス凝集法、蛍光免疫測定法(FIA法)、酵素免疫測定法(EIA法)、放射免疫測定法(RIA法)、ウエスタンブロット法を例示することができる。好ましい検出法としては、FIA法及びEIA法(ELISA法を含む)を挙げることができる。これらの方法によれば高感度、迅速且つ簡便に検出可能である。FIA法では蛍光標識した抗体を用い、蛍光をシグナルとして免疫複合体を検出する。一方、EIA法では酵素標識した抗体を用い、酵素反応に基づく発色ないし発光をシグナルとして免疫複合体を検出する。非競合法に限らず、競合法を用いることにしてもよい。

20

【0021】

ステップ(3)では、ステップ(2)の検出結果に基づきA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力の強さを判定する。本発明では、判定の際、検出された免疫複合体の量をA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力の強さの指標とする。典型的には、検出された免疫複合体の量に基づき、A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力の強さを判定する。ここでの判定は、その判定基準から明らかな通り、医師や検査技師など専門知識を有する者の判断によらずとも自動的/機械的に行うことができる。具体的な判定基準の例を以下に示す。

30

< 判定基準の例 >

- (a) 免疫複合体が検出されればA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力がある
- (b) 免疫複合体が検出されればA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力が強い
- (c) 免疫複合体の量が多いほどA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力が強い

【0022】

40

(定性的判定の例 1)

基準値よりも検出値が高いときに「A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力がある」と判定し、基準値よりも検出値が低いときに「A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力がない」と判定する。

(定性的判定の例 2)

基準値よりも検出値が高いときに「A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力が強い」と判定し、基準値よりも検出値が低いときに「A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力が弱い」と判定する。

(定性的判定の例 3)

検出できたとき(陽性の場合)に「A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力がある

50

」と判定し、検出できないとき（陰性の場合）に「A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力がない」と判定する。

（定性的判定の例4）

検出できたとき（陽性の場合）に「A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力が強い」と判定し、検出できないとき（陰性の場合）に「A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力が弱い」と判定する。

【0023】

（定量的判定の例）

以下に示すように検出値の範囲毎に抵抗力の強さを予め設定しておき、検出値から抵抗力を判定する。

測定値 < a : 抵抗力がない

a 測定値 < b : 抵抗力が弱い

b 測定値 < c : 抵抗力があるが十分ではない

c < 測定値 : 抵抗力が強い

この例では4段階に区分したが、区分数は任意に設定できる。区分数の例は2～7、好ましくは3～6である。

【0024】

本発明の一態様では、ワクチン接種前の生体サンプルとワクチン接種後の生体サンプルを比較してA型インフルエンザウイルスに対する抵抗力を判定する。即ち、この態様は、以下のステップ（4）も含む。

（4）インフルエンザワクチン接種前の被検者の生体サンプルと、VH1-69遺伝子を用いた抗体を認識する抗イディオタイプ抗体とを接触させることにより生成する免疫複合体を検出し、該免疫複合体の量と、ステップ（2）で検出された免疫複合体の量を比較し、比較結果に基づき、抵抗力の強さを判定するステップ

【0025】

比較の結果、ワクチン接種後に免疫複合体の量の増加が認められれば、A型インフルエンザウイルスに対する抵抗力が強いと判定することができる。また、VH1-69遺伝子を用いた抗体に関して応答性を把握することもできる。このように、ステップ（4）を行うことにより、補助的ではあるものの、有益な情報が得られる。また、ステップ（4）によって判定した場合、典型的には、被検者を以下の4グループに分類することができる。

（a）VH1-69遺伝子を用いた抗体（A型インフルエンザウイルスに対する中和抗体）を大量に保有する者

（b）VH1-69遺伝子を用いた抗体（A型インフルエンザウイルスに対する中和抗体）を少量保有する者

（c）VH1-69遺伝子を用いた抗体（A型インフルエンザウイルスに対する中和抗体）を保有しない者

（d）ワクチン接種後も、VH1-69遺伝子を用いた抗体（A型インフルエンザウイルスに対する中和抗体）が誘導されない者

【0026】

以上のように(a)～(d)に分類すれば、各グループに対して、例えば、以下のごとき対策を講じることができ、極めて有効且つ効率的なパンデミック対策を実現できる。

グループ(a)：基本的に対策は必要ない。

グループ(b)：H5N1型インフルエンザワクチン接種による、標的中和抗体産生細胞の選択的増殖刺激

グループ(c)：数種の異なるグループ1インフルエンザウイルスワクチンの接種による標的中和抗体の産生誘導

グループ(d)：グループ1インフルエンザウイルス中和ヒト抗体を予防・治療用抗体として準備し、必要に応じて投与

【0027】

2．インフルエンザウイルス抵抗力判定用のキット

10

20

30

40

50

本発明の第2の局面は本発明の判定方法に用いられるキットに関する。本発明のキットは、VH1-69遺伝子を用いた抗体を検出又は捕捉するため、VH1-69遺伝子を用いた抗体を特異的に認識する抗イディオタイプ抗体を主要構成要素として含む。抗イディオタイプ抗体はその用途に適するように必要に応じて標識化されている。抗体の標識化に使用可能な標識物質の例はフルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、オレゴングリーン等の蛍光色素、西洋ワサビペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等の酵素、ルミノール、アクリジン色素等の化学又は生物発光化合物、 ^{32}P 、 ^{131}I 、 ^{125}I 等の放射性同位体、及びビオチンを挙げることができる。抗イディオタイプ抗体を認識する標識化2次抗体をキットに含めることもできる。この場合には、通常、無標識の抗イディオタイプが用いられることになる、抗イディオタイプ抗体が固相化されていてもよい。固相化に用いる不溶性支持体は特に限定されない。例えばポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂や、ガラス等の水に不溶性の物質からなる不溶性支持体を用いることができる。不溶性支持体への抗体の担持は物理吸着又は化学吸着によって行うことができる。

【0028】

本発明の判定方法を実施する際に使用するその他の試薬（緩衝液、溶媒、ブロッキング用試薬、酵素の基質、発色試薬など）及び/又は装置ないし器具（容器、反応装置、蛍光リーダーなど）をキットに含めてもよい。また、コントロールや検量線の作成などに用いられるインフルエンザ株をキットに含めてもよい。尚、通常、本発明のキットには取り扱い説明書が添付される。

【実施例】

【0029】

A型インフルエンザウイルスのパンデミック対策に有効な手段の創出を目指し、以下の検討を行った。

【0030】

1. 材料と方法

(1) ウイルス

本検討では以下のインフルエンザウイルス株を使用した。A/H1N1pdm: A/California/7/2009pdm (Cal09), A/Suita/1/2009pdm (Sui09); A/H1N1: A/New Caledonia/20/1999 (NC99), A/Solomon Islands/3/2006 (SI06), A/Brisbane/59/2007(Bri07). A/H3N2: A/Panama/2007/1999. A/H5N1: A/Indonesia/5/2005/PR8-IBCDC-RG2. 括弧内は略称。

【0031】

(2) 抗体ライブラリーの構築

既報の方法（参考文献8）に従ってファージ抗体ライブラリーを構築した。概要を説明すると、まず、ワクチン接種の前後で、1947年生まれのドナーからアフエーシスで単球（血液3Lに相当する量）を回収した。回収した単球は 8.0×10^8 個（ワクチン接種前）又は 1.2×10^9 個（ワクチン接種後）のBリンパ球を含んでいた。既報のファージディスプレイ方法（参考文献17）に従って、巨大なコンビナトリアル抗体ライブラリーを構築した。ライブラリーサイズは、ワクチン接種前ではH鎖が 1.6×10^9 クローン、L鎖が 2.0×10^9 クローン、Fabが 1.4×10^{10} 、ワクチン接種後ではH鎖が 3.2×10^9 クローン、L鎖が 1.3×10^9 クローン、Fabが 2.6×10^{10} クローンであった。

【0032】

(3) ライブラリーのスクリーニング

既報の方法（参考文献17、18）に従い、ウイルス粒子に結合するファージを選択した。概要を説明すると、ホルマリン処理後のCal09株又はBri07株ウイルス粒子を使用してスクリーニングした。2回又は3回のパニングの後、E. coli (DH12S)細胞に溶出ファージを感染させ、100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン及び0.2%グルコースを含むLBプレートに播種した。ファージミドを保有するE. coliのコロニーをピックアップし、100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン、0.05%グルコース及び1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranosideを含む2 x YT培地を使用し、30℃で終夜培養した。E. coliの生育に伴い、Fab-cp3型抗体が培地中に分泌され

る(参考文献19)。Fab-cp3分子を含む培養上清を、H1N1ウイルス(スクリーニングに使用したウイルス株)及びH3H2ウイルスを抗原としたELISAに供した。H1のみに結合性を示すクローンを選択し、更なる解析に使用した。

【0033】

(4) ELISA

ホルマリン処理ウイルス粒子を96ウェルMaxisorp immunoplate (Nunc)にコートし、E. coliの培養上清に含まれるFab-cp3抗体を各ウェルに添加した。ウサギ抗cp3抗体(株式会社医学生物学研究所)とインキュベートした後、ウェルにペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG(H+L鎖; 株式会社医学生物学研究所)を添加し、更にインキュベートした。その後、HRP基質(OPD; 和光純薬工業株式会社)を各ウェルに添加し、発色させた。H₂SO₄の添加によりペルオキシダーゼ反応を停止させた後、492nmの吸光度を測定した。

10

【0034】

(5) 配列の解析

抗体クローンから単離したV_H断片のヌクレオチド配列をGenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit (BECKMAN COULTER)及びCEQ2000 DNA Analysis System (BECKMAN COULTER)を使用して決定した。T7ETZ (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (配列番号129)をV_Hシーケンス用プライマーに使用した。

【0035】

(6) ウイルス中和試験

ウイルス中和活性を測定するために、シングルサイクル法(VN)又はマルチサイクル法(M-VN)を実施した。200又は500 µg/mlのFab-pp型抗体又は2倍段階希釈した血清と等量の100 FFU インフルエンザウイルスを混合し、96ウェルプレートに用意したMDCK細胞に添加した。VN法では、混合物をインキュベートした後、血清フリーのMEMで洗浄し、0.4% BSAを含むMEMを使用して、37℃で15時間、培養した。M-VN法では、インキュベートの後、混合物を除くことなく、混合物と等量の0.4% BSA、5 µg/mlアセチル化トリプシン、0.5%メチルセルロースを含むMEMを細胞に添加し、37℃で28時間、培養した。続いて、細胞をエタノールで固定化し、PAP(ペルオキシダーゼ及び抗ペルオキシダーゼ)複合体で染色した。フォーカス当たり1以上の細胞(VN法の場合)を含むフォーカス又は4以上の細胞(M-VN法の場合)を含むフォーカスの数を計数した。結果を、Fab-pp型抗体についてはフォーカス減少率(%)で表し、血清については50%フォーカス減少率を示す、血清の希釈倍率の逆

20

30

【0036】

(7) ヘマグルチニン凝集阻害アッセイ

既報の方法(参考文献20)に従いHI試験を行った。概要を説明すると、段階希釈した160 µg/mlの精製Fab-pp型抗体又はドナー血清(PBSで希釈)を用意した。段階希釈したFab-pp型抗体又は血清をウェル当たり4 HAユニットのウイルスとブレインキュベートした。PBSで希釈した0.75%のモルモット赤血球細胞を各ウェルに添加し、室温で30~60分インキュベートした。結果は、ヘマグルチニン凝集を阻害した、Fab-pp型抗体の最小濃度(µg/ml)又は血清の最大希釈倍率の逆数で表した。

【0037】

(8) 競合ELISA

ウイルス株に対する結合活性の検出用抗体としてFab-pp型抗体又はC179を、競合物質としてFab-cp3型抗体を用いて、競合ELISAを実施した。使用前に培養上清内のFab-cp3分子を20倍濃縮した。ホルマリン不活化ウイルス粒子を96ウェルMaxisorp immunoplateにコートした。最適濃度にしたFab-pp型抗体(総量50 µl)を50 µlの20倍濃縮Fab-cp3型抗体と混合し、ウイルスでコートしたウェルに添加した。次に、ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ストレプトアビジン抗体を2次抗体として各ウェルに添加した。終濃度0.25 µg/mlのC179を使用したときには、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(H+L鎖; MBL)を2次抗体に使用した。続いて、HRP基質(OPD; 和光純薬株式会社)を各ウェルに添加し、発色させた。H₂SO₄の添加によりペルオキシダーゼ反応を停止させた後、492nmの吸光度を測定した。

40

50

【 0 0 3 8 】

(9) K1-18抗体の作製

5種類の1-69抗体のFab-pp型 (F081-007, F083-103, F083-115, F083-305, F083-311)を精製し、完全フロイントアジュバントとともにマウスの足底球に一回注入し、11日後にアジュバントなしでさらに一回注入した。2回目の注入の3日後、リンパ球を鼠径リンパ節から単離し、ミエローマ株化細胞P3-X63AG8.653と融合した。ハイブリドーマをクローニングした後、培養液を上述の1-69抗体とVH1-69遺伝子を使用していない様々な種類の抗体に対し、ELISAによりスクリーニングした。複数のVH1-69遺伝子を使用している抗体には結合するが、VH1-69遺伝子を使用していない抗体には結合しない抗体を選択した。K1-18抗体の単離は、株式会社モノクローナル抗体研究所(札幌, 日本)が実施した。

10

【 0 0 3 9 】

(1 0) VH1-69遺伝子を使用するIgGの血清中濃度の測定

ヒトIgG ELISA Quantitation set (Bethyl Laboratories, Inc)を多少の修正を加えて使用した。VH1-69遺伝子を使用するIgGの検出用にK1-18抗体を、標準曲線を作成するためにアフィニティー精製ヒトIgGコート抗体 (affinity purified Human IgG coating antibody) を96ウェルMaxisorp immuonoplateにコートした。血清及びヒト参照血清(Human reference serum; 標準曲線用)を所定のウェルに添加した。HRP結合ヒトIgG検出抗体とインキュベート後、TMB基質を各ウェルに添加した。H₂SO₄を添加してペルオキシダーゼ反応を停止させ、450nmの吸光度を測定した。ヒト参照血清を用いて作成した標準曲線を利用してK1-18抗体に結合したIgGの濃度を算出した。

20

【 0 0 4 0 】

(1 1) K1-18抗体の存在下での血清のウイルス中和活性

前述のウイルス中和試験を修正して使用した。概要を説明すると、RDEで処理した血清を血清フリー培地で希釈し (1:10又は1:20の希釈率)、等量のK1-18抗体 (800又は1,600 µg/ml) と混合した。インキュベート後、2倍段階希釈し、等量のインフルエンザウイルス (100 FFU) と混合し、96ウェルプレートに用意したMDCK細胞に添加した。インキュベート後、細胞をエタノールで固定し、PAP(ペルオキシダーゼ及び抗ペルオキシダーゼ)複合体で染色した。50%フォーカス減少率を示した、血清の希釈倍率の逆数をウイルス中和活性とした。

【 0 0 4 1 】

30

2 . 結果

(1) 異なる特徴を持つ2タイプの中和抗体

S-10Vのワクチンを接種することで誘導された抗体のレパートリーを解析した。ドナーは1947年生まれで、子供の頃に数回インフルエンザに感染し(おそらくH1N1型ウイルスとH2N2型ウイルス)、1968年にも感染している(おそらくH3N2型ウイルス)。その後41年間、インフルエンザにはかかっておらず、ワクチンも接種していない。ワクチン接種と血液採取のスケジュールは図4に示した。ワクチン接種と血液採取は、2009年10月末から12月中ごろの間に行っており、その間S-10Vによる自然感染はなかった。ワクチン接種前後におけるBリンパ球からそれぞれ巨大ライブラリーを作製し、パンデミックH1N1ワクチン株(A/Ca l i f o r n i a / 2 0 0 9 p d m)と季節性H1N1ワクチン株でスクリーニングを行った。2回または3回パ ニングを行った段階で120クローンをそれぞれ単離し、スクリーニングに使ったH1N1株に結合するクローンの解析をさらに行った。H1N1とH3N2両株に同じ強さで結合するクローンは抗NP抗体である可能性が高いため、解析からは除外した(参考文献8)。それぞれのスクリーニングで単離された240クローンのうち、抗HA抗体であると判断したクローンは次のようであった。スクリーニング1 (ワクチン接種後のBリンパ球より作製したライブラリーをパンデミック株でスクリーニング), 105クローン; スクリーニング2 (ワクチン接種前のBリンパ球より作製したライブラリーをパンデミック株でスクリーニング), 3クローン; スクリーニング3 (ワクチン接種後のBリンパ球より作製したライブラリーを季節性株でスクリーニング), 58クローン; スクリーニング1 (ワクチン接種前のBリンパ球より作製したライブラリーを季節性株でスクリーニング), 16クローン。これらクローン全てのV

40

50

Hの塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列を比較した結果、182クローンは96種類のモノクローナル抗体からなることが判明した。さらにアミノ酸配列の類似性、特にCDR3領域の同一性から、96種類は63グループに分類できた。VHのアミノ酸配列を図5に示した。

【0042】

63グループの代表クローンのHAに対する結合活性、赤血球凝集阻害反応、ウイルス中和活性を測定した(参考文献9)。図1に示したように、これらクローンの全てが例外なく2タイプに分類された。タイプ1に属するクローンは、パンデミックH1N1株には結合するが、季節性のH1N1株には結合活性は示さない。全てのクローンがHI活性を示し、スクリーニング1から単離されたクローンのみが属している。タイプ2はパンデミックH1N1株だけでなく、全ての季節性H1N1株にも結合する。HI活性はなく、ほとんどのクローンはH1N1株だけでなくH5N1株ウイルスも中和する。0%から5%という低い変異導入率から判断して、タイプ1のクローンの大半が、ワクチン接種により新しく誘導されたB細胞の産物であると考えられる。一方、10%から15%という高い変異導入率から判断して、数クローンを除いて、タイプ2に属するクローンの全ては、ワクチン接種前にすでに作られていた長寿命メモリーB細胞の産物であると考えられる。さらに、3クローンを除いて全てのクローンがVH1-69のgermline遺伝子を使用している。

【0043】

スクリーニング1から単離された105個のクローンのうち98個がタイプ1で7クローンがタイプ2である。タイプ2のクローンは季節性株だけでなくパンデミックウイルスのHAにも結合するので、この単離数の少なさは、血中のタイプ2の抗体を作る細胞の数が、タイプ1の抗体を作る細胞の数よりずっと少ないことを意味している。タイプ1では、98クローンが単離され、31グループに分類できた。31グループのうち、1クローンしか単離されていないのが19グループ、2クローン単離されているのが7グループであった。同じように、タイプ2の抗体では85クローンが単離され、32グループに分類できた。32グループのうち1クローンしか単離されていないのは14グループで、2クローンが単離されているのは8グループである。ポアソン分布から考えると、このスクリーニングでは単離できていないクローンがまだあるだろうと思われる。しかし、図1で示したクローンと大きく異なる特徴を持つクローンを見落としてはいないと考えている。

【0044】

(2) ワクチン接種後に新しく出現した抗体

実質的にタイプ1の抗体はすべてHI活性を示すので、それらのエピトープはシアル酸結合ポケットの周辺領域であると考えられる。これら抗体が認識するエピトープの相対的な位置を体系的に確かめるために、以前の研究で使った競合実験を行った(参考文献10)。ライブラリーのスクリーニング後は、それぞれの抗体はFab-cp3型であるが、それらは簡単にFab-pp型に変換できるようにベクター内で設計されている(参考文献11)。もし、クローンAが認識するエピトープがクローンBの認識するエピトープと重複しているならば、Fab-cp3型のクローンBが過剰量存在する時には、Fab-pp型のクローンAのHAに対する結合活性は大きく妨げられることになる。この原理を基にして、図1で示したタイプ1の抗体から選ばれた17クローンを使って、競合実験を行った。図2で示したように、17クローンのうち14クローンは、HAの結合に関しては互いによく競合した。F082-317、F082-254、F082-022の3クローンは、結合阻害の程度が低かった。この結果は、他のデータと一致する。F082-022はHI活性が非常に低い(タイター: 160 $\mu\text{g/ml}$)。F082-254はパンデミックウイルスだけでなく季節性ウイルスにも結合し、両ウイルス株を中和する。さらに、高い変異導入率を示している(18%)。F082-317は、HAに対する結合活性は高いが、中和活性は相対的には低い。

【0045】

これらの結果から、HA上のシアル酸結合ポケットとその周辺領域は、免疫原性という点では非常に強い影響力を持ち、ワクチンの接種により新たに成長が誘導されて増殖したB細胞は実質上全てこれらの領域を認識する抗体を作り出すと結論付けた。また、ホルマリンで処理され、生きてはいないウイルスの精製産物をワクチンとして接種したときには、

HAには結合するがウイルスを中和しない抗体を作り出すB細胞は十分量誘導されないと考えている。このことから、HA上の中和に関与しないエピトープは、たとえそれが存在していたとしても免疫原性という点では大きな影響力はないことが示唆される。

【 0 0 4 6 】

(3) 長寿命メモリーB細胞から作られる抗体

タイプ2のクローンは32グループに分類されるが、3クローンを除いて全てVH1-69遺伝子を使っていた。さらに、これら抗体の大半がH1N1ウイルスだけでなくH5N1ウイルスも中和できた。このことから、いくつかのグループが示してきたように、C179抗体が認識するエピトープの近くにこれら抗体のエピトープがあると考えられた(参考文献12、13)。そこで、C179抗体のHAに対する結合が、これらクローンのFab-cp3型が過剰量存在することで妨げられるかどうかを検討した。図3に示したように、VH1-69遺伝子を使っていない3クローンを含むクローンの全てが、C179のHAへの結合を阻害した。このようにタイプ2のクローンは、すでに他グループが報告しているCR6261やF10のようなVH1-69遺伝子を使っているほかの抗体と同じかよく似た方法でHAの膜近傍の軸索(stem)に結合していると考えられる(参考文献12、13)。図3では、F081-268、F082-243、F082-237、F083-373の4クローンは他のクローンよりも阻害活性が低いことを示している。図1で示したデータで、F081-268はHA結合活性は強いが中和活性は弱いことを示している。他の3クローンは結合活性も中和活性も相対的に弱い。このように、タイプ2の抗体が認識するエピトープは、C179が認識するエピトープと正確には同じではないが、C179のエピトープと全く異なる場所をエピトープとするクローンはなかった。このことは、このエピトープがグループ1ウイルス間で共有されており、安定に保たれていることを示唆している。このエピトープの免疫原性がたとえ弱かったとしても、一度ヒトがこのエピトープを認識する抗体を産生するB細胞を獲得してしまえば、そのB細胞は体内でメモリー細胞として長期間残り、グループ1ウイルスに対し主要な働きをするだろう。興味深いことに、F083-115はVH1-69遺伝子を使っているが、H3ウイルスも中和できる。

【 0 0 4 7 】

タイプ2の抗体として単離された84クローンは、49種類のクローンから構成され、32グループに分類できる。それぞれのグループは、B細胞が分化しているときには、それぞれが独立して成熟したB細胞から作られた抗体群であると考えられるが、図1で異なったグループに分類されたクローンのいくつかは同じB細胞から誘導されているのかもしれない。たとえそうだったとしても、図1で要約したクローンのリストでは、VH1-69遺伝子を使う10個以上のB細胞が、おそらくドナーが若かったときにドナーの体内にそれぞれ独立して作られたことを示している。16個の抗HA抗体がスクリーニング4(ワクチン接種前のライブラリーを季節性株でスクリーニング)から単離されているが、季節性のH1N1ウイルスには結合するがパンデミックウイルス株には結合しないというクローンはなく、全てタイプ2の抗体であった。このスクリーニングで使われたライブラリーは、ワクチンを接種する前のB細胞から作られているので、スクリーニング4から単離されたクローンの特徴に、ワクチン接種によるタイプ1のB細胞の増殖の影響はない。もし、季節性H1N1ウイルスのHA頭部に結合する抗体を産生するB細胞が十分なレベルで存在しているのであれば、そのようなクローンが単離できているはずである。この研究で使われた方法は、以前の研究で、3人の血液ドナーでのH3N2ウイルスに対する中和抗体のレパートリー解析に使われた(参考文献8、10)。ワクチン接種のステップは含まれておらず、単離された抗体の多くはHA頭部に結合した(参考文献10、14)。これらのことから、グループ1ウイルス全てを中和する1-69抗体は、ドナーの体内で長期にわたりインフルエンザAグループ1に対し、主要な役割を果たしていると結論付けた。

【 0 0 4 8 】

(4) 血清中に分泌された抗体の存在

3種類のウイルス(H1N1パンデミック株、季節性H1N1株とH5N1株)に対する2種類の生物活性、HI活性とウイルス中和活性を図4で示したように、異なった日にドナーから採取した8種類の血清サンプルに対して測定した。

【 0 0 4 9 】

図 6 で示したように、HI 活性の場合は、季節性 H1N1 および H5N1 ウイルスに対する活性はどの血清でも検出できなかった。H1N1 パンデミックウイルスに対する HI 活性は 1 回目のワクチン接種後 2 週間で現れ始めた。一般的なフォーカス減少法により測定されたウイルス中和試験の場合では、パンデミック H1N1 ウイルスに対する活性はワクチン接種後 1 週間ですでに上昇し始め、2 週間後には安定な状態に達した。季節性 H1N1 ウイルスに対しては、ウイルス中和活性はワクチンを接種する前からすでに検出されており、ワクチン接種後 1 週間で上昇した。H5N1 ウイルスに対しては、一般的なフォーカス減少法では検出できなかったが（参考文献 9）、方法の欄で述べたように、より感度の高い方法では検出できた（参考文献 15）。

10

【 0 0 5 0 】

H5N1 ウイルスに対する中和活性は、ドナーの体内で H1N1 とおそらく H2N2 に対しもともと作られた一連の抗体から誘導されたと考えられる。それゆえ、季節性 H1N1 ウイルスと H5N1 ウイルス間で観察された違いは活性の強さの違い、つまり、季節性 H1N1 ウイルスに対する活性は H5N1 ウイルスに対するよりも数倍強いことによるのかもしれない。季節性ウイルスに対する中和活性がワクチン接種前でさえ検出可能であることは、注目すべきことである。

【 0 0 5 1 】

1-69 抗体が実際に H1N1 パンデミックウイルスの中和に役割を果たしているかを証明するため、1-69 抗体に特異的に結合する抗体、即ち抗イディオタイプ抗体を作製した。ヒトの 1-69 抗体の VH ドメインでは、2 個の疎水性アミノ酸 (53 番目のイソロイシンと 54 番目のフェニルアラニン) が CDR2 領域に存在することが非常に特徴的であり（参考文献 16）、そのためこのアミノ酸を含む領域がマウスでは免疫原性が高いであろうことを期待した。さらに、これら 2 個のアミノ酸は HA と抗体の結合に直接関与しているため（参考文献 12、13）、抗イディオタイプ抗体が 1-69 抗体の HA への結合を阻害するかもしれないと予想した。作製の結果、図 1 で示した 1-69 抗体の 80% 以上に結合し、その半数の 1-69 抗体の HA への結合を阻害することができるモノクローナル抗体 K1-18 を単離した（詳細は方法の欄と図 8）。

20

【 0 0 5 2 】

K1-18 抗体をプローブにを使って、血清中の 1-69 抗体の IgG 量を測定した。その結果、ワクチン接種前の 10 月 30 日に採取した血清中には 1-69 抗体が $4.58 \mu\text{g/ml}$ の濃度で存在していたが、ワクチン接種後の 12 月 14 日に採取した血清中では 1-69 抗体の濃度が $11.24 \mu\text{g/ml}$ まで上昇した。パンデミックウイルスと季節性ウイルスに対する中和活性を K1-18 抗体存在下で測定した。図 7 で示したように、H1N1 パンデミックウイルスについては、K1-18 は明らかに中和活性を阻害した。季節性 H1N1 については、明らかに阻害しているが、完全阻害ではなかった。このように、1-69 抗体が実際に血清中に存在し、H1N1 ウイルスの中和に機能していることが示された。さらに、図 7 のデータより、機能的に異なる 2 タイプの抗体、即ち、HA/レセプターとの結合を阻害するタイプ 1 と、低 pH によって誘導される HA のコンフォメーションの変化を阻害するタイプ 2 が共存するときにはウイルス中和活性が相乗効果的に上昇することが示唆された。

30

40

【 0 0 5 3 】

3. 展望

以前に報告した研究において本発明者らの研究グループは、1968 年から 2004 年の間に単離された 12 種類の異なる H3 株に対する抗 HA 抗体の多量の単離を通して、3 人のヒトの中和抗体レパートリーを解析した（参考文献 8、10、14）。1960 年と 1944 年に生まれた二人のドナーから単離された抗体の大半は、異なる株特異性を持つ 3 つのグループ（1968～1973 の株特異的、1977～1993 の株特異的、1997～2003 の株特異的）に分類された。HA 頭部に位置する A、B、C、D、E といった 5 つのサイトが中和エピトープとして単離されているが、1977～1993 年の株を中和するクローンの多くはサイト C に結合した。1974 年に生まれた 3 番目のドナーから単離されたクローンは 4 タイプに分類できた。タイプ 1 は 1973 年株に強く

50

結合し、株特異性も狭かった。タイプ2は1997年～2003年の株のHAに結合した。他の2タイプは幅広く株を中和する抗体であった。ひとつはH3N2全てを中和する抗体であり、もうひとつはH3だけでなくH1、H2、H5を含むグループ1のウイルスも中和する抗体であった。ウイルスを中和することのできる抗体を作る一連のB細胞が感染やワクチン接種によって免疫されることにより作られた後、更なる抗原刺激により、異なるコースをたどるだろう。あるB細胞は消えてなくなり、他のB細胞はメモリー細胞として残る。さらに、それらは長寿命のメモリー細胞と短寿命のメモリー細胞になるはずである。ほぼ毎年インフルエンザを経験しているヒトは、以前のウイルスから変化した新しいインフルエンザウイルスに感染する機会があるはずである。あるメモリー細胞は新しいウイルスを中和できる抗体を産生し、ある細胞は中和できない抗体を作る。それらは、抗原刺激があるかないかで選択されているはずである。この仮説に従えば、エピトープの安定性はメモリーB細胞の運命に大きな影響を与えていると考えられる。今回の研究では、グループ1ウイルスを中和することのできる1-69抗体を産生する細胞のみが、ドナーの体内にメモリー細胞として残っていたことを示していた。この実験では、若い頃にはインフルエンザを経験したが、その後全くかかっていないヒトを解析の対象とした。ドナーはインフルエンザワクチンをこれまで接種していないため、ドナーの体内で作られた抗体レパートリーは、生きているウイルス感染の影響のみで作られたと考えられる。ホルマリン処理されたウイルスで何回もワクチンを受けているヒトの体内で形成された抗体レパートリーは、この研究で示されたようにシンプルな傾向は示さないだろう。さらに、この研究では一人のヒトを対象としている。しかし、全てのヒトでグループ1ウイルスを幅広く中和することのできる1-69抗体を作ることができると思われる。なぜなら、VH1-69遺伝子のみが、VLドメインがなくても抗原結合サイトを形成して幅広く中和活性を示す抗体を作ることができ、さらに、VHのCDR3領域の、HAの軸索部分への結合への関与は限られているようである。タイプ2の抗体が病原性鳥インフルエンザ(HPAI)H5N1ウイルスによって将来引き起こされると考えられているパンデミックでの感染を防ぐのに十分に強力であるかどうかは更なる検証が必要であるが、タイプ2抗体を産生するクローンがメモリー細胞として存在していることは、その体内でパンデミックウイルスが増殖するのを防ぐのに役立つといえる。H5N1パンデミックへの対処法は、それぞれの個人の免疫プロファイルによって構築されたほうが良いと考えられる。VH1-69遺伝子を使っている抗HA抗体(1-69抗体)の存在は、インフルエンザウイルスを幅広く中和する抗体が体内に存在していることを示すのに役立つ指標となる。また、1-69抗体に対する抗イディオタイプ抗体は、インフルエンザウイルスを幅広く中和する抗体の検出に有用な試薬となるであろう。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明はA型インフルエンザウイルスのパンデミック対策に有用である。本発明を利用することにより、合理的且つ効率的なパンデミック対策を講じることが可能になる。

【0055】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

【0056】

<参考文献>

1. Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Ann. Rev. Biochem.* 69, 531-569 (2000).
2. Knossow, M. et al. Mechanism of neutralization of influenza virus infectivity by antibodies. *Virology* 302, 294-298 (2002).
3. Okuno, Y., Isegawa, Y., Sasao, F. & Ueda, S. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. *J. Virol.* 67, 2552-2558 (1993).

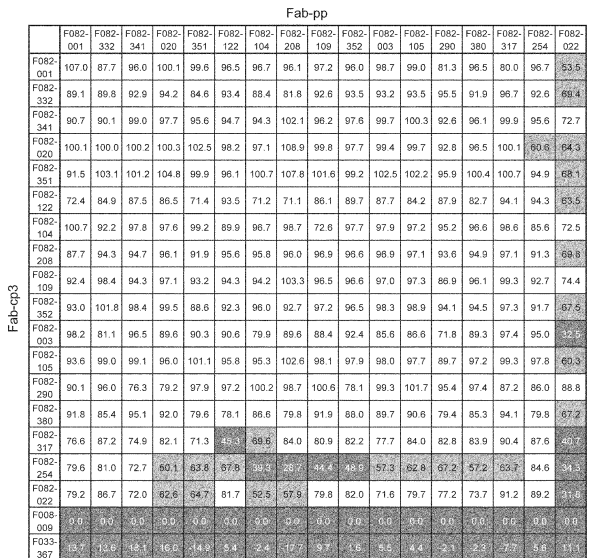
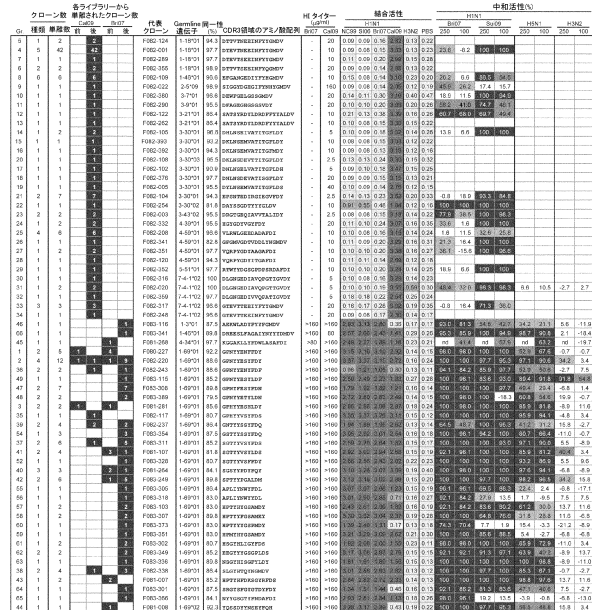
4. Fraser, C. et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science* 324, 1557-1561 (2009).
5. Hancock, K. et al. Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N. Engl. J. Med.* 361, 1945-1952 (2009).
6. Wrammert, J. et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 208, 181-193 (2011).
7. Li, G.M. et al. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 9047-9052 (2012).
8. Okada, J. et al. Monoclonal antibodies in man that neutralized H3N2 influenza viruses were classified in to three groups with distinct strain specificity: 1968-1973, 1977-1993 and 1997-2003. *Virology* 397, 322-330 (2010).
9. Okuno, Y. et al. Rapid focus reduction neutralization test of influenza A and B viruses in microtiter system. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1308-1313 (1990).
10. Ohshima, N. et al. Naturally occurring antibodies in humans can neutralize a variety of influenza virus strains, including H3, H1, H2, and H5. *J. Virol.* 85, 11048-11057 (2011).
11. Ito, W. & Kurosawa, Y. Development of an artificial antibody system with multiple valency using an Fv fragment fused to a fragment of protein A. *J. Biol. Chem.* 268, 20668-20675 (1993).
12. Sui, J. et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 265-273 (2009).
13. Ekiert, D.C. et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324, 246-251 (2009).
14. Okada, J. et al. Localization of epitopes recognized by monoclonal antibodies that neutralized the H3N2 influenza viruses in man. *J. Gen. Virol.* 92, 326-335 (2011).

【配列表フリーテキスト】

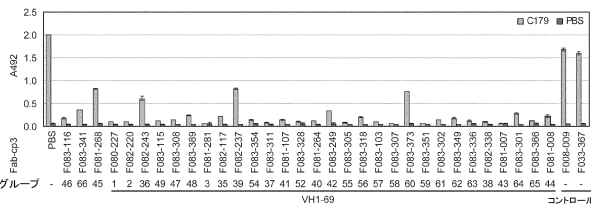
【 0 0 5 7 】

配列番号 1 2 9 : 人工配列の説明 : primer T7ETZ

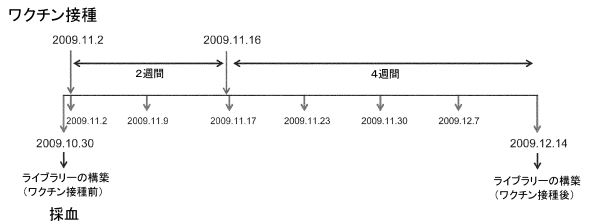
【圖 2】



【图 3】



【 図 6 】

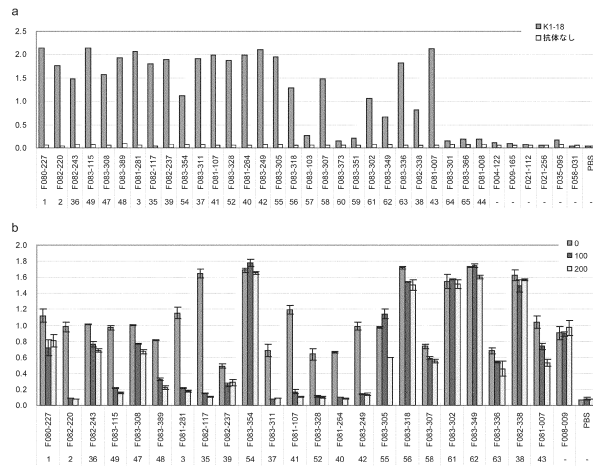


【圖 7】

アセンブリ	PC	PC+1	PC+2	PC+3	PC+4	PC+5	PC+6	PC+7	PC+8	PC+9	PC+10	PC+11	PC+12	PC+13	PC+14	PC+15	PC+16	PC+17	PC+18	PC+19	PC+20	PC+21	PC+22	PC+23	PC+24	PC+25	PC+26	PC+27	PC+28	PC+29	PC+30	PC+31	PC+32	PC+33	PC+34	PC+35	PC+36	PC+37	PC+38	PC+39	PC+40	PC+41	PC+42	PC+43	PC+44	PC+45	PC+46	PC+47	PC+48	PC+49	PC+50	PC+51	PC+52	PC+53	PC+54	PC+55	PC+56	PC+57	PC+58	PC+59	PC+60	PC+61	PC+62	PC+63	PC+64	PC+65	PC+66	PC+67	PC+68	PC+69	PC+70	PC+71	PC+72	PC+73	PC+74	PC+75	PC+76	PC+77	PC+78	PC+79	PC+80	PC+81	PC+82	PC+83	PC+84	PC+85	PC+86	PC+87	PC+88	PC+89	PC+90	PC+91	PC+92	PC+93	PC+94	PC+95	PC+96	PC+97	PC+98	PC+99	PC+100	PC+101	PC+102	PC+103	PC+104	PC+105	PC+106	PC+107	PC+108	PC+109	PC+110	PC+111	PC+112	PC+113	PC+114	PC+115	PC+116	PC+117	PC+118	PC+119	PC+120	PC+121	PC+122	PC+123	PC+124	PC+125	PC+126	PC+127	PC+128	PC+129	PC+130	PC+131	PC+132	PC+133	PC+134	PC+135	PC+136	PC+137	PC+138	PC+139	PC+140	PC+141	PC+142	PC+143	PC+144	PC+145	PC+146	PC+147	PC+148	PC+149	PC+150	PC+151	PC+152	PC+153	PC+154	PC+155	PC+156	PC+157	PC+158	PC+159	PC+160	PC+161	PC+162	PC+163	PC+164	PC+165	PC+166	PC+167	PC+168	PC+169	PC+170	PC+171	PC+172	PC+173	PC+174	PC+175	PC+176	PC+177	PC+178	PC+179	PC+180	PC+181	PC+182	PC+183	PC+184	PC+185	PC+186	PC+187	PC+188	PC+189	PC+190	PC+191	PC+192	PC+193	PC+194	PC+195	PC+196	PC+197	PC+198	PC+199	PC+200	PC+201	PC+202	PC+203	PC+204	PC+205	PC+206	PC+207	PC+208	PC+209	PC+210	PC+211	PC+212	PC+213	PC+214	PC+215	PC+216	PC+217	PC+218	PC+219	PC+220	PC+221	PC+222	PC+223	PC+224	PC+225	PC+226	PC+227	PC+228	PC+229	PC+230	PC+231	PC+232	PC+233	PC+234	PC+235	PC+236	PC+237	PC+238	PC+239	PC+240	PC+241	PC+242	PC+243	PC+244	PC+245	PC+246	PC+247	PC+248	PC+249	PC+250	PC+251	PC+252	PC+253	PC+254	PC+255	PC+256	PC+257	PC+258	PC+259	PC+260	PC+261	PC+262	PC+263	PC+264	PC+265	PC+266	PC+267	PC+268	PC+269	PC+270	PC+271	PC+272	PC+273	PC+274	PC+275	PC+276	PC+277	PC+278	PC+279	PC+280	PC+281	PC+282	PC+283	PC+284	PC+285	PC+286	PC+287	PC+288	PC+289	PC+290	PC+291	PC+292	PC+293	PC+294	PC+295	PC+296	PC+297	PC+298	PC+299	PC+300	PC+301	PC+302	PC+303	PC+304	PC+305	PC+306	PC+307	PC+308	PC+309	PC+310	PC+311	PC+312	PC+313	PC+314	PC+315	PC+316	PC+317	PC+318	PC+319	PC+320	PC+321	PC+322	PC+323	PC+324	PC+325	PC+326	PC+327	PC+328	PC+329	PC+330	PC+331	PC+332	PC+333	PC+334	PC+335	PC+336	PC+337	PC+338	PC+339	PC+340	PC+341	PC+342	PC+343	PC+344	PC+345	PC+346	PC+347	PC+348	PC+349	PC+350	PC+351	PC+352	PC+353	PC+354	PC+355	PC+356	PC+357	PC+358	PC+359	PC+360	PC+361	PC+362	PC+363	PC+364	PC+365	PC+366	PC+367	PC+368	PC+369	PC+370	PC+371	PC+372	PC+373	PC+374	PC+375	PC+376	PC+377	PC+378	PC+379	PC+380	PC+381	PC+382	PC+383	PC+384	PC+385	PC+386	PC+387	PC+388	PC+389	PC+390	PC+391	PC+392	PC+393	PC+394	PC+395	PC+396	PC+397	PC+398	PC+399	PC+400	PC+401	PC+402	PC+403	PC+404	PC+405	PC+406	PC+407	PC+408	PC+409	PC+410	PC+411	PC+412	PC+413	PC+414	PC+415	PC+416	PC+417	PC+418	PC+419	PC+420	PC+421	PC+422	PC+423	PC+424	PC+425	PC+426	PC+427	PC+428	PC+429	PC+430	PC+431	PC+432	PC+433	PC+434	PC+435	PC+436	PC+437	PC+438	PC+439	PC+440	PC+441	PC+442	PC+443	PC+444	PC+445	PC+446	PC+447	PC+448	PC+449	PC+450	PC+451	PC+452	PC+453	PC+454	PC+455	PC+456	PC+457	PC+458	PC+459	PC+460	PC+461	PC+462	PC+463	PC+464	PC+465	PC+466	PC+467	PC+468	PC+469	PC+470	PC+471	PC+472	PC+473	PC+474	PC+475	PC+476	PC+477	PC+478	PC+479	PC+480	PC+481	PC+482	PC+483	PC+484	PC+485	PC+486	PC+487	PC+488	PC+489	PC+490	PC+491	PC+492	PC+493	PC+494	PC+495	PC+496	PC+497	PC+498	PC+499	PC+500	PC+501	PC+502	PC+503	PC+504	PC+505	PC+506	PC+507	PC+508	PC+509	PC+510	PC+511	PC+512	PC+513	PC+514	PC+515	PC+516	PC+517	PC+518	PC+519	PC+520	PC+521	PC+522	PC+523	PC+524	PC+525	PC+526	PC+527	PC+528	PC+529	PC+530	PC+531	PC+532	PC+533	PC+534	PC+535	PC+536	PC+537	PC+538	PC+539	PC+540	PC+541	PC+542	PC+543	PC+544	PC+545	PC+546	PC+547	PC+548	PC+549	PC+550	PC+551	PC+552	PC+553	PC+554	PC+555	PC+556	PC+557	PC+558	PC+559	PC+560	PC+561	PC+562	PC+563	PC+564	PC+565	PC+566	PC+567	PC+568	PC+569	PC+570	PC+571	PC+572	PC+573	PC+574	PC+575	PC+576	PC+577	PC+578	PC+579	PC+580	PC+581	PC+582	PC+583	PC+584	PC+585	PC+586	PC+587	PC+588	PC+589	PC+590	PC+591	PC+592	PC+593	PC+594	PC+595	PC+596	PC+597	PC+598	PC+599	PC+600	PC+601	PC+602	PC+603	PC+604	PC+605	PC+606	PC+607	PC+608	PC+609	PC+610	PC+611	PC+612	PC+613	PC+614	PC+615	PC+616	PC+617	PC+618	PC+619	PC+620	PC+621	PC+622	PC+623	PC+624	PC+625	PC+626	PC+627	PC+628	PC+629	PC+630	PC+631	PC+632	PC+633	PC+634	PC+635	PC+636	PC+637	PC+638	PC+639	PC+640	PC+641	PC+642	PC+643	PC+644	PC+645	PC+646	PC+647	PC+648	PC+649	PC+650	PC+651	PC+652	PC+653	PC+654	PC+655	PC+656	PC+657	PC+658	PC+659	PC+660	PC+661	PC+662	PC+663	PC+664	PC+665	PC+666	PC+667	PC+668	PC+669	PC+670	PC+671	PC+672	PC+673	PC+674	PC+675	PC+676	PC+677	PC+678	PC+679	PC+680	PC+681	PC+682	PC+683	PC+684	PC+685	PC+686	PC+687	PC+688	PC+689	PC+690	PC+691	PC+692	PC+693	PC+694	PC+695	PC+696	PC+697	PC+698	PC+699	PC+700	PC+701	PC+702	PC+703	PC+704	PC+705	PC+706	PC+707	PC+708	PC+709	PC+710	PC+711	PC+712	PC+713	PC+714	PC+715	PC+716	PC+717	PC+718	PC+719	PC+720	PC+721	PC+722	PC+723	PC+724	PC+725	PC+726	PC+727	PC+728	PC+729	PC+730	PC+731	PC+732	PC+733	PC+734	PC+735	PC+736	PC+737	PC+738	PC+739	PC+740	PC+741	PC+742	PC+743	PC+744	PC+745	PC+746	PC+747	PC+748	PC+749	PC+750	PC+751	PC+752	PC+753	PC+754	PC+755	PC+756	PC+757	PC+758	PC+759	PC+760	PC+761	PC+762	PC+763	PC+764	PC+765	PC+766	PC+767	PC+768	PC+769	PC+770	PC+771	PC+772	PC+773	PC+774	PC+775	PC+776	PC+777	PC+778	PC+779	PC+780	PC+781	PC+782	PC+783	PC+784	PC+785	PC+786	PC+787	PC+788	PC+789	PC+790	PC+791	PC+792	PC+793	PC+794	PC+795	PC+796	PC+797	PC+798	PC+799	PC+800	PC+801	PC+802	PC+803	PC+804	PC+805	PC+806	PC+807	PC+808	PC+809	PC+810	PC+811	PC+812	PC+813	PC+814	PC+815	PC+816	PC+817	PC+818	PC+819	PC+820	PC+821	PC+822	PC+823	PC+824	PC+825	PC+826	PC+827	PC+828	PC+829	PC+830	PC+831	PC+832	PC+833	PC+834	PC+835	PC+836	PC+837	PC+838	PC+839	PC+840	PC+841	PC+842	PC+843	PC+844	PC+845	PC+846	PC+847	PC+848	PC+849	PC+850	PC+851	PC+852	PC+853	PC+854	PC+855	PC+856	PC+857	PC+858	PC+859	PC+860	PC+861	PC+862	PC+863	PC+864	PC+865	PC+866	PC+867	PC+868	PC+869	PC+870	PC+871	PC+872	PC+873	PC+874	PC+875	PC+876	PC+877	PC+878	PC+879	PC+880	PC+881	PC+882	PC+883	PC+884	PC+885	PC+886	PC+887	PC+888	PC+889	PC+890	PC+891	PC+892	PC+893	PC+894	PC+895	PC+896	PC+897	PC+898	PC+899	PC+900	PC+901	PC+902	PC+903	PC+904	PC+905	PC+906	PC+907	PC+908	PC+909	PC+910	PC+911	PC+912	PC+913	PC+914	PC+915	PC+916	PC+917	PC+918	PC+919	PC+920	PC+921	PC+922	PC+923	PC+924	PC+925	PC+926	PC+927	PC+928	PC+929	PC+930	PC+931	PC+932	PC+933	PC+934	PC+935	PC+936	PC+937	PC+938	PC+939	PC+940	PC+941	PC+942	PC+943	PC+944	PC+945	PC+946	PC+947	PC+948	PC+949	PC+950	PC+951	PC+952	PC+953	PC+954	PC+955	PC+956	PC+957	PC+958	PC+959	PC+960	PC+961	PC+962	PC+963	PC+964	PC+965	PC+966	PC+967	PC+968	PC+969	PC+970	PC+971	PC+972	PC+973	PC+974	PC+975	PC+976	PC+977	PC+978	PC+979	PC+980	PC+981	PC+982	PC+983	PC+984	PC+985	PC+986	PC+987	PC+988	PC+989	PC+990	PC+991	PC+992	PC+993	PC+994	PC+995	PC+996	PC+997	PC+998	PC+999	PC+1000
-------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---------

	A/Suita/1/2009H1N1pdm			A/Brisbane/59/2007(H1N1)		
	K1-18 (μg/mL)の濃度			K1-18 (μg/mL)の濃度		
採血日	800	400	0	800	400	0
2009.11.02	<40	<40	40	<20	<20	20
2009.11.09	80	320	320	<40	<40	40
2009.11.17	640	640	1280	40	40	40
2009.11.03	320	640	2560	40	40	40
2009.12.07	320	640	2560	40	40	80
2009.12.14	320	320	2560	<40	40	80

【図 8】



【配列表】

0006288621000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2010-502207(JP,A)

国際公開第2012/029997(WO,A1)

Daniel LINGWOOD et al, Structural and genetic basis for development of broadly neutralizing influenza antibodies, Nature, 2012年 9月27日, Vol.489, No.7417, Page.566-570

Nobuko OHSHIMA et al., Naturally Occurring Antibodies in Humans Can Neutralize a Variety of Influenza Virus Strains, J. Virol., 2011年 8月, Vol.85, No.21, P.11048-11057

Okada, J. et al., Monoclonal antibodies in man that neutralized H3N2 influenza viruses were classified in to three groups, Virology, 2010年, Vol.397, P.322-330

Taia T. WANG & Peter PALESE, Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins?, Nature structural & Molecular Biology, 2009年 3月, Vol.16, No.3, P.233-234

永田恭介, ウィルス抵抗性を支配する細胞遺伝子産物の機能解析, 旭硝子財団助成研究成果報告, 1995年12月, Vol.1995, P.283-290

Jianhua SUI et al., Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A virus, Nat. Struct. Mol. Biol., 2009年, Vol.16, P.265-273

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	确定对流感病毒的抗性的方法		
公开(公告)号	JP6288621B2	公开(公告)日	2018-03-07
申请号	JP2015532853	申请日	2014-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人藤田学園		
申请(专利权)人(译)	学校法人藤田学園		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人藤田学園		
[标]发明人	黒澤良和 大島信子		
发明人	黒澤 良和 大島 信子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 C07K16/42 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/686 C07K16/1018 C07K2317/21 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/76 G01N33/56983 G01N2333/11		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/569.L C07K16/42.ZNA C12N15/00.A C12P21/08		
代理人(译)	萩野 干治		
优先权	2013172902 2013-08-23 JP		
其他公开文献	JPWO2015025825A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种提供有效手段作为处理流感病毒大流行的对策的方法。使用源自受试者的生物样品中VH1-69基因的抗体的存在或作为指示，确定对A型流感病毒的抗性。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6288621号 (P6288621)
(45) 発行日 平成30年3月7日 (2018.3.7)	(24) 登録日 平成30年2月16日 (2018.2.16)	
(51) Int. Cl. G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2006.01) G 0 1 N 3 3 / 5 6 9 (2006.01) C 0 7 K 1 6 / 4 2 (2006.01) C 1 2 N 1 5 / 0 9 (2006.01) C 1 2 P 2 1 / 0 8 (2006.01)	F I G O 1 N 3 3 / 5 3 N G O 1 N 3 3 / 5 6 9 L C O 7 K 1 6 / 4 2 Z N A C 1 2 N 1 5 / 0 0 A C 1 2 P 2 1 / 0 8	
(21) 出願番号 特願2015-532853 (P2015-532853)	(73) 特許権者 000125381 学校法人藤田学園	
(86) (22) 出願日 平成26年8月18日 (2014.8.18)	愛知県豊明市岩手町田栗ヶ窪1番地98	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/071591	(74) 代理人 100114362 弁理士 萩野 幹治	
(87) 国際公開番号 W02015/025825	(72) 発明者 黒澤 良和 愛知県豊明市岩手町田栗ヶ窪1番地98	
(87) 国際公開日 平成27年2月26日 (2015.2.26)	学校法人藤田学園 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所内	
審査請求日 平成29年7月14日 (2017.7.14)	(72) 発明者 大島 信子 愛知県豊明市岩手町田栗ヶ窪1番地98	
(31) 優先権主張番号 特願2013-172902 (P2013-172902)	学校法人藤田学園 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所内	
(32) 優先日 平成25年8月23日 (2013.8.23)	審査官 海野 佳子	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルスに対する抵抗力の判定方法