

### 3.4 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する HI 抗体価測定試験

#### 3.4.1 試薬調製

- (1) RDE II 「生研」に生理食塩水 20mL を添加し、溶解する。

#### 3.4.2 血清の前処理

一容の血清に三容の RDE 液を添加し、37°C で 18~20 時間反応させる。反応終了後、56°C で 60 分間加温し、六容の生理食塩水を添加する。

#### 3.4.3 血球吸収処理

- (1) 洗浄済みウマ血球浮遊液を、前処理済み血清に添加する。転倒混和し、室温で 60 分間吸収する。途中転倒混和し、血球が沈殿しないようにする。
- (2) 遠心分離後、上清を回収し検体とする。

#### 3.4.4 HA 価の測定

- (1) 50  $\mu$ L の PBS を全てのウェルに分注する。
- (2) 抗原液 50  $\mu$ L を 1 列目のウェルに添加する。
- (3) 1 列目のウェルを混和後、50  $\mu$ L を取り順次 2 倍階段希釈を行う。
- (4) 全てのウェルにウマ血球浮遊液を添加する。
- (5) 攪拌後、室温で 2 時間反応し、判定する。完全凝集を認める抗原の最高希釈倍数の逆数を HA 価とする。
- (6) 求められた抗原の HA 価から、4 HA/25  $\mu$ L となるように抗原を希釈し、HI 抗体価測定試験用抗原とする。

#### 3.4.5 バックタイトレーション

- (1) HI 抗体価測定試験用抗原について HA 価の測定を実施し、4 HA/25  $\mu$ L に調製されていることを確認する。

#### 3.4.6 HI 試験

- (1) 25  $\mu$ L の PBS を B 列から H 列まで分注する。
- (2) 50  $\mu$ L の前処理血清を A ウェルに分注する。
- (3) A ウェルから 25  $\mu$ L 取り、順次 2 倍階段希釈する。
- (4) 各ウェルに 25  $\mu$ L ずつ 4 HA/25  $\mu$ L に調製した抗原を添加する。

- (5) 攪拌後、室温で 60 分間反応する。
- (6) 反応後、ウマ血球浮遊液を 50  $\mu$  L 添加する。
- (7) 攪拌後、室温で 2 時間反応し、判定する。

### 3.4.7 結果の算出方法

完全な凝集阻止を認める血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

### 3.4.8 結果の算出方法

完全な凝集阻止を認める血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

## 3.5 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する中和抗体価測定試験

### 3.5.1 MDCK 細胞の調製

凍結保存されている細胞を融解後、75 cm<sup>2</sup> フラスコを用いて 10%FBS 添加 MEM 培地で 3 日間培養 (37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿条件下) する。3~4 日の周期で 2 代以上細胞を継代し、細胞の増殖が安定していることを確認する。細胞の増殖性が安定したら、フラスコに細胞を単層培養し、剥離・回収して、その 1/4~1/6 量を 1 枚の 96 well マイクロプレート (以降、「細胞プレート」) に播種する。細胞プレートは細胞が単層を形成するまで 3~4 日間培養 (37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿条件下) する。

### 3.5.2 血清の前処理

血清 50  $\mu$  L に、RDE 液 150  $\mu$  L を添加し、37°C で 18~20 時間反応させる。反応終了後、56°C で 60 分間加温し、希釈液 300  $\mu$  L を添加する。

### 3.5.3 攻撃用ウイルスの希釈

攻撃ウイルス液を 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$  L となるよう、希釈液を用いて希釈する。

### 3.5.4 バックタイトレーション

- (1) 96 穴プレートを準備し、7 列目から 11 列目の B から H に希釈液を 100  $\mu$  L、A には希釈液を 75  $\mu$  L 添加する。12 列目の A から D はウイルス対照 well、E から H は細胞対照 well とする。
- (2) 7 列目から 11 列目の A の well に攻撃用ウイルスを 75  $\mu$  L 添加し混和する。
- (3) 7 列目から 11 列目の A から 46  $\mu$  L 採取し、B に添加し混和する。混和後 46  $\mu$

L を C に添加し、以後同様の操作を H まで行う ( $10^{0.5}$  倍段階希釈)。H well 混和後のウイルス液  $46 \mu\text{L}$  は廃棄する。また、ここまでの操作が終了したプレートに「バックタイトレーション測定用プレート」とする。

### 3.5.5 抗体価測定用プレート

12 列目の A から D はウイルス対照 well、E から H は細胞対照 well とする。以下に従って、血清標本、陰性血清及び陽性血清の希釈を実施する。

- (1) プレートの 2 列目から 11 列目の A から H に希釈液  $50 \mu\text{L}$  添加する。
- (2) 1 列目の A~H に前処理済みの血清標本、陽性血清、陰性血清を  $100 \mu\text{L}$  添加する。
- (3) 1 列目の A~H から  $50 \mu\text{L}$  採取し、2 に添加し混和する。さらに 2 列目から  $50 \mu\text{L}$  採取し、3 列目に添加し混和する。以後同様の操作を 11 列目まで行い (2 倍段階希釈)、11 列目の  $50 \mu\text{L}$  は廃棄する。また、ここまでの操作を終えたプレートを「抗体価測定用プレート」とする。

### 3.5.6 中和反応及び細胞への接種

- (1) 3.5.5 の操作終了後、バックタイトレーション測定用プレート及び抗体価測定用プレートのウイルス対照 well に希釈液を  $50 \mu\text{L}$ 、細胞対照 well に希釈液を  $100 \mu\text{L}$  添加する。
- (2) 攻撃用ウイルス液を抗体価測定用プレートの 1~11 列目に  $50 \mu\text{L}$  添加する。バックタイトレーション測定用プレートを含むすべてのウイルス対照 well にも攻撃用ウイルス液  $50 \mu\text{L}$  を添加する (ここまで操作したプレートを「希釈プレート」という)。
- (3) 希釈プレートを攪拌し、 $37^{\circ}\text{C}$  に設定した  $\text{CO}_2$  インキュベーターにて 30 分間静置する。30 分後、PBS で洗浄後の細胞プレートへ希釈プレートから血清・ウイルス混液を  $100 \mu\text{L}$  接種し、6 日間培養 ( $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、加湿条件下) する。

### 3.5.7 細胞の固定及び染色

培養開始から 6 日後、培養上清を吸引し、 $10 \text{ vol}\%$ ホルマリン溶液  $100 \mu\text{L}$  を加え、室温で 5 分以上静置し、固定及び不活化処理を行う。 $10 \text{ vol}\%$ ホルマリン溶液

を吸引後、NB 染色液 50  $\mu$ L を加え、室温で 30 分以上 UV 下に静置する。その後、水道水で数回洗浄し、プレート室温で乾燥させる。

### 3.5.8 吸光度測定

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 50  $\mu$ L を加え、攪拌し、630 nm の波長で吸光度を測定する。

### 3.5.9 結果及び試験成立条件

陽性 well [ (ウイルス対照の吸光度の平均値 + 細胞対照の吸光度の平均値)  $\times$  0.5) より高い吸光度を示す well ] を血清の希釈倍率の低い方から確認する場合、最初に陰性となった well の 1 つ手前の血清の希釈倍率を中和抗体価とする。ただし、中和抗体価が検出感度未満 (10 倍未満) の個体は、中和抗体価を 5 とする。各群における平均中和抗体価は、幾何平均を用いて算出し、Reed-Muench 法を用いて、バックタイトレーションの数値より攻撃用ウイルスの力価を算出する。また、試験責任者は下記に規定する項目を確認し、試験結果の妥当性を評価する。

#### (1) 被験血清成立条件

- 被験血清を接種した列において、陰性の後に陽性がないこと。

#### (2) プレート成立条件

プレート毎に下記の条件を全て満たすこと。

- ウイルス対照 4 穴の細胞はすべて死滅していること。
- 細胞対照 4 穴の細胞はすべて生存していること。
- 陽性血清の抗体価が期待値から  $\pm 1$  管以内であること。
- 陰性対照の抗体価が 10 倍未満であること。

#### (3) 試験成立条件

下記の条件を全て満たした場合に試験成立とする。

- バックタイトレーションのプレートがプレート成立条件を満たしていること。
- バックタイトレーションの値が  $10^{1.7} \sim 10^{2.6}$  TCID<sub>50</sub>/0.05 mL の範囲内であること。

## 3.6 ワクチン株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する HI 及び中和抗体価測定

一般財団法人阪大微生物病研究会から提出された HB-01-P01-V に従い、一般財団

法人阪大微生物病研究会が実施する。

**4. 統計学的解析**

実施しない。

**5. 参考文献**

なし

**6. 試験責任者署名**

表題 : HB-01 を免疫したマウスに対するインフルエンザウイルス  
インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) 攻撃試験

試験番号 : HB-01-P01

国立感染症研究所  
インフルエンザウイルス研究センター  
試験責任者 : 山本典生

年 月 日

---

HB-01-P01

## 試験報告書

HB-01 を免疫したマウスに対するインフルエンザウイルスインドネシア株  
(A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) 攻撃試験

(試験番号 : HB-01-P01)

2012 年 12 月 21 日

国立感染症研究所

## 目次

1. 試験実施概要 .....	1
1.1 表題 .....	1
1.2 試験番号 .....	1
1.3 試験目的 .....	1
1.4 適用ガイドライン .....	1
1.5 試験施設 .....	1
1.6 試験責任者 .....	1
1.7 試験担当者 .....	2
1.8 試験日程 .....	2
1.9 試験計画書の変更 .....	2
1.10 資料の保存場所 .....	2
2. 被験物質、対照物質及び使用した動物 .....	3
2.1 被験物質 .....	3
2.2 対照物質 .....	3
2.3 使用した動物 .....	4
3. 方法 .....	5
3.1 免疫及び採血 .....	5
3.2 群構成 .....	5
3.3 ウイルス接種、生存率及び体重推移 .....	6
3.4 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する HI 抗体価測定試験 .....	7
3.4.1 試薬調製 .....	7
3.4.2 血清の前処理 .....	7
3.4.3 血球吸収処理 .....	7
3.4.4 HA 価の測定 .....	7
3.4.5 バックタイトレーション .....	7
3.4.6 HI 試験 .....	7
3.4.7 結果の算出方法 .....	8
3.4.8 結果の算出方法 .....	8
3.5 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する中和 抗体価測定試験 .....	8
3.5.1 MDCK 細胞の調製 .....	8



3.5.2	血清の前処理.....	8
3.5.3	攻撃用ウイルスの希釈.....	8
3.5.4	バックタイトレーション.....	8
3.5.5	抗体価測定用プレート.....	9
3.5.6	中和反応及び細胞への接種.....	9
3.5.7	細胞の固定及び染色.....	9
3.5.8	吸光度測定.....	10
3.5.9	結果及び試験成立条件.....	10
3.6	ワクチン株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する HI 及び中和抗体価測定.....	10
4.	結果.....	11
4.1	インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する HI 抗体価測定試験.....	11
4.2	インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する中和抗体価測定試験.....	12
4.3	インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) 攻撃試験に対する生存率及び体重変動.....	14
4.4	ワクチン株 A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する HI 抗体価測定試験結果.....	16
4.5	ワクチン株 A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する中和抗体価測定試験結果.....	18
5.	考察.....	19
6.	統計学的解析.....	20
7.	参考文献.....	20
8.	添付資料.....	20
9.	試験責任者署名.....	21

## 1. 試験実施概要

### 1.1 表題

HB-01 を免疫したマウスに対するインフルエンザウイルスインドネシア株  
(A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) 攻撃試験

### 1.2 試験番号

HB-01-P01

### 1.3 試験目的

HB-01 のインドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する感染防御効果について、HB-01 を免疫したマウスにインドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) ウイルスを攻撃接種し、マウスの生存率及び体重減少を評価した。また、ウイルス攻撃前のマウスより採血し、インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) 及びワクチン株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する HI 及び中和抗体価をそれぞれ評価する。

### 1.4 適用ガイドライン

なし

### 1.5 試験施設

「被験物質の免疫、ウイルス攻撃、インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する HI 及び中和抗体価測定」  
国立感染症研究所  
東京都武蔵村山市学園 4-7-1

「ワクチン株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する HI 及び中和抗体価測定」  
一般財団法人 阪大微生物病研究会  
香川県観音寺市瀬戸町四丁目 1 番 70 号

### 1.6 試験責任者

国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター  
第 5 室長 山本典生

### 1.7 試験担当者

国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター  
 第6室長 浅沼秀樹  
 主任研究官 中村一哉  
 主任研究官 原田勇一  
 研究員 浜本いつき  
 研究員 相内 章

### 1.8 試験日程

試験開始日		2012年	8月	10日				
被験物質の受領日		2012年	8月	24日				
免疫 予定日	1次免疫	2012年	9月	29日	～	2012年	9月	18日
	2次免疫	2012年	9月	19日	～	2012年	10月	2日
採血日		2012年	10月	2日				
ウイルス攻撃日		2012年	10月	3日				
生存率観察		2012年	10月	3日	～	2012年	10月	17日
HI抗体価測定		2012年	10月	4日	～	2012年	10月	10日
中和抗体価測定		2012年	10月	4日	～	2012年	10月	19日
一般財団法人阪大微生物病研究会への標本発送日		2012年	10月	15日				
一般財団法人阪大微生物病研究会で実施した試験の報告書受領日		2012年	12月	7日				
試験終了日		2012年	12月	21日				

### 1.9 試験計画書の変更

試験計画書の変更はなかった。

### 1.10 資料の保存場所

インフルエンザウイルス研究センター 第3室居室及び第5室居室

## 2. 被験物質、対照物質及び使用した動物

### 2.1 被験物質

名称 : HB-01  
ロット番号 : IFM1103  
製造元 : 一般財団法人 阪大微生物病研究会  
HA 含量 : 1 mL 中に 30  $\mu\text{g}$  の HA タンパク質および 300  $\mu\text{g}$  のアルミニウムを含む。  
性状 : 振り混ぜるとき, 均等に白濁した液剤  
受領日 : 2012 年 8 月 24 日  
入手量 : 5 本 (表示量 : 1 mL/本)  
保存条件 : 遮光して, 10°C 以下に凍結を避けて保存した。  
調製濃度 : 0.03、0.003 及び 0.0003  $\mu\text{g}$  HA/100  $\mu\text{L}$  となるよう PBS で段階希釈した。用事調製した。  
残余物質 : すべて廃棄した。

### 2.2 対照物質

名称 : 水酸化アルミニウムゲル  
ロット番号 : AL120822  
製造元 : 一般財団法人 阪大微生物病研究会  
HA 含量 : 1 mL 中に 300  $\mu\text{g}$  のアルミニウムを含む。  
性状 : 振り混ぜるとき, 均等に白濁した液剤  
受領日 : 2012 年 8 月 24 日  
入手量 : 2 本 (表示量 : 10 mL/本)  
保存条件 : 遮光して, 10°C 以下に凍結を避けて保存した。  
調製濃度 : 0.3  $\mu\text{g}$ /100  $\mu\text{L}$  となるよう PBS で段階希釈した。用事調製した。  
残余物質 : すべて廃棄した。

### 2.3 使用した動物

種 : マウス  
系統 : BALB/cCr Slc  
入手元 : 日本エスエルシー株式会社  
性 : 雌  
免疫開始時 : 5 週齢  
入手日 : 2012 年 8 月 28 日

### 3. 方法

#### 3.1 免疫及び採血

マウスの筋肉内に調製した被験物質 0.1 mL を群 1～6 に、調製した対照物質 0.1 mL を群 7 と 8 にそれぞれ 3 週間隔で 2 回投与した。2 回目投与の 2 週間後に、ウイルス攻撃・臨床観察群（群 2、4、6、8）は、3.3 ウイルス接種の項に従い、ウイルスを経鼻接種し、抗体価測定群（群 1、3、5、7）は全採血を行い、血清を分離し標本とした。血清は使用するまで-20℃以下で保存した。また、分離した血清の一部は、ドライアイスを梱包し一般財団法人阪大微生物病研究会に送付した。

#### 3.2 群構成

	免疫		測定項目	マウス (匹)
	抗原投与量 ( $\mu$ g HA/mouse)	アルミニウムゲル 投与量 ( $\mu$ g Alum./mouse)		
1	0.03	0.3	抗体価測定	10
2			ウイルス接種・臨床観察	10
3	0.003	0.03	抗体価測定	10
4			ウイルス接種・臨床観察	10
5	0.0003	0.003	抗体価測定	10
6			ウイルス接種・臨床観察	10
7	0	3	抗体価測定	10
8			ウイルス接種・臨床観察	10

### 3.3 ウイルス接種、生存率及び体重推移

名称	: A/Indonesia/5/2005 (H5N1)
ロット番号	: E1E1
ウイルス原液の力価	: $10^{8.3}$ TCID <sub>50</sub> / 50 $\mu$ L
調製後の力価(20MLD <sub>50</sub> )	: $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> / 10 $\mu$ L
保存条件	: 冷凍

ソムノペンチル (共立製薬株) の麻酔下にて、A/Indonesia/5/2005 (H5N1)を 0.2% BSA-MEM で 20 MLD<sub>50</sub>/0.01mL に希釈したウイルス液を、片鼻に 0.01 mL 接種し感染させる。もう片鼻に接種しない。

体重測定は、ウイルス接種直後に 1 度 (接種した日)、接種後は 1 回/日で接種 14 日後まで行う。死亡の判定は以下のどちらかが当てはまった個体とし、接種 14 日後まで観察した。

- ・生物学的に死亡と認められた個体
- ・ウイルス接種前の体重と比べ、体重が 30%以上減少した個体 (多数の感染実験の経験から、マウス個体死との強い相関が考えられる設定値)

### 3.4 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する HI 抗体価測定試験

#### 3.4.1 試薬調製

(1) RDE II 「生研」に生理食塩水 20mL を添加し、溶解した。

#### 3.4.2 血清の前処理

一容の血清に三容の RDE 液を添加し、37°C で 18~20 時間反応させる。反応終了後、56°C で 60 分間加温し、六容の生理食塩水を添加した。

#### 3.4.3 血球吸収処理

- (1) 洗浄済みウマ血球浮遊液を、前処理済み血清に添加した。転倒混和し、室温で 60 分間吸収した。途中転倒混和し、血球が沈殿しないようにした。
- (2) 遠心分離後、上清を回収し検体とした。

#### 3.4.4 HA 価の測定

- (1) 50  $\mu$ L の PBS を全てのウェルに分注した。
- (2) 抗原液 50  $\mu$ L を 1 列目のウェルに添加した。
- (3) 1 列目のウェルを混和後、50  $\mu$ L を取り順次 2 倍階段希釈を行う。
- (4) 全てのウェルにウマ血球浮遊液を添加した。
- (5) 攪拌後、室温で 2 時間反応し、判定した。完全凝集を認める抗原の最高希釈倍数の逆数を HA 価とした。
- (6) 求められた抗原の HA 価から、4 HA/25  $\mu$ L となるように抗原を希釈し、HI 抗体価測定試験用抗原とした。

#### 3.4.5 バックタイトレーション

- (1) HI 抗体価測定試験用抗原について HA 価の測定を実施し、4 HA/25  $\mu$ L に調製されていることを確認した。

#### 3.4.6 HI 試験

- (1) 25  $\mu$ L の PBS を B 列から H 列まで分注した。
- (2) 50  $\mu$ L の前処理血清を A ウェルに分注した。
- (3) A ウェルから 25  $\mu$ L 取り、順次 2 倍階段希釈した。
- (4) 各ウェルに 25  $\mu$ L ずつ 4 HA/25  $\mu$ L に調製した抗原を添加した。



- (5) 攪拌後、室温で 60 分間反応した。
- (6) 反応後、ウマ血球浮遊液を 50  $\mu$ L 添加した。
- (7) 攪拌後、室温で 2 時間反応し、判定した。

### 3.4.7 結果の算出方法

完全な凝集阻止を認める血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とした。

### 3.4.8 結果の算出方法

完全な凝集阻止を認める血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とした。

## 3.5 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する中和抗体価測定試験

### 3.5.1 MDCK 細胞の調製

凍結保存されている細胞を融解後、75 cm<sup>2</sup> フラスコを用いて 10%FBS 添加 MEM 培地で 3 日間培養 (37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿条件下) した。3~4 日の周期で 2 代以上細胞を継代し、細胞の増殖が安定していることを確認した。細胞の増殖性が安定したら、フラスコに細胞を単層培養し、剥離・回収して、その 1/4~1/6 量を 1 枚の 96 well マイクロプレート (以降、「細胞プレート」) に播種した。細胞プレートは細胞が単層を形成するまで 3~4 日間培養 (37°C、5%CO<sub>2</sub>、加湿条件下) した。

### 3.5.2 血清の前処理

血清 50  $\mu$ L に、RDE 液 150  $\mu$ L を添加し、37°C で 18~20 時間反応させる。反応終了後、56°C で 60 分間加温し、希釈液 300  $\mu$ L を添加した。

### 3.5.3 攻撃用ウイルスの希釈

攻撃ウイルス液を 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L となるよう、希釈液を用いて希釈した。

### 3.5.4 バックタイトレーション

- (1) 96 穴プレートを準備し、7 列目から 11 列目の B から H に希釈液を 100  $\mu$ L、A には希釈液を 75  $\mu$ L 添加した。12 列目の A から D はウイルス対照 well、E から H は細胞対照 well とした。
- (2) 7 列目から 11 列目の A の well に攻撃用ウイルスを 75  $\mu$ L 添加し混和した。
- (3) 7 列目から 11 列目の A から 46  $\mu$ L 採取し、B に添加し混和した。混和後 46  $\mu$

L を C に添加し、以後同様の操作を H まで行う ( $10^{0.5}$  倍段階希釈)。H well 混和後のウイルス液  $46 \mu\text{L}$  は廃棄した。また、ここまでの操作が終了したプレートに「バックタイトレーション測定用プレート」とした。

### 3.5.5 抗体価測定用プレート

12 列目の A から D はウイルス対照 well、E から H は細胞対照 well とした。以下に従って、血清標本、陰性血清及び陽性血清の希釈を実施した。

- (1) プレートの 2 列目から 11 列目の A から H に希釈液  $50 \mu\text{L}$  添加した。
- (2) 1 列目の A~H に前処理済みの血清標本、陽性血清、陰性血清を  $100 \mu\text{L}$  添加した。
- (3) 1 列目の A~H から  $50 \mu\text{L}$  採取し、2 に添加し混和した。さらに 2 列目から  $50 \mu\text{L}$  採取し、3 列目に添加し混和した。以後同様の操作を 11 列目まで行い (2 倍段階希釈)、11 列目の  $50 \mu\text{L}$  は廃棄した。また、ここまでの操作を終えたプレートを「抗体価測定用プレート」とした。

### 3.5.6 中和反応及び細胞への接種

- (1) 3.5.5 の操作終了後、バックタイトレーション測定用プレート及び抗体価測定用プレートのウイルス対照 well に希釈液を  $50 \mu\text{L}$ 、細胞対照 well に希釈液を  $100 \mu\text{L}$  添加した。
- (2) 攻撃用ウイルス液を抗体価測定用プレートの 1~11 列目に  $50 \mu\text{L}$  添加した。バックタイトレーション測定用プレートを含むすべてのウイルス対照 well にも攻撃用ウイルス液  $50 \mu\text{L}$  を添加した (ここまで操作したプレートを「希釈プレート」という)。
- (3) 希釈プレートを攪拌し、 $37^{\circ}\text{C}$  に設定した  $\text{CO}_2$  インキュベーターにて 30 分間静置した。30 分後、PBS で洗浄後の細胞プレートへ希釈プレートから血清・ウイルス混液を  $100 \mu\text{L}$  接種し、6 日間培養 ( $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、加湿条件下) した。

### 3.5.7 細胞の固定及び染色

培養開始から 6 日後、培養上清を吸引し、 $10 \text{ vol}\%$ ホルマリン溶液  $100 \mu\text{L}$  を加え、室温で 5 分以上静置し、固定及び不活化処理を行う。 $10 \text{ vol}\%$ ホルマリン溶液

を吸引後、NB 染色液 50  $\mu$ L を加え、室温で 30 分以上 UV 下に静置した。その後、水道水で数回洗浄し、プレート室温で乾燥させる。

### 3.5.8 吸光度測定

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 50  $\mu$ L を加え、攪拌し、630 nm の波長で吸光度を測定した。

### 3.5.9 結果及び試験成立条件

陽性 well [ (ウイルス対照の吸光度の平均値 + 細胞対照の吸光度の平均値)  $\times$  0.5 ] より高い吸光度を示す well ] を血清の希釈倍率の低い方から確認する場合、最初に陰性となった well の 1 つ手前の血清の希釈倍率を中和抗体価とした。ただし、中和抗体価が検出感度未満 (10 倍未満) の個体は、中和抗体価を 5 とした。各群における平均中和抗体価は、幾何平均を用いて算出し、Reed-Muench 法を用いて、バックタイトレーションの数値より攻撃用ウイルスの力価を算出した。また、試験責任者は下記に規定する項目を確認し、試験結果の妥当性を評価した。

#### (1) 被験血清成立条件

- 被験血清を接種した列において、陰性の後に陽性がないこと。

#### (2) プレート成立条件

プレート毎に下記の条件を全て満たすこと。

- ウイルス対照 4 穴の細胞はすべて死滅していること。
- 細胞対照 4 穴の細胞はすべて生存していること。
- 陽性血清の抗体価が期待値から  $\pm 1$  管以内であること。
- 陰性対照の抗体価が 10 倍未満であること。

#### (3) 試験成立条件

下記の条件を全て満たした場合に試験成立とした。

- バックタイトレーションのプレートがプレート成立条件を満たしていること。
- バックタイトレーションの値が  $10^{1.7} \sim 10^{2.6}$  TCID<sub>50</sub>/0.05 mL の範囲内であること。

## 3.6 ワクチン株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する HI 及び中和抗体価測定

阪大微生物病研究会から提出された HB-01-P01-V に従い、阪大微生物病研究会が

実施した。

#### 4. 結果

##### 4.1 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する HI 抗体価測定試験

幾何平均 HI 抗体価は、0.03  $\mu\text{g}$  HA 投与群では 519.8 倍、0.003  $\mu\text{g}$  HA 投与群では 367.6 倍、0.0003  $\mu\text{g}$  HA 投与群では 211.1 倍、水酸化アルミニウムのみ投与群では、5.00 倍であった。(図 1、表 1)。

以上より、HB-01 を投与したマウス血清中には、インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する HI 抗体が誘導され、その抗体価は、投与用量に応じて上昇する傾向にあった。

図 1. 細胞培養沈降インフルエンザワクチンを接種したマウス血清の HI 抗体価 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株)

