

表 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インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005(H5N1)強毒型野生株) に対する幾何平均 HI 抗体価

抗原量 (μgHA/dose)	0.03	0.003	0.0003	水酸化アルミニウムゲルのみ
平均抗体価(GMT)	519.8	367.6	211.1	5.0
陽転率(抗体価 40 以上,%)	100.0	100.0	90.0	0.0

抗体価 10 未満は 5.0 と表記

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

幾何平均中和抗体価は、0.03 μg HA 投与群では 519.8 倍、0.003 μg HA 投与群では 367.6 倍、0.0003 μg 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 2、表 2)。

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 2. 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中和抗体価 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株)

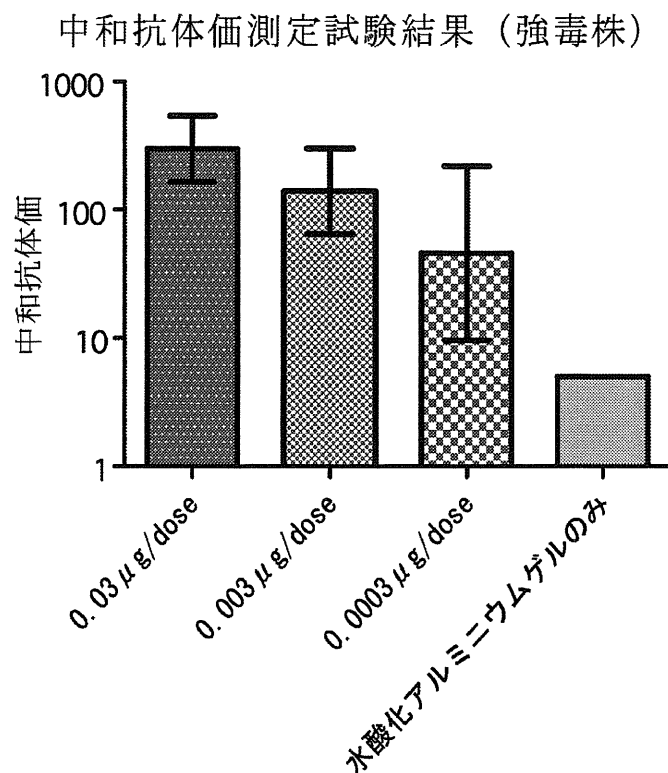


表 2. 細胞培養沈降インフルエンザワクチンを接種したマウス血清のインドネシア株 (A/Indonesia/5/2005(H5N1)強毒型野生株) に対する幾何平均中和抗体価

抗原量 (µgHA/dose)	0.03	0.003	0.0003	水酸化アルミニウムゲルのみ
平均抗体価(GMT)	298.6	139.3	45.9	5.0

抗体価 10 未満は 5.0 と表記

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

生存率と体重変動の比較では、水酸化アルミニウムのみ投与群は、致死性ウイルス感染後3日目から体重の減少が始まり、7日目には死亡する個体が現れた(図3、4)。その後、水酸化アルミニウムのみ投与群はウイルス感染後10日目にはすべて死亡した。HB-01投与群はいずれの投与用量においてもすべての個体が生残り、体重の減少もほとんど観察されなかった。

図3 致死性ウイルス感染後のマウス生存率

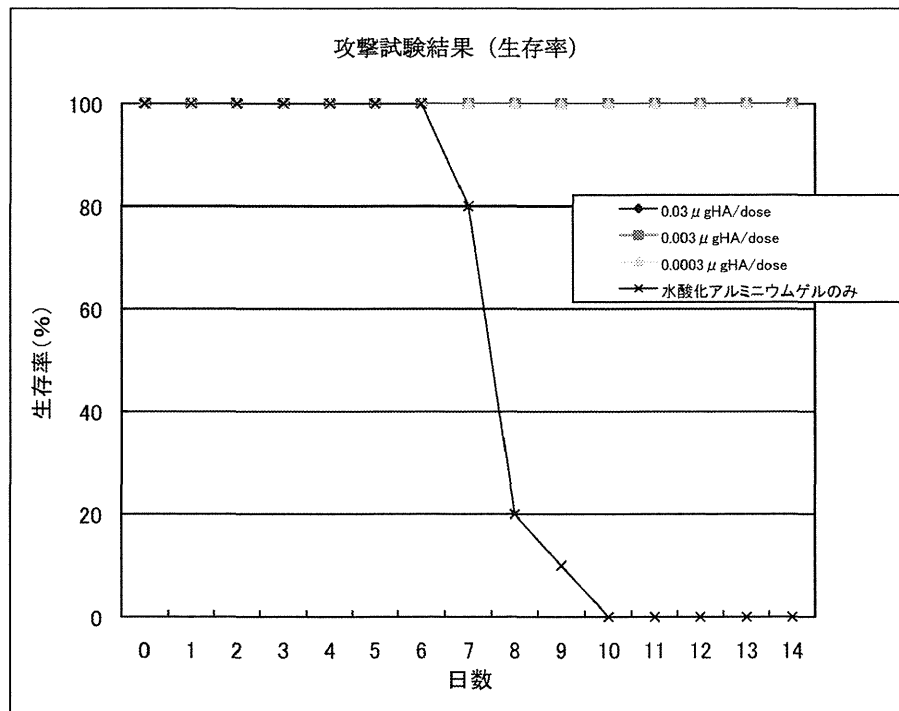
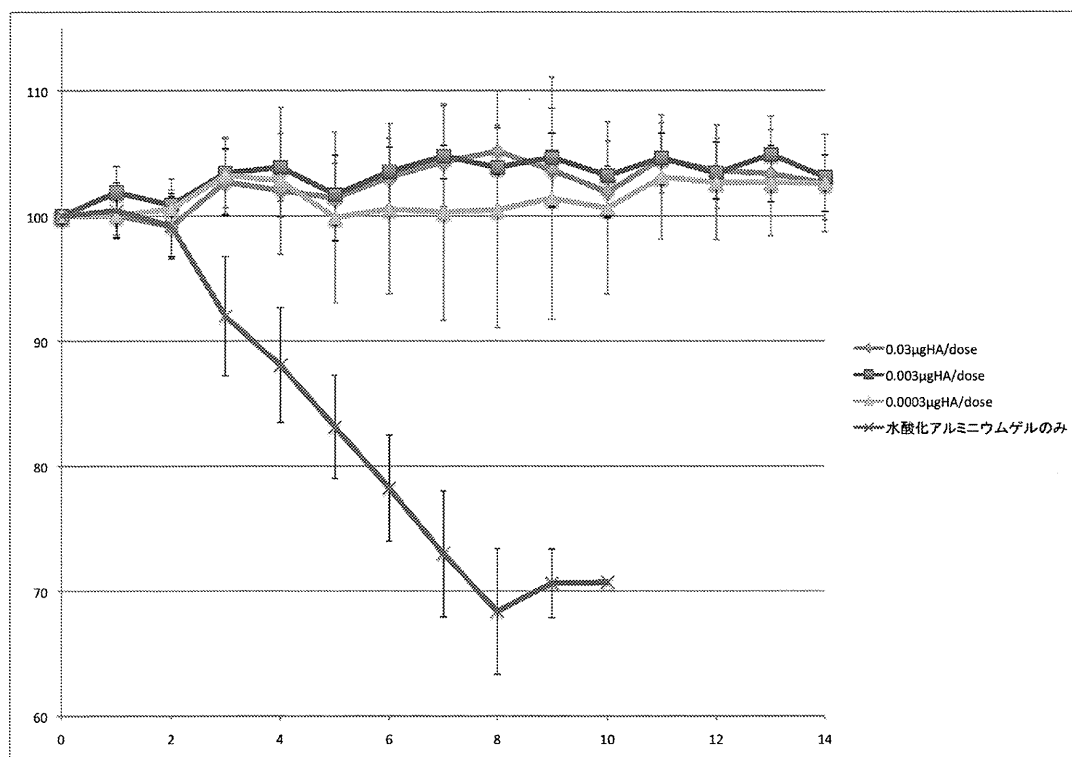


図4 致死性ウイルス感染後のマウス平均体重変動



※感染前マウスの体重を100%とし、各群の平均体重の変動を割合(%)で示した。図中の誤差範囲は標準偏差を示す。

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

幾何平均 HI 抗体価は、0.03 μg HA 投与群では 171.5 倍、0.003 μg HA 投与群では 105.6 倍、0.0003 μg HA 投与群では 74.6 倍、水酸化アルミニウムゲルのみ投与群では、5.0 倍であった (図 5、表 3)。

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 (弱毒株) 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 5. 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ワクチン株に対する幾何平均 HI 抗体価

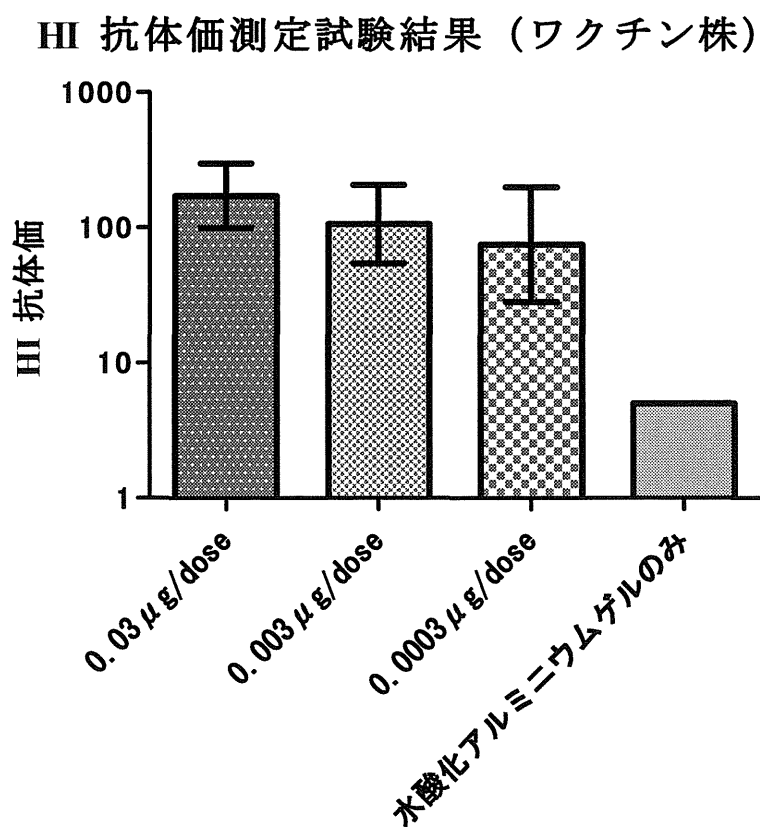


表 3. 細胞培養沈降インフルエンザワクチンを接種したマウス血清のワクチン株に対する幾何平均 HI 抗体価

抗原量 (µgHA/dose)	0.03	0.003	0.0003	水酸化アルミニウム ゲルのみ
平均抗体価(GMT)	171.5	105.6	74.6	5.0
陽転率(抗体価 40 以上,%)	100.0	80.0	80.0	0.0

抗体価 10 未満は 5.0 と表記

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

幾何平均中和抗体価は、0.03 μg HA 投与群では 171.5 倍、0.003 μg HA 投与群では 105.6 倍、0.0003 μg HA 投与群では 74.6 倍、水酸化アルミニウムゲルのみ投与群では、5.0 倍であった（図 6、表 4）。

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（弱毒株）に対する中和抗体が誘導され、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 6. 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ワクチン株に対する幾何平均中和抗体価

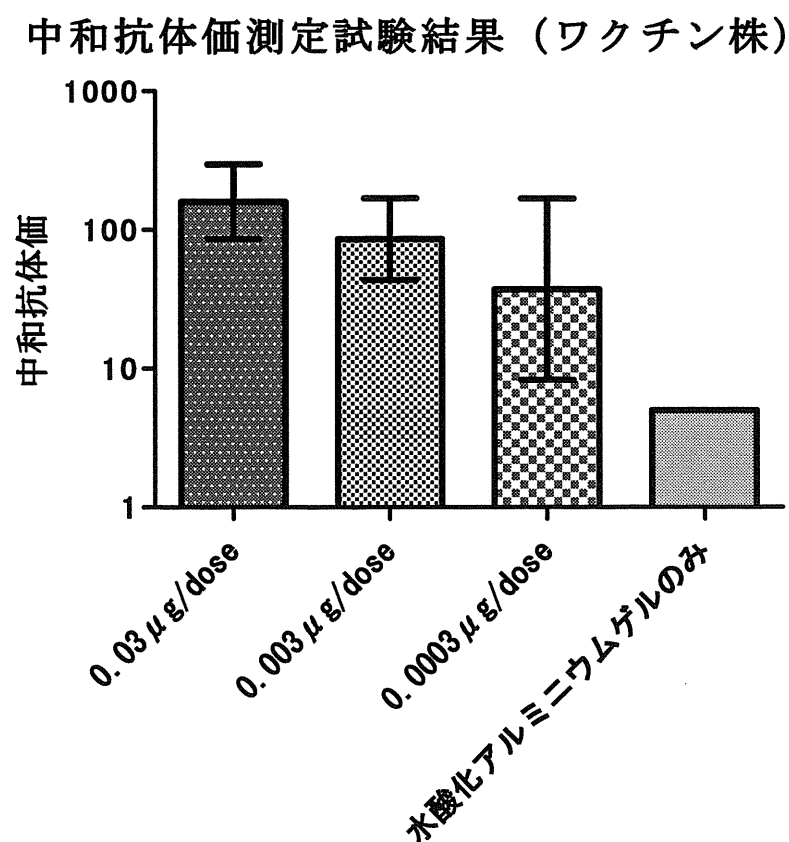


表 4. 細胞培養沈降インフルエンザワクチンを接種したマウス血清のワクチン株に対する幾何平均中和抗体価

抗原量 (μgHA/dose)	0.03	0.003	0.0003	水酸化アルミニウムゲルのみ
平均抗体価(GMT)	160.0	85.7	37.3	5.0

抗体価 10 未満は 5.0 と表記

5. 考察

ワクチン接種マウスにおける致死性ウイルス感染直前の血中抗体価は、用いる抗原の種類によらず、接種ワクチン量に応じて増大する傾向が観察された。マウス血清中の HI 抗体価は、ウイルス中和抗体価と比較して高く、この傾向は野生株に対してもワクチン株に対しても同様であった。この結果は、HI 試験に用いている血球が感度の高いウマ赤血球であることと関連している可能性がある。他の赤血球を用いた HI 試験も行うことができれば、有益な情報が得られると思われる。また、ワクチン株に対する抗体価と野生株に対する抗体価を比較すると、野生株に対する抗体価の方が高い傾向が見られた。野生株に対する HI 抗体価はワクチン株に対する HI 抗体価に比べて約 3 倍、野生株に対する中和抗体価はワクチン株に対する中和抗体価に比べて約 1.5 倍であった。

接種ワクチンのマウスに対する防御効果は良好で、今回設定したいずれのワクチン濃度においてもワクチン接種マウスは野生株による攻撃から全例生残し、ウイルス感染後の体重変動もほとんど観察されなかった。最も低い濃度のワクチン接種群の中には、少数ではあるが血中に抗野生株中和抗体が検出されないマウス（10 匹中 2 匹）や、抗野生株 HI 抗体価が 40 未満のマウス（10 匹中 1 匹）も存在した。

今回の解析では抗体価測定とウイルス攻撃試験に用いた個体が同一でないため、抗体価と感染防御能との関係を直接的に結論付けできないものの、被攻撃群マウスにもウイルス感染直前の血中抗体価が低いレベルにとどまっている個体の存在が想定され、これらのマウスにおいても感染防御能が付与される可能性が示唆された。今後血液採取と被攻撃に同一個体を用いた更に詳細な解析が必要と思われる。

6. 統計学的解析

実施しなかった。

7. 参考文献

なし

8. 添付資料

・試験報告書

表題：HB-01 を免疫したマウスのインフルエンザウイルスインドネシア株（弱毒株）に対する Haemagglutination Inhibition 及び中和抗体価測定試験

試験番号：HB-01-P01-V

9. 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-V

試験計画書

HB-01 を免疫したマウスのインフルエンザウイルスインドネシア株（弱毒株）に
対する Haemagglutination Inhibition 及び中和抗体価測定試験

（試験番号：HB-01-P01-V）

2012年8月10日

一般財団法人 阪大微生物病研究会

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	1
1.8	試験日程	2
1.9	試験計画書の変更	2
1.10	保存	2
1.11	保存する資料	2
2.	使用する標本	3
2.1	使用する標本	3
2.2	群構成	3
3.	試験方法	4
3.1	HI 抗体価測定試験	4
3.1.1	試薬調製	4
3.1.2	血清の前処理	4
3.1.3	血球吸収処理	4
3.1.4	HA 価の測定	4
3.1.5	バックタイトレーション	4
3.1.6	HI 試験	4
3.1.7	結果の算出方法	5
3.2	中和抗体価測定試験	5
3.2.1	MDCK 細胞の調製	5
3.2.2	血清の前処理	5
3.2.3	攻撃用ウイルスの準備	5
3.2.4	バックタイトレーション	5
3.2.5	抗体価測定用プレート	5
3.2.6	中和反応及び細胞への接種	6
3.2.7	細胞の固定及び染色	6
3.2.8	吸光度測定	6

3.2.9	結果の算出方法.....	6
3.2.10	試験成立条件.....	6
4.	統計学的解析.....	7
5.	参考文献.....	7
6.	試験責任者署名.....	8

1. 試験実施概要

1.1 表題

HB-01 を免疫したマウスのインフルエンザウイルスインドネシア株（弱毒株）に対する Haemagglutination Inhibition 及び中和抗体価測定試験

1.2 試験番号

HB-01-P01-V

1.3 試験目的

HB-01 (Indo/5/2005 (H5N1) /PR8-IBCDC-RG2 株 (A/Indonesia/5/2005 を弱毒化した株) : Clade2.1 より製造したワクチン) のインドネシア株（強毒株）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（強毒株）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する試験を国立感染症研究所にて実施する（試験番号：HB-01-P01）。

本試験では、HB-01-P01 にて採血する感染直前の血清を用いて、インドネシア株（弱毒株）に対する Haemagglutination Inhibition (HI) 及び中和抗体価を評価する。

1.4 適用ガイドライン

なし

1.5 試験施設

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

一般財団法人 阪大微生物病研究会
研究開発本部 研究部 五味康行

1.7 試験担当者

一般財団法人 阪大微生物病研究会
研究開発本部 研究部 研究課
課長 谷本武史
研究員 高野大輔
研究員 森本孝一

1.8 試験日程

試験開始日	2012年	8月	10日				
標本の授受予定日予定	2012年	10月	16日				
HI抗体価測定予定	2012年	10月	18日	～	2012年	10月	24日
中和抗体価測定予定	2012年	10月	16日	～	2012年	11月	2日
試験終了予定	2012年	11月	29日				

1.9 試験計画書の変更

試験計画書を変更する場合は、変更内容及びその理由を記載した試験計画書変更書を作成し、試験責任者が日付を記し署名する。

1.10 保存

次項に示す試験関係資料を一般財団法人阪大微生物病研究会の文書保管庫に保存する。保存期間は最終報告書作成後10年間とする。

1.11 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験計画書変更書（作成した場合）
- (3) 試験結果に関する資料（生データ含む）
- (4) 最終報告書

2. 使用する標本

2.1 使用する標本

5週齢の各群雌10匹のBALB/cCr SlcマウスにHB-01 (Lot No. : IFM1103) をリン酸緩衝液 (PBS) にて100、1000、10000倍希釈 (HA含量として、0.03、0.003及び0.0003 μg HA/0.1 mL) した被験物質またはアルミニウムゲル (Lot No. : AL120822) をPBSにて10倍希釈 (アルミニウム含量として、0.3 μg /0.1 mL) した対照物質を各0.1 mL筋肉内に3週間隔2回投与 (day 0、day 21) する。2回目投与の2週間後 (day 35) に抗体価測定群 (群1、3、5、7) は全採血を行い、血清を分離し標本とする (試験番号: HB-01-P01)。標本の一部を感染症研究所から一般財団法人阪大微生物病研究会へ送付し、本試験に供試する。

2.2 群構成

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

3. 試験方法

3.1 HI 抗体価測定試験

3.1.1 試薬調製

(1) RDE II 「生研」に生理食塩水 20mL を添加し、溶解する。

3.1.2 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。

3.1.3 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。

3.1.4 HA 価の測定

- (1) 50 μ L の PBS を全てのウェルに分注する。
- (2) 抗原液 50 μ 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 μ 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 μ 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。

3.1.5 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 μ L に調製されていることを確認する。

3.1.6 HI 試験

- (1) 25 μ L の PBS を B 列から H 列まで分注する。
- (2) 50 μ 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 μ L 取り、順次 2 倍階段希釈する。
- (4) 各ウェルに 25 μ L ずつ 4 HA/25 μ 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 $50\ \mu\text{L}$ 添加する。
- (7) 攪拌後、室温で2時間反応し、判定する。

3.1.7 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。

3.2 中和抗体価測定試験

3.2.1 MDCK 細胞の調製

凍結保存されている細胞を融解後、 $75\ \text{cm}^2$ フラスコを用いて、10%FBS-MEM で培養 (37°C 、5% CO_2 、加湿条件下) する。単層培養した細胞を回収し、96 well 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培養する。

3.2.2 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 RDE 反応を止める。

3.2.3 攻撃用ウイルスの準備

ウイルス浮遊原液を $100\text{TCID}_{50}/50\ \mu\text{L}$ となるよう、希釈液を用いて希釈する。

3.2.4 バックタイトレーション

- (1) 96 穴プレートを準備し、1 列目から 10 列目の B から H に希釈液を $120\ \mu\text{L}$ 、A には希釈液を $90\ \mu\text{L}$ 添加する。11 列目はウイルス対照 well、12 列目は細胞対照 well とし、ウイルス対照 well 及び細胞対照 well に、希釈液をそれぞれ $60\ \mu\text{L}$ 及び $120\ \mu\text{L}$ 添加する。
- (2) 1 列目から 10 列目の A に攻撃ウイルスを $90\ \mu\text{L}$ 添加し混和する。
- (3) A から $55\ \mu\text{L}$ 取り、順次 $10^{0.5}$ 倍階段希釈する。
- (4) 11 列目のウイルス対照 well には、攻撃ウイルスを $60\ \mu\text{L}$ 添加する。

3.2.5 抗体価測定用プレート

- (1) 12 列目を除く A に希釈液 $72\ \mu\text{L}$ を添加する。
- (2) 96 穴プレートを準備し、12 列目を除く B から H に希釈液を $60\ \mu\text{L}$ 添加する。
- (3) 12 列目を除く A に前処理済み血清を $48\ \mu\text{L}$ 添加し、混和する。
- (4) A から $60\ \mu\text{L}$ 取り、順次 2 倍階段希釈する。
- (5) 12 列目の A から D を細胞対照 well、E から H をウイルス対照 well とし、細

胞対照 well 及びウイルス対照 well に、希釈液をそれぞれ 120 μ L 及び 60 μ L 添加する。

3.2.6 中和反応及び細胞への接種

- (1) 攻撃用ウイルス液を抗体価測定用プレートの 1 から 11 列目及びウイルス対照 well に 60 μ L 添加する。
- (2) プレートを攪拌し、37°C の CO₂ インキュベーターで 30 分間静置する。
- (3) 単層培養した細胞プレートを PBS で洗浄し、攻撃ウイルスを添加した抗体価測定用プレート及びバックタイトレーション用プレートから、細胞プレートへ 100 μ L 移注する。
- (4) 37°C の CO₂ インキュベーターで 5 日間培養する。

3.2.7 細胞の固定及び染色

- (1) 培養後、10%ホルマリン/PBS を 100 μ L 添加し、室温で 10 分以上静置して、固定及び不活化処理を行う。
- (2) 固定及び不活化処理後の上清を除去後、NB 染色液を 50 μ L 添加し、室温で 30 分間 UV 照射下で静置する。
- (3) 染色後、水道水で数回洗浄し、プレートを乾燥する。

3.2.8 吸光度測定

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 50 μ L 添加し、攪拌する。630 nm の波長で吸光度を測定する。

3.2.9 結果の算出方法

- (1) 抗体価測定用プレートについて、細胞対照 4 well とウイルス対照 4 well の吸光度の平均値より高い吸光度を示す well を陽性 well とする。各血清検体の希釈列において、中和陽性となった血清の最大希釈倍数を中和抗体価とする。
- (2) バックタイトレーション用プレートについて、Reed-Muench 法を用いて攻撃用ウイルスの力価を算出する。

3.2.10 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。

- (1) バックタイトレーションの値が $10^{1.5}$ から $10^{2.5}$ TCID₅₀/50 μ L の範囲内である。
- (2) 細胞対照 well に異常を認めない。

(3) 陰性対照血清の抗体価が 10 未満である。

4. 統計学的解析

なし

5. 参考文献

なし