

6. 試験責任者署名

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

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 部長 五味康行

(署名) (年 月 日)

HB-01-P01-V

試験報告書

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 11 月 29 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	保存した資料.....	2
2.	使用した標本.....	3
2.1	使用した標本.....	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	結果の算出方法及.....	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.	試験方法.....	8
4.1	HI 抗体価測定試験結果.....	8
4.2	中和抗体価測定試験結果.....	9
5.	統計学的解析.....	10
6.	参考文献.....	10
7.	試験責任者署名.....	11

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した試験を国立感染症研究所にて実施した（試験番号：HB-01-P01）。

本試験では、HB-01-P01 にて採血した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した。

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				
標本の授受日	2012年	10月	16日				
HI抗体価測定	2012年	10月	18日	～	2012年	10月	24日
中和抗体価測定	2012年	10月	16日	～	2012年	11月	2日
試験終了	2012年	11月	29日				

1.9 試験計画書の変更

試験計画書を変更した場合は、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した。

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した。保存期間は最終報告書作成後10年間とした。

1.11 保存した資料

- (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. 使用した標本

2.1 使用した標本

5週齢の各群雌10匹のBALB/cCrSlc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) した。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した (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、本試験に供試した。

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、溶解した。

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 時間反応させた。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。

3.1.3 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。

3.1.4 HA 価の測定

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

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した。

3.1.6 HI 試験

- (1) 25 μ L の PBS を B 列から H 列まで分注した。
- (2) 50 μ 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 μ L 取り、順次 2 倍階段希釈した。
- (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 $50 \mu\text{L}$ 添加した。
- (7) 攪拌後、室温で 2 時間反応し、判定した。

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 抗体価とした。

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 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) した。単層培養した細胞を回収し、96 well プレートに播種した。細胞プレートは、細胞が単層を形成したまで培養した。

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 時間反応させた。反応終了後、 56°C で 60 分間加温し RDE 反応を止めた。

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した。

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 $90 \mu\text{L}$ 添加した。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 $120 \mu\text{L}$ 添加した。
- (2) 1 列目から 10 列目の A に攻撃ウイルスを $90 \mu\text{L}$ 添加し混和した。
- (3) A から $55 \mu\text{L}$ 取り、順次 $10^{0.5}$ 倍階段希釈した。
- (4) 11 列目のウイルス対照 well には、攻撃ウイルスを $60 \mu\text{L}$ 添加した。

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 $72 \mu\text{L}$ を添加した。
- (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 $60 \mu\text{L}$ 添加した。
- (3) 12 列目を除く A に前処理済み血清を $48 \mu\text{L}$ 添加し、混和した。
- (4) A から $60 \mu\text{L}$ 取り、順次 2 倍階段希釈した。

- (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 添加した。

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 添加した。
- (2) プレートを攪拌し、37°C の CO₂ インキュベーターで 30 分間静置した。
- (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 移注した。
- (4) 37°C の CO₂ インキュベーターで 5 日間培養した。

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なった。
- (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 照射下で静置した。
- (3) 染色後、水道水で数回洗浄し、プレートを乾燥した。

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、攪拌した。630 nm の波長で吸光度を測定した。

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 とした。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した。
- (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した。

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した。

- (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. 試験結果

4.1 HI 抗体価測定試験結果

本試験で得られたマウスの免疫血清の HI 抗体価測定試験の結果を次に示す。

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 HI 抗体価 (ワクチン株)

抗原量 ($\mu\text{gHA}/\text{dose}$)	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

HI 抗体価測定試験結果 (ワクチン株)

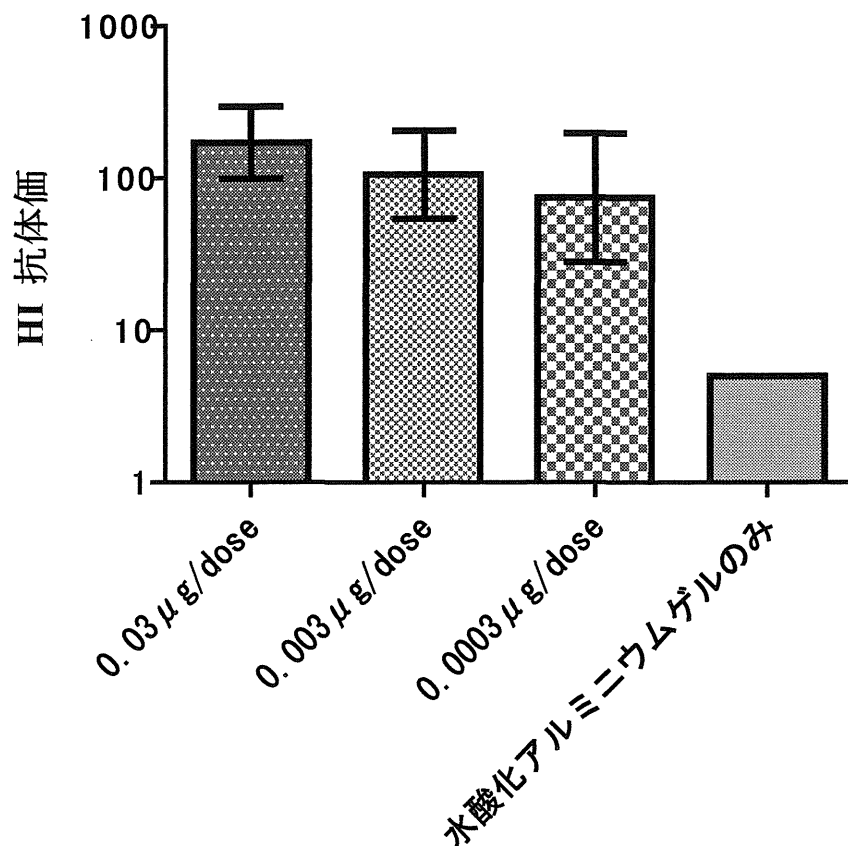


図 1. 細胞培養沈降インフルエンザワクチンを接種したマウス血清の HI 抗体価 (ワクチン株)

上記のとおり、最小用量である 0.0003 μ g HA/dose を接種した群でも、HI 抗体価の幾何平均は人での発症防御レベルとされる 40 を上回っていた。

4.2 中和抗体価測定試験結果

本試験で得られたマウスの免疫血清の中和抗体価測定試験の結果を次に示す。

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中和抗体価（ワクチン株）

抗原量 (μ gHA/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

中和抗体価測定試験結果（ワクチン株）

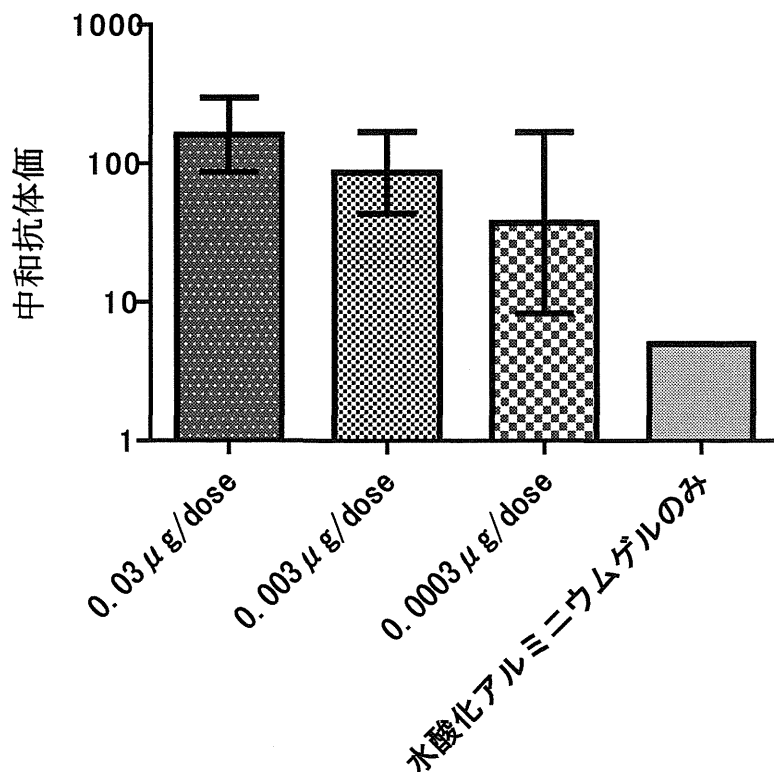


図 3. 細胞培養沈降インフルエンザワクチンを接種したマウス血清の中和抗体価（ワクチン株）

中和抗体価を測定した場合でも、抗体価の上昇については HI 抗体価の場合と同様の傾向が見られた。また、水酸化アルミニウムゲルのみを接種した群では、HI 抗体価測定試験、中和抗体価測定試験ともにインフルエンザに対する抗体価の上昇は見られなかった。

5. 統計学的解析
なし

6. 参考文献
なし

7. 試験責任者署名

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

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 部長 五味康行

（署名）

（ 年 月 日）

KIB-PCI-P03

試験計画書

KIB-PCI 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 : KIB-PCI-P03)

2012年8月10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.....	8
3.4.6	HI 試験.....	8
3.4.7	結果及び試験成立条件.....	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.....	9
3.5.1	MDCK 細胞の調製.....	9
3.5.2	血清の前処理.....	9
3.5.3	攻撃用ウイルスの希釈.....	9

3.5.4	バックタイトレーション.....	9
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.....	10
3.5.7	細胞の固定及び染色.....	10
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	インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワ クチン株) に対する SRH、HI 及び中和抗体価測定	11
4.	統計学的解析.....	11
5.	参考文献.....	11
6.	試験責任者署名.....	12

1. 試験実施概要

1.1 表題

KIB-PCI 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

KIB-PCI-P03

1.3 試験目的

KIB-PCI 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、KIB-PCI 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する。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) に対する Haemagglutination Inhibition (HI) 及び中和抗体価を、インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する Single radial haemolysis (SRH)、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

「インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する SRH、HI 及び中和抗体価測定」

北里第一三共ワクチン株式会社

埼玉県北本市荒井 6 丁目 111

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				
被験物質の受領予定日		2012年	8月	27日				
免疫 予定日	1次免疫	2012年	9月	7日	～	2012年	9月	27日
	2次免疫	2012年	9月	28日	～	2012年	10月	11日
採血予定日		2012年	10月	11日				
ウイルス攻撃予定日		2012年	10月	12日				
生存率観察予定		2012年	10月	12日	～	2012年	10月	26日
HI抗体価測定予定		2012年	10月	15日	～	2012年	10月	18日
中和抗体価測定予定		2012年	10月	15日	～	2012年	10月	30日
北里第一三共ワクチン 株式会社へ標本発送予 定日		2012年	10月	22日				
北里第一三共ワクチン 株式会社で実施した試 験の報告書受領予定日		2012年	12月	7日				
試験終了予定		2012年	12月	21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 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