

## 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	: KIB-PCI
ロット番号	: CR-PCI-012
製造元	: 北里第一三共ワクチン株式会社
HA 含量	: 1 mL 中に 30 $\mu$ g の HA タンパク質および 300 $\mu$ 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 27 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する。
調製濃度	: 0.3、0.012 及び 0.00048 $\mu$ g HA/100 $\mu$ L となるよう PBS で段階希釈する。用事調製する。
残余物質	: すべて廃棄する。

### 2.2 対照物質

名称	: 水酸化アルミニウムゲル
ロット番号	: 12-1(6)-TELHa-1
製造元	: 北里第一三共ワクチン株式会社
HA 含量	: 1 mL 中に 300 $\mu$ 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 27 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する。
調製濃度	: 0.3 $\mu$ g/100 $\mu$ L となるよう PBS で段階希釈する。用事調製する。
残余物質	: すべて廃棄する。

### 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 : 6 週齢  
入手日 : 2012 年 9 月 6 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（左右大腿部筋肉内に 0.05mL ずつ投与）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 回投与する。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する。血清は使用するまで-20℃以下で保存する。また、分離した血清の一部は、ドライアイスを梱包し北里第一三共ワクチン株式会社に送付する。

#### 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	0.3	3	抗体価測定	10
2			ウイルス接種・臨床観察	10
3	0.012	0.12	抗体価測定	10
4			ウイルス接種・臨床観察	10
5	0.00048	0.0048	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（接種する日）、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 日後まで観察する。

- ・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) 1% 赤血球浮遊液

PBS に七面鳥赤血球を加え、1 v/v%赤血球浮遊液を調整する。

#### 3.4.2 血清の前処理

(1) RDE (II) 粉末 1 本に生理食塩液を 20 mL 加え RDE 液とする。

(2) 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。

(3) 56°C で 60 分間加温し、生理食塩液 300  $\mu$ L を添加する。

#### 3.4.3 血球吸収処理

(1) 生理食塩液を加えた血清 300  $\mu$ L に 30  $\mu$ L の赤血球ペレットを添加し、室温で 1 時間反応させた後、遠心 (約 300 $\times$ g、5 分間) し上清を分取する。

(2) 反応後、血球吸収が十分であることを確認するために、非特異的血球凝集因子の除去の確認を実施する。分取した上清 50  $\mu$ L を 96well プレートで 2 倍階段希釈し 50  $\mu$ L/well の 1%赤血球浮遊液を添加する。血清存在下で血球対照と同様に血球が沈殿するかどうかを判定し、非特異的血球凝集因子が除かれたかどうかを調べる。

(3) 非特異的血球凝集因子が除かれた場合は、HI 抗体価測定試験に処理した血清を供する。

(4) 不十分であった場合は、(1)及び(2)の処理と確認を必要に応じて赤血球ペレット添加量を増やし、非特異的血球凝集因子が除かれるまで繰り返し行う。

#### 3.4.4 HA 価の測定

(1) 96 穴プレートの A1~12 列に PBS を 50  $\mu$ L 加え、抗原溶液を 50  $\mu$ L 添加する。A1 well 内を懸濁後 50  $\mu$ L を取り、2~12 列まで 2 倍段階希釈し、12 列目の 50  $\mu$ L は廃棄する。また、A 列を除くいずれか 1 well に陰性対照として 50  $\mu$ L の PBS を添加する。

(2) 1%赤血球浮遊液を A の 1~12 列及び陰性対照 well に 50  $\mu$ L 加え、プレートミキサーで攪拌した後、室温で 30 分間反応させる。反応後、赤血球凝集反応の判定を行う。赤血球凝集を認める最大希釈倍率 (凝集限界) を HA 価とする。

### 3.4.5 バックタイトレーション

- (1) 3.4.4 HA 価の測定において求めた HA 価より、8HA 抗原浮遊液を調製し、バックタイトレーションを行う。
- (2) 8 HA 抗原浮遊液を PBS にて 2.5 倍、3 倍、7 倍に希釈し、96 穴 U 字プレートに A1~D1 に 1 倍、2.5 倍、3 倍及び 7 倍に希釈した抗原浮遊液を 100  $\mu$ L ずつ添加する。A~D の 2~6 列に PBS を 50  $\mu$ L 加え、A~D の 1 列目から 50  $\mu$ L を取り、2~6 列まで 2 倍段階希釈し、6 列目の 50  $\mu$ L は廃棄する。
- (3) 1%赤血球浮遊液を A~D の 1 列から 6 列に 50  $\mu$ L 加え、プレートミキサーで攪拌した後、室温で 30 分間反応させる。反応後、赤血球凝集反応の判定を行う。
- (4) 赤血球凝集を認める最大希釈倍率（凝集限界）を HA 価とし、1 倍、2.5 倍、3 倍及び 7 倍の各 4 希釈系列の HA 価をそれぞれ求める。各希釈系列の中で最も高い値を 8HA 抗原浮遊液の HA 価とする。  
8 HA 抗原浮遊液の HA 価が 8 HA/0.05 mL であることが確認されるまで、8 HA 抗原浮遊液を再調製し、バックタイトレーションを行う。8 HA であることが確認できた 8HA 抗原浮遊液を HI 試験に使用する。

### 3.4.6 HI 試験

- (1) U 底 96 穴プレートの 2~12 列目に PBS 25  $\mu$ L を添加する。1 列目に血球処理した血清を 50  $\mu$ L 添加し、ここから 25  $\mu$ L を取って 11 列目まで 2 倍階段希釈を行う（12 列目は陽性対照 well）。11 列目の溶液 25  $\mu$ L は廃棄する。8HA 抗原浮遊液 25  $\mu$ L を 1~12 列目に加える。別に陰性対照 well を作製し、well 内に 50  $\mu$ L の PBS を添加する。10 分間室温放置後、全ての well に 1%赤血球浮遊液を 50  $\mu$ L/well 添加する。
- (2) 攪拌後、室温で 30 分反応させ、血球凝集の有無を観察し判定する。抗原浮遊液のみを添加した陽性対照 well で血球凝集が起こっていることを確認し、検体希釈列において凝集阻止が確認できた最大血清希釈倍数を HI 抗体価とする。

### 3.4.7 結果及び試験成立条件

検出感度未満（10 倍未満）の個体は HI 抗体価を 5 とし、各群における平均 HI 抗体価は幾何平均を用いて算出する。ただし、以下の条件を全て満たすこと。

- (1) あらかじめ 100 倍希釈した陽性対照血清の HI 価が期待値から  $\pm 1$  管以内であること。
- (2) 陰性対照血清の HI 価が 10 未満であること。

### 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<sup>0.5</sup> 倍段階希釈)。H well 混和後のウイルス液 46  $\mu$ L は廃棄する。また、ここまでの操作が終了したプレートを「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  $\mu$ 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  $\mu$ L 添加する。
- (3) 1 列目の A~H から 50  $\mu$ L 採取し、2 に添加し混和する。さらに 2 列目から 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L、細胞対照 well に希釈液を 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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°C に設定した CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L 接種し、6 日間培養 (37°C、5%CO<sub>2</sub>、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 vol%ホルマリン溶液 100  $\mu$ 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 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、プレートを室温で乾燥させる。

### 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  $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.05 mL の範囲内であること。

### 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

北里第一三共ワクチン株式会社から提出された KIB-PCI-P03-SHN に従い、北里第一三共ワクチン株式会社を実施する。

## 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 : 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

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

---

KIB-PCI-P03

## 試験報告書

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 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	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	8
3.5.1	MDCK 細胞の調製	8
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.	結果.....	12
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 .....	12
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 .....	13
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	A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する SRH 抗体価.....	15
4.5	A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する HI 抗体価 .....	16
4.6	A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する中和抗体価.....	17
5.	考察.....	18
6.	統計学的解析.....	18
7.	参考文献.....	18
8.	添付資料.....	18
9.	試験責任者署名.....	19

## 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

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 : KIB-PCI  
ロット番号 : CR-PCI-012  
製造元 : 北里第一三共ワクチン株式会社  
HA 含量 : 1 mL 中に 30 µg の HA タンパク質および 300 µg 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 27 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 : 0.3、0.012 及び 0.00048 µg HA/100 µL 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 : 12-1(6)-TELHa-1  
製造元 : 北里第一三共ワクチン株式会社  
HA 含量 : 1 mL 中に 300 µg 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 27 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 µg /100 µL 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 : 6 週齢  
入手日 : 2012 年 9 月 6 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 (左右大腿部筋肉内に 0.05mL ずつ投与) 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°C 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北里第一三共ワクチン株式会社へ送付した。

#### 3.2 群構成

	免疫		測定項目	マウス (匹)
	抗原投与量 ( $\mu\text{g}$ HA/mouse)	アルミニウムゲル 投与量 ( $\mu\text{g}$ Alum./mouse)		
1	0.3	3	抗体価測定	10
2			ウイルス接種・臨床観察	10
3	0.012	0.12	抗体価測定	10
4			ウイルス接種・臨床観察	10
5	0.00048	0.0048	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 接種し感染させた。もう片鼻に接種しなかった。

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 日後まで行った。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) 1% 赤血球浮遊液

PBS に七面鳥赤血球を加え、1 v/v%赤血球浮遊液を調整した。

#### 3.4.2 血清の前処理

(1) RDE (II) 粉末 1 本に生理食塩液を 20 mL 加え RDE 液とした。

(2) 血清 50 $\mu$ L に、RDE 液 150 $\mu$ L を添加し、37°C で 18~20 時間反応させた。

(3) 56°C で 60 分間加温し、生理食塩液 300 $\mu$ L を添加した。

#### 3.4.3 血球吸収処理

(1) 生理食塩液を加えた血清 300  $\mu$ L に 30  $\mu$ L の赤血球ペレットを添加し、室温で 1 時間反応させた後、遠心 (約 300 $\times$ g、5 分間) し上清を分取した。

(2) 反応後、血球吸収が十分であることを確認するために、非特異的血球凝集因子の除去の確認を実施した。分取した上清 50 $\mu$ L を 96well プレートで 2 倍階段希釈し 50 $\mu$ L/well の 1%赤血球浮遊液を添加した。血清存在下で血球対照と同様に血球が沈殿するかどうかを判定し、非特異的血球凝集因子が除かれたことを確認した。

#### 3.4.4 HA 価の測定

(1) 96 穴プレートの A1~12 列に PBS を 50  $\mu$ L 加え、抗原溶液を 50  $\mu$ L 添加した。A1 well 内を懸濁後 50  $\mu$ L を取り、2~12 列まで 2 倍段階希釈し、12 列目の 50  $\mu$ L は廃棄した。また、A 列を除くいずれか 1 well に陰性対照として 50  $\mu$ L の PBS を添加した。

(2) 1%赤血球浮遊液を A の 1~12 列及び陰性対照 well に 50  $\mu$ L 加え、プレートミキサーで攪拌した後、室温で 30 分間反応させた。反応後、赤血球凝集反応の判定を行った。赤血球凝集を認める最大希釈倍率 (凝集限界) を HA 価とした。

#### 3.4.5 バックタイトレーション

(1) 3.4.4 HA 価の測定において求めた HA 価より、8HA 抗原浮遊液を調製し、バックタイトレーションを行った。

(2) 8 HA 抗原浮遊液を PBS にて 2.5 倍、3 倍、7 倍に希釈し、96 穴 U 字プレートに A1~D1 に 1 倍、2.5 倍、3 倍及び 7 倍に希釈した抗原浮遊液を 100  $\mu$ L ずつ添加した。A~D の 2~6 列に PBS を 50  $\mu$ L 加え、A~D の 1 列目から 50  $\mu$ L