

を取り、2～6列まで2倍段階希釈し、6列目の50 µLは廃棄した。

- (3) 1%赤血球浮遊液をA～Dの1列から6列に50 µL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。
- (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価をそれぞれ求めた。各希釈系列の中で最も高い値を8HA抗原浮遊液のHA価とした。

8HA抗原浮遊液のHA価が8HA/0.05 mLであることが確認されるまで、8HA抗原浮遊液を再調製し、バックタイトレーションを行った。8HAであることが確認できた8HA抗原浮遊液をHI試験に使用した。

3.4.6 HI試験

- (1) U底96穴プレートの2～12列目にPBS 25 µLを添加した。1列目に血球処理した血清を50 µL添加し、ここから25 µLを取って11列目まで2倍段階希釈を行った（12列目は陽性対照well）。11列目の溶液25 µLは廃棄した。8HA抗原浮遊液25 µLを1～12列目に加えた。別に陰性対照wellを作製し、well内に50 µLのPBSを添加した。10分間室温放置後、全てのwellに1%赤血球浮遊液を50 µL/well添加した。
- (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した。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抗体価とした。

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した。以下の条件は全て満たしていた。

- (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±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 cm²フラスコを用いて10%FBS添加MEM培地で3日間培養（37°C、5%CO₂、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%CO₂、加湿条件下）した。

3.5.2 血清の前処理

血清 50 μ L に、RDE 液 150 μ L 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、希釈液 300 μ 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 TCID₅₀/50 μ 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 μ L、A には希釈液を 75 μ 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 μ L 添加し混和した。
- (3) 7 列目から 11 列目の A から 46 μ L 採取し、B に添加し混和した。混和後 46 μ L を C に添加し、以後同様の操作を H まで行った（10^{0.5} 倍段階希釈）。H well 混和後のウイルス液 46 μ L は廃棄した。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 μ 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 μ L 添加した。
- (3) 1 列目の A～H から 50 μ L 採取し、2 に添加し混和した。さらに 2 列目から 50 μ 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 μ 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 μ L、細胞対照 well に希釈液を 100 μ 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 μ 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 μ 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°C に設定した CO₂ 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 μ L 接種し、6 日間培養（37°C、5%CO₂、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 vol%ホルマリン溶液 100 μ 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った。10 vol%ホルマリン溶液を吸引後、NB 染色液 50 μ 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、プレートを室温で乾燥させた。

3.5.8 吸光度測定

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 μ 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た。測定に用いた攻撃用ウイルスの力価は、Reed-Muench 法により算出し、あらかじめ定めた範囲内であることを確認した。

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、陰性の後に陽性はなかった。

(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していた。

- 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±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。

- 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 $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ TCID₅₀/0.05 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、0.3 μg HA 投与群では 56.57 倍、0.012 μg HA 投与群では 14.14 倍、0.00048 μg HA 投与群では 8.71 倍、PBS 投与群では、5.00 倍であった。(図 1、表 1)。

以上より、KIB-PCI 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。

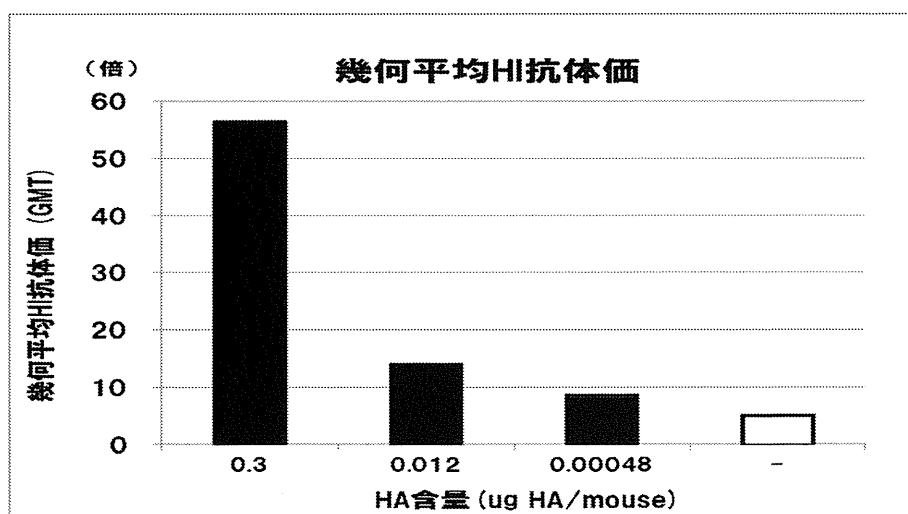


図 1 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する幾何平均 HI 抗体価

表 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

| 抗原 | | 動物数 (n) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | GMT |
|---------|--------------------------|------------|----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| 抗原名 | (μg HA/body) | | | | | | | | | | | | |
| KIB-PCI | 0.3 | 10 | 40 | 20 | 320 | 80 | 80 | 40 | 40 | 80 | 40 | 40 | 56.57 |
| | 0.012 | 10 | 5 | 40 | 10 | 20 | 5 | 20 | 5 | 40 | 20 | 20 | 14.14 |
| | 0.00048 | 10 | 40 | 160 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 8.71 |
| PBS | - | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5.00 |

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、0.3 μg HA 投与群では 905.10 倍、0.012 μg HA 投与群では 149.29 倍、0.00048 μg HA 投与群では 49.25 倍、PBS 投与群では、5.00 倍であった。(図 2、表 2)。

以上より、KIB-PCI 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。

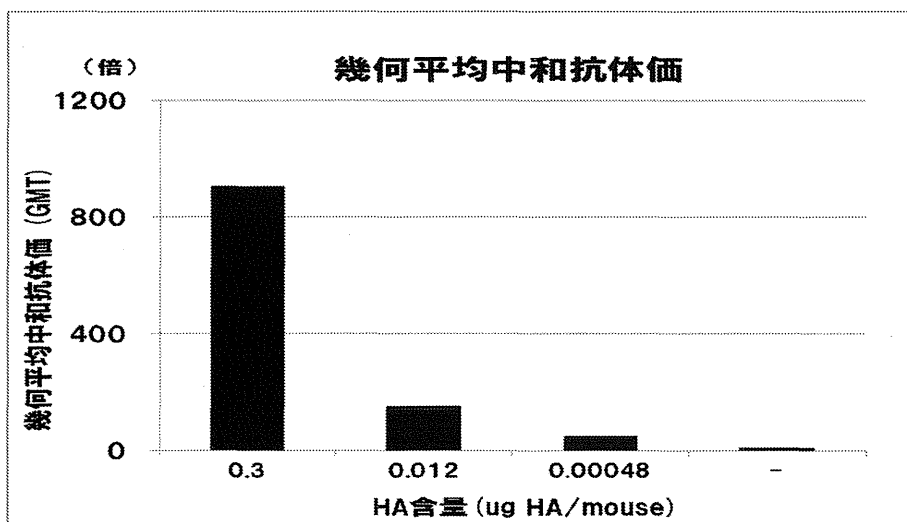


図 2 インドネシア株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) に対する幾何平均中和抗体価

表 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

| 抗原 | | 動物数 (n) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | GMT |
|---------|--------------------------|---------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|-----|------|--------|
| 抗原名 | (μg HA/body) | | | | | | | | | | | | |
| KIB-PCI | 0.3 | 10 | 640 | 640 | 5120 | 1280 | 640 | 320 | 640 | 1280 | 640 | 1280 | 905.10 |
| | 0.012 | 10 | 80 | 320 | 80 | 80 | 80 | 320 | 80 | 320 | 320 | 160 | 149.29 |
| | 0.00048 | 10 | 80 | 640 | 80 | 5 | 80 | 80 | 10 | 20 | 40 | 80 | 49.25 |
| PBS | - | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5.00 |

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、PBS 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、PBS 投与群はウイルス感染後 10 日目にはすべて死亡した。KIB-PCI 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。

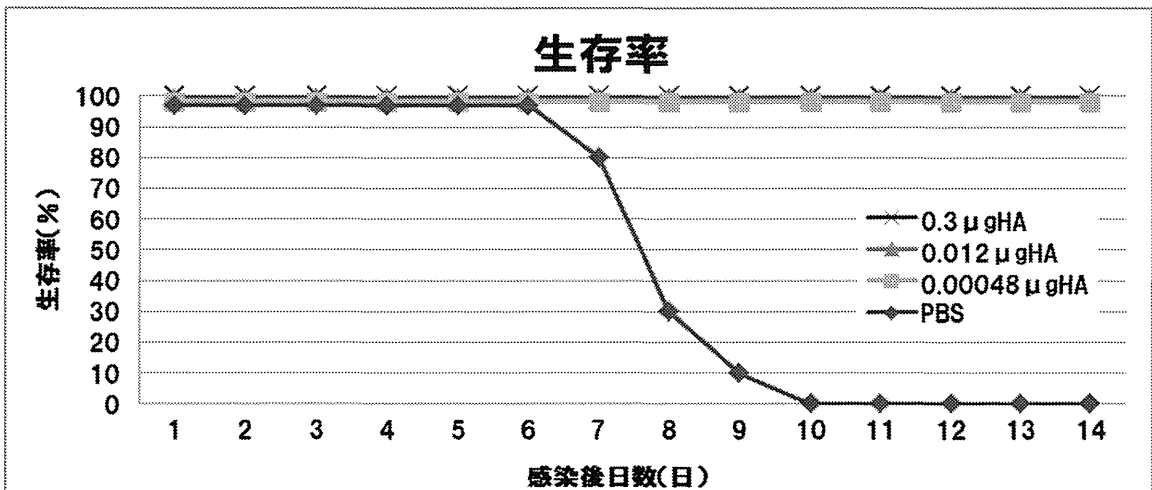


図 3 致死性ウイルス感染後のマウス生存率

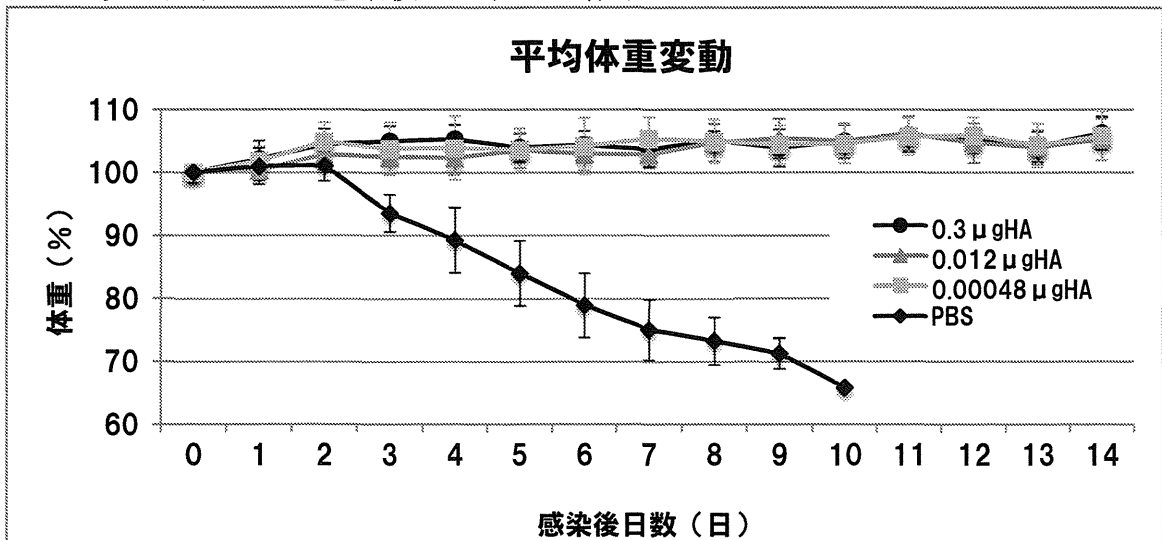


図 4 致死性ウイルス感染後のマウス平均体重変動

※感染前の各群の体重の平均値を 100%とし、体重の変動を割合 (%) で示した。

4.4 A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する SRH 抗体価

幾何平均 SRH 抗体価は、0.3 μg HA 投与群では 74.99 mm^2 、0.012 μg HA 投与群では 51.07 mm^2 、0.00048 μg HA 投与群では 18.36 mm^2 、PBS 投与群では、3.997 mm^2 であった (図 5、表 3)。

以上より、KIB-PCI 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 SRH 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 幾何平均 SRH 抗体価

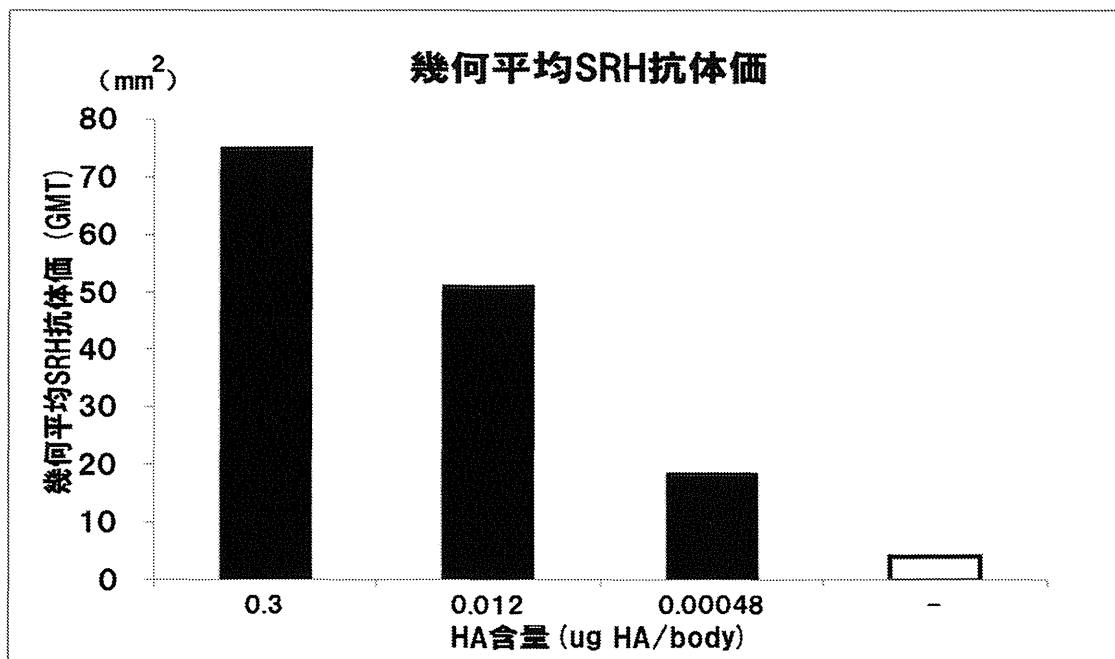


表 3 SRH 抗体価

| No. | 抗原 | | 動物数 (n) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | GMT |
|-----|---------|--------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 抗原名 | (μg HA/body) | | | | | | | | | | | | |
| 1 | KIB-PCI | 0.3 | 10 | 69.62 | 67.98 | 99.04 | 84.52 | 80.73 | 73.27 | 66.04 | 73.27 | 64.42 | 76.97 | 74.99 |
| 3 | | 0.012 | 10 | 48.20 | 61.02 | 56.14 | 64.25 | 46.91 | 48.56 | 31.98 | 51.38 | 62.57 | 48.56 | 51.07 |
| 5 | | 0.00048 | 10 | 33.07 | 71.42 | 38.15 | 19.79 | 42.39 | 27.34 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 33.07 | 18.36 |
| 7 | PBS | - | 10 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 3.997 | 3.997 |

4.5 A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する HI 抗体価

幾何平均 HI 抗体価は、0.3 μg HA 投与群では 49.25 倍、0.012 μg HA 投与群では 13.20 倍、0.00048 μg HA 投与群では 7.58 倍、PBS 投与群では、5.36 倍であった (図 6、表 4)。

以上より、KIB-PCI 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。

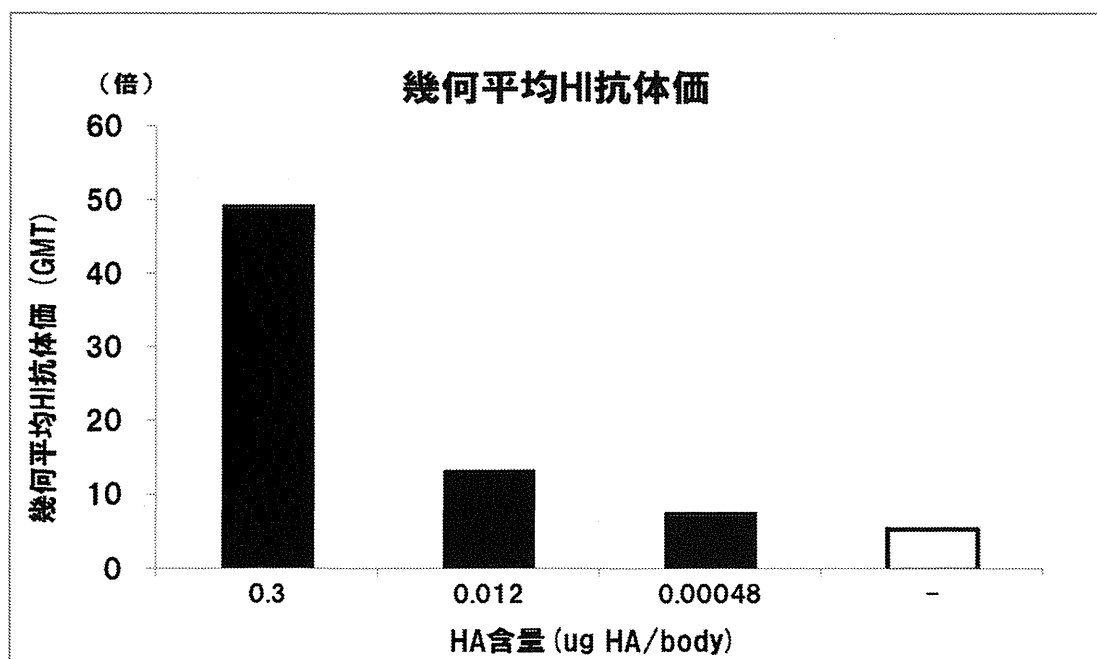


図 6 幾何平均 HI 抗体価

表 4 HI 抗体価

| No. | 抗原 | | 動物数 (n) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | GMT |
|-----|---------|--------------------------|---------|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| | 抗原名 | (μg HA/body) | | | | | | | | | | | | |
| 1 | KIB-PCI | 0.3 | 10 | 40 | 10 | 160 | 80 | 80 | 40 | 40 | 40 | 40 | 80 | 49.25 |
| 3 | | 0.012 | 10 | 5 | 40 | 5 | 20 | 5 | 10 | 10 | 40 | 20 | 20 | 13.20 |
| 5 | | 0.00048 | 10 | 10 | 80 | 5 | 5 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 7.58 |
| 7 | PBS | - | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5.36 |

4.6 A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する中和抗体価

幾何平均中和抗体価は、0.3 μg HA 投与群では 1371.87 倍、0.012 μg HA 投与群では 422.24 倍、0.00048 μg HA 投与群では 105.56 倍、PBS 投与群では、5.36 倍であった（図 7、表 5）。

以上より、KIB-PCI を投与したマウス血清中には、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。

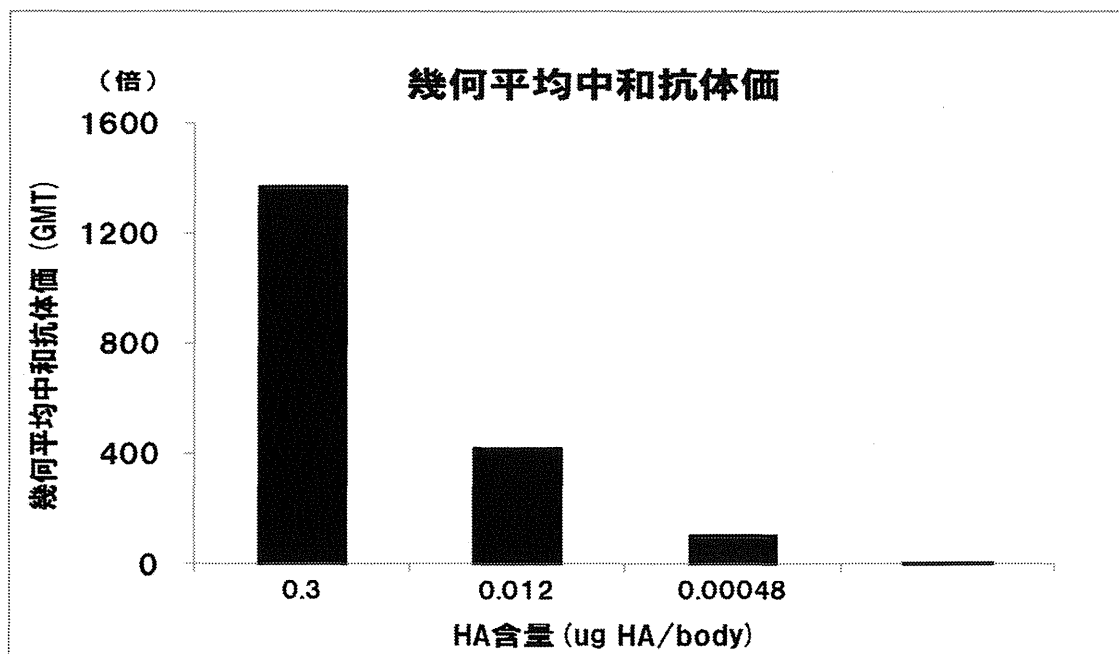


図 7 幾何平均中和抗体価

表 5 中和抗体価

| No. | 抗原 | | 動物数 (n) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | GMT |
|-----|---------|--------------------------|---------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|---------|
| | 抗原名 | (μg HA/body) | | | | | | | | | | | | |
| 1 | KIB-PCI | 0.3 | 10 | 1280 | 640 | 5120 | 1280 | 2560 | 640 | 640 | 1280 | 1280 | 2560 | 1371.87 |
| 3 | | 0.012 | 10 | 160 | 640 | 320 | 640 | 320 | 640 | 160 | 1280 | 640 | 320 | 422.24 |
| 5 | | 0.00048 | 10 | 160 | 2560 | 160 | 10 | 320 | 160 | 20 | 40 | 40 | 160 | 105.56 |
| 7 | PBS | - | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5.36 |

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。マウス血中ウイルス中和抗体の検出感度は HI 抗体や SRH 抗体の検出感度と比較して高く、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 (SRH 抗体価を除く)。一方、ワクチン株に対する HI 価が野生株に対する HI 価とほぼ同等であったのに対し、ワクチン株に対するウイルス中和抗体価は、野生株に対するウイルス中和抗体価と比較して高い傾向が観察された。ワクチン株の改変部位は野生株 HA の連続するトリプシン開裂部位のみであるが、この改変が HA 分子全体の構造に変化をもたらし、マウス体内で産生されるウイルス中和抗体を変化させた可能性も考えられる。

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も存在したことから、被攻撃群マウスにもウイルス感染直前の血中にウイルス中和抗体価が検出できない個体の存在が想定されるが、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。しかしながら、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、中和抗体価と感染防御能との関係は結論できない。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である。

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：KIB-PCI を免疫したマウスの A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1) に対する Single radial haemolysis、Haemagglutination Inhibition 及び中和抗体価測定
試験番号：KIB-PCI-P03-SHN

9. 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-SHN

試験計画書

KIB-PCI を免疫したマウスの A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する Single radial haemolysis、Haemagglutination Inhibition 及び中和抗体価測定試験

(試験番号：KIB-PCI-P03-SHN)

2012 年 8 月 10 日

北里第一三共ワクチン株式会社

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、材料及び機器 | 3 |
| 2.1 | 使用する標本 | 3 |
| 2.2 | 群構成 | 3 |
| 2.3 | 試薬の作製 | 4 |
| 2.3.1 | SRH 抗体価測定試験 | 4 |
| 2.3.2 | HI 抗体価測定試験 | 5 |
| 2.3.3 | 中和抗体価測定試験 | 6 |
| 2.4 | 使用機器 | 9 |
| 3. | 試験方法 | 10 |
| 3.1 | SRH 抗体価測定試験 | 10 |
| 3.1.1 | 試薬調製 | 10 |
| 3.1.2 | HA 価測定 | 10 |
| 3.1.3 | 抗原感作赤血球浮遊液の作製 | 10 |
| 3.1.4 | 標本及び対照血清の非働化处理 | 10 |
| 3.1.5 | SRH 反応プレートの作製 | 10 |
| 3.1.6 | SRH 反応 | 10 |
| 3.1.7 | 溶血環の計測 | 10 |
| 3.1.8 | 結果の算出方法及び試験成立条件 | 11 |
| 3.1.9 | 再試験の取扱い | 11 |
| 3.2 | HI 抗体価測定試験 | 12 |
| 3.2.1 | 試薬調製 | 12 |

| | | |
|--------|-----------------------------------|----|
| 3.2.2 | 血清標本及び対照血清の前処理..... | 12 |
| 3.2.3 | 血球吸収処理..... | 12 |
| 3.2.4 | HA 価の測定..... | 12 |
| 3.2.5 | バックタイトレーション..... | 12 |
| 3.2.6 | HI 試験..... | 13 |
| 3.2.7 | 結果の算出方法及び試験成立条件..... | 13 |
| 3.2.8 | 再試験の取扱い..... | 13 |
| 3.3 | 中和抗体価測定試験..... | 14 |
| 3.3.1 | MDCK 細胞の調製..... | 14 |
| 3.3.2 | 血清標本及び対照血清の前処理..... | 14 |
| 3.3.3 | 血清及び攻撃用ウイルス（バックタイトレーション用）の準備..... | 14 |
| 3.3.4 | バックタイトレーション..... | 14 |
| 3.3.5 | 抗体価測定用プレート..... | 14 |
| 3.3.6 | 中和反応及び細胞への接種..... | 15 |
| 3.3.7 | 細胞の固定及び染色..... | 15 |
| 3.3.8 | 吸光度測定..... | 15 |
| 3.3.9 | 結果の算出方法及び試験成立条件..... | 16 |
| 3.3.10 | 再試験の取扱い..... | 16 |
| 4. | 統計学的解析..... | 16 |
| 5. | 参考文献..... | 16 |
| 6. | 試験責任者署名..... | 17 |

1. 試験実施概要

1.1 表題

KIB-PCI を免疫したマウスの A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する Single radial haemolysis、Haemagglutination Inhibition 及び中和抗体価測定試験

1.2 試験番号

KIB-PCI-P03-SHN

1.3 試験目的

KIB-PCI の A/Indonesia/5/2005 (H5N1)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 A/Indonesia/5/2005 (H5N1)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：KIB-PCI-P03）。

本試験では、KIB-PCI-P03 にて採血する感染直前の血清を用いて、A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)に対する Single radial haemolysis (SRH)、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

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 番地

1.6 試験責任者

北里第一三共ワクチン株式会社
開発研究部長
本川 賢司

1.7 試験担当者

北里第一三共ワクチン株式会社
開発研究部 榎本 匡志
開発研究部 祖父江 友芳
開発研究部 坂上 浩美

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 | 23日 | | | | |
| HI抗体価測定予定 | 2012年 | 10月 | 31日 | ～ | 2012年 | 11月 | 1日 |
| SRH抗体価測定予定 | 2012年 | 10月 | 31日 | ～ | 2012年 | 11月 | 1日 |
| 中和抗体価測定予定 | 2012年 | 10月 | 23日 | ～ | 2012年 | 11月 | 6日 |
| 試験終了予定 | 2012年 | 11月 | 17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北里第一三共ワクチン株式会社 開発研究部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、材料及び機器

2.1 使用する標本

6週齢の各群雌 10匹の BALB/cCr Slc マウスに KIB-PCI (Lot No. : CR-PCI-012) をリン酸緩衝液 (PBS) にて 10、250、6250 倍希釈 (HA 含量として、0.3、0.012 及び 0.00048 μg HA/0.1 mL) した被験物質またはアルミニウムゲル (Lot No. : 12-1(6)-TELHa-1) 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 : KIB-PCI-P03)。標本の一部を感染症研究所から北里第一三共ワクチン株式会社へ送付し、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 | 0.3 | 3 | 抗体価測定 | 10 |
| 2 | | | ウイルス攻撃・臨床観察 | 10 |
| 3 | 0.012 | 0.12 | 抗体価測定 | 10 |
| 4 | | | ウイルス攻撃・臨床観察 | 10 |
| 5 | 0.00048 | 0.0048 | 抗体価測定 | 10 |
| 6 | | | ウイルス攻撃・臨床観察 | 10 |
| 7 | 0 | 3 | 抗体価測定 | 10 |
| 8 | | | ウイルス攻撃・臨床観察 | 10 |

2.3 試薬の作製

2.3.1 SRH 抗体価測定試験

- 1) 名称 : PBS
ロット番号 : 1155712
製造元 : Life Technologies
- 2) 名称 : 七面鳥保存血
ロット番号 : 未定
製造元 : 日本バイオテスト
- 3) 名称 : アガロース、Traditional Gelling Temperature
ロット番号 : 071M0551V
製造元 : Sigma Aldrich
- 4) 名称 : アガロース、Type VII、Low Gelling Temperature
ロット番号 : 061M1393V
製造元 : Sigma Aldrich
- 5) 名称 : アジ化ナトリウム (NaN₃)
ロット番号 : 903S1940
製造元 : 関東化学
- 6) 名称 : 塩化クロム (III) 六水和物 (CrCl₃、6H₂O)
ロット番号 : WER5999
製造元 : 和光純薬工業
- 7) 名称 : モルモット補体血清
ロット番号 : 未定
製造元 : Sigma Aldrich
- 8) 名称 : 蒸留水
ロット番号 : K0C77
製造元 : 大塚製薬工場

- 9) 名称 : 陽性血清 (KIB-PCI 免疫高抗体価マウス血清)
ロット番号 : Serum.PCI-20110113
製造元 : 自社作成 (KIB-PCI を免疫したマウスのプール血清)
- 10) 名称 : 陰性血清 (ヒト正常血清)
ロット番号 : R156026
製造元 : コージンバイオ株式会社
- 11) 名称 : 細胞培養 A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)
ロット番号 : PCI-P II / III-1
製造元 : 自社作成

2.3.2 HI 抗体価測定試験

- 1) 名称 : RDE (II) 粉末
ロット番号 : 422081
製造元 : デンカ生研株式会社
- 2) 名称 : 生理食塩液
ロット番号 : K2C98
製造元 : 株式会社大塚製薬工場
- 3) 名称 : 鶏卵培養 A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1)
ロット番号 : 10-PF-1
製造元 : 自社作成
- 4) 名称 : PBS
ロット番号 : 1155712
製造元 : GIBCO
- 5) 名称 : 七面鳥赤血球
ロット番号 : 未定
製造元 : 株式会社日本バイオテスト研究所
- 6) 名称 : 陰性血清 (ヒト正常血清)
ロット番号 : R156026
製造元 : コージンバイオ株式会社