

- 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 : 452
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
- 7) 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)

2.3.3 中和抗体価測定試験

- 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 : Minimum Essential Medium
ロット番号 : 1119691
製造元 : GIBCO
- 4) 名称 : ウシ胎児血清 (FBS)
ロット番号 : 9E0808
製造元 : ニチレイ
- 5) 名称 : 10,000 U ペニシリン/ストレプトマイシン溶液
ロット番号 : SLBB2608
製造元 : SIGMA
- 6) 名称 : 炭酸水素ナトリウム (試薬特級)
ロット番号 : WEL4611
製造元 : 和光純薬工業株式会社

- 7) 名称 : 10×MEM
ロット番号 : RNBB6125
製造元 : SIGMA
- 8) 名称 : 100×Glutamine
ロット番号 : 395683
製造元 : GIBCO
- 9) 名称 : 1 M HEPES バッファー液
ロット番号 : 1042420
製造元 : GIBCO
- 10) 名称 : 35% ウシ血清アルブミン
ロット番号 : 040M7007
製造元 : SIGMA
- 11) 名称 : アセチル化トリプシン
ロット番号 : SLBC0728V
製造元 : SIGMA
- 12) 名称 : PBS
ロット番号 : 1147315
製造元 : GIBCO
- 13) 名称 : ホルムアルデヒド (試薬特級)
ロット番号 : TLP5688
製造元 : 和光純薬工業株式会社
- 14) 名称 : 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液
ロット番号 : STN0897
製造元 : 和光純薬工業株式会社
- 15) 名称 : ナフトールブルーブラック
ロット番号 : MKBC62255.028
製造元 : SIGMA

- 16) 名称 : 酢酸ナトリウム (試薬特級)
ロット番号 : PEG03955.028
製造元 : 和光純薬工業株式会社
- 17) 名称 : 酢酸 (試薬特級)
ロット番号 : DCH5688
製造元 : 和光純薬工業株式会社
- 18) 名称 : 蒸留水
ロット番号 : K0C77
製造元 : 株式会社大塚製薬工場
- 19) 名称 : 0.25% Trypsin-EDTA
ロット番号 : 1123260
製造元 : GIBCO
- 20) 名称 : MDCK 細胞
ロット番号 : MDW20120820
製造元 : 国立感染症研究所
- 21) 名称 : 攻撃用ウイルス
(A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2(H5N1) : 弱毒株)
ロット番号 : IndH5080918
製造元 : 国立感染症研究所
- 22) 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)
- 23) 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

2.4 使用機器

機器名称	型式	機器番号
遠心機	KUBOTA (6930)	B70221
	TOMY (MX-201)	4231 1111
マイクロピペット	GILSON (P-1000)	DC60396
	GILSON (P-1000)	DC60406
	GILSON (P-200)	CK60471
	GILSON (P-200)	CK60513
	GILSON (P-20)	DG55757
	GILSON (P-20)	DG55782
	12 チャンネルピペット	Thermo (F2)
Thermo (F2)		FJ91793
Thermo (F2)		FJ49963
保冷庫 (4℃)	日本フリーザー (MC-30EF3)	E6127902
低温槽 (-20℃)	SANYO (MDF-V536D)	010232
超低温槽 (-80℃)	SANYO (MDF-U50V)	010006
安全キャビネット	日本エアーテック (BHC-1903 II A/B3)	F203380101
恒温槽	TITEC (PERSONAL-11)	5127038
CO ₂ インキュベーター	Forma Scientific (3326)	35597-6352
プレートリーダー	和光純薬株式会社 (Infinite F200)	607000013
電子天秤	Sartorius (CP224S)	18509411
LAS-3000	GE ヘルスケア	FK-316

3. 試験方法

3.1 SRH 抗体価測定試験

3.1.1 試薬調製

北里第一三共ワクチン株式会社にて定められた手順に従い、作製した。

3.1.2 HA 価測定

北里第一三共ワクチン株式会社にて定められた手順に従い、測定した。

3.1.3 抗原感作赤血球浮遊液の作製

北里第一三共ワクチン株式会社にて定められた手順に従い、作製した。

3.1.4 血清標本及び対照血清の非働化处理

北里第一三共ワクチン株式会社にて定められた手順に従い、非働化处理した。

3.1.5 SRH 反応プレートの作製

北里第一三共ワクチン株式会社にて定められた手順に従い、作製した。

3.1.6 SRH 反応

北里第一三共ワクチン株式会社にて定められた手順に従い、反応させた。

3.1.7 溶血環の計測

モード	Pro モード
Exposure Type	Precision
Exposure Time	1 sec
Sensitivity/Resolution	Standard
Invert Pixels	ON
Light	White(DIA)
Filter	1:Through
Iris	F2.8

表 1 : 画像解析システム条件

- (1) 画像撮影解析システムで溶血環を撮影する。撮影条件は表 1 の通りとした。
- (2) 画像撮影解析システムの画像解析ソフト Multi Gage ver2.0 を用いて溶血環の面積を計測した。

3.1.8 結果の算出方法及び試験成立条件

得られた溶血環の面積を当該血清のSRH抗体価 (mm^2) とした。Multi Gage ver2.0 で算出した溶血環の面積は小数第 2 位まで得られることから、算出した血清のSRH抗体価は小数第 2 位まで表記した。ただし、溶血環の直径がアガロース穴抜き直径 2.256mm のとき (アガロース穴抜きの外側に溶血環が確認できなかったとき)、当該血清のSRH抗体価は 3.997mm^2 とし、Multi Gage ver2.0 を用いて溶血環の面積を測定しなかった。また、各群における平均SRH抗体価は幾何平均を用いて評価した。

設定した下記の条件を全て満たしていた。

- (1) 陽性対照のSRH抗体価が 25mm^2 以上であること。
- (2) 陰性対照のSRH抗体価が 4mm^2 未満であること。
- (3) 陽性対照のSRH抗体価の変動係数が 15%以内であること。

3.1.9 再試験の取扱い

逸脱はなく、再試験は実施しなかった。

3.2 HI 抗体価測定試験

3.2.1 試薬調製

(1) 1% 赤血球浮遊液

「3.1.1(5)HA 価測定用赤血球浮遊液」と同様に調製した。

3.2.2 血清標本及び対照血清の前処理

(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 60 μ L に、RDE 液 180 μ 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 360 μ L を添加した。

3.2.3 血球吸収処理

(1) 生理食塩液を加えた血清 600 μ L に 60 μ 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 100 μ L を 96well プレートで 2 倍階段希釈し 50 μ 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かどうかを調べた。

(3) 非特異的血球凝集因子が除かれた場合は、3.2.5 の HI 抗体価測定試験に処理した血清を供した。

(4) 不十分であった場合は、(1)及び(2)の処理と確認を非特異的血球凝集因子が除かれるまで繰り返し行った。

3.2.4 HA 価の測定

(1) 抗原を PBS にて 10 倍に希釈した保存溶液を作製した。

(2) 抗原保存溶液を 96 穴 U 字プレートの A1 に 100 μ L 添加した。A の 2~12 列に PBS を 50 μ L 加え、A1 から 50 μ L を取り、2~11 列まで 2 倍段階希釈し、11 列目の 50 μ L は廃棄した。

(3) 1%赤血球浮遊液を A の 1~12 列に 50 μ 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。

3.2.5 バックタイトレーション

(1) 3.2.4 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) 8HA 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 μ L ずつ添加した。A~D の 2~6 列に PBS を 50 μ L 加え、A~D の 1 列目から 50 μ L を取り、2~6 列まで 2 倍段階希釈し、6 列目の 50 μ L 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 μ 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。
- (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 3.2.5 HI 試験に使用した。

3.2.6 HI 試験

- (1) 3.2.3 にて血球吸収処理した血清を、PBS にて U 底プレート上で 2 倍段階希釈した（各 well に血清が 25 μ L）。8HA 抗原浮遊液を 25 μ L 加え、10 分間感作させた後、1%赤血球浮遊液を 50 μ L/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。凝集阻止が確認できた血清の最大希釈倍数を HI 抗体価とした。

3.2.7 結果の算出方法及び試験成立条件

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。

設定した下記の条件を全て満たしていた。

- (1) 陽性対照血清の HI 価が 80 以上であること。
- (2) 陰性対照血清の HI 価が 10 未満であること。

3.2.8 再試験の取扱い

逸脱はなく、再試験は実施しなかった。

3.3 中和抗体価測定試験

3.3.1 MDCK 細胞の調製

凍結保存されている細胞を融解後、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日後に細胞を継代し、その3日後に細胞を 2.0×10^4 cell/wellとなるように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、さらに3日間培養（37°C、5%CO₂、加湿条件下）した。

3.3.2 血清標本及び対照血清の前処理

陽性血清を予め生理食塩液を用いて40倍に希釈した。血清100 µLに、RDE液300 µL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分間加熱し、希釈液600 µLを添加した。

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

96 wellマイクロプレートを2枚準備し、1枚目の行をA~H、2枚目をA'~H'とした。攻撃用ウイルス（20 µg/mLアセチル化トリプシン含有100 TCID₅₀/50 µLウイルス液）のバックタイトレーションのあるプレートを「バックタイトレーション測定用のプレート」、それ以外のプレートを「抗体価測定用プレート」という。

3.3.4 バックタイトレーション

- 1) バックタイトレーション測定用のプレートの7列目から11列目のBからHに10 µg/mLアセチル化トリプシン含有希釈液を120 µL、Aにはアセチル化トリプシン非含有である希釈液を90 µL添加した。
- 2) 7列目から11列目のAのwellに攻撃用ウイルスを90 µL添加し混和した。
- 3) 7列目から11列目のAから55 µL採取し、Bに添加し混和した。混和後55 µL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）。

3.3.5 抗体価測定用プレート

抗体価測定用プレートの1列目から9列目は血清標本、10列目は陰性血清及び11列目は陽性血清の希釈系列とし、12列目のA（A'）からD（D'）はウイルス対照well、E（E'）からH（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1列目から11列目のBからHに希釈液を60 µL添加した。また、2枚目の10列目及び11列目のA'を除く1列目から11列目のすべてのwellに希釈液を各60 µL添加した。

- 2) 1 列目から 9 列目の A に前処理済みの血清標本を 120 μL 添加した。10 列目の A 及び A' に前処理済みの陰性血清、11 列目の A 及び A' に前処理済みの陽性血清をそれぞれ 120 μL 添加した。
- 3) 1 列目から 11 列目の A から 60 μL 採取し、B に添加し混和した。さらに B から 60 μL 採取し、C に添加し混和した。以後同様の操作を H まで行い（2 倍段階希釈）、10 列目及び 11 列目の H（陰性血清及び陽性血清）の 60 μL は廃棄した。
- 4) 次に 1 列目から 9 列目の H より 60 μL 採取し、1 列目から 9 列目の A' に移送した後、1 枚目のプレート同様、1 列目から 11 列目の A' から H' まで 2 倍段階希釈を行った。最後に H' の 60 μL は廃棄した。

3.3.6 中和反応及び細胞への接種

- 1) 4.3. の操作終了後、バックタイトレーション測定用の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 90 μL 、細胞対照 well に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アセチル化トリプシン含有希釈液を 120 μL 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 60 μL 添加した。すべてのウイルス対照 well には攻撃用ウイルス液 90 μL 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 分間加温した。希釈プレートの加温終了後、PBS で洗浄後の細胞プレートへ希釈プレートから 100 μL 移送し、5 日間培養（37°C、5%CO₂、加湿条件下）した。

3.3.7 細胞の固定及び染色

培養開始から 5 日後、培養上清を吸引し、10 vol%ホルマリン溶液 100 μL 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 μL 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。

3.3.8 吸光度測定

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

3.3.9 結果の算出方法及び試験成立条件

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) × 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、中和抗体価が 40 倍以上を示したマウスの比率を各群における中和抗体陽性率として算出した。同時に、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。

設定した下記の条件を全て満たしていた。

(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

- 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

- 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。

3.3.10 再試験の取扱い

逸脱はなく、再試験は実施しなかった。

4. 結果

4.1 SRH 抗体価測定試験

幾何平均SRH抗体価は、0.3 μg HA投与群では 74.99mm^2 、0.012 μg HA投与群では 51.07mm^2 、0.00048 μg HA投与群では 18.36mm^2 、PBS投与群では、 3.997mm^2 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(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。

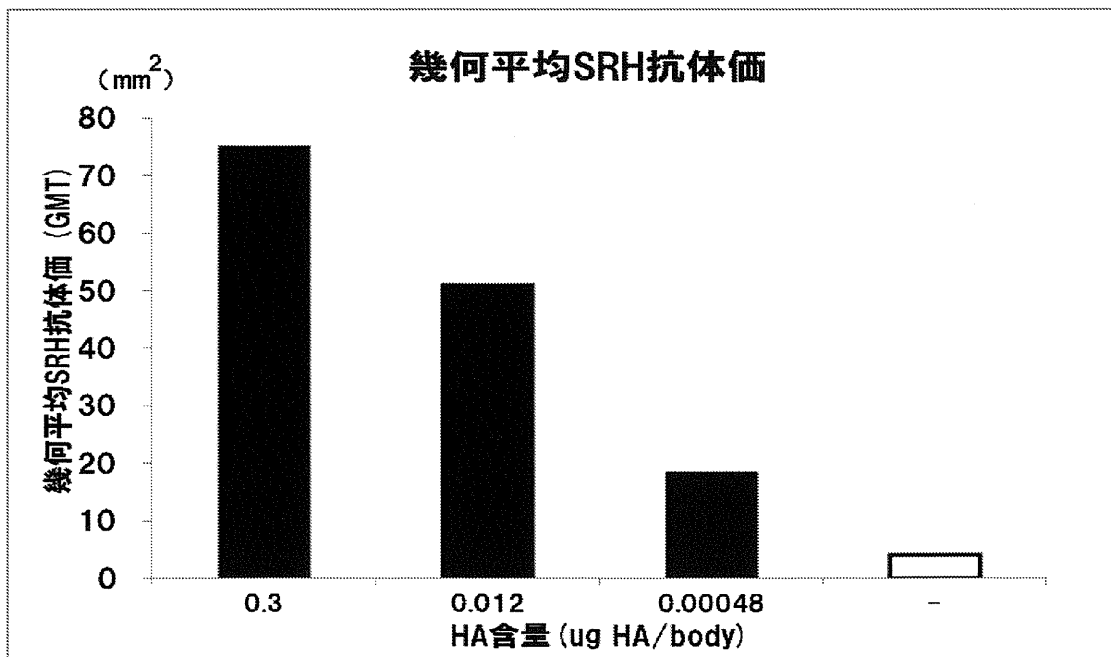


図1 幾何平均 SRH 抗体価

表1 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

4.2 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 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 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 (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。

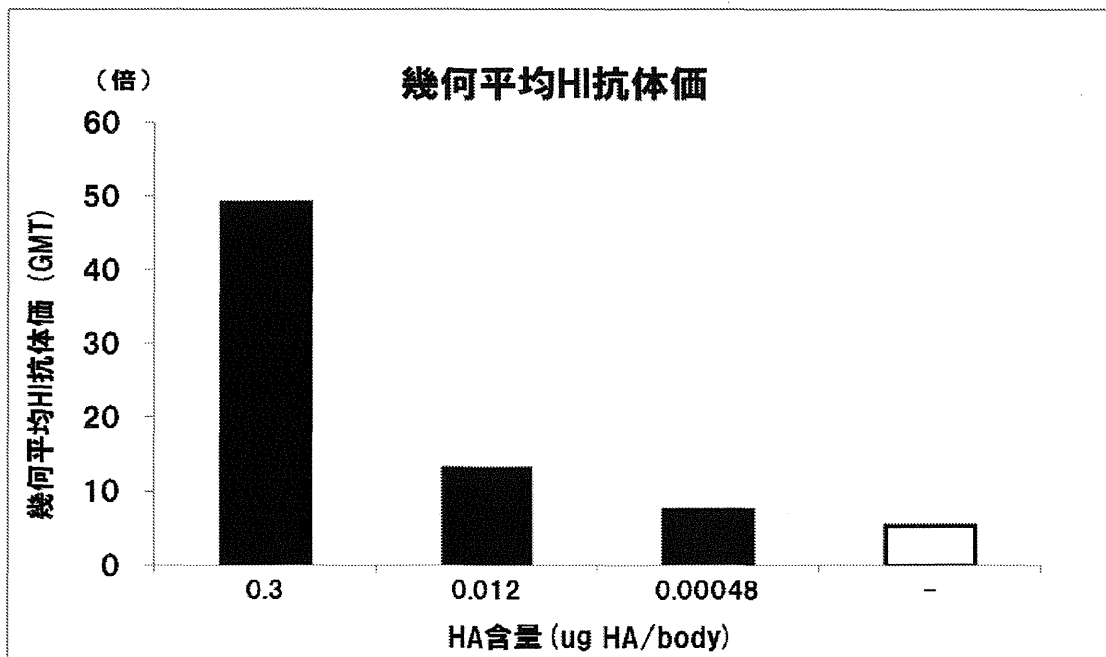


図 2 幾何平均 HI 抗体価

表 2 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

4.3 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 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 3、表 3)。

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。

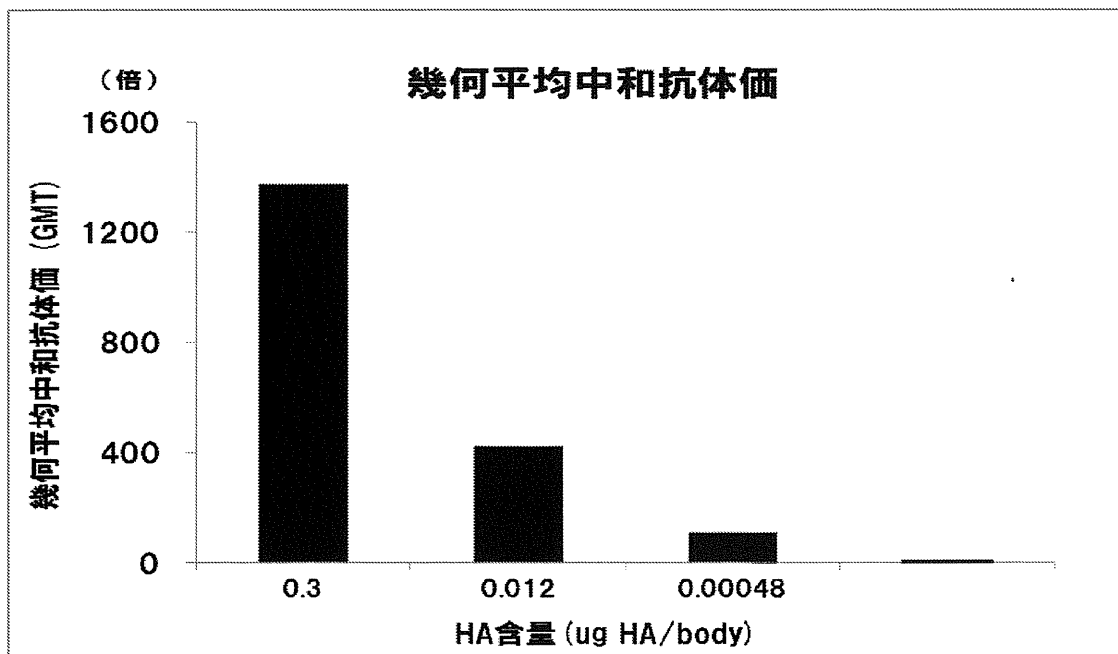


図 3 幾何平均中和抗体価

表 3 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. 参考文献
なし。

KIB-PCI-P03-SHN

6. 試験責任者署名

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

試験番号：KIB-PCI-P03-SHN

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

(署名) _____ (年 月 日)

