

表3 保管等の基準（感染症法関係）

病原体等の保管等の技術上の基準一覧（法第56条の25関係）

対象病原体等		4種病原体等	
		F	G
保管の基準	密封容器に入れ保管庫で保管	○	○
	保管庫等の施設	○	○
	複数名での出し入れ	—	—
	保管施設のバイオハザード標示	○	○
使用の基準	複数名での作業	—	—
	安全キャビネット内での適切な使用 *1	○(クラスⅡ以上)	—
	飲食、喫煙、化粧の禁止	○	○
	防御具の着用	○	○
	退出時の汚染除去等	○	○
	排気、汚染排水・汚染物品の滅菌等	○(排気、汚染排水・汚染物品)	○(汚染物品)
	管理区域に人がみだりに立入らない措置	○	○
	感染させた動物の持ち出し制限	○	○ *2
	感染動物の逸走防止の措置	○	○
	実験室 出入口へのバイオハザード標示	○	○
滅菌等の基準	汚染物品等の滅菌等	121℃、15分以上の高圧蒸気滅菌又は0.01%以上の次亜塩素酸Na浸漬1時間以上又は同等以上の効果を有する方法	【毒素】 1分以上の煮沸又は2.5%以上水酸化Na浸漬30分以上又は同等以上の効果を有する方法 【毒素以外】 左記の方法
	排水の滅菌等	○ (121℃、15分以上の高圧蒸気滅菌又は0.01%以上の次亜塩素酸Na浸漬1時間以上又は同等以上の効果を有する方法)	—

※ 陽圧気密防護服着用の場合（着用前に異常の有無を確認）【編注：本表記載範囲には該当無し】

注釈 *1: 製造施設においては「特定病原体等を拡散させないための措置が講じられていること」に読み替える。
(1種病原体等を除く。)

*2: 毒素を使用した動物は除く。

※ 指定製造施設(厚生労働大臣が使用の様態等に照らし施設基準を課すことが適当でないとする施設)について一部適用除外。

製造施設、検査室の場合は、**実験室** と読み替える。

○ 運搬の基準(1種～4種病原体等)

- ・運搬する場合には容器に封入すること。
- ・容器は、次の基準に適合するものであること。
 - 容易、かつ安全に取り扱えること。
 - 運搬中の温度・内圧の変化、振動等により、破損等が生じる恐れがないこと。
 - みだりに開封されないように容易に破れないシール等が貼り付けられていること。(事業所内の運搬には適用しない。)
 - 内容物の漏洩のおそれのない十分な強度・耐水性があること。
 - 感染性物質危険物表示(バイオハザードマーク)が付されていること。(事業所内の運搬には適用しない。)
- ・容器の車両等への積付けは、運搬中の移動、転倒、転落等により安全性が損なわれないように行うこと。
- ・この他厚生労働大臣が定める基準に適合すること。→別途告示。

【編注】

- ・「法」とは感染症法(感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律)を指す。
- ・インフルエンザ(新型でないものも含む)の病原体は4種病原体に分類されるため、1種～3種病原体の記載は省略した。
- ・「対象病原体等」の区分「F」は、厚生労働省「病原体等の名称と疾患名称の対照表」(添付資料 表1 参照)の参考欄における「BSL3」に対応する。また、「G」は「BSL2」に対応する。

(出典：厚生労働省ホームページ www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou17/pdf/03-06.pdf)

表4 質疑応答集（検討用文案作成時実施）

細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティ対策
 質疑応答集（検討用文案作成時実施）

特定非営利活動法人 バイオメディカルサイエンス研究会
 新型インフルエンザワクチン短期製造装置等の
 確立に関する調査研究班

本表は、「細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティ対策」の内容をより適切で理解しやすいものとして発行するため、その編集の過程において、
 ワクチン分野の専門家かつ実際の適用者でもありうる日本国内のワクチン製造関係者に、検討用文案を送付して、各送付先との質疑応答を行った結果をまとめたものである。
 本表では、各送付先別であった質疑応答内容を、総合的にまとめ、整理した。

対象 文書	最終版原稿		検討用文案(2011/09/26案)				
	No.	項目	ページ	ページ	検討用文案(2011/09/26案)での記述文面	質問・確認内容	調査研究班 回答内容
1. 全般							
(1)	全般	-	-	-	-	本資料の位置づけを紹介して欲しい。 今後、規制要件となる内容か。	本資料は設備計画に当たっての参考となるよう、関連規制、ガイドライン類、実施例の紹介を目的としたものであり、新たに規制要件を設けるものではありません。 最終的に科学研究費指定研究の協力研究班成果として公開を予定しておりますが、その前に各ワクチンメーカー、厚労省、PMDAの御意見を伺う予定です。
2. 2章（日本及びWHOのバイオセーフティに関するガイドライン）							
(1)	2.3.1 製造に係わるBSL1構造設備	p.8	p.6	-	-	「日本及びWHOとも、製造に係わる構造設備の要件は適用されない。」とあり、記載内容が理解し難いがこれで良いか。当方では、BSL1の病原体（生ワクチン製造用株等）であっても、国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別表2 付表1、を参考に、ワクチン製造等のために大量培養（20Lを超える）作業を行う施設は、1ランク上の構造設備にすべきと考え対応している。また、廃棄物、廃液の消毒・滅菌の取り扱いについても同様と考え対応している。	御指摘のケースは、実際の対応においては病原菌等の通常のBSL分類よりもリスクが上がると判断し、構造設備など諸対応のBSLとしては1ランク上のものを指定するケースと考えます。その場合は、構造設備などの1ランク上の要件を選んで参照することになります。各BSL自体の要件を変更するわけではありません。したがって、現状のBSL1の記述でも、特に支障はないと考えます。

対象文書		最終版原稿		検討用文案(2011/09/26案)		
No.	項目	ページ	ページ	検討用文案(2011/09/26案)での記述文面	質問・確認内容	調査研究班 回答内容
(2)	2.3.2 製造に係わるBSL2構造設備、 2.4.2 試験検査に係わるBSL2構造設備	p.8, p.12	p.6, p.10	室内への気流要 HEPA不要	WHO BSL2の陰圧管理において「室内への気流要HEPA不要」との記載だが、これは、吸気のHEPA設置は不要であるが、陰圧管理が必要である。との内容か。	室内への気流は必要ですが、陰圧管理までは要求されていません。HEPAは不要と考えます。WHO BSL2の原文を下記します。 Ventilation 1. There are no specific ventilation requirements. In the planning of new facilities, however, consideration should be given to the provision of mechanical ventilation systems that provide an inward flow of air without recirculation. If there is no mechanical ventilation, windows should be openable and preferably fitted with arthropod-proof screens. 【編注：本回答は質問されたバイオセーフティ指針の記述に関してであり、GMP上の考慮は含まれていない。HEPA設置要否はGMP上でも検討される必要がある。最終版原稿では本文にも注意喚起を追加した。】
3. 3章（新型インフルエンザワクチン製造のバイオセーフティ対策）						
(1)	3.1施設 他	p.14 ～p.15	p.11 ～p.15	—	ワクチンの製造施設について記載されているが、「製造・実験室」との表現がある。「実験室とはワクチンの品質管理試験等を行う施設」と理解すれば良いか。	御理解の通りと考えます。
(2)	3.1施設 3.1.1 施設・区域の独立 ～ 3.1.5 バイオセキユリティ	p.14 ～p.15	p.11 ～p.14	3.1施設 3.1.1 インフルエンザワクチン製造施設は、その他の施設とは…。 ～ 3.1.30 実験室の侵入対策のため物質的耐久性と…。	3.1.1～3.1.30まで箇条書きで記載されているが、3.2空調設備の項のように内容でまとめるとより良いのではないか。	検討チーム内でも同様な指摘があり、中項目単位に区分することにしております。 【編注：最終版原稿では、3.1.1～3.1.5の5つの中項目に区分した。】
(3)	3.1.1 施設・区域の独立 1)	p.14	p.11	インフルエンザワクチン製造施設は、その他の施設とは明確に区別される構造とする。	(旧3.1.1) 「インフルエンザワクチン製造施設」と区別される「その他の施設」とは「製造施設以外」を指すか、「その他の製造施設」を指すか、明確に表現をしないか。	より明確に表現するため、「その他の施設」を「その他の区域」に修正します。 例えば、「インフルエンザワクチン製造施設と他の製造施設との両方に面する廊下」と「他の製造施設」は、いずれもインフルエンザワクチン製造施設との明確な区分けの外部に設置される区域と考えられ、参考文献5「医薬品製造におけるバイオセーフティ対策—インフルエンザワクチン製造を例に—」(平成13年度厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業))図1にその旨の図示があります。

対象 文書	最終版原稿		検討用文案(2011/09/26案)			
	No.	項目	ページ	ページ	検討用文案(2011/09/26案)での記述文面	質問・確認内容
(4)	3.1.2 作業者の安全 1)	p.14	p.12	—	(旧3.1.4)「製造・実験室」とあるが、製造室／実験室それぞれの室の用途が定義されていると理解しやすいと思われる。また、以下には「実験室」のみの記載があるが、「製造・実験室」と区別ある場合はその旨の記載が欲しい。	製造室はBSL対応製造作業が行われる室、実験室は製造以外のBSL対応作業が行われる室です。用語定義の項(1.1項)に両室の定義を加えるようにします。また、「実験室」のみと記載していた箇所は、「製造・実験室」が適切でしたので、その旨修正します。…【*1】
	3.1.3 施設からの漏出防止 1)	p.14、p.15	p.12、p.13	p.12 3.1.3 1)項 (旧3.1.5) …実験室で通常使用する薬品や消毒薬に耐え得るものとする。	—	修正箇所： p.4 1.1項 製造室・実験室の定義を追記 p.12 3.1.3 1)項 「実験室」⇒「製造・実験室」 p.13 3.1.5 1)項 「実験室」⇒「製造・実験室」
	3.1.5 バイオセキュリティ 1)			p.13 3.1.5 1)項 (旧3.1.30) …実験室の侵入対策のため物質的耐久性と耐火性を考慮する。		
(5)	3.1.2 作業者の安全 5)	p.14	p.13	製造・実験室の設備は頑丈なものとする。作業台、キャビネット、機器の間と下の開放空間は、清掃できる空間を確保する。【WHO製BSL1】【WHO実BSL2】	(旧3.1.19)「清掃できる空間を確保する」とあるが、加えて消毒も必要ではないか。	・本項の記述は、実際は“WHO実BSL2”の記述を基にしたものです。 この“WHO実BSL2”には、本項の開放空間について消毒必要との記載はないため、本書でのさらなる限定は避けたく考えます。 (なお、一般的には、清掃できるだけの空間があれば、例えば消毒剤清拭などの消毒作業は実施可能と考えます。) ・“WHO製BSL1”には本項の開放空間についての明記はないため、「【WHO製BSL1】」は削除します。
(6)	3.1.3 施設からの漏出防止 1)	p.14	p.12	—	(旧3.1.5)「製造・実験室」とあるが、ウイルスを取り扱う管理区域内の製造・実験室が対象ではないか。	本書での各室の設備要件は、特記なき場合、当然ながらBSL対象の微生物を取り扱う管理区域内が対象です。したがって文章簡潔化のため、それに関する説明は原則として省略しております。 また、「管理区域」がどのようなものであるかは、現在本文(2.2.1(1)項)に示しておりますが、さらに明示するため用語定義の項(1.1項)に定義を記載するようにします。…【*2】
(7)	3.1.3 施設からの漏出防止 1)	p.14	p.12	製造・実験室は、… 加えて、消毒用の通気管システムを有する。	(旧3.1.5) 通気管システムの具体例が示されると理解しやすい。	燻蒸消毒後(職員立入前)の室内換気を行う通気管と換気システムを指します。「消毒ができるように…」と修正します。
(8)	3.1.3 施設からの漏出防止 4)	p.15	p.12	—	(旧3.1.9)「管理区域外への貫通部、…は確実にシールする」とあるが、どのような管理区域が明示が必要ではないか。	【*2】と同様
(9)	3.1.3 施設からの漏出防止 6)	p.15	p.12	—	(旧3.1.13)「手洗い、流し台等の蛇口は、相互汚染を防ぐため自動又は肘式もしくは足踏み式とする」とあるが、対象となる管理区域であることの記載が必要ではないか。	【*2】と同様

対象 文書	最終版原稿		検討用文案(2011/09/26案)			
	No.	項目	ページ	ページ	検討用文案(2011/09/26案)での記述文面	質問・確認内容
(10)	3.1.3 施設からの漏出防止7)	p.15	p.12	排水系には逆流防止装置を設置する。	(旧3.1.16)「排水系には逆流防止装置を設置する」とあるが、逆流防止装置はすべての排水系に必要か。	相互汚染を防ぐ上では、原則すべての排水系に必要と考えます。 記述としては装置に限定せず、「逆流防止装置または機能を備える。」と修正します。 但し非汚染系から供給される用役等で、汚染可能性のある場所に漏出しないまで非汚染系に戻るものは、ここでの排水系には含まれないものとします。
(11)	3.1.4 不測の事態への対応策1)	p.15	p.12	・・・加えて、全身シャワーをBSL3 Enhanced 封じ込め施設の出口に設置する。	(旧3.1.10)「BSL3 Enhanced封じ込め施設」とあるが、「施設」は前項の「管理区域」と同等か。	ここでは同等です。記述を「また、BSL3 Enhanced区域の出口については全身シャワー装置を備える。」と修正します。
(12)	3.1.4 不測の事態への対応策4)	p.15	p.13	適切な設備を有し、常時利用できる救急区域や救急室を整備する。	(旧3.1.25) 救急区域や救急室は、具体的に設置場所の記載が必要ではないか。	「常時利用できるアクセスが容易な」と修正します。 参照した原典の英語版(WHO製BSL1、WHO実BSL2英語版)には、「readily accessible」とありますので、要件として「アクセスが容易なこと」が含まれていると考えます。 現状(修正前)の記述の基とした日本語版WHO実BSL2には、「アクセスが容易な」という表現が使われておりませんが、上記にかんがみ追記します。
(13)	3.1.5 バイオセキュリティ1)	p.15	p.13	実験室の侵入対策のため物質的耐久性と耐火性を考慮する。強固な扉、格子付き窓、鍵の交付の制限及び安全保障強化の必要に応じその他の対策を行う。【WHO実BSL2】	(旧3.1.30)「強固な扉、格子付き窓、鍵の交付の制限及び安全保障強化の必要に応じその他の対策を行う」とあるが、この記載だと「強固な扉、格子付き窓、鍵の交付の制限」が前提とも読み取れる。安全保障対策としては各社それぞれの対策を取らうので、「必要に応じて安全保障強化の対策を行う」で良いと思われるが。	この文は参考文献14「WHO実験室バイオセーフティ指針(第3版)」を参照した記述です。そのため「強固な扉、格子付き窓、鍵の交付の制限」は、前提として要求されることとなります。 但し、上記指針の参照有無はケースバイケースであり、例えば製造に係わるBSL2構造設備の“WHO BSL2 Enhanced”では参照しますが、“WHO BSL2”では参照しません(※1)。 したがって、以下の記述に修正し考えます。 ”製造・実験室の侵入対策のため、必要に応じて安全保障強化を実施する。 加えて、物質的耐久性と耐火性を考慮する。強固な扉、格子付き窓、鍵の交付の制限を行う。【WHO実BSL2】” (※1): 製造に係わる“WHO BSL2”で参照する指針は、参考文献3「Biosafety Guidelines for Personnel Engaged in the Production of Vaccines and Biological Products for Medical Use」(WHO/CDS/BVI/95.5)の方になります。

対象 文書	最終版原稿		検討用文案(2011/09/26案)				
	No.	項目	ページ	ページ	検討用文案(2011/09/26案)での記述文面	質問・確認内容	調査研究班 回答内容
(14)	3.1.5 バイオセキュリティ(1)	p.15	p.13	同上		(旧3.1.30)「実験室」とあるが、製造室の併記は不要か。	【*1】と同様
(15)	3.2.6 空調設備の不測の事態への対応策	p.16	p.14	—		「直ちに」という表現は解釈が難しいため、省いた方が良いと思われる。	「直ちに」は突然の空調停止の際にウイルス漏出を防止するために閉まることを意味しており、省くとその意味が失われます。したがって削除なしとします。また、かっこ内は例示であり、「これ以外は不適切」という意味ではありませんので、現状の記載でも特に支障はないと考えます。
(16)	3.3.3 密閉型装置(3)	p.17	p.15	—		堰を立ち上げる「機器の周囲」とは機器直近を指す場合と機器設置室内も指す場合があるかと思われる。「適切に」の表記が欲しい。	参照した原典(WHO-BSL3E)では御質問での片方の場合に限定した記述、および「適切に」という記述はないため、本書でのさらなる限定は避けたく考えます。一般的には、部屋の腰壁としてではなく機器廻りの堰として設置され、1基単位が数基まとめてかばケースハイケースにならうかと考えます。
(17)	3.3.3 密閉型装置(3)	p.17	p.15	—		「バイオリアクター…、機器の周囲には堰を立ち上げる。」とあるが、「機器の周囲には堰を立ち上げる等、ウイルスが漏出しても管理区域外に漏出しない構造とする。」のような別途の対応が可能な表現にして頂きたい。	参照した原典【WHO-BSL3E】では「堰」が必要とされているため、この表現のままとします。但し本項はWHO BSL3 Enhancedのみの要求事項なので、通常の場合であれば対応不要かと想定します。 以下に原典の該当部分を抜粋します。 3.4.2 Specifications for “BSL3 enhanced (pandemic influenza vaccine)” 3.4.2.1 Facility — floor dams should be erected around bioreactors or other large scale equipment including storage tanks to contain spillage of virus from large virus-containing vessels
(18)	3.4 廃棄物の処理	p.17	p.15	… 管理区域内で適切な薬剤又は加熱消毒等の処理後、製造所内の焼却施設で焼却する。		「製造所内の焼却施設で焼却」とあるが、「製造所内」でなく「敷地内」と思う。	「原則として製造所内の…」と修正します。廃棄物処理の法令／指導の内容は深く膨大なため、本書では十分記述しかねるのが実情です。それに対し本書のメインテーマは廃棄物処理よりは製造のBSLですので、ここをさらに詳細化するよりは、記述対象を広くカバーする表現で対応したく考えます。なお、参考文献4の「8.廃棄物」では「製造所内」なので、現状でも合っています。
(19)	3.4 廃棄物の処理	p.17	p.15	同上		「焼却施設で焼却」とあるが、焼却しない場合は想定できないか。	焼却せず業者委託することなども想定されます。直前のコメントと重複する対応になりますが、「原則として製造所内の…」と修正します。

HB-01-P01

試験報告書

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)

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	7
3.4.7 結果の算出方法	8
3.4.8 結果の算出方法	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.....	8
3.5.3	攻撃用ウイルスの希釈.....	8
3.5.4	バックタイトレーション.....	8
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.....	9
3.5.7	細胞の固定及び染色.....	9
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	ワクチン株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する HI 及び中和抗体価測定.....	10
4.	結果.....	11
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.....	11
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.....	12
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	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.....	16
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.....	18
5.	考察.....	19
6.	統計学的解析.....	20
7.	参考文献.....	20
8.	添付資料.....	20
9.	試験責任者署名.....	21

1. 試験実施概要

1.1 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

1.2 試験番号

HB-01-P01

1.3 試験目的

HB-01 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、HB-01 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した。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) 及びワクチン株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する 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

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

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

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				
被験物質の受領日		2012年	8月	24日				
免疫 予定日	1次免疫	2012年	9月	29日	～	2012年	9月	18日
	2次免疫	2012年	9月	19日	～	2012年	10月	2日
採血日		2012年	10月	2日				
ウイルス攻撃日		2012年	10月	3日				
生存率観察		2012年	10月	3日	～	2012年	10月	17日
HI抗体価測定		2012年	10月	4日	～	2012年	10月	10日
中和抗体価測定		2012年	10月	4日	～	2012年	10月	19日
一般財団法人阪大微生物病研究会への標本発送日		2012年	10月	15日				
一般財団法人阪大微生物病研究会で実施した試験の報告書受領日		2012年	12月	7日				
試験終了日		2012年	12月	21日				

1.9 試験計画書の変更

試験計画書の変更はなかった。

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 : HB-01
ロット番号 : IFM1103
製造元 : 一般財団法人 阪大微生物病研究会
HA 含量 : 1 mL 中に 30 μ g の HA タンパク質および 300 μ 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 24 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 : 0.03、0.003 及び 0.0003 μ g HA/100 μ L 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 : AL120822
製造元 : 一般財団法人 阪大微生物病研究会
HA 含量 : 1 mL 中に 300 μ 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 24 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 μ g/100 μ L 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 : 5 週齢
入手日 : 2012 年 8 月 28 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 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℃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一般財団法人阪大微生物病研究会に送付した。

3.2 群構成

	免疫		測定項目	マウス (匹)
	抗原投与量 (μ g HA/mouse)	アルミニウムゲル 投与量 (μ g Alum./mouse)		
1	0.03	0.3	抗体価測定	10
2			ウイルス接種・臨床観察	10
3	0.003	0.03	抗体価測定	10
4			ウイルス接種・臨床観察	10
5	0.0003	0.003	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 ₅₀ / 50 μ L
調製後の力価(20MLD ₅₀)	: $10^{4.0}$ TCID ₅₀ / 10 μ 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 MLD₅₀/0.01mL 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 (接種した日)、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) RDE II 「生研」に生理食塩水 20mL を添加し、溶解した。

3.4.2 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した。

3.4.3 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。

3.4.4 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。

3.4.5 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。

3.4.6 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 μ L 添加した。
- (7) 攪拌後、室温で 2 時間反応し、判定した。

3.4.7 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。

3.4.8 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。

3.5 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 時間反応させる。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 まで行う ($10^{0.5}$ 倍段階希釈)。H well 混和後のウイルス液 $46 \mu\text{L}$ は廃棄した。また、ここまでの操作が終了したプレートに「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 $50 \mu\text{L}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 添加した。
- (3) 1 列目の A~H から $50 \mu\text{L}$ 採取し、2 に添加し混和した。さらに 2 列目から $50 \mu\text{L}$ 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 $50 \mu\text{L}$ 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 $50 \mu\text{L}$ 、細胞対照 well に希釈液を $100 \mu\text{L}$ 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 $50 \mu\text{L}$ 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 $50 \mu\text{L}$ 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 CO_2 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 $100 \mu\text{L}$ 接種し、6 日間培養 (37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、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、 $10 \text{ vol}\%$ ホルマリン溶液 $100 \mu\text{L}$ 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。 $10 \text{ vol}\%$ 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 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、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。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 ± 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 $10^{1.7} \sim 10^{2.6}$ TCID₅₀/0.05 mL の範囲内であること。

3.6 ワクチン株 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1)-PR8-IBCDC-RG2、弱毒型ワクチン株) に対する HI 及び中和抗体価測定

阪大微生物病研究会から提出された HB-01-P01-V に従い、阪大微生物病研究会が

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、0.03 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 1、表 1)。

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 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 (A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株)

