

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し、体重の減少もほとんど観察されなかった。

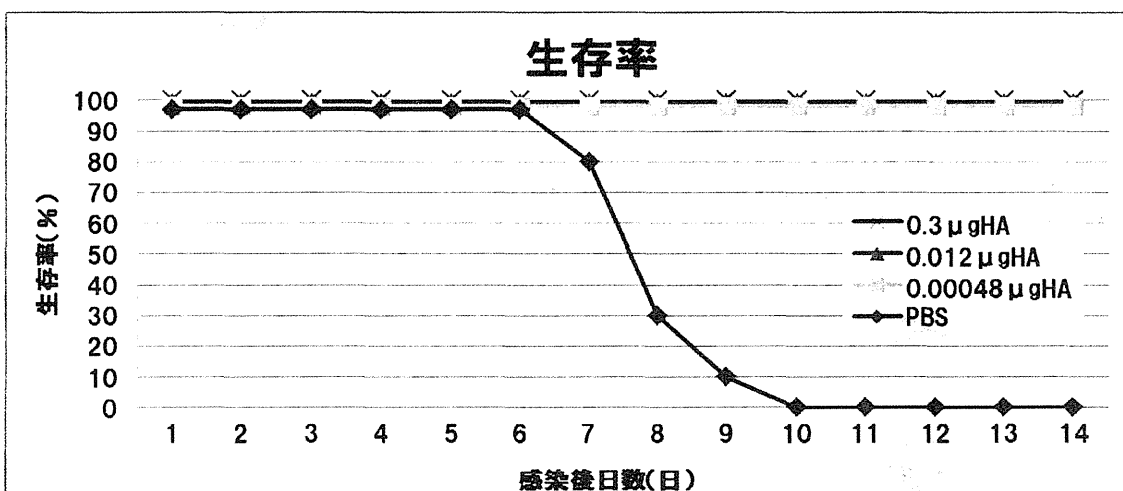


図 3 致死性ウイルス感染後のマウス生存率

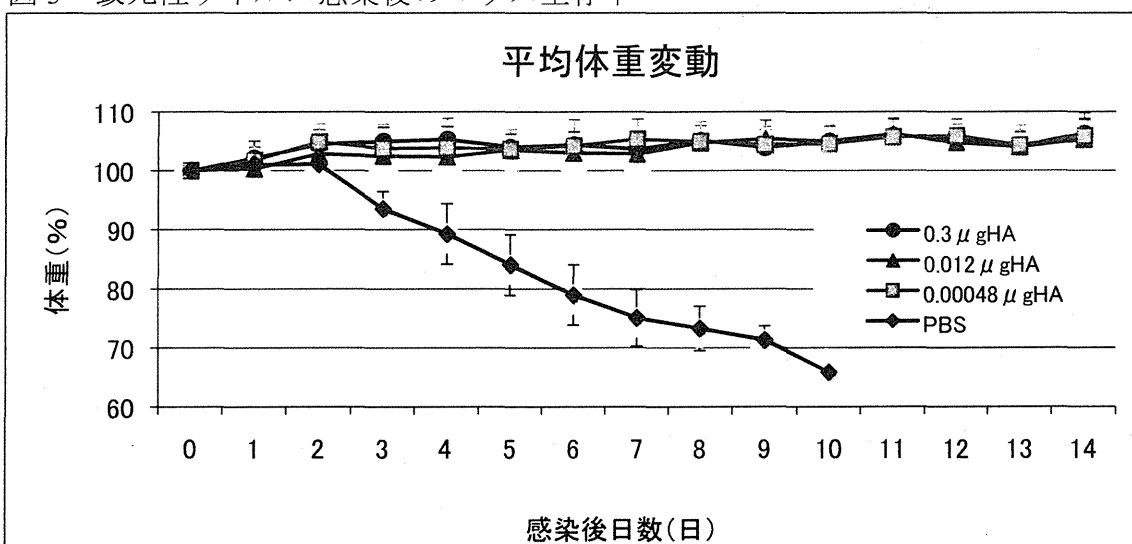


図 4 致死性ウイルス感染後のマウス平均体重変動

※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

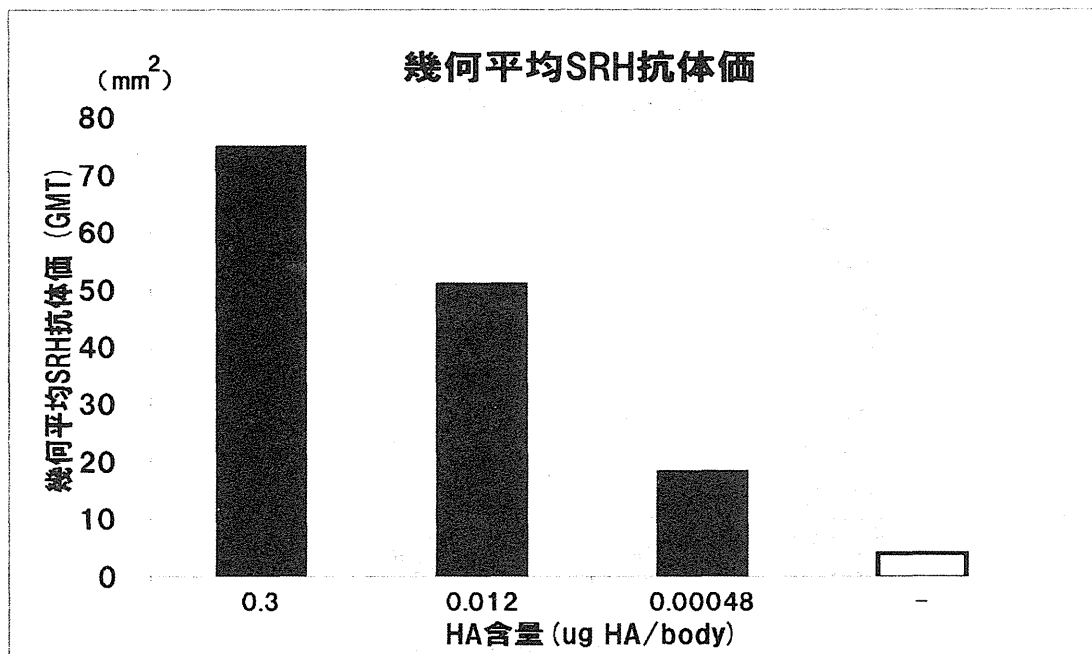


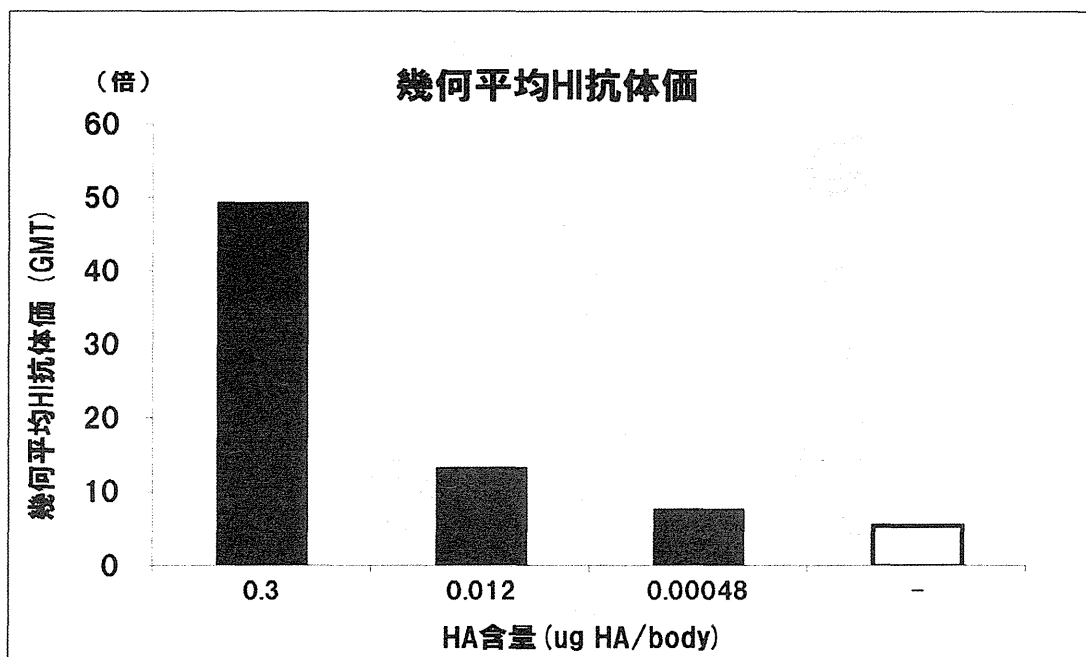
表 3 SRH 抗体価

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。

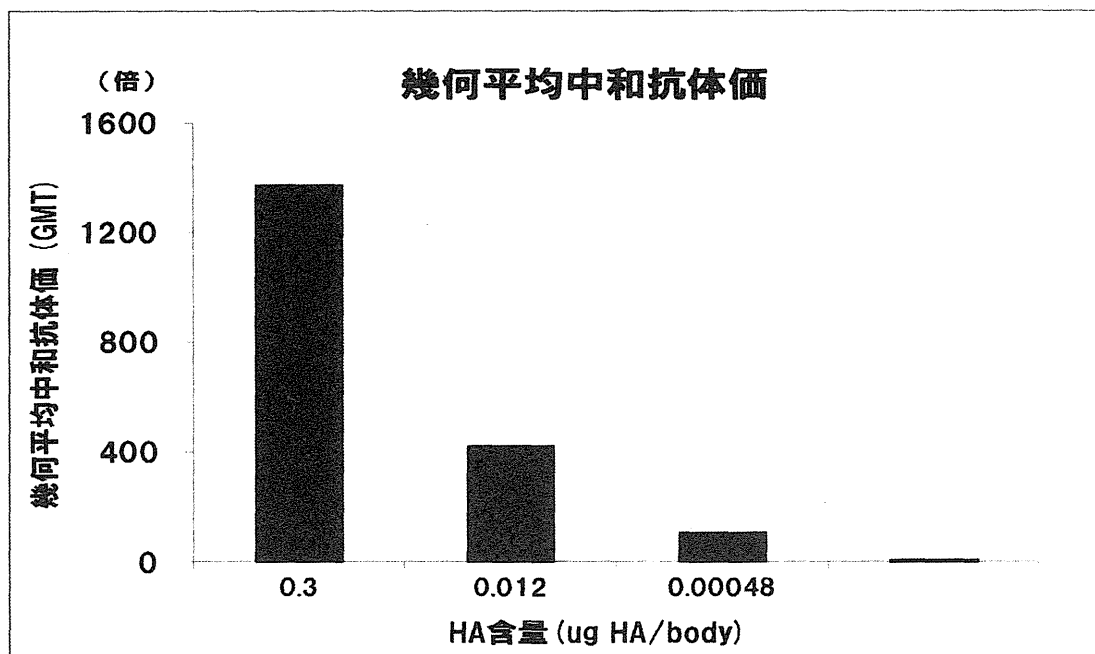


図 7 幾何平均中和抗体価

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

試験報告書

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

(試験番号：KIB-PCI-P03-SHN)

2012 年 11 月 17 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.....	2
1.8	試験日程.....	2
1.9	保存.....	2
1.10	保存する資料.....	2
2.	材料及び方法.....	3
2.1	使用した検体（マウス血清）.....	3
2.2	群構成.....	3
2.3	試薬・試液の作製.....	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	血清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.	結果.....	17
4.1	SRH 抗体価測定試験.....	17
4.2	HI 抗体価測定試験.....	18
4.3	中和抗体価測定試験.....	19
5.	参考文献.....	20
6.	試験責任者署名.....	21

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した。

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	24日				
検体の授受	2012年	10月	23日				
HI 抗体価測定	2012年	10月	31日	～	2012年	11月	1日
SRH 抗体価測定	2012年	10月	31日	～	2012年	11月	1日
中和抗体価測定	2012年	10月	23日	～	2012年	11月	6日
試験終了	2012年	11月	17日				

1.9 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。

1.10 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験結果に関する資料 (生データ含む)
- (3) 試験報告書

2. 材料及び方法

2.1 使用した検体（マウス血清）

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) 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 : 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	0.3	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・試液の作製

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 : 452
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 (NaN_3)
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 ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
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 : 101M6018V
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 : 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 : KOC77
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-IBCCDC-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)	42311111
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
保冷库 (4°C)	日本フリーザー (MC-30EF3)	E6127902
低温槽 (-20°C)	SANYO (MDF-V536D)	010232
超低温槽 (-80°C)	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。