

資料

遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の
承認申請に係る審査報告書

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2
蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイル
ス vHVT013-69 株 (IBDV VP2, *Meleagrid
herpesvirus 1*)

平成 28 年 6 月 28 日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

目 次

	頁
1. 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論	1
2. 審査の概要	2
〈審査参考資料〉	
資料 1. 第一種使用規程承認申請書	8
資料 2. 審査データの概要	11
資料 3. 緊急措置計画書	86
資料 4. その他	89

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan. A registration authority outside of Japan should not grant a registration on the basis of an evaluation unless it has first received authorization for such use from the owner of the data submitted to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan or has received the data on which the summaries are based, either from the owner of the data or from a second party that has obtained permission from the owner of the data for this purpose.

1. 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論

メリアル・ジャパン株式会社より、平成27年11月27日付けで承認申請のあった「伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルスvHVT013-69株 (IBDV VP2, *Meleagrid herpesvirus 1*) (以下「本遺伝子組換え微生物」という。)」について、生物多様性影響評価を行った。本申請には、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律(昭和35年法律 第145号)に基づく動物用医薬品に係る治験のための使用が含まれている。

本遺伝子組換え微生物の宿主は、鶏の疾病であるマレック病に対する生ワクチン用のウイルス株であり、健康な七面鳥の血液から分離された非病原性の七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)である。本遺伝子組換え微生物は宿主と同様に鶏に感染しても病徴を示さず、さらに、鶏から鶏への核酸の伝播性は認められない。また、ワクチンの接種部位から血液へ侵入した際には、強毒株であるマレック病ウイルス1型(MDV1)に対する防御抗体を誘導し、マレック病に対する免疫が長時間持続する。加えて、本遺伝子組換え微生物には、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)の防御抗原を発現するIBDV VP2遺伝子が挿入されており、鶏に致死や免疫抑制を起こすIBDVに対する防御抗体が誘導されるため、IBDVの感染を阻止することができる。

審査の概要は、本報告書の2のとおりである。学識経験者からは、本遺伝子組換え微生物を承認申請のあった第一種使用規程に従って使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価の結論は妥当であるとの意見をj得ている。これらの結果に基づいて、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(参考) これまでの審査経緯

日付	事項	備考
平成27年12月3日	第一種使用規程承認申請受理	
平成27年12月18日	薬事・食品衛生審議会薬事分科会再生医療等製品・生物由来技術部会 動物用組換えDNA技術応用医薬品調査会における審査	非公開※
平成28年3月30日	薬事・食品衛生審議会薬事分科会再生医療等製品・生物由来技術部会における審査	非公開※
平成28年5月19日	薬事・食品衛生審議会薬事分科会長へ報告	非公開※
平成28年6月6日	学識経験者からの意見提出	
平成28年6月28日	審査報告書とりまとめ	

※ 開発製薬会社の知的財産等が開示され特定の者に不当な利益又は不利益をもたらすおそれがあるため。

2. 審査の概要

本遺伝子組換え微生物の宿主は、マレック病に対する鶏用生ワクチンとして日本で一般的に市販されている七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）FC126 株を起源として、さらに鶏胚細胞等で継代した vHVT 株である。

マレック病は、鶏の脚麻痺等の神経疾患や種々の組織及び臓器の悪性リンパ腫を主徴とする伝染性の高い疾病であり、養鶏場における著しい経済的被害の原因になっているが、HVT をワクチンとして鶏に接種すると、体内で血液中に入り全身に移動し、長期にわたりマレック病感染に対する抵抗性が付与される。また HVT は、本来の保有動物である七面鳥に感染しても病徴を呈さない特性がある。

本遺伝子組換え微生物には、vHVT 株の *Bam*HI-I 領域の挿入遺伝子座に IBDV VP2 遺伝子が挿入されている。IBDV VP2 遺伝子は、IBDV の核酸を包んでいる外殻部分のカプシド蛋白質である VP2 蛋白を発現させ、これにより鶏に IBDV に対する防御抗体を誘導することで、長期間 IBDV の感染を阻止することができる。IBDV は B リンパ球の分化に関与する器官であるファブリキウス嚢内で増殖し、その際に罹患鶏のリンパ組織を破壊し、罹患鶏は致死や免疫抑制を起こすことが知られている。

本遺伝子組換え微生物の宿主及び用いられた遺伝子組換え技術を考慮し、本遺伝子組換え微生物の生物多様性影響を生じさせる可能性について、(1) 他の微生物を減少させる性質、(2) 病原性、(3) 有害物質の産生性、(4) 核酸を水平伝達する性質の4つの項目から評価を行った。

(1) 他の微生物を減少させる性質（競合、有害物質の産生により他の微生物を減少させる性質）

宿主の属する分類学上の種である HVT については、微生物を減少させる性質は報告されていない。

HVT は細胞随伴性のため、細胞の生存できる環境が必須である。HVT は、マレック病に対する生ワクチンとして、飼育されている鶏群に接種されているため、鶏群内に普遍的に存在することは知られているが、鶏の HVT の排泄量は少ないため、鶏間の自然感染性は低い。本遺伝子組換え微生物は、HVT と同等の特性を有しており、鶏体内の増殖能は HVT と比較して低い。また、鶏への接種試験において、鶏から鶏、鶏から七面鳥への感染は認められず、また接種鶏の敷き藁等から感染性ウイルスは検出されなかった。

このことから、競合により他の微生物を減少させる性質については、本遺伝子組換え微生物は HVT と同様に細胞随伴性であること、鶏体内の増殖能は HVT と比較し

て低く、鶏からの飼育環境中への排泄量は少ないことから、HVT と同様に低いと考えられる。

本遺伝子組換え微生物が発現する IBDV VP2 蛋白質をコードする塩基配列については、登録されているアレルゲン配列に相同性のある配列は存在しない。また、IBDV VP2 遺伝子にファブリキウス嚢の傷害に関与する機能は含まれない。

このことから、有害物質の産生により他の微生物を減少させる性質については HVT と同様に低いと考えられる。

以上により、他の微生物を減少させる性質に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、第一種使用規程に従った使用を行う限り、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

(2) 病原性（野生動物に感染し、それらの野生動物の生息に支障を及ぼす性質）

宿主の属する分類学上の種である HVT については、病原性は報告されていない。

HVT は、本来の保有動物が七面鳥であり、七面鳥と同じキジ科の鳥類であるコウライキジ、ウズラ等で感受性があることが感染試験により報告されているが、野生の七面鳥以外に野生の鳥類における自然感染については報告されていない。

海外の本遺伝子組換え微生物のコウライキジへの高用量の感染試験結果から、抗体価が陽性を示し、感染は確認されたが、鶏よりも感染性は低いことが示され、臨床症状や病変等は観察されなかった。また、霊長類を含む哺乳類には、HVT と血清交差性のある MDV の接種試験によって感染しないことから、HVT の感染性はないと考えられる。

このことから、野生動物への感染性に関しては、キジ科鳥類の試験報告では、コウライキジ、鶏の感染性は低いことから、七面鳥と系統的に遠い野生鳥類への自然感染性は低いと考えられた。

本遺伝子組換え微生物は HVT と同様に、細胞随伴性で、細胞の生存できる環境が必須であり、鶏体内での増殖能は HVT と比較して低く、鶏から鶏への同居感染は認められていない。また、HVT と同様、垂直（介卵）感染も認められていない。さらに、本遺伝子組換え微生物を鶏に筋肉内接種し、7 日後に血液内から採取し、更に次代に継代することを 9 代繰り返した試験では、臨床症状又は死亡は確認されず、継代を通して病原性を獲得するような傾向は確認されなかった。

このことから、本遺伝子組換え微生物の増殖能や病原性復帰等、野生動物の生息に支障を及ぼす性質に関しては、HVT と同様に非常に低いと考えられた。

以上により、病原性に起因して影響をうける可能性のある野生動植物等は特定され

ず、第一種使用規程に従った使用を行う限り、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

(3) 有害物質の産生性(野生動物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質)

宿主の属する分類学上の種である HVT は有害物質の産生性は知られていない。

供与核酸は、IBDV VP2 遺伝子であり、登録されているアレルゲン配列に相同性のある塩基配列は存在しない。また IBDV VP2 遺伝子は IBDV の感染防御抗体を誘導するがファブリキウス囊の傷害に関与する機能は発現しない。ベクターを構成する遺伝子配列が、有害な物質を発現する塩基配列を含まないことが明らかにされている。

また、本遺伝子組換え微生物は、vHVT 株の *Bam*HI-I 領域の挿入遺伝子座にその領域に元々あった塩基配列による発現を妨げないように IBDV VP2 遺伝子が挿入されており、意図しない新たな物質の発現はないと考える。

以上により、アレルギー性物質及び IBDV の病原性に係る有害物質、意図しない新たな物質の産生はなく、有害物質の産生性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、第一種使用規程に従った使用を行う限り、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

(4) 核酸を水平伝播する性質(遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)が対象とする技術により移入された核酸を野生動植物又は他の微生物に伝播する性質)

宿主の属する分類学上の種である HVT は、通常、ゲノムを感染動物の染色体に組み込み、核酸を水平伝播する性質は持たない。

マレック病に対しては、一般飼育環境下で他の血清型の MDV との多価ワクチンが使用されているが、HVT と血清交差性のある MDV との間で生体内における自然組換えは報告されていない。

また、MDV 以外にアルファヘルペスウイルス亜科に属するウイルスである鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)のワクチンと併用されているが、これまで自然組換えによると考えられる問題は起こっていない。

同種ウイルスとの相同組換えの可能性については、本遺伝子組換え微生物を接種した鶏から同居鶏への伝播性は非常に低く、養鶏場における七面鳥との同居飼育は通常ないため、重感染の機会はほとんどなく、組換えリスクは極めて低い。

以上により、近縁ウイルスとの相同組換えの可能性、同種ウイルスとの相同組換えの可能性については極めて低く、自然組換えの報告も無いことから、核酸を水平伝播

する性質に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、第一種使用規程に従った使用を行う限り、核酸を水平伝播する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

II 生物多様性影響の総合的評価

他の微生物を減少させる性質については、宿主の属する分類学上の種である HVT は報告されていないこと、本遺伝子組換え微生物の鶏体内の増殖能は宿主と比較して低く、鶏からの飼育環境中への排泄量は少ないこと、供与核酸である IBDV VP2 遺伝子に有害物質の産生性はないと考えられることから、第一種使用規程に従った使用を行う限り、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

病原性については、宿主の属する分類学上の種である HVT は報告されていないこと、野生動物への感染性は、七面鳥と系統的に遠い野生鳥類への自然感染性は低いと考えられること、本遺伝子組換え微生物の増殖能や病原性復帰等の野生動物の生息に支障を及ぼす性質は、非常に低いと考えられることから、第一種使用規程に従った使用を行う限り、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

有害物質の産生性については、本遺伝子組換え微生物は宿主と同様に、アレルギー性等有害な性質を有しておらず、供与核酸についても挿入遺伝子座の領域に元々あった塩基配列による発現を妨げず挿入し、有害な塩基配列を含まないことから、第一種使用規程に従った使用を行う限り、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

核酸を水平伝達する性質については、本遺伝子組換え微生物は HVT と同様に、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質を持たないこと、近縁ウイルスとの相同組換えの可能性、同種ウイルスとの相同組換えの可能性については、リスクは極めて低いことから、第一種使用規程に従った使用を行う限り、水平伝達に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

以上を総合的に評価し、当該遺伝子組換え微生物を第一種使用規程に従った使用を行う限り、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

< 審査参考資料 >

資料 1. 第一種使用規程承認申請書

承認を受けるために申請者から提出された申請書類

第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 11 月 27 日

農林水産大臣 森山 裕 殿
環境大臣 大塚 珠代 殿

メリアル・ジャパン株式会社
代表取締役 永田 正
東京都新宿区西新宿三丁目 20 番 2 号

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

資料1. 第一種使用規程承認申請書

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHVT013-69 株 (IBDV VP2, <i>Meleagrid herpesvirus 1</i>)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>① 運搬及び保管 (生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の運搬及び保管を含む) ② 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律 (昭和 35 年法律第 145 号。以下「医薬品医療機器等法」という。) の第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験 (以下「治験」という。) に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (平成 9 年農林水産省令第 75 号) 第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用 ③ 医薬品医療機器等法第 14 条第 1 項に基づく承認申請書に従った使用 (④に該当する行為は除く) ④ 接種 (鶏への接種) ⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律 (昭和 45 年法律第 137 号) 第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残渣の廃棄 ⑥ ⑤以外の廃棄 (生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む) ⑦ ①～⑥に付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>—</p>

資料 1 . 第一種使用規程承認申請書

資料 2. 審査データの概要
(審査に使用した評価のデータ)

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ 分類学上の位置・学名（属及び種）和名、

① 分類学上の位置・学名（属及び種）

学名：Meleagrid herpesvirus 1: MeHV-1

科：*Herpesviridae*（ヘルペスウイルス科）

亜科：*Alphaherpesvirinae*（アルファヘルペスウイルス亜科）

属：*Mardivirus*（マルディウイルス属）

和名：七面鳥ヘルペスウイルス 1 型又は七面鳥ヘルペスウイルス

英名：Herpesvirus of Turkey: HVT

② 宿主の同定の根拠となる事項

アメリカで七面鳥群から採取した血液検体から七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株が分離された（Witter R.L.ら、1970）（別紙 1）。FC126 株を鶏胚細胞等の継代を経て vHVT 株を作出した（別紙 2）。ゲノムは線状 2 本鎖 DNA で塩基数は約 165 kbp である（別紙 3）。

③ 宿主を誘導するために用いた遺伝的改変の内容

vHVT 株はアメリカで分離された七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株を培養細胞での継代のみ行った。

(2) 使用等の歴史及び現状

マレック病ウイルス (Marek's disease virus: MDV) には鶏ヘルペスウイルス 2 型 (*Gallid herpesvirus* 2) 及び鶏ヘルペスウイルス 3 型 (*Gallid herpesvirus* 3) の 2 種類あり、それぞれ血清型 1 (MDV1) 及び血清型 2 (MDV2) に分類される。MDV1 に属するウイルス株のみが腫瘍原性をもち、MDV2 は腫瘍原性をもたない（文献 17）。七面鳥ヘルペスウイルス 1 型 (Herpesvirus of Turkey: HVT) は MDV と血清学的交差性を示し、血清型 3 (MDV3) に分類される非病原性ウイルスである（文献 17）。HVT は MDV 感染に対して防御効果を示し、1970 年代に初めて実用化されたマレック病に対するワクチンで、現在も世界中で使用されている。vHVT 株は HVT FC126 株を起源とするが、HVT FC126 株はマレック病に対する生ワクチンとして一般的に使用され、日本においても市販されている（別紙 28）。米国では年間 50 億羽以上のブロイラーに接種されている。

(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性

イ 基本的特性

HVT は七面鳥に普遍的に存在する非病原性ウイルスである（文献 2、17、18）。MDV と血清学的に交差性を示すことから、血清型 3（MDV3）に分類される。HVT は二本鎖 DNA ウイルスで約 99 の推定タンパク質をコードする。HVT（MDV3）のゲノム遺伝子構成は、MDV1 及び MDV2 と Unique Long (U_L) 及び Unique Short (U_S) ゲノム領域において高い相同性を示し、またヒト単純ヘルペスウイルス 1 型（human simple herpes virus type I; HSV-1）とも 57 の相同遺伝子を持つ（別紙 5）。野生の七面鳥以外では、HVT ワクチンの使用に伴い、鶏においても HVT がユビキタスに存在することは知られているが、それ以外の野生の鳥類における伝播についてはよく知られていない（文献 17）。一方、MDV は鶏を自然宿主とし、キジ目の七面鳥、ウズラ、コウライキジは MDV 感染に対して感受性が高いとされ（文献 17）、キジ目以外の野鳥であるマガンからも分離の報告がある（文献 3）。一方、アヒル、スズメ、ヤマウズラ、ハト及びクジャクは MDV 感染に対して抵抗性があると考えられている（文献 17）。また、HVT は鳥類のリンパ球にのみ指向性を示し（文献 17）、感受性のある動物はコウライキジ、ウズラなどの鳥類に限定されるが、七面鳥以外に対する自然感染率は低いと考えられ、霊長類を含む哺乳類では MDV の実験的な接種によっても感染しないことから、人を含め感染性はないと考えられている（文献 17）。また、HVT に他の微生物を減少させるような性質は報告されていない（文献 17）。

HVT は細胞随伴性ウイルスであるが、感染性をもつ細胞遊離型ウイルスは感染七面鳥の羽包上皮で産生されフケに内包される形で体外に排出される（文献 4）。伝播様式は感染性ウイルスを含有するフケを介する経気道感染であると考えられ、介卵（垂直）感染はない（文献 5）。フケが気道より侵入すると貪食細胞により取り込まれる。鶏体内においてウイルスは、細胞に吸着後、エンベロープを細胞膜に融合させることによって細胞に侵入する（文献 6、7）が、ウイルスの環境中への排出量は少ないため、HVT の鶏への自然感染率は低い。なお、HVT を接種した鶏では体内に長期にわたり持続する（文献 7）。

マレック病は MDV1 に起因する鶏の脚麻痺といった神経疾患や種々の組織及び臓器の悪性リンパ腫を主徴とする伝染性の高い疾病であり、養鶏場における著しい経済的被害の原因になっている。MDV1 ゲノムは腫瘍原性遺伝子が挿入されているが、HVT ゲノムにはなく（文献 8、21）、感染しても自然宿主である七面鳥にさえも臨床症状を呈さない。HVT を鶏に接種すると体内でウイルス血症を誘導し、MDV1 感染に対する抵抗性を付与していると考えられている（文献 17）。

ロ 生息又は生育（増殖）可能な環境の条件

鳥類の細胞は HVT に対して感受性があり、鶏胚細胞（CEF）、アヒル胚細胞（DEF）、七面鳥胚細胞（TEF）、コウライキジ胚細胞（PhEF）、ウズラ胚細胞（JQEF）、鶏腎細胞（CK）等で増殖するこ

資料2. 審査データの概要

とが知られている（文献9）。HVTをCEFで増幅培養するには通常の細胞培養条件（38°C±2°C、5%CO₂）、及びMEMやF10等の一般的な細胞増殖用培地を用い、培養後3日前後で採材可能である。HVTは哺乳類の培養細胞では増殖しない（文献10、11）。宿主ウイルスであるvHVT株はDEF及びCEFで培養して得られた（別紙2）。vHVT株はHVT FC126株生ワクチンと同一の起源であり（別紙1）、培養細胞での継代についても同等であるため、その増殖能力は同等と考えられる。

ヘルペスウイルスは、ウイルスの増殖が細胞核内で行われ、細胞の生存できる環境が必須であるため、浸透圧の低い水中では殆ど生存できないと考えられる。ヘルペスウイルスはエンベロープを有するウイルスで、逆性石鹼、2%グルタール、次亜塩素酸ナトリウム、消毒用エタノール、70%イソプロパノール、ポビドンヨード等で不活化される（文献19）。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 宿主を誘導するために用いた遺伝的改変の内容

1 (1) ④に示す通り、継代培養のみ行った。

② 生存能力又は増殖能力

一般的にDEF、CEF及びCKがHVTの分離及び継代に用いられる。その他、コウライキジやウズラ等、鳥類の胚細胞でも培養可能であったことが報告されている（文献9）。数%の牛血清を含むMEMやF10等の一般的な培地で、5%CO₂、38°C前後の通常の培養条件でよく増殖するが、哺乳類の培養細胞では増殖しない（文献10、11）。

HVTは細胞随伴性ウイルスである。ウイルスが細胞に吸着後、エンベロープを細胞膜に融合させることによって細胞へ侵入する。リンパ球指向性を示し、全身の組織に運ばれ持続感染することから免疫が長期間持続する（文献12、13、14）。感染性をもつ細胞遊離型ウイルスは感染七面鳥の羽包上皮で産生されフケに内包される形で体外に排出される（文献4）。七面鳥を自然宿主として遍在するウイルスであり、七面鳥間で水平伝播し、垂直感染は認められない（文献5）。HVTを接種した鶏の体内ではウイルスは長期にわたり持続するもののウイルスの排泄は稀である（文献7）。MDV1の伝播性は高く、鶏間の伝播は容易であるが（文献15）、HVTの鶏への自然感染性は非常に低い（文献7、18）。

③ 生殖の様式及び交雑性

HVTは非病原性であるが、ウイルスの基本的動態はMDVと相同である。MDVの自然感染は感染性ウイルスを吸入することにより始まる。リンパ組織に侵入したウイルスは、感染初期にはB細胞、後にT細胞で細胞溶解性に複製する。溶解性感染の後、主に活性化CD4⁺T細胞

資料 2. 審査データの概要

において潜伏感染し、増殖性 T 細胞性リンパ腫に形質転換する。ただし、HVT は MDV と異なり、meq に代表される腫瘍原性・形質転換に係る遺伝子配列を有さない（文献 8、21）ため、感染性ウイルス粒子は、感染リンパ球が羽包上皮細胞に移行し産生され、フケに内包される形で環境中に排泄されることにより、感染源となり、環境中に維持される（文献 22）。

養鶏場ではマレック病予防のため、1970 年代から HVT 単味ワクチンが使用されていたが、1980 年代以降マレック病の病原性の増強に伴い、HVT と MDV2 を組み合わせた 2 価ワクチンが導入され、その後、弱毒 MDV1 生ワクチンも導入された（文献 22、23、24）。

イルトウイルス属 (*Iltovirus*) のトリヘルペスウイルス 1 型 (*Gallid herpesvirus 1*; GaHV-1) がある。これは伝染性喉頭気管炎 (ILT) の原因として知られている。遺伝子学的系統樹解析において GaHV-1 は HVT と近縁ではなく（文献 31）、また、HVT はリンパ球指向性を示すのに対し、GaHV-1 は主に呼吸器粘膜及び眼粘膜で増殖するため、重感染の機会はほとんどないと考えられる。野外では一般的に MD 及び ILT に対するワクチンが併用して使用されているが、これまで組換えによると考えられる問題は起こっていない。

ホ 病原性

vHVT 株は、アメリカで分離された七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株（別紙 2）由来のマレック病生ワクチン株と同じ起源である。親株 HVT FC126 株は、自然宿主であり分離された動物である七面鳥に対しても、同じ鳥類である鶏に対しても、感染性はあるが病原性を示さない（別紙 6）。哺乳動物に対しては体内で複製できないことから病原性はない（別紙 7 及び 8）。HVT FC126 株は鶏ヘルペスウイルスのマレック病ウイルスと交差性を示すことから、鶏に対する生ワクチン株として広く世界中で用いられている。

HVT は人、犬、牛、バブーン、ウサギ又は豚の腎臓細胞で増殖しない。文献的に検索した結果においても、主要な農林水産動物（牛、馬又は豚）に対する病原性については報告がない*。哺乳動物であるマウス（別紙 7）、モルモット（別紙 8）に対して HVT を接種しても病原性及び局所の所見も認められなかった。

*製造元における申請書記載内容並びに 2014 年 7 月以前の Medline (PubMed) による文献検索を実施。キーワード：Herpesvirus of turkey, pathogenicity, mammal

へ 有害物質の産生性

HVT は非病原性ウイルスとして知られており、有害な影響を及ぼす生理活性物質の産生性が認められるとの報告はない*。vHVT は七面鳥分離株 FC126 株から継代培養のみ行っていることから、HVT の性状と同一であり、有害物質の産生性はない。

*製造元における申請書記載内容並びに 2014 年 7 月以前の Medline (PubMed) による文献検索を実施。キーワード：VP2, Herpesvirus of turkey, avian, allergy

ト その他の情報

—

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

①-1 供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」の構成要素及びその由来は以下の通りである。

表1 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHVT013-69 株の作出に用いた供与核酸の各構成要素

供与核酸の名称：VP2 遺伝子発現カセット (別紙 3. 3.3~3.5)		
構成要素	サイズ	構成要素の由来
IBDV VP2 遺伝子	1,405 bp	IBDV Faragher 52/70 株に感染させた SPF 鶏ファブリキウス嚢から抽出された IBDV ウイルス粒子を由来とする。
マウスサイトメガロウイルス(MCMV)-Immediate-early (IE)プロモーター	1,414 bp	マウスサイトメガロウイルス由来の IE プロモーター (プラスミド pAMB33 に存在)。
SV40 poly A	218 bp	シミアンウイルス由来のポリアデニル化 (poly A) 配列 (プラスミド pCMV β に存在)。

IBDV VP2 遺伝子について

学名：ビルナウイルス科 (Birnaviridae)、アビビルナウイルス属 (Avibirnavirus)、
伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (Infectious bursal disease virus: IBDV)

株名：52/70 Faragher

配列：VP2 蛋白質コード遺伝子 (1,405bp)

IBDV は鶏において伝染性ファブリキウス嚢病を引き起こす原因となる。本ウイルスは感染鶏において、B リンパ球の分化に関与する器官であるファブリキウス嚢のリンパ組織を破壊することによって致死や免疫抑制を起こす。

ウイルスゲノムは2本鎖 RNA の2つの断片から構成される (図1)。

A 断片 (3.1 kbp) はポリ蛋白質 (N 末端 VP2-VP4-VP3 C 末端) をコードし、3つのウイルス蛋白質 (VP2、VP3 及び VP4) に開裂する。VP2 及び VP3 はカプシド蛋白質になる。B 断片 (2.9 kbp) は、VP1 (ポリメラーゼ) をコードする (Kibenge ら、1988、別紙9)。

資料2. 審査データの概要

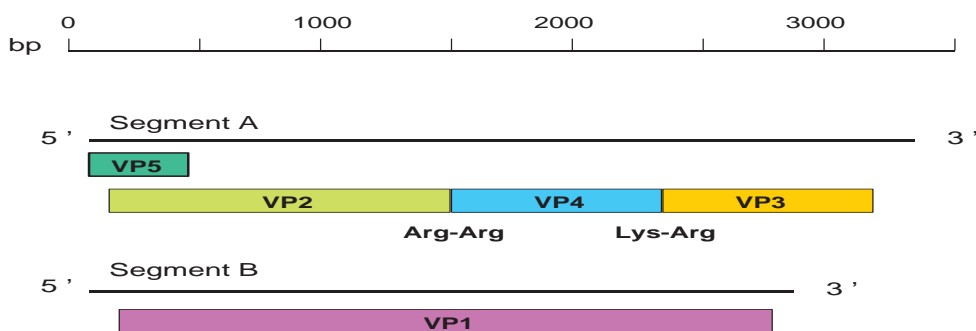


図1 IBDV ゲノム

①-2 プラスミド pEL070 における供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」とその制限酵素地図は以下の通りである。

「VP2 遺伝子発現カセット」は MCMV IE プロモーター、IBDV VP2 遺伝子及び SV40 ポリアデニレーションシグナルから成る。プラスミド pEL070 における「VP2 発現カセット」の位置は図2の赤矢印で示した *EcoRI-SalI* フラグメントであり、その制限酵素地図は図中に示した通りである。

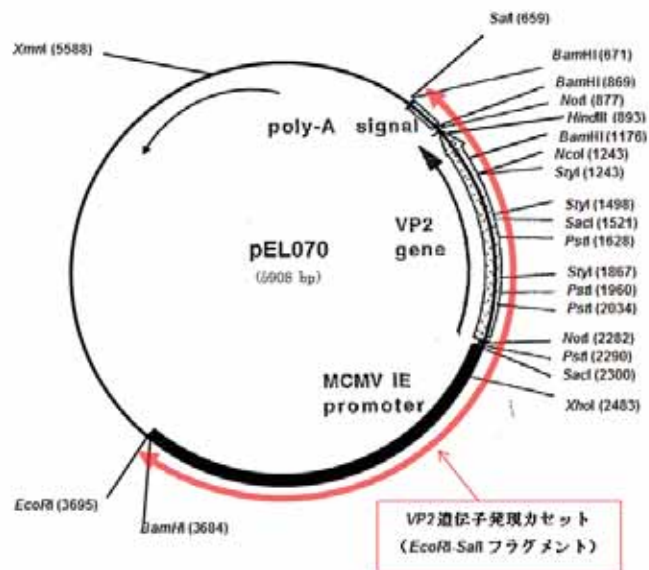


図2 プラスミド pEL070 における供与核酸：VP2 遺伝子発現カセット

②-1 供与核酸の構造

供与核酸の塩基配列 (3,037 bp) は、別紙3の Annex 5「遺伝子組換え体 vHVT013 の HVT *BamHI*-I 領域の塩基配列」を参照。

②-2 供与核酸の調製

IBDV VP2 遺伝子のクローニング

a) cDNA の作製

IBDV Faragher 52/70 株を接種した SPF 鶏のファブリキウス嚢からウイルスを分離して、そのゲノム RNA を抽出した材料から cDNA を得た。

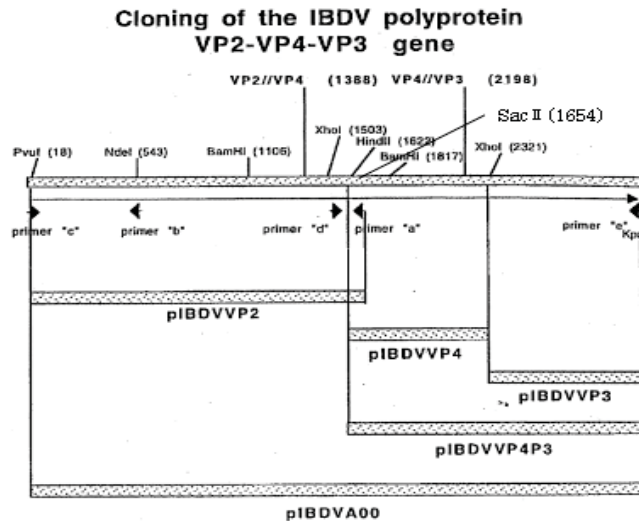


図3 IBDV VP2-VP4-VP3 蛋白質をコードする配列のクローニング

b) 供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」の作製

b)-1 pEL024 の作製 (供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」の VP2 の供給プラスミドを作製する過程)

cDNA を PCR により増幅し、カプシド蛋白質を含む IBDV の VP2-VP4-VP3 遺伝子配列を保持するクローン (図 8 の「pIBDVA00」に相当する部分) を作製した。このクローンをもとに、VP2 遺伝子の完全長 orf を含む断片 (図 3 の「pIBDVVP2」に相当する部分) を、pBlueScriptII SK+ にクローニングし、プラスミド「pEL024」とした (図 4)。本配列については GenBank Accession Number D00869 として登録されている IBDV 52/70 株と不安定な 1 塩基を除いて同一であり、アミノ酸レベルでは変化していないことが確認されている。

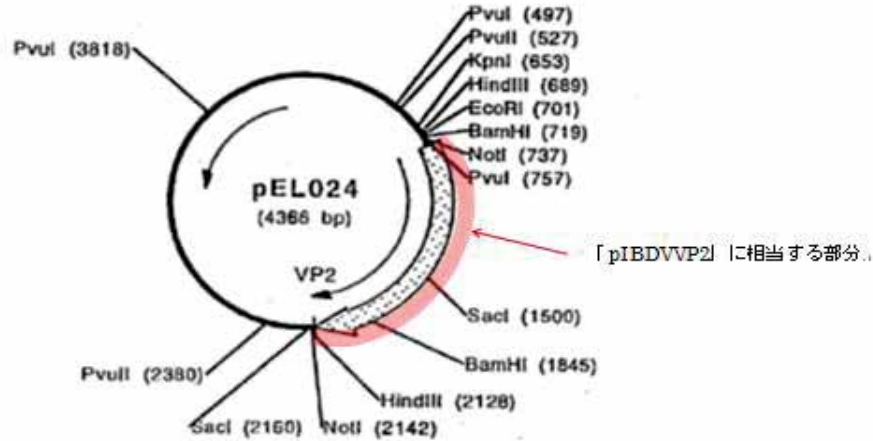
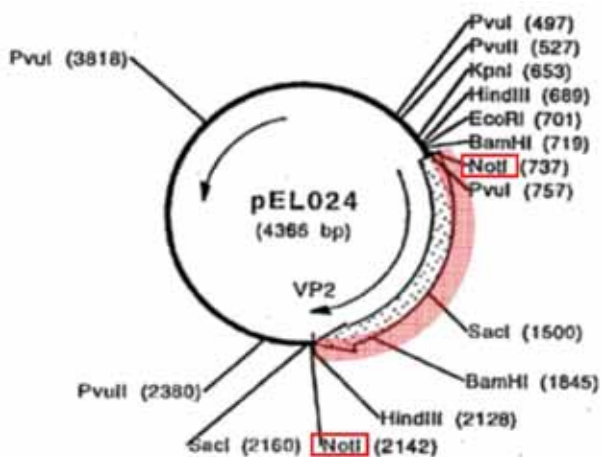


図4 プラスミド pEL024

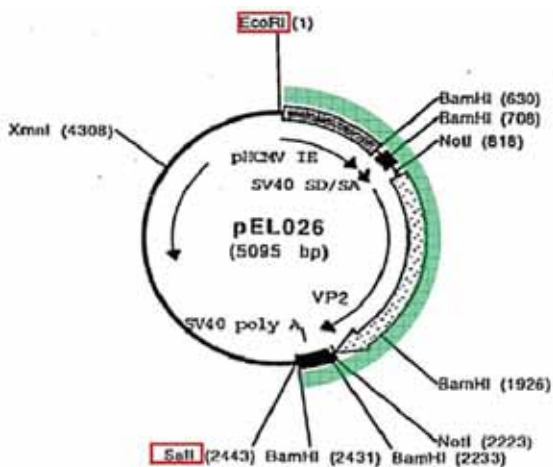
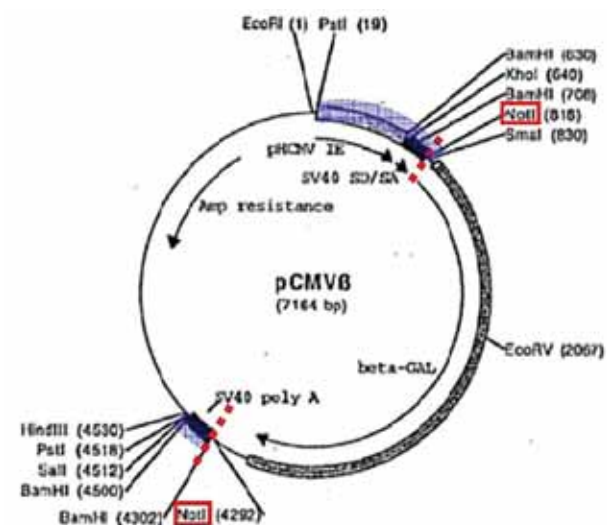
b)-2 pEL027 の作製 (供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」の poly A の供給プラスミドを作製する過程) (図 5)

- pEL024 の NotI- NotI フラグメントを pCMV β (Not I サイトで結合) に組み込み pEL026 を作製。
- pEL026 の EcoR I-Sal I フラグメントを pBlueScript II SK+ に組み込み pEL027 を作製。

資料2. 審査データの概要

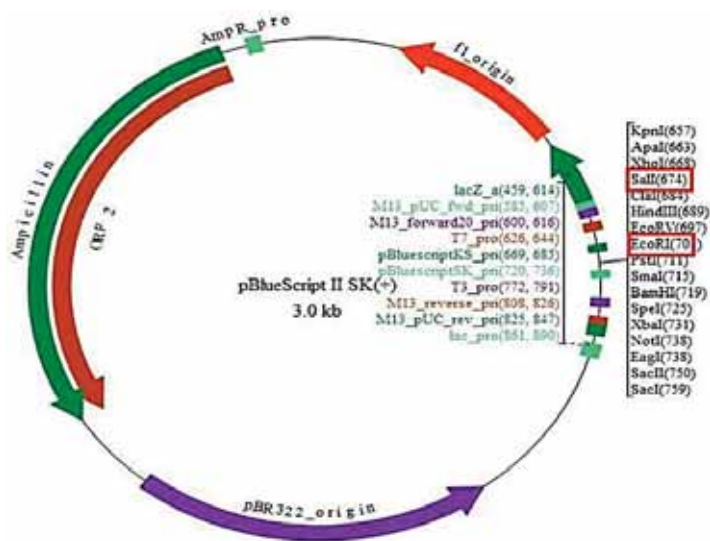


pCMVbを *NotI* で切断し（点線部）、pEL024の *NotI*-*NotI* フラグメントと *lacZ* 遺伝子（*beta*-GAL）と置換し、pEL026 を作製。



(次ページへ)

資料2. 審査データの概要



pBlueScript II SK+を *EcoRI*-*SalI* で切断し、pEL026由来 *EcoRI*-*SalI* フラグメントを組み込みpEL027 を作製。

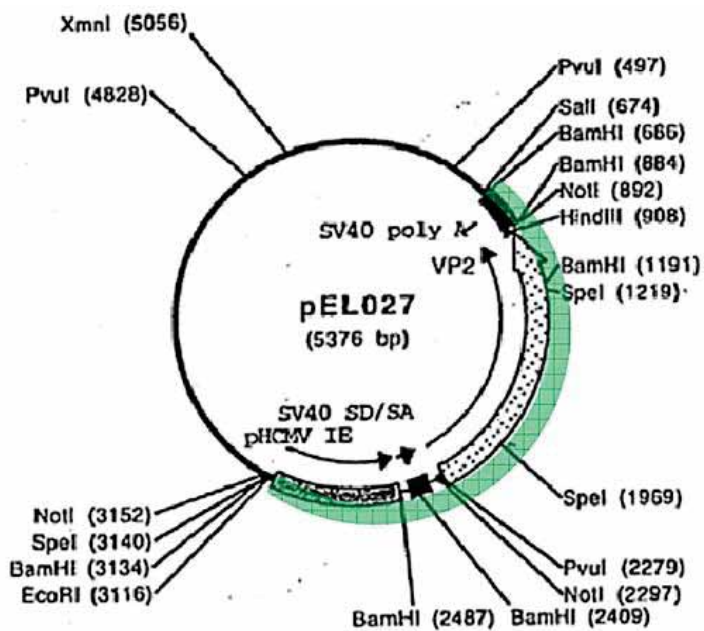
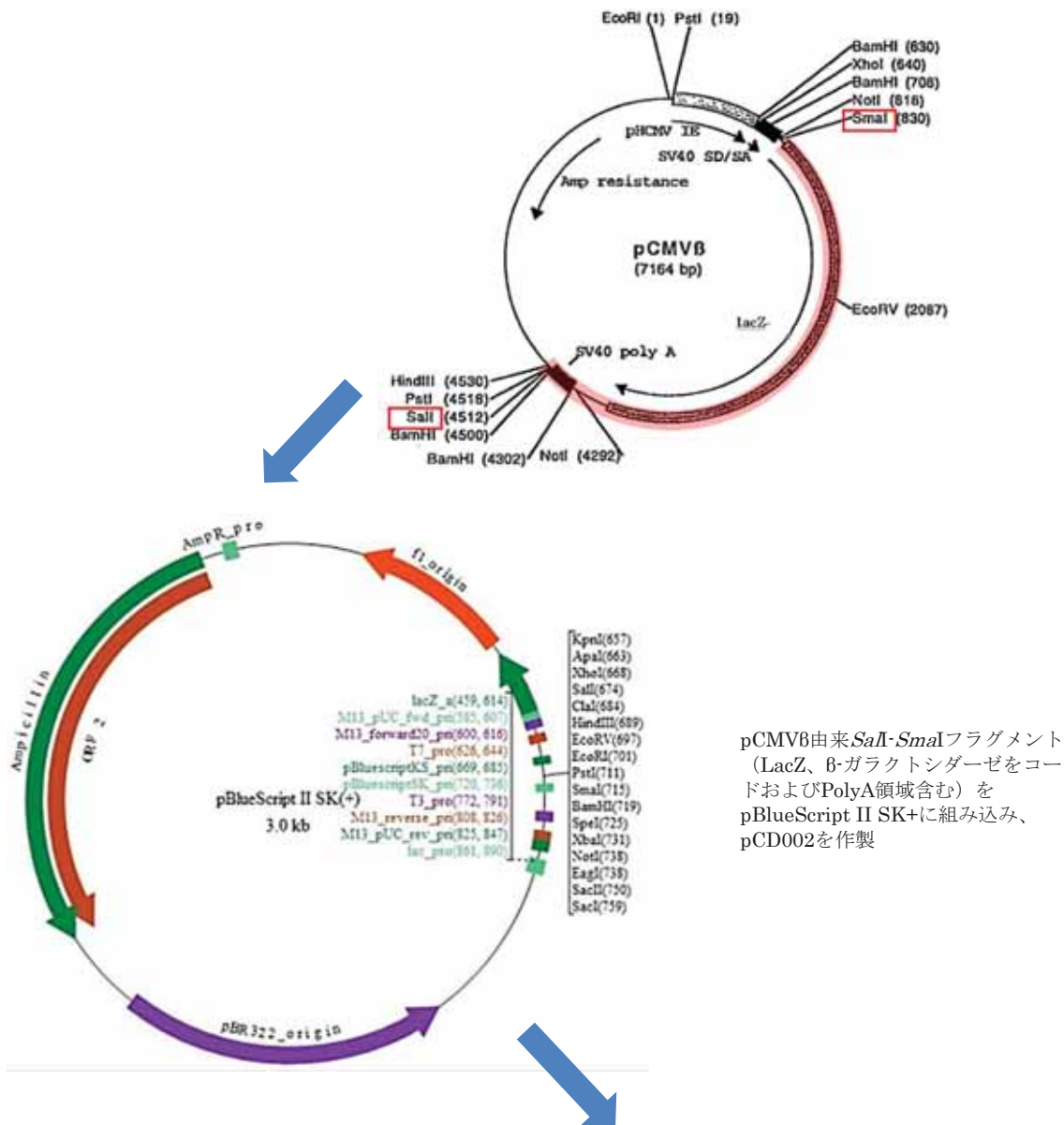


図5 プラスミド pEL027 の作製

資料2. 審査データの概要

b)-3 pEL068 の作製 (供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」の土台であり、MCMV-IE プロモーターを含むプラスミドを作製する過程) (図6)

- ・ pCMV β 由来 *SalI-SmaI* フラグメント (LacZ (β -ガラクトシダーゼをコード) および PolyA 領域含む) を pBlueScript II SK+に組み込み、pCD002 を作製。
- ・ pCD004 由来 *HpaI-PstI* フラグメント (MCMV-IE プロモーター領域を含む) を pCD002 に組み込み、pCD009 を作製。
- ・ オリゴヌクレオチド MB070 と MB071 は、[*SacI*]-*EcoRI*-*SpeI*-*PstI*-*NotI*-*SalI*-[*KpnI*]という特有の制限酵素配列を含み、この二つの配列をハイブリダイズして *SacI-KpnI* 二本鎖 DNA リンカーを作製した。この *SacI-KpnI* リンカー配列を、あらかじめ *SacI* と *KpnI* で切断した pBlueScript II SK+に組み込み pEL067 を作製。これにより、pEL067 は pCD009 由来 MCMV-IE プロモーター領域の挿入部位である *SpeI-PstI* を含む。
- ・ pCD009 の *SpeI-PstI* フラグメントを pEL067 に組み込み pEL068 を作製。



資料2. 審査データの概要

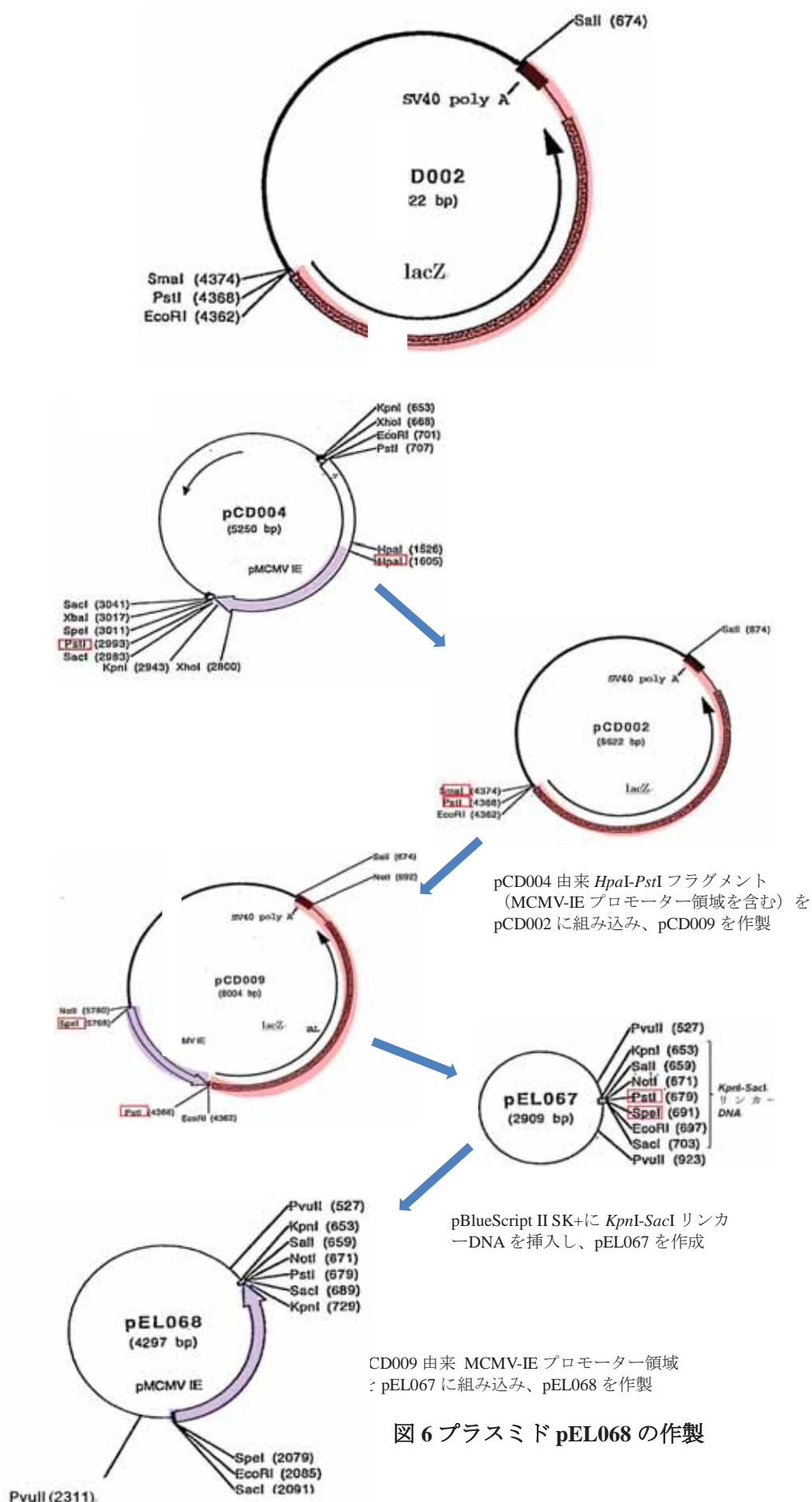
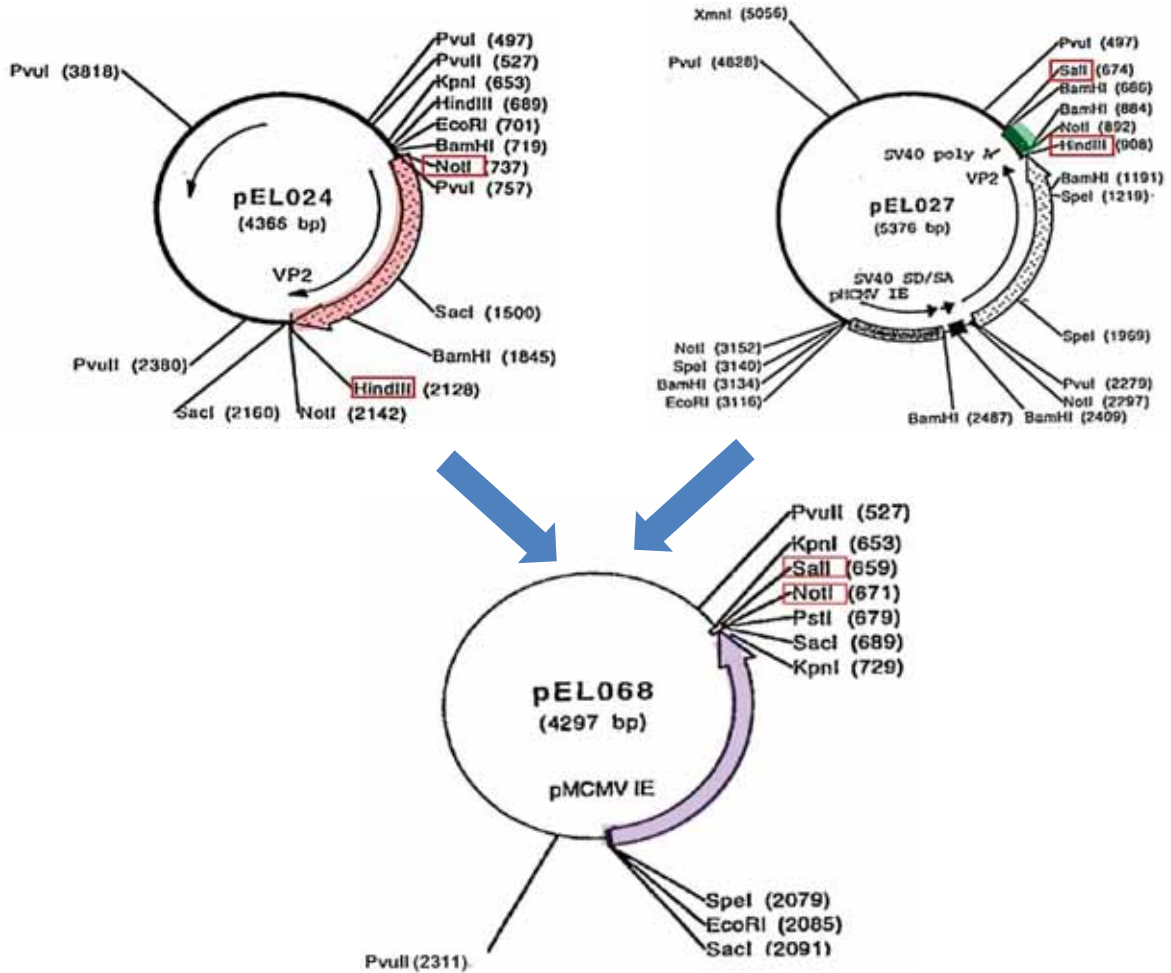


図6 プラスミド pEL068 の作製

資料2. 審査データの概要

b)-4 pEL070 の作製 (pEL068 を土台に、pEL024 の *Not* I-*Hind* III フラグメント (VP2) と pEL027 の *Sal* I-*Hind* III フラグメント (poly A) を組み込んで作製する過程)

- ・ pEL024 の *Not* I-*Hind* III フラグメント (VP2 領域を含む) と pEL027 の *Sal* I-*Hind* III フラグメント (poly A 領域を含む) をライゲートし、*Not* I と *Sal* I で予め切断した pEL068 に組み込み、pEL070 を作製した (図7)。



pEL024 の *Not* I-*Hind* III フラグメント (VP2) と pEL027 の *Sal* I-*Hind* III フラグメント (poly A) をライゲートし、*Not* I と *Sal* I で予め切断した pEL068 に組み込んで pEL070 を作製。

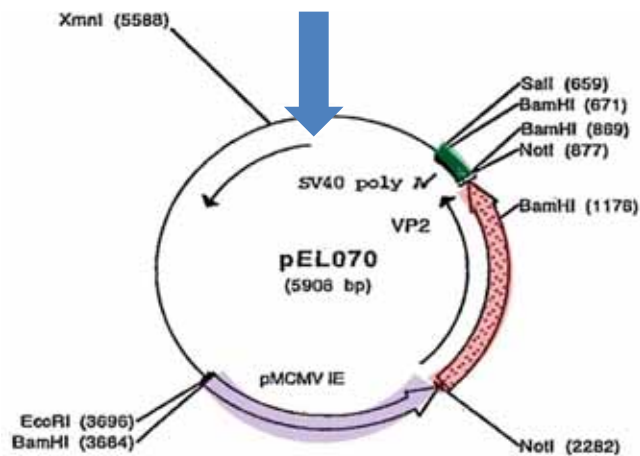


図7 プラスミド pEL070 の構築

イ 構成要素の機能

① 供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」の各構成要素の機能は以下の通りである。

表 2 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHV013-69 株の作出に用いた供与核酸の各構成要素の機能

供与核酸の名称：VP2 遺伝子発現カセット（別紙 3）	
構成要素	構成要素の機能
IBDV VP2 遺伝子	VP2 遺伝子は IBDV のカプシド蛋白質をコードする遺伝子であり、IBDV に対する防御誘導遺伝子領域（主要防御抗原）である（中和抗体の主要な部分はこの蛋白に対するものである）。
MCMV-IE プロモーター	マウスサイトメガロウイルスの主要最初期（immediate-early, IE）遺伝子で、非常に高い転写活性を示す。本プロモーターは医学分野で広く安全に用いられていることより選択した。
SV40 poly A	poly A は、真核細胞の mRNA 3'末端についているアデニン・ヌクレオチド鎖を指し、転写終結およびポリアダニル化に必要なシグナルをもたらす機能がある。

② 目的遺伝子をコードする遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

IBDV は血清型 1 型と 2 型に分かれ、病原性株は 1 型に属す。供与核酸は欧州古典型の標準株である IBDV Faragher 52/70 株（血清型 1 型）由来の VP2 遺伝子を含む。目的遺伝子である VP2 遺伝子の発現により産生されるのは、IBDV カプシド蛋白質 VP2 である。カプシド蛋白質（VP2 及び VP3）は IBDV の抗原性に関与するエピトープを含んでいるが、VP2 蛋白質は中和防御抗体の誘導を担う血清型特異的抗原をもたらすことが示されている。VP2 には少なくとも 2 つのウイルス中和エピトープがあり、その内の一つは血清型特異的である（Kibenge ら、1988、別紙 9）。IBDV VP2 蛋白質がアレルギー性を有するとの報告はなく* VP2 蛋白質シーケンスと既知のアレルゲンシーケンスとのホモロジー検索の結果、相同性のあるシーケンスは存在しなかった（別紙 35）。

* 製造元における申請書記載内容並びに 2014 年 7 月以前の Medline（PubMed）による文献検索を実施。キーワード：VP2, Herpesvirus of turkey, avian, allergy

③ 宿主の持つ代謝系を変化させるか否か

供与核酸は宿主（vHVT 株）の BamHI-I 領域の挿入遺伝子座に挿入されている。BamHI-I 領域は HVT の増殖に不可欠な機能を担っていない（別紙 10）。この領域に発現カセットを挿入された組換え体である vHVT013-69 株は *in vitro* において HVT FC126 株と同様に鶏胚細胞でよく増殖するが、体内での増殖能は HVT FC126 株より若干低いことが示唆された（別紙 22）。一方、vHVT013-69 株はマレック病に対する感染防御能が十分に誘導されることは確認されている（別紙 17）。これらのことから、宿主の代謝系を大きく変化させるとは考えられない。

資料2. 審査データの概要

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

名称： pEL079

由来： ベクターpEL079 は、プラスミド pBluescript II KS+ (図 8) に、HVT FC126 株ゲノム DNA 由来の *Bam*HI-I 領域の *Xho*I-*Sac*I フラグメント (以下、「HVT オープンリーディングフレーム (orf) 2-3/4」とする。) (図 10) を組み込み改変したものである。

ベクターの主要部分 pBSII-KS+ については別紙 11 の通りである。

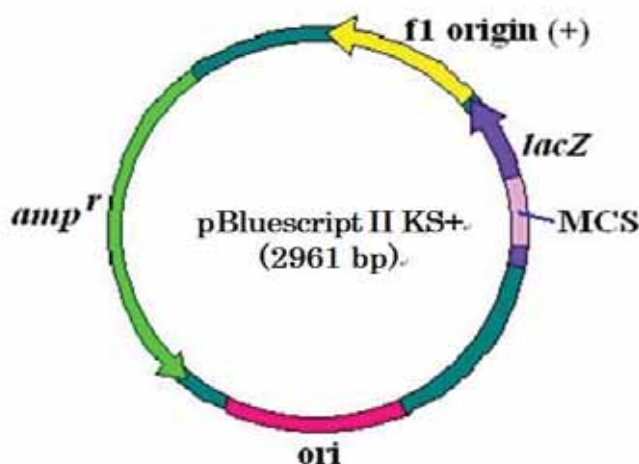


図 8 pBSII-KS+の遺伝子地図

ベクターpEL079 の各構成要素の詳細は以下の通りである (表 3 及び図 9)。

表 3 ベクターpEL079 の構成要素の由来

ベクターpEL079 (4,959 bp、別紙 3)		
構成要素	サイズ	構成要素の由来
HVT orf 2-3/4	2,084 bp	ベクターpEL079 は HVT FC126 株ゲノム DNA 由来の HVT orf 2 及び 3/4 を含み (図 10)、供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」が挿入される部位 (12 bp、1500-1512) を含んでいる。供与核酸挿入部位は orf 2 と 3/4 を分断する形で存在しており、 <i>Sal</i> II、 <i>Sma</i> I、 <i>Eco</i> RI の 3 つの制限酵素切断部位を含む。
pBluescriptII KS+	2,961 bp	ストラタジーン社が開発したクローニングベクター (図 8)。大腸菌 K12 株における実験用クローニングベクターとして汎用されているもので、全遺伝子配列が決定されている。ファージとプラスミドの両方の性質を持つのでファージミッドと呼ばれている。

資料2. 審査データの概要

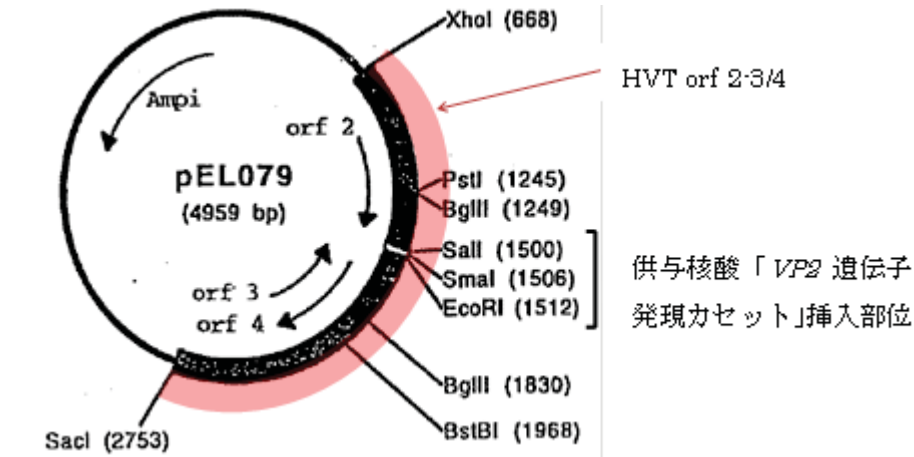


図9 ベクターpEL079の遺伝子地図

HVT ゲノムは 82% の L 領域と 12% の S 領域との二つの部分からなる。各々の領域は、ユニークな配列 (U_L 及び U_S) とその両端の倒置反復配列 (TR_L 及び IR_L、IR_S 及び TR_S) からなる。R は反復配列、T は末端部 (Terminal)、I は内部 (Internal)、下付きの L は L 領域、下付きの S は S 領域を示す (Igarashi et al., 1987)。

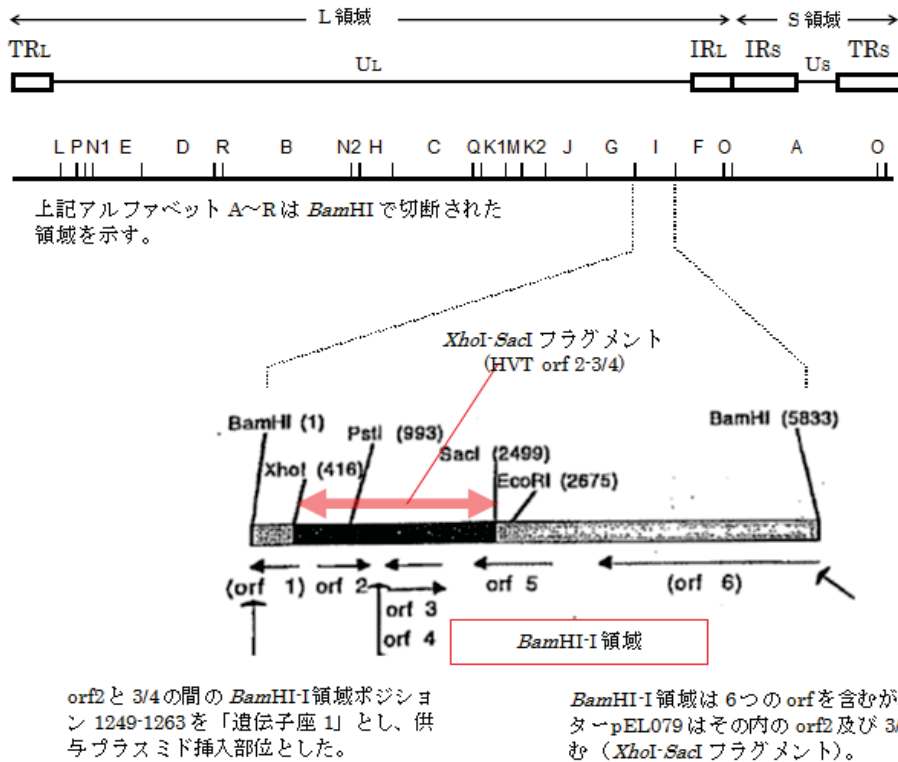


図10 HVT ゲノムの構造、及び *Bam*HI 領域と *Xho*I-*Sac*I フラグメント

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

ベクターpEL079は、HVT FC126株ゲノムDNA由来の「HVT orf 2-3/4」を、プラスミドpBluescriptII KS+ (pBSII-KS+) に組み込み改変したものである。供与核酸の挿入部位をHVT orf2と3/4の間に持つ(図9)。HVT orf 2、3/4が供与核酸を挟む形になるため、vHVTゲノムDNAとの*in vitro* 相同組換えが可能となる。

表 4 ベクターpEL079の各構成要素の特性

構成要素	構成要素の特性
ベクターpEL079 (4,959 bp、別紙 3)	
HVT orf 2-3/4	HVT FC126株ゲノムDNA由来のBamHI-I領域は、4つの完全長orf2、3、4及び5、及び2つの部分的orf1及び6の6つのorfを含む(図10)。ベクターpEL079はそのうちorf2及び3/4を含む(XhoI-SacIフラグメント(HVT orf 2-3/4))。各orfの特性は表5に示した。BamHI-I領域は伝染性、病原性及び伝達性に関する遺伝子は保持しない。
pBluescriptII KS+	ベクターの主要部分であるpBSII-KS+は実験用クローニングベクターであり、病原性、伝染性及び伝達性に関する遺伝子は保持しない。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

表5にBam HI-I領域に存在する推定orfと、それと相同性を有する配列について記載した。

名称 ^a	転写方向	開始コドン	終止コドン	orfの長さ (アミノ酸数)	Poly-A ^b	相同性
(Orf1)	左	479	-	(>159)	NA	該当なし
Orf2	右	676	1185	169	1236	HSV-1 U _L 55 ^c
Orf3	左	4968	4411	185	1281	EHV-1 遺伝子3 ^d
Orf4	右	4430	4987	185	2176	該当なし
Orf5	左	6108	5311	265	2210/ 2036	該当なし
(Orf6)	左	-	6597	(>755)	3553	MDV orf21 ^e

a () は一部の配列のorf

b ポリアデニレーションサイト配列AATAAA(あるいはATTAAA)。Poly-Aは、RNA合成酵素による転写終結および転写後のPoly-A付加の起点となるシグナル配列であり、その位置は上流にある翻訳領域(Orf)を転写したmRNAの機能的終結部位を示す。Poly-A、開始コドン、終始コドンを確認する事により、その上流にあるOrfが機能する事を示している。

c McGeoch et al. (1988): HSV-1 U_L55は、単純ヘルペスウイルス(HSV)1型のU_L配列の一つであり、非本質的な遺伝子として考えられている。その明確な機能はわかっていないが、マウスにおける実験においてウイルスの複製、腹腔内における病原性、潜伏期間に関与しないとの報告がある。

d Telford et al. (1992): 馬ヘルペスウイルス1型(EHV-1)遺伝子3はOrf3の遺伝子領域であり、糖蛋白質をコードし、防御免疫に関連する遺伝子であると考えられている。

資料 2. 審査データの概要

- e Ross et al. (1993): マレック病ウイルス (MDV) の orf21 は U_L 内に位置し、少なくとも 322 のアミノ酸塩基からコードされると推定され、水痘帯状ヘルペスウイルス (VZV) の アルファ変換誘導蛋白とある種の相同性を示すが、明確な機能は報告されていない。

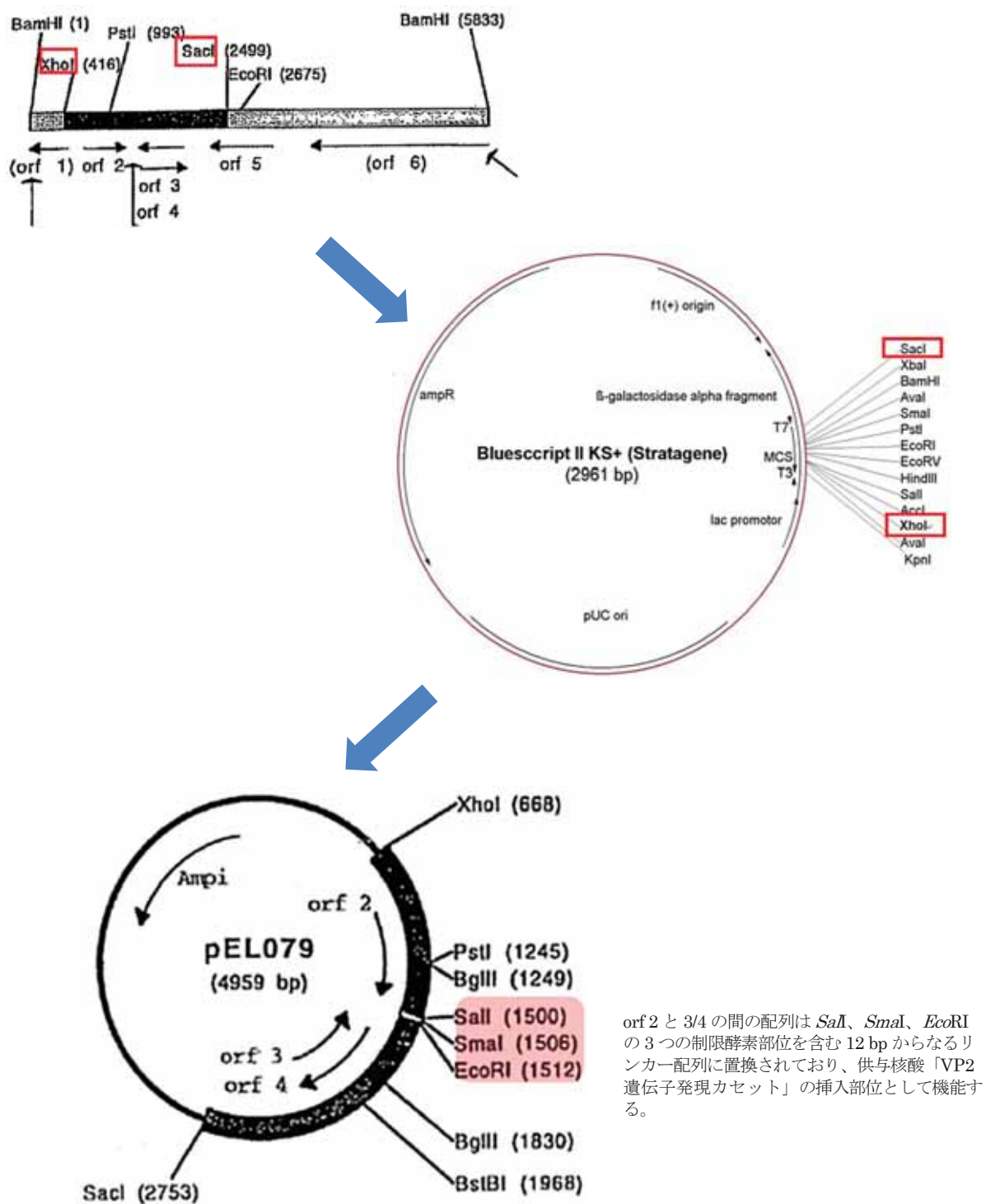
③ ベクターの伝染性の有無及び伝染性・病原性を有する場合はその宿主域に関する情報

ベクターである pEL079 は大腸菌系のプラスミドベクターである pBSII-KS+が主要な部分を構成し、HVT FC126 株由来 *XhoI-SacI* フラグメントを有するが、伝染性、病原性、伝達性は pBSII-KS+と同等であると考えられる。pBSII-KS+は大腸菌 K12 株における実験用プラスミドベクターとして汎用されているもので、全遺伝子配列が決定されており、病原性、伝染性は知られておらず、接合伝達性は低い種類として一般的に認識されている。

④ 既知のベクターについて改造又は修飾を行い、新しいベクターを開発した場合、改造又は修飾前のベクターに関する文献、改造又は修飾を行った部分についての方法

HVT *BamHI-I* 領域をクローニング後、*BamHI-I* の *XhoI-SacI* フラグメントが含まれるように pBSII-KS+にクローニングし、VP2 遺伝子発現カセットを組み込むためのベクターである pEL079 を作製した (図 11、別紙 3 参照)。orf 2 と 3/4 の間の配列は *SalI*、*SmaI*、*EcoRI* の 3 つの制限酵素部位を含む 12 bp からなるリンカー配列に置換されており、供与核酸の挿入部位として機能する。よって、供与核酸は orf 2 と orf 3/4 の間の 12bp の部位に挿入され、各 orf の機能には影響を与えないと考えられる。

資料2. 審査データの概要



orf 2 と 3/4 の間の配列は *SaI*、*SmaI*、*EcoRI* の3つの制限酵素部位を含む12 bp からなるリンカー配列に置換されており、供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」の挿入部位として機能する。

図 11 供与核酸を挿入するベクターpEL079 の構築

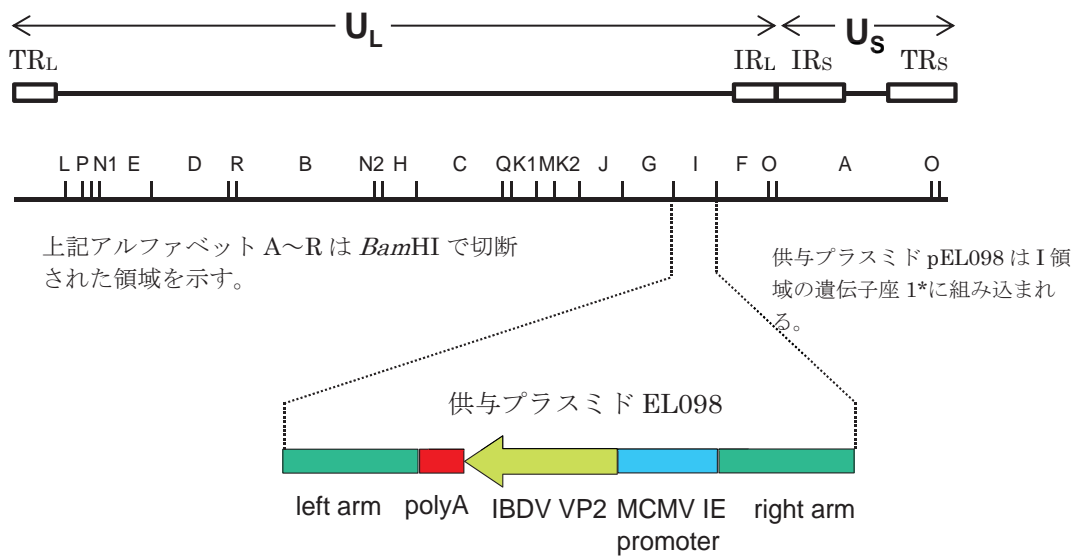
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

① ベクター内での供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位

供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」をベクターpEL079 に組み込んだ供与プラスミド pEL098 は、宿主である vHVT の orf 3/4 を含む遺伝子座 1 right arm 領域、MCMV-IE プロモーター領域、VP2 遺伝子領域、SV40 poly A 領域、そして vHVT の orf 2 を含む遺伝子座 1 left arm 領域から構成されている (図 12)。

挿入した VP2 遺伝子の塩基配列については別紙 3 に示した。



U_L 及び U_S: HVT ゲノムのユニーク配列 (L 領域及び S 領域)
 TR_L、IR_L、IR_S 及び TR_S: U_L 及び U_S 両端の倒置反復配列

* orf2 と 3/4 の間の *Bam*HI-I 領域ポジション 1249-1263 を「遺伝子座 1」とし、供与プラスミド挿入部位とした。

図 12 vHVT ゲノムに移入する核酸の構造及び位置

② ベクター (pEL079) への供与核酸 (VP2 遺伝子発現カセット) の挿入方法

供与プラスミド pEL098 の構築 ((別紙 3 及び図 13 参照)

pEL070 を *Sal*II/*Eco*RI で切断し、*Sal*II/*Eco*RI で切断したベクター pEL079 に pEL070 由来の VP2 遺伝子発現カセットを挿入して、供与プラスミド pEL098 を作製した。

資料 2. 審査データの概要

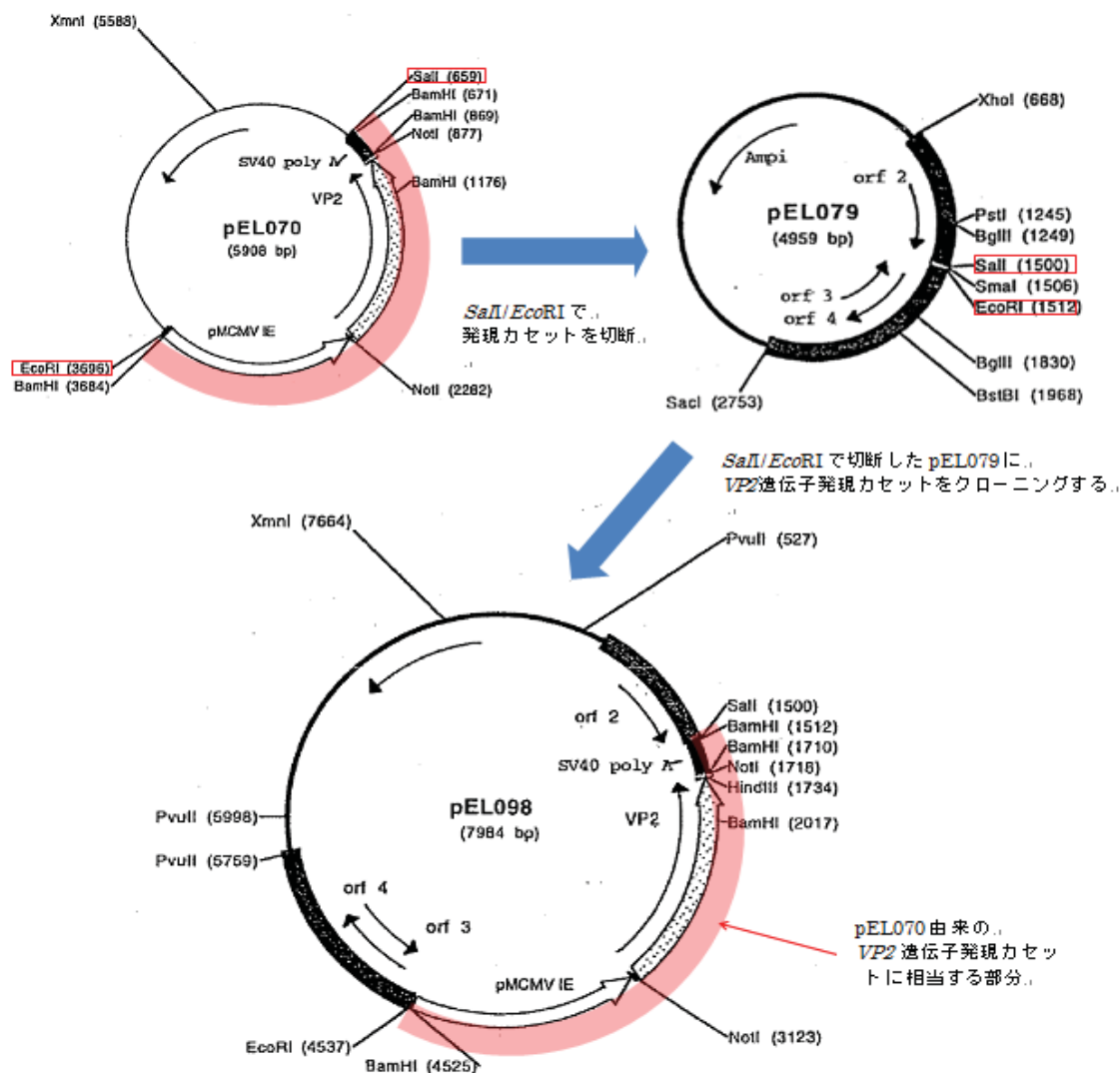


図 13 供与プラスミド 図 13 供与プラスミド (pEL098) の構築

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

目的遺伝子、プロモーターを挿入した発現カセットを含む供与プラスミド pEL098 を PvuII 制限酵素で直線状にした後、vHVT ゲノム DNA とともにリポフェクタミンと混合し、鶏胚線維芽細胞でトランスフェクトさせ、相同組換えをおこさせることで vHVT に目的遺伝子である VP2 遺伝子発現カセットを挿入して遺伝子組換え微生物 vHVT013 を作製した (別紙 3 及び図 14 参照)。

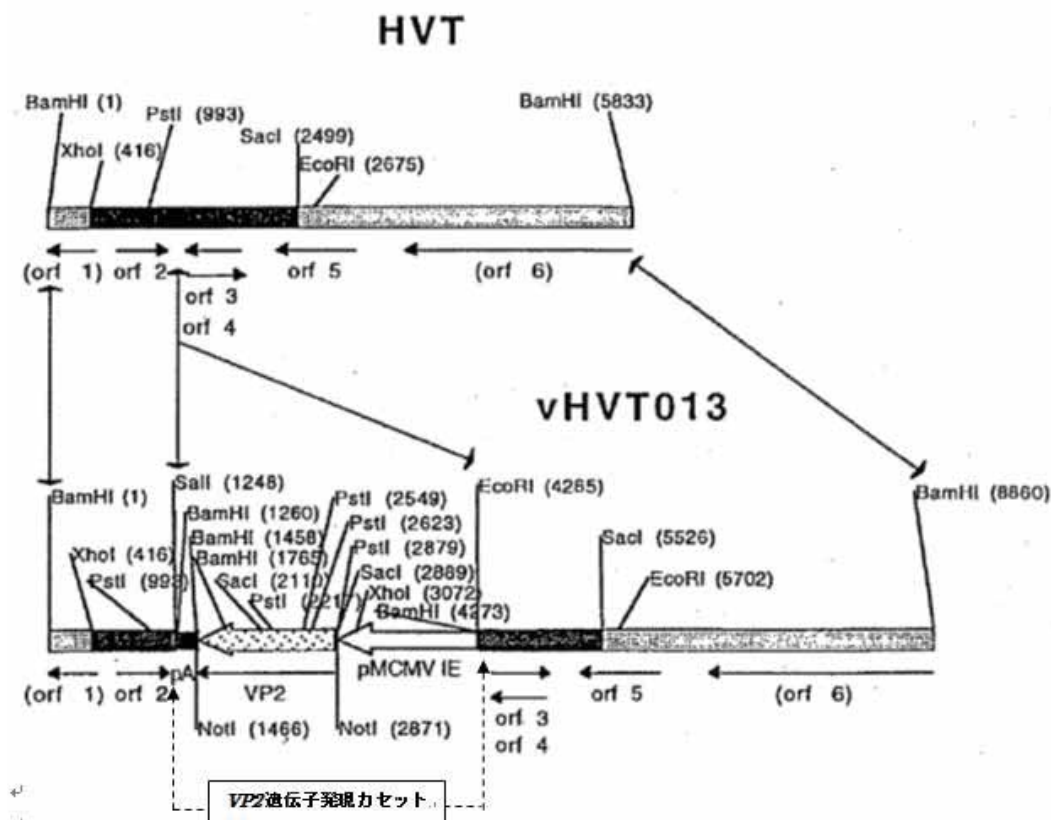


図15 親株 (HVT) 及び組換え後 (vHVT013) の VP2 遺伝子発現カセット領域

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

相同組換えにより作製した vHVT013 を増幅するため、トランスフェクトした細胞を継代培養した。トランスフェクション後4代目で期待する PCR プロファイルを示す組換え体 (クローン “C1”) が得られた。このウイルスを3代継代して増幅し、Stock “CRYO vHVT013/26/CEP1” を得た。このクローンを PCR 分析したところ、一部に TR_L に欠損が確認されたものが認められたため、欠損のないウイルスを得るため再クローニングを行った。Stock “CRYO vHVT013/26/CEP1” の限界希釈法によるクローニングにより、PCR で非欠損であった2クローン (#8 及び #69) が得られた。結果的にクローン #8 はサザンブロットで IR_L 及び又は TR_L にくつかの欠損が認められ、クローン #69 には欠損が認められなかったため、#69 を選択した (vHVT013-69)。IR_L 及び TR_L の欠損は HVT FC126 株由来の BamHI-I と BamHI-F において一部確認されているが、これらの欠損が *in vitro* や *in vivo* における HVT の増殖や、マレック病防御に本質的な役割を果たさないとの報告がある (別紙 10)。

相同組換えから 11 代目で得られた遺伝子組換え微生物 vHVT013-69/31/CEP1/96.10.17 dated 17.10.96 を、さらに SPF 鶏胚線維芽細胞を用いローラーボトルで2代継代して得たものを、製造に用いるマスターシードウイルス (MSV) vHVT 013-69/33/CEP1/6418/961205 とした。MSV は液体窒素 (≤-196°C) で凍結保存する。(※継代の詳細を示した表 6 は、社外秘のため非公開)

資料 2. 審査データの概要

なお、vHVT013-69/31/CEP1/96.10.17 dated 17.10.96 以降、MSV を 2 代継代培養したものを「本遺伝子組換え微生物」と規定して名称を統一して以降の記載を行った。

(4) 細胞内（宿主体内）に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

①移入した核酸が遺伝子組換え微生物の染色体に組み込まれているかプラスミドとして存在するか等

目的遺伝子は宿主である七面鳥ヘルペスウイルス vHVT のゲノム DNA 内に組み込まれていることを本遺伝子組換え微生物について確認した（別紙 3 p204）。挿入場所は vHVT の *Bam*HI-I 領域の遺伝子座 1 で（別紙 12）、目的遺伝子 IBDV VP2 遺伝子は上流に MCMV-IE プロモーター、下流に SV40 poly A を付加されている。

②移入された核酸の複製物の世代交代時における伝達の安定性

本遺伝子組換え微生物について *in vitro*（鶏胚線維芽細胞）で初代、5 代及び 10 代継代したものを、PCR 法を用いて解析したところ、予想されるサイズのバンドが認められ、親株である HVT のコンタミネーションは確認されなかった（別紙 13, p399, 3.3.3）。また、サザンブロット分析においても組換え遺伝子の挿入が確認された（別紙 13, p394, 3.1.3）。

③目的遺伝子の動物内での発現の安定性

MSV から *in vitro*（鶏胚線維芽細胞）で 3 代及び 8 代継代したのち、IBDV VP2 遺伝子の発現を間接免疫蛍光抗体法によって確認したところ、それぞれについて全てのプラークで発現が確認された（別紙 14）。また、本遺伝子組換え微生物と、本遺伝子組換え微生物を鶏で 9 代継代したウイルスをサザンブロット分析及び PCR 法によって比較したところ、VP2 遺伝子領域の配列間が同一であり、*in vivo* 継代における安定性が確認された（別紙 15）。

以上の結果より、挿入した供与核酸の継代による脱落は観察されず、世代交代時における伝達の安定性が示され、目的遺伝子は挿入部位に安定的に存在していることが確認された。また、挿入遺伝子により目的とする VP2 蛋白質が 100% のプラークで発現していたことから、遺伝子挿入部位における変異に伴う目的以外の蛋白質の発現は無く、目的遺伝子の形質発現が安定的であることが確認された。

遺伝子組換え微生物 vHVT013-69 株は哺乳動物由来細胞では複製しないので、その安定性については確認できない。

vHVT013-69 株を接種した鶏で IBDV 及び MDV の攻撃に対し、防御効果を示すことが確認されている（別紙 16 及び 17）。

資料 2. 審査データの概要

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

VP2 蛋白は IBDV カプシド蛋白の主要な構成要素の一つである。VP2 蛋白の発現は、IBDV VP2 蛋白特異的モノクローナル抗体や IBDV 感染鶏から得られた血清を用いた免疫蛍光法や放射性免疫沈降法等によって確認できると考えられる。通常は、品質管理試験の方法である

Fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識抗マレック病ウイルス特異抗体と Indocarbocyanine (Cy3) 標識抗 VP2 蛋白モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により行う (別紙 18、34)。蛍光抗体法の特異性を検証した際の試験方法及び条件の概要を以下に述べる (別紙 18)。鶏胚細胞を調整し、本遺伝子組換え微生物、HVT、IBDV 又は MDV Rispens 株を感染させた後にアセトン固定し、蛍光免疫染色に供する。IBDV 由来抗 VP2 蛋白モノクローナル抗体及び抗 HVT 特異抗体を一次抗体として固定感染鶏胚細胞へ添加し、38°C で 30 分間反応する。PBS により洗浄後、標識 (FITC 又は Cy3) 二次抗体により染色し、蛍光顕微鏡において観察する。HVT 感染は FITC 標識により緑色の蛍光として観察され、VP2 蛋白の発現は赤色の蛍光として観察される。特異性の検証結果として、抗 VP2 蛋白モノクローナル抗体は IBDV 及び本遺伝子組換え微生物には反応したが、HVT 及び MDV Rispens 株には反応しなかった。また、抗 HVT 特異抗体は HVT 及び本遺伝子組換え微生物には反応したが、IBDV には反応せず、MDV Rispens 株への反応性は低かった事が示された。本結果により、蛍光抗体法の特異性は立証された。その他に挿入配列とベクターを同定する方法として、理論的にはウイルス DNA の制限酵素切断パターン、PCR、ELISA 又はウェスタンブロット等の方法が考えられる。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 遺伝子組換え微生物と、その調製に利用した宿主又はこれらの属する生物種との特性の違い

七面鳥ヘルペスウイルスは鳥類由来細胞において一般的な細胞培養条件で増殖する。本遺伝子組換え微生物は、親株 FC126 株を培養細胞で継代して得られた宿主である vHVT 株の *Bam*HI-I 領域の挿入遺伝子座に IBDV VP2 遺伝子を挿入している。遺伝子学的特性として HVT ゲノムに IBDV VP2 遺伝子を 1 コピー持つとともに、マウスサイトメガロウイルスプロモーター MCMV-IE を 1 コピー持っている。上記の遺伝子は vHVT 株の *Bam*HI-I 領域に挿入されているが、その領域にもともとあった orf の発現は妨げないように挿入している (別紙 12)。よって、本遺伝子組換え微生物は IBDV VP2 蛋白質を発現する以外は宿主である七面鳥ヘルペスウイルスと同等の性質を示し、ウイルスの増殖が細胞核で行われ、細胞の生存できる環境が必須であるため、浸透圧の低い水中では殆ど生存できないと考えられる。宿主及び本遺伝子組換え微生物はその親株である HVT FC126 株と同一の細胞指向性及び増殖様式を示し、自然宿主である鳥類において感染性はあるが非病原性である。本遺伝子組換え微生物を鶏に接種した場合の体内分布、体外への排泄及び同居感染性については、その宿主の性質と同等であることが、試験により確認された (別紙 19

資料 2. 審査データの概要

及び 20)。また、本組換え体はその宿主と同様に羽包のみに分布し（別紙 19）、鶏から鶏への伝播性は認められなかった（別紙 20）。なお、本遺伝子組換え微生物接種鶏との同居による七面鳥への伝播は認められたが（表 7、別紙 21）、飼育環境（敷き藁）からの伝播は HVT FC126 では確認されたものの、本遺伝子組換え微生物では認められなかった（別紙 30）。また、SPF 鶏体内におけるウイルス量を確認したところ、本遺伝子組換え微生物の増殖能は宿主と比較して高くないと考えられた（表 8、別紙 22）。

哺乳動物に対しては体内で複製できないことから病原性はない（別紙 7、8）。

表 7 遺伝子組換え微生物の鶏から七面鳥への伝播（別紙 21：試験番号 98.183 試験結果抜粋）

群	材料	供試動物	HVT ウイルス分 離 ¹⁾	抗 IBDV 抗体 (log10) ²⁾	抗 HVT 抗体 ³⁾	
			D28	D28	D28	D42
G1A	vHVT013-69	鶏 12 羽	+	3.6	11/12	
G1B	－ (G1A と同居)	七面鳥 8 羽	+	4.2	0/6	5/6
G2A	HVT FC126	鶏 6 羽	+	≤0.4	6/6	
G2B	－ (G2A と同居)	七面鳥 4 羽	+	≤0.4	0/3	2/3
G3A	マレック溶解用 液	鶏 6 羽	－	≤0.4	0/6	
G3B	－ (G3A と同居)	七面鳥 4 羽	－	≤0.4	0/3	0/3

① 初代培養結果、②各群の幾何平均値、③陽性検体数／供試数

表 8 遺伝子組換え微生物の SPF 鶏における残存性（別紙 22：試験番号 98.255 試験結果抜粋）

群	処置	D0	()		()		D61	
		IBD ¹⁾	HVT ²⁾	IBD	HVT	IBD	HVT	IBD
G0	血清対照 (D0 に安 楽殺)	<0.5						
G1 (n=10)	vHV013-69	ND	4/5	()	5/5	()	5/5 ()	()
G2 (n=10)	HVT FC126	ND	5/5	ND	5/5	ND	5/5 ()	ND
G3 (n=10)	対照	ND	0/5	<0.5	0/5	<0.5	0/5	<0.5

1) 抗 IBD 抗体価幾何平均値 (log10)

2) HVT ウイルス分離結果：陽性検体数／供試数()
D61 において分離ウイルス量を定量した()

3) ()は社外秘のため非公開

② 遺伝子組換え微生物の宿主との識別を可能とするコロニー形成性、発色性等の特徴

本組換え体とその宿主との識別は、Fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識抗マレック病ウイルス特異抗体と Indocarbocyanine (Cy3) 標識抗 VP2 蛋白質モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により行う。本試験法は品質管理試験 同定試験法と同様である（別紙 18、34）。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

家畜伝染病予防法において、マレック病（MD）及び伝染性ファブリキウス嚢病（IBD）は双方とも届出伝染病に指定され、両ウイルス性疾病をコントロールすることは養鶏産業において非常に重要である。MD 及び IBD は最も一般的な免疫抑制ウイルス性疾病である。MD はリンパ球増殖性疾病で、末梢神経の腫大や臓器組織におけるリンパ腫形成を特徴とする。IBD ウイルスはリンパ組織に向性を示し、ファブリキウス嚢を標的臓器として増殖する。B リンパ球で増殖する際にリンパ球を破壊し、罹患鶏では免疫抑制を起こす。

本遺伝子組換え微生物 vHVT013-69 株は、MD 及び IBD の予防を目的とする遺伝子組換え生ワクチン VAXXITEK® HVT+IBD の主剤として使用される。本ワクチンの用法及び用量として、皮下接種及び発育鶏卵内接種を想定している。皮下接種は「凍結ワクチンを融解後、溶解用液で 1 羽当たり 0.2mL となるように溶解し、初生鶏の皮下に 0.2mL を接種する」、発育鶏卵内接種は「凍結ワクチンを融解後、溶解用液で 1 羽当たり 0.05mL となるように溶解し、18~19 日齢の発育鶏卵内に 0.05mL を接種する」を予定している。

免疫抑制疾病である MD 及び IBD に対する防御を早期に誘導するためには、それぞれの生ワクチンをできるだけ早期（初生又は卵内）に接種することが推奨されるが、このアプローチは安全性及び有効性の面から困難であった。IBD 生ワクチンは免疫能賦与に関して移行抗体の影響を著しく受け、特にひな用のワクチンウイルスは弱毒化が進んでいるので、それだけ移行抗体の影響は大きい。また、全ての個体がテイクするよう一般的に頻回接種が行われている。一方、本ワクチンの宿主である HVT ワクチン株はヘルペスウイルスであり、細胞随伴性ウイルスであることから液性抗体である移行抗体の影響を受けにくく、また、HVT は IBDV 移行抗体価のレベルに影響されない。潜伏感染して体内で長期間持続感染する特性があることから（文献 13）、長期間有効な省力型ワクチンベクターである。また、HVT FC126 株生ワクチンは発育鶏卵内接種が承認されているように、同等の生物学的性状をもつ本遺伝子組換え生ワクチンについても発育鶏卵内接種における安全性が確認されている。本遺伝子組み換え生ワクチンに挿入された IBDV VP2 遺伝子は主要構造蛋白の一つである VP2 蛋白を発現し、中和抗体誘導を担うエピトープを含む防御抗原である。ファブリキウス嚢の傷害に関与する遺伝子は含まないため安全であり、初生雛又は 18~19 日齢の発育鶏卵に接種できる。また、IBD 移行抗体レベルの影響を受けず有効性が発揮されることが確認されている（別紙 33）。

(1) 使用等の内容

- ① 運搬及び保管（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の運搬及び保管を含む）
- ② 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号。以下「医薬品医療機器等法」という。）第 14 条第 3 項の規程により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験（以下「治験」という。）に該

資料 2. 審査データの概要

当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験実施届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施基準に関する省令（平成 9 年農林水産省令 75 号）第 7 号に基づき作成する治験実施計画書に従った使用

- ③ 医薬品医療機器等法第 14 条第 1 項に基づく承認申請に従った使用（④に該当する行為は除く。）
- ④ 接種（鶏への接種）
- ⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残渣の廃棄
- ⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄等に伴う場合を含む）
- ⑦ ①～⑥に付随する行為

(2) 使用等の方法

—

(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置 緊急措置計画書を参照

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似環境での使用等の結果

本遺伝子組換え生ワクチン使用対象である鶏を用いた実験室内試験の結果、*in vivo* 継代による組換え領域の安定性が確認された（別紙 15、26）。ワクチンの安全性について問題となるような所見は認められず、病原性復帰を示唆する傾向は認められなかった（別紙 24、25）。また、HVT 及び IBD に対する攻撃試験による有効性評価試験において、本遺伝子組換え生ワクチンが両疾病に対する防御能を鶏に付与できることが確認された（別紙 16、17）。ワクチン接種鶏におけるウイルスの体内分布について総排泄腔、気管、ファブリキウス囊及び羽包を調べたところ、羽包にのみウイルスが認められたが（別紙 19）、飼育環境から感染性ウイルスは検出されなかった（別紙 29）。また、ウイルス接種鶏の白血球中に接種後 61 日目においてもウイルスが確認され、少なくとも 8 週間は鶏体内で持続感染することが確認された（別紙 22）。鶏から七面鳥への同居感染が認められたが（別紙 21）、鶏間での同居感染は認められなかった（別紙 20）。これらの性状はいずれも HVT FC126 株と同等であった。

海外で実施された臨床試験結果においても安全性及び有効性が確認された（別紙 33）。

資料 2. 審査データの概要

(6) 国外における使用等に関する情報

当該遺伝子組換え微生物 vHVT013-69 株を有効成分とするワクチン（製品名：VAXXITEK® HVT+IBD）の外国における承認取得は 2002 年以降 85 か所（84 か国）である（2015 年 2 月現在）（別紙 4）。

主要 10 か国の直近 3 年の販売実績を「表 7 主要 10 か国における販売状況」に示した。これら主要 10 か国の合計として 2011 年で 4,784,952,000 ドース、2012 年で 6,206,425,000 ドース、2013 年で 7,802,741,000 ドースである。2014 年 8 月時点の全世界における本ワクチン接種累計数は 480 億ドース以上に上る。

表 9 主要 10 か国における販売状況

販売国	販売量（千ドース）*		
	2011 年	2012 年	2013 年
ブラジル	1,251,090	1,667,146	1,505,348
アメリカ合衆国	1,061,086	1,245,436	2,258,766
フランス	97,048	130,539	154,701
中国	889,596	1,300,518	1,731,040
ロシア	292,580	429,590	490,040
メキシコ	248,084	491,816	603,384
ベネズエラ	366,110	318,500	351,500
アルゼンチン	335,516	353,728	379,230
コロンビア	174,670	199,980	210,790
フィリピン	69,172	69,172	117,942
合計	4,784,952	6,206,425	7,802,741

*販売量は 1 月から 12 月の数値として記載。

(7) 接種動物体内における挙動に関する情報

① 接種動物の体内における遺伝子組換え生ワクチンの消長に関する情報

HVT は七面鳥群に普遍的に存在する非病原性ウイルスで、非常に広範囲に分布している。鶏には自然発生しないが、ウイルスは七面鳥と同様に鶏でも複製する。HVT は羽包及び白血球に組織指向性があり、実験的には HVT 生ワクチン株である親株 FC126 株と本遺伝子組換え生ワクチンを接種した鶏において、両者ともウイルスは羽包にのみ確認された（別紙 19）。また、両者とも鶏体内で 8 週間は持続することが確認されたが、ウイルス量としては本遺伝子組換え生ワクチンは親株より少ないことが示された（別紙 22）。鶏体内での 9 継代後と未継代の比較において、病原性復帰を示唆するような傾向は認められなかった（別紙 24、25）。本遺伝子組換え生ワクチンの *in vivo* 遺伝子学的安定性に関する試験結果から、組換え領域の安定性及び鶏での *in vivo* 複製においてゲノム改変しないことが証明された（別紙 15、26）。

資料2. 審査データの概要

② 接種動物体及び接種動物の排泄物、血液・体液、卵等からの遺伝子組換え生ワクチンの環境への拡散の有無に関する情報

HVT が鶏間で直接伝播する可能性は低いと考えられている。HVT FC126 株及び本遺伝子組換え生ワクチン各 10^5 PFU を 1 日齢 SPF 鶏 6 羽ずつに皮下接種し、無処置の SPF 鶏各 4 羽と 56 日間同居させた。接種 29 日目及び 56 日目に各鶏の白血球からウイルス分離を行い、更に 42 日目及び 56 日目の血清サンプルについて抗 IBD 中和抗体及び抗 HVT 蛍光抗体を調査した。その結果、HVT FC126 株及び本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏の白血球からウイルスが検出され、全羽に特異抗体が認められたが、同居群の鶏からはウイルスが分離されず、抗体も検出されなかった（別紙 20）。これらのことから、本遺伝子組換えワクチンは HVT FC126 株と同様に鶏間での同居感染の可能性は非常に低いと考えられた。

一方、HVT は鶏から七面鳥及び七面鳥間で伝播することが知られている。HVT FC126 株接種又は本遺伝子組換え生ワクチン接種 SPF 初生雛に、SPF 七面鳥初生雛を同居させ、鶏を安楽殺後、更に七面鳥を 14 日間飼育し、白血球からのウイルス分離及び抗体検査を実施したところ、同居七面鳥のウイルス分離及び抗体検査結果は陽性であったことから（別紙 21）、鶏から七面鳥への伝播は可能であった。しかしながら、HVT FC126 株及び本遺伝子組換え生ワクチン接種 SPF 鶏を 21 日間飼育した敷き藁で、SPF 七面鳥を 20 日間飼育し、更に SPF 七面鳥を同居させて 22 日間飼育したところ、HVT FC126 株については敷き藁飼育及び同居七面鳥ともにウイルスが伝播することが確認されたが、本遺伝子組換え生ワクチンの鶏から七面鳥への敷き藁を通じた伝播は認められなかった（別紙 30）。

HVT は主に感染性ウイルスを含有する羽包上皮の落屑（フケ）や敷藁屑によって経気道感染すると考えられている。HVT は鶏間での伝播の可能性は低いと考えられており、本遺伝子組換え生ワクチンについても同居感染は認められなかった（別紙 20）。鶏から七面鳥への伝播については本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏と SPF 七面鳥が同居することによって七面鳥への感染が成立したが（別紙 21）、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏の敷き藁で七面鳥を飼育しても感染が成立しなかったことから、本遺伝子組換え生ワクチンが鶏から七面鳥へ伝播するには同居するといった密接な接触が必要であると考えられる。

本遺伝子組換え生ワクチンの接種対象動物ではないが、HVT に最も感染リスクの高い七面鳥を用いて本遺伝子組換え生ワクチンの拡散に関する試験を実施した（別紙 27）。コンベンショナル七面鳥に本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥を接触させたところ、本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥と単独同居群（非接種）では 9 羽中 5 羽に HVT 抗体が、9 羽中 2 羽に IBD 抗体が検出されたが、本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥と共に HVT Genesis2 株*接種七面鳥とも同居させた非接種群においては、IBD 特異抗体は検出されなかった。本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥と同居した HVT 接種群は、10 羽中 3 羽に特異的レベルに満たない IBDV 抗体のわずかな陽転が認められた（ $1.0 \log_{10}$ ）が、それらの七面鳥を同居させた七面鳥には遺伝

資料 2. 審査データの概要

子組換え生ワクチンは継代（伝播）されなかった。これらのことから、HVT 感染七面鳥が存在している環境では、本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥から同居の七面鳥には遺伝子組換え生ワクチンが拡散する可能性が低いことが確認された。

以上より、本遺伝子組換え生ワクチンは接種対象動物である鶏間では伝播の可能性が非常に低く、宿主ウイルス HVT に最も感受性の高い七面鳥においても、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏とのみ同居させるといった密接な接触でない限り伝播しない。よって、本遺伝子組換え生ワクチンが環境へ拡散するリスクは極めて低いと考えられる。主として人に感染すると考えられるヘルペスウイルスは現在 8 種類同定されているが（文献 32）、人を含む非鳥類への MDV の伝播は、全ての血清型についてこれまで報告されていない。

* 1997 年に米国ノースカロライナ州の七面鳥農場から分離された株。分離後の継代数が少ないことから、野外における七面鳥の HVT 感染に代わるもの。

③ 接種動物において当該遺伝子組換え生ワクチンが垂直感染する可能性の有無に関する情報

宿主である vHVT 株に行った遺伝子学的改変は供与プラスミド挿入部位である遺伝子座 1 における 15 bp の欠失のみである。遺伝子組換えの工程で、既知の有害な配列や遺伝子伝達能を改変するような配列は挿入されていない。組換えによって宿主域、組織指向性、拡散性、体内分布及び持続性は親株に比してほとんど変化していない（別紙 19、20、21、22、27）ことから、本組換え生ワクチンは一般的な HVT と相同と考えることができる。よって、HVT に関する知見が本組換え体にも適用できると考えられる。HVT は垂直感染（介卵感染）が認められず、本組換え生ワクチンの体内での増殖能は HVT FC126 株と比較して高くない（別紙 22）ことから、垂直（介卵）感染する可能性は一般的な HVT と同等以下であると考えられ、本遺伝子組換え生ワクチンも HVT と同様に介卵感染しないと考えられる。

④ 野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

本遺伝子組み換え生ワクチンの宿主である FC126 株をはじめ HVT はマレック病に対するワクチン株として世界中で広く使用されている。その安全性は対象動物及び非対象動物において数十年にわたって野外で証明されている。現在までの知見では HVT は全ての動物種において非病原性である。

本遺伝子組換え生ワクチンは HVT に IBDV の遺伝子を挿入したもので、MD 及び IBD に対する鶏用のワクチンとして使用する。HVT の伝播様式は感染性ウイルスを含有するフケを介する経気道感染である。感染性ウイルス吸入により侵入したウイルスはリンパ系組織に移行し、T 細胞において潜伏感染する。感染性ウイルス粒子は感染リンパ球が羽包上皮細胞に移行し産生

資料2. 審査データの概要

される。それがフケに内包される形で環境中に排泄されることによって感染源となり、環境中に維持される。

HVT は一般的に鶏から鶏への伝播の可能性は非常に低く（文献4）、HVT FC126 株及び本遺伝子組換え生ワクチンについても鶏から鶏への同居感染は認められなかった（別紙20）。本遺伝子組換え生ワクチンのウイルス排泄について確認したところ、接種鶏の羽包にウイルスが確認されたものの（別紙19）、粉塵及び敷き藁から感染性ウイルスは検出されず（別紙29）、飼育環境中へのウイルス排泄量は非常に少ないと考えられた。

アルファヘルペスウイルス弱毒生ワクチンは HSV-1 等の人用を含め、動物用に関しても MDV をはじめ広く使用されている。一方、近年、自然組換えによる病原性の獲得に関するリスクについて問題提起されている（文献25、29、30）。しかしながら、組換えが起こるには、ウイルス間に遺伝子レベルで有意な相同性があり、同一の宿主に感染した上で、同一の細胞に感染する必要があり、自然界では宿主側、ウイルス側で様々な制約があるため、その頻度は限定的である。

本遺伝子組換え生ワクチンの用法は発育鶏卵内接種又は初生鶏へ皮下接種である。MDV は介卵感染しないため、ワクチン接種時には対象鶏は MDV に感染していないと想定されることから、本遺伝子組換え生ワクチンと MDV が重感染する機会はない。また、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏から他の MDV 感染鶏への伝播による組換えリスクに関しては、本遺伝子組換え生ワクチンは鶏間での伝播の可能性は低いため（別紙20）、重感染の機会是非常に低いと考えられる。

HVT の本来の保有動物は七面鳥であるが、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏と SPF 七面鳥の同居によってウイルスは伝播したものの（別紙21）、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏を飼育した敷き藁で飼育した SPF 七面鳥への伝播は認められなかったことから（別紙30）、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏飼育環境からの七面鳥への感染は認められず、最も HVT 感受性が高い七面鳥に対してでも、自然感染が成立するためには、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏とのみ七面鳥単独で同居する等の密接な接触が必要である。一方、養鶏場で鶏と七面鳥が同居するような状況は通常考えられないため、重感染のリスクはほとんどない。

養鶏場ではマレック病予防のため、1970年代から HVT 単味ワクチンが使用されていたが、1980年代以降マレック病の病原性増強に伴い HVT と MDV2 を組み合わせた2価ワクチンが導入され、その後、弱毒 MDV1 生ワクチンも導入された（文献23、24）。環境中に複数の血清型が同時に存在する場合があることから同時感染の機会が想定されるが、HVT と他の MDV 血清型との間の *in vivo* における自然組換えは報告されていない（文献1、15、25）。本遺伝子組換え生ワクチンと野外株を鶏に共感染させた場合においても MD の病原性が変化することはなかった（別紙32）。

資料2. 審査データの概要

HVTは七面鳥を本来の宿主とし、野生の七面鳥においてHVTがユビキタスに存在することは知られている。また、鶏に対してMD予防のためHVTワクチンが広く使用されていることから鶏においても遍在しているが、それ以外の野生の鳥類におけるHVTの伝播はよく知られていない(文献17)。一方、MDVは鶏を自然宿主とし、同じキジ目の七面鳥、ウズラ、コウライキジに感受性があることが報告されており(文献17)、カモ目のマガンから分離が報告された(文献3)。実験的に本遺伝子組換え生ワクチン高用量をコウライキジに接種したところ、感染が成立することが確認されたが、抗体陽転の程度は鶏よりも低かった。また、臨床症状や病変等は観察されず安全性が確認された(別紙23)。実験感染によりアヒルがMDV抗体を産生したとの報告はあるが、アヒル、スズメ、ヤマウズラ、ハト及びクジャクはMDV感染に対して抵抗性があると考えられている(文献17)。これらのことから、七面鳥以外のキジ目野鳥に対するHVTの感受性は鶏より低いと考えられ、それ以外の野鳥の感受性はほとんどないと考えられることから、本遺伝子組換え生ワクチンの野鳥を介した伝播のリスクは極めて低いと考えられる。

HVTは鳥類のリンパ球にのみ指向性を示すことより、感受性のある動物は鳥類に限定される(文献17)。MDVはヒトを含む霊長類(アカゲザル、カニクイザル、ボンネットモンキー、マーモセット)、ラット、ハムスター等の哺乳類には感染しないとされ(文献17)、またMDV CVI988株を誤ってヒトに接種した際に抗体が陽転しなかった事も報告されている(文献33)ことから、本遺伝子組換え生ワクチンの哺乳類への伝播リスクはない。

本遺伝子組換え生ワクチンは既に世界中の何十億という鶏に対して接種が行われているが、人や他の種への伝播は報告されていない。

⑤ その他必要な情報

—

別紙リスト

- 別紙1 Witter R. L. et al., Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. American Journal of Veterinary Research, 1970, 31, 525-538
- 別紙2 vHVT の系統図
- 別紙3 99.1034.R:組換え体 vHVT013-69 の構築
- 別紙4 VAXXITEK HVT+IBD 承認取得国一覧
- 別紙5 Afonso C. L., et al., The genome of Turkey Herpesvirus, Journal of Virology, 2001, 75(2):971-978
- 別紙6 98.356:SPF 七面鳥における組換えワクチン及び親株 HVT の安全性評価
- 別紙7 98.189:マウスにおける組換えワクチン及び親株 HVT の非特異的安全性
- 別紙8 98.190:モルモットにおける組換えワクチン及び親株 HVT の非特異的安全性
- 別紙9 Kibenge et al., Biochemistry and Immunology of Infectious Bursal Disease Virus. J.gen.Virol, 1988, 69:1757-1775
- 別紙10 Bublot M et al., Non-essential loci in the BamHI-I and -F fragments of the HVT FC126 genome. Acta Virol. 1999, 43:181-185
- 別紙11 プラスミド pBSII SK+の配列
- 別紙12 宿主ウイルス vHVT の Bam HI-I フラグメントと「挿入遺伝子 1」遺伝子座の位置
- 別紙13 98.132:鶏胚線維芽細胞培養で 10 代継代後の組換えウイルス vHVT013-69(ガンボロ病ウイルス VP2 遺伝子発現 HVT 組換えウイルス)の *in vitro*における遺伝子学的安定性
- 別紙14 99.0262:*in vitro*で 3 代あるいは 8 代継代した後の発現安定性
- 別紙15 98.133:組換えウイルス vHVT013-69 の *in vivo*における遺伝子安定性の分析(鶏(接種対象動物)で 5 代あるいは 9 代継代後の伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(ガンボロ病ウイルス)の VP2 遺伝子を発現する HVT 組換え体ウイルス)
- 別紙16 97.359:SPF 鶏における伝染性ファブリキウス嚢病に対する用量依存性
- 別紙17 99.1047.R:SPF 初生雛に対するマレック病ワクチン皮下投与の最小有効量
- 別紙18 99.016:免疫蛍光法を用いた組換え体 vHVT013 ワクチンの同定試験
- 別紙19 98.154:vHVT013-69 遺伝子組換え体:ワクチン接種鶏の体内でのワクチンウイルス株の分布
- 別紙20 97.361:ワクチン株及び親株における鶏から鶏への伝播
- 別紙21 98.183:ワクチン株及び親株における鶏から七面鳥への伝播
- 別紙22 98.255:vHVT013-69 遺伝子組換え生ワクチンを接種した SPF 鶏での残存性
- 別紙23 98.254:遺伝子組換え生ワクチン vHVT013-69 株のコウライキジ(*Phasianus colchicus*)における安全性試験
- 別紙24 98.007:鶏で連続継代後の特性 病原性復帰試験の一環として
- 別紙25 98.334:ワクチン及び継代株(鶏で 9 代継代後)のマレック病に関する安全性
- 別紙26 98.294:鶏で 9 代継代後の組換え領域のシーケンスによる vHVT013-69 の *in vivo* 遺伝子学的安定

資料2. 審査データの概要

性

- 別紙27 99.0548.R:vHVT013-69 遺伝子組換え生ワクチン
HVT ウイルスの存在下でのコンベンショナル七面鳥における伝播
- 別紙 28 七面鳥ヘルペスウイルス成分を含有する既承認ワクチン
- 別紙 29 01.0440:ワクチンウイルス及び HVT の環境における拡散性 SFP 鶏接種後の粉塵及び敷き藁に関連するウイルスの追跡
- 別紙 30 01.0486:七面鳥における安全性 ワクチンウイルス及びHVTの敷き藁を通じた鶏から七面鳥への伝播
七面鳥間の伝播
- 別紙 31 01.0856:七面鳥及び鶏におけるワクチン感染性の比較 用量依存性
- 別紙 32 98.355:マレック病血清型 1 及び 2 との組換えリスク
- 別紙 33 00.0897:野外試験 発育鶏卵内接種 — ガンボロ病に対する力価及び免疫持続
- 別紙 34 RW-14-06-003:独立プラークにおけるマレックウイルスベクターと導入遺伝子ウイルス含有量における相違の検討
- 別紙 35 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)の VP2 タンパクのアレルゲンとしての可能性

別紙 1

Witter R. L. et al.,

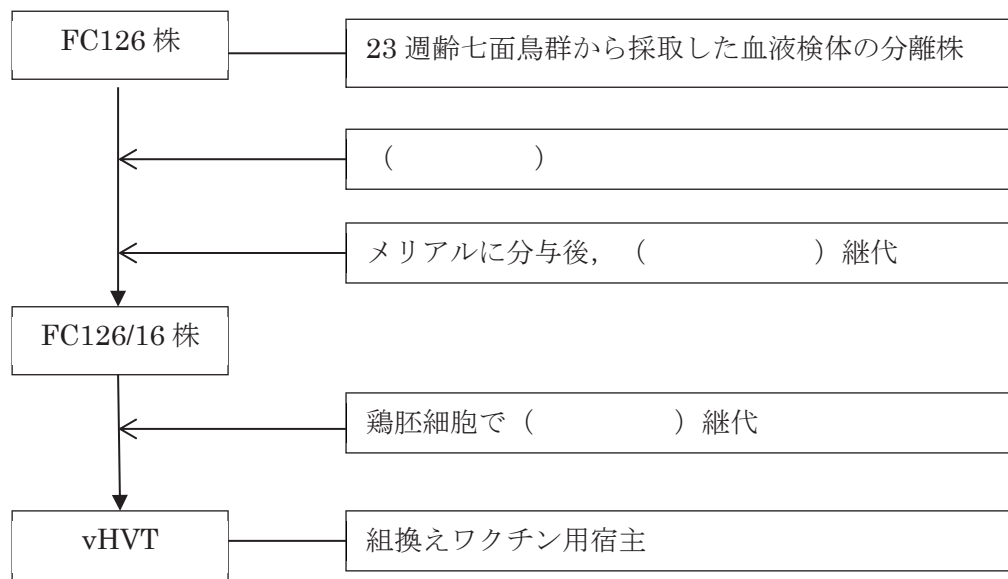
**Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek' s disease virus.
American Journal of Veterinary Research, 1970, 31, 525-538**

要旨

細胞変性ヘルペスウイルス (HVT) はインディアナ及びジョージアにて 3 群の七面鳥の血液及び腎臓から鶏腎細胞及びアヒル胚線維芽細胞を用いて分離された。これら分離株の *in vitro* の特徴は、高い細胞随伴性の感染性、合胞体形成細胞変性、タイプ A 核内封入体、5-BUDR によるプラーク形成阻害及びヘルペスウイルスタイプ粒子の存在を含め、類似していた。HVT 分離株は血清学的に同一であったが、以前に七面鳥より分離された他のウイルスとは区別された。このウイルスは 8 週間、七面鳥と鶏の両方に病原性は示さなかったが、ウイルスの回復や抗体の存在によってこれらの宿主は感受性であることを示した。HVT はマレック病ヘルペスウイルス (MDHV) の強毒株及び弱毒株とは異なるが、寒天ゲル沈降素、蛍光抗体そして中和試験の結果から HVT と MDHV には抗原の交差性が確認された。

別紙2

vHVT の系統図



()は社外秘のため非公開

別紙 3

99.1034.R : 組換え体 vHVT013-69 の構築

要旨

本報告書では vHVT013 (クローン vHVT013-69 株) として特定された HVT/IBDV VP2 遺伝子組換えウイルスの作製について記載する。本組換えウイルスは、HVT FC126 株ゲノムの *Bam*HI I フラグメント内の遺伝子座 1 に、HVT ゲノム DNA と挿入する MCMV-IE/IBDV VP2 発現カセットのドナープラスミドを相同 *in vitro* 組換え (IVR) することによって作製された。

本報告書で以下について記載する：

- a) HVT の *Bam*HI I フラグメントの配列と遺伝子座 1 の位置
- b) ドナープラスミド pEL098 の構築のステップ
 - HVT *Bam*HI-I フラグメントの構築 (プラスミド pRD069)
 - 遺伝子座 1 への挿入プラスミドの構築 (プラスミド pEL079)
 - IBDV VP2 遺伝子のクローニング (プラスミド pEL024)
 - MCMV-IE/IBDV VP2/SV40 poly A 発現カセットの構築 (プラスミド pEL070)
 - 供与プラスミドの構築 (プラスミド pEL098)
- c) IVR 後のクローニングのステップと、組換え体 vHVT013-69 ウイルスの遺伝子構造が期待通りであるか、またこのウイルスの発現カセットが機能しているかを確認するための品質管理

選択した vHVT013 クローンの最初のストック (vHVT013-69/31/CEP1/96.10.17) における最終品質管理では以下が示された：

- vHVT013-69 ストックウイルスが純粋であること (親株 HVT のウイルスの欠如)
- vHVT013-69 は組換え領域に予想通りの遺伝子構造を持っている
- vHVT013-69 は TRL 及び IRL 反復領域が欠けていない
- vHVT013-69 ストックは IBDV VP2 発現に関して均一である (約 1000 プラックのうち全てが IBDV VP2 特異的タンパク質を発現している)

結論

選択した vHVT013 組換え体クローンで実施した分析結果全てについて、HVT FC126 株ゲノム DNA とドナープラスミド pEL098 の IVR が期待通りに行われ、vHVT013 の最初のストックが IBDV VP2 免疫抗原の発現について純粋で機能的であることが示された。

資料2. 審査データの概要

別紙4

VAXXITEK HVT+IBD 承認取得国一覧

表：VAXXITEK HVT+IBD 承認取得国名と承認年月日

	国名	承認年月日
1	アルゼンチン	2008年7月18日
2	ベラルーシ	2010年11月3日
3	ボリビア	2007年3月6日
4	ブラジル	2006年8月24日
5	カナダ	2008年7月15日
6	中国	2010年10月19日
7	コロンビア	2007年11月8日
8	コスタリカ	2011年3月3日
9	ドミニカ共和国	2008年7月2日
10	エクアドル	2008年7月20日
11	エジプト	2009年7月1日
12	エルサルバドル	2006年11月20日
13	グアテマラ	2007年8月9日
14	ヨルダン	2009年10月21日
15	レバノン	2010年10月11日
16	メキシコ	2008年4月18日
17	ナミビア	2011年10月24日
18	ナイジェリア	2011年7月29日
19	パキスタン	2009年5月9日
20	パナマ	2009年3月19日
21	パラグアイ	2010年10月29日
22	ペルー	2006年9月25日
23	フィリピン	2008年3月5日
24	プエルトリコ	2007年1月24日
25	ロシア	2008年10月20日
26	マレーシア (サラワク)	2007年2月14日
27	サウジアラビア	2009年2月4日
28	シンガポール	2009年7月31日
29	南アフリカ	2009年10月22日
30	韓国	2009年7月13日
31	タイ	2007年10月10日
32	トルコ	2011年6月11日
33	ウクライナ	2007年10月5日
34	アメリカ合衆国	2004年11月23日
35	ウルグアイ	2009年1月29日
36	ベネズエラ	2006年11月1日
37	ベトナム	2011年3月23日
38	アルジェリア	2009年6月2日
39	オーストリア	2002年8月9日
40	ベルギー	2002年8月9日
41	ブルガリア	2007年1月1日
42	キプロス (ギリシア)	2004年5月1日
43	チェコ共和国	2004年5月1日
44	デンマーク	2002年8月9日
45	エストニア	2004年5月1日

資料2. 審査データの概要

	国名	承認年月日
46	フィンランド	2002年8月9日
47	フランス	2002年8月9日
48	ドイツ	2002年8月9日
49	ギリシア	2002年8月9日
50	ハンガリー	2002年8月9日
51	アイルランド	2002年8月9日
52	イタリア	2002年8月9日
53	ラトビア	2004年5月1日
54	リトアニア	2004年5月1日
55	ルクセンブルグ	2002年8月9日
56	マルタ	2004年5月1日
57	モロッコ	2008年7月16日
58	オランダ	2002年8月9日
59	ノルウェー	2002年8月9日
60	ポーランド	2004年5月1日
61	ポルトガル	2002年8月9日
62	ルーマニア	2007年1月1日
63	スロバキア	2004年5月1日
64	スロベニア	2004年5月1日
65	スペイン	2002年8月9日
66	スウェーデン	2002年8月9日
67	チュニジア	2008年12月16日
68	イギリス	2002年8月9日
69	アラブ首長国連邦	2011年1月9日
70	クロアチア	2010年7月7日
71	アイスランド	2002年8月9日
72	マダガスカル	2012年6月8日
73	ブルガリア	2007年1月1日

別紙 5

Afonso C. L., et al.,

The genome of Turkey Herpesvirus

Journal of Virology, 2001, 75(2):971-978

我々は七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) としても知られるマレック病ウイルス血清型 3 型 (MDV3) の完全長ゲノム塩基配列を世界で初めて解析したのでここに報告する。全長 159,160 bp のゲノムは約 99 の推定タンパク質をコード化し、ゲノム構成とゲノム含量においてアルファヘルペスウイルスに類似している。HVT は、MDV1 および MDV2 のユニークロング (UL) 及びユニークショート (US) ゲノム領域内において非常に類似しており、相同遺伝子領域は高度の供直線性を共有し、それらの蛋白領域は高度のホモログなアミノ酸を共有する。UL 遺伝子領域において、HVT は単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) とホモログな 57 つの遺伝子を持ち、6 遺伝子は MDV にのみにホモログで、2 遺伝子 (HVT068 と HVT070 遺伝子) は HVT 独自の遺伝子である。HVT の US 領域は MDV1 (Md5 株) の US 領域よりも 2.2 kb 短い、それは MDV096 (SORF4) ホモログの欠如と UL/short repeat (RS) 境界領域における違いのためである。HVT は、MDV1 (Md5) の UL/RS 境界領域の蛋白をコードする MDV087 のホモログを欠き、RS において MDV096 (糖タンパク E) のホモログを二つ持つ。HVT の RS は MDV1 の RS よりも 1,039 bp 長く、ICP4 遺伝子ホモログの例外を持ち、その遺伝子含量は MDV1 とは異なる。HVT には抗アポトーシス遺伝子である *Bcl-2* のホモログを含めて 6 つのユニークな遺伝子が RS 領域に確認されている。これはアルファヘルペスウイルスにおいて *BCI-2* 遺伝子ホモログの初めての報告である。HVT long repeat (LR) は MDV1 のそれより 7,407 bp 短く、病原性、癌原性、そして免疫回避を引き起こす機能を持つ MDV1 遺伝子のホモログを含まない。HVT は MDV1 の癌蛋白 MEQ、CxC ケモカイン、そして発癌性関連リン酸化蛋白 pp24 を含まないが、リン酸化蛋白 pp38 の領域は保存している。RS 及び RL 領域内・隣接部における著しいゲノムの相違が、おそらく非病原性である HVT と高病原性である MDV1 間の宿主域、病原性、発癌性に違いを与える原因であると考えられる。

別紙 6

98.356 : SPF 七面鳥における組換えワクチン及び親株 HVT の安全性評価

要旨

本試験は七面鳥において組換えワクチンの安全性を評価するために設定された。11 日齢 SPF 七面鳥 16 羽の 3 群を体重による無作為化によって D0 に構成した。D0 に動物を以下の通りに免疫した：

- G1 群：組換えワクチン
- G2 群：親株 HVT
- G3 群：滅菌溶解用液

余剰の七面鳥 5 羽については D0 に HVT の血清学的検査のために採血した。

D0 から D42 まで、臨床検査を毎日実施した。D42 に動物を安楽死させ、性別を判定して、剖検した。マレック病の症状について特に留意した。全ての七面鳥を D7 及び D21 に体重測定して、日増体重を評価した。それぞれの群における平均体重について、群と性別の因子を考慮して多重分散分析法により比較した。

それぞれの群で 1 羽ずつ、試験の開始時 (D2 から D4 まで) につつきによって死亡した。これらの動物にはその他に肉眼的異常は認められなかった。つつきは対照群の動物 2 羽についても認められた。D7 に、親株 HVT で免疫した 1 羽に呼吸器症状が認められた。これらの観察は組換えワクチンによるものではなかった。

安楽死後の D42 に、肉眼的な異常は認められなかった。

D21 までの 3 群における日増体重に有意さは認められなかった。

抗 HVT 抗体が組換えワクチン及び親株 HVT を免疫した動物全てに認められた。D0 に血液採取した動物及び G3 群の動物は全て抗体陰性であった。

組換えワクチンの七面鳥における安全性が明らかに示された。また、組換えによって HVT の自然宿主である七面鳥におけるウイルス株の安全性に変化は認められなかった。

別紙7

98.189 : マウスにおける組換えワクチン及び親株 HVT の非特異的安全性

要旨

ワクチンである組換え体ウイルス vHVT013-69 と親株である HVT FC126 株について非特異的な安全性をマウスで試験した。

SPF マウス 10 匹の 3 群を構成した。1 群には組換えワクチン株を接種し (G1 群), 第 2 群には親株を接種した (G2 群)。第 3 群には溶解用液を接種し, 対照群とした (G3 群)。

ワクチン接種後 7 日間の毎日の臨床観察 (一般及び局所の症状) を実施し, 全ての動物について体重測定で成長を確認した。

全ての群で斃死は観察されず, 一般症状及び局所の症状も認められなかった。

成長については観察期間中 3 群で同等であった。

試験条件下で, 組換えワクチン株及び親株のマウスに対する異常毒性の兆候は認められなかった。

別紙 8

98.190 : モルモットにおける組換えワクチン及び親株 HVT の非特異的安全性

要旨

ワクチンである組換え体ウイルス vHVT013-69 と親株であるヘルペスウイルスの HVT FC126 株について非特異的な安全性を、ヨーロッパ薬局方, 1997, § 2.6.9 に準じてモルモットで試験した。

SPF モルモット 4 匹の 3 群を構成した。1 群には組換えワクチン株を接種し (G1 群), 第 2 群には親株を接種した (G2 群)。第 3 群には溶解用液を接種し, 対照群とした (G3 群)。

ワクチン接種後 7 日間の毎日の臨床観察 (一般及び局所の症状) を実施し, 全ての動物について体重測定で成長を確認した。

全ての群で斃死は観察されず, 一般症状及び局所の症状も認められなかった。

成長については観察期間中 3 群で同等であった。

試験条件下で, 組換えワクチン株及び親株のモルモットに対する異常毒性の兆候は認められなかった。

別紙 9

**Kibenge et al.,
Biochemistry and Immunology of Infectious Bursal Disease Virus.
J.gen.Virol, 1988, 69:1757-1775**

総説

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの生化学及び免疫学

緒論

伝染性ファブリキウス嚢病 (Infectious Bursal Disease: IBD) とは、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBD virus: IBDV) 感染を原因とする感染症であり、ガンボロ病とも呼ばれる。IBDV はビルナウイルス科アピビルナウイルス族に属する RNA ウイルスである。本総説は、IBDV の構造および免疫学的観点における記載を主にまとめたものである。

IBD は若齢鶏において非常に感染性の強いウイルス性疾患であり、免疫器官の炎症と壊死を特徴とし、特にファブリキウス嚢におけるリンパ球 (B 細胞) の破壊を特徴としている。感受性鶏群 (3~6 週齢) に免疫抑制を誘導し、著しい成長阻害と高い致死率を示す。IBD によって免疫抑制が生じることにより他の疾病の感受性を高め、ニューカッスル病、マレック病そして伝染性気管支炎のワクチネーションに対する効果を減じ、多大な経済的損失を養鶏産業に与える要因の一つとして考えられている。

また、IBDV は、自然環境下で長時間生存でき消毒薬にも強いため、ワクチン接種による予防が IBD を制御する上で非常に重要となる。IBDV には、二つの血清型が知られており、血清型 I は鶏に対して病原性があり、血清型 II は鶏と七面鳥に感染はするものの臨床的意義は不明である。現在、血清型 I が野外株として認知されており、養鶏エリアは IBDV 血清型 I を含む生ワクチンや不活化ワクチンによってコントロールされている。

別紙 10

Bublot M et al.,

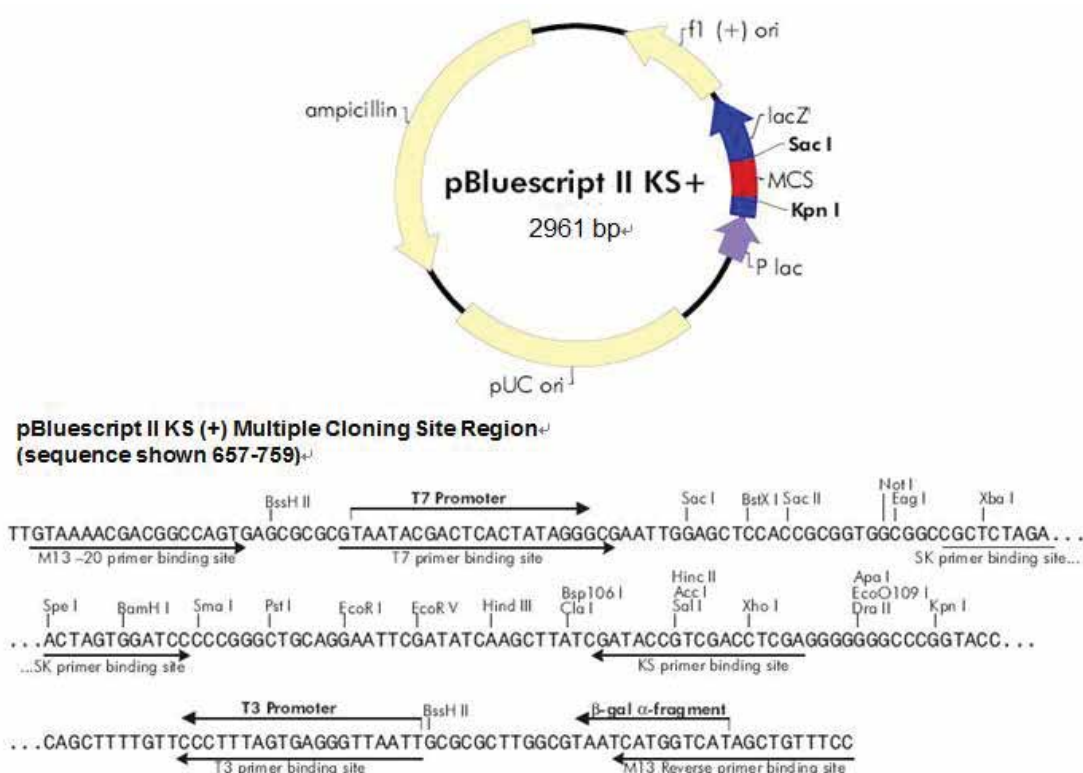
Non-essential loci in the BamHI-I and -F fragments of the HVT FC126 genome.

Acta Virol. 1999, 43:181-185

七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) FC126 株 DNA の BamHI-I の配列に機能部位である ORF が存在する可能性を検討した。4 つの完全長 ORF 領域 (ORF 2~5) と 2 つの部分的な ORF 領域 (ORF 1 及び 6) が検出された。ORF 2 及び 3 には、それぞれ HSV-1 UL55 及び EHV-1 遺伝子 3 の相同性が確認された。ORF6 はすでにスミス等によって部分的な配列の決定が行われており (Virology 207, 205-216, 1995)、マレック病ウイルス (MDV) の同様のポジションに位置する ORF と相同性があることが明らかとなった (ORF 21; Ross et al., Virus Genes 7, 33-51, 1993a)。他の ORF に明確な相同性は確認されなかった。ORF4 は ORF3 の相補的な配列となっている。二つの挿入遺伝子座に発現カセットを持つ二つの HVT 組換え体が作製され、鶏におけるウイルス血症が確認された。その結果、それらの二つの挿入遺伝子座は *in vitro* および *in vivo* における HVT の複製に本質的で無い事が明らかとなった。U_L に隣接する反復配列 (TR_L と IR_L (BamHI-F)) において 650 bp の遺伝子欠損が、HVT FC126 株のいくつかの DNA において確認された。この遺伝子欠損は、切断された pp38 とホモログの ORF をカバーし、小さな ORF の N 末端に相同性は検出されなかった。我々の結果は以下の事を示している。(1) HVT pp38 ホモログを含む遺伝子領域は、*in vitro* 及び *in vivo* における HVT の増殖に本質的では無く、そして(2) この遺伝子欠損は HVT による誘導されるマレック病 (MD) に対する感染防御機能に影響を与えるものでは無かった。

別紙 11

プラスミド pBSII SK+の配列



pBluescript II KS (+), 2961 bp、 Accession X52327.1

1 ctaaattgta agcgttaata ttttgttaa attcgcgta aatTTTTgtt aatcagctc
 61 atTTTTaac caataggccg aatcggcaa aatcccttat aatcaaaag aatagaccga
 121 gatagggttg agtgtgttc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc
 181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc cactacgtg aacctacc
 241 ctaatcaagt ttttgggt cgagggtccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag
 301 ccccgattt agagcttgc ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa
 361 agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtacg gtcacgctgc gcgtaaccac
 421 cacaccgcc gcgctaatg cccgctaca gggcgctcc cattcgccat tcaggctgcg
 481 caactgttg gaagggcgat cgttgcggc ctcttcgcta ttacgccagc tggegaagg
 541 gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg tttccagc cagcagttg
 601 taaaacgac gccagtgac gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tggagtcca
 661 ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa
 721 gcttatcgat accgtgacc tcgagggggg gcccggtacc cagctttgt tcctttagt
 781 gaggttaat tgccgcttg gcgtaatcat ggtcatagct gttcctgtg tgaattgtt
 841 atccgtcac aatccacac aacatacag ccggaagcat aaagttaa gcttgggtg
 901 ctaatgagt gagtaactc acattaattg cgttgcgctc actccccgct ttccagtcg
 961 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg gcggggaga ggcggttgc
 1021 gtattggcg ctctccgct tcctcgctca ctactcgtc gcctcggtc gttcggctgc
 1081 ggcgagcgg atcagctcac taaaggcgg taatcgggtt atccacagaa tcaggggata

資料 2. 審査データの概要

1141 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaagge caggaaccgt aaaaaggccg
1201 cgttgctggc gttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct
1261 caagtacagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa
1321 gtcctctcgt ggcgtctcct gtccgaccc tgcgcttac cggatactcg tccgccttc
1381 tcccttcggg aagcgtggcg cttctcata gtcacgctg taggtatctc agttcgggtg
1441 aggtcgttcg tcceaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg
1501 cttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgacta tcgccactgg
1561 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagattct
1621 tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc
1681 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctctg atccggcaaa caaacaccg
1741 ctggtagcgg tggtttttt gttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc
1801 aagaagatcc tttgatctt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt
1861 aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctgatcctt ttaaataaa
1921 aatgaagttt taatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat
1981 gcttaatcag tgaggcacct atctagcga tctgtctatt tcgtcatcc atagttgcct
2041 gactccccgt cgttgataga actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgcg
2101 caatgatacc gcgagacca cgctaccgg ctccagatt atcagcaata aaccagccag
2161 ccggaaggcc cgagcgcaga agtggctctg caactttac cgcctccatc cagtctatta
2221 attgtgccg ggaagctaga gtaagtagt gccagtaa tagtttgcg aacgttgtg
2281 ccattgctac aggcacgctg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggctca ttcagctccg
2341 gttcccaac atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaa gcggttagct
2401 cctcggctc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgtatca ctcatggtta
2461 tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatcctt tctgtgactg
2521 gtgagtact aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgc
2581 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaagtg ctcatcattg
2641 gaaacgttc ttcggggcga aaactctaa ggatcttacc gctgttga tccagttcga
2701 tgaaccac tcgtgcacc aactgatct cagcatctt tacttccacc agcgtttctg
2761 ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaggg aataaggcg acacggaat
2821 gttgaatact catactctc cttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgc
2881 tcatgagcgg atacatatt gaatgtatt agaaaaata acaaatagg gttccgcga
2941 cattccccg aaaagtcca c

別紙 12

宿主ウイルス vHVT の *Bam* HI-I フラグメントと「挿入遺伝子 1」 遺伝子座の位置

宿主ウイルスは、1970 年 R. L. Witter (Regional Poultry Research Laboratory, USDA, East Lansing, MI, USA) によって七面鳥から分離された七面鳥ルペスウイルス HVT FC-126 株で、ヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス亜科、Meleagrid ヘルペスウイルス属、七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) (Meleagrid ヘルペスウイルス 1) に属し、マレック病ウイルス感染に対する一般的なワクチンとして世界中で用いられている。

ヘルペスウイルスの特性を有し、162 カプソメアからなる直径 150~170nm のエンベロープを有するウイルスである。カプソメアは直径 90~100nm で、約 165 kbp の二本鎖 DNA を有する。DNA は 106 kbp の固有の長い配列 (UL: A unique long sequence) と 6 kbp の固有の短い配列 (US; A unique short sequence) を有する。

宿主ウイルス vHVT の遺伝子における「挿入遺伝子 1」 遺伝子座の位置すなわち *Bam*HI-I 遺伝子座は、特異的で大きなゲノム遺伝子部分 UL に存在する (図 1)。*Bam*HI-I 遺伝子座内で想定されるオープンリーディングフレーム (orf) については表 1 に、*Bam*HI-I フラグメントにおける「挿入遺伝子 1」 遺伝子座の位置は図 2 に示したとおりである。

図 1 宿主ウイルス vHVT の遺伝子における「挿入遺伝子 I」 遺伝子座の位置

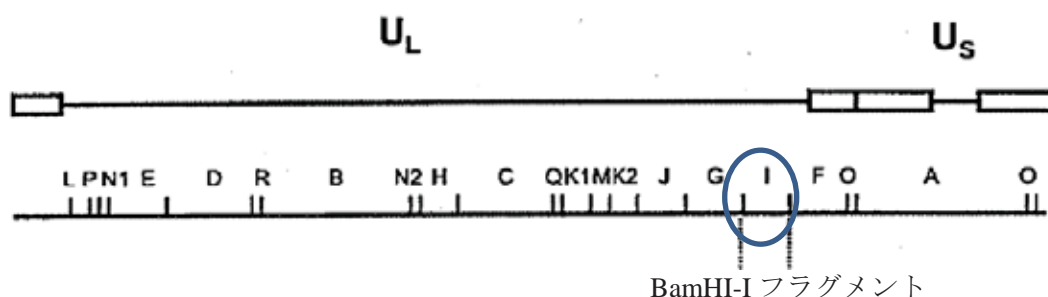


表1 BamHI-I 遺伝子座で想定されるオープンリーディングフレーム

Table 1: Putative open reading frames present in the cloned BamHI I fragment of HVT

Name ^a	Orientation	ATG	STOP	orf length	Poly-A ^b	Homology
(orf1)	Leftward	479	-	(>159)	NA	not found
orf2	Rightward	676	1185	169	1236	HSV-1 UL55 ^c
orf3	Leftward	1941	1384	185	1281	EHV-1 gene 3 ^d
orf4	Rightward	1403	1960	185	2176	not found
orf5	Leftward	3081	2284	265	2210/2036	not found
(orf6)	Leftward	-	3570	(>755)	3553	MDV orf21 ^e

^a an orf between brackets is a partial orf

^b potential poly-adenylation site sequence AATAAA (or ATTAAA)

^c McGeoch *et al.* (1988)

^d Telford *et al.* (1992)

^e Ross *et al.* (1993)

Orientation : 転写方向 (leftward: マイナス鎖側, rightward: プラス鎖側)

ATG : 開始コドンの位置

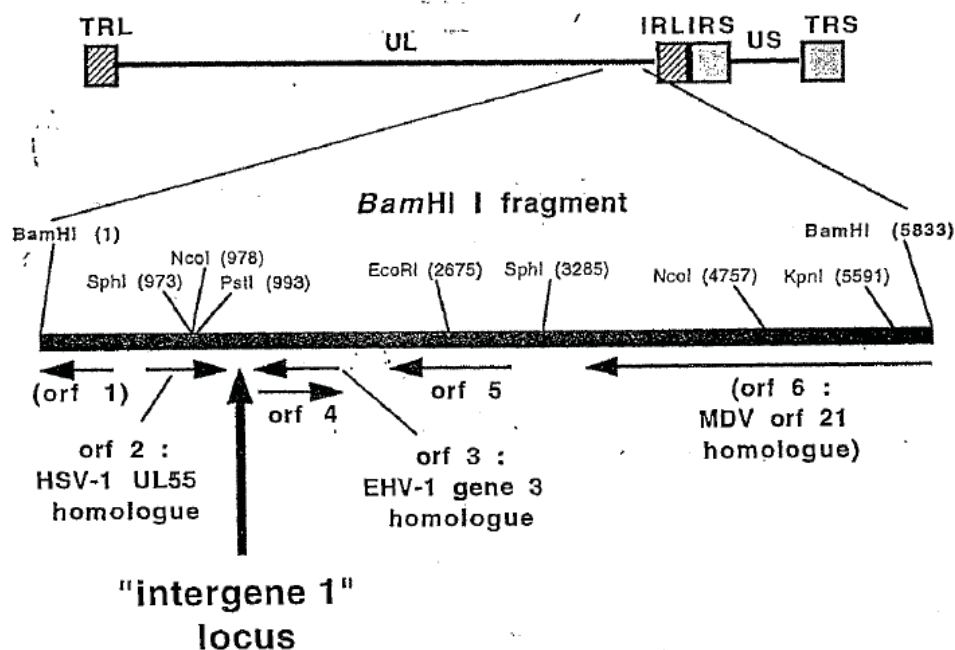
STOP : 終止コドンの位置

orf length : オープンリーディングフレームの長さ

Poly-A : Poly-A 配列の有無 (ある場合にはその位置)

Homology : 同定配列の有無 (ある場合にはその種類)

図2 HVT BamHI I フラグメントにおける「挿入遺伝子1」遺伝子座の位置



別紙 13

98.132 : 鶏胚線維芽細胞培養で連続継代後の組換えウイルス vHVT013-69 (ガンボロ病ウイルス VP2 遺伝子発現 HVT 組換えウイルス) の *in vitro* における遺伝子学的安定性

要旨

in vitro における組換えウイルス vHVT013-69 の遺伝子学的安定性について、鶏胚線維芽細胞 (CEF) で 5 代及び 10 代継代を行った後、分子生物学手法を用いて解析を行った。

遺伝子組換え領域の安定性は以下の結果より確認された :

- 1) 幾つかの組換え領域特異的なプライマーを用いた PCR 解析の結果 : 継代前、5 代及び 10 代継代したウイルスの遺伝子発現に変化は確認されなかった。PCR の結果は、調べられたウイルスサンプルにおいて、親株 HVT ウイルスの混入が無い事も確認された。
- 2) 組換え領域特異的なプローブ (IBDV VP2 発現カセットプローブ、HVT *Bam*HI I フラグメントプローブ) を用いたハイブリダイゼーションの結果 : 組換え前、連続継代したウイルスの結果に違いは確認されなかった。

継代前、10 代継代したウイルスの組換え領域特異的プローブを用いてハイブリダイゼーションを行ったところ、全領域において vHVT013-69 ゲノムの高い遺伝子学的安定性が示された。これらの結果は、組換えウイルス vHVT013-69 が CEF 細胞において *in vitro* で 10 代継代後に、ゲノムに再変異が無く、組換え遺伝子領域が安定であったことを明確に示している。

挿入遺伝子座 I に IBDV VP2 発現カセットを挿入することによって他のゲノムの安定性に影響を与えなかった。組換えウイルス vHVT013-69 は、少なくとも CEF での製造時に用いられる最大継代数よりも高い継代培養後も、高い安定性があることが明らかとなった。

別紙 14

99.0262 : *in vitro* で連続継代した後の発現安定性

要旨

本試験の目的は、組換えウイルス vHVT013-69 に挿入された IBDV（伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス）VP2 遺伝子の発現に関する安定性を、CEF（鶏胚線維芽細胞）で *in vitro* で継代した後、確認することであった。

組換えウイルスで感染させた全てのプレート（CEF で 3 代あるいは 8 代継代後のもの）を抗 HVT 血清及び抗 IBDV VP2 モノクローナル抗体で処理した。その後、2 種類の標識抗体、すなわち、抗鶏血清蛍光標識抗体及び抗マウス Cy3 血清蛍光標識抗体を加えた。

CEF で 3 代及び 8 代継代した後の組換えウイルスに HVT 蛋白質及び VP2 蛋白質の発現が観察された。

結論として、CEF での *in vitro* における連続継代後に、vHVT013-69 の 100% のウイルスで、IBDV VP2 蛋白質が発現していた。

組換えウイルス vHVT013-69 は製造時に用いられる最大継代数よりも高い継代数においても IBDV VP2 蛋白質の発現が安定であった。

別紙 15

98.133 : 組換えウイルス vHVT013-69 の *in vivo* における遺伝子安定性の分析 (鶏 (接種対象動物) で 5 代あるいは 9 代継代後の伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (ガンボロ病ウイルス) の VP2 遺伝子を発現する HVT 組換え体ウイルス)

要旨

生体内における組換えウイルス vHVT013-69 の遺伝的安定性について、鶏で 9 代継代を行った後、分子生物学手法を用いて解析を行った。

各材料からウイルス DNA を抽出し、サザンブロットングおよび PCR により遺伝子組み換え部位を解析し、遺伝的安定性の評価を行った。

サザンブロットングによる組換え領域の解析

継代前、鶏 5 代及び 9 代継代後のウイルスから調製した DNA を、4 つの制限酵素 (*Bam*HI、*Pst*I、*Nco*I 及び *Sly*I) により処理したところ、組換え領域のサイズが全ての群で完全な相同性を示した。また、組換え領域解析用プローブでのハイブリダイゼーションによって検出されたフラグメントのサイズは理論値と完全に一致していた。しかし、当然の事ながら、サザンブロットングでは、0.3kb より小さいフラグメントについて検出限界以下であった。

サザンブロットングによる全ゲノム構造解析

継代前、鶏 5 代継代後、鶏 9 代継代後及び CEF 10 代継代後の 4 種類のウイルス由来の DNA 抽出物を、*Bam*HI、*Pst*I 及び *Hind*III 制限酵素で切断し、サザンブロットした後に、「総 HVT DNA」及び「*Bam* F」プローブでハイブリダイゼーションを行った。

総 HVT DNA プローブにおけるサザンブロットングの結果では、*in vivo* における継代前及び鶏 9 代継代後 vHVT013-69 の *Bam*HI、*Pst*I 及び *Hind*III 制限酵素切断プロファイルに想定以外の相違は認められなかった。*Bam* F プローブにおけるサザンブロットングの結果では、*in vivo* における継代前及び鶏 9 代継代後の *Bam*HI、*Pst*I 及び *Hind*III 制限酵素切断プロファイルに想定以外の相違は認められなかった。

PCR を用いた組換え領域の分析

親株 HVT FC126 株、vHVT013-69 継代前、鶏における連続継代、CEF における連続継代のウイルス DNA を PCR 反応のテンプレートとして用いた。全ての PCR フラグメントは予想通りの大きさであった。

サザンブロットの結果から、組換え領域の遺伝子構造は、vHVT013-69 の鶏 9 代継代後に変化しなかったことが示された。また、特異的プライマーで得られた PCR の結果から、*in vivo* の遺伝学的安定性が確認され、供試された全ての継代ウイルス (継代前、n+5 及び n+9) の中に親株が存在しないことが確認された。

別紙 16

97.359 : SPF 鶏における伝染性ファブリキウス嚢病に対する用量依存性

要旨

1 日齢 SPF 鶏 20 羽の 4 群に対して用量依存性を確認するために、低用量から常用量のワクチンを皮下接種した。また陰性対照群として、ワクチンを接種しない群を設定した。14 日齢時に、全ての鶏を強毒伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) ウイルスで攻撃した。全ての鶏について臨床観察を行い、試験終了時に全ての生存動物を安楽死させ、剖検し、ファブリキウス嚢を組織学的検査のために収集した。ワクチン接種も攻撃も実施しなかった同一日齢で同一由来の 10 羽の鶏については安楽死させて同様の方法で検体を採取し、組織学的検査の対照として用いた。

攻撃によって斃死あるいは重篤な組織学的病変が攻撃対照群の全ての鶏において認められた。対照的に、ワクチン投与群では用量依存的な防御率の上昇が確認され、消瘦変化のパーセンテージは用量依存性であった。これらの結果分析における直線回帰は防御率と用量の対数間の強い相関性を示すものであった。

別紙 17

99.1047.R : SPF 初生雛に対するマレック病ワクチン皮下投与の最小有効量

要旨

本試験の目的は SPF 初生雛に皮下投与した際のマレック病に対する組換えワクチンの用量依存性の効果を評価することである。

D0 に各群 35 羽で構成された 4 群を設定し、各初生雛にそれぞれ 500、750、1000 及び 1500 PFU (2.70、2.88、3.0 及び 3.18 log₁₀ PFU) に調製された組換えワクチンを皮下投与した。またこれら以外に 35 羽をワクチン未接種として維持し、攻撃対照群として設定した。さらに同日に 25 羽を陰性対照群として設定した。

5 日齢 (D4) に陰性対照群以外の全てのワクチン接種群に対してマレック病ウイルス攻撃株を接種した。ウイルス接種後 70 日間 (D4~D74) 観察し、その後 D74 で安楽殺し、マレック病の症状 (主要臓器・神経の肥大・腫瘍形成) について剖検を行った。試験終了前に死亡した供試鶏については MD ウイルスの感染を確認するため剖検を行った。

ウイルス接種によって攻撃種対照群の 94.3% で特徴的な症状 (MD による死亡または傷害) を引き起こした。この結果は欧州薬局方のマレック病生ワクチン (1997;0589) で規定された最小率 (70%) を超えた。この結果は本試験の成立を保証し、接種ウイルス株の病原性と供試鶏の感受性を示した。予想通り、ワクチン未接種・ウイルス株未接種の陰性対照群は未感染のままであった。

ワクチン接種群の比較防御スコアはそれぞれ 66.7%、93.6%、97.0% 及び 100% であった。したがって 750 (2.88 log₁₀) PFU 以上の組換えワクチンのワクチネーションによって欧州薬局方が求める最小率 (80%) を超える MD に対する防御率が得られた。

したがって本試験の条件下では、SPF 初生雛に皮下投与した組換えワクチンの最小有効量は 750 (2.88 log₁₀) PFU と規定された。この接種量によって病原性マレック病ウイルス接種に対して 80% 以上の防御が得られた。

別紙 18

99.016 : 免疫蛍光法を用いた組換え体 vHVT013 ワクチンの同定試験

要旨

ベクターウイルス (HVT) と組換え蛋白 (IBD ウイルスの VP2) を明らかにするため、二重免疫蛍光法を実施する。

同定試験は力価測定で使用した、1 シャーレ当たり 50~100PFU を示す希釈液のシャーレを用いる。シャーレは抗 HVT 血清及び抗 VP2 モノクローナル抗体を用いて二重免疫蛍光法を用いて染色後、蛍光顕微鏡下で観察を行う。

- ・ PBS でシャーレを洗浄する。
- ・ -20℃で 20 分もしくは室温で 5 分、アセトンで固定する。
- ・ すぐに使用するか、使用まで-20℃で保管する。
- ・ PBS で洗浄する。
- ・ 希釈した抗 HVT 血清 1mL を加える。
- ・ 希釈した抗 VP2 モノクローナル抗体 1mL を加える。
- ・ 38℃で 30 分反応させる。
- ・ PBS で洗浄する。
- ・ 希釈した抗マウス IgG 標識抗体 1mL 加える。
- ・ 希釈した抗鶏 IgG 標識抗体を加える。
- ・ 38℃で 30 分反応させる。
- ・ PBS で洗浄する。
- ・ 脱イオン水で洗浄する。
- ・ シャーレを乾燥させる。
- ・ 蛍光顕微鏡下でシャーレを観察する。

同じプラークに緑色蛍光発色 (ベクターウイルスに対する) と赤色蛍光発色 (IBD VP2 発現産物に対する) が見られることが特異的反応である。

別紙 19

98.154 : vHVT013-69 遺伝子組換え体 : ワクチン接種鶏の体内でのワクチンウイルス株の分布

要旨

70 羽の 1 日齢 SPF 鶏を交互分配によって以下の 4 群に分けた :

- G1 : 組換えワクチン株 1 用量を接種。
- G2 : 親株である HVT 株 1 用量を接種。
- G3 : マレック溶解用液を接種
- G4 : 強毒マレック病ウイルスで攻撃。

G1, G2 及び G3 の 5 羽ずつを, D14, D21 及び D28 に安楽死させ、ファブリキウス嚢を採取してウイルス学的検査に供した。5 羽中 2 羽の羽毛検体を用いて, 毛胞中のウイルス検査を実施した。同様に各検体採取日に G4 の 2 羽ずつを安楽死させた。D14, D21 及び D28 に, G1, G2 及び G3 の生存鶏について気管スワブ及び総排泄腔スワブの採取を行い, ウイルス学的検査に供した。試験終了日に, G1, G2 及び G3 のそれぞれの生存鶏から血清を採取して特異的血清学的検査の評価に供した。

全ての総排泄腔及び気管のスワブ検体は陰性で, ファブリキウス嚢も同様に陰性であった。マレック病ウイルスが G1 及び G2 の D14 及び D21 採取毛胞で同定され, D28 では量が減少していた。D14 で G4 にもウイルスが検出された。HVT ウイルスに対する血清学的抗体応答が蛍光抗体法によって G1 及び G2 の全ての鶏で確認された。

試験環境下で, ワクチン株を接種鶏の体内に分布させた。毛胞のみでウイルスが確認された。七面鳥ヘルペスウイルスへの IBDV 遺伝子導入後, 組換え体と親株 HVT 株との結果の相同性から, 性状変化がないことも示された。

別紙 20

97.361 : ワクチン株及び親株における鶏から鶏への伝播

要旨

1 日齢 SPF 鶏 6 羽ずつの 3 群を設定した。

第一群及び第二群の鶏に vHVT013-69 組換え体ワクチン株と親株 HVT をそれぞれ 10^5 PFU 皮下接種した。第三群にはマレック溶解用液を注射した。

それぞれの群について、アイソレーター内で同じ由来と日齢の 4 羽の鶏を 56 日間同居させた。

試験中 (D29) ならびに試験終了時 (D56) に、鶏の白血球について鶏胚線維芽細胞による分離試験によってウイルスの有無を試験した。その結果、ウイルスは双方の接種群において確認された。同居群ならびに対照群 (マレック溶解用液接種) の個体は抗体陰性のままであった。

vHVT013-69 株及び親株 HVT の伝播性は認められなかった。

別紙 21

98.183 : ワクチン株及び親株における鶏から七面鳥への伝播

要旨

1 日齢 SPF 鶏の 3 群を設定した。第一群は鶏 12 羽で、第二群及び第三群はそれぞれ 6 羽であった。第一群の鶏に vHVT013-69 組換えワクチン株を接種し、第二群には親株 HVT を接種し、第三群にはマレック溶解用液を接種した。

それぞれの群について 1 日齢 SPF 七面鳥を同居させた：第一群には 8 羽の七面鳥、第二群及び第三群にはそれぞれ 4 羽の七面鳥を同居させた。

鶏と七面鳥の同居 28 日後（すなわち D28 に）、鶏は安楽死させて、七面鳥についてはさらに 14 日間（すなわち D42 まで）飼育した。

同居終了時点（D28）及び試験終了時（D42）に、鶏胚線維芽細胞を用いてウイルス分離試験を行った。ウイルスは、ウイルスを接種された鶏とそれらと同居していた七面鳥群の双方から検出された。一方、対照群の鳥（マレック溶解用液を注射した鶏及びその後同居した七面鳥）から採取された検体は陰性のままであった。

同様にウイルスに対する特異的な抗体について試験したところ、D28 にウイルスを接種された鶏及び D28 及び D42 に同居させた七面鳥で検出された。一方、対照鳥は抗体陰性であった。

よって、vHVT013-69 株は、親株 HVT と同一のウイルス量で接種したとき、鶏から SPF 七面鳥に伝播することが確認された。

別紙 22

98.255 : vHVT013-69 遺伝子組換えワクチンを接種した SPF 鶏での残存性

要旨

組換えワクチンの SPF 鶏における残存性を確認するため、1 日齢 SPF 鶏を 10 羽ずつ供試し、以下の 4 群を設定した。:

- G0 : 血清学的コントロールとして D0 で安楽殺し、血清学的試験を実施した。
- G1 : 遺伝子組換えワクチン vHVT013-69 を接種した群。
- G2 : HVT FC126 株を接種した群。
- G3 : コントロール、ワクチン未接種。

試験期間中、ウイルス血症を観察した。G1、G2 および G3 すべての鶏から継時的に採血を行った。各サンプルから白血球を分離し、鶏胚細胞(CEC)に接種した。ウイルスの有無は細胞変性効果によって評価した。試験最終日に得られたサンプルにおいて、ウイルス量を定量するため培養細胞上で PFU 数を計測した。

血清学的モニタリングも実施した。まず D0 において G0 を試験し、G1 および G3 について継時的に採血を行った。すべての血清を抗 IBDV 中和抗体価測定に供試した。

ウイルスの存在が G1 で観察期間後半にすべての鶏で確認されたのに対し、G2 ではすべての時点においてすべての鶏がウイルス陽性であった。予想通りコントロール (G3) ではウイルスは分離されなかった。観察終了日における PFU 数は、G2 は G1 の 4 倍を示した。

D0 において G0 のすべての鶏が抗 IBDV 抗体陰性であることが示された。試験期間中、G3 も陰性であった。G1 では D21 においてすべての血清で陽性を示し、抗体価は試験が終了するまで上昇した。

本試験において SPF 鶏における HVT ウイルスの残存は、HVT FC126 株および組換え体どちらについても少なくとも 8 週間は続くことが示された。また本試験においては、組換えワクチンを接種した鶏のウイルス量は、HVT FC126 株を接種した鶏と比較して少ないことが示された。組換えワクチン接種後、ガンボロ病に対する抗体価が安定的に上昇することも証明された。

別紙 23

98.254 : 遺伝子組換え生ワクチン vHVT013-69 株のコウライキジ (*Phasianus colchicus*) における安全性試験

本遺伝子組換え生ワクチンは、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の VP2 遺伝子を発現する HVT ベクターから構成される遺伝子組み換え生ワクチンである。コウライキジは本剤の対象動物ではないが、野鳥における安全性を確認する試験の一つとして本試験を実施した。

試験開始時 (D0) に、7 日齢のコウライキジ (コンベンショナル) および 12 日齢の SPF 鶏に以下の表の通りに接種を行った。なおワクチン接種群では、安全性試験用に適した高用量ワクチンを用いた。

群	動物種	日齢	被験薬	経路
G0	コウライキジ	7	- (D0 の血清検査用非接種対照)	-
G1	コウライキジ	7	組換えワクチン	皮下
G2	コウライキジ	7	溶解用液 (非接種対照)	皮下
G3	鶏	12	組換えワクチン	皮下

D0 に血清学的検査の為に G0 の全羽から採血し、その後安楽殺した。

D0 から試験終了 (D42) まで、G1、G2 および G3 に対して毎日臨床観察を実施し、病気または瀕死のものは安楽殺した。死亡および安楽殺したものについては剖検を行った。

試験終了時 (D42) に G1、G2、G3 の全羽から採血し、その後安楽殺し剖検を行った。剖検時には特にマレック病によって引き起こされる病変について注意を払った。

D0 (G0) および D42 (G1、G2 及び G3) に採取した血清について抗 IBDV 抗体価を個体ごとに中和試験法によって測定した。

試験中に観察された臨床症状および剖検所見は G2 の 2 羽でみられた跛行およびそれに伴う肉眼的病変のみであった。この症状は非特異的なものであり、先天性奇形またはアイソレーターにおける飼育環境によって引き起こされたものであると考えられた。また全試験期間中、G1、G2、G3 のその他のコウライキジおよび鶏では臨床症状および剖検所見の異常を示すものはいなかった。従って、試験期間中に死亡ならびにマレック病および IBD による明らかな兆候は認められなかった。

D0 の中和試験では、7 日齢のコウライキジ (G0) において抗 IBDV 抗体は認められなかった。

D42 において、溶解用液を接種したコウライキジの群 (G2) では抗 IBD 抗体価は陰性のままであった。組換えワクチン投与群 (G1 および G3) では抗 IBD 抗体価が陽転し、ワクチン接種が立証さ

資料2. 審査データの概要

れた。G3（鶏）では高い抗体価を示したのに対し、G1（コウライキジ）はD0の値より有意に高かったものの鶏よりも低い抗体価であった。

以上のことから、本試験環境下でのコウライキジに対する組換えワクチンの安全性が示された。

別紙 24

98.007 : 鶏で連続継代後の特性 病原性復帰試験の一環として

要旨

本試験は、鶏における継代後のワクチン株の特性を知るために病原性復帰試験の一環として実施された。

第 1 群として 10 羽の SPF 初生雛に、vHVT013-69 遺伝子組換え生ワクチンを筋肉内接種した。7 日後に、血液サンプルを各雛より採取し、白血球を分離し、プールした。鶏でウイルスを次代に継代をするため、白血球懸濁液の一部を第 2 群として 10 羽の初生 SPF 雛に 1mL 腹腔内接種した。残りの白血球懸濁液は液体窒素内に保管された。

鶏において 9 代の継代を行うため上記手順を同じタイプの鶏で繰り返した。最終継代は大量の白血球を得るために 20 羽の鶏において行われ、14 日齢の時点で採血された。

本試験における規定された観察期間の間（1 週間または 2 週間）において、臨床症状及び死亡は確認されなかった。

ウイルスは継代ごとに鶏胚継代細胞での分離によって検出され、また試験終了時に、鶏における 9 代継代目に相当するウイルスの分離によって検出された。後者のウイルスは分子生物学的手法を用いた遺伝子学的安定性試験に最初に用いられ、次に病原性復帰試験に用いられた。

遺伝子組換え生ワクチン vHVT013-69 を鶏で 9 代継代を行い、ウイルスを採取した。この株は、継代を通して病原性を獲得するような傾向は確認されなかった。

別紙 25

98.334 : ワクチン及び継代株のマレック病に関する安全性

要旨

初生雛 40 羽の 6 群を D0 に設定し、組換えワクチン及び継代株の安全性をマレック病 (MD) について、欧州薬局方 (1997:0589) に即して評価した。

- G1: 非接種対照群、D9 に攻撃
- G2a: 組換えワクチン、継代レベル MSV+2
- G2b: 組換えワクチン、継代レベル MSV+5 (最終製品の継代レベル)
- G2c: 鶏において継代した組換えワクチン株を接種、継代レベル MSV+2 を鶏で 9 代継代後
- G2d: 鶏胚細胞 (CEC) で増幅した継代株を接種
- G3: 非接種対照群、非攻撃

接種は脚部 (脛末節) 皮下に行った

D9 に、G1 の雛を攻撃株でチャレンジし、D78 まで臨床的に評価した。生存鶏は安楽死し、MD の兆候 (主要臓器又は神経叢の肥大又は腫瘍病変) について剖検を行った。

その他の全ての群 (G2 及び G3) は少なくとも接種後 120 日 (D120 又は D121) まで臨床的に観察した。この期間中、死亡が記録された。試験終了時に、生存鶏は全て安楽死し、MD の兆候について剖検した。上腕及び坐骨神経叢及び生殖腺を組織学的検査のためにサンプリングした。MD に一致する肉眼病変を全てのサンプルについて検索した。

D28 に、G2 の各群及び G3 の 5 羽から抗 IBDV 抗体検査用に血液をサンプリングした。D120 に、G2 の各群 10 羽及び G3 の全羽から採血を行った：各個体の血清について抗 HVT 抗体を免疫蛍光法によって検査した。

試験の妥当性は、欧州薬局方の MD 生ワクチン安全性試験の要件 (1997:0589) に合致し、使用した鶏の感受性等がバリデートされた。

ワクチン株 (継代レベル MSV+2 及び MSV+5) 接種群において試験終了時の生存数は非攻撃対照と同等であり、MD 肉眼病変を示したものはなかった。これらの群は全ての鶏において抗 HVT 及び抗 IBDV 抗体の存在が確認された。これらの群において MD に一致する組織学的傷害は観察されず、追加的な安全性の基準と考えることができる。

G2d の全ての鶏は抗 HVT 及び抗 IBDV 抗体を示し、これはウイルスがテイクされたことを示しており、また、MD の肉眼病変を示した鶏はいなかった。非継代ウイルスと比較して継代ウイルスの病原性の増加を示唆するものはなかった。継代ウイルス (増幅又は増幅なし) を接種された群の組織学的結果は、非継代ウイルスを接種された群と統計学的に有意差はなかった。

組換えワクチンの MD に関する安全性及びウイルス株の病原性復帰がないことは欧州薬局方モノグラフ MD 生ワクチン (1997:0589) の要件に関して証明された。

別紙 26

98.294 : 鶏で連続継代後の組換え領域のシーケンスによる vHVT013-69 の *in vivo* 遺伝子学的安定性

要旨

vHVT013-69 遺伝子組換えウイルスの組換え領域（フランキング領域及び MCMV-IE / IBDV VP2 発現カセット）のシーケンスの安定性を鶏での *in vivo* 継代後に試験した。

鶏で 9 代 *in vivo* 継代した vHVT013-69 遺伝子組換えウイルスから抽出した DNA について、ドナープラスミドの組換え領域のシーケンスと比較するためにシーケンスを行った。この試験によりさらに vHVT013-69 の組換え領域（MCMV-IE/IBDV VP2 発現カセット及び周囲の領域（フランキングアーム））の安定性を分子生物学レベルで評価した。

鶏で 9 代継代及び鶏胚線維芽細胞で 3 代継代増幅後に得られた組換え領域のシーケンスは、組換えウイルスを作成するために使用したドナープラスミド pEL098 のシーケンスと完全に同一であることが示された。

この試験により、鶏における複数の連続継代後の遺伝子組換えウイルス vHVT013-69 の高い安定性が証明された。

別紙 27

99.0548.R : vHVT013-69 遺伝子組換え生ワクチン

HVT ウイルスの存在下でのコンベンショナル七面鳥における伝播

目的

本試験の目的は、HVT ウイルスに感染した七面鳥の存在下で、組換えワクチンの伝播性を評価することであった。

供試動物

1 日齢コンベンショナル七面鳥 (D0 及び D28 の 2 群を設定した)

群設定

D0 における群設定

- G0a : 血清対照 (D0 にサンプル採取)
- G1 : 組換えワクチンを D0 に接種
- G2 : HVT を D0 に接種 (G1 と同居)
- G3 : 非接種 (D0 に G1 及び G2 と同居)
- G4 : 組換えワクチンを D0 に接種
- G5 : 非接種 (D0 に G4 と同居)
- G11 : 無処置 (ウイルス血症陰性対照)

D28 における群設定

- G0b : 血清対照 (D28 に 1 日齢雛よりサンプル採取)
- G6 : HVT を 1 日齢雛に D28 に接種 (D28 に G2 と同居)
- G7 : 非接種 (1 日齢雛を G2 及び G6 と D28 に同居)
- G8 : HVT を 1 日齢雛に D28 に接種
- G9 : 非接種 (1 日齢雛を D28 に G8 と同居)
- G10 : 非接種 (1 日齢雛を D28 に G3 及び G5 に同居)
- G12 : 無処置 (ウイルス血症陰性対照)

初代 (D0~D28)

D0 に 65 羽の 1 日齢雛を設定した群に割り付け、G1 及び G4 に組換えワクチン、G2 に HVT を接種した。G1、G2 及び G3 を部屋 A に、G4 及び G5 を部屋 B に入れて 28 日間同居させた。D28 に G1 及び G4 を安楽殺し、他の群は 2 代目継代に使用した。

2 代目継代 (D28~D57)

D28 に初代と同様の操作を 65 羽の 1 日齢雛に対して実施した。G6 及び G7 は G2 と同じ部屋 A で、G10 は G3 及び G5 と部屋 B で、G8 及び G9 は部屋 C で 29 日間飼育した。

資料2. 審査データの概要

D57にG2、G3及びG5は安楽殺し、G6、G7、G8、G9及びG10はD77までそれぞれの部屋で維持した。

HVT及び組換えワクチンの実際の継代は、各継代開始時及び終了時に、HVT蛍光抗体(IF)法及びIBD中和試験を用い、血清学的に評価した。G11及びG12についてはHVT感染に関して鳥の状態を確認するため、初代及び2代目継代終了時にウイルス分離を実施した。

結果及び考察

G11及びG12からのウイルス分離の結果、試験に使用した七面鳥はHVTに自然感染しなかったことが示された。

非感染七面鳥におけるHVT単独の伝播

G8(HVT)及びG9(非接種)の評価によってHVTの七面鳥間の伝播性を確認できる。G8との同居29日後に、G9の9羽中7羽に抗体が認められた。また、同居49日後にはG9の全羽にHVT抗体が確認された。これにより、HVT接種七面鳥から非接種七面鳥への伝播が示された。

非接種七面鳥における組換えワクチン単独の伝播

G4(組換えワクチン)及びG5(非接種)の評価によってワクチンの七面鳥間の伝播性を確認できる。D28にG5にIBDVの抗体陽転は確認されなかったが、9羽中5羽半数以上にHVT抗体が確認された。D57には9羽中2羽数羽にIBDV抗体が確認された。これはG4から組換えワクチンが伝播したことによると考えられた。

HVT感染七面鳥における組換えワクチンの継代

初代

G2(HVT)をG1(組換えワクチン)にD0からD28まで同居させた。D28にG2の1羽にわずかなIBDV抗体が認められ、D57に3羽に同様に認められた。この抗体価レベルは特異的ではないが、HVT接種七面鳥に組換えワクチンが感染したことを示すものかもしれない。

2代目継代

2代目継代としてG2をG7(非接種)とG6(HVT)に同居させた。G6の全羽は試験終了時(D77)までIBDV抗体陰性であった。G7の全羽はD57にHVTに対するIF反応を強く示したが、それらはIBDに対しては試験終了時まで陰性であった。

以上の結果から、組換えワクチンのHVT感染七面鳥における伝播はあまり起こりえず、起こったとしてもHVT感染七面鳥において2代目には継代されないことが示された。

HVT 存在下での非感染七面鳥における組換えワクチンの伝播

初代

G1 (組換えワクチン)、G2 (HVT) 及び G3 (非接種) の D0 から D28 の同居によって HVT 存在下での非感染七面鳥の組換えワクチンの伝播性を評価できる。G3 の 10 羽中 2 羽にわずかな IBD 抗体が認められ、3 羽に HVT 抗体が認められた。D57 には G3 に IBD 抗体陽性個体は認められなかったが、HVT 抗体は強い反応が認められた。これらのことから、HVT は G2 から G3 に広がり、組換えワクチンは HVT 存在下で G3 に広がらないことが示された。

2 代目継代

HVT 存在下での組換えワクチンの潜在的な継代を、G3、G5 及び G10 間の同居によって評価した。これらの群は何れも直接ウイルスの接種を受けていない。D57 に G10 の 10 羽中 1 羽に非特異的な IBD 抗体が認められ、6 羽に HVT 抗体が認められた。この結果より、HVT ウイルスは G10 にのみ広がったことを示している。HVT 存在下で非接種七面鳥に組換えワクチンの伝播がなかったことが確認された。

HVT は本試験条件で接種七面鳥から非接種七面鳥へ伝播したことが血清学的に証明された。組換えワクチンも七面鳥で伝播可能であることが確認されたが、HVT 感染七面鳥の存在下では組換えワクチンは七面鳥間の伝播が起こらないことが示された。

資料2. 審査データの概要

別紙 28

七面鳥ヘルペスウイルス成分を含有する既承認ワクチン

表 日本で承認されている七面鳥ヘルペスウイルス成分を含有するワクチン

製品名称	製造販売業者	製造用株	承認年月日
2価MD生ワクチン(H+C)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV CVI 988 株	平成 20 年 7 月 16 日
2価MD生ワクチン (HVT+SB-1)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	昭和 63 年 3 月 1 日
MD (HVT) 1000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株	平成 25 年 5 月 14 日
MD (HVT) 2000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株	平成 25 年 5 月 14 日
MD (HVT+SB-1) 1000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	平成 25 年 5 月 14 日
MD (HVT+SB-1) 2000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	平成 25 年 5 月 14 日
MD生ワクチン (2H)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株	平成 3 年 11 月 28 日
MD生ワクチン (HVT)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC 126 株	平成 17 年 3 月 9 日
アビテクト HVT	一般財団法人化学及血清療法研究所	HVT YT-7 株	平成 24 年 7 月 4 日
イノボ鶏痘/2価MD生ワクチン(H+S)	ワクチノーバ株式会社	APV TL 株 HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	平成 20 年 10 月 28 日
2価MD生ワクチン (H+S)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC 126 株 MDV SB-1 株	平成 17 年 3 月 15 日
2価MD生ワクチン (H+S) 2000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	平成 14 年 7 月 18 日
日生研マレック乾燥ワクチン	日生研株式会社	HVT H2 株	平成 15 年 4 月 2 日
日生研マレックワクチン Q	日生研株式会社	HVT H2 株	昭和 47 年 6 月 21 日
バックスオン MD (HVT+CVI) -N	ワクチノーバ株式会社	HVT FC 126 株 MDV CVI988-N 株	平成 26 年 11 月 21 日
ポールバック MD HVT+SB-1	共立製薬株式会社	HVT FC-126・KS 株 MDV SB-1・KS 株	平成 21 年 6 月 15 日
ポールバック MD HVT	共立製薬株式会社	HVT FC-126・KS 株	平成 20 年 9 月 9 日
マレック病生ワクチン	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株	昭和 48 年 10 月 2 日
マレック病生ワクチン “化血研”	一般財団法人化学及血清療法研究所	HVT YT-7 株	平成 1 年 4 月 21 日

別紙 29

01.0440 : ワクチンウイルス及び HVT の環境における拡散性 SPF 鶏接種後の粉塵及び敷き藁に関するウイルスの追跡

要旨

本試験の目的は、組換えワクチン及び HVT 接種 SPF 鶏の粉塵及び敷き藁におけるウイルス感染価を評価することであった。

1 日齢 SPF 鶏 15 羽ずつを G1、G2 及び G3 に D0 に設定し、下記のように皮下接種した。

- G1 : 組換えワクチン
- G2 : HVT FC126
- G3 : 溶解用液

各群を別々のアイソレーターに設置し、飼育後、各アイソレーターから粉塵及び敷き藁から採材し、鶏胚培養細胞に接種してウイルスを検出した。

本試験条件で、分離ウイルスは認められなかった。仮に接種鶏から排泄された組換えワクチンウイルス又は HVT が粉塵及び敷き藁に存在していても、排泄レベルは分離可能なレベルより低い。

別紙 30

01.0486 : 七面鳥における安全性 ワクチンウイルス及び HVT の敷き藁を通じた鶏から七面鳥への伝播
七面鳥間の伝播

要旨

本試験の目的は、(i) 組換えワクチン及び HVT の敷き藁を通じた鶏から七面鳥への伝播、(ii) 七面鳥におけるワクチンウイルスの複製及び持続能、及び HVT のそれとの比較であった。

本試験は 3 つのフェイズから成る。

- 高用量の組換えワクチン (G1) 又は HVT (G2) を皮下接種、又は非接種 (G3) の SPF 鶏の 3 群を 21 日間飼育する。
- それらの鶏の敷き藁の上で SPF 七面鳥 4 群を 20 日間飼育した後、敷き藁を除き、更に 22 日間飼育する。(G1 の敷き藁、G2 の敷き藁、G1+G2 の敷き藁、G3 の敷き藁)
- 敷き藁を除いたとき、これらの潜在的に感染した七面鳥を非接種の七面鳥と同居させ 22 日間飼育し、それらの同居七面鳥を更に 21 日間飼育する。

これらの群の IBD 中和抗体、HVT 蛍光抗体について血清学的に観察した。採血までの期間は完全に血清転換するのに十分な長さであった。

結果

- 接種群 (G1、G2) は血清陽転し、最初のウイルスがテイクされたことが証明された。
- 対照群 (G3、G7、G11) において血清転換はなく、操作の適正が証明された。
- HVT の伝播 : G5 及び G9 の全ての七面鳥は HVT 陽性に血清転換し、敷き藁からウイルスが伝播したことが証明された。
- 組換えワクチンの伝播 : G4 において、IBDV 陽性になった七面鳥は非常に低い抗体価の数羽のみであり、それらの抗体価レベルはある採取日と他の日に一貫性がなかった。G8 において、採取日当たり多くて 1 羽 (各日によって異なる鳥) に IBD 抗体が認められた。同様の血清学的パターンが HVT についても認められた。IBD と HVT 抗体応答の間に一貫性は認められなかった。七面鳥の初代継代後にウイルス回収ができなかったこと、低い抗体応答と一貫性のなさは、組換えワクチンが鶏から七面鳥に敷き藁を通じて伝播しなかったことを示唆している。
- HVT+組換えワクチンの伝播 : 結果は組換えワクチン伝播について認められたのと同様であった。HVT ウイルスが G2-G5-G9 で認められたのと同様に伝播しなかった理由は明らかではなかった ; おそらく、G1 と G2 の敷き藁を混合したことによって「ウイルスが希釈された」ことと関連する (ウイルス濃度が全体的に低くなり、最小感染量に近かった)。しかしながら、データによって、鶏の敷き藁を通じた七面鳥に対する組換えワクチンの感染性が低いことが確認された。

本試験条件下で、

- HVT は鶏から七面鳥に敷き藁を通じて伝播した。
- 組換えワクチンの鶏から七面鳥への敷き藁を通じた伝播は認められなかった。

別紙 31

01.0856 : 七面鳥及び鶏におけるワクチン感染性の比較 用量依存性

要旨

本試験は、用法でない自然感染経路、及び皮下接種の場合の、七面鳥及び鶏における組換えワクチンの感染性を比較するために設定された。

組換えワクチンは、伝染性ファブリキウス囊病ウイルス (IBDV) の VP2 遺伝子を発現する HVT ベクターから構成される遺伝子組換え生ワクチンである。

D0 に、8 日齢コンベンショナル七面鳥及び 6 日齢 SPF 鶏に低用量から高用量の組換えワクチン接種を行った後、血清を採取し、抗 IBDV 抗体及び抗 HVT 抗体の有無を確認した。

本試験条件において、以下の結果が示された。

- 鶏及び七面鳥の両方とも、組換えワクチン低用量の皮下接種によって感染した。
- 七面鳥は用法外の接種経路で高用量のワクチン接種によって部分的に感染したが、鶏は用法外の経路ではワクチンに感染しなかった。

この結果から、ワクチンは鶏に伝播せず、七面鳥には伝播する可能性があることが示唆された。また、七面鳥は鶏と比較して用法外の投与により感染しやすいが、部分的な陽転を誘導するにはかなりの高用量が必要である。

別紙 32

98.355 : マレック病血清型 1 及び 2 との組換えリスク

要旨

本試験の目的は、組換えワクチンと異なるマレック病 (MD) ウイルス血清型 1 型及び 2 型との組換えリスクを臨床的に評価することであった。様々な病原性の 3 種の MD ウイルスを使用した : GA22 株 (低病原性、血清型 1)、SB1 株 (血清型 2) 及び Rispens 株 (ワクチンとして一般的に使用される非病原性株、血清型 1)。D0 に SPF 初生鶏を含む 8 群が設定され、以下のように接種された。

- G1 組換えワクチン及び GA22 株接種群
- G2 組換えワクチン及び SB1 株接種群
- G3 組換えワクチン接種群
- G4 GA22 株接種群
- G5 SB1 株接種群
- G6 組換えワクチン及び Rispens 株接種群
- G7 Rispens 株接種群
- G8 非接種群

D0 に、群分け前に同一鶏群の 10 羽から血清学的対照としてサンプルを採取した。D120 に、各群 10 羽から血液サンプルを採取した。血清はマレック病について検査した。

全ての鶏の体重を D7、D21 及び D120 に測定した。

120 日間毎日臨床観察を実施した。異常及び死亡鶏を記録し、瀕死の鶏は安楽殺した。死亡又は安楽殺した鶏はマレック病の徴候がないか剖検し、組織学的検査のためにサンプル採取した。

D120 に、全ての生存鶏を安楽殺し、マレック病の徴候がないか剖検した。同日、G1 及び G4 から 10 羽を無作為に抽出し、組織学的検査に供した。

血清学的結果より、G1 から G7 における接種が適正であることがわかった。対照 (G8) は MD に対して血清陰性のままであった。

D120 の体重を統計学的に比較した。この分析で、ウイルス単独接種との比較において、組換えワクチンとどのタイプの MD ウイルスを組み合わせても体重に有害な影響がないことが示された。

G1 及び G4 で斃死率が高かったが、これらの群は低病原性 GA22 株を接種されていた。これらの群の斃死鶏のほとんどは、肉眼的及び組織学的にマレック病に一致する病変が認められた。試験終了時、MD 肉眼病変を示した鶏がこれら 2 群に 4 羽ずつ認められた。D120 の組織サンプルの多くは MD の徴候を示した。G1 及び G4 の累積斃死曲線はまた、GA 株と組換えワクチンの両方を接種することによって MD が遅延することを示している。

資料2. 審査データの概要

他の群ではほとんど斃死はなかった。これらの群の斃死鶏で肉眼的に MD 病変を示した例はなく、D120 に生存していた鶏で最終剖検時に MD 肉眼病変を示した例はなかった。SB1 株を接種した群において、2羽が試験期間中に死亡したが（1羽は G2、もう1羽は G5）、神経に軽度なリンパ球浸潤が認められた。この種の病変は MD ワクチン接種後に通常観察され、SB1 株は非病原性であることが知られている。つまり、MD はおそらくこれら2羽の死亡の原因ではない。

組換えワクチンと組み合わせても MD ウイルス株の病原性に変化はなかった。本試験条件において、組換えワクチンとマレック病ウイルス血清型 1 及び 2 の同時接種で、潜在的な組換えによる病原性の増加の傾向はなかった。

別紙 33

00.0897 : 野外試験 発育鶏卵内接種 — ガンボロ病に対する力価及び免疫持続

要旨

本試験は、組換えワクチンを野外で発育鶏卵内接種した際の力価を試験することを目的とした。力価は血清学的に評価し、動物舎に移送した鶏について超強毒 IBD ウイルス (vvIBDV) で攻撃試験を行った。

各鶏群について 2 群を設定した :

G1 : 組換えワクチンを卵内接種したブロイラー

G2 : 溶解用液を卵内接種した対照ブロイラー

18 日齢以上の発育鶏卵に孵化場で接種機を用いて卵内接種を実施した。孵化日を本試験の Day 0 (D0) とした。最初の 2 鶏群からの約 300 羽 (150 羽/群) の雛を、その後の攻撃のため D0 に施設に移動した。他の雛はその農場の標準的な手順に従って飼育した。野外で採血された G2 の鶏は、標準的なワクチネーションプログラムに従って、一般的に野外で使用されている IBDV 中等毒株に対する生ワクチンを 2 週齢時までに接種された。

3 農場の鶏は畜産の観点からモニターした斃死率、平均体重及び各群の出荷時廃棄率。

全飼育期間中、中和試験によって IBD の血清学的追跡を実施した。

F1 及び F2 鶏群について、動物飼育施設において vvIBDV 株を用いて 2 回の攻撃試験を実施した。: 早期の攻撃として 3 週齢 (D21 又は D22)、後期の攻撃として 6 週齢 (D40 又は D42)。各群各日において少なくとも 20 羽が攻撃された。10 羽の非攻撃陰性対照を各攻撃について設定した。各攻撃時、死亡、若しくは攻撃後 10 日にファブリキウス嚢に重度な組織学的病変があった場合、その鶏は陽性と考えられた。

畜産データは組換えワクチン接種群と対照群で同等であり、出荷時の経済学的結果についても問題なかった。

血清学的結果により、ブロイラーは孵化時に高い IBD 移行抗体価があることが確認された。抗体価レベルは、移行抗体の減少により、その後およそ 3 週齢まで減少した。施設で維持された非ワクチン接種群の G2 の鶏の IBD 抗体価は、その後 6 週齢時の最後の血液採取時まで減少し続けた。組換えワクチン接種群 (野外+施設内) において、D20 から D25 に、IBD 抗体価の上昇又は安定が観察された。

標準的な IBD ワクチン接種を受けた G2 のワクチンテイクは最初の 2 鶏群において満足いくものではないようであったが、F3 において明らかな陽転が認められた。標準的なワクチン接種を受けた G2 の抗体価レベルは組換えワクチン接種を受けた鶏で観察されたよりも低かった。

後期の攻撃後 (D40/42)、G1 及び G2 の防御数の間に大きな有意差が認められた

2 鶏群の攻撃後に得られた結果は同等であり、収集したデータの再現性及び信頼性があることを示している。

資料2. 審査データの概要

野外条件下における18日齢コンベンショナル発育鶏卵に対する組換えワクチン接種後の力価及び免疫持続がvvIBDV攻撃に対して証明された。免疫は、少なくともブロイラーの経済寿命の間維持することが示された。

工業スケールで実施した試験において、対照は農場で非接種として維持できなかった。すなわち、IBDワクチンとして野外で広く使用されているIBDワクチンを対象として接種した。動物舎内で飼育した対照は非接種で維持し、それらによって攻撃に使用する感受性動物として供試でき、また、移行抗体減衰を血清学的にモニター可能になった。

2回の攻撃試験の実施は欧州薬局方におけるIBD生ワクチンの力価試験モデル（モノグラフ1997:0587）に基づいて実施された。

各群はワクチンテイクを確認するため、血清学的に検査された。

農場で試験期間を通じてモニターした項目（体重、死亡率、出荷維持の畜産学的データ）によって、本試験が通常の野外モデルに準じていることを確認できる。それらはまた、野外環境におけるワクチンの安全性を示すことができる。

畜産学的データ

組換えワクチン接種群（G1）及び参照IBDワクチン接種群（G2）の畜産学的データは鶏群及び群間で同等であった。

全ての鶏群の死亡率は中程度で、全体的に群間で同等であり、鶏群ごとについても同等であった。出荷時の経済学的結果は、全ての鶏群で問題なく、その鶏種で予想されるものに合致していた。

別紙 34

RW-14-06-003:独立プレートにおけるマレックウイルスベクターと導入遺伝子ウイルス含有量における相違の検討

要旨

本試験は、七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）ウイルスベクターと導入遺伝子の含有量（発現）の相違を確認するために実施された。

独立したプレートを測定し、平均値を数理生物学（BioMath）解析することによってベクターと導入遺伝子の発現の相違の評価が行われた。正確な試験結果を得るため、試験は同じ品質管理認定技師によって測定され、十分なサンプル数についてを繰り返し測定した平均値から解析を実施した。測定時におけるアンプルセットは、測定ごとに別のアンプルが使用され、それぞれのアンプル測定結果は5回測定されたものの平均値（PFU/Dose）として報告された。BioMath解析は、Log変換された測定結果であるHVTベクター含有量の平均値（PFU/Dose）から導入遺伝子の発現の平均値を割った値で実施され、統計解析が実施された。

HVTベクターと導入遺伝子の発現の分散の階層分解解析の結果、製品コードとそれぞれのロットに有意差が無く、またベクターと導入遺伝子の発現に関しても相違が無い事を示している。また、小分け製品における本試験で用いられたすべてのアンプルにおいて、ベクターと導入遺伝子の発現の同一性が確認された。

別紙 35

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の VP2 タンパクのアレルゲンとしての可能性

伝染性ファブリキウス嚢病 (IBDV) の VP2 タンパクのシーケンスは GeneBank より vHVT013-69 株供与核酸の構成要素である Faragher 52/70 株の VP2, VP4, VP3 の Fusion タンパクを使用した (Accession no. HG974565)。

このシーケンスをアレルゲン検索サイトである AllergenOnline (University of Nebraska-Lincoln: <http://www.allergenonline.com/index.shtml>) でアレルゲンとなるシーケンスが存在するかどうかを検索した。1897 のアレルギー物質のライブラリーシーケンスからアレルゲンシーケンスと考えられる 443551 アミノ酸残基とホモロジー検索を実施し、全シーケンスアライメントで 50%を超える交差反応性で一致するアレルゲンシーケンスの探索、及び各タンパク質の 80 アミノ酸セグメントのスライディングウィンドウ検索 (80 アミノ酸ごとの相同性検索) を使用して 35%よりもホモロジーの大きいものを探索した (CODEX Alimentarius guidelines, 2003 に従う)。結果、IBDV VP2 タンパクシーケンスと、登録されているアレルゲンシーケンスに相同性のあるシーケンスは存在しなかった。

資料3. 緊急措置計画書

資料3. 緊急措置計画書

緊急措置計画書

平成27年11月27日

メリアル・ジャパン株式会社

代表取締役 永田 正

東京都新宿区西新宿三丁目20番2号

第一種使用規程の承認を申請している伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス (vHVT013-69 株) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置を執ることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

実施体制 (実施体制図を別添として添付)

実施責任者 (メリアル・ジャパン株式会社 執行役員 研究開発部部长)

実施責任者はメリアルのフランス、アメリカ及び中国の製造所において製造され日本に輸入される本伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス (vHVT013-69 株) (以下、「本組換え微生物」という) が生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、各国の本組換え微生物製造法人 (以下、「製造法人」という) に連絡するとともに、日本国内業務安全委員会に報告し、同業務安全委員会は緊急措置を執るための社内体制及び連絡窓口を通じて、実施責任者とともに緊急措置を講じる。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 各国の製造法人から日本向けに輸出される本組換え微生物の製造状況、輸出業者等の情報提供を依頼するとともに、本組換え微生物の治験実施機関等、又は販売先、国内販売代理店等に関する情報を把握し、その情報を整理して記録する。
- (2) さらに、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、(1)により把握している治験実施機関、販売先、販売実績のある販売代理店等に対して情報提供を依頼し、本組換え微生物を保有している者及び使用状況の把握に努め、得られた情報を整理し記録する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を執る必要があること及び緊急措置の具体的な内容を周知するための方法

資料3. 緊急措置計画書

各国の製造法人へ本組換え微生物が日本において生物多様性影響を生じるおそれがあると認められたことを連絡する。また、各国の製造法人のホームページにおいても、本件についてのお知らせを掲載するとともに、問い合わせ専用窓口を設置することを協議する。

日本国内においては、プレスリリースを行う等、メディアを通じて広く使用者に周知するとともに、2で把握した関係者に対して、電話や文書などにより連絡を取る。また、当社のホームページにおいても、本件についてのお知らせを掲載するとともに、問い合わせ専用窓口を設置する。ただし、日本国内の治験において生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合はこの限りではない。

4 遺伝子組換え生ワクチンを不活化する又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

- (1) 各国の製造法人に対し、日本向けの輸出の自粛及び日本向けの輸出業者等への販売を自粛してもらうよう要請する。
- (2) 日本国内において治験に使用されている場合は、本組換え微生物が自然環境に拡散しないように必要な拡散防止措置（本組換え微生物によって汚染されたおそれのある施設、糞や敷料等の資材や死体等の消毒を含む）を直ちに執るよう治験実施機関に要請するとともに、本組換え微生物を含む使用残の被験薬を治験実施機関より当社へ速やかに回収し、高圧滅菌等の不活化措置を実施する。
- (3) 日本国内において販売流通されている場合には、本組換え微生物の販売中止及び回収を行い、回収した本組換え微生物は密閉容器に保管の上、高圧滅菌等の不活化措置を実施する。
- (4) 日本国内において本組換え微生物がワクチンとして使用されている場合は、獣医関係者に対して、密閉容器に保管の上、高圧滅菌等の不活化措置を要請する。
- (5) 日本国内において本組換え微生物を接種されている場合には、自然環境に本組換え微生物が拡散しないよう、当該動物及び感染している可能性の高い動物（例えば同居動物）の隔離又は安楽死、飼養環境の消毒等の適切な措置を執るよう関係者に要請する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への速やかな連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省農産安全管理課（TEL：03-6744-2102）及び環境省野生生物課（TEL：03-5521-8282）に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

6 その他必要な事項

—

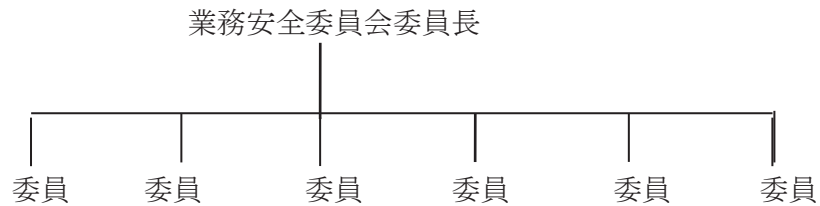
別添

実施体制

・ 業務安全委員会

- 委員長 【個人情報につき非開示】 メリアル・ジャパン株式会社
 委員 【個人情報につき非開示】 日本全薬工業株式会社
 委員 【個人情報につき非開示】 日本全薬工業株式会社
 委員 【個人情報につき非開示】 日本全薬工業株式会社
 委員 【個人情報につき非開示】 日本全薬工業株式会社
 委員 【個人情報につき非開示】 メリアル・ジャパン株式会社
 委員（連絡窓口） 【個人情報につき非開示】 メリアル・ジャパン株式会社

・ 実施体制図



・ 委員名簿

	氏名	職名
委員長	【個人情報につき非開示】	メリアル・ジャパン株式会社 代表取締役
委員	【個人情報につき非開示】	日本全薬工業株式会社 中央研究所
委員	【個人情報につき非開示】	日本全薬工業株式会社 中央研究所 生物化学研究チーム
委員	【個人情報につき非開示】	日本全薬工業株式会社 中央研究所 生物化学研究チーム
委員	【個人情報につき非開示】	日本全薬工業株式会社 開発部 開発薬事第2チーム
委員	【個人情報につき非開示】	メリアル・ジャパン株式会社 研究開発部
委員 (連絡窓口)	【個人情報につき非開示】	メリアル・ジャパン株式会社 研究開発部

参考文献

- 1 Calnek B.W. and Witter R.L. (ed.) 1997
Marek's disease, in *Disease of poultry*, 10th ed. 375-377, Iowa State University Press,
Ames, Iowa
- 2 Schat K.A.
Marek's disease: a model for protection against herpesvirus-induced tumors.
Cancer Surveys vol.6, 1987, 1-37
- 3 浅川光彦
渡り鳥の感染症—マレック病感染マガン発見を機に考える
日本獣医師会雑誌 2002 : 55 巻 : 264-265
- 4 Witter R.L. et al.
Studies on the *in vivo* replication of turkey herpesvirus
Journal of the National Cancer Institute, 49, 1121-1129, 1972
- 5 Witter R.L. and Solomon J.J.
Epidemiology of a Herpesvirus of Turkeys: Possible sources and spread of infection in
turkey flocks.
Infection and Immunity, 356-361, 1971
- 6 ウイルス／日本ウイルス学会編
獣疫ウイルス研究の歩み
日本ウイルス学会 25 周年記念、ウイルス 28 (記念号)、93-117、1978
- 7 加藤四郎
マレック病ウイルス及び七面鳥ヘルペスウイルスについて
鶏病研究会報 1972 : 8 巻 2 号 : 44-60
- 8 Shamblin C.E., Greene N., Arumugaswami V., Dienglewicz R.L., Parcels M.S.
Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38-
and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with
MDVs of high virulence.
Vet. Microbiol. 102, 147-167, 2004
- 9 Purchase H.G., Burmester B.R. and Cunningham C.H.
Responses of cell cultures from various avian species to Marek's disease virus and
herpes of turkeys.
American Journal of Vet. Research, 32-11, 1811-1823, 1971
- 10 Hlozanek I. and Sovona V.
Lack of pathogenicity of Marek's disease herpesvirus and herpesvirus of turkey for
mammalian hosts and mammalian cell cultures.
Folia Biol., 20, 51-58, 1974

資料4. その他

- 11 Meumelans G, Halen P. and Schyns P.
Susceptibility of mammalian and avian cell cultures to infection with cell-free turkey herpesvirus.
J.Comp.Path., 83, 605-508, 1973
- 12 Witter R.L. and Solomon J.J.
Experimental infection of turkeys and chickens with a herpesvirus of turkeys (HVT)
Avian Diseases, 16, 34-44, 1972
- 13 Purchase H.G., Okazaki W, and Burmester B.R.
Lon-term field trials with the herpesvirus of turkeys vaccine against Marek's disease.
Avian Dis. 16, 57-71, 1972
- 14 Calnek B.W. and Witter R.L.
Marek's disease, in *Disease of poultry*, 1997, 10th ed., 390-392
- 15 Biggs P.M.
The history and biology of Marek's disease virus.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 255, 1-24, 2001
- 16 Kawamura H., King D.J.Jr., and Anderson D.P.
A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys.
Avian Dis. 13, 853-863, 1969
- 17 Schat KA, Venugopal Nair
Marek's disease.
Editor-In-Chief, Saif. Y.M. Diseases of Poultry. 12th ed., Blackwell Publishing, 2008:
452-514.
- 18 Prasad L.B.M.
Turkey herpesvirus and Marek's disease virus. A comparative appraisal.
Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis., 2, 335-358, 1979
- 19 野田雅博、松田俊二、小林正夫
消毒剤の殺ウイルス効果に関する検討 —殺ウイルス効果に及ぼす血清蛋白の影響—
感染症学雑誌 74, 664-669, 2000
- 20 Cho B.R. and Kenzy S.G.
Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens.
Poultry Sci., 54, 109-115, 1975
- 21 Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Rock D.L., and Kutish G.F.
The genome of turkey herpesvirus
J. Virol. 75, 971-978, 2001
- 22 Gennart I., Coupeau D., Pejakovic S., Laurent S., Rasschaert D., and Muylkens B.
Marek's disease: Genetic regulation of gallid herpesvirus 2 infection and latency
Vet J. 205, 339-348, 2015

資料4. その他

- 23 Baigent S.J., Smith L.P., Nair V.K., and Currie R.J.W.
Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection
Vet Immunol Immunopathol. 112, 78-86, 2006
- 24 Gimeno I.M.
Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow?
Vaccine, 26S, C31-41, 2008
- 25 Thiry E., Meurens F., Muylkens B., McVoy M., Gogev S., Thiry J., Vanderplasschen A., Epstein A., Keil G., and Schynts F.
Recombination in alphaherpesviruses
Rev Med Virol. 15, 89-102, 2005
- 26 Meurens F., Schynts F., Keil G.M., Muylkens B., Vanderplasschen A., Gallego P., and Thiry E.
Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1
J. Virol, 78, 3872-3879, 2004
- 27 Lee L.F., Cui F.X., Gimeno I., Lupiani B., and Reddy S.M.
Characterization of a very virulent Marek's disease virus mutant expressing the pp38 protein from the serotype1 vaccine strain CVI988/Rispens
Virus Genes, 31, 73-80, 2005
- 28 Muylkens B., Farnir F., Meurens F., Schynts F., Vanderplasschen A., Georges M., and Thiry E.
Coinfection with two closely related alphaherpesviruses results in a highly diversified recombination mosaic displaying negative genetic interference.
J. Virol, 83, 3127-3137, 2009
- 29 Jarosinski K.W.
Dual infection and superinfection inhibition of epithelial skin cells by two alphaherpesviruses co-occur in the natural host
PLoS One, 7, 1-15, 2012
- 30 Sloutskin A., Yee M.B., Kinchington P.R., and Goldstein R.S.
Caricella-zoster virus and herpes simplex virus 1 can infect and replicate in the same neurons whether co- or superinfected
J Virol. 88, 5079-5086, 2014
- 31 Hughes A.L. and Rivailler P.
Phylogeny and recombination history of gallid herpesvirus 2 (Marek's disease virus) genomes
Virus Res. 130, 28-33, 2007
- 32 近藤一博
18. HHV-6・HHV-7 — β -ヘルペスウイルスの共通点と相違点—

資料4. その他

ウイルス 52, 117-122, 2002

- 33 Rispens BH, van Vloten H, Mastebroek N, Maas JL, Schat KA
Control of Marek's disease in the Netherlands. II. Field trials on vaccination with an
avirulent strain (CVI 988) of Marek's disease virus.
Avian Dis. Apr:16(1):126-38. 1972