

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
蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイ
ルス HVT-IBD #9 株(IBDV VP2, *Meleagrid
herpesvirus 1*)

令和6年8月1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	9
資料 2. 審査データの概要	12
資料 3. 緊急措置計画書	89
資料 4. その他	92

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.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

ゾエティス・ジャパン株式会社より、令和6年2月7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 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9 株 (IBDV VP2, *Meleagrid herpesvirus 1*) (以下「本遺伝子組換えウイルス」という。）」について、生物多様性影響評価を行った。

本遺伝子組換えウイルスの宿主は、1969年に健康な七面鳥から分離された非病原性の七面鳥ヘルペスウイルス(以下「HVT」という。)であり、マレック病ウイルス(以下「MDV」という。)との血清学的交差性を示し、MDV血清型3と分類されている。病原性MDVは、MDV血清型1であり、鶏の神経疾患や悪性リンパ腫を主徴とするマレック病を引き起こすが、これに対し、HVTは非病原性であり、MDV血清型1の防御抗体を誘導する働きを持ち、マレック病に対する生ワクチン株として使用されている。

本遺伝子組換えウイルスは宿主と同様の特性を持ち、鶏に感染しても病徴を示さず、鶏から鶏への伝達性は認められない。

また、本遺伝子組換えウイルスには、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(以下「IBDV」という。)の防御抗原を発現するIBDV VP2 遺伝子が挿入されているため、若齢鶏に伝染性の高い疾病で高率な致死や免疫抑制を起こすIBDVを防御する中和抗体が誘導され、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、本遺伝子組換えウイルスの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。これらを踏まえ、本申請に基づく使用について、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
令和6年 2月 7日	第一種使用規程承認申請受理	
令和6年 3月 5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※
令和6年 3月 22日	学識経験者からの意見提出	
令和6年 8月 1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

本遺伝子組換えウイルスの宿主は、HVT FC126 株であり、マレック病ワクチン製造用株として米国農務省¹に承認されており、マスターシードウイルスから鶏胚線維芽細胞（CEF）細胞で4代継代されたものである。マレック病は、腫瘍原性を有するMDV血清型1に属する強毒株の感染に起因しており、鶏の翼麻痺、脚麻痺、斜頸といった神経疾患や悪性リンパ腫を主徴とする伝染性の高い疾病である。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白血球により全身に移動し、マレック病感染に対する抵抗性が付与される。なお、HVTは、非病原性で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り、また、感染性を持つ細胞遊離型ウイルス粒子を感染鳥類の羽包上皮細胞でのみ産生する。その後、落屑（フケ）として環境中に排泄されるが、鶏間の水平伝達は限定的であることが感染試験で確認されている。さらに、HVTは鶏の羽包上皮細胞以外の全ての組織では細胞随伴性を示し、細胞外に放出されると感染性を失い、水平伝達が限定的であることから環境中での感染拡大の可能性は考え難い。

また、本遺伝子組換えウイルスにはIBDV VP2 遺伝子が挿入されている。IBDVは約6.1 kbの二本鎖RNAウイルスであり、若齢鶏に伝染性が高く、鶏の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、免疫抑制を起こす。その結果、鶏に羽毛逆立て、下痢、沈鬱といった症状がみられ、致死率は50%以上であることが知られている。IBDV VP2 遺伝子が発現するVP2蛋白質はウイルス粒子の表面に露出して中和抗体¹を誘導し、蛋白質自体には毒性や病原性はない。

IBDV VP2 遺伝子発現カセットは、宿主HVT FC126株ゲノムの遺伝子間の非翻訳領域に宿主核酸の欠損なしに1コピー挿入されている。HVTゲノムの中で特に保存性の高い領域に位置しており、隣接領域には調節因子の存在は知られていない。

本遺伝子組換えウイルスの宿主及び用いられた遺伝子組換え技術を考慮し、本遺伝子組換えウイルス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）有害物質の産生性及び（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は、七面鳥を自然宿主とする非病原性

¹ 病原体や感染性粒子が細胞に対して及ぼす生物学的な影響を中和して、細胞を防御する抗体である。

ウイルスで、七面鳥間で水平伝達するが、鶏に対しても感染性があり、自然環境に遍在する。HVT は、MDV との血清学的交差性を持つことから、1970 年代の初頭からマレック病を予防するワクチンとして市販され、宿主である HVT FC126 株は、マレック病の HVT 生ワクチンとして最も一般的な株である。

挿入されている IBDV VP2 遺伝子は、ウイルス粒子の表面に露出し中和抗体を誘導するウイルス蛋白質を発現するが、蛋白質自体には毒性や病原性がない。IBDV VP2 遺伝子は、宿主 HVT FC126 株ゲノムの非翻訳領域に宿主核酸の欠損なしに挿入されている。挿入サイトは、HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域に位置し、隣接領域には調節因子の存在は知られていない。

これらのことから、本遺伝子組換えウイルスでは、宿主ウイルス HVT FC126 株の ORF²に改変はなく、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性並びに他の微生物に対する病原性及び有害物質を産生する可能性は極めて低い。

また、本遺伝子組換えウイルスを培養細胞で 8 代継代培養して得たウイルスと継代前のウイルスとの性状に差違は認められず、本遺伝子組換えウイルスの供与核酸の安定性が確認されている。

また、本遺伝子組換えウイルスを 18 日齢 SPF 発育鶏卵に卵内接種し、孵化後 7 又は 8 日目に脾臓及び血液中の白血球からのウイルスの回収を 5 代継代したところ、当該鶏の臨床症状及び剖検に、マレック病又は伝染性ファブリキウス嚢病に起因すると考えられる病変は認められず、病原性が復帰しなかったことが示された。

さらに、各継代の回収したウイルスを CEF³ 細胞で培養し、DNA 抽出して PCR⁴ により確認したところ、遺伝子欠損のバンドは認められず、IBDV VP2 遺伝子の安定性が確認され、回収したウイルスのウイルス量測定時に実施した二重免疫染色により、全てのプラークに VP2 蛋白質が発現していることが確認されたことから、当該鶏の継代においても移入された核酸の複製物の発現が安定していることが示された。

本遺伝子組換えウイルスを発育鶏卵に接種した試験では、孵化した鶏から限定的なウイルスの排泄および同居する鶏への水平伝達が認められたが、その程度は HVT での既知の程度と同等であることが確認された。

本遺伝子組換えウイルスと宿主ウイルスの培養細胞における増殖能について比較するため、培養細胞のウイルス量を経時的に測定したところ、宿主ウイルスへの IBDV VP2 遺伝子の挿入によってウイルスの増殖能が高まっていないことが確認された。

これらのことから、本遺伝子組換えウイルスの供与核酸の安定性が確認され、宿

² オープンリーディングフレーム（英: open reading frame、ORF）：翻訳される能力を持つリーディングフレームの部分のことである。これらが翻訳され蛋白質が作られる。

³ 発育鶏卵,ニワトリ胎児 線維芽細胞(英: chicken embryonic fibroblasts 、CEF)

⁴ ポリメラーゼ連鎖反応（英: polymerase chain reaction、PCR）：DNA サンプルの特定領域を増幅させる反応。少量の DNA サンプルからその詳細を解析するに十分な量にまで増幅することが目的である。

主 HVT FC126 株と比較して本遺伝子組換えウイルスの増殖能の上昇はみられなかった。ウイルスの排泄及び同居する鶏への水平伝達の程度は HVT と同等であることが示され、内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性は考えられないことから、競合により他の微生物を減少させる性質については、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）

HVT FC126 株は鶏、七面鳥及びウズラに感染することが確認されている。本遺伝子組換えウイルスは IBDV VP2 蛋白質を発現すること以外は、宿主 HVT FC126 株の特性を受け継いでおり、本遺伝子組換えウイルスを、鶏、七面鳥、ウズラ及びマウスに接種した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、異常は認められなかった。

一方、MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生動物にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている。HVT は MDV との血清学的交差性を持つことから MDV が感染する動物には HVT も感染する可能性は否定できないが、宿主 HVT FC126 株の感染性が確認されていない動物種に感染し、感受性の高い鶏と同等以上に本遺伝子組換えウイルスが排泄されるとは考えられず、感染源になるとは考え難い。また、野生動物への感染性に関しては、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た。

本遺伝子組換えウイルスは HVT と同様に、羽包上皮細胞以外は細胞随伴性で、細胞外に放出されると感染性を失う。本遺伝子組換えウイルスを発育鶏卵に接種した試験では、孵化した鶏からは限定的なウイルスの排泄及び同居する鶏への水平伝達が認められたが、その程度は、HVT と同等であることが示された。

また、IBDV VP2 蛋白質は IBDV の主要なウイルス構造蛋白質で、中和抗体応答誘導を担い、IBDV VP2 蛋白質自体には毒性や病原性がない。

本遺伝子組換えウイルスを当該鶏から回収し、回収したウイルスを鶏で5代継代したが、臨床症状及び剖検において、マレック病又は伝染性ファブリキウス嚢病に関連する所見を示す鶏は認められず、病原性が復帰しなかったことが示された。このことから、本遺伝子組換えウイルスが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 については、有害物質の産生性は知られていない。本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルスである HVT FC126 株も有害物質の産生性は認められておらず、使用実績においてアレルゲンに関する問題は報告されていないことから有害物質を産生する可能性はないと考えられた。

本遺伝子組換えウイルスは、IBDV VP2 蛋白質を発現する以外、基本的な生物学的性状は宿主ウイルスと同一である。IBDV VP2 蛋白質はIBDVの主要なウイルス構造蛋白質で、VP2は露出部に親水性の可変領域を持つ。VP2の露出部はアミノ酸206-350の間の蛋白質に認められ、感染した動物の中和抗体応答誘導を担う。IBDV VP2 蛋白質自体に毒性や病原性がないこと、アレルゲンデータベース（国立医薬品食品衛生研究所）においてIBDV VP2のアミノ酸配列と有意な相同性を示す配列は認められなかったことから、本遺伝子組換えウイルスに有害物質の産生性はないと考えられた。

また、本遺伝子組換えウイルスを、鶏、七面鳥、ウズラ及びマウスに接種した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、異常は認められなかった。鶏に接種した試験では、ウイルスの排泄及び同居感染性は宿主であるHVT FC126株と同程度であった。

IBDV VP2 遺伝子発現カセットは、宿主 HVT FC126 株ゲノムの遺伝子間の非翻訳領域に宿主核酸の欠損なしに挿入され、HVTゲノムの中で特に保存性の高い領域に位置し、隣接領域には調節因子の存在は知られていないため、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性及び有害物質を産生する可能性は極めて低い。

以上により、IBDV の病原性に係る有害物質、アレルギー性物質等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) 核酸を水平伝達する性質（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達する性質）

HVT（MDV 血清型 3）と他の血清型（MDV 血清型 1 又は MDV 血清型 2）のウイルス間の組換えの可能性が考えられるが、実際には実験室内において MDV 血清型 1 と MDV 血清型 2 の組換えが 1 件報告されているのみで、それ以外は、長年にわたる各種血清型マレック病ワクチンの野外使用実績においてそのような事象は報

告されていない。HVT と MDV 間の組換えの可能性が低い要因としては、ヌクレオチドレベルで両者間の配列の相同性が低いこと及び両者間で重感染阻害⁵が生じることが考えられる。仮に、野外 HVT と本遺伝子組換えウイルス間で組換えが起こった場合に想定されるウイルスは、本遺伝子組換えウイルスと同様の IBDV VP2 をコードする遺伝子を含むウイルスであり、病原性付与の可能性はない。本遺伝子組換えウイルスは、DNA ウイルスであり核内で複製されるが、IBDV は RNA ウイルスであり細胞質内で複製されるため、野外 IBDV と本遺伝子組換えウイルスの IBDV VP2 コード遺伝子配列の交換の可能性は極めて低いと考えられる。

海外を含め、本遺伝子組換えウイルスと類似の HVT をベクターとする HVT-IBD ワクチンは、従来のマレック病ワクチンとともに既に野外で使用されているが、現在までに組換えが生じたとする報告はされていない。

MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、宿主ウイルス HVT FC126 株の感染性が確認されていない動物種において、宿主ウイルス HVT FC126 株に感受性の高い鶏と同等以上にウイルスが排泄されるとは考えられず、感染源になり得ないと考えられる。

HVT ゲノムは、鶏染色体テロメア⁷反復配列の相同遺伝子を有しており、感染した細胞の染色体に組み込まれることがある。しかし、テロメア領域は遺伝子発現に関する機能を有さず、HVT ゲノムの一部あるいは全部がこの領域へ組み込まれたとしても、HVT の遺伝子調節因子が鶏ゲノム上の主要な遺伝子と隣接していないため、鶏ゲノム遺伝子の発現を変化させる可能性は低い。

以上により、核酸を水平伝達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、核酸を水平伝達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。

(5)その他の性質

上記の他に、本遺伝子組換えウイルスに関して生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる性質はないと判断した。

(6)結論

他の微生物を減少させる性質については、宿主 HVT FC126 株及び IBDV VP2 蛋白質自体には毒性や病原性がなく、IBDV VP2 遺伝子挿入サイトは、HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域であり、隣接領域には調節因子の存在は知られておらず、本遺伝子組換えウイルスの供与核酸の安定性が確認されたことから、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性、並びに他の微生物に対する病原性及びアレルゲンとなる物質を含め有害物質を産生す

⁵ 既に感染した細胞への同種のウイルスの再感染を防ぐこと。

る可能性は極めて低いと判断された。

また、宿主 HVT FC126 株と比較して本遺伝子組換えウイルスの増殖能の上昇はみられず、鶏における体内動態、排泄および同居感染性は宿主ウイルスと同程度であった。マレック病又は伝染性ファブリキウス嚢病に関連する病原性復帰は確認されず、内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性は考えられないことから、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、本遺伝子組換えウイルスは IBDV VP2 蛋白質を発現すること以外は、宿主 HVT FC126 株の特性を受け継いでおり、野生動物への感染性に関しては、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た。本遺伝子組換えウイルスを接種した鶏からのウイルスの排泄及び同居する鶏への水平伝達は、HVT での既知の程度と同等であることが示され、本遺伝子組換えウイルスのマレック病又は伝染性ファブリキウス嚢病への病原性復帰は見られず、本遺伝子組換えウイルスが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ず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、宿主ウイルスである HVT FC126 株も有害物質の産生性は認められておらず、本遺伝子組換えウイルスは、IBDV VP2 蛋白質を発現する以外、基本的な生物学的性状は宿主ウイルスと同一であり、IBDV VP2 蛋白質自体に毒性や病原性がない。また、遺伝子発現カセットは、HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域に位置しており、隣接領域には調節因子の存在は知られていないため遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性及び有害物質を産生する可能性は極めて低いこと、アミノ酸配列にアレルギーと相同な配列がないことから、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、ヌクレオチドレベルで HVT と MDV 間の配列の相同性が低いこと、HVT と MDV 間で重感染阻害が生じ、同種ウイルスとの相同組換えの可能性についてのリスクは極めて低いこと、本遺伝子組換えウイルスは DNA ウイルスであり核内で複製されるため、RNA ウイルスである野外 IBDV と本遺伝子組換えウイルスの遺伝子配列の交換の可能性は極めて低いこと、宿主ウイルス HVT FC126 株に感受性の高い鶏と同等以上にウイルスが排泄されるとは考えられず、感染源になり得ないこと、類似の HVT-IBD ワクチンは、従来のマレック病ワクチンとともに既に野外で使用されているが、現在までに組換えが生じたとする報告はされていないこ

と及び感染した鶏のゲノムから獲得したと考えられているテロメア領域は鶏ゲノム遺伝子の発現を変化させる可能性は低いことから、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、当該遺伝子組換えウイルス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。

＜審查參考資料＞

資料1. 第一種使用規程承認申請書

第一種使用規程承認申請書

令和 6 年 2 月 7 日

農林水産大臣 坂本 哲志 殿
環 境 大 臣 伊藤 信太郎 殿

氏名 ズエティス・ジャパン株式会社
 代表取締役社長 加藤 克利
住所 東京都渋谷区代々木三丁目 22 番 7 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（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）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

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9 株 (IBDV VP2, <i>Meleagrid herpesvirus 1</i>)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	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（以下「薬機法」という。）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 薬機法第 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さの廃棄 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
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

資料2. 審査データの概要

資料2. 審査データの概要

(審査に使用した評価のデータ)

I 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

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

① 分類学上の位置・学名（属及び種）及び株名

科：ヘルペスウイルス科 (*Herpesviridae*)

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

属：マルディウイルス属 (*Mardivirus*)

種：七面鳥ヘルペスウイルス 1 型 (*Meleagrid herpesvirus 1: MeHV-1*) 又は七面鳥ヘルペスウイルス (英名：Herpesvirus of Turkey (以下「HVT」という。))

株名：FC126 株 (以下「宿主ウイルス HVT FC126 株」という。))

② 公的な微生物保存機関から分与されたものである場合には、当該機関の名称及び株番号並びに受領年月日

該当せず。

③ ②でない場合には、同定の根拠となる事項

宿主ウイルス HVT FC126 株は、ソルベイ・アニマルヘルス社が ATCC (American Type Culture Collection) から入手した HVT を起源とし、鶏胚線維芽細胞 (Chicken Embryo Fibroblast、以下「CEF 細胞」という。) で継代してマレック病 (Marek's Disease、以下「MD」という。) 生ワクチン製造用 HVT マスターシードウイルスとした。この株は 1987 年に米国農務省 (U.S. Department of Agriculture、以下「USDA」という。) により MD ワクチン製造用株として承認されている (承認番号 MS1611786)。この MD 生ワクチン製造用マスターシードウイルス HVT FC126 株を CEF 細胞で 4 代継代したものを、今回の申請対象である遺伝子組換えウイルス「伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9」(以下「本遺伝子組換えウイルス」という。) の宿主ウイルス HVT FC126 株とした。

④ 宿主を誘導するために用いた遺伝的改変の内容

該当せず。

⑤ 宿主として野生株を用いる場合には、自然環境における分布状況

該当せず。

資料2. 審査データの概要

(2) 使用等の歴史及び現状

HVTは1969年にKawamuraら[26]、Witterら[45]によって健康な七面鳥から分離された、七面鳥を自然宿主とするウイルスである。HVTはマレック病ウイルス（以下「MDV」という。）と抗原的に関連性があり、MDVと血清学的交差性を示すことから、MDV血清型3に分類される。HVTはウイルス種としては七面鳥ヘルペスウイルス1型（*Meleagrid herpesvirus 1*; MeHV1）であるが、MDV血清型1及び2はそれぞれ鶏ヘルペスウイルス2型（*Gallid herpesvirus 2*; GaHV-2）及び鶏ヘルペスウイルス3型（*Gallid herpesvirus 3*; GaHV-3）である[41, 50]。MDV血清型1は腫瘍原性、MDV血清型2は非腫瘍原性ウイルスで、HVTは非病原性ウイルスである[41, 50]。HVTは自然宿主の七面鳥間で水平感染するが、鶏間での自然感染は限定的である[15]。以降、MDVの血清型を明記しない場合はMD発病の原因となるMDV血清型1（腫瘍原性株）のことを指し、MDV血清型3はHVTという。

MDは、MDV感染に起因する鶏のリンパ系細胞の腫瘍性増殖を主徴とする疾病であり、末梢神経や様々な臓器/組織における単核細胞浸潤を特徴とする[14, 41, 49, 50]。MDVは病原型によって、弱毒型（mild; mMDV）、強毒型（virulent; vMDV）、超強毒型（very virulent; vvMDV）及び超強毒+型（very virulent plus; vv+MDV）の4種類に分類され、MDV血清型1のワクチン株は弱毒化MDV（attenuated; atMDV）といわれる[14, 41, 50]。MDV血清型2は病原型分類に含まれない[50]。MDVはリンパ球に指向性を有し、全身へウイルスが移行する急性期を過ぎるとT細胞に持続感染する。末梢神経に病変が形成されると、翼麻痺、脚麻痺、斜頸といった神経症状が認められる。内臓に腫瘍が形成される急性型では死亡率が10～50%になる。ウイルスは羽包上皮で増殖し、感染性ウイルスが羽やフケとともに体外に排泄され、これを鶏が吸入して感染することによって鶏群での感染が維持される。HVTについてもMDVと同様に羽包上皮から排泄された感染性ウイルスの吸引により感染し、ウイルスはリンパ球指向性を示すが潜伏感染を起こさず病原性はない。

HVTは鶏、七面鳥及びウズラに感染することが確認されている。一方、MDVはウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等、多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている[41]。HVTはMDVと近縁で血清学的交差性を示し、MDの発症防御効果が認められることから、MDを予防するワクチンとして実用化されている。日本においてもHVTは1972年からMDワクチンとして長く使用されている[50]。

HVTウイルス株の中でFC126株はMD生ワクチンとして最も一般的な株であり、1970年代の初頭から現在まで安全に使用されている[41, 50]。本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルスHVT FC126株は、MD生ワクチン製造用株としてUSDAに承認されているHVT FC126株マスターシードウイルスMS1611786をCEF細胞で4代継代したものである。このUSDA承認マスターシードウイルスは、我が国の既承認マレック病生ワクチン「イノボプレックスMD CVI+HVT」（ゾエティス・ジャパン株式会社）のHVTマスターシードウイルスである。HVT FC126株は長年にわたる生ワクチンとしての使用実績に加え、海外において強毒伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（以下「IBDV」という。）由来VP2蛋白質を発現するベクターワクチンとしてコマーシャル鶏に安全に使用されている[30]。本遺伝子組換えウイルスも、宿主ウイルスHVT FC126株のゲノム中にIBDV VP2蛋白質発現遺伝子を挿入したものである。

伝染性ファブリキウス囊病（以下「IBD」という。）は若齢鶏において伝染性の高い疾病で、IBDVはリンパ組織、特にファブリキウス囊（B細胞）を標的とする。IBDVに感染すると斃死率が上昇するほか、雛に感染した場合には定型的な発病がなくても長期間にわたって免疫抑制の状態になり、日和見感染やワクチンの効果（抗体産生）を抑制することから養鶏経営に経済的損失を与えている。IBDVは主に鶏に病原性を

資料2. 審査データの概要

示す血清型 1 と、七面鳥由来で鶏には病原性の低い血清型 2 に分けられる。血清型 1 は病原性及び抗原性の違いにより従来型 (classical virulent; cvIBDV)、強毒型 (very virulent; vvIBDV) 及び抗原変異型 (antigenic variant; avIBDV) に大別される[3, 18]。いわゆる従来型 IBDV は 1962 年に米国デラウェア州のガンボロで初めて報告され、1970 年代までに米国内や欧州に広がった。そのため IBD は「ガンボロ病」と呼称されることがある。その後、1986 年にオランダで 90%の致死率を示す強毒型 IBDV が発生し、現在では強毒型 IBDV は日本を含めほぼ世界中に広がっている[17]。

IBDV は血清型 1 及び 2 ともに鶏、七面鳥、アヒル、ホロホロチョウ及びダチョウに自然感染するが、血清型 1 は鶏にのみ病原性を示し、血清型 2 は鶏に対し病原性がない[3, 19]。vvIBDV と遺伝子的に関連性のあるウイルスが東アフリカの外見上健康なハト及びホロホロチョウから RT-PCR によって検出されたとの報告がある[19]。また、キジ、ヤマウズラ、ウズラ、ホロホロチョウで vvIBDV 実験感染を行ったところ、ウズラにのみ感染が認められたとの報告がある[19]一方で、鶏由来ウイルスの実験感染ではウズラ[19]やホロホロチョウ[38]において感染がみられなかったとの報告もあり、鶏由来 IBDV は野生鳥類への感染性が低いことが推察される。

国内では、HVT を宿主ウイルスとする遺伝子組換えウイルスとして「ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F 株」及び「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」が第一種使用規程の承認を受けている。また、後者は本遺伝子組換えウイルスと同様に HVT FC126 株を宿主ウイルスとしており「バキシテック® HVT+IBD」(ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社) の商品名で鶏の IBD 及び MD の予防を効能効果とする鶏用生ワクチンとして 2020 年 11 月 25 日付けで動物用医薬品製造販売承認を得て 2021 年 10 月から国内販売されている。

(3) 生理学的及び生態学(生物学)的特性

イ) 基本的特性

① HVT の基本的性状

HVT は直鎖状の 2 本鎖 DNA をゲノムとして有し、ゲノムは 162 個のカプソメアから構成される直径約 100 nm の正 20 面体カプシドに内包されている[2]。カプシドはエンベロープに覆われ、エンベロープとカプシドの間にはテグメントと呼ばれるヘルペスウイルスに特徴的な蛋白質層が介在する(図 1)。

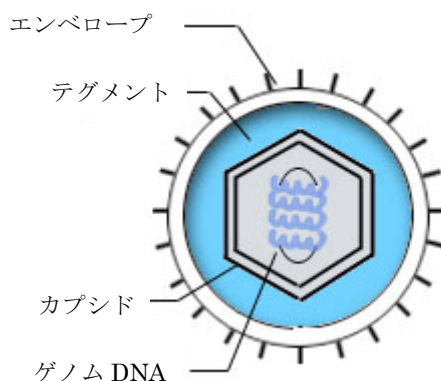


図 1. ヘルペスウイルスの基本構造

資料2. 審査データの概要

② 遺伝的性状

各血清型 MDV ゲノムサイズは約 160~180 kb の線状 2 本鎖 DNA で、ゲノム構造は全ての血清型で共通している (図 2)。ウイルスは感染鳥ゲノムから独立しているときには環状構造 (エピソーム) をとることが多い。各血清型 MDV ゲノムは末端反復配列 (Terminal Repeats Long, TR_L および Terminal Repeats Short, TR_S) および内部反復配列 (Internal Repeats Long, IR_L および Internal Repeats Short, IR_S) に隣接する Unique Long (U_L) および Unique Short (U_S) と呼ばれる固有の長短の領域から構成される (図 2) [35]。

MDV 血清型 1 の腫瘍原性株は *Meq* 腫瘍原性遺伝子や vTR のような特徴的な遺伝子が、反復配列、特に TR_L 領域に存在する (表 1) [35]。これらの遺伝子は、活性化 T リンパ球を標的に形質転換するといった病原性 MDV 独特の生物学的特徴に大きく関与している。

しかし、非病原性ウイルスである HVT にはこれら病原性に関与する遺伝子配列は確認されていない (表 1)。

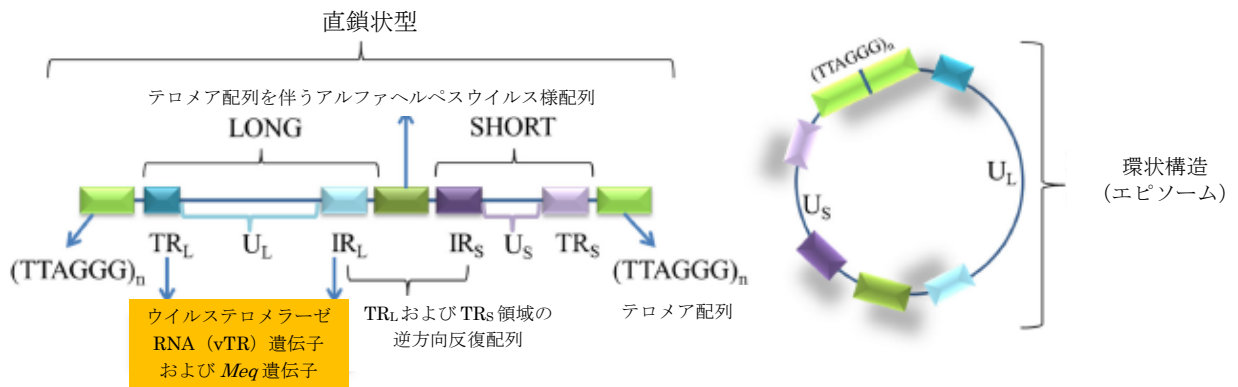


図 2. 細胞遊離型 (非統合型) 直鎖状及び環状 MDV ゲノムの模式図

MDV ゲノムは約 180 kb の 2 本鎖 DNA ウィルスで、ユニークロング (U_L) およびユニークショート (U_S) 領域を有し、各領域は末端反復配列およびその逆方向反復配列 (TR および IR)、テロメア配列 ((TTAGGG)_n)、およびテロメア配列を含むアルファヘルペスウイルス様配列でそれぞれ区分される。環状構造ではテロメア配列の両ブロックが融合する。

緑: テロメア配列

濃青/青: U_L ブロック配列 (TR_L/IR_L)

濃紫/紫: U_S ブロック配列 (IR_S/TR_S)

[出典 35]

表 1. マレック病ウイルス血清型およびその特徴

MDV 血清型	株	毒性	ゲノムサイズ (kb)	ORFs	vTR 遺伝子	<i>Meq</i> 腫瘍原性遺伝子	テロメア反復配列
1	GA	v (強毒)	174	103	+	+	+
1	Md5	vv (超強毒)	177.8	103	+	+	+
1	Md11	vv (超強毒)	178	99	+	+	+
1	CVI988/ Rispens	弱毒	178.3	102	+	+ / NF	+
2	SB-1	非腫瘍原性	165.9	75	-	-	+
3	HVT	非病原性	160	75	-	-	+

ORFs: オープンリーディングフレーム (翻訳領域)

vTR: ウィルステロメラーゼ RNA

+: あり

-: なし

+ / NF: 存在するが機能なし

[出典 35]

資料2. 審査データの概要

③ 生化学的・生物学的性状

HVT は健康な七面鳥から分離された非病原性ウイルスであり[41, 46]、MDV 血清型 1 のような腫瘍原性や病原性はない。

④ 感受性動物、感染経路、感染様式等

HVT は七面鳥を自然宿主とする非病原性ウイルスで、七面鳥間で水平伝播するが、鶏に対しても感染性があり、自然環境に遍在している。

HVT は細胞随伴性ウイルスで、鳥類の白血球に指向性を示す。図 3-1 及び 3-2 に HVT を含む弱毒 MDV 及び強毒 MDV 感染様式の模式図を示す。MDV 各血清型の感染は、感染鶏から排泄された落屑中の感染性ウイルス粒子を吸引することにより、呼吸器を介して開始される。リンパ系細胞に侵入・増殖後、他の臓器・組織へ運ばれる。HVT は脾臓、ファブリキウス囊、胸腺、及び羽髄等で確認される[7, 13, 21]。由来の異なる 7 株の HVT について組織指向性を確認したところ、体内分布パターンに差は認められなかった[48]。MDV は全ての血清型で羽包上皮以外の全ての組織において細胞随伴性で[41,49]、直接接触する細胞のみに感染を広げ、細胞が破壊される（細胞外に放出される）とウイルスは感染性を失う[49]。感染性を有する細胞遊離型ウイルス粒子（ビリオン）は羽包上皮細胞のみで産生され、細胞から放出される際にエンベロープを伴う [13, 41, 46]。これらの上皮細胞は落屑（フケ）として環境中に排泄されるが[22]、鶏間の水平伝播は限定的である[16, 44]（図 3-1）。HVT は一般的に多種の組織から調製したリンパ球から分離可能である。リンパ球は HVT の主要な感染細胞であり、他の組織へ分布する役割を担う。

強毒 MDV には潜伏感染や病原性に関連する 4 つの感染ステージ（初期細胞溶解期、潜伏感染期、後期細胞溶解期、および形質転換期）がある（図 3-2）[14, 35, 50]。最初の感染臓器である肺へウイルスが到達すると、そこでウイルスが増殖するとともにマクロファージに取り込まれ、ファブリキウス囊、胸腺、脾臓などのリンパ系組織に移行し、初期のウイルス増殖が行われる。これら組織において MDV はリンパ球と接触し、初期の細胞溶解性感染が起こる。この間に増殖するウイルスは細胞随伴性で、細胞間を伝播して感染が広がる。リンパ組織での感染は、感染後約 7~8 日で潜伏感染（非複製性）に移行し、末梢リンパ球でウイルスが検出される。感染した末梢血リンパ球は各上皮系組織にウイルスを伝播し、そこで再活性化されたウイルスは後期の細胞溶解性感染を起こす。また、潜伏感染したリンパ球の内、主に CD4+ヘルパーT 細胞は形質転換能を有し 14~21 日後には内臓にリンパ腫を形成させる。後期細胞溶解期には、血液中の循環末梢血リンパ球を経て羽包上皮（FFE）に感染し、FFE で再活性化した MDV は細胞遊離型ウイルス粒子を産生、環境中に排泄し、感染源となる（図 3-2）。

資料2. 審査データの概要

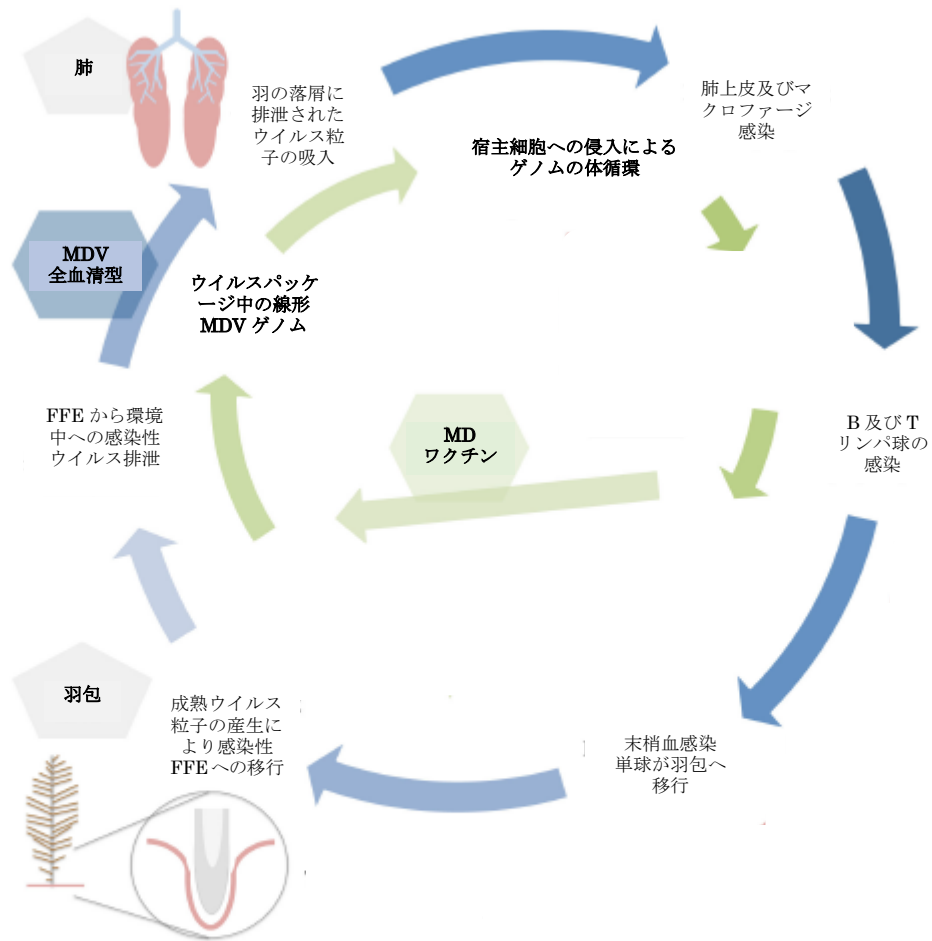


図 3-1. HVT を含む弱毒 MDV の感染様式模式図

青色矢印：鳥体内（感染細胞及び組織）および外部（環境中の落屑）のウイルスの動き

緑色矢印：感染鳥ゲノムの状態

FFE：羽包上皮

六角形：MDV 血清型の経路（青色：MDV 全血清型、緑色：MD ワクチン）

[出典 35]

資料2. 審査データの概要

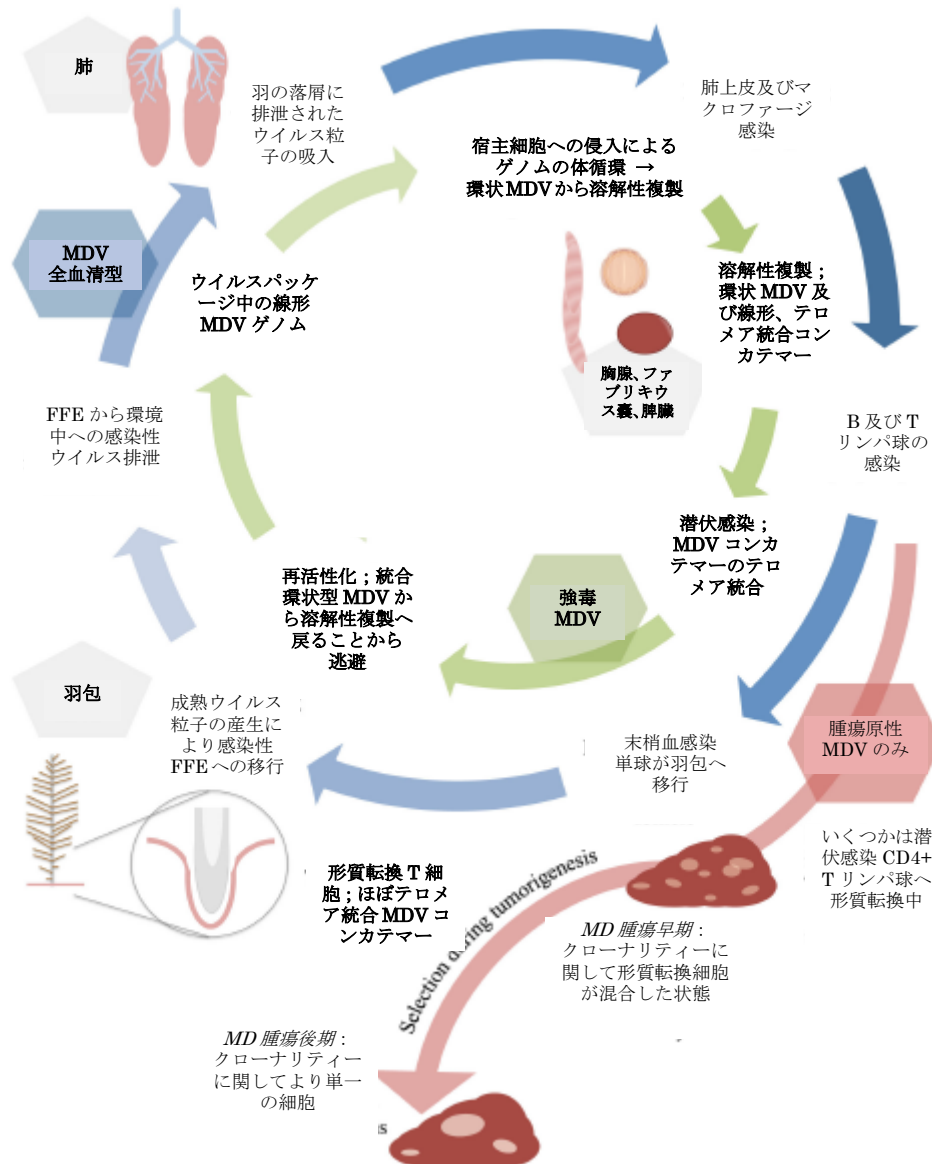


図 3-2. 強毒 MDV の感染様式模式図

青色矢印：鳥体内（感染細胞及び組織）および外部（環境中の落屑）のウイルスの動き
 緑色矢印：感染鳥ゲノムの状態
 赤色矢印：形質転換及び腫瘍原性
 FFE：羽包上皮
 五角形（灰色）：疾病に関与する臓器
 六角形：MDV 血清型の経路（青色：MDV 全血清型、緑色：強毒 MDV、赤色：腫瘍原性 MDV）
 感染ステージ（細胞溶解期、潜伏感染期、再活性化、形質転換期）と鳥ゲノムの状態が重なるものは太字で示した

[出典 35]

ロ) 生息又は生育（増殖）可能な環境の条件

HVT は七面鳥を自然宿主とするウイルスで、鶏やウズラに感染することが確認されている。一方、MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等、多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている[41]。一般的に多種の組織から調製したリンパ球から分離可能である。リンパ球は HVT の主要な感染細胞であり、他の組織へ分布する役割を担う。ウイルスは羽包上皮以外の全ての組織において細胞随伴性である[41]。

HVT は二本鎖 DNA ウイルスであり核内で複製する。HVT を接種した鶏又は七面鳥の白血球から回収することが可能である[13, 22]。HVT は CEF 細胞での増殖性が最もよく、その他、七面鳥胚線維芽細胞

資料2. 審査データの概要

(TEF 細胞)、鶏腎細胞 (CK 細胞)、DF-1 株化細胞等の鳥類の細胞で、通常の培養条件 (37°C、5% CO₂) で増殖する。HVT は MDV 血清型 1 及び血清型 2 と比較して培養細胞で増殖するスピードが速く、大きな CPE を形成するが、腫瘍原性ウイルスである MDV 血清型 1 では培養細胞での増殖が遅く、形成される CPE は小さい[41]。MDV のウイルス分離は CK 細胞又はアヒル胚線維芽細胞 (DEF 細胞) を用いる方が CEF 細胞より効率が良い。CEF 細胞への順化は弱毒化の傾向を示す。MDV 血清型 1 は培養細胞で 30~70 代継代して順化させることにより弱毒化される。弱毒化された株は *in vitro* での増殖性が高まるが、*in vivo* におけるウイルス量は減少する[41]。

哺乳類の細胞は一般的に HVT に対する感染性が低いものの[43]、ハムスター腎細胞 (BHK21 細胞) やアフリカミドリザル腎細胞 (Vero 細胞) 等、一部の哺乳類細胞には感染可能であることが報告されている[8, 23]。ただし、CPE の確認には当該細胞への順化が必要であり、HVT の哺乳類細胞における増殖性はほとんどない又は鳥類細胞と比較して非常に低いと考えられる。

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

該当せず

② 生存能力又は増殖能力

宿主ウイルス HVT FC126 株の繁殖又は増殖の様式は上記 HVT 一般の性状と同一であり、二本鎖 DNA ウイルスで、核内で複製する。CEF 細胞、TEF 細胞、CK 細胞、DF-1 株化細胞等の鳥類の細胞で、通常の培養条件 (37°C、5% CO₂) で増殖することが知られている。また、鶏又は七面鳥に接種して白血球から回収することも可能である[13, 22]。哺乳類の細胞は一般的に HVT に対する感染性が低いものの[41]、BHK21 細胞や Vero 細胞等、一部の哺乳類細胞には感染可能であることが報告されている[8, 22]。ただし、CPE の確認には当該細胞への順化が必要であり、HVT の哺乳類細胞における増殖性はほとんどない又は鳥類細胞と比較して非常に低いと考えられる。HVT は細胞-細胞間で接触伝播する細胞随伴性 (cell-associated) ウイルスで、通常細胞外に放出されない[41, 49, 50]。感染性を有する細胞遊離型 (cell-free) ウイルス粒子は羽包上皮細胞のみで産生され、細胞から放出される際にエンベロープが形成される (図 4)。それ以外の細胞遊離型ウイルスは環境中で感染性がない[49]。

③ 生殖の様式及び交雑性

HVT 及び MDV の複製サイクルを図 4 に示す[33]。ウイルスはエンベロープと細胞膜との融合により細胞内に侵入する。ウイルスは少なくともテグメント部まで融合後、ヌクレオカプシドと分離する。テグメント蛋白質は細胞をウイルス複製に都合が良い環境に調節すると考えられている。侵入したヌクレオカプシドは微小管を経て核膜孔に移行する。ウイルスゲノム DNA は核内に放出され、ウイルスゲノムの転写がカスケード方式で行われる (最初期、初期および後期ウイルス mRNA の形成)。後者は主にウイルス粒子の構造蛋白質をコードする。カプシド蛋白質は細胞質内で翻訳され、核内に輸送され、カプシドアッセムブリが行われる。直鎖状多量体 (コンカテマー) ウイルス DNA の複製後、カプシド形成期にユニット長に開裂しカプシド前駆体が形成される。カプシドは核膜出芽時に一次エンベロープが形成され、細胞質内でテグメント物質を得た後、ゴルジネットワークの小胞に出芽時に二

資料2. 審査データの概要

次エンベロープ化される。小胞内ウイルスが細胞膜と融合することにより、成熟ウイルス粒子は細胞外に放出される。

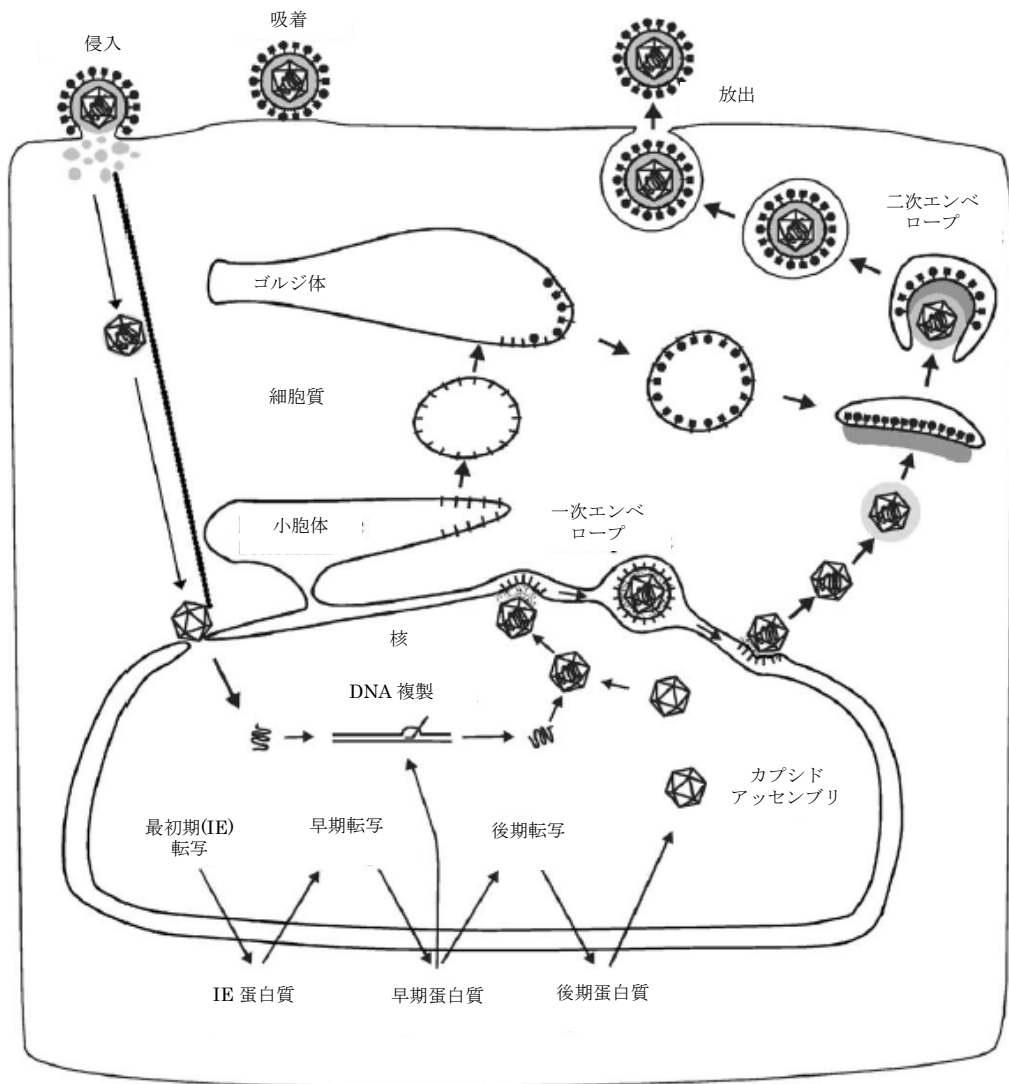


図4. HVT 及び MDV の複製サイクル

ウイルスの細胞内侵入、テグメントの分離、カプシドの核膜孔への輸送、細胞核へのウイルス DNA の放出、カスケード式転写、DNA の複製、カプシドのアッセムブリ、DNA パッケージ、核膜から放出（一次エンベロープ）、二次エンベロープ形成、細胞外への放出

[出典 33]

ホ) 病原性

HVT は健康な七面鳥に由来する非病原性ウイルスであり[41, 46]、腫瘍原性や病原性がない。

MD は、MDV 血清型 1 感染に起因する、鶏の脚麻痺といった神経疾患や悪性リンパ腫を主徴とする伝染性の高い疾病である。MDV 血清型 1 に属するウイルス株のみが腫瘍原性を有する。

対象動物に感染したウイルスは、ウイルスの複製を伴う細胞溶解性感染の後、ウイルスが増殖されない潜伏感染に移行する。MDV 血清型 1 では比較的早期に潜伏感染に移行し、潜伏感染した CD4+ヘルパー T 細胞のみが T 細胞性リンパ腫に形質転換する。MDV 血清型 1 ゲノムは *meq* に代表される腫瘍原性・形質転換に関わる遺伝子配列を有する[14, 41, 50]。

資料2. 審査データの概要

HVT ゲノムは腫瘍原性・形質転換に係る遺伝子配列を持たないことから形質転換が誘導されない[2, 42]。

HVT ゲノムは鶏染色体テロメア反復配列のホモログを有しているが[4, 27, 35]、それらは進化の過程で感染鶏のゲノムから獲得したと考えられている[27, 35]。テロメア領域は遺伝子発現に関して直接的な機能を有さないことから、HVT が鶏ゲノム染色体末端のテロメア領域へ組込まれたとしても、HVT の遺伝子調節因子が鶏ゲノム上の主要な遺伝子と隣接していないため、鶏ゲノム遺伝子の発現を変化させる可能性は低い[4]。HVT では溶解性感染の期間が延長されることによって MDV 強毒株に対する競合排除に寄与している可能性が示唆されている[34]。また、潜伏感染期の HVT ゲノムがテロメアにおいてエピソームとして取り込まれることにより、HVT の終生免疫に寄与している可能性がある[27]。

HVT は 1970 年代の初頭から MD を予防するワクチンとして市販され、MDV 血清型 1 又は血清型 2 との 2 価ワクチンや HVT をバックボーンとするベクターワクチンを含め、現在まで安全に使用されている[41]。

宿主ウイルス HVT FC126 株は、HVT 生ワクチンとして最も一般的な株であり、上記 HVT 一般の性状と同様に病原性がない[41]。

へ) 有害物質の産生性

HVT は病原性に関わる遺伝的要素や毒素遺伝子を含まない[41]。また、アレルゲンデータベース（国立医薬品食品衛生研究所）のカテゴリーサーチにおいて、Food Animal にリストされているアレルゲン 259 種中、鶏関連のアレルゲン 13 種にウイルス由来のものは含まれていなかったこと、HVT FC126 株の長年にわたるワクチンとしての野外での使用実績においてアレルゲンに関連する問題は報告されていないことから有害物質を産生する可能性はない [別紙 1-1 : 17 頁 III. B.]。

宿主ウイルス HVT FC126 株は生ワクチン製造用株マスターシードウイルスから培養細胞で 4 代継代が行われたのみで HVT 一般の性状と同様に有害物質を産生する可能性はない。

ト) その他の情報

HVT が血清学的交差性を示す MDV には、鶏ヘルペスウイルス 2 型 (GaHV-2、MDV 血清型 1) 及び鶏ヘルペスウイルス 3 型 (GaHV-3、MDV 血清型 2) の 2 種類がある。

宿主 HVT FC126 株は細胞随伴性ウイルスであり、羽包上皮細胞から放出されるウイルス粒子以外の細胞遊離型ウイルスは感染性がない。一方、羽包上皮細胞から放出される感染性を有するウイルス粒子は、脂質二重膜から成るエンベロープを有することから、次亜塩素酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム及びヨード剤など多くの一般的な消毒剤により容易に不活化でき[12]、紫外線に対しても感受性である。

資料2. 審査データの概要

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

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) 由来 VP2 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9 の作出に用いられた供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの構成及び構成要素の由来は図 5 及び表 2 に示した通りである。

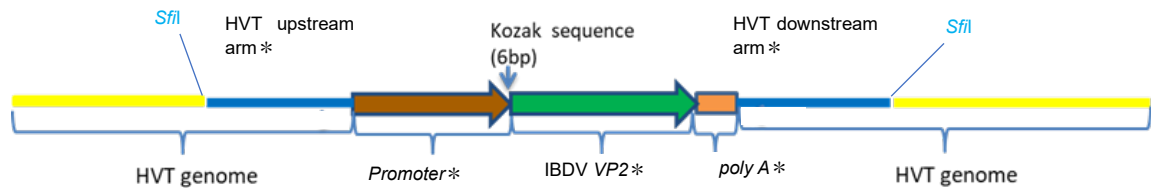


図 5. 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの構造

* : 社外秘につき一部非開示

表 2. IBDV 由来 VP2 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9 の作成に用いられた供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの各構成要素

構成要素	サイズ	構成要素の由来
制限酵素サイト	13 bp	既知の <i>Sfi</i> I 配列
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接領域上流	【社外秘につき非開示】	HVT ゲノム上の IBDV VP2 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する上流領域 (【社外秘につき非開示])
プロモーター*		【社外秘につき非開示】
IBDV VP2 遺伝子	1,368 bp	IBDV ¹⁾ 【社外秘につき非開示】 を由来とする VP2 蛋白質コード遺伝子コザック配列 6 bp
ポリアデニル化配列*	【社外秘につき非開示】	【社外秘につき非開示】 由来のポリアデニル化配列 (以下「poly A*」という。)
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接領域下流		HVT ゲノム上の IBDV VP2 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する下流領域 (【社外秘につき非開示])
制限酵素サイト	13 bp	既知の <i>Sfi</i> I 配列

¹⁾ 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV)

科: ビルナウイルス科 (*Birnaviridae*)

属: アビビルナウイルス属 (*Avibirnavirus*)

種: 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

* : 社外秘につき一部非開示

資料2. 審査データの概要

IBDV は約 6.1 kb の 2 本鎖 RNA ウイルスであり、ウイルスゲノムは VP2～VP5 及び VP1 ウイルス蛋白質をコードするセグメント A 及び B から構成される[3] (図 6)。構造蛋白質である VP2 と VP3、及びセリンプロテアーゼである VP4 は一つのポリ蛋白質として翻訳され、自己切断される。VP5 は非構造蛋白質で、感染初期の抗アポトーシス作用、及びウイルス放出や分布に関する調節機能を有する[19]。セグメント B は RNA ポリメラーゼである VP1 をコードしている[19, 32]。

IBDV 【社外秘につき非開示】は 1970 年に英国で分離された、死亡率が 50% までの従来型病原性株 (cvIBDV) (I の 1 の (2) 参照) の代表的な株である [18, 19]。

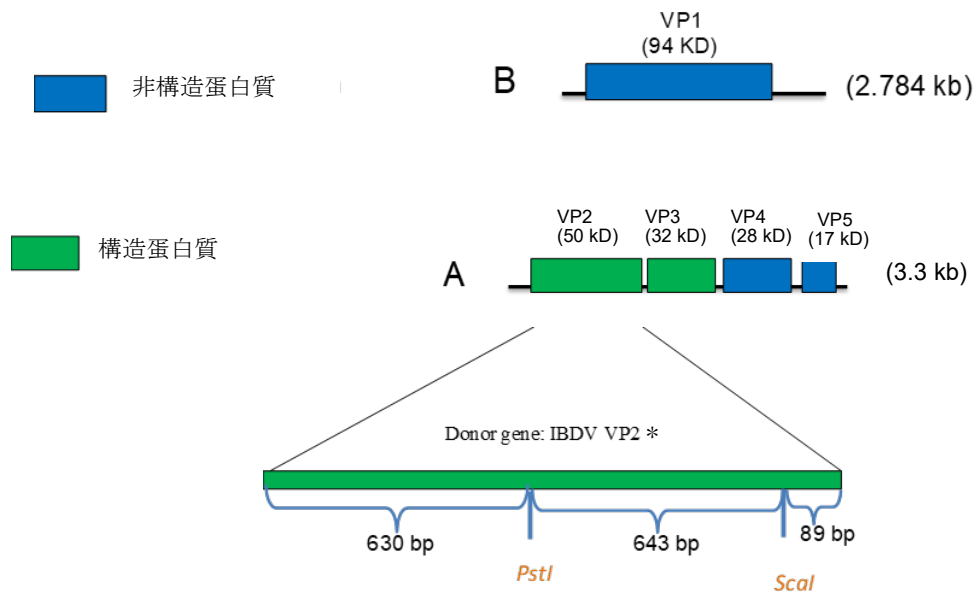


図 6. IBDV ウイルスゲノム構造及び供与核酸 IBDV VP2 遺伝子
* 社外秘につき一部非開示

ロ) 構成要素の機能

供与核酸の各構成要素の機能は表 3 の通りである。供与核酸部分は全合成された。

資料2. 審査データの概要

表3. 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの各構成要素の機能

構成要素	構成要素の機能
制限酵素サイト	<i>Sfi</i> I 認識配列
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接領域上流	HVT ゲノム上の IBDV VP2 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する領域上流。HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置し、その特性について解析されている[28]。 【社外秘につき非開示】 よって、HVT の翻訳領域（オープンリーディングフレーム、ORF）に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない。
プロモーター*	非常に高い転写活性を持つことから、遺伝子発現用に一般的によく使用され、分子学的特性が明らかなプロモーター。
IBDV VP2 遺伝子	VP2 蛋白質は主要なウイルス構造蛋白質で、ウイルス蛋白質の約 50%を占める。VP2はウイルス粒子の表面に露出し、中和抗体を誘導するウイルス蛋白質である[3,6]。VP2 は露出部に位置する親水性の可変領域を持つ。VP2 の露出部はアミノ酸 206-350 の間の蛋白質に認められ、感染した動物の中和抗体応答誘導を担う[3,31]。 コザック配列：蛋白質発現量に影響を与えている翻訳開始点近傍の配列で、本遺伝子発現カセットでは開始点の前 6 bp を当該配列として追加した。
ポリアデニル化配列 (<i>poly A</i>) *	ポリアデニル化 (<i>poly-A tail</i> の付加) により、mRNA の安定性を向上させ、RNA の核外輸送、翻訳が促進される。
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接領域下流	HVT ゲノム上の IBDV VP2 遺伝子発現カセット挿入サイト挿入サイト隣接領域下流。HVT ORF に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない。
制限酵素サイト	<i>Sfi</i> I 認識配列

【社外秘につき非開示】

*：社外秘につき一部非開示

(2)ベクターに関する情報

イ) 名称及び由来

名称：pMA-RQ-Bs クローニングベクター

由来：市販のクローニングベクター (Invitrogen) (図 7)

資料2. 審査データの概要

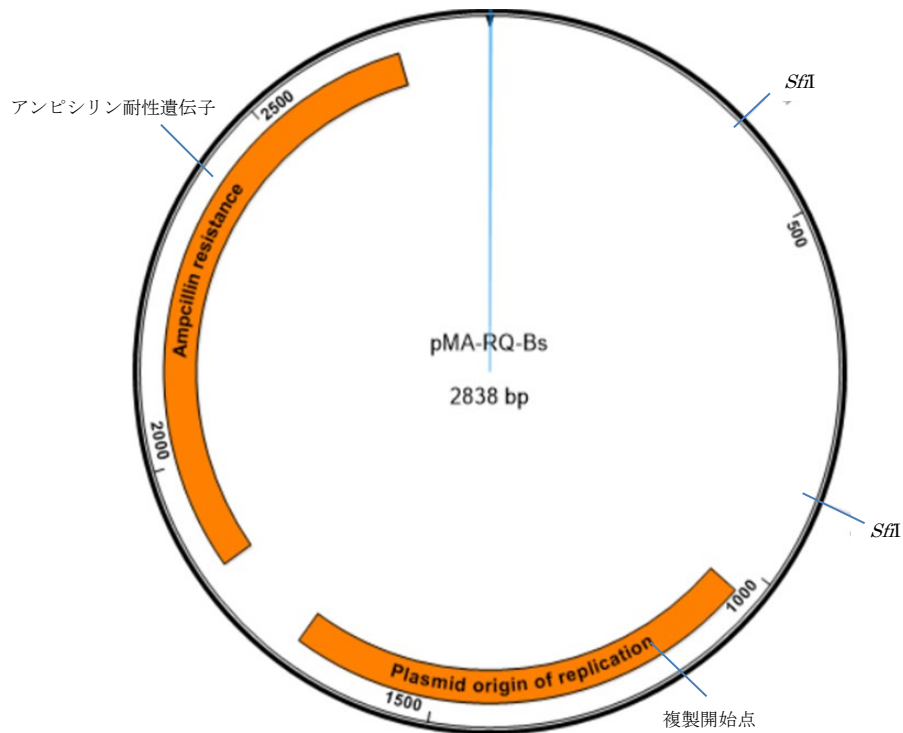


図7. 市販クローニングベクターpMA-RQ-Bsの構成

ロ) 特性

実験用クローニングベクター (Invitrogen) として市販されているもので、全遺伝子配列が決定されており、ベクターウイルスの作出[10]等、実験用に汎用されている。複製開始点及びアンピシリン耐性遺伝子を有するが、病原性や伝達性に関与する遺伝子は保有しない。

(3) 遺伝子組換え生物の調製方法

イ) 宿主内に移入された核酸全体の構成

本遺伝子組換えウイルス全体の構成を図8に示した。

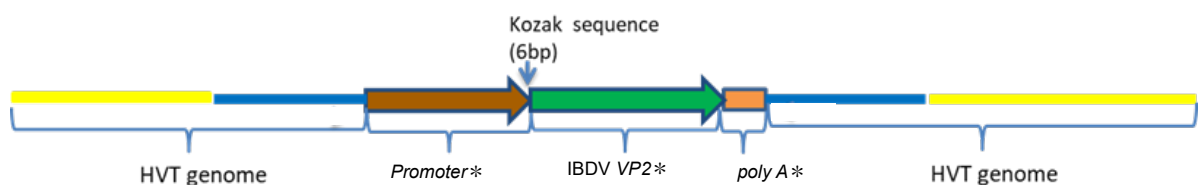


図8. 本遺伝子組換えウイルス「HVT-IBD #9」の構成

* : 社外秘につき一部非開示

資料2. 審査データの概要

ロ) 宿主内に移入された核酸の移入方法

① トランスファープラスミド「pHVT-IBD #9」の調製

pMA-RQ-Bs クローニングベクター (図9) の *SfiI* サイトに IBDV VP2 遺伝子発現カセットを挿入し、IBDV VP2 遺伝子発現カセットトランスファープラスミド「pHVT-IBD #9」を作成した (表4、図9、10)。

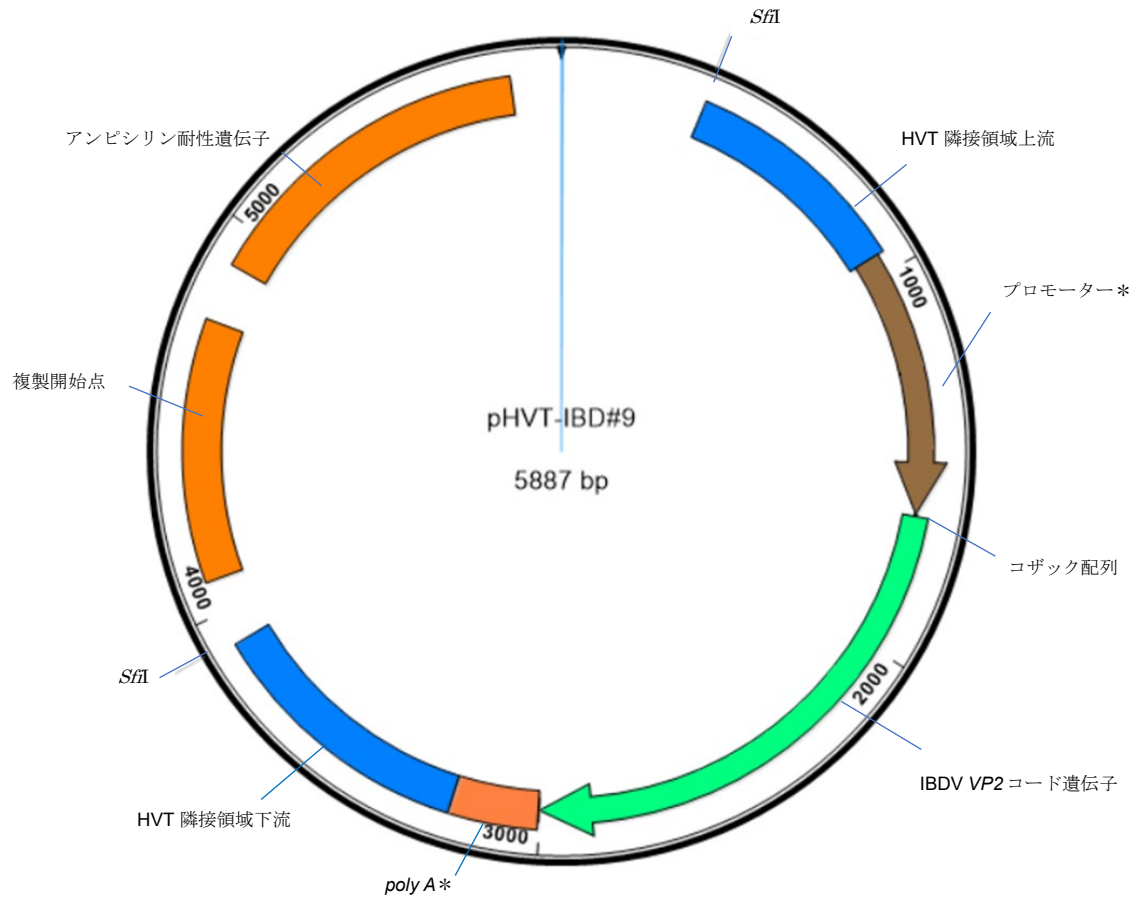


図9. IBDV VP2 遺伝子発現カセットトランスファープラスミド「pHVT-IBD #9」の構成

* 社外秘につき一部非開示

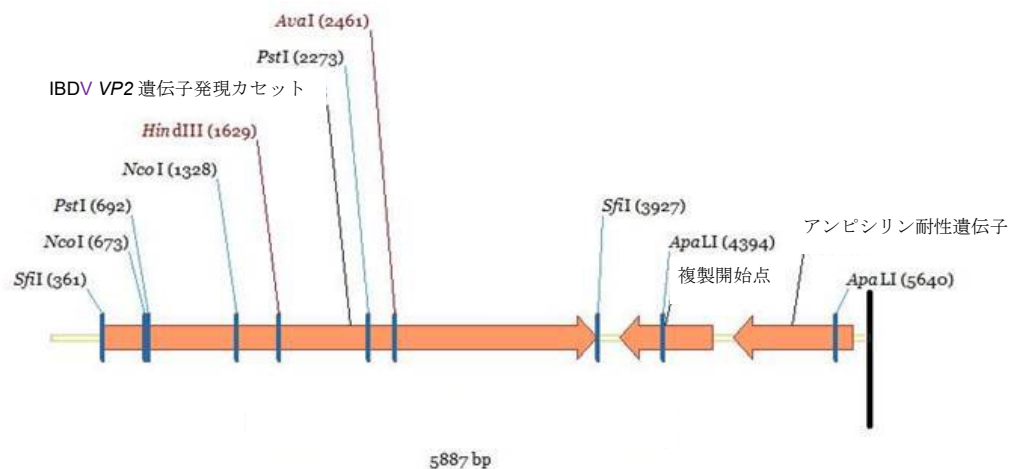


図10. トランスファープラスミド「pHVT-IBD #9」の制限酵素地図

資料2. 審査データの概要

表 4. トランスファープラスミド「pHVT-IBD #9」の各構成要素及び特性

構成要素	サイズ	構成要素の由来
ベクター由来配列	2,341 bp	市販の pMA-RQ-Bs クローニングベクター (Invitrogen、サイズ 2,838 bp) から遺伝子挿入箇所である <i>Sfi</i> I サイト間の配列を除いた配列。 本配列にはベクター由来の複製開始点及びアンピシリン耐性遺伝子を含む。
遺伝子挿入サイトの隣接上流領域	【社外秘につき非開示】	HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置し、その特性について解析されている[28]。HVT ゲノム上の遺伝子挿入サイトは【社外秘につき非開示】遺伝子間の非翻訳領域に位置し、宿主遺伝子の欠損はなく ³⁾ 、隣接領域には調節因子の存在は知られていない。よって、HVT の ORF に変化はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない。
IBDV VP2 遺伝子発現カセット		プロモーター*、コザック配列 (6 bp)、IBDV VP2 遺伝子*、及び <i>poly A</i> *
遺伝子挿入サイトの隣接下流領域		【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

*：社外秘につき一部非開示

② 【社外秘につき非開示】

③ 遺伝子組換えウイルス「HVT-IBD #9」の作製方法

【社外秘につき非開示】

ハ) 遺伝子組換え生物等の育成の過程

【社外秘につき非開示】

本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9 の VP2 蛋白質発現の安定性を確認するため、以下①～③の3種類の方法を使用し、IBDV VP2 蛋白質発現性の評価、並びに宿主ウイルス HVT FC126 株の有無や供与核酸挿入サイトの自然欠失変異株の存在がないかを確認した。

① 二重免疫染色 [別紙 1-1 : 13 頁 II. C. 2. i、32 頁 Figure 9]

本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9 を感染させた CEF 細胞に、抗 HVT モノクローナル抗体【社外秘につき非開示】及び抗 IBDV 鶏ポリクローナル抗体を用いた二重免疫染色により宿主ウイルス HVT FC126 株及び挿入遺伝子 (IBDV VP2 蛋白質コード遺伝子) 発現を評価でき、また、本遺伝子組換えウイルスの表現型の安定性を証明できる (表 5)。

表 5. 本遺伝子組換えウイルスの細胞培養プラークにおける二重免疫染色の結果

継代数	観察プラーク数	HVT-IBD 両抗原陽性プラーク率 (%)
MSV	1,457	100
MSV+1	913	100
MSV+2	1,126	100
MSV+3	293	100
MSV+4	924	100
MSV+5	964	100
MSV+6	248	100
MSV+7	464	100
MSV+8	536	100

MSV：マスターシードウイルス

資料2. 審査データの概要

② PCR 法 [別紙 1-1 : 13、14 頁 II. C. 2. ii、32 頁 Figure 9、37 頁 Figure 14]

4 組のプライマーセット A~D を用いて PCR 法により、宿主ウイルス HVT FC126 株における供与核酸の安定性評価を行った (表 6、図 15)。本遺伝子組換えウイルスで予想される PCR 増幅産物 (2,544 ~4,901 bp) に対して、供与核酸が脱落した場合には、宿主ウイルス HVT FC126 株で予想される PCR 増幅産物 (264~2,621 bp) が確認される (図 17)。

表 6. PCR 法で使用するプライマーセット及び増幅産物サイズ

プライマーセット	プライマー	本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9	宿主ウイルス HVT FC126 株
A	SiteB-F1 + SiteB-R1	2,575 bp	295 bp
B	SiteB-F2 + SiteB-R2	2,544 bp	264 bp
C	SiteB-FL-F1 + SiteB-FL-R1	4,680 bp	2,400 bp
D	SiteB-FL-F2 + SiteB-FL-R2	4,901 bp	2,621 bp

各プライマーの配列については【社外秘につき非開示】

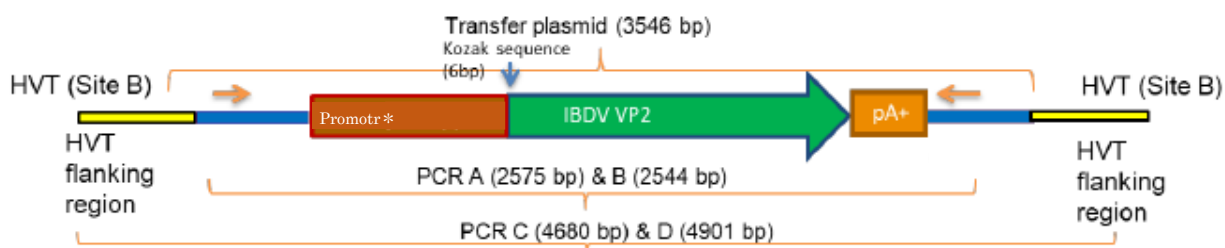


図 15. PCR 法に使用するプライマーのウイルスゲノム上の位置及びその推定産物長

*社外秘につき一部非開示

③ PCR 産物制限酵素切断法 [別紙 1-1 : 14、15 頁 II. C. 3. b、31 頁 Figure 8]

プライマーセット A (表 6 参照) を用いて増幅させた DNA (2,575 bp) を 5 種の制限酵素で切断し、供与核酸が目的のサイトに正確に挿入されているかどうかを確認した (表 7、図 16)。

表 7. 本遺伝子組換えウイルスの PCR 産物制限酵素切断法解析に用いた制限酵素及び分解産物サイズ

酵素	分解産物サイズ	
	なし	PCR 増幅産物 2,575 bp*
<i>SpeI</i>	215 bp	2,360 bp
<i>NcoI</i>	576 bp	1,999 bp
<i>HindIII</i>	877 bp	1,698 bp
<i>PstI</i>	1,521 bp	1,054 bp
<i>ScaI</i>	2,164 bp	411 bp

*プライマーセット A (表 6 参照) を用いた。

資料2. 審査データの概要

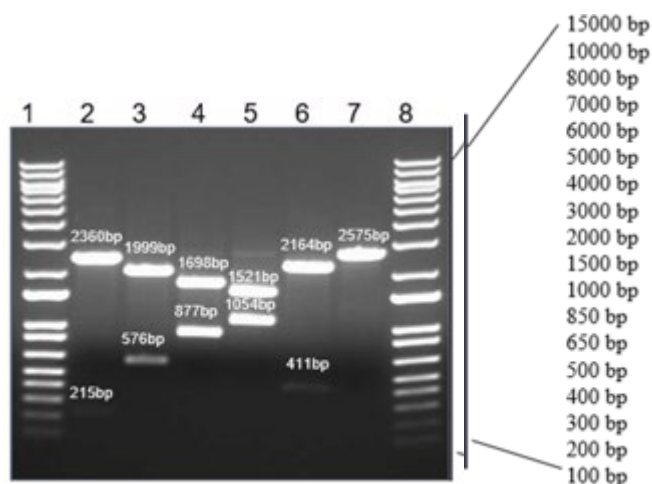


図 16. 本遺伝子組換えウイルスの PCR 産物制限酵素切断法による解析結果
1 及び 8 : 1 kb ラダー、2 : *SpeI*、3 : *NcoI*、4 : *HindIII*、5 : *PstI*、6 : *ScaI*、7 : 酵素処理なし (2,575 bp)

(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 移入した核酸の遺伝子組換え微生物における存在状態

移入した IBDV *VP2* 遺伝子は、宿主ウイルス HVT FC126 株ゲノムの【社外秘につき非開示】遺伝子間の非翻訳領域に、宿主の欠損なしに挿入されている。【社外秘につき非開示】によって、供与核酸挿入サイトに宿主遺伝子の改変はなく [別紙 1-1 : 17 頁 III. B.]、HVT の ORF に影響しないことから、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない [別紙 1-1 : 16 頁 II. C. 5]。

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 (培養細胞での継代及び接種動物体内)

移入された核酸の培養細胞における複製物の安定性は、宿主に移入された IBDV *VP2* 遺伝子の外側 (宿主ゲノム上) に設計された 4 組のプライマーセットを用い、マスターシードウイルスの継代物について PCR により確認した (図 17)。マスターシードウイルス及び継代 3~6 代目の PCR 産物は全て、全長バンドのみが確認され、移入された核酸が脱落した宿主ウイルス HVT FC126 株で想定されるようなバンドは認められなかったことから、複製物の培養細胞での継代における安定性が確認された [別紙 1-1 : 14~16 頁 II. C. 3. c.、32 頁 Figure 9]。

資料2. 審査データの概要

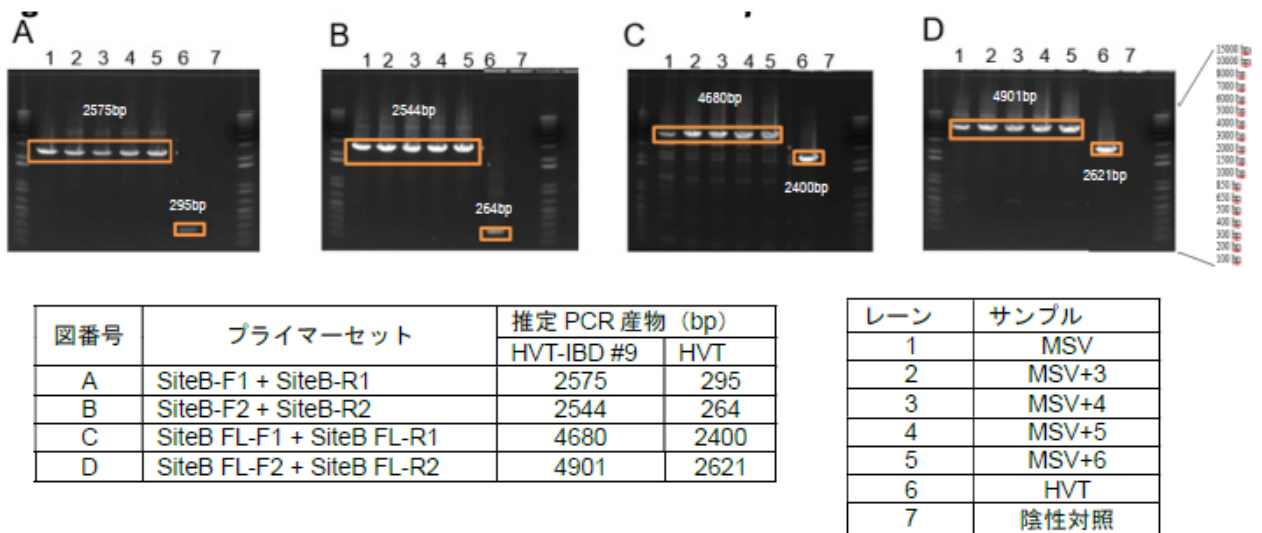


図 17. 本遺伝子組換えウイルスの培養細胞での継代における供与核酸の PCR による遺伝的安定性

また、発現蛋白質 IBDV VP2 の安定性に関しては、マスターシードウイルス及び継代 1～8 代目の培養細胞を用いて HVT 及び IBDV VP2 の二重免疫染色により確認した。各継代について 200 プラーク以上を検査し、各継代の全てのプラークが HVT 及び IBDV 陽性であることが確認された（表 5）。「別紙 1-1：14～16 頁 II. C. 3. c.、32 頁 Figure 9」。

IBDV VP2 遺伝子の接種動物体内での複製物の安定性は、マスターシードウイルスを SPF 発育鶏卵に卵内接種し、孵化後 7 又は 8 日に、脾臓及び血液中の白血球からウイルスを回収し、次代に継代することで確認した〔別紙 5〕。鶏での継代を 5 代目まで行ったところ、臨床症状及び剖検において MD 又は IBD に関連する所見を示す鶏は認められず、病原性が復帰しなかったことが示された。

また、各継代で回収されたウイルスを CEF 細胞で培養し、DNA を抽出して挿入遺伝子の安定性について 4 組のプライマーセット（表 8、図 18）を用い PCR により確認した〔別紙 5-1：16 頁、別紙 5-2：4 頁〕。その結果、各継代の回収ウイルスに IBDV VP2 遺伝子の挿入が確認され、挿入遺伝子が欠損したバンドは認められなかった。また、回収ウイルスのウイルス定量時に実施した二重免疫染色により、全てのプラークに VP2 蛋白質が発現していることが確認された（図 19）ことから、接種動物の継代においても移入された核酸の複製物の発現が安定していることが確認された。

表 8. 鶏継代試験において PCR 法で使用したプライマーセット及び増幅産物サイズ

プライマーセット	プライマー	本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9	宿主ウイルス HVT FC126 株
B1	SiteB-F1 + SiteB-R1	2,575 bp	295 bp
B2	SiteB-F2 + SiteB-R2	2,544 bp	264 bp
B3	SiteB FL-F2 + SiteB FL-R2	4,901 bp	2,621 bp
B4	SiteB FL-F3 + SiteB FL-R3	4,507 bp	2,227 bp

各プライマーの配列については【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

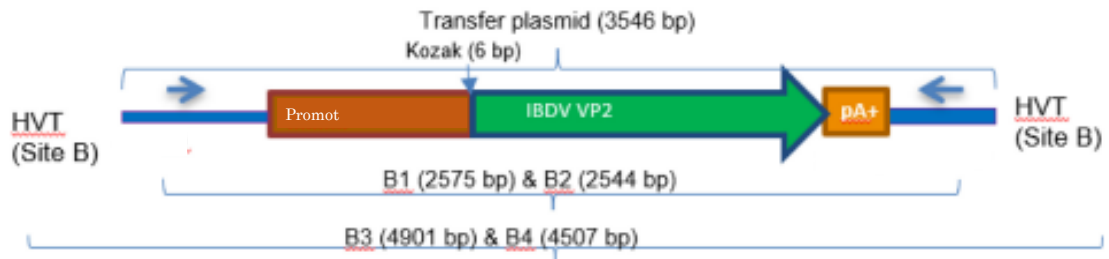
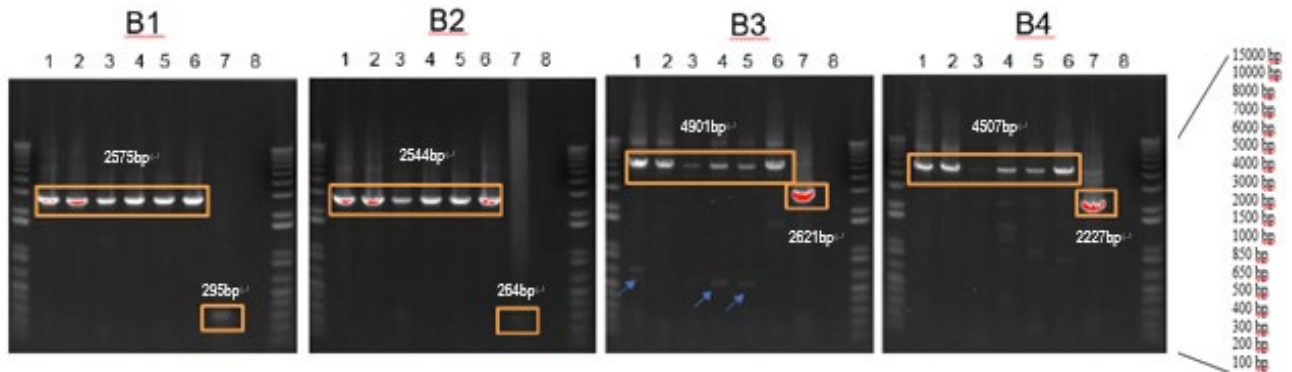


図 18. PCR 法に使用したプライマーのウイルスゲノム上の位置及びその推定産物長

* 社外秘につき一部非開示



レーン	試料
1	MSV
2	P02 接種材料
3	P03 接種材料
4	P04 接種材料
5	P05 接種材料
6	P05 回収ウイルス
7	HVT
8	試料なし

プライマーセット	プライマー	PCR 産物長 (bp)	
		HVT-IBD #9	HVT
B1	SiteB-F1+SiteB-R1	2575	295
B2	SiteB-F2+SiteB-R2	2544	264
B3	SiteB FL-F2+SiteB FL-R2	4901	2621
B4	SiteB FL-F3+SiteB FL-R3	4507	2227

図 19. 本遺伝子組換えウイルスの接種動物（鶏）体内での継代における供与核酸の PCR による遺伝的安定性
 レーン 1 はマスターシードウイルス（MSV）を用いた。レーン 2 は MSV を 18 日齢発育鶏卵に接種後孵化した鶏について 7 日齢時に血液及び脾臓を採取し、それぞれの試料から白血球を回収しプールして 2 代目鶏継代接種材料（P02 接種材料）とした。PCR には接種材料を CEF 細胞で増殖させたものを用いた。レーン 3～5 の P03～P05 接種材料も P02 接種材料と同様に準備した。レーン 6 の P05 回収ウイルスは、P05 接種材料を 18 日齢発育鶏卵に接種後孵化した鶏から 7 日齢時に血液及び脾臓から回収した白血球を CEF 細胞で増殖させたものを用いた。レーン 7 は宿主ウイルス、レーン 8 は陰性対照である。
 B1～B4 のバンド上に認められる赤色は強シグナルによる画像解析ソフトウェアのノイズ、B3 の青矢印は非特異的バンドを示す。[別紙 5]

③ 共感染時にウイルスゲノムの組換えが起こる可能性

細胞にあるウイルスが感染すると、次のウイルスによる感染が阻害される重感染（superinfection）阻害は多くのウイルスで報告されている[25, 36, 37]。ウイルス間で遺伝子組換えが起こるには、第一に遺伝子レベルで 2 つのウイルス間に有意な相同性があること、第二に両ウイルスが同じ宿主に感染すること、第三に両ウイルスが同じ細胞に感染する必要がある[24]。MDV 血清型 1 及び 2 を実験的に細胞に同時感染させた場合、重感染の抑制と共に同時感染（coinfection）が起こることが報告されたが[24]、動物の体内においてはウイルス側だけでなく動物側の要因も関与するため、その頻度は *in vitro* より極めて低いと考えられる。MD の予防のため、HVT は 1970 年代から、その後、各血清型の単価若しくは多価の MD 生ワクチンが世界中で広く用いられているが、長年にわたる商業養鶏での使用

資料2. 審査データの概要

実績において *in vivo* で自然組換えが生じたとの報告はない[9, 41]。HVT と MDV とは遺伝子配列の相同性が比較的低いことが、両者の組換えの可能性が低い一つの要因と考えられる[39]。MDV 血清型 1 及び 2 の混合感染の報告はあるが、実際に組換えが起こった事例としては、実験室内試験で 1 件が報告されているのみである[41]。また、HVT は既に IBDV VP2 遺伝子のベクターとしても実用化されているが組換えが起こったという報告はない。[別紙 1-1 : 19、20 頁 III. E.]

HVT と IBDV はともに鶏、七面鳥及びウズラに感染する。宿主ウイルス HVT FC126 株は 2 本鎖 DNA ウイルスであり核内で複製するのに対し、供与核酸を含む IBDV は 2 本鎖 RNA ウイルスであり細胞質内で複製する。本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルス HVT FC126 株と同じく核内で複製することから、本遺伝子組換えウイルスと野外 IBDV 間での組換えが起こる可能性はほぼないと考えられる。[別紙 1-1 : 19、20 頁 III. E.]

(5) 遺伝子組換え微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

本遺伝子組換えウイルスは、感染細胞において HVT に対するモノクローナル抗体及び IBDV に対するポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により検出され、かつ宿主感染細胞と識別される。本遺伝子組換えウイルス感染細胞は上記の抗体の両方に反応し、宿主ウイルス感染細胞は HVT モノクローナル抗体のみに反応する (I の 2 の (3) のハ) の①参照)。この方法は感染単位 (PFU, plaque forming unit) を測定する方法としても用いられており、感度は 1 感染細胞であり、非感染細胞は検出されない。[別紙 1-1 : 11、12 頁 II. C. 1. e]。

また、培養細胞、組織、環境等から採取された試料から直接、あるいは試料を培養細胞を用いて増殖させた後、PCR により本遺伝子組換えウイルスの検出および識別が可能である (I の 2 の (3) のハ) の②及び③参照)。本遺伝子組換えウイルスおよび宿主ウイルス HVT FC126 株は DNA ウイルスであるため、PCR のための鋳型 DNA として直接用いることが可能で、RNA ウイルスの PCR による検出の際に必要な RNA から DNA への逆転写等の操作は不要である。PCR のプライマーを、宿主ゲノムの遺伝子挿入サイトの外側に設計することにより、本遺伝子組換えウイルスの PCR 複製産物長が、宿主ウイルスのそれに対し、挿入配列分 (2,280 bp) 長い結果が得られる。感度は通常の PCR と同様であり、信頼性は想定される長さが増幅された場合は極めて高く、PCR 産物を制限酵素で切断した場合の長さあるいは PCR 産物の DNA 配列を調べてそれが本遺伝子組換えウイルスと一致した場合は完全に信頼できる。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ) 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に属する生物種との特性の違い

① 増殖様式 (ウイルス血症及び新たな感染性ウイルスの発生を含む)

本遺伝子組換えウイルスと宿主ウイルス HVT FC126 株の培養細胞における増殖性について比較するため、培養細胞のウイルス量を経時的に測定した [別紙 10]。宿主ウイルスは 50 時間後に、本遺伝子組換えウイルスは 50/60 時間後にウイルス価のピークを示し、以降のウイルス価は宿主ウイルスと同様に減衰するものと考えられる。ピーク時のウイルス価は宿主ウイルスの 6.79×10^6 PFU/mL に対して、本遺伝子組換えウイルスでは $5.21 \sim 5.25 \times 10^6$ PFU/mL で (図 20)、本遺伝子組換えウイルスの増殖能は宿主ウイルスと同等又はそれ以下であることが示された。宿主ウイルス

資料2. 審査データの概要

への IBDV VP2 遺伝子の挿入によってウイルスの増殖性が高まっていないことが確認された。

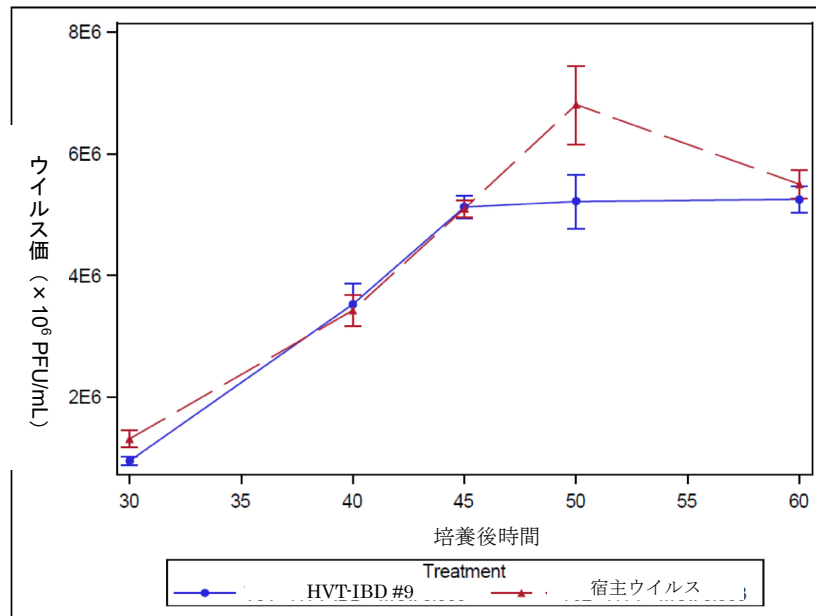


図 20. 宿主ウイルス HVT FC126 株及び本遺伝子組換えウイルスの培養細胞における増殖性

本遺伝子組換えウイルスの鶏体内における組織指向性及び環境中へのウイルス排泄についても宿主ウイルス HVT FC126 株と同等又はそれ以下であると考えられる [別紙 7、8、11]。HVT は感染性を有する細胞遊離型ウイルス粒子を羽包上皮細胞で産生し、これらの細胞はフケとして環境中に排泄される。細胞遊離型ウイルスの感染性は環境中で約 1 年間保持されるが [12]、消毒剤での清掃が定石である養鶏の飼育環境では、HVT についても容易に不活化されると考えられ、宿主ウイルス HVT FC126 株についても同様である。感染した動物の中和抗体誘導を担う、IBDV VP2 遺伝子発現カセットが挿入された本遺伝子組換えウイルスについても消毒剤への耐性が上昇するとは考えられず、同様に不活化されると考えられる。

② 遺伝的特性

本遺伝子組換えウイルスは、宿主ウイルス HVT FC126 株ゲノムの【社外秘につき非開示】非翻訳領域に、IBDV VP2 発現遺伝子が宿主核酸の欠損なしに挿入されている (I の 2 の (4) の①参照)。HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置し、その特性について解析されている [28]。挿入された核酸の隣接領域には調節因子の存在は知られていない。【社外秘につき非開示】 (I の 2 の (4) の①参照)。よって、HVT の ORF に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない [別紙 1-1 : 16 頁 II. C. 5]。【社外秘につき非開示】

③ 病原性 (発がん性を含む)

HVT は健康な七面鳥から分離された非病原性ウイルスであり [41, 46]、1970 年代初頭から MD の予防のため安全で有効な生ワクチンとして使用されている (I の 1 の (3) のホ)、(へ) 参照)。また、FC126 株は HVT 生ワクチンとして最も一般的な株である [41]。本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株は HVT 生ワクチンのマスターシードウイルスを培養細胞で 4 代継代

資料2. 審査データの概要

したもので、ウイルスゲノムは腫瘍原性・形質転換に係る遺伝子配列を持たない。本遺伝子組換えウイルスはIBDV VP2 蛋白質を発現する以外、基本的な生物学的性状は宿主ウイルスと同一であり、病原性への影響はないと考えられる。

IBDV VP2 蛋白質はIBDV の主要なウイルス構造蛋白質で、ウイルス蛋白質の約 50%を占める。VP2 はウイルス粒子の表面に露出し、中和抗体を誘導するウイルス蛋白質である[6]。VP2 は露出部に位置する親水性の可変領域を持つ。VP2 の露出部はアミノ酸 206 - 350 の間の蛋白質に認められ、中和抗体応答誘導を担う[31]。IBDV VP2 蛋白質自体には毒性や病原性がないことから、植物発現系等で発現させた VP2 蛋白質をワクチン抗原とする試みも行われている[1]。

したがって、IBDV VP2 蛋白質を発現することを含めて本遺伝子組換えウイルスは病原性がないと考えられる。

本遺伝子組換えウイルスの鶏における安全性を確認するため、約 $10^{5.0}$ PFU/羽（ワクチンとして使用する最大量の約 10 倍量）を SPF 初生ひなへ皮下接種及び 18 日齢発育鶏卵へ卵内接種し、120 日齢まで臨床症状を観察後、剖検したところ、MD 及び IBD に起因すると考えられる病変は認められず、本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルスと同様に病原性及び腫瘍原性がないことが確認された [別紙 5、別紙 6]。

④ 有害物質の産生性

本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株において有害物質の産生性は認められない (I の 1 の (3) の へ) 参照)。

本遺伝子組換えウイルスは、宿主ウイルスの遺伝子発現を変化せず、IBDV VP2 蛋白質を発現する以外、基本的な生物学的性状は宿主ウイルスと同一である。前項のとおり、IBDV VP2 蛋白質自体に毒性や病原性がなく、アレルゲンについても問題はないと考えられるが、アレルゲンデータベースにおいて IBDV VP2 アミノ酸配列と有意な相同性を示す配列は認められなかったため、本遺伝子組換えウイルスに有害物質の産生性はないと考えられる。また、鶏への接種試験において、本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルスと同様に有害物質の産生性がないことが確認された [別紙 6]。

⑤ 感染性

本遺伝子組換えウイルスの体内分布（組織指向性）について SPF 鶏を用いて確認した [別紙 7]。HVT は血液、ファブリキウス嚢、脾臓、胸腺及び羽髄からウイルスが検出されることが知られている [13, 21]。約 10^4 PFU の本遺伝子組換えウイルス又は宿主ウイルス（HVT FC126 株）を 18 日齢 SPF 発育鶏卵に卵内接種し、それぞれ T02 及び T03 とした。また、非投与群を T01 とした。鶏の孵化日を Day 0 として 11 日齢（Day 11）及び 21 日齢（Day 21）の各群の鶏から血液、ファブリキウス嚢、脾臓、胸腺及び羽髄サンプルを採取した。血液、ファブリキウス嚢、脾臓及び胸腺について白血球を回収し、ウイルス分離を行った。羽髄サンプルについては qPCR によって HVT DNA の検出を試みた。結果を表 9-1 に示す。本遺伝子組換えウイルス接種群（T02）の 11 日齢時の各サンプルからウイルスが検出されたが 21 日齢時では検出率が低下する傾向にあり、宿主ウイルスに関しても同様の傾向が認められた。脾臓及び胸腺における本遺伝子組換えウイルス検出率は、11 日齢時にいずれも 100%、21 日齢時にそれぞれ 40%及び 80%と低下傾向を示したが、宿主ウイルスの 21 日齢時のウイルス検出率（それぞれ 10%及び 0%）より低下傾向は緩やかであった。一方、感染性ウイルス粒子が産生される羽髄における 21 日齢時のウイルス検出率は、本遺伝子組換え

資料2. 審査データの概要

えウイルスが 44.4%を示したのに対し、宿主ウイルスは 100%を維持していた。

さらにペンフィルターの塵埃からのウイルス検出を行った（表 9-2）。Day 11 及び 21 にペンフィルターの塵埃を採取し、抗菌剤及び抗真菌剤を添加したトリプトースフォスフェイトブロス (TPB) に浮遊させ、CEF 細胞に接種してウイルスの検出を試みた。また、Day 21 のペンフィルターは 4 分割し、採取日 (Day 21)、翌日 (Day 22)、4 日後 (Day 25) 及び 7 日後 (Day 28) まで 20~28°C で保管してからウイルスの検出を行った。その結果、本遺伝子組換えウイルスは Day 11 のみ陽性を示したが、宿主ウイルスは Day 28 においても陽性を示し、宿主ウイルスの方がウイルス排泄に関連する検出率が高い傾向にあった。これらのことから、本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルスより羽髄への分布 (排泄性) がやや低い傾向にあると考えられる。

以上の結果から、本遺伝子組換えウイルスの鶏における体内分布及びウイルス排泄は、宿主ウイルスと同程度と考えられる [別紙 7]。

表 9-1. 宿主ウイルス HVT FC126 株及び本遺伝子組換えウイルスの体内分布

群	HVT ウイルス陽性率 (%)									
	血液		ファブリキウス嚢		脾臓		胸腺		羽髄 ¹	
	11 ²	21	11	21	11	21	11	21	11	21
T01	0 (0/6) ³	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)	0	0
T02	100 (6/6)	66.7 (4/6)	83.3 (5/6)	0 (0/5)	100 (6/6)	40 (2/5)	100 (6/6)	80 (4/5)	100	44.4 (8/18)
T03	100 (6/6)	100 (6/6)	83.3 (5/6)	20 (1/5)	83.3 (5/6)	20 (1/5)	100 (6/6)	0 (0/5)	100	100

¹羽髄は qPCR、他の臓器はウイルス分離によるウイルス検出

² 鶏日齢

³ 陽性数/供試数

T01：非接種群 T02：本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9 接種群 T03：宿主ウイルス HVT FC126 株接種群

鶏 No. 177 (T01)、157 (T03)、188 (T02) 及び 181 (T01) のファブリキウス嚢、脾臓及び胸腺サンプルは標識を間違えたため解析から除外した。[別紙 7]

表 9-2. 供試鶏飼育ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス検出

群	ペン番号	HVT ウイルス分離結果				
		Day 11	Day 21	Day 22*	Day 25*	Day 28*
T01 (非接種群)	01B	—	—	—	—	—
	02B	—	—	—	—	—
T02 (HVT-IBD #9 接種群)	02A	+**	—	—	—	—
	03A	—	—	—	—	—
T03 (HVT FC126 株接種群)	01A	+	—	—	—	+
	03B	—	—	—	—	+

* Day 21 のサンプルを 20~28°C で 1 日 (Day 22)、4 日 (Day 25) 及び 7 日 (Day 28) 保存したサンプル

+ : HVT 陽性 — : HVT 陰性

** IBDV 蛋白質発現陽性。その他は全て陰性。[別紙 7]

⑥ 内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性

HVT (MDV 血清型 3) と MDV 血清型 1 及び 2 の複製サイクルは類似していることから理論的にはウイルス間の組換えの可能性が考えられるが、実際には実験室内において MDV 血清型 1 と MDV 血清型 2 との組換えが 1 件報告されているのみで[41]、それ以外については、長年にわたる各種血清型マレック病生ワクチンの野外使用実績においてそのような事象は報告されていない。HVT と MDV 血清型 1 及び 2 とは遺伝子配列の相同性が低いことが、両者の組換えの可能性が低い一つの要因と考えられる[39]。また、HVT と MDV 血清型 1 及び 2 との組換えは重感染阻害 (既

資料2. 審査データの概要

に感染した細胞への同種のウイルスの再感染を防ぐこと)によっても妨げられると考えられる[25]。HVT と MDV 野外強毒型 (MDV 血清型 1) との組換えは、HVT 間よりその可能性が低いと考えられる。仮に、野外 HVT と本遺伝子組換えウイルス間で組換えが起こった場合に想定される事象は、本遺伝子組換えウイルスと同様の IBDV VP2 をコードする遺伝子を含むウイルスの産生であり、病原性付与の可能性はない。本遺伝子組換えウイルスは DNA ウイルスであり核内で複製されるが、IBDV は RNA ウイルスであり細胞質内で複製されるため、野外 IBDV と本遺伝子組換えウイルスの IBDV VP2 コード遺伝子配列の交換の可能性は極めて低いと考えられる。VP2 蛋白質は中和抗体の誘導を担い、それ自体に病原性はない。

本遺伝子組換えウイルスと類似の HVT をベクターとする HVT-IBD ワクチンは、従来の MD 生ワクチンとともに既に野外で使用されているが、現在までに組換えが生じたとする報告はされていない。本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株は従来型ワクチンおよびベクターワクチンの両方に広く使用されている。本遺伝子組換えウイルスは *in vitro* 及び *in vivo* における遺伝的及び表現型の安定性並びに対象動物における安全性が確認されている [別紙 1、5、6、7、8]。

⑦ 接種動物からの排泄量、自然界での生存能及び同居感染性

HVT は鶏における排泄及び水平伝播が限定的であり[16, 44]、感染性を有する細胞遊離型 HVT は羽包上皮細胞のみから排泄される[11]。18 日齢 SPF 発育鶏卵に本遺伝子組換えウイルス又は宿主ウイルス HVT FC126 株を卵内接種して孵化させ、孵化日を 0 日齢として、各群に非接種発育鶏卵由来の鶏を同居させて排泄及び伝播について試験した [別紙 8]。その結果、本遺伝子組換えウイルス接種群及び宿主ウイルス接種群の両群において、全試験日 (8、15 及び 22 日齢時) で脾臓及び血液白血球からウイルスが回収された。クロアカスワブも両群とも陽性例が認められたが、咽頭スワブでは 15 日齢に宿主ウイルス接種群のみから回収された。同居鶏では、脾臓及び血液白血球において 22 日齢に両群ともに 1 羽がウイルス陽性となったが、クロアカスワブおよび咽頭スワブからはいずれの日にも両同居鶏ともウイルスは回収されなかった。本遺伝子組換えウイルスを発育鶏卵に接種後孵化した鶏から限定的なウイルスの排泄および同居鶏への水平伝播が認められたが、その程度は宿主ウイルスと同等であることが示され、HVT での既知の程度と同等であると考えられる (表 10)。

表 10. 宿主ウイルス HVT FC126 株及び本遺伝子組換えウイルスの鶏における排泄及び同居感染性

群	ペン	HVT ウイルス分離陽性率 (%)											
		クロアカスワブ			咽頭スワブ			脾臓			血液白血球		
		8*	15	22	8	15	22	8	15	22	8	15	22
T01	01B	0 (0/6)**	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.7 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)
T02		83.3 (5/6)	16.7 (1/6)	16.7 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	83.3 (5/6)	100 (6/6)	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)	100 (6/6)	50 (3/6)
T01	01A	0 (0/4 ^{1,2})	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/4 ¹)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/4 ¹)	0 (0/6)	16.7 (1/6)	0 (0/4 ¹)	0 (0/6)	16.7 (1/6)
T03		66.7 (4/6)	20 (1/5 ³)	20 (1/5 ²)	0 (0/6)	20 (1/5 ³)	0 (0/5 ²)	100 (6/6)	100 (5/5 ³)	100 (5/5 ²)	100 (6/6)	100 (5/5 ³)	100 (5/5 ²)

* 鶏日齢

** 陽性数/供試数

T01：非接種群 T02：本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9 接種群 T03：宿主ウイルス HVT FC126 株接種群

¹ T01 群の 1 羽 (No. 327) が 2 日齢に死亡した状態で発見された。

² T01 群の 1 羽 (No. 370) と T03 群の 1 羽 (No. 372) が 8 日齢に識別不可となったためサンプルに含めなかった。No. 372 の鶏は 22 日齢に採材予定であった。

³ No. 325 (T03 群) は 15 日齢に採材予定であったが、怪我のため 8 日齢に除外した。

資料2. 審査データの概要

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(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 薬機法第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 薬機法第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さの廃棄
- 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

(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の環境での使用等の結果

—

(6) 国外における使用等に関する情報

本遺伝子組換えウイルスを有効成分とする鶏用生ワクチンは「Poulvac® Procerta™ HVT-IBD」の名称で米国において承認されている他、カナダ、エジプト、ボリビア、エクアドル、コロンビア、メキシコ及びブラジルにおいても承認されている。また、2023年10月27日付けで欧州においても中央審査制度

資料2. 審査データの概要

により承認された。これまでに少なくとも1億1200万ドースが使用されたが、有害事象の報告はない。

(7) 接種動物の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微生物の消長に関する情報

HVTは一般的に血液、ファブリキウス嚢、脾臓、胸腺及び羽髄からウイルスが検出されることが知られており[13, 21]、多種の組織から調製したリンパ球から分離可能である。リンパ球はHVTの主要な感染細胞であり、他の組織へ分布する役割を担う。ウイルスは羽包上皮以外の全ての組織において細胞随伴性である[41]。本遺伝子組換えウイルス接種動物における体内分布及び消長についてSPF鶏を用いて確認した。約 10^4 PFUを18日齢SPF発育鶏卵に卵内接種し、11日齢及び21日齢の血液、ファブリキウス嚢、脾臓、胸腺及び羽髄サンプルを採取した。血液、ファブリキウス嚢、脾臓及び胸腺について白血球を回収し、ウイルス分離を行った。羽髄サンプルについてはqPCRによってHVT DNAの検出を試みた。その結果、本遺伝子組換えウイルス接種群の11日齢時の各サンプルからウイルスが検出されたが、21日齢時には検出率が低下する傾向にあり、宿主ウイルスHVT FC126株に関しても同様の傾向が認められた[別紙7]。本遺伝子組換えウイルスは脾臓及び胸腺における検出率の低下傾向は宿主ウイルスと比較して緩やかであったが、宿主ウイルスは本遺伝子組換えウイルスより羽髄における検出率がやや高く、ウイルス排泄では本遺伝子組換えウイルスの方が低い傾向を示した。本遺伝子組換えウイルスの接種鶏における体内分布及び消長は、宿主ウイルスと同程度であることが確認され[別紙11]、HVT一般の性状と同等と考えられた。

② 接種動物体内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微生物の環境への拡散の有無に関する情報

HVTは鶏における排泄及び水平伝播が限定的であり[16, 44]、感染性ウイルス粒子は羽包上皮細胞のみから排泄される[11]。18日齢SPF発育鶏卵に本遺伝子組換えウイルス又は宿主ウイルスHVT FC126株を卵内接種して孵化させ、孵化日を0日齢として各群に非接種の発育鶏卵由来の鶏を同居させて排泄及び伝播について試験した[別紙8]。その結果、本遺伝子組換えウイルス接種群及び宿主ウイルス接種群の両群において、全試験日(8、15及び22日齢時)で脾臓及び血液白血球からウイルスが回収された。クロアカスワブも両群とも陽性例が認められたが、咽頭スワブでは15日齢に宿主ウイルス接種群のみから回収された。同居鶏では、脾臓及び血液白血球において22日齢に両群ともに1羽がウイルス陽性となったが、クロアカスワブおよび咽頭スワブからはいずれの日にも両同居鶏ともにウイルスは回収されなかった[別紙8]。

本遺伝子組換えウイルス及び宿主ウイルス接種鶏から環境中への排泄を調べるため、18日齢発育鶏卵に各ウイルスを卵内接種して孵化させ、11日齢及び21日齢時に各群のペンフィルターから採取した塵埃サンプル中のウイルスを分離することによって評価した。21日齢時のフィルターは4分割し、採取日及び室温で1、4及び7日間保存後のサンプルについても試験し、環境中の生残性について評価した。その結果、本遺伝子組換えウイルス及び宿主ウイルスともに11日齢時の塵埃サンプルからウイルスが分離されたが、21日齢時には両群ともウイルスは分離されなかった。しかし、Day 28(21日齢時のフィルターを7日間保存)に宿主ウイルス群から感染性ウイルスが分離された[別紙7]。これらのことから、HVTの既知の性状[15, 16]と同じく、宿主ウイルスは限定的ではあるが排泄されると考えられる。フケ中の感染性羽包細胞の落屑は、代表的なMDV排泄メカニズムである。宿主ウイルスと本遺伝子組換えウイル

資料2. 審査データの概要

スのこれらのデータは、環境中に宿主ウイルスの排泄が予想されることと一致している [別紙 7]。

以上の結果から、本遺伝子組換えウイルスを発育鶏卵に接種後、孵化した鶏から限定的なウイルスの排泄および同居鶏への水平伝播が認められたが、その程度は HVT の既知の程度と同等であることが確認された。

③ 接種動物において遺伝子組換え微生物が垂直感染する可能性の有無に関する情報

MDV の垂直感染は起こらないとされている[41, 47]。また HVT についても垂直感染に関する報告はなく[40]、MDV と同様にその可能性は極めて低いと考えられる。本遺伝子組換えウイルスも宿主ウイルス HVT FC126 株と同様の性状を示すことから、垂直感染の可能性は極めて低いと考えられる。

④ 野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株は、七面鳥を自然宿主とする非病原性ウイルスで、七面鳥の他、鶏及びウズラに感染することが確認されている。一方、MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等、多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている[41]。本遺伝子組換えウイルスを七面鳥、ウズラ及びマウスに接種した非対象動物安全性試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、異常は認められなかった [別紙 2、3、4]。

MDV が感染する動物には HVT も感染する可能性がないとは言えないが、宿主ウイルスの感染性が確認されていない動物種において、本ウイルスに感受性の高い鶏と同等以上にウイルスが排泄されるとは考えられず、感染源になり得ないと考えられる。HVT は細胞随伴性ウイルスで、鳥類の白血球に指向性を示し、リンパ球に侵入・増殖後、他の臓器・組織に運ばれる。HVT は脾臓、ファブリキウス囊、胸腺及び羽髄等で認められる[7, 13, 21]。感染鳥内において HVT は細胞随伴性であり細胞外へ放出されず、細胞の破壊等により細胞から遊離したウイルスは感染性がない[49]。感染性を有する細胞遊離型ウイルス粒子は羽包上皮で産生され[13, 41, 46]、これらの上皮細胞は落屑(フケ)として環境中に排泄されるが[22]、鶏間の水平伝播は限定的である[16, 44]。

⑤ その他必要な情報

—

資料2. 審査データの概要

II 項目ごとの生物多様性影響評価

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

HVT は健康な七面鳥を自然宿主とする非病原性ウイルスで、七面鳥間で水平伝播するが、鶏に対しても感染性があり、自然環境に遍在している。感染性ウイルス粒子は羽包上皮細胞で産生されるが、それ以外の全ての組織において細胞随伴性である。紫外線や消毒薬に対する感受性が高く自然界での生存能力は宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度で低い。

HVT は 1970 年代の初頭から MD を予防するワクチンとして市販され、MDV 血清型 1 又は血清型 2 との 2 価ワクチンや、HVT をバックボーンとするベクターワクチンを含め、現在まで安全に使用されている。宿主ウイルス HVT FC126 株は、HVT 生ワクチンとして最も一般的な株であり、HVT 一般の性状と同様に病原性がない。

IBDV VP2 蛋白質コード遺伝子は、宿主ウイルス HVT FC126 株ゲノムの【社外秘につき非開示】非翻訳領域に、宿主核酸の欠損なしに挿入されている。HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置し、【社外秘につき非開示】、調節因子の存在は知られていない。

よって、宿主ウイルス HVT FC126 株の ORF に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない。

IBDV VP2 蛋白質は IBDV の主要なウイルス構造蛋白質で、中和抗体を誘導するウイルス蛋白質である。IBDV VP2 蛋白質自体には毒性や病原性がない。

以上のことから、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性、並びに他の微生物に対する有害物質を産生する可能性は極めて低いと判断した。

本遺伝子組換えウイルスの培養細胞における増殖性に関する試験では、本遺伝子組換えウイルスは 50/60 時間後にピーク ($5.21 \sim 5.25 \times 10^6$ PFU/mL) を示したのに対し、宿主ウイルス HVT FC126 株は 50 時間後にピーク (6.79×10^6 PFU/mL) を示し、本遺伝子組換えウイルスの増殖性は、宿主ウイルス HVT FC126 株と比較して同等以下であった。

また、本遺伝子組換えウイルスを培養細胞で 8 代継代培養して得たウイルスと、継代前のウイルスの性状に差違は認められず、本遺伝子組換えウイルスの供与核酸の安定性が確認されている。

本遺伝子組換えウイルスを 18 日齢 SPF 発育鶏卵に卵内接種し、孵化後 7 又は 8 日に、脾臓及び血液中の白血球からウイルスを回収し、5 代継代したところ、臨床症状及び剖検において MD 又は IBD に関連する所見を示す鶏は認められず、病原性が復帰しなかったことが示された。また、各継代の回収ウイルスに IBDV VP2 遺伝子の挿入が確認され、遺伝子欠損のバンドは認められなかった。

さらに、回収ウイルスのウイルス量測定時に実施した二重免疫染色により、全てのプラークに VP2 蛋白質が発現していることが確認されたことから、接種動物の継代においても移入された核酸の複製物の発現が安定していることが確認された。

HVT は鶏、七面鳥及びウズラに感染することが知られているが、本遺伝子組換えウイルスを鶏、七面鳥、ウズラ及びマウスに接種した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、異常は認められなかった。MDV はそれら以外にもキジや野生水禽に感染すると報告されている。MDV が感染する動

資料2. 審査データの概要

物には HVT も感染する可能性がないとは言えないが、宿主ウイルスの感染性が確認されていない動物種において、本ウイルスに感受性の高い鶏と同等以上に、他の野生動物においてウイルスが感染、増殖、体外に排泄されるとは考えられず、感染源になり得ないと考えられる。

以上のことから、宿主ウイルス HVT FC126 株と比較して本遺伝子組換えウイルスの増殖性の上昇はみられず、供与核酸の発現の安定性が確認され、病原性復帰は見られなかった。本遺伝子組換えウイルスの排泄及び同居感染性は、宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度と判断された。

本遺伝子組換えウイルスの物理学的及び生物学的特性が、宿主ウイルス HVT FC126 株の特性を受け継いでいることを考慮すると、本遺伝子組換えウイルスは *in vitro* 及び *in vivo* における遺伝的及び表現型の安定性並びに対象動物における安全性が確認されており、内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性は考えられない。また、紫外線や消毒薬に対する感受性が高く、自然界での生存能力は宿主と同程度で、他の微生物に影響を与える可能性は宿主と同等と考えられる。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスによる他の微生物を減少させる性質（競合、有害物質の産生性等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微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質（競合、有害物質の産生性等により他の微生物を減少させる性質）に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

資料2. 審査データの概要

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換えウイルスはIBDV VP2 蛋白質を発現すること以外は、宿主ウイルス HVT FC126 株の特性を受け継いでいる。

本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株は鶏、七面鳥及びウズラに感染することが確認されている。一方、MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等、多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている。MDV が感染する動物には HVT も感染する可能性は否定できないが、宿主ウイルス HVT FC126 株の感染性が確認されていない動物種において、本遺伝子組換えウイルスに感受性の高い鶏と同等以上にウイルスが排泄されるとは考えられず、感染源になり得ないと考えられる。

IBDV VP2 蛋白質は主要なウイルス構造蛋白質で、中和抗体応答誘導を担う。IBDV VP2 蛋白質自体には毒性や病原性がないことから植物発現系等で発現させた VP2 蛋白質がワクチン抗原とする試みも行われている。

本遺伝子組換えウイルスを、鶏、七面鳥、ウズラ及びマウスに接種した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、異常は認められなかった。本遺伝子組換えウイルス又は宿主ウイルス HVT FC126 株を発育鶏卵に接種後、孵化した鶏からは限定的なウイルスの排泄及び同居鶏への水平伝播が認められたが、その程度は、HVT で既知の程度と同等であることが示された試験結果を踏まえ、野生動物への感染性については、限定的であると考えられた。また、本遺伝子組換えウイルスを接種鶏から回収し、回収したウイルスを鶏で5代継代したが、臨床症状及び剖検において MD 又は IBD に関連する所見を示す鶏は認められず、病原性が復帰しなかったことが示された。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスの病原性（野生動植物に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質）に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性（野生動植物に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質）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。

資料2. 審査データの概要

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）

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株において有害物質の産生性は認められない。

本遺伝子組換えウイルスは、宿主ウイルスの遺伝子発現に変化はなく、IBDV VP2 蛋白質を発現する以外は基本的な生物学的性状は宿主ウイルスと同一である。また、IBDV VP2 蛋白質自体に毒性や病原性はなく、既知のアレルゲンとの相同性がないことから、本遺伝子組換えウイルスに有害物質の産生性はないと考えられる。

前項に示した通り、鶏への接種試験により、本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルスと同様に有害物質の産生性がないことが確認された。

本遺伝子組換えウイルスを、鶏、七面鳥、ウズラ及びマウスに投与した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、異常は認められなかった。鶏に投与した試験では、ウイルスの排泄及び同居感染性は宿主である HVT FC126 株と同程度であった。

挿入遺伝子は、宿主ウイルス HVT FC126 株遺伝子間の非翻訳領域に、宿主核酸の欠損なしに挿入され、HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置している。隣接領域には調節因子の存在は知られていないため、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性及び有害物質を産生する可能性は極めて低い。

以上のことから、有害物質の産生性（野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質）によって影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性（野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質）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。

資料2. 審査データの概要

4 核酸を水平伝達する性質（法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）

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

MDV と HVT 間で遺伝子の水平伝搬が鶏あるいは鶏以外の動物で起こったという報告はない。MDV と HVT 間の遺伝子配列の相同性は比較的低いため、これまで両ウイルス間の組換えは認められていない。HVT は MD ワクチンとして広く用いられており、また、IBDV VP2 遺伝子のベクターとしても用いられているが、これらの中で組換えが起こったという報告はないことから、これらは起こらないか起こったとしても極めてまれであると考えられる。従って感染の対象となる野生動物は宿主ウイルス HVT FC126 株と同じであると考えられる。

HVT と IBDV はともに鶏、七面鳥及びウズラに感染するが、供与核酸を含む IBDV は 2 本鎖 RNA ウイルスであり細胞質で複製するのに対し、宿主ウイルス HVT FC126 株は 2 本鎖 DNA ウイルスであり核内で複製する。本遺伝子組換えウイルスも宿主ウイルス HVT FC126 株と同じく核内で複製することから、野外 IBDV と本遺伝子組換えウイルスとの間で組換えが起こるとは考えにくい。

MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等、多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている。MDV が感染する動物には HVT が感染する可能性がないとは言えないが、宿主ウイルス HVT FC126 株の感染性が確認されていない動物種において、宿主ウイルス HVT FC126 株に感受性の高い鶏と同等以上にウイルスが排泄されるとは考えられず、感染源になり得ないと考えられる。HVT と MDV 間の組換えは重感染阻害（既に感染した細胞への同種のウイルスの再感染を防ぐこと）が生じること等から、両者の組換えの可能性が低い一つの要因と考えられる。

HVT を含め MDV 遺伝子は、感染した細胞の染色体に組込まれることがあり、HVT 組込みサイトは鶏染色体末端のテロメア反復配列に認められる。HVT ゲノムは既に鶏染色体テロメア反復配列のホモログを有しているが、それらは進化の過程で感染鶏のゲノムから獲得したと考えられている。テロメア領域は遺伝子発現に関して直接的な機能を有さず、HVT がこの領域へ組込まれたとしても、HVT の遺伝子調節因子が鶏ゲノム上の主要な遺伝子と隣接していないため、鶏ゲノム遺伝子の発現を変化させる可能性は低い。

既存のワクチン株を含む HVT と本遺伝子組換えウイルスとの間の組換えは、理論的には考えられるが、既に野外で使用されている IBDV VP2 遺伝子組換えワクチンと HVT ワクチン株との間で組換えが実際に起こったという報告はなく、MDV、IBDV を含め HVT 以外の微生物に核酸を水平伝搬する可能性はない。

以上より、本遺伝子組換えウイルスの核酸が他の野生動植物等に水平伝播する性質（法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達する性質）はないものと考えられる。すなわち、核酸を水平伝達する性質によって影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

資料2. 審査データの概要

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質（法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達する性質）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。

5 その他の性質（生態系の基盤を変化させることを通じて間接的に野生動植物等に影響を与える性質等生物多様性影響評価を行うことが適切であると考えられるもの）

上記のほかに、本遺伝子組換えウイルスに関して生物多様性影響の評価を行うことが適切であると考えられる性質はないと判断した。

資料2. 審査データの概要

III 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（競合、有害物質の産生等により他の微生物を減少させる性質）については、

- ① 本遺伝子組換えウイルスの遺伝子は安定しており、宿主ウイルス HVT FC126 株と比較して培養細胞における増殖性は同等以下であり、鶏における体内動態、排泄および同居感染性は宿主ウイルスと同程度であり、アレルゲンとなる物質を含め有害物質を産生する可能性は低いこと、
- ② 自然界での残存性は宿主ウイルスと同程度で、消毒薬に対する感受性が高く自然界での残存性は低いことから、他の微生物に影響を与える可能性は宿主ウイルスと同程度であること、
- ③ 宿主ウイルスと他の微生物との交雑性は報告されておらず、他の微生物に影響を与える可能性は宿主ウイルスと同程度であると考えられることから、
 - ア. 挿入遺伝子座への操作による生物学的影響は予測されない
 - イ. IBDV VP2 蛋白質自体には毒性、病原性はない
 - ウ. 移入された核酸の複製物の発現が安定しており、病原性の復帰は見られない
 - エ. 感染性が確認されていない動物種において感染源になり得ない

第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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ものと判断した。

病原性（野生動植物に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質）については、本遺伝子組換えウイルスの野生動物に対する伝播力は宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度であり、宿主ウイルス HVT FC126 株と同様に病原性はないと考えられること、鶏への接種試験においてウイルスの排泄及び同居感染性は宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度で限定的であり、安全性が確認されていること、病原性復帰の評価に係る試験において鶏の体内でウイルスの病原性は復帰されないことが確認されたことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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（野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質）については、宿主ウイルス HVT FC126 株の遺伝子間非翻訳領域に宿主ゲノムの欠損なしに、IBDV VP2 蛋白質コード遺伝子が挿入されており、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性は極めて低いと考えられること、かつ、IBDV VP2 蛋白質コード遺伝子の挿入サイトは安定していて、新たな ORF による有害物質産生の可能性はなく、挿入遺伝子により発現するアミノ酸配列にアレルゲンと相同な配列がないこと、鶏への接種試験においてウイルスの排泄及び同居感染性は宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度で限定的であることから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、アレルゲンを含め有害物質の産生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。

核酸を水平伝播する性質（法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達する性質）については、

MDV と HVT 間の遺伝子配列の相同性は比較的低いため、これまで両ウイルス間の組換えは認められていない。IBDV は 2 本鎖 RNA ウイルスで細胞質で複製するのに対し、宿主ウイルス HVT FC126 株は 2 本鎖 DNA ウイルスで核内で複製する。本遺伝子組換えウイルスも宿主ウイルス HVT FC126 株と同じく核内で複製することから、野外 IBDV と本遺伝子組換えウイルスとの間で組換えが起こるとは考えにくい。

資料2. 審査データの概要

感染の対象となる動物は宿主ウイルス HVT FC126 株と同じであると考えられ、HVT 遺伝子が感染動物の染色体のテロメア部分に組み込まれる可能性は排除できないものの、感染動物の遺伝子の発現を変化させる可能性は低く、HVT 以外の微生物に核酸を水平伝達する可能性はない。既存の HVT ワクチン等と本遺伝子組換えウイルスとの間の組換えは、理論的には考えられるが、既に野外で使用されている HVT を宿主とする IBDV VP2 蛋白質発現遺伝子挿入ワクチンと、HVT ワクチン株との間で組換えが起こったという報告はない。

HVT と MDV 間の組換えは重感染阻害が生じることが考えられる等から、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達す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かぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

資料2. 審査データの概要

別紙リスト

- 別紙 1 1-1. Summary Information Format: Bursal Disease-Marek's Disease Vaccine, Serotype 3, Live Marek's Disease Vector (Product Code: 1A88.R3)
1-2. 伝染性ファブリキウス嚢病 - マレック病血清型 3 ワクチン、生マレック病ウイルスベクター (製品コード : 1A88.R3)
- 別紙 2 2-1. Non-target animal safety for HVT-IBD in Mice (Study No. 【社外秘につき非開示】)
2-2. マウスにおける本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の非対象動物安全性試験
- 別紙 3 3-1. Non-target animal safety for HVT-IBD in Quail (Study No. 【社外秘につき非開示】)
3-2. ウズラにおける本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の非対象動物安全性試験
- 別紙 4 4-1. Non-target animal safety for HVT-IBD in Turkeys (Study No. 【社外秘につき非開示】)
4-2. 七面鳥における本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の非対象動物安全性試験
- 別紙 5 5-1. Backpassage of HVT-IBD and Assessment of Reversion to Virulence Confirmation (Study No. 【社外秘につき非開示】)
5-2. 本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の戻し継代による病原性復帰の評価
- 別紙 6 6-1. Study report, 10× Target animal safety – HVT-IBD (Study No. 【社外秘につき非開示】)
6-2. Contributing Scientist Report – Pathology (Study No. 【社外秘につき非開示】)
6-2. 本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の高用量 (×10) 対象動物安全性試験
- 別紙 7 7-1. Study report Amendment 01 (Study No. 【社外秘につき非開示】)
7-2. Study report, Dissemination within the animal and environmental survival of HVT-IBD (Study No. 【社外秘につき非開示】)
7-3. 本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の体内分布および環境中における生残性
- 別紙 8 8-1. Evaluation of the Shed and Spread of HVT-IBD (Study No. 【社外秘につき非開示】)
8-2. 本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の排泄および拡散性の評価
- 別紙 9 9-1. Herpes Virus of Turkeys – Infectious Bursal Disease Viral (HVT-IBD) Survivability at 25°C and 30°C (Study No. 【社外秘につき非開示】)
9-2. 七面鳥ヘルペスウイルス - 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD) の 25°C および 30°C における生存性
- 別紙 10 10-1. HVT-IBD to HVT Backbone Growth Comparison (Study No. 【社外秘につき非開示】)
10-2. 本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD と宿主ウイルス HVT FC126 株の培養細胞における増殖性の比較
- 別紙 11 本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD と宿主ウイルス HVT FC126 株の比較

資料2. 審査データの概要

別紙 1. 伝染性ファブリキウス嚢病 - マレック病血清型 3 ワクチン、生マレック病ウイルスベクター (製品コード : 1A88.R3)

Summary Information Format

Bursal Disease-Marek's Disease Vaccine Serotype 3, Live Marek's Disease Vector (Product Code: 1A88.R3)

本解析の目的は、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) 【社外秘につき非開示】由来の VP2 遺伝子発現カセットを含むマレック病ウイルス血清型 3 (HVT) ウイルスを用いた鶏における野外での実験的ワクチネーションを実施する計画に関連するリスクを評価し、ワクチンの市販に当たって鶏における使用認可を支持するデータの CVB (Center for Veterinary Biologics) による承認を確実にすることである。

注) 本資料は Summary Information Format の内容に基づき第一種使用規程承認申請書の内容に合わせて構成し直したものである。

資料2. 審査データの概要

1. 遺伝子組換え微生物「伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子挿入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9」の作出過程

1-1. VP2 遺伝子発現カセットトランスファープラスミド「pHVT-IBD #9」の作製方法と本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9 の作出方法

(1) 【社外秘につき非開示】

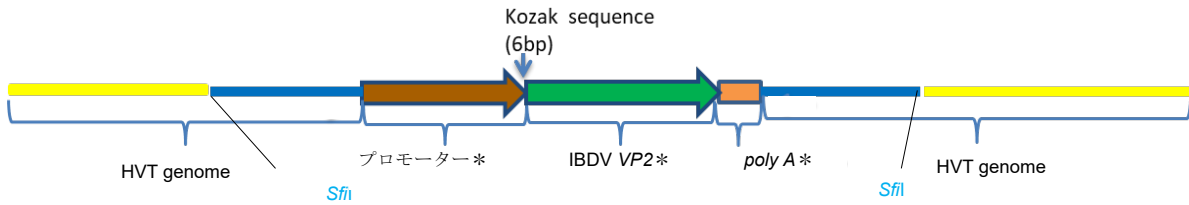
(2) 【社外秘につき非開示】

(3) 【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

(4) VP2発現カセットトランスファープラスミドpHVT-IBD #9の作製

HVT ゲノムの一部を上流と下流に含んだ IBDV 【社外秘につき非開示】由来 VP2 遺伝子の発現カセット (IBDV VP2 遺伝子上流にプロモーター*、下流に poly A*) を合成し (図 1-6)、pMA-RQ-Bs ベクター (GeneArt, Invitrogen、米国) (図 1-2) にクローニングし、VP2 トランスファープラスミド pHVT-IBD #9 (図 1-7、図 1-8) を作製した。



* : 社外秘につき一部非開示

図 1-6. IBDV VP2 遺伝子発現カセットの構成

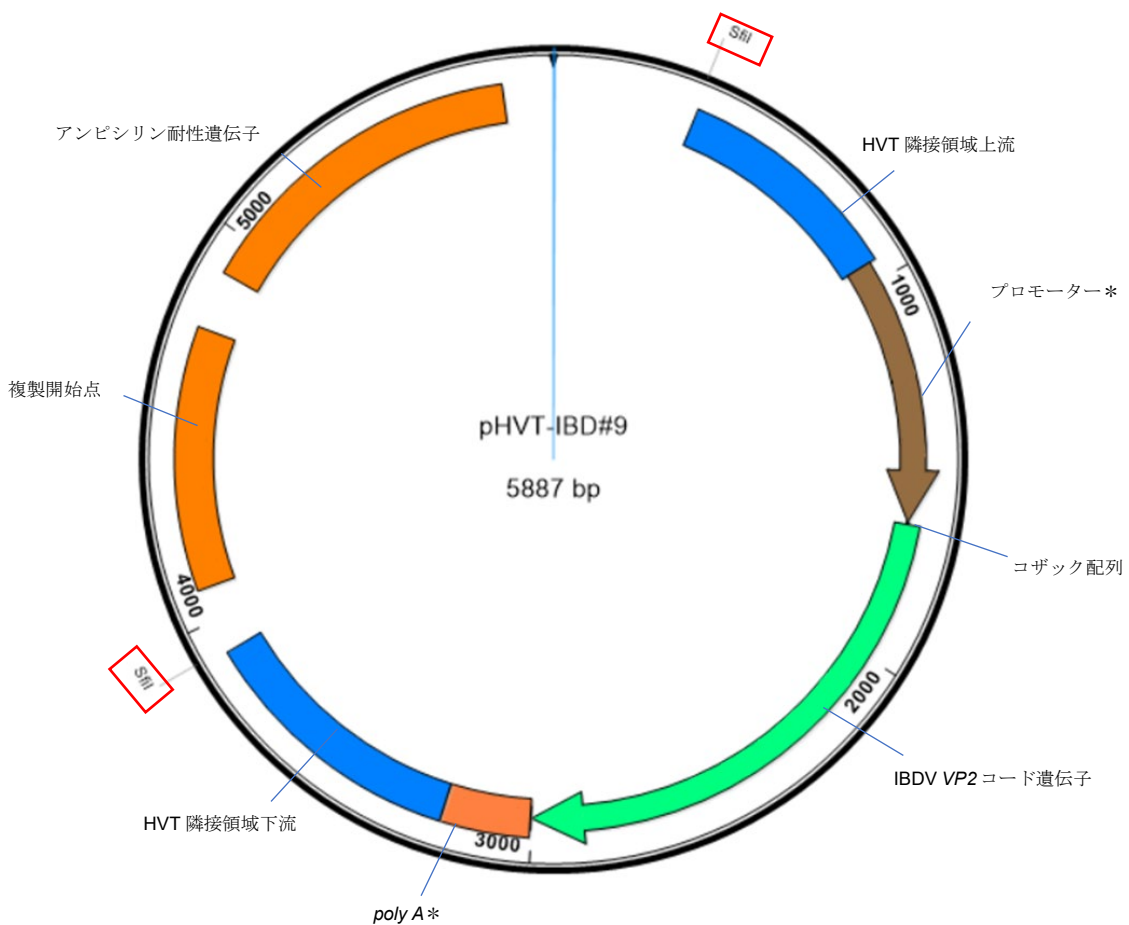


図 1-7. 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットトランスファープラスミド「pHVT-IBD #9」
HVT 隣接領域上流*、プロモーター*、コザック配列 (6 bp)、IBDV VP2 遺伝子*、poly A* 及び HVT 隣接領域下流* を含む【社外秘につき非開示】DNA 断片を合成し、pMA-RQ-Bs ベクター (GeneArt, Invitrogen、米国) の SfiI サイトにクローニングした。

* : 社外秘につき一部非開示

資料2. 審査データの概要

【社外秘につき非開示】

図1-8. トランスファープラスミドpHVT-IBD #9におけるIBDV VP2遺伝子発現カセットの塩基配列

(5) 本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9 の作製

【社外秘につき非開示】

図 1-9. 本遺伝子組換えウイルス「HVT-IBD #9」の調製

資料2. 審査データの概要

1-2. 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子の情報

学名	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (Infectious Bursal Disease Virus) ビルナウイルス科 (Birnaviridae) アビビルナウイルス属 (Avibirnavirus)
株名	【社外秘につき非開示】
供与核酸	VP2蛋白質コード遺伝子 (1362 bp、454 aa)

供与核酸の由来である IBDV は、2 分節から成る全長 6.1 kb の 2 本鎖 RNA ウイルスで、VP1~VP5 のウイルス蛋白質をコードする(図 1-10)。HVT に挿入した供与核酸は IBDV VP2 蛋白質をコードする(図 1-11)。VP2 蛋白質は主要なウイルス構造蛋白質であり、ウイルス蛋白質の約 50% を占める。VP2 蛋白質は表面に露出し、中和抗体応答を誘導する唯一のウイルス蛋白質である[1]。VP2 蛋白質は親水性の可変領域を有し、最も露出する部分に位置する。VP2 蛋白質の露出領域はアミノ酸 206~350 の間にあり、宿主の中和抗体応答の誘導に関与する[2]。IBDV VP2 遺伝子発現カセットは、本遺伝子組換えウイルス作出に当たって、HVT ゲノムの【社外秘につき非開示】に挿入するために使用された。IBDV VP2 遺伝子は主要構造タンパク質をコードし、主要な防御抗原であることが示されている。また、米国既承認の HVT ベクター IBD ワクチンに用いられ、安全に使用されている[3]。

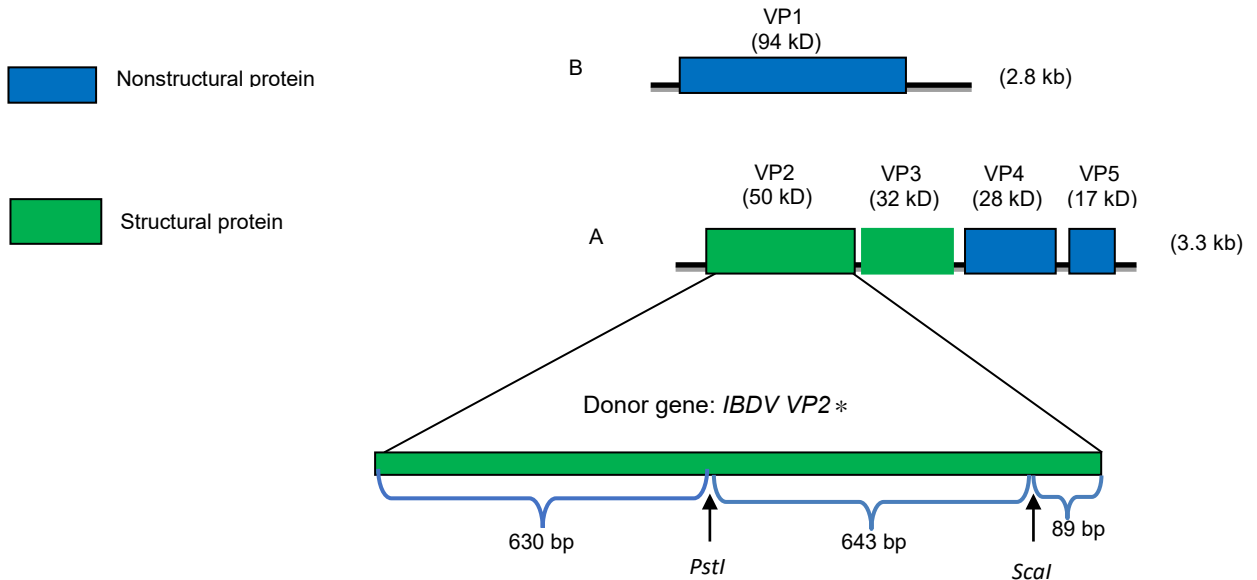


図 1-10. 供与核酸 IBDV 【社外秘につき非開示】由来 VP2 遺伝子
供与核酸はトランスファープラスミド pHVT-IBD #9 の一部として合成された。
IBDV VP2 蛋白質は 454 アミノ酸 (1,362 bp) から成る。
* : 社外秘につき一部非開示

IBDV VP2 ORF の塩基配列

【社外秘につき非開示】

IBDV VP2 推定アミノ酸配列

【社外秘につき非開示】

図 1-11. 供与核酸 IBDV (【社外秘につき非開示】) VP2 遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列

2. 遺伝子組換えウイルスにおける挿入遺伝子の確認

2-1. 【社外秘につき非開示】

2-2. 蛋白質発現の確認

挿入遺伝子による VP2 蛋白質の発現を、抗 IBDV VP2 蛋白質ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析により確認した（図 2-2）。本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD #9 に想定される約 50 kDa のバンドが認められた。

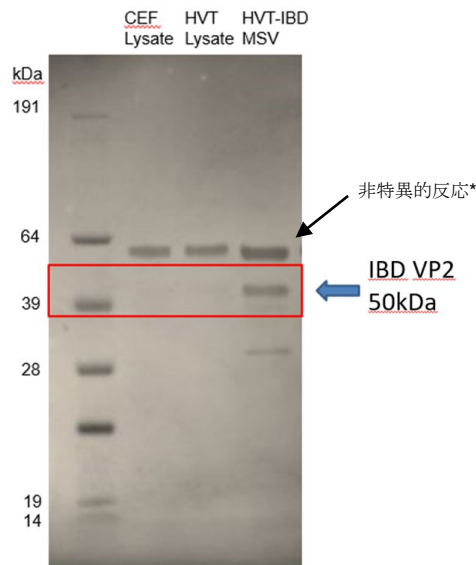


図 2-2. ウェスタンブロットによる挿入遺伝子蛋白質発現の確認

* ウェスタンブロットに使用した IBDV VP2 蛋白質に対する抗体はポリクローナル抗体であり、バンドは HVT-IBD #9 株だけでなく CEF 及び HVT ライセートにおいても認められたことから、CEF 細胞の蛋白質に反応した非特異的反応と考えられる。

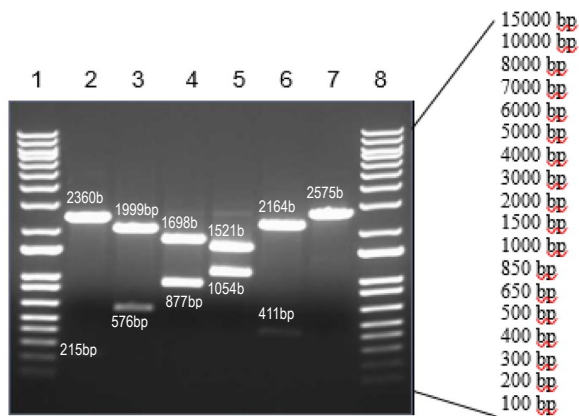
資料2. 審査データの概要

2-3. PCR 及び PCR 産物の制限酵素切断による挿入遺伝子の確認

IBDV VP2 遺伝子発現カセットの外側に位置するプライマーセット（全 IBDV VP2 遺伝子発現カセット領域をカバーする）を用いて PCR を実施し、その産物に制限酵素切断解析を行った。2575 bp の PCR 産物を 5 種の制限酵素で切断したところ、それぞれ推定される DNA 断片が認められた（図 2-3、2-4）。

【社外秘につき非開示】

図 2-3. IBDV VP2 遺伝子挿入部分の制限酵素地図



レーン	制限酵素	断片サイズ (bp)	
1、8		サイズマーカー	
2	<i>SpeI</i>	215	2360
3	<i>NcoI</i>	576	1999
4	<i>HindIII</i>	877	1698
5	<i>PstI</i>	1521	1054
6	<i>Scal</i>	2164	411
7		未切断産物 (2,575 bp)	

PCR プライマーセット A

- プライマーSiteB-F1: 5'- TAGAGGGGGTATGTTTCCACTGC -3'
- プライマーSiteB-R1: 5'-GTCATAACATCATCTGCTAAAG -3'

図 2-4. PCR 産物及びその制限酵素切断産物

資料2 . 審査データの概要

3. 遺伝子組換えウイルスにおける供与核酸の安定性

3-1. 遺伝的安定性

本遺伝子組換えウイルスの遺伝的安定性を、マスターシードウイルス (MSV ; 継代数 = n) 及びその細胞継代 (n+3~6) について、表 3-1 の 4 種の PCR プライマーセットを用いて評価した。これらのプライマーの位置を図 3-1 に示す。全ての継代についてそれぞれ予想されるバンドのみが確認された。遺伝子挿入前の宿主ウイルス (HVT FC126 株) についても予想されるバンドが確認された (図 3-2)。また、プライマーセット B (SiteB-F2 + SiteB-R2) を用いた MSV と MSV+5 の PCR 産物 (2544 bp) についてオリジナルの遺伝子配列 (GenBank NC_002641.1) と比較したところ、すべて一致していることが確認された。

表 3-1. 遺伝的安定性の評価に用いた PCR プライマー

【社外秘につき非開示】

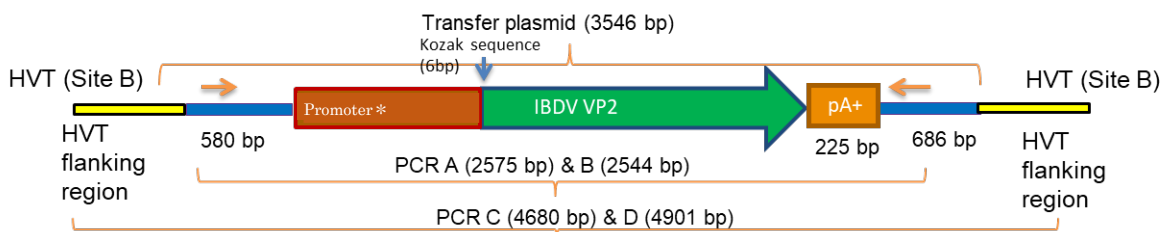
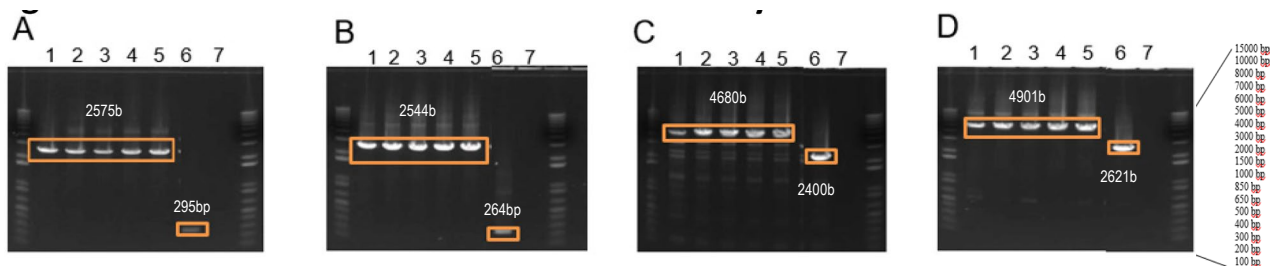


図 3-1. PCR プライマーの位置及びその推定産物

* : 社外秘につき一部非開示



図番号	プライマーセット	推定 PCR 産物 (bp)	
		HVT-IBD #9	HVT
A	SiteB-F1 + SiteB-R1	2575	295
B	SiteB-F2 + SiteB-R2	2544	264
C	SiteB FL-F1 + SiteB FL-R1	4680	2400
D	SiteB FL-F2 + SiteB FL-R2	4901	2621

レーン	サンプル
1	MSV
2	MSV+3
3	MSV+4
4	MSV+5
5	MSV+6
6	HVT
7	陰性対照

図 3-2. 本遺伝子組換えウイルスにおける供与核酸の PCR による遺伝的安定性

資料2. 審査データの概要

3-2. 表現型の安定性

本遺伝子組換えウイルスはIBDV VP2蛋白質を発現する。二重免疫蛍光染色により、バックボーンHVT FC126株と挿入遺伝子による蛋白質発現を確認できる。抗HVTマウスモノクローナル抗体L78.2 [4]及び抗IBDV鶏ポリクローナル抗体で反応させ、各抗体に対する蛍光標識抗体により染色することによって、遺伝子組換えウイルスではHVT（緑色）及びIBDV（赤色）の両方に対する蛍光が確認できる。

MSV (n) 及びその細胞継代 (n+1~8) について、各継代につき200プラーク以上を試験したところ、100%のプラークで両抗原が陽性であることが確認された（表3-2）。

表3-2. 本遺伝子組換えウイルスHVT-IBD #9株プラークの二重免疫染色結果

ウイルス	観察プラーク数	HVT-IBD 両抗原 陽性プラーク率 (%)
MSV	1457	100
MSV+1	913	100
MSV+2	1126	100
MSV+3	293	100
MSV+4	924	100
MSV+5	964	100
MSV+6	248	100
MSV+7	464	100
MSV+8	536	100

参考文献

1. Azad, A. A. *et al.*, 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161: 145-152.
2. Letzel, T. *et al.*, 2007. Molecular and structural basis for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, 81: 12827-12835.
3. Le Gros, F. X. *et al.*, 2009. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine*, 27: 592-596.
4. Lee, L. F. *et al.* 1983. Monoclonal antibody with specificity for three different serotypes of Marek's disease virus in chickens. *J. Immunology*. 130(2): 1003-1006.

資料2. 審査データの概要

別紙2. マウスにおける HVT-IBD の非対象動物安全性

Non-target animal safety for HVT-IBD in Mice (【社外秘につき非開示】)

目的

HVT-IBD マスターシードウイルス (MSV) の安全性を、非対象動物であるマウスにおいて確認する。

材料及び方法

6週齢のマウス 24 匹を供試し、10 倍用量の HVT-IBD MSV を 8 匹のマウスに 0.2 mL ずつ皮下接種した (T02)。同様に溶解用液を接種した 12 匹を対照群 (T01) とした。1 ボックス当たり 3 匹を飼育し、T02 の 2 匹に対し非接種群 (T03) の 1 匹を同居させた。D21 まで観察し、D21 に剖検し病理学的検査を実施した。

群設定

群	接種材料	用量 (PFU/0.2mL)	投与経路	ボックス数	マウス匹数 /ボックス	供試頭数
T01	溶解用液	-	皮下	4	3	12
T02	HVT-IBD (K012618MSV)	117,277	皮下	4	2	8
T03	非接種同居	-	-		1	4

試験スケジュール

試験日	実施項目
D-7	5 週齢マウスを導入
D-3	個体識別及び配置
D0	皮下投与及び配置
D0-21	臨床症状の観察
D21	剖検及び病変の観察

結果

死亡

観察期間中、死亡は認められなかった。

剖検

D21 の剖検において何れの群においても肉眼病変は認められなかった。

臨床症状

21 日間の観察期間中、何れの群においても異常は認められなかった。

有害事象・脱落

21 日間の観察期間中、何れの群においても有害事象及び脱落は認められなかった。ヒトへの暴露もなかった。

考察・結論

何れの群においても病変、臨床症状又は死亡は観察されなかったことから、HVT-IBD MSV はマウス及び同居マウスに対して安全であると考えられた。

資料2. 審査データの概要

別紙3. ウズラにおける HVT-IBD の非対象動物安全性試験

Non-target animal safety for HVT-IBD in Quail (【社外秘につき非開示】)

目的

HVT-IBD マスターシードウイルス (MSV) の安全性を、非対象動物であるウズラにおいて確認する。

材料及び方法

24 日齢のウズラ 50 羽を供試し、10 倍用量の HVT-IBD MSV を 20 羽のウズラに 0.2 mL ずつ皮下接種した (T02)。同様に溶解用液を 0.2 mL ずつ接種した 25 羽を対照群 (T01) とした。T02 には非接種の 5 羽 (T03) を同居させた。D35 まで観察した後、剖検し、病理学的検査を実施した。

群設定

群	接種材料	用量 (PFU/0.2mL)	投与経路	ペン数	羽数/ペン	供試羽数
T01	溶解用液	-	皮下	1	25	25
T02	HVT-IBD (K012618MSV)	117,277	皮下	1	20	20
T03	非接種同居	-	-		5	5

試験スケジュール

試験日	実施項目
D - 1	23 日齢ウズラを導入、個体識別
D0	皮下投与及び配置
D0 - 35	臨床症状の観察
D35	剖検及び病変の観察

結果

死亡

観察期間中、死亡は認められなかった。

臨床症状

35 日間の観察期間中、何れの群においても異常は認められなかった。

有害事象・脱落

35 日間の観察期間中、何れの群においても有害事象及び脱落は認められなかった。ヒトへの暴露もなかった。

剖検

マレック病に関しては、虹彩における色素の欠乏 (gray eye)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、腺胃、膵臓、生殖腺、ファブリキウス嚢及び腸を含む内臓、胸筋及び皮膚の腫瘍病変、神経の炎症、並びに胸腺の萎縮について観察した。

伝染性ファブリキウス嚢病については、ファブリキウス嚢病の病変 (浮腫、出血、萎縮) を観察した。

D35 の剖検においてどの群においても病変は認められなかった。

考察・結論

何れの群においても肉眼病変、臨床症状又は死亡は観察されなかったことから、HVT-IBD MSV はウズラ及び

資料2. 審査データの概要

同居ウズラにおいて安全であると考えられた。

資料2. 審査データの概要

別紙 4. 七面鳥における HVT-IBD の非対象動物安全性試験

Non-target animal safety for HVT-IBD in turkeys (【社外秘につき非開示】)

目的

HVT-IBD マスターシードウイルス (MSV) の安全性を、非対象動物である七面鳥において確認する。

材料及び方法

2.5 週齢の七面鳥 60 羽を供試し、10 倍用量の HVT-IBD MSV を 20 羽の七面鳥に 0.2 mL ずつ皮下接種した (T02)。同様に溶解用液を 0.2 mL ずつ接種した 30 羽を対照群 (T01) とした。T02 には非接種の 10 羽 (T03) を同居させた。D35 まで観察した後、剖検し、病理学的検査を実施した。

群設定

群	接種材料	用量 (PFU/0.2mL)	投与経路	ペン数	羽数/ ペン	供試羽数
T01	溶解用液	-	皮下	1	30	30
T02	HVT-IBD (K012618MSV)	69,228	皮下	1	20	20
T03	非接種同居	-	-		10	10

試験スケジュール

試験日	実施項目
D -19	1 日齢七面鳥を導入
D -1	2.5 週齢の七面鳥に個体識別
D0	皮下投与及び配置
D0 - 35	臨床症状の観察
D35	剖検及び病変の観察

結果

死亡

観察期間中、T01 群の 1 羽 (番号 177) が D6 に、T02 群の 1 羽 (番号 168) が D7 に死亡した。剖検の結果、死因は両羽とも心不全 (心肥大) と判断されたが、マレック病またはファブリキウス嚢病に由来すると思われる病変なかった。

臨床症状

35 日間の観察期間中、何れの群においても死亡した 2 羽を除き、異常は認められなかった。

有害事象・脱落

35 日間の観察期間中、何れの群においても死亡した 2 羽を除き、有害事象及び脱落は認められなかった。

剖検

マレック病病変に関しては、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、腺胃、脾臓、生殖腺、胸腺、及び腸を含む内臓、並びに胸筋及び皮膚の表面又は内部の腫瘍、虹彩における色素の欠乏 (gray eye)、神経 (迷走神経、腕神経叢及び坐骨神経叢) の炎症、並びにファブリキウス嚢及び胸腺の萎縮について観察した。

ファブリキウス嚢病の病変については、ファブリキウス嚢の水腫、出血及び萎縮を観察した。

試験期間中に死亡した 2 羽及び D35 の剖検において、何れの群においてもマレック病又はファブリキウス嚢

資料2. 審査データの概要

病に関連する病変は認められなかった。

D35の剖検においてT02群の1羽(番号206)の腸にシストが認められサンプルを採取したが、マレック病又はファブリキウス嚢病と関係しないと判断され、病理組織学的検査は行わなかった。

群	死亡数/ 供試数	臨床症状発現数/ 供試数	剖検所見陽性数/ 供試数	
			マレック病	ファブリキウス嚢病
T01	1*/30	1*/30	0/30	0/30
T02	1*/20	0/20	0/20	0/20
T03	0/10	0/10	0/10	0/10

* T01の1羽(番号177)がD6に心不全の症状が、T02の1羽(番号168)がD7に死亡が認められた。剖検の結果、両羽ともマレック病又はファブリキウス嚢病に関連する病変は認められず、死因は心不全(心肥大)と判断された。

考察・結論

観察期間中、T01群の1羽(番号177)がD6に心不全の症状が、T02群の1羽(番号168)がD7に死亡が認められた。死因は両羽ともマレック病又はファブリキウス嚢病に関連しない心不全と判断された。七面鳥における心筋症の原因は不明だが1~4週齢時に起こることが知られている[1]。

何れの群においてもマレック病及びファブリキウス嚢病に関連した病変、臨床症状又は死亡は観察されなかったことから、HVT-IBD MSVは七面鳥及び同居七面鳥において安全であると考えられた。

文献

1. Riddle, C. Developmental, metabolic and miscellaneous disorders. In Diseases of Poultry 9thed., Calnek, BW editor, Iowa State University Press (1991).

資料2. 審査データの概要

別紙 5. HVT-IBD の戻し継代による病原性復帰の評価

Backpassage of HVT-IBD and Assessment of Reversion to Virulence Confirmation

(【社外秘につき非開示】)

目的

VICH ガイドライン 41 に準じて、HVT-IBD マスターシードウイルスを SPF 発育鶏卵に卵内接種により鶏で 5 代継代して病原性復帰について評価するとともに、*in vivo* 継代における挿入遺伝子 VP2 の安定性を確認する。[4 頁 1. OBJECTIVES]

材料及び方法

マスターシードウイルス (MSV) を 18 日齢の SPF 発育鶏卵 (E18) に接種し、孵化後 7 日に血液および脾臓からウイルスを回収し、次代継代用材料とした。同様に孵化後 7~8 日の雛からウイルスを回収し、さらに 4 代、SPF 鶏での継代を行った。継代 5 代目 (P05) について、ウイルスを回収後、残りの 9 羽を Day 21 まで臨床症状を観察し、剖検して病原性復帰について評価した。剖検ではマレック病 (MD) および伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) の両方について関連肉眼病変を評価した。[3 頁 STUDY SUMMARY]

接種材料

継代数 (群)	P01	P02	P03	P04	P05
接種材料	HVT-IBD MSV	継代 1 代目の脾臓および血液	継代 2 代目の脾臓および血液	継代 3 代目の脾臓および血液	継代 4 代目の脾臓および血液
ロット番号	K012618MSV	P02 inoculum	P03 inoculum	P04 inoculum	P05 inoculum
接種時齢	18 日齢発育鶏卵 (E18)				
接種経路	卵内				
用量 (PFU/卵) *	42,151	1,767	1,153	1,363	354
接種量	0.1 mL/卵	0.15 mL/卵	0.15 mL/卵	0.2 mL/卵	0.1 mL/卵
保存条件	≤ -100°C (液体窒素気相)	継代材料 (脾臓及び血液白血球) は次代継代用に E18 の胚へ接種する前に保存しなかった。残りの材料は ≤ -100°C (液体窒素気相) で保存した。			

* 実測値。P01 は 25,000 PFU をターゲットとした。

[5 頁 4. INVESTIGATIONAL VETERINARY AND CONTROL PRODUCTS]

群設定

継代数 (群)	接種材料	用量 (PFU/卵)	接種卵数	供試羽数	サンプル採取羽数 (Day 7/8)	個体番号 (ペン番号)
P01	HVT-IBD MSV	42,151	30	25	25	101-125 (1A)
P02	P02 inoculum (P01 回収ウイルス)	1,767	30	25	25	126-150 (1B)
P03	P03 inoculum (P02 回収ウイルス)	1,153	30	25	25	151-175 (2A)
P04	P04 inoculum (P03 回収ウイルス)	1,363	30	25	25	176-200 (2B)
P05	P5 inoculum (P04 回収ウイルス)	354	40	39 ¹⁾	29 ²⁾	201-239 (3A, 3B)

各ペンを実験単位とした。継代数 P01-P04 について反復を設けなかった。P05 は 2 ペン (反復) を設定した。

1 ペンにつき最大 25 羽まで収容した。

1) 孵化した健康な雛に番号を付けた。孵化時に 10 羽 (各ペンにつき 5 羽) を Day 21 までの観察用とした。

2) 観察用としなかった雛は Day 7 のサンプル採取用とした。

[6 頁 5. ANIMALS、7 頁 6.1. Study Design Summary、6.2. Experimental Unit/Replication、7、8 頁 6.3. Allotment/Randomization]

資料2. 審査データの概要

試験スケジュール

試験日	群	実施項目
D-3	P01-P05	E18 に卵内接種 (P01-04 : 30 個、P05 : 40 個)
D0		孵化、個体識別 (P01-04 : 25 羽、P05 : 39 羽)、ペンに収容
D0 - D7/D8		臨床症状の観察
D7/D8		ヒナを安楽殺し、採血及び脾臓サンプルの無菌的採取
D21	P05	MD 及び IBD の観察用に残しておいた雛 (10 羽) の剖検

[9~11 頁 7.1. Schedule of Events]

試験の概要

試験項目	説明
初代継代	HVT-IBD MSV を E18 に接種した。孵化後 7 日に雛を安楽殺し、全羽から脾臓及び血液を採取した。脾臓はプールし、ホモジネートして白血球を回収した。血液サンプルはプールし、白血球を回収した。脾臓と血液サンプルから得られた白血球をプールした (P01 inoculum)。
その後の連続継代	P01 inoculum を E18 に卵内接種することにより P02 を作製し、戻し継代を計 5 回繰り返した。 E18 に前継代材料を卵内経路により接種し、孵化後 7-8 日目に雛を安楽殺し、全羽から脾臓及び血液サンプルを採取し、初代と同様に処理した。この細胞浮遊液を次代への接種に使用した。また、CEF 細胞培養により増殖させ、PCR 分析に使用した。 回収した P05 材料 (P04 材料を接種した卵から孵化した雛から得られた脾臓及び血液由来白血球材料) は次の継代を行わなかった。
挿入遺伝子の性状	各継代 (P01 - P05) の回収ウイルスについて、蛍光抗体法 (IFA) によって表現型を、PCR によって遺伝的性状を解析した。接種材料とした各回収ウイルスの含有量を測定し、IFA により抗 HVT 及び IBDV 抗体を用いて、特異蛍光の発現を確認した。 さらに、遺伝的性状解析用に CEF で増殖したウイルスから DNA を抽出し、PCR によって VP2 挿入遺伝子の安定性を評価した。 50 ng の DNA、20 µM の上流及び下流プライマー (4 セット)、12.5 µL の 2xRedTag PCR Mix (Sigma P0982) から成る PCR 反応液とともに総量 25 µL とした。PCR の温度設定は以下の通りとした ; 最初に 94°C 2 分、次に 94°C 15 秒、55-57°C 30 秒、68°C 8 分を 40 サイクル、最後に 68°C 8 分とし、装置から取り出すまで 4°C で保存した。PCR 反応液を、1.2% アガロースゲルを用いて電気泳動した。
臨床観察	発症、死亡、重篤な MD 関連症状 (特に麻痺および沈鬱)、並びにその他の MD 又は IBD に関連した症状について毎日観察した。 死亡した鶏は剖検し、MD に起因する病変を含め異常がないか観察した。
一般健康観察	一般健康状態について毎日観察した。
剖検	MD 及び IBD に起因する病変を含め異常がないか剖検した鶏について評価した。

[11~13 頁 7.2. Summary of Procedures]

資料2. 審査データの概要

サンプル及び分析

サンプル	数	試験
接種材料 (P01-P05)	5	PCR: 各接種材料を CEF 培養で増殖した。DNA を抽出し、遺伝子挿入部位の外側に位置するプライマーセットを用いて PCR を実施した。
		プラークアッセイによりウイルス量を測定し (3 反復)、HVT 及び IBDV の発現について IFA にて検出した (3 反復)。
P05 回収ウイルス (血液及び脾臓由来白血球)	1	PCR: 継代 5 代目の回収ウイルスを CEF 培養で増殖させた。DNA を抽出し、遺伝子挿入部位の外側に位置するプライマーセットを用いて PCR を実施した。
		プラークアッセイによりウイルス量を測定し (3 反復)、HVT 及び IBDV の発現について IFA により確認した。
		残りのウイルスは凍結用培地中で凍結保存した。
血液	129	個体別に採取し、各継代について白血球をプールし、次継代用接種材料とした。
脾臓	5	各継代について白血球をプールし、次継代用接種材料とした。

[13 頁 8. SAMPLE AND LABORATORY TESTING]

結果

ウイルス回収 [15 頁 14.4.1. Virus Recovery]

接種材料のウイルス量測定結果を表に示す。すべての HVT プラークは IBDV VP2 蛋白質発現陽性であった。

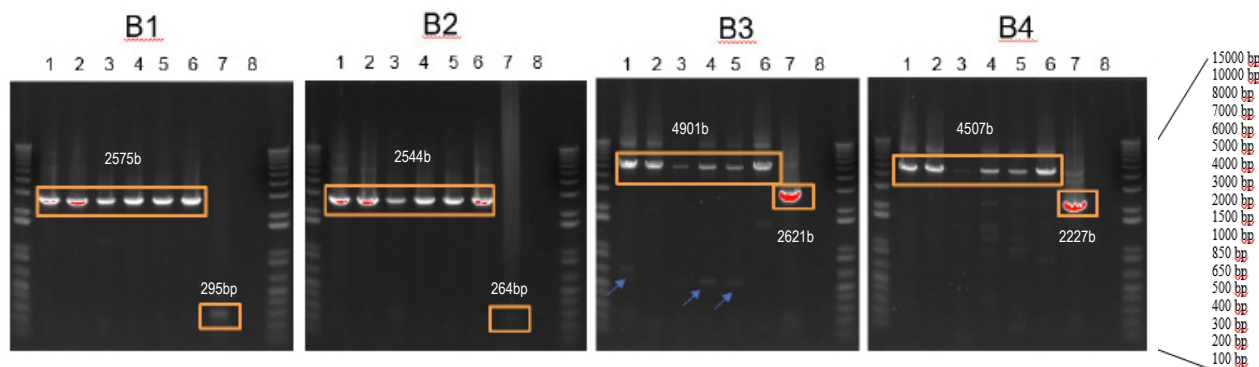
群	幾何平均 (PFU/mL)		幾何平均 (PFU/dose)	
	HVT	IBDV	HVT	IBDV
P01 接種材料	421,507	421,507	42,151	42,151
P02 接種材料	11,781	11,781	1,767	1,767
P03 接種材料	7,690	7,690	1,153	1,153
P04 接種材料	6,815	6,815	1,363	1,363
P05 接種材料	3,544	3,544	354	354
P05 回収ウイルス	13,736	13,736	NA	NA

挿入遺伝子の安定性 [16 頁 14.4.2. Insert Stability]

各継代から回収されたウイルスを CEF 培養により増幅させ、PCR によって挿入遺伝子を確認したところ、全ての試料で陽性であることが確認された。挿入遺伝子の全長のみが認められ、欠失やリバータントを示唆する短いバンドは認められなかった。

群	ウイルス回収元	結果
P02 接種材料	P01	陽性
P03 接種材料	P02	陽性
P04 接種材料	P03	陽性
P05 接種材料	P04	陽性
P05 回収ウイルス	P05	陽性

資料2. 審査データの概要



PCR:

- 94°C 2 min
- 94°C 15", 57°C 30", 68°C 8' (40 cycles)
- 68°C 8', 4°C forever

DNA: 3 uL of total DNA (200 uL)

プライマーセット	プライマー	PCR 産物長 (bp)	
		HVT-IBD #9	HVT
B1	SiteB-F1+SiteB-R1	2575	295
B2	SiteB-F2+SiteB-R2	2544	264
B3	SiteB FL-F2+SiteB FL-R2	4901	2621
B4	SiteB FL-F3+SiteB FL-R3	4507	2227

レーン	試料
1	MSV
2	P02 接種材料
3	P03 接種材料
4	P04 接種材料
5	P05 接種材料
6	P05 回収ウイルス
7	HVT
8	試料なし

孵化率 [17 頁 14.4.3. Percent Hatch]

孵化率は、(正常ヒナ数 / (孵化器に入れた卵数 - 異常胚数)) × 100 の式により計算した。試験卵の孵化率は 83.3~100%、対照卵の孵化率は 96.3~98.3%であった。

死亡 [17 頁 14.4.4. Mortality]

供試した全ての鶏の中で P05 の 1 羽 (鶏番号 231) のみが試験終了前に死亡が確認されたが、腹腔内に卵黄成分および細菌による腐敗が観察されたため死因は臍炎と結論された。

臨床観察 [17 頁 14.4.5. Clinical Observations]

臨床症状について正常でないと記録された鶏は存在しなかった。

マレック病病変 [18 頁 14.4.6. Marek's Lesions]

MD によると考えられる肉眼病変が組織/臓器に認められた場合、MD 陽性とすることとした。D21 に剖検した P05 について確認したところ、剖検した 9 羽のいずれにも病変は認められなかった。

伝染性ファブリキウス嚢病病変 [18 頁 14.4.7. Bursal Lesions]

ファブリキウス嚢の肉眼病変 (腫脹、充血、浮腫及び充血、委縮) の有無について P05 を評価した。D21 に剖検した 9 羽のファブリキウス嚢は全て正常であった。

資料2. 審査データの概要

考察・結論 [18、19頁 15. DISCUSSION/ CONCLUSION]

- 本試験は規定の条件に合致しバリデートされた。
- ウイルスを回収し、各継代についてウイルス量を測定した。IFAにより100%のプラークがHVT及びIBDV VP2 蛍光陽性を示した。
- PCR結果によりIBDV VP2挿入遺伝子が回収サンプルの全てに存在することが確認された。VP2挿入遺伝子の安定性が、VP2発現カセットの外側プライマー（4セット）を用いたPCRによって証明された。PCR産物の全長のみが各継代で観察され、欠失やリバータントを示唆するより小さなバンドは確認されなかった。
- 各継代において、卵内接種卵は83%以上が孵化した。対照卵の孵化率は95%以上であった。
- P05の1羽がD4に死亡した。この鶏（231）は臨床観察では正常であったが、剖検において卵黄成分と細菌による腐敗が観察された。この所見は臍炎に一致する。臍炎（卵黄嚢感染）は、典型的には10～14日齢まで（死亡を伴ったものは1～3日齢から、ピークは5～7日齢）に起こり、15%のヒナが臍炎により脱落するとされている（Sander, 2018 and Animal DVM, 2018）。どの継代においても他に死亡例は認められなかった。
- P05について、D21の剖検でMD又はIBDに関連する肉眼病変を示した鶏はいなかった。更に、それ以外の肉眼病変についても認められなかった。
- 各継代の回収ウイルスについて、IFAによって表現型を、PCRによって遺伝的性状を解析した。すべての継代において、完全長のIBDインサートを含んだバンドが、4セットのプライマーを用いたすべてのPCRで観察され、プラークの100%でHVTおよびIBDVの発現が認められた。VSM800.201（米国農務省のVeterinary Services Memorandum 800.201は病原性復帰に関するガイドライン）に準じて、最終継代（P05）とMSV（P01接種材料）を比較し、当該株の表現型および遺伝的安定性が示された。
- 各継代用接種材料を卵内接種したところ臨床症状は認められず、P5のD21における剖検においてもMD又はIBDの肉眼病変は認められなかった。これらのことは、VICH GL41に準拠して、ウイルスをSPF鶏で継代しても病原性が復帰しなかったことを示している。更にIBDV VP2遺伝子発現カセットの全長は、卵内接種による鶏体内での5代の継代の間、安定して挿入されており、発現が認められた。
- MD又はIBDの臨床症状や病変は認められず、副反応が発生しなかったことから、MSVは安定であり、ワクチン製造の目的に適合していると考えられる。

資料2. 審査データの概要

別紙 6. HVT-IBD の高用量 (×10) 対象動物安全性試験

10× Target animal safety - HVT-IBD (【社外秘につき非開示】)

目的：

HVT-IBD マスターシードウイルス (MSV) の高用量 (×10) の安全性を 9CFR 113.330(b) に準じて卵内又は初生時に皮下接種して評価する。

試験方法：

孵卵 18 日齢 (E18、Day-3) の発育鶏卵に T01 群は溶解用液を、T02 群は 10 用量の HVT-IBD を 1 発育鶏卵当たり 0.3mL ずつ投与した。T03 群には 1 羽当たり 0.3mL のワクチンを孵化日 (Day 0) に皮下投与した。T04 群にはマレック病ウイルス強毒株である RB1B 株を 1 羽当たり 0.2 mL ずつ 5 日齢時 (Day 5) に腹腔内投与した。

1 群当たり 60 羽を選定し、個体識別した後、所定のペン又はアイソレーターに、それぞれ 30 羽又は 15 羽ずつ配置した。T04 群の鶏は Day 50 まで飼育し、剖検してマレック病病変を観察した。T01～T03 群の鶏は Day 120 まで飼育してから剖検した。

接種材料、接種経路及び接種量

群	接種材料	接種日齢	接種経路	接種量	用量
T01	溶解用液	孵卵 18 日	卵内	0.3 mL/卵	
T02	10X HVT-IBD MSV (K012618MSV)	孵卵 18 日	卵内	0.3 mL/卵	114,952 PFU/卵
T03		初生	皮下	0.3 mL/鶏	144,024 PFU/鶏
T04	RB1B 株 (040414KZO)	5 日齢	腹腔内	0.2 mL/鶏	100 倍希釈脾臓乳剤

試験群の設定

群	接種材料	攻撃	接種経路	卵数	孵化器数	ペン数	鶏数/ ペン	総鶏数
T01	溶解用液	—	卵内	100	1	2 ペン	30	60
T02	10×HVT-IBD	—	卵内	100	1	2 ペン	30	60
T03	10×HVT-IBD	—	皮下	100	1	2 ペン	30	60
T04	非接種	RB1B	—	100		4 アイソレーター	15	60
計				400	3	6 ペン、 4 アイソレーター		240

資料2. 審査データの概要

試験方法概要

試験日	作業内容
Day -3 (E18)	発育鶏卵の状態確認、発育停止卵の除去 T01 群に溶解用液の卵内接種、T02 群に HVT-IBD の卵内接種 各群 100 個を孵化器に移動
Day 0	孵化しなかった卵の開卵 発育不全ヒナの除外及び除外理由の記録 T03 群への HVT-IBD の皮下接種 試験デザイン及び無作為化表に基づくヒナの識別及び配置
Day 0 - Day 120	毎日の臨床観察、死亡又は安楽殺個体の剖検*
Day 5	T04 群への攻撃
Day 55	T04 群の観察終了、剖検 外観及び臓器のマレック病肉眼病変の検査*
Day 120	観察終了、体重測定、T01～T03 群の全羽の剖検 マレック病に相当する病変の有無の観察及びファブリキウス囊の評価*

* 性別及びマレック病特異的肉眼病変を観察した。胸筋及び皮膚の肉眼病変、虹彩の色素欠乏（グレーアイ）及び下記の器官について検査し、病変を記録した：胸腺、肝、脾、腎、心、肺、腺胃、脾、生殖腺、ファブリキウス囊及び腸。神経（迷走、並びに上腕及び座骨神経叢）は炎症について検査した。胸腺及びファブリキウス囊は萎縮について検査した。T01、T02 又は T03 に腫瘍又は神経の炎症が認められた場合、組織学的検査を実施した。

結果：

卵内接種群の孵化率は T01 群（溶解用液）で 95.9%、T02 群（HVT-IBD）で 96.0%であり、10 用量を卵内に接種したときの HVT-IBD の安全性が確認された。

剖検時にマレック病に関連する以下の所見が認められた場合にマレック病陽性と判断した：肝、肺、脾、腎、心、腺胃、脾、生殖腺、腸を含む内臓、胸筋、ファブリキウス囊及び皮膚に腫瘍が認められた場合、並びに虹彩色素の欠乏（グレーアイ）、神経の炎症、ファブリキウス囊及び胸腺の重度な萎縮が認められた場合。

T04 群の Day 50 までの生存鶏を剖検したが、生存率は 15%であった。また、マレック病に相当する肉眼病変は 93.33%の鶏に認められた。これは 80%以上の鶏がマレック病に感受性があると規定した本試験の試験成立基準に合致した。

T01、T02 及び T03 群では Day 120 の剖検時まで少なくとも 96%以上（≥58 羽）の鶏が生存し、剖検によるマレック病の肉眼病変は観察されなかった。剖検時に T02 群の 1 羽（No. 195）において迷走神経の肥大が認められたが、診断のための追加検査によって腫瘍原性のマレック病または非腫瘍原性の HVT のどちらによるものでもない結論された。ファブリキウス囊病の病変についても剖検時に観察したが、病変は認められなかった。

体重測定において各群間に有意な差は認められなかった。

T01 及び T03 群において、マレック病の症状（脚麻痺又は沈鬱）を示した鶏は認められなかった。Day 32～43 に T02 群の 1 羽（No. 218）が沈鬱及び脚麻痺の症状を示したが、診断用検査及び組織学的検査により、突発性末梢神経障害によるものとされた。試験期間中、T02 群の他の鶏に臨床症状は認められなかった。T04 群は 90%の鶏にマレック病の症状が認められた。

資料2. 審査データの概要

孵化率、死亡率、マレック病肉眼病変率及び体重

群	孵化率 ¹⁾	臨床症状	死亡率	肉眼病変	体重
T01 (溶解用液)	94/98 (95.9%)	0/60 (0.0%)	1/60 (1.67%)	0/60 (0.0%)	T01 群と T02 又は T03 群と の間に 有意差なし
T02 (10×HVT-IBD/ 卵内)	95/99 (96.0%)	1*/60 (1.67%)	2/60 (3.33%)	0**/60 (0.0%)	
T03 (10×HVT-IBD/ 皮下)	185/198 (93.4%)	0/60 (0.0%)	1/60 (1.67%)	0/60 (0.0%)	
T04 (非接種/攻撃)		54/60 (90.0%)	51/60 (85.00%)	56/60 (93.3%)	(対象外)

1) 未授精、孵卵早期及び中期の死亡を対象から除外した。

* Day 32～43 に 1 羽 (No. 218、T02 群) に脚麻痺及び/又は沈鬱が観察された。Day 43 に安楽殺し、剖検を行ったところ、マレック病又はファブリキウス嚢病に関連する病変は認められなかったが、臨床症状から、神経組織を採取して更に評価を行った。MDV 及び REV について IHC を実施したが陰性であり、組織学的検査により突発性末梢神経障害と診断された。

** Day 120 の剖検時に No. 195 は右側迷走神経に多発性肥大が認められたが、神経組織の組織学的検査により、病変は非特異的であり、マレック病に一致しないことが示された。更に、神経組織は IHC 及び PCR により MDV 陰性であった。病理学的診断により、突発性末梢神経障害又はリポフラビン欠乏症のどちらかによると考えられた。

まとめ及び考察：

卵内接種した群の孵化率は 96% であり、HVT-IBD は臨床使用用量の 10 倍量の卵内接種において安全であることが示された。

強毒株の攻撃 (Day 5) 前に死亡した鶏はいなかった。T01、T02 及び T03 群では少なくとも 96% の鶏 (≥58 羽) が観察期間終了 (Day 120) まで生存していた。

攻撃対照群 (T04) においては 93.33% の鶏がマレック病病変陽性であったのに対し、T01、T02 及び T03 群ではマレック病病変陽性例はなかった。剖検時に T02 群の 1 羽 (No. 195) において迷走神経の肥大が認められたが、追加検査によって腫瘍原性のマレック病または非腫瘍原性の HVT のどちらによるものでもないと結論された。

Day 120 における各群の平均体重に有意な差はなかった。

T01 及び T03 群において試験期間中マレック病の症状を示した鶏はいなかった。T02 群の 1 羽 (No. 218) が沈鬱及び脚麻痺の症状を示したが、追加の診断用検査及び組織学的検査により、突発性末梢神経障害によるものとされた。T02 群の他の鶏では試験期間中マレック病の症状は観察されなかった。

結論として、本試験に使用した鶏はマレック病に感受性であることが確認された。10 倍量のワクチンを卵内又は皮下に接種された鶏は被験薬に起因する副反応、臨床症状、及び肉眼病変を示さなかった。また、被験薬投与群 (T02 及び T03 群) と非投与対照群 (T01) 間の平均体重に有意差は認められなかった。これらのデータから HVT-IBD MSV は 9CFR 113.330(b) (マレック病ワクチンにおける安全性試験のガイドライン) に準じた試験において鶏に安全であることが確認された。

資料2. 審査データの概要

別紙 7. HVT-IBD の体内分布及び環境中における生残性

Dissemination within the animal and environmental survival of HVT-IBD (【社外秘につき非開示】)

目的 [3頁 STUDY SUMMARY、5頁 1.2. Study Objectives]

1. HVT-IBD のマスターシードウイルス (MSV) を卵内接種した場合の鶏における体内分布を確認する。
2. HVT-IBD MSV 接種鶏からの環境への排泄及び生残性を評価する。

材料及び方法

HVT-IBD MSV (T02 群) 及び遺伝子組換えウイルスの親株である HVT FC126 株 (T03 群) をそれぞれ 70 個の 18 日齢発育鶏卵に 0.1 mL (約 10^4 PFU) ずつ卵内接種した。T01 群は非接種とした。孵化日 (0 日齢、Day 0) に健康な 38 羽を 1 群として選別し、19 羽ずつアイソレーターペンに収容した。11 及び 21 日齢時に各群から 6 羽 (3 羽/ペン) ずつ無作為に抽出し、血液、脾臓、ファブリキウス嚢、胸腺及び羽髄を採取し、剖検した。また、21 日齢時に、全ての残りの鶏を剖検した。試験期間中、毎日臨床症状を観察した。11 及び 21 日齢時に、塵埃採取用に各ペンのフィルターを保存した。[3頁 STUDY SUMMARY、8頁 6.3. Allotment/ Randomization、9頁 7.1. Schedule of Events]

21 日齢時に採取した血液の血清サンプルについて伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) に対する抗体応答を ELISA (ProFlock Plus IBD kit) により測定した。また、11 及び 21 日齢時の血液、脾臓、ファブリキウス嚢及び胸腺から白血球を分取し、鶏胚線維芽 (CEF) 細胞を用いてウイルス分離を行った。羽髄サンプルについては、qPCR による HVT の検出を実施した。21 日齢時に採取したフィルターは 4 分し、Day 21、22、25 及び 28 (フィルター採取後 0、1、4 及び 7 日) に塵埃を採取した。11 日齢時の塵埃サンプルと共に、CEF 細胞を用いてウイルス分離を行った。[10、11 頁 7.2. Summary of Procedures、11、12 頁 8. SAMPLE AND LABORATORY TESTING]

群設定

群	接種材料	発育鶏卵数	接種量	アイソレーターペン数	羽数/ペン	羽数/群
T01	非接種	70	—	2	19	38
T02	HVT-IBD ¹⁾	70	0.1 mL/卵 (16,379 PFU) ³⁾	2	19	38
T03	HVT ²⁾	70	0.1 mL/卵 (11,091 PFU) ³⁾	2	19	38
総数		210		6		114

¹⁾ HVT-IBD MSV (ロット K012618MSV) 9.43×10^5 PFU/mL

²⁾ HVT FC126 株 (ロット 082114KZO) 7.53×10^6 PFU/mL

³⁾ 10,000 PFU を目標値とし、実測値を示した。

[6頁 4. INVESTIGATIONAL VETERINARY PRODUCTS、7頁 6.1. Study Design Summary]

結果

孵化率は、(正常ヒナ数 / (孵卵器に入れた卵数 - 異常胚数)) × 100 の式により計算した。各群の孵化率は、非接種群 (T01)、HVT-IBD 群 (T02) 及び HVT 群 (T03) の順に 91.4% (64/70)、94.3% (66/70) 及び 94.3% (66/70) であり、全群 90% 以上を示した。[14 頁 14.4. Hatch]

試験期間中、死亡鶏は観察されず、マレック病 (MD) 又はファブリキウス嚢病 (IBD) の臨床症状を示した鶏はいなかった。また、剖検時に MD 又は IBD に関連する病変を示した鶏はいなかった。[14 頁 14.5. Mortality、14.6. Clinical Signs、16 頁 14.10. Marek's Lesions、17 頁 14.11. Acute Bursal Lesions]

抗体検査の結果、T02 は 80% 以上が IBD 抗体陽性、T01 及び T03 は全羽 IBD 抗体陰性であることが確認された。[14 頁 14.7. Serology]

群	幾何平均	標準偏差	IBD (%)	
			陰性	陽性
T01 (非接種)	0.0	0.0	12/12 (100)	0/12 (0.0)
T02 (HVT-IBD)	1371.9	2928.6	2/12 (16.7)	10/12 (83.3)
T03 (HVT)	0.0	0.0	12/12 (100)	0/12 (0.0)

資料2. 審査データの概要

T01 の鶏からウイルスは分離されなかった。T02 及び T03 の鶏では、血液、脾臓、ファブリキウス嚢及び胸腺の白血球からウイルスが分離された。T03 の分離ウイルスでは IBDV 蛋白質の発現は認められなかったが、T02 の分離ウイルスでは IBDV 蛋白質の発現が認められた。HVT-IBD DNA は 11 及び 21 日齢時の T02 及び T03 の羽髄に存在することが確認された。T01 で陽性の鶏は認められなかった。[15 頁 14.8. Virus Presence、16 頁 14.9. HVT Detection by qPCR、Report Amendment 01 : 2 頁 1.1. Change to Report]

各サンプルからの HVT ウイルス検出

群	HVT ウイルス陽性率 (%)									
	血液		ファブリキウス嚢		脾臓		胸腺		羽髄 ¹⁾	
	11	21	11	21	11	21	11	21	11	21
T01 (非接種)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)
T02 (HVT-IBD)	100.0 (6/6)	66.7 (4/6)	83.3 (5/6)	0 (0/5)	100.0 (6/6)	40.0 (2/5)	100.0 (6/6)	80.0 (4/5)	100.0	44.4 (8/18)
T03 (HVT)	100.0 (6/6)	100.0 (6/6)	83.3 (5/6)	20.0 (1/5)	83.3 (5/6)	20.0 (1/5)	100.0 (6/6)	0 (0/5)	100.0	100.0

鶏 No. 177 (T01)、157 (T03)、188 (T02) 及び 181 (T01) のファブリキウス嚢、脾臓及び胸腺サンプルは標識を間違えたため解析から除外した。

1) 羽髄は qPCR、他の臓器はウイルス分離によるウイルス検出

[6、7 頁 5. ANIMALS、16 頁 14.9. HVT Detection by qPCR、Report Amendment 01 : 2 頁 1.1. Change to Report]

分離ウイルスにおける IBDV 蛋白質発現率

群	IBDV 蛋白質発現陽性率 (%)							
	血液		ファブリキウス嚢		脾臓		胸腺	
	11	21	11	21	11	21	11	21
T01 (非接種)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)
T02 (HVT-IBD)	100.0 (6/6)	66.7 (4/6)	83.3 (5/6)	0 (0/5)	100.0 (6/6)	40.0 (2/5)	100.0 (6/6)	80.0 (4/5)
T03 (HVT)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/5)	0 (0/6)	0 (0/5)	0 (0/6)	0 (0/5)

鶏 No. 177 (T01)、157 (T03)、188 (T02) 及び 181 (T01) のファブリキウス嚢、脾臓及び胸腺サンプルは標識を間違えたため解析から除外した。

[Report Amendment 01 : 2、3 頁 1.1. Change to Report]

感染性ウイルスは Day 11 の T02 及び T03 の鶏を収容する各 2 ペン中 1 ペン、及び Day 28 の T03 の両ペンの塵埃サンプルから分離された。HVT-IBD は環境中で生残することが示されたが、その程度は遺伝子非組み換えの HVT と同程度であった。

供試鶏飼育ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス検出

群	ペン番号	HVT ウイルス分離結果				
		Day 11	Day 21	Day 22*	Day 25*	Day 28*
T01 (非投与)	01B	—	—	—	—	—
	02B	—	—	—	—	—
T02 (HVT-IBD)	02A	++	—	—	—	—
	03A	—	—	—	—	—
T03 (HVT)	01A	+	—	—	—	+
	03B	—	—	—	—	+

*Day 21 のサンプルを 20~28°C で 1 日 (Day 22)、4 日 (Day 25) 及び 7 日 (Day 28) 保存したサンプル。

+ : HVT 陽性 — : HVT 陰性

** IBDV 発現陽性。その他は全て陰性。

[Report Amendment 01 : 2、3 頁 1.1. Change to Report]

資料2 . 審査データの概要

考察及び結論

- 孵化率は 91.4%以上を示した。
- 試験期間中、MD や IBD の臨床症状を示した鶏は認められず、剖検において MD や IBD に関連する病変のある鶏は認められなかった。よって、HVT-IBD の卵内接種は安全であると考えられた。
- HVT ウイルスは T02 及び T03 の血液、ファブリキウス嚢、脾臓及び胸腺の白血球から分離された。羽髄において HVT DNA は 11 日齢に T02 及び T03 の両群の全羽、Day 28 に T03 の全羽及び T02 の 18 羽中 8 羽に認められた。
- HVT-IBD MSV 接種鶏からの環境への排泄を調べるため、Day 11 及び 21 に採取した塵埃サンプルからのウイルス分離によって評価した。また、Day 21 のサンプルは室温で 1、3 及び 7 日間保存して環境中の生残性について評価した。T02 及び T03 の 2 ペン中 1 ペンから Day 11 にウイルスが分離されたが、Day 21 では両群からウイルスは分離されなかった。しかしながら、T03 (HVT) の 2 ペン共から Day 28 に感染性ウイルスが分離されたことから、限定的ではあるが HVT が排泄されたと考えられた (Cho et al, 1971, Cho and Kenzy, 1975)。感染性 HVT の排泄源は羽包の上皮細胞である (Calnek et al, 1979)。フケ中の感染羽包細胞の落屑は、代表的な MD ウイルス排泄メカニズムである。HVT 親株と HVT-IBD のこれらのデータは、環境中に HVT 親株の排泄が予想されることと一致している。
- 結論として、本試験データから HVT と HVT-IBD は両者とも環境への排泄が同様に限定的であることが示され、ウイルスは両群とも羽髄において検出可能であった。HVT-IBD MSV の組織指向性、排泄、及び環境へのウイルス排泄は親株である HVT の性状と同等であることが確認された。

資料2. 審査データの概要

別紙 8. HVT-IBD の排泄及び拡散性の評価

Evaluation of the Shed and Spread of HVT-IBD (【社外秘につき非開示】)

目的：

HVT-IBD マスターシードウイルス (MSV) の排泄および同居鶏への感染性 (拡散性) について評価する。
[3 頁 STUDY SUMMARY、5 頁 1.2. Study Objectives]

材料及び方法：

HVT-IBD MSV (T02) 又は HVT (T03) を 18 日齢発育鶏卵に各群 90 個ずつ卵内接種し、同数の非接種対照 (T01) とともにそれぞれ孵卵器に移動した。孵化日 (0 日齢) に、各孵卵器からデブリサンプルを回収した。孵化後、T01 の 36 羽、T02 及び T03 の各 18 羽ずつを識別し、T01 の鶏を 18 羽ずつ 2 ペンに分け、一方を T02 (ペン 01B)、他方を T03 (ペン 01A) と同居させた。

孵化後 22 日間、毎日臨床観察を行うとともに、8、15 及び 22 日齢時に、各ペンから 12 羽ずつ (T01 (同居鶏) 6 羽+T02/03 (ワクチン接種鶏) 6 羽) をサンプリングに供した。各日において、血液 (白血球および血清)、脾臓、クロアカおよび咽頭スワブ、羽髄、及びペンフィルターの塵埃サンプルを採取した。また、マレック病 (MD) 及び伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) による異常がないか剖検によって確認した。羽髄以外のサンプルについて鶏胚線維芽 (CEF) 細胞を用いてウイルス分離を実施した。HVT 又は IBD ウイルスに対する蛍光抗体法によりウイルスの有無を確認した。羽髄については qPCR による HVT DNA の確認を行った。また、22 日齢の血清について IBD ウイルスに対する ELISA 抗体を測定した。

[3、4 頁 STUDY SUMMARY、6、7 頁 5. ANIMALS、7、8 頁 6. STUDY DESIGN、9~12 頁 7. PROCEDURES、12 頁 8. SAMPLE AND LABORATORY TESTING]

群設定

群	接種材料	発育鶏卵数	接種量	孵卵器数	ペン番号	羽数/ペン	羽数/群
T01	非接種	90	—	1	01B/01A	18	36
T02	HVT-IBD ¹⁾	90	0.1 mL/卵 (7,540 PFU) ³⁾	1	01B	18	18
T03	HVT ²⁾	90	0.1 mL/卵 (6,149 PFU) ³⁾	1	01A	18	18
総数	-	270		3	2	-	72

¹⁾ HVT-IBD MSV (ロット K012618MSV)、 9.43×10^5 PFU/mL

²⁾ HVT (ロット 082114KZO)、 7.53×10^6 PFU/mL

³⁾ 10,000 PFU を目標値とした。実測値で示した。

結果：

孵化率は、(正常ヒナ数 / (孵卵器に入れた卵数 - 異常胚数)) × 100 の式により計算した。各群の孵化率は、非接種群 (T01)、HVT-IBD 群 (T02) 及び HVT 群 (T03) の順に 91.0% (81/89)、95.6% (86/90) 及び 95.6% (86/90) であり、全群 90% 以上を示した。[14 頁 14.3.2. Percent Hatch]

試験期間中、T03 と同居させた T01 の 1 羽 (No. 327) が 2 日齢に死亡した。剖検の結果、死因は細菌感染/臍炎と考えられた。その他に臨床症状を示した鶏は認められなかった。また、剖検時に MD 又は IBD に関連する肉眼病変を示した鶏はいなかった。[14 頁 14.3.3. Clinical Signs、15 頁 14.3.4. Mortality、14.3.5. Marek's Lesions、15、16 頁 14.3.6. Acute Bursal Lesions]

ワクチン接種した T02 及び T03 について、脾臓及び血液から試験期間を通じてウイルスが検出された。T01 では Day 22 の各ペン 1 羽 (T02 又は T03 と同居) の脾臓及び血液サンプルからウイルスが検出された。T03 及び T03 と同居した T01 から分離されたウイルスに IBD の発現は認められなかった。T02 及び T02 と同居した T01 から分離されたウイルスは全て IBD の発現が認められた。

HVT-IBD 群 (T02) ではクロアカスワブからウイルスが分離される例があったが、咽頭スワブからは分離されなかった。HVT 群 (T03) はクロアカスワブだけでなく、15 日齢時に 1 例で咽頭スワブからウイルスが分離された。

同居鶏のクロアカスワブおよび咽頭スワブからはいずれの日にもウイルスは分離されなかったが、脾臓及び血液白血球からは 22 日齢時に 1 羽がウイルス分離陽性となった。

[16、17 頁 14.3.7. Virus Isolation、18、19 頁 15. DISCUSSION/ CONCLUSION]

資料2. 審査データの概要

クロアカスワブ、咽頭スワブ、脾臓及び血液白血球からの HVT ウイルス分離陽性率

群	ペン	HVTウイルス分離陽性率 (%)											
		クロアカスワブ			咽頭スワブ			脾臓			血液白血球		
		8*	15	22	8	15	22	8	15	22	8	15	22
T01 (非接種)	01B	0	0	0	0	0	0	0	0	16.67	0	0	16.67
		(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(1/6)
T02 (HVT-IBD)	01B	83.33	16.67	16.67	0	0	0	83.33	100.0	83.33	83.33	100.0	50.0
		(5/6)	(1/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(5/6)	(6/6)	(5/6)	(5/6)	(6/6)	(3/6)
T01 (非接種)	01A	0	0	0	0	0	0	0	0	16.67	0	0	16.67
		(0/4 ^{1,2})	(0/6)	(0/6)	(0/4 ¹)	(0/6)	(0/6)	(0/4 ¹)	(0/6)	(1/6)	(0/4 ¹)	(0/6)	(1/6)
T03 (HVT)	01A	66.67	20.0	20.0	0	20.0	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		(4/6)	(1/5 ³)	(1/5 ²)	(0/6)	(1/5 ³)	(0/5 ²)	(6/6)	(5/5 ³)	(5/5 ²)	(6/6)	(5/5 ³)	(5/5 ²)

* 日齢

¹ T01 群の 1 羽 (No. 327) が 2 日齢に死亡した状態で発見された。

² T01 群の 1 羽 (No. 370) と T03 群の 1 羽 (No. 372) が 8 日齢に識別不可となったためサンプルに含めなかった。No. 372 の鶏は 22 日齢に採材予定であった。

³ No. 325 (T03 群) は 15 日齢に採材予定であったが、怪我のため 8 日齢に除外した。

[16、17 頁 14.3.7. Virus Isolation]

クロアカスワブ、咽頭スワブ、脾臓及び血液白血球からの IBD 抗原陽性率

群	ペン	IBD抗原陽性率 (%)											
		クロアカスワブ			咽頭スワブ			脾臓			血液白血球		
		8*	15	22	8	15	22	8	15	22	8	15	22
T01 (非接種)	01B	0	0	0	0	0	0	0	0	16.67	0	0	16.67
		(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(1/6)
T02 (HVT-IBD)	01B	83.33	16.67	16.67	0	0	0	83.33	100	83.33	83.33	100.0	50.00
		(5/6)	(1/6)	(1/6)	(0/6)	(0/6)	(0/6)	(5/6)	(6/6)	(5/6)	(5/6)	(6/6)	(3/6)
T01 (非接種)	01A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		(0/4 ^{1,2})	(0/6)	(0/6)	(0/4 ¹)	(0/6)	(0/6)	(0/4 ¹)	(0/6)	(0/6)	(0/4 ¹)	(0/6)	(0/6)
T03 (HVT)	01A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		(0/6)	(0/5 ³)	(0/5 ²)	(0/6)	(0/5 ³)	(0/5 ²)	(0/6)	(0/5 ³)	(0/5 ²)	(0/6)	(0/5 ³)	(0/5 ²)

* 日齢

¹ T01 群の 1 羽 (No. 327) が 2 日齢に死亡した状態で発見された。

² T01 群の 1 羽 (No. 370) と T03 群の 1 羽 (No. 372) が 8 日齢に識別不可となったためサンプルに含めなかった。No. 372 の鶏は 22 日齢に採材予定であった。

³ No. 325 (T03 群) は 15 日齢に採材予定であったが、怪我のため 8 日齢に除外した。

[16、17 頁 14.3.7. Virus Isolation]

孵卵器デブリ (孵化日) からウイルスは分離されなかった。ペンフィルターから採取した塵埃について、T02 及び T03 とともに 15 日齢時にウイルスが分離され、T03 は 22 日齢時においてもウイルス分離陽性であった。

孵卵器デブリ (孵化日) における HVT ウイルス分離及び IBD 発現

群	孵卵器	ウイルス	IBD VP2 発現
T01 (非接種)	C	—	—
T02 (HVT-IBD)	A	—	—
T03 (HVT)	B	—	—

— : 陰性 + : 陽性

[16、17 頁 14.3.7. Virus Isolation]

資料2. 審査データの概要

ペンフィルター塵埃における HVT ウイルス分離及び IBD 抗原検出

群	ペン	ウイルス			IBD 発現		
		8*	15	22	8	15	22
T01 (非接種) + T02 (HVT-IBD)	01B	—	+	—	—	+	—
T01 (非接種) + T03 (HVT)	01A	—	+	+	—	—	—

* 日齢

— : 陰性 + : 陽性

[16、17 頁 14.3.7. Virus Isolation]

HVT-IBD 接種 (T02) のすべての鶏は IBDV 抗体陽性となったが、HVT 接種鶏 (T03) 及び同居鶏 (T01) は両ペンとも陰性であった。[18 頁 14.3.8. Serology]

22 日齢時における IBDV 抗体陽性率 (%)

群	IBDV 抗体陽性率%
T01 (非接種)	0 (0/12)
T02 (HVT-IBD)	100.0 (6/6)
T03 (HVT)	0 (0/5*)

* No. 372 (T03) は 22 日齢時にサンプリングの予定だったが、標識がなくなったため 8 日齢時に除外した。

[18 頁 14.3.8. Serology]

HVT ウイルス DNA はワクチン接種鶏 (T02 及び T03) の 8、15 及び 22 日齢時の羽髄で認められた。T01 の羽髄サンプルでウイルス DNA の陽性例はなかった。[18 頁 14.3.9. HVT Detection by PCR]

羽髄における qPCR による HVT DNA の検出

群	ペン	HVT DNA 検出率% (陽性例数/供試数)		
		8日齢	15日齢	22日齢
T01 (非接種)	01B	0	0	0
T02 (HVT-IBD)		50.0 (3/6)	66.67 (4/6)	50.0 (3/6)
T01 (非接種)	01A	0	0	0
T03 (HVT)		100.0 (6/6)	100.0 (5/5)	80.0 (4/6)

[18 頁 14.3.9. HVT Detection by PCR]

ワクチンの安全性は孵化時、臨床観察、斃死率及び剖検データによって示された。

- 孵化率はいずれの群も 90%以上を示した。
- 各群の鶏はすべて試験期間を通じて異常は認められなかった。
- 剖検時に MD 又は IBD と関連する病変を示した鶏は認められなかった。
- 試験期間中、HVT 群 (T03) と同居した非接種群 (T01) の 1 羽 (No. 327) が菌感染 (臍炎) により斃死した。ワクチン接種鶏 (T02 及び T03) に斃死は認められなかった。
- HVT-IBD および HVT とともに低率であるが同居鶏に感染した。また、ペンフィルターの塵埃からもウイルスが分離された。ワクチン接種鶏と同居鶏間で水平伝播が低い頻度であるという知見 (Cho et.al. 1971; Cho and Kenzy, 1975) から、限定的な HVT の排泄及び拡散は想定されていた。感染性 HVT の排泄源は羽包上皮細胞である (Calnek et al, 1979)。フケ中の感染羽包細胞の落屑は、代表的な MDV 排泄メカニズムである。これらのデータにより、親株 HVT の性状は、非組換え HVT の排泄・拡散で想定される性状と一致することが確認された。
- HVT-IBD 群 (T02) の鶏は全て 22 日齢時に IBD 抗体陽性を示した。
- HVT ウイルス DNA は各試験日の接種群 (T02 及び T03) の羽髄で認められた。
- 総合すると、HVT-IBD は脾臓、血液およびクロアカサンプルに存在し、HVT ウイルス DNA は羽髄で認められた。また、同居鶏 1 羽への限定的な拡散が認められた。しかし、排泄及び拡散パターンは HVT (T03) で認められるのと同様であった。
- 孵卵器デブリからウイルスが分離されなかったことから、HVT-IBD および HVT は孵卵器に検出可能レベルに排泄されないことが示された。
- HVT-IBD および HVT は塵埃から 15 日齢時に分離され、HVT は 22 日齢時に再度分離された。これ

資料2. 審査データの概要

- は、HVT-IBD および HVT がペン中に同程度、検出可能レベルに排泄されたことを示している。
- 結論として、HVT-IBD および HVT は両者とも限定的な排泄、拡散が認められるが、感染性 HVT-IBD の排泄および拡散は、HVT で既知の程度と同等であることが示された。
- [18、19 頁 15. DISCUSSION/ CONCLUSION]

資料2. 審査データの概要

別紙9. 七面鳥ヘルペスウイルス-伝染性ファブリキウス嚢ウイルス (HVT-IBD) の 25°C及び 30°Cにおける生存性 Herpes Virus of Turkeys – Infectious Bursal Disease Viral (HVT-IBD) Survivability at 25°C and 30°C (【社外秘につき非開示】)

目的 [1頁 ABSTRACT] :

室温 (25°C) 及び養鶏場 (30°C) を模した環境条件に HVT-IBD 組換えウイルスを暴露し、その生存性を確認する。

方法 [4頁 1. INTRODUCTION、2. MATERIALS AND METHOD、5頁 3. EXPERIMENTAL DESIGN] :

HVT-IBD 組換えウイルス X+5 (ロット K022118TB1)、及び組換えウイルスのバックボーンである HVT ワクチン (ロット 082114KZO) を、ポールバック溶解用液を用いて標準的な用量 (10⁵ PFU/mL) で準備した。溶解後すぐに含有量を測定し、無処置対照 (それぞれ、NT1 および NT2) とした。溶解したサンプルを 0.05 mL ずつ 35 mm 径のプラスチックプレートに入れ (3 反復/群)、安全キャビネット内で 2 時間、室温で乾燥させた。2 時間後にプレートに蓋をして、この時点を 0 時間 (T0) とした。プレートは 25°C又は 30°Cに静置する群に分割した。各サンプリング時点 (0、2、5、8、24、48、72、96 時間及び 7 日間) において、各群 3 枚のプレートに培地 (TPB 及び牛胎子血清を含む F10/199 培地) 1 mL を加え、初代鶏胚線維芽 (CEF) 細胞を用いて IFA により PFU を測定した。

試験設計

群	ワクチン	温度	時点	反復数	サンプル数
NT1	HVT-IBD	調製後氷上で保管 (2 時間以内)	該当なし	3	3
NT2	HVT		該当なし	3	3
T01	HVT-IBD	室温 (25°C)	0 hr, 2 hr, 5 hr, 8 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr, 7 days	3	27
T02		30°C		3	27
T03	HVT	室温 (25°C)		3	27
T04		30°C		3	27
総サンプル数					114

[5頁 3. EXPERIMENTAL DESIGN]

結果 [6頁 4. RESULTS] :

各群の各温度、各時点における平均ウイルス価を表にまとめた。

経過時間によるウイルス価

処理		ウイルス価 (PFU/0.05 mL)	
		HVT-IBD	HVT
NT1 または NT2 ¹	NA	6,597	6,820
0 時間	25°C	0.53	0.61
	30°C	0.20	0.55
2 時間	25°C	0.27	0.48
	30°C	0.10	0.38
5 時間	25°C	0.08	0.00
	30°C	0.28	0.00
8 時間	25°C	0.08	0.10
	30°C	0.19	0.03
24 時間	25°C	0.00	0.00
	30°C	0.00	0.00
48 時間	25°C	0.00	0.00
	30°C	0.00	0.00
72 時間	25°C	0.00	0.00
	30°C	0.00	0.00
96 時間	25°C	0.00	0.00
	30°C	0.00	0.00

資料2. 審査データの概要

7日間	25℃	0.00	0.00
	30℃	0.00	0.00

¹無処置対照

考察／結論 [7頁 5. DISCUSSION AND CONCLUSIONS]

- HVT-IBD および HVT は 25℃及び 30℃で T0 から 8 時間後まで生存していた。
- HVT-IBD および HVT は 25℃及び 30℃ともに、24 時間後以降、検出されなくなった。
- HVT-IBD および HVT は T0 前の 2 時間の乾燥時間中にほとんど感染性を失い、24 時間後までに室温（25℃）又は一般的な養鶏場の温度（30℃）の何れでも感染性がなくなったと結論づけることができる。

資料2. 審査データの概要

別紙 10. 遺伝子組換えウイルス HVT-IBD と宿主 HVT FC126 株の培養細胞における増殖性の比較 HVT-IBD to HVT Backbone Growth Comparison (【社外秘につき非開示】)

目的：

遺伝子組換えウイルス HVT-IBD と、本遺伝子組換えウイルスの宿主（バックボーン）である HVT FC126 株の培養細胞における増殖性について経時的に比較して評価する。[2 頁 ABSTRACT]

方法：

1. ウイルス培養

表 1 に試験設計の概要を示す。SPF 発育鶏卵由来の鶏胚線維芽（CEF）細胞に、HVT-IBD 遺伝子組換えウイルス（MSV+4）又は HVT-IBD の宿主である HVT ワクチンウイルス（MSV+3）を、MOI が 0.003 となるように混合し、それぞれ 10 本のローラーボトルに分注して 39°C で培養した。培養後 30、40、45、50 及び 60 時間後に、1 時点当たり各群 2 本のローラーボトルについて細胞変性効果（CPE）を観察し、ウイルス価を測定した。

表 1. 試験設計

群	ウイルス	MOI	温度	1 時点当たりの サンプリングした ローラーボトル数*	採取時点 (培養後時間)
T01	HVT-IBD (ロット K110918TB2)	0.003	39°C	2	30, 40, 45, 50, 60
T02	HVT (ロット 082114KZO)	0.003	39°C	2	30, 40, 45, 50, 60

*ローラーボトル 1 本（490 cm²）当たり 5.0x10⁸ 個の CEF 細胞を播種した。[7 頁 2.2.5. Study Design Table]

2. 評価方法

CPE は、0 = 0%、1 = 1-25%、2 = 26-50%、3 = 51-75%、4 = 76-100% の 5 段階のスコアで評価した。また、各観察時点においてローラーボトルからトリプシン処理により剥離した細胞を遠心後、再浮遊した懸濁液を小分けして保存した。ウイルス価の測定には凍結した小分け試料を融解して使用し、凍結しなかった試料は生細胞率（% = (生細胞数 / 総細胞数) × 100）を確認した。ウイルス価は CEF 細胞におけるプラーク形成単位（PFU）を、間接蛍光抗体法（IFA）を用いて測定した。[5 頁 1. INTRODUCTION、6 頁 2.2.2. Harvest, Sampling and Data Collection、7 頁 2.3. Data Summary and Analysis]

結果：

1. ウイルス価 [8 頁 3.1. Potency (PFU/mL)]

各群の培養後各時点における平均ウイルス価を表 2 及び図 1 にまとめた。

表 2. 各時点におけるウイルス価

採取時点 (時間)	平均ウイルス価 ± 標準偏差 (PFU/ mL) (最小値 ~ 最大値)	
	T01 : HVT-IBD	T02 : HVT
30	9.46 x 10 ⁵ ± 7.07 x 10 ⁴ (8.97 ~ 9.97 x 10 ⁵)	1.31 x 10 ⁶ ± 1.41 x 10 ⁵ (1.21 ~ 1.41 x 10 ⁶)
40	3.52 x 10 ⁶ ± 3.46 x 10 ⁵ (3.28 ~ 3.77 x 10 ⁶)	3.42 x 10 ⁶ ± 2.62 x 10 ⁵ (3.24 ~ 3.61 x 10 ⁶)
45	5.12 x 10 ⁶ ± 1.91 x 10 ⁵ (4.99 ~ 5.26 x 10 ⁶)	5.10 x 10 ⁶ ± 1.41 x 10 ⁵ (5.00 ~ 5.20 x 10 ⁶)
50	5.21 x 10 ⁶ ± 4.45 x 10 ⁵ (4.90 ~ 5.53 x 10 ⁶)	6.79 x 10 ⁶ ± 6.50 x 10 ⁵ (6.35 ~ 7.27 x 10 ⁶)
60	5.25 x 10 ⁶ ± 2.12 x 10 ⁵ (5.10 ~ 5.40 x 10 ⁶)	5.50 x 10 ⁶ ± 2.40 x 10 ⁵ (5.33 ~ 5.67 x 10 ⁶)

[8 頁 Table 1]

資料2. 審査データの概要

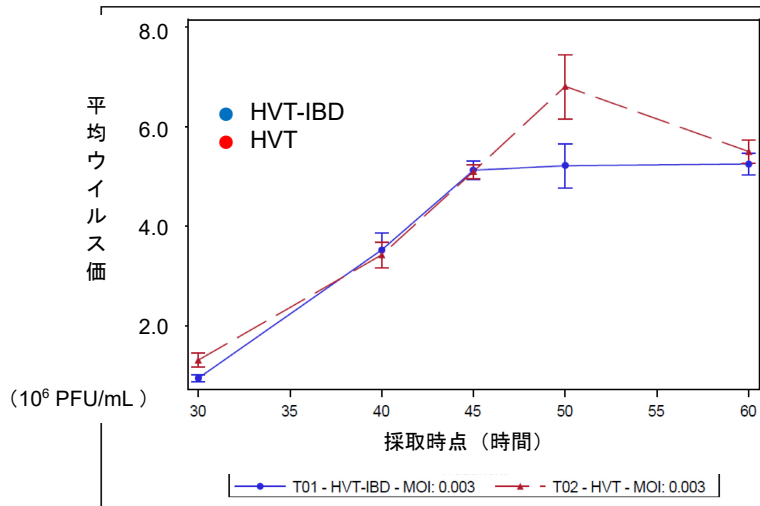


図 1. 経過時間によるウイルス価の推移

2. CPE スコア [9 頁 3.2. CPE Scores]

各群の培養後各時点における CPE スコアを表 3 及び図 2 にまとめた。

表 3. 各時点における CPE スコア*

採取時点 (時間)	平均CPEスコア (最小値 - 最大値)	
	T01 : HVT-IBD	T02 : HVT
30	1.0 (1 -1)	1.0 (1 -1)
40	1.5 (1 -2)	2.0 (2 -2)
45	2.5 (2 -3)	3.0 (3 -3)
50	4.0 (4 -4)	3.0 (3 -3)
60	4.0 (4 -4)	4.0 (4 -4)

*スコア 0 = 0%、1 = 1-25%、2 = 26-50%、3 = 51-75%、4 = 76-100% [9 頁 Table 2]

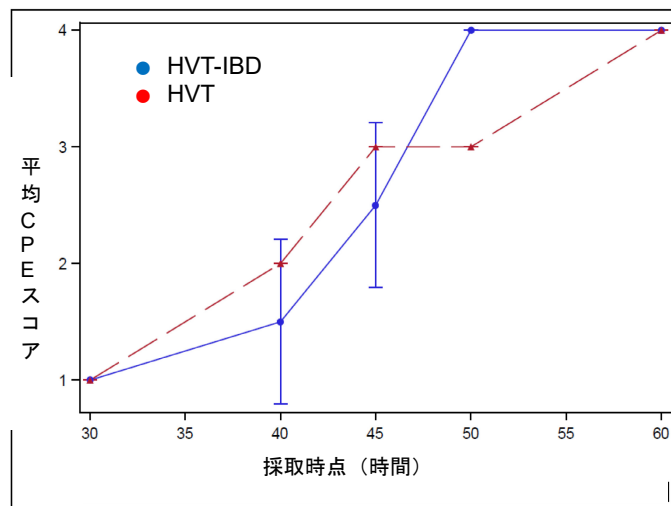


図 2. 経過時間による平均 CPE スコアの推移

資料2. 審査データの概要

3. 生細胞率 [10、11 頁 3.3 Vicell Data]

3.1. 総細胞数

各群の培養後各時点における平均総細胞数を表 4 にまとめた。

表 4. 各時点における総細胞数

採取時点 (時間)	平均±標準偏差 (cells)	
	T01 : HVT-IBD	T02 : HVT
30	$3.35 \times 10^7 \pm 9.48 \times 10^6$	$3.51 \times 10^7 \pm 1.06 \times 10^7$
40	$3.29 \times 10^7 \pm 1.13 \times 10^6$	$3.14 \times 10^7 \pm 2.47 \times 10^6$
45	$2.88 \times 10^7 \pm 1.91 \times 10^6$	$2.98 \times 10^7 \pm 1.13 \times 10^6$
50	$2.96 \times 10^7 \pm 4.24 \times 10^5$	$3.09 \times 10^7 \pm 2.69 \times 10^6$
60	$2.98 \times 10^7 \pm 1.63 \times 10^6$	$3.00 \times 10^7 \pm 3.18 \times 10^6$

[10 頁 Table 3]

3.2. 生細胞率

各群の培養後各時点における生細胞率を表 5 にまとめた。

表 5. 各時点における生細胞率

採取時点 (時間)	平均±標準偏差 (%)	
	T01 : HVT-IBD	T02 : HVT
30	96.5 ± 0.35	94.7 ± 2.12
40	97.4 ± 0.14	96.7 ± 0.71
45	96.5 ± 1.34	96.2 ± 0.28
50	97.2 ± 0.42	96.7 ± 0.14
60	88.7 ± 2.19	91.1 ± 1.13

[11 頁 Table 4]

考察 [12、13 頁 4. DISCUSSION] :

本試験の目的は、遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の増殖性を、その宿主である HVT FC126 株と比較し、HVT-IBD の増殖能が IBD ウイルスの遺伝子挿入によって変化していないか評価することであった。

ウイルス価は、HVT-IBD は 50/60 時間後に、宿主である HVT FC126 株は 50 時間後にピークを示した。試験期間中、HVT-IBD のウイルス価が HVT FC126 株を有意に上回ることなく、ピーク時のウイルス価は、HVT-IBD が $5.21 \sim 5.25 \times 10^6$ PFU/mL で、HVT FC126 株の 6.79×10^6 PFU/mL に対して同等又はそれ以下であることが示された。

CPE スコアは両群とも 30 時間後の 1.0 から 60 時間後の 4.0 まで経時的に上昇し、各時点の両群のスコアは同程度であり、CPE 発現の全体的な傾向は両ウイルスで同等であると考えられた。

細胞数は観察期間を通じて、HVT-IBD が $2.88 \sim 3.35 \times 10^7$ 個、HVT FC126 株が $2.98 \sim 3.35 \times 10^7$ 個と同等であった。培養 30~50 時間後の生細胞率は、HVT-IBD が 96.5~97.4%、HVT FC126 株が 94.7~96.7% と同等で、60 時間後ではそれぞれ 88.7% 及び 91.1% と両者とも低下したが、両ウイルス間の生細胞率に有意な差はないと考えられた。

以上より、遺伝子組換えウイルス HVT-IBD の増殖能は宿主 HVT FC126 株と同等またはそれ以下であることが示された。

資料2. 審査データの概要

別紙 11. 遺伝子組換えウイルス HVT-IBD と宿主 HVT FC126 株との増殖能の比較

目的

遺伝子組換えウイルス HVT-IBD と、宿主である HVT FC126 株の *in vivo* における増殖性、及び環境中への排泄性、生残性について、以下の比較試験成績に基づいて考察する。

- 別紙 7：HVT-IBD の体内分布及び環境中における生残性（試験番号：B910R-US-18-937）
- 別紙 8：HVT-IBD の排泄及び拡散性の評価（試験番号：B913R-US-18-A29）
- 別紙 9：HVT-IBD の 25℃及び 30℃における生存性（試験番号：BHXZ-US-18-768）

ウイルスの体内分布

1) 別紙 7 の試験におけるウイルスの体内分布

遺伝子組換えウイルス HVT-IBD MSV (T02 群) 及び遺伝子組換えウイルスの宿主である HVT (T03 群) をそれぞれ 70 個の 18 日齢発育鶏卵に 0.1mL (約 10⁴ PFU) ずつ卵内投与した。T01 群は非投与とした。孵化日 (0 日齢、Day 0) に健康な 38 羽を 1 群として選別し、19 羽ずつアイソレーターペンに収容した。11 及び 21 日齢時に各群から 6 羽 (3 羽/ペン) ずつ無作為に抽出し、血液、脾臓、ファブリキウス嚢、胸腺及び羽髄を採取し、羽髄については qPCR による HVT の検出を実施した。それ以外のサンプルについては、鶏胚線維芽 (CEF) 細胞を用いてウイルス分離を行った。Day 11 及び 21 に、塵埃採取用に各ペンのフィルターを保存した。Day 21 に採取したフィルターは 4 分し、Day 21、22、25 及び 28 (フィルター採取後 0、1、4 及び 7 日) に塵埃を採取した。これらについて Day 11 の塵埃サンプルと共に、CEF 細胞を用いてウイルス分離を行った。

表 1 及び図 1 に各サンプルからのウイルス検出結果を示す。T01 の鶏からウイルスは分離されなかった。T02 及び T03 の鶏では、血液、脾臓、ファブリキウス嚢及び胸腺の白血球からウイルスが分離された。

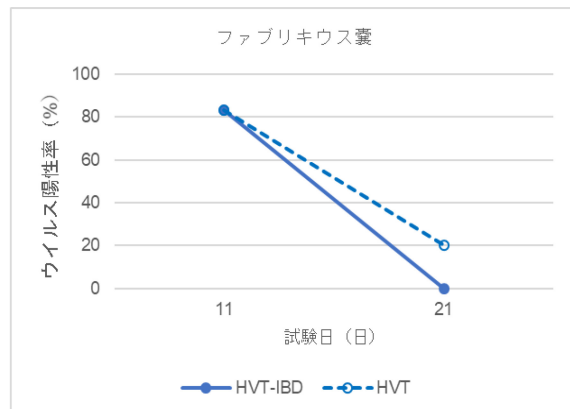
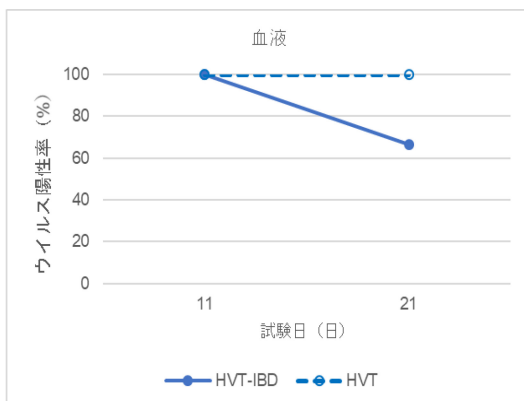
表 1. 各サンプルからのウイルス検出率 (別紙 7)

群	HVT ウイルス陽性率 (%)										
	血液		ファブリキウス嚢		脾臓		胸腺		羽髄 ¹⁾		
	11*	21	11	21	11	21	11	21	11	21	
T01 (非投与)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 (0/6)	0 (0/4)	0 0
T02 (HVT-IBD)	100.0 (6/6)	66.7 (4/6)	83.3 (5/6)	0 (0/5)	100.0 (6/6)	40.0 (2/5)	100.0 (6/6)	80.0 (4/5)	100.0	44.4 (8/18)	
T03 (HVT)	100.0 (6/6)	100.0 (6/6)	83.3 (5/6)	20.0 (1/5)	83.3 (5/6)	20.0 (1/5)	100.0 (6/6)	0 (0/5)	100.0	100.0	

* 日齢

鶏 No. 177 (T01)、157 (T03)、188 (T02) 及び 181 (T01) のファブリキウス嚢、脾臓及び胸腺サンプルは標識を間違えたため解析から除外した。

1) 羽髄は qPCR、他の臓器はウイルス分離によるウイルス検出



資料2. 審査データの概要

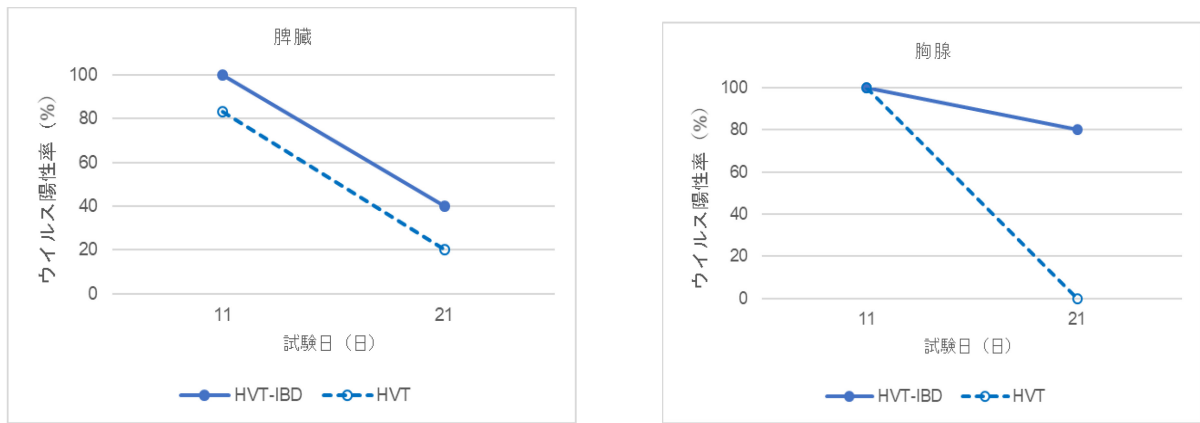


図 1. HVT-IBD 及び HVT 投与群の各サンプルにおけるウイルス陽性率（別紙 7）

2) 別紙 8 の試験におけるウイルスの体内分布

HVT-IBD MSV (T02) 又は HVT (T03) を 18 日齢発育鶏卵に各群 90 個ずつ卵内投与し、同数の非投与対照 (T01) とともにそれぞれ孵化器に移動した。孵化 (0 日齢、Day 0) 後、T01 の 36 羽、T02 及び T03 の各 18 羽ずつを識別し、T01 の鶏を 18 羽ずつ 2 ペンに分け、一方を T02 (ペン 01B)、他方を T03 (ペン 01A) と同居させた。

孵化後、毎日臨床観察を行うとともに、8、15 及び 22 日齢時に、各ペンから 12 羽ずつ (T01 (同居鶏) 6 羽 + T02/03 (ワクチン接種鶏) 6 羽) から、血液、脾臓、クロアカおよび咽頭スワブ、羽髄、及びペンフィルター上の塵埃サンプルを採取した。羽髄以外のサンプルについて鶏胚線維芽 (CEF) 細胞を用いてウイルス分離を実施した。羽髄については qPCR による HVT DNA の確認を行った。

表 2 及び図 2 に各サンプルからのウイルス分離陽性率を示す。

ワクチン接種した T02 及び T03 について、脾臓及び血液から試験期間を通じてウイルスが分離された。T02 ではクロアカスワブからウイルスが分離される例があったが、咽頭スワブからは分離されなかった。T03 ではクロアカスワブだけでなく、15 日齢時に 1 例で咽頭スワブからもウイルスが分離された。

T01 (非投与同居鶏) のクロアカスワブおよび咽頭スワブからはいずれの日にもウイルスは分離されなかったが、脾臓及び血液白血球からは 22 日齢時に各 1 羽がウイルス分離陽性となった。

表 2. 各サンプルからのウイルス分離陽性率（別紙 8）

群	ペン	HVTウイルス分離陽性率 (%)											
		クロアカスワブ			咽頭スワブ			脾臓			血液白血球		
		8*	15	22	8	15	22	8	15	22	8	15	22
T01 (非投与)	01B	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)
T02 (HVT-IBD)		83.33 (5/6)	16.67 (1/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	83.33 (5/6)	100.0 (6/6)	83.33 (5/6)	83.33 (5/6)	100.0 (6/6)	50.0 (3/6)
T01 (非投与)	01A	0 (0/4 ^{1,2})	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/4 ¹)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/4 ¹)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/4 ¹)	0 (0/6)	16.67 (1/6)
T03 (HVT)		66.67 (4/6)	20.0 (1/5 ³)	20.0 (1/5 ²)	0 (0/6)	20.0 (1/5 ³)	0 (0/5 ²)	100.0 (6/6)	100.0 (5/5 ³)	100.0 (5/5 ²)	100.0 (6/6)	100.0 (5/5 ³)	100.0 (5/5 ²)

* 日齢

¹ T01 群の 1 羽 (No. 327) が 2 日齢に死亡した状態で発見された。

² T01 群の 1 羽 (No. 370) と T03 群の 1 羽 (No. 372) が 8 日齢に識別不可となったためサンプルに含めなかった。No. 372 の鶏は 22 日齢に採材予定であった。

³ No. 325 (T03 群) は 15 日齢に採材予定であったが、怪我のため 8 日齢で除外した。

資料2. 審査データの概要

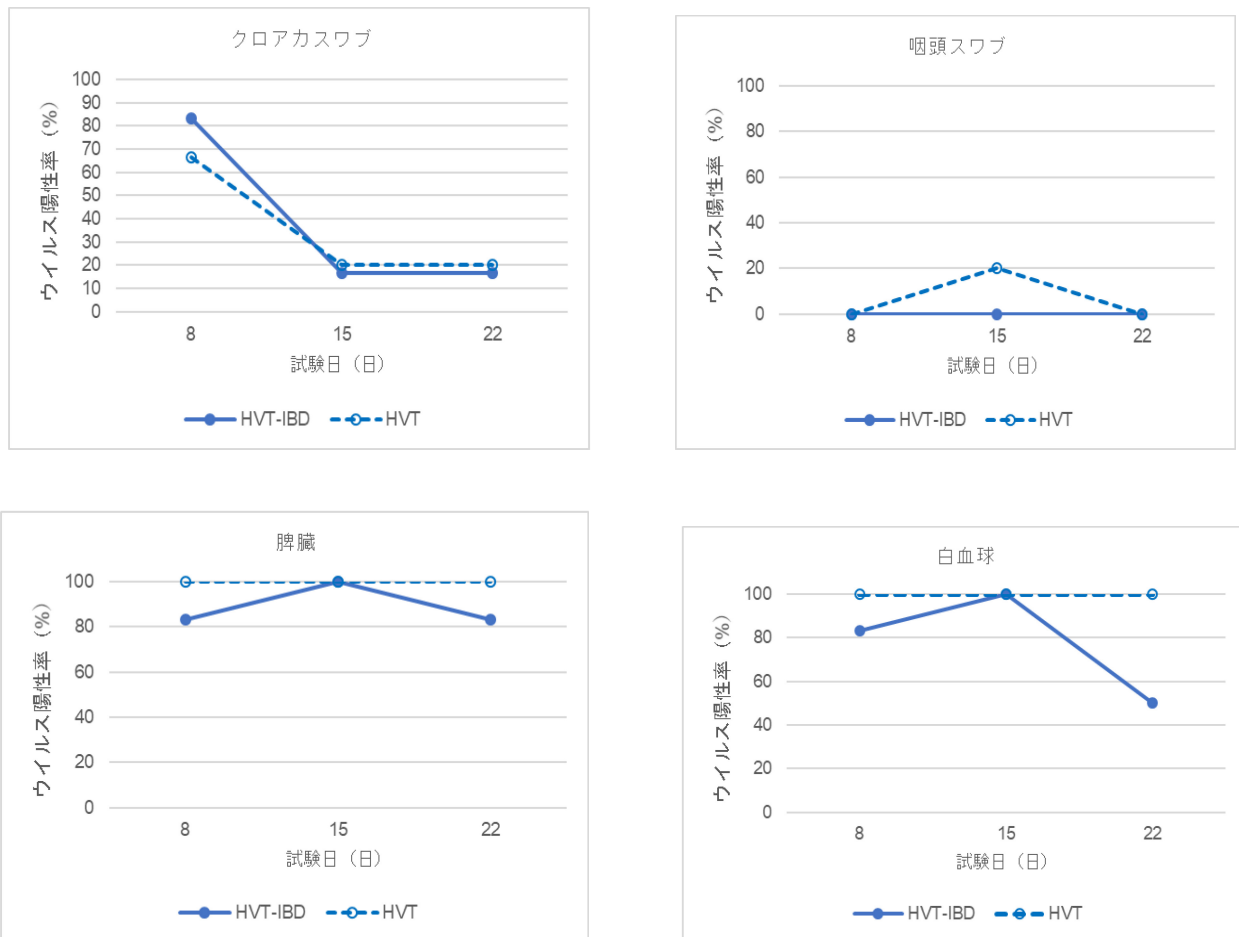


図 2. HVT-IBD 及び HVT 投与群の各サンプルにおけるウイルス陽性率（別紙 8）

環境中への排泄性、生残性

1) 環境中への排泄性

① 羽髄サンプルのウイルス陽性率

別紙 7 の試験において、ウイルス DNA は 11 及び 21 日齢のワクチン接種鶏（T02 及び T03）の羽髄に存在することが確認された（表 1、図 3）。

別紙 8 の試験において、HVT ウイルス DNA はワクチン接種鶏（T02 及び T03）の 0、15 及び 22 日齢の羽髄で認められた（表 3、図 3）。T01（同居鶏）の羽髄サンプルでウイルス DNA の陽性例はなかった。

表 3. 羽髄における qPCR による HVT DNA の検出（別紙 8）

群	ペン	HVT DNA 検出率% (陽性例数/供試数)		
		8日齢	15日齢	22日齢
T01 (非投与)	01B	0	0	0
T02 (HVT-IBD)		50.0 (3/6)	66.67 (4/6)	50.0 (3/6)
T01 (非投与)	01A	0	0	0
T03 (HVT)		100.0 (6/6)	100.0 (5/5)	80.0 (4/6)

資料2. 審査データの概要

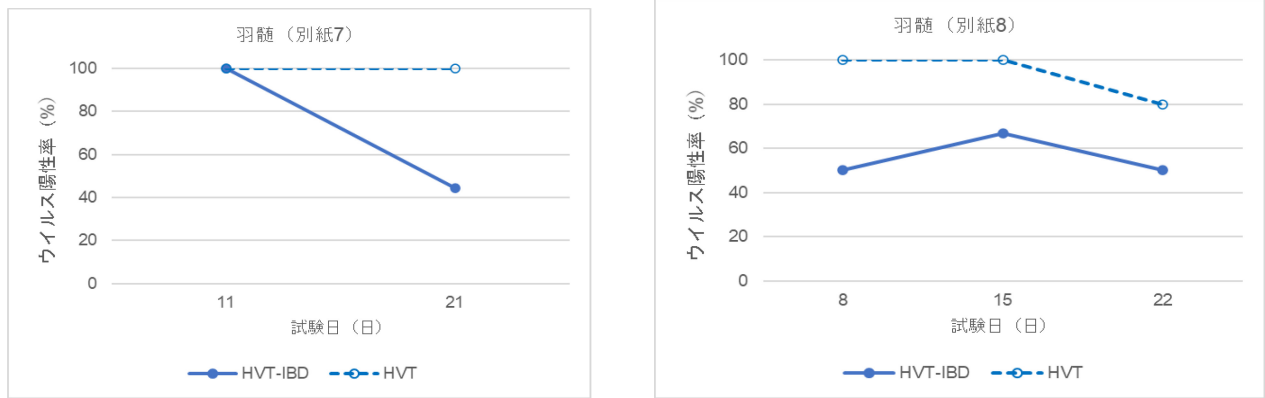


図 3. 羽髄サンプルからのウイルス DNA 陽性率（別紙 7 及び 8）

② ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス陽性率

別紙 7 の試験において、感染性ウイルスは Day 11 の T02 及び T03 の鶏を収容する各 2 ペン中 1 ペン、及び D28 の T03 の両ペンの塵埃サンプルから分離された（表 4）。HVT-IBD は環境中で生残することが示されたが、その程度は遺伝子非組み換えの HVT と同程度以下と考えられた。

別紙 8 の試験において、T02 及び T03 ともに Day 15 にウイルスが分離され、T03 は Day 22 においてもウイルス分離陽性であった（表 5）。

表 4. ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス検出（別紙 7）

群	ペン番号	ウイルス分離結果				
		D11	D21	D22*	D25*	D28*
T01 (非投与)	01B	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	02B	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
T02 (HVT-IBD)	02A	陽性**	陰性	陰性	陰性	陰性
	03A	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
T03 (HVT)	01A	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性
	03B	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性

*Day 21 のサンプルを 20~28℃で 1 日（Day 22）、4 日（Day 25）及び 7 日（Day 28）保存したサンプル。

** IBD 発現陽性。その他は全て IBD 陰性。

表 5. ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス分離（別紙 8）

群	ペン	ウイルス		
		D8	D15	D22
T01 (非投与) + T02 (HVT-IBD)	01B	陰性	陽性*	陰性
T01 (非投与) + T03 (HVT)	01A	陰性	陽性	陽性

* IBD 発現陽性。その他は全て IBD 陰性。

2) 環境中での生残性（別紙 9）

遺伝子組換えウイルス HVT-IBD 又はその宿主 HVT を含むそれぞれのウイルス溶液について、実験室内において 25℃（室温）及び 30℃（養鶏場の気温）における経時的な含有量の推移について確認したところ、両者とも両条件で 8 時間後までウイルスが検出されたが、24 時間以降は検出されなくなった（図 4）。

資料2. 審査データの概要

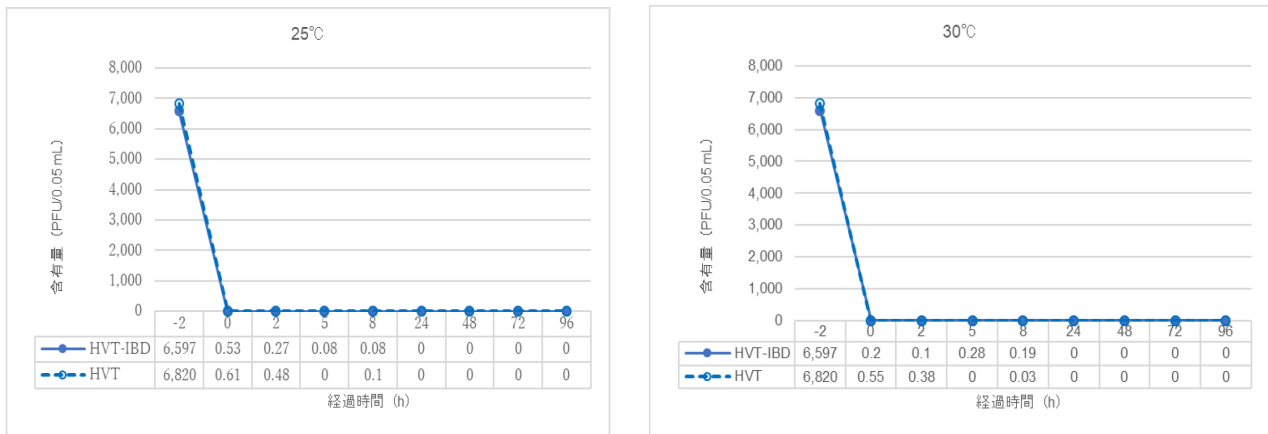


図 4. 25°C及び 30°Cにおけるウイルス含有量の推移（別紙 9）

考察及び結論

- ウイルスは HVT-IBD 及び HVT 接種群の血液、ファブリキウス嚢、脾臓及び胸腺から分離された。ウイルス陽性率は HVT-IBD 接種群では 15 日齢以降、いずれの臓器においても減少傾向を示したが、HVT 接種群では血液・白血球において 21 日齢まで全羽陽性であった。
- クロアカスワブにおけるウイルス陽性率は、HVT-IBD 接種群と HVT 接種群は同程度であった。咽頭スワブでは HVT 接種群において 15 日齢にウイルス陽性例が認められたが、HVT-IBD 接種群は試験期間中陰性であった。
- 羽髄における HVT DNA の陽性率は、両試験ともに HVT 接種群より HVT-IBD 接種群の方が低い傾向にあった。
- ペンフィルター塵埃サンプルからのウイルス分離において、HVT-IBD 接種群では Day 11（別紙 7）及び 15（別紙 8）に陽性、HVT 接種群では Day 11（別紙 7）、15 及び 22（別紙 8）に陽性を示した。また、Day 21 のサンプルを室温で 1、3 及び 7 日間保存したサンプルについて、HVT 接種群において Day 28 に感染性ウイルスが分離された（別紙 7）。
- HVT-IBD 及び HVT ウイルス溶液の 25°C 及び 30°C における生残性は同程度であり、いずれも 24 時間以降、検出されなかった。
- 以上の結果から、HVT-IBD の体内分布は HVT と同様であり、ウイルス陽性率についても同程度以下であったことから、HVT-IBD の体内における増殖能は HVT と同等又はそれ以下と考えられる。また、両群について羽髄から HVT DNA が検出され、一部の塵埃サンプルにおいてもウイルスが分離された。感染性 HVT の排泄源は羽包の上皮細胞であり、フケ中の感染羽包細胞の落屑は、代表的なウイルス排泄メカニズムである。HVT-IBD についても HVT と同様に排泄が予想されるが、その程度は限定的であり、宿主 HVT と同等以下と考えられた。25°C/30°C におけるウイルス含有量の推移は HVT-IBD と HVT で同様であり、ペンフィルター保存後に HVT についてはウイルス分離陽性であったことから、環境中で一定期間生残する可能性が示唆され、HVT-IBD 及び HVT とともに低率ではあるが同居鶏への感染が認められた。
- これらのデータから、組換えウイルス HVT-IBD の組織指向性及び環境へのウイルス排泄性・生残性は宿主である HVT の性状と一致していることが確認され、その程度は HVT と同様又はそれ以下と考えられる。

資料3. 緊急措置計画書

緊急措置計画書

令和6年2月1日

氏名 ゴエティス・ジャパン株式会社
代表取締役社長 加藤 克利
住所 東京都渋谷区代々木三丁目22番7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蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9 株 (IBDV VP2, *Meleagrid herpesvirus 1*) 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執るための実施体制及び責任者

実施体制 (別添1として添付)

実施責任者 ■■■■■ (ゴエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部長)

実施責任者は、米国又は欧州にて製造され日本に輸入される伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来VP2蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9 株 (IBDV VP2, *Meleagrid herpesvirus 1*) (以下、「本遺伝子組換えウイルス」という。) が生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められたとき、本遺伝子組換えウイルスを開発した米国の法人 (以下、米国開発法人)、輸出国である米国又は欧州の本遺伝子組換えウイルス製造法人及び日本国内に設置した業務安全委員会に連絡する。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執る。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

(1) 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、日本向けに輸出される本遺伝子組換えウイルスの製造状況、輸出業者等の情報提供を米国開発法人に一元的に依頼するとともに、本遺伝子組換えウイルスを使用する治験の実施機関、本遺伝子組換えウイルスの販売先及び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) (1) により把握した治験の実施機関、販売先及び国内販売代理店等に情報提供を依頼し、本遺伝子組換えウイルス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て記録する。

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内容を周知するための方法

米国開発法人に、本遺伝子組換えウイルスが日本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ことを連絡する。また、米国開発法人及び輸出国である米国又は欧州の本遺伝子組換えウイルス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、問い合わせ窓口を設置することを協議する。

資料3. 緊急措置計画書

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メール、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、問い合わせ窓口を設置する。

ただし、日本国内で実施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 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続させるための具体的な措置の内容

- (1) 米国開発法人及び輸出国である米国又は欧州の本遺伝子組換えウイルス製造法人に対して、本遺伝子組換えウイルスの日本への輸出の自粛、及び日本向け輸入業者等への販売を自粛してもらうよう要請する。
- (2) 日本国内において本遺伝子組換えウイルスが治験に使用されている場合は、本遺伝子組換えウイルスが自然環境に拡散しないよう必要な拡散防止措置（本遺伝子組換えウイルス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）を執るよう実施機関に要請するとともに、本遺伝子組換えウイルスを含む治験薬を実施機関から速やかに回収し、高圧蒸気滅菌等により不活化措置を執るよう受託機関に要請する。
- (3) 日本国内において本遺伝子組換えウイルスが市販されている場合は、本遺伝子組換えウイルスの販売中止及び回収を行い、回収した本遺伝子組換えウイルスは密閉容器に保管の上、高圧蒸気滅菌等の不活化措置を執る。
- (4) 日本国内において本遺伝子組換えウイルスが市販され、一般使用されている場合は、密閉容器に本遺伝子組換えウイルスを保管の上、高圧蒸気滅菌等の不活化措置を執るよう使用者に要請する。
- (5) 日本国内において本遺伝子組換えウイルスが動物に接種されている場合は、自然環境に本遺伝子組換えウイルスが拡散しないよう、接種された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）の隔離飼育又は安楽死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

—

資料3. 緊急措置計画書

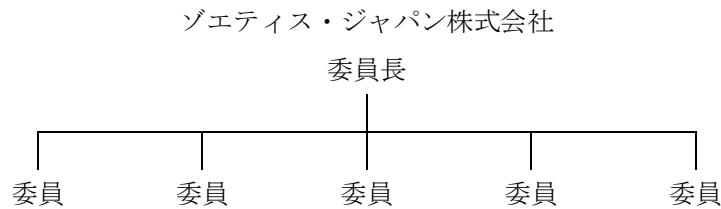
別添 1

実施体制

業務安全委員会

委員長	ゾエティス・ジャパン株式会社	製品開発・薬事統括部長
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	製品開発・薬事統括部 生物学的製剤部長
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	製品開発・薬事統括部 生物学的製剤部 部長補佐
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	製品開発・薬事統括部 生物学的製剤部
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	ライブストック・ビジネス統括部長
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	コマースオペレーションズ&デジタル推進部統括部長

実施体制図



	氏名	職名
委員長	■■■■■	ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部長
委員	■■■■■	ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部 生物学的製剤部長
委員	■■■■■	ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部 生物学的製剤部 部長補佐
委員	■■■■■	ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部 生物学的製剤部
委員	■■■■■	ゾエティス・ジャパン株式会社 ライブストック・ビジネス統括部長
委員	■■■■■	ゾエティス・ジャパン株式会社 コマースオペレーションズ&デジタル推進部統括部長

資料4. その他

本申請書で使用した略号・用語表

略語	正式名称（英名）	和名・説明
ATCC	American Type Culture Collection	細胞、微生物等の収集、保管、配布機関
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
CDS	Coding Sequence	蛋白質コード領域
CEF	Chicken Embryo Fibroblast	鶏胚線維芽細胞
CPE	Cytopathic effect	細胞変性効果
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	固相酵素免疫吸着法
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
GFP	Green Fluorescent Protein	緑色蛍光蛋白質
HVT	Herpesvirus turkey	七面鳥ヘルペスウイルス
IBD	Infectious bursal disease	伝染性ファブリキウス嚢病
IBDV	Infectious bursal disease virus	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス
IR _L	Internal Repeats Long	内部反復配列ロング
IR _S	Internal Repeats Short	内部反復配列ショート
MD	Marek's disease	マレック病
MDV	Marek's disease virus	マレック病ウイルス
ORF	Open Reading Frame	翻訳領域 オープンリーディングフレーム (開始コドン及び終止コドンを含む)
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PFU	Plaque forming unit	プラーク形成単位
RNA	Ribonucleic Acid	リボ核酸
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
TCID ₅₀	Tissue culture infection dose 50	50%組織培養感染量
TR _L	Terminal Repeats Long	末端反復配列ロング
TR _S	Terminal Repeats Short	末端反復配列ショート
U _L	Unique Long	ユニークロング配列
U _S	Unique Short	ユニークショート配列
USDA	U.S. Department of Agriculture	米国農務省
UTR	Untranslated Region	非翻訳領域

参考文献

1. Adino GW and Bayu MD, 2022. Review of diagnostic and vaccination approaches of infectious bursal disease of poultry. *Vet. Med. Open J.* 7: 22-28.
2. Afonso CL, *et al.* 2001. The genome of turkey herpesvirus. *J. Virol.* 75: 971-978.
3. Aliyu HB, *et al.* 2021. Genetic diversity of recent infectious bursal disease viruses isolated from vaccinated poultry flocks in Malaysia. *Frontiers in Vet. Sci.* 8: 1-17.
4. Anonymous, 2012, Bursal disease – Marek’s disease vaccine, Serotype 3, Live Marek’s disease vector – Environmental assessment for licensing in Canada. Canadian Food Inspection Agency, *In: www.inspection.gc.ca/animals/veterinary-biological/*
5. Atasoy MO, 2021. Herpesvirus of Turkeys as a vaccine vector in viral diseases: Pros and Cons. *Hosts and Viruses* 8: 13-20.
6. Azad AA, *et al.* 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161: 145-152.
7. Baigent SJ, *et al.* 2005. Replication kinetics of Marek’s disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation. *J. Gen. Virol.* 86: 2989-2998.
8. Bedigian HG and Sevoian M, 1972. Susceptibility of mammalian (hamster) cell culture to infection with herpesvirus of turkeys. *Am. Soc. Microbiol.* 24: 275-280.
9. Biggs PM. 2001. The history and biology of Marek’s disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255 1-24.
10. Bouton C, *et al.* 2018. Foxtail mosaic virus: A viral vector for protein expression in cereals. *Plant Physiology* 177: 1352-1367.
11. Calnek BW, *et al.* 1970. Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.* 14: 219-233.
12. Calnek BW and Hitchner SB, 1973. Survival and disinfection of Marek’s disease virus and the effectiveness of filters in preventing airborne dissemination. *Poult. Sci.* 52: 35-43.
13. Calnek BW, *et al.* 1979. Comparative pathogenesis studies with oncogenic and nononcogenic Marek's disease viruses and turkey herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 40: 541-548.
14. Calnek BW, 2001. Pathogenesis of Marek’s disease virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*
15. Cho BR, *et al.* 1971. Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 1. Preliminary observation. *Poult. Sci.* 50: 881-887.
16. Cho BR and Kenzy SG, 1975. Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 3. Transmission in three different lines of chickens. *Poult. Sci.* 54: 109-115.
17. Dey S, *et al.* 2019. Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Vet. Med.: Research and Reports*, 10: 85-97.
18. Domanska K, *et al.* 2004. Antigenic and genetic diversity of early European isolates of *Infectious bursal disease virus* prior to the emergence of the very virulent viruses: early European epidemiology of *Infectious bursal disease virus* revisited? *Arch. Virol.* 149: 465-480.
19. Etteradossi N and Saif YM, 2013. Chapter 7. Infectious bursal disease. *In: Diseases of Poultry*, 13th edition, Swayne DE. *et al.* eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp219-246.
20. Hall RN *et al.* 2015. Identification of non-essential loci within the *Meleagrid herpesvirus 1* genome. *Virol. J.* 1-12.

資料4 . その他

21. Islam A, *et al.* 2006. Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J. Virol. Methods* 132: 127-134.
22. Islam A and Walkden-Brown SW, 2007. Quantitative profiling of the shedding rate of the three Marek's disease virus (MDV) serotypes reveals that challenge with virulent MDV markedly increases shedding of vaccinal viruses. *J. Gen. Virol.* 88: 2121-2128.
23. Jaikumar D, *et al.* 2001. Adaptation of Marek's disease virus to the Vero continuous cell line. *Vet. Microbiol.* 79: 75-82.
24. Jarosinski KW. 2012. Dual infection and superinfection inhibition of epithelial skin cells by two alphaherpesviruses co-occur in the natural host. *PLoS One*, 7, 1-15.
25. Karpf A.R, *et al.* 1997. Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with Sindbis virus. *J. Virol.* 71, 7119-7123.
26. Kawamura H, *et al.* 1969. A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. *Avian Dis.* 13: 853-863.
27. Kheimar A, *et al.* 2017. Telomeres and Telomerase: Role in Marek's disease virus pathogenesis, Integration and tumorigenesis. *Viruses* 9: 173.
28. Kingham BF, *et al.* 2001. The genome of herpesvirus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses. *J. Gen. Virol.* 82: 1123-1135.
29. Lee S-I, *et al.* 2000. Difference in the *meq* gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 287-292.
30. Le Gros FX, *et al.* 2009. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* 27: 592-596.
31. Letzel T, *et al.* 2007. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 81: 12827-12835.
32. Mahgoub HA, 2012. An overview of infectious bursal disease. *Arch. Virol.* 157: 2047-2057.
33. Mettenleiter TC, 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 106: 167-180.
34. McPherson MC, *et al.* 2016. Marek's disease herpesvirus vaccines integrate into chicken host chromosomes yet lack a virus-host phenotype associated with oncogenic transformation. *Vaccine* 34: 5554-5561.
35. McPherson MC and Delany ME, 2016. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. *Poult. Sci.* 95, 412-429.
36. Meurens F. *et al.*, 2004. Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 78, 3872-3879.
37. Muylkens B, *et al.*, 2009. Coinfection with two closely related alphaherpesviruses results in a highly diversified recombination mosaic displaying negative genetic interference. *J. Virol.* 83, 3127-3137.
38. Okoye JOA and Okpe GC, 1989. The pathogenicity of an isolate of infectious bursal disease virus in guinea fowls. *Acta Vet Brno*, 58: 91-96.
39. Osterrieder K and Vautherot J-F, 2004. The genome content of Marek's disease-like viruses. In F. Davidson & V. Nair (Eds.) Marek's Disease. An Evolving Problem, Elsevier Academic Press, pp 17-31.
40. Prem Paul CT, Kumar MC and Pomeroy BS, 1972. Preliminary observations on egg transmission of turkey herpesvirus (HVT) in turkeys. *Avian Dis.* 16, 27-33.
41. Schat KA and Nair V, 2013. Chapter 15. Marek's Disease. In: Diseases of Poultry, 13th edition, Swayne DE *et al.* eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp515-645.

資料4 . その他

42. Shamblin CE, *et al.* 2004. 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.
43. Sharma JM, *et al.* 1972. Lack of pathogenicity of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys in marmoset monkeys. *J. Natl. Cancer Inst.* 49: 1191-1197.
44. Tink KJ, *et al.* 2005. Effects of *in ovo* vaccination with herpes virus of turkeys against Marek's disease on chicken performance in the absence of a challenge with Marek's disease virus. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 15: 77-86.
45. Witter RL and Solomon JJ, 1971. Epidemiology of a herpesvirus of turkeys: possible sources and spread of infection in turkey flocks. *Infect. Immun.* 4: 356-361.
46. Witter RL and Solomon JJ, 1972. Experimental infection of turkeys and chickens with a herpesvirus of turkeys (HVT). *Avian Dis.* 16: 34-44.
47. Witter RL, 1998. Control strategies for Marek's disease: A perspective for the future. *Poult Sci.* 77: 1197-1203.
48. Zygraich N and Huygelen C, 1972. Inoculation of one-day-old chicks with different strains of turkey herpesvirus. II. Virus replication in tissues of inoculated animals. *Avian Dis.* 16: 793-798.
49. 山本 佑, 2016. — 最新の家畜疾病情報 (XIV) — マレック病. *日獣会誌*, 69, 114-117.
50. 湯浅 襄, 2012. マレック病の病理発生と防疫対策上の問題点. *鶏病研報*, 47, 211-222.