

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

改変 VP2 蛋白質遺伝子導入
犬パルボウイルス CPV630a 株 (CPV *VP2*,
Protoparvovirus carnivoran1)

令和 8 年10月27日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

目 次

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	7
------------------------------	---

資料 2. 審査データの概要	9
--------------------------	---

資料 3. 緊急措置計画書	210
-------------------------	-----

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.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

MSD アニマルヘルス株式会社から、令和8年6月1日付けで承認申請のあった「改変 VP2 蛋白質遺伝子導入犬パルボウイルス CPV630a 株（CPV *VP2*、*Protoparvovirus carnivoran1*）（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は、犬パルボウイルス（以下「CPV」という。）感染症の予防を目的とする犬用生ワクチン株であり、CPV-2c 型に対する感染防御免疫を早期に誘導するために作出された。宿主は、弱毒生ワクチン株 CPV154 であり、犬の疾患である CPV 感染症に対する生ワクチン用のウイルス株として、我が国も含め一般的に使用されている。野生型の CPV に感染した犬は、CPV 感染症を発症し、嘔吐、下痢、出血性腸炎、白血球減少症等の症状を呈し、特に2か月齢未満の仔犬では重症化しやすく、死亡率が高いことが知られている。一方で、本遺伝子組換えウイルスの宿主は、標的臓器における増殖能が低下した弱毒株であり、病原性は認められていない。

また、本遺伝子組換えウイルスには、CPV の野外分離株由来の VP2 カプシド蛋白質遺伝子を弱毒化するため一部改変した配列が導入されている。これにより、CPV-2c 型に由来する VP2 蛋白質を発現し、早期に感染防御免疫を誘導する性質を有する。

審査の概要は、本報告書の2のとおりであり、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じるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であるとの意見を得ている。

この結果を踏まえ、承認申請のあった第一種使用規程に従って本遺伝子組換えウイルスを使用した場合には、我が国における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8年 6月 1日	第一種使用規程承認申請受理	
令和8年 6月 19日	薬事審議会 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8年 6月 26日	学識経験者からの意見提出	
令和8年 10月 27日	審査報告書とりまとめ	

※公開とすることにより、開発製薬会社が知的財産権等を有する非公知情報が開示され、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の属する分類学上の種である CPV-2 型は、犬を自然宿主とするウイルスで、自然環境中に遍在する。本遺伝子組換えウイルスの宿主である CPV154 株は、CPV 感染症に対する生ワクチン株として、1980 年代から現在まで世界各国において使用されており、日本においても 2000 年に製造販売承認されて以来、使用されている。

本遺伝子組換えウイルスには、近年世界的に流行している CPV-2c 型由来の VP2 カプシド蛋白質遺伝子を弱毒化するため一部改変した配列が導入されている。本遺伝子組換えウイルスの塩基配列において宿主と異なっているのは、VP2 カプシド蛋白質遺伝子の配列のみである。これにより、本遺伝子組換えウイルスは CPV-2c 型に対する感染防御免疫を早期に誘導する性質を有する。また、挿入された遺伝子は、複数世代にわたり安定して伝達されていることが DNA 配列分析により確認されている。

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、有毒物質の産生により他の微生物を減少させる性質）

本遺伝子組換えウイルスの宿主である CPV154 株は、CPV 感染症に対する生ワクチン株として、長年にわたり使用されているが、他の微生物を減少させるような性質は報告されていない。CPV154 株は、野生型 CPV と比較して標的臓器での増殖の低下が認められる。

本遺伝子組換えウイルスには、CPV の野外分離株由来の VP2 カプシド蛋白質遺伝子を弱毒化するため一部改変した配列が導入されている。VP2 カプシド蛋白質は主として抗原性及び細胞への侵入・感染に関与する構造蛋白質であり、当該遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列に既知のアレルゲン物質などの有害物質と相同性を有する配列は認められない。また、CPV が標的細胞へ侵入した後のウイルスゲノムの複製能力は、主として非構造遺伝子（NS）領域と呼ばれる遺伝子領域に規定されることが知られているが、NS 領域の配列は、本遺伝子組換えウイルスと宿主において共通であることから、本遺伝子組換えウイルスで宿主と比べて増殖率が増加することは想定されない。実際、犬への接種試験において、本遺伝子組換えウイルスの増殖率は、宿主と同等又はそれ以下であることが確認されている。

また、犬における体内動態などを調査する試験において、本遺伝子組換えウイル

スは、接種後約 4 日目までに主にリンパ系組織、骨髄系組織及び腸管内で増殖した後、接種 9～11 日目頃には減退・消失し、直腸スワブ又は糞便中へのウイルス排泄がみられるのは、接種後 1、2 日目から約 1 週間前後であった。この結果は宿主と共通しており、本遺伝子組換えウイルスの体内動態及び排泄は宿主と同様であると考えられた。

さらには、本遺伝子組換えウイルスは、海外で市販されているが、他の微生物を減少させるような性質は報告されていない。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスについて、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）

本遺伝子組換えウイルスの宿主である CPV154 株は、CPV 感染症に対する生ワクチン株として、長年にわたり使用されているが、病原性についての報告はされていない。CPV154 株を含む混合ワクチンを犬へ接種した試験では、いずれの接種動物においても健康状態は良好に経過した。

CPV は VP2 カプシド蛋白質のアミノ酸配列に基づき、CPV-2、CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c などの亜型に分類される。CPV154 株は CPV-2 に該当し、本遺伝子組換えウイルスに導入された遺伝子配列は CPV-2c 由来の配列を基礎として弱毒化をするため一部改変したものであるが、病原性については亜型間で大きな差異はないとされている。本遺伝子組換えウイルスは、改変 VP2 カプシド蛋白質を発現すること以外については、宿主の特性を引き継いでいると考えられる。

VP2 カプシド蛋白質は感染可能な生物種の範囲を規定する蛋白質ではあるものの、本遺伝子組換えウイルスに導入された遺伝子配列は既に自然界に広く存在する CPV-2c 由来の配列を基礎としており、既知の CPV の感染可能な生物種の範囲を超えて新たな動物種への感染性を付与するものではない。CPV-2 と CPV-2a、CPV-2b 及び CPV-2c では、猫での感受性に違いがあることが知られており、本遺伝子組換えウイルスでは宿主と異なり、猫での増殖が認められるが、本遺伝子組換えウイルスを猫に接種した試験では、供与動物は臨床的に健康であり、異常は認められなかった。そのうえ、本遺伝子組換えウイルスを犬、フェレット、マウス及び鶏へ接種した試験においても病原性は認められなかった。加えて、海外で本遺伝子組換えウイルスが使用されたことで病原性に起因した有害事象の報告はない。

国内に分布し、CPV への感受性が報告されている主な野生動物としてタヌキ及びアカギツネが挙げられるが、犬以外の動物では一般に感受性は低く、感染した場合も軽症又は不顕性感染であることが多い。また、海外でタヌキ及びアカギツネが

生息する地域において本遺伝子組換えウイルスが使用されたことで悪影響を及ぼしたとの報告はない。

本遺伝子組換えウイルスを犬に接種し、糞便試料を別の群に接種することにより5代継代し、試験動物の糞便から回収したウイルスの遺伝子配列を解析したところ変異は検出されず、病原性復帰は認められていない。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスについて、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（野生動物の生息に支障を及ぼす物質を産生する性質）

本遺伝子組換えウイルスの宿主である CPV154 株は、CPV 感染症に対する生ワクチン株として、長年にわたり使用されているが、有害物質を産生するとの報告はない。

本遺伝子組換えウイルスには、CPV の野外分離株由来の VP2 カプシド蛋白質遺伝子を弱毒化するため一部改変した配列が導入されている。本遺伝子組換えウイルスの塩基配列をアレルゲンデータベースにて検索したところ、当該遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列に既知のアレルゲン等の有害物質と高い相同性を有する配列は認められない。また、遺伝子の挿入領域の近隣配列について、有害物質を産生する配列が新たに生じていないことが確認されている。本遺伝子組換えウイルスについて、犬、猫、フェレット、マウス及び鶏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。加えて、海外で本遺伝子組換えウイルスが使用されたことで、有害物質の産生性に起因した有害事象の報告はない。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスについて、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を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）

本遺伝子組換えウイルスの宿主である CPV154 株は、CPV 感染症に対する生ワクチン株として、長年にわたり使用されているが、野外株との相同組換えによる高病原性株の出現や病原復帰についての報告はない。CPV154 株は、CPV 及び近縁種である猫パルボウイルス（FPLV）との間で相同組換えが起こり得るが、感染した動物の免疫成立前の短時間に共感染した場合に稀に起こる現象と考えられる。ま

た、CPV154 株は、パルボウイルスの一種であり、通常、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。

本遺伝子組換えウイルスは、改変 VP2 カプシド蛋白質を発現すること以外については、宿主の性質を引き継いでいると考えられるため、本遺伝子組換えウイルスが国内において感染する可能性のある野生動物として、主にタヌキ及びアカギツネが考えられる。CPV への感染は、糞便中に排泄されたウイルスの経口・経鼻経路からの感染が主な経路であるが、接種動物の飼育実態等を踏まえると、タヌキ及びアカギツネが本遺伝子組換えウイルスに感染する機会は極めて限定的である。

他の微生物への核酸の伝達について、本遺伝子組換えウイルスとの間で相同組換えが起きる可能性があるウイルスとして、宿主と同様に CPV 及び FPLV が考えられるが、本遺伝子組換えウイルスは、犬への接種後 3 日で感染防御が成立し、体内よりウイルスが排除されるため、相同組換えが生じるためには、感染防御が成立する前の短時間に本遺伝子組換えウイルスと近縁パルボウイルスが同時感染する必要があり、相同組換えの可能性は非常に低いと考えられる。加えて、海外で本遺伝子組換えウイルスが使用されたことで野生株との相同組換えに起因した有害事象の報告はない。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスについて、第一種使用規程に従った使用等を行う限り、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

以上を総合的に評価し、本遺伝子組換えウイルスについては、第一種使用規程に従った使用等を行う限り、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書の結論は妥当であると判断した。

＜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8年6月1日

農林水産大臣 殿
環境大臣 殿

東京都千代田区九段北一丁目13番12号
MSD アニマルヘルス株式会社
代表取締役社長 土田 拓史

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

資料1. 第一種使用規程承認申請書

遺伝子組換え生物等の種類の名称	改変 VP2 蛋白質遺伝子導入犬パルボウイルス CPV 630a 株 (CPV VP2、<i>Protoparvovirus carnivoran1</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（昭和 35 年法律第 145 号。以下、「医薬品医療機器等法」という。）第 14 条第 3 項の規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 条に基づき作成される治験実施計画書に従った使用 ③ 医薬品医療機器等法第 14 条第 1 項に基づく承認申請に従った使用（④に該当する行為を除く。） ④ 接種（接種の対象動物は犬であり、食用に供される可能性はない。） ⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残渣の廃棄 ⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む。） ⑦ ①～⑥に付随する行為
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

改変 VP2 蛋白質遺伝子導入犬パルボウイルス CPV 630a 株 (CPV VP2、*Protoparvovirus carnivoran 1*) 生物多様性影響評価書

目次

I	生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(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
イ	分類学上の位置・学名(属及び種)及び株名	1
ロ	宿主の同定の根拠となる事項	1
ハ	宿主を誘導するために用いた遺伝子的改変の内容	1
ニ	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	1
(2)	使用等の歴史及び現状	1
(3)	生理学的及び生態学(生物学)的特性	2
イ	基本的特性	2
ロ	生息又は育成(増殖)可能な環境の条件	5
ハ	捕食性又は寄生性	6
ニ	繁殖又は増殖の様式	6
ホ	病原性	8
ヘ	有害物質の産生性	10
ト	その他の情報	10
2	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	10
(1)	供与核酸に関する情報	10
イ	構成及び構成要素の由来	10
ロ	構成要素の機能	11
(2)	ベクターに関する情報	12
イ	名称及び由来	12
ロ	特性	13
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法	15
イ	宿主内に移入された核酸全体の構成	15
ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法	15
ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過	15
(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	16
イ	目的遺伝子が宿主の染色体に組み込まれているかプラスミドとして存在しているか等	16
ロ	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	16
ハ	目的遺伝子の動物内での発現の安定性	16
(5)	遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	16
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	17
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らの属する生物種との特性の違い	17
ロ	遺伝子組換え微生物等の宿主との識別を可能にするコロニー形成性、発色性等の特徴	23
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	23
(1)	使用等の内容	24
(2)	使用等の方法	25
(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	25
(4)	生物多様性影響が生じ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	25
(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	25
(6)	国外における使用等に関する情報	25
(7)	接種動物の体内における挙動に関する情報	25
イ	接種動物の体内における遺伝子組換え生ワクチンの消長に関する情報	26
ロ	接種動物体及び接種動物の排泄物、血液・体液、卵等からの遺伝子組換えワクチンの環境への拡散の有無に関する情報	26
ハ	接種動物において当該遺伝子組換えワクチンの垂直感染の可能性の有無に関する情報	26
ニ	野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報	27
ホ	その他必要な情報	27
II	項目ごとの生物多様性影響評価	29
1	他の微生物を減少させる性質	29
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	29

資料2. 審査データの概要

(2)	影響の具体的内容の評価	29
(3)	影響の生じやすさの評価	29
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	29
2	病原性	29
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	29
(2)	影響の具体的内容の評価	31
(3)	影響の生じやすさの評価	31
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	31
3	有害物質の産生性	31
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	31
(2)	影響の具体的内容の評価	32
(3)	影響の生じやすさの評価	32
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	32
4	核酸を水平伝播する性質	32
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
(2)	影響の具体的内容の評価	32
(3)	影響の生じやすさの評価	33
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	33
5	その他の性質	33
III	生物多様性影響の総合的評価	33

資料2. 審査データの概要

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

イ 分類学上の位置・学名（属及び種）及び株名

- ・パルボウイルス科 (Family: *Parvoviridae*)
- ・パルボウイルス亜科 (Subfamily: *Parvovirinae*)
- ・プロトパルボウイルス属 (Genus: *Protoparvovirus*)
- ・肉食動物プロトパルボウイルス 1 (Species: *Protoparvovirus carnivoran1*)
通称 犬パルボウイルス 2 型 (Canine parvovirus Type 2; CPV-2)

- ・株名：犬パルボウイルス 154 株 (Canine parvovirus, Strain 154)

ロ 宿主の同定の根拠となる事項

宿主である犬パルボウイルス 154 株（以下、CPV 154 株）¹は、1980 年に英国のインターベット研究所において、【社外秘につき非開示】継代した培養上清をアンプルに分注し、溶封したものをマスターシードウイルスとした。同マスターシードウイルスは、Nobivac Puppy DP（ノビバック PUPPY DP）及び Nobivac DHPPi（ノビバック DHPPi）等の犬用ワクチンに含まれる主剤 CPV 154 株の製造に用いられている（2025 年 9 月時点）。改変 VP2 蛋白質遺伝子導入犬パルボウイルス CPV 630a 株（以下、本遺伝子組換え微生物）の作出には、このマスターシード（【社外秘につき非開示】）から得たウイルスが用いられた。

CPV 154 株はモノクローナル抗体による分析により、CPV 亜型のうち CPV-2 (Original type) に属することが確認されている（別添資料 1）。CPV 154 株において、非構造たんぱく質 NS の遺伝子には、独特な【社外秘につき非開示】配列が確認されており、PCR 等でプライマーの設計によってこの配列を検出することにより、野外株と識別可能である。CPV 154 株、CPV 630a 株、又はその他の CPV-2 検出 PCR プライマー配列及び、これらのプライマーを用いた PCR 試験に関する資料を別添資料 2 に示した。

ハ 宿主を誘導するために用いた遺伝子的改変の内容

—

ニ 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

—

(2) 使用等の歴史及び現状

¹ 宿主及び本遺伝子組換え微生物の国際ウイルス命名委員会による種の名称は *Carnivore protoparvovirus 1* であるが、長年、犬パルボウイルス 2 型 (CPV) の通称が用いられている。CPV 亜型の CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c と original type CPV-2 との混合を避けるため、本申請書においてウイルス名は原則として犬パルボウイルス (略称 CPV) と記載する。また、ウイルス亜型としての CPV-2 (Original type)、2a、2b、及び 2c の各型を区別する際には original CPV type は CPV-2 (Original type) と記載して区別する。

資料2. 審査データの概要

CPV 154 株を含む犬用（混合）ワクチンは 1980 年代より現在まで、世界各国において使用されている。日本においても CPV 154 株を含む犬用（混合）ワクチンが 2000 年に製造販売承認されて以来、使用されている（別添資料 3）。

CPV 154 株を含む犬用（混合）ワクチンの世界における承認国一覧及び販売数量を別添資料 4 に添付した。欧州における規制に基づき、市販後安全性情報の定期報告を欧州医薬品局（以下、EMA）へ提出している。EMA による動物用医薬品の市販後調査基準に基づく調査において、CPV 154 株を含む製品において新たな安全性上の懸念は特定されておらず、対象動物における使用において安全であると結論されている。Nobivac Parvo C（CPV 154 株を主剤とするパルボウイルス感染症予防ワクチン）の市販後安全性報告を別添資料 5 に添付した。

(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性

イ 基本的特性

犬パルボウイルス感染症を引き起こすウイルスは、従来では犬パルボウイルス 2 型（CPV-2）と呼称されていたが、国際ウイルス命名委員会における正式な種の名称は肉食動物プロトパルボウイルス 1（*Protoparvovirus carnivoran1*）である。なお、Minute virus of canines（MVC）は別名犬パルボウイルス 1 型（CPV-1）とも呼ばれていたが、CPV との遺伝的系統は遠く、抗原的な関連はない。CPV はプロトパルボウイルス属（Genus: *Protoparvovirus*）に属するのに対し、MVC はボカパルボウイルス属（Genus: *Bocaparvovirus*）に属する[2]。

パルボウイルスのウイルス粒子はエンベロープを持たず、直径約 25 nm で、正二十面体対称性を有する。宿主指向性及び組織指向性を決定するネコ及びイヌパルボウイルスの受容体結合部位は、カプシドの細胞表面に存在する。パルボウイルスカプシドは合計 60 個のタンパク質分子から構成され、このうち約 90%は VP2 で構成され、約 10%は VP1 で構成される[2, 3]。

CPV のゲノムは、ヘアピン構造の形成を可能にする末端パリンドローム配列を両末端に有する。これらの構造は、DNA 複製の起点として機能するとともに、ビリオン内へのウイルス DNA のパッケージングを促進する。ゲノムは 1 分子の一本鎖のマイナス鎖線状 DNA からなり、長さは約 5 kbp である[2, 4]。主に 2 つの Open reading frame（ORF）があり、選択的スプライシングによって 4 つの蛋白質に翻訳される。第一の ORF は遺伝子複製や発現制御に関わる非構造蛋白 NS1 及び NS2 をコードし、第二の ORF はカプシドを構成する VP1 及び VP2 をコードする。VP1 と VP2 は同じメッセンジャーRNA（mRNA）の選択的スプライシングにより形成され、VP2 の全配列は VP1 遺伝子内にコードされている。VP3 はプロテアーゼによる VP2 切断を経て生成されるが、VP3 の機能については明らかになっていない[5]（図 1）。

資料2. 審査データの概要

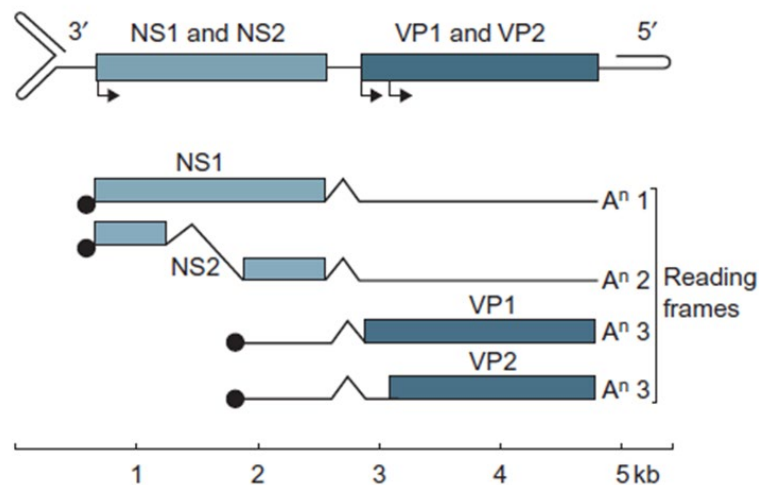


図 1: CPV のゲノム DNA と転写機構の模式図 ([2]より引用)

RNA 転写産物の 5' 末端はキャップされ(黒丸)、3' 末端はポリアデニル化されている(Aⁿ)。

犬パルボウイルス感染症の原因となる犬パルボウイルス 2 型（CPV-2）は、1970 年代に出現して以降、世界各地に急速に広まり、現在まで世界中に存在している。

CPV の自然宿主は、その名称（Canine Parvovirus）の通り、犬である[6]。CPV の感染は、イヌ科（*Canidae*）に属する犬（イエイヌ、*Canis lupus familiaris*）のほか、オオカミ（*Canis lupus*）、コヨーテ（*Canis latrans*）において報告があり、イヌ科イヌ属（*Canis*）に属する動物は感受性を有する可能性があると考えられている。ネコ科（*Felidae*）に属する猫（イエネコ、*Felis catus*）及び、ボブキャット（*Lynx rufus*）においても CPV 感染例が報告されている[6]。CPV 野外株において、VP2 遺伝子のアミノ酸配列に基づく亜型によって猫体内での増殖に違いがみられることが報告されている。CPV-2（Original type）は猫由来の培養細胞では実験的に増殖可能であるものの、猫体内では増殖しない[7]。一方、CPV-2a、2b、2c の亜型（次段落参照）はいずれも猫の体内で増殖することが報告されている[4, 7-10]。

分類学的に食肉目（CARNIVORA）は、ネコ型亜目（FELIFORMIA）及びイヌ型亜目（CANIFORMIA）に大別される。世界において CPV の野外又は実験での感染が報告されている動物種は、ネコ型亜目においてはネコ科ネコ属のイエネコやオオヤマネコ属のオオヤマネコであり、イヌ型亜目においてはイヌ科イヌ属のイエイヌ、コヨーテ、オオカミ、イヌ科タヌキ属のタヌキ（*Nyctereutes procyonoides*）、イヌ科キツネ属のアカギツネ（*Vulpes vulpes*）及びアライグマ科アライグマ属のアライグマ（*Procyon lotor*）である。このうちアライグマに感染するパルボウイルスは RDPV（*Raccoon dog parvovirus*）と呼ばれているが、CPV 感染の報告もある[6, 11-13]。ただしイエイヌから分離された病原性 CPV 株をアカギツネへ実験感染させた例では、症状はみられず、ウイルス排泄は微量であった[14]。イタチ科ミンク属のミンク（*Neovison vison*）への実験感染においては、CPV は接種動物及び同居動物のいずれからも検出されなかった。食肉目に分類される数種の野生動物において CPV の感染例やその可能性が示唆されている動物において、自然宿主であるイヌ科イヌ属イエイヌ以外では感受性は一様ではなく、これらの動物においては野外株に感染しても軽症又は不顕性感染であることも多い。食肉目以外の動物では、鱗甲目センザンコウ科のミミセンザンコウ（*Manis pentadactyla*）[37]

資料2. 審査データの概要

への感染が報告されている。なお、ヒトを含む霊長類（Order Primates）への CPV の感染例は報告されておらず、人畜共通感染症ではない[15]。

CPV は 1978 年に初めて報告され、CPV-2 と名付けられたが、1980 年代初めには（Prototype）CPV-2a、CPV-2b と呼ばれる 2 つの亜型（Variant）が検出され、世界中に広まった。さらにこれらの亜型ウイルスの VP2 アミノ酸残基 297 がセリン（Ser）からアラニン（Ala）に置換した亜型は、new CPV-2a 及び new CPV-2b と呼ばれる。2000 年には、イタリアにおいて new CPV-2b のアミノ酸残基 426 がアスパラギン酸（Asp）からグルタミン酸（Glu）に変化した亜型が報告され、2c とされ、欧州のドイツ、スペイン、ポルトガル、フランス、ベルギーなどの国々や米国、ウルグアイ、アルゼンチンで報告されている[16-18]。このほか、1997 年にベトナムで検出された、2c（a）型、2c（b）型の報告もある。

表1: 犬パルボウイルスの VP2 蛋白質におけるアミノ酸配列の多様性([16]改変)

亜型名称	VP2 アミノ酸残基							
	87	101	297	300	305	375	426	555
CPV-2 (Original type)	Met	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Val
Prototype CPV-2a	Leu	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asn	Ile
Prototype CPV-2b	Leu	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asp	Val
New CPV-2a	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Asn	Val
New CPV-2b	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Asp	Val
CPV-2c	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Glu	Val

Met: メチオニン、Leu: ロイシン、Ile: イソロイシン、Ser: セリン、Ala: アラニン、Gly: グリシン、Asp: アスパラギン酸、Tyr: チロシン、Asn: アスパラギン、Glu: グルタミン酸、Val: バリン

日本においても CPV の発生及び亜型（Variant）分布における、このような経時的推移は他国に類似する点が多い。国内において、CPV は 1979 年に初めて報告され、1980 年代に Prototype CPV-2a 及び CPV-2b が、1990 年代には new CPV-2a が、そしてその後 new CPV-2b が優勢となった。国内での、2014～2019 年の下痢症例における疫学調査で CPV 野生株の亜型の割合は、2b 型（new CPV-2b）が 92%、2a 型（new CPV-2a）が 8%であった[19]。2025 年には、国内において CPV-2c 型の発生も報告された[20]。

現在、多くの国において分布している亜型は new CPV-2a、new CPV-2b、及び CPV-2c である。このため、本申請書においては以降これらを CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c と呼称する。

国内において、下痢を呈した犬症例からの CPV 検出率は 2007～2009 年の 1 歳未満症例で 43.8%[21]、2014～2019 年の症例で 77%[19]であった。また、ペットショップの 4～9 週齢の臨床健康な犬における CPV 検出率は 2.6%[22]であり下痢症例における検出率と比較すると CPV が野外において、下痢症状の起因ウイルスとして重要であることは明らかである。また、調査対象の 5 施設のペットショップのうち、CPV 感染犬が 0 頭であったのは 2 施設[22]のみであり、3 施設において 1 頭以上の CPV 感染犬が確認された。CPV の環境抵抗性を考慮すると、この結果は多頭飼育施設におけるリスク管理の困難さを示している。

資料2. 審査データの概要

ロ 生息又は育成（増殖）可能な環境の条件

CPV 154 株は、犬腎株化（DK）細胞、犬大腿部腫瘍由来株化（A72）細胞、猫腎株化（CRFK）細胞及び猫胎子線維芽（FEF）細胞等の犬及び猫由来細胞で増殖する。

CPV はエンベロープを持たない一本鎖 DNA ウイルスで、環境中で非常に安定であり、酸や熱に抵抗性を示す[23]。エタノール、ヨード系消毒剤及び界面活性剤には抵抗性を示すが、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム等の塩素系消毒剤で不活化される[24]。

野生型 CPV :

自然界において CPV は、感受性動物の口又は鼻に汚染された糞便が接触することにより感染する。野生型ウイルスの複製は、咽頭リンパ節、扁桃、及び顎下リンパ節で始まる。その後ウイルスは一次ウイルス血症を介して、脾臓、胸腺、リンパ節、パイエル板などのリンパ系組織に広がる。顕著なウイルス血症は感染後 1～5 日目で認められ、肺、脾臓、肝臓、腎臓及び心筋からもウイルスが分離されることがある。ウイルス血症期の後、ウイルスはパイエル板から小腸の陰窩細胞に播種し、小腸上皮の障害を引き起こす。また、細胞分裂が活発な、骨髄系・リンパ系前駆細胞への感染により、感染犬に好中球減少症やリンパ球減少症を引き起こす。

CPV は、感染犬の糞便中に排泄される。一般的に、排泄は曝露後 3～4 日目に始まり、最長約 7～10 日間の期間中、糞便中に認められると考えられている[25]。

宿主 CPV 154 株 :

CPV 154 株を含む犬用生ワクチンは、世界各国において長く犬に使用され、安全性が確認されている。CPV 154 株が犬において病原性を示さないことについては、「ホ 病原性」の項にて述べる。

CPV 154 株の犬における組織指向性や増殖様式については、以下の通り試験で確認されている。

犬への接種試験（別添資料 6）において、高用量の CPV 154 株を静脈内及び経口接種¹後 4、6、及び 9 日目の各組織におけるウイルス分布を評価した。接種後 4 日目に、胸腺、脾臓、小腸の内容物、直腸の内容物、骨髄及び血液バフィーコートでウイルスが検出されたが、接種後 9 日目には脾臓のみで検出された。また、接種後 1～6 日目に糞便中へのウイルス排泄がみられ、接種犬の直腸スワブ抽出物をさらに経口接種することにより継代した犬においては、ウイルスの排泄は接種後 4～9 日目にみられた。

別添資料 7 に示す CPV 154 株の犬への接種試験においては、CPV 154 株を経鼻、筋肉内、及び皮下接種した後、糞便へのウイルス排泄の評価において、接種後 2～6 日目に糞便中にウイルスの排泄がみられたが、糞便試料をさらに経口・経鼻接種した群では 2 代目、3 代目の継代群いずれも排泄はみられなかった。

以上より、宿主 CPV 154 株は、感染初期にリンパ組織で増殖するという増殖様式や、ウイルス接種後数日間は糞便中に排泄されるという CPV の特性は引き継いでいるものの、野生型の CPV のように組織での増殖により病原性を生じるような傷害を引き起こすことはないという点、ならびに、一部の組織での増殖の程度は減衰している点などにおいて野生型 CPV とは異なっている。

¹ CPV154 株 10^{8.9} TCID₅₀ 0.5ml を静脈内接種し、同用量のウイルスを同時に経口接種した。

資料2. 審査データの概要

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 該当なし

② 生存能力又は増殖能力

CPV は、血清を添加した一般的な哺乳類細胞培養培地（MEM 培地やダルベッコ改変イーグル培地）で、犬及び猫由来細胞（DK 細胞、A72 細胞、CRFK 細胞及び FEF 細胞）において 37℃で培養し、増殖する[7]（別添資料 8）。

③ 生殖の様式及び交雑

生殖の様式

感受性細胞の細胞質上のレセプターへ結合することにより、ウイルス感染が開始される。CPV はトランスフェリン受容体（TfR）に結合し、クラスリン媒介エンドサイトーシス経路を介して細胞内に取り込まれる[26]と考えられている。

細胞への感染、増殖、放出の過程（図 2）を以下に示す。

- a. CPV は TfR に結合し内在化される。
- b. 初期エンドソームに取り込まれる。
- c. 後期エンドソームへの転換
- d. リソソームへの転換及びホスホリパーゼ A2（PLA2）の活性化
- e. 活性化された PLA2 によるリソソーム膜の破壊、及びウイルスの細胞質内への放出
- f. VP1 核局在シグナル（NLS）の介在により核へ輸送される。ウイルスゲノムは、核膜孔複合体（NPC）を介して輸送された後、複製と構築を開始する。成熟したウイルス粒子は最終的に NPC を通過し、細胞外に放出される。

資料2. 審査データの概要

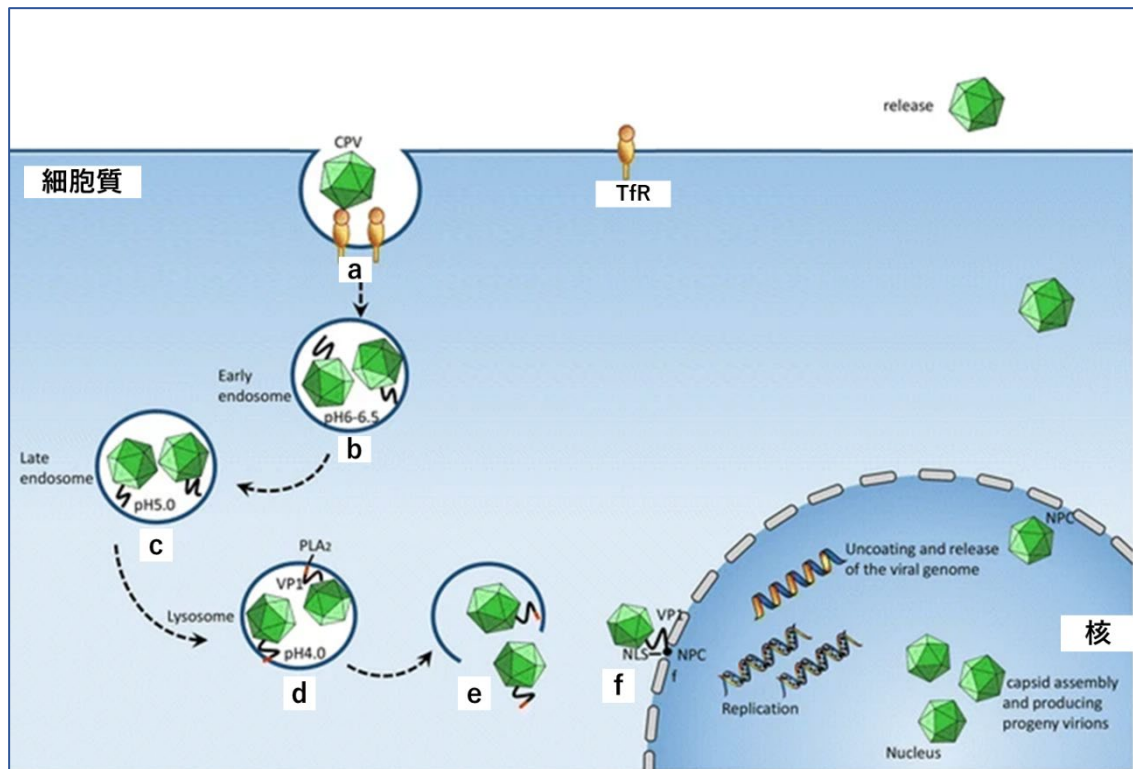


図 2: CPV の感染機構 ([26]より改変)

CPV は DNA ポリメラーゼをコード又はパッケージしていないため、DNA の複製には感染細胞の DNA 複製機構を用いる必要がある。このため、CPV の複製は細胞周期において S 期の状態にある細胞のみで複製が可能である[27]。

細胞の DNA ポリメラーゼにより一本鎖ウイルス DNA から二本鎖 DNA 中間体が生成され、これを鋳型としてウイルス mRNA への転写が起こる。非構造タンパク質 NS1 は、(1) DNA に結合してウイルスの DNA 複製に必要であり、(2) ヘリカーゼとして働き、(3) エンドヌクレアーゼとして働き、(4) 細胞の DNA 複製を阻害して S 期の細胞分裂周期を停止させるなど、ウイルス DNA の複製において多くの機能を担っている[2]。

ゲノムの複製は「ローリングヘアピン型複製」とよばれる複雑な機構で進行すると考えられている。すなわち、マイナス鎖 DNA ゲノム上の末端のヘアピン構造は、二本鎖 DNA 複製中間体 (Replicative form: RF) の合成開始のための自己プライマーとして働き、DNA の二量体や四量体を経て、最終的に一本鎖 DNA が生成され、カプシドにパッケージされた後、放出される[2, 4]。

水平伝播、垂直感染

CPV の感染は、糞便中に排泄されたウイルスの経口・経鼻経路からの感染による水平伝播が主である。野外における CPV 感染で主に問題となるのは水平感染後の幼若犬における病態である。宿主 CPV 154 株については、犬に接種後、排泄されたウイルスが同居犬に水平感染しても臨床症状を示さないことを確認している。

野外 CPV は、幼若犬における病態が主であり、胎子への感染性やそれによる問題はほとんど明らかとなっていない。野生型 CPV は、細胞分裂が亢進状態にある幼若個体の腸管陰窩、

資料2. 審査データの概要

心筋細胞又はリンパ・骨髄系細胞が標的となり、増殖し病原性を示す。一方、性成熟後の成体が感染した場合、野生型ウイルスの初感染であっても組織での増殖は限定的となり、多くの場合は軽症や不顕性である。犬を含む食肉目は胎盤の構造として内皮絨毛性型であり、母体からのウイルス移行性は限定的となる構造を有しており、ウイルスが子宮や胎盤移行しにくい。したがって野生型 CPV の犬や野生動物における、成体へ感染した CPV が胎盤を通じて胎子へ移行する可能性は非常に低いと考えられる。可能性が低いものの出生時、又は出生直後に母体が感染した野生型 CPV に曝露される可能性は否定できない。

一方、CPV 154 株は標的臓器における増殖能が大幅に低下しており、CPV 本来の標的臓器である腸や心臓においても病原性を生じず、垂直感染のリスクは極めて低いと考えられる。実際、宿主の CPV154 株ワクチンを分娩 34 日前の妊娠犬に接種した試験において、母犬及び出生した仔犬のいずれにおいても、臨床症状、剖検及び病理組織検査において異常は認められなかった。また、出生後の仔犬の胸腺、出産時の母犬の子宮排泄物、及び母犬から出産後 1～10 日間に採材した直腸スワブのいずれからでも、CPV が分離されなかったことを確認している（別添資料 9）。

交雑性

CPV は、細胞外で複製することはできないため、本遺伝子組換え微生物が環境中で自律的に複製・交雑することはない。このため、CPV が同一細胞に共感染した場合以外には交雑する可能性はない。

CPV は、*Protoparvovirus carnivoran1* に属する CPV 間、ならびに猫汎白血球減少症ウイルス（Feline panleukopenia virus; FPLV¹）との間で相同組換えが起こりうることが報告されている[28, 29]。ただし、CPV は数日～数週間で免疫成立すると、免疫機構により体内よりウイルスが排除されるため、相同組換えが起こるのは最初に感染した株に対する免疫成立前の短期間に別の株に感染した場合に稀に起こる事象と考えられている[30]。Reddy らの報告においては、2009～2019 年及び 2023 年に分離された CPV 株のゲノム比較解析において、解析対象の CPV 間において相同組換えが起こっていなかったことが示された[31]。CPV は 1978 年に出現して以降、亜型の報告はあるものの、40 年の期間でみられた遺伝的多様性は比較的小さいと評価されている[30]。CPV ゲノムの変遷は、主に point mutation（点突然変異）と natural selection（自然選択）に拠るところが主と考えられている[30, 31]。相同組換えによる交雑株において病原性や感染性の増加を来したり、感受性動物の集団における選択的優位性等を生じたことにより問題が起こったという報告はない。実際、世界中で CPV 154 株やその他のワクチン株を含む犬用生ワクチンが長く使用されているが、野外株とワクチン株との相同組換えによる、高病原性株の出現や、病原復帰の報告は知られていない。

ホ 病原性

野生型 CPV：

野生型 CPV の犬における臨床症状は、嘔吐、下痢（特徴的な血様下痢を含む）、白血球減少症、元気消失、脱水[2, 15, 32-35]であり、海外においては心筋症[2, 15]の報告もある。病理組織学所見としては、小腸粘膜上皮の壊死、陰窩の減数・消失、粘膜下出血のほか、胸腺萎

¹ 国際ウイルス命名委員会 (ICTV) による種名は *Protoparvovirus carnivoran1*

資料2. 審査データの概要

縮、脾臓における濾胞変性・消失、骨髓における造血幹細胞の減少、心筋繊維変性がみられることがある[33]。全ての年齢の犬が感染する可能性があるが、特に2か月齢未満の仔犬で重症化しやすく、死亡率が高い[34]。感染しても、特に成犬では軽症や不顕性感染で経過する例も多い、潜伏期間は3～10日間である。

CPV は、VP2 蛋白質のアミノ酸配列により主に CPV-2 (Original type)、2a、2b、及び 2c の各亜型に分類される。CPV の犬における病原性の研究や臨床的調査は世界的に CPV-2 (Original type) に集中しており、亜型の病原性について報告は限定的であるが、概してウイルスの病原性には亜型間で差異はないとされることが多い。亜型間の病原性の違いの有無については相反する報告もあるが、これは背景因子（個体の年齢、免疫学的状態、ストレス因子等）による病態発現への影響が大きいと考えられている[16, 36, 37]。

野生型 CPV は、猫における感染実験において、下痢、脱水、白血球減少症を来することが報告[38]されている。

野生型 CPV の野生動物における病原性については、未だ明らかになっていないことが多い。CPV の単独感染又は他の病原体との混合感染による疑いが示唆された、食肉目イヌ科のオオカミ[39]、タヌキ[40, 41]及び鱗甲目センザンコウ科のミミセンザンコウ[41]等における胃腸炎や下痢の症例が報告されている。食肉目イヌ科のコヨーテ (*Canis latrans*) の幼齢期における CPV 感染との死亡率との関連を示唆する報告[42]もある。しかし、野生動物における病態については、ケースレポートや観察研究の報告が主であることや、CPV と FPLV の混同（実際は CPV でなく FPLV 感染であった事例）や CPV 以外の病原体との混合感染の事例も多く、CPV との因果関係の解析には注意を要し、確証的結論に至っていない[43]。イヌ科のアカギツネへ実験的に CPV を感染させた実験において臨床症状は認められなかったことが報告されている[14]。

宿主 CPV 154 株：

宿主である CPV 154 株は、犬パルボウイルス感染症に対する弱毒ワクチン CPV 株であり、病原性を示さず、CPV 154 株を含む犬用ワクチンは対象動物である犬において日本及び海外において安全に使用されている。

犬における高用量安全性試験（別添資料 10）において、CPV 154 株を含む混合生ワクチン（Nobivac DHPPi¹）を 4～5 週齢の幼若犬に 10 倍用量接種した試験において、いずれの犬も顕著な局所又は全身反応は認められず、健康状態は良好に経過した。

犬における CPV ワクチンの安全性及び病原性復帰試験（別添資料 6）は、犬間伝播における病原性復帰の徴候評価と犬への高用量接種による安全性の評価の 2 つの目的のために実施された。CPV 154 株を 6 週齢の犬に静脈内及び経口的に同時に接種した。また、接種群と同居させた犬群から採取した直腸スワブ抽出物をさらに別の犬群に接種することを繰り返した。その結果、高用量の宿主株を接種した犬において顕著な臨床症状は認められず、7 代までの犬間伝播においても病原性復帰の徴候は認められなかった。さらに、別添資料 7 に示す CPV ワクチンの病原性復帰試験においても、犬に筋肉、皮下及び口腔内へ同時に接種しても、犬に

¹ Nobivac DHPPi：ジステンパー・犬アデノウイルス（2 型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチンであり、犬パルボウイルス抗原として CPV 154 株を含む。

資料2. 審査データの概要

において臨床症状は認められなかった。また、CPV 154 株を犬間で 3 代継代しても病原性復帰の徴候は認められなかった。

以上の通り、対象動物である犬において宿主株は病原性を示さず、病原性復帰を生じないことが確認されている。

また、宿主株をワクチンの非対象動物である猫及びフェレットに接種しても、臨床症状を示さず、病原性は認められないことが確認されている。また接種後、糞便スワブのウイルス分離検査においても猫及びフェレットのいずれにおいてもウイルスは分離されなかった。このことから宿主株は猫及びフェレットにおいて水平伝播しないと考えられた（別添資料 11、12）

へ 有害物質の産生性

CPV が有害な生理活性物質等を産生することは報告されていない。宿主である CPV 154 株は、野外株を継代によって弱毒化したウイルスであり、野外株と同様に有害物質産生を産生することはないと考えられる。また、CPV 154 株を含む犬用ワクチンは日本を含め世界で多く使用されているが、有害物質を産生したとの報告はない。

Pubmed による文献検索を実施（2024 年 7 月）

キーワード：「canine parvovirus allergen」「carnivore protoparvovirus allergen」

ト その他の情報

—

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

供与核酸は、CPV 改変 VP2 カプシド蛋白質遺伝子である。VP2 カプシド蛋白質遺伝子は、野外分離株 CPV Jes 株由来の塩基配列で構成されており、そのアミノ酸残基【社外秘につき非開示】及び【社外秘につき非開示】がそれぞれ【社外秘につき非開示】及び【社外秘につき非開示】に置換されている。これら 2 つのアミノ酸残基置換は弱毒化が目的であり、対応する塩基配列を有する合成 DNA 断片をカプシド遺伝子配列内に導入している。したがって、本遺伝子組換え微生物は、弱毒化のためのアミノ酸配列【社外秘につき非開示】及び【社外秘につき非開示】に対応する塩基配列以外の配列は CPV の塩基配列で構成されており、CPV 以外の異なる種の遺伝子を含まない。

CPV 154 株、CPV Jes 株、及び CPV 630a 株における、VP2 カプシド蛋白質遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列の比較を別添資料 13 に示した。CPV Jes 株は、【社外秘につき非開示】であり、アミノ酸配列に基づく亜型の型別により CPV-2c 型であることが確認されている。

資料2. 審査データの概要

【社外秘につき非開示】

表 2: 供与核酸及び周辺領域の各構成要素(図 3 の左より順に記載)

構成要素	サイズ	構成要素の由来
非構造遺伝子配列 (NS)	22 bp	CPV 154 株ウイルス由来の非構造遺伝子 (Non Structural Gene、以下 NS) 配列である。【社外秘につき非開示】
遺伝子間領域配列 (IR)	93 bp	【社外秘につき非開示】
カプシド遺伝子配列 (Capsid)	985 bp	CPV Jes 株ウイルス由来のカプシド遺伝子配列である。
合成カプシド遺伝子配列 (Capsid Synthesis)	664 bp	カスタム合成された合成 DNA 断片配列である。カプシド遺伝子配列の一部をコードしており、2 つの弱毒化アミノ酸残基を含む。 【社外秘につき非開示】
カプシド遺伝子配列 (Capsid)	520 bp	CPV Jes 株ウイルス由来のカプシド遺伝子配列である。

ロ 構成要素の機能

各遺伝子の機能を表 3 に記載した。

供与核酸の改変 VP2 カプシド蛋白質遺伝子以外は、宿主 CPV 154 株のウイルスゲノムと同様の機能を有する。CPV Jes 株由来 VP2 カプシド遺伝子について、弱毒化を目的としたアミノ酸残基の置換（【社外秘につき非開示】）に対応する DNA 配列（【社外秘につき非開示】）を含めたフラグメントを化学合成により作製した。

供与核酸の発現による、既知アレルゲンの類似蛋白の予期せぬ発現の可能性を評価するため、合成遺伝子及びその近隣のアミノ酸配列、並びに VP2 カプシド蛋白質遺伝子を実験動物データベース ADSF にて FAO/WHO で推奨されている方法で検索した。検索結果の評価の結果、本遺伝子組換え微生物がアレルゲン等の有害物質を産生する性質は無いものと考えられた。（別添資料 14）。

CPV630a 株は、プラスミド p630att を【社外秘につき非開示】にトランスフェクションすることにより生成される。

表 3: 供与核酸及び周辺領域の各構成要素の機能

構成要素	構成要素の機能
非構造遺伝子配列 (NS)	【社外秘につき非開示】 NS2 の mRNA は、NS1 と共通の 87 個のアミノ酸をコードする左側配列と、mRNA のオルタナティブスプライシングにより生成される右側の 78 個のアミノ酸をコードする配列から成り、NS2 mRNA の全長を構成する。 NS1 は、(1)DNA に結合してウイルスの DNA 複製に必要であり、(2)ヘリカーゼとして働き、(3)エンドヌクレアーゼとして働き、(4)細胞の DNA 複製を阻害して S 期の細胞分裂周期を停止させるなど、ウイルス DNA の複製において多くの機能を担っている[2]。NS2 は、ウイルス遺伝子の複製や発現において機能するとされる[44, 45]。 【社外秘につき非開示】
遺伝子間領域配列 (IR)	非構造遺伝子と構造遺伝子の間にある遺伝子間領域で、非コード領域である。CPV2 の遺伝子間領域の特異的機能については明らかになっていないが、一般的に遺伝子間領

資料2. 審査データの概要

	域は遺伝子制御機能をもつといわれている。 【社外秘につき非開示】
カプシド遺伝子配列 (Capsid)	カプシド蛋白は VP2 と VP1 から成り、その約 90%は VP2 で構成されている。VP1 の mRNA から選択的スプライシングにより VP2 が生成される。VP1 は細胞におけるウイルスの感染成立において必須であり、VP2 は受容体の認識と核内移行などに関わっていると考えられている[26]。 構成要素の由来に基づき、以下の合成カプシド遺伝子配列と構成要素として分けて記載しているが、転写時はカプシド遺伝子配列領域はあわせて読み込まれる。 供与核酸により発現されるカプシド蛋白は宿主同様に VP2 と VP1 から成り、細胞における感染成立、受容体の認識及び核内移行に機能することにおいて宿主と相違無いと考えられる。
合成カプシド遺伝子配列 (Capsid Synthesis)	CPV Jes 株由来 VP2 カプシド蛋白質遺伝子配列断片のうち、CPV の犬に対する弱毒化を目的として【社外秘につき非開示】を置換になるようコードする DNA 配列(【社外秘につき非開示】)となっている。この二つのアミノ酸は、【社外秘につき非開示】。本遺伝子組換え微生物は犬への接種試験において病原性を示さないことが確認されている(別添資料 15、16)。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

本遺伝子組換え微生物を作出するのに用いたベクターは以下である。いずれも市販ベクターで、研究用に汎用されている。

- ① pBluescript II SK(-)
- ② pCR 2.1

資料2. 審査データの概要

ロ 特性

① pBluescript II SK(-) (pBS)

pBluescript (図 4) は、大腸菌由来のプラスミド pBR322 から改変して構築した pUC 系のプラスミドに、ラムダファージ由来の遺伝子配列を導入したファージミドである[46, 47]。市販ベクターには、ssDNA 複製起点の向きの違いにより、pBluescript II SK(+)と pBluescript II SK(-)があるが、本遺伝子組換え微生物の調製に用いられたのは pBluescript II SK(-)である。

β -ガラクトシダーゼ（ラクトースをグルコースとガラクトースに加水分解する酵素）遺伝子（lacZ）、MCS（マルチプルクローニングサイト）、T7 及び T3 RNA ポリメラーゼプロモーター、lac プロモーター、pUC 由来複製起点、アンピシリン耐性遺伝子及び、f(-) ssDNA 複製起点を有する。

lacZ は発色マーカーとして機能する。MCS が lacZ の配列内に存在しているため、特定の細菌を用いることにより MCS への遺伝子挿入の有無によって青白識別でき、遺伝子の挿入状態を確認できるようになっている。

pBluescript II SK(-)は実験用クローニングベクターとして汎用されているもので、全塩基配列が決定されており、病原性、伝染性及び伝達性に関する遺伝子は保持しない。

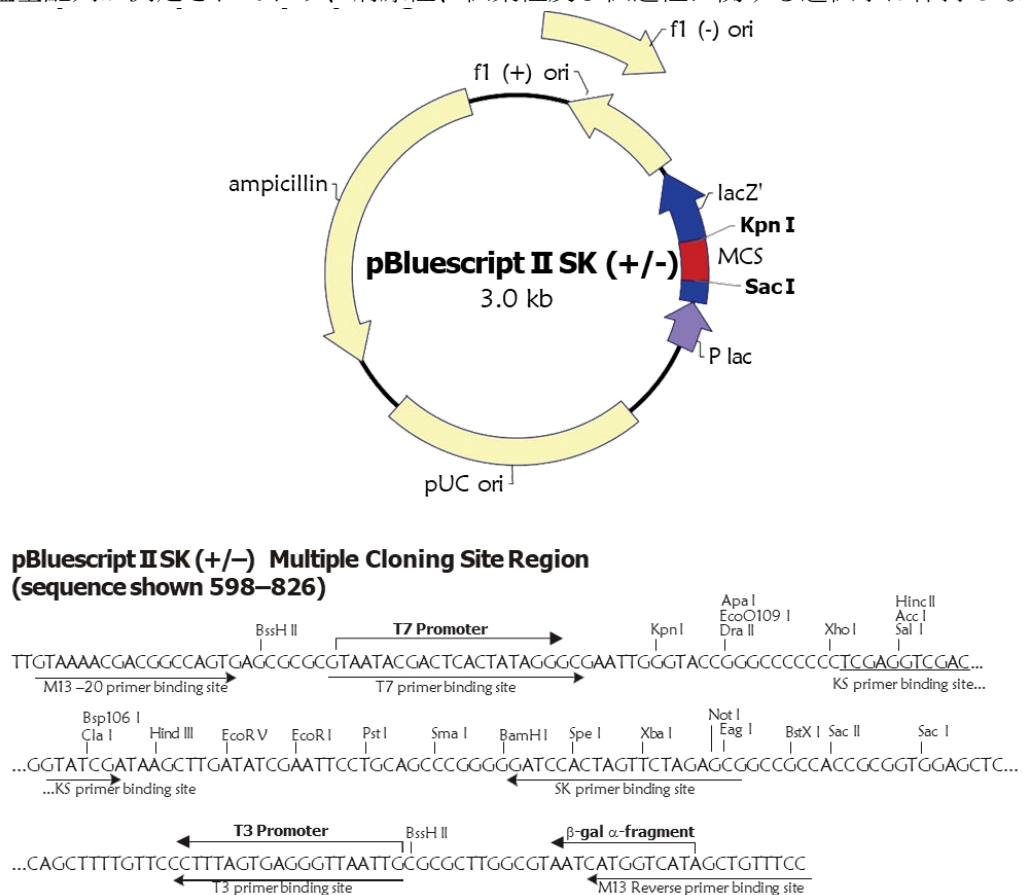


図 4: プラスミド pBluescript の構造

② pCR 2.1

ベクター pCR2.1 (図 2) は PCR 産物のサブクローニング用として設計されたプラスミドである。 β -ガラクトシダーゼ（ラクトースをグルコースとガラクトースに加水分解

資料2. 審査データの概要

する酵素) α 遺伝子 (lacZ α)、lac プロモーター、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、pUC 由来複製起点、in vitro での RNA 転写及びシーケンス解析用の T7 プロモーター及びプライミングサイト、シーケンス解析用の M13 プライミングサイト、及び、f1 起点を含む。lacZ α は、 β -ガラクトシダーゼの始めの 146 アミノ酸断片をコードしており、 Ω 断片を用いたトランス相補性により、青白色スクリーニング用の活性 β -ガラクトシダーゼが得られる。

in vitro での RNA 転写とシーケンシング用の T7 プロモーター/M13 フォワード及びリバースプライマー領域を持つ。前述の pBruescript と同様に、薬剤耐性マーカーを持ち、導入大腸菌ではコロニーのスクリーニングが色で容易に判別できる。病原性及び伝染性に関する遺伝子は保有しない。

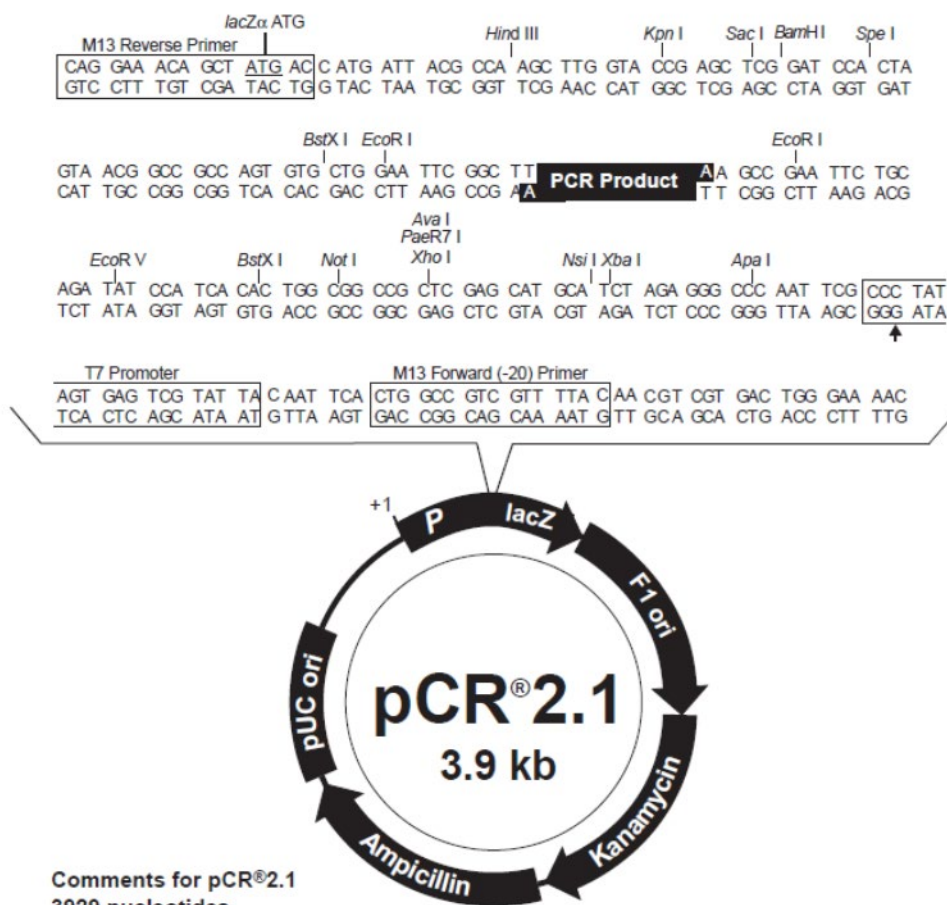


図 5: プラスミド pCR2.1 の構造

資料2. 審査データの概要

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

別添資料 17 に遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株の DNA 塩基配列及び構成配列の由来を示した。

以下の工程により、本遺伝子組換え微生物を構築した。CPV 630a 株構築におけるクローニング工程の模式図を別添資料 18 に示す。

【社外秘につき非開示】

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

前項に記載の通り。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

【社外秘につき非開示】 ウイルス CPV 630a を、HA 試験、CPV 特異的 IFA を用いたウイルス含有量試験、及びシーケンス解析により評価した。ウイルス CPV 630a のシーケンス解析により、組換えが意図した通りに起こったことを確認した。

【社外秘につき非開示】。

資料2. 審査データの概要

(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

イ 目的遺伝子が宿主の染色体に組み込まれているかプラスミドとして存在しているか等

目的遺伝子であるカプシド遺伝子は、宿主 CPV 154 株のゲノム DNA に組み込まれている。
本遺伝子組換え微生物 CPV630a について、DNA の遺伝子配列を分析し、意図したとおりの配列が DNA に組み込まれていることを確認している（別添資料 17、19）。

ロ 移入された核酸の複製物の世代交代時における伝達の安定性

本遺伝子組換え微生物は、プラスミド p630a を培養細胞にトランスフェクションして生成される。プラスミド p630a を培養細胞にトランスフェクションした直後の時点、及び、細胞培養継代後のウイルス DNA を抽出し、遺伝的安定性についてシーケンス解析を実施し配列比較することにより評価した。この結果、トランスフェクション後 0 継代目、培養細胞での 1、2 継代目（別添資料 26）、及び 3 継代目（別添資料 27）の試料において、いずれも配列は参照配列と一致し、移入された核酸の世代交代時における伝達の安定性が示された。

病原性復帰試験（別添資料 15）において、本遺伝子組換え微生物を犬に接種し、糞便試料を別の群に接種することにより 5 代継代し、試験動物の糞便から回収したウイルスの遺伝子配列について参照配列¹と比較した結果においても変異は検出されず（別添資料 26）、動物内での本遺伝子組換え微生物の遺伝的安定性が示された。

ハ 目的遺伝子の動物内での発現の安定性

CPV 630a 株を含む犬用ワクチンの免疫成立時期評価試験（別添資料 27）において、ワクチンを接種した対象動物においては、接種後に動物内で改変 VP2 蛋白質が発現されることにより 2c、2a 及び 2b の各亜型に対して液性免疫を誘導した。またワクチン接種 3 日後に CPV 野外株による攻撃したところ、対照群（ワクチン非接種群）においては犬パルボウイルス感染症の臨床症状がみられたのに対し、試験群（ワクチン接種群）においては有意な臨床症状はみられず、CPV 630a 株の非病原性の特性が安定していることが示された。本試験において、ワクチン接種 6 日後に接種動物の直腸スワブから回収したウイルスの CPV 630a 株特異的 PCR 解析において CPV 630a 株が同定された。

従って、本遺伝子組換え微生物の動物内での発現の安定性が確認された。

以上より、in vitro 及び in vivo において、本遺伝子組換え微生物は遺伝的に安定であり、動物内での遺伝子発現においても安定していることが示された。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

PCR 法及びシーケンス解析法によって、遺伝子組換え生物等の検出及び識別が可能である。なお、宿主 CPV 154 株と CPV 630a 株の区別にはシーケンス解析法が用いられる。各方法の感度及び信頼性について、以下に記載する。

¹ 参照配列：「別添資料 27：CPV 630a 株の配列解析」内で示した解析により同定された参照配列

資料2. 審査データの概要

PCR 法：

【社外秘につき非開示】宿主 CPV 154 株及び本遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株と、他のワクチン株および野外株を識別することができる。これらの PCR 法の特異性は高く、理論的検出限界は 5 μ L サンプルあたり 1 ゲノムコピーである。検出用プライマー配列及び PCR 法に関する資料を別添資料 2 に示した。

シーケンス解析：

CPV 630a 株の同定及び、他の CPV 遺伝子との区別はサンガー法及び NGS によるシーケンス解析により確認できる。

【社外秘につき非開示】比較的小さな重複断片（100～500 bp）を用いて二方向で配列決定をすることにより、サンガー法を用いて 100%の精度でコンセンサス配列を構築することができる。サンガー法による配列解析により、DNA 配列に基づく CPV 630a 株の識別が可能である。サンガー法は配列の同定に関して高い信頼性を有することから、配列解析法として汎用されている。単一塩基位置における異なる塩基の検出限界については、試料における別アレルの混在割合として 5～20%までであり、NGS 法においては 0.1～1%、測定条件によっては 0.01%未満までも検出可能とされる[49, 50]。

(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らの属する生物種との特性の違い

本遺伝子組換え微生物は、宿主由来の非構造蛋白と Jes 株由来の CPV-2c カプシド蛋白を発現するハイブリッドパルボウイルスであり、犬パルボウイルス以外の生物の「外来性」の蛋白を発現する遺伝物質を含んでいない。宿主でみられる以下に示すような主な特性は変化していない。

- ・ 犬大腿部腫瘍由来株化（A72）細胞、犬腎株化（SAH-DK）細胞¹にて増殖する（別添資料 15、16、8²）。
- ・ 犬において、犬パルボウイルス感染症の臨床症状を起こさない（別添資料 15、30）。
- ・ 犬パルボウイルス感染症に対して免疫を惹起する（別添資料 30、31）。

VP2 領域におけるアミノ酸配列に基づく CPV 亜型分類において、宿主 CPV 154 株は CPV-2 型に、本遺伝子組換え微生物は CPV-2c 型に分類される。CPV 野外株においては、VP2 カプシド蛋白質遺伝子のアミノ酸配列に基づく亜型によって猫における増殖に違いがみられることが報告されている。CPV-2（Original type）は猫由来の培養細胞では実験的に増殖可能であるものの、猫体内では増殖しない[7]。一方、CPV-2a、2b、2c の亜型はいずれも猫において増殖することが報告されている[4, 7-10]。⑤に後述するように、宿主 CPV 154 株は CPV-2（Original type）であり猫体内で増殖せず、本遺伝子組換え微生物は CPV-2c 型であり、猫体内で増殖すると考えられる。実際、本遺伝子組換え微生物の猫における安全性試験において、CPV 630a 株を接種した猫の直腸スワブから CPV 630a ウイルスが分離されることから、猫体内で増殖することが示唆された（別添資料 30）。

¹ 犬腎株化（SAH-DK）細胞：犬腎株化細胞であり、SAH は本株化細胞を樹立した Solvay Animal Health 社の略である。

² 病原性復帰試験及び体内分布試験におけるウイルス分離において A72 細胞を用いて培養した。SAH-DK 細胞は実製造においてウイルスを培養する際に使用される培養細胞である。

資料2. 審査データの概要

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の有無）

本遺伝子組換え微生物は宿主同様に、A72 細胞、SAH-DK 細胞等の犬由来細胞において、一般的な細胞培養条件（ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ ）で増殖する。CPV 630a 株は宿主 CPV 154 株の遺伝子配列と比較し、VP2 蛋白質遺伝子配列が異なる。この遺伝子はカプシドを構成する構造遺伝子であり、抗原性や細胞への侵入・感染に関与する。一方、増殖性との関係においては、細胞侵入後のゲノム複製・産生能力（内在的複製能：Intrinsic replicative capacity）は主として NS 領域に規定される。NS 領域の配列は CPV 630a 及び CPV 154 株の両株において同一であるため、内在的複製能に違いを生じることは考えにくい。

【社外秘につき非開示】各培養細胞におけるウイルス接種後のウイルス力価は、各 3 バッチのウイルス原液（別添資料 8）において CPV 154 株は【社外秘につき非開示】日間の培養後【社外秘につき非開示】 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、CPV 360 株は【社外秘につき非開示】日間の培養後【社外秘につき非開示】 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ を示し、CPV 154 株は CPV 630 株と比較し、高いウイルス力価まで増殖した。

CPV 630a 株の犬における体内分布試験（別添資料 28）において、約 4 週齢の犬へ本遺伝子組換え微生物 $10^{7.0} \text{TCID}_{50}$ を皮下接種後、4 日目と 11 日目の各組織におけるウイルス分布を評価した。4 日目に、胸腺、脾臓、腸管、リンパ組織、扁桃、肝臓及び注射局所の皮膚でウイルスが分離された。ウイルス含有量が最も多く検出された組織は胸腺であった。11 日目には、これらの組織におけるウイルス含有量は、ほとんどが検出限界以下となった。腎臓、肺、脳、心臓では、4 日目及び 11 日目のいずれにおいても、ほとんど又は全くウイルスが検出されなかった。直腸スワブにおいては、接種後 1～8 日目にウイルスが検出された。

CPV 630a 株の病原性復帰試験（別添資料 15）において、4～6 週齢の犬に、本遺伝子組換え微生物 $10^{7.4} \text{TCID}_{50}$ を皮下接種後、糞便中のウイルス含有量を評価した。この結果、糞便中に接種後 2～4 日目にウイルスが検出され、排泄のピークは接種後 3、4 日目であった。2～6 日目の糞便をプールした試料を別の犬群に経口・経鼻接種することを 5 継代まで繰り返したところ、5 継代接種後においては、排泄は 3～6 日目にみられた。

したがって、本遺伝子組換え微生物の犬の体内において、接種後約 4 日目までに主にリンパ系組織、骨髄系組織、及び腸管内で増殖した後、接種 9～11 日目位には減退・消失した。また、直腸スワブ又は糞便中へのウイルス排泄がみられるのは、接種後 1、2 日目から約 1 週間前後であった。このため、1. (3)、ロに記載した宿主の増殖動態と同様であった。

以上より、CPV 630a 株の増殖性は CPV 154 株と同等またはそれ以下と考えられる。

② 遺伝的特性

本遺伝子組換え微生物は、宿主 CPV 154 株由来のバックボーンに弱毒化 CPV-2c カプシド蛋白をコードする遺伝子を導入した犬パルボウイルスである。遺伝子組換え微生物は、CPV 由来以外の「外来性」蛋白質をコードする遺伝物質を有しないため、新たな形質や特性は発現しないと考えられる。本遺伝子組換え微生物は、非構造遺伝子、カプシド遺伝子、及び両端のフランキンゲン末端逆位反復配列を有する典型的な犬パルボウイルス遺伝物質のみから構成されている。

挿入された VP2 カプシド蛋白質遺伝子には 2 つの弱毒化配列が加えられている。アミノ酸残基【社外秘につき非開示】に置換している。塩基配列において、宿主 CPV 154 株と異なってい

資料2. 審査データの概要

るのはカプシド蛋白の配列のみであり、遺伝子組換え微生物においてワクチンの免疫原としての弱毒化改変カプシド蛋白を発現する以外は宿主との遺伝的特性における差異はないと考えられる。

③ 病原性

CPV 630a 株は、長年対象動物に対して安全なワクチン株として使用されてきた実績を持つ CPV 154 株をバックボーンとし、抗原性に関わる弱毒化 VP2 蛋白質遺伝子が導入された遺伝子組換え微生物である。

CPV 630a 株に導入されている VP2 蛋白質遺伝子配列は、CPV 亜型における 2c 型の Jes 株に由来し、CPV 以外の種の遺伝子を含まない。I、1、(3)に記載の通り、犬における CPV の病原性において亜型間で差異はないと考えられる。

CPV 630a 株が病原性を示さないことについて、CPV 630a 株は遺伝子配列において次の特徴を有する。第一に、【社外秘につき非開示】一般的に野生型 CPV にはみられないことから、一定の弱毒化への関与が考えられている。第二に、本遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株には、(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法、イ、④に示す通り、さらに VP2 カプシド蛋白質遺伝子に弱毒化のためのアミノ酸 2 残基をコードする配列が導入（【社外秘につき非開示】）されている。

本遺伝子組換え微生物構築時の【社外秘につき非開示】。本遺伝子組換え微生物 CPV 630a は、中間産物 CPV 630 の遺伝子配列のうち、VP2 カプシド蛋白質遺伝子に弱毒化のためのアミノ酸 2 残基（【社外秘につき非開示】）をコードする配列が更に導入されている。宿主株 CPV 154 株においても、【社外秘につき非開示】の配列は同配列であり、弱毒化に関与するものと考えられている。

また、本遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株は、以下の通りワクチンの対象動物である犬及び非対象動物において、病原性を示さないことが確認されている。

犬での CPV 630a 株の病原性復帰試験（別添資料 15）において、本遺伝子組換え微生物を 4～6 週齢の犬に皮下投与しても、さらに接種犬の糞便試料を経口・経鼻接種することにより犬間で 5 継代しても、接種群及び 5 継代までのいずれの継代群の犬においても臨床症状は認められなかった。

CPV 630a 株の体内分布試験（別添資料 16）において、本遺伝子組換え微生物を皮下接種後、体温は正常範囲内であり、臨床症状はみられなかった。また、心筋の病理組織検査において、本遺伝子組換え微生物を接種したいずれの個体においても肉眼的又は組織学的異常は認められなかった。

したがって、犬における接種試験においても宿主ウイルス同様に、病原性を示さない本遺伝子組換え微生物の特性が確認された。

さらに、ワクチンの対象動物以外の動物種として猫、フェレット、マウス及び鶏に本遺伝子組換え微生物を接種することにより、各動物種における安全性を評価した。猫（別添資料 30）においては、本遺伝子組換え微生物を皮下及び経口・経鼻接種した後、軽度で一過性の白血球数低下がみられた以外に、臨床症状に異常は認められなかった。フェレット（別添資料 31）、マウス（別添資料 32）及び鶏（別添資料 33）において、いずれも本遺伝子組換え微生物の接種後、CPV に関連する臨床症状は認められなかった。

以上より、対象動物である犬において、接種犬又は接種犬より排泄された CPV 630a 株を接種した、いずれの個体においても病原性を示さないという特性において、1. (3)、ホに記載した

資料2. 審査データの概要

宿主の特性と同様であった。また非対象動物である猫、フェレット、マウス及び鶏いずれにおいても、病原性が懸念されるような所見は認められなかった。

④ 有害物質の産生性

宿主 CPV 154 株は、犬のパルボウイルス感染症に対するワクチンとして世界中で長年使用されており、野生動植物の生育に問題を生じさせるような報告は認められなかったことから、有害物質の産生性はないと考えられる。

本遺伝子組換え微生物のカプシド遺伝子の由来である Jes 株は野外株であるが、弱毒配列を含めるためにクローニング工程において合成 DNA 遺伝子が用いられている。アレルゲン等の予期せぬ発現の可能性を評価するため、合成遺伝子及びその近隣のアミノ酸配列、並びに VP2 カプシド蛋白質遺伝子をアレルゲンデータベース ADSF にて FAO/WHO で推奨されている方法で検索した。検索結果の評価の結果、本遺伝子組換え微生物がアレルゲン等の有害物質を産生する性質は無いものと考えられた。（別添資料 14）。

さらに、対象動物の犬及び非対象動物の猫、フェレット、マウス、及び鶏を用いた接種試験（別添資料 15、16、30、31、32、33）においても有害物質の産生性を示す所見は認められなかったことから、有害物質の産生又は意図しない性質の発現はないものと考えられる。また、本遺伝子組換え微生物を含む犬用ワクチンは、海外においては 2021 年より市販され野外使用されているが、自然環境又は人における問題を生じたとの報告はなく、安全性が確認されている。

以上より、本遺伝子組換え微生物が有害物質を産生する可能性は極めて低いと考えられる。

⑤ 感染性

本遺伝子組換え微生物を以下の動物に接種した試験において、組織や糞便からのウイルス検出及び、血清や組織中の抗体検査を実施した。

犬（別添資料 15）及び猫（別添資料 30）においては、接種後の動物体内より本遺伝子組換え微生物が分離された。また、接種後の犬及び猫の糞便・直腸スワブへのウイルス排泄が認められた。したがって、本遺伝子組換え微生物は犬及び猫に感染性を有することが確認された。

フェレット（別添資料 31）、マウス（別添資料 32）及び鶏（別添資料 33）においては、血清、組織又は糞便のウイルス分離において本遺伝子組換え微生物は検出されず、接種後に HI 抗体陽転のみがみられた。マウスにおいて、中和抗体価は陰性であり、HI 法で検出された抗体は CPV 抗原との非中和性の交差反応によるものであると考えられた。フェレット、マウス、及び鶏のいずれにおいても、糞便中にウイルスは検出されず、ウイルス排泄はないことが確認された。

1. (3)、イに記載の通り、CPV 亜型において猫での増殖に違いがみられることが報告されている。CPV-2 (Original type) は猫由来の培養細胞では実験的に増殖可能であるものの、猫体内では増殖しない[7]。一方、現在国内及び世界に分布している CPV の 3 つの亜型である CPV-2a、2b、2c はいずれも猫において増殖することが報告されている[4, 7-10]。宿主 CPV 154 株は CPV-2 (Original type) であり猫体内で増殖せず、本遺伝子組換え微生物は CPV-2c 型であり猫体内で増殖する。

⑥ 内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性

資料2. 審査データの概要

宿主 CPV 154 株は感染により免疫抑制を起こさず、本遺伝子組換え微生物についても同様であるため、内在性ウイルスの活性化の可能性は極めて低いと考えられる。また、本遺伝子組換え微生物は海外において臨床使用されているが、内在性ウイルスの活性化及び病原性付与に起因した事象は報告されていない。

⑦ 接種動物からの排泄及び同居感染性

本遺伝子組換え微生物は、宿主同様に犬に接種後、約 1 週間程度糞便中にウイルスを排泄する。CPV 630a 株の犬への接種試験における排泄に関する結果は以下の通りである。

①に記載の通り、CPV 630a 株の犬における体内分布試験（別添資料 16）において、約 4 週齢の犬へ本遺伝子組換え微生物 $10^{7.0}$ TCID₅₀ を皮下接種後、直腸スワブにおいて接種後 1～8 日目にウイルスが検出された。

CPV 630a 株の病原性復帰試験（別添資料 15）において、4～6 週齢の犬に、本遺伝子組換え微生物 $10^{7.4}$ TCID₅₀ を皮下接種後、糞便中のウイルス含有量を評価した。この結果、糞便中に接種後 2～4 日目にウイルスが検出され、排泄のピークは接種後 3、4 日目であった。2～6 日目の糞便をプールした試料を別の犬群に経口・経鼻接種することを 5 継代まで繰り返したところ、5 継代接種後においては、排泄は 3～6 日目にみられた。

CPV 630a 株を含む犬用ワクチン Nobivac Puppy DP PLUS の免疫成立時期評価試験（別添資料 28）においては、4 週齢の犬に本遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株 $10^{5.1}$ TCID₅₀ を含むワクチンを皮下接種後、2～6 日目にウイルスが検出された（図 6）。

直腸スワブにおける排泄動態について、犬に宿主 CPV154 株を接種した結果と、CPV630a 株を接種した結果を図 6 に示した。排泄は、いずれのウイルス株も接種後 1～2 日目に始まり、3～5 日目付近でピークとなった後減衰し、7 日目前後以降は検出されなくなるという動態において同様であった。

資料2. 審査データの概要

したがって、犬における本遺伝子組換え微生物の排泄動態は、1. (3)、ロで述べた宿主の特性と同様である。

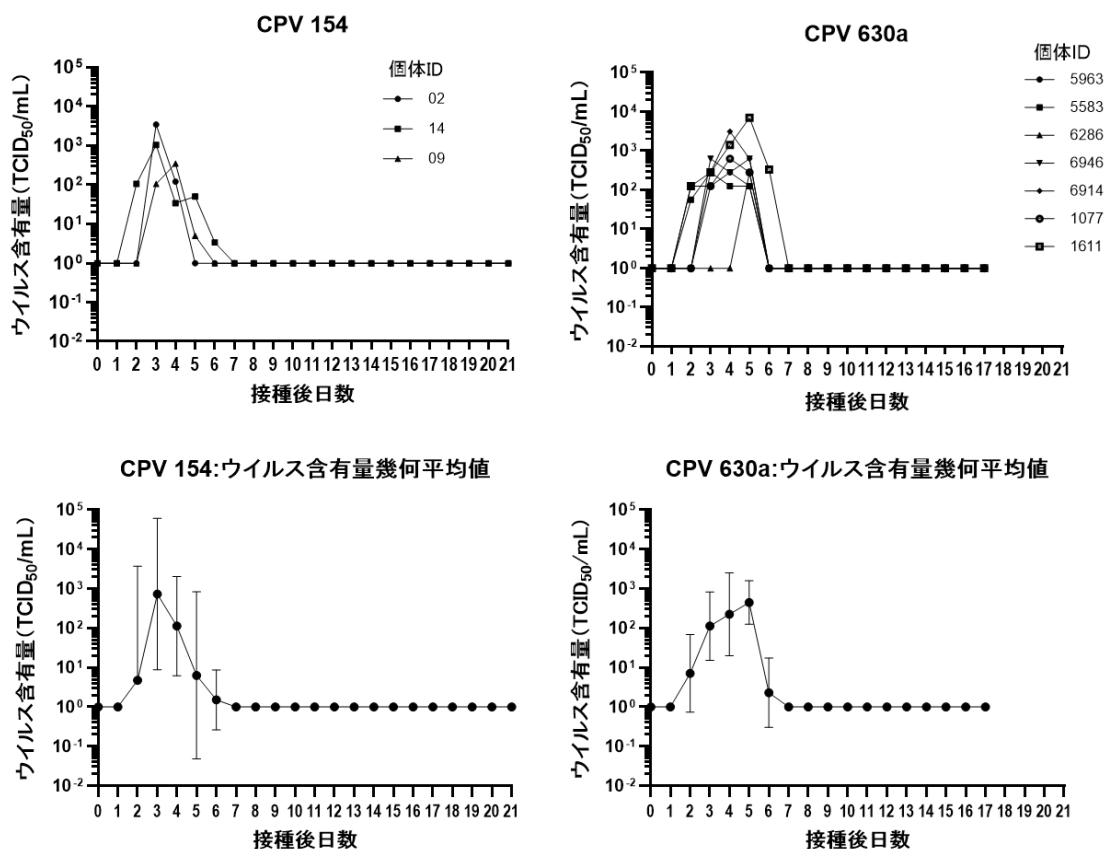


図 6: 直腸スワブにおけるウイルス含有量測定結果

CPV 154 株については、CPV ワクチン(CPV 154 株)の安全性及び病原性復帰試験(別添資料 7)の接種群(1 継代目)の結果(接種日以降)を引用し、CPV 630a 株については、Nobivac Puppy DP PLUS¹(CPV 630a 株を含むワクチン)の免疫成立時期評価(別添資料 28)におけるワクチン接種群の結果(接種日以降)を引用し、作図した。

上段: 個体別ウイルス含有量成績(左: CPV 154 株、右: CPV 630a 株)

下段: ウイルス含有量幾何平均値(左: CPV 154 株、右: CPV 630a 株)

CPV154 株の同居感染性について、CPV 154 株を 3 頭の犬(接種群)に筋肉内、皮下、及び経口経路で高用量接種し、非接種同居群 1 頭(B 群)と同居させたとき、接種群へ接種し同居開始後、7 日目に同居犬の直腸スワブ又は糞便試料において CPV が分離された。CPV 154 株接種犬から同居犬への同居感染が認められたものの、各個体の直腸スワブにおける CPV 分離検査では接種群では排泄が 2~5 日間程度(ウイルス含有量の範囲: 0.7~3.54 log₁₀TCID₅₀/mL)で認められたのに対し、同居犬ではわずかな排泄が 1 日間(ウイルス含有量の範囲: 0.7 log₁₀TCID₅₀/mL)みられたのみであった。また、接種群及び同居群のいずれの個体においても、臨床症状はみられなかった(別添資料 7)。

¹ Nobivac DP Plus、Nobivac Puppy DP Plus: 本遺伝子組換え微生物 CPV630a 株と犬ジステンパーウイルスの混合生ワクチンである。

資料2. 審査データの概要

本遺伝子組換え微生物を接種した動物からの排泄については、対象動物以外に猫（別添資料 30）、フェレット（別添資料 31）、マウス（別添資料 32）、及び鶏（別添資料 33）においても評価された。この結果、猫において、排泄及び同居感染性を認めた。フェレット、マウス、及び鶏においては、排泄はみられなかった。

宿主 CPV 154 株の猫への接種では、猫における排泄は認められなかった（別添資料 11）が、本遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株の猫への接種（別添資料 30）では 10 頭中 6 頭において直腸スワブに排泄がみられた。多くは接種後 3～5 日目の期間に 1 日間又は 2 日間 CPV 陽性となった。また、接種後 1 日目、11 日目にそれぞれ 1 頭ずつの猫で、1 日間のみ排泄がみられた。

1. (3)、イに記載の通り、CPV 亜型において猫での増殖に違いがみられることが報告されている。CPV-2 (Original type) は猫由来の培養細胞では実験的に増殖可能であるものの、猫体内では増殖しない[7]。一方、CPV-2a、2b、2c の亜型はいずれも猫において増殖することが報告されている[4, 7-10]。宿主 CPV 154 株は CPV-2 (Original type) であり猫体内で増殖せず、本遺伝子組換え微生物は CPV-2c 型であり猫体内で増殖する。

⑧ 自然界での生存能力

CPV2 は環境中で非常に安定であり、環境負荷に対して抵抗性を有する。本遺伝子組換え微生物は CPV2 以外の種の外来遺伝子を有しておらず、自然界での生存能力は宿主と同様であると考えられる。CPV の高い環境抵抗性は、ウイルスの非エンベロープ構造及び安定なカプシド構造に起因するものであり、亜型間で有意な差が生じることは示されていない。環境中の物理化学的安定性を左右する構造要素は、亜型間で高度に保存されており、糞便中並びに水中での生存能力、温度又は pH の違いによる生存能力について、本遺伝子組換え微生物と宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違はないと考えられる。したがって、CPV 154 株も CPV 630 株も環境抵抗性において同等と考えられる。

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

カプシド蛋白は CPV 特異モノクローナル抗体により検出可能である。CPV 特異モノクローナル抗体は犬パルボウイルスを特異的に検出するが、宿主と CPV630a 株との区別をすることはできない。宿主との識別には、2. (4)に記載の通り、シーケンス解析が用いられる。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

犬パルボウイルス感染症は、犬の消化器感染症において最も重要な疾病の一つである[34]。幼若犬において、CPV 感染は重篤又は死亡のリスクが高い。成犬においては、CPV 感染は軽症又は不顕性感染となるケースも多いが、特に繁殖場やペットショップ等の多頭飼育の環境においては、CPV の高い環境抵抗性のため糞便中に排泄されたウイルスが残存しやすく、同居する幼若犬が感染して問題となる場合がある。また、これらの施設における CPV 発生の影響は、罹患動物における病状の深刻さに加えて、廃業のリスクを抱えるなど社会経済的損失も大きい。

CPV に対するワクチン接種は、コアワクチンとして幼若期及びその後定期的に追加接種すべきワクチン抗原としてガイドラインで推奨されている。国内において製造販売承認され、流通している犬用パルボウイルスワクチン又は混合ワクチンに含まれる犬パルボウイルス抗原は全て CPV 生ワクチン株である（動物医薬品検査所 動物用医薬品等データベース：

資料2. 審査データの概要

<https://www.vm.nval.go.jp/>)。これらのワクチンは、製品の承認内容に基づき4～8週齢以上の犬への投与が用法となっている。

仔犬への初回ワクチン接種が行われる時期は、移行抗体の漸減期と重なることが多く、仔犬によって移行抗体レベルにバラつきがみられる。移行抗体レベルが高い時期にワクチンを接種し、抗体の干渉により仔犬において免疫応答しない場合や、逆に移行抗体が早期に減衰した場合にはワクチン接種前に感染のリスクが高まるという課題がある[51, 52]。仔犬が野外株に感染しうるが、ワクチンによる免疫は得られないという易感染状態の期間は Immunity gap と呼ばれる。

仔犬の移行抗体レベルの背景因子は、母犬のワクチン歴や抗体価に加え、母犬の哺育・授乳行動にも影響を受けるため、コントロールが困難である。この点において、本遺伝子組換え微生物を含むワクチン接種による抗体応答では、中～高レベルの移行抗体存在下でも有効であることが確認されている（別添資料 29）。

CPV の流行株には亜型があり、最初に流行した CPV-2 は世界的にほぼ消失し、現在世界において分布している株は主に CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 型である。現在、国内において分布している CPV 株も、これら 3 つの亜型である。3 つの亜型である CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 型は、病原性に違いはみられず、CPV-2 型の生ワクチン接種により惹起される抗体は 3 つの亜型にも交差反応するとされる一方で、3 つの亜型に対する中和抗体応答の頑強性については懸念も示されている。この点において、本遺伝子組換え微生物は 3 亜型のいずれに対しても高い抗体応答を誘導することを確認している（別添資料 28、29）。このことは、CPV-2c 接種により惹起された免疫応答が 3 つの亜型に対する高い抗体価を誘導したことを示した既報とも一致する[53]。

本遺伝子組換え微生物は、CPV 感染予防のための有効なワクチン接種において、以上のように現在の臨床上の課題である「移行抗体存在下における免疫応答の不確実性」及び「流行亜型への、早く、頑強な免疫賦与」の 2 点においてベネフィットを提供し、犬の臨床上重要である CPV 予防に寄与するものである。

申請者は、犬用ワクチンとして CPV 630a 株に加え、犬ジステンパーウイルス、犬アデノウイルス 2 型、犬パラインフルエンザウイルス、不活化レプトスピラ抗原のうちいずれか、又は全ての抗原を含む混合ワクチンについて、国内における製造販売承認申請を予定している。

(1) 使用等の内容

- ① 運搬及び保管（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の運搬及び保管を含む。）
- ② 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号。以下、「医薬品医療機器等法」という。）第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験（以下、「治験」という。）に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年農林水産省令第 75 号）第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用
- ③ 医薬品医療機器等法第 14 条第 1 項に基づく承認申請書に従った使用（④に該当する行為を除く。）
- ④ 接種（接種の対象動物は犬であり、食用に供される可能性はない。）

資料2. 審査データの概要

- 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じ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 緊急措置計画書を別添資料 39 に添付した。

(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 一外における使用等に関する情報

本遺伝子組換え微生物を含む製品は、海外において主に製品名「Nobivac Puppy DP PLUS」又は「Nobivac DP PLUS¹」として市販されている。欧州において 2020 年 12 月 9 日に中央審査方式（Centralized procedure）により承認を取得されて以降、世界 51 か国で承認が取得されている（2024 年 5 月時点）。海外において、「Nobivac Puppy DP PLUS」の使用に関連し、環境において問題となった事象の報告は無い（2024 年 7 月までの累計報告において）。

海外における販売実績を表 4 に示した。過去 3 年間の総販売数量は、2021 年が【社外秘につき非開示】ドーズ、2022 年が【社外秘につき非開示】ドーズ、2023 年が【社外秘につき非開示】ドーズであった。現在までの累計販売数量は【社外秘につき非開示】ドーズ以上である。

表 4: 主要¹10 か国における販売状況

販売国	販売量(ドーズ)		
	2021 年	2022 年	2023 年
ルーマニア	【社外秘につき非開示】		
スペイン			
ポーランド			
イタリア			
ペルー			
オランダ			
ギリシャ			
フランス			
スロバキア			
ハンガリー			

(6) 接種動物の体内における挙動に関する情報

¹ ドーズ販売数が多い国上位 10 か国における情報を示す。

資料2. 審査データの概要

イ 接種動物の体内における遺伝子組換え生ワクチンの消長に関する情報

犬の体内分布試験（別添資料 16）において、本遺伝子組換え微生物を 3～4 週齢の犬に接種し、接種後 4 及び 11 日目に組織及び血清を採取し、ウイルス含有量を測定した。接種後 4 日目に、胸腺、脾臓、腸組織、リンパ組織、扁桃、肝臓及び接種部位皮膚より本遺伝子組換え微生物が検出され、ウイルス分布が最も多くみられたのは胸腺であった。腎臓、肺、脳組織及び心臓からは、全く又はほとんど検出されなかった。接種 11 日後、いずれの組織からも本遺伝子組換え微生物は検出されなかった。また、血清中及び組織ホモジネート中の HI 抗体価測定において、血清中 HI 抗体価は接種後 4 日目に 1024～4096 倍、11 日目に 8192 倍を示し、各組織においても全般的に接種後 11 日目にかけて上昇がみられた。ウイルスが組織に分布したのちに消失した推移は、ワクチン接種後に惹起された高レベルの抗 CPV 抗体による中和の結果である可能性が高いと考えられた。

また、試験開始時から接種後 11 日目まで、これらの本遺伝子組換え微生物接種犬の直腸スワブにおけるウイルス含有量を評価したところ、接種後 1～8 日目にウイルスが検出され、値のピークは接種後 4 日目であった。また、接種後 9 日目以降は検出されなかった。

以上より、本遺伝子組換え微生物は犬において接種後 4 日頃をピークに体内分布後減衰し、接種後約 9～11 日目に消失するものと考えられた。また、糞便からの排泄も同様に、接種日 4 日目をピークとして、その後減衰し、排泄がみられるのは約 8 日目までと考えられる。したがって、犬体内での消長の特性において、本遺伝子組換え微生物は 1. (3)、ホに示した宿主株の特性と同様であった。

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

病原性復帰試験（別添資料 15）において、4～6 週齢の犬に、本遺伝子組換え微生物 $10^{7.4}$ TCID₅₀ を皮下接種した後、糞便中のウイルス含有量を評価したところ、接種後 3、4 日目をピークに、接種後 2～4 日目にウイルスが検出された。接種犬からの糞便試料を別の犬群に経口・経鼻接種することを 5 継代まで繰り返したとき、2、3、4、5 継代目の各群において約 2～7 日目の期間の間でウイルスが検出された。

(7)、イに記載のとおり、体内分布試験（別添資料 16）においては、直腸スワブでウイルスが検出されるのは接種後 4、5 日目をピークに、接種後 1～8 日目にみられた。

宿主株を含む犬パルボウイルスワクチン株は、一般的に初回ワクチン後に排泄されることが知られている。宿主における排泄の特性については 1. (3)、ロに記載の通りである。

以上より、本遺伝子組換え微生物は宿主と同様、糞便中にウイルスを排泄する。排泄が認められる期間も接種 8 日までであり、宿主と同等である。

ハ 接種動物において当該遺伝子組換えワクチンの垂直感染の可能性の有無に関する情報

宿主の CPV154 株ワクチンを分娩 34 日前の妊娠犬に接種した試験において、母犬及び出生した仔犬のいずれにおいても、臨床症状、剖検及び病理組織検査において異常は認められなかった。また、出生後の仔犬の胸腺、出産時の母犬の子宮排泄物、及び母犬から出産後 1～10 日間に採材した直腸スワブのいずれから、CPV が分離されず、垂直感染を示す兆候は認められなかった（別添資料 9）。本遺伝子組換え微生物は CPV 以外の外来遺伝子を含んでおらず、2、(5)、イ、①に示したとおり、犬における体内分布動態は宿主株及び CPV 630a 株において同等

資料2. 審査データの概要

であった。このことから、宿主である CPV154 株と同様に CPV 630a 株が垂直感染する可能性は低いと考えられる。

ニ 野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

CPV は、イヌ科動物及び猫に感染性を有する。また、本遺伝子組換え微生物は対象動物の犬に接種後、糞便中に一定期間排泄される。野生動物がこれらの糞便へ接触した場合、これら感受性動物は感染する可能性がある。

I、1、(3)、「イ 基本的特性」に記載した CPV 感染域及び、環境省において公表されている「日本の動物分布図集（哺乳類）」(<https://www.biodic.go.jp/kiso/atlas/pdf/3.mammals.pdf>)から考察すると、国内で CPV が感染する、又はその可能性を有する主な固有野生動物としては、イヌ科のタヌキ及びアカギツネが考えられる。国内に生息しているタヌキ及びアカギツネにおける CPV 保有状況は不明であるが、韓国においてはタヌキから CPV が分離されたことが報告されている[54]が、病原性については明確になっていない。アカギツネにおいては、野生型 CPV を感染しても病原性は認められなかったことが報告されている[14]。

本遺伝子組換え微生物は「(6)国外における使用等に関する情報」に示した海外の国々で既に臨床使用されており、タヌキ及びアカギツネの生息地域とされる国々[55, 56]でも使用されているが、野生動物において問題となる事象は報告されていない。また、現在までに日本において、犬用生ワクチンとして承認されコアワクチンとして広く臨床使用されている宿主 CPV 154 株を含む生ワクチン CPV 株は、いずれも同様に糞便中に排泄するものと考えられる（別添資料 34）が、これらの CPV 株は全て弱毒化ウイルスであり、野外に排泄された CPV 生ワクチン株が野生動物に感染したことにより顕著な問題を引き起こしたとの報告は知られていない。本遺伝子組換え微生物は、弱毒化配列を有しており、また本遺伝子組換え微生物の遺伝的安定性は前述の通り *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験で確認されており、本遺伝子組換え微生物の動物接種試験において、対象動物の犬以外にも、猫、フェレット、マウス、鶏においても安全性は確認されていることから、イヌ科、ネコ科、イタチ科等の食肉目の動物、げっ歯類、及び鳥類等を含む野生動物において問題を生じる可能性は非常に低いと考えられる。

国内において、CPV 生ワクチンは WSAVA（世界小動物獣医師会）ワクチンガイドラインにおいてもコアワクチン（推奨）とされており、犬に広く接種されている。これら生ワクチンに使用されているワクチン株は犬に接種後一定期間排泄する特性を持つが、いずれも弱毒化されているウイルス株であり、野生動物において被害が生じたという報告は知られていない。

本遺伝子組換え微生物 CPV 以外の外来遺伝子を含んでおらず、有害物質を産生する性質もないことを確認しており、野生動物に感染したとしても、現在までに使用されている他の犬用生ワクチン株同様、問題となることは考えにくい。

ホ その他必要な情報

犬における免疫成立時期の評価試験（別添資料 28）において、本遺伝子組換え微生物を含む犬用混合生ワクチン（Nobivac Puppy DP PLUS）1 用量を 4 週齢の CPV 抗体陰性の試験群に投与した。3 日後、試験群と対照群（ワクチン非接種）を病原性野外株で攻撃した。対照群においては、犬パルボウイルス感染症の症状及び糞便中への攻撃株ウイルスの排泄がみられたが、試験群の全ての犬において、体重減少、体温上昇、白血球減少症を含め臨床症状はみられず、攻撃に耐過し健康状態は良好であった。また、試験群においては、抗 CPV 抗体価の上昇を認め、

資料2. 審査データの概要

攻撃対照群にみられた攻撃株の排泄がみられなかった。このことより、試験群においてはワクチン接種3日後に感染防御免疫（Sterilizing immunity）が惹起されたことが示された。

移行抗体保有犬における有効性評価試験（別添資料 29）において、本遺伝子組換え微生物を含む犬用混合生ワクチン（Nobivac Puppy DP PLUS）1用量を4週齢の試験群に投与した。野外の状況を反映するため、中～高レベルの移行抗体を有する仔犬が供試された。

CPV は、野外で相同組換えが起これることが報告されている[28, 29]。ただし、CPV は数日～数週間で免疫成立すると、免疫機構により体内よりウイルスが排除されるため、相同組換えが起こるのは最初に感染した株に対する免疫成立前の短期間に別の株に感染した場合に稀に起こる事象であり、生じる可能性は非常に限定的である[30]。現在までに世界中で CPV-154 株やその他のワクチン株を含む犬用生ワクチンが長く使用されているが、野外株とワクチン株との相同組換えによる、高病原性株の出現や、病原復帰の報告は知られていない。本遺伝子組換え微生物についても、海外で使用されているが、環境中で問題を生じたという報告はない。本遺伝子組換え微生物は、対象動物である犬に接種後、移行抗体の存在下であっても CPV に対して非常に速やかに免疫を惹起し、3 日間で高い抗体価を示し、CPV に対する感染防御（Sterilizing immunity）が成立する（別添資料 28、29）。本遺伝子組換え微生物のこの特性から考慮すると、接種後の犬において免疫成立前までのわずかな期間に別の株に感染し相同組換えが起こる可能性は、免疫成立まで数週間要する既存の CPV 生ワクチン株と比較しても非常に限定的と考えられる。また、本遺伝子組換え微生物は CPV 以外の異種遺伝子を含んでおらず、ウイルスゲノムを構成する全構成塩基配列において弱毒化配列以外は自然界に存在する CPV 配列と同様である。したがって、仮に相同組換えが起こったとしても、新たな組換えウイルスの病原性は野生株より低い又は同等と考えられる。

欧州では本遺伝子組換え微生物を含むワクチン「Nobivac DP Plus¹」は、2020 年 12 月 9 日に承認を得ている。欧州医薬品局における審議結果において、環境リスクアセスメントをその評価書（別添資料 35）内で述べている。環境リスクアセスメントの審査結果として、環境へのリスクレベルは、「低い」と結論付けられ、フェーズ 2 評価は「必要なし」とされた。使用者への注意事項として「ワクチンを直近に接種した後の仔犬及びその糞便と、猫との接触について、ならびに、他の猫へ感染すること」を SPC（SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS：製品概要）に含むこととされた。

オーストラリアにおいて、遺伝子組換え微生物を含む動物用ワクチンは遺伝子技術規制官局（Office of Gene Technology Regulator（OGTR））により環境安全性が審査され、農業・動物用医薬品局（APVMA）により動物用ワクチンの安全性有効性が審査されている。「Nobivac Puppy DP Plus¹」について、OGTR による環境リスクアセスメント（別添資料 36）は 2024 年 8 月 21 日に完了している。この結果、ワクチンの製造販売による人への健康及び安全、及び、遺伝技術の結果としての環境へのリスクは、「無視できるリスク（negligible risk）」と結論付けられた。使用者への注意事項として「ワクチン接種は健康な犬に限ること。」及び、「次の CPV 生ワクチンを使用する場合は、ワクチン接種後最低 2 週間の間隔を空けるというワクチネーション推奨スケジュールにしたがうこと。」を含むこととされた。

¹ Nobivac DP Plus、Nobivac Puppy DP Plus: 本遺伝子組換え微生物 CPV630a 株と犬ジステンパーウイルスの混合生ワクチンである。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主である CPV154 株は、犬において長年生ワクチンとして使用されている株であるが、他の微生物を減少させる性質は報告されていない。また本遺伝子組換え微生物は、2021 年より海外で市販されているが、欧州における市販後安全性情報において、「Environmental problems（環境毒性）」として分類される事象は現在まで報告されておらず、本遺伝子組換え微生物が環境中微生物叢を含む環境を攪乱すること等により他の微生物を減少させたとの示唆は認められていない。本遺伝子組換え微生物は CPV 以外の種の外来遺伝子を含んでおらず、遺伝的安定性も確認されており、意図しない有害な蛋白質を発現することは考えにくい。

CPV 154 株及び CPV 630a 株の培養細胞における増殖、イヌにおける体内分布動態及び排泄の各データにおいて CPV 630a 株の増殖率は CPV 154 株と同等又はそれ以下と考えられる。

本遺伝子組換え微生物のカプシド遺伝子における合成遺伝子及びその近隣のアミノ酸配列の検索において、既知のアレルゲン物質と有意な相同性を有する物質は確認されなかった。対象動物及び非対象動物を用いた接種試験においても有害物質の産生性を示す所見は認められなかったことから、有害物質の産生又は意図しない性質の発現はないものと考えられる。

現在までに宿主 CPV 154 株以外にも数種類の犬パルボウイルス用ワクチン株が日本で市販され、使用されているが、いずれのワクチン株の排泄によってもワクチン株が生態系に影響し他の微生物を減少させたという報告は無い。

国内で流行している CPV 亜型は、2a、2b、2c 型であり、本遺伝子組換え微生物は CPV 2c 型に分類される。世界における流行株も 2a、2b、2c 型であるが、国によっても分布に違いがあるが、混在して流行していることも多い。例としてオーストラリアでは 2015 年に 2c 型の発生例があったが、2015～2019 年の試料を検査した結果では 2b 型が 54.4%で優勢であり、2a 型が 43%、2c 型は検出されなかった。3つの亜型が混在しつつ、2a 又は 2c が優勢の地域もあり、動物への伝播において3つの亜型間における明らかな優位性はみられない。したがって CPV 2c 型である本遺伝子組換え微生物が接種動物からの排泄された後、感受性動物に伝播した場合でも、国内で流行している野外株に対して優位性を示す可能性は極めて低いと考えられる。

以上のことから、他の微生物を減少させる性質については、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。

2 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

資料2. 審査データの概要

本遺伝子組換え微生物の宿主である CPV 154 株は、長年ワクチン株として海外及び国内で使用されており、安全に使用され続けている。本遺伝子組換え微生物は、CPV 以外の微生物等の外来遺伝子を含んでおらず、CPV の増殖性及び病原性に主として関与する NS 遺伝子配列は宿主である弱毒化 CPV 154 株の配列と同一である。本遺伝子組換え微生物は、ワクチンにおける免疫原性に主に寄与する VP2 遺伝子を改変しているが、VP2 蛋白質遺伝子にも弱毒化配列が導入されている。宿主株は、犬での高用量安全性試験及び病原性復帰試験において、病原性を示さず、犬間における継代後も病原性復帰を生じないことが確認されている。また、宿主株をワクチンの非対象動物である猫及びフェレットに接種しても、臨床症状を示さず、病原性は認められないことが確認されている。本遺伝子組換え微生物が病原性を示さないことについては、ワクチンの対象動物である犬においても、また、非対象動物である猫、フェレット、マウス、及び鶏への接種試験においても確認している。さらに、犬へ本遺伝子組換え微生物を接種した後に排泄されたウイルスを更に別の犬群に接種することにより、犬において 5 代継代しても病原性を示さず、遺伝的に安定しており、本遺伝子組換え微生物が病原性を示さない特性は変わらないことを確認している。犬及び猫への本遺伝子組換え微生物の接種試験で病原性を呈さなかったことから、イヌ科やネコ科の感受性動物の生息又は生育に支障を及ぼすことは考えにくい。

CPV の感染域の報告、ならびに、本遺伝子組換え微生物の動物接種試験結果より、本遺伝子組換え微生物は犬及び猫に感染することが示されている。犬に接種後、糞便中に排泄された本遺伝子組換え微生物に感受性動物が曝露された場合、感染する可能性は否定できない。日本において感染する、又はその可能性のある主な固有野生動物は、イヌ科のタヌキ及びアカギツネが考えられる。アカギツネは野生型 CPV が感染しても臨床症状を示さなかったとの報告がある。野生型 CPV のタヌキに対する病原性は明らかとなっていないが、CPV が国内で発生して以降タヌキの生息に野生型 CPV 又は犬用ワクチンと使用されている CPV 生ワクチン株が悪影響を与えたという知見は認められない。本遺伝子組換え微生物は犬において安全であることが確認されており、タヌキは犬と同じイヌ科であることから、タヌキにおいて本遺伝子組換え微生物によって意図しない病原性が発現する可能性は非常に低いと考えられる。したがって、以下の点から、これらの動物への影響はこれまでに市販されている CPV 生ワクチンと同様と考えられ、意図しない問題が生じる可能性は極めて低いと考えられる。

- タヌキ及びアカギツネにおける CPV の感受性や病原性に関するこれまでの知見
- 本遺伝子組換え微生物が食肉目のイヌ科、ネコ科、げっ歯類及び鳥類の各動物において接種試験を行い、病原性を示さないことが確認されていること
- 本遺伝子組換え微生物は、海外においてタヌキ及びアカギツネが生息する地域や国々で使用されているが、野生動物に悪影響を及ぼしたとの報告はないこと
- 国内においても、現在までに弱毒 CPV 生ワクチンは広く犬用生ワクチンとして使用され、野外へ排泄されていると考えられるが、これらの野生動物の生息に悪影響を及ぼした兆候は認められないこと

現在までに世界中で CPV 154 株やその他のワクチン株を含む犬用生ワクチンが長く使用されているが、野外株とワクチン株との相同組換えによる、高病原性株の出現や、病原復帰の報告は知られていない。本遺伝子組換え微生物は、既に海外で臨床使用されているが、環境中で問題を生じたという報告はない。本遺伝子組換え微生物は CPV 以外の異種遺伝子を含んでおらず、ウイルスゲノムを構成する全塩基配列において弱毒化配列以外は自然界に存在する CPV 配列と

資料2. 審査データの概要

同様である。ワクチン接種後のウイルス排泄期間、ワクチン接種後免疫成立までの期間、ワクチンの使用状況並びに清掃等の飼育実態をふまえると、CPV 630a 株と野生型 CPV 間での相同組換えが起こる可能性は非常に低いと考えられ、仮に相同組換えが起こったとしても、新たな組換えウイルスの病原性は野生株と比較し同等以下と考えられる。

CPV 630a 株と FPLV の相同組換えは、発生する可能性は否定できないものの、ワクチン接種後のウイルス排泄期間や免疫成立までの期間、ワクチンの使用方法ならびに清掃等の飼育実態をふまえると、生じる可能性は非常に低いと考えられる。仮に、FPLV と CPV 630a 株の相同組換えが生じた結果、NS 領域に CPV 様配列を、VP 領域に FPLV 配列をもつ場合、CPV 630a 株の NS 領域には弱毒化配列があり、病原性は野生株と比較し同等以下になる可能性が高いと考えられる。また、仮に NS 領域に FPLV 様配列を、VP 領域に CPV 配列をもつ場合にも、CPV 630a 株の VP2 領域には弱毒化配列があり、病原性は野生株と比較し同等以下になる可能性が高いと考えられる。過去に国内において市販されていた犬用混合ワクチン「デュラミューン MX5」の弱毒化 CPV 株は 2b 型[57]であり、猫にも感染する可能性はあるが、CPV/FPLV の相同組換えが生じ、問題となったという報告は知られていない。したがって、CPV 630a 株と FPLV の相同組換えの可能性は低く、また仮に相同組換えが起こったとしても、新たな組換えウイルスの病原性は野生株と比較し同等以下と考えられる。

本遺伝子組換え微生物は、病原性を示さない点、及び、犬に接種後の排泄期間においても宿主と同等であり、動物への接種試験における各実験結果、国内における固有野生動物に関するこれまでの知見、及び宿主及び本遺伝子組換え微生物の海外での使用実績を鑑みても、野生動物の生息又は生育に支障を及ぼす性質が生じる可能性は著しく低いと考えられる。

(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、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。

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主である CPV 154 株は、犬において長年生ワクチンとして使用されている株であり、本遺伝子組換え微生物も 2021 年より海外で市販されているが、いずれも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は報告されていない。

本遺伝子組換え微生物は CPV 以外の種の外来遺伝子を含んでおらず、遺伝的安定性も確認されており、意図しない有害な蛋白質を発現することは考えにくい。

本遺伝子組換え微生物の供与遺伝子領域の合成遺伝子配列及びその近隣のアミノ酸配列のアレルゲン検索、並びに VP2 カプシド蛋白質について、アレルゲン検索を実施した結果、本遺伝子組換え微生物がアレルゲン等の有害物質を産生する性質は無いものと考えられた。

資料2. 審査データの概要

また、対象動物である犬及び非対象動物である猫、フェレット、マウス、及び鶏を用いた接種試験においても、有害物質の産生性を示す所見は認められなかったことから、有害物質の産生、又は意図しない性質の発現はないものと考えられる。

以上のことから、有害物質の産生性について影響を受ける可能性のある野生動植物等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、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。

4 核酸を水平伝播する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え微生物は、対象動物である犬に接種後、宿主同様に糞便中に接種後約一週間程度排泄されるため、感受性動物である犬及び猫が曝露された場合、感染する可能性は否定できない。国内においては CPV の感染域を考慮すると感染する可能性のある固有野生動物として主にタヌキ及びアカギツネが可能性として考えられる。CPV 630a 株の伝播に関するシナリオ別考察を別添資料 37 に示した。各シナリオ別考察に基づくと、タヌキ及びアカギツネ等の野生動物に本遺伝子組換え微生物が感染し、持続的な伝播が生じる可能性は非常に低いと考えられた。

同種ウイルスとの相同組換えの可能性については、CPV は数日～数週間で免疫成立すると、免疫機構により体内よりウイルスが排除されるため、相同組換えが起こるのは最初に感染した株に対する免疫成立前の短期間に別の株に感染した場合に稀に起こる事象であり、可能性は非常に低いと考えられる。本遺伝子組換え微生物は対象動物である犬へ接種後、移行抗体の存在下であっても CPV に対して非常に速やかな免疫を惹起し、3 日で感染防御（Sterilizing immunity）が成立することが実験で確認されていることから、共感染するような可能性は極めて低いと考えられる。本遺伝子組換え微生物のこの特性から考慮すると、接種後の犬において免疫成立前までのわずかな期間に別の株に感染し相同組換えが起こる可能性は、免疫成立まで数週間要する既存の CPV 生ワクチン株と比較しても非常に限定的と考えられる。CPV と FPLV 間における相同組換えは、理論上はありうるものの、ワクチン接種後のウイルス排泄期間や免疫成立までの期間、ワクチンの使用方法ならびに清掃等の飼育実態をふまえると、生じる可能性は非常に低いと考えられる。さらに、相同組換えによって生じたウイルスが、野生動物に感染する可能性は極めて低いと考えられる。

なお、パルボウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。CPV は感受性動物に感染しない限り、野外で核酸の複製を生じることはない。

以上のことから、核酸を水平伝播する性質について、影響を受ける可能性のある野生動植物等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

本遺伝子組換え微生物については、第一種使用規程に従った使用を行う限りにおいて、核酸を水平伝播する形での生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

5 その他の性質

上記の他に、本遺伝子組換え微生物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。

III 生物多様性影響の総合的評価

1. 他の微生物を減少させる性質について、宿主である CPV 154 株は、長年生ワクチンとして使用されている株であり、他の微生物を減少させるような性質は報告されておらず、安全に使用され続けている。本遺伝子組換え微生物は宿主と同様に、犬に接種しても、また更に犬で継代を繰り返しても病原性を示すことなく、安全であることを接種試験で確認している。本遺伝子組換え微生物は、CPV 以外の微生物等の外来遺伝子を含んでおらず、宿主同様に他の微生物を減少させる性質は無いものと考えられる。本遺伝子組換え微生物の遺伝子レベルでの検索及び、動物への接種試験においても、有害物質の産生性を示す所見は認められなかったことから、有害物質の産生又は意図しない性質の発現はないと考えられる。CPV 154 株及び CPV 630a 株の培養細胞における増殖、イヌにおける体内分布動態及び排泄の各データに基づき、CPV 630a 株の増殖率は CPV 154 株と同等又はそれ以下と考えられ、本遺伝子組換え微生物を含むワクチンの使用方法を勘案しても、野生型 CPV に対して優位性を示す可能性は極めて低いと考えられる。現在までに宿主含む、数種類の犬パルボウイルス用ワクチン株が長年国内で市販され使用されているが、いずれのワクチン株の排泄によっても生態系に影響し他の微生物を減少させたという報告は無く、排泄されたウイルスの生態系への影響は非常に限定的であると考えられる。このため、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。
2. 病原性について、本遺伝子組換え微生物の宿主である CPV 154 株は、長年ワクチン株として海外及び国内で使用されており、安全に使用され続けている。本遺伝子組換え微生物は、CPV 以外の微生物等の外来遺伝子を含んでおらず、CPV の増殖性及び病原性に主として関与する NS 遺伝子配列は宿主である弱毒化 CPV 154 株の配列と同一であり、改変した VP2 遺伝子にも弱毒化配列が導入されている。本遺伝子組換え微生物は宿主と同様に非病原性であり、犬への接種試験、また犬で継代を繰り返した試験においても、非病原性の特性が変わることが無いことが確認されている。本遺伝子組換え微生物は、宿主と同様に、糞便より接種後数日間のみ排泄されることから、感受性のある犬及び猫が曝露された場合に感染する可能性については否定できない。しかし、接種試験において犬、猫、フェレット、マウス、及び鶏において病原性を示さないことが確認されている。さらに、犬へ本遺伝子組換え微生物を接種した後に排泄されたウイルスを更に別の犬群に接種することにより、犬において 5 代継代しても病原性を示さず、遺伝的に安定しており、本遺伝子組換え微生物が病原性を示さない特性は変わらないことを確認している。また仮に相同組換えが生じたとしても、その遺伝子組

資料2. 審査データの概要

み換え生物の感染性や病原性についての性質については、本遺伝子組換え微生物が CPV 以外の外来遺伝子を含んでいないこと、及び弱毒化配列を有していることから、野生型 CPV と比較し低い又は同等であると考えられる。CPV 630a 株と FPLV の相同組換えは、発生する可能性は否定できないものの、ワクチン接種後のウイルス排泄期間や免疫成立までの期間、ワクチンの使用方法ならびに清掃等の飼育実態をふまえると、生じる可能性は非常に低いと考えられる。また仮に相同組換えが起こったとしても、新たな組換えウイルスの病原性は野生株と比較し同等以下と考えられる。

国内に生息する野生動物であるイヌ科のタヌキ及びアカギツネについて、これまでの知見を勘案しても本遺伝子組換え微生物によってこれらの野生動物の生息に意図しない悪影響が生じる可能性は極めて低いと考えられる。また、海外においては本遺伝子組換え微生物を含む犬用ワクチンは既に 2021 年より使用されており、タヌキ及びアカギツネが生息する国々も含むが、環境中の動物に病原性等の問題が生じたとの報告はない。このため、第一種使用規程に従った使用を行う限り、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

3. 有害物質の産生性について、宿主である CPV 154 株は、犬において長年生ワクチンとして使用されている株であり、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は報告されていない。本遺伝子組換え微生物の供与遺伝子領域の合成遺伝子配列及びその近隣のアミノ酸配列のアレルゲン検索、並びに VP2 カプシド蛋白質について、アレルゲン検索を実施した結果、本遺伝子組換え微生物がアレルゲン等の有害物質を産生する性質は無いものと考えられた。対象動物の犬及び非対象動物の猫、フェレット、マウス及び鶏への接種試験においても、有害物質の産生性を示す所見は認められなかったことから、有害物質の産生又は意図しない性質の発現はないものと考えられる。このため、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と判断した。
4. 核酸を水平伝達する性質について、本遺伝子組換え微生物は、排泄されたウイルスに犬や猫等の感受性動物が接触した場合に感染する可能性があるが、CPV 630a 株の伝播をシナリオ別に考察しても、本遺伝子組換え微生物による野生動物への悪影響が生じる可能性は、既存の CPV 弱毒生ワクチンと同様に、極めて低いと判断される。パルボウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。また、CPV は感受性動物に感染しない限り、野外で核酸の複製を生じることはない。CPV 又は FPLV との相同組換えの可能性については、相同組換えは生体内の同じ細胞に共感染した場合の非常に限定された事象であること、犬において CPV 630 株接種後の排泄期間は短いこと、糞便清掃等の犬の飼育実態、ワクチンの使用方法（健康な犬への接種）、本遺伝子組換え微生物は犬へ接種後非常に速やかに免疫惹起し感染防御が成立すること、ならびに、本遺伝子組換え微生物は猫への接種試験において FPLV に対する免疫を惹起することから、その可能性は非常に低いと考えられる。さらに、相同組換えによって生じたウイルスが、野生動物に感染する可能性は極めて低いと考えられる。本遺伝子組換え微生物を含むワクチンは海外で 2021 年より臨床使用されているが、野外株との相同組換えに起因した有害事象の報告はない。以上のことから、核酸を水平伝播する性質に関して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。このため、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じるおそれはないと判断した。

資料2. 審査データの概要

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定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。

資料2. 審査データの概要

参考文献

1. Churchill, A.E., *Preliminary development of a live attenuated canine parvovirus vaccine from an isolate of British origin*. Vet Rec, 1987. **120**(14): p. 334-9.
2. *Chapter 12 - Parvoviridae*, in *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*, N.J. MacLachlan and E.J. Dubovi, Editors. 2017, Academic Press: Boston. p. 245-257.
3. Parrish, C.R., *Structures and Functions of Parvovirus Capsids and the Process of Cell Infection*, in *Cell Entry by Non-Enveloped Viruses*, J.E. Johnson, Editor. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 149-176.
4. *Parvoviruses (1st ed.)*. 2006: CRC Press.
5. Cotmore, S.F. and P. Tattersall, *Parvoviral Host Range and Cell Entry Mechanisms*, in *Advances in Virus Research*. 2007, Academic Press. p. 183-232.
6. Barker, I.K. and C.R. Parrish, *Parvovirus Infections*, in *Infectious Diseases of Wild Mammals*. 2001. p. 131-146.
7. Truyen, U. and C.R. Parrish, *Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo*. J Virol, 1992. **66**(9): p. 5399-408.
8. Truyen, U., C.R. Agbandje M Fau - Parrish, and C.R. Parrish, *Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus*. (0042-6822 (Print)).
9. Truyen, U., et al., *Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range*. Virology, 1996. **215**(2): p. 186-9.
10. Goto, H., et al., *Comparative Studies of Physicochemical and Biological Properties between Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus*. The Japanese Journal of Veterinary Science, 1984. **46**(4): p. 519-526.
11. Aoki, E., et al., *SURVEILLANCE FOR ANTIBODIES AGAINST SIX CANINE VIRUSES IN WILD RACCOONS (PROCYON LOTOR) IN JAPAN*. Journal of Wildlife Diseases, 2017. **53**(4): p. 761-768.
12. Canuti, M., et al., *Epidemiology and molecular characterization of protoparvoviruses infecting wild raccoons (Procyon lotor) in British Columbia, Canada*. Virus Research, 2017. **242**: p. 85-89.
13. Allison, A.B., et al., *Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus*. J Virol, 2012. **86**(2): p. 865-72.
14. Barker, I.K., R.C. Povey, and D.R. Voigt, *Response of mink, skunk, red fox and raccoon to inoculation with mink virus enteritis, feline panleukopenia and canine parvovirus and prevalence of antibody to*

資料2. 審査データの概要

- parvovirus in wild carnivores in Ontario*. Can J Comp Med, 1983. **47**(2): p. 188-97.
15. Parrish, C.R. and J.E. Sykes, *29 - Canine Parvovirus Infections and Other Viral Enteritides*, in *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat (Fifth Edition)*, J.E. Sykes, Editor. 2021, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 341-351.
 16. Decaro, N. and C. Buonavoglia, *Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c*. Vet Microbiol, 2012. **155**(1): p. 1-12.
 17. Ikeda, Y., et al., *Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats*. Virology, 2000. **278**(1): p. 13-9.
 18. Nakamura, M., et al., *Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(6): p. 1085-9.
 19. Takano, T., et al., *Predominance of canine parvovirus 2b in Japan: an epidemiological study during 2014-2019*. Archives of Virology, 2021. **166**(11): p. 3151-3156.
 20. Matsuu, A., E. Aoki, and T. Kagiwada. *Genetic analysis of parvoviruses isolated from puppies in Japan*. in *Annual meeting of Japanese society of Clinical veterinary medicine*. 2025.
 21. Soma, T., et al., *Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan*. (1532-2661 (Electronic)).
 22. Soma, T., et al., *Prevalence of Canine Coronavirus and Canine Parvovirus Type 2 Infections in Pet Shops in Japan*. Journal of Animal Clinical Medicine, 2012. **21**(3): p. 126-129.
 23. Ajiki, M. and author_in_Japanese, *Properties and Distribution of Canine Parvovirus Isolated in Japan*. Journal of the Japan Veterinary Medical Association, 1983. **36**(2): p. 68-73.
 24. Hirata, K. and H. Goto, *Virucidal Effect of Disinfectants on Some Animal Viruses*. Journal of the Japan Veterinary Medical Association, 1986. **39**(8): p. 508-511.
 25. Greene, C.E., *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th edition ed. 2011.
 26. Tu, M., et al., *Role of capsid proteins in parvoviruses infection*. Virol J, 2015. **12**: p. 114.
 27. Strauss, J.H. and E.G. Strauss, *CHAPTER 7 - DNA-Containing Viruses*, in *Viruses and Human Disease (Second Edition)*, J.H. Strauss and E.G. Strauss, Editors. 2008, Academic Press: London. p. 261-323.
 28. Ohshima, T. and M. Mochizuki, *Evidence for Recombination Between Feline Panleukopenia Virus and Canine Parvovirus Type 2*. Journal of Veterinary Medical Science, 2009. **71**(4): p. 403-408.
 29. Pérez, R., et al., *Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain*. PLOS ONE, 2014. **9**(11): p. e111779.

資料2. 審査データの概要

30. Voorhees, I.E.H., et al., *Limited Intrahost Diversity and Background Evolution Accompany 40 Years of Canine Parvovirus Host Adaptation and Spread*. J Virol, 2019. **94**(1).
31. Reddy, H., et al., *Whole-genome sequence analysis of canine parvovirus reveals replacement with a novel CPV-2c strain throughout India*. Arch Virol, 2024. **169**(9): p. 189.
32. 佐々木, 伸. and 啓. 竹内, イヌのパルボウイルス性腸炎について. 日本獣医師会雑誌, 1980. **33**(6): p. 287-291.
33. 東海地方における犬パルボウイルス感染症の自然発生例について〔英文〕. 岐阜大学農学部研究報告 / 図書編集委員会 編, 1982(46): p. 257~265.
34. 倉田, 一., 動物用ワクチンの概要とその正しい使い方 33. 犬パルボウイルス感染症ワクチン. 日本獣医師会雑誌, 1982. **35**(8): p. 477-480.
35. 安食, 政., et al., わが国で分離されたイヌパルボウイルスの性状と抗体調査. 日本獣医師会雑誌, 1983. **36**(2): p. 68-73.
36. Decaro, N., et al., *Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant*. J Vet Diagn Invest, 2005. **17**(2): p. 133-8.
37. Spibey, N., et al., *Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus*. Veterinary Microbiology, 2008. **128**(1): p. 48-55.
38. Gamoh, K., et al., *The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats*. J Vet Med Sci, 2003. **65**(9): p. 1027-9.
39. Mech, L.D., et al., *Demographic effects of canine parvovirus on a free-ranging wolf population over 30 years*. J Wildl Dis, 2008. **44**(4): p. 824-36.
40. Lu, R., et al., *Emergence of Canine Parvovirus Type 2a and Canine Enteric Coronavirus in Diarrheal Outbreaks Among Farmed Raccoon Dogs in China*. Transboundary and Emerging Diseases, 2025. **2025**(1): p. 8880613.
41. Lina, Z., et al., *Fatal canine parvovirus type 2a and 2c infections in wild Chinese pangolins (Manis pentadactyla) in southern China*. Transbound Emerg Dis, 2022. **69**(6): p. 4002-4008.
42. Gese, E.M., et al., *Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (Canis latrans) in Yellowstone National Park, Wyoming*. J Wildl Dis, 1997. **33**(1): p. 47-56.
43. Decaro, N., et al., *Parvovirus Infections*, in *Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*. 2012. p. 181-190.
44. Wang, D., et al., *Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus*, in *Virology*. 1998: United States. p. 273-81.

資料2. 審査データの概要

45. Mattola, S., et al., *Parvovirus nonstructural protein 2 interacts with chromatin-regulating cellular proteins*. PLoS Pathog, 2022. **18**(4): p. e1010353.
46. Altling-Mees, M.A., J.A. Sorge, and J.M. Short, *pBluescriptII: multifunctional cloning and mapping vectors*. Methods Enzymol, 1992. **216**: p. 483-95.
47. Short, J.M., et al., *Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(15): p. 7583-600.
48. Parrish, C.R., C.F. Aquadro, and L.E. Carmichael, *Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses*. Virology, 1988. **166**(2): p. 293-307.
49. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 31-46.
50. Shendure, J. and H. Ji, *Next-generation DNA sequencing*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(10): p. 1135-45.
51. Iida, H., et al., *Effect of Maternally Derived Antibody Levels on Antibody Responses to Canine Parvovirus, Canine Distemper Virus and Infectious Canine Hepatitis Virus after Vaccinations in Beagle Puppies*. Experimental Animals, 1990. **39**(1): p. 9-19.
52. 秦, 敦., et al., イヌパルボウイルスに対する子犬の移行抗体の消長ならびに成犬の血清疫学調査. 日本獣医師会雑誌, 1983. **36**(8): p. 453-458.
53. Cavalli, A., et al., *Evaluation of the Antigenic Relationships among Canine Parvovirus Type 2 Variants*. Clinical and Vaccine Immunology, 2008. **15**(3): p. 534-539.
54. Son, K., et al., *Genetic Characterization of Canine Parvovirus Type 2 Detected in Wild Raccoon Dogs (Nyctereutes procyonoides) in the Republic of Korea*. J Wildl Dis, 2019. **55**(2): p. 512-515.
55. Hoffmann, M. and C. Sillero-Zubiri, *Red Fox*, in *The IUCN Red List*. 2016.
56. Kauhala, K. and M. Saeki, *Raccoon Dog*, in *The IUCN Red List*. 2016.
57. 中村遊香, 川., *動物用ワクチン理論と実際*. 3 ジステンパー・犬アデノウイルス(2型)感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチン.

資料2. 審査データの概要

別添資料一覧

- 別添資料 1 モノクローナル抗体を用いた抗原亜型同定試験 (Antigenic typing using monoclonal antibodies)
- 別添資料 2 CPV 154 株、CPV 630a 株、又はその他の CPV-2 検出 PCR プライマー配列及び PCR 試験
- 別添資料 3 国内における、CPV 154 株を含む製造販売承認動物用医薬品一覧
- 別添資料 4 世界における CPV 154 株を含む犬用 (混合) ワクチン承認国一覧及び販売数量
- 別添資料 5 Nobivac Parvo C の市販後安全性情報
- 別添資料 6 静脈内及び経口接種後の犬間 7 代継代における CPV ワクチン (CPV 154 株) の安全性及び病原性復帰試験 (SAV/AK/7: Safety and stability of avirulence of the CPV vaccine virus component in 7 serial dog-to-dog transmissions after intravenous and oral inoculation)
- 別添資料 7 経鼻、筋肉内及び皮下接種後の犬間 3 代継代における CPV ワクチン (CPV 154 株) の安全性及び病原性復帰試験 (SAV/AKa/2: Safety and stability of avirulence of the CPV vaccine virus component in 3 serial dog-to-dog transmissions after intranasal, intramuscular and subcutaneous inoculation)
- 別添資料 8 CPV 154 株及び CPV 630a 株の培養細胞における増殖
- 別添資料 9 分娩 34 日前の抗体陰性妊娠犬における CPV ワクチン (CPV 154 株) の安全性試験 (SAV/AP/26: Safety of the CPV vaccine antigen after vaccination of an antibody negative pregnant bitch at 34 days before parturition)
- 別添資料 10 Nobivac DHPPi 高用量安全性試験 (SAV/BF/20: Nobivac DHPPi overdose safety)
- 別添資料 11 猫における CPV 154 株の安全性試験 (SAV/AJ/19: Safety of the CPV vaccine component in cats)
- 別添資料 12 フェレットにおける CPV 154 株の安全性試験 (SAV/AJa/18: Safety of the CPV vaccine component in ferrets)
- 別添資料 13 CPV 154 株、CPV Jes 株、及び CPV 630a 株における、VP2 カプシドの遺伝子塩基配列及びアミノ酸配列の配列比較
- 別添資料 14 合成 DNA 遺伝子配列及び近隣配列、並びに VP2 領域配列におけるアレルゲン検索
- 別添資料 15 病原性復帰試験: 幼若犬における CPV 630a 株の 5 代継代
- 別添資料 16 約 4 週齢の犬における CPV 630a 株の体内分布試験 (PDP-E/0114/15: Dissemination of canine parvovirus strain 630a in dogs of approximately 4 weeks of age.)
- 別添資料 17 CPV 630a 株の DNA 塩基配列と構成配列の由来
- 別添資料 18 CPV 630a 株構築におけるクローニング工程模式図
- 別添資料 19 【社外秘につき非開示】
- 別添資料 20 【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

- 別添資料 21 【社外秘につき非開示】
- 別添資料 22 【社外秘につき非開示】
- 別添資料 23 【社外秘につき非開示】
- 別添資料 24 犬における CPV 生ワクチン候補株評価試験 (Study to determine the response of dogs to modified vaccine strains of CPV)
- 別添資料 25 【社外秘につき非開示】
- 別添資料 26 承認申請資料に使用した CPV 630a 株の遺伝的解析 (PDP-E-0084-15 : Genetic characterization of 630a used in registration studies)
- 別添資料 27 CPV 630a 株の配列解析 (【社外秘につき非開示】)
- 別添資料 28 4 週齢の犬における Nobivac Puppy DP PLUS ワクチンの犬パルボウイルスに対する免疫成立時期の評価 (PDP-E/0015/18 : Study to Investigate the Efficacy of an Improved Puppy DP Vaccine in 4 week old Pups: Canine Parvovirus 3 Day Onset of Immunity)
- 別添資料 29 移行抗体を有する 4 週齢の犬における Nobivac Puppy DP PLUS ワクチンの犬パルボウイルスに対する有効性評価 (PDP-E/0084/17 : Efficacy of the CPV 630a strain in 4 week old pups with maternally derived antibody)
- 別添資料 30 猫における CPV 630a 株ワクチンの安全性試験 (CAP-E-0040-13 : Safety of the administration of CPV strain 630a vaccine in cats)
- 別添資料 31 フェレットにおける CPV 630a 株の安全性試験 (PDP-E/0075/17 : Study to Investigate the Safety of CPV Strain 630a in Ferrets)
- 別添資料 32 マウスにおける CPV 630a 株の安全性及び拡散評価試験 (19R/0140 : Study to investigate the safety and spread of CPV strain 630a in the non-target species mice after oral administration)
- 別添資料 33 鶏における CPV 630a 株の安全性及び拡散評価試験 (19R/0139 : Study to investigate the safety and spread of CPV strain 630a after oral administration to the non-target species chicken)
- 別添資料 34 参考 : 国内における犬パルボウイルス生ワクチン使用の状況
- 別添資料 35 Nobivac DP Plus の欧州医薬品局評価書 (CVMP assessment report for Nobivac DP Plus (EMA/V/C/005251/0000))
- 別添資料 36 Nobivac Puppy DP Plus のオーストラリア遺伝子技術規制官局 環境リスクアセスメント (Australian OGTR Risk Assessment and Risk Management Plan for DIR 202: Commercial supply of a live attenuated vaccine containing canine distemper virus and a genetically modified canine parvovirus (Nobivac Puppy DP Plus) for dogs)
- 別添資料 37 CPV 630a 株の伝播及び核酸の水平伝播に関するシナリオ別考察
- 別添資料 38 CPV 630a 株の FPLV 感染に対する有効性
- 別添資料 39 緊急措置計画書

資料2. 審査データの概要

別添資料1 モノクローナル抗体を用いた抗原亜型同定試験 (Antigenic typing using monoclonal antibodies)

本試験は 1994 年に実施された。

1. 試験設計

以下を用いて、HI 抗体検査を実施した。

CPV ウイルス株

ワクチンとして、Nobivac Parvo-C (CPV 154 株)、Webster Protech (P69 株)。

実験用株として、Cp49 (2 型)、CPV265 (米国、2 型)、CPV15 (米国、2a 型)、CPV133 (米国、CPV2b)、CPV706 (英国、2a 型)。

モノクローナル抗体 (C. Parrish 博士より分与)

mAb B4E1 : CPV 2 型に反応するが、2a 及び 2b 型への反応は非常に低い (1/50~1/100)。

mAb B4A2 : CPV 2 型及び 2a 型に反応するが、2b 型への反応は非常に低い (約 1/100)。

mAb C1D1 : CPV 2a 及び 2b 型のみへ反応する。

2. 結果

下表に結果を示す。Nobivac Parvo-C ワクチンウイルス及び CPV 2 型参考ウイルス (CPV265) は mAb B4E1 とよく反応したが mAb C1D1 とは反応が低かった。CPV 2a 型ウイルス (CPV15) 及び CPV 2b 型ウイルス (CPV133) は mAb C1D1 とよく反応したが B4A1 とは反応が低かった。CPV 2b 型ウイルス (CPV133) は mAb B4A2 とは反応しなかった。これらの結果から、Nobivac Parvo-C は CPV 2 型であることが確認された。

No	ウイルス	HI 抗体価			CPV 亜型
		C1D1	B4E1	B4A2	
1	Nobivac Parvo-C	<40	2560	80	2
2	WebstersProtech	<40	2560	80	2
3	CPV49	<40	10240	80	2
4	CPV265	40	10240	80	2
5	CPV15	1280	80	80	2a
6	CPV706	1280	40	80	2a
7	CPV133	2560	80	<20	2b

3. 結論

Nobivac Parvo-C (CPV 154 株) は、CPV 2 型であることが確認された。

資料2. 審査データの概要

別添資料 2 CPV 154 株、CPV 630a 株、又はその他の CPV-2 検出 PCR プライマー配列及び PCR 試験

CPV 154 株又は CPV 630a 株は、PCR によって検出することができる。下流プライマーと対になった非構造領域の「ホットスポット」領域にアニーリングするプライマーを用いて、サイズ特異的断片を増幅することが可能である。

利用可能な 2 つのプライマー対の組合せがあり、第 1 の対におけるフォワードプライマーは、CPV 154 株又は CPV 630a 株にのみ存在する「ホットスポット」ヌクレオチド配列の一部にアニーリングし、第 2 の対におけるフォワードプライマーは、全ての他の CPV-2 株に存在する元のヌクレオチド配列にアニーリングする。

第 1 の PCR 反応からのサイズ特異的バンドは CPV 154 株又は CPV 630a 株の存在を示し、第 2 の PCR 反応におけるサイズ特異的バンドは異なる CPV2 株の存在を示す。

【社外秘につき非開示】

CPV 154 株又は CPV 630a 株との識別にはカプシド遺伝子のシーケンス解析が必要である。カプシド遺伝子の増幅には以下のプライマーを用いることができる。

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

<試験 1>

試験方法:

野外で採取された糞便を試料とし、陽性対照として CPV 154 株を用いた。QIAGEN PCR purification kit を用いて DNA を抽出し、以下の反応液及び条件にて PCR 反応を実施した。

【社外秘につき非開示】

結果:

CPV 154 株又は CPV 630a 株検出用プライマーペアを用いた PCR において、CPV 154 株は陽性を示した。

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

<試験 2>

試験方法:

「野外で採取 4 週齢の犬における Nobivac Puppy DP PLUS ワクチンの犬パルボウイルスに対する免疫成立時期の評価(PDP-E/0015/18: Study to Investigate the Efficacy of an Improved Puppy DP Vaccine in 4 week old Pups: Canine Parvovirus 3 Day Onset of Immunity)」の試験において、試験動物の糞便を試料とし Differential PCR を実施した。陽性対照 1 として CPV 154 株、陽性対照 2 として CPV Jes 株(野外株)を用いた。Roche MagNA Pure automated nucleic acid extraction robot を用いて DNA を抽出し、以下の条件で PCR 検査を実施した。

【社外秘につき非開示】

結果:

CPV 154 株又は CPV 630a 株検出用プライマーペアを用いた PCR において、CPV630 株は陽性を示し、野外株である CPV Jes 株は陰性を示した。また、DP PLUS 接種群の全頭の直腸スワブは陽性を示し、非投与対照群の全頭は陰性を示した。

その他の CPV2 ウイルス検出用プライマーペア(MBL18 及び MBL15)を用いた PCR において、CPV630 株は陰性を示し、野外株である CPV Jes 株は陽性を示した。また、DP PLUS 接種群の全頭の直腸スワブは陰性を示し、非投与対照群の全頭は陽性を示した。

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 3 国内における、CPV 154 株を含む製造販売承認動物用医薬品一覧

品名	一般的名称	製造販売業者	承認年月日
ノビバック PUPPY DP	ジステンパー・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン(シード)	MSD アニマルヘルス株式会社	2000 年 12 月 8 日
ノビバック DHPPi	ジステンパー・犬アデノウイルス(2 型) 感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン(シード)	MSD アニマルヘルス株式会社	2000 年 2 月 16 日
ノビバック DHPPi+L	ジステンパー・犬アデノウイルス(2 型) 感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬レプトスピラ病(カニコーラ・イクテロヘモラジー)混合ワクチン(シード)	MSD アニマルヘルス株式会社	2000 年 2 月 16 日

資料2. 審査データの概要

別添資料 4 世界における CPV 154 株を含む犬用(混合)ワクチン承認国一覧及び販売数量

CPV 154 株を含む犬用ワクチンは、表 4-1 に示す各国において承認されている。各製剤は以下の抗原を含み、犬パルボウイルス抗原として CPV 154 株を含む。

Parvo-C: 犬パルボウイルス感染症生ワクチン

Puppy DP: ジステンパー・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン

DHP: ジステンパー・犬アデノウイルス(2型)感染症・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン

DHPPi: ジステンパー・犬アデノウイルス(2型)感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン

DHPPi+L: ジステンパー・犬アデノウイルス(2型)感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチン

【社外秘につき非開示】

表 4-1: 世界における CPV 154 株を含む犬用(混合)ワクチン承認国一覧

製品名	Nobivac Parvo-C	Nobivac Puppy DP	Nobivac DHP	Nobivac DHPPi	Nobivac DHPPi+L	【社外秘につき非開示】
国名	【社外秘につき非開示】					
承認国数	【社外秘につき非開示】					

CPV 154 株を含む犬用(混合)ワクチンの世界における販売数量を表 4-2 に示す。2020 年 6 月～2025 年 5 月の期間において、合計【社外秘につき非開示】ドーズ以上が市販された。【社外秘につき非開示】。

資料2. 審査データの概要

表 4-2: 世界における CPV 154 株を含む犬用(混合)ワクチン販売ドーズ数
(2020 年 6 月～2025 年 5 月の期間における累計)

	Nobivac Parvo-C	Nobivac Puppy DP	Nobivac DHP	Nobivac DHPPI	Nobivac DHPPI+L
欧州	【社外秘につき非開示】				
米国・カナダ					
その他の国々					
合計	【社外秘につき非開示】				

資料2. 審査データの概要

別添資料 5 Nobivac Parvo C の市販後安全性情報

2020 年 6 月 1 日から 2025 年 5 月 31 日までの市販後安全性報告調査において、製品との因果関係が「可能性が高い」、「可能性あり」、「未分類」、及び「未結論」を含む、対象動物の有害事象発生率(効能外使用を含む)は 0.005%であった。

表 5-1: Nobivac Parvo C の対象動物有害事象発生率¹⁾

	販売ドーズ数	報告件数	発生率(%)
全世界	【社外秘につき非開示】	【社外秘につき非開示】	0.005

1) 2020 年 6 月 1 日から 2025 年 5 月 31 日までの市販後安全性報告調査において、製品との因果関係が「可能性が高い」、「可能性あり」、「未分類」、及び「未結論」及び、効能外使用を含む、対象動物の有害事象発生率を示す。

以上のとおり、効能内及び効能外使用後の、対象動物における有害事象発生率は 0.005%であり、全世界における販売数と比較しても、非常に稀である。

資料2. 審査データの概要

別添資料 6 静脈内及び経口接種後の犬間 7 代継代における CPV ワクチン (CPV 154 株) の安全性及び病原性復帰試験 (SAV/AK/7: Safety and stability of avirulence of the CPV vaccine virus component in 7 serial dog-to-dog transmissions after intravenous and oral inoculation)

本報告書は、1985 年以前に実施された試験結果に基づくものである。

1. 試験設計 (表 6-1)

表 6-1: 試験設計 (別添資料 6, p5)

群	継代数	n 数	接種週齢	接種方法
A	1	3	6	CPV 154 株 $10^{8.9}$ TCID ₅₀ を静脈内投与 + $10^{8.9}$ TCID ₅₀ を経口投与
B	2	2	6	A 群と同居
C	3	2	8	B 群からの直腸スワブ抽出物を経口接種
D	4	2	8	C 群と同居
E	5	1	12	D 群からの直腸スワブ抽出物を経口接種
F	6	2	12	E 群と同居
G	7	6	16	犬番号 1、2、3、及び 4 は、F 群からの直腸スワブ抽出物を経口接種 犬番号 5、6 は、非接種のまま、別室で飼育。 (犬番号 1、2、5、6 の犬は Nobivac DH、1 用量を接種)

A 群及び B 群 (1 及び 2 継代目)

A 群に割り当てた、6 週齢の 3 頭の幼若犬に CPV154 株 $10^{8.9}$ TCID₅₀ 0.5ml を静脈内投与し、同用量のウイルスを同時に経口接種した。接種後、4、6、又は 9 日目に各 1 頭を安楽殺し、組織を採取し、胸腺、十二指腸、空腸、回腸、脾臓及び心筋について、病理組織学的検査を実施した。また、胸腺、脾臓、小腸の内容物、直腸の内容物、骨髄及び血液バフィーコートについて、ウイルス分離を実施した。

同週齢の 2 頭は非接種のまま B 群とし、A 群と同居させた。

C 群及び D 群 (3 及び 4 継代目)

B 群からの直腸スワブ抽出物を 8 週齢の 2 頭の C 群の個体に経口接種した後、別の清浄な隔離室へ配置した。

同週齢の 2 頭は非接種のまま D 群とし、C 群と同居させた。

C 群の犬については接種 4 日目から、D 群の犬については接種 9 日目からウイルス排泄について検査した。C 群及び D 群の全頭について、14 日間臨床観察を毎日実施し、試験 0、7、10 及び 14 日目に抗体価測定のために採血を実施した。

E 群及び F 群 (5 及び 6 継代目)

D 群からの直腸スワブ抽出物を E 群の 12 週齢の個体 1 頭に経口接種した後、別の清浄な隔離室へ配置した。

同週齢の 2 頭は非接種のまま F 群とし、E 群と同居させた。

資料2. 審査データの概要

E 群及び F 群の全頭について、直腸温及び総白血球数を含め、臨床反応を観察した。また、ウイルス排泄検査及び抗体価測定を実施した。

G 群（7 継代目）

F 群からの直腸スワブ抽出物を G 群の 16 週齢の個体 6 頭に接種し、以下の 3 群に各 2 頭ずつ割り当てた。

- a 個体番号 1 及び 2 に、ジステンパー及び犬アデノウイルスの混合ワクチンを投与した後、F 群からの直腸スワブ抽出物を経口接種した。
- b 個体番号 3 及び 4 に、F 群からの直腸スワブ抽出物を経口接種した。
- c 個体番号 5 及び 6 に、ジステンパー及び犬アデノウイルスの混合ワクチンを投与した。

2. 結果

臨床観察

A 群の 1 頭で接種後 2 日目のみ軟便が見られた以外は、全ての個体で臨床症状はみられず正常であった。

体温

G 群の 1 頭で接種 5 日目に体温上昇がみられた以外は正常範囲内であった。

病理組織検査

A 群及び B 群の病理組織検査において、病変は見られなかった。

白血球数

A 群の 2 頭で、それぞれ接種後 4 日目及び 5 日目に軽度の好中球数低下がみられたが、いずれも顕著な影響はないものと考えられた。E 群の 1 頭でも、10 日目に軽度の好中球数低下がみられたが、臨床的好中球減少症には当たらないと考えられた。G 群の 2 頭で CPV と DH の接種後 5 日目にみられたリンパ球増加がみられたが、好中球数は正常値であり、ジステンパーワクチンの接種に対する反応と考えられた。

CPV 分離

A 群において接種後 1～6 日目に、C 群において接種後 4～9、及び 12 日目に CPV の排泄がみられた。同居群である B 群、D 群、F 群においては排泄が開始してから約 4～8 日間の期間にわたって排泄がみられた（表 6-2）。

表 6-2: 直腸スワブにおける CPV 検出結果（別添資料 6）

群	継代数	n 数	直腸スワブ CPV 検出数	直腸スワブ CPV 陽性期間
A	1	3	3	接種後 1～6 日目
B	2	2	2	A 群へ接種し同居開始後、7～12 日目
C	3	2	2	接種後 4～9、12 日目
D	4	2	2	D 群へ接種し同居開始後、9～13 日目
E	5	1	1	接種後 3～8 日目

資料2. 審査データの概要

F	6	2	2	E 群へ接種し同居開始後、6～14 日目
G	7	6	NA	—

NA: 測定していないことを示す。

A 群における臓器でのウイルス分離において、接種 4 日目には胸腺、脾臓、小腸の内容物、直腸の内容物、骨髄及び血液から採取したバフィーコートで検出され、接種 9 日目には脾臓以外の臓器からは検出されなかった（表 6-3）。

表 6-3: 組織におけるウイルス分離 (A 群) (別添資料 6、p10)

個体 ID	接種後日数	胸腺	脾臓	バフィーコート	骨髄	小腸内容物	直腸内容物
L49	4	+	+	+	+	+	+
L50	6	+	+	+	-	-	+
L47	9	-	+	-	-	-	-

CPV 抗体価測定

C、D、E、F 群の各全頭及び G 群の個体番号 1、2、3、4（直腸スワブ抽出物を経口接種した全頭）において、抗 CPV 抗体価陽転がみられた。

3. 結論

6 週齢の幼若犬へ高用量 CPV を接種しても、有意な臨床症状は示さなかった。また、犬間で 7 継代しても、病原復帰の徴候はみられなかった。

資料2. 審査データの概要

別添資料 7 経鼻、筋肉内及び皮下接種後の犬間 3 代継代における CPV ワクチン(CPV 154 株)の安全性及び病原性復帰試験 (SAV/AKa/2: Safety and stability of avirulence of the CPV vaccine virus component in 3 serial dog-to-dog transmissions after intranasal, intramuscular and subcutaneous inoculation)

本報告書は、1991 年に実施された試験結果に基づくものである。

4. 試験設計

CPV 154 株のマスターシードウイルス (MSV) を 6 週齢の犬 3 頭へ筋肉内、皮下、及び経口経路にて計 $10^{8.36}$ TCID₅₀ 接種した (1 代目)。1 頭はウイルス接種せず、同居させた。CPV を接種した犬の糞便試料から調製した接種試料を別の群 2 頭へ経鼻・経口接種した。これを 3 代目まで繰り返した。供試した犬は試験前に CPV 抗体陰性であることを確認した。

体温、臨床症状、白血球数を 21 日間記録した。直腸スワブ及び糞便の採取を試験 21 日目まで毎日実施し、ウイルス含有量を測定した。試験開始前と 3 週間目に採血し、抗体価測定を行った。

5. 結果

1 継代目の群で軽微な白血球数の一過性の降下がみられた。2、及び 3 継代目の群のいずれの犬においても、白血球減少はみられなかった。したがって、白血球数降下の程度は、継代によって強まるといった傾向はみられなかった。

1 継代目の群では、接種後約 2~6 日目に CPV の排泄がみられ、2 及び 3 継代目の群では直腸スワブにおいて CPV 陰性であった。

全ての群の、いずれの個体においても臨床症状はみられず、体温は正常であった。

【社外秘につき非開示】

6. 結論

CPV MSV は最初の接種群に感染し、良好な抗体反応を示した。接種した犬のいずれにおいても一般状態の変化はみられず、体温は正常のままであった。CPV ウイルスの犬から犬への活発な伝播は認められなかった。

犬において 3 回継代しても、CPVMSV の病原性への復帰はないことが示された。

資料2. 審査データの概要

別添資料 8 CPV 154 株及び CPV 630a 株の培養細胞における増殖

ワクチン製造における標準的培養条件で培養して得たウイルス原液のウイルス含有量測定値を基に、各製造用培養細胞における CPV 154 株及び CPV 630a 株のウイルス増殖を評価した。

添付の製造記録を基に、表 8-1 及び 8-2 に培養条件及び得られたウイルス原液のウイルス含有量を記載した。

CPV154 株は犬大腿部腫瘍由来株化 (A72) 細胞に接種し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で【社外秘につき非開示】日間培養して回収したウイルス原液について、ウイルス含有量を測定した。CPV630a 株は SAH-DK 細胞に接種し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で【社外秘につき非開示】日間培養して回収し、濃縮したウイルス原液について、ウイルス含有量を測定した。

CPV 630a 株は犬腎株化 (SAH-DK) 細胞に接種し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で【社外秘につき非開示】日間培養後に、濃縮したウイルス原液について、ウイルス含有量を測定した。CPV 630a 株の原液 (【社外秘につき非開示】日間培養及び濃縮工程後) のウイルス含有量は【社外秘につき非開示】 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ と測定されており、宿主である CPV 154 株の原液 (【社外秘につき非開示】日間培養し濃縮工程はない) のウイルス含有量 (【社外秘につき非開示】 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) より低い力価であった。

以上より、各培養細胞における推定増殖率は、CPV 154 株と比較し CPV 630a 株の方が低値であった。

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料9 分娩 34 日前の抗体陰性妊娠犬における CPV ワクチン (CPV 154 株) の安全性試験 (SAV/AP/26: Safety of the CPV vaccine antigen after vaccination of an antibody negative pregnant bitch at 34 days before parturition)

本報告書は、1985 年以前に実施された試験結果に基づくものである。

要約

1. 試験設計

抗体陰性の、分娩 34 日前の妊娠犬に 1 用量の Nobivac Parvo-C¹ を接種した。

ワクチン接種後 10 日間及び分娩後 10 日間、母犬の一般状態及び体温測定を記録した。

抗体測定のため、母犬からはワクチン接種後 0、7、21、62 日目に、仔犬からは分娩後 1、7、28 日後に採血を実施した。

出生後の仔犬について、0、1、及び 4 週齢の段階で、1 頭ずつ安楽死させ、剖検及び病理組織検査を行った。

出生後 1 週齢及び 4 週齢で安楽死した各個体から採材した胸腺、並びに出産日に母犬から採材した子宮排泄物及び出産後 1～10 日目の母犬における直腸スワブについて、ウイルス分離検査を実施した。

2. 結果

母犬の直腸温は正常範囲内 (表 9-1) で、いずれの段階においても、一般状態の異常は認められなかった。

5 頭の健康な仔犬が生まれ、いずれの仔犬においても臨床上の異常はみられなかった。

抗体価測定において、母犬はワクチン接種後良好な抗体反応を示し、仔犬への受動免疫賦与も観察された (表 9-2)。ウイルスは、分娩後のいずれの時期においても、母犬又は仔犬からのいずれからも検出されなかった。

出生した仔犬の剖検ならびに病理組織検査においても、心臓、胸腺及びその他の組織 (扁桃、腸間膜リンパ節、パイエル板、腸陰窩上皮、肝臓、肺及び骨髄) において異常は認められなかった。

出産後、仔犬及び母犬のいずれの試験試料においても、ウイルスは分離されなかった。

【社外秘につき非開示】

3. 結論

ワクチン接種により、母犬及び仔犬のいずれにおいても有害事象はみられなかった。また、いずれの仔犬において、いかなる臨床上の異常所見や組織学的変化も認められなかった。

¹ Nobivac Parvo-C: CPV 154 株を有効成分とする犬パルボウイルス生ワクチンである。

資料2. 審査データの概要

別添資料 10 Nobivac DHPPi 高用量安全性試験(SAV/BF/20: Nobivac DHPPi overdose safety)

本報告書は、1994 年に実施された試験結果に基づくものである。

要約

1. 試験設計

4～5 週齢の幼若犬に 10 用量の Nobivac DHPPi¹（CPV 154 株を含む犬用混合生ワクチン）4 ロットを各 2 頭ずつに皮下接種した。ワクチン接種後 21 日間、一般状態、局所及び全身反応を観察した。

2. 結果

いずれの犬も健康状態は良好に経過し、顕著な局所又は全身反応は認められなかった。

3. 結論

Nobivac DHPPi は、10 倍用量を犬に接種しても安全であった。

¹ Nobivac DHPPi: ジステンパー・犬アデノウイルス(2型)感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチンであり、犬パルボウイルス抗原として CPV 154 株を含む。

資料2. 審査データの概要

別添資料 11 猫における CPV 154 株の安全性試験 (SAV/AJ/19: Safety of the CPV vaccine component in cats)

本報告書は、1985 年以前に実施された試験結果に基づくものである。

要約

1. 試験設計

29 週齢の SPF 猫 6 頭のうち、2 頭に CPV 154 株を筋肉内接種 ($10^{8.1}$ TCID₅₀)、2 頭に CPV 154 株を経口接種 ($10^{8.1}$ TCID₅₀)、2 頭は非接種で同居群とした。

評価項目として、臨床観察、白血球数測定、抗体価測定、直腸温測定及び直腸スワブからのウイルス分離を実施した。

2. 結果

いずれの猫においても、臨床上の異常はみられず、直腸スワブからも、ウイルスは検出されなかった。

試験前に全ての猫は抗 CPV 抗体陰性であった。試験中、接種 10 日目に、筋肉内接種した猫 2 頭において高いレベルの抗体陽転 (5120 及び 2560) がみられたが、経口接種群及び対照群の猫においては抗体陰性であった。

直腸温及び白血球数は、表 11-1、及び表 11-2 の通りであった。

表 11-1: 直腸温 (°C) 測定結果 (別添資料 11、p6、Table1)

接種後日数	経口接種		筋肉内接種		対照群	
	個体番号／直腸温(℃)					
	P37	P42	P32	P31	P14	P45
0	39.6	39.2	39.4	39.3	38.2	39.2
1	39.1	39.0	39.2	38.8	38.8	39.2
2	39.2	39.0	39.1	39.0	39.0	39.1
3	39.0	39.2	38.8	38.9	39.0	39.2
4	39.1	38.8	39.7	39.2	39.0	39.2
5	38.7	38.5	38.9	39.2	38.6	39.1
6	38.9	38.5	38.4	38.5	38.6	38.7
7	39.1	38.8	38.7	39.0	38.8	38.3
8	38.6	38.8	38.8	39.2	39.1	39.1
10	38.4	38.5	38.5	38.3	38.7	38.4

表 11-2: 白血球数 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) 測定結果 (別添資料 11、p7、Table2)

接種後日数	経口接種		筋肉内接種		対照群	
	個体番号／白血球数(x 10 ³ /mm ³)					
	P37	P42	P32	P31	P14	P45
0	18.5	16.2	13.1	18.0	18.5	12.4
3	20.1	20.2	13.4	18.7	14.4	15.6
4	19.0	13.5	13.6	15.9	17.8	17.0
5	18.1	21.0	19.0	18.0	22.8	-
6	22.4	19.6	14.4	20.2	-	18.8
7	17.4	12.7	10.6	12.1	24.8	17.0
8	21.8	13.4	19.0	21.5	19.0	18.0
10	13.8	15.8	14.4	15.1	18.8	12.8

資料2. 審査データの概要

3. 結論

CPV 154 株を経口又は筋肉内接種した後の、いずれの猫においても排泄はみられなかった。また、経口接種した猫は抗体陽転を認めなかった。

資料2. 審査データの概要

別添資料 12 フェレットにおける CPV 154 株の安全性試験 (SAV/AJa/18: Safety of the CPV vaccine component in ferrets)

要約

1. 試験設計

12 か月齢未満の、幼若フェレット 13 匹のうち、試験群 10 匹に Nobivac-C¹ ワクチン 1ml を皮下接種し、残りの 3 匹は対照群として、別室で飼育した。

臨床観察、直腸温、白血球数測定を試験開始 2 日前より開始し、接種後 7 日間継続した。その後の 14 日間は一般状態の観察のみ行った。

試験-2 及び 28 日目に採血し、HI 抗体価測定を実施した。

糞便スワブは試験-2～7 日目まで採取し、ウイルス分離を実施した。

2. 結果

試験群及び対照群のいずれのフェレットにおいても、臨床上的異常はみられず、直腸温及び白血球数は正常範囲内であった。

直腸スワブのウイルス検査において、ウイルスの排泄は認められなかった。

ワクチン接種後 28 日目において、血清 HI 抗体価は 256～2024 倍を示した。

表 12-1: 血清 HI 抗体価(倍) (添付資料 12、p9、Table3)

個体番号	試験 2 日前	試験 28 日目
G15	<20	512
G17	<20	512
G18	<20	1024
G19	<20	256
G20	<20	1024
G21	<20	512
G23	<20	512
G24	<20	1024
G27	<20	256
G28	<20	1024
対照群		
G16	<20	<20
G22	<20	<20
G26	<20	<20

3. 結論

Nobivac Parvo-C 接種により、フェレットは抗体反応を示した。

ウイルス排泄、発熱、又は白血球数減少症は、いずれも認められなかった。21 日間の観察期間において、フェレットは健康であり、下痢、傾眠、又は食欲不振等の臨床症状はみられなかった。したがって、Nobivac Parvo-C 接種はフェレットにおいて抗体反応をみとめ、安全であった。

¹ Nobivac Parvo-C: CPV 154 株を有効成分とする犬パルボウイルス生ワクチンである。

資料2. 審査データの概要

別添資料 13 CPV 154 株、CPV Jes 株、及び CPV 630a 株における、VP2 カプシドの遺伝子塩基配列及びアミノ酸配列の配列比較

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 14 合成 DNA 遺伝子配列及び近隣配列、並びに VP2 領域配列におけるアレルゲン検索

本遺伝子組換え微生物のカプシド遺伝子の由来である Jes 株は野外株であるが、弱毒配列を含めるためにクローニング工程において合成 DNA 遺伝子が用いられている。既知アレルゲンの類似蛋白の予期せぬ発現の可能性を評価するため、合成遺伝子及びその近隣のアミノ酸配列(以下)をアレルゲンデータベース ADSF にて FAO/WHO で推奨されている方法で検索した。この結果、既知アレルゲンのアミノ酸配列と 35%以上の相同性のある配列は確認されなかった。

合成遺伝子(下線部)及びその近隣のアミノ酸配列:

【社外秘につき非開示】

さらに、本遺伝子組換え微生物のカプシド遺伝子 VP2 のアミノ酸配列について、アレルゲンデータベース ADSF にて FAO/WHO で推奨されている方法で検索した。

検索の結果、オーバーラップ領域 80 残基の条件において、アミノ酸残基【社外秘につき非開示】までの領域より 80 残基の配列においてブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*) のペプチドと相同性 35~36%であることが示された。ブタクサのペプチド「【社外秘につき非開示】」の塩基配列は以下の通りである。

【社外秘につき非開示】

「【社外秘につき非開示】」と CPV 630a 株のアミノ酸配列において 31~36%相同であったフラグメントについて、CPV 630a 株の VP2 アミノ酸配列及び CPV 154 株の VP2 アミノ酸配列における位置との関係を調査した。この結果、当該部位におけるアミノ酸配列は CPV 630a と CPV 154 株において同一配列であった(次図)。

CPV 154 株は長年犬において使用され、安全に使用されている。FAO/WHO で推奨されている方法において、オーバーラップ領域 80 残基で 35%以上の相同性のあるペプチドが検出されるが、今回の相同性は 35~36%であり、35%をわずかに上回るレベルであった。また、当該配列は VP2 蛋白質の一部であり、糞便中にウイルスが排泄されても外界において増殖しない。

以上より、本遺伝子組換え微生物がアレルゲン等の有害物質を産生する性質は無いものと考えられた。

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 15 病原性復帰試験: 幼若犬における CPV 630a 株の 5 代継代

(PDP-E/0047/15: Reversion to virulence: Five back passages of CPV 630a through young pups)

要約

1. 試験設計

本遺伝子組換え微生物を 5 群の幼若犬に連続的に継代した。4～6 週齢の 18 頭の幼若犬を用いて、試験開始前に抗 CPV 抗体測定を行った(表 15-1)。

CPV 630a 株 $10^{7.5}$ TCID₅₀ を第 1 群の 3 頭に皮下投与した。接種後 2～6 日目に、第 1 群から採取した糞便のプール試料を第 2 群に経鼻・経口接種することにより継代し、これを 5 継代まで繰り返した。

評価項目は、体重、体温、臨床スコア、及び糞便中のウイルス量測定とした。

表 15-1: 試験設計(別添資料 15、p9-10)

群	接種	n 数	接種週齢	評価項目	観察期間 (接種後日数)
1	CPV 630a	3	4	体重、体温、臨床スコア、 糞便中のウイルス量測定	10
2	第 1 群からの糞便プール試料	2	5		7
3	第 2 群からの糞便プール試料	2	5		7
4	第 3 群からの糞便プール試料	3	6		7
5	第 4 群からの糞便プール試料	8	4		10

2. 結果

試験開始前、全ての供試犬は抗 CPV 抗体陰性であった。

体温は試験期間中全ての個体において正常範囲内であり、発熱はみられなかった。また、いずれの個体においても、下痢や傾眠含め、いかなる臨床症状も認められなかった。

観察期間中、すべての個体が成長を示した。第 3、4、及び 5 群で接種後 5 日目に軽微な体重減少を示したが、一過性であり、その後体重増加した。

CPV 630a 株を皮下投与した第 1 群においては、接種後 3、4 日目をピークに、接種後 2～4 日目の間にウイルス排泄が認められた(表 15-2)。第 2 群～第 5 群においては、ウイルス排泄のピークは第 1 群と比較してやや遅れて、長くなり、接種後 4～6 日目に認められた。なお、第 2 群においてウイルス排泄量が少なかったのは、第 2 群へ接種した糞便試料のウイルス含有量が低かったことによるものと考えられるが、継代には十分な量であったと考えられた。各継代時のプール糞便試料のウイルス含有量測定結果を表 15-3 に示す。

表 15-2: 25%CPV 糞便プール¹のウイルス含有量

	測定値 1	測定値 2	平均	TCID ₅₀ / ml ²
第 1 群からの糞便プール	【社外秘につき非開示】			
第 2 群からの糞便プール				
第 3 群からの糞便プール				
第 4 群からの糞便プール				

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

表 15-3: 糞便中の CPV ウイルス含有量推定値¹(TCID₅₀/g)

群	糞便 番号	接種後日数／ウイルス含有量推定値(TCID ₅₀ /g)								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	【社外秘につき非開示】								
1 継代目	2									
2	1									
2 継代目	2									
3	1									
3 継代目	2									
4	1									
4 継代目	2									
5 5 継代目	1									
	2									
	3									
	4									

【社外秘につき非開示】

3. 結論

CPV 630a 株を犬において 5 継代しても、病原性復帰を示す徴候はみられなかった。

資料2. 審査データの概要

別添資料 16 約 4 週齢の犬における CPV 630a 株の体内分布試験 (PDP-E/0114/15: Dissemination of canine parvovirus strain 630a in dogs of approximately 4 weeks of age.)

要約

1. 試験設計

CPV 630a 株 $10^{7.0}$ TCID₅₀ を第 1、2 群の各 3 頭に皮下接種した。第 3 群は非投与対照群とした。

試験には、3～4 週齢のビーグル犬が供試された (表 16-1)。

観察期間中、体温測定、臨床観察、直腸スワブ採取を毎日実施し、ワクチン接種時と接種後の血清の HI 抗体価測定を行った。

第 1 群及び第 3 群は、接種後 4 日目に、第 2 群は接種後 11 日目に、安楽殺後に組織採取し、以下の組織についてウイルス分離を実施した; 胸腺、脾臓、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、扁桃、心臓 (心筋)、肝臓、腎臓、肺、脳 (大脳、小脳及び脳幹) 及び注射部位皮膚。各組織試料について、ウイルス検出法の妥当性を担保するため $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml CPV630a 株をスパイクしたホモジネートと、スパイク無しホモジネートを作製し、これらについてウイルス含有量測定を行った。スパイク無しホモジネートについては、遠心後上清を採取し、抗 CPV2 抗体価測定を行った。心筋については、病理組織学検査を実施し心筋炎有無を評価した。

表 16-1: 試験設計 (別添資料 16、p12)

群	接種	n 数	組織採取日 (接種後日数)	観察項目
1	CPV 630a	3	4	体重、体温、臨床スコア、直腸スワブ、抗体価測定
2	CPV 630a	3	11	
3	非投与	1	4	

2. 結果

全頭において、試験開始前には抗 CPV 抗体陰性であった。ワクチン接種後、第 1 群において 4 日目に高い抗体反応がみられ、第 2 群において 11 日目に更に高い反応がみられた。第 3 群 (対照群) においては、0 日目及び 4 日目とも抗体陰性 (<8) であった (表 16-2)。

表 16-2: 血清 HI 抗体価¹ (別添資料 16、p16、Table3)

群	個体番号	各接種後日数における HI 抗体価 (倍)		
		0	4	11
1	2007	【社外秘につき非開示】		
	2008			
	2009			
2	1981			
	1982			
	1810			
3	2006			

NS: 接種後 4 日目に第 2 群の個体から採取した血清試料なし。

- 1) HI 値を 4 HA 単位の抗原に対しての値として示された過去の試験及び過去の HI 値と一致させるために、本試験の HI 値に係数 2 を乗じ、同様に 4 HA 単位に対しての値として示した。
- 2) 試験計画に従い、4 日目に組織採取のため安楽殺されたため、非測定。

資料2. 審査データの概要

第1群及び第2群の犬は、ワクチン接種後も体温は正常範囲内で推移し、臨床上の異常は認められず、健康であった。

直腸スワブからの CPV 630a ウイルス検出では、ワクチン接種した第1及び第2群において排泄がみられた。排泄は、接種後1～8日目にみられ、ピークは4及び5日目であった。対照群においてウイルスは検出されなかった(表16-3)。

表 16-3: 直腸スワブにおけるウイルス含有量(Log₁₀ TCID₅₀/ml)¹⁾ (別添資料 16、p18、Table5)

群	個体 ID	接種後日数											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	2007	【社外秘につき非開示】											
	2008												
	2009												
2	1981												
	1982												
	1810												
3	2006												

1) 直腸スワブ試料を培地に溶解後、遠心分離した。遠心上清を段階希釈し、A72細胞に接種して、ウイルス含有量を測定した。
N: CPV が検出されなかったことを示す。(<1.05 Log₁₀ TCID₅₀/ml)

心筋の病理組織学検査において、肉眼的又は組織学的異常や、炎症性徴候はいずれの個体にも認められなかった。

接種後4日目(第1群)に採取した組織ホモジネートの HI 抗体価測定において、脾臓、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、肝臓、腎臓、肺において約16～64単位の抗体価が検出された。接種後11日目(第2群)には、すべての組織において抗体価の更なる上昇がみられた。接種後4日目(第1群)において、CPV630a ウイルスは胸腺、脾臓、腸組織、リンパ組織、扁桃、肝臓、及び注射部位皮膚で検出され、胸腺では最も多く検出された。腎臓、肺、脳組織及び心臓ではほとんど又は全く検出されなかった。接種後11日目(第2群)において、いずれの組織からも CPV630a ウイルスは検出されなかった(表16-4)。分布したウイルスの消失は、ワクチン接種後に生じた高レベルの CPV 抗体によるウイルス中和の結果であると考えられる(表16-5)。

表 16-4: 各組織における CPV 分布(10%組織ホモジネートにおけるウイルス含有量 (Log₁₀ TCID₅₀/ml)) (別添資料 16、p18、Table6)

組織	スパイク有無	第1群 4日目			第2群 11日目			第3群 4日目
		2007	2008	2009	1810	1981	1982	2006
胸腺	- +	【社外秘につき非開示】						
脾臓	- +							
小腸-十二指腸	- +							
小腸-空腸	- +							
小腸-回腸	- +							

資料2. 審査データの概要

腸間膜リンパ節	- +	
顎下リンパ節	- +	
扁桃	- +	
肝臓	- +	
腎臓	- +	
肺	- +	
脳- 大脳	- +	
脳- 小脳	- +	
脳- 脳幹	- +	
注射部位皮膚	- +	
心臓-心筋	- +	

—: スパイク処理無し試料

+: スパイク処理済み試料

*: 最初の希釈ウェルでは、組織由来の毒性作用が細胞に対して時折認められたため、これらの特定のウェルについて明確な記録を行うことはできなかった。細胞単層が完全に破壊された場合は、スワブの希釈倍率を上げたときの測定値に応じて陽性又は陰性のいずれかでウェルを記録した。これらの試料では CPV 特異的な蛍光は認められなかった。この分析法の検出限界は 1.20 未満であった。

表 16-5: 組織ホモジネートの HI 抗体価(倍)¹ (別添資料 16、p17、表 4)

組織	第 1 群 4 日目			第 2 群 11 日目			第 3 群 4 日目
	2007	2008	2009	1810	1981	1982	2006
胸腺	【社外秘につき非開示】						
脾臓							
小腸- 十二指腸							
小腸-空腸							
小腸-回腸							
腸間膜リンパ節							
顎下リンパ節							
扁桃							
肝臓							
腎臓							
肺							
脳- 大脳							
脳- 小脳							
脳- 脳幹							
注射部位皮膚							
心臓-心筋							

1) HI 値を 4 HA 単位の抗原に対しての値として示された過去の試験及び過去の HI 値と一致させるために、本試験の HI 値に係数 2 を乗じ、同様に 4 HA 単位に対しての値として示した。

3. 結論

約 4 週齢の幼若犬に CPV 630a 株を接種しても、臨床的異常はみられなかった。CPV 630a は接種から 4 日以内に組織に分布することが示された。しかしながら、接種後 11 日目には抗体の中和作用により同様の組織において検出されなくなった。

資料2. 審査データの概要

別添資料 17 CPV 630a 株の DNA 塩基配列と構成配列の由来

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 18 CPV 630a 株構築におけるクローニング工程模式図

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 19 【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 20 【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 21 【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 22 【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 23 【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 24 犬における CPV 生ワクチン候補株評価試験 (Study to determine the response of dogs to modified vaccine strains of CPV)

【社外秘につき非開示】

要約

1. 試験設計

【社外秘につき非開示】を 11～13 週齢のビーグル犬 5 頭に皮下接種した。

ウイルス接種後 14 日間の観察期間中、体温測定、臨床観察、直腸スワブ採取を毎日実施し、接種-4、-2、0、3、5、7、及び 10 日目に採血して、白血球数を測定した。また、ワクチン接種時と接種後の血清抗体価測定を行った。試験最終日（接種後 14 日目）に安楽殺後、胸腺を採材し病理組織学検査を実施した。

2. 結果

【社外秘につき非開示】

表 24-1: 体温 (別添資料 24、p15、Table4)

個体 ID	試験日																	
	-2	-1	0	0 +4h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
371 959	【社外秘につき非開示】																	
526 964																		
374 320																		
373 148																		
402 761																		

下線: 39.5℃以上

表 24-2: 体重 (別添資料 24、p16、Table5)

個体 ID	試験日 (接種後日数)												
	-1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
371 959	【社外秘につき非開示】												
526 964													
374 320													
373 148													
402 761													

表 24-3: 白血球数¹⁾及び変化率 (別添資料 24、p19、Table8)

個体 ID	-4	-2	0	平均 ²⁾	3	% ³⁾	5	% ³⁾	7	% ³⁾	10	% ³⁾
371 959	【社外秘につき非開示】											
526 964												
374 320												
373 148												
402 761												

資料2. 審査データの概要

平均	
----	--

- 1) $\times 10^9$ 個/L
- 2) 試験開始前測定値(-4、-2、0日目)の基礎平均値
- 3) 試験3、5、7、及び10日目における各測定値の基礎平均値に対する変化率(%)

表 24-4: 直腸スワブにおけるウイルス含有量測定(別添資料 24、p20、Table9)

	試験日(接種後日数)														
個体 ID	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
371 959	【社外秘につき非開示】														
526 964															
374 320															
373 148															
402 761															

- 3) 結論 (【社外秘につき非開示】)

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 25 【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

別添資料 26 承認申請資料に使用した CPV 630a 株の遺伝的解析 (PDP-E-0084-15 : Genetic characterization of 630a used in registration studies)

要約

1. 試験設計

パルボウイルスは、約 5000 ヌクレオチドの小さな非エンベロープ一本鎖 DNA ウイルスであり、感受性細胞におけるその複製サイクルの間に、二本鎖ゲノム RF-DNA (複製形 DNA) が生成され、これは、高塩溶液での抽出によって単離し (McMaster ら、1981 及び Hirt 1967)、標準的な分子生物学的プロトコルを用いてさらに精製することができる。

各 DNA テンプレート (ウイルスゲノム DNA) を CPV-2 を感染させた A72 培養細胞から抽出・精製した後、シーケンス解析については外部の配列解析業者 (GATC Biotech 社) にて、提供した DNA テンプレートとオリゴヌクレオチドプライマーを用いて実施された。

12 の試料 (表 26-1) について、配列解析した。CPV-2 ゲノムと重複する、フォワード及びリバースオリゴヌクレオチドプライマーのパネル (表 26-2) を用いた。パルボウイルスに対して予想されたように、右側 ITR 全体に渡っての配列決定は不可能であった。複雑な三次元構造の存在により、DNA ポリメラーゼがヘアピン領域を動くのを阻害したものと考えられる。

【社外秘につき非開示】

シーケンスファイルについて、Chromas プログラムを用いて配列の完全性を調べ、Clone Manager Professional 9 ソフトウェアを用いて配列を分析した。個々の配列を組み立て、隣接するコンセンサス配列を決定した。コンセンサスは、可能な限り CPV ウイルス DNA の両方の鎖からの配列の確認によって決定された。参照 630a「出発物質」(別添資料 26、原文 Appendix13 参照)との配列アラインメントを行った。

2. 結果

ゲノム配列について、PDP/5 及び PDP/10 以外の全ての試験品の大部分において、配列解析された。PDP/5 (病原性復帰試験における糞便試料) については、ヌクレオチド 864~952 (非構造遺伝子) の配列、PDP/10 (凍結乾燥最終製品) についてはヌクレオチド 3673~4546 (カプシド遺伝子) の配列において読込不能となり、配列決定できなかった。右側ヘアピン配列については、試料 ID PDP1、2、9 及び 10 以外の全ての試料について配列解析した。

PDP/5 及び PDP/10 の読込不能配列以外については、全ての配列が予測された通りであり、630a 参照配列と同じであった。病原性復帰試験における試料を含め、いずれの 630a 試料についても変異は検出されず、遺伝的非安定性や不均一性は示唆されなかった。CPV 630a の配列は、病原性復帰試験において、犬での継代後も変化しないことが示された。また、630a は、トランスフェクションの後、及びローラーボトルにおける 2 継代培養の後にも変化しないことが示された。

3. 結論

PDP/5 及び PDP/10 の一部領域における技術的事象による読込不能配列以外については、解析した全試料の配列は予測された通りであり、変異は検出されなかった。

資料2. 審査データの概要

結論として、本試験で解析した試料について、630a は遺伝的に安定であることが示された。

参考文献

- McMaster GK, Tratschin JD, Sieg! G. Comparison of canine parvovirus with mink enteritis virus by restriction site mapping. Journal Virol. 1981 Apr; 38(1) :368- 371.
- Hirt, B. Selective extraction of polyoma DNA from infected cell cultures. 1967 J. Mol. Biol 1967; 26, 365-369

資料2. 審査データの概要

別添資料 27 CPV 630a 株の配列解析(【社外秘につき非開示】)

【社外秘につき非開示】

要約

1. 方法

CPV 630a (D) 【社外秘につき非開示】の DNA 配列解析のため、【社外秘につき非開示】を感染させた A72 細胞より RF-DNA を抽出し、PCR を実施した。合計 【社外秘につき非開示】のコンティグ（連続断片）を用いて、配列データを得た。シーケンス解析は、提供したプライマーを用いて GATC 社（GATC Biotech）にて実施された。CPV 【社外秘につき非開示】コンセンサス配列を特定するため、Clone Manager 9 ソフトウェアにて、全てのシーケンシングコンティグを用いて組み立てた。

2. 結果

シーケンス解析により、CPV 【社外秘につき非開示】630a コンセンサス配列が得られた。（コンセンサス配列：別添資料 27 原文参照）

資料2. 審査データの概要

別添資料 28 4 週齢の犬における Nobivac Puppy DP PLUS ワクチンの犬パルボウイルスに対する免疫成立時期の評価 (PDP-E/0015/18: Study to Investigate the Efficacy of an Improved Puppy DP Vaccine in 4 week old Pups: Canine Parvovirus 3 Day Onset of Immunity)

要約

1. 試験設計

12 頭の 4 週齢 SPF 犬を 2 群に割り当て、第 1 群は 7 頭、第 2 群は 5 頭とした。

全頭は、スワブ及び抗体価測定によりパルボウイルス陰性であった。

第 1 群の犬に、Nobivac Solvent (溶解液) で溶解した 1 用量の Nobivac Puppy DP PLUS¹ 試験品² を皮下投与した。第 2 群は、攻撃対照群とした。投与 3 日目に、両群に CPV-2 野外株³ を経口投与し、攻撃した。

抗体価測定のため、試験 0 日目 (接種日)、3 日目 (攻撃日)、6 日目 (攻撃後 3 日目)、10 日目 (攻撃後 7 日目)、及び 17 日目 (試験終了日) に採血し、CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 亜型に対する抗体反応を測定した。攻撃前後に総白血球数を測定した。ワクチン株又は攻撃株の排泄を評価するため、直腸スワブを毎日採取した。攻撃後、直腸温及び体重測定を含め臨床観察を毎日実施した。

2. 結果

ワクチン投与した全頭は、体重減少や体温上昇等を含め、犬パルボウイルス感染に関連するいかなる臨床症状も示さず、防御されていることが示された。白血球減少症はワクチン投与群いかなる犬にも認められなかった。一方、攻撃対照群においては全頭で体重減少が、5 頭中 3 頭に発熱がみられ、典型的な犬パルボウイルス感染症の徴候が認められた。白血球減少症は、ベースライン平均値の 50% 未満への減少とした定義において、5 頭中 1 頭でみられ、5 頭中 3 頭は低白血球数を認めた (表 28-1)。

表 28-1: 白血球数測定結果 ($\times 10^9/L$) (別添資料 28、p24、Table5)

群	個体 ID	試験日 (カッコ内は攻撃からの日数)								
		-1 (-4)	+1 (-2)	+3 攻撃日	ベースライン 平均値	+6 (+3)	+8 (+5)	+9	+10 (+7)	+13 (+10)
接種群	5963	【社外秘につき非開示】								
	6286									
	6914									
	1077									
	1611									
	5583									
	6946									
対照群	6937									
	2134									
	6412									
	7286									
	6013									

犬における正常範囲は、 $6.0 \sim 18.0 \times 10^9/L$

ベースライン平均値: ワクチン接種前ベースライン平均値をワクチン接種後データと比較された。

イタリック: 正常範囲未満の白血球数

太字: ベースライン平均値と比較し 50% 未満

¹ Nobivac Puppy DP PLUS は、本遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株と犬ジステンパーウイルスを含む二価犬用混合ワクチンである。

【社外秘につき非開示】

資料2. 審査データの概要

NT: 測定せず
EE: 犬は安楽死されたため、測定せず。

HI 抗体価測定結果を表 28-2 に、中和抗体価測定結果を表 28-3 に示した。攻撃日（接種 3 日目）における、接種群の平均 HI 抗体価は CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 亜型に対してそれぞれ 254、214、及び 238 倍で、平均中和抗体価は 19 以下、17 以下、15 以下であった。なお、中和抗体価 14 以下は陰性と判断され、この値を上回る数値（例えば 15 以下）は、非常に低い血清中和及び中和抗体の存在を示している。

表 28-2: HI 抗体価測定結果(倍) (別添資料 28、p25、Table6)

群	個体	接種後日数／HI 抗体価(倍)														
		0 ワクチン接種			3 攻撃			6			10 (対照群は 8 又は 9)			17 (母犬は 12)		
		2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c
接種群	母犬 I	<8	<8	<8				<8	<8	<8	<8	<8	<8	6144	1152	1664
	5963	8 ^a	<8	16 ^a	288	208	288	>26,624	>26,624	40,960 ^b	>40,960	>36,864	>40,960	>28,672	13,312	36,864
	6286	8 ^a	8 ^a	16 ^a	144	144	144	40,960 ^b	40,960 ^b	40,960 ^b	>40,960	>40,960	>40,960	>36,864	18,432	>40,960
	6914	<8	<8	8 ^a	288	208	224	18,432	18,432	26,624	28,672	18,432	18,432	18,432	9216	13,312
	1077	<8	<8	<8	288	288	288	>26,624	>26,624	40,960 ^b	>40,960	26,624	>40,960	36,864	14,336	26,624
	1611	<8	<8	<8	144	104	144	>26,624	26,624	40,960 ^b	>40,960	28,672	>40,960	>28,672	9216	18,432
	5583	<8	<8	8 ^a	288	288	288	>26,624	36,864	40,960 ^b	>40,960	>36,864	>40,960	>36,864	18,432	18,432
	6946	<8	<8	<8	208	256 ^b	288	>26,624	36,864	>36,864	>36,864	>36,864	>40,960	>36,864	18,432	26,624
対照群	母犬 II	<8	<8	<8				<8	<8	<8	<8	<8	<8			
	6937	<8	<8	<8				<8	<8	<8	6656	6656	9216			
	2134	<8	<8	<8				<8	<8	<8	9216	9216	9216			
	6412	<8	<8	<8				<8	<8	<8	4608	4608	4608			
	7286	<8	<8	16 ^a				<8	<8	<8	6656	9216	9216			
	6013	<8	<8	16 ^a				<8	<8	<8	3328	4608	4608			

血清干渉が認められない限り、HI 抗体価 8 倍未満を抗体陰性とした。
a: HI プレート最初の 1 又は 2 個のウェルに血清干渉がみられた。このような現象は、低希釈の仔犬の血清を測定する際には珍しいことではなく、当該個体は CPV 抗体陰性と判断された。
B: 2 試料の血清希釈でなく 1 試料
母犬 I: 個体 ID HIG-1609、ワクチン非接種
母犬 II: 個体 ID 8692、ワクチン非接種

表 28-3: 中和抗体価測定結果(倍) (別添資料 28、p26、Table7)

		接種後日数／中和抗体価(倍)								
		3 攻撃			6			10 (対照群は 8 又は 9)		
		2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c
接種群	母犬 I				≤14	≤14	≤14	≤14	≤14	≤14
	5963	≤20	≤15	≤14	15,020	9051	8300	36,204	21,527	43,632
	6286	<20	<20	≤16	10,159	4525	4525	60,081	37,807	37,807
	6914	<20	≤16	≤14	16,127	6400	10,973	18,102	9051	21,816
	1077	≤14	23	≤16	18,102	6400	15,020	36,204	36,204	41,587
	1611	≤16	≤14	≤14	10,159	5080	15,020	60,081	25,600	32,254
	5583	28	≤14	≤14	4525	3805	6400	51,200	32,254	30,444
	6946	≤15	≤16	≤14	15,020	7510	10,908	36,204	30,041	25,600
対照群	母犬 II							≤14	≤14	≤14
	6937							2016	2263	2691
	2134							1300	2016	2727
	6412							400	566	2016
	7286							3592	2599	5198
	6013							1270	1600	1270

中和抗体価 14 以下は陰性と判断され、この値を上回る数値（例えば 15 以下）は、非常に低い血清中和及び中和抗体の存在を示している。
母犬 I: 個体 ID HIG-1609、ワクチン非接種
母犬 II: 個体 ID 8692、ワクチン非接種

直腸スワブにおける CPV 分離結果を表 28-4 に示した。ワクチン投与群においてウイルスは直腸スワブから、投与後 2～6 日目に検出された。攻撃対照群においては、攻撃株が攻撃後 3～6 日目に検出された。対照群の全ての個体で、8～9 日目（安楽殺を実施した日）に高レベルの排泄がみられた。

ワクチン投与群の排泄フェーズの終わりは、攻撃対照群の排泄始まりの時期とオーバーラップしていたため、排泄されたウイルスが CPV630a 株であるか、攻撃株であるかを区別するためディフィレンシャル PCR を実施した。この結果、オーバーラップしていた試験 6 日目（攻撃後 3 日目）にウイルス投与群から排

資料2. 審査データの概要

泄されたウイルスは、攻撃株でなくワクチン株 CPV 630a であることが確認された。したがって、ワクチン投与群において、攻撃株の排泄はみられなかった。これは、攻撃 3 日前のワクチン投与が感染防御 (Sterilizing immunity) を惹起し、野外株の排泄を防いだことを示すものである。

表 28-4: 直腸スワブにおける CPV 分離結果 (別添資料 28、p28、Table10)

群	個体 ID	試験日／ウイルス含有量																
		-1	0 V	1	2	3 C	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
接種群	母犬Ⅰ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.49	≥3.84	≥3.84	≥3.84	E		
	5963	-	-	-	≤2.1	≤2.1	≤2.45	2.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5583	-	-	-	1.75	2.45	≤2.1	≤2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6286	-	-	-	-	-	-	≤2.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6946	-	-	-	-	2.80	2.45	2.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6914	-	-	-	-	2.45	3.49	2.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1077	-	-	-	-	2.10	2.80	2.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1611	-	-	-	≤2.1	≤2.45	3.15	3.84	2.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-
対照群	母犬Ⅱ	-	-	-	-	-	-	-	-	<3.49	5.24	4.19	E					
	6937	-	-	-	-	-	-	-	3.15	6.29	≥6.64	≥6.64	E					
	2134	-	-	-	-	-	-	-	2.1	≥6.64	≥6.64	≥6.64						
	6412	-	-	-	-	-	-	-	3.84	≥6.64	≥6.64	≥6.64						
	7286	-	-	-	-	-	-	-	-	≥6.64	≥6.64	≥6.64						
	6013	-	-	-	-	-	-	-	2.45	≥6.64	≥6.64	E						

-: 直腸スワブにおいて CPV 陰性

+: 直腸スワブにおいて CPV 陽性

V: ワクチン接種日

C: 攻撃日

E: 安楽死されたため、測定せず。

母犬 I: 個体 ID HIG-1609、ワクチン非接種

母犬 II: 個体 ID 8692、ワクチン非接種

3. 結論

4 週齢の犬への Nobivac Puppy DP PLUS 1 用量の投与は、ワクチン投与後 3 日目の野外株攻撃において、犬パルボウイルス感染症の典型的な症状、白血球減少症及び野外株のウイルス排泄を防ぐのに有効であることが示された。

資料2. 審査データの概要

別添資料 29 移行抗体を有する 4 週齢の犬における Nobivac Puppy DP PLUS ワクチンの犬パルボウイルスに対する有効性評価 (PDP-E/0084/17: Efficacy of the CPV 630a strain in 4 week old pups with maternally derived antibody)

要約

1. 試験設計

4 週齢の犬 16 頭を 2 群に割り当て、第 1 群は 11 頭、第 2 群は 5 頭とした。全ての仔犬は、通常通りワクチン接種した母犬から生まれ、CPV に対して中～高レベルの移行抗体を有しており、野外の状況を反映しているものであった。仔犬は試験前にスクリーニングされ、両群において均等になるよう、予測移行抗体レベルを基に群分けされた。全ての仔犬は、ワクチン投与前に犬パルボウイルス検出において陰性であった。

第 1 群に、最小ウイルス力価となるように調製した Nobivac Puppy DP PLUS 1 用量を投与した。第 2 群はワクチン投与せず、移行抗体の減衰を確認するための対照群とした。

2. 結果

ワクチン投与日において、第 1 群の HI 抗体価は 288～1664 倍、中和抗体価は 806～4542 倍であった。対照群においてはそれぞれ、HI 抗体価 288～832 倍、中和抗体価 640～4032 倍であった。1 週間に 2 回採血し、抗体価測定した。血清サンプルは、現在野外に存在する CPV 亜型 3 つすべてに対する HI 抗体価及び中和抗体価を測定した。

第 1 群の全ての犬は、対照群において移行抗体が消失する前に抗体陽転した。

表 29-1: HI 抗体価測定結果 (別添資料 29、p17-20、Table3 より試験日-8、0、25、52 日目の結果を抜粋)

群	個体 ID	試験日／HI 抗体価(倍)													
		-8		0			11			25			52		
		2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c
接種群	8732	640	1280	576	576	832	416	288	416	104	144	144	7168	9216	18,432
	8995	832	576	288	288	288	208	208	288	18,432	18,432	18,432	9216	9216	14,336
	9019	1152	1152	288	288	288	288	208	288	9216	9216	9216	4608	9216	9216
	8651	1152	576	288	288	416	4608	6656	9216	6656	9216	9216	9216	13,312	18,432
	8580	1152	1152	416	416	416	3328	4608	6656	†					
	9030	1152	1152	288	288	416	288	416	416	18,432	18,432	18,432	9216	9216	9216
	8584	1664	1152	416	416	416	3328	3328	6656	4608	9216	9216	9216	9216	9216
	9002	2304	1664	576	832	832	576	288	576	144	208	208	9216	9216	18,432
	8998	2304	1664	832	832	576	576	576	832	4608	6656	9216	4608	6656	9216
	8635	2304	2304	1152	1152	832	576	576	576	208	224	208	13,312	13,312	18,432
	8755	3584	2304	1152	1152	1664	576	576	832	208	144	208	9216	8192	13,312
対照群	9033	832	576	208	288	288	208	144	208	36	52	52	<8	<8	<8
	9024	1152	1152	416	288	416	288	288	288	72	144	104	14	18	18
	8747	2304	1664	832	832	832	576	416	576	144	144	144	26	36	26
	8582	2304	2304	832	832	832	832	576	576	144	208	144	36	36	36
	8751	3328	1664	832	576	832	576	416	416	144	144	144	18	18	18

†: ワクチンとは関連しない理由により、安楽死処置を行った。

網掛け: 血清抗体陽転、又は、ワクチンへの抗体反応開始

NS: 血清試料不十分

資料2. 審査データの概要

表 29-2: 中和抗体価測定結果(別添資料 29、p21-24、Table3 より試験日-8、0、25、52 日目の結果を抜粋)

群	個体 ID	試験日／中和抗体価(倍)													
		-8		0			11			25			52		
		2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c	2a	2b	2c
接種群	8732	640	1280	576	576	832	640	1016	905	403	254	226	36,204	25,600	64,508
	8995	832	576	288	288	288	376	905	320	36,204	36,204	51200	64,508	36,204	64,508
	9019	1152	1152	288	288	288	453	806	508	18,102	21,816	21816	36,204	36,204	40,637
	8651	1152	576	288	288	416	3805	1878	4755	NS	NS	NS	72,408	64,508	102,400
	8580	1152	1152	416	416	416	1903	9051	2263	†					
	9030	1152	1152	288	288	416	453	640	254	≥129,016	≥129,016	102400	40,637	30,444	64,508
	8584	1664	1152	416	416	416	2263	6400	2263	18,102	32254	21,816	40,637	57,470	64,508
	9002	2304	1664	576	832	832	905	1613	1280	806	320	508	10,908	10,159	10,159
	8998	2304	1664	832	832	576	320	202	403	32,254	20319	25,600	25,600	20,319	32,254
	8635	2304	2304	1152	1152	832	800	2263	1131	806	508	453	36,204	14,368	28,735
	8755	3584	2304	1152	1152	1664	1181	3200	1600	453	320	453	9051	3200	14,368
対照群	9033	832	576	208	288	288	202	751	226	101	32	80	≤14	≤14	≤16
	9024	1152	1152	416	288	416	453	905	453	202	101	226	28	28	32
	8747	2304	1664	832	832	832	640	1810	1280	453	160	453	80	28	50
	8582	2304	2304	832	832	832	686	2540	1131	806	376	453	101	57	113
	8751	3328	1664	832	576	832	1810	1613	1280	403	254	320	40	28	40

†: ワクチンとは関連しない理由により、安楽死処置を行った。

網掛け: 血清抗体陽転、又は、ワクチンへの抗体反応開始

NS: 血清試料不十分

3. 結論

Nobivac Puppy DP PLUS 1 用量の投与は、4 週齢の仔犬に認められた全てのレベルの移行抗体下においても、その影響を受けることなく免疫反応を惹起できることが示された。

資料2. 審査データの概要

別添資料 30 猫における CPV 630a 株ワクチンの安全性試験 (CAP-E-0040-13 : Safety of the administration of CPV strain 630a vaccine in cats)

要約

1. 試験設計

本試験は、以下の目的を評価するため実施された。

- 1) 誤って猫にワクチン接種した場合の潜在的リスク
- 2) ウイルスがワクチン非接種の猫へ拡散するかどうかの評価

11-12 週齢の SPF 猫（イエネコ）15 頭を 2 群に割り当てた。第 1 群（ワクチン接種群）は 10 頭、第 2 群（非ワクチン接種群）は 5 頭とし、両群は同居させた。

第 1 群の猫に CPV630a 株ワクチン 1 バイアル中 $10^{7.2}$ TCID₅₀ を 1 バイアルを皮下接種し、1 バイアルを経口・鼻接種した。ワクチン接種後 21 日間、臨床観察、体温及び体重測定を毎日実施した。白血球数を -4, -2, -1, 0, 4, 6, 8 及び 10 日目に測定した。また、抗体価測定し、直腸スワブは 1～14、17 及び 21 日目に採取し、ウイルス含有量測定に供試した。

2. 結果

ワクチンを接種した全頭の猫において、高いレベルでの抗 CPV 抗体上昇がみられた。また、同居群のうち 5 頭中 3 頭において、試験終了までに抗体陽転した。

1 群では、10 頭中 6 頭でウイルスの排泄が主にワクチン接種後 3～5 日目に認められた。2 群（同居群）では 5 頭中 1 頭で、11 日目に CPV の排泄がみられた（表 30-1）。これは本遺伝子組換え微生物が環境中に排泄された場合、非ワクチン接種猫に拡散する可能性を示している。これは、ワクチン非接種の同居猫 5 頭中 3 頭で抗体陽転したことから確認した。

表 30-1: 直腸スワブのウイルス分離結果 (別添資料 22、p17、表 3)

個体番号	群	試験日 (接種後日数)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	21
35992	1	【社外秘につき非開示】															
36060	1																
36135	1																
36137	1																
36372	1																
36380	1																
36414	1																
36415	1																
36416	1																
36467	1																
35971	2																
36210	2																

資料2. 審査データの概要

36356	2
36490	2
36365	2

-: ウイルス分離陰性、+: ウイルス分離陽性

総白血球数は試験中数回測定された。50%以上の白血球数減少を「有意な白血球減少」と判断した。白血球数の一時的な降下は第1群のほとんどの猫で見られたが、短期的なものであり、試験6日目及びそれ以降には回復した。第1群において、3頭のみ顕著な白血球数減少がみられた。また、第1群の1頭で、接種後に白血球数上昇がみられ、第2群において同居群の白血球数はかなり安定していた（表30-2）。

表 30-2: 総白血球数における基礎平均値の割合(別添資料 30、p19、Table 5)

個体番号	群	基礎平均値 ¹	基礎平均値に対する割合(%) ²			
			4日目	6日目	8日目	10日目
35992	1	【社外秘につき非開示】				
36060	1					
36135	1					
36137	1					
36372	1					
36380	1					
36414	1					
36415	1					
36416	1					
36467	1					
35971	2					
36210	2					
36356	2					
36490	2					
36365	2					

1) -4、-2、-1 及び 0 日目のカウント数を用いて、各個体の基礎値の平均値を算出した。

2) 各日の各個体の総白血球数をその個体の基礎平均値と比較し、基礎平均値に対する割合(%)である。基礎平均値の50%未満に低下した総白血球数を太字の下線で示す。

3. 結論

本遺伝子組換え微生物の猫への接種において、軽度で短期間のリンパ球減少以外に臨床症状は認められなかった。本遺伝子組換え微生物の猫への接種により環境中にウイルスは排泄され、非ワクチン接種猫にも拡散しうると考えられた。

資料2. 審査データの概要

別添資料 31 フェレットにおける CPV 630a 株の安全性試験 (PDP-E/0075/17: Study to Investigate the Safety of CPV Strain 630a in Ferrets)

要約

1. 試験設計

本試験では、CPV 630a 株の幼若フェレットにおける安全性、体内分布及び外部への拡散について評価した。

フェレットにおける安全性は、接種後フェレットの臨床状態を観察することにより評価した。

フェレットから環境中へのワクチンウイルスの排泄及び、接触動物への拡散の可能性について、血清学的反応及び、接種群及び同居群フェレットの血液、糞便、及び組織からのウイルス検出が試験された。

雌雄混合フェレット 15 匹 (12 週齢) を 8 匹の接種群 (第 1 群)、2 匹の同居群 (第 2 群)、及び対照血清及び組織試料の供試のための 5 匹の無処置対照群 (第 3 群) に割り当てた。

第 1 群及び第 2 群のフェレットは試験期間を通じて同居させた。

第 1 群には、高用量の CPV 株 630a を 2 回接種 ($10^{6.8}$ TCID₅₀ の経口接種及び $10^{6.8}$ TCID₅₀ の皮下接種) した。第 2 群は非接種同居群とした。

全ての個体について試験期間を通じて、一般状態を毎日評価した。

ウイルスの体内分布及び排泄を評価するため、第 1 群のフェレット 2 匹を接種 7 日後に安楽死し、さらに第 1 群のフェレット 2 匹を接種 14 日後に安楽死した。第 1 群の残りの接種個体及び同居個体は 21 日目に安楽死した。

安楽死の日に、血清学的分析及びウイルス分離のために血液を採取し、ウイルス分離及び抗体検出のために胸腺、脾臓、小腸、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、扁桃、肝臓、心臓及び糞便を採取した。

2. 結果

高用量の CPV 630a 株を投与によって、局所又は全身の有害な臨床反応は認められなかった。フェレットの健康状態は、試験期間を通して良好であった。

試験開始時に、すべてのフェレットで抗 CPV2 抗体価は陰性であった。接種後、第 1 群のフェレットは試験 7～14 日目に CPV に対する頑健な抗体反応を示したが、21 日までに低下した。同居させた第 2 群のフェレットは抗体陰性のままであった。

表 31-1: 抗 CPV2 抗体価測定結果 (別添資料 31、p39、表 1)

群	個体番号	HI 抗体価 (倍)			
		0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
1	0983	【社外秘につき非開示】			
	4174				
	4569				
	6708				
	1306				
	4535				
	8097				
	2489				
2	5326				
	2823				

資料2. 審査データの概要

3	2367
	3150
	3358
	4993
	8796

グレー: 採血していないことを示す。

†: 安楽死

CPV 630a 株は、第 1、2 及び 3 群の全個体において血清、糞便又は組織試料のいずれから分離することができなかった。

表 31-2: 糞便ホモジネートにおける CPV ウイルス含有量(log10 TCID₅₀/ml) (別添資料 31、p19、Table 3)

試料	スパイク有無	第 1 群			第 2 群	第 3 群
		7 日目 (n=2)	14 日目 (n=2)	21 日目 (n=4)	21 日目 (n=2)	0 日目 (n=5)
10%糞便 ホモジネート	-	【社外秘につき非開示】				
	+					
スパイク済み PBS	+					

1: 二重測定のうち 1 回: 10⁻¹ 希釈の 10 ウェル全てにおいて細胞毒性がみられた。

2: 二重測定のうち両方: 10⁻¹ 希釈の 10 ウェル全てにおいて細胞毒性がみられた。

3: 二重測定のうち 1 回: 10⁻¹ 希釈の 5 ウェルにおいて細胞毒性がみられた。

太字: ウイルス特異蛍光陽性

1.20 log₁₀ TCID₅₀/ml 以下を CPV 陰性とした。

すべての非スパイク試料を 2 回測定した。1 回目はグループ 3 のスパイク試料のみと同時に、2 回目はすべての試料にスパイクすることを決定した後に、グループ 1、2 及び 3 のスパイク試料と同時に測定した。

非スパイクの第 3 群試料を用いた 1 回目の測定結果は、2 回目の測定結果よりも低い細胞毒性を示した。このため、陰性の閾値は 1 回目測定の方が低かったため、これを本サンプルの最終結果とみなす。

第 1、2 及び 3 群の全ての脾臓ホモジネートで顕著な細胞毒性が認められ、ウイルスを分離することができなかった。また、第 1 群の組織サンプルの多くでは、パルボウイルス株 630a をスパイクした組織ホモジネートの複製(対照試料)からも CPV を回収することができなかった。組織ホモジネートの血清学的分析では、第 1 群の試料中に低レベルの抗体が存在することが示され、これがウイルスを中和したと考えられる。したがって、接種したフェレットの組織サンプルにワクチンウイルスが全く存在しなかったと断定することはできないが、存在していたとしても検出限界未満であったか、あるいは細胞毒性成分の存在またはウイルスを不活化し複製不能にする中和抗体反応のために分離できなかった。

3. 結論

本試験において、高用量の CPV 株 630a がフェレットにおいて臨床的に安全であることが示された。ワクチンウイルスは、接種又は接触動物の血液、糞便、又は組織から分離できなかったことから、環境中への排泄、又は他のフェレットへの伝播が起らないことが示された。

資料2. 審査データの概要

別添資料 32 マウスにおける CPV 630a 株の安全性及び拡散評価試験(19R/0140:Study to investigate the safety and spread of CPV strain 630a in the non-target species mice after oral administration)

要約

1. 試験設計

本試験では、CPV 630a 株のマウスにおける安全性及び拡散について評価した。

安全性については、接種後の臨床状態を観察することにより評価した。

マウスから環境中へのワクチンウイルスの排泄及び、接触動物への拡散の可能性について、血清学的反応及び、接種群及び同居群マウスの血清及び糞便からのウイルス検出により評価された。

29～33 日齢マウス 60 匹を 4 群に分けた。

18 匹を接種群(第 1 群)、18 匹を同居群(第 2 群)、18 匹を培地投与群ならびに処置前の対照試料の供試のための 6 匹を無処置対照群(第 4 群)とした。第 1 群及び第 2 群のマウスは試験期間を通じて同居させた。第 1 群には、CPV 株 630a を $10^{6.5}$ TCID₅₀ を経口接種し、第 2 群は非接種同居群とした。第 3 群は、ウイルスを含まない培地のみを経口投与した。第 4 群は、無処置対照として試験開始時に安楽殺し、対照試料として全採血及び糞便試料を採取した(表 32-1)。

表 32-1: 試験設計(別添資料 32、p10、Table1)

群	n 数	接種試料	採血及び糞便採取(n 数)				
		0 日目	0 日目	7 日目	14 日目	21 日目	
1(接種群)	18	CPV630a 株	-	6	6	6	
2(同居群)	18	-	-	6	6	6	
3(培地投与群)	18	培地	-	6	6	6	
4(無処置対照)	6	-	全個体	-	-	-	

第 1 群 3 匹と第 2 群 3 匹ずつをケージで同居させた。第 3、4 群は、6 匹ごとケージに割り当てた。

全ての個体について 21 日目までの試験期間を通じて、一般状態を毎日評価した。

ウイルスの体内分布及び排泄を評価するため、接種 7、14 及び 21 日後に採血し、糞便を 1～3 群各 6 匹ずつから採取し、CPV の有無を検査した。

2. 結果

全群のいずれのマウスにおいても、CPV に関連する臨床症状はみられなかった。

試験 0 日目に採取した第 4 群の対照マウスの血清、及びその他のすべての採取時点で採取した第 1～3 群の血清は、HI 法で抗体陽性であった。しかし、同じ血清試料を血清中和 (SN) 法で検査したところ、試験 21 日目の第 1 群の試料を除く全ての試料で CPV 特異的中和抗体は陰性であった。第 1 群の試験 21 日目の血清試料では、低レベルの中和抗体反応が検出された(表 32-2)。これらの結果から、HI 法で検出された抗体産生は、CPV 抗原との非中和性の交差反応であることが示唆された。第 4 群の対照マウスで SN 法により中和抗体反応が認められなかったことから、試験開始前にマウスが CPV に接触していなかったことが示唆される。第 1 群のマウスでは、接種 21 日後に CPV 630a に対する低レベルの血清学的反応が認められたが、これは異常なことではない。

資料2. 審査データの概要

表 32-2: CPV に対する血清中和抗体価 (別添資料 32、p20、Table5)

接種	群	CPV-2c に対する中和抗体価 (倍) ¹⁾			
		0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
CPV630a 株	1	-	≤14	≤14	32
-	2	-	≤14	≤14	≤14
培地	3	-	≤14	≤14	≤14
-	4	≤14	-	-	-

1) 中和抗体価 14 以下は抗体陰性と判断した。
陽性対照の中和抗体価は 25600 であり、陰性対照は 14 以下であった。

血清中 CPV 検出では、いずれの群及び時点においても、CPV スパイク試料及び非スパイク試料からも CPV は分離されなかった。CPV に対する中和抗体は血清中に検出されなかったことから、スパイクしたウイルスを回収できなかったのは、マトリックスの干渉によるものと考えられた。

表 32-3: 糞便試料からのウイルス分離 (別添資料 32、p21、Table7)

接種	群	スパイク 有無	平均 CPV ウイルス含有量 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) ¹⁾			
			0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
CPV630a 株	1	-	-	≤1.20	≤1.20	≤1.20
		+	-	3.24	3.23	3.27
-	2	-	-	≤1.20	≤1.20	≤1.20
		+	-	3.06	3.19	3.20
培地	3	-	-	≤1.20	≤1.20	≤1.20
		+	-	2.87	3.26	3.20
-	4	-	≤1.20	-	-	-
		+	3.05	-	-	-

1) 1.20 以下を PCV 陰性と判断した。
太字: ウイルス特異抗体陽性

糞便中 CPV 検出では、非スパイク試料において、いずれの群及び時点においても CPV は検出されなかった。スパイクした各糞便試料から CPV が分離され、試験の妥当性が示された。第 2 群のマウスは第 1 群の投与マウスと同居していたことから、これらの結果は、CPV 630a 株が経口暴露マウスから接触対照に伝播しないことを示している (表 32-3)。

3. 結論

結論として、マウスへの CPV 株 630a の曝露は臨床的に安全である。接種マウス又は同居マウスのいずれからもウイルスは分離されなかった。このことから、本遺伝子組換え微生物に経口曝露されたマウスは、この株を環境中に排泄したり、他のマウスに伝播したりすることはないことが示唆された。

資料2. 審査データの概要

別添資料 33 鶏における CPV 630a 株の安全性及び拡散評価試験(19R/0139:Study to investigate the safety and spread of CPV strain 630a after oral administration to the non-target species chicken)

要約

1. 試験設計

本試験では、CPV 630a 株の鶏における安全性及び拡散について評価した。

安全性については、接種後の臨床状態を観察することにより評価した。

鶏から環境中へのワクチンウイルスの排泄及び、接触動物への拡散の可能性について、血清学的反応及び、接種及び同居鶏の血清及び糞便からのウイルス検出により評価した。

1 週齢の鶏 60 羽を次のように 4 群に割り当てた。18 羽を接種群(第 1 群)、18 羽を同居群(第 2 群)、18 羽を培地投与群ならびに処置前の対照試料の供試のための 6 羽を無処置対照群(第 4 群)とした。第 1 群及び第 2 群の鶏は試験期間を通じて同居させた。第 1 群には、CPV 株 630a を $10^{6.5}$ TCID₅₀ を経口接種し、第 2 群は非接種同居群とした。第 3 群は、ウイルスを含まない培地のみを経口投与した。第 4 群は、無処置対照として試験開始時に安楽殺し、対照試料として全採血及び糞便試料を採取した(表 33-1)。

表 33-1: 試験設計(別添資料 33、p10、Table1)

群	n 数	接種試料	採血及び糞便採取(n 数)			
		0 日目	0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
1(接種群)	18	CPV630a 株	-	6	6	6
2(同居群)	18	-	-	6	6	6
3(培地投与群)	18	培地	-	6	6 (5*)	6
4(無処置対照)	6	-	全個体	-	-	-

第 1 群 3 匹と第 2 群 3 羽ずつをケージで同居させた。第 3、4 群は、6 匹ごとケージに割り当てた。

*鶏番号 989(第 3 群)の 1 羽において、純化期間中の試験日-1 日目に動物愛護上の理由で安楽殺した。(異常を呈した後の剖検の結果、卵黄嚢における炎症が認められた。)

2. 結果

全群のいずれの鶏においても、CPV に関連する臨床症状はみられなかった。

試験開始時に、第 4 群の全ての鶏は血清抗体及び糞便からの CPV 検査で CPV 陰性であった。

表 33-2: CPV に対する血清 HI 抗体価(別添資料 33、p20、Table5)

接種	群	平均 HI 抗体価 ¹⁾ (倍)			
		0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
CPV630a 株	1	-	36	72	288
-	2	-	<8	<8	<8
培地	3	-	<8	<8	<8
-	4	<8	-	-	-

1) HI 抗体価 8 倍未満は抗体陰性と判断した。

接種後、第 1 群において血清抗体陽転となったが、第 2、3 群においては全ての時点で血清抗体陰性であった。CPV は、いずれの群のいずれの鶏においても血清又は糞便から検出されなかった。

資料2. 審査データの概要

(表 33-2 及び 33-3)。第 2 群は第 1 群と同居させていたので、この結果は CPV 630a 株は経口曝露された個体から感受性のある接触個体へ伝播しないことを示すものである。

表 33-3: 糞便試料からのウイルス分離(別添資料 33、p20、Table5)

接種	群	スパイク 有無	平均 CPV ウイルス含有量(log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) ¹			
			0 日目	7 日目	14 日目	21 日目
CPV630a 株	1	-	-	≤1.20	≤1.20	≤1.20
		+	-	≤1.26	≤1.20	≤1.20
-	2	-	-	≤1.20	≤1.20	≤1.20
		+	-	3.19	2.93	2.99
培地	3	-	-	≤1.20	≤1.20	≤1.20
		+	-	3.14	3.10	3.06
-	4	-	≤1.20	-	-	-
		+	3.13	-	-	-

1) 1.20 以下を PCV 陰性と判断した。

太字: ウイルス特異抗体陽性

3. 結論

結論として、鶏への CPV 株 630a の曝露は臨床的に安全である。接種鶏又は同居鶏のいずれからもウイルスは分離されなかった。このことから、本遺伝子組換え微生物に経口曝露された鶏は、この株を環境中に排泄したり、他の鶏に伝播したりすることはないことが示唆された。

資料2. 審査データの概要

別添資料 34 参考:国内における犬パルボウイルス生ワクチン使用の状況

1. 国内における承認状況

以下は現在国内で承認・販売されている犬パルボウイルス株を含むワクチンであり、全ての添付文書に排泄に関し次のような記載がある。「ワクチン注射後、(犬パルボウイルスについては)一過性のウイルス排泄が認められるが、ワクチンウイルスの安全性については確認されている。」

動物医薬品検査所 動物用医薬品等データベース調べ (2024 年 11 月時点)

品名	製造販売業者
犬用ビルバゲン DA2PPi	株式会社 ビルバックジャパン
犬用ビルバゲン DA2PPi/L	株式会社 ビルバックジャパン
ノビバック DHPPi	MSD アニマルヘルス株式会社
ノビバック DHPPi+L	MSD アニマルヘルス株式会社
ノビバック PUPPY DP	MSD アニマルヘルス株式会社
バンガード プラス CPV	ゾエティス・ジャパン株式会社
バンガード プラス 5	ゾエティス・ジャパン株式会社
バンガード プラス 5/CV	ゾエティス・ジャパン株式会社
バンガード プラス 5/CV-L	ゾエティス・ジャパン株式会社
バンガード プラス 5/CV-L4	ゾエティス・ジャパン株式会社
ユーリカン 5	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
ユーリカン 7	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

上記以外で過去に製造販売承認されていた犬パルボウイルス株を含むワクチン (一部) の動物用医薬品等部会議事録

デュラミューン MX 5、デュラミューン MX 6、デュラミューン MX 8

https://www.maff.go.jp/nval/syonin_sinsa/gijiroku/pdf/h200227.pdf

“京都微研,, キャナインー11

https://www.maff.go.jp/nval/syonin_sinsa/gijiroku/pdf/240911iyakuhinbukai.pdf

2. 文献検索

野生動物での病原性に関する報告を調べるため、以下の文献検索を行った。

- 検索エンジン: J-stage (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/-char/ja>)
キーワード: 犬パルボウイルス ワクチン 野生動物 病原性
- 検索エンジン: Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)
キーワード: CPV vaccine wild animal virulence

資料2. 審査データの概要

別添資料 35 Nobivac DP Plus の欧州医薬品局評価書 (CVMP assessment report for Nobivac DP Plus (EMA/V/C/005251/0000))

(表紙)

資料2. 審査データの概要



EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

22 October 2020
EMA/565735/2020
Veterinary Medicines Division

Committee for Medicinal Products for Veterinary Use

CVMP assessment report for Nobivac DP Plus (EMA/V/C/005251/0000)

Vaccine common name: Canine distemper vaccine (live, attenuated) and canine parvovirus vaccine (live, recombinant)

Assessment report as adopted by the CVMP with all information of a commercially confidential nature deleted.



資料2. 審査データの概要

Introduction.....	4
Scientific advice.....	4
MUMS/limited market status	5
Part 1 - Administrative particulars	5
Detailed description of the pharmacovigilance system	5
Manufacturing authorisations and inspection status.....	5
Overall conclusions on administrative particulars	5
Part 2 – Quality	6
Chemical, pharmaceutical and biological/microbiological information (quality)	6
Qualitative and quantitative particulars of the constituents	6
Qualitative and quantitative particulars	6
Container and closure	6
Product development	6
Description of the manufacturing method	7
Production and control of starting materials	8
Starting materials listed in pharmacopoeias	8
Specific materials not listed in a pharmacopoeia	8
Starting materials of biological origin	8
Starting materials of non-biological origin	9
In-house preparation of media and solutions consisting of several components	9
Specific measures concerning the prevention of the transmission of animal spongiform encephalopathies.....	10
Control tests during the manufacturing process.....	10
Control tests on the finished product.....	10
Batch-to-batch consistency	11
Stability.....	11
Overall conclusions on quality	12
Part 3 – Safety	14
Introduction and general requirements.....	14
Safety documentation	14
Laboratory tests	15
Safety of the administration of one dose and an overdose	15
Safety of one administration of an overdose.....	16
Safety of the repeated administration of one dose	17
Examination of reproductive performance	18
Examination of immunological functions	18
Special requirements for live vaccines	18
Spread of the vaccine strain.....	18
Dissemination in the vaccinated animal	18
Reversion to virulence of attenuated vaccines	20
Biological properties of the vaccine strain	21
Recombination or genomic reassortment of the strains.....	21
User safety	22

資料2. 審査データの概要

Study of residues.....	22
Interactions	22
Field studies.....	23
Environmental risk assessment	24
Environmental risk assessment for products containing or consisting of genetically modified organisms.....	25
Overall conclusions on the safety documentation	25
Part 4 – Efficacy	27
Introduction and general requirements.....	27
Challenge model:	27
Efficacy parameters and tests:	28
Efficacy documentation	28
Laboratory trials.....	29
Dose determination.....	29
Onset of immunity	30
Duration of immunity	32
Maternally derived antibodies (MDA)	34
Interactions	36
Field trials.....	36
Overall conclusion on efficacy.....	37
Part 5 – Benefit-risk assessment	38
Introduction.....	38
Benefit assessment.....	38
Direct therapeutic benefit	38
Additional benefits	39
Risk assessment.....	39
Risk management or mitigation measures	40
Evaluation of the benefit-risk balance.....	40
Conclusion	40

資料2. 審査データの概要

Introduction

The applicant Intervet International B.V. submitted on 31 October 2019 an application for a marketing authorisation to the European Medicines Agency (the Agency) for Nobivac DP Plus, through the centralised procedure under Article 3(1) of Regulation (EC) No 726/2004 (mandatory scope).

On 7 October 2020, the CVMP adopted an opinion and CVMP assessment report.

The eligibility to the centralised procedure was agreed upon by the CVMP on 6 December 2018 as Nobivac DP Plus has been developed by recombinant DNA technology.

The applicant applied for the following indication which is considered appropriate by CVMP: For the active immunisation of puppies from 4 weeks of age onwards to prevent clinical signs and mortality of canine distemper virus (CDV) infection and canine parvovirus (CPV) infection and to prevent viral excretion following canine distemper virus infection and following canine parvovirus infection.

Onset of immunity: for canine distemper virus: 7 days;
for canine parvovirus: 3 days.

Duration of immunity: 8 weeks.

The active substances of Nobivac DP Plus are canine distemper virus (live, attenuated) and canine parvovirus (live recombinant), to provide early protection against CDV and CPV and the immunity against CPV is achieved in animals of 4 weeks of age with levels of maternal antibodies in the highest range present at this age. The target species are dogs (puppies). The product is intended for administration by the subcutaneous route.

Furthermore, the CVMP considers that the live recombinant canine parvovirus strain 630a is a new active substance, as claimed by Intervet International B.V.

Nobivac DP Plus, lyophilisate and solvent for suspension for injection contains $10^{5.1} - 10^{6.5}$ TCID₅₀/dose canine distemper virus strain Onderstepoort and $10^{5.1} - 10^{6.7}$ TCID₅₀/dose canine parvovirus strain 630a (live recombinant) and is presented in packs containing:

- 5 x 1 dose vial of vaccine and 5 vials containing 1 ml of solvent
- 25 x 1 dose vial of vaccine and 25 vials containing 1 ml of solvent

The rapporteur appointed is Esther Werner and the co-rapporteur is Frida Hasslung Wikström.

The dossier has been submitted in line with the requirements for submissions under Article 12(3) of Directive 2001/82/EC – full application.

Scientific advice

The applicant requested scientific advice from the CVMP on 14 October 2016 and it was provided on 16 February 2017 (EMA/CVMP/SAWP/724500/2016). The scientific advice pertained to the quality and the safety part of the dossier.

The questions discussed in the advice concerned a new reversion to virulence study for the CDV strain, whether the plasmid preparation would be considered as a chemical starting material, and the extraneous agents and mycoplasma testing of the plasmid preparation.

It was concluded that a new study on reversion to virulence is not necessary. However, a respective justification and risk assessment was requested. This is provided in Part 3 of the dossier.

Testing of the plasmid preparation for extraneous agents and mycoplasma was also considered dispensable provided a satisfactory risk assessment is available. The document is provided in Part 2.

資料2. 審査データの概要

The company's answers on the questions regarding the plasmid as a starting material were satisfactory.

MUMS/limited market status

Not applicable.

Part 1 - Administrative particulars

Detailed description of the pharmacovigilance system

A detailed description of the pharmacovigilance system (version 3.0, dated 1st July 2018) which fulfils the requirements of Directive 2001/82/EC was provided. Based on the information provided the applicant has the services of a qualified person responsible for pharmacovigilance and the necessary means for the notification of any adverse reaction occurring either in the Community or in a third country.

Manufacturing authorisations and inspection status

A number of sites are involved in the manufacture, labelling and quality control (QC) of Nobivac DP Plus and the solvent.

Production of the active substances is performed by Intervet International B.V. in Boxmeer, Netherlands.

Manufacture of finished product and primary packaging (filling and freeze-drying) was initially planned to be performed at a CMO. However, in July 2020 the production site of the CMO was sold, and manufacturing activities were being stopped with immediate effect. Due to this situation, a different FP manufacturing site is licensed for blending, filling and freeze-drying of Nobivac DP Plus. Based on available batch data, the maximum bulk size is limited until production scale data from this manufacturer are available. In addition, a post approval change management protocol to license the manufacturing site for blending, filling and freeze-drying at production scale is provided. An increase to a production scale bulk size would then be implemented by variation (B.II.b.4.f) after the product is licensed.

Batch release for the lyophilisate fraction and solvent is performed by Intervet International B.V. in Boxmeer.

Manufacturing authorisations from the respective competent authorities are provided for all production sites.

All sites have been inspected. Certificates that detail the date of the last GMP inspection are provided. Therefore, additional inspections are regarded as unnecessary.

No GMP, GLP or GCP inspection is requested in connection with this application.

Overall conclusions on administrative particulars

The detailed description of the pharmacovigilance system was considered in line with legal requirements.

The GMP status of the active substances and of the finished product manufacturing sites have been

資料2. 審査データの概要

satisfactorily established and are in line with legal requirements.

Part 2 – Quality

Chemical, pharmaceutical and biological/microbiological information (quality)

Nobivac DP Plus is a lyophilised live vaccine without any adjuvant or preservative, containing canine distemper virus (CDV) strain Onderstepoort and canine parvovirus (CPV) strain 630a.

The CDV component is a conventionally attenuated live vaccine strain while the CPV component is a genetically modified hybrid CPV strain.

The solvent used with the vaccine has the same composition as the solvent for the live freeze-dried feline, canine and lapine vaccines of the Nobivac series.

Qualitative and quantitative particulars of the constituents

Qualitative and quantitative particulars

The vaccine is presented as lyophilisate in a single dose presentation with an accompanying solvent.

The active ingredients in the vaccine are live Canine distemper virus strain Onderstepoort and live, recombinant Canine parvovirus strain 630a.

The stabiliser contains hydrolysed gelatin, pancreatic digest of casein, sorbitol and disodium phosphate dihydrate.

The solvent is a sterile phosphate buffer, containing disodium phosphate dihydrate, potassium dihydrogen phosphate and water. The vaccine is mixed with the solvent prior to subcutaneous injection into dogs (puppies). The dose volume is 1 ml.

The qualitative and quantitative particulars of the vaccine suspension and the solvent are described adequately. No adjuvant or preservative are present in the vaccine.

All necessary certificates are provided.

Container and closure

The product consists of two containers that should be mixed before use; one for the lyophilisate and one for the solvent.

The product is filled in hydrolytical class type I glass vials. The same vials are used for the freeze-dried vaccine and the solvent.

Vials are closed with rubber stoppers and aluminium caps.

The primary packaging materials for the product Nobivac DP Plus are considered compliant with the respective requirements in the Ph. Eur. and USP and their sterilisation is adequate.

Product development

An explanation and justification for the composition and presentation of the vaccine has been provided.

資料2. 審査データの概要

Nobivac DP Plus is the successor product for the already licensed product Nobivac Puppy DP. The distemper strain included is unchanged; the parvovirus strain however has been replaced with canine parvovirus strain 630a.

For the CDV component the batch of the vaccine used in the clinical studies had a titre of $5.1 \log_{10}$ TCID₅₀/ds and this was therefore chosen as minimum titre.

The minimum titre of the parvovirus component is based on a dose response study with R&D material produced before the final production process was established; the respective study is provided.

The CDV component is produced in a conventional seed lot system using a master seed virus (MSV).

The production process of the CPV component starts with a transfection step with plasmid p630a instead of a seed lot.

Composition and volume of the solvent are the same as for the other live canine vaccines of the Nobivac range.

The formulation of most batches used during clinical studies is the same as that intended for marketing. Some of the studies were performed with single CPV antigen or CDV pre-MSV.

One batch of the CPV component used in a clinical study in cats differs in the production process from that described in the dossier. However, the applicant performed a comparative study of the consensus sequences of both products and no differences were found. The study can be considered valid. In the study, virus was shed from the cats, in summary it can be assumed that the virus used was sufficiently replication competent.

All excipients are well known, pharmaceutical ingredients and their quality is compliant with Ph. Eur. standards. There are no novel excipients used in the finished product formulation. The list of excipients is included in section 6.1 of the SPC.

The CPV component is a live canine hybrid parvovirus strain named 630a based on the attenuated live vaccine strain 154 (backbone) and a capsid-coding insert derived from a currently circulating type 2c isolate.

The applicant describes the development of the recombinant CPV virus. The construction of the DNA plasmid and its use are described in detail. The plasmid is defined as a critical starting material. Information on the development process, the manufacturing process and the materials used during manufacture of the plasmid are presented. Furthermore, more details on the methods and specifications for testing are provided.

Satisfactory information on the strains used in the vaccine and development process of the plasmid are provided.

Description of the manufacturing method

The production process is described in detail and relevant validation studies are provided. A flow chart of the manufacturing process is provided.

The manufacturing process for both virus strains, their lyophilisation and the solvent are described in detail.

The production process for the CDV strain is a common production process for a viral vaccine employing a seed lot system and propagation of the virus in VERO cell culture.

The production process of the CPV strain is an innovative procedure using plasmid DNA and SAH-DK cells.

資料2. 審査データの概要

For the plasmid DNA, which is defined and characterised, it was demonstrated that passage 2 has the same sequence as the original plasmid.

Storage and stability of the plasmid are described and discussed. The storage period of the plasmid material is currently considered as unlimited.

A complete monograph on production and control of the plasmid is provided, which is considered acceptable. The DNA plasmid is defined as a critical starting material and a biological substance.

There is no in-process control test or finished product test performed which determines the amount of possible residual plasmid in the harvest and final product. An additional study was provided which demonstrated that no residual plasmid capable of transforming highly susceptible *E. coli* was present in the final product. Therefore, it is not necessary to implement a respective control test. Relevant validation studies on test methods are provided.

Data regarding the validation of viral titration of the CDV component is provided and the test for quantitative titration and identity is considered valid.

To produce the finished product, both vaccine viruses are combined with a stabiliser and M6/B8 medium, filled in glass vials and subsequently lyophilised.

Information on the lyophilisation process are described in the dossier.

Antibiotics are used in the manufacturing process. Their use was justified. A calculation on possible traces of antibiotics in the final product is provided and satisfactory. The amount of antibiotics possibly present in one dose of the final product is not considered as pharmacologically active.

Production and control of starting materials

Starting materials listed in pharmacopoeias

Certificates of analysis for all starting materials are provided and considered satisfactory.

Bovine serum is extensively tested by the supplier and in-house in accordance with Ph. Eur. monograph 2262 and the respective EU guideline EMEA/CVMP/743/00.

The quality and testing of the bovine serum are considered satisfactory.

Specific materials not listed in a pharmacopoeia

Starting materials of biological origin

CDV component

The description of the production and control of the MSV and working seed virus (WSV) for the CDV component is satisfactory. All relevant tests have been performed and the respective batch protocols are provided. The strain used in the product is identical to the one used in other products of the applicant.

The description of the production and control of the WSV for the CDV component is satisfactory.

Plasmid p630a

The information provided on the plasmid DNA as starting material for the CPV component is considered satisfactory.

資料2. 審査データの概要

The production process of the plasmid DNA, including information on the specific *E. coli* and other materials used for production and the complete manufacturing procedure have been provided. Information on all these starting materials including respective certificates and the description of the production process are also presented.

Detailed descriptions concerning the tests performed on the plasmid are provided.

VERO cells

Passage history and preparation at the company is satisfactory described.

Controls and tests carried out on the MCS are described and the respective quality control batch protocol for the MCS is provided.

The applicant provides a risk assessment and justification for omission of tests for several pathogens relevant for the target species (canine) and the species from which starting materials were obtained (porcine, bovine). These justifications are considered satisfactory. The respective documentation is provided.

Tests for identification of the species and karyology were performed; results on isoenzyme analysis, genetic stability and karyology are considered satisfactory.

In summary, the VERO cell line is considered suitable as production system for the CDV antigen component of Nobivac DP Plus.

SAH-DK cells

The SAH-DK cell line was developed by a company that has been acquired by the applicant.

Controls and tests were carried out on the MCS. The respective quality control batch protocol for the MCS is provided.

The applicant provides a risk assessment and justification for omission of tests for several pathogens relevant for the target species (canine) and the species from which starting materials were obtained (porcine, bovine). These justifications are considered satisfactory. The respective documentation is provided.

Tests for identification of the species and karyology were performed; results on isoenzyme analysis, species-specific immunofluorescence, genetic stability and karyology are considered satisfactory.

In summary, the SAH-DK cell line is considered suitable as production system for the CPV antigen component of Nobivac DP Plus.

The function, characteristics and origin of starting materials from animal origin is described. Satisfactory certificates of analysis for all listed substances are provided.

Starting materials of non-biological origin

A commercially available plasmid buffer is used. It is a balanced salt solution free from components originating from humans or animals. A satisfactory certificate of analysis is provided.

In-house preparation of media and solutions consisting of several components

During production of the vaccine several media and buffers are used.

Used starting materials and preparation, as well as storage conditions for the listed solutions are satisfactory described.

資料2. 審査データの概要

Specific measures concerning the prevention of the transmission of animal spongiform encephalopathies

A detailed TSE risk assessment is provided. A list of all starting materials of animal origin is provided indicating either that they all are derived from species which are not considered as TSE relevant, milk sourced from healthy animals in the same conditions as milk collected for human consumption, or a Certificate of Suitability was issued by the EDQM for this starting material.

Furthermore, Nobivac DP Plus is indicated for dogs, a species that is not naturally susceptible to TSE. It is concluded that the risk of TSE agents being transmitted by the use of this vaccine is negligible.

Control tests during the manufacturing process

The detailed description of the in-process controls comprises viral titration and sterility testing of the CDV and CPV component. The tests performed are the same as those performed in final product testing.

Data from four independent production runs for CDV antigen and CPV antigen respectively are provided. Antigen batches were tested for virus titre and sterility. All batches were demonstrated to be sterile. The virus titres were demonstrated as above the proposed minimum titre in all batches.

Control tests on the finished product

Parameter	Method
Solvent	
Contents on average	Weighing
Appearance	Visual inspection
Colour	Examination of the degree of coloration in accordance with Ph. Eur. 2.2.2.
Clarity	Visual inspection in accordance with Ph. Eur. 2.2.1.
pH	Potentiometric method according to the Ph. Eur. 2.2.3.
Identity	Presence of sodium, potassium and phosphate according Ph. Eur. 2.3.1.
Sterility	According to Ph. Eur. 2.6.1. and Monograph 0062

資料2. 審査データの概要

Parameter	Method
Lyophilisate	
Identity CDV	Cell culture method in accordance with Ph. Eur. monograph 0448
Identity CPV	Cell culture method in accordance with Ph. Eur. monograph 0964
Titre CDV (release titre)	Serial dilution on VERO cells and naphthalene black staining (CPE)
Titre CPV	Serial dilution on A72 cells and immunofluorescence staining
Sterility	According to Ph. Eur. 2.6.1. and Monograph 0062
Test on Mycoplasma	According to Ph. Eur. 2.6.7. and Monograph 0062
Extraneous agents	Cell culture test with monospecific sera against CDV and CPV
Residual humidity	Volumetric Karl Fischer titration

The test methods used for the control of the finished product (identity, viral titre, sterility, absence of mycoplasma, extraneous agents testing, residual humidity) and the solvent (contents on average, appearance, colour, clarity, pH, identity, sterility) are briefly described and the specifications were provided.

Detailed description and validations of the tests are discussed; description and validation of all tests are considered satisfactory.

Batch-to-batch consistency

Results for 4 batches of lyophilisate finally produced at the CMO and 3 batches of the solvent at production scale are provided. In addition, results of 12 pilot batches finally produced at the applicant's manufacturing site are provided.

All tests were performed. All results were within the specifications as proposed. Detailed batch protocols are provided.

Stability

The following storage conditions and shelf life for the lyophilisate are approved:

After manufacture, the product may be stored for 24 months below -15 °C followed by the storage at +2 to +8 °C for up to 24 months. This results in a maximum storage period of up to 48 months, if the internal storage period is maximally extended.

The applicant provided the intended stability protocol and the already obtained stability data on four independent batches manufactured with aged antigen stored for different periods of time. All results provided remained within the proposed requirements.

Active substance

資料2. 審査データの概要

Stability data on antigen batches are provided, from which it can be concluded that a shelf life of one year for the CDV component and a shelf life of two years for the CPV component are justified.

Finished product

A statistical regression analysis for the stability data currently available is provided. It is concluded that the CPV titre is stable over the analysed time period.

For the CDV component a slight decrease in titre and for the residual moisture content a slight increase over the analysed time period was observed, this was taken into account for setting of the release parameters.

A shelf life of 24 months at +2 to +8 °C with a maximal pre-storage period of the final product in the applicant's storage facilities of 24 months at below -15 °C has been approved.

Stability at elevated temperatures

Data of samples of two batches of Nobivac DP Plus stored at +30 °C for 3 days, compared to samples stored at the proposed storage temperature of +2 to +8 °C were provided.

It was demonstrated that the vaccine is stable for 3 days at +30 °C.

The SPC should therefore include the statement "Do not transport above 30 °C".

Photo-stability

Additionally, a photo-stability study was provided which showed satisfactory results. The transparent plastic packaging is suitable for its purpose. Stability of the product is guaranteed when kept in its original packaging under the recommended storage conditions.

Reconstituted product (in use-stability)

It was demonstrated that the vaccine is stable for at least 60 minutes after reconstitution with solvent.

Stability of the solvent

Data on three solvent batches stored for up to 48 months at room temperature and tested for filling volume, appearance, pH value and sterility are provided.

All parameters remained within the proposed specifications, except for one batch for which the pH value increased above the limit after 36 and 48 months.

A study to investigate the effect on solvent with an elevated pH was performed for 2 other products from the Nobivac range (Nobivac DHPPi and Nobivac Tricat Trio), having a similar composition as Nobivac DP Plus using 1 ml of solvent with a pH within the range and the maximum pH proposed during shelf life. Results show that the pH of the reconstituted product remained well within the normal range for parenteral products for at least 30 min after reconstitution when solvent with maximum pH was used.

As the solvent does not contain active ingredients, the storage conditions of the solvent in glass vials were defined as "No special precautions for storage".

Overall conclusions on quality

Nobivac DP Plus is a lyophilised live vaccine without any adjuvant or preservative, containing as active substances live, attenuated canine distemper virus (CDV) strain Onderstepoort and live, attenuated canine parvovirus (CPV) strain 630a.

Maximum and minimum titre were proposed as follows:

CDV: 5.1 - 6.5 log₁₀ TCID₅₀/dose

資料2. 審査データの概要

CPV: 5.1 – 6.7 log₁₀ TCID₅₀/dose

The CDV component is a conventionally attenuated live vaccine strain while the CPV component is a genetically modified hybrid CPV strain. It is a recombinant vaccine virus derived from the backbone of the existing vaccine virus strain 154 and the attenuated capsid of a currently circulating type 2c isolate.

The CDV component is produced in a conventional seed lot system using MSV and WSV.

The CPV component production is started with a plasmid.

A scientific advice on this alternative approach was provided by the CVMP in 2017 (EMA/CVMP/SAWP/724500/2016). After additional information was provided, the applicant's approach is considered acceptable.

In the section product development, sufficient information on the origin of the strains is provided.

The qualitative and quantitative particulars of the vaccine lyophilisate and suspension, the solvent and the containers are described adequately. The necessary certificates are provided.

The composition of the solvent is the same as used for other canine and feline vaccines manufactured by the applicant.

The production process of vaccine and solvent is described in detail and relevant validation reports are provided.

The starting materials comply with the provisions of Ph. Eur. and the TSE risk assessment is adequate. The respective certificates of suitability are provided. The VERO cell line is considered as a suitable production system.

Information on the production of the plasmid 630a used as starting material for the CPV component is provided and adequate.

The in-process and finished product controls performed on Nobivac DP Plus are described in detail and appropriate specifications are proposed. The production process results in a reproducible composition of the vaccine.

Stability data were provided for storage of antigen bulk before filling, the finished product, stability at elevated temperatures, the in-use stability of the reconstituted product and the stability of the solvent. Additionally, a photo-stability study was provided.

Stability of the vaccine for 3 days at elevated temperature of 30 °C was demonstrated. The statement "Do not transport above 30 °C" is included in the SPC.

The shelf life for the final product with an internal storage of 24 months at below -15 °C followed by an external storage of 24 months at +2 to +8 °C was approved. The shelf life for the solvent is 48 months with no special precautions for storage.

In conclusion, the production and quality of Nobivac DP Plus are adequately described and controlled and comply with the respective legal requirements including the TSE risk assessment.

The strategy followed to solve the situation created by the close of the CMO is acceptable.

Part 3 – Safety

Introduction and general requirements

Nobivac DP Plus (in the studies, reference is made to the name used during the development phase Nobivac Puppy DP Plus) is a live virus vaccine indicated for the immunisation of healthy puppies from four weeks of age against canine distemper and parvovirus infections presented in freeze-dried form in a vial and to be reconstituted with a solvent presented in a second vial. Nobivac DP Plus contains at least $10^{5.1}$ TCID₅₀, but not more than $10^{6.7}$ TCID₅₀ of CPV strain 630a and at least $10^{5.1}$ TCID₅₀, but not more than $10^{6.5}$ TCID₅₀ of CDV strain Onderstepoort per dose. No adjuvant or preservative is included.

The vaccine is the successor vaccine of the licensed product Nobivac Puppy DP, which contains live CDV strain Onderstepoort and live CPV strain 154 as active substances. Nobivac DP Plus contains the same live CDV strain Onderstepoort, but the live CPV vaccine strain 154 has been replaced by live CPV vaccine strain 630a (CPV630a).

Vaccine strain CPV630a is a hybrid virus that was derived from the backbone of the existing vaccine virus strain 154 and the attenuated capsid of a currently circulating type 2c isolate. The virus was constructed using molecular cloning techniques and is therefore termed a genetically modified organism (GMO), but does not contain any exogenous 'non-canine parvovirus' genetic material.

The hybrid vaccine strain CPV630a has the unique feature to achieve immunity in 4-week-old pups with high maternal antibody titres against CPV-2a, 2b and 2c.

One of the safety studies were performed with a 0.5 ml dose volume, but the 1 ml dose volume was finally chosen, as the end user is more familiar with it.

A full safety file in accordance with Article 12(3)(j) has been provided. Studies to determine the safety of the bivalent vaccine were performed in accordance with Ph. Eur. monographs 0964 ('*Canine parvovirus vaccine [live]*'), 0448 ('*Canine distemper vaccine [live]*'), Ph. Eur. chapter 5.2.6 ('*Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera*'), VICH GL 41, Directive 2001/82, Annex I, Title II as amended and EU Directive 2001/18/EC ('*Safety of genetically modified organisms*').

All reported laboratory studies were described to be GLP-compliant.

Safety documentation

Four laboratory safety studies were conducted to investigate the safety of Nobivac DP Plus in 4-week-old puppies. Studies were performed to investigate the safety of the administration of a tenfold overdose and repeated dose of CPV630a, the effect of a tenfold overdose of CPV630a on thymus, the reversion to virulence of CPV630a and the dissemination of canine parvovirus strain 630a. A fifth laboratory safety study was conducted to investigate the reversion to virulence of the CDV strain Onderstepoort. This study was not in compliance with Ph. Eur. monograph 0448 requirements but is acceptable on the basis of the scientific advice provided.

One field study was performed in two kennels located in Morocco.

Additionally, five studies were conducted to investigate the safety of the CPV strain 630a in ferrets, safety of the administration of CPV strain 630a vaccine virus in cats and safety and spread of CPV strain 630a after oral administration in mice and in chickens.

The following studies were performed:

資料2. 審査データの概要

Study title
Safety of 10x overdose followed by repeated dose
Effect on the thymus of an overdose of canine parvovirus strain 630a
CPV reversion to virulence
CDV reversion to virulence
Dissemination of the CPV strain 630
Disinfection of CPV 630a contaminated animals' facilities using formaldehyde fumigation
Safety of CPV strain 630a in ferrets
Safety and spread of CPV strain 630a in mice after oral administration
Safety and spread of CPV strain 630A after oral administration to the non-target species chicken
Safety of the administration of CPV strain 630a vaccine virus in cats
Study to Investigate the Dissemination of Canine Parvovirus strain 630a in Ferrets early after Inoculation
Field study to assess the safety and efficacy of Nobivac DP Plus

Laboratory tests

Safety of the administration of one dose and an overdose

Studies applicable to live vaccines include the investigation of the safety of a single dose. However, this study was not performed as an isolated study. The safety of a single dose was assessed in the frame of the assessment of the safety of the repeated administration of a single dose after administration of a tenfold overdose.

As the basic application for this vaccine consists of the administration of one single dose to puppies from 4 weeks of age onwards, and in order to avoid animal use for an additional safety study as well as in conformity with the principles of Directive 2010/63/EU, the CVMP accepted this approach.

The study was conducted to examine the safety of a tenfold overdose of the bivalent test vaccine administered subcutaneously to 4-week-old specific pathogen free (SPF) Beagle puppies followed by a single repeat dose administration after 3 weeks. Examinations of possible interactions with Nobivac L4 by mixed vaccination and Nobivac KC by intranasal administration were included.

Ten naïve 4-week-old Beagle pups of mixed sex were assigned to two groups of 5 animals each:

- Group 1: 5 naïve pups were subcutaneously vaccinated with a tenfold overdose on day 0 (D0), i.e. CDV $10^{7.5}$ CPV $10^{7.7}$ TCID₅₀/ds of Nobivac DP Plus mixed with Nobivac L4. Pups additionally received Nobivac KC via the intranasal route.
- Group 2: 5 naïve pups were subcutaneously vaccinated with a tenfold overdose on D0, i.e. CDV $10^{7.6}$ CPV $10^{7.8}$ TCID₅₀/ds of Nobivac DP Plus reconstituted with the Nobivac Solvent. Pups additionally received Nobivac KC via the intranasal route.

資料2. 審査データの概要

Three weeks after the first vaccination (D21), a single dose was applied to the same puppies via the subcutaneous route:

- Group 1: Nobivac DP Plus CDV $10^{6.5}$ CPV $10^{6.7}$ TCID₅₀/ds reconstituted in a single dose of Nobivac L4.
- Group 2: Nobivac DP Plus CDV $10^{6.5}$ CPV $10^{6.7}$ TCID₅₀/ds reconstituted with the Nobivac Solvent.

For treatment of a mild respiratory infection observed in two pups of group 2, antibiotics were given for five days to all ten pups from D21 to D25. The applicant stated that the two pups became most likely infected with *Bordetella (B.) bronchiseptica* during the transport from the colony to the laboratory facilities.

Following the administration of the overdose vaccination, a soft diffuse thickening (discrete non measurable swelling) was observed at the injection site in one pup of each group. Following the single repeat dose vaccination, a majority of the vaccinated pups showed a similar soft diffuse thickening. Local reactions disappeared within 2 to 6 days after vaccination. No abnormal clinical observations were recorded, and no clinical observation data were observed, except for the two pups suffering from mild respiratory signs. The weights of all animals increased continuously throughout the study and there was no increase in body temperature in any pup following either overdose or repeat single dose vaccination.

Following the overdose vaccination, all five pups of group 1 which had received Nobivac DP Plus mixed with Nobivac L4 showed a drop in white blood cells (WBC) below 50% of their mean baseline by D3, 5 and 7, which returned to normal by D10 but dropped again by D16 to 70–80% of the mean baseline. The value of the circulating white blood cells for the pups of group 2 remained relatively close to the baseline mean by D7, whereas an increase of more than 100% was seen by D10. This leucocytosis was probably due to a *B. bronchiseptica* infection during the transport as described above.

This study meets the requirements of Ph. Eur. monographs 0964 and 0448, Ph. Eur. chapter 5.2.6 and Directive 2001/82/EC.

Haematological results indicate that the test vaccine alone does not cause a significant reduction in the number of circulating white blood cells for a longer time when given as an overdose, whereas the mixed use of the test vaccine with Nobivac L4 may lead to a decrease of white blood cells after vaccination. Leucodepletion following mixed vaccination of 4-week-old puppies with Nobivac L4 may increase the susceptibility of 4-week-old pups to other infectious agents during 7 days after vaccination or even longer after administration of an overdose (i.e. D16).

It can be concluded that the administration of one overdose of Nobivac DP Plus containing the tenfold of the maximum potency of antigens by the recommended route was found to be safe for puppies of 4 weeks of age. The administration of one dose to the same puppies 3 weeks later was found to be similarly safe.

However, as the mixed use of Nobivac DP Plus and Nobivac L4 is not supported by the provided data, the advice regarding the mixed use with Nobivac L4 was waived.

Safety of one administration of an overdose

The study was carried out to determine the effect of an overdose of canine parvovirus strain 630a on the thymus of pups approximately 4 weeks of age. Here, pups received the monovalent CPV630a vaccine strain.

In this overdose study, eight naïve less-than-4-week-old Beagle pups of mixed sex were assigned to two groups of 4 animals each. Pups of group 1 were subcutaneously vaccinated (CPV $10^{8.0}$ TCID₅₀/ds)

資料2. 審査データの概要

and pups of group 2 represented non-vaccinated controls. On D14 and D21, two dogs from each group were euthanised to obtain a panel of sixteen different organs and tissues including thymus for histological examination, as required by Ph. Eur. monograph 0964, and virus isolation. White blood cell counts were determined from blood samples collected at regular intervals. Serology was done with serum samples collected on D0 and D14.

Because of a breakdown in biosecurity that occurred during the initial study period as indicated by detection of seroconversion in the non-vaccinated pups of group 2 on D14, an additional three 6–7-week-old pups served as replacement animals. The report of the results of group 2 and replacement pups is therefore divided into two parts: results from part 1 before biosecurity had been compromised and results from part 2 describing the results and actions taken thereafter. The three additional pups replaced the non-vaccinated controls of group 2.

All pups remained healthy. No abnormal clinical observations and no adverse effects were recorded. The weights of all animals increased continuously throughout the study, supporting that all dogs developed and grew normally. The rectal temperatures of all animals remained within the physiological range for the entire observation period. Following the administration of the overdose, no adverse effects were recorded at the injection site.

By D14 post vaccination, all group 1 pups had seroconverted, with hemagglutination inhibition (HAI) antibody values up to 1:8192. As mentioned above, all group 2 pups had similarly seroconverted.

Haematological results did not show any evidence for a drop of white blood cells counts towards the 50% baseline.

Comparative histological examination of the thymus from pups of group 1 and the replacement group did not show evidence for thymic atrophy on D14 and D21 in the vaccinated pups. However, minimal to slight histopathological changes in the thymus were observed in three out of four of the unintentionally infected control animals, both on D14 and D21. The day on which the pups became infected due to the biocontainment breakdown and the infection titre was not known and therefore conclusions regarding the histopathological changes cannot be drawn. The histopathological description of the lesions was provided. In the replacement pups, CPV630a virus could neither be detected in serum samples nor in 10% (w/v) thymus and tonsil homogenates, whereas tissue homogenates from pups of group 2 were CPV-positive as demonstrated by virus isolation. Genomic sequence determination confirmed unique 630a sequences, thereby also confirming that group 2 had been infected with CPV vaccine strain from the room housing the group 1 pups.

As, after administration of an overdose of CPV strain 630a, there were no adverse histological observations made on the thymus tissue on D14 and 21 post inoculation or any other adverse clinical observations in pups of approximately four weeks of age, the requirement of Ph. Eur. monograph 0964, section 2.3.1.2 is met.

The guidance on component-specific safety requirements of Ph. Eur. monograph 0964 ('*Canine parvovirus vaccine [live]*') was considered. The study is considered valid even though the control pups had to be replaced and only three pups were used instead of the required four control animals. After administration of an overdose of canine parvovirus strain 630a, no adverse histological changes on the thymus tissue of approximately 4 weeks aged pups were observed.

Safety of the repeated administration of one dose

For clinical safety and injection site safety after the repeated administration of one dose, reference is made to the above 10x overdose and repeated dose safety study.

資料2. 審査データの概要

Examination of reproductive performance

The vaccine is not intended for pregnant animals. Therefore, studies in pregnant animals were not performed. The advice '*The safety of the veterinary medicinal product has not been established during pregnancy*' is included in the SPC Section 4.7 and in the PL section 12.

Examination of immunological functions

Immunological functions should be examined where the product might be expected to adversely affect the immune response of the vaccinated animal. Mixed vaccination of puppies with a leptospirosis vaccine did not result in a negative effect on the serology of the bivalent vaccine Nobivac DP Plus. Reference is made to the results of the field trial. The applicant concluded that the product Nobivac DP Plus does not adversely affect the immunological functions.

In the overdose study in pups receiving mixed vaccination, a transient drop of the white blood cells below 50% of their mean value was noted followed by another drop. In the non-target species cat, a similar drop of white blood cells towards the 50% baseline was similarly noted.

Special requirements for live vaccines

To fulfil the special requirements for live vaccines according to Directive 2001/82/EC as amended, Title II Part 3.B.6 and Ph. Eur. monographs 0448 and 0964, several laboratory studies in the target species were carried out.

Spread of the vaccine strain

Virus shedding of CPV 630a or CDV strain Onderstepoort after vaccination were closely monitored in two respective reversion to virulence studies.

Dissemination in the vaccinated animal

Dissemination in the vaccinated animal is required for live GMO strains (Section 3.2.1.2 of EMEA/CVMP/004/04-FINAL). Therefore, a dissemination study was only carried out for canine parvovirus strain 630a.

One dissemination study was carried out to investigate the *in vivo* dissemination and duration of virus shedding following administration of CPV strain 630a to six 4-week-old SPF Beagle pups and one non-vaccinated control pup.

The animals were assigned to three groups. Pups from groups 1 and 2 with three animals each were subcutaneously vaccinated with a high dose ($10^{7.0}$ TCID₅₀/ds) and euthanised on D4 (group 1) and D11 (group 2). Group 3 comprised a single non-vaccinated/non-in-contact control pup that served as a donor for control tissues, blood and faeces samples on D4.

A panel of tissue samples comprising sixteen different organs was collected and homogenized (10% [w/v] in PBS) to examine dissemination of CPV630a in the body of vaccinated pups including important viral target organs (e.g. thymus, intestine, myocardium) and skin around the injection site. Blood was collected on D0, D4 and D11 for serology and only for group 2 daily for virus isolation. Rectal swabs were taken daily to determine viral shedding. In addition to serology in serum, possible presence of CPV630a-specific antibodies in tissue homogenates was examined by HAI.

資料2. 審査データの概要

The validity of the virus detection methods, i.e. possible inhibitory matrix effects, was shown by using replica homogenates from vaccinated and non-vaccinated pups spiked with $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml CPV 630a virus.

Cell culture-based virus isolation and PCR were applied to examine CPV630a dissemination in the body of the pups. However, technical inconsistencies with the PCR method were encountered, and the inconclusive PCR results were not reported.

Tissue samples from the myocardium were taken for histological examination of myocarditis by the usual histopathological method.

No abnormal clinical observations were recorded. All pups remained healthy and no adverse effects were recorded after vaccination during the course of this study. The scoring protocols used were provided by the applicant. The body weights were not presented in this report, but they were recorded daily. Rectal temperatures of all animals remained within the physiological range for the entire observation period with no indication of pyrexia.

All vaccinated pups seroconverted successfully showing positive titres from D4 onwards and reaching levels of 8192 HAI units on D11 in group 2. Low CPV630a-specific HAI titres (16–64) could be detected in tissues on D4, and levels increased thereafter. On D11, the highest antibody values were in the thymus (512–1024 HAI units) and slightly lower values in all the other tissues (64–256 HAI units). The unvaccinated pup remained seronegative throughout the observation period.

Rectal swab supernatant titration revealed virus shedding appearing in group 1 on D+2 and continued until D+4 with considerable shedding (titre of $> 6.64 \log_{10}$ TCID₅₀/ml). In group 2, shedding was seen for one pup on D1 ($2.45 \log_{10}$ TCID₅₀/ml), on D2 for another pup ($2.80 \log_{10}$ TCID₅₀/ml), on D3 for all three pups of this group with different titres (2.45 , > 6.64 and $5.24 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, respectively), continuing on D4 and 5 for all pups until D6 for two of the three pups (no virus, 3.84 and $3.49 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, respectively). There was no virus shedding detected in the non-vaccinated pup.

In the tissue samples of thymus, spleen, intestinal tissues, lymph tissues, tonsil, liver, and injection site skin CPV630a virus was detected in group 1 pups on D4. Here, the thymus had the greatest amount of virus ($> 6.64 \log_{10}$ TCID₅₀/ml), typically 100x higher than any of the other tissues (smallest amount injection site: mean $3.03 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, highest amount tonsil: mean $5.59 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, most tissues: mean $4.20 \log_{10}$ TCID₅₀/ml). Very little or no virus was detected in the kidney, lung, brain tissues and heart. Different to group 1, there was no CPV 630a isolated from any of the tissues taken from the group 2 pups. This decrease of disseminated virus is most probably a result of virus neutralization by the high levels of CPV antibodies produced following vaccination.

Histological examination of heart myocardium samples showed no macroscopic or microscopic abnormalities or evidence of inflammatory processes in any of the pups.

There was no evidence of any adverse effects following administration of CPV630a in pups of approximately four weeks of age. CPV630a was shown to have disseminated to various tissues within four days of administration. However, virus could not be detected in the same tissue types eleven days post administration due to neutralizing levels of antibodies.

The study is valid. The fact that the virus-spiked tissue homogenates were only found positive in the tissue samples from group 1, exhibiting low CPV630a-specific antibodies, whereas in group 2, all virus-spiked tissue homogenates with relatively high HAI titres were virus-negative, was described in detail in the safety in ferrets study. Similarly, these data indicated that virus could not be isolated in the presence of neutralising antibody titres, or in the occasional presence of tissue toxicity. Any virus, if present, was assumed to be either neutralised or otherwise inactivated and unable to replicate. Unfortunately, PCR-based virus detection results could not be used to verify this assumption.

資料2. 審査データの概要

Consequently, it is not possible to definitively state that vaccine virus was entirely absent in homogenates which yielded a negative result.

Reversion to virulence of attenuated vaccines

CDV vaccine strain

The reversion to virulence of the CDV vaccine strain was investigated in one study using the original CDV MSV. Three six-week-old pups were inoculated intramuscularly, subcutaneously and intranasally (3x 1 ml of $10^{6.92}$ TCID₅₀/ml) with a total of $10^{7.4}$ TCID₅₀. One dog was not inoculated and served as in-contact control. Nasopharyngeal swabs were taken daily, starting on D0 through D21. Isolation and titration were done using VERO cells. No virus could be isolated from any dog. Therefore, individual nasopharyngeal swab material from the previous passage from D3 through D8 were used to inoculate two new pups. These two dogs were observed as stated before and nasopharyngeal swabs were then passaged to another two pups. Since no virus could be isolated from the third passage, the study was terminated at this passage level. Seroconversion at passage 1 confirmed the presence of CDV infection. The in-contact control dog remained seronegative. The lack of seroconversion at passage levels 2 and 3 and the lack of virus shedding indicate that the virus failed to be transmitted. All dogs at passage levels 2 and 3 remained seronegative. The non-vaccinated in-contact pup of the first group remained virus and seronegative. None of the pups developed clinical signs nor pyrexia or a disturbed body weight gain.

The inoculation of the first backpassage group stimulated a good antibody response. The CDV MSV could not be isolated at any passage nor did it spread to the in-contact dog. All pups remained clinically healthy. No reversion to virulence of the CDV after being backpassaged through dogs three times could be demonstrated.

This study is not fully compliant with the current Ph. Eur. monograph 0448, but reference is made to a scientific advice (EMA/CVMP/SAWP/724500/2016). The CVMP concluded that a new reversion to virulence study is not required if the new master seed is produced within the maximum allowed number of passages (new MSV+4). The applicant followed this advice. The new MSV corresponds to old MSV+1.

The history of the long-term use of the vaccine strain combined with the original study results were suitable to show that the CDV MSV does not present a risk of reversion to virulence.

CPV630a vaccine strain

The reversion to virulence of strain CPV630a was investigated in one study taking into account the requirements of Ph. Eur. chapter 5.2.6 and Ph. Eur. monograph 0964, but the requirements as given are met only partially. The monograph 0964 states that WBC counts and histological examination of the thymus should be considered in the evaluation. However, these data were not collected. Instead the sequence of the 5th passage was compared with the consensus sequence of canine parvovirus strain 630a.

Eighteen SPF Beagle pups were assigned to 5 groups. Groups 2 and 3 consisted of two pups, groups 1 and 4 comprised three pups and eight pups were included in group 5. Group 1 pups subcutaneously received an overdose (CPV $10^{7.5}$ TCID₅₀/ds) and pools of faecal collections (D2 to D6) were then oronasally transmitted from group to group thereafter.

All pups remained healthy. No abnormal clinical observations and no adverse effects were recorded after vaccination or inoculation of the test material during the course of this study. There were no signs of diarrhoea or lethargy in any of the dogs throughout the study. The weights of all pups increased continuously throughout the study. Rectal temperatures of all animals remained within the physiological

資料2. 審査データの概要

range for the entire observation period with no indication of pyrexia with only one exception on a single day.

In group 1, virus shedding via faeces shedding began on D2, peak shedding was seen on D3 and D4. There was no shedding detected from D5 onwards. Virus was then shown to be shed following administration of faecal samples via the oronasal route. Virus shedding appeared to begin two days later on D4 and continued for a longer time with considerable shedding detected on D4, D5 and D6 in group 2. In group 3, shedding was seen from D3 up to D6. In group 4, virus shedding appeared to begin on D2 and continued for a longer time, with considerable shedding detected on D3 until D7. In group 5, shedding was seen from D3 and continued for two days up to D5 for two pups and up to D6 for the two other pups.

Titration of the faecal pool materials that were prepared from faecal collections from D2 until D6 showed the following mean titres of faecal pools 1, 2, 3 and 4 administered to the pups (second, third, fourth and fifth passage): 1st faecal pool < 2.3 log₁₀ TCID₅₀/g, 2nd faecal pool 6.2 log₁₀ TCID₅₀/g, 3rd faecal pool 6.6 log₁₀ TCID₅₀/g and 4th faecal pool 6.3 log₁₀ TCID₅₀/g. The fact that the amount of virus in the first faecal pool (administered to group 2) was much lower than that determined for the second, third and fourth faecal pools was explained by the lower amount of shedding in group 1 pups, where shedding had effectively stopped by D5.

After five sequentially successful passages of CPV630a through five groups of young pups, there was no evidence of reversion to virulence.

The study demonstrated that strain 630a can be spread via faeces of recently vaccinated dogs.

All pups developed and grew normally, and the rectal temperatures of all animals remained within the physiological range for the entire observation period. By appropriate sequencing data submitted by the applicant, it could be shown that there was no difference between the vaccine virus (inoculum) and virus recovered from faecal samples of the virulence study. In conclusion, even though the study design did not fulfil all general and specific requirements of the Ph. Eur., it is acknowledged that the reversion to virulence study did not indicate any genetic (sequencing results after 5 passages show that the sequence was identical to the consensus CPV 630a sequence) or clinical signs indicating reversion to virulence of vaccine strain CPV630a in pups after the 5th passage.

Biological properties of the vaccine strain

The CPV component is a live canine hybrid parvovirus strain named 630a based on the attenuated live vaccine strain 154 (backbone) and a capsid-coding insert derived from a currently circulating type 2c isolate. It induces protection against canine parvovirus within 3 days in naïve animals and it has the unique feature of achieving immunity in pups with levels of maternal antibodies in the highest range.

The CDV component is a well-known vaccine strain. No special biological properties are known for the vaccine strain.

Recombination or genomic reassortment of the strains

Canine distemper virus is a paramyxovirus. Being a single-stranded RNA virus, it is not readily amenable to recombination.

Canine parvovirus is a single-stranded DNA virus that replicates in the nucleus of the host cell. It is therefore evident that recombination can occur when two different canine parvovirus strains are present in the same cell. Therefore, opportunities for recombination between vaccine virus and field strains of

資料2. 審査データの概要

canine parvovirus do exist. This event is just as natural as a recombination between two field strains and it is not to be expected that a recombinant virus will have virulence factors, which are not already present in the contributing parent field strain.

Each of the two viruses concerned has a single genome. Therefore, genomic reassortment will not occur.

User safety

A user risk assessment in accordance with applicable guidelines has been provided. The following elements are discussed by the applicant: hazard identification, exposure assessment, assessment of the consequence of a hazard occurring, risk characterisation and risk management and communication. Accidental self-injection during preparation or administration of the vaccine was identified as the main exposure scenario. As the active ingredients are live attenuated antigens, which are not considered zoonotic and the excipients are not regarded as hazardous, the risk for adverse effects in relation to an accidental self-injection is considered to be low. Furthermore, the person who will administer the vaccine is a trained professional, which reduces the risk for exposure via accidental self-injection.

The CVMP acknowledged the user risk assessment, which is considered satisfactory. It addresses the exposure situations under normal conditions of use and in case of foreseeable accidents, and this is reflected in the SPC and product literature.

Study of residues

Performing a study of residues is not applicable, as Nobivac DP Plus is not intended for food producing species.

Interactions

Under *Interactions*, the applicant proposes additional information concerning interactions with two other Nobivac products based on two safety studies (10x and repeat dose laboratory study, field trial), in which the applicant wanted to demonstrate that Nobivac DP Plus can be given in combination with Nobivac L4 instead of solvent and that Nobivac DP Plus can be concurrently administered with Nobivac KC.

Nobivac L4 is a centrally authorised inactivated vaccine for active immunisation of dogs against four different *Leptospira* serogroups. The minimum age for vaccination is 6 weeks.

Regarding the 10x overdose and repeat study, the applicant concluded that the clinical observations remained within the limits as stated in SPC section 4.6 of Nobivac L4. However, all five pups that received Nobivac Puppy DP Plus mixed with Nobivac L4 showed a transient drop of white blood cells counts below 50% of their mean baseline value, whereas all 5 pups vaccinated with Nobivac Puppy DP Plus reconstituted in solvent did not. The mixed use of Nobivac DP Plus and Nobivac L4 is not supported and the advice regarding the mixed use with Nobivac L4 was waived.

With regard to the field trial, stronger adverse reactions were observed when the lyophilisate was dissolved in Nobivac L4 compared to the reactions seen in the 10x overdose and repeat study using the vaccine in question dissolved as provided in the SPC (lyophilisate and solvent).

Nobivac KC (also named Nobivac BbPi) is a lyophilised vaccine containing live *B. bronchiseptica* and live canine parainfluenza virus (CPiV) as active ingredients, indicated to reduce clinical signs induced by *B.*

資料2. 審査データの概要

bronchiseptica and CPiV and to reduce shedding of CPiV for periods of increased risk. The vaccine is administered intranasally to dogs from 3 weeks of age onwards.

In the laboratory 10x overdose and repeat safety study, Nobivac Puppy DP Plus was concurrently administered with Nobivac KC. The applicant concluded that the clinical observations remained within the limits as stated in section 4.6 of the Nobivac KC SPC.

However, to reflect the absence of sufficient data in support of efficacy for Nobivac KC when used in combination with Nobivac DP Plus, the following statement is included in section 4.8 of the SPC.

Interaction with other medicinal products and other forms of interaction

Safety data are available which demonstrate that this vaccine can be administered on the same day but not mixed with a vaccine of the Nobivac series containing *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza virus components for intranasal administration. Efficacy after concurrent use has not been tested. Therefore, while safety of concurrent use has been demonstrated, the veterinarian should consider this when deciding to administer the products at the same time.

Field studies

One field study was conducted in two private kennels located in Morocco to evaluate safety and efficacy of Nobivac DP Plus. The vaccine was reconstituted in a low volume (0.5 mL) of Nobivac L4 and administered subcutaneously. Two different Nobivac DP Plus batches were used.

The study comprised 89 pups of different breeds. From one kennel, only one litter with three pups was included in the study. The other pups were located in the second kennel. In one kennel, there were 3 cases of CPV infection in 2015 and in the other kennel there were an unknown number of kennel cough cases in 2016, but no new cases since then were noticed regarding both diseases. All 89 pups were vaccinated, and no control group was included. The pups included in the field study were on average 5 weeks of age (34.4 ± 5.2 days), with a range between 25 and 43 days.

One litter with three puppies was excluded prior to the vaccination, since 2 out of 3 puppies developed clinical signs of illness and died thereafter. From the remaining 89 puppies, several puppies suffered from gastrointestinal (*E. coli* and rotavirus infections, severe ascariasis) or sarcoptic mange infection. Ocular/nasal discharges occurred in a number of puppies. Two puppies died during the study. The applicant stated that these diseases were probably not related to vaccination and submitted information on how the diarrhoeic pups (13 in total) were diagnosed with specific conditions such as diarrhoea due to change of feed, rotavirus or *E. coli* infection. Body weights were recorded to determine the blood volume that could be withdrawn, but not evaluated as a clinical parameter. Rectal temperatures were recorded between D-3 and D4 but not thereafter. No clinically relevant changes in rectal temperature were noticed.

During or immediately after vaccination, 17% (15 out of 89) of the puppies showed whining or scratching at the injection site (whining: 9 puppies, scratching: 3 puppies, pain: 2 puppies, whining and scratching: 1 puppy). These reactions were noted immediately after or during vaccination. In all cases, immediate reactions resolved quickly thereafter (within approximately one minute).

Forty-nine per cent (44/89) of the puppies showed a local transient reaction at the injection site, which resolved between 5 (66%) and 14 days (98%) after appearance, with one exception. An estimated maximum measured size of swelling up to approximately 3 cm (2 puppies) was observed but the majority of the puppies (61%) showed a maximum swelling of ≤ 1 cm. Both hard and soft swellings were scored, and in 15 puppies the reaction was scored as painful and in 6 puppies as painful and/or warm.

資料2. 審査データの概要

17% (15/89) had an abnormal clinical score (score 1) for general health after vaccination. 14 puppies came from three litters and were scored as 'less active, minor signs of discomfort' for several hours to two days. In addition, 8% of the puppies (7/89) from these litters showed a reduced feed intake for one day after vaccination. Six of them were also scored as less active for general health. The most common reaction 'less active' occurred in eight cases within four hours after vaccination. Those puppies came all from the same litter and this reaction was considered to be a reaction to the animal handling. Occurrence of reduced activity is listed in the SPC.

The overall health status in both kennels was characterised by a relatively high morbidity rate by non-vaccine related diseases. Nevertheless, this was not considered to be influencing the results of the study as the housing and daily husbandry of the bitches with pups were comparable to the EU. Regarding the surveillance of the two breeders by a veterinary medical officer, a statement and additional information are provided by the applicant, which confirm that surveillance in Morocco is comparable to the situation in the EU.

The study did not include a control group (either non-vaccinated or vaccinated with a comparable vaccine), which was explained satisfactorily by the applicant (see efficacy part). Clinical parameters such as the body weight evolution were not reported or were only reported during a very short period of time, not covering the whole observation period. Due to the study design it is not possible to draw any conclusion regarding an association between weight gain retardation and vaccination with Nobivac DP Plus from the field data alone.

The mixed use of Nobivac DP Plus and Nobivac L4 is not supported; the advice regarding the mixed use with Nobivac L4 is waived.

Environmental risk assessment

The CPV strain 630a has the same attenuating backbone and capsid amino acid changes as canine parvovirus strain 154, which has a history of safe use for more than 25 years. There are no indications that recombination or reversion to virulence occurs under field conditions. Therefore, the risk that a hazard occurs is considered as low.

For the CDV component, there are no potential risks for the environment since this strain is not shed by vaccinated animals. The CDV strain is derived from the same seed lineage as the CDV that has been used for a long period by the company as a live vaccine strain. Environmental problems and reversion to virulence have not been reported for CDV derived from this lineage.

The CPV strain is intended for pups from 4 to 6 weeks of age and, at this age, the animals remain within the home or kennel and have not yet been taken for a walk. This reduces the chance that wild animals or other non-vaccinated domestic dogs will come into contact with the vaccine strain. If other animals would unintentionally or intentionally (ferrets or cats) come into contact with the vaccine strain, it is unlikely that a hazard would occur since it has been demonstrated that canine parvovirus strain 630a is safe for non-target species which may come into contact with the vaccine. Therefore, the risk that a hazard would occur is considered as negligible.

Taking all the risk factors in consideration, the assessment of the level of risk for Nobivac DP Plus can be considered as being low. This is also reflected in the product literature. Phase II environmental risk assessment is not considered necessary. Nevertheless, a warning is included in section 4.5 in the SPC regarding the possibility of cats becoming infected albeit without any signs of disease.

資料2. 審査データの概要

Environmental risk assessment for products containing or consisting of genetically modified organisms

Nobivac DP Plus or rather the active substance of this vaccine, CPV strain 630a, falls within the scope of Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms.

Detailed information on the parental virus CPV strain 154 has been provided, including safety studies of the parental strain even if not required by guidelines or the Directive.

Detailed information on the possible risks for humans and for the environment has been provided.

The vaccine is compliant with Directive 2001/18/EC.

Nobivac DP Plus does not infect humans and is restricted to the infection of dogs and other animals of the family Canidae, as well as members of the family Felidae (e.g. domestic cats) and Procyonidea (e.g. raccoons).

The vaccine strain was generated by a multistep process using molecular cloning techniques. The vaccine virus does not contain any non-parvovirus sequences, which were exchanged as described above. Reversion to virulence studies (*in vivo*) did not show any tendency for reversion.

The vaccine virus was shed from vaccinated animals via faeces for a limited time span of 8 days. In non-target species studies, cats inoculated with CPV strain 630a shed the virus via faeces within the first week post-inoculation and the vaccine virus did also spread to in-contact animals. These animals also showed faecal shedding without any clinical signs or loss of body weight. A mild transient drop in white blood cell counts in inoculated cats was observed, which coincided with faecal shedding. Inoculated and in-contact cats did not develop any signs of infection but CPV-specific antibodies. Similarly, ferrets inoculated with CPV strain 630a did not show any clinical signs and developed antibodies against CPV. Ferrets did not shed the virus via faeces and virus could not be isolated from the tissues after infection. Another study in ferrets investigated earlier time points. Results showed that the virus was not shed via faeces and ferrets did not show any clinical signs. Virus could not be isolated from tissue samples. Studies in mice and chickens inoculated with the CPV vaccine strain 630a did not lead to shedding, spreading or any clinical signs, but inoculated animals showed a CPV-specific seroconversion. A warning is included in the SPC indicating that the vaccine virus may spread to cats and shed to other cats after contact with primary vaccinated dogs or faeces of dogs without the induction of clinical signs.

Taken together, any risk emerging from the use of the attenuated vaccine viruses is expected to be negligible for humans and low for the environment.

Overall conclusions on the safety documentation

The safety of Nobivac DP Plus was investigated in laboratory studies and one field trial. All laboratory studies were carried out with the most sensitive category of target animals, i.e. 4-week-old SPF pups. In the laboratory studies, batches containing the maximum release titre were used. In the field trial, standard batches were used. The vaccine was administered by the subcutaneous route, as recommended. Laboratory studies were reported to be compliant with GLP principles.

In the tenfold overdose study, the test vaccine was either given alone or administered in a mixed vaccine together with Nobivac L4. Concurrently, one dose of Nobivac KC was administered intranasally. Three weeks later, a single dose of Nobivac DP Plus was given alone or mixed with Nobivac L4. As the basic vaccination for this vaccine consists of the administration of one single dose (1 ml), and in order to avoid animal use for an additional safety study, this approach is acceptable. Here, the test vaccine is considered safe for the administration of one dose and the tenfold overdose. Local reactions were

資料2. 審査データの概要

adequately mentioned in the SPC. Regarding white blood cells, the test vaccine alone has no negative effect, but the mixed use of Nobivac DP PLUS together with Nobivac L4 may lead to a decrease of white blood cells after vaccination.

In the second laboratory study, a tenfold overdose of a monovalent CPV 630a vaccine was administered. In this study, the effect of an overdose of CPV strain 630a on the thymus in comparison to non-vaccinated control animals was investigated. No histopathological changes were observed in any of the organs.

In the field trial, the vaccination of Nobivac DP Plus mixed with Nobivac L4 induced stronger local adverse reactions, with 17% of the puppies having an abnormal clinical score (score 1) for general health after vaccination and up to 8% of the puppies showing a reduced food intake for one day after vaccination.

The examination of immunological functions was conducted based on the estimation of serological titres after vaccination. Mixed vaccination of puppies with a leptospirosis vaccine did not result in a negative effect on the serology of this product.

A reversion to virulence study of the CPV 630a vaccine was carried out by passaging the CPV630a strain sequentially through five groups of pups. The vaccine virus strain was shown to be genetically and phenotypically stable.

The vaccine virus spreading via faeces of recently vaccinated dogs was shown. Following administration of faecal samples containing the vaccine, virus was also shed after each passage.

A dissemination study using virus isolation based on cell culture demonstrated that CPV 630a was shed by vaccinated pups from D1 to D2 onwards and could be detected in a number of organs and tissues with the highest levels found in the thymus. The detection method failed to detect virus as soon as CPV-specific antibodies reached a certain level indicating that immune-complexed CPV could not be detected.

A reversion to virulence study of the CDV component was carried out demonstrating that the CDV MSV does not present a risk of reversion to virulence.

A user safety risk assessment was made in accordance with the '*Guideline on user safety for immunological veterinary medicinal products*'. No hazard was identified, and the risk can be considered very low. For the risk of self-administration, the standard warning was included in the product literature, which is acceptable.

No study of residues was performed, as Nobivac DP Plus is not intended for food producing species.

A laboratory 10x overdose and repeat safety study and a field trial were performed, in which the applicant wanted to demonstrate that Nobivac DP Plus can be mixed with Nobivac L4 instead of solvent and that Nobivac DP Plus can be concurrently given with Nobivac KC. The impact on the WBC was reflected in the proposed SPC. However, the proposed mixed use of Nobivac DP Plus with Nobivac L4 is not supported and therefore the advice regarding the mixed use with Nobivac L4 is waived.

A recombination event between the vaccine CPV strain and the CPV field strain is possible if the two viruses will infect the same cell, which is unlikely. This event is just as natural as a recombination between two field strains and it is not to be expected that a recombinant will have virulence factors, which are not already present in the contributing parent field strain. CDV is not readily amenable to recombination.

Part 4 – Efficacy

Introduction and general requirements

According to the approved claim, Nobivac DP Plus is intended for the active immunisation of puppies from four weeks of age onwards

- to prevent clinical signs and mortality of canine distemper virus infection and canine parvovirus infection and
- to prevent viral excretion following canine distemper virus infection and following canine parvovirus infection.

Onset of immunity: for canine distemper virus: 7 days
for canine parvovirus: 3 days

Duration of immunity: 8 weeks

Efficacy was demonstrated in compliance with the European Directive 2001/82/EC as amended, and the Ph. Eur. monograph 0062 (Vaccines for veterinary use), Ph. Eur. chapter 5.2.7 as well as Ph. Eur. monographs 0448 (Canine Distemper vaccine - live) and 0964 (Canine Parvovirus vaccine - live).

Challenge model:

The efficacy of CDV and CPV components of Nobivac DP Plus was assessed by challenges with heterologous challenge strains according to component-specific monographs.

CDV challenge strain

CDV strain Snyder Hill was isolated in 1950 in the United States from a dog showing generalised signs of distemper (Gillespie and Rickard 1956). Virus derived from the original isolate was used by Chalmers and Baxendale (1994) to challenge dogs vaccinated with Nobivac vaccine containing CDV strain Onderstepoort from the same lineage. The challenge material used in the studies provided for Nobivac DP Plus derived from the challenge virus used by Chalmers and Baxendale.

To validate the challenge model, one study was performed.

Five puppies, seronegative against CDV, were divided into two groups and challenged at 5 weeks of age:

Group 1: 2 puppies, challenged Snyder Hill virus [1 ml intravenously (i.v.)]

Group 2: 3 puppies, challenged Snyder Hill virus (1 ml i.v.)

After challenge, clinical signs, rectal temperature and body weights were recorded daily. Pathognomonic clinical signs of disease (malaise, reduced appetite, gastrointestinal and respiratory signs, tremor, weight loss) were seen in the pups of both groups. Virus was isolated post-challenge from nasal and conjunctival swabs of all puppies of group 1 and of 2/3 of group 2. The amount of virus used in group 1 was chosen since it induced pathognomonic signs of disease in all control animals. The challenge model is considered valid.

In the same study, the efficacy of the CDV Onderstepoort vaccine strain was assessed.

Five puppies were divided into two groups:

Group 3: 2 puppies were vaccinated with Nobivac DHPPi + Nobivac L4 at 4 weeks and 6 days of age (CDV titre: $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml). Seven days later they were challenged with Snyder Hill challenge strain.

資料2. 審査データの概要

Group 4: 2 controls, only vaccinated with Nobivac L4.

After challenge, clinical signs, rectal temperature, body weight, nasal and conjunctival swabs were taken daily. After challenge, both control pups had transient pyrexia, weight loss and clinical signs of disease (malaise, reduced appetite). One puppy had gastrointestinal distress and was euthanised. As the disease progression was somewhat delayed in comparison to previous studies, neurological disturbance was not seen in the controls. Due to facility constraints, the study design was not optimal, and the challenge phase was terminated 9 days after challenge. All pups were seronegative for CDV before vaccination and challenge. The vaccinates seroconverted by 16 days after vaccination and 9 days after challenge. Virus was isolated from the nasal and conjunctival swabs of one control puppy. No virus could be isolated from swabs taken from vaccinated pups.

It can be concluded that the canine distemper Onderstepoort vaccine strain provides a 7-day onset of immunity when administered from 4 weeks of age. As the challenge phase was not long enough this part of the study can be considered as information only.

CPV challenge strain

For CPV challenges, a pathogenic Italian 2c strain (136/006) was used. The pathogenicity of this strain was described by Spibey et. al. (2008). For all challenges the same dose of challenge virus was given by the oral route as described by Spibey et. al. This CPV challenge model was in use by the company for many years. Therefore, no further validation studies were performed. This is considered acceptable.

Efficacy parameters and tests:

The requirements for demonstrating the efficacy of the vaccine as specified in the "Requirements for immunological veterinary medicinal products" (Title II, Part 7 of the Annex to Directive 2001/82/EC as amended), in Ph. Eur. monographs 5.2.7. "Evaluation of efficacy of veterinary vaccines", 0062 "Vaccines for veterinary use", 0448 "Canine Distemper vaccine (live)" and 0964 "Canine Parvovirus vaccine (live)" were followed.

The challenge studies contained vaccine groups and for every vaccine group a corresponding unvaccinated control group. The results of the control and vaccine groups were evaluated according to the requirements of the specific Ph. Eur. monographs.

In addition, blood sampling was performed on several occasions during the studies. The serum was tested for antibodies against CDV (virus neutralisation test, VN test) and CPV (hemagglutination inhibition test, HAI and serum neutralisation test, SN test). The results of the vaccine group and control group were compared.

The test parameters can be regarded as adequate. Methods and appropriate validations for serological tests used in the clinical studies (the VN assay for CDV and the HAI test for CPV) are provided and are considered acceptable.

Efficacy documentation

Seven studies were conducted to investigate the efficacy of the product and included 6 laboratory studies and one field trial. Laboratory studies were well documented and carried out in puppies of the minimum age recommended for vaccination, using batches containing the minimum proposed titre of the CDV and CPV antigens. Production batches were used in the field trial.

Overview of the submitted efficacy studies:

資料2. 審査データの概要

Study title
Study to investigate the efficacy of an improved puppy DP vaccine in 4-week-old pups: canine distemper onset of immunity
Study to investigate the efficacy of an improved puppy DP vaccine in 4-week-old pups: canine parvovirus 3 days onset of immunity
Study to investigate the efficacy of an improved puppy DP vaccine in 4-week-old pups: canine distemper duration of immunity
Study to investigate the efficacy of an improved puppy DP vaccine in 4-week-old pups: canine parvovirus duration of immunity
Efficacy of the CDV Onderstepoort strain in 4-week-old pups with maternally derived antibodies
Efficacy of the CPV 630a strain in 4-week-old pups with maternally derived antibodies
A clinical study in Morocco to assess the safety and efficacy of a new Nobivac CPV2c/CDV vaccine in puppies

Laboratory trials

Dose determination

As regards the CPV component of Nobivac DP Plus one study was performed to determine the minimum immunisation dose.

In this study, the minimum effective dose for the CPV component of Nobivac DP Plus was established.

Twenty-one (21) SPF dogs, 10 weeks old, were divided into seven groups and vaccinated subcutaneously with 1 ml of the test article CPV 630a:

Group 1: 3 dogs, 10^5 TCID₅₀ of test article CPV 630a
Group 2: 3 dogs, $10^{5.5}$ TCID₅₀ of test article CPV 630a
Group 3: 3 dogs, 10^6 TCID₅₀ of test article CPV 630a
Group 4: 3 dogs, 10^5 TCID₅₀ of test article CPV 630a
Group 5: 3 dogs, $10^{5.5}$ TCID₅₀ of test article CPV 630a
Group 6: 3 dogs, 10^6 TCID₅₀ of test article CPV 630a
Group 7: 3 dogs, unvaccinated controls

All dogs were challenged orally with CPV-2c Italian field virus:

Groups 1, 2, 3 three days after vaccination; Groups 4, 5, 6 five days after vaccination.

Blood samples for serology were taken on D0, 5, 7, 11/12, 28; in groups 1, 2, 3 and 7 additionally on D2. Blood samples for white blood cell count were taken on D-1, -3, the day of challenge and D8, 10, 12 and 15 post-challenge. Clinical observation was performed daily, and the puppies were weight every day.

Rectal swabs were taken from D-1 until D21.

資料2. 審査データの概要

After challenge, there were no clinical signs of parvovirus infection in any of the vaccinates. With the exception of one dog, all rectal temperatures remained within normal parameters and did not exceed 39.5 °C. One dog had a temperature of 39.5 °C on D20; however, it is unlikely that this represents a challenge-related pyrexia. All dogs gained weight throughout the study. All vaccinates shed vaccine virus over a period of one to four days. The level or duration of shedding does not appear to correlate with the vaccine dose. The pups in groups 1, 2 and 3 begin to shed vaccine virus two days post vaccination, the pups in groups 4, 5 and 6 begin to shed vaccine virus four days post vaccination. The shedding of vaccine virus after challenge was confirmed by PCR. On the day of challenge, 2/3 dogs of groups 1 and 2, and all dogs of group 3 had begun to seroconvert in a dose-dependent manner. Two days post-challenge, all pups had strongly seroconverted.

All pups of groups 4, 5 and 6 seroconverted on the day of challenge. The antibody titres were maximal on D12 and remained high until the end of the study.

All control dogs were euthanised six days post-challenge with acute symptoms of haemorrhagic parvovirus infection. One dog had a spike in rectal temperature on D9 that coincided with the beginning of the symptoms. No pyrexia was seen in the other control dogs. All dogs gained weight until D9. In line with the beginning of clinical symptoms, they lost weight until the end of the study. All control pups began to shed field virus on D8; 3 days post challenge. The titres were maximal on D10 and remained high until the end of the study. Thymic hypoplasia was found in all control animals.

As regards the white blood cell count, 1/3 control animals showed a reduction > 50% of the baseline average but were euthanised before a full dataset could be obtained.

All pups were seronegative for CPV at the start of the study. They seroconverted 6 days post challenge.

In conclusion, the results of this study indicate that vaccination with CPV 630a with a titre of 10^5 TCID₅₀ is able to provide a 3-day onset of immunity against clinical signs and challenge virus shedding in 10-week old SPF pups.

Onset of immunity

Two studies were carried out in puppies in compliance with Ph. Eur. requirements to investigate the onset of immunity for the two antigens of Nobivac DP Plus.

CDV

Nine 4-week old SPF puppies, seronegative against CDV, were divided into two groups:

Six puppies were vaccinated on D0 with Nobivac DP Plus (subcutaneously, CDV potency $10^{5.1}$ TCID₅₀/dose) and Nobivac KC (intranasally), three control puppies were vaccinated on D0 with Nobivac KC (intranasally) only. Seven days after vaccination all dogs were challenged intravenously with canine distemper challenge virus Snyder Hill. The puppies were observed daily from D-1 to D28. Rectal temperature and body weight were determined daily from D-1 to D28. Blood samples for serology were taken on D-1, 7, 28 for all dogs and on D10 and 17 for the vaccinates. Nasal and conjunctival swabs were taken on D0, 7, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 24 and 28.

From vaccination to challenge all vaccinates and controls did not show any clinical signs, had temperatures in the physiological range (37.9 °C – 39.4 °C) and gained weight. As regards CDV, they were seronegative on the day of challenge. As regards CPV, the vaccinates had seroconverted on D7. The titres remained high until the end of the study. The controls remained seronegative throughout the study.

資料2. 審査データの概要

After challenge, one vaccinated puppy showed coughing and clear serous nasal discharge on study D13 and clear serous nasal discharge on D14. Another puppy coughed on D4 and vomited on D16. A third dog vomited on D19. All other vaccinates showed no clinical signs until the end of the study. All vaccinated puppies had temperatures in the physiological range and gained weight until the end of the study. The nasal and conjunctival swabs of the vaccinates were negative for CDV. Three days after challenge, the puppies seroconverted regarding CDV. The titres increased until the end of the study.

All control puppies showed severe clinical signs of distemper (coughing, sneezing, nasal discharge, malaise, reduced appetite, vomiting) starting 6 days after challenge. One puppy had respiratory clinical signs until the end of the study. The other two puppies developed neurological signs (tremor, chorea, twitching). One puppy had to be euthanised on study Day 16. A slight increase in temperature was noted in all three puppies after challenge. One puppy had pyrexia on study D16. Two puppies lost weight over two or more consecutive days. Viral shedding began 6 to 8 days (nasal) or 8 days (conjunctival) after challenge in 2/3 or 1/3 animals, respectively.

The two controls that survived the challenge had CDV titres at the end of the study.

The study was designed to meet the requirements of Ph. Eur. monograph 0448. However, two deviations were made:

- As the use of Nobivac DP Plus is intended for puppies of 4 weeks of age onwards, the age of the animals used in this study was 4 weeks of age instead of 8-16 weeks.
- As a short onset of immunity is applied for this vaccine, the time between vaccination and challenge was 7 days instead of 20-22 days.

These deviations from the immunogenicity test stated in the monograph are considered acceptable as they can be regarded as a worst-case scenario.

According to Ph. Eur. monograph 0448, the challenge is not valid if during the observation period after challenge fewer than 100% of the control dogs die or show notable signs of canine distemper. In this study, all control dogs developed severe clinical signs of distemper and one puppy had to be euthanised. Therefore, this requirement of the monograph is fulfilled, and the challenge is considered valid.

Ph. Eur. monograph 0448 states that "the vaccine virus complies with the test if during the observation period after challenge all the vaccinated dogs survive and show no signs of disease."

In this study, one puppy showed an incidental cough and clear serous nasal discharge on study D13 and D14. Another puppy coughed on D14 and vomited on D16. A third dog vomited on D19.

The applicant justified that these clinical signs are not related to the challenge as it is quite normal for puppies in this age to show these symptoms as they are continuously exposed to micro-organisms (food, mother, animal handlers, toys). Moreover, dogs are enthusiastic eaters and often eat too fast or too much, leading to the occasional vomit. Furthermore, the puppies in this study were concurrently vaccinated with Nobivac KC. Above observed clinical signs are described in section 4.6 of the SPC of Nobivac KC. Therefore, it is not finally possible to decide if the observed clinical signs of the vaccinates (coughing and nasal discharge) are attributable to the vaccination with Nobivac KC or to the challenge virus. In addition, as CDV challenge virus could not be isolated from the conjunctiva or upper respiratory tract of the vaccinates it is unlikely that the clinical observations are related to an infection with CDV. Therefore, the proposed claims "to prevent clinical signs" "prevention of viral shedding" and "to prevent mortality" are supported by this study.

CPV

資料2. 審査データの概要

Twelve 4-week old SPF puppies, seronegative against CPV, were divided into two groups:

Seven puppies were vaccinated on D0 with Nobivac DP Plus (subcutaneously, CPV potency $10^{5.1}$ TCID₅₀/dose), five control puppies did not receive a vaccination. Three days after vaccination all dogs were challenged orally with Italian CPV type 2c field strain. The puppies were observed daily from D-1 to D17. Rectal temperature and body weight were determined daily from D-1 to D17. Blood samples for serology and white blood cell count were taken on D-1, 0, 1, 3, 6, 8, 10, 13, 17. Rectal swabs were taken daily from D-1 to D17.

From vaccination to challenge all vaccinates and controls did not show any clinical signs, had temperatures in the physiological range (37.9 °C – 39.4 °C) and gained weight. Vaccine virus (confirmed by PCR) was isolated from the rectal swabs of the vaccinates over a one to five-day period from 2 to 6 days post vaccination. The swabs of the control dogs were negative for CPV until challenge.

All puppies were seronegative against CPV and CDV prior to vaccination. As regards CDV the vaccinated puppies showed a clear serological response at the end of the study. As regards CPV on the day of challenge (3 days after vaccination) all vaccinates showed a low seroconversion in the HAI and SN test.

After challenge, all vaccinated puppies did not show any clinical signs of CPV disease until the end of the study. They had temperatures in the physiological range and gained weight until the end of the study. No challenge virus was shed by any of the vaccinates. There was no evident leukopenia during the study. The serological response to CPV reached maximum levels by study D6 and D10 and remained high until the end of the study.

All control puppies showed severe clinical signs of canine parvovirus disease (quiet behaviour, malaise, lack of appetite, mucoid/haemorrhagic diarrhoea, dehydration, vomiting) starting 4 days after challenge. The puppies were euthanised 5 or 6 days after challenge. A transient pyrexia was observed in 3/5 puppies. All puppies lost weight over multiple consecutive days. Virus was isolated from the rectal swabs over a three to four-day period from 3 to 6 days post challenge. All controls shed high levels of field virus on D9, the day of euthanasia. Leukopenia was seen in 1/5 puppies and 3/5 puppies showed a low white blood cell count below the level considered normal for a dog. Since all control dogs were euthanised 5 or 6 days after challenge, it was not possible to obtain data until the end of the study. Seven days after challenge, all controls had seroconverted.

The study was designed to meet the requirements of Ph. Eur. monograph 0964. However, one deviation was made: As a short onset of immunity is applied for this vaccine, the time between vaccination and challenge was 3 days instead of 20-22 days. This deviation from the immunogenicity test stated in the monograph is considered acceptable as it can be regarded as a worst-case scenario.

This study fulfils the requirements of the monograph. Therefore, the proposed onset of immunity of 3 days is considered acceptable.

Duration of immunity

Two studies were carried out in puppies to investigate the duration of immunity for the two antigens of Nobivac DP Plus.

CDV

Eleven 4-week old SPF puppies, seronegative against CDV, were divided into two groups:

Group 1 (6 puppies) was vaccinated on D0 with Nobivac DP Plus reconstituted in Nobivac L4 (subcutaneously, CDV potency $10^{5.1}$ TCID₅₀/dose) and Nobivac KC (intranasally). Group 2 (5 control puppies) was vaccinated on D0 with Nobivac L4 (subcutaneously) and Nobivac KC (intranasally). Four

資料2. 審査データの概要

weeks after the first vaccination all dogs of groups 1 and 2 received a second vaccination with 0.5 ml Nobivac L4. 8 weeks after the first vaccination all dogs were challenged intravenously with canine distemper challenge virus Snyder Hill (/dog). The puppies were observed daily from D54 to D77. Rectal temperature and body weight were determined daily from D54 to D77. Blood samples for serology were taken on D0, 28, 56 and 77. Nasal and conjunctival swabs were taken on D0, 56, 59, 62, 64, 66, 69, 71, 73, 77.

One vaccinated puppy showed lachrymation on several days after challenge. Another puppy had a petechial chest rash on several days after challenge. A third dog showed lachrymation and a petechial chest rash on several days after challenge. All other vaccinates remained healthy until the end of the study. All vaccinated puppies had temperatures in the physiological range and gained weight until the end of the study. The nasal and conjunctival swabs of the vaccinates were negative for CDV. All vaccinates had seroconverted on D28 with high titres. The titres remained high until the end of the study. As regards CPV, all vaccinates had seroconverted on D28 with high titres. The titres remained high until the end of the study. All vaccinates remained seronegative against CPiV throughout the study. All vaccinates had seroconverted against *B. bronchiseptica* on the day of challenge. As regards *Leptospira* (*L.*) *Australis*, *Grippotyphosa* and *Canicola* all animals of group 1 had seroconverted on the day of challenge. Regarding *L. Icterohaemorrhagiae* the dogs of group 1 did not show any seroconversion.

All control puppies showed severe clinical signs of distemper: respiratory/gastrointestinal phase with diarrhoea, coughing, malaise, reduced appetite, vomiting starting 4 days after challenge and epithelial phase with petechial abdominal and/or groin rash starting 10 days after challenge. Transient pyrexia was noted in all puppies several days after challenge. Sustained weight loss over multiple consecutive days was seen in each puppy during the first phase of the disease. Viral shedding began 3 to 6 days (nasal) or 3 to 8 days (conjunctival) after challenge and was detectable over a 3 to 8 days period. As regards CDV the animals remained seronegative until the challenge and had seroconverted at the end of the study. Regarding CPV the control animals remained seronegative until the end of the study. The control animals were seropositive against *B. bronchiseptica* on D0. The titres declined until challenge. It is likely that the dogs were infected with *B. bronchiseptica* during the transport, which took place two weeks before. The animals had seroconverted against CPiV on Day 28. The titres declined until challenge. It is likely that the infection with *B. bronchiseptica* caused tissue damage, which might be an aid in the opportunistic growth of the canine parainfluenza vaccine strain. This combination could have resulted in the enhanced antibody response. As regards *L. Australis*, *Grippotyphosa* and *Canicola* all animals of Group 2 had seroconverted on the day of challenge. Regarding *L. Icterohaemorrhagiae* 4/5 dogs of Group 2 had seroconverted on the day of challenge.

The study was designed to meet the requirements of Ph. Eur. monograph 0448.

According to this monograph the challenge is not valid if during the observation period after challenge fewer than 100% of the control dogs die or do not show notable signs of canine distemper. In this study, all control dogs developed severe clinical signs of distemper and one puppy had to be euthanised. Therefore, this requirement of the monograph is fulfilled, and the challenge is considered valid.

Ph. Eur. monograph 0448 states that "the vaccine virus complies with the test if during the observation period after challenge all the vaccinated dogs survive and show no signs of disease."

In this study, one puppy showed lachrymation on several days after challenge. Another puppy had a petechial chest rash on several days after challenge and a third puppy showed lachrymation and a petechial chest rash on several days after challenge. The applicant is of the opinion that these clinical signs are not related to the challenge. As lachrymation is observed in most of the puppies in all laboratory studies it can be concluded that it is not related to the CDV challenge. As regards the

資料2. 審査データの概要

abdominal rash observed in the vaccinates the applicant states that it can be regarded as a sign of an active immune system neutralising a low level of the challenge virus in the epithelium. The observation of a more severe rash in all of the surviving controls indicates a much higher level of virus replication and inflammation, in line with the clinical signs of systemic disease. This explanation is considered acceptable. Therefore, the requirement of the monograph is fulfilled and the proposed duration of immunity of 8 weeks is considered acceptable.

CPV

Ten 4-week old SPF puppies, seronegative against CPV, were divided into two groups:

Group 1 (7 puppies) was vaccinated on D0 with Nobivac DP Plus (subcutaneously, CPV potency $10^{5.0}$ TCID₅₀/dose) and Nobivac KC (intranasally). Group 2 (3 control puppies) was vaccinated on D0 with Nobivac KC (intranasally). 8 weeks after vaccination all dogs were challenged orally with Italian CPV type 2c field strain. The puppies were observed daily from D0 to D71. Rectal temperature and body weight were determined daily from D55 to D71. Blood samples for serology and white blood cell count were taken on D0, 6, 10, 17, 28, 49, 53, 55, 57, 60, 62, 64, 67, 71. Rectal swabs were taken on D0, then daily from D55 to D71.

All vaccinates did not show any clinical signs, had temperatures in the physiological range (37.9 °C – 39.4 °C) and gained weight. One vaccinated puppy showed lachrymation on D56, 62, 69, 70, 71. As lachrymation was also observed in the vaccination phase, it is not related to the challenge. The rectal swabs of all vaccinated puppies were negative for CPV. In group 1, there was no leukopenia evident during the study. All vaccinates had seroconverted against CDV on D17. The titres remained high until challenge. All vaccinates had seroconverted against CPV 2a, 2b and 2c on D6 with high titres. The titres remained high until the end of the study.

All control puppies showed typical clinical signs of canine parvovirus. The first signs of disease began 3 to 4 days after challenge (malaise, soft faeces, vomiting). The symptoms rapidly progressed (loose mucoid/haemorrhagic diarrhoea, dehydration, abdominal pain, vomiting). Five days after challenge the dogs were euthanised on humane grounds. Transient increase in rectal temperature was noted in all puppies. Sustained weight loss over multiple consecutive days was seen in each puppy until they had to be euthanised. CPV was isolated over a period of three to five days, 1 to 5 days after challenge. All control dogs shed high levels of challenge virus until they were euthanised. Leukopenia (drop in white blood cell count below 50% of the pre-challenge baseline mean) was evident in none of the control pups. However, a drop in the white blood cell counts was seen five days after challenge. Since all of the control animals were euthanised on humane grounds on this day, it was not possible to obtain the full complement of white blood cell measurements. The control animals remained seronegative against CDV and CPV until challenge. After challenge, they developed antibody titres against CPV 2a, 2b and 2c.

This study fulfils the requirements of Ph. Eur. monograph 0964. The proposed claims “to prevent clinical signs and mortality of canine parvovirus infection and to prevent viral excretion following canine parvovirus infection” are supported by this study. Therefore, the proposed duration of immunity of 8 weeks is considered acceptable.

Maternally derived antibodies (MDA)

Since Nobivac DP Plus is intended for puppies from 4 weeks of age onwards, two laboratory studies to investigate the influence of maternally derived antibodies on the efficacy of the vaccine were performed.

CDV

Sixteen 4-week old SPF puppies, seropositive against CDV, were divided into two groups:

資料2. 審査データの概要

Group 1 (10 puppies) was vaccinated on D0 with Nobivac DP Plus (subcutaneously, CDV potency $10^{5.1}$ TCID₅₀/dose). Group 2 (6 control puppies) was not vaccinated. The puppies were observed daily from D0 to D35. Blood samples for serology were taken weekly on D0, 7, 14, 21, 28 and 35. Nasal and conjunctival swabs were taken on D0. All puppies (vaccinates and controls) did not show any clinical signs during the study. The nasal and conjunctival swabs of all puppies (vaccinates and controls) were negative for CDV. Three puppies of group 1 seroconverted 14 days after vaccination. Their CDV titres on D0 were 16 and 40. Puppies with higher titres did not seroconvert after vaccination. Despite a history of frequent vaccinations, the mother of the puppies of group 2 had a low antibody titre on D0. Therefore, all her puppies had low maternally derived antibodies on D0. The puppies were seronegative on D7 and remained seronegative until the end of the study. The applicant is of the opinion that the low maternal antibody titres in the control pups do not invalidate the overall interpretation of the data from the vaccinates. As the live attenuated canine distemper Onderstepoort vaccine virus strain is not shed from the dogs after vaccination, the efficacy of vaccination in the presence of maternally derived antibodies can be assessed without the need for a control group.

The study indicated that the presence of >40 VN₅₀ units of maternally derived antibodies against CDV may influence the efficacy of the CDV component of Nobivac DP Plus. The relevance of this finding for the use of the vaccine in the field is, however, limited if no information is given about levels of MDAs expected in puppies from regularly vaccinated bitches, i.e. under normal field conditions. The study shows that vaccination with Nobivac DP Plus was able to break through in dogs with MDA levels ≤ 40 VN₅₀. However, only three of the 10 dogs that were included in the study had MDAs below ≤ 40 VN₅₀. Considering the low number of animals in the study the relevance of the cut-off level is uncertain. Therefore, more data on the levels of maternally derived antibodies against CDV present in young puppies (born from mothers which were vaccinated against CDV with different distemper vaccines) are provided. Data provided show that the majority of 4-6-week-old puppies have antibody titres ≤ 40 VN₅₀ units, but not all. It is advised in the SPC and package leaflet to vaccinate 6-week-old puppies with Nobivac DP Plus followed by vaccinations with other core vaccines against canine distemper, canine parvovirus, canine contagious hepatitis and respiratory disease caused by adenovirus type 2 infection. This information for the practitioner is considered acceptable.

CPV

Sixteen 4-week old SPF puppies, seropositive against CPV, were divided into two groups:

Group 1 (11 puppies) was vaccinated on D0 with Nobivac DP Plus (subcutaneously, CPV potency $10^{5.1}$ TCID₅₀/dose). Group 2 (5 control puppies) was not vaccinated. The puppies were observed daily from D0 to D59. Blood samples for serology were taken twice a week on D-8, 0, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 31, 34, 38, 41, 45, 48, 52, 55, 59. Rectal swabs were taken on D0. All puppies (vaccinates and controls) did not show any clinical signs during the study. The rectal swabs of all puppies (vaccinates and controls) were negative for CPV. On the day of vaccination, the range of maternally derived antibodies against CPV-2c measured in the vaccinates was between 288 and 1664 HAI units and 806 and 4525 SN₅₀ units, respectively. All vaccinated puppies seroconverted prior to the decay of maternally derived antibodies in the controls. The first puppies seroconverted on D7. All puppies had seroconverted by D52. After seroconversion, the titres remained high until the end of the study. On the day of vaccination, the range of maternally derived antibodies against CPV-2c measured in the controls was between 288 and 832 HAI units and 640 and 4032 SN₅₀ units, respectively. The antibody titres declined continuously (half-life of approximately 11 to 14 days) until the end of the study.

In this study, it was demonstrated that the vaccine was able to break through HAI antibody titre levels against CPV-2c varying between 288 and 1664 HAI units and 806 and 4525 SN₅₀ units respectively. Therefore, it can be concluded that maternally derived antibodies against CPV do not have a negative influence on the immune response to vaccination with Nobivac DP Plus. This is reflected in section 5 of

資料2. 審査データの概要

the SPC: "Maternally derived antibodies against canine parvovirus do not interfere with the efficacy of this product."

Interactions

As regards section 4.8 of the SPC the following wording is proposed:

"Safety data are available which demonstrate that this vaccine can be administered on the same day but not mixed with vaccine of the Nobivac series containing Bordetella bronchiseptica and canine parainfluenza virus components for intranasal administration. Efficacy after concurrent use has not been tested. Therefore, while safety of concurrent use has been demonstrated, the veterinarian should take this into account when deciding to administer the products at the same time."

This wording is considered acceptable.

Field trials

One field study was performed in two private kennels in Morocco under GCP conditions. As no control group was included, it was an open-label study. 89 dogs of different breeds (Pinscher, Spitz, Bichon, Cocker Spaniel, Spaniel, Husky, German Shepherd crossed with Belgian Shepherd, German Wirehaired Pointer, German Short Hair, Dobermann, Rottweiler), 25-43 days of age, male and female were included in the study. In 2015 there were 3 cases of CPV infection in litters from one breeder and in 2016 there were cases of kennel-cough in litters from the other breeder. No new cases since then were noticed for both infections. As two puppies died during the study (1 Pinscher on Day 4 due to ascariasis, 1 Spitz on D12 due to haemorrhagic gastric ulcers) the results of 87 puppies were assessed. Two batches of Nobivac DP Plus were used (CPV potency: $10^{5.8}$ TCID₅₀/dose, CDV potency: $10^{5.2}$ TCID₅₀/dose and CPV potency: $10^{5.9}$ TCID₅₀/dose, CDV potency: $10^{6.4}$ TCID₅₀/dose). All dogs were vaccinated subcutaneously on D0 with Nobivac DP Plus mixed with Nobivac L4 (0.5 ml). Blood samples for serology and rectal swabs were taken on D-3 and D21. The mothers of the puppies were weighed on D-3 and D21 and blood samples for serology and rectal swabs were taken on the same days.

To assess the efficacy of Nobivac DP Plus the antibody titres against CDV and CPV were measured three weeks after vaccination. Seroconversion was determined based on an expected half-life of CDV and CPV MDA titres of approximately 10 days; i.e. the titre of the sample on D21 had to be higher than 25% ($\frac{1}{4}$) of the titre of the sample taken on D-3 in order to count a puppy as having seroconverted. The choice for a half-life of CDV and CPV of 10 days was based on Wilson et al. (2014) and Pollock and Carmichael (1982), respectively.

For the HAI test performed in the applicant's laboratory < 8 (1 in 2 dilution) or < 16 (1 in 4 dilution) HAI units are the limits of detection.

For the VN test performed in the applicant's laboratory ≤ 4 VN₅₀ is the limit of detection. 79/87 (91%) puppies seroconverted to CPV and 86/87 (99%) puppies seroconverted to CDV after vaccination. The nine puppies that did not seroconvert were not those with the highest MDA levels. However, this is not unusual as under field conditions there are always some puppies that do not seroconvert after vaccination for other reasons than the interference of MDAs.

The field study was performed in Morocco, which is outside the EU. The applicant argues that the study was carried out by a contract research organisation in accordance with GCP as required by EU Directive 2001/82/EC. The vaccinated puppies were of breeds that are also kept in the EU and the housing and daily husbandry of the bitches with pups were also comparable to the EU. Therefore, the conditions were representative for the EU as required by EMEA/CVMP/852/99-FINAL.

資料2. 審査データの概要

The applicant chose 2 private kennels for the field study. However, only one litter from one kennel (3 Cocker Spaniel puppies) was included in the study. All other litters (84 puppies) came from the second kennel. The applicant explains that on the first site, the number of litters at the time of the study was less than expected at start of the study. This is considered acceptable.

According to EMEA/CVMP/852/99-FINAL, the trial shall, unless justified, compare a group of vaccinated animals with an equivalent group of unvaccinated or placebo controls. In this study, no control group was included. The applicant states that Nobivac DP Plus is a live vaccine and, as is the case for all live CPV vaccines for dogs in susceptible animals, the CPV component is shed and spread via the faecal-oral route. Preventing the spread of vaccine virus to e.g. unvaccinated control animals is virtually impossible in a field situation. As it was a combined safety and efficacy study, control animals could have become seropositive due to spread of the vaccine strain by vaccinated animals, which might have compromised the outcome with regard to the efficacy part of the study. Therefore, it was decided not to include a control group in this field study. This is considered acceptable.

In the CPV MDA laboratory study Nobivac DP Plus batch 12I17b was used. 4/11 puppies (36%) did not seroconvert within 21 days after vaccination but at a later time point (D28, 41 and 52). In the field study two different batches were used. Within 21 days after vaccination 47/47 puppies (100%) and 34/42 puppies (81%) seroconverted with batch CPC15.20.206Z and 25D17, respectively. However, the study was terminated on day 21. Therefore, it was not possible to detect an antibody titre increase at later time points.

Overall conclusion on efficacy

Six laboratory studies and one field study were conducted to evaluate the efficacy of Nobivac DP Plus.

The minimum protective dose of $10^{5.1}$ TCID₅₀ for CDV and CPV could be demonstrated.

The onset of immunity of 7 days for CDV and of 3 days for CPV was shown as well as a duration of immunity of 8 weeks for both antigens.

As regards the efficacy of Nobivac DP Plus, the applicant proposes the following claims for the CDV component: "prevent clinical signs and mortality of canine distemper virus infection and prevent viral excretion following canine distemper virus infection". The claims are considered supported by the studies.

As regards the CPV component the proposed claims "to prevent clinical signs and mortality of canine parvovirus infection and to prevent viral excretion following canine parvovirus infection" are supported by the studies.

Since Nobivac DP Plus is intended for puppies from 4 weeks of age onwards, two laboratory studies to investigate the influence of maternally derived antibodies on the efficacy of the vaccine were performed.

Based on the results of these studies and additional data about the levels of maternally derived antibodies against CDV present in young puppies (born from mothers which were vaccinated against CDV with different distemper vaccines) the following is stated in section 4.4 of the SPC: "*Moderate to high levels of maternally derived antibodies against canine distemper virus can reduce the efficacy of the product against canine distemper*". In section 5 of the SPC it is stated that "*Immunity against canine distemper virus is achieved in animals of 4 weeks of age with low to moderate levels of maternal antibodies. Maternally derived antibodies against canine parvovirus do not interfere with the efficacy of this product.*" This is considered acceptable.

資料2. 審査データの概要

It is proposed to allow the use of Nobivac DP Plus with the intranasal vaccine Nobivac KC on the same day. However, the absence of sufficient data in support of efficacy for Nobivac KC when used this vaccine in combination with Nobivac DP Plus is stated in SPC section 4.8.

The advice for the mixed use with Nobivac L4 was deleted.

An advice for the practitioner on how to use this vaccine and when to continue the routine vaccination with other vaccines in order to achieve appropriate protection against the major infectious diseases of young dogs is included in the SPC and package leaflet.

Part 5 – Benefit-risk assessment

Introduction

Nobivac DP Plus is a bivalent live virus vaccine, which is indicated for the immunisation of healthy puppies from four weeks of age onwards by one subcutaneously injection to prevent clinical signs, mortality and viral excretion following canine distemper virus infection and to prevent clinical signs, mortality and viral excretion following canine parvovirus infection.

It is the successor vaccine of the nationally licensed product Nobivac Puppy DP and contains the same CDV strain Onderstepoort. The CPV strain, however, was replaced by the live CPV recombinant vaccine strain 630a.

Nobivac DP Plus is presented as a freeze-dried vaccine. Each vial contains one dose. Before use, the lyophilisate is reconstituted with 1 ml of solvent. No adjuvant or preservatives are included in this product.

The dossier was submitted in line with requirements of Article 12(3) of Directive 2001/82/EC.

The evaluation follows Guideline EMEA/CVMP/248499/2007 (Recommendation on the evaluation of the benefit risk balance of veterinary medicinal products).

Benefit assessment

Direct therapeutic benefit

The vaccine components CDV and CPV are directed against canine infectious diseases present and widespread in most European countries. The vaccine protects against distemper and parvovirosis which are serious illnesses and often fatal in young dogs.

Well-conducted controlled laboratory trials demonstrated that the product is efficacious. The following SPC claims are proposed by the applicant:

For the active immunisation of puppies from 4 weeks of age onwards to prevent clinical signs and mortality of canine distemper virus infection and canine parvovirus infection and to prevent viral excretion following canine distemper virus infection and following canine parvovirus infection.

Onset of immunity: for canine distemper virus: 7 days;
 for canine parvovirus: 3 days.

Duration of immunity: 8 weeks.

資料2. 審査データの概要

A direct beneficial effect is seen based on the individual animal, which is protected from canine distemper and canine parvovirus.

Two studies were performed to assess the possible influence of maternally derived antibodies on the antibody response to CDV and CPV. Regarding CDV a negative influence of maternally derived antibodies on the antibody response to CDV after vaccination was shown. Advice for the practitioner on how to use this vaccine and when to continue the routine vaccination with other vaccines in order to achieve appropriate protection against the major infectious diseases of young dogs is included in the SPC and package leaflet.

As regards the CPV component it could be shown that the maternally derived antibody titres did not have a negative influence on the active immunity against CPV. This property of the vaccine helps very young puppies to overcome the so-called "window of susceptibility" or "immunity gap" which is a dangerous period of time during which maternally derived antibodies have fallen below protective levels against virulent field strains but are still able to interfere with the efficacy of the vaccination. The very short onset of immunity (3 days for CPV and 7 days for CDV) is a benefit for those puppies, which do not have maternally derived antibodies and are therefore fully susceptible for infections with CDV and CPV.

Additional benefits

As vaccination with Nobivac DP Plus leads to prevention of viral excretion following CDV infection and following CPV infection, the vaccination will not only prevent dog-to-dog transmission of field virus but also the transmission to other susceptible in-contact species.

Risk assessment

Quality:

Development, manufacture and control of the active substance and finished product is well described and ensure a consistent quality of the finished product.

Safety:

The main potential risks are identified as follows:

For the target species and non-target species:

Subcutaneous injection of Nobivac DP Plus induces soft diffuse painless thickening at the injection sites up to 1 cm, which is normally resolved within 1 to 7 days post vaccination. During or immediately after vaccination whining and/or scratching at the injection site may occur.

After mixed administration with a leptospirosis vaccine, a transient reduction of white blood cells counts in circulating blood below 50% of their mean baseline value was observed on D3, 5 and 7 after vaccination. However, the mixed use of the vaccine with a leptospirosis vaccine is not further advised.

Studies have been carried out in pups of the most sensitive category of target animals, i.e. 4-week-old SPF pups.

Nobivac DP Plus is restricted to the infection of dogs and other animals of the family Canidae, as well as members of the family Felidae (e.g. domestic cats) and Procyonidae (e.g. raccoons). Accordingly, a warning has been included in section 4.5 of the SPC indicating that the vaccine virus may spread to cats after contact with primary vaccinated dogs or faeces of dogs and maybe also spread to other cats without the induction of clinical signs.

資料2. 審査データの概要

Risk for the user:

The risk of accidental self-injection of the vaccine to the user is very low. The consequences of accidental self-injection are negligible. In addition to it, there are no user safety issues identified.

Risk for the environment:

As regards the assessment in accordance with Directive 2001/18/EC, all points to be considered for a live recombinant vaccine have been addressed. In respect of the live CPV recombinant vaccine strain 630a, the GMO poses no enhanced risk for target and non-target animals, environment and humans even though the vaccine virus is transferred via the faeces of a vaccinated dog to another animal.

There are no indications that recombination or reversion to virulence occurs under field conditions. Therefore, the risk that a hazard occurs is considered as low.

For the CDV component there are no potential risks for the environment since this strain is not shed by vaccinated animals. The CDV strain is derived from the same seed lineage as the CDV that has been used for a long period by the company as a live vaccine strain. Environmental problems and reversion to virulence have not been reported for CDV derived from this lineage. Therefore, the risk that a hazard occurs is considered as negligible.

Risk management or mitigation measures

Appropriate information has been included in the SPC to inform on the potential risks of this product relevant to the target animal, user and environment and to provide advice on how to prevent or reduce these risks. A warning for the contact of cats with recently vaccinated pups or their faeces and spreading to other cats in alignment with the results of the non-target safety studies is included in the SPC under section 4.5.

Environmental safety:

The assessment of level of risk for the environment for Nobivac DP Plus can be considered as low. Second phase evaluation is not considered necessary. The environmental risk assessment in accordance with the principles of Annex II of Directive 2001/18/EC is considered low.

Evaluation of the benefit-risk balance

Based on the available data, the CVMP concludes that the benefit-risk balance is positive.

Conclusion

Based on the original and complementary data presented on quality, safety and efficacy the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) concluded that the application for Nobivac DP Plus is approvable since these data satisfy the requirements for an authorisation set out in the legislation (Regulation (EC) No 726/2004 in conjunction with Directive 2001/82/EC).

The CVMP considers that the benefit-risk balance is positive and, therefore, recommends the granting of the marketing authorisation for the above mentioned veterinary medicinal product.

資料2. 審査データの概要

別添資料 36 Nobivac Puppy DP Plus のオーストラリア遺伝子技術規制官局 環境リスクアセスメント
(Australian OGTR Risk Assessment and Risk Management Plan for DIR 202: Commercial supply
of a live attenuated vaccine containing canine distemper virus and a genetically modified canine
parvovirus (Nobivac Puppy DP Plus) for dogs)

(表紙)



Australian Government

Department of Health and Aged Care
Office of the Gene Technology Regulator

Risk Assessment and Risk Management Plan for

DIR 202

Commercial supply of a live attenuated vaccine
containing canine distemper virus and a
genetically modified canine parvovirus (Nobivac
Puppy DP Plus) for dogs

Applicant: Intervet Australia Pty Ltd

24 August 2024

PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK

Summary of the Risk Assessment and Risk Management Plan for Licence Application DIR 202

Decision

The Gene Technology Regulator (the Regulator) has decided to issue a licence for import, transport, storage and disposal for the commercial supply of a live attenuated vaccine containing canine distemper virus (CDV) and a genetically modified (GM) canine parvovirus (CPV) (Nobivac Puppy DP Plus) for dogs. These activities are classified as Dealings involving the Intentional Release (DIR) of genetically modified organisms into the Australian environment under the *Gene Technology Act 2000*.

Before the vaccine containing a GM component can be used, Intervet Australia Pty Ltd must also obtain regulatory approval from the Australian Pesticide and Veterinary Medicines Authority (APVMA). The APVMA administers the *Agricultural and Veterinary Chemicals Code Act 1994* (the Agvet Code) to regulate agricultural and veterinary chemical products, including veterinary vaccines. For commercial products, the standard form of approval is through registration. The APVMA can impose conditions on the use of veterinary products via registrations and permits.

The Regulator has prepared a Risk Assessment and Risk Management Plan (RARMP) for this application, which concludes that the proposed supply of the GM vaccine poses negligible risks to human health and safety and negligible risks to the environment. Licence conditions have been imposed for the proposed supply.

The application

Application number	DIR-202
Applicant	Intervet Australia Pty Ltd
Project title	Commercial supply of a live attenuated vaccine containing canine distemper virus and a genetically modified canine parvovirus (Nobivac Puppy DP Plus) for dogs ¹
Parent organism	Canine parvovirus type 2 (CPV-2)
Introduced gene and modified trait	Introduction of a wild type CPV-2c capsid into the attenuated CPV 154 strain, resulting in an attenuated live vaccine that does not cause severe disease in dogs.
Previous releases	The GM vaccine has not been previously approved for release in Australia
Current approvals	The GM vaccine is currently approved for use in 36 countries by the European Medicines Agency and the Philippines Federal Drug Administration.
Proposed locations	Australia-wide
Primary purpose	Commercial supply of the GM vaccine against CDV and CPV-2 in dogs.

¹ The title for the licence application submitted by Intervet Australia Pty Ltd is “Nobivac Puppy DP Plus Live Vaccine”.

Risk assessment

The risk assessment process considers how the genetic modification and activities conducted with the GM vaccine in the context of import, transport, storage and disposal might lead to harm to people or the environment. Risks are characterised in relation to both the seriousness and likelihood of harm, taking into account information in the application, relevant previous approvals, current scientific knowledge and advice received from a wide range of experts, agencies and authorities consulted on the preparation of the RARMP. Both the short- and long-term risks were considered.

Credible pathways to potential harm that were considered include; the potential exposure of people to the GMO; the potential exposure of animals to the GMO; and the potential for the GMO to recombine with other similar viruses. The potential for the GMO to be released into the environment and its effects were also considered.

The risk assessment concludes that risks to the health and safety of people are negligible and the risks to the environment from the proposed supply of this vaccine are negligible. Specific risk treatment measures are included in the licence to maintain the risk context.

The principal reasons for the conclusion of negligible risks associated with import, transport, storage and disposal of the GMO are:

- The GMO has a limited host range, is attenuated and unlikely to cause disease in dogs or other susceptible mammalian species;
- Canine parvovirus does not cause disease in humans or animals other than dogs, except for some susceptible mammalian carnivore species including big cats;
- The likelihood of accidental exposure to the GMO by people and the environment would be minimised due to well-established transport, storage and disposal procedures that are regulated by each State and Territory; and local councils;
- The GMO would be imported under a Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (DAFF) import permit, that requires specific import conditions to manage biosecurity risks;
- The GMO would need to be registered with the APVMA, who would impose conditions on the use, transport, storage and disposal of the vaccine; and
- Recombination of the GMO with another parvoviruses is possible but since the vaccine contains genetic material from CPV-2 similar to that circulating in Australia, similar genetic material would already be present in the environment.

Risk management

Risk management is used to protect the health and safety of people and to protect the environment by controlling or mitigating risk. The risk management plan evaluates and treats identified risks and considers general risk management measures. The risk management plan is given effect through licence conditions.

The risk management plan concludes the negligible risks can be managed to protect the health and safety of people and the environment. The risk of recombination leading to novel CPV-2 strains was assessed as negligible given the risk context in which the dealings would be conducted which includes APVMA registration. To maintain critical aspects of the risk context, a condition requiring the licence holder to advise end users of the vaccine to only vaccinate healthy dogs, and to follow recommended vaccination schedule is included in the licence.

General conditions were also included in the licence to ensure that there is ongoing oversight of the GM vaccine. Conditions were included requiring the applicant to report any new information obtained after release of the GMO to allow the collection of information to verify the findings of the RARMP. Post-market surveillance of veterinary vaccines is carried out in an ongoing capacity by State and Territories. The licence also contains a number of general conditions relating to ongoing licence holder suitability, auditing and

monitoring, and other reporting requirements, which include an obligation to report any unintended effects.

Table of contents

SUMMARY OF THE RISK ASSESSMENT AND RISK MANAGEMENT PLAN	I
DECISION	I
THE APPLICATION	I
RISK ASSESSMENT	II
RISK MANAGEMENT	II
TABLE OF CONTENTS	IV
ABBREVIATIONS	VI
CHAPTER 1 RISK ASSESSMENT CONTEXT	1
SECTION 1 BACKGROUND	1
1.1 Interface with other regulatory schemes	2
SECTION 2 THE PROPOSED DEALINGS	2
2.1 Details of the proposed dealings	3
SECTION 3 PARENT ORGANISM	3
3.1 Pathology	4
3.2 Structure and genomic organisation	4
3.3 Viral infection and replication	5
3.4 Variants and potential for recombination of CPV-2	6
3.5 Epidemiology	7
SECTION 4 THE GM VACCINE - NATURE AND EFFECT OF THE GENETIC MODIFICATION	9
4.1 The genetic modifications	9
4.2 Characterisation of the GMO	9
SECTION 5 THE RECEIVING ENVIRONMENT	11
5.1 Site of vaccination	11
5.2 Dog breeders	11
5.3 Domestic dogs	13
5.4 Canine recommended vaccination schedule	13
5.5 Biosecurity	14
5.6 Presence of related viral species in the receiving environment	14
5.7 Presence of similar genetic material in the environment	15
5.8 Potential hosts in the environment	15
SECTION 6 PREVIOUS AUTHORISATIONS	15
CHAPTER 2 RISK ASSESSMENT	16
SECTION 1 INTRODUCTION	16
SECTION 2 RISK IDENTIFICATION	17
2.1 Risk source	17
2.2 Causal pathway	18
2.3 Potential harms	19
2.4 Postulated risk scenarios	19
SECTION 3 RISK CHARACTERISATION	26
3.1 Risk Scenario 3	26
SECTION 4 UNCERTAINTY	30
SECTION 5 RISK EVALUATION	30
CHAPTER 3 RISK MANAGEMENT PLAN	32
SECTION 1 BACKGROUND	32
SECTION 2 RISK TREATMENT MEASURES FOR SUBSTANTIVE RISKS	32
SECTION 3 GENERAL RISK MANAGEMENT	32

3.1	Applicant suitability	33
3.2	Testing methodology	33
3.3	Identification of the persons or classes of persons covered by the licence	33
3.4	Modes of administration	33
3.5	Reporting requirements	33
3.6	Monitoring for compliance	34
SECTION 4	POST RELEASE REVIEW	34
4.1	Adverse effects reporting system	34
4.2	Requirement to monitor specific indicators of harm	34
4.3	Review of the RARMP	35
SECTION 5	CONCLUSIONS OF THE RARMP	35
REFERENCES		36
APPENDIX A: SUMMARY OF SUBMISSIONS		40
APPENDIX B: SUMMARY OF ADVICE ON CONSULTATION RARMP FROM PRESCRIBED AGENCIES AND STATE, TERRITORY AND LOCAL GOVERNMENT		42

資料2. 審査データの概要

Abbreviations

ACT	Australian Capital Territory
AgVet Code	<i>Agricultural and Veterinary Chemicals Code Act 1994</i>
AHA	Animal Health Australia
APVMA	Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority
CPV-2	Canine Parvovirus Type 2
DAFF	Department of Agriculture, Fisheries and Forestry
DIR	Dealings involving Intentional Release
DNA	Deoxyribonucleic acid
EPA	Environment Protection Authority
GLP	Good Laboratory Practice
GM	Genetically modified
GMP	Good Manufacturing Practice
GMO	Genetically modified organism
GTTAC	Gene Technology Technical Advisory Committee
HGT	Horizontal gene transfer
IR	internal repeat
kb	Kilobase pair of DNA
LGA	Local government area
ml	Milli litre
NSW	New South Wales
NT	Northern Territory
OGTR	Office of the Gene Technology Regulator
Orf	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
QLD	Queensland
RARMP	Risk Assessment and Risk Management Plan
RNA	Ribonucleic acid
SA	South Australia
TAS	Tasmania
the Act	<i>The Gene Technology Act 2000</i>
the Regulations	The Gene Technology Regulations 2001
the Regulator	The Gene Technology Regulator
USA	United States of America
VIC	Victoria
WA	Western Australia

Chapter 1 Risk assessment context

Section 1 Background

1. An application has been made under the *Gene Technology Act 2000* (the Act) for Dealings involving the Intentional Release (DIR) of genetically modified organisms (GMOs) into the Australian environment.
2. The Act and the Gene Technology Regulations 2001 (the Regulations), together with corresponding State and Territory legislation, comprise Australia's national regulatory system for gene technology. Its objective is to protect the health and safety of people, and to protect the environment, by identifying risks posed by or as a result of gene technology, and by managing those risks through regulating certain dealings with GMOs.
3. Section 50 of the Act requires that the Gene Technology Regulator (the Regulator) must prepare a Risk Assessment and Risk Management Plan (RARMP) in response to an application for release of GMOs into the Australian environment. Sections 50, 50A and 51 of the Act and sections 9 and 10 of the Regulations outline the matters which the Regulator must take into account and who must be consulted when preparing the RARMP.
4. The *Risk Analysis Framework* (RAF) (OGTR, 2013) explains the Regulator's approach to the preparation of RARMPs in accordance with the Act and the Regulations. The Regulator has also developed operational policies and guidelines that are relevant to DIR licences. These documents are available from the Office of the Gene Technology Regulator ([OGTR website](#)).
5. Figure 1 shows the information that is considered, within the regulatory framework above, in establishing the risk assessment context. This information is specific for each application. Risks to the health and safety of people or the environment posed by the proposed supply are assessed within this context. Chapter 1 describes the risk assessment context for this application.

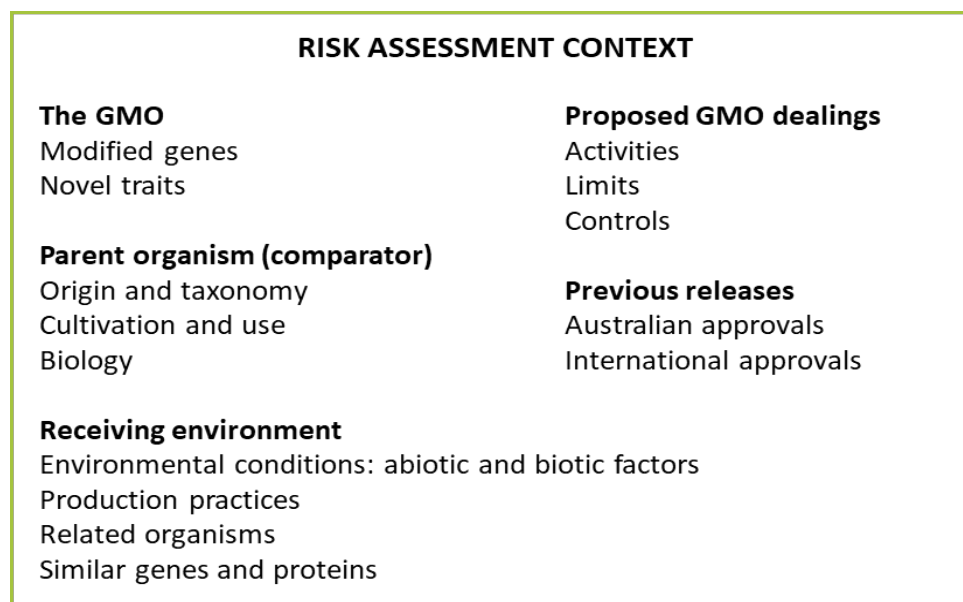


Figure 1. Summary of parameters used to establish the risk assessment context, within the legislative requirements, operational policies and guidelines of the OGTR and the RAF.

6. Since this application is for commercial purposes, it does not meet the criteria for a limited and controlled release application under section 50A of the Act. Therefore, under section 50(3) of the Act, the Regulator was required to seek advice from prescribed experts, agencies and authorities on matters relevant to the preparation of the RARMP. This first round of consultation included the Gene Technology Technical Advisory Committee (GTTAC), State and Territory Governments, Australian Government

authorities and agencies prescribed in the Regulations and the Minister for the Environment. A summary of issues contained in submissions received is provided in Appendix A.

7. Section 52 of the Act requires the Regulator to seek comment on the RARMP from the experts, agencies and authorities outlined above, as well as the public through a second round of consultation. Advice from the prescribed experts, agencies and authorities in the second round of consultation, and how it was taken into account, is summarised in Appendix B. No submissions were received from the public.

1.1 Interface with other regulatory schemes

8. Gene technology legislation operates in conjunction with other regulatory schemes in Australia. The GMOs and any proposed dealings conducted under a licence issued by the Regulator may also be subject to regulation by other Australian government agencies that regulate GMOs or GM products, including the Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA) and the Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (DAFF). Proposed dealings may also be subject to the operation of State legislation declaring areas to be GM, GM free, or both, for marketing purposes.

9. The APVMA provides a national registration and permit scheme for agricultural and veterinary chemical products. It administers the provisions of the *Agricultural and Veterinary Chemicals Code Act 1994* (AgVet Code). For registration, the APVMA assesses whether a new veterinary vaccine meets the criteria set out in the AgVet Code before it is registered in the Register of Agricultural and Veterinary Chemical Products. A new veterinary vaccine that is not registered may be legally used for animal trials by obtaining a permit from the APVMA.

10. As part of the registration process, the APVMA must first approve the new active constituent; and then assess the quality, safety and efficacy of the vaccine. Quality aspects could include batch-to-batch consistency in vaccine composition, purity and potency. The product must also be manufactured in premises that comply with Good Manufacturing Practice (GMP), which is also audited by the APVMA. Safety aspects include the toxicological profile of the vaccine and its residues, including metabolites and degradation products. The APVMA approves the label, which includes instructions for the handling, storing and directions for supply of veterinary vaccines to ensure safe use. The APVMA would also carry out an environmental risk assessment to minimise environmental risks. The APVMA may also impose conditions on a permit for the supply of veterinary vaccines for research purposes. The States and Territories are responsible for the enforcement of the conditions associated with an APVMA registration and carry out post-market surveillance.

11. To avoid duplication of regulatory oversight, risks that have been considered by other regulatory agencies would not be re-assessed by the Regulator.

12. For the commercial supply of a GM veterinary vaccine, dealings regulated under the Act include the import, transport, storage and disposal of GMOs. The Regulator has assessed risks to people as a consequence of conducting these activities and risks from persistence of the GMO in the environment.

Section 2 The proposed dealings

13. Canine parvovirus type 2 (CPV, or CPV-2) or *Protoparvovirus carnivoran 1* is a viral gastrointestinal infection, which is highly infectious and causes severe infection in dogs between 6 weeks and 6 months of age (Miranda and Thompson, 2016). There are three described antigenic variants of CPV-2, (CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c), with varied prevalence around the globe (Miranda and Thompson, 2016). The most prevalent antigenic variants detected in Australia are CPV-2a and CPV-2b, however CPV-2c has been detected in Australia since 2015 (Woolford et al., 2017). CPV-2 is transmitted by faecal to oral contact and is shed primarily in the faeces of infected dogs (Ogbu et al., 2017). Clinical symptoms occur 3 to 7 days after infection and present in two major clinical manifestations: gastroenteritis or myocarditis (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021). Both clinical forms can be fatal. There are currently 21 non-GM

live attenuated CPV-2 vaccines that are registered for use in Australia ([APVMA PubCRIS database](#)). These vaccines consist of attenuated strains of CPV-2.

14. Intervet Australia Pty Ltd (Intervet) is seeking authorisation for the commercial supply of a vaccine containing attenuated canine distemper virus (CDV) and genetically modified (GM) CPV-2 (known as Nobivac DP Puppy Plus) to prevent canine distemper disease and CPV disease in dogs Australia-wide.

15. For the ongoing commercial supply of the GM vaccine, the dealings assessed by the Regulator are to:

- (a) import the GMO;
- (b) transport the GMO;
- (c) dispose of the GMO;

and possession (including storage), supply or use of the GMO for the purposes of, or in the course of, any of the above.

2.1 Details of the proposed dealings

16. The vaccine, including the GM CPV-2 component, would be manufactured overseas in Good Manufacturing Practices (GMP) licensed sites and imported into Australia under an import permit from DAFF. The product would need to be registered through the APVMA before commercial use. As mentioned in Section 1.1, the APVMA would also approve the labels for the GM vaccine, which would contain instructions for the handling, storing and directions for supply to ensure safe use.

17. The vaccine would be transported to Schedule 4 licensed warehouses (prescription only medicines and prescription animal remedies, Therapeutic Goods (Poisons Standard – October 2023) Instrument 2023). The vaccine is freeze-dried in rubber stoppered vials with aluminium caps. The vial is contained within a product carton containing one vial and enough solvent to make up one dose. Cartons will be labelled with an approved APVMA label indicating the contents of the vial and an accompanying leaflet with instructions for use, storage and disposal. The label does not indicate that this vaccine contains a GM component but as part as the constituent statements, the label indicates that each dose contains a live attenuated canine distemper virus and a live recombinant canine parvovirus strain 630a.

18. The vaccine would be administered to dogs in the normal course of vaccination schedules, between 4 and 6 weeks of age. At this age, most young dogs are still with a breeder and are kept isolated to limit exposure to diseases. During vaccination periods, veterinarians also advise that dogs are kept indoors until the vaccines have been effective and to limit exposure between animals and the environment. The vaccine may also be used in outbreak areas to break the chain of transmission of wild-type CPV-2.

19. The applicant has stated that the vaccine would be used as per an approved APVMA registration.

20. Administration of the vaccine will occur via subcutaneous injection into the scruff of the neck by trained veterinarians. The applicant proposes to register this method of administration with the APVMA.

21. All residual vaccine and associated waste which has come in to contact with the vaccine (such as syringes and vials) would be discarded in veterinary clinics in accordance with State/Territory, local council and Environmental Protection Agency (EPA) requirements, and conditions imposed by the APVMA registration of the GMO. These requirements and guidelines all aim to limit the exposure of other people or animals to the waste.

Section 3 Parent organism

22. The vaccine contains attenuated CDV and GM CPV-2. This assessment only focuses on the GM component of this vaccine. The GM CPV-2 (CPV-630a) is derived from an attenuated CPV-2 strain, currently used as a vaccine (CPV-154), which was originally isolated in the United Kingdom in 1980

(Churchill, 1987). CPV-2 is a member of the *Parvoviridae* family, *Protoparvovirus* genus and is also known as *Protoparvovirus carnivoran 1* (Decaro et al., 2020; Singh et al., 2021). The characteristics of the parent organism provide a baseline for comparing the potential for harm from dealings with the GM vaccine. As such, the relevant biological properties of CPV-2 will be discussed here.

3.1 Pathology

23. CPV-2 is a highly contagious viral enteric pathogen that causes haemorrhagic enteritis and myocarditis in dogs. It presents in two major clinical forms, depending on the age of the affected dog; i) dogs of any age develop gastroenteritis with vomiting and diarrhea and ii) puppies less than 3 months old develop myocarditis with potential heart failure (Decaro and Buonavoglia, 2012; Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021). Clinical signs generally appear between 3-7 days following exposure (Rabbani et al., 2021). The clinical course of the disease is highly variable, depending on age, infectious dose, immune-status and the presence of maternally derived antibodies, with more severe disease observed in dogs less than 6 months old or immune-compromised dogs (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021). CPV disease is often fatal in dogs less than 6 months old and has killed puppies in as little as two days following clinical manifestation (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021).

24. Typical clinical signs of the gastroenteritis form of the disease include loss of appetite, depression, vomiting, bloody diarrhea, anaemia, dehydration and fever (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021; Tuteja et al., 2022). Estimated mortality rate ranges from 25-35% in dogs less than 12 months old but can reach 91% without treatment, while in adult dogs the rate is typically less than 1% (Ling et al., 2012). Clinical signs of the myocarditis form include cold extremities, gasping respiration, abdominal swelling or sudden death in puppies between 2 and 16 weeks of age, with a mortality rate between 20-100% (Meunier et al., 1984; Decaro and Buonavoglia, 2012; Rabbani et al., 2021).

25. CPV-2 infection may also present with marked haematological changes that can result in transient immunosuppression and reduction in white blood cells, and can be a predictor of disease prognosis (Ogbu et al., 2017). Death resulting from CPV-2 induced immune suppression is largely due to co-infection with other pathogens (Alves et al., 2020).

3.2 Structure and genomic organisation

26. CPV-2 has a single-stranded DNA genome approximately 5,200 base pairs (bp) in length. The genome contains two open reading frames (ORFs), the first encoding two non-structural proteins (NS1 and NS2) and the second encodes three structural proteins (VP1, VP2, and VP3) (Decaro and Buonavoglia, 2012; Rabbani et al., 2021). The VP1 and VP2 proteins make up the viral capsid in a 1:11 ratio to form a 60-subunit spherical capsid (Figure 2) approximately 25 nm in size (Decaro and Buonavoglia, 2012; Tuteja et al., 2022). VP3 is derived from VP2 via proteolytic cleavage and is only present in complete virions (Rabbani et al., 2021).

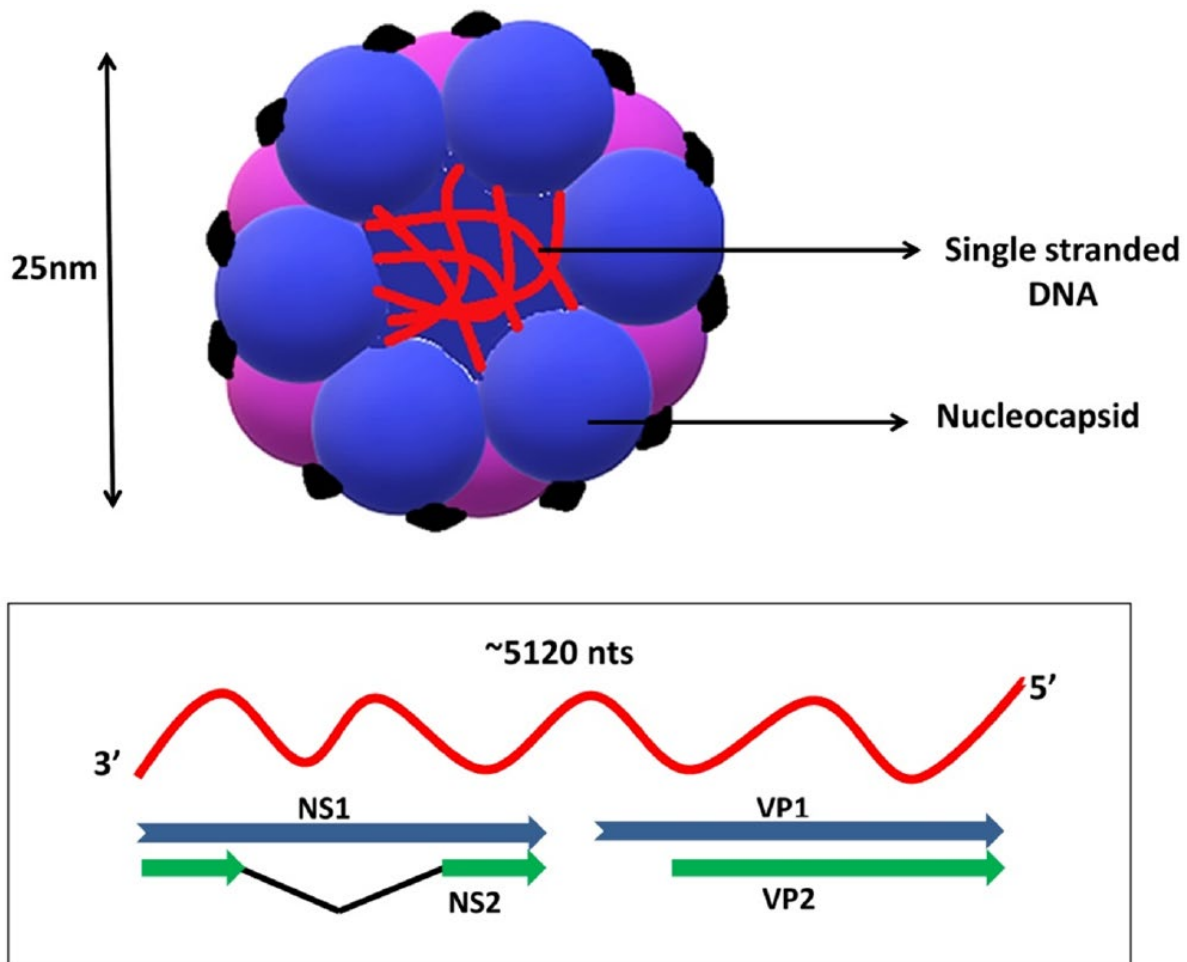


Figure 2. Structure and genome of CPV-2. Single stranded DNA is contained within a nucleocapsid made up of VP1 and VP2 subunits, VP3 not depicted as it is produced post-translationally. The CPV-2 genome encodes non-structural (NS) proteins and structural proteins (VP) that comprise the capsid (Tuteja et al., 2022).

27. The CPV-2 capsid is made up of 60 structural protein subunits, VP1 (5-6 subunits) and VP2 (54-55 subunits). VP1 and VP2 are encoded within the same ORF and produced by alternative splicing of the viral mRNAs (Miranda and Thompson, 2016), with VP3 produced by proteolytic cleavage of VP2 within host cells. VP2 encodes the capsid proteins that make up the so-called three spike region on the capsid surface (Miranda and Thompson, 2016; Vannamahaxay and Chuammitri, 2017). Small sequence changes in VP2 produce the antigenic variation that defines the CPV-2 variants that have emerged since 1970; CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c (Vannamahaxay and Chuammitri, 2017).

3.3 Viral infection and replication

28. CPV-2 targets rapidly dividing cells, such as intestinal crypts, lymphoid organs, or myocardial cells in neonatal or very young puppies. Early replication occurs mostly in the lymphatic system and spread by infected leukocytes to crypt epithelia in the small intestine (Decaro and Buonavoglia, 2012). Infection of intestinal cells typically coincides with symptomatic onset and viral shedding in the faeces. Infected intestinal crypt cells impairs cells turnover, leading to necrosis and villi collapse and causing haemorrhagic diarrhea (Ogbu et al., 2017).

29. Cells are infected by VP2 binding to the canine transferrin receptor type-1 which facilitates cell entry. Inside the cell, the capsid breaks down and the virus is released into the cytosol then transported to the cell nucleus by a nuclear localisation signal encoded within VP1 (Mattola et al., 2021; Tuteja et al., 2022). In the cell nucleus, the virus replicates using host cell machinery and is encapsidated within newly

assembled capsid proteins (Mattola et al., 2021). Replicated virions leave the cell by lysis, leading to necrosis of infected cells (Ogbu et al., 2017; Mattola et al., 2021; Tuteja et al., 2022).

3.4 Variants and potential for recombination of CPV-2

30. CPV-2 is thought to have evolved from the highly similar Feline Panleukopenia Virus (FPV), which readily infects felines and causes similar symptoms (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021). The first circulating CPV-2 identified shares a high level of sequence similarity to FPV but has an altered host range to canines. The first antigenic variant of CPV-2, CPV-2a, emerged almost a decade after CPV-2 was initially identified and regained the ability to infect felines (Ogbu et al., 2017). CPV-2a contains 5-6 amino acid changes within the VP2 protein compared with CPV-2, three of which allow replication in cats (Miranda and Thompson, 2016). CPV-2b and CPV-2c, detected in 1984 and 2000 respectively, are most similar to CPV-2a but contain different amino acids at residue 426 (Miranda and Thompson, 2016; Vannamahaxay and Chuammitri, 2017). CPV-2a contains asparagine, CPV-2b contains aspartic acid and CPV-2c contains glutamic acid at residue 426 which is a major antigenic site (Figure 3) (Miranda and Thompson, 2016; Vannamahaxay and Chuammitri, 2017). Different isolates of CPV-2 are named based on the amino acid differences within the antigenic site of VP2, however there is documented additional sequence variation within each strain (Kwan et al., 2021).

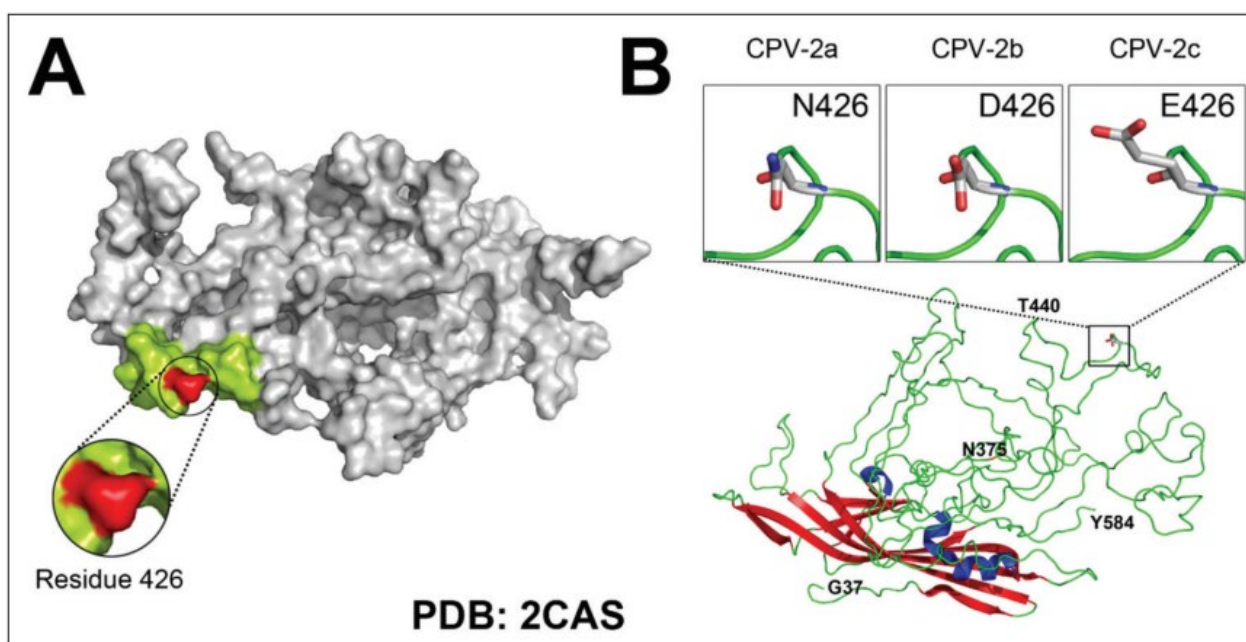


Figure 3. Amino acid variations in CPV-2 capsid protein VP2. (A) VP2 structure, residue 426 is shown in red with surrounding amino acids shown in green. Enlarged inset shows residue 426. (B) VP2 capsid protein is made up of eight-stranded antiparallel β barrels (red), α helices (blue) and loops (green). G37 is the N-terminal and Y584 is the C-terminal. Enlarged insets show the structural differences from amino acid variations between CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c of residue 426 (N=asparagine, D=aspartic acid, E=glutamic acid). Sequence information obtained from PDB accession number 2CAS (Vannamahaxay and Chuammitri, 2017).

31. Recombination requires a cell to be simultaneously co-infected by two viruses, which is not commonly reported but has been shown to occur for CPV-2 and other parvoviruses (Decaro et al., 2007; Mochizuki et al., 2008). Instances of recombination between wild-type variants CPV-2a and CPV-2c has been observed (Pérez et al., 2014), as has recombination between wild type strains and vaccine strains (Mochizuki et al., 2008). However, under field conditions there is a limited temporal window for a dog to be exposed to multiple CPV-2 strains, reducing the likelihood of recombination events.

32. Genetic analysis suggests that some recombination occurs in the field between Feline Panleukopenia Virus and CPV-2, and may be a mechanism to alter host range (Kwan et al., 2021), however recombination between parvoviruses resulting in altered host range is rarely reported.

33. Reversion to virulence of modified live virus CPV-2 vaccine strains has been theorised, however numerous studies have failed to demonstrate that this occurs (Churchill, 1987; Decaro et al., 2007; Sehata et al., 2017; Pearce et al., 2023).

3.5 Epidemiology

3.5.1 Host range and transmissibility

34. Canines are the primary host for CPV-2. Puppies less than 6 months of age are most susceptible to CPV-2 (Ogbu et al., 2017; Tuteja et al., 2022). Natural infection with CPV-2 has also been observed in coyotes, raccoons, foxes, wolves, honey badgers, cheetahs, African wild cats and Siberian tigers (Ogbu et al., 2017).

35. CPV-2 is not known to infect humans, other non-canid or non-felid vertebrates or other organisms including invertebrates, plants, microorganisms and aquatic organisms.

36. CPV-2 is mainly transmitted from infected to susceptible hosts through oral routes by direct contact between dogs, or indirect contact with surfaces contaminated with infected faeces (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021). The infectious dose of CPV-2 for a naïve dog is, on average, 1000 viral particles (Nandi and Kumar, 2010). CPV-2 infection can be detected using numerous molecular and biochemistry methods, including polymerase chain reaction (PCR) in stool samples and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or hemagglutination assay (HA) in blood and plasma (Ogbu et al., 2017; Tuteja et al., 2022).

37. CPV-2 can be indirectly transmitted between dogs through contaminated indoor or outdoor surfaces, shoes, clothing and food bowls (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021). CPV-2 is highly stable in the environment at ambient temperatures, resistant to desiccation, and can persist in the environment for up to 7 months (Gordon and Angrick, 1986; McGaving, 1987).

3.5.2 Bio-distribution and shedding

38. CPV-2 primarily targets mitotically active cells for replication. Cells in the pharynx, gastroenteric associated lymphoid tissues and lymphocytes are among the first cells targeted by the virus, which facilitate dissemination into the blood stream (Ogbu et al., 2017; Tuteja et al., 2022). Once in the blood stream, the virus preferentially invades rapidly dividing cells in the bone marrow, intestines and, in very young puppies, myocardial cells (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021), however, CPV-2 has been detected in all tissues, including the brain (Decaro and Buonavoglia, 2012).

39. CPV-2 shedding begins 3-7 days after infection, coinciding with the onset of symptoms (Ogbu et al., 2017; Rabbani et al., 2021). CPV-2 can be shed in faeces for up to 54 days post infection (Decaro et al., 2005b), usually peaking at up to 35 million viral particles being shed during the two weeks following exposure (Nandi and Kumar, 2010).

40. CPV-2 can persist in the environment for up to 7 months, if protected from light (Gordon and Angrick, 1986).

3.5.3 Prevalence

41. CPV-2 is considered endemic in Australia with an estimated 20,000 cases per year (Kelman et al., 2020). Historically, only CPV-2a and CPV-2b circulated in Australia, however CPV-2c has been detected in Australia since 2015 (Woolford et al., 2017). There is evidence that the predominant circulating strain is CPV-2b (Kwan et al., 2021).

3.5.4 Controls and other vaccines currently available

42. Vaccination and isolation are the main methods used to control CPV-2 (Miranda and Thompson, 2016; Decaro et al., 2020; Tuteja et al., 2022). There are three main types of CPV-2 vaccines used worldwide; inactivated CPV-2, live attenuated CPV-2 and recombinant CPV-2. Inactivated vaccines are the least used type due to a higher rate of immunisation failure than live attenuated or recombinant vaccines, and are primarily recommended for immunocompromised dogs (Decaro et al., 2020). There are currently two inactivated and 21 attenuated live CPV-2 vaccines, including CPV-154, approved for use in Australia (APVMA PubCRIS database). Live virus CPV-2 vaccines are typically recommended from 6 to 8 weeks of age.

43. Live attenuated CPV-2 vaccines have been shown to result in a drop of white blood cells counts, but to a much lesser extent than wild type CPV-2 (Day et al., 2016; Pearce et al., 2023). Immunocompromised dogs vaccinated with live attenuated CPV-2 vaccines show a comparable vaccine response to healthy dogs, with an elevated incidence of mild vaccine associated adverse events (Bergmann et al., 2020, 2021).

44. Like many vaccine strains of CPV-2, CPV-154 was derived from a virulent field isolate in Britain in 1987, attenuated by serial passages in cell culture (Churchill, 1987). Attenuated live CPV vaccines are the most commonly used worldwide, usually containing attenuated CPV-2 and CPV-2b.

45. Attenuated live vaccines have demonstrated a high level of immunisation and a long duration of immunity (Decaro et al., 2020; Dall'Ara et al., 2023a; Dall'Ara et al., 2023b). Natural CPV-2 infection or successful immunisation produces a robust sterilising immunity, with subsequent exposure to CPV-2 or CPV-2 vaccines, in the form of boosters, resulting in no viremia or viral shedding (Decaro et al., 2020; Rabbani et al., 2021).

46. The sterilising immunity produced by natural infection or vaccines generally shows protective cross-reactivity against different strains of CPV-2. CPV-154, based on CPV-2, has a demonstrated efficacy against CPV-2a, CPV-2b and CPV-2c (Spibey et al., 2008), however other studies have shown that the virus neutralising titres are lower in dogs vaccinated with CPV-2 based vaccines rather than vaccines based on later variants (CPV-2a, CPV-2b or CPV-2c) (Decaro et al., 2020).

47. A major impediment to successful vaccination against CPV-2 is the presence of maternally derived antibodies in young puppies which can neutralise CPV-2 vaccines. These antibodies are inefficiently carried across the placenta and provide some protection against CPV-2 infection, depending on the titre of antibodies present (Decaro et al., 2005a). Maternal antibody titre in puppies declines over time and is depleted by 15 weeks of age at the latest (Decaro et al., 2020). Sufficient titres of maternal antibodies in puppies can neutralise vaccine strains of CPV-2 prior to seroconversion, interfering with effective immunisation (Decaro et al., 2005a; Decaro et al., 2020). Maternally derived antibodies are thought to be a major cause of immunisation failure against CPV-2, contributing to a so-called “immunity gap” where maternal antibodies provide insufficient protection against infection, but the maternal antibodies are sufficient to impact on vaccine efficacy (Decaro et al., 2005a; Decaro et al., 2020). Vaccination protocols recommend re-vaccinating puppies at 2-4 week intervals (2-3 doses total by 16 weeks) to ensure adequate opportunities for vaccines to effectively overcome this immunity gap.

3.5.5 Stability and decontamination methods

48. As a small, non-enveloped DNA virus, CPV-2 is highly stable and resistant to many disinfectants and environmental conditions (McGaving, 1987). The most effective method of decontamination is 30 minutes exposure to bleach (sodium hypochlorite) concentrations greater than 0.37% (Cavalli et al., 2018). Organic materials, such as soil, blood or faeces, interfere substantially with effective decontamination of CPV-2. Therefore effective decontamination is best achieved by cleaning surfaces prior to treatment with bleach (Cavalli et al., 2018).

49. CPV-2 remains viable at a range of temperatures. At 100°C, CPV-2 is completely inactivated within 2 minutes, but viable CPV-2 can still be recovered after 7 hours at 80°C and after 3 days at 56°C

(McGaving, 1987). At room temperature (20-25°C), CPV-2 can persist for at least 6 months under laboratory conditions (McGaving, 1987) and between 5 and 7 months in the environment, depending on light exposure (Gordon and Angrick, 1986).

Section 4 The GM vaccine - nature and effect of the genetic modification

4.1 The genetic modifications

50. The parent strain (CPV-154) is a vaccine strain derived from a field isolate of a CPV-2 outbreak in Britain in 1980 (Churchill, 1987). The field isolate strain was passaged in cell lines to attenuate the strain, generating CPV-154.

51. Some information about the construction and testing of the GMO has been declared Confidential Commercial Information (CCI) under Section 185 of the Act. Under Section 187 of the Act, this information must not be disclosed except where it is made available to the Commonwealth or a Commonwealth Authority, a State agency of the Gene Technology Technical Advisory Committee in the course of carrying out their duties or functions under the Act or under corresponding State law.

52. The GMO (CPV-630a) is a recombinant live vaccine based on CPV-154 and aims to induce an immune response against multiple strains of CPV-2 in the presence or absence of maternally derived antibodies. The vaccine strain, called CPV-630a, was constructed as a plasmid in a multistep process to replace the CPV-154 capsid with the capsid from a circulating CPV-2c strain. The CPV-2c capsid has been further modified with two amino acid substitutions present in the CPV-154 capsid that are thought to attenuate the virus (Pearce et al., 2023). The mechanism of attenuation has not been characterised.

53. Compared with CPV-154, the GMO contains the same non-structural protein sequences as the parent strain with an attenuated CPV-2c capsid sequence. It is expected that the modification in the GM CPV-630a strain will generate a robust immune response to all currently circulating CPV-2 strains in dogs inoculated with the GM vaccine.

4.2 Characterisation of the GMO

4.2.1 Growth kinetics and virulence

54. Attenuated CPV-2 strains have been shown to replicate in intestinal mucosa and be shed in the faeces for up to four weeks post vaccination (Decaro et al., 2007; Decaro et al., 2020). CPV-154 is shed from vaccinated dogs for up to two weeks post vaccination, usually correlating with clearance of the vaccine (Churchill, 1987; Decaro et al., 2014).

55. No significant difference was observed in the growth kinetics between the GMO and the CPV-154 parent strain *in vivo*. Rectal swabs from inoculated puppies demonstrated that CPV-630a is shed in faeces for up to two weeks post administration, from 2-6 days post administration, (Pearce et al., 2023), comparable with the parent CPV-154 strain (Churchill, 1987), suggesting that there is no difference in the growth between the parent strain and the GMO.

56. Puppies and kittens inoculated with the GMO show a transient drop in white blood cell counts between day 3 and 6 post vaccination (Pearce et al., 2023).

57. The GMO was shown to be attenuated as puppies inoculated with the GMO showed no clinical symptoms of CPV disease and maintained expected body weight increases (Pearce et al., 2023). In the same study, vaccinated and unvaccinated puppies were challenged with wild type CPV-2c three days post vaccination. All vaccinated puppies exhibited no clinical signs of disease while all unvaccinated puppies showed symptoms of CPV disease from four days after CPV-2c challenge without recovery (Pearce et al., 2023). Similar experiments with the full vaccine (containing CPV-630a and attenuated CDV) showed similar results with no increased virulence resulting from vaccinating puppies with two other commercially available live viral vaccine strains (Pearce et al., 2023).

58. To meet the requirements set out in the *European Pharmacopeia Monograph 0964 - Vaccines for Veterinary Use – Canine parvovirus vaccine (live)*, an overdose study with the GMO was performed (Pearce et al., 2023). Puppies vaccinated with a 10x overdose of the full vaccine (CPV-630a and attenuated CDV) showed no clinical symptoms of CPV disease and no serious adverse reactions. Some puppies had a local reaction at the injection site that resolved without intervention within 3 days (Pearce et al., 2023).

4.2.2 Bio-distribution, shedding and transmission

59. As mentioned above, the GMO DNA is mainly detected in rectal swabs, resulting from the high level of CPV-2 replication in intestinal tissue. In studies where puppies are vaccinated with the GMO subcutaneously, viral DNA is detected in rectal swabs from 2 days after vaccination, showing that the GMO has a similar tropism to the parent organism (Pearce et al., 2023).

60. The GMO was administered to kittens subcutaneously and via the oronasal route to determine the capacity of the GMO to infect non-target hosts (Pearce et al., 2023). Five sentinel kittens were also housed with the vaccinated kittens to determine whether the shed vaccine could naturally infect naïve kittens. Vaccinated kittens showed no clinical symptoms of disease throughout the study and most vaccinated kittens shed the vaccine between day 3 and 5 post vaccination (Pearce et al., 2023). Vaccine shedding was detected in one sentinel kitten 11 days post vaccination, suggesting that sufficient viral vaccine is shed to be transmitted between animals.

61. The GMO was administered subcutaneously to ferrets, who showed no sign of clinical CPV disease, no adverse reaction to the GMO and no shedding of the GMO was detected in faeces, serum or tissues. Sentinel ferrets housed with vaccinated ferrets remained seronegative to CPV by day 21 after vaccination, indicating that infective viral shedding was either limited or absent. Similar results were obtained in studies using mice and chickens.

4.2.3 Phenotypic and genomic stability

62. To meet requirements set out in the *European Pharmacopeia Monograph 0964- Vaccines for Veterinary Use – Canine parvovirus vaccine (live)*, a reversion to virulence study was carried out in puppies. CPV-630a was administered to the first group of puppies subcutaneously. Faecal samples were collected for 2-6 days post administration to re-isolate CPV-630a, which was then administered to a subsequent group of puppies by the oronasal route. The GMO was passaged in this way 5 times. No clinical signs of disease and no reversion to virulence was observed in this study. In virus isolated from the final group of puppies, no sequence differences were observed from CPV-630a.

63. The parent strain, CPV-154, has not demonstrated reversion to virulence in the three decades that it has been in use (Decaro et al., 2020). The applicant has performed two reversion-to-virulence studies using CPV-154, one with seven serial passages and one with three serial passages. In both studies, CPV-154 showed no reversion to virulence, suggesting that the parent strain is genetically stable.

4.2.4 Efficacy

64. The efficacy of the GMO in protecting dogs from CPV disease has been assessed in naïve puppies and in puppies with high levels of maternal antibodies (Pearce et al., 2023).

65. In the naïve puppies challenged with wild type CPV-2c three days after vaccination with CPV-630a, no clinical manifestation of CPV disease was observed, while all unvaccinated control puppies developed clinical CPV disease (Pearce et al., 2023). Serological analysis showed that vaccinated puppies developed antibodies against CPV-2 three days after vaccination, with very high antibody levels developed by day 6. In contrast, unvaccinated puppies did not develop antibodies until day 5-6 after the wild type CPV-2c challenge, at which point disease progression was severe (Rabbani et al., 2021; Pearce et al., 2023).

66. In puppies with maternally derived antibodies, puppies were vaccinated with CPV-630a at approximately 4 weeks of age (Pearce et al., 2023). All vaccinated puppies produced high levels of CPV-2 antibodies between 8 and 51 days post vaccination, while unvaccinated control puppies showed a

decline in maternal antibodies over the same period (Pearce et al., 2023). Subsequent challenge with wild type CPV-2 was not assessed in this study.

4.2.5 Manufacture of the GMO and quality testing

67. The GMO will be manufactured overseas under Good Laboratory Practices consistent the requirements in *European Pharmacopeia Monograph 0964- Vaccines for Veterinary Use – Canine parvovirus vaccine (live)*.

68. The presence of residual plasmid in the final vaccine product is within acceptable limits as defined by the World Health Organisation (WHO) and the Food and Drug Administration (FDA) of less than 10 nanograms (ng) per dose (Vernay et al., 2019; Zheng et al., 2019).

4.2.6 Decontamination of the GMO

69. Methods to decontaminate CPV-2, which have been described in Section 3.5.5, would also be effective against the GMO.

70. The applicant performed decontamination studies using formaldehyde fumigation (6 hours with a minimum of 3000 ppm) to validate that this method can be used to decontaminate rooms housing animals vaccinated with CPV-630a. Rooms that had housed vaccinated puppies for five days were cleaned then fumigated with formaldehyde over two consecutive fumigation cycles. Naïve dogs were introduced to the rooms after the formaldehyde was measured at safe levels. Blood samples, rectal swabs and faecal samples were all negative for CPV-630a or CPV antibodies in samples collected on day 7 and day 21. This study shows that CPV-630a can be decontaminated using this decontamination method.

71. Additional decontamination studies using common cleaning agents Virkon S® and Presept™ found that these cleaning agents were insufficient for decontaminating CPV-630a.

Section 5 The receiving environment

72. The receiving environment forms part of the context for assessing risks associated with dealings with GM vaccine (OGTR, 2013). It informs the consideration of potential exposure pathways, including the likelihood of the GMO spreading or persisting outside the site of release. Relevant information about the receiving environment includes state and local council requirements relevant to domestic dogs; waste management practices; related viral species in the environment; and potential hosts in the environment.

5.1 Site of vaccination

73. The intended primary receiving environment would be domestic dogs, administered by qualified veterinarians within clinics Australia wide. The mode of administration would be subcutaneous injection in the scruff of the neck. To use other methods of administration (i.e. oronasal administration), the applicant would also need to seek a registration from the APVMA to authorise these modes of administration.

74. The principal route by which the GMO may enter the wider environment following vaccination is via shedding. Further, the GMO may also enter the environment via accidental spills of the vaccine and residual GMO on contaminated surfaces (floors, shoes, hands etc).

5.2 Dog breeders

75. Australian requirements for licensing of veterinary hospitals or other facilities offering dog breeding services are imposed by States and Territories, with additional requirements imposed by their respective legislation (Table 1). Vaccination is not required under any state or territory legislation but is recommended under standards and guidance for breeders Australia wide. States and territories strongly recommend that puppies remain with the breeder until after 8 weeks of age.

資料2. 審査データの概要

Table 1 State and territory requirements for dog breeders in Australia.

State	Legislation	Additional requirements
Australian Capital Territory (ACT)	Domestic Animals Act 2000 and Animal Welfare Act 1992	Mandatory registration. No vaccination requirements.
New South Wales (NSW)	Companion Animals Act 1998	Mandatory registration. Standards set out in <i>Animal Welfare Code of Practice Breeding Dogs and Cats</i> . Vaccinations required prior to sale or transfer of ownership under Code of Ethics (not legislatively required).
Northern Territory (NT)	Animal Protection Act 2018	Registration encouraged. No vaccination requirements.
Queensland (QLD)	Animal Management (Cats and Dogs) Act 2008	Mandatory registration. Welfare standards set out in the <i>Queensland Animal Welfare Standard and Guidelines for the Breeding of Dogs and their Progeny (Oct 2018)</i> . Vaccination recommended.
South Australia (SA)	Dog and Cat Management Act 1995	Mandatory registration. Welfare standards set out in <i>South Australian Standards and Guidelines for Breeding and Trading Companion Animals 2017</i> . Vaccination recommended.
Tasmania (TAS)	Dog Control Act 2000 and Animal Welfare (Dogs) Regulations 2016	Mandatory registration. Vaccination status must be disclosed prior to rehoming.
Victoria (VIC)	Domestic Animal Act 1994 and Domestic Animals Amendment (Puppy Farms and Pet Shops) Act 2017	Mandatory registration. Vaccination required prior to sale or transfer of ownership under <i>Code of Practice for the Operation of Breeding and Rearing Businesses 2014</i> (not legislatively required).
Western Australia (WA)	Dog Act 1976	Mandatory registration. Vaccination recommended.

5.3 Domestic dogs

76. In 2021, it was estimated that 69% of Australian households have a pet, with 6.3 million domestic dogs registered Australia wide (Animal Medicines Australia, 2021).

77. Domestic dogs must be registered, except in NT, and this is enforced by states and territories under their respective legislation (Table 1).

5.4 Canine recommended vaccination schedule

78. Vaccines for dogs in Australia follow the recommendations defined by the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Vaccination Guidelines Group (VGG) (Day et al., 2016). The VGG defines vaccines as core and non-core, with the recommendation that all dogs should be vaccinated with core vaccines while non-core vaccines should only be used as necessary.

79. All vaccines must be administered by a qualified veterinarian, who are trained to administer vaccines via multiple routes, including subcutaneously using sharps.

80. Vaccination protocols and labels typically recommend only vaccinating healthy animals and avoiding live vaccines in immunocompromised animals (Day et al., 2016).

81. The core vaccines include CPV-2, CDV and canine adenovirus (CAvV), with a preference for modified live or recombinant vaccines, if available. Administration of core vaccines is recommended between 6-8 weeks of age, with additional vaccination 2-4 weeks apart until 16 weeks of age. Attenuated live and recombinant vaccines are generally considered protective after one dose. Boosters are recommended at 1 year old then at intervals of three years thereafter (Day et al., 2016). CPV-2 vaccination is not associated with a period of immunosuppression, however a brief period of immunosuppression is expected following vaccinations containing a modified live CDV component, which rarely causes clinical complications (Day et al., 2016).

82. Non-core vaccines include Parainfluenza virus, *Bordetella bronchiseptica* and *Leptospira interrogans* as modified live virus or attenuated bacterial vaccines, respectively. Non-core vaccines may be administered within similar time frames to core vaccines, depending on veterinary assessment of individual health risks to puppies or dogs. Non-core vaccines are administered when the risk of exposure to each disease is identified based on regional outbreaks, lifestyle, and expected socialisation with other dogs (Day et al., 2016).

83. Vaccines are not mandatory in any states or territories, however veterinary associations, veterinary clinics, national breeder associations and state and territory departments responsible for biosecurity strongly advocate for vaccination of all domestic dogs. These bodies further recommend that puppies have limited environmental exposure until 2 weeks after the completion of their vaccination schedule, and that, in known outbreak areas, unvaccinated dogs should be vaccinated and isolated for two weeks (Day et al., 2016).

84. Overall vaccine coverage of dogs in Australia is not known, however studies overseas have shown that owned dog populations are vaccinated against CPV-2 at a rate of 86-98.5% while stray or surrendered dogs in shelters are vaccinated at a rate of 67-84% (Decaro et al., 2020).

85. While not mandatory, standard practices for animal shelters and animal care facilities (animal daycare and long stay services) require all animals to be vaccinated to limit disease spread. Shelters and care facilities must be designed for effective cleaning and disinfection which must be carried out at least daily using disinfectants that are effective against canine pathogens.

86. The APVMA issues product labels with directions for use, however veterinarians may use products off-label (e.g. vaccinating ferrets with CDV vaccines to protect against distemper).

5.5 Biosecurity

87. Each state and territory have their own biosecurity regulations and legislation. The following state departments are responsible for the biosecurity for each state and territory:

- Environment, Planning and Sustainable Development Directorate – Environment (ACT);
- Department of Primary Industries (NSW);
- Northern Territory government (NT);
- Department of Agriculture and Fisheries (QLD);
- Department of Primary Industries and Regions (SA);
- Department of Natural Resources and Environment Tasmania (TAS);
- Agriculture Victoria (VIC); and
- Department of Primary Industries and Regional Development (WA).

88. Biosecurity considerations includes the following: import of animals for domestic or commercial purposes; management of animal diseases (including vaccination and risk of transmission); and animal welfare. Australia also has a national *Biosecurity Act 2015* and a [website](#) for managing and reporting national pest and disease outbreaks, that is managed by the Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (DAFF).

5.6 Presence of related viral species in the receiving environment

89. The presence of related viruses may offer an opportunity for introduced genetic material to transfer between the GMO and other organisms or for genetic recombination in the receiving environment.

90. Twenty-one live attenuated CPV-2 vaccines are registered for use in Australia, including CPV-154. However, CPV-2 remains endemic in Australia with a range of CPV-2 capsid variants detected between 2015 and 2019 (Woolford et al., 2017; Kwan et al., 2021). Detected variants were predominantly CPV-2b (54%), CPV-2a (43%) and CPV-2 (2.5%) (Kwan et al., 2021), with CPV-2c detected in a small number of dogs in a separate study (Woolford et al., 2017). Kwan et al. (2021) also identified CPV-2 variants with a high level of similarity to Asian variants and CPV-2 with capsid mutations similar to FPV, showing a high diversity in circulating CPV-2 in Australia. The National Pest and Disease Outbreaks [website](#), has no current listed outbreaks of CPV-2 (as of April 2024).

91. Other parvoviruses also circulate in Australia and are highly host specific, including Porcine Parvovirus (infecting pigs), FPV, human parvovirus B19, human bocavirus 1 and a range of adeno-associated viruses (AAV). Species in the family Parvoviridae infect many different animals across invertebrates and vertebrate animals, with naming often linked to the specific host (e.g. rat parvovirus, turkey parvovirus etc)(Du et al., 2019). Recombination between different species of parvoviruses has been observed under field conditions, most often within the same genera that share similar cell tropism (Shackelton et al., 2007; Wang et al., 2012).

92. Approximately half of adults in Australia are estimated to have immunity to human parvovirus B19, based on the seroprevalence of antibodies across several population groups (Faddy et al., 2018). Human parvovirus has different cell tropism and transmission to CPV-2, primarily spread through respiratory routes and targeting red blood cells and bone marrow (Pudasaini et al., 2023). Clinical manifestation is also distinct from CPV-2, with a characteristic rash and arthritic symptoms (Pudasaini et al., 2023).

5.7 Presence of similar genetic material in the environment

93. The balance of an ecosystem could be perturbed by the introduction of new genetic material through horizontal gene transfer or through release of GMO into the environment. However, the effect of perturbation would be relatively small if the genetic material was already present in the system and did not confer any selective advantage to an organism that gained this genetic material.

94. The GMO was derived from naturally occurring CPV-2c and a vaccine strain already used in Australia, hence similar genetic material would already be present in the environment.

5.8 Potential hosts in the environment

95. The potential for CPV-2 to infect other susceptible hosts that may be present in rural or urban areas is considered in the risk assessment (Chapter 2). The primary host for CPV-2 is dogs and other canids. CPV-2 disease in cats, ferrets and other carnivores is rarely reported (see Chapter 1, Section 3.5.1).

96. Australia has wild canines, including feral dogs, dingoes (*Canis lupus dingo*, or *Canis familiaris dingo*) and red foxes (*Vulpes vulpes*) (Van Arkel et al., 2019). CPV-2 cases have been detected in both red foxes and dingoes, with similar disease pathology to that observed in dogs (Zourkas et al., 2015; Van Arkel et al., 2019).

97. There is extensive spatial overlap between populations of wild dogs and domestic dogs in Australia (Van Arkel et al., 2019). Given the prolonged survival of CPV-2 in the environment, there is likely bi-directional transmission of CPV-2 between wild and domestic dogs which contributes to the ongoing circulation of CPV-2 in Australia (Van Arkel et al., 2019).

98. Wild dogs typically move over larger areas than domestic dogs, with dingoes having the largest estimated home range of 10 to 60 km² (Van Arkel et al., 2019).

99. Dingoes are primarily active at dusk and dawn, with activity varying between searching (hunting) behaviour and exploratory (social) movement (Harden, 1985; Thomson, 1992). Packs of dingoes usually consist of a mated pair and their offspring from the current breeding season with distinct territories that have little overlap with neighbouring territories (Harden, 1985; Thomson et al., 1992). The breeding season is estimated to occur between March and June, with denning and whelping occurring from June to August (Thomson, 1992; Thomson et al., 1992). Dingo litters range from 1-10 pups, with an average of two pups surviving to adulthood (Thomson et al., 1992). The pups leave the den periodically between 3 and 8 weeks of age within a range of 2.5 km (Thomson, 1992). The pups become independent between 3-6 months of age and will leave the pack at 10 months of age (Thomson et al., 1992).

Section 6 Previous authorisations

100. This GM vaccine has not been previously authorised for commercial supply in Australia.

101. This GM vaccine has been authorised for use in the European Union by the European Medicines Agency (EMA/531403/2020) since 2021.

102. This GM vaccine has been authorised for use by the Philippines Food and Drug Administration (VR-4383) since 2022.

Chapter 2 Risk assessment

Section 1 Introduction

103. The risk assessment identifies and characterises risks to the health and safety of people or to the environment from dealings with GMOs, posed by or as the result of gene technology (Figure 4). Risks are identified within the established risk assessment context (Chapter 1), taking into account current scientific and technical knowledge. A consideration of uncertainty, in particular knowledge gaps, occurs throughout the risk assessment process.

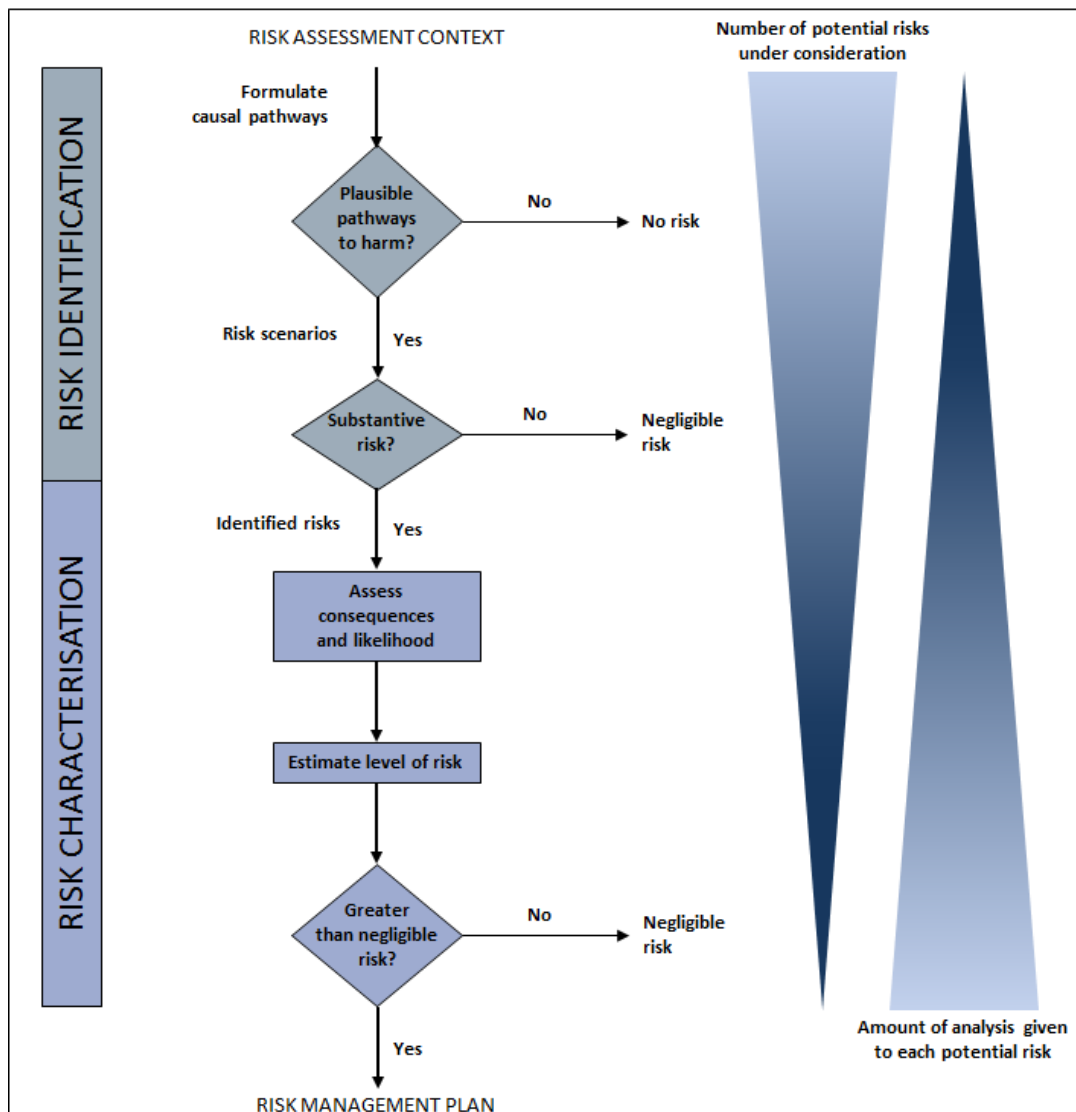


Figure 4: The risk assessment process

104. The Regulator uses a number of techniques to identify risks, including checklists, brainstorming, previous agency experience, reported international experience and consultation (OGTR, 2013).

105. Risk identification first considers a wide range of circumstances in which the GMO, or the introduced genetic material, could come into contact with people or the environment. This leads to postulating causal pathways that may give rise to harm for people or the environment from dealings with a GMO. These are called risk scenarios.

106. Risk scenarios are screened to identify substantive risks, which are risk scenarios that are considered to have some reasonable chance of causing harm. Risk scenarios that could not plausibly occur, or do not lead to harm in the short and long term, do not advance in the risk assessment process (Figure 4), i.e. the risk is considered no greater than negligible.

107. Risk scenarios identified as substantive risks are further characterised in terms of the potential seriousness of harm (Consequence assessment) and the likelihood of harm (Likelihood assessment). The consequence and likelihood assessments are combined to estimate the level of risk and determine whether risk treatment measures are required. The potential for interactions between risks is also considered.

Section 2 Risk identification

108. Postulated risk scenarios are comprised of three components (Figure 5):

- i. The source of potential harm (risk source)
- ii. A plausible causal linkage to potential harm (causal pathway), and
- iii. Potential harm to people or the environment.

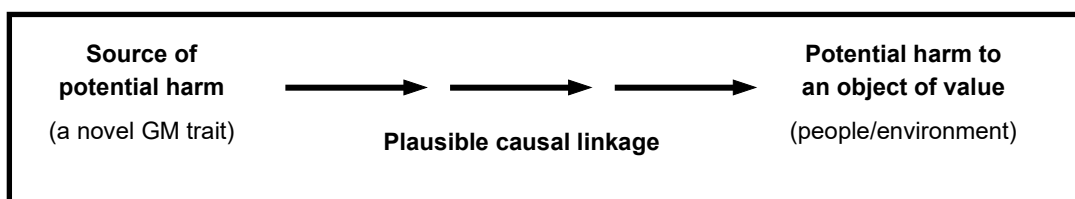


Figure 5: Components of a risk scenario

109. When postulating relevant risk scenarios, the risk context is taken into account, including the following factors detailed in Chapter 1:

- the proposed dealings
- the proposed limits including the extent and scale of the proposed dealings
- the proposed controls to limit the spread and persistence of the GMO and
- the characteristics of the parent organism(s).

2.1 Risk source

110. The parent organism is an infectious canine parvovirus type 2 (CPV-2) vaccine strain. Details of the pathogenicity and transmissibility of CPV-2 is discussed in Chapter 1. Infection is the result of direct contact with infected dogs or indirect contact with surfaces contaminated with infected faeces. Canines vaccinated with the GMO could transmit the GMO to uninfected canines or other susceptible carnivore species (e.g. cats, wild dogs and dingoes).

111. The sources of potential harms can be the intended novel GM traits associated with the genetic modification, or unintended effects arising from the use of gene technology.

112. As discussed in Chapter 1, Section 4.1, the GMO has been modified by replacing the vaccine strain capsid protein with an attenuated CPV-2c capsid protein. This modification is considered further as a potential source of risk.

113. Unintended effects can arise through horizontal gene transfer (HGT) which is the stable transfer of genetic material from one organism to another without sexual reproduction. As discussed in Chapter 1, Section 4.2, there is a possibility that the GMO could recombine with other field or vaccine strains resulting in a novel trait. The novel trait may result in negative, neutral or positive effects on the fitness of the recipient organism. This pathway is further considered as a potential source of risk.

114. Infection with CPV-2 could result in significant shedding into the environment via faeces of infected dogs and increase the period of viral persistence and transmission. Therefore, this pathway is further considered as a potential source of risk.

115. CPV-2 is not known to integrate into the host DNA as discussed in Chapter 1, Section 3.3. Thus, the consequences of integration of viral DNA into a host cell genome will not be further discussed.

116. CPV-2 is known to have a very limited host range and not shown to be able to infect and cause disease in non-carnivore species. In the event of exposure of other animals to the GMO, it is highly unlikely that it would lead to any harm to those animals. Therefore, this pathway will not be further discussed.

117. CPV-2 attenuated vaccines have not demonstrated a reversion to virulence in three decades of use. Therefore, this pathway will not be further discussed.

118. The vaccine contains GM CPV-2 and attenuated CDV and is likely to be administered with other viral vaccines. However, CPV-2 does not undergo recombination with CDV or other viruses that are not parvoviruses. Therefore, this pathway is not discussed further.

119. The GMO will be administered with a CDV component and can be expected to induce a brief period of immunosuppression between 3 and 10 days post administration. However, other live attenuated combination vaccines containing CPV-2 and CDV are already widely used in Australia and are not associated with severe clinical outcomes for dogs or cats. Therefore, this pathway is not discussed further.

120. The current assessment focuses on risks posed to people and to the environment, including long term persistence of the GMO, which may arise from the transport, storage or disposal of the GMO.

2.2 Causal pathway

121. The following factors are taken into account when postulating plausible causal pathways to potential harm:

- the proposed dealings, which are transport or disposal of the GMO and possession (including storage) in the course of any of these dealings,
- regulations in place for the transport or disposal of the GMO by other regulatory agencies, the States and Territories,
- characteristics of the parent organism,
- routes of exposure to the GMOs,
- potential for transmission,
- potential effects of the genetic modification on the properties of the organism,
- potential exposure of other organisms to the GMOs in the environment,
- the release environment,
- spread and persistence of the GMOs (e.g. dispersal pathways and establishment potential),
- environmental stability of the organism (e.g. tolerance to temperature, UV irradiation and humidity),
- potential risk of revertant/novel strains due to HGT,
- practices before and after administration of the GMO including veterinary practices.

122. Although these factors are taken into account, some are not included in the risk scenarios because they are regulated by other agencies, have been considered in previous RARMPs or are not expected to give rise to substantive risks (see Sections 2.4.1 to 2.4.2 below).

123. The APVMA regulates the quality, safety and efficacy, and trade risks associated with the GM vaccine under the AgVet Code, as mentioned in Chapter 1, Section 1.1. This includes safety and efficacy of the vaccine; environmental risks; and recommended practices for the use, transport, storage and disposal of the GM vaccine. Therefore, risk scenarios in the current assessment focus primarily on risks posed to people and to the environment from the GMO, and not the intended vaccine recipients (dogs).

124. The Act provides for substantial penalties for unauthorised dealings with GMOs or non-compliance with licence conditions, and also requires the Regulator to have regard to the suitability of an applicant to hold a licence prior to the issuing of the licence. These legislative provisions are considered sufficient to minimise risks from unauthorised activities. Therefore, unauthorised activities will not be considered further.

2.3 Potential harms

125. Potential harms from the GM vaccine include:

- harm to the health of people or desirable organisms, including disease in humans, dogs and other carnivores or adverse immune response to the GMO
- the potential for establishment of a novel virus that could cause harm to people or the environment.

2.4 Postulated risk scenarios

126. Three risk scenarios were postulated and screened to identify substantive risk. These hypothetical scenarios are summarised in Table 2.

127. In the context of the activities proposed by the applicant and considering both the short and long term, two of the three risk scenarios did not give rise to any substantive risks that could be greater than negligible (discussed in depth in sections 2.4.1-2.4.2; this chapter). One risk scenario was identified as posing substantive risk which warranted further assessment (characterised in Section 3; this chapter).

Table 2 Summary of hypothetical risk scenarios from dealings with GM vaccine

Risk scenario	Risk source	Possible causal pathway	Potential harm	Substantive risk	Reason
1	GM CPV-2	Exposure of people to the GMO via fomites or needle stick: <u>During:</u> (a) preparation and administration of the GMO; (b) handling waste from vaccinated dogs; (c) unintentional spills; and (d) transport, storage or disposal of the GMO and waste associated with GMO.	Disease in people	No	• The vaccine is transported in sealed single dose vials, therefore exposure to the GMO from spills or needlestick injury would be in small volumes. • Vaccination would be conducted by registered veterinarians who are trained in the appropriate use of sharps. • Other CPV-2 vaccines have a history of safe use with no adverse effects in people from direct exposure. • CPV-2 has a very narrow

資料2. 審査データの概要

Risk scenario	Risk source	Possible causal pathway	Potential harm	Substantive risk	Reason
		↓ Infection of people with the GMO.			host range, is not a human pathogen and is not expected to cause disease, toxicity or allergenicity in people.
2	GM CPV-2	Exposure of other animals to the GMO via transmission from vaccinated dogs or shedding the GMO into the environment ↓ Infection of other animals (e.g. wild, feral, pest, native or pet/household animals). ↓ Disease in susceptible animals; or vaccination of susceptible feral animals	Disease in domestic or native animals or Increased numbers of feral/pest animals	No	- Animals previously exposed to CPV-2 or CPV-2 vaccines are unlikely to be infected with the GMO. <i>Domestic animals</i> - Exposure is minimised due to recommended vaccination protocols. Considering that most domestic dog owners are conscious of preventing disease in pets, they are likely to follow recommendations. - Most puppies receive their first vaccines while in the care of a breeder, limiting their exposure to other susceptible dogs and the environment. - GMO is unlikely to cause disease in susceptible animals housed with the vaccinated dog due to attenuation of the virus. <i>Native and Feral animals</i> - GMO is unlikely to cause disease in wild dogs, including foxes and dingoes due to potential prior exposure. - Native non-canid animals, such as marsupials, birds and reptiles, are not known to be infected by CPV-2. Serious outbreaks in native animal with circulating strain of CPV-2 have never been reported.
3	GM CPV-2	Vaccination of dogs with the GMO	Disease in dogs or other	Yes	CPV-2 vaccines have a known history of recombination with field

資料2. 審査データの概要

Risk scenario	Risk source	Possible causal pathway	Potential harm	Substantive risk	Reason
		OR Off label use of the GMO ↓ Infection of cells by GMO. ↓ a) Transduced cells co-infected with circulating CPV-2 strain. OR b) Shed GMO infects susceptible animal infected with a parvovirus ↓ Homologous recombination with CPV-2 (field or vaccine strains). ↓ Generation of recombinant CPV-2 or parvovirus strains. ↓ Infection of dogs and/or other susceptible animals with recombinant CPV-2.	susceptible species		strains resulting in novel strains that could infect and cause disease in susceptible species or alter host range. See Section 3 for risk characterisation

2.4.1 Risk scenario 1

Risk source	GM CPV-2
Causal pathway	Exposure of people to the GMO via fomites, contact with contaminated faeces and needle stick: <u>During:</u> (a) preparation and administration of the GMO; (b) handling waste from vaccinated dogs; (c) unintentional spills; and (d) transport, storage or disposal of the GMO and waste associated with GMO. ↓ Infection of people with the GMO
Potential harm	Disease in people

Risk source

128. The source of potential harm for this postulated risk scenario is the GMO.

Causal Pathway

129. People conducting the dealings could be exposed to the GMO in several ways. The GMO could be transmitted indirectly by contaminating clothes and hands during an unintentional spill of the GMO or during the preparation and administration of the GMO. Transmission could also occur through a needle stick injury during subcutaneous injection of the GMO. People handling waste containing the GMO could be exposed to the GMO via contact (e.g. hands, clothing). This exposure could potentially result in infection with the GMO that could lead to disease.

Exposure during preparation and administration of the GMO

130. As discussed in Chapter 1, Section 2.1, the GMO would be supplied as a freeze-dried vaccine in sealed vials, which would need to be reconstituted prior to use. There is the potential for exposure of people involved in the administration of the GMO from breakage/spillage of GMO onto surfaces during preparation and administration or via needle stick injury.

131. The GM vaccine would be prepared and administered by a qualified veterinarian who is trained in the use of sharps and vaccine administration.

132. Based on the current registration for approved live CPV-154 vaccines, the APVMA registration of veterinary vaccines would include a label indicating the dosage; method of administration; precautions; personal protective equipment (PPE) requirements; and instructions relating to first aid, storage, and disposal of the GMO. Compliance with these behavioural practices by veterinarians would reduce the likelihood of unintended exposure of people to the GMO.

133. The existing work practices mentioned above would minimise the potential exposure of people to the GMOs during preparation and administration of the vaccine.

Exposure during handling of waste from vaccinated dogs

134. As mentioned in Chapter 1, Section 3.5.2, CPV-2 is mainly transmitted by direct contact with infected dogs or indirect contact with surfaces contaminated by waste from infected dogs. This could occur as a result of vaccinated dogs defecating in public or in private spaces or in care facilities such as kennels. People cleaning up faeces may be exposed to the GMO. However, cleaning of dog faeces is typically done with limited direct contact through the use of gloves, plastic bags, shovels or high-pressure hoses. This limits the potential exposure of people to the GMO through the waste from vaccinated dogs.

Exposure via unintentional spill

135. If the GM vaccine was unintentionally/accidentally spilled or lost during transport or storage, this could result in exposure to people transporting or storing the GMO via contamination of surfaces.

136. As described in Chapter 1, Section 2.1, the GMO would be packaged in sealed vials and subsequently packaged into a cardboard box prior to import and transport. This would lower the likelihood of unintended dispersal of the GMOs.

137. The packaged final product will be stored at Schedule 4 licensed distribution centres prior to transportation to veterinarian clinics. The current APVMA registered CPV-2 vaccines include storage instructions (in refrigerators).

138. The transport and storage procedures discussed above would meet the containment requirements of the Regulator's *Guidelines for the Transport, Storage and Disposal of GMOs*, which ensures that the GM vaccine would be properly contained for transport and storage. This would mitigate exposure due to spills of the GMO during these dealings.

Exposure during disposal of the GMO and waste contaminated with the GMO during administration

139. Individuals may be inadvertently exposed to GMOs while disposing of used, expired, or unused vials of the GM vaccine.

140. As mentioned in Chapter 1, Section 2.1, the applicant has stated that all residual vaccine and associated waste which has come into contact with the GM vaccine (such as syringes and vials) would be discarded in waste disposal streams at veterinary clinics. As mentioned in Chapter 1, Section 3.5.5, CPV-2 is a non-enveloped virus that is resistant to many disinfectants. However, veterinary clinics have strict cleaning protocols using appropriate disinfectants for veterinary pathogens. Current registered CPV-2 vaccines have disposal instructions on their labels to discard the vial/container in designated biological containers.

141. The disposal and decontamination procedures discussed above would minimise the likelihood of exposure of people that could be associated with conducting these dealings with the GMOs.

Potential harm

142. As mentioned in Chapter 1, Section 3.5.1, CPV-2 has a very narrow host range and is not known to cause disease in humans. Non-attenuated CPV-2 strains are currently present in the Australian environment, and live attenuated CPV-2 vaccines are widely used in Australia. Therefore, it is highly likely that people are currently exposed to various strains of CPV2 with no reports of disease, infection (clinical or subclinical), toxicity or allergic reactions.

Conclusion

143. The exposure of people to the GMO resulting in disease is not identified as a risk that could be greater than negligible. Therefore, it does not warrant further detailed assessment.

2.4.2 Risk scenario 2

Risk source	GM CPV-2
Causal pathway	Exposure of other animals to the GMO via transmission from vaccinated dogs or shedding the GMO into the environment ↓ Infection of animals (e.g. wild, feral, pest, native or pet/household animals). ↙ ↘ Disease in susceptible animals vaccination of susceptible feral animals
Potential harm	Decreased numbers of susceptible animals Or Increased numbers of susceptible feral/pest animals

Risk Source

144. The source of potential harm for this postulated risk scenario is the GMO.

Causal Pathway

145. Other animals (e.g. wild, feral, pest, native or pet/household animals) may be exposed to the GMO via transmission from dogs vaccinated with the GMO or contamination in the environment via shedding in faeces either a) in the home of the vaccinated dog or b) outside the home in kennels, dog parks, or gardens.

a) Exposure and infection of animals in the home

146. CPV-2 has a narrow host range and is known to infect dogs and cats. Other domestic animals such as ferrets, mice, rats or birds are not known to be infected by CPV-2 and are therefore not considered to be susceptible to CPV-2 or the GMO.

147. Animals in the home could be exposed to the GMO directly via transmission from a vaccinated dog. For other dogs in the home, it could be other puppies from the same litter or another litter if the vaccinated dog is housed in a breeder facility. Some of these puppies may have been vaccinated at the same time or they may be younger and awaiting vaccination. It is likely that, if these animals have been vaccinated against CPV-2, their pre-existing immunity against CPV2 makes them unlikely to be infected with the GMO. If, however, they have not yet been vaccinated, maternal antibodies may reduce the symptoms associated with a CPV-2 infection. For older dogs, as the immunity provided by vaccination is lasting, those would be unlikely to be infected with the GMO.

148. Cats living with the vaccinated dog may become infected with and shed the GMO.

b) Exposure and infection of animals outside the home

149. Animals outside the home include other domestic animals, and feral and native animals. CPV-2 is known to infect dogs, foxes, dingoes and cats. Native animals, such as marsupials, reptiles and birds, are not known to be infected by CPV-2 and infection is considered unlikely due to the narrow host range of CPV-2.

150. The GMO is expected to be shed in faeces of vaccinated dogs for a period after vaccination. Animals outside the home, including other dogs, cats, wild dogs, dingoes, feral cats and foxes, are unlikely to come into direct contact with vaccinated dogs if vaccination protocols are reasonably

adhered to. However, due to the environmental persistence of the GMO, these animals may be exposed to GMO shed into the environment in the faeces of vaccinated dogs. This could occur if, during the post-vaccination isolation period, the vaccinated dog is exercised outside the home, housed in a kennel, or toilets outside in spaces accessible to feral animals.

151. Vaccination protocols recommend that animals vaccinated for the first time are not taken out into the environment to limit their exposure to disease until the vaccine has taken effect. Kennels also restrict the housing of animals to those that have completed their vaccination schedule. Many pet owners are conscious of the health of their animals and are likely to adhere to the recommendations. In addition, States and Territories can issue fines for failing to pick up dog faeces in public spaces. Therefore, the likelihood of the potential spread of the GMO in the environment is reduced.

152. As described in Chapter 1, Section 3.5.1, CPV-2 could potentially infect other canids and felids such as feral foxes, wild dogs or cats, or native dingoes. Wild dogs, dingoes and foxes that have previously been exposed to CPV-2 are unlikely to be infected by the GMO due to the sterilising immunity against CPV-2 strains.

153. As mentioned in Chapter 1 in Section 3.5.4, vaccination against or prior exposure to CPV-2 produces sterilising immunity against all strains of CPV-2 in dogs. Therefore, most susceptible canines (domestic or wild) would likely be less than 6 months of age.

Potential harm

154. If susceptible animals are exposed and infected with the GMO, they are unlikely to develop CPV-2 disease due to the attenuation of the virus. As mentioned in Chapter 1, Section 4.2, the vaccine did not cause any clinical disease in puppies even at 10 times the dose or after multiple doses (2 doses, one week apart). The vaccine also did not cause disease when administered as a full dose to cats, chickens, mice or ferrets. It is unknown whether native birds, marsupials or reptiles would be susceptible to the GMO, however it is highly unlikely due to the narrow host range of the GMO.

155. Susceptible animals are more likely to be less than 6 months of age because they have not been previously exposed to CPV-2 or a vaccine. As mentioned in Chapter 1 Section 5.8, dingo pups move over a much more limited range than adults, therefore reducing the likelihood of encountering the GMO in the environment. Adult dingoes or foxes caring for pups may have been previously exposed to CPV-2 or a vaccine and are unlikely to shed the GMO if infected due to sterilising immunity. For adults not previously exposed to CPV-2 or a vaccine, they may become infected with the GMO and shed the GMO in close proximity to their den.

156. Alternatively, as the GMO was shown to offer protection to vaccinated puppies from CPV-2 infection, exposure of wild/feral animals (e.g. dogs, foxes and cats) could also potentially result in immunity towards CPV-2. This could inadvertently result in increased numbers of wild dogs, foxes and cats as these feral species could be vaccinated via an exposure to the GMO, increasing their survival in the event of an outbreak due to a more pathogenic strain of CPV2. However, for this scenario to lead to harm to the environment, many wild dogs, foxes and cats have to become infected with the GMO, and CPV-2 circulating viruses would need to be an important factor limiting the populations. As mentioned in Chapter 1, Section 5.8, CPV-2 already circulates within wild populations of dogs and foxes, and these animals are likely to encounter a number of live non-GM vaccine strains in their lifetimes. This reduces the likelihood of the GMO coming into contact with a significant number of naïve animals. This impact has not been observed thus far with the large number of live attenuated vaccines already available in Australia.

157. As mentioned in Chapter 1, Section 5.8, there are native dingoes in Australia. If dingoes are exposed to the GMO, disease is highly unlikely as the GMO does not cause disease in canines, and wild CPV-2 already circulates in dingo populations, reducing the likelihood of the GMO encountering a naïve animal.

Conclusion

158. The potential of direct or indirect exposure of susceptible or feral animals to the GMO via transmission from vaccinated dogs or from shedding of the GMO into the environment is not identified as a risk that could be greater than negligible. Therefore, it does not warrant further assessment.

Section 3 Risk characterisation

159. Three risk scenarios were postulated and evaluated, as summarised in Table 2. The third risk scenario was identified as posing a substantive risk which warrants further assessment. This section provides more detail on the evaluation of this scenario.

3.1 Risk Scenario 3

Risk source	GM CPV-2
Causal pathway	Vaccination of dogs with the GMO OR Off label use of the GMO ↓ Infection of cells by GMO ↓ a) Transduced cells co-infected with another CPV-2 strain (field or vaccine strains) OR b) Shed GMO infects susceptible animal infected with a parvovirus ↓ Homologous recombination with CPV-2 or other parvovirus ↓ Generation of recombinant CPV-2 or parvovirus strains ↓ Infection of dogs and/or other susceptible animals
Potential harm	Disease in dogs and/or other susceptible species

Risk source

160. The source of potential harm for this postulated risk scenario is the GMO.

Causal Pathway

161. An animal containing the GMO could be co-infected with another CPV-2 strain, or other parvovirus, which recombines to generate a novel CPV-2 or parvovirus strain that causes disease in dogs or other susceptible species.

Likelihood assessment

162. The probability of recombination occurring in viruses is dependent on co-circulation of different viruses in the same geographical area, genetic similarity between the viruses, rate of co-infection of a host with both viruses and viral population size within the infected host cell. For recombination between the GMO and a strain of CPV-2 or another parvovirus to occur, both strains would need to be present and replicating in the same cell at the same time. This could occur if:

- i. the dog vaccinated with the GMO is exposed to another strain of CPV-2 before or after vaccination;
- ii. two different live attenuated CPV-2 vaccines are administered at the same time; or
- iii. a susceptible animal is infected by a parvovirus and infected by the GMO following exposure to a vaccinated dog, from GMO shed into the environment;
- iv. the GMO is mistakenly administered to a non-canid species or is used off-label by a veterinarian into an infected animal.

Potential for recombination between the GMO and another strain of CPV-2

163. Dogs may be exposed to field strains of CPV-2 immediately prior to or after vaccination with the GMO. This could occur if dogs are housed with other animals that can move freely between the home and the environment, or if dogs are taken out into the environment within the period immediately prior to vaccination with the GMO or before onset of immunity from the vaccine (3 days, discussed in Chapter 1). As the GMO and wild-type CPV-2 share similar cell tropism, co-infection is highly likely to occur in the same cell and could result in recombination. As discussed in Chapter 1, Section 3.4, bioinformatic studies have shown that recombination occurs between vaccine strains and circulating strains of CPV-2.

164. Many puppies are vaccinated within 4 to 8 weeks old while still in the care of a breeder and are typically isolated from other dogs. Any other dogs likely to encounter those puppies in a breeder environment are likely to have already been vaccinated against CPV-2.

165. Puppies not vaccinated while in the care of the breeder are likely to be vaccinated shortly after being bought, with the recommendation that puppies are kept in the home until vaccinations are complete (Chapter 1, Section 5.4). This reduces the likelihood of puppies being infected with field strains of CPV-2 before being vaccinated. Vaccination of dogs with the GMO or other available CPV-2 vaccines should also generate immunity towards circulating strains, minimising the window in which naïve dogs would be infected with the virus to around 4 to 8 weeks old.

166. As discussed in Chapter 1, CPV-2 causes symptomatic disease in young dogs within 2 days after exposure. The APVMA has registered several live attenuated CPV2 vaccines and has issued recommendations about their use. This includes the recommendation to only vaccinate healthy puppies. This recommendation reduces the likelihood that puppies will be co-infected with the GMO and a field strain of CPV-2.

167. Vaccination protocols recommend that animals vaccinated for the first time are not taken out into the environment to limit their exposure to disease until the vaccine has taken effect. As mentioned in Risk scenario 1, many pet owners are conscious of the health of their animals and are likely to adhere to the recommendations, therefore reducing the likelihood a vaccinated puppy being exposed to field strains of CPV-2 after vaccination.

168. The vaccination of dogs with the GMO would confer protective immunity against circulating strains of CPV-2, reducing the likelihood of co-infection with multiple strains outside of the two-week post-vaccination period. Vaccination protocols and practices recommend that vaccinated dogs have limited environmental exposure. Adherence to the recommendations limits the likelihood of a dog being exposed to a field strain of CPV-2 before the onset of immunity.

Potential for recombination between the GMO and other CPV-2 vaccine strains

169. Recombination between two vaccine strains of CPV-2 could occur if a dog is exposed to two different CPV-2 vaccine strains within a small temporal window. This could occur by administering another CPV-2 vaccine strain at the same time as the GMO, by administering the GMO while another vaccine strain has not been cleared from the dog, or by being vaccinated with the GMO then exposed to another vaccine strain that has been shed into the environment.

170. All animal vaccines approved for administration by injection in Australia must be administered by a qualified veterinarian. Veterinary protocols recommend only vaccinating with one strain of a given live attenuated vaccine, reducing the likelihood of two CPV-2 vaccines being administered concurrently.

171. A dog could be vaccinated with the GMO while still infected with a different CPV-2 vaccine strain or vice versa. This could occur if a puppy is vaccinated while in the care of a breeder and then vaccinated again after being re-homed. As discussed in Chapter 1, vaccine strains are typically cleared within two weeks. Australian vaccination schedules recommend at least two weeks between vaccine administrations for young puppies, reducing the likelihood of a dog being infected with two different vaccine strains of CPV-2.

172. Several APVMA registered CPV-2 vaccines also include recommendations to administer vaccine doses at least two weeks apart.

173. For both adult domestic and wild dogs, the likelihood of previous exposure to CPV-2 or a vaccine against CPV-2 is high, therefore limiting the potential for co-infection with the GMO and a second strain of CPV-2 in the environment due to existing immunity.

174. Several live attenuated CPV-2 vaccines are already in use in Australia, and several strains of wild type CPV-2 are already circulating in Australia. To date, there are no reported instances of recombinant strains of CPV-2 or other parvoviruses with increased virulence.

175. Therefore, based on the information discussed above and assuming reasonable adherence to vaccination guidelines, the likelihood that both the GMO and other CPV-2 are present in the same host/cells for recombination to occur is plausible. However, the likelihood of recombination events leading to an established novel pathogenic CPV-2 strain is **unlikely**.

Potential for recombination between the GMO and other parvoviruses

176. For recombination to occur, both the GMO and another strain of CPV-2 or a similar parvovirus must be present and replicating in the same cell at the same time.

177. It is expected that the GMO will be shed in the faeces of vaccinated dogs for up to 10 days post vaccination. While the environmental stability of the GMO has not been tested, it is likely similar to the parent strain. The GMO could persist on contaminated surfaces or in the environment for an extended period. As described in Chapter 1 Section 5.8, there is significant spatial overlap in the habitats of wild dogs and urban dogs, increasing the likelihood of animals encountering surfaces or environment where the GMO has been shed in faeces.

178. Animals exposed to the GMO on contaminated surfaces or in the environment would not be expected to adhere to an isolation period, and therefore may also encounter field strains of CPV-2 or similar parvoviruses such as FPV, thereby leading to potential recombination events.

179. As mentioned in Chapter 1, veterinarians may use APVMA registered products off label or mistakenly administer this vaccine into a non-canid animal. This could result in the GMO being administered to non-canids who may be exposed to other parvoviruses, thereby leading to potential recombination events.

180. As mentioned in Chapter 1, Section 5.6, sequence analysis shows that parvovirus species can recombine with each other. Many parvoviruses already circulate in Australia, however cases of co-infection with different parvovirus species have not been reported. CPV-2 has not been reported in non-canid and non-felid vertebrates, and cases of infection with a parvovirus that is not CPV-2 has not been reported in dogs. Therefore, it is **highly unlikely** that the GMO and another parvovirus species would co-infect dogs or wild animals simultaneously resulting in the generation of novel recombinant strains that could cause disease or have altered host range.

Consequence assessment

Recombination of the GMO with field CPV-2 strains or vaccine CPV-2 strains

181. If recombination occurred between the GMO and either a field strain or a vaccine strain of CPV-2, the likely result would be a recombinant GMO with a wild type capsid, or a wild type strain with an attenuated capsid. In either case, the recombinant GMO would have similar characteristics to the vaccine strain or the already circulating wild type CPV-2. The recombination between the GMO and other strains of CPV-2 (field or vaccine) would result in either vaccination against CPV-2 or clinical disease that is not more severe than wild type CPV-2. Therefore, the consequence to susceptible species would be **marginal** (minimal or no increase in harm to desirable components of the environment).

Generation of novel recombinant CPV-2 or parvovirus

182. If recombination between the GMO and other CPV-2 strains or parvoviruses were to occur, it could result in the generation of a novel strain of CPV-2. As discussed in Chapter 1, CPV-2 is genetically highly similar to FPV, with the greatest variation occurring in the capsid sequence. Therefore, the likely result of recombination is a recombinant GMO with a wild type parvovirus capsid or a wild type parvovirus with an attenuated capsid. However, even with the presence of several live attenuated vaccines used in Australia and the circulation of several CPV-2 strains in Australia, novel, more virulent strains have not been reported. It is highly unlikely that the GMO would recombine with other strains of CPV-2 at a greater rate than other strains already present in Australia, or that the resulting strain would be more virulent. In the event of a recombinant strain emerging, it would only cause serious disease in the small number of animals which have not been either vaccinated or exposed to CPV. Therefore, the consequence of resulting in a novel CPV-2 is **marginal**.

Risk estimate

183. The risk estimate is based on a combination of the likelihood and consequence assessments, using the Risk Estimate Matrix (see Chapter 2, Section 1), as described in the Regulator's Risk Analysis Framework 2013.

184. The likelihood of generating a novel CPV-2 more pathogenic than the parent organism via homologous recombination in dogs/other susceptible species has been assessed as **unlikely** with the potential consequence considered **marginal**. The overall risk is therefore estimated to be **negligible** (risk is of no discernible concern and there is no present need to invoke actions for mitigation).

185. The likelihood for recombination of the GMO and other strains of CPV-2 or another parvovirus in dogs/other susceptible species is considered **highly unlikely** with a **marginal** consequence. The overall risk is therefore estimated to be **negligible** (risk is of no discernible concern and there is no present need to invoke actions for mitigation).

Section 4 Uncertainty

186. Uncertainty is an intrinsic part of risk analysis². There can be uncertainty in identifying the risk source, the causal linkage to harm, the type and degree of harm, the likelihood of harm or the level of risk. In relation to risk management, there can be uncertainty about the effectiveness, efficiency and practicality of controls.

187. There are several types of uncertainty in risk analysis (Clark and Brinkley, 2001; Hayes, 2004; Bammer and Smithson, 2008). These include:

- uncertainty about facts:
 - knowledge – data gaps, errors, small sample size, use of surrogate data
 - variability – inherent fluctuations or differences over time, space or group, associated with diversity and heterogeneity
- uncertainty about ideas:
 - description – expression of ideas with symbols, language or models can be subject to vagueness, ambiguity, context dependence, indeterminacy or under-specificity
 - perception – processing and interpreting risk is shaped by our mental processes and social/cultural circumstances, which vary between individuals and over time.

188. Uncertainty is addressed by approaches such as balance of evidence, conservative assumptions, and applying risk management measures that reduce the potential for risk scenarios involving uncertainty to lead to harm. If there is residual uncertainty that is important to estimating the level of risk, the Regulator will take this uncertainty into account in making decisions.

189. For DIR-202 uncertainty is noted in relation to several points, including:

- the ability of the GMO to persist in the environment;
- the potential of the GMO to recombine and generate novel pathogenic strains; and
- the length of the protection from CPV-2 conferred by the GM vaccine.

190. The uncertainties outlined above have been accommodated by taking a conservative approach to the risk analysis.

Section 5 Risk evaluation

191. Risk is evaluated against the objective of protecting the health and safety of people and the environment to determine the level of concern and, subsequently, the need for controls to mitigate or reduce risk. Risk evaluation may also aid consideration of whether the proposed dealings should be authorised, need further assessment, or require collection of additional information.

192. Factors used to determine which risks need treatment may include:

- risk criteria,
- level of risk,
- uncertainty associated with risk characterisation, and
- interactions between substantive risks.

² A more detailed discussion is contained in the Regulator's *Risk Analysis Framework* available from the OGTR [website](#) or via Free call 1800 181 030.

193. Three risk scenarios were identified whereby the proposed dealings might give rise to harm to people or the environment. This included consideration of whether people and animals can be exposed to the GMO while conducting the dealings or in the environment and whether there is a potential for recombination of the GMO with other CPV-2 strains. The potential effects of releasing the GMO into the environment was also considered.

194. A risk is substantive only when the risk scenario may, because of gene technology, have some chance of causing harm. Risk scenarios that do not lead to harm, or could not reasonably occur, do not represent an identified risk and do not advance in the risk assessment process.

195. In the context of the range of measures already in place, including the operating guidelines and requirements of the other regulatory agencies, and considering both the short and long term, one of these scenarios was identified as representing a substantive risk requiring further assessment.

196. The likelihood and consequences of the substantive risk was characterised (Chapter 2, Section 3), and the level of risk estimated using the Risk Estimate Matrix, as described in the *Regulator's Risk Analysis Framework 2013* (see Chapter 2, Section 1).

197. The risk due to recombination of GMO with other CPV-2 strains, with the potential for transmission of recombinant CPV-2 to other susceptible animal species resulting in disease was estimated as posing a negligible risk to the environment. Hence, the Regulator considers that the dealings involved in this proposed release do not pose a significant risk to either people or the environment.

198. Control measures are likely to be imposed by the APVMA during the registration process to manage those risks. Control measures for administration of other live attenuated CPV-2 vaccines are currently imposed under other APVMA registrations. However, since this product is yet to be registered with the APVMA, additional measures to maintain critical elements of the risk context are considered in Chapter 3

Chapter 3 Risk management plan

Section 1 Background

199. Risk management is used to protect the health and safety of people and to protect the environment by controlling or mitigating risk. The risk management plan addresses risks evaluated as requiring treatment and considers limits and controls proposed by the applicant, as well as general risk management measures. The risk management plan informs the Regulator's decision-making process and is given effect through licence conditions.

200. Under section 56 of the Act, the Regulator must not issue a licence unless satisfied that any risks posed by the dealings proposed to be authorised by the licence are able to be managed in a way that protects the health and safety of people and the environment.

201. All licences are subject to three conditions prescribed in the Act. Section 63 of the Act requires that each licence holder inform relevant people of their obligations under the licence. The other statutory conditions allow the Regulator to maintain oversight of licensed dealings: Section 64 requires the licence holder to provide access to premises to OGTR inspectors and Section 65 requires the licence holder to report any information about risks or unintended effects of the dealing to the Regulator on becoming aware of them. Matters related to the ongoing suitability of the licence holder are also required to be reported to the Regulator.

202. The licence is also subject to any conditions imposed by the Regulator. Examples of the matters to which conditions may relate are listed in Section 62 of the Act. Licence conditions can be imposed to limit and control the scope of the dealings. In addition, the Regulator has extensive powers to monitor compliance with licence conditions under Section 152 of the Act.

Section 2 Risk treatment measures for substantive risks

203. The risk identification process led to identification of one substantive risk, which involves the GMO recombining with other CPV-2 strains, with the potential for transmission of the recombinant GMO to other susceptible animals resulting in disease. This risk was characterised in Chapter 2, Section 3.

204. Some of the current APVMA registered CPV-2 vaccines have warning statements on their labels to ensure that:

- CPV-2 vaccines are available by prescription only;
- only healthy dogs should be vaccinated following adequate clinical examination; and
- a minimum period of two weeks should lapse between vaccination courses.

205. To maintain critical elements of the risk context, prior to APVMA registration, the licence imposes conditions requiring that end users of the vaccine must be advised to only administer the vaccine to healthy dogs, and to follow recommended vaccination schedules indicating that the next CPV-2 vaccine must not be given until at least two weeks after vaccination with the GMO. This is to manage the risk of recombination between CPV-2 vaccine or field strains circulating in the environment.

Section 3 General risk management

206. All DIR licences issued by the Regulator contain a number of conditions that relate to general risk management. These include conditions relating to:

- applicant suitability
- testing methodology

- identification of the persons or classes of persons covered by the licence
- reporting structures
- access for the purpose of monitoring for compliance
- other modes of administration.

3.1 Applicant suitability

207. In making a decision whether or not to issue a licence, the Regulator must have regard to the suitability of the applicant to hold a licence. Under Section 58 of the Act, matters that the Regulator must take into account include:

- any relevant convictions of the applicant
- any revocation or suspension of a relevant licence or permit held by the applicant under a law of the Commonwealth, a State or a foreign country
- the capacity of the applicant to meet the conditions of the licence.

208. On the basis of information submitted by the applicant and records held by the OGTR, the Regulator considers Intervet Australia Pty Ltd suitable to hold a licence. The licence includes a requirement for the licence holder to inform the Regulator of any circumstances that would affect their suitability.

209. In addition, any applicant organisation must have access to a properly constituted Institutional Biosafety Committee and be an accredited organisation under the Act.

3.2 Testing methodology

210. As part of their licence application, Intervet Australia Pty Ltd provided a method to the Regulator for the reliable detection of the GMO, and the presence of the introduced genetic materials in a recipient organism..

3.3 Identification of the persons or classes of persons covered by the licence

211. Any person, including the licence holder, could conduct any permitted dealing with the GMO.

3.4 Modes of administration

212. The applicant has proposed one mode of administration (subcutaneous injection). The risks associated with this method of administration has been included in the risk assessment for DIR 202.

3.5 Reporting requirements

213. The licence obliges the licence holder to immediately report any of the following to the Regulator:

- any additional information regarding risks to the health and safety of people or the environment associated with the dealings;
- any contraventions of the licence by persons covered by the licence;
- any unintended effects of the release.

214. The licence holder is also obliged to submit an Annual Report containing any information required by the licence.

215. There are also provisions that enable the Regulator to obtain information from the licence holder relating to the progress of the commercial release (see Section 4, below).

216. The licence also requires the licence holder to notify the Regulator of the following authorisations by the APVMA:

- inclusion on the Public Chemicals Registration Information System (PubCRIS); and

- any amendments to the registration.

3.6 Monitoring for compliance

217. The Act stipulates, as a condition of every licence, that a person who is authorised by the licence to deal with a GMO, and who is required to comply with a condition of the licence, must allow the Regulator, inspectors or other person authorised by the Regulator, to enter premises where a dealing is being undertaken for the purpose of monitoring or auditing the dealing.

218. In cases of non-compliance with licence conditions, the Regulator may instigate an investigation to determine the nature and extent of non-compliance. The Act provides for criminal sanctions of large fines and/or imprisonment for failing to abide by the legislation, conditions of the licence or directions from the Regulator, especially where significant damage to the health and safety of people or the environment could result.

Section 4 Post release review

219. Regulation 10 requires the Regulator to consider the short and the long term when assessing risks. The Regulator takes account of the likelihood and impact of an adverse outcome over the foreseeable future and does not disregard a risk on the basis that an adverse outcome might only occur in the longer term. However, as with any predictive process, accuracy is often greater in the shorter rather than longer term.

220. For the current application for a DIR licence, the Regulator is including conditions that require ongoing oversight in order to provide feedback on the findings of the RARMP and ensure the outcomes remain valid for future findings or changes in circumstances. If a licence was issued, this ongoing oversight would be achieved through PRR activities. The three components of PRR are:

- adverse effects reporting system (Section 4.1)
- requirement to monitor specific indicators of harm (Section 4.2)
- review of the RARMP (Section 4.3).

The outcomes of these PRR activities may result in no change to the licence or could result in the variation, cancellation or suspension of the licence.

4.1 Adverse effects reporting system

221. Any member of the public can report adverse experiences/effects resulting from a GMO to the OGTR through the Free-call number (1800 181 030), mail (MDP 54 – GPO Box 9848, Canberra ACT 2601) or via email to the OGTR inbox (ogtr@health.gov.au). Reports can be made at any time on any DIR licence. Credible information would form the basis of further investigation and may be used to inform a review of a RARMP (see Section 4.3 below) as well as the risk assessment of future applications involving similar GMOs.

4.2 Requirement to monitor specific indicators of harm

222. Collection of additional specific information on an intentional release provides a mechanism for ‘closing the loop’ in the risk analysis process and for verifying findings of the RARMP, by monitoring the specific indicators of harm that have been identified in the risk assessment.

223. The term ‘specific indicators of harm’ does not mean that it is expected that harm would necessarily occur if a licence was issued. Instead, it refers to measurement endpoints which are expected to change should the authorised dealings result in harm. Should a licence be issued, the licence holder would be required to monitor these specific indicators of harm as mandated by the licence. A note is included in the licence clarifying that outbreaks linked to the GMO must be reported to the Regulator.

224. The triggers for this component of PRR may include risk estimates greater than negligible or significant uncertainty in the risk assessment.

225. The characterisation of the risk scenarios discussed in Chapter 2 identified the risk of recombination as a risk that could be greater than negligible. Therefore, it was considered a substantive risk that warranted further detailed assessment. Further assessment determined that this risk was not greater than negligible. No specific indicators of harm have been identified in this RARMP for application DIR 202. However, specific indicators of harm may also be identified during later stages, e.g. through either of the other components of PRR.

226. Conditions have been included in the licence to allow the Regulator to request further information from the licence holder about any matter to do with the progress of the release, including research to verify predictions of the risk assessment.

4.3 Review of the RARMP

227. The third component of PRR is the review of RARMPs after a commercial/general release licence is issued. Such a review would take into account any relevant new information, including any changes in the context of the release, to determine if the findings of the RARMP remained current. The timing of the review would be determined on a case-by-case basis and may be triggered by findings from either of the other components of PRR or be undertaken after the authorised dealings have been conducted for some time. If the review findings justified either an increase or decrease in the initial risk estimate(s) or identified new risks to people or to the environment that require management, this could lead to changes to the risk management plan and licence conditions. In the case of a veterinary vaccine where the APVMA is the primary regulatory body overseeing the vaccine, any review of the RARMP or licence would likely only be initiated in consultation with APVMA.

Section 5 Conclusions of the RARMP

228. The risk assessment concludes that the proposed commercial release of this GM CPV-2 vaccine poses negligible risks to the health and safety of people and a negligible risk to the environment as a result of gene technology.

229. The risk management plan concludes that the identified negligible risks can be managed to protect the health and safety of people and the environment by imposing risk treatment measures. Licence conditions are imposed to ensure that end users of the vaccine are advised to restrict the vaccination to healthy dogs and to follow recommended vaccination schedules indicating that the next CPV-2 live vaccine must not be given until at least two weeks after vaccination with the GMO. General conditions were also included in the licence to ensure that there is ongoing oversight of the GM vaccine.

References

- Alves, F., Prata, S., Nunes, T., Gomes, J., Aguiar, S., Aires da Silva, F., Tavares, L., *et al.* (2020). Canine parvovirus: a predicting canine model for sepsis. *BMC veterinary research* 16, 1-11.
- Bagshaw, C., Isdell, A.E., Thiruvaiyaru, D.S., Brisbin Jr, I.L., and Sanchez, S. (2014). Molecular detection of canine parvovirus in flies (Diptera) at open and closed canine facilities in the eastern United States. *Preventive veterinary medicine* 114, 276-284.
- Bammer, G., and Smithson, M. (2008). *Uncertainty and risk: Multidisciplinary perspectives* (London: Earthscan).
- Bergmann, M., Freisl, M., Hartmann, K., Speck, S., Truyen, U., Zablotzki, Y., Mayr, M., *et al.* (2020). Antibody response to canine parvovirus vaccination in dogs with hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Vaccines* 8, 547.
- Bergmann, M., Freisl, M., Hartmann, K., Speck, S., Truyen, U., Zablotzki, Y., Mayr, M., *et al.* (2021). Antibody response to canine parvovirus vaccination in dogs with hypothyroidism treated with levothyroxine. *Vaccines* 9, 180.
- Cavalli, A., Marinaro, M., Desario, C., Corrente, M., Camero, M., and Buonavoglia, C. (2018). In vitro virucidal activity of sodium hypochlorite against canine parvovirus type 2. *Epidemiology & Infection* 146, 2010-2013.
- Churchill, A. (1987). Preliminary development of a live attenuated canine parvovirus vaccine from an isolate of British origin. *The Veterinary Record* 120, 334-339.
- Clark, A.J., and Brinkley, T. (2001). *Risk management: for climate, agriculture and policy*. (Canberra: Commonwealth of Australia).
- Dall'Ara, P., Lauzi, S., Turin, L., Castaldelli, G., Servida, F., and Filipe, J. (2023a). Effect of Aging on the Immune Response to Core Vaccines in Senior and Geriatric Dogs. *Veterinary Sciences* 10, 412.
- Dall'Ara, P., Lauzi, S., Zambarbieri, J., Servida, F., Barbieri, L., Rosenthal, R., Turin, L., *et al.* (2023b). Prevalence of Serum Antibody Titers against Core Vaccine Antigens in Italian Dogs. *Life* 13, 587.
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D., and Squires, R.A. (2016). WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J Small Anim Pract* 57, E1-e45.
- Decaro, N., and Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary microbiology* 155, 1-12.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., and Barrs, V. (2020). Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Veterinary microbiology* 247, 108760.
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., and Buonavoglia, C. (2005a). Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals* 33, 261-267.
- Decaro, N., Crescenzo, G., Desario, C., Cavalli, A., Losurdo, M., Colaianni, M.L., Ventrella, G., *et al.* (2014). Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine* 32, 3850-3853.

Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., *et al.* (2005b). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 17, 133-138.

Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V., *et al.* (2007). Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25, 1161-1166.

Du, J., Wang, W., Chan, J.F.-W., Wang, G., Huang, Y., Yi, Y., Zhu, Z., *et al.* (2019). Identification of a Novel Ichthyic Parvovirus in Marine Species in Hainan Island, China. *Frontiers in Microbiology* 10.

Faddy, H.M., Gorman, E.C., Hoad, V.C., Frentiu, F.D., Tozer, S., and Flower, R. (2018). Seroprevalence of antibodies to primate erythrovirus 1 (B19V) in Australia. *BMC Infectious Diseases* 18, 1-7.

Gordon, J., and Angrick, E. (1986). Canine parvovirus: environmental effects on infectivity. *American Journal of Veterinary Research* 47, 1464-1467.

Harden, R. (1985). The ecology of the dingo in north-eastern New South Wales I. Movements and home range. *Wildlife Research* 12, 25-37.

Hayes, K.R. (2004). Ecological implications of GMOs: robust methodologies for ecological risk assessment. Best practice and current practice in ecological risk assessment for genetically modified organisms. (Tasmania: CSIRO Division of Marine Research).

Kelman, M., Norris, J., Barrs, V., and Ward, M. (2020). A history of canine parvovirus in Australia: what can we learn? *Australian veterinary journal* 98, 504-510.

Kwan, E., Carrai, M., Lanave, G., Hill, J., Parry, K., Kelman, M., Meers, J., *et al.* (2021). Analysis of canine parvoviruses circulating in Australia reveals predominance of variant 2b and identifies feline parvovirus-like mutations in the capsid proteins. *Transboundary and Emerging Diseases* 68, 656-666.

Ling, M., Norris, J.M., Kelman, M., and Ward, M.P. (2012). Risk factors for death from canine parvovirus-related disease in Australia. *Veterinary microbiology* 158, 280-290.

Mattola, S., Hakanen, S., Salminen, S., Aho, V., Mäntylä, E., Ihalainen, T.O., Kann, M., *et al.* (2021). Concepts to reveal parvovirus–nucleus interactions. *Viruses* 13, 1306.

McGaving, D. (1987). Inactivation of canine parvovirus by disinfectants and heat. *Journal of small animal practice* 28, 523-535.

Meunier, P., Cooper, B., Appel, M., and Slauson, D. (1984). Experimental viral myocarditis: parvoviral infection of neonatal pups. *Veterinary Pathology* 21, 509-515.

Miranda, C., and Thompson, G. (2016). Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology* 97, 2043-2057.

Mochizuki, M., Ohshima, T., Une, Y., and Yachi, A. (2008). Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures. *Journal of Veterinary Medical Science* 70, 1305-1314.

Nandi, S., and Kumar, M. (2010). Canine parvovirus: current perspective. *Indian J Virol* 21, 31-44.

Ogbu, K., Anene, B., Nweze, N., Okoro, J., Danladi, M., and Ochai, S. (2017). Canine parvovirus: a review.

OGTR (2013). Risk Analysis Framework 2013. (Office of the Gene Technology Regulator).

Pearce, J., Spibey, N., Sutton, D., and Tarpey, I. (2023). Development of a Novel Canine Parvovirus Vaccine Capable of Stimulating Protective Immunity in Four-Week-Old Puppies in the Face of High Levels of Maternal Antibodies. *Vaccines* 11, 1499.

Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., Blanc, H., *et al.* (2014). Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. *PLoS One* 9, e111779.

Pudasaini, P., Das, K., Gorai, S., Paudel, S., GC, S., Adhikari, S., Thapa, B., *et al.* (2023). Parvovirus in dermatology: A review. *JEADV Clinical Practice* 2, 689-698.

Rabbani, A.H., Ullah, Q., Naseer, O., Raza, A.I., Shahid, M., Ali, S., Hussain, K., *et al.* (2021). Canine Parvo Virus: A Review on Current Perspectives in Seroprevalence, Diagnostics and Therapeutics. *Glob Vet* 23, 113-126.

Sehata, G., Sato, H., Yamanaka, M., Takahashi, T., Kainuma, R., Igarashi, T., Oshima, S., *et al.* (2017). Substitutions at residues 300 and 389 of the VP2 capsid protein serve as the minimal determinant of attenuation for canine parvovirus vaccine strain 9985-46. *Journal of General Virology* 98, 2759-2770.

Shackelton, L.A., Hoelzer, K., Parrish, C.R., and Holmes, E.C. (2007). Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J Gen Virol* 88, 3294-3301.

Singh, P., Kaur, G., Chandra, M., and Dwivedi, P. (2021). Prevalence and molecular characterization of canine parvovirus. *Veterinary World* 14, 603.

Spibey, N., Greenwood, N., Sutton, D., Chalmers, W., and Tarpey, I. (2008). Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Veterinary microbiology* 128, 48-55.

Thomson, P. (1992). The behavioural ecology of dingoes in north-western Australia. II. Activity patterns, breeding season and pup rearing. *Wildlife Research* 19, 519-529.

Thomson, P., Rose, K., and Kok, N. (1992). The behavioural ecology of dingoes in north-western Australia. V. Population dynamics and variation in the social system. *Wildlife Research* 19, 565-583.

Tuteja, D., Banu, K., and Mondal, B. (2022). Canine parvovirology—A brief updated review on structural biology, occurrence, pathogenesis, clinical diagnosis, treatment and prevention. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 82, 101765.

Van Arkel, A., Kelman, M., West, P., and Ward, M.P. (2019). The relationship between reported domestic canine parvovirus cases and wild canid distribution. *Heliyon* 5.

Vannamahaxay, S., and Chuammitri, P. (2017). Update on canine parvovirus: Molecular and genomic aspects, with emphasis on genetic variants affecting the canine host. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 23.

Vernay, O., Sarcey, E., Detrez, V., Abachin, E., Riou, P., Mouterde, B., Bonnevey, T., *et al.* (2019). Comparative analysis of the performance of residual host cell DNA assays for viral vaccines produced in Vero cells. *Journal of Virological Methods* 268, 9-16.

資料2. 審査データの概要

Wang, J., Cheng, S., Yi, L., Cheng, Y., Yang, S., Xu, H., Zhao, H., *et al.* (2012). Evidence for natural recombination between mink enteritis virus and canine parvovirus. *Virology Journal* 9, 252.

Woolford, L., Crocker, P., Bobrowski, H., Baker, T., and Hemmatzadeh, F. (2017). Detection of the canine parvovirus 2c subtype in Australian dogs. *Viral Immunology* 30, 371-376.

Zheng, W., Jiang, L., Lei, Q., Yang, J., Gao, X., Wang, W., Zhang, Y., *et al.* (2019). Development and Validation of Quantitative Real-Time PCR for the Detection of Residual CHO Host Cell DNA and Optimization of Sample Pretreatment Method in Biopharmaceutical Products. *Biol Proced Online* 21, 17.

Zourkas, E., Ward, M.P., and Kelman, M. (2015). Canine parvovirus in Australia: a comparative study of reported rural and urban cases. *Veterinary Microbiology* 181, 198-203.

Appendix A: Summary of submissions

The Regulator received several submissions from prescribed experts, agencies and authorities³ on matters relevant to preparation of the RARMP. All issues raised in submissions relating to risks to the health and safety of people and the environment were considered. These issues, and where they are addressed in the consultation RARMP, are summarised below.

Submission	Summary of issues raised	Comment
1	As this has been approved by the European Medicine Authority no issues are raised. I do not have an issue.	Noted.
2	Information noted.	Noted.
3	Does not have the required expertise to assess this application or provide meaningful comment. Therefore, are unable to support nor challenge this application.	Noted.
4	No objections to the application.	Noted.
5	No comments to provide	Noted
6	No issues at this time.	Noted.
7	Do not have specialist veterinary qualifications so does not plan to make any comment on the application.	Noted.
8	It is noted that the risk scenarios presented appear to pose negligible effect to both environmental and human health. We do not have any policy in place opposing gene technology	Noted.
9	Accepts that, overall, Intervet Australia Pty Ltd's application has negligible risks to the health and safety of people and the environment. Is satisfied that the measures taken to manage the short and long term risks from the proposal are adequate.	Noted.
10	Advised to consider the following in the preparation of the RARMP: - Clarification of the mechanism of attenuation of the parent CPV strain, if known; - Whether the circulating CPV-2 strain used for the capsid protein is circulating in Australia; - The genetic diversity of circulating strains of CPV-2 in Australia; - Clarification on how the GMO was constructed;	Noted. The raised issues have been addressed in the RARMP prepared by the Regulator and are discussed in Chapter 1 and 2.

³ Prescribed experts, agencies and authorities include GTTAC, State and Territory Governments, Australian government agencies and the Minister for the Environment.

資料2. 審査データの概要

DIR 202 – Risk Assessment and Risk Management Plan (Month 2024)

Office of the Gene Technology Regulator

Submission	Summary of issues raised	Comment
	- The frequency of recombination between field strains of CPV-2; - Has the GMO been tested in immunocompromised animals; - Potential shedding of the GMO from vaccinated animals; and - Whether the applicant will be seeking an import permit from DAFF.	
11	Advised to consider the following in preparation of the RARMP: - The relative risk of the GMO to human health from needlestick injuries compared to non-GM CPV-2 vaccines; - The relative risk of the GMO reverting to virulence compared with non-GM CPV-2 vaccines; - The relative risk of the GMO causing disease in animals in contact with vaccinated animals compared with non-GM CPV-2 vaccines; and The risk of recombination leading to virulent strains of CPV-2 that cause disease in animals.	Noted. The raised issues have been addressed in the RARMP prepared by the Regulator and are discussed in Chapter 1 and 2.
12	Agrees that the following should be included in the RARMP: potential accidental exposure of humans and other organism to the GMO resulting in harm, potential for GMO to be harmful to the environment and potential for complementation or recombination with other CPV strains. Recommended seeking clarification on the methods used to detect residual plasmid and the sensitivity of the assay used; the potential for reversion to virulence; and the potential response of dingoes in Australia to the GMO.	Noted. Risks associated with residual plasmid, reversion to virulence and potential response of dingoes in Australia to the GMO are discussed in Chapter 1 and 2 (Risk scenario 2 and 3).
13	No advice or comments on the RARMP for DIR 202.	Noted.

Appendix B: Summary of advice on consultation RARMP from prescribed agencies and state, territory and local government

The Regulator received several submissions from prescribed experts, agencies and authorities⁴ on the consultation RARMP. All issues raised in submissions relating to risks to the health and safety of people and the environment were considered in the context of the currently available scientific evidence and were used in finalising the RARMP that formed the basis of the Regulator's decision to issue the licence. Advice received is summarised below.

Submitter	Summary of issues raised	Comment
1	Does not possess the specialised scientific expertise required to provide informed feedback on the subject matter and therefore will not submit comments on this application.	Submission has been noted.
2	Agrees: - that all plausible risk scenarios relating to the health and safety of people, or the environment have been identified. - that the risk of generating novel pathogenic CPV-2 due to recombination of the GMO with other strains is negligible. - that the conditions proposed in the draft licence to prevent the recombination of the GMO with other CPV-2, or vaccine strains of the GMO are appropriate. - with the overall conclusion of the RARMP. Advises that ongoing surveillance of circulating strains and recombination would be valuable to monitor the emergence of novel strains.	Submission has been noted. The licence holder is required to inform the Regulator if they become aware of any additional information, contraventions and any unintended effects of the dealings authorised by the licence (Condition 17). A note has been included in Condition 17 to clarify that any reported CPV-2 outbreaks associated with the commercial release of the GMO would need to be reported to the Regulator. Under condition 19(d), the Regulator can also request the licence holder to collect and provide information about any matter

⁴ Prescribed experts, agencies and authorities include GTTAC, State and Territory Governments, Australian Government agencies and the Minister for the Environment.

資料2. 審査データの概要

Submitter	Summary of issues raised	Comment
		to do with the progress of the dealings.
3	Notes the high quality of the document and considers the risk assessment to be thorough and appropriate. Supports the proposed negligible risk estimate of the GMO. Agrees: - there is no substantive risk of infection and/or disease in humans following direct or indirect exposure to the GMO, or to animals following direct or indirect exposure to dogs vaccinated with the GMO. - that the recombination of the GMO with other strains of CPV-2, other CPV variants, or other species of parvovirus is possible but a recombination event between this GMO and a parvovirus in Australia is expected to be of no greater consequence than a recombination event between two field strains. Notes that administration of the GMO to non-canid species, such as accidental administration to a cat due to human/vet error, or off-label administration in ferrets for distemper protection, has not been considered in risk scenario 3 as a potential recombination event. However, don't believe that this would change the negligible risk estimate of the GMO. The scientific name of canine parvovirus should be updated from Carnivore protoparvovirus 1 to Protoparvovirus carnivoran1 (as of 2023, according to ICTV).	Submission has been noted. The potential for off-label use has been included in Chapter 1 and 2 of the final RARMP. The RARMP has been updated to include the more recent scientific name.
4	Agrees that overall, there is negligible risk to the health and safety of people and the environment. Satisfied that the measures taken to manage the short term and long-term risks are adequate.	Submission has been noted.
5	Satisfied that there are no risks to people and that the proposed licence conditions are reasonable for managing the potential risks identified. Notes that the vaccine is already approved internationally.	Submission has been noted.
6	Agrees that the release poses negligible risks to human health and the environment and that the proposed conditions are appropriate. Notes:	Submission has been noted.

資料2. 審査データの概要

Submitter	Summary of issues raised	Comment
	- The parent strain and the GMO do not cause severe disease in dogs; - The GMO is currently approved for use internationally; - Issues outside the scope of the OGTR fall under the remit of the APVMA; - There is a plausible exposure pathway from dogs to dingoes, however disease is unlikely to develop. Suggests that the OGTR continues to monitor the literature for future reports of CPV-2 in non-canine related native animals and revise the RARMP as needed.	The licence holder is required to inform the Regulator if they become aware of any additional information, contraventions and any unintended effects of the dealings authorised by the licence (Condition 17). A note has been included in Condition 17 to clarify that any reported CPV-2 outbreaks associated with the commercial release of the GMO would need to be reported to the Regulator under this condition. Under condition 19(d), the Regulator can also request the licence holder to collect and provide information about any matter to do with the progress of the dealings. The licence includes conditions that require ongoing oversight under Post Release Review. Outcomes of PRR activities may result in changes to the licence, or cancellation or suspension of the licence.
7	Overall, agrees that the release poses negligible risks to human health and the environment and that the proposed conditions are appropriate. Satisfied that the risks identified are negligible and can be managed with the specific risk treatment measures included in the draft licence conditions. Notes that: - CPV-2 has been shown to enter cells expressing the human transferrin receptor <i>in vitro</i>, however these results do not correlate with human infection in the environment, supporting the conclusion that human infection is highly unlikely; - The parent strain and CPV-2c have been	Submission has been noted. Some information about the construction of the GMO has been declared Confidential Commercial Information (CCI) under Section 185 of the Act. This information was available to the prescribed experts and agencies that were consulted on this application upon request in the course of them performing duties or functions under the Act or under a corresponding State law.

資料2. 審査データの概要

Submitter	Summary of issues raised	Comment
	present together in the environment for at least 9 years and has not resulted in more pathogenic or vaccine escape recombination events; - The capsid modifications to attenuate the CPV-2c capsid are unclear and should be included; - CPV2c has been detected in Australia since 2015 and not 2017 as mentioned in the RARMP; - Insufficient evidence was included in the RARMP about the efficacy of CPV-2 vaccines against different CPV-2 strains, and the proposed GMO likely provides greater protection against CPV-2c; - The potential for altered host range resulting from recombination of the GMO with other strains is not sufficiently addressed, considering the evolution of CPV-2 from feline panleukopenia virus. The risk of this likely depends on the mechanism of host specificity.	CCI is not available to the public. These details were considered in the RARMP. The RARMP has been amended to rectify the date of detection of CPV2c in Australia. The RARMP considers CPV-2 vaccines and the potential for cross-protective effect in Chapter 1. The potential benefits and efficacy of a GM vaccine are however, outside the scope of the OGTR assessment. This is considered by the APVMA registration assessment. More information on the potential for altered host range has been included to Chapter 1 and 2 of the RARMP.
8	Agrees with the overall conclusions of the RARMP. Notes that: - More detailed consideration should be given to the potential for accidental exposure to people via needlestick injury; - Commercial release of the GMO would still be subject to a Permit to Import a Genetically Modified Organism into Tasmania and a Permit to Deal with a GMO in a GMO-Free Area under Section 9 of Tasmania's <i>Genetically Modified Organisms Control Act 2004</i>.	Submission has been noted. The risk of exposure to humans via needlestick is considered in Chapter 2 of the RARMP. Noted.

資料2. 審査データの概要

別添資料 37 CPV 630a 株の伝播及び核酸の水平伝播に関するシナリオ別考察

本遺伝子組換え微生物は、対象動物である犬へのワクチン接種後、約 1～8 日目に糞便中にウイルス排泄することが認められている。接種動物より排泄された CPV 630a 株が野生動物へ伝播する可能性及び核酸の水平伝播の観点について、以下のシナリオ別に考察した。

なお、パルボウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。したがって、CPV 630a 株が感受性動物に感染した後にウイルスの核酸が感染動物のゲノムに組み込まれることはないと考えられる。

シナリオ 1: 接種動物→野生動物への拡散へ拡散

シナリオ 2: 接種動物→他のコンパニオンアニマル(伴侶動物)→野生動物へ拡散

シナリオ 3: CPV との相同組み換えによる拡散

シナリオ 4: 猫汎白血球減少症ウイルス(Feline panleukopenia virus; FPLV)との相同組み換えによる拡散

シナリオ 1: 接種動物→野生動物への拡散へ拡散

接種動物
1) 犬にワクチン接種後、CPV 630a 株が糞便に排泄される。 2) 野外飼育又は散歩等で野外に出ることにより、野外で糞便に排泄する。
↓
野生動物
3) 野生動物が野外で排泄された糞便に接触することにより感染する。
<u>感染の可能性及び核酸の水平伝播に関する考察</u> 1)の段階において、糞便への排泄はワクチン接種後約 7 日間までである。2)において、犬の散歩においては通常、飼育者により糞便は清掃される。 CPV の感染域を考慮すると、国内で CPV が感染する、又はその可能性を有する主な固有野生動物としては、イヌ科のタヌキ及びアカギツネが考えられるが、以上の段階 1)～2)の可能性を考慮すると、段階 3)が発生する可能性は非常に低いと考えられる。 なお、パルボウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。したがって、CPV 630a 株が感受性動物に感染した後にウイルスの核酸が感染動物のゲノムに組み込まれることはないと考えられる。

資料2. 審査データの概要

シナリオ 2: 接種動物→他のコンパニオンアニマル(伴侶動物)→野生動物へ拡散

接種動物
1) 犬にワクチン接種後、CPV 630a 株が糞便に排泄する。
↓
他の伴侶動物
2) 同居する犬又は猫が排泄されたウイルスに接触し、感染する。 3) 野外飼育又は散歩等で野外に出ることにより、野外で排泄されたウイルスに他の伴侶動物が感染する。
↓
野生動物
4) 野生動物が野外で排泄された糞便に接触することにより感染する。
<u>感染の可能性及び核酸の水平伝播に関する考察</u> 1)の段階において、糞便への排泄はワクチン接種後約7日間までである。飼育されている犬の糞便は飼育者により清掃されるため、次の段階である 2)の可能性は、低いと考えられる。また 3)においても、犬の散歩においては通常、飼育者により糞便は清掃される。なお、猫においては 3)の段階においては、本遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株を猫へ接種した試験では、多くは接種後 3～5 日目の期間に 1 日間又は 2 日間のみ排泄が認められ、排泄する期間が非常に短い。 CPV の感染域を考慮すると、国内で CPV が感染する、又はその可能性を有する主な固有野生動物としては、イヌ科のタヌキ及びアカギツネが考えられるが、以上の段階 1)～3)の可能性を考慮すると、段階 4)が発生する可能性は非常に低いと考えられる。 なお、パルボウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。したがって、CPV 630a 株が感受性動物に感染した後にウイルスの核酸が感染動物のゲノムに組み込まれることはないと考えられる。

資料2. 審査データの概要

シナリオ 3: CPV との相同組み換えによる拡散

接種動物
1) 野生型 CPV に感染し、CPV に対して免疫が成立していない犬にワクチンを接種。又は、ワクチン接種後、CPV 630a 株に対して免疫が成立していない犬が野生型 CPV に感染。
2) 野生型 CPV と CPV 630a 株がこの個体内の細胞に共感染し、相同組換えを生じる。

↓

接種動物	他の伴侶動物
3-1) 野外飼育又は散歩等で野外に出ることにより、野外で糞便に排泄する。	3-2) 同居する犬又は猫が排泄されたウイルスに接触し、感染する。
	4) 野外飼育又は散歩等で野外に出ることにより、野外で糞便に排泄する。

↓

↓

野生動物
5) 野生動物が野外で排泄された糞便に接触することにより感染する。

感染の可能性及び核酸の水平伝播に関する考察

1)の段階において、ワクチンの使用上の注意には、健康な犬に接種するよう明記されるため、野生型 CPV に感染し、下痢等の臨床症状を呈している個体に CPV 630a 株を含むワクチンが接種される可能性は低いと考えられる。また、CPV 630a 株と犬ジステンパーウイルス感染症混合ワクチンを犬に接種後、3 日目において防御免疫が成立することが試験で確認されている。ワクチン接種日から接種後 3 日目までの間に野生型 CPV に曝露され、感染する可能性は非常に低いと考えられる。

なお、仮に相同組換えが生じた場合に生じたウイルスは CPV であることから 3-1)又は 3-2)～5)の段階の可能性についてはシナリオ①と同様と考えられる。

犬において、糞便への排泄はワクチン接種後約 7 日間までである。飼育されている犬の糞便は飼育者により清掃されるため、次の段階である 2)の可能性は否定できないものの、低いと考えられる。また 3)においても、犬の散歩においては通常、糞便は飼育者により清掃される。なお、猫においては 3)の段階においては、本遺伝子組換え微生物 CPV 630a 株の猫への接種では多くは接種後 3～5 日目の期間に 1 日間又は 2 日間 CPV 陽性となり、排泄する期間が短い。したがって、段階 4)の発生の可能性については、3-2)の動物が犬及び猫のいずれにおいても、低いと考えられる。

CPV は野外で相同組換えが起こりうることが報告されている[1, 2]。ただし、イヌにおいて CPV は数日～数週間で免疫成立すると、免疫機構により体内よりウイルスが排除されるため、相同組換えが起こるのは最初に感染した株に対する免疫成立前の短期間に別の株に感染した場合に稀に起こる事象であり、生じる可能性は非常に限定的である[3]。

また、本遺伝子組換え微生物は、対象動物である犬に接種後、移行抗体の存在下であっても CPV に対して非常に速やかに免疫を惹起し、3 日間で高い抗体価を示し、CPV に対する感染防御(Sterilizing immunity)が成立する(別添資料 28、29)。本遺伝子組換え微生物のこの特性から考慮すると、接種後の犬において免疫成立前までのわずかな期間に別の株に感染し相同組換えが起こる可能性は、免疫成立まで数週間を要する、国内で使用されている既存の CPV 生ワクチン株と比較しても非常に限定的と考えられる。

以上より、CPV 630a 株と野生型 CPV 間での相同組換えが起こる可能性は極めて低く、さらに相同組換えで生じたウイルスが野生動物に感染する可能性もさらに低いと考えられた。

なお、パルボウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。したがって、CPV 630a 株が感受性動物に感染した後にウイルスの核酸が感染動物のゲノムに組み込まれることはないと考えられる。

資料2. 審査データの概要

シナリオ 4: FPLV との相同組み換えによる拡散

接種動物	
1) 犬にワクチン接種後、CPV 630a 株が糞便に排泄する。	
↓	
他の伴侶動物(猫)	
2-1) 野生型 FPLV に罹患し、FPLV に対して免疫が成立していない猫が排泄された CPV 630a 株ウイルスに接触し、感染する。	2-2) 同居する猫が排泄された CPV 630a 株ウイルスに接触し、感染する。
3-1) FPLV と CPV 630a 株が体内の細胞に共感染し、相同組換えを生じる。	3-2) FPLV に対して免疫が成立する前に野生型 FPLV に感染する。
4-1) 感染猫が野外で組換え FPLV/CPV 株を糞便に排泄する。	4-2) FPLV と CPV 630a 株が体内の細胞に共感染し、相同組換えを生じる。
	5-2) 感染猫が野外で組換え FPLV/CPV 株を糞便に排泄する。
↓	
野生動物	
6) 野生動物が野外で排泄された糞便に接触することにより感染する。	
感染の可能性及び核酸の水平伝播に関する考察 1)の段階において、糞便への排泄はワクチン接種後約 7 日間である。飼育されている犬の糞便は飼育者により清掃されるため、次の段階である 2-1)又は 2-2)の可能性は低いと考えられる。 また、抗 FPLV 抗体は CPV に対して交差反応を示す[4]。したがって、FPLV に対して免疫が成立している猫は CPV に対しても防御され、FPLV と CPV 630a 株の共感染状態は生じないものと考えられる。したがって、2-1)が生じるケースは主に、FPLV に初感染し、免疫成立していない状態の猫が考えられる。このため、その後の段階 3-1)～6)が生じる可能性は非常に限定的である。 また、CPV 630 株を接種した猫において、抗 FPLV 抗体が誘導されることが猫への接種試験において確認されている(別添資料 38)。この試験において、CPV 630a 株接種後 7 日目までに、猫において FPLV に対して防御が有効なレベルの抗 FPLV 抗体の上昇が認められた。このように FPLV に対して交差免疫が成立している猫は野生型 FPLV に対して防御され、CPV 630a 株と FPLV との共感染状態は生じないものと考えられる。このため、その後の段階 4-2)～6)が生じる可能性は非常に限定的である。 CPV と FPLV の相同組換えの可能性については文献[1]によって示唆されている。FPLV と CPV は現在ではいずれも同じ種名である肉食動物プロトパルボウイルス 1(<i>Protoparvovirus carnivoran1</i>)に分類され、配列相同性は高いものの、感染域が異なる。FPLV は猫に感染するが、犬に感染しない。したがって理論上、FPLV と CPV が相同組換えを生じる可能性があるのは、猫が FPLV に感染し免疫が成立する前に CPV に曝露し、同細胞に FPLV と CPV が共感染した場合、又は猫が排泄された CPV 630a 株に感染し FPLV に対する免疫が成立する前に FPLV に曝露し、同細胞に FPLV と CPV が共感染した場合のみである。このため、CPV と FPLV の相同組換えの可能性は否定できないが、その可能性は非常に限定的である。 以上より、CPV 630a 株と FPLV 間での相同組換えが起こる可能性は極めて低く、さらに相同組換えで生じたウイルスが野生動物に感染する可能性もさらに低いと考えられた。なお、パルボウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。したがって、CPV 630a 株が感受性動物に感染した後にウイルスの核酸が感染動物のゲノムに組み込まれることはないと考えられる。	

総括

資料2. 審査データの概要

- 犬へ CPV 630 株接種後の排泄期間は短く、飼育実態(糞便回収)をふまえると、環境中での持続的な伝播が生じる可能性は低い。
- 相同組換え(CPV 同士、あるいは FPLV との間)は、理論上はありうるものの、ワクチンの使用状況や有効性における特性を勘案すると、相同組換えを生じる可能性は非常に低いと考えられる。さらに、相同組換えにより生じたウイルスが野生動物へ感染する可能性は極めて低いと考えられる。
- パルボウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は持たない。したがって、CPV 630a 株が感受性動物に感染した後にウイルスの核酸が感染動物のゲノムに組み込まれることはない。

参考文献

1. Ohshima, T. and M. Mochizuki, *Evidence for Recombination Between Feline Panleukopenia Virus and Canine Parvovirus Type 2*. Journal of Veterinary Medical Science, 2009. **71**(4): p. 403-408.
2. Pérez, R., et al., *Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain*. PLOS ONE, 2014. **9**(11): p. e111779.
3. Voorhees, I.E.H., et al., *Limited Intrahost Diversity and Background Evolution Accompany 40 Years of Canine Parvovirus Host Adaptation and Spread*. J Virol, 2019. **94**(1).
4. Nakamura, K., et al., *Characterisation of cross-reactivity of virus neutralising antibodies induced by feline panleukopenia virus and canine parvoviruses*. Res Vet Sci, 2001. **71**(3): p. 219-22.

資料2. 審査データの概要

別添資料 38 CPV 630a 株の FPLV 感染に対する有効性

申請者注釈:本試験においては、CPV 630a 株及び CPV 154 株の FPLV に対する有効性を評価している。本申請においては、別添資料 37 の補足資料として CPV 630a 株(DP PLUS)を猫に接種した際の FPLV に対する抗体反応を中心に参照する。

要約

1. 試験設計

13 頭の 19～22 週齢 SPF 猫を以下の通り、3 群に割り当てた。

群	n 数	接種週齢	供試ワクチン	攻撃
第 1 群	5	19～22 週齢	Puppy DP ¹⁾ (CPV 154 株含有ワクチン)	FPLV ウイルス含有量 $10^{7.7}$ FAID ₅₀ /2mL/頭を経口接種 及び FPLV ウイルス含有量 $10^{6.2}$ TCID ₅₀ /0.2mL/頭を経鼻接種
第 2 群	5		DP PLUS ²⁾ (CPV 630a 株含有ワクチン)	
第 3 群	3		なし	

1) Puppy DP: CPV 154 株及び CDV オンダーステポート株を含むジステンパー・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン

2) DP PLUS: CPV 630a 株及び CDV オンダーステポート株を含むジステンパー・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン

第 1 群及び第 2 群においては、2 ロットの供試ワクチンを 4 バイアルずつ、それぞれ Nobivac Solvent (溶解液) 1mL で溶解し、プールした。これを 1mL ずつ頸部へ皮下投与した。第 3 群は非投与の攻撃対照群とした。

抗体価測定のため、試験 0 日目(接種日)、4、7、11、14、21、28 日目(攻撃日)、35、36(又は 38 日目に対照群のみ)、42 及び 49 日目(試験終了日)に採血し、FPLV、CPV-2 及び 2c 亜型に対する HI 及び中和抗体反応を測定した。攻撃前後に総白血球数を測定した。ワクチン株又は攻撃株の排泄を評価するため、直腸スワブを毎日採取した。攻撃後、体重測定を含め臨床観察を毎日実施した。

2. 結果

臨床症状の観察結果を表 38-1 に示す。第 1 群及び第 2 群の全頭においては、ワクチン接種後、いかなる臨床症状もみられなかった。第 3 群(攻撃対照群)においては嘔吐、食欲低下及び体重減少等の典型的な猫汎白血球減少症の症状がみられた。FPLV 攻撃後、第 1 群及び第 2 群の猫では有意な白血球減少は認められなかったが、第 3 群では 3 匹全頭において、攻撃 3 日目に白血球数の急速な低下が認められ、5 日目から顕著な白血球減少症を呈した。これらの個体においては、白血球数の最低値はベースラインの 14～17%まで低下した。

資料2. 審査データの概要

表 38-1: 臨床症状結果(別添資料 38、Table 3)

群	個体 ID	接種後日数														
		26	27	28 C	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40-49
第 1 群 (Puppy DP)	3724	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3728	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3892	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3895	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
第 2 群 (DP PLUS)	3722	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3886	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3887	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3890	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
第 3 群 (攻撃対照 群)	3717	0	0	0	0	0	0	0	0*	RA#	0	0	0	RA, EE	†	
	3723	0	0	0	0	RA	0	0	0*	RA	RA	RA, Quiet, EE	†			
	3893	0	0	0	0	0	0	0	0*	RA#	RA^	RA^	RA	RA, EE	†	

C: 攻撃日、RA:食欲減退、*:軽微な食欲減退、#:排便又は排尿が観察できず、^:飼育室にて胆汁嘔吐物を観察。どの個体が嘔吐したかは特定できず。
Quiet: 沈鬱、EE:臨床症状のため、試験終了前に安楽殺。

直腸スワブにおける CPV 分離結果について、ワクチン接種後の結果を表 38-2 に、攻撃後の結果を表 38-3 に示す。ウイルス排泄については、第 1 群の猫 1 頭においては全く排泄がみられず、第 2 群の猫 1 頭においては 3 時点以上の排泄がみられたことを除いては、第 1 群及び第 2 群の大部分の猫においては接種後 6～12 日目の一時点において低レベル(2.45 TCID₅₀/mL)の排泄がみられた。第 3 群においては、攻撃後 3 日目から高力価のウイルスの活発な排泄がみられた。

【社外秘につき非開示】

HI 抗体価測定結果を表 38-4 に、中和抗体価測定結果を表 38-5 及び図 38-1 に示した。

CPV 630a 株を含有するワクチンを接種した第 2 群では、CPV-2 抗原及び CPV-2c 抗原のいずれに対してもほぼ同様に、速やかな抗体反応が認められた。FPLV に対する中和抗体応答も十分強かったが、その強さは CPV に対する応答のおよそ 3 分の 1 程度であった。

一方、CPV 154 株を含有するワクチンを接種した第 1 群では、抗体応答の立ち上がりはやや遅く、全体としてもやや弱めで、CPV-2c や FPLV よりも CPV-2 に対する中和活性の方が高かった。一方、FPLV に対する交差中和抗体応答は、すべての猫で防御レベルに達していた。

表 38-4: HI 抗体価測定結果(倍)(別添資料 38、Table7)

群	個体 ID	接種後日数／HI 抗体価(倍)																	
		0(ワクチン接種)			4			7			11			14			21		
		FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c
第 1 群	3724	<16	<16	<16	<16	18	<16	104	576	288	144	832	288	144	2,304	576	448	6,656	576
	3728	<16	<16	<16	<16	<16	<16	36	104	52	416	2,304	576	288	1,664	576	288	3,584	896
	3892	<16	<16	<16	<16	<16	<16	36	208	144	144	832	576	144	576	288	288	2,304	1,152
	3894	<16	<16	<16	<16	<16	<16	18	144	36	288	1,664	576	576	3,328	576	576	9,216	1,152
	3895	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	36	18	52	576	208	576	4,608	2,304	576	9,216	1,664
	平均値	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<42	214	108	209	1,242	445	346	2,496	864	435	6,195	1,088
第 2 群	3722	<16	<16	<16	<16	36	144	416	1,664	4,608	1,792	4,608	9,216	3,328	4,608	13,312	2,304	6,656	13,312
	3886	<16	<16	<16	<16	26	72	1,152	6,656	13,312	1,152	9,216	18,432	1,664	18,432	40,960	1,664	>36,864	>40950
	3887	<16	<16	<16	16	104	144	1,152	4,608	13,312	1,152	9,216	26,624	1,152	9,216	18,432	1,152	9,216	18,432
	3890	<16	<16	<16	26	144	288	576	2,304	6,656	576	3,584	9,216	576	2,304	4,608	576	2,304	9,216
	3891	<16	<16	<16	16	52	288	1,152	4,608	13,312	896	4,608	18,432	1,152	3,584	14,336	1,152	4,608	14,336
	平均値	<16	<16	<16	<18	72	187	890	3,968	10,240	1,114	6,246	16,384	1,574	7,629	18,330	1,370	>11,930	>19,251
	3717	<16	<16	<16															
	3723	<16	<16	<16															
	3893	<16	<16	<16															

資料2. 審査データの概要

第3群	平均値	<16	<16	<16												
群	個体	接種後日数／HI 抗体価(倍)														
		28(攻撃)			35			36 又は 38			42			49		
		FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c
第1群	3724	576	4,608	1,152	9,216	14,336	6,656				4,608	6,656	4,608	6,656	21,504	10,752
	3728	288	1,664	576	2,304	4,608	2,304				3,328	6,656	4,608	3,328	10,752	4,608
	3892	416	3,328	1,152	9,216	18,432	9,216				6,656	13,312	14,336	6,656	21,504	6,656
	3894	416	6,656	1,152	18,432	>40,960	18,432				13,312	40,960	>28,672	13,312	>26,624	21,504
	3895	832	9,216	3,584	9,216	>26,624	13,312				9,216	>26,624	18,432	6,656	>26,624	10,752
	平均値	506	5,094	1,523	8,550	>20,992	9,984				7,424	>18,842	>14,131	7,322	>21,402	10,854
第2群	3722	2,304	6,656	9,216	2,304	6,656	9,216				1,664	6,656	13,312	1,152	2,304	3,328
	3886	2,304	18,432	>26,624	9,216	>40,960	>40,960				13,312	>26,624	>26,624	26,624	>40,960	>40,960
	3887	2,304	14,336	13,312	3,328	18,432	18,432				6,656	26,624	26,624	4,608	18,432	>21,504
	3890	576	2,304	6,656	2,304	4,608	9,216				4,608	13,312	13,312	5,376	9,216	13,312
	3891	2,304	4,608	9,216	4,608	9,216	18,432				9,216	13,312	>26,624	6,656	10,752	>21,504
	平均値	1,958	9,267	>13,005	4,352	>15,974	>19,251				7,091	>17,306	>21,299	8,883	>16,333	>20,122
第3群	3717	<16	<16	<16	26,624	13,312	4,608	36,864	26,624	13,312						
	3723	<16	<16	<16	13,312	4,608	4,608	>40,960	26,624	>21,504						
	3893	<16	<16	<16	36,864	9,216	9,216	21,504	6,656	5,376						
	平均値	<16	<16	<16	25,600	9,045	6,144	>33,109	19,968	>13,397						

注) 斜線部の時点は採血していないことを示す。

資料2. 審査データの概要

表 38-5: 中和抗体価測定結果(倍)(別添資料 38、Table8)

群	個体 ID	接種後日数／中和抗体価(倍)																	
		0(ワクチン接種)			4			7			11			14			21		
		FPLV	CPV- 2	CPV- 2c	FPLV	CPV- 2	CPV- 2c	FPLV	CPV-2	CPV- 2c	FPLV	CPV-2	CPV- 2c	FPLV	CPV-2	CPV- 2c	FPLV	CPV-2	CPV- 2c
第1群	3724	≦4	≦14	≦14	28	127	≦20	588	2,560	640	1,024	9,051	2,032	1,024	18,102	1,270	4,096	16,127	1,600
	3728	≦4	≦14	≦14	≦5	≦14	≦14	256	640	113	4,096	18,102	4,525	1,783	18,435	2,016	3,104	20,319	1,270
	3892	≦4	≦14	≦14	9	50	≦14	256	2,560	320	1,024	8,063	939	1,351	5,080	1,016	2,353	8,063	1,270
	3894	≦4	≦14	≦14	≦4	80	≦14	64	1,091	80	1,351	14,368	1,600	3,104	12,800	2,016	5,405	28,735	1,878
	3895	≦4	≦14	≦14	≦4	≦14	≦14	37	273	57	338	2,560	905	1,351	20,319	4,525	4,096	32,254	9,051
	平均値	≦4	≦14	≦14	≦10	≦57	≦15	240	1,425	242	1,567	10,429	2,000	1,723	14,947	2,169	3,811	21,100	3,014
第2群	3722	≦4	≦14	≦14	84	160	226	1,351	5,080	7,510	12,417	25,600	20,319	7,132	36,204	20,319	16,384	32,254	18,102
	3886	≦4	≦14	≦14	12	80	101	2,353	18,102	20,319	12,417	60,081	72,408	7,132	64,508	72,408	7,132	72,408	64,508
	3887	≦4	≦14	≦14	49	273	202	7,132	16,127	20,319	12,417	40,637	36,204	5,405	32,254	32,254	12,417	36,204	36,204
	3890	≦4	≦14	≦14	147	226	508	2,353	7,184	6,400	4,096	16,127	15,020	5,405	10,908	16,127	7,132	7,184	15,020
	3891	≦4	≦14	≦14	49	160	376	4,096	18,102	18,102	9,410	25,600	32,254	3,104	14,368	20,319	16,384	15,020	28,735
	平均値	≦4	≦14	≦14	68	180	283	3,457	12,919	14,530	10,151	33,609	35,241	5,636	31,648	32,285	11,890	32,614	32,514
第3群	3717	≦4	≦14	≦14															
	3723	≦4	≦14	≦14															
	3893	≦4	≦14	≦14															
	平均値	≦4	≦14	≦14															
群	個体 ID	接種後日数／中和抗体価(倍)																	
		28(攻撃)			35			36又は38			42			49					
		FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c	FPLV	CPV-2	CPV-2c			
第1群	3724	5,405	32,254	2,540	21,619	129,016	16,127				49,667	162,550	36,204	65,536	129,016	16,127			
	3728	1,351	16,127	1,270	5,405	11,404	4,032				21,619	51,200	16,127	12,417	40,637	9,051			
	3892	2,353	10,159	2,263	21,619	45,614	12,800				37,641	102,400	18,102	28,526	91,228	9,051			
	3894	9,410	36,204	4,032	86,475	240,325	36,204				65,536	≧516,064	64,508	86,475	349,053	40,637			
	3895	5,405	40,637	4,525	28,526	129,016	20,319				16,384	144,815	32,254	16,384	81,275	18,102			
	平均値	4,785	27,076	2,926	32,729	111,075	17,896				38,169	115,241	33,439	41,868	138,242	18,102			
第2群	3722	9,410	36,204	32,254	7,132	32,254	36,204				9,410	36,204	32,254	7,132	21,816	25,600			
	3886	6,384	144,815	72,408	65,536	289,631	120,162				114,105	229,880	162,550	150,562	289,631	162,550			
	3887	16,384	81,275	36,204	9,410	102,400	36,204				21,619	72,408	51,200	16,384	60,081	57,470			
	3890	3,104	12,800	17,775	12,417	25,600	40,637				16,384	36,204	36,204	21,619	40,637	30,041			
	3891	21,619	20,319	36,204	21,619	64,508	43,632				49,667	64,508	64,508	49,667	45,614	43,632			
	平均値	11,380	59,083	38,969	23,223	102,879	55,368				42,237	87,841	69,343	49,073	91,556	63,858			
第3群	3717	≦4	≦14	≦14	37,641	57,470	20,319	37,641	102,400	32,254									
	3723	≦4	≦14	≦14	16,384	10,159	4,032	86,475	72,408	20,319									
	3893	≦4	≦16	≦14	28,526	36,204	6,400	49,667	60,081	32,254									
	平均値	≦4	≦14	≦14	27,517	34,611	10,250	57,928	78,296	28,276									

注) 斜線部の時点は採血していないことを示す。

資料2. 審査データの概要

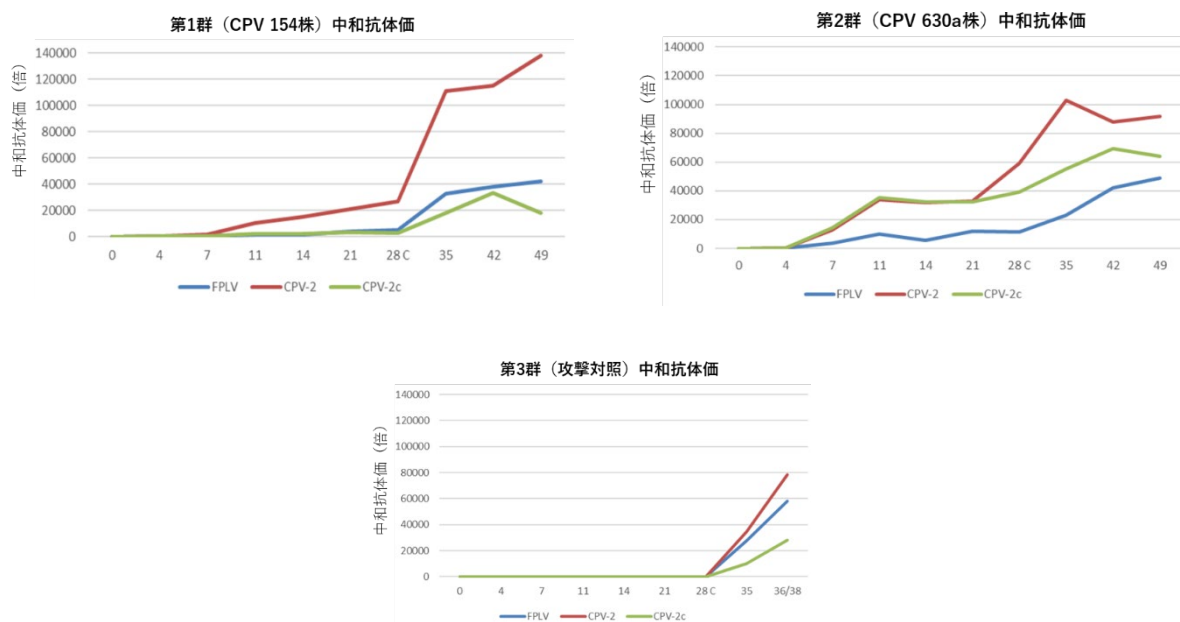


図 38-1: FPLV 及び CPV に対する抗体反応(中和抗体価)

3. 結論及び考察

Puppy DP 又は DP PLUS のいずれのワクチンも、猫への1回の接種により、臨床症状、白血球減少症及びウイルス排泄において防御効果を示した。

CPV 630a 株の FPLV に対する抗体反応

CPV 630a 株を含む DP PLUS を接種した猫において、FPLV に対する HI 抗体価は接種後7日目に416～1152倍(平均値890倍)を示した。FPLV に対する防御において最小有効抗体価は HI 抗体価において10～40倍以上とされる[1, 2]。ウイルス攻撃による猫汎白血球減少症関連症状を指標とした有効性評価においては、遅くとも接種後28日目には防御効果が示されることが確認されたが、抗体反応を指標とすると CPV 630a 株接種後7日目頃には FPLV に対する防御レベルの抗体が誘導されていた可能性が高いと考えられた。

資料2. 審査データの概要

参考文献

1. Mouzin, D.E., et al., Duration of serologic response to three viral antigens in cats. J Am Vet Med Assoc, 2004. 224(1): p. 61-6.
2. Lappin, M.R., Feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1 and feline calicivirus antibody responses in seronegative specific pathogen-free kittens after parenteral administration of an inactivated FVRCP vaccine or a modified live FVRCP vaccine. J Feline Med Surg, 2012. 14(2): p. 161-4.

資料3. 緊急措置計画書

別添資料 39 緊急措置計画書

緊急措置計画書

令和 8 年 6 月 1 日

氏名 MSD アニマルヘルス株式会社
代表取締役社長 土田 拓史
住所 東京都千代田区九段北一丁目 13
番 12 号

第一種使用規程の承認を申請している改変 VP2 蛋白質遺伝子導入犬パルボウイルス CPV 630a 株（以下「本遺伝子組換え微生物」という。）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防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置をと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 【社外秘につき非開示】製品開発・薬事部門 部門長

実施責任者は、オランダで製造されて日本に輸入される本遺伝子組換え微生物が生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合には、本遺伝子組換え微生物を製造したオランダの法人（以下「オランダ法人」という。）及び日本国内に設置した業務安全委員会に報告する。業務安全委員会は緊急措置対応のための社内体制及び連絡窓口を通じて、実施責任者とともに緊急措置を講じる。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 日本向けに輸出される本遺伝子組換え微生物の製造状況、他国における状況等の情報提供をオランダ法人に依頼するとともに、本遺伝子組換え微生物の治験実施機関、販売先、又は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) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、(1) により把握している治験実施機関、販売先、販売実績のある販売代理店に対して情報提供を依頼し、本遺伝子組換え微生物を保有している者の把握に努め、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具体的な内容を周知するための方法

オランダ法人に、本遺伝子組換え微生物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、オランダ法人と、本件について問合せ窓口の設置等について協

資料3. 緊急措置計画書

議する。

日本国内においては広く使用者に周知するとともに、2 で把握した関係者に対して、電話や文章などにより連絡を取る。

ただし、日本国内の治験において生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、この限りではない。

4 遺伝子組換え生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するための具体的な措置の内容

- (1) オランダ法人に対して、本遺伝子組換え微生物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微生物が治験に使用されている場合は、本遺伝子組換え微生物が自然環境に拡散しないように必要な拡散防止措置（本遺伝子組換え微生物によって汚染されたおそれのある施設、糞や敷料等の資材や死体等の消毒も含む）を直ちに執るよう治験実施機関に要請するとともに、本遺伝子組換え微生物を含む使用残の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実施する。
- (3) 日本国内において販売され流過程にある場合には、本遺伝子組換え微生物の販売中止及び回収を行い、回収した本遺伝子組換え微生物は密閉容器に保管の上、高圧蒸気滅菌等の不活化措置を実施する。
- (4) 日本国内において販売され使用者の元にある場合には、密閉容器に本遺伝子組換え微生物を保管の上、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微生物が動物に接種されている場合には、接種された動物及び同居等で感染している可能性の高い動物の隔離飼育等の措置を実施することを関係者に要請する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合は、速やかに、農林水産省農産安全管理課（03-6744-2102）、及び環境省野生生物課（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。

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	製品開発・薬事部門 部門長
委員	品質保証部 部長
委員	ポートリー&アクアカルチャー事業部 事業部長
委員	コンパニオンアニマル事業部 事業部長
委員	製品開発・薬事部門 製品開発部 部長
委員	グローバルサプライヤーマネジメント部
委員	製品開発・薬事部門 薬事部
委員	製品開発・薬事部門 製品開発部

・実施体制図



役職	氏名	職名
委員長	【社外秘につき 非開示】	製品開発・薬事部門 部門長
委員	【社外秘につき 非開示】	品質保証部 部長
委員	【社外秘につき 非開示】	ポートリー&アクアカルチャー事業部 事業部長
委員	【社外秘につき 非開示】	コンパニオンアニマル事業部 事業部長
委員 (連絡窓口)	【社外秘につき 非開示】	製品開発・薬事部門 製品開発部 部長
委員	【社外秘につき 非開示】	グローバルサプライヤーマネジメント部
委員	【社外秘につき 非開示】	製品開発・薬事部門 薬事部
委員 (連絡窓口)	【社外秘につき 非開示】	製品開発・薬事部門 製品開発部