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。

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*、*Protoparvovirus carnivoran1*）
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	―

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

(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

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 type2 は CPV-2（Original type）と記載して区別する。

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）。

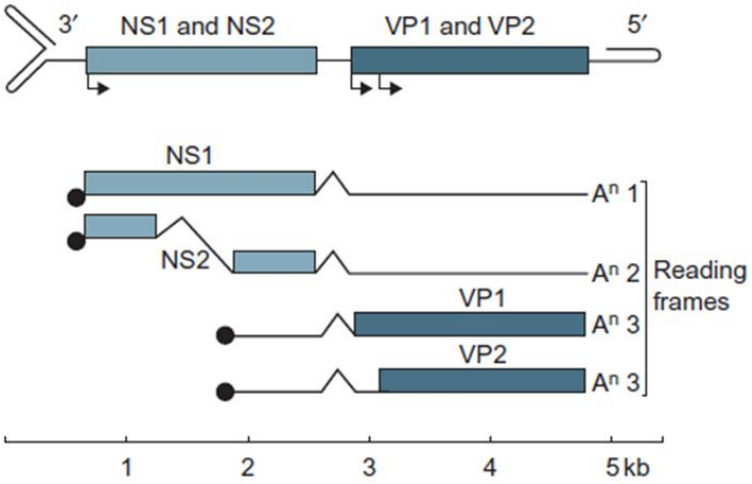


図 1：CPV のゲノム DNA と転写機構の模式図（[2]より引用）

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ポウイルスは 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]

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 週齢の臨床上健康な犬における 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。

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 $10^{8.9}$ $TCID_{50}$ 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。

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。

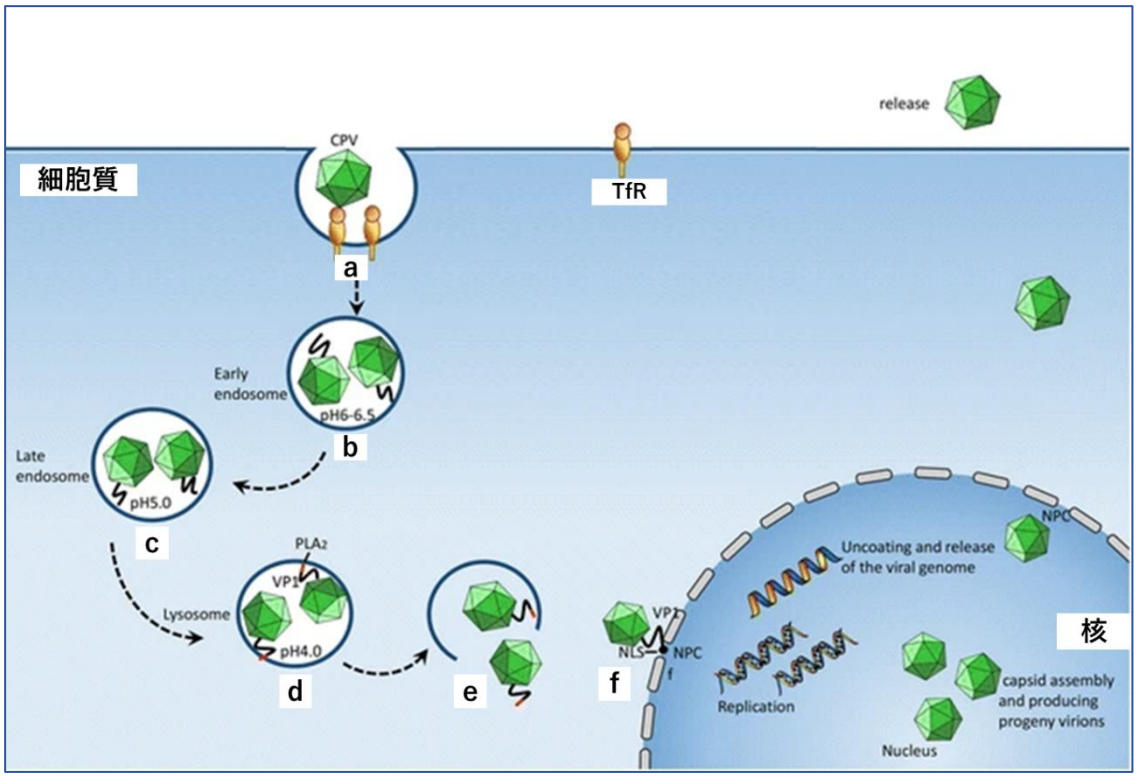


図 2：CPV の感染機構（[26]より改変）

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、

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; FPLV [1]）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*

縮、脾臓における濾胞変性・消失、骨髄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続けている。

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 DHPPi[1]）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。

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）

ヘ　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。

【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)。

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

	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

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。

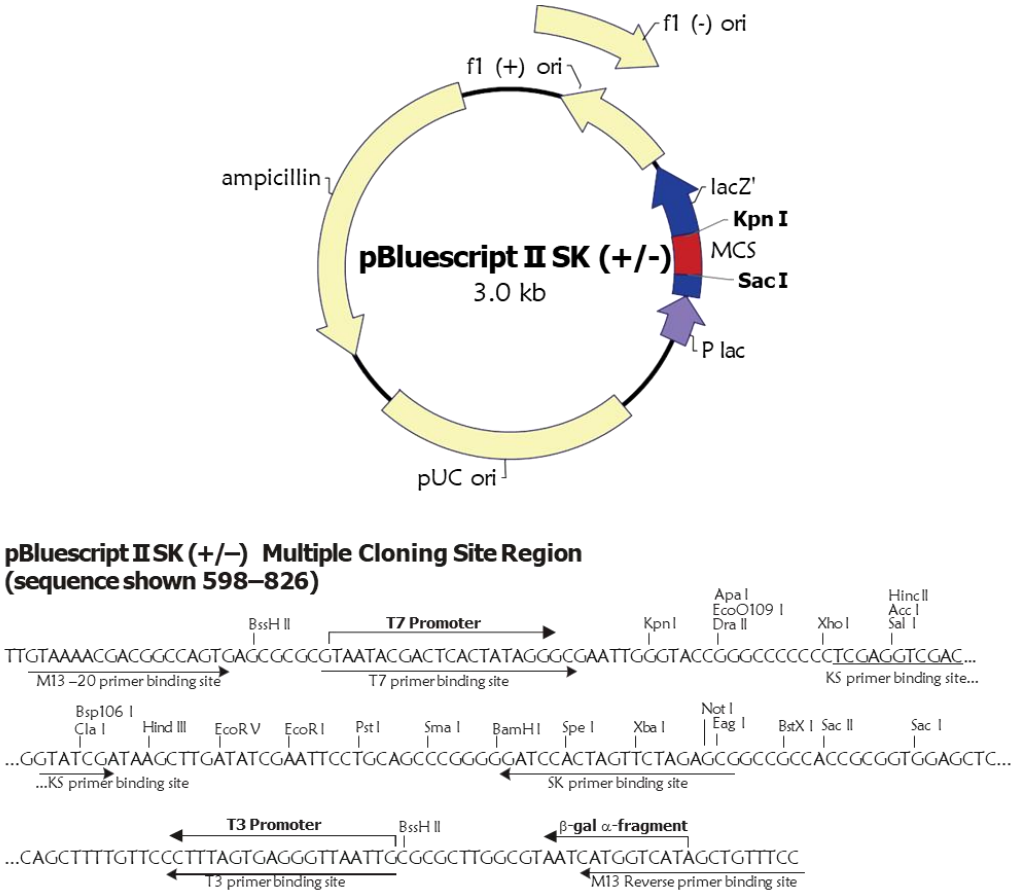


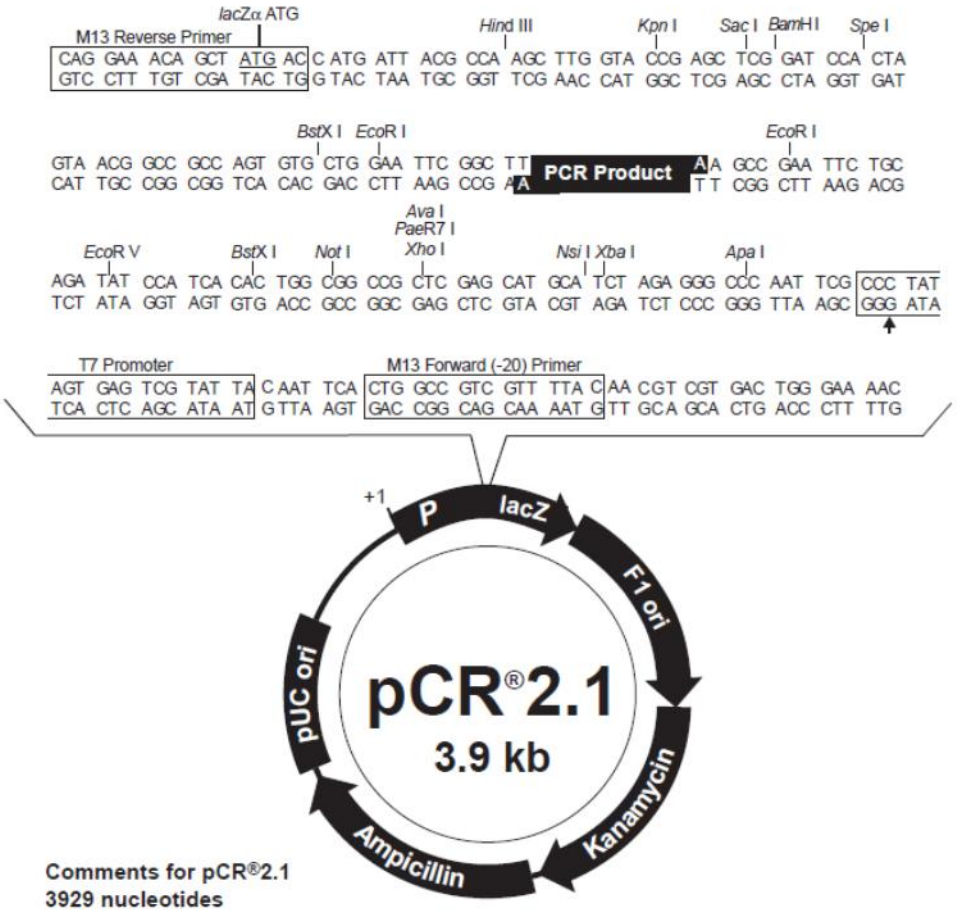
図 4:プラスミド pBluescript の構造

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

する酵素）α 遺伝子（lacZα）、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 転写及びシークエンス解析用の T7 プロモーター及びプライミングサイト、シークエンス解析用の M13 プライミングサイト、及び、f1 起点を含む。lacZα 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。



Comments for pCR®2.1
3929 nucleotides

LacZα gene: bases 1-545
M13 Reverse priming site: bases 205-221
T7 promoter: bases 362-381
M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
f1 origin: bases 546-983
Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
pUC origin: bases 3134-3807

図 5:プラスミド pCR2.1 の構造

(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、及びシークエンス解析により評価した。ウイルス CPV 630a のシークエンス解析により、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】。

(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クエ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 法及びシークエ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 株の区別にはシークエ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

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 5μL 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。

シークエンス解析：

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 によるシークエ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、8[2]）。
- 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。

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±1℃、5%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】 $TCID_{50}$/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】$TCID_{50}$/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 $10^{7.0}$ $TCID_{50}$ 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 $10^{7.4}$ $TCID_{50}$ 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グ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

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

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

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 $10^{7.0}$ $TCID_{50}$ 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 $10^{7.4}$ $TCID_{50}$ 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。

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 $10^{5.1}$ $TCID_{50}$ 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。

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。

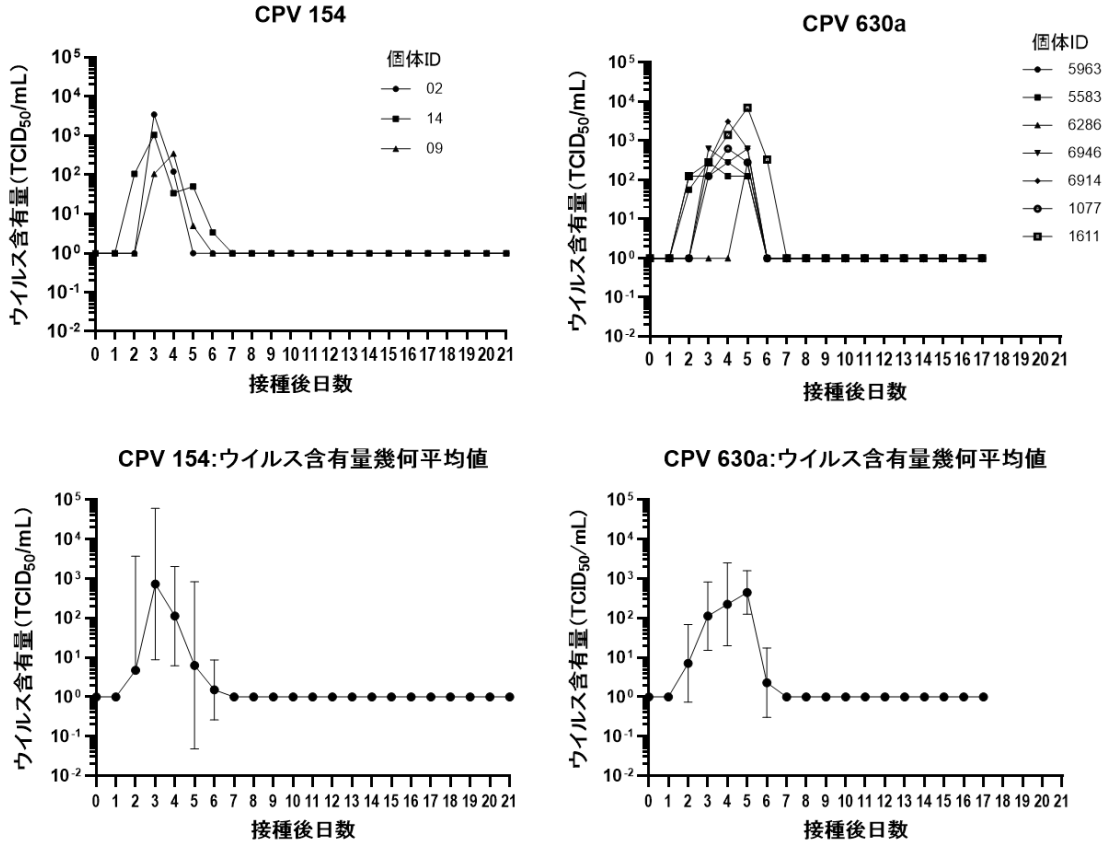


図 6:直腸スワブにおけるウイルス含有量測定結果

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 PLUS[1](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 $\log_{10}TCID_{50}$/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 $\log_{10}TCID_{50}$/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。

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、シークエ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：

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。）

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
―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 PLUS[1]」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[1]10 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。

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、接種目 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 $10^{7.4}$ $TCID_{50}$ 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も、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

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、

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 Plus[1]」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 Plus[1]」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。

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

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

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。

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も、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

－

(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

み換え生物の感染性や病原性にお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。

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。

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*

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.

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.

45. Mattola, S., et al., *Parvovirus nonstructural protein 2 interacts with chromatin-regulating cellular proteins.* PLoS Pathog, 2022. **18**(4): p. e1010353.

46. Alting-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.

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】

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 (EMEA/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

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。

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クエ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】

＜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】

＜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】

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

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】。

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】				

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。

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 $10^{8.9}$ $TCID_{50}$ 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。

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

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。

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 $10^{8.36}$ $TCID_{50}$ 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。

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±1℃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±1℃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±1℃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】$TCID_{50}$/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】$TCID^{50}$/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】

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-C[1]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 週齢で安楽殺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 頭の健康な仔犬が産まれ、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。

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。

---

[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。

要約

1. 試験設計

4～5 週齢の幼若犬に 10 用量の Nobivac DHPPi[1]（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。

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（$10^{8.1}$ $TCID_{50}$）、2 頭に CPV 154 株を経口接種（$10^{8.1}$ $TCID_{50}$）、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（℃）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. l	38.8	38.7	39.0	38.8	38.3
8	38.6	38.8	38.8	39.2	39.1	39.l
10	38.4	38.5	38.5	38.3	38.7	38.4

表 11-2：白血球数（x 10^3/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. l	18.8	12.8

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。

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-C[1]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、臨床上の異常はみられず、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		
Gl6	<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。

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】

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】

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 $10^{7.5}$ $TCID_{50}$ 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】

表 15-3:糞便中の CPV ウイルス含有量推定値[1](TCID$_{50}$/ 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 継代目	1	【社外秘につき非開示】								
	2									
2 2 継代目	1									
	2									
3 3 継代目	1									
	2									
4 4 継代目	1									
	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。

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 $10^{7.0}$ TCID$_{50}$ 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 $10^{5.0}$TCID$_{50}$/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。

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（Log_{10} $TCID_{50}$/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 Log_{10} $TCID_{50}$/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 （Log_{10} $TCID_{50}$/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	- ＋							
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。

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】

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】

別添資料 19　【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

別添資料 20　【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

別添資料 21　【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

別添資料 22　【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

別添資料 23　【社外秘につき非開示】

【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)

【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												

平均	

1) x 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】

別添資料 25　【社外秘につき非開示】

【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）

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、シークエ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】

シークエ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、可能なかぎり 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。右側ペ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。

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。

参照文献

- 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

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。シークエンス解析は、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、全てのシークエンシングコンティグを用いて組み立てた。

2. 結果

シークエンス解析により、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）

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 PLUS[1]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（x 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	ﾍﾞｰｽﾗｲﾝ 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、6.0～18.0 x 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】

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 プレートの最初の 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

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。

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	18432
	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

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。

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 $10^{7.2}$ $TCID_{50}$ 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も確認した。

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																

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。

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（$10^{6.8}$ $TCID_{50}$ の経口接種及び $10^{6.8}$ $TCID_{50}$ 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				

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も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 $TCID_{50}$/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 $TCID_{50}$/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こらないことが示された。

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 $10^{6.5}$ $TCID_{50}$ 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。

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 株が経口曝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。

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 $10^{6.5}$ $TCID_{50}$ 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（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		平均 CPV ウイルス含有量（log_{10} $TCID_{50}$/ml）[1]

		スパイク有無	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。

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－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

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 (EMEA/V/C/005251/0000)）

（表紙）

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）

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。
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える。 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。

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。

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える。

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。

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。

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。

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。

4-1) 感染猫が野外で組換え FPLV/CPV 株を糞便に排泄する。

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。

3-2) FPLV に対して免疫が成立する前に野生型 FPLV に感染する。

4-2) 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(*Protoparvovirus carnivoran1*)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

- 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.

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 ずつ頚部へ皮下投与した。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。

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 $TCID_{50}$/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															

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。

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。

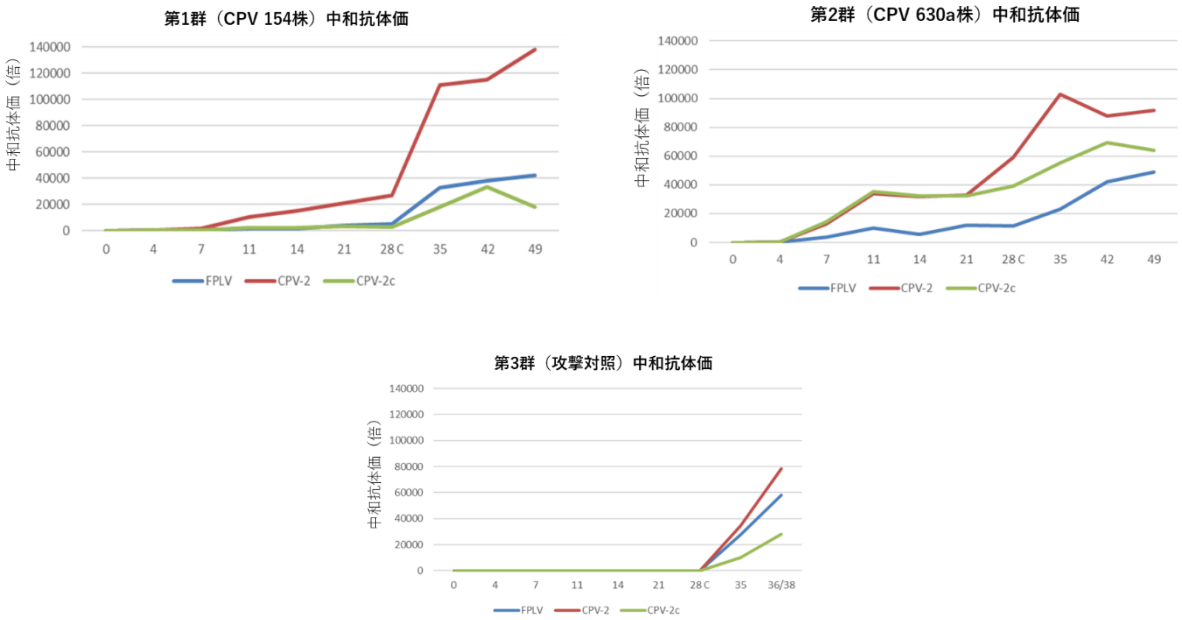


図 38-1：FPLV 及び CPV に対する抗体反応（中和抗体価）

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。

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.

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

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通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おける組織体制及び連絡窓口を報告する。

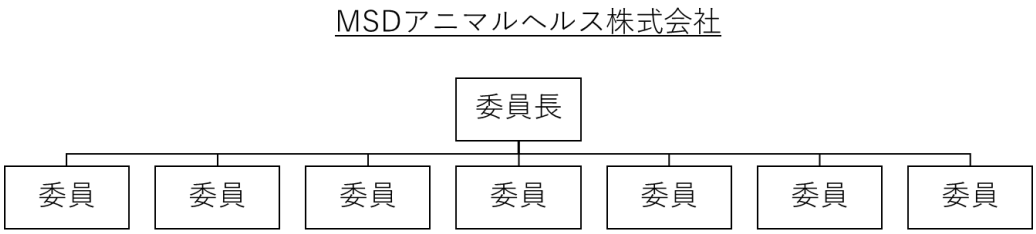
（別添 1）

・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