

資料

遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の 承認申請に係る審査報告書

ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝
子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F
(NDV-F、*Meleagrid herpesvirus 1* (Herpesvirus of turkey、Turkey
Herpesvirus、Marek's disease virus serotype 3))

平成 27 年 12 月 4 日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

目 次

	頁
1 . 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論	1
2 . 審査の概要	2
審査参考資料	
資料 1 . 第一種使用規程承認申請書	8
資料 2 . 審査データの概要	1 1
資料 3 . 緊急措置計画書	9 7
資料 4 . その他	1 0 0

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.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

1. 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論

株式会社インターベットより、平成27年6月4日付けで承認申請のあった「ニューカッスル病ウイルス由来F 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルスHVT-NDV/F (NDV-F , *Meleagrid herpesvirus 1*(Herpesvirus of turkey , Turkey Herpesvirus , Marek's disease virus serotype 3))(以下「本組換え微生物」という。)」について、生物多様性影響評価を行った。本申請は、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律(昭和35年法律第145号)に基づく動物用医薬品に係る治験のための使用を含んでいる。

本組換え微生物の宿主は、鶏の疾病であるマレック病に対する生ワクチン製造用株であり、健康な七面鳥の血液から分離された非病原性の七面鳥ヘルペスウイルス株である。本組換え微生物は宿主と同様に鶏に感染しても病徴は示さず、かつ感染部位から血液へ侵入した際には、強毒株であるマレック病ウイルス1 型に対する防御免疫を誘導し、長期間免疫が持続する。併せて、本組換え微生物は、鶏の急性感染性であるニューカッスル病ウイルスのF蛋白質のみを発現させたことにより、F蛋白質に対する抗体を誘導し、ニューカッスル病の感染を阻止することができる。

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

(参考) これまでの審査経緯

日 付	事 項	備 考
平成27年 6月 5日	第一種使用規程承認申請受理	
平成27年 6月29日	薬事・食品衛生審議会薬事分科会再生医療等製品・生物由来技術部会 動物用組換えDNA技術応用医薬品調査会における審査	非公開
平成27年 9月 2日	薬事・食品衛生審議会薬事分科会再生医療等製品・生物由来技術部会における審査	非公開
平成27年 9月17日	薬事・食品衛生審議会薬事分科会へ報告	非公開
平成27年11月17日	学識経験者からの意見提出	
平成27年12月 4日	審査報告書とりまとめ	

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

2. 審査の概要

本組換え微生物の宿主は、マレック病生ワクチン製造用株の七面鳥ヘルペスウイルス PB1 株であり、1969 年頃に英国の Norfolk において、飼育群の健康な七面鳥の血液から分離された非病原性の株を継代したものである。特性としては、鶏に感染しても病徴を示さず、ウイルス血症を起こさせ、強毒株であるマレック病ウイルス 1 型（以下「MDV1」という）に対する防御免疫を誘導し、持続感染により長期間免疫が持続する。マレック病は、伝染性の高い腫瘍性の病気であり、主な臨床症状は翼や脚部の麻痺や内臓の腫瘍形成等で、ワクチン接種していない鶏における死亡率は、5～50%程であり、通常 10 週齢から 20 週齢頃に発症する。

本組換え微生物は、宿主ウイルス PB1 株にニューカッスル病ウイルス NDV の F 蛋白質遺伝子及びラウス肉腫ウイルス（以下「RSV」という）の末端反復配列（以下「LTR」という）の 1 つを挿入したのみである。本組換え微生物は、ニューカッスル病ウイルスの F 蛋白質を発現させたことにより、当該ウイルスの感染に必須の F 蛋白質に対する抗体を誘導し、1 回の接種で終生にわたりニューカッスル病の感染を阻止することができる。ニューカッスル病は、呼吸器症状、神経症状等を呈し、強い感染性を示す経済上重要な病気であり、症状は 100%死亡する場合から軽い呼吸器症状のみの場合まで幅がある。採卵鶏では、産卵率低下、卵殻及び卵白の品質低下が認められる。

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

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

宿主の属する分類学上の種である HVT 自体に他の微生物を減少させる性質は報告されていない。HVT は七面鳥が本来の保有動物であり、他のキジ科鳥類の感受性は低く、たとえ、一部の個体に感染が成立したとしても群内に感染が拡大し、維持されることはないと考えられる。また HVT は、ワクチンを接種していない鶏からは分離されないこと、日本国内に野生の保有動物はいないことから、野外感染による重感染の機会はほとんど無く、かつ、非病原性であるため、新たな病原性を獲得する等の問題を生じるおそれはないものと考えられる。

本組換え微生物は、ニューカッスル病ウイルスの F 蛋白質を発現させるが、F 蛋白質に毒性があるとの報告は無く、他の微生物を減少させる性質に関しては宿主ウイ

ルス PB1 株から変化していないと考えられることから、他の微生物を減少させる性質に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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ずるおそれはないものと判断した。

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

宿主の属する分類学上の種である HVT の感染が実験的に確認されている鳥類の範囲は、七面鳥と同じキジ科の鳥類の鶏、うずら、コウライキジであり、きじ、やまどり、ライチョウ等のキジ科野鳥も HVT が感染する可能性を否定できない。しかし、農場に侵入する可能性がある鳩、カラス、スズメ等の野鳥は、七面鳥とは系統的に遠いため、HVT が感染することはないと考えられる。哺乳動物由来細胞における増殖試験の結果から、鶏を捕食するイタチ、タヌキ、テン等の野生の哺乳動物には HVT が感染することはないこと、誤注射事例を含む抗体検査の結果から、人に HVT が感染することはないことを認識している。

わが国の養鶏及び養^{ようじゅん}鶏においては HVT の生ワクチンが使用されているが、七面鳥以外の野生の鳥類から HVT が分離されたとの報告はなく、ワクチン未接種の鶏から HVT が分離されたこともない。

HVT は、七面鳥はもとより特殊な実験用系統以外の鶏、うずら、コウライキジに病原性を示さないことから、他のキジ科鳥類に感染した場合にも病原性は示さないと考えられ、感染により個体の生存や繁殖などに影響を与えることはないと判断した。

本組換え微生物は、病原性及び腫瘍原性に関して調査し、宿主ウイルス PB1 株から変化していないことから、本組換え微生物が感染する可能性があると思定されるキジ科野鳥等は存在するが、病原性に起因して影響をうける可能性のある野生動植物等は特定されず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

なお、HVT-NDV/F 株は、RSV 由来の配列を含んでおり、RSV は増殖の過程でウイルスゲノムを感染細胞の染色体に組み込む過程を経て、感染細胞の癌化にも関与するが、これには RSV の両末端の 2 つの LTR 配列とウイルス由来のインテグラーゼの存在が必要となる。しかしながら、HVT-NDV/F 株には 1 つの LTR 配列しか導入しておらず、末端に配置していないこと、ウイルス由来のインテグラーゼもないことから、HVT-NDV/F 株の遺伝子が接種鶏の染色体へ組み込まれることや接種鶏が癌化することはないものと判断した。

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

宿主の属する分類学上の種である HVT が有害物質を産生するとしての報告はない。

本組換え微生物はニューカッスル病ウイルスの F 蛋白質を発現する。NDV は人獣共通感染症の病原体であり、人に結膜炎の症状を起こすが、F 蛋白質に毒性があるとの報告はない。

組換えに使用した供与核酸中の翻訳可能な読み取り枠 (open reading frame;ORF) について検索した結果、F 蛋白質がサザエ由来のアレルゲン物質トロポミオシンと 27%の相同性を示したが (FAO/WHO 法では 37%以上を陽性とする) この他にアレルゲン性の疑われる物質は検索されなかった。また、病原性の確認試験から鶏で 5 代継代しても病原性が復帰することがないことを確認しており、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。

以上から、有害物質の産生性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

(4) 核酸を水平伝播する性質(法が対象とする技術により移入された核酸を野生動植物又は他の微生物に伝播する性質)

HVT は通常の増殖において核酸を水平伝播する性質を持たない。ヘルペスウイルス科の一部にはゲノムを感染動物の染色体に組込むものが存在し、HHV4、HHV6 及び MDV1 が知られているが、それ以外のヘルペスウイルス科のウイルスは、ゲノムを感染動物の染色体に組み込む性質は知られていない。

近縁のウイルスとの相同組換えの可能性については、養鶏において HVT を含む多価ワクチンの使用や野外感染により、MDV1 又は MDV2 との重感染の機会が多数あるにもかかわらず、血清型間で組換えが起きたとの報告はない。同種のウイルスとの相同組換えの可能性については、野外感染による重感染の機会はほとんどないため、株間で組換えが起きる可能性は極めて低く、万が一、株間で組換えが起きたとしても HVT は非病原性であるため、新たな病原性を獲得するおそれはないものと考えられる。本組換え微生物は、PB1 株に RSV の LTR 配列の 1 つ及び NDV の F 蛋白質遺伝子を挿入したのみであり、核酸を水平伝播する性質に関しては宿主ウイルス PB1 株から変化していないと考えられる。

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

(5) 結論

他の微生物を減少させる性質については、宿主の属する分類学上の種である HVT は有していない。本組換え微生物は、ニューカッスル病ウイルスの F 蛋白質を発現させるが、F 蛋白質に毒性があるとの報告は無く、他の微生物を減少させる性質に関しては宿主ウイルス PB1 株から変化していないと考えられる。このことから、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。

病原性については、HVT は、健康な七面鳥に由来し一般に病原性を持たない。HVT のワクチン株は、野生株を継代したものであり、弱毒化は行われていない。HVT は特殊な実験用の系統以外の鶏及び、うずら、コウライキジに病原性を示さないことから、他のキジ科鳥類に感染した場合にも病原性は示さないと考えられ、感染により個体の生存や繁殖などに影響を与えることはないと考えられる。このことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

有害物質の産生性については、組換えに使用した供与核酸中の ORF について検索した結果、アレルギー性の疑われる物質は検索されなかった。また、病原性の確認試験から鶏で 5 代継代しても病原性が復帰することがないことを確認しており、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。このことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

核酸を水平伝播する性質については、宿主の属する分類学上の種である HVT はゲノムを感染動物の染色体に組込む性質は知られていない。近縁のウイルスとの相同組換えの可能性については、重感染の機会が多数あるにもかかわらず、血清型間で組換えが起きたとの報告はない。また、同種のウイルスとの相同組換えの可能性については、野外感染による重感染の機会はほとんどないため、株間で組換えが起きる可能性は低いと考えられる。このことから、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ものと判断した。

以上を総合的に評価し、本組換え微生物を第一種使用規程に従った使用を行う限り、生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

< 審査参考資料 >

資料 1 . 第一種使用規程承認申請書

承認を受けるために申請者から提出された申請書類

第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 6 月 4 日

農林水産大臣 林 芳 正 殿

環 境 大 臣 望 月 義 夫 殿

氏名 株式会社インターベツト

申請者 代表取締役社長 武本 行弘

住所 大阪市中央区平野町二丁目 3 番 7 号

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

資料 1 . 第一種使用規程承認申請書

遺伝子組換え生物等の種類の名称	ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F 株 (NDV-F, <i>Meleagrid herpesvirus 1</i> (Herpesvirus of turkey, Turkey Herpesvirus, Marek's disease virus serotype 3))
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	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。) 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 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 (に該当する行為は除く。) 接種 (採卵鶏及び肉用鶏への接種) 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 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。) ～ に付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-

資料 1 . 第一種使用規程承認申請書

資料 2 . 審査データの概要

審査に使用した評価のデータ

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ 分類学上の位置・学名（属及び種）和名、

学名：*Meleagrid Herpesvirus 1*

属：マルデイウイルス *Mardivirus*

種：シチメンチョウヘルペスウイルス *Meleagrid herpesvirus 1*

和名：七面鳥ヘルペスウイルス（以下「HVT」という。）

英名：Herpesvirus of turkey ,Turkey Herpesvirus ,Marek's disease virus serotype 3

ロ 宿主の株名

七面鳥ヘルペスウイルス PB1 株

本遺伝子組換え微生物の親株として用いたウイルスは、七面鳥ヘルペスウイルスであり、マレック病生ワクチン製造用株として使用された PB1 株である。PB1 株は、1969 年頃に英国の Norfolk において飼育群の健康な七面鳥の血液から分離された株（文献 1）であり、野生株を継代したもので弱毒化は行われていない。

ハ 国内及び国外の自然環境における生息状況

HVT は、健康な七面鳥に由来し、一般には七面鳥の飼育群に広く分布しており、野生の七面鳥からの分離例もある。HVT の異名としてマレック病ウイルス 3 型（以下「MDV3」という。）があり、抗原的にマレック病ウイルス 1 型（以下「MDV1」という。）及びマレック病ウイルス 2 型（「以下 MDV2」という。）に類似している。MDV1 は病原性を示すのに対し、MDV2 及び HVT（MDV 3）は非病原性である。

(2) 使用等の歴史及び現状

マレック病は、病原性の MDV1 の感染により起こるリンパ腫瘍形成及び神経障害を特徴とした鶏の疾病で、養鶏産業上重要な疾病の 1 つである。マレック病の予防には生ワクチンが有効であり、弱毒化した MDV1、非病原性の MDV2 及び HVT が生ワクチンとして使用されている。宿主ウイルス PB1 株は海外で市販されたマレック病生ワクチンの製造用株として 1970 年から 2009 年まで用いられ、その生ワクチンは 45 の国又は地域で認可を受けており、2001 年以降だけで少なくとも 22 億羽分以上が販売された。異なる株の HVT 生ワクチン（FC126 株）は、1970 年代から国内でも、現在も使用されている。

(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性

イ 基本的特性

HVT を自然界における保有動物は七面鳥である。七面鳥はキジ目 GALLIFORMES キジ科 Phasianidae に属している（国際鳥類学会議の World Bird List による。分類名の和名は日本鳥類目録第 7 版に従った）。七面鳥以外に実験的に HVT の感染が確認されている鳥類は、鶏（文献 1）、うずら（文献 2）及びコウライキジ（別添 1）であり、感染が否定されているのは、あひる（別添 2）、鳩（別添 2）、コリンウズラ（別添 1）である。

あひる（カモ目 ANSERIFORMES に属す）及び鳩（ハト目 COLUMBIFORMES に属す）は、七面鳥との系統的な遠さにより感染しないと考えられる。コリンウズラは、キジ目のナンベイウズラ科 Odontophoridae に属し、キジ科とは系統が異なるために感染しないと考えられる。

HVT に感染する鶏、うずら及びコウライキジはキジ科の鳥であり、同じキジ科のきじ、やまどり、ライチョウは HVT に感受性を示す可能性がある。きじは、コウライキジと極めて近縁であるため、コウライキジと同程度の感受性を示すと考えられる。

本来の保有動物である七面鳥は、HVT の存在する地域で飼育を行うと自然感染し、10 週齢までに群内のすべての個体がウイルス及び抗体を保有ようになる（文献 3）。HVT を七面鳥に接種した場合、接種した個体はすべて感染し、接種した個体と同居している個体もすべて感染する（文献 4）。他のキジ科鳥類での HVT 感受性を調べたデータは少ないが、鶏では接種した個体はすべて感染するものの、同居している個体は感染しないか又は感染しても一部の個体に限られる（文献 5、文献 6、文献 7、文献 8、別添 3）。うずらでは、感染率を示すデータはないが接種すると抗体が産生され感染が成立する。また、養鶏において HVT は養鶏と同様にマレック病ワクチンとして使用されている（文献 2）。コウライキジでは、HVT を接種した個体の一部しかウイルスを保有しておらず、HVT の感受性が低いことが示唆されている（別添 1）。これらの知見から、七面鳥は本来の保有動物であり、他のキジ科鳥類の感受性は低いと考えられる。きじ、やまどり、ライチョウ等のキジ科鳥類が HVT に感受性を示したとしても、これらの鳥類における HVT の感受性は七面鳥に比べ低いと考えられることから、一部の個体に感染が成立したとしても群内に感染が拡大し、維持されることはないと考えられる。

カニクイザル、アカゲザル、ボンネットモンキー及びマーモセット等の霊長類に対する FC126 株及び病原性 MDV JM 株の接種試験では、臨床症状及び血液学的検査で異常は認めなかった。また、中和抗体は産生されないことから、上記の霊長類にウイルスの感染は起こらないと考えられる（文献 10、文献 11）。誤注射事例を含む HVT に暴露される機会のある人及び暴露される機会のない人約 200 名に対し HVT に対する抗体の保有を蛍光抗体法により調べたところ 6 名が陽性を示したが、HVT の暴露との相関は認められず、また蛍光抗体保有者から中和抗体陽性者を見出すことは出来なかった（文献 10）。

HVT は、約 160kbp の 2 本鎖 DNA をゲノムとして有する（文献 9）。ゲノムは、直径約

資料 2. 審査データの概要

90-100nm のカプシドに包まれている。カプシドは、162 個の中空のカプソメアが正 20 面体に配列して構成されている。カプシドはエンベロープに包まれており、核から出芽した粒子はエンベロープを失い 150-170nm 程である。細胞質内でも粒子は成熟し、さらにエンベロープ化され 220-250nm の粒子となる（図 1、文献 7）。

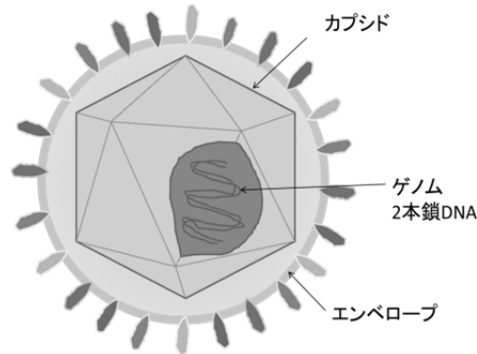


図 1 HVT の粒子の模式図

HVT のゲノム構成は、他のアルファヘルペスウイルス亜科と同様であり、MDV1 や MDV2 あるいは単純ヘルペスウイルス 1 型（以下 HSV1 という）と類似している（図 2）。ゲノムは 6 つの領域から構成されており、主な遺伝子をコードする UL 領域（Unique Long）及び US 領域（Unique Short）、その外側にそれぞれ反復配列が位置する。UL 領域の両側に位置する TRL（Terminal Repeat Long）及び IRL（Internal Repeat Long）は、同じ塩基配列が反転した構成となっている。US 領域の両側の反復配列も同様の構成となっている（文献 9）。

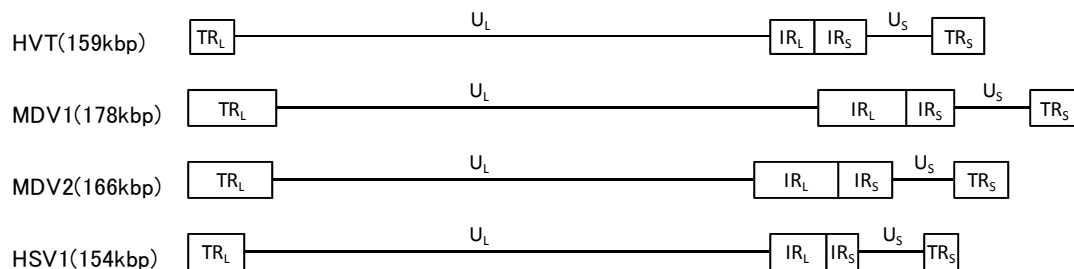


図 2 HVT のゲノム構成

HVT ゲノムの全塩基配列（日本 DNA データバンクアクセス番号 AF291866）の情報から、翻訳可能な読み取り枠（以下 ORF : Open Reading Frame）は 397 個あり、99 個の有効な遺伝子がコードされていると考えられている。このうちの 76 個の遺伝子が MDV1 にも保存されており、71 個の遺伝子が MDV2、65 個の遺伝子が HSV1 にも保存されている（文献 9）。保存されている遺伝子から発現する蛋白質のアミノ酸の相同性は MDV1 で 36-82%、MDV2 で 34-81%である（文献 9）。HVT ゲノムの全塩基配列は、宿主ウイルス PB1 株とは異なる FC126 株の解析によるものであるが、宿主ウイルス PB1 株の部分塩基配列（日本 DNA データバンクアクセス番号 M84473）は、FC126 株と 98.9%の相同性が認められる。また、FC126 株及

資料 2. 審査データの概要

び宿主ウイルス PB1 株は、共にワクチン株であり、健康な七面鳥に由来し、分離当初から非病原性の野外株を継代したものである。

ロ 生息又は育成（増殖）可能な環境の条件

HVT が自然界における保有動物は七面鳥である。七面鳥の飼育群には広く分布しており、野生の七面鳥からの分離例もある（文献 8）。HVT は我が国においても鶏用のワクチンとして使用されているため、多くの鶏群にも存在していると考えられるが、ワクチンを使用していない鶏からは分離されない（文献 7）。宿主ウイルス PB1 株は、鶏胚細胞で 30℃ から 40℃ において増殖し、25℃ 及び 45℃ では増殖しなかった（別添 4）。人、ミドリザル、犬、猫、兎及び牛由来細胞では増殖しなかった（別添 5）。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

HVT は細胞随伴性であるため、生存には生きた細胞が必須であり、細胞外の環境で増殖又は生存することは出来ない。しかし例外的に、HVT は羽包で成熟することから、HVT に感染した七面鳥の皮膚及び羽包の乳剤は感染性を有しており、（文献 6、文献 7）、このため皮膚から体外に排泄されたものが感染源になると考えられている。

感染経路に関しては、HVT は、鶏及び七面鳥において空気感染（塵埃感染）することが確認されている（文献 4、文献 5、文献 6）。感染鶏のアイソレーターの塵からはウイルス DNA が検出された（文献 18）ことから、HVT は皮膚で成熟してフケとともに体外に排泄されたものが感染源になると考えられる。空気感染（塵埃感染）は、七面鳥では 90m 程離れた農場から伝播したと考えられる事例（文献 7）、鶏では吸気口と排気口を接続したケージで伝播した事例がある（文献 6）。HVT に暴露された七面鳥群では、数週間で群全体に感染が広がる。しかし鶏においては、稀に一部の個体に限られた感染しか起こさない（文献 6、文献 7、文献 8）。総説（文献 7、文献 8）には接触により感染するとの記載があるが、同居により感染したという観察に基づくものであり、皮膚や粘膜の接触による感染や排泄されたウイルスに汚染された餌や水からの経口的な感染の有無について実証されたデータは含まれておらず、接触感染が成立することは十分に実証されていない。その他に口腔や糞便からの排泄は認められないため（別添 6、別添 7）、飛沫感染及び飛沫核感染はないと考えられる。また、垂直感染は起こさないことが確認されている（文献 7、文献 8）。HVT を鶏に接種すると、早い個体では 6 日後に、また 3～4 週間にはほとんどの個体でウイルス血症を起こす。細胞随伴性のウイルスは接種後 1～4 日間、肺、胸腺、ファブリキウス嚢、脾臓等のリンパ組織で増殖し、その後白血球が感染することにより他の臓器に拡がっていく。セルフリーのウイルスは、接種後 2～3 週目に羽包から検出されるが、その時期を過ぎると検出され

資料 2. 審査データの概要

にくくなる（文献 7）。HVT が感染する白血球は、マクロファージ又は B リンパ球以外の細胞であり、おそらく T リンパ球であろうと考えられている（文献 8、文献 12）。HVT は鶏に感染した後、様々な臓器で増殖性感染を起こし、その後潜伏感染に移行する。潜伏感染とは、再活性化されるまで感染性の粒子を産生しない状態を指す。潜伏が確認されている臓器は、脾臓、胸腺、ファブリキウス嚢、翼神経叢、坐骨神経叢、上皮細胞、羽包等である（文献 13）。羽包での増殖は感染後 2～3 週間の一過性の経過を示す（文献 7、文献 8）。感染は長期持続しても、排泄が短い期間で終息することが、HVT の鶏での感染拡大が一部の個体に限定される理由と考えられる。

ヘルペスウイルス科の複製サイクルを図 3 に示した。ヘルペスウイルスは、エンベロープ表面の糖蛋白質を介して細胞表面に吸着する。吸着したウイルスは、直接またはエンドサイトーシスの後にエンベロープと細胞膜が融合し、カプシドが細胞質内に侵入する。このとき、エンベロープの内側にあるテグメント物質を細胞質内に放出する。カプシドはマイクロチューブを伝って核膜孔に運搬され、ウイルスゲノムが核内に放出される。核内でウイルスゲノムの複製及び転写が行われる。多量体として複製されたウイルスゲノムは、単一の長さに切断されカプシド内に取り込まれる。カプシドは核膜の内側膜から出芽するときに 1 次エンベロープ化され、核膜の外側膜との間のスペースに出てくる。粒子が細胞内に移動するときに 1 次エンベロープは失われる。粒子の成熟は細胞質で起こる。カプシドは細胞質内でテグメント物質を得た後、ゴルジネットワークの小胞に出芽するときに 2 次エンベロープ化される。この過程により、成熟した粒子は細胞室内の小胞内に位置する。小胞が細胞膜と融合することにより、成熟粒子は細胞外に放出される（文献 14、文献 15）。

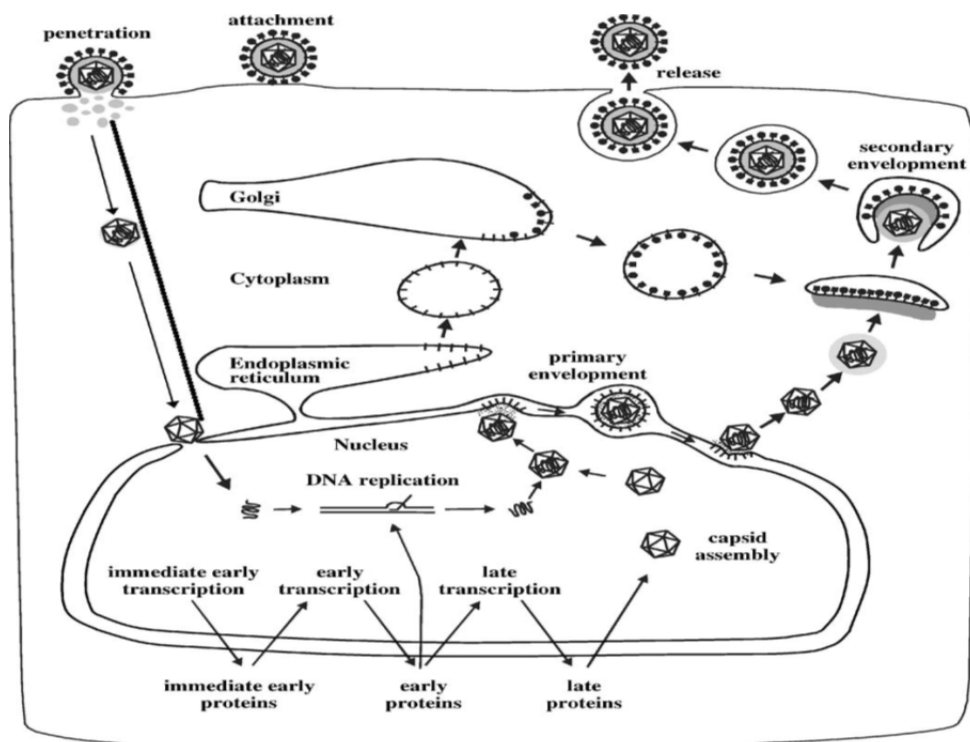


図 3 ヘルペスウイルスの複製サイクル

(“Budding events in herpesvirus morphogenesis” Mettenleiter T. C., 2004 Virus Research 106:167-180 引用)

資料 2. 審査データの概要

交雑性については、アルファヘルペスウイルス科の中で極めて近縁な種同士の間（単純ヘルペスウイルスの 1 型と 2 型、馬ヘルペスウイルスの 1 型と 4 型及び牛ヘルペスウイルスの 1 型と 5 型）で交雑が起こることが知られているが、相同性の低いウイルス種間で交雑が起こった例は知られていない（文献 16、文献 17）。HVT は、MDV1 又は MDV2 と遺伝子の構成が異なり相同性も低いことから、これらのウイルスと組換えを起こすことはないと考えられる。

同種のウイルス内での株間の相同組換えについては、アルファヘルペスウイルス科の多くの種内で頻繁に起きていることが近年明らかにされ、これがウイルスの進化に重要な役割を果たしていることが示された（文献 18）。このことから、HVT においても異なる株との重感染の機会があれば相同組換えを起こす可能性は考えられるが、HVT はワクチンを接種していない鶏から分離された例はないこと（文献 7）や、日本国内に野生の保有動物はいないことから、野外感染による重感染の機会はほとんど無いと考えられる。また、万が一、株間での相同組換えが起こったとしても HVT は非病原性であるため、新たな病原性を獲得する等の問題を生じるおそれはないものと考えられる。

潜伏感染期におけるヘルペスウイルスのゲノムは一般に、細胞核内で環状の染色体外遺伝因子（エピソーム）として維持されている。ヘルペスウイルス科の中で、Epstein-Barr ウイルス（HHV4）、ヒトヘルペスウイルス 6 型（HHV6）及び MDV1 は、ウイルスゲノムが感染動物の染色体に組み込まれ、感染動物の染色体からウイルスの複製が可能であることが知られているが、HVT を含むその他のヘルペスウイルスで、ウイルスゲノムが感染動物の染色体に組み込まれる例は知られていない（文献 19）。

ホ 病原性

HVT は、健康な七面鳥に由来し一般に病原性を持たない。HVT のワクチン株は、野生株を継代したものであり、弱毒化は行われていない。HVT は、七面鳥に対して腫瘍原性を示さないが、雄の七面鳥に感染した場合に授精障害を起こす可能性がある（文献 8）。

鶏に HVT を接種した場合、一般的には病徴を示さず、免疫系に障害を与えない。しかし、過剰量を接種した場合には、ファブリキウス嚢及び胸腺の萎縮並びに軽度の神経の炎症が認められる。HVT は、特定の系統の鶏における末梢神経障害や自己免疫性白斑と関係があることから、自己免疫疾患の誘発因子となっている可能性が考えられる（文献 8）。ただし、末梢神経障害が認められるのはマレック病ウイルス感受性である ADOL experimental line（文献 20）、自己免疫性白斑が認められるのは白斑の実験モデル動物である Smith line（文献 21）の系統の鶏に限られる。これらの系統の鶏は、実験用に使われる特殊な系統であり、一般に飼育されている鶏はこのような症状を示さない。

うずらに HVT を接種した場合、病徴は認められず、肉眼的及び組織学的に腫瘍病変は認めら

資料 2. 審査データの概要

れなかった（文献 2）。コウライキジ（日本のきじの近縁種）に HVT を接種した場合、一部の個体でウイルス血症が認められたが、肉眼的な腫瘍病変は認められなかった（別添 1）。

HVT は、特殊な実験用の系統以外の鶏、うずら、コウライキジに病原性を示さないことから、他のキジ科鳥類に感染した場合にも病原性は示さないと考えられ、感染により個体の生存や繁殖などに影響を与えることはないと考えられる。

へ 有害物質の産生性

HVT が有害物質を産生するとの報告はない。

HVT の全塩基配列（日本 DNA データバンクアクセッション番号：AF291866）から予測されるアミノ酸配列をアレルゲンデータベース ADFS (<http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/index.jsp>) で検索したところ、UL36 Large tegument protein がゴキブリ由来のアレルギー物質 Bla g 1.02 と 25%の類似性を示したが（FAO/WHO 法では 37%以上を陽性とする）、この他にアレルゲン性が疑われる蛋白質はコードされていなかった（別添 8）。HVT は、マレック病のワクチンとして 40 年以上にわたって採卵鶏及び肉用鶏に使用されているが、野生動植物の生育又は育成に問題を起こしたとの報告を見つけることは出来なかったため、有害物質の産生はないと考えられる。

ト その他の情報

—

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

① LTR プロモーター

ラウス肉腫ウイルス（以下 RSV）SR-ASV-D 株（Schmidt-Ruppin avian sarcoma virus of subgroup D）に由来する末端反復配列（Long Terminal Repeat）の cDNA である。塩基数は約 600bp である（別添 9）。

② F 蛋白質遺伝子

ニューカッスル病ウイルス（以下 NDV）Clone 30 株（ワクチン株）に由来する F 蛋白質遺伝子の cDNA である。塩基数は約 1800bp である（別添 9）。

資料 2. 審査データの概要

ロ 構成要素の機能

① LTR プロモーター

下流に接続した F 蛋白質遺伝子の発現を促進する機能を有する。レトロウイルスの LTR には、ウイルスゲノムの逆転写開始、感染細胞の染色体への組み込み、感染細胞のゲノムからの転写の調節の作用がある（文献 23）。

② F 蛋白質遺伝子

NDV の F 蛋白質（fusion protein）は、HN 蛋白質（hemagglutinin-neuraminidase protein）との共存下で膜融合作用をもつ（文献 24）。ウイルスエンベロープと細胞膜の融合により、ウイルスは細胞内へと侵入する。また、細胞と細胞の融合によりシンシチウムの形成が起こる。膜融合作用は NDV の感染成立に必須であり、F 蛋白質及び HN 蛋白質に対する抗体は、ウイルス感染を阻止することが知られている（文献 25）。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

pGEM-3Z（別添 10 の図 1、文献 26）

大腸菌由来のプラスミドを改変し遺伝子クローニングに使用しやすくしたもの。汎用ベクターとして市販されている。

ロ 特性

pGEM-3Z の塩基数は 2743bp、塩基配列は日本 DNA データバンクのアクセッション番号 X65304.3 に登録されている。プラスミドを他の菌株へ伝達するための配列は含まない。HVT の相同組換え用の配列を導入したクローニングベクター pVEC04 のバックボーンとして使用した。

本ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、マルチクローニングサイト、LacZ、Sp6/T7 プロモーターを有するクローニングベクターである。挿入を保持するクローンのスクリーニングがブルー／ホワイトセレクションによって行えること、挿入した遺伝子の in vitro 転写ができることが特徴である。

(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

クローニングベクター pVEC04（別添 10 の p2 の図 2）は、pGEM-3Z のクローニングサイトに、HVT 相同配列（別添 10 の p3-4 の図 3、4）、LTR プロモーター（pRSVcat より調製）及び新た

資料 2. 審査データの概要

なクローニングサイトを導入して作製した（別添 10 の p5 の図 5、文献 27）。

F 蛋白質遺伝子は、発育鶏卵で培養し精製した NDV からゲノム RNA を抽出して cDNA を合成し、クローニングした（別添 10 の p6 の図 6、文献 27）。F 蛋白質遺伝子は、最終的に pVEC04 の BglIII サイトにクローニングし、得られたプラスミドを pNDV04 とした（別添 10 の p7 の図 7、文献 28）。細胞内に移入する核酸は、プラスミド pNDV04 から調製し、制限酵素で消化して直鎖状にして用いた（別添 10 の p8 の図 8）。細胞内に移入する核酸には、上流から順に HVT 相同領域（839bp）、LTR（約 600bp）、F 蛋白質遺伝子（非コード領域を含め約 1800bp）、HVT 相同領域（164bp）が含まれる（合計 3472bp）。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

HVT を感染させた鶏胚初代細胞から抽出した全 DNA と直鎖状化した pNDV04 をリン酸カルシウム沈殿法により、鶏胚初代細胞にコトランスフェクションした（文献 27）。

LTR プロモーターの下流のクローニングサイトに挿入された遺伝子は、その外側に配置する HVT の相同配列を利用して、HVT のゲノム中に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

F 蛋白質を発現しているウイルスを、間接蛍光抗体法により選抜した。1 次抗体には、NDV 高度免疫鶏血清、2 次抗体には、Fluorescein Isothiocyanate（以下 FITC）標識抗鶏 IgG 血清を用いた。ランダムに選択したプラークから回収したウイルスを鶏胚初代細胞に感染させ、蛍光の有無を確認した。蛍光が認められたウイルスから限界希釈を行って再度蛍光の有無を確認し、95% 以上均一に蛍光が認められるまで限界希釈を繰り返した（文献 27）。F 蛋白質遺伝子を保持する分離株#04-44-13 は、鶏胚初代細胞で更に継代を繰り返し、製造用原株を作成した。製造用原株には「HVT-F 011299」の表示をし、米国の製造所(Intervet Inc. 29160 Intervet Lane, Millsboro, DE 19966-4217) で管理を行っている。当該組換え体ウイルスの名称は、HVT-NDV/F 株とした。

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

イ 移入した核酸の遺伝子組換え微生物における存在状態

供与核酸は宿主のゲノム内に組み込まれており、US 領域（別添 10 の p9 の図 9）の US10 相同遺伝子（以下ホモログ）内の BglIII サイト（別添 10 の p10-11 の図 10 及び 11）に位置している（図 4）。



図 4 HVT-NDV/F 株における供与核酸の挿入部位
 LTR：ラウス肉腫ウイルス由来 LTR プロモーター
 NDV/F：ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子

ロ 目的遺伝子の宿主内での発現の安定性

HVT-NDV/F 株を培養細胞（鶏胚初代細胞）で継代した後、供与核酸挿入部位付近の制限酵素切断パターン（サザンブロット）及び塩基配列を確認したところ、製造用原株（以下マスターシード）と 11 代継代時で、供与核酸に欠損や再配置は認められず（別添 11）、塩基配列にも変異は認められなかった（別添 12）。また、HVT-NDV/F 株を鶏で継代した後、サザンブロットで調べたところ、マスターシードから 2 代継代した HVT-NDV/F 株と鶏で 8 代継代した HVT-NDV/F 株との間に切断パターンに差異は認められなかった（別添 13）。

F 蛋白質遺伝子の発現を F 蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法及び免疫沈降法により確認したところ、蛍光抗体法では、マスターシード、培養細胞 11 代継代ウイルス、鶏 5 代継代ウイルスのいずれから F 蛋白質の発現が確認され（別添 11）、免疫沈降法では、マスターシード及び培養細胞 5 代継代ウイルスから NDV の F 蛋白質と同じ約 60kDa の蛋白質の沈降が確認された（別添 14）。

鶏で継代した HVT-NDV/F 株に病原性が現れるか検討したところ、鶏で 4 代継代した HVT-NDV/F 株を接種した 1 日齢の鶏（5 代目）は、8 週間の観察期間中にマレック病の症状を示さず、接種後 8 週目の剖検時にも肉眼的なマレック病の所見は認められなかった（別添 11）。HVT-NDV/F 株のマレック病及びニューカッスル病に対する免疫賦与能力を鶏に対する攻撃試験により確認したところ、マスターシードから培養細胞で 11 代継代して製造したワクチンでも有効な防御能を賦与することが出来た（別添 15）。以上のことから、HVT-NDV/F 株の遺伝的安定性は高いと考えられる。

(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

HVT-NDV/F 株の検出は、鶏胚初代培養細胞を用いて検査材料から HVT を分離した後、抗 NDV-F 蛋白質モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により行う。蛍光染色は 8 穴チャンバースライド上で行う。小分け製品を分離した HVT として用い感度を検討したところ、400 倍まで希釈しても特異蛍光を検出することが出来、その際の 1 接種量 0.1mL 当たりの感染価は 12PFU であった。本方法により、HVT-NDV/F 株を接種した鶏胚培養細胞は特異的に染色されるが、HVT を接種した鶏胚培養細胞及び非接種の鶏胚培養細胞は染色されなかった（別添 16）。

(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

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）

鶏胚初代細胞における HVT-NDV/F 株の増殖は、宿主ウイルスと同様に 30～40℃の範囲で増殖し、25℃及び 45℃では増殖しなかった（別添 4）。

接種鶏における体内の HVT-NDV/F 株は、宿主ウイルスと同様に、接種後 1 週目までに肝臓、脾臓、腎臓、肺、胸腺、ファブリキウス嚢等、多くの臓器で増殖し、2～3 週目に羽包からウイルスが検出された。一方で、感染鶏の口腔やクロアカ（総排泄口）からはウイルスは検出されなかった（別添 6、別添 7）。

② 遺伝的特性

HVT-NDV/F 株は、宿主ウイルスの Us 領域に F 蛋白質発現カセットが挿入されている（図 4、別添 10 の p10 の図 10）。挿入部位には、機能不明の遺伝子 ORF2（US10 ホモログ）が存在していたが、挿入により途中で破壊されている（別添 10 の p11 の図 11）。ORF2 の機能は不明であり、ORF2 が破壊されたことによる表現型の変化はない。

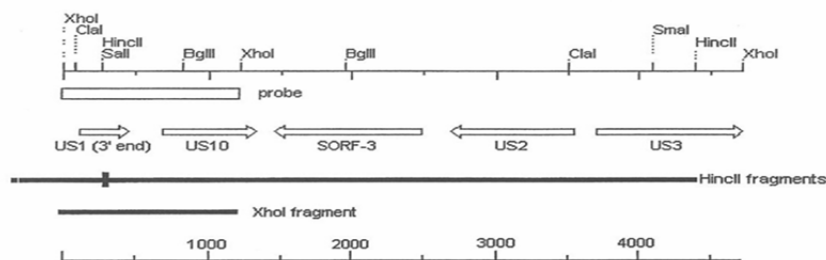


図 5 供与核酸挿入部位付近の制限酵素地図

矢印は ORF とその向きを示す。下段のバーは bp を示す。

図は、挿入前の親株（PB1 株）を示したもので、US10 ホモログの *Bgl*II サイトに供与核酸を挿入した。

③ 病原性

宿主ウイルスは、鶏に対して腫瘍原性及び病原性を示さない（文献 2 9）。HVT-NDV/F 株は宿主ウイルス同様に、鶏に対して腫瘍原性及び病原性を示さなかった（別添 1 7）。

HVT-NDV/F 株は、レトロウイルス由来の配列を含む。レトロウイルスは、増殖の過程でウイルスのゲノムを感染細胞の染色体に組み込む過程（プロウイルス化）を経るが、この過程は、感染細胞の癌化にも必須の過程である。プロウイルス化には、レトロウイルスのゲノムの両末端の 2 つの LTR 配列とウイルス由来のインテグラーゼの存在が必要となる（文献 2 4）。HVT-NDV/F 株には 1 つの LTR 配列しか導入しておらず、末端に配置していないことから、HVT-NDV/F 株の遺伝子が接種鶏の染色体へ組み込まれることや接種鶏が癌化することは、無いものと考えられる。

④ 有害物質の産生性

HVT-NDV/F 株は NDV の F 蛋白質を発現する。NDV は人獣共通感染症の病原体であり、人に結膜炎の症状を起こすが、F 蛋白質に毒性があるとの報告はない。

本組換えに使用した供与核酸中の ORF について検索した結果、目的の蛋白質をコードする ORF (1662bp) が最も長い ORF として検索され、それ以外に 18 個の 117～543bp の短い ORF が検索された (別添 10 の p12 の図 12)。短い ORF を含む供与核酸の 6 フレームすべての翻訳ペプチドに対してアレルゲンデータベース ADFS を検索したところ、F 蛋白質がサザエ由来のアレルゲン物質トロポミオシンと 27%の相同性を示したが (FAO/WHO 法では 37%以上を陽性とする)、この他にアレルゲン性の疑われる物質は検索されなかった (別添 18)。短い ORF から実際に蛋白質が翻訳される可能性は否定できないが、病原性の確認試験 (別添 11) から鶏で 5 代継代しても病原性が復帰することがないことを確認しており、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、HVT-NDV/F 株を含む鶏用ワクチンは、海外では 2007 年から販売され、34 億 5 千万ドース以上が使用されているが、接種した鶏や周辺の自然環境又は食肉として消費した人に問題を起こしたとの報告はなく、安全性が確認されている。

⑤ 感染性

(組織親和性及び持続感染性)

感染鶏において HVT-NDV/F 株は、宿主ウイルス PB1 株と同様に肝臓、脾臓、腎臓、肺、胸腺、ファブリキウス嚢及び羽包から検出されたが、口腔やクロアカ (総排泄口) からは検出されなかった (別添 15、別添 16)。宿主ウイルス PB1 株は、長期に亘って持続感染し、抗体は終生持続する (文献 8)。HVT-NDV/F 株の持続感染は接種後 2 年目まで末梢血リンパ球からウイルスが回収されたことで確認している (別添 19)。

HVT-NDV/F 株の感染が可能な鳥類としては、宿主ウイルスと同様であり、七面鳥の外、鶏、うずら、キジ科の鳥類が考えら、鳩及びあひるには感染しなかった (別添 2)。人、ミドリザル、犬、猫、兎及び牛由来の細胞株において HVT-NDV/F 株は、宿主ウイルス PB1 株同様増殖しなかった (別添 5)。

⑥ 内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性の有無

HVT が内在性ウイルスを活性化するとの報告はない。また、RSV 及び NDV についても同様の報告はない。従って、HVT-NDV/F 株も宿主ウイルス PB1 株同様に内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性はないものと考えられる。

HVT-NDV/F 株を使用したワクチンの製造には鶏胚細胞を使用する。鶏胚細胞に由来する粒子産生性内在性レトロウイルスには、内在性のトリ白血病ウイルス (ALV) 及び内在性トリウイルス (EAV) が知られており (文献 32)、鶏胚細胞を用いて製造される鶏用生ワクチンにはこれらのウイルスが混入していると考えられる。

資料 2. 審査データの概要

鶏胚細胞で製造した鶏用生ワクチンには、過去に外来性の ALV が混入した報告があり、鶏に対する病原性が示された（文献 33）。また、あひる胚細胞で製造された鶏用生ワクチンでは、細網内皮症ウイルス（REV）が混入した例も報告されている（文献 34）。

しかし、鶏胚細胞で製造した鶏用生ワクチンの内在性ウイルスが鶏に対して病原性を示した例は知られていない。通常内在性レトロウイルスは、宿主に対して病原性を示さない。HVT-NDV/F 株を使用したワクチンの適用対象動物は鶏であり、製造用細胞と同種の動物であるため、製造用細胞に由来する内在性のトリ白血病ウイルス（ALV）及びトリウイルス（EAV）等が適応対象動物で病原性を示すことはないと考えられる。

⑦ 接種動物からの排泄及び同居感染性

HVT-NDV/F 株は宿主ウイルス PB1 株と同様に同居感染性を示し（別添 3）、接種後 2～3 週目に羽包で感染性が認められるが、口腔及びクローカに感染性は認められなかった（別添 16、別添 17）。HVT-NDV/F 株は、宿主ウイルス PB1 株と同様にフケからウイルス DNA が検出される（別添 20）。HVT-NDV/F 株は、接種後 2～5 週目までの間、接種鶏のフケからウイルスの排泄が認められた（別添 21、別添 22）。しかし、接種鶏は、排泄期間終了後に給餌給水制限によるストレスを付加しても、再びフケからウイルスを排泄することはなかった（別添 20）。HVT-NDV/F 株は、宿主ウイルス PB1 株同様、卵から検出されなかった（別添 23、別添 24）。感染鶏が排泄した糞便からは HVT-NDV/F 株を回収することは出来なかった（別添 25）。

⑧ 自然界での生存能力

HVT-NDV/F 株は、細胞随伴性ウイルスでありは、雨水、泥水、血餅及び血清中で 1 週間以上の生存はできなかった（別添 26）。HVT-NDV/F 株をワクチンの溶解用液で調製し室温に静置した場合、48 時間後までウイルスが検出されたが、1 週間後には検出されなかった（別添 27）。フケに排泄されたセルフリーの HVT-NDV/F 株は、1 週間後には感染価の低下が認められ、4℃では 4 週間後でも感染価が残存していたが、常温では 4 週間後に検出限界以下となった（別添 28）。

⑨ 交雑性

HVT が MDV1 や MDV2 と交雑する可能性については、相同性の低いウイルス間で交雑が起こった例は知られていないことから（文献 16）、血清型間で交雑をおこすことはないと考えられる。

HVT の株間の相同組換えの可能性については、野外感染による重感染の機会はほとんどないため、株間で相同組換えが起きる可能性は低いと考えられる。HVT-NDV/F 株は宿主ウイルスの特性と変化はないことから、血清型間での交雑や株間での相同組換えを起こす可能性はないと考えられる。

⑩ 不活化

HVT-NDV/F 株は、アルコール、塩素、逆性石鹼及び消石灰によって不活化された（別添 29）。また、HVT-NDV/F 株は人工胃液により不活化された（別添 30）。

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

HVT-NDV/F 株のブランクは、通常の HVT とは異なり、F 蛋白質を認識するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により特異的に染色される（別添 14）。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

ニューカッスル病は、強い感染性を示し、多くは急性型で、呼吸器症状、下痢、神経症状を伴う、経済上重要な病気である。NDV の病原性は株によって非常に異なっており、強毒型、中等毒型、弱毒型に分類される。週齢や管理状態に関わらず、臨床症状のほとんどは流行した株の病原性によって決まる。症状は、100%死亡する場合から軽い呼吸器症状のみの場合までである。採卵鶏において最も多く認められる経済損失は、産卵率低下、卵殻及び卵白の品質低下である。受精率や孵化率の低下も報告されている。

マレック病は、伝染性の高い腫瘍性の病気である。マレック病の臨床症状は多様であるが、多くの場合罹患した鳥は、体重減少や翼、脚部に麻痺症状及び腫瘍形成を示す。ワクチン接種していない鶏における死亡率は、5~50%程であり、通常 10 週齢から 20 週齢頃に発症する。MDV1 に感染した鶏は、生涯ウイルスを保菌し排泄し続ける。ウイルスの伝染は口腔や気道からである。マレック病ウイルスに感染した鶏の羽包から生じたフケの感染性は数か月間持続する。

ニューカッスル病の予防は、生ワクチン又は不活化ワクチンが用いられている。生ワクチンの利点は、不活化ワクチンでは一羽ずつ注射が必要なのに対し、飲水や噴霧による投与が可能である。しかし稀に、呼吸器症状を起こす場合がある。ニューカッスル病のワクチンは、通常数回にわたる投与が必要である。オイルアジュバントタイプの不活化ワクチンは、長い免疫持続を示すが、アジュバント成分の残留があることから注射後一定期間出荷が禁止されている。

マレック病の予防には、HVT、弱毒化した MDV1 及び MDV2 がワクチンとして広く用いられている。HVT は、有効性が高く他の製品と併用しやすいことから、長い間広く用いられている。市場にはセルフリーと細胞随伴性のウイルスがあるが、MDV1 及び 2 のワクチンは細胞随伴性ウイルスの製品しかない。ワクチンは、18 日齢発育鶏卵又は初生時に皮下又は筋肉内に接種する。一般に、これらのワクチンは生涯にわたる防御を付与する。

HVT-NDV/F 株の特徴は、従来のワクチンでは数回の接種が必要であった（図 5）ニューカッスル病の免疫が、マレック病と同じ 1 回の接種で終生にわたる免疫を賦与しうることである。但し、ニューカッスル病の流行がある地域では、免疫出現までに 1 回の ND 生ワクチンの併用が推奨される。この他に、呼吸器症状を起こすリスクがなく、残留による出荷制限もないことが利点

資料 2. 審査データの概要

としてあげられる。また、ベクターとして用いた HVT の効果により、マレック病の予防も同時に可能となっている。現在、ニューカッスル病及びマレック病のワクチンは、大規模な養鶏場ではほぼすべて接種が行われている。HVT をベクターとしたニューカッスル病ワクチンの使用は、ワクチンの投与回数の減少による労力とコストの削減及び鶏のストレスの低減により生産性向上に貢献すると考えられる。製品に関する情報を別添 31 に示した。

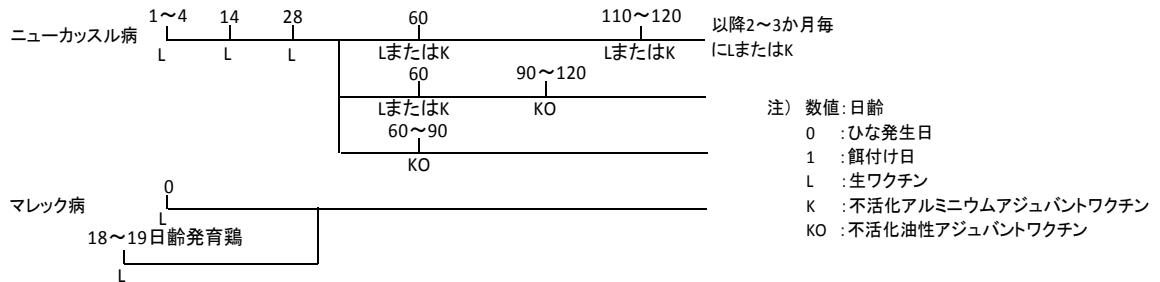


図 5 鶏病研究会が推奨するニューカッスル病及びマレック病のワクチンプログラム（採卵鶏）

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

(2) 使用等の方法

—

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

—

(4) 生物多様性影響が生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

p28 の緊急措置計画書を参照

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

アイソレーターで飼育した場合、HVT-NDV/F 株は宿主ウイルス PB1 株と同様に、同居している鶏に低い割合で水平感染を起こした（別添 3）。しかし、より野外の条件に近い実験室で飼育した場合に、HVT-NDV/F 株は同居している鶏に水平感染を起こさなかった（別添 17、別添 32）。同様に鳩及びあひるにも水平感染を起こさなかった。しかし、七面鳥には水平感染した（別添 32）。HVT-NDV/F 株は、海外では既に野外で使用されているが、周辺環境に影響を及ぼしたとの報告はない。

(6) 国外における使用等に関する情報

HVT-NDV/F 株を含む単味ワクチン「Innovax-ND」は、米国、カナダ、コロンビア、コストリカ、ヨルダン及びタイで認可を受けている（表 1）。HVT-NDV/F 株及び MDV2（SB-1 株）を含む 2 種混合ワクチン「Innovax-ND-SB」は、米国、カナダ、コロンビア、アゼルバイジャン、メキシコ、パナマ、ペルー、タイ及びインドで認可を受けている（表 2）。HVT-NDV/F 株を含むワクチンは、2007 年の発売以来 34 億 5 千万ドース以上が使用されている。

米国で Innovax-ND 及び Innovax-ND-SB の認可を受けた際に添付したリスクアセスメントを別添 33 に示した。カナダで Innovax-ND-SB の認可を受けた後に、カナダ食品検査庁が公表した環境評価書を別添 34 に示した。

表 1 Innovax-NDの国別販売実績（単位：千ドース）

販売年	米国	カナダ	トリニダード・トバゴ	ヨルダン	UAE	オマーン	レバノン	イラク	タイ	合計
2010	7,640									7,640
2011	290,214	2,880	8,300	13,400						314,794
2012	310,196	5,840	0	52,400	9,600	2,450	4,900	1,200	22,454	409,040

資料 2. 審査データの概要

表 2 Innovax-ND-SB の国別販売実績 (単位: 千ドース)

販売年	米国	カナダ	トリニダード・トバゴ	メキシコ	コロンビア	ボリビア	ペルー	ベネズエラ	タイ	アゼルバイジャン	合計
2007	32,096		100								32,196
2008	162,132		5,775								167,907
2009	307,317	750	40,660	6,085							354,812
2010	432,844	4,437	40,947	124,978	11,409	1,200				15,000	630,815
2011	415,038	753	31,796	184,763	72,207	0	7,787		38,005	4,900	755,249
2012	514,525	0	45,500	110,838	98,744	0	11,724	10,420	105,200	4,900	901,851

(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報

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

鶏に筋肉内接種又は皮下接種した場合、21 日後までに肝臓、脾臓、腎臓、生殖巣、肺、胸腺、ファブリキウス嚢、末梢血リンパ球、羽包から HVT-NDV/F 株が回収されたが、クロアカ（総排泄口）や口腔洗浄液からは回収されなかった（別添 15、別添 16）。また、糞便からも感染性のあるウイルスは回収されなかった（別添 25）

羽包からの感染性ウイルスの回収では、卵内に接種した場合 1～5 週齢までの間に回収され、1 日齢で接種した場合には 2～5 週齢までの間に回収されたが、6 及び 9 週目には回収されなかった（別添 15、別添 16、別添 20、別添 21、別添 22）。持続感染については、接種後 104 週目（2 年目）まで末梢血リンパ球ウイルスが回収され、持続を確認している（別添 19）。

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

HVT-NDV/F 株を接種した鶏を接種していない鶏又は七面鳥と同居飼育すると水平感染が認められるため、HVT-NDV/F 株を接種した鶏からは HVT-NDV/F 株の排泄があると考えられる。鶏における水平感染は、アイソレーターで飼育した場合に一部の個体に限られた水平感染が認められたが（別添 3）、実験室で飼育した場合には認められなかった（別添 17、別添 32）。接種動物の体内では、白血球、肝臓、脾臓、腎臓、生殖巣、肺、胸腺、ファブリキウス嚢、羽包及びフケからウイルスが分離されるが、口腔、クロアカ、糞便及び卵（卵黄及び卵白）からウイルスは分離されなかった（別添 15、別添 16、別添 19、別添 21、別添 22、別添 25）。

HVT-NDV/F 株を接種した鶏の血液、筋肉、肝臓、心臓、筋胃を 4℃に保存した場合、肝臓では 24 時間後にウイルスが検出されたが 48 時間後には検出されなくなり、そのほかの部位では 24 時間後にウイルスは検出されなかった（別添 35）。また -20℃に保存した場合には、24 時間後に検査したすべての部位でウイルスは検出されなかった（別添 35）。泥水、雨水、血清及び血餅

資料 2. 審査データの概要

に暴露した場合、4 日後までウイルスが検出されたが 1 週間後には検出されなかった（別添 26）。

フケに排泄されたウイルスは、4℃においては 4 週間後に一部の感染性が残存していたが、常温においては 4 週間後には感染性は認められなかった（別添 28）。

これらのことから、ワクチンや鶏体内に存在する細胞随伴性のウイルスは環境中で 1 週間以上の生存は出来ず、またフケに排泄されたセelfreeウイルスにおいても環境中で 4 週間以上の生存は困難と考えられた。

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

HVT-NDV/F 株を卵内又は皮下に接種した種鶏から採卵した卵、発育鶏卵及びひなについて検査した結果、ウイルスは検出されなかった（別添 23、別添 24）。HVT-NDV/F 株は卵に排泄されず、垂直感染の可能性は無いと考えられた。

ニ 野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

HVT-NDV/F 株は、人、ミドリザル、犬、猫、兎及び牛等の哺乳動物由来細胞では増殖しなかった（別添 5）。HVT-NDV/F 株を接種した鶏と鳩及びあひるを同居飼育しても感染しなかったが、七面鳥には感染した（別添 32）。また、鳩及びあひるに直接 HVT-NDV/F 株を接種しても感染しなかった（別添 2）。HVT-NDV/F 株の鶏間での水平伝播は、起こらないか（別添 17、別添 32）又は起きて一部に個体に限られた（別添 3）。以上の性質は宿主ウイルス PB1 株から変化していなかったため（別添 5、別添 32、別添 2、別添 3）、HVT-NDV/F 株の野生動植物への伝播の可能性は、宿主ウイルス PB1 株 と同等であると考えられる。

また、うずらやコウライキジは HVT に対して感受性を示すため、その他のキジ科の鳥類も HVT に対して感受性を有する可能性がある。なお、農場に侵入する可能性がある鳩、カラス、スズメ等の野鳥は、キジ科の鳥類ではないため HVT に感染することはないと考えられ、鶏を捕食するイタチ、タヌキ、テン等の野生動物は、哺乳動物であるため HVT に感染することはないと考えられる。人は、誤注射事例を含む抗体検査の結果から HVT に感染することはないと考えられる。

HVT は、鶏用生ワクチンとして国内でも約 40 年にわたり安全に使用されてきた歴史があり、これまでにキジ科の鳥類を含む野生動植物へ伝播したとの報告はなく（別添 36、別添 37）、HVT-NDV/F 株がキジ科の鳥類に伝播する可能性は、宿主ウイルス PB1 株と同等であると考えられる。

ホ その他必要な情報

—

別添資料リスト

- 別添 1 鶏以外の鳥類における HVT の感受性（海外試験）
- 別添 2 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の鳥類での増殖（海外試験）
- 別添 3 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の同居による水平伝播（海外試験）
- 別添 4 HVT-NDV/F 株の増殖温度の検討
- 別添 5 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の哺乳動物由来細胞株における増殖（海外試験）
- 別添 6 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の皮下接種における体内分布（海外試験）
- 別添 7 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の筋肉内接種における体内分布（海外試験）
- 別添 8 HVT にコードされるアミノ酸のアレルゲンデータベース検索結果
- 別添 9 供与核酸の塩基配列
- 別添 10 供与核酸及びベクターに関する資料
- 別添 11 HVT-NDV/F 株の遺伝子型及び表現型の安定性（海外試験）
- 別添 12 HVT-NDV/F 株のシーケンスによる遺伝子型の安定性（海外試験）
- 別添 13 HVT-NDV/F 株の鶏による継代後の遺伝子型の安定性（海外試験）
- 別添 14 HVT-NDV/F 株の F 蛋白質の発現確認（海外試験）
- 別添 15 HVT-NDV/F 株の皮下接種における免疫原性（海外試験）
- 別添 16 Innovax ND のマーカー試験
- 別添 17 HVT-NDV/F 株の安全性と水平感染（海外試験）
- 別添 18 供与核酸にコードされるアミノ酸のアレルゲンデータベース検索結果
- 別添 19 HVT-NDV/F 株の免疫持続
- 別添 20 HVT-NDV/F 株のストレス下での排泄の検討
- 別添 21 HVT-NDV/F 株の卵内接種における排泄期間の検討
- 別添 22 HVT-NDV/F 株の皮下接種における排泄期間の検討
- 別添 23 HVT-NDV/F 株の垂直感染

資料 2. 審査データの概要

- 別添 24 鶏卵からの DNA 抽出法の検討
- 別添 25 ワクチン接種した肉用鶏の糞便からの HVT-NDV/F 株の検出（海外試験）
- 別添 26 HVT-NDV/F 株の自然界に対応する環境条件下での生存試験
- 別添 27 HVT-NDV/F 株のワクチンの環境中での安定性（海外試験）
- 別添 28 フケに排泄された HVT-NDV/F 株の生存性の検討
- 別添 29 HVT-NDV/F 株の消毒剤による不活化
- 別添 30 HVT-NDV/F 株の人工胃液による不活化
- 別添 31 製品に関する情報
- 別添 32 HVT-NDV/F 株の鳥類への水平感染（海外試験）
- 別添 33 HVT-NDV/F 株の米国におけるリスク評価書（米国農務省 許可番号 17H1.R2）
- 別添 34 HVT-NDV/F 株のカナダにおけるリスク評価書（米国農務省 許可番号 17H1.R2）
- 別添 35 食鳥処理後の鶏の可食部位における HVT-NDV/F 株の感染性ウイルスの残存（海外試験）
- 別添 36 日本国内におけるキジ科野鳥の死亡事例に関する調査
- 別添 37 米国におけるキジ科野鳥の死亡事例に関する調査
- 別添 38 七面鳥ヘルペスウイルスの感受性鳥類及び自然界における維持

別添 1 鶏以外の鳥類における HVT の感受性（海外試験）**目的：**

鶏以外の鳥類の HVT（FC126 株）に対する感受性を検討する。

方法：

成鳥の鳩、4 週齢のコリンウズラ、1 日齢のコウライキジ及び 1 日齢の七面鳥に、HVT のワクチンを接種し 3 週後に血液を採取した。血液は、2～3 羽分をプールして白血球を分離し、鶏胚 2 代培養細胞に接種して、37℃で 5 日間培養し、プラークの観察を行った。

接種後 8 週目にすべての鳥を安楽死させ、マレック病の肉眼所見が認められるか観察を行った。

結果：

七面鳥及びコウライキジでウイルスの増殖が認められた。しかし、供試した 4 種の鳥類は何れも臨床症状を示さず、腫瘍等を含めた病変を示さなかった（表 1）。

表 1 鳥種毎のウイルス分離及び剖検の成績

鳥種	ウイルス分離 ¹⁾		剖検 ²⁾	
	HVT	対照	HVT	対照
鳩	0/10	0/2	0/20	0/12
コリンウズラ	0/10	0/3	0/23	0/15
コウライキジ	5/10	0/2	0/20	0/14
七面鳥	7/7	0/3	0/21	0/13

1) 陽性数/検体数（検体は 2～3 羽をプール）

2) マレック病の病変を示した羽数/検査羽数

考察及び結論：

HVT のワクチンは、適用対象外の鳥類に拡散したとしても臨床症状や病変を示さず、安全と考えられる。

別添 2 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の鳥類での増殖（海外試験）**目的：**

HVT-NDV/F 株及びその作出に使用した PB1 株の鳥類（鳩、七面鳥及びあひる）の体内での増殖を検討する。

方法：

10 羽の鳩（5～7 週齢）、10 羽の七面鳥（初生）及び 10 羽のあひる（2 日齢）に高用量（ $10^{4.1}$ PFU）の HVT-NDV/F 株を 1 回筋肉内接種した。さらに、10 羽のあひる、鳩及び七面鳥に高用量（ $10^{4.0}$ PFU）の PB1 株を 1 回筋肉内接種した。3 及び 4 週間後に全ての動物から採血し、白血球を分離した。白血球を鶏胚初代培養細胞に接種し、プラークの観察を行った。

結果：

HVT-NDV/F 株を筋肉内に直接注射した場合に鳩及びあひるの体内では増殖しなかった。同様に PB1 株も鳩及びあひるの体内では増殖しなかった。七面鳥において HVT-NDV/F 株は、9 羽中 7 羽で増殖した。親株である PB1 株は 10 羽中 8 羽で増殖した（表 1）。

表 1 HVT-NDV/F 株と PB1 株の鳩、七面鳥及びあひるにおける増殖

鳥種	HVT-NDV/F 株		PB1 株	
	接種後 3 週目	接種後 4 週目	接種後 3 週目	接種後 4 週目
鳩	0/10	0/10	0/10	0/10
七面鳥	4/9	6/9	4/10	7/10
あひる	0/10	0/10	0/10	0/9

陽性数/検査数（白血球が分離できなかった検体や細菌汚染のあった検体は、検査数に含めなかった。）

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株とその作出に使用した PB1 株の宿主域を比較した結果、試験した種において遺伝子組換えによる宿主域の変化は認められなかった。

別添 3 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の同居による水平伝播（海外試験）**目的：**

HVT-NDV/F 株とその作出に使用した PB1 株の水平伝播の有無を比較する。

方法：

$10^{3.4}$ PFU の HVT-NDV/F 株又は $10^{3.6}$ PFU の PB1 株をそれぞれ 1 日齢の SPF 鶏 10 羽の筋肉内に接種した。10 羽の対照鶏を各群にそれぞれ同居させた。ワクチン注射後 3、4、5 及び 6 週目に、試験鶏及び対照鶏から採血し、血中のウイルスの存在を調べた。ウイルス検査は、血液から白血球を分離し、鶏胚初代培養細胞に接種してプラークを観察した。

結果：

HVT-NDV/F 株又は PB1 株を接種した鶏は、接種後 4 週目に接種群のすべての鶏で感染が確認された（表 1、表 2）。同居群では、HVT-NDV/F 株では 6 週目（表 1）、PB1 株では 4 週目（表 2）から一部の個体で感染が確認された。

表 1 HVT-NDV/F 株の水平感染

群	接種後週数			
	3	4	5	6
接種	9/10	10/10	4/8	6/10
同居	0/10	0/10	0/7	2/10

陽性数/検査数（白血球が分離できなかった検体や細菌汚染のあった検体は、検査数に含めなかった。）

表 2 PB1 株の水平感染

群	接種後週数			
	3	4	5	6
接種	10/10	10/10	7/9	6/10
同居	0/10	2/10	3/8	3/8

陽性数/検査数（白血球が分離できなかった検体や細菌汚染のあった検体は、検査数に含めなかった。）

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株は、同居鶏に拡散した。この性質は、作出に使用した PB1 株から変化していなかった。

別添 4 HVT-NDV/F 株の増殖温度の検討

目的：

HVT-NDV/F 株の増殖可能な温度域を検討する。同時に作出に使用した PB1 株の増殖可能な温度域についても検討し組換えにより性状の変化が起きていないか確認する。

方法：

HVT-NDV/F 株又は PB1 株を鶏胚初代培養細胞に MOI 0.001 となるように接種し 25、30、35、37、40 及び 45℃で培養した。培養後 1、2、3 及び 4 日目に細胞及び培養上清を回収した。増殖の確認は、CPE の観察及びリアルタイム PCR により行った。リアルタイム PCR は、Islam らの方法*を参考に HVT の SORF1 遺伝子を増幅するプライマー及び TaqMan プローブを使用し、半定量的にウイルス DNA 量を比較した。増幅に要するサイクル数 (Ct 値) が減少した場合に増殖があったと判断した。

結果：

HVT-NDV/F 株及び PB1 株はともに 30℃から 40℃において、鶏胚初代培養細胞上に CPE を示したが、25℃においては CPE を示さなかった。45℃においては、細胞がシートしなかったため CPE を観察することができなかった (表 1)。

HVT-NDV/F 株及び PB1 株はともに 30℃から 40℃において、継時的なウイルス DNA 量の増加が認められた。25℃及び 45℃においては 2 日目までに DNA 量のわずかな増加が認められたが Ct 値 4 未満の変化で推移した (図 1、図 2)。非接種の対照は、培養前及び 37℃4 日間培養後共にウイルス DNA の増幅は認められなかった。

表 1 各培養温度における CPE の観察結果

培養温度	ウイルス株		
	HVT-NDV/F 株	PB1 株	対照
25℃	—	—	—
30℃	＋ (4 日目)	＋ (4 日目)	—
35℃	＋ (4 日目)	＋ (4 日目)	—
37℃	＋ (3 日目)	＋ (3 日目)	—
40℃	＋ (3 日目)	＋ (3 日目)	—
45℃	×	×	×

＋：CPE 陽性 ー：CPE 陰性 ×：細胞がシートしなかったため確認できず
() は CPE 出現日

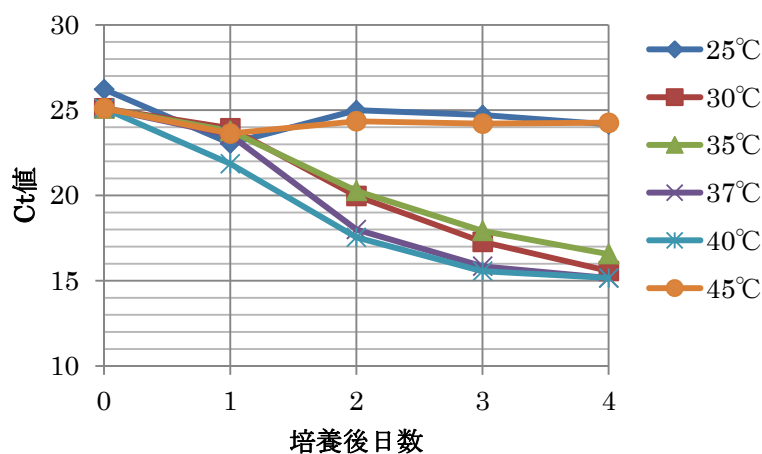


図 1 HVT-NDV/F 株の各温度におけるウイルス DNA 量の推移

資料 2. 審査データの概要

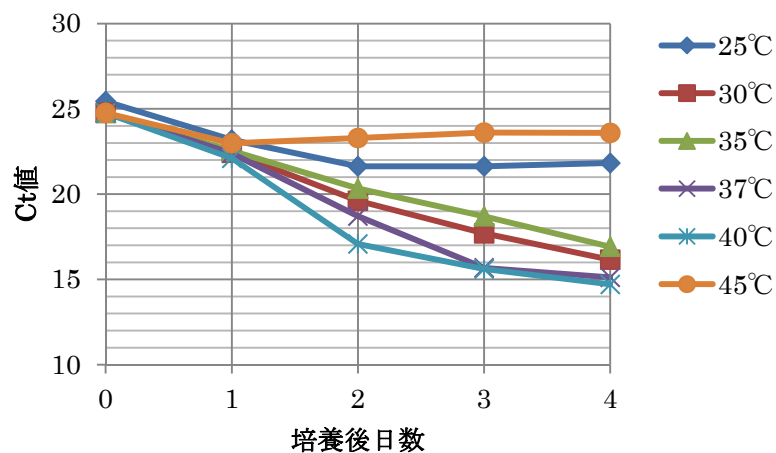


図 2 PB1 株の各温度におけるウイルス DNA 量の推移

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株の増殖可能な温度範囲は、30℃から 40℃であった。25℃及び 45℃においては継続的なウイルス DNA の増加が起こらないこと及び CPE が観察されないことから、これらの温度では増殖しないと考えられた。

HVT-NDV/F 株は、作出に使用した PB1 株から増殖可能な温度において変化は認められなかった。

参考文献：

Islam, A., *et al.* 2004. Differential amplification and quantification of Marek's disease virus using real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 119, 103-113

別添 5 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の哺乳動物由来細胞株における増殖（海外試験）**目的：**

HVT-NDV/F 株及びその作出に使用した PB1 株の哺乳動物由来細胞株における増殖を検討する。

方法：

各ウイルスにつき 25cm² のフラスコ 2 本の供試細胞を準備した（表 1）。一方のフラスコに 200PFU のウイルスを接種して 37℃で培養し、3～5 日毎に 4 回継代し（継代時の希釈倍率は 3～4 倍）、CPE の観察を行った。最終継代は、6 穴のプレートに接種し、七面鳥ヘルペスウイルス特異的モノクローナル抗体（L78.2）による蛍光染色を行った。

表 1 供試細胞株

細胞株名	由来
RK13	ウサギ腎臓
JCK	子牛腎臓
CRFK	猫腎臓
A72	犬腫瘍（組織不明）
Vero	アフリカミドリザル腎臓
Hela	人腺癌（子宮頸癌）

陽性対照として鶏胚 2 代培養細胞も用いた

結果：

鶏胚 2 代培養細胞は、HVT-NDV/F 株又は PB1 株の接種後 3 日目にプラークが観察された。しかし、ウサギ、牛、猫、犬、アフリカミドリザル及び人由来の細胞株では、どの継代においてもウイルスの増殖は検出されなかった。HVT に特異的なモノクローナル抗体で染色した場合、HVT-NDV/F 株又は PB1 株を接種したどの培養細胞株からもウイルスのプラークは検出されなかった。

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株は、哺乳動物由来や人由来培養細胞で増殖しなかった。この性質は、作出に使用した PB1 株から変化していなかった。

別添 6 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の皮下接種における体内分布（海外試験）

目的：

HVT-NDV/F 株及びその作出に使用した PB1 株の皮下接種における体内分布を検討する。

方法：

1 日齢の SPF 鶏に $10^{4.7}$ PFU の HVT-NDV/F 株又は $10^{4.8}$ PFU の PB1 株を接種した。ワクチン接種後 3、7、10、14、17 及び 21 日目に、各群から 3 羽の鶏を剖検し、肝臓、脾臓、腎臓、卵巣／精巣、肺、末梢血白血球、羽包、口腔洗浄液及び総排泄ロスワブからウイルス分離を試みた。試料は鶏胚初代細胞に接種し、2～4 日間の培養で CPE が認められない場合、1 回の植え継ぎを行い、CPE が認められない場合は陰性と判定した。

結果：

何れの群も、接種後 3 日目に最初にウイルスが検出されたのはリンパ性組織（ファブリキウス嚢、胸腺及び脾臓）と肝臓であった（成績は社外秘のため非公開）。接種後 10 日目の試料は、細胞が剥離したために評価ができなかった。接種後 14 日目には、口腔洗浄液と総排泄ロスワブを除くほとんどの臓器からウイルスが検出された。口腔洗浄液と総排泄ロスワブからは、どの時点でもウイルスは検出されなかった。

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株は、皮下接種後の鶏における体内分布において PB1 株から変化していなかった。

別添 7 HVT-NDV/F 株及び PB1 株の筋肉内接種における体内分布（海外試験）

目的：

HVT-NDV/F 株及びその作出に使用した PB1 株の筋肉内接種における体内分布を検討する。

方法：

1 日齢の SPF 鶏に $10^{5.2}$ PFU の HVT-NDV/F 株又は $10^{5.3}$ PFU の PB1 株を接種した。ワクチン接種後 3、7、10、14、17 及び 21 日目に、各群から 3 羽の鶏を剖検し、肝臓、脾臓、腎臓、卵巣／精巣、肺、末梢血白血球、羽包、口腔洗浄液及び総排泄ロスワブからウイルス分離を試みた。試料は鶏胚初代細胞に接種し、2～4 日間の培養で CPE が認められない場合、1 回の植え継ぎを行い、CPE が認められない場合は陰性と判定した。

結果：

何れの群も、接種後 3 日目に最初にウイルスが検出されたのはリンパ性組織（ファブリキウス嚢、胸腺及び脾臓）と肝臓であった（成績は社外秘のため非公開）。接種後 7 日目には、口腔洗浄液と総排泄ロスワブを除くほとんどの臓器からウイルスが検出された。口腔洗浄液と総排泄ロスワブからは、どの時点でもウイルスは検出されなかった。

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株は、皮下接種後の鶏における体内分布において PB1 株から変化していなかった。

別添 8 HVT にコードされるアミノ酸のアレルゲンデータベース検索結果

目的：

宿主として用いた七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）が有害物質を産生する可能性について検討するためアレルゲンデータベースの検索を行う。

方法：

HVT の全塩基配列（日本 DNA データバンクアクセス番号：AF291866）から予測されるアミノ酸配列をアレルゲンデータベース ADFS (<http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/index.jsp>) で検索した。

結果：

ゴキブリ由来のアレルゲン蛋白質 Bla g 1 が、269 残基について 25% の一致性を示した。当該アミノ酸は、HVT の UL36 Large tegument protein 遺伝子にコードされていた。連続して一致するアミノ酸は、3 残基以下であった。このほかにアレルゲン性が疑われる蛋白質は検索されなかった。

考察：

FAO/WHO の方法では、既知のアレルゲン蛋白質に対してアミノ酸 80 残基について 35% 以上の一致、又はアミノ酸 6～8 残基連続で一致した場合にアレルゲン陽性としている。従って、HVT の遺伝子には、既知のアレルゲン蛋白質と類似した蛋白質は含まれていない。

別添 9 供与核酸の塩基配列

HVT-NDV/F 株作出のため七面鳥ヘルペスウイルス PB1 株の相同組換えに挿入した DNA 断片の配列は成績は社外秘のため非公開。配列中に HVT (PB1 株) 相同領域、ラウス肉腫ウイルス由来 LTR プロモーター、ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子の開始及び終始コドン、ならびに F 蛋白質のアミノ酸配列が含まれる。

PB1 株の部分塩基配列は日本 DNA データバンクアクセス番号 M84473 に登録されている。PB1 株の塩基配列と FC126 株の塩基配列 (AF291866) は 98.9%の相同性がある。

ラウス肉腫ウイルス由来 LTR プロモーターの配列は、アクセス番号 DQ075935 に登録されている。

ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子の配列は、アクセス番号 Y18898 に登録されている。

クローニングベクター pGEM-3Z の配列は、アクセス番号 X65304 に登録されている。

別添 10 供与核酸及びベクターに関する資料

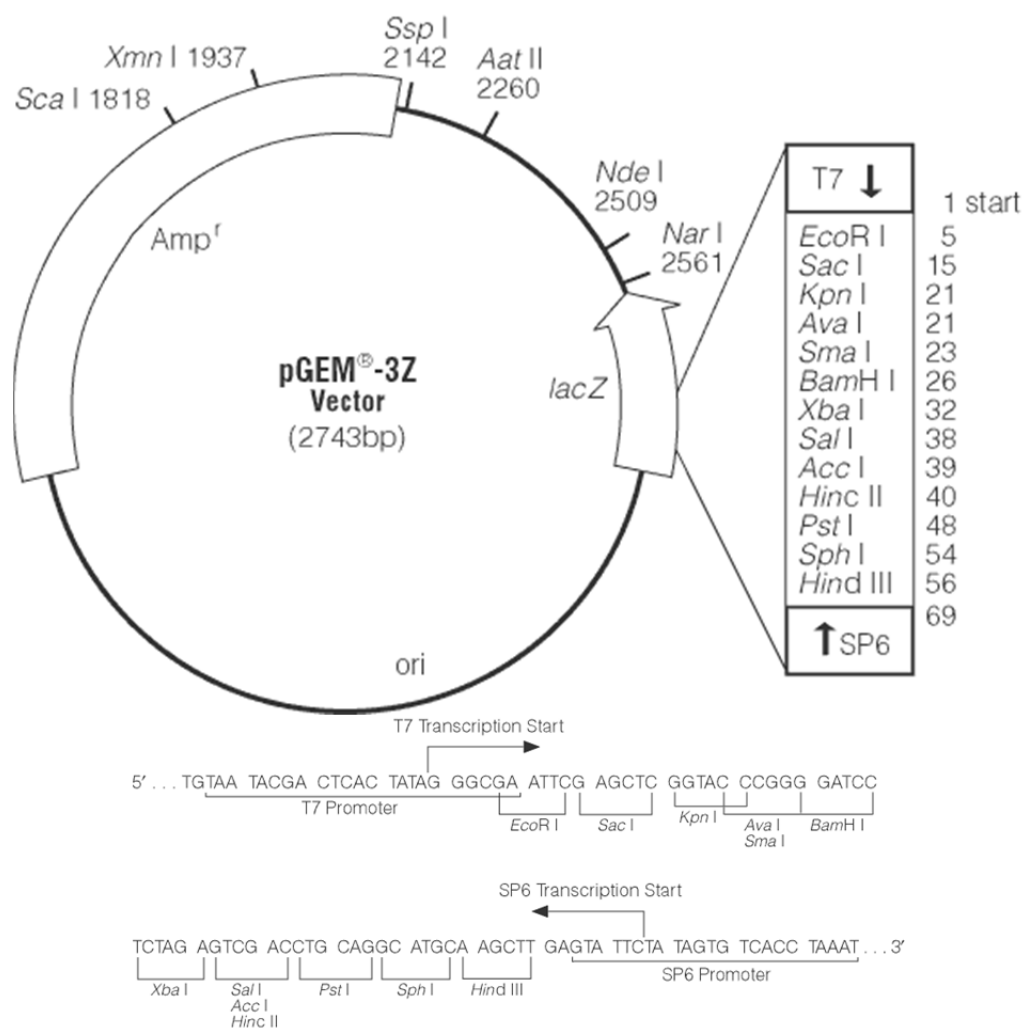


図1 pGEM-3Z のマップ、プロモーター及びマルチクローニングサイト

ベクターpVEC04 (図2) を構築する際にバックボーンとして使用した市販のプラスミドベクター。

T7 RNA ポリメラーゼ転写開始部位 1

SP6 RNA ポリメラーゼ転写開始部位 69

T7 RNA ポリメラーゼプロモーター 2727-3

SP6 RNA ポリメラーゼプロモーター 67-86

マルチクローニングサイト 5-61

lacZ スタートコドン 108

lac オペロン配列 2561-2724; 94-323

lac オペレーター 128-144

β-lactamase (Amp^r) コード領域 1265-2125

pUC/M13 Forward シークエンス用プライマー結合部位 2686-2702

pUC/M13 Reverse シークエンス用プライマー結合部位 112-128

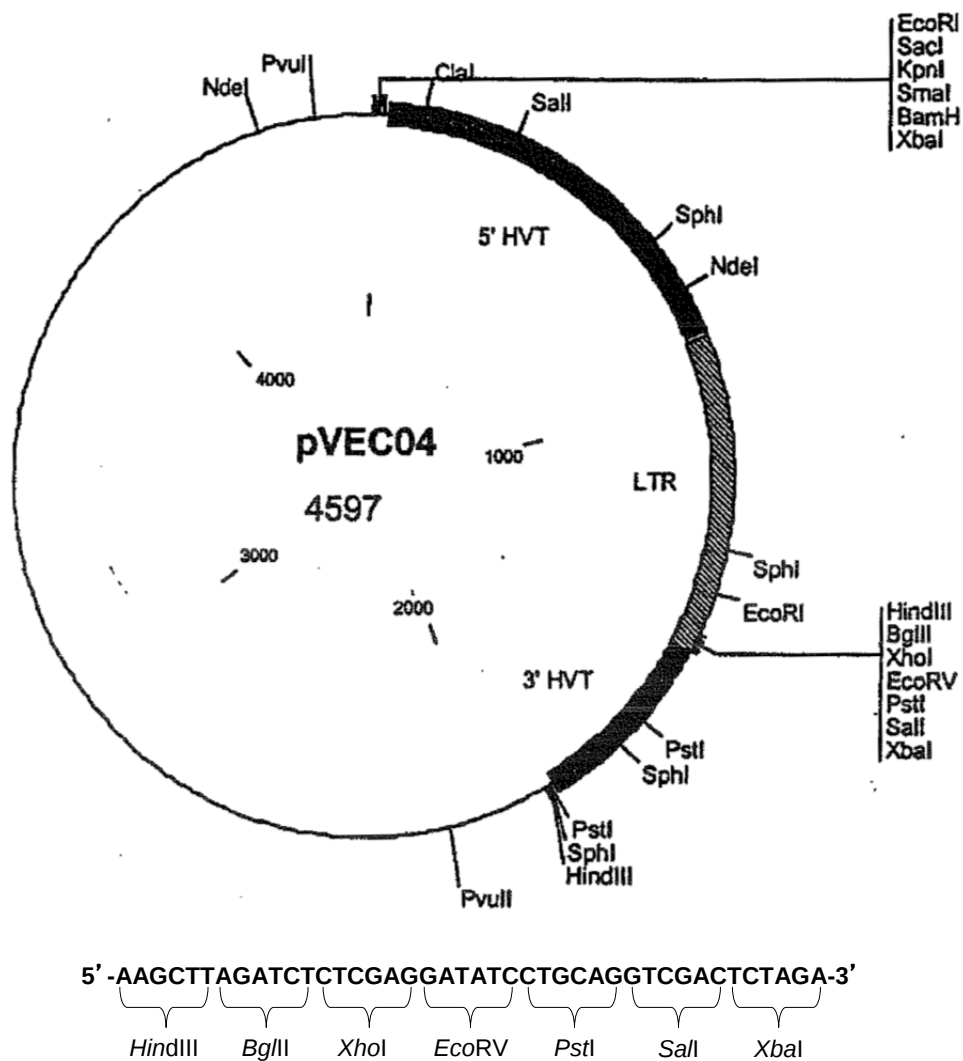


図2 ベクターpVEC04 のマップ及びクローニングサイトの配列

本ベクターは pGEM-3Z (図1) をバックボーンとして構築した。LTR プロモーター配列、LTR の下流側にクローニングサイト、その両側に HVT 由来の配列を有している。LTR 下流側のクローニングサイトで、ユニークな制限酵素サイトとして利用できるのは *Bgl*II、*Xho*I 及び *Eco*RV の3種類である。HVT 相同配列の5'側の制限酵素サイトは pGEM-3Z 由来の配列。

ニューカッスル病ウイルスの F 蛋白質遺伝子のクローニングには、*Bgl*II のサイトを用いた。

HTV 相同配列及び LTR の配列は、F 蛋白質遺伝子の配列とともに別添9に示した。

本ベクターに F 蛋白質遺伝子を導入したものが、pNDV04 (図7) となった。

資料 2. 審査データの概要

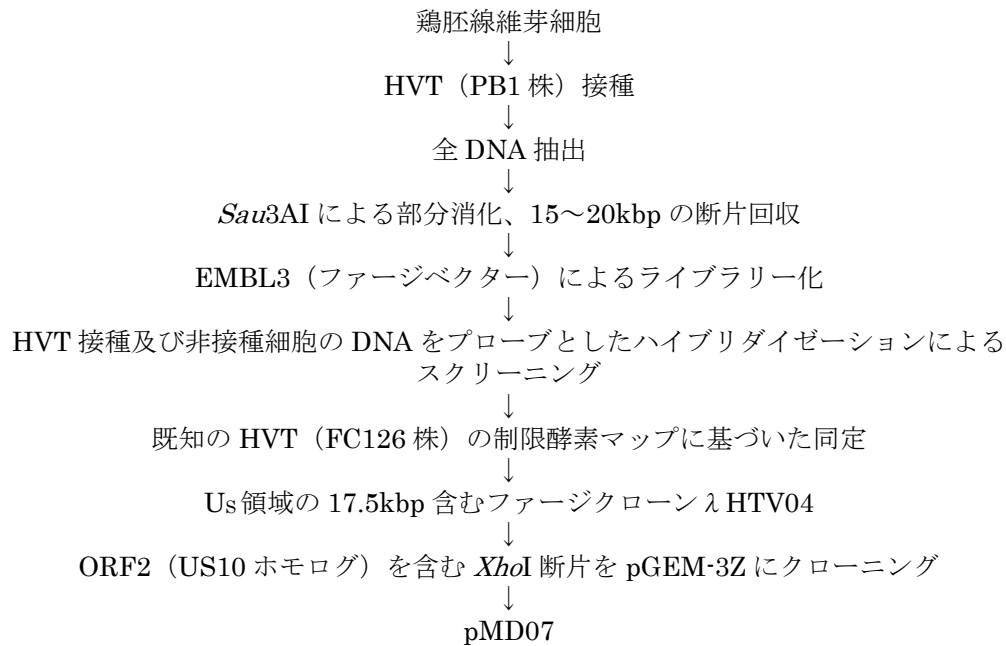


図 3 HVT 相同配列のクローニング手順

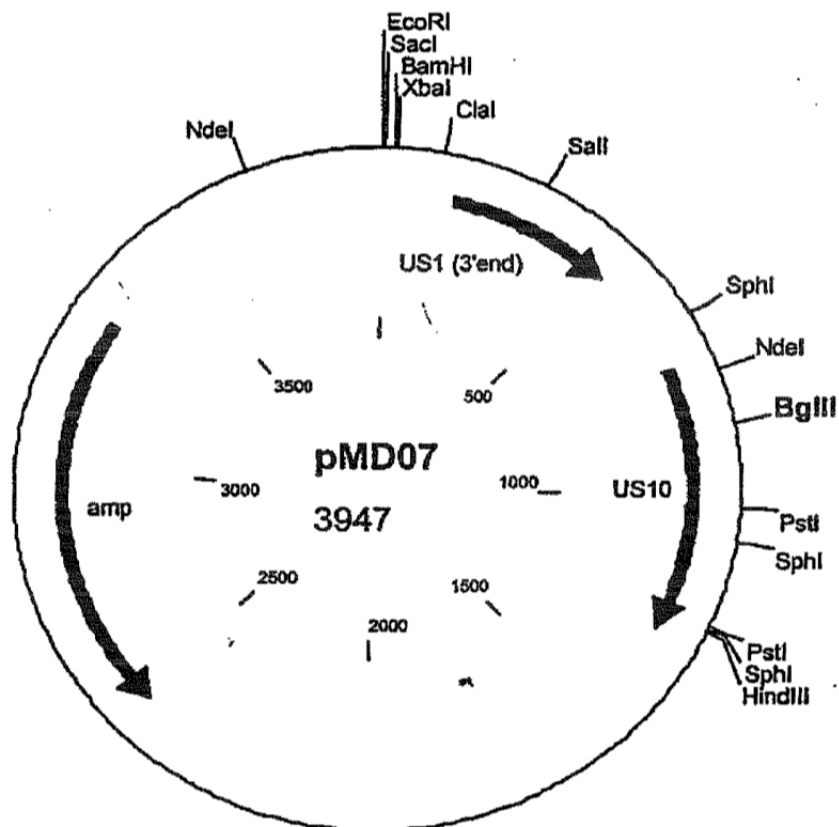


図 4 pMD07 のマップ

pMD07 は、pGEM-3Z に HVT の配列 (US 領域の ORF2 (US10 ホモログ) を含む領域) の断片をクローニングしたもの。US10 配列中の *BglII* サイトに LTR 配列と新たなクローニングサイトを挿入して pVEC04 を構築した (図 5)。

資料 2. 審査データの概要

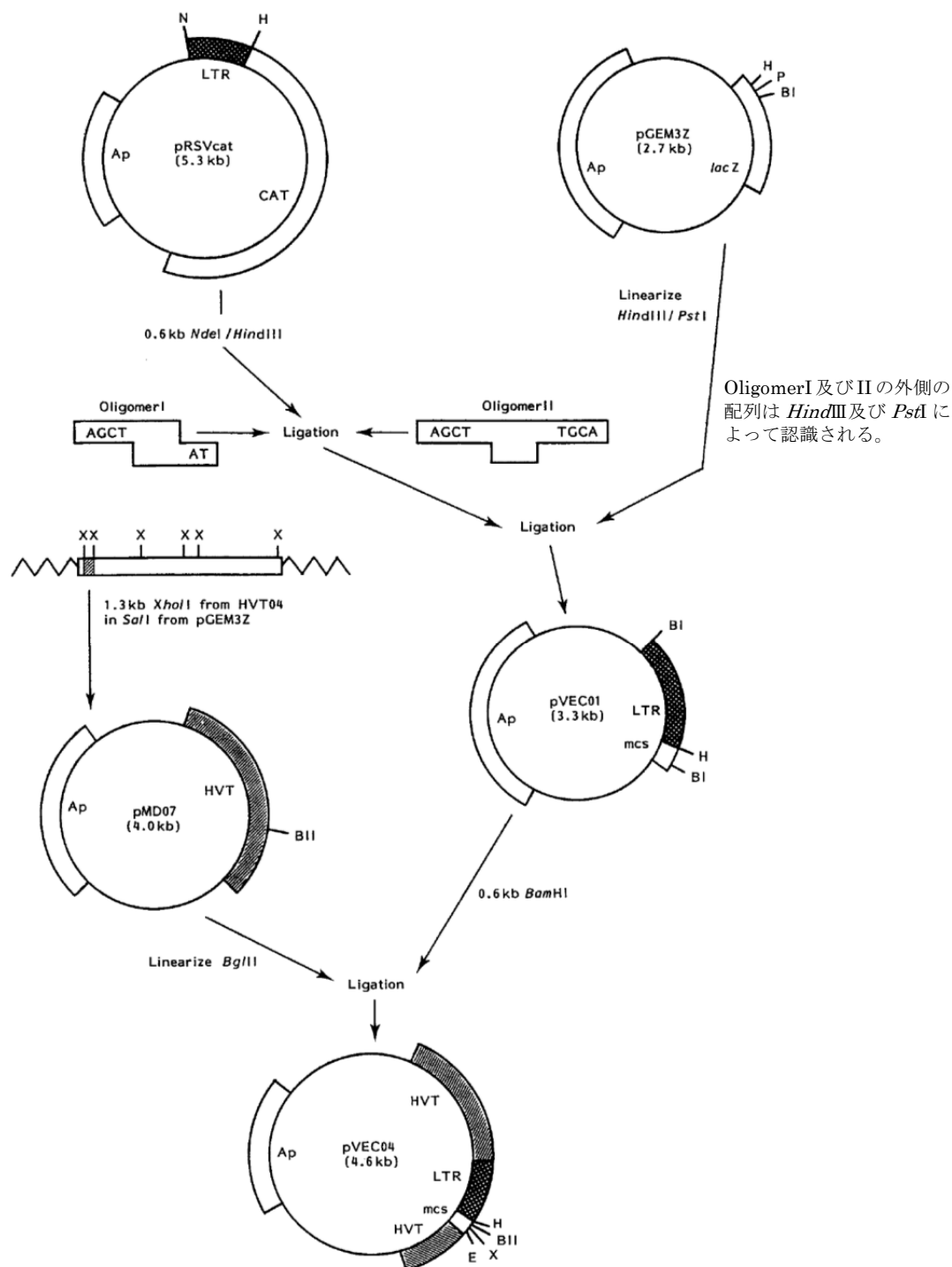


図5 クローニングベクターpVEC04の構築手順

pVEC04は3つのクローニング用制限酵素サイトを持ったHVT組換え用ベクターである。OligomerIは、*BamHI*配列を含んでおり、pVEC01のLTRの上流に*BamHI*サイトを作るのに用いた。OligomerIIは、*BglII*、*XhoI*及び*EcoRV*の配列を含んでおり、最終的なプラスミドpVEC04において、それぞれ唯一の配列となる。LTRプロモーターは右回り向きに位置しており、クローニングサイトとして*BglII*、*XhoI*及び*EcoRV*サイト、5'側と3'側にそれぞれ800bpと400bpのHVT配列が隣接している。

略号 Ap: アンピシリン耐性マーカー、BI: *BamHI*、BII: *BglII*、E: *EcoRV*、H: *HindIII*、N: *NdeI*、P: *PstI*、X: *XhoI*、mcs: マルチクローニングサイト、CAT: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ

資料 2. 審査データの概要

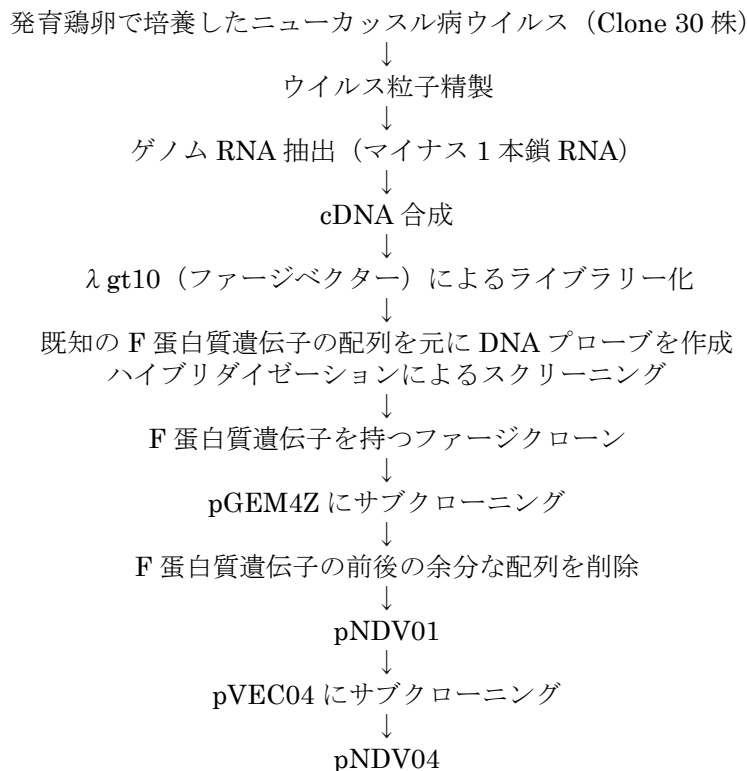


図 6 ニューカッスル病ウイルスの F 蛋白質遺伝子のクローニング手順

pNDV01 の挿入断片を *Bam*HI で切り出し、pVEC04 (図 2) の *Bgl*II サイトにサブクローニングして pNDV04 (図 7) を作成した (*Bam*HI と *Bgl*II のライゲーションにより、*Bgl*II の制限酵素サイトは失われている)。

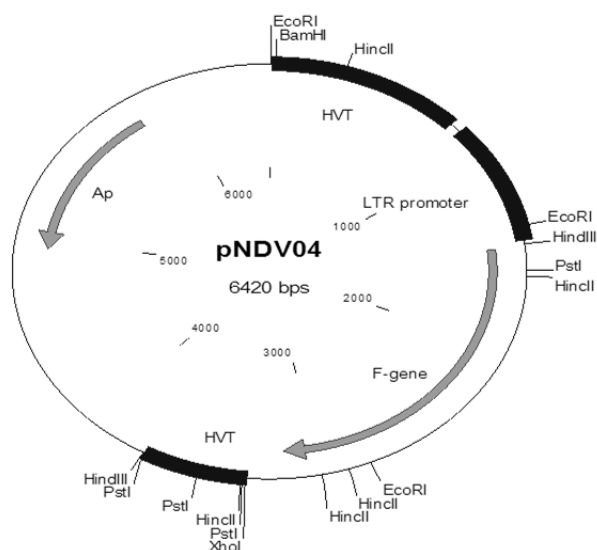


図 7 供与核酸を含むプラスミッド pNDV04 の全体構成と制限酵素サイト

- F-gene : ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子
- LTRpromoter : ラウス肉腫ウイルス由来の LTR プロモーター
- HVT : 相同組替えに使用した七面鳥ヘルペスウイルス相同配列
(Us 領域の ORF2(US10 ホモログ)の一部)
- Ap: アンピシリン耐性遺伝子

資料 2. 審査データの概要

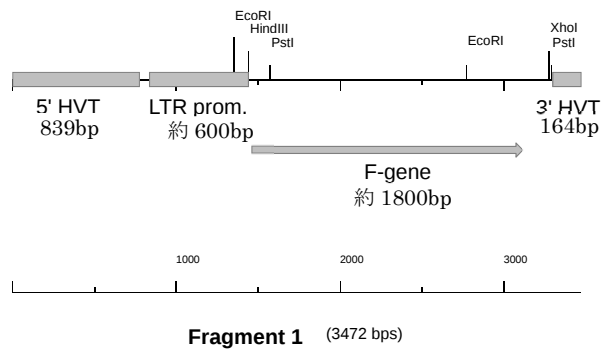


図 8 相同組換えに用いた供与核酸

相同組換えには図 7 のプラスミドを直鎖状にして用いた。

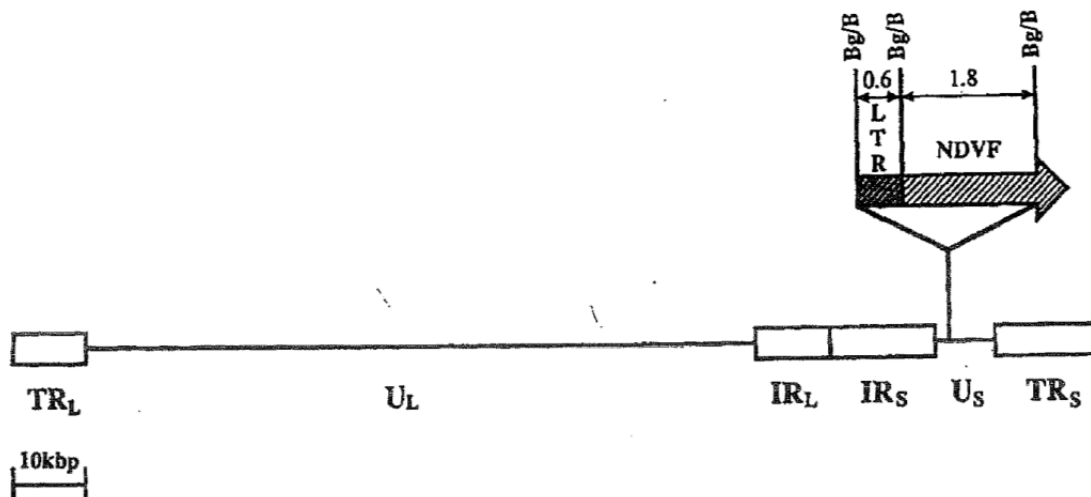


図 9 組換え体における供与核酸の挿入部位

組換え体のゲノムを模式的に示した。
 LTR：ラウス肉腫ウイルス由来 LTR プロモーター
 NDVF：ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子
 U_L：U_L 領域（ユニークロング）
 U_S：U_S 領域（ユニークショート）
 TR_L：U_L 側の末端反復配列
 TR_S：U_S 側の末端反復配列
 IR_L：U_L 側の逆向き反復配列
 IR_S：U_S 側の逆向き反復配列

資料 2. 審査データの概要

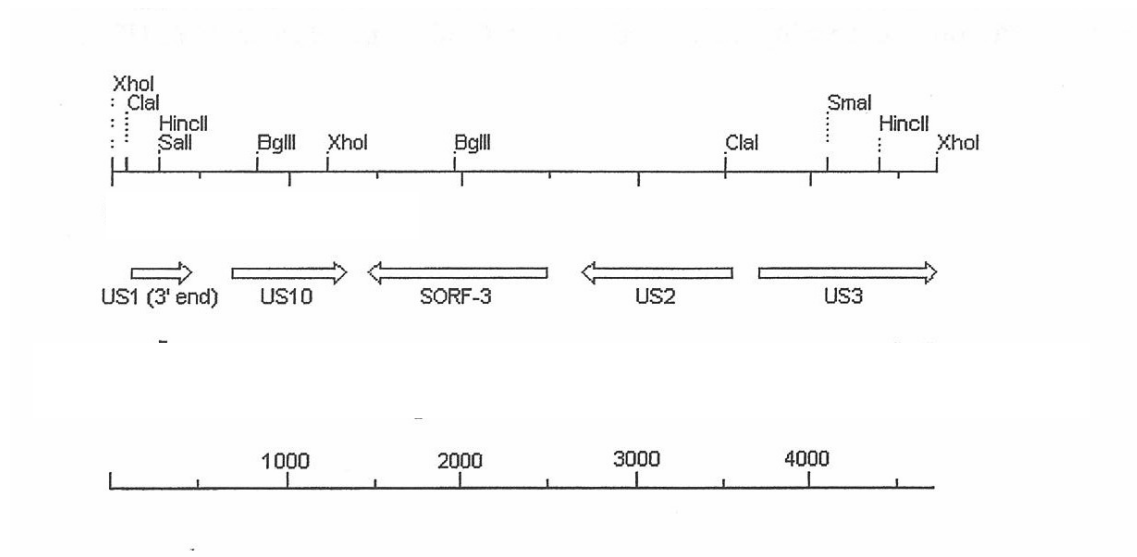


図 10. 供与核酸挿入部位付近の制限酵素地図

HVT の *Us* 領域（図 9 の *Us*）付近の制限酵素地図。矢印は ORF とその向きを示す。下段のバーは bp を示す。図は、挿入前の親株（PB1 株）を示したもので、US10 ホモログの *Bgl*II サイトに供与核酸を挿入した。

資料 2. 審査データの概要

```

GAAACCACTTTTTCAGTGACGCTGACATTGTGCAACACGAGGGGTAGCATCTACATACAATATATGTTGATTA 75
M I G E K T M Q L A D H M A N S P S P I W R T P R
ATGATTGGAGAAAAAACTATGCAGCTCGCCGATCATATGGCTAACTCGCCTTCGCCTATATGGCGGACCCCGCG 150
E K S T Y H L I Y N T S N E H V A S L P R S V R P
GAAAAATCGACGTACCATCTGATTACCAACACAGTAATGAACATGTCGCATCCCTGCCAGATCTGTGCGCCCA 225
L A R I V V N A A E T L Q V G M R A G R P P S A G
TTGGCGCTATCGTTTGAATGCCGCCGAAACACTTCAGGTCGGTATGAGAGCCGGGAGGCCGCCATCAGCAGGA 300
V W R E V F D R M M T A F R D Y E P T A T F N A A
GTTTGGCGAGAGGTGTTTGTAGAAATGATGACAGCCTTCGGTGACTACGAGCCTACTGCGACATTTAATGCTGCA 375
D P I R K M V E T V L Q N N E E P P R T H A E M G
GATCCCATTAGAAAAATGGTCGAGACAGTTCTACAGAATAATGAAGAGCCTCCGCGGACGCATGCTGAAATGGGT 450
N R L M N I M Y W C C L G H A G Q C S I W Q L Y E
AATCGCCTTATGAACATTATGATGTTGTTGCTGGGACACGAGGACAATGCTCGATCTGGCAGTTGTACGAG 525
T N Q A I L S L L D E V V I G T T N P F C T L E Q
ACGAATCAGGCCATTAAAGTTTATTAGATGAAGTGGTTATCGGCACAACAAATCCCTTTTGACCCCTCGAGCAA 600
Y W K P L C T A I A N K G T S S L V E D A K V A E
TACTGGAAGCCATTATGCACCGCAATCGCCAACAAGGGGACCTCATCGCTTGTGAGGATGCCAAAGTGGCCGAG 675
Y L V S M R K L I *
TACCTGGTTAGCATGCGCAAATTGATATAACACAGGCACGCTCTGATGTTACAGACCACAATACCGCATACATT 750
ATTGTAAGGTTGTTAATAAAGGTTTATTCTATGTAAGACTACAATACTTTTGACATTGCTTGTATACATATTA 825
TACTTTCTCAAGTTCCTATTACATAAAATGGGATCTATCATTACATTGCTTAAGAGTCTGGATAATTTTACTGTT 900
* M F H S R D N C E N L T Q I I K S N
TGCCAGCTTCGATCTTGGAACTGCTGTGGATAGTGCCCTTACTTGGAAATCGTGAAAATTTGAAGCGTTTATT 975
A L K S R P V Y Q P Y H R V Q F R S F K F R E N N
TGGATATCTTCGGTTGTGCCATCCCGCCCTGGTACCGCTCGGATACCTTGCCCGTATGGATTGCTATTGACA 1050
P Y R G T T G Y G A R T G S P Y R A R I S E Y Q C
GTCGCGCAATTGGGGACCAACAACGCGTGGGTCCACACTCATTGCGAAATTTTCCGATGATTCTGAATATTTATT 1125
D R L Q P G V V R P D V S M R F N E S S E S Y K N
GCCGCTCGTTACGAGTGTGTTGACATATCTGTAATACAGTTCTTCTTGAAGGATCGTGACATTTGATCTAT 1200
G S T V L Q Q V Y R Y Y L E E E S P D S C M Q D I
ACATTGGCCAGGATGTTCAAGTCTCAGATGTTGCATTCTGGCACAGCACAACTTTATGGCATTTCGACGTAATC 1275
C Q G P H E L R L H Q M R A C C L K I A N G V Y D
GTCCGGCAGCCCTGGGAGTTCTATATTCGCATATGGGATGGTAAGGACAATAGCAGATCTCGCAACCTCCAG 1350
D P L G P P T R Y E C I P I T L V I A S R A V E L
GGAGGCTATAATAACGTTTTTAAAGGATGGACTTCTCATAAAATCTGTGCAAATTACACTGAGAATATCCTTT 1425
S A I I V N K F S P S R M F I Q R L N C Q S Y G K
ACTAGCGCGATTGAGAGCATCGTCGTCCAATTTTCTAAATGGAAGAAAAACAAGGCGGGCAAGAGTGTTCAAA 1500
S A G I S L M T T W N E L H F S F L A P L L T G F
CATTTTCATTTTCGACGAATCTCTCAAATCCCATGGCGTGCAATTGATTGCAAAATGGCACTTCCGTTACGTT 1575
M K M K S S D R L D W P T C N I A F N A S G N V N
TGTATCTCCAACTCTAAGATACTTTTAAATGAAAACTACGTTCTAGTGTGGAAGAAACCTATAGGCAGACCA 1650
T D G F E L I S K I S F S R E L T S L F R Y A S W
TAGAACTATTTGACACCACATATCTTTTGTATGTCAAACGACCATGATCGCATGTTGCTGAATGCACTAGGGC 1725
L V I Q C W M D K Q I D F Q G H D C T A S H V L A
AATTCGCTCGCGCGATCCATACATTGAATAATCCACACGTCAGCTCATCTGTTAGCAAGGTCCAGTAGTTGAA 1800
I R E R S E M C Q I I G C T L E D T L L T W Y N F
GTCATTTATTTTCCCGCGGCTGGCCAAATCTACCTCTGGGAATATCCAAGTTGTGCAATATGATCGCACCGGC 1875
D N I K G R P Q G F R G R P I D L N D F I I A G A
TCTGGTCATGGTGAAGGAATTTGTAGCATAAAGACGAGGTATCATAGGGGTAATATTTTATTCACTCACATG 1950
R T M
CAAAAAGTAACGCATATTAGCACCATGTATGGGCCATCAATTGACATTTCGCTAGCACTACATCACGATTATGTA 2025

```

図 11 供与核酸挿入部位の塩基配列 (HVT のユニークショートリージョンの ORF2 及び ORF3 を含む部分)

ORF2 (US10 ホモログ) は塩基番号 76 番から 702 番の間にある。ORF3 は塩基番号 1884 番から 846 番にかけて逆向きに走っている。β ガラクトシターゼ発現カセットを用いたインビボ組換えによって、HVT ゲノムのこの領域に外来遺伝が挿入可能であることが示された。2 つの *Bgl*II 制限酵素サイト (2 重下線) が、マーカー遺伝子が挿入された部位である。最終的には、ORF2 中の *Bgl*II 制限酵素サイトをニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子の挿入部位として用いた。

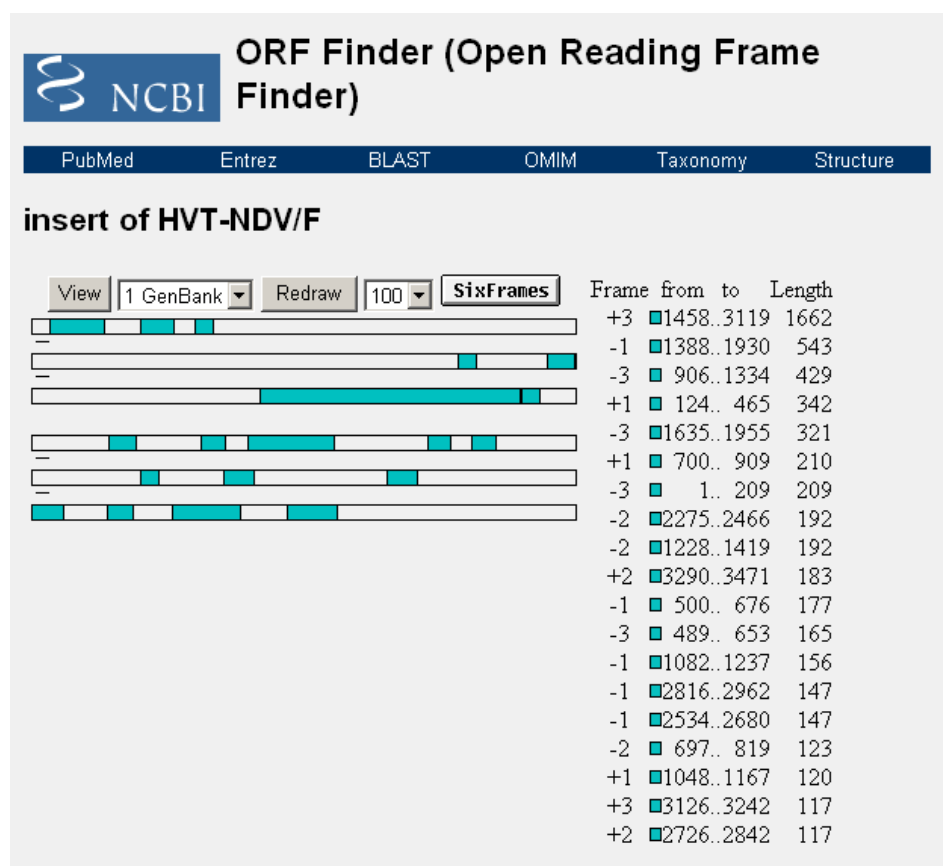


図 12 組換えに使用した供与核酸のオープンリーディングフレームの検索結果

組換えに使用した供与核酸（3472bp、別添 9）について、米国立バイオテクノロジーインフォメーションセンターが公開している解析ツール（ORF Finder）を用いてオープンリーディングフレームの検索を行った。

相補鎖を含めた 6 つの読み枠について、開始コドンから終止コドンまで 100 アミノ酸以上の領域（ORF）について、緑色で示されている。右側の数値は、発見された ORF を長い順に、読み枠、開始位置、終止位置及び長さを示している。

目的の遺伝子は、一番長い ORF（1458～3119）として検索された。その他に、117 から 543bp の短い ORF が 18 箇所検索された。

別添 11 HVT-NDV/F 株の遺伝子型及び表現型の安定性（海外試験）

目的：

HVT-NDV/F 株の遺伝子型及び表現型の安定性を確認する。

この目的のために製造用原株（以下 MSV）を鶏で 5 代継代し、病原性復帰の確認を行った。又鶏胚培養細胞を用いて 11 代継代をした後に、サザンブロットにより遺伝子型の安定性、並びに蛍光染色により F 蛋白質発現の安定性を確認した。

方法：

鶏による継代：

1 日齢の SPF 鶏 20 羽に MSV を皮下接種し 14 日間観察した。観察終了時に採血及び剖検を行い、血液から白血球を分離してプールし、鶏胚初代培養細胞に接種してウイルスの存在を確認した。継代には白血球を用い、2～4 代目まで初代と同様に継代した。5 代目では、55 羽の鶏を用いて 14 日目に 20 羽を採血及び剖検するとともに、残りの鶏を接種後 8 週間目まで飼育し、マレック病の症状を観察した。

細胞による継代：

MSV を鶏胚初代培養細胞を用いて 11 代継代し、サザンブロット及び蛍光染色に供試した。

サザンブロット：

ウイルス DNA を制限酵素 *Xho*I で消化し、1.5%アガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。PB1 株の挿入部位に隣接する 1.2kb の断片を放射性リン酸 (32 P) でラベルし、プローブとして用いた。検出は X 線フィルムに感光した。予想されるバンドサイズは、PB1 株では 1.2bp、HVT-NDV/F 株では、0.4 及び 3.3kb となる。（図 1、図 2）

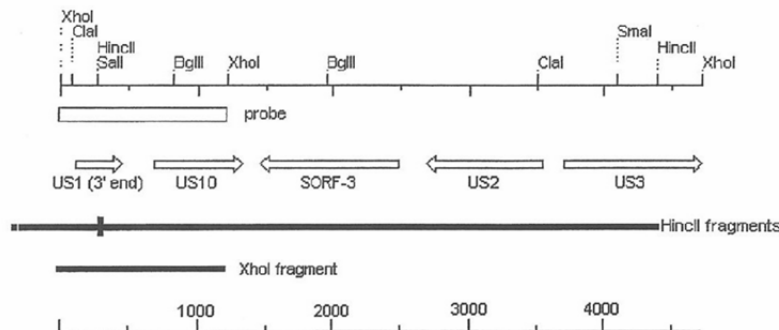


図 1 PB1 株の制限酵素地図

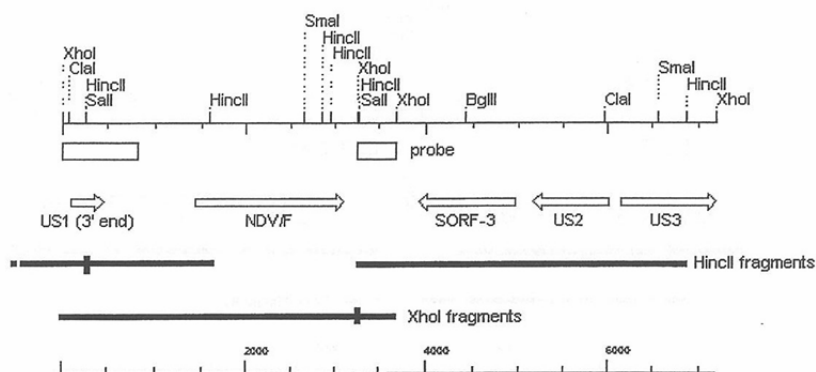


図 2 HVT-NDV/F 株の制限酵素地図

資料 2. 審査データの概要

間接蛍光抗体法：

HVT-NDV/F 株の MSV、鶏で 5 代継代したウイルス、細胞で 11 代継代したウイルス、及び PB1 株を鶏胚 2 代継代細胞に接種し、5 日間培養し、70%アセトンで固定した。ウイルス感染細胞を F 蛋白質特異的モノクローナル抗体 (Mab-57) 又は HVT 特異的モノクローナル抗体 (L78.2) を用いた間接蛍光抗体法により染色し、ブラック数を計測した。

結果：

鶏による継代：

継代 3 代目に試験鶏の 2 羽が死亡した。検死の結果、尻突きによる死亡であった。各継代において回収した血液からは、100%ウイルスが分離された。5 代目の継代で 8 週齢まで飼育した鶏を剖検した結果、マレック病の病変は認められなかった。

サザンブロット：

鶏で 5 代継代したウイルスは、ウイルス量が少なかったため、細胞で 4 回継代して増殖したものをを用いた。3.3kb と 0.4kb のバンドは、マスターシード、11 代継代ウイルス及び鶏で 5 代継代したウイルスに認められたが、PB1 株には認められなかった(成績は社外秘のため非公開)。

間接蛍光抗体法：

鶏で 5 代継代したウイルス及び細胞で 11 代継代したウイルスについて F 蛋白質の発現が確認された (表 1、表 2)。

表 1 鶏で 5 代継代した HVT-NDV/F 株の F 蛋白質発現

ウイルス	平均ブラック数	
	F-57 (αF 蛋白質)	L78.2 (αHVT)
鶏 5 代継代ウイルス	138.6	142.2
PB1 株	0	45.2

表 2 鶏胚初代培養細胞で 11 代継代した HVT-NDV/F 株の F 蛋白質発現

ウイルス	感染価 (PFU/mL)	
	F-57 (αF 蛋白質)	L78.2 (αHVT)
製造用原株 (MSV)	699,300	649,450
11 代継代ウイルス	5,483,400	6,060,600
PB1 株	0	517200

考察及び結論：

MSV、11 代継代ウイルス及び鶏による 5 代継代ウイルスは、挿入したニューカッスル病ウイルスの F 蛋白質を発現していることが確認された。また、MSV、11 代継代ウイルス及び鶏による 5 代継代ウイルスは、遺伝子が失われたりあるいはゲノムの再配列が起きたりすることなく、挿入したニューカッスル病ウイルスの F 蛋白質遺伝子が安定であることが確認された。HVT-NDV/F の MSV は、ニューカッスル病ウイルスの挿入遺伝子を保持し続け、鶏で 5 代継代しても病原性が復帰することはない。

別添 12 HVT-NDV/F 株のシーケンスによる遺伝子型の安定性（海外試験）

目的：

HVT-NDV/F 株の遺伝的安定性を塩基配列によって検討する。

方法：

製造用原株（以下 MSV）、5 代継代ウイルス及び 11 代継代ウイルス（鶏胚初代培養細胞による継代）について、挿入遺伝子と隣接領域を PCR により増幅し、増幅産物の塩基配列をダイターミネーターサイクルシーケンス法によって決定した。増幅及びシーケンスに使用したプライマーは社外秘のため非公開。

結果：

各継代レベルの塩基配列は、オーバーラップする断片配列を整列して作成した。続いて、各継代レベルの塩基配列を整列し、塩基の変換があるか比較した。比較の結果、解析した領域は、3 つの継代レベルですべて同じであった（成績は社外秘のため非公開）。

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株は MSV から 11 代継代する間、遺伝的に安定である。

別添 13 HVT-NDV/F 株の鶏による継代後の遺伝子型の安定性（海外試験）

目的：

HVT-NDV/F 株を鶏で継代した場合の遺伝子型の安定性を検討する。

方法：

ウイルス：

製造用原株から 1 代継代したウイルス（以下 MSV+1）を鶏で 8 回継代し、鶏胚初代培養細胞を用いて再分離し、ブラック純化を行ったウイルス 3 株（サンプル 2、7 及び 19）を供試した。対照として製造用原株から 2 代継代したウイルス（以下 MSV+2）を供試した。

サザンブロット：

ウイルスを感染させた鶏胚初代培養細胞から全 DNA を抽出した。DNA を *HincII* 又は *XhoI* で消化し、0.8%アガロースゲルで泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。HVT のゲノムの挿入部位に隣接する 1.2kb の断片を放射性リン酸 (^{32}P) でラベルし、プローブとして用いた。検出は X 線フィルムに感光した。予想されるバンドサイズは、*HincII* 消化では 0.8、1.3 及び 3.5kb、*XhoI* 消化では、0.4 及び 3.3kb となる。制限酵素地図については、別添 11 の図 2 参照。

結果：

サンプル 2 と 7 は、MSV+2 と同じバンドパターンを示した。サンプル 19 はウイルスの増殖が確認できず、バンドが観察されなかった（成績は社外秘のため非公開）。

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株の遺伝子型は、鶏で継代しても安定である。

別添 14 HVT-NDV/F 株の F 蛋白質の発現確認（海外試験）

目的：

HVT-NDV/F 株が発現する F 蛋白質の正確な分子量を確認する。同時に、蛋白質としての発現の安定性を確認する。

方法：

HVT-NDV/F 株の製造用原株(以下 MSV)、MSV から 5 代継代したウイルス(以下 MSV+5) を供試した。陽性対照としてニューカッスル病ウイルス(以下 NDV) を感染させた鶏腎細胞、並びに陰性対象として HVT のマスターシードウイルス (FC126 株) も用いた。

細胞の溶解及び免疫沈降は、Sieve X Immunoprecipitation Kit (Pierce) の説明書に従って行った。免疫沈降には、F 蛋白質特異的モノクローナル抗体 (57NDV-INT) を用いた。

沈降した蛋白質は、ポリアクリルアミドゲルで泳動しクマシー染色を施して可視化した。

結果：

MSV 及び MSV+5 のサンプルには、NDV 感染細胞から沈降したバンドと同様なサイズの約 60kDa 付近にバンドが認められたが、HVT のサンプルには認められなかった。(成績は社外秘のため非公開)。

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株は、NDV と同じ分子量の F 蛋白質を発現していた。F 蛋白質の分子量はマスターシードから 5 代継代しても変化しなかった。

別添 15 HVT-NDV/F 株の皮下接種における免疫原性（海外試験）**目的：**

HVT-NDV/F 株を 1 日齢鶏の皮下に接種した場合の有効性を確認する。この目的のために製造に使用する最多の継代数の試作ワクチン（製造用原株から 11 代目）で試験を行った。

方法：

ウイルス含有量の異なる 2 種類の試作ワクチンを製造し、接種時に鶏胚 2 代培養細胞及び HVT と F のモノクローナル抗体を用いて感染価を測定した。1 日齢の SPF 鶏 206 羽を表 1 の様に群分けし、試作ワクチン 0.2mL を頸部皮下に接種した。試験鶏は翼帯で個体識別をし、アイソレーターケージで飼育した（表 1）。

5 日齢時に強毒マレック病ウイルス GA5 株を腹腔内に攻撃し、49 日齢まで臨床観察を行った。途中で死亡したものはすべて剖検し、マレック病の病変を観察した。試験終了時にすべての鶏を剖検し、マレック病の病変を観察した。

28 日齢時に、強毒ニューカッスル病ウイルス Texas BG 株を筋肉内に攻撃し、2 週間観察を行った。

表 1 群分け

群	処置	マレック病 攻撃羽数	ニューカッスル病 攻撃羽数
1	試作ワクチン 1	35	32
2	試作ワクチン 2	35	32
3	攻撃対照	35	12
4	非攻撃対照	25	-

結果：

マレック病ウイルスの攻撃に対して 89 及び 97%の防御率が得られた。ニューカッスル病ウイルスの攻撃に対しては 97 及び 100%の防御が得られた。

考察及び結論：

2 種類の試作ワクチンは、何れも連邦規則第 9 条に定める有効性の条件（マレック病防御率 80%以上、ニューカッスル病防御率 90%以上）を満たした。1 日齢の鶏に皮下接種する場合、試作ワクチン 1 以上のウイルス量があればマレック病及びニューカッスル病に対して有効である。

別添 16 Innovax ND のマーカー試験

目的：

鶏用生ワクチン Innovax ND は七面鳥ヘルペスウイルスにニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子を導入した HVT-NDV/F 株を有効成分とする。HVT-NDV/F 株の製造用原株（以下 MSV）、作出に使用した PB1 株及びワクチンの製品 3 バッチをニューカッスル病ウイルス F 蛋白質特異的モノクローナル抗体を用いて染色し、F 蛋白質検出の特異性と感度を検討する。

方法：

特異性の検討：

鶏胚 2 代培養細胞を 8 穴チャンバースライドに播種し、MSV、PB1 株又はワクチンを 1 穴当たり 100PFU となるように接種し、5%CO₂ 存在下 37℃ で 2～5 日間培養した。CPE を確認後、細胞を 70%アセトンで固定し、抗 F 蛋白質モノクローナル抗体（57NDV-INT）及び FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

感度の検討：

ワクチンのアンプル 1 本を溶解用液 1 バッグに溶解したものをワクチン液とした（0.2 mL 当たり 1 羽分）。ワクチン液を細胞維持用培地で希釈し 0.1mL 当たり 1/25 羽分となるように調整し試料とした。試料を更に 2 倍階段希釈し、1/25～1/1,600 希釈の試料を作成した。各試料を特異性試験と同様にチャンバースライドに接種し蛍光染色した。試験に使用したワクチン液のウイルス含有量は、鶏胚初代培養細胞を用いたブラック法により測定した。

結果：

特異性の検討：

HVT-NDV/F 株及びワクチン接種した細胞は、特異蛍光を認めた（表 1、写真 1、写真 2）。一方、PB1 株を接種した細胞及び非接種細胞では特異蛍光は認められなかった（表 1、写真 3、写真 4、写真 5、写真 6）。

表 1 抗 F 蛋白質モノクローナル抗体の蛍光染色結果

接種材料	特異蛍光
HVT-NDV/F 株（製造用株）	+
PB1 株（親株）	—
非接種細胞	—
Innovax ND Batch 91790025	+
Innovax ND Batch 91790030	+
Innovax ND Batch 91790031	+

＋：陽性 —：陰性

感度の検討：

ワクチン液は 400 倍に希釈しても特異蛍光を検出することができた（表 2）。その時の、測定されたウイルス感染価は、11.3PFU であった。

表 2 検出感度の検討

ワクチン液の希釈率 (ドース/0.1mL)	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	非接種
計算上のウイルス感染価 (PFU/well)	245	125	62.4	31.2	15.6	7.8	3.9	0
測定されたウイルス感染価 (PFU/well)	180	90.3	45.1	22.5	11.3	5.6	2.8	
特異蛍光	+	+	+	+	+	—	—	—

資料 2. 審査データの概要

考察及び結論：

本試験で実施した染色方法は、F 蛋白質を特異的に染色していることが確認された。本染色方法によりワクチン株と他の HVT の株を識別が可能と考えられた。

本染色方法の検出感度は、接種量 0.1mL 当たり 11.3 PFU であった。検体 0.1mL 当たり 12 PFU 以上のワクチンウイルスが含まれているとき、本染色方法により検出可能であると考えられた。

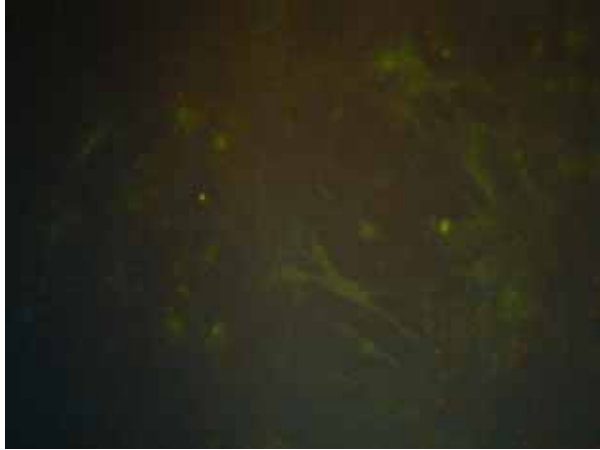


写真 1 HVT-NDV/F 株接種細胞の 57NDV-INT 染色
特異蛍光を認める

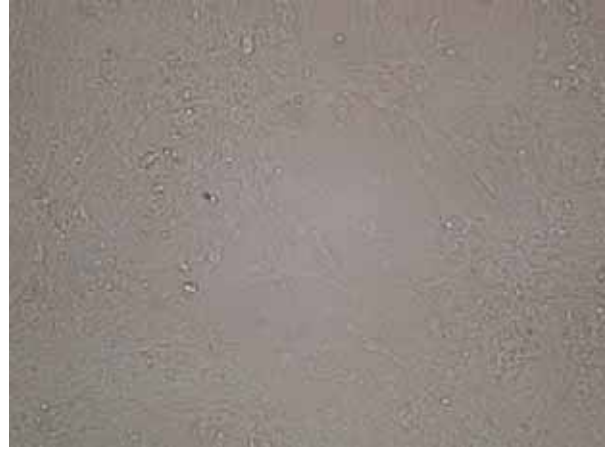


写真 2 HVT-NDV/F 株接種細胞の可視光撮影
HVT の CPE を認める



写真 3 PB1 株接種細胞の 57NDV-INT 染色
特異蛍光を認めない



写真 4 PB1 株接種細胞の可視光撮影
HVT の CPE を認める



写真 5 非接種細胞の 57NDV-INT 染色
特異蛍光を認めない



写真 6 非接種細胞の可視光撮影
CPE を認めない

別添 17 HVT-NDV/F 株の安全性と水平感染（海外試験）

目的：

HVT-NDV/F 株の製造用原株（以下 MSV）の安全性を確認する。同時に水平感染についても確認する。

方法：

18 日齢発育鶏卵を表 1 の様に群分けし、A 群には 10 羽分/0.2mL の MSV、D 群には溶解用液 0.2mL を接種し、その他の群は非接種として孵化率を観察した。

孵化後に B 群は A 群と同居飼育し、120 日齢まで観察した。C 群は 1 日齢時に超強毒マレック病ウイルス（RB1B 株）で攻撃し、50 日齢まで観察を行った。

6 週齢時に、A 群と B 群から各 20 羽ずつ採血し、ウイルス分離を行った。血液から白血球を分離し、鶏胚 2 代継代細胞に接種して 5%CO₂ 存在下 37℃で 5 日間培養し、CPE の観察を行った。

観察期間終了時に体重を測定して剖検し、マレック病の病変を確認した。

表 1 群分け

群	処置	入卵数	育成数
A	発育鶏卵 18 日齢時に MSV 接種	70	60
B	孵化後に A 群と同居飼育	40	30
C	1 日齢時に超強毒 MDV 攻撃	66	56
D	対照（溶解用液で疑似接種）	60	60

結果：

MSV を接種した A 群に孵化率及び生存率に異常は認められず、120 日齢の剖検時にマレック病の病変は認められなかった（成績は社外秘のため非公開）。強毒 MDV で攻撃した C 群は 50 日齢までにすべてマレック病の病変を示した。対照の D 群ではマレック病の症状や病変は認められなかった。

MSV を接種した A 群と対照の D 群の体重に有意差は認められなかった。雌雄別に解析した場合にも、A 群と D 群の体重に有意差は認められなかった（成績は社外秘のため非公開）。

MSV を接種した A 群からは検査したすべての個体からウイルスが回収されたが、同居飼育していた B 群からは回収されなかった（表 2）。

表 2 接種群及び同居飼育群のウイルス分離結果

群	ウイルス分離結果
A (MSV 接種)	20/20 ¹⁾
B (A 群と同居飼育)	0/20

1) 陽性数/検査数

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株の MSV の 10 用量を発育鶏卵に接種しても孵化率及び生存率に影響はなく、病変も認められなかった。また、HVT-NDV/F 株は、水平感染しなかった。

別添 18 供与核酸にコードされるアミノ酸のアレルゲンデータベース検索結果

目的：

供与核酸にコードされているアミノ酸が有害物質を産生する可能性について検討するためアレルゲンデータベースの検索を行う。

方法：

供与核酸（社外秘のため非公開）の 6 つの読み枠から予想されるアミノ酸配列をアレルゲンデータベース ADFS (<http://allergen.nih.gov/ADFS/index.jsp>) で検索した。

結果：

6 つの読み枠のうち、3 つ目の読み枠にサザエ由来のアレルゲン物質トロポミオシンが検索された。44 残基中に 27%の一致性が認められ、連続して一致する残基は 3 残基以下であった。このほかにアレルゲン性が疑われる蛋白質は検索されなかった。

考察：

FAO/WHO の方法では、既知のアレルゲン蛋白質に対してアミノ酸 80 残基について 35%以上の一致、又はアミノ酸 6～8 残基連続で一致した場合にアレルゲン陽性としている。従って、供与核酸には、既知のアレルゲン蛋白質と類似した蛋白質は含まれていない。

別添 19 HVT-NDV/F 株の免疫持続

目的：

Innovax ND の接種後 2 年目までのワクチンウイルスの感染持続及び抗体持続を検討する。

方法：

18 日齢発育鶏卵 30 個の卵内及び 1 日齢鶏 15 羽の頸部皮下にワクチン 1 羽分を接種し、各群から 5 羽を育成して、104 週齢まで飼育した（表 1）。接種後 28、40、60、80 及び 104 週目に採血を行い、抗体検査及びウイルス検査を行った。抗体検査は、HVT の FA 抗体と F 蛋白質の ELISA 抗体について検査した。ウイルス検査は白血球を分離して、鶏胚初代培養細胞に接種するとともに、白血球から DNA を抽出し HVT の PCR を行った。PCR は、Islam らの方法を参考とし Sorf1 を増幅した。

表 1 群分け

群	接種材料	接種量	ウイルス量	供試数
卵内接種	ワクチン 1 羽分	0.05mL	10 ³ PFU/個	30 個
皮下接種	ワクチン 1 羽分	0.2mL	10 ³ PFU/羽	15 羽

卵内接種群は孵化後 15 羽を飼育した。7 週齢時に選別を行い、各群 5 羽を育成した。

結果：

接種後 60 週まですべての個体で、PCR 及びウイルス分離が陽性であった。接種後 80 週目及び 104 週目では、PCR 陰性が 3 羽及びウイルス分離陰性が 1 羽認められたが、個体別では PCR 又はウイルス分離のどちらか一方は陽性であり、すべての個体からワクチンウイルスの回収が確認された。F 蛋白質 ELISA 抗体及び FA 抗体は、いずれも接種後 28～104 週目まで、すべての個体で陽性であった（表 2）。

表 2 検査結果

群	検査項目	接種後週数				
		28	40	60	80	104
卵内接種	PCR	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5
	ウイルス分離	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	F 蛋白質 ELISA 抗体	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	MD-FA 抗体	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
皮下接種	PCR	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
	ウイルス分離	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5
	F 蛋白質 ELISA 抗体	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	MD-FA 抗体	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

1) PCR は 1 検体当たり 2 反応行い、一方が陽性となった検体は陽性と判定した。

2) ウイルス分離は、盲継代を 2 回行い判定した。

3) F 蛋白質 ELISA 抗体は、吸光係数 80%未満を示す数/供試数で示した。

4) FA 抗体価は、40 倍以上を示す数/供試数を示した。

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株の感染は、接種後 104 週まで続くことを確認した。

参考文献：

Islam, A. *et al.* 2004. Differential amplification and quantification of Marek's disease virus using real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 119, 103-113

別添 20 HVT-NDV/F 株のストレス下での排泄の検討**目的：**

HVT-NDV/F 株は、鶏において同居飼育した群の一部に水平感染を起こすため（別添 3）、体外への排泄があるものと考えられる。絶食により強制換羽を模したストレスを鶏に与えた場合にフケ及び羽包から感染性のあるウイルスが排泄されるか検討する。

方法：

HVT-NDV/F 株を製造用株とするワクチンの 1 羽分を 18 日発育鶏卵又は 1 日齢鶏の頸部皮下に接種し、10 週齢まで飼育した。排泄のある陽性対照として CVI988 株（マレック病ウイルス 1 型）のワクチンを接種する群も用意した（表 1）。ストレス付加の前後に羽包およびフケを採取し、ウイルス検査を行った。ウイルス検査は、群ごとに材料をプールし、Islam らの方法を用いた PCR と鶏胚初代培養細胞を用いたウイルス分離により行った。ストレス付加は、9 週齢から 1 週間の絶食により行った。ただし餓死を防ぐため 4 日目に通常の 1/3 程度給餌した。

表 1 群分け

群	注射材料	接種量	ウイルス量	供試数
卵内接種	ワクチン 1 羽分	0.05mL	6,244 PFU/個	30 個
皮下接種	ワクチン 1 羽分	0.2mL	6,244 PFU/羽	10 羽
陽性対照	MD 生ワクチン (CVI) 1 羽分	0.2mL	1,000 PFU 以上/羽	10 羽

卵内接種群は、孵化後に 10 羽を育成した。

結果：

ストレス付加のない状態では、PCR はいずれの群においても羽包及びフケともに陽性となり、ウイルスは陽性対照群から分離されたが、HVT-NDV/F 株を接種した群から分離されなかった。ストレスを付加後にも、HVT-NDV/F 株を接種した群からウイルスは分離されなかった（表 2）。

表 2 ストレス付加前後のウイルス検査結果

ストレス	群	羽包上皮		フケ	
		PCR	ウイルス分離	PCR	ウイルス分離
付加なし (5 週齢)	卵内接種	+	—	+	—
	皮下接種	+	—	+	—
	陽性対照	+	+	+	+
付加なし (9 週齢)	卵内接種	+	—	+	—
	皮下接種	+	—	+	—
	陽性対照	+	+	+	+
付加後 (10 週齢)	卵内接種	+	—	—	—
	皮下接種	+	—	+	—
	陽性対照	+	—	+	+

ウイルス分離は、CPE が認められない場合盲継代を 3 代目まで行って判定した。

考察及び結論：

PCR で陽性、ウイルス分離で陰性となるのは細胞随伴性ウイルスが存在するが粒子の成熟が起きていないためと考えられる。フケからウイルスが分離された場合に、排泄があったと判断される。HVT-NDV/F 株を接種した鶏は、5 週齢及び 9 週齢時にウイルスを排泄しておらず、ストレスを付加してもウイルスを排泄しなかった。

参考文献：

Islam, A., *et al.* 2004. Differential amplification and quantification of Marek's disease virus using real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 119, 103-113

別添 21 HVT-NDV/F 株の卵内接種における排泄期間の検討

目的：

卵内接種した鶏からフケ及び羽包を採材し、感染性のあるウイルスが検出される期間について検討する。

方法：

18 日齢発育鶏卵にワクチン 1 羽分を卵内接種した。孵化したひな及び対照のひなを 6 週間飼育し、各群の 5 羽から毎週羽包及びフケを採材しウイルス検査を行った。ウイルス検査は、群ごとに材料をプールし、Islam らの方法を用いた PCR と鶏胚初代培養細胞を用いたウイルス分離を定量的に行った。

結果：

フケからのウイルスの排泄は 2、3 及び 5 週目に認められた。排泄量は 2 週齢で最も多く、その後減少した。フケ及び羽包中のウイルス DNA 量は 1 週目が最も高く、その後減少した（成績は社外秘のため非公開）。

考察及び結論：

1 週齢時の羽包及びフケからは多量のウイルス DNA が検出されたが、フケへの排泄が認められなかった理由は、羽包で成熟した粒子がこの時点ではまだフケに出てきていなかったためと考えられる。

HVT-NDV/F 株を 18 日発育鶏卵に卵内接種した場合のウイルスの排泄期間は、2～5 週齢であった。

参考文献：

Islam, A., *et al.* 2004. Differential amplification and quantification of Marek's disease virus using real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 119, 103-113

別添 22 HVT-NDV/F 株の皮下接種における排泄期間の検討

目的：

皮下接種した鶏からフケ及び羽包を採材し、感染性のあるウイルスが検出される期間について検討する。

方法：

1 日齢鶏の頸部皮下にワクチン 1 羽分又は 100 羽分を接種した。孵化したひな及び対照のひなを 6 週間飼育し、各群の 5 羽から毎週羽包及びフケを採材しウイルス検査を行った。ウイルス検査は、群ごとに材料をプールし、Islam らの方法を用いた PCR と鶏胚初代培養細胞を用いたウイルス分離を定量的に行った。

結果：

フケからのウイルス排泄は、皮下接種群では 2、3 及び 4 週後、100 用量皮下接種群では 2、3 及び 5 週後に認められた。排泄量は 2 週齢時が最も多くその後減少した。ウイルス DNA は、羽包中では 2 週齢時が最も多く、フケ中では 1 週齢時が最も多くその後は減少した（成績は社外秘のため非公開）。

結論及び考察：

フケに排泄されるウイルスは、羽包で産生されたウイルスが時間の経過とともにフケに出てくると考えられる。1 週齢時のフケのウイルス DNA 量は羽包よりも高い値となっているが、これは羽包の重量を羽包上皮単独ではなく羽軸を含めて測定しているためにこのような値となったと考えられる。

1 週齢時の羽包及びフケからは、ウイルス DNA が検出されたが、生きたウイルスは回収されなかった理由は、この時点では細胞随伴性ウイルスが増殖しているが、粒子の成熟が起こっていないと考えられた。

HVT-NDV/F 株を 1 日齢鶏の皮下に接種した場合のウイルス排泄期間は、2～4 週齢と考えられた。

参考文献：

Islam, A., *et al.* 2004. Differential amplification and quantification of Marek's disease virus using real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 119, 103-113

別添 23 HVT-NDV/F 株の垂直感染

目的：

HVT-NDV/F 株を卵内又は皮下に接種した種鶏から有精卵を採取し、卵、発育鶏卵及びひなからウイルスの検出を行う。

方法：

種鶏の育成：

ワクチン 1 羽分を発育鶏卵の卵内又は 1 日齢鶏の皮下に接種し、28 週齢まで育成した (表 1)。19～28 週齢の間に採取した卵について検査を行った。また、卵内接種群の選別前及び試験終了時すべての試験鶏について HVT-NDV/F 株の感染を確認した。

表 1 種鶏

群	接種材料	感染価	接種量	供試数
卵内接種	ワクチン 1 羽分	6244PFU	0.05mL	30 個
皮下接種	ワクチン 1 羽分	6244PFU	0.2mL	15 羽

42 日齢時に選別を行い、各群オス 1 羽メス 4 羽を育成した。

卵の検査：

各群の卵 5 個について、卵黄及び卵白にキャリアーとしてサケ精子 DNA を加えてから、DNA を抽出し、Islam らの方法を用いて HVT の SORF1 を検出する PCR を行った。

発育鶏卵の検査：

各群の発育鶏卵 5 個から、胚を採取し頭部を取り除いて乳剤を作成し、鶏胚初代培養細胞に接種してウイルス分離を行った。また、乳剤から DNA を抽出し、HVT を検出する PCR を行った。

ひなの検査：

各種鶏に由来するひな 5 羽を 10 日齢まで育成し、血液、腎臓及び脾臓を採取した。血液からは白血球を分離し、ウイルス分離及び HVT を検出する PCR を行った。腎臓及び脾臓は群ごとにプールして乳剤を作成し、ウイルス分離及び HVT を検出する PCR を行った。

結果：

卵の検査：

卵内接種又は皮内接種した種鶏のいずれに由来する卵からも、PCR によるウイルス検出は陰性であった (表 2)。

表 2 卵からのウイルス検出

卵の由来	PCR 結果 ¹⁾
卵内接種種鶏	0/5
皮下接種種鶏	0/5

1) 陽性数／検査数

発育鶏卵の検査：

いずれの群の発育鶏卵からも HVT は検出されなかった。

表 3 発育鶏卵 (11 日齢) からのウイルス検出

鶏胚の由来	PCR 結果 ¹⁾	ウイルス分離結果 ¹⁾
卵内接種種鶏	0/5	0/5
皮下接種種鶏	0/5	0/5

1) 陽性数／検査数

資料 2. 審査データの概要

ひなの検査：

いずれの群のひなからも、HVT は検出されなかった（表 4）。また、ひなの育成中に臨床上の異常は認められず、解剖時にも異常は認められなかった。

表 4 ひな（10 日齢）からのウイルス検出

ひなの由来	材料	PCR	ウイルス分離
卵内接種種鶏	血液	0/5	0/5
	脾臓	0/1	0/1
	腎臓	0/1	0/1
皮下接種種鶏	血液	0/5	0/5
	脾臓	0/1	0/1
	腎臓	0/1	0/1

1) 陽性数／検査数

考察及び結論：

試験に用いた卵は、HVT-NDV/F 株に感染した種鶏から生まれたことを確認した。卵からの PCR による検出は陰性であった。事前の検討では卵 1 個当たり 100PFU あれば検出可能であった。ひなの検査時期は 10 日齢としたが、初生ひなに HVT の 1～5PFU 接種した場合、1 週間後に半数以上の個体でウイルス血症が起こることが報告されているため（Churchill ら）、垂直感染があった場合に検出が可能な時期と考えられる。

以上から、供試ウイルスが垂直感染を起こす可能性はほとんど無いと考えられた。

参考文献：

Islam, A., *et al.* 2004. Differential amplification and quantification of Marek's disease virus using real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 119, 103-113

Churchill, A. E., *et al.* 1973. Viremia and antibody development in chicks following the administration of Turkey Herpesvirus. Vet. Rec. 92, 327-334

別添 24 鶏卵からの DNA 抽出法の検討

目的:

HVT-NDV/F 株の垂直感染を検討するためには、卵からウイルス DNA を抽出し PCR により検査を行う必要がある。本試験では、鶏卵にワクチンウイルスを様々な量で添加して DNA を抽出し、卵からの HVT の DNA の検出限界を求める。

方法:

社外秘のため非公開

結果:

社外秘のため非公開

考察及び結論:

この方法におけるワクチンウイルスの検出限界は、卵 1 個当たり 100PFU であった。

別添 25 ワクチン接種した肉用鶏の糞便からの HVT-NDV/F 株の検出（海外試験）

目的：

HVT-NDV/F 株を接種した鶏の糞便中のウイルスが排泄されるかを検討する。

方法：

18 日齢の肉用鶏の発育鶏卵に 1 用量の HVT-NDV/F 株を接種した。ふ化した鶏は 1 日齢時にニューカッスル病生ワクチンを点眼接種した。試験鶏はアイソレーターで飼育した。接種後 4、5、6 及び 7 週目に糞便を採取し、糞便を洗浄した上清及び沈殿から鶏胚初代培養細胞を用いてウイルス分離を行った。

結果：

検査をしたすべての時点において糞便サンプルから感染性のウイルスは検出されなかった（表 1）。

表 1 ウイルス分離の結果

サンプル	接種後週数				
	3	4	5	6	7
上清	—	—	—	×	—
沈殿	—	—	—	—	—

—：陰性 ×：汚染により評価できなかった

考察及び結論：

ワクチンを接種した肉用鶏の糞便サンプルから感染性のウイルスは検出できなかった。

別添 26 HVT-NDV/F 株の自然界に対応する環境条件下での生存試験**目的：**

HVT-NDV/F 株の泥水、雨水、血餅及び血清中での生存能力を検討する。

方法：

HVT-NDV/F 株のワクチンウイルス約 2×10^6 PFU を、滅菌した泥水（± 10%）、雨水、採血した鶏血液又は鶏血清と混合し、室温で 4 時間～7 日間静置した。2,500rpm、5 分間の遠心により上清を除き細胞培養用培地（MEM）に浮遊して、鶏胚初代培養細胞に接種し 5%CO₂ 存在下 37℃ で 10 日間培養し CPE を観察した。対照として PBS 中で静置した細胞随伴性ウイルス、及び新たに融解した細胞随伴性ウイルスも接種して観察した。

結果：

HVT-NDV/F 株は、血清中で 1 日（24 時間）、血餅中で 4 日間、泥水、雨水及び PBS で 7 日間静置すると感染性を失っていた。ウイルス対照は全ての接種時において CPE が観察された（表 1）。

表 1 HVT-NDV/F 株（細胞随伴性ウイルス）の環境中での生存試験結果

試験条件	処理時間				
	4 時間	1 日	2 日	4 日	7 日
泥水	+	+	+	+	—
雨水	+	+	+	+	—
血餅	+	+	+	—	—
血清	+	—	—	—	—
陽性対照（PBS）	+	+	+	+	—
非接種対照	—	—	—	—	—
ウイルス対照		+	+	+	+

＋：CPE 陽性 —：CPE 陰性

考察及び結論：

組換え体ウイルス HVT-NDV/F 株は泥水、雨水、血餅及び血清中で 1 週間以上の生存はできなかった。

別添 27 HVT-NDV/F 株のワクチンの環境中での安定性（海外試験）**目的：**

HVT-NDV/F 株のワクチンの体外の環境における生存能力を検討する。

方法：

ワクチンの 1 アンプルを融解し、溶解用液 200mL に溶解して分注し、室温で直射日光を避けて静置した。静置後に、鶏胚 2 代培養細胞に接種してプラークを観察した。対照として溶解直後のワクチン及び HVT（FC126 株）のワクチンの感染価も測定した。

結果：

静置後 2 日目には、プラーク数が著しく減少し、7 日後には検出不能となった（表 1）。

表 1 室温で静置したワクチンのプラーク数

ワクチン	溶解後日数			
	開始時	1 日後	2 日後	7 日後
HVT-NDV/F 株	126	29	7	0
HVT（FC126）	123	46	18	0
溶解直後	—	65	89	87

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株のワクチンの環境中における生存は 1 週間以内であった。

別添 28 フケに排泄された HVT-NDV/F 株の生存性の検討

目的：

HVT-NDV/F 株を接種したひなからフケを採取し、採取当日、採取後 1、7 及び 28 日目に感染性のあるウイルスを定量し、フケに排泄されたウイルスの生存期間を検討する。

方法：

1 日齢鶏 50 羽の頸部皮下にそれぞれワクチン 100 羽分を接種し、2 週齢時にフケを採取した。フケは重量を測定して試験管に分注し、4℃及び常温に保存し、1、7 及び 28 日後にセルフリーウイルスを抽出し、鶏胚 2 代培養細胞を用いた感染価の測定及び Islam らの方法を用いたリアルタイム PCR による HVT の DNA 定量を行った。

結果：

フケ 10mg 当たりの感染価は、4℃に保存した場合は、7 日目までに感染価の低下が認められたが、28 日目においても感染性は維持されていた。

常温に保存した場合、1 日目ではほとんど変化しなかったが、7 日目には低下し、28 日目には検出限界以下となった。

フケ 10mg 当たりの DNA 量は、サンプル間で変動が認められるが、DNA 量当たりの感染価は、いずれの条件下でも時間の経過とともに低下した（成績は、社外秘のため非公開）。

考察及び結論：

フケから排泄された HVT-NDV/F 株は、4℃保存した場合には 28 日目にも感染性が残存していた。また、常温では 28 日目までに失活した。

HVT-NDV/F 株は、低温状態が保たれた環境下では、長期間感染性が維持されるものと考えられた。また、常温の条件下においては排泄から 4 週間程度で失活するものと考えられた。

参考文献：

Islam, A., *et al.* 2004. Differential amplification and quantification of Marek's disease virus using real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 119, 103-113

別添 29 HVT-NDV/F 株の消毒剤による不活化

目的：

HVT-NDV/F 株の消毒剤（アルコール、塩素、逆性石鹼及び消石灰）による不活化を検討する。

方法：

HVT-NDV/F 株のワクチンを溶解し、 2×10^6 PFU のウイルスに対し、アルコール（70% エタノール）、塩素（次亜塩素酸ナトリウム 100ppm）、逆性石鹼（塩化ベンザルコニウム 200ppm）又は消石灰（0.1%塩化カルシウム）の溶液を加えた。室温で 10 分～4 時間静置した後、遠心によりウイルス感染細胞を回収し、鶏胚初代培養細胞に接種してウイルス分離を行った。

結果：

逆性石鹼では 10 分後、アルコール及び消石灰では 30 分後から CPE は認められなかった。塩素は 30 分後には CPE が認められたが、4 時間後には認められなかった。対照の PBS では 30 分後、4 時間後ともに CPE が認められた（表 1）。

表 1 HVT-NDV/F 株（細胞随伴性ウイルス）消毒剤中での生存試験結果

消毒剤	処理時間		
	10 分後	30 分後	4 時間後
アルコール	—	—	—
塩素	—	+	—
逆性石鹼	—	—	—
消石灰	—	—	—
対照 (PBS)	+	+	+

+ : CPE 陽性 — : CPE 陰性

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株は、いずれの消毒剤によっても不活化された。不活化に必要な時間は、逆性石鹼が 10 分、アルコール及び消石灰は 30 分、塩素では 4 時間であった。

別添 30 HVT-NDV/F 株の人工胃液による不活化**目的：**

鶏肉中に残存するワクチンウイルスを食したときに、胃液によってウイルスが不活性化されるか確認する。

方法：

0.2%塩化ナトリウム、0.7%塩酸、0.6%豚由来ペプシンの水溶液を人工胃液とした。HVT-NDV/F 株のワクチンウイルス約 3.5×10^6 PFU に人工胃液、10 倍希釈人工胃液、又は PBS を加え、37℃で振盪した。振盪後に溶液から細胞随伴性ウイルスを回収し、鶏胚初代培養細胞に接種してウイルス分離を行った。

結果：

人工胃液及び 10 倍希釈人工胃液で処理されたワクチンウイルスは 30 後には活性を失っていた。PBS で処理されたワクチンウイルスは HVT-NDV/F 株感染細胞を接種した鶏胚 2 代細胞では CPE が観察された。

表 1 HVT-NDV/F 株（細胞随伴性ウイルス）の人工胃液中での生存試験結果

試験条件	処理時間	
	0.5 時間	4 時間
人工胃液 (pH1.2)	—	—
1/10 人工胃液 (pH2.2)	—	—
対照 (PBS、pH7.3)	+	+

考察及び結論：

人工胃液に暴露された HVT-NDV/F 株は、少なくとも 30 分後には不活化された。鶏肉に残存したワクチン株を食した場合、HVT-NDV/F 株は不活化されと考えられた。また、ワクチン接種鶏が野生動物に捕食された場合にも、ワクチンウイルスは不活性化されと考えられた。

別添 31 製品に関する情報

予定される商品名称（仮称）	
ノビリス イノフュージョン ND	
製造販売業者名	株式会社インターベット
製剤区分	生物学的製剤
剤型	凍結 生

主成分	
ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F 株 107.4PFU 以上/1 アンプル（1.8mL、4,000 羽分）	

投与経路	
1	皮下注射
2	卵内注射

対象動物	
鶏	
効能又は効果	
鶏のマレック病及びニューカッスル病の予防	
予定される用法及び用量	
1. 頸部皮下接種 凍結ワクチンを速やかに融解し、凍結ワクチン溶解用液“ノビリス ディルエント CA（申請中の製剤）”で 1 羽当たり 0.2mL となるように溶解し、初生ひなの頸部皮下に 0.2mL を接種する。 2. 発育鶏卵内接種 凍結ワクチンを速やかに融解し、凍結ワクチン溶解用液“ノビリス ディルエント CA”で 1 羽当たり 0.05mL となるように溶解し、自動卵内接種機を用いて 0.05mL ずつを 18 日齢卵に接種する。	

資料 2. 審査データの概要

予定される商品名称（仮称）	
ノビリス イノフュージョン ND-SB	
製造販売業者名	株式会社インターベット
製剤区分	生物学的製剤
剤型	凍結 生

主成分	
ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F 株 10 ^{6.8} PFU 以上/1 アンプル（1.8mL、4,000 羽分）	
非腫瘍原生マレック病ウイルス SB-1 株 10 ^{6.8} PFU 以上/1 アンプル（1.8mL、4,000 羽分）	

投与経路	
1	皮下注射
2	卵内注射

対象動物	
鶏	
効能又は効果	
鶏のマレック病及びニューカッスル病の予防	
予定される用法及び用量	
1. 頸部皮下接種 凍結ワクチンを速やかに融解し、凍結ワクチン溶解用液“ノビリス ディルエント CA (申請中の製剤)” で 1 羽当たり 0.2mL となるように溶解し、初生ひなの頸部皮下に 0.2mL を接種する。 2. 発育鶏卵内接種 凍結ワクチンを速やかに融解し、凍結ワクチン溶解用液“ノビリス ディルエント CA” で 1 個当たり 0.05mL となるように溶解し、自動卵内接種機を用いて 0.05mL ずつを 18 日齢卵に接種する。	

別添 32 HVT-NDV/F 株の鳥類への水平感染（海外試験）**目的：**

HVT-NDV/F 株を接種した鶏からの排泄及び接種鶏と同居飼育している鶏、鳩、あひる及び七面鳥への水平感染の有無を検討する。

方法：

$10^{4.1}$ PFU の HVT-NDV/F 株を 1 日齢の SPF 鶏 20 羽に接種した。非接種の SPF 鶏 10 羽、鳩 10 羽、七面鳥 15 羽及びあひる 10 羽を同じ部屋の別な籠で飼育した。接種後 4、5、6、7 及び 8 週目すべての動物から採血し末梢血白血球を分離し、鶏胚初代培養細胞に接種してウイルス分離を行った。

結果：

HVT-NDV/F 株を直接接種した鶏はすべてウイルス血症を起こしていたが、同居飼育していた鶏、鳩及びあひるは検査したどの時点においてもウイルス血症は認められなかった。試験期間中 15 羽中 11 羽の七面鳥は、HVT-NDV/F 株によるウイルス血症を起こしていた（表 1）。

表 1 白血球からのウイルス回収結果

群	接種後週数				
	4	5	6	7	8
接種鶏	19/19	20/20	19/19	20/20	19/19
同居鶏	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
同居鳩	0/10	0/10	0/10	0/10	0/9
同居あひる	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
同居七面鳥	0/14	4/11	4/13	2/13	11/13

陽性数/検査数

考察及び結論：

HVT-NDV/F 株は、接種した鶏から同居飼育している鶏、鳩又はあひるに水平感染しない。しかし、同居飼育している七面鳥には水平感染した。

別添 33 HVT-NDV/F 株の米国におけるリスク評価書（米国農務省 許可番号 17H1.R2）

1. 背景

ニューカッスル病ウイルス（NDV）は、パラミクソウイルス科のパラミクソウイルス亜科ルブラウイルス属に分類され、この属には吸入や摂食により鳥類に感染する多くのウイルスが存在する（Alexander, 1997）。ニューカッスル病は、NDV によって引き起こされる家禽類の疾病で、非常に病原性が高く経済的意義は大きい。NDV の多くの既知の株は、病原性が非常に異なっており 1) 無症状型 2) 弱毒型 3) 中等毒型 4) 強毒型が知られている。NDV の生ワクチンには、弱毒型又は中等毒型が用いられる。

米国ではニューカッスル病（ND）の予防のために数種類の弱毒生ワクチンが利用可能である。ワクチンには、弱毒型の La Sota 株や B1 株がよく利用されている。しかし弱毒生ワクチンの使用は、ワクチン株や環境条件、複合感染の存在により副作用を起こす場合がある。また、いくつかの ND 生ワクチンで問題となるのは、NDV の移行抗体によりワクチンによる防御が干渉されてしまうことである。

七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）はヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に分類され、マレック病に対するヘテロ型ワクチンとして野外で広く使われている。病原性のない HVT は、マレック病ウイルス 3 型に分類され、最も一般的に使われているワクチンである。HVT は、鶏に病原性がなく、環境中に広がるリスクがマレック病ウイルス（MDV）の 1 型や 2 型よりも低い。このような理由から、HVT はワクチン接種した動物に外来性抗原を届けるための生ウイルスベクターとして有用である（Sondermijer et al., 1993）。

マレック病の防御には、HVT の生ワクチンを用いた大規模な初生ひなへのワクチン接種がおこなわれている。広範なワクチンの使用によりマレック病の発生は著しく減少しているが、ワクチン使用下でも時折発生がある。

一回のワクチン接種で、若い時期の鶏を MDV 及び NDV から防御するワクチンを作製するため、Intervet Inc. は、NDV の弱毒株の遺伝子を HVT に組み込んだ組み換え生ワクチン（HVT-NDV/F 株）の開発を行った。強毒型 ND の防除には全身免疫の誘導が必要であり、これを既存のワクチンで達成するのは困難なため、組換え生ワクチンは最適である可能性が考えられた。超強毒マレック病の防除のため MDV2 型（SB-1 株）も加えた。マレック病ニューカッスル病生ワクチン（マレック病ウイルス 2 型、七面鳥ヘルペスウイルスベクター）のコード番号は 17H1.R2（未承認）である。

2. 懸念の領域

米国農務省の国際動植物検疫課が懸念する 3 の領域は、1) 動物に対する安全性、2) 公衆衛生上の安全性、3) 環境に対する安全性である。Intervet Inc. は、この開発中のワクチンの臨床試験を米国内で実施する届出に関連してリスク評価を行った。下記の結論は、各領域のリスク評価に基づくものである。

2.1 動物に対する安全性

HVT-NDV/F 株を含む生ワクチンコード番号 17H1.R2 の安全性の特性を評価した。HVT-NDV/F 株の動物への安全性のリスクは低い。本リスク評価の受理と同時に、製品の臨床安全性試験実施の許可を求めた。

ワクチンの安全性を確認するため、製造用原株を 18 日齢の SPF 発育鶏卵 60 個に接種した。接種量は、10 羽分以上としたが、孵化率及び生存率に異常は認められなかった。すべてのひなは孵化から 5 日間生存した。その後、120 日齢まで飼育したが、マレック病や ND の病変を示すものはなかった。接種を行わずに同居飼育した鶏にもマレック病の病変は認められなかった。ワクチン非接種の鶏に超強毒マレック病ウイルス RB1B 株を攻撃したところ、すべての鶏にマレック病の病変が観察された。このことから、試験に使用した鶏群はマレック病に感受性であることが確認された。非攻撃の対照群は、マレック病の病変を示さなかった。ワクチン群と対照群の体重に統計的有意差は認められなかった。雌雄別に体重を解析した場合も同様であった。

このワクチンの安全性は、有効性試験の中でも検討されている。18 日齢発育鶏卵の卵内に接

資料 2. 審査データの概要

種した群、HVT の単味ワクチンを皮下に接種した群、非接種群、MD 及び ND の攻撃対象群を、5 日齢時に RB1B 株、28 日齢時に ND ウイルスの Texas GB 株でそれぞれ攻撃した。その結果、孵化率や生存率に異常は認められなかった。ワクチンは 18 日齢発育鶏卵に使用すると超強毒マレック病ウイルスや強毒ニューカッスル病から鶏を防御することが示された。

HVT は鶏に対して非病原性であり、羽包上皮に存在するウイルスが限られているため、排泄や鶏間での感染も限られている (Cho, 1975; Zygraich and Huygelen, 1972)。マレック病ウイルス 1 型や 2 型と異なり 3 型 (HVT) が羽包上皮で複製するのは、一過性である (Zygraich and Huygelen, 1972)。ワクチン接種した鶏から非接種鶏への拡散について安全性を評価した。18 日齢 SPF 発育鶏卵に 10 羽分の HVT-NDV/F 株を接種し、孵化後に非接種の鶏と同居飼育した。接種後 6 週目に、接種群 20 羽、非接種群 20 羽から採血し、白血球を分離して検査した。接種群は、すべて HVT のウイルス血症を起こしていたが、非接種群には拡散しておらず病変も観察されなかった。以上から HVT-NDV/F 株を鶏に使用しても安全性の問題はないと考えられる。

ワクチンウイルスの拡散は、10 羽分を鶏に接種した場合についても検討されている。ワクチン接種した鶏を、接種していない鶏、鳩、七面鳥及びあひると同室で飼育し、4、5、6、7 及び 8 週後に血液を採取して白血球を分離し、ウイルス分離を行った。ウイルスは接種した鶏と、同居飼育した七面鳥だけから分離された。従って、組換えウイルスは同居飼育している鶏や鳩、あひるには拡散しない。しかし接種した鶏と七面鳥を一緒に飼育した場合には拡散が起こる。

NDV の遺伝子を HVT に挿入したことにより、HVT の親和性に変化が起こるという懸念があるため、HVT-NDV/F 株の組織親和性を評価した。高用量の組換えウイルス又は組換え体の作出に使用した HVT を鶏に免疫し、様々な組織からのウイルスの回収を行った。接種後 3、7、10、14、17 及び 21 日目に各群から 3 羽の鶏を安楽死させ、肝、脾、腎、卵巣又は精巣、肺、胸腺、ファブリキウス囊、末梢血白血球、羽包、口腔洗浄液、総排泄ロスワブからウイルス検査を行った。どちらの群も接種後 3 日目に最初にウイルスが検出されたのはリンパ系組織 (ファブリキウス囊、胸腺及び脾臓) であった。接種後 14 日後になると、口腔洗浄液と総排泄ロスワブを除くほぼすべての臓器から分離された。口腔洗浄液と総排泄ロスワブはどの時点においてもウイルスは分離されなかった。以上から、組換え体と HVT は、対象動物での体内分布において差異は認められなかった。

非対象動物に対する安全性は、他の鳥類である七面鳥、鳩、あひるに製造用原株 10 羽分を接種して検討した。別な群の七面鳥、鳩、あひるには、HVT の PB1 株を高用量で接種した。文献情報から、HVT は七面鳥から分離されたウイルスなので七面鳥で複製すると予想された (Witter et al., 1970)。結果は、組換え体の HVT-NDV/F 株は、鳩やあひるでは複製しなかった。同様に、作出に使用した PB1 株も鳩やあひるで複製しなかった。これらの結果から、HVT-NDV/F 株の製造用原株の感受性動物の範囲は、作出に使用した PB1 株を同様であることが確認された。従って、HVT-NDV/F 株を鶏に使用することは、他の鳥類に対して安全性のリスクはない。

組換え体の兎における複製も検討した。ワクチン一羽分の組換えウイルスを兎 2 羽の目に接種した。同時に他の兎 2 羽には PB1 株を接種した。その結果、どちらのウイルスも兎に臨床症状や結膜炎を引き起こさなかった。さらに、ウイルス血症は起こしておらず、組換え体も PB1 株も非対象動物である兎で複製しないことが確認された。

HVT-NDV/F 株は、病原性復帰確認のため鶏で 5 代戻し継代する間、遺伝子型及び表現型が安定であることが確認されている。NDV の遺伝子は、製造用原株、11 代継代株及び 5 代戻し継代株で発現していることが、蛍光抗体法により確認されている。同様にその間遺伝子は、欠失や再配置を起こしておらず安定であることが、ウェスタンブロットにより確認されている。

2.1 公衆衛生上の安全性

公衆衛生上の危険はないと考えられる。HVT が鶏と七面鳥以外の種に感染したとの報告はない。ウイルスは、鶏や七面鳥で複製するが、臨床症状を引き起こさない。人への感染の報告はない。開発中のワクチンの作成に使用した株は、1972 年から鶏用のワクチンとして使用されており、副作用や公衆衛生への危険はない。人への暴露は、ワクチンの接種作業を行う者と接種後の観察を行う者に限られる。HVT のワクチンが人への感染を起こしたという報告はない。

2.2 環境に対する安全性

環境に対する安全性のリスクは低い。組換えワクチンが排泄され拡散する能力は限定的である。開発中のワクチンの感受性動物の範囲は、作出に使用した HVT から変化しておらず、鳥類（鶏、七面鳥）に限られている。HVT が存在するのは、主に鶏か七面鳥が使用されている地域である。開発中のワクチンの非対象動物に対する安全な性状は、作出に使用した市販のワクチン株から変化していないと考えられる。HVT のワクチン株の環境への分布はこれまで報告はないが、このワクチンの野外での使用による副作用はない。開発中のワクチンの臨床試験を実施することによる環境への悪影響はないと考えられる。

環境に対する安全性を確認するため、HVT-NDV/F 株が感受性動物の体外の環境で生存できるかを検討した。ワクチンの 1 バイアルを融解して溶解用液に溶解し、分注して 1、2 及び 7 日間静置した。その結果 HVT-NDV/F 株は、環境中で 1 週間以上の生存は出来なかった。従って、HVT-NDV/F 株の生存性は低く、拡散する機会は少なく、安全性のリスクはない。

核酸の水平伝達とは HVT とは関係がない。組換えが起こる可能性については、他のヘルペスウイルスのワクチン株であるオーエスキーウイルスでの報告がある (Henderson et al., 1990, 1991; Katz et al., 1990)。しかし、これらの研究は実験的な性質のものであり、高感染価のストックウイルス 2 種類を混ぜ合わせ一本の注射器で動物に注射している。このような特殊な状況下では、ワクチン株は様々な遺伝子の欠損を起こす。細胞培養では、MDV1 型が潜伏感染した株化細胞に MDV2 型を感染させると組換えウイルスが生じたとの報告がある (Hrai et al., 1990)。しかし、この現象は再現されていないため、組換えを起こす能力は相当に低い。

2 つのワクチン株の間で組換えが起こると、元の株と組み変わった株の二つのウイルスが存在する。組換え体のバックボーンとなる HVT に遺伝子を欠損させる改変は行っていないため、野生型の HVT や MDV との組換えを起こす能力は、従来型の HVT の生ワクチンから変化していないと考えられる。マレック病ウイルスの 2 型や 3 型を含む多価ワクチンは、野外で 10 年間使用されているが、それらのウイルスの間で組換えが起こったとの報告はない。

NDV の F 遺伝子を挿入したことによって、組換えの能力が高まるとは考えられない。NDV も HVT も遺伝子を伝達する能力はないと考えられる。

HVT をベクターとするワクチンの遺伝子の水平伝達や組換えの能力は極めて低いと考えられる。

3. リスクの検討

リスクの検討は、危険の特定とその評価を統合したものであり、1) 有害事象の発生確率、2) 有害事象の発生の結果、3) リスクの評価、4) 評価の論考の 4 項目からなる。発生確率と結果の評価は、評価の正当性を含む「評価の確実性」により修飾される。評価の正当性は、危険の同定の該当する節及びリスクの計算と評価からなる。

発生確率の評価

- 低 = 有害事象は起こりそうにない。
- 中 = 有害事象が起こる可能性がある。
- 高 = 有害事象が起こる可能性が高い。

結果の評価

- 低 = 有害事象発生の結果は深刻ではない。たとえば、有害事象は自己限定的であり影響は無視できる。
- 中 = 有害事象発生は中等度に深刻である。たとえば、有害事象による影響は、不可逆的ではなく対処方がある。
- 高 = 有害事象の発生は深刻である。たとえば、有害事象による影響は不可逆的で対処方がない。

評価の確実性

- 確実 = 評価は直接的な科学的証拠に裏付けられている。
- 中等度に確実 = 評価は間接的な科学的証拠に裏付けられている。

資料 2. 審査データの概要

不確実 = 評価は科学的根拠に裏付けられていない。

発生率、結果、評価の確実性に対して数値が割り当てられている（表 1）。各数値による評価は、各領域の評価の重要性に基づいている。割り当てられた数値は、考えられるリスクの深刻さの重点を示すためのものである。考えられるリスクの大きさを決めるため、数値を乗じる。

表 1 リスクの計算法

発生率	
低 (L)	LL = 1.00
中 (M)	LM = 0.50
高 (H)	LH = 0.10
結果	
低 (L)	CL = 1.00
中 (M)	CM = 0.10
高 (H)	CH = 0.01
もし発生率が中又は高で、結果も中又は高であれば、確実性の評価 I を使う。そのほかの組み合わせでは、確実性の評価 II を使う。	
確実性の評価 I	
確実 (C)	C = 0.50
中等度に確実 (MC)	MC = 0.75
不確実 (U)	U = 1.00
確実性の評価 II	
確実 (C)	C = 1.00
中等度に確実 (MC)	MC = 0.75
不確実 (U)	U = 0.50
予想されるリスク	
予想されるリスク = [発生率×確実性]×[結果×確実性]	

リスクの評価

- 低 = 容認可能なリスク（予想されるリスクが 0.5000～1.0000）
申請に関わる懸念は少ない（申請を却下する正当性がない）。
中 = 容認不可能なリスク（予想されるリスクが 0.0025～0.3750）
申請に関わる懸念は中等度（緩和的な措置を取るか又は申請を却下する）。
高 = 容認不可能なリスク（予想されるリスクが 0.0003～0.0019）
申請に関わる懸念は重大（申請を却下する）。

3.1 動物に対する安全性

有害事象の発生率の評価： 低
評価の確実性： 確実
有害事象の発生の結果の評価： 低
評価の確実性： 確実
リスクの検討： LL.C.CL.C （[1.00×1.00]×[1.00×1.00]）
予想されるリスク： 1.0000
リスクの評価： 低
評価の正当性： 2.1 動物に対する安全性

3.2 公衆衛生上の安全性

有害事象の発生率の評価： 低

資料 2. 審査データの概要

評価の確実性：	確実
有害事象の発生の結果の評価：	低
評価の確実性：	中等度に確実
リスクの検討：	LL.C.CL.MC $([1.00 \times 1.00] \times [1.00 \times 0.75])$
予想されるリスク：	0.7500
リスクの評価：	低
評価の正当性：	2.2 公衆衛生上の安全性

3.3 環境に対する安全性

有害事象の発生率の評価：	低
評価の確実性：	確実
有害事象の発生の結果の評価：	低
評価の確実性：	中等度に確実
リスクの検討：	LL.C.CL.MC $([1.00 \times 1.00] \times [1.00 \times 0.75])$
予想されるリスク：	0.7500
リスクの評価：	低
評価の正当性：	3.2 環境に対する安全性

4. 結論

リスクを解析する試験結果に基づき Intervet Inc.は、組換えウイルスである HVT-NDV/F 株と SB-1 株の混合ワクチンは、動物に対する安全性、公衆衛生上の安全性及び環境に対する安全性に関わるリスクは低いと結論する。マレック病・ニューカッスル病生ワクチン（コード番号 17H1.R2）は、鶏に使用しても安全であることが確認された。このリスク評価書の国際動植物検疫課への届出により、このワクチンの臨床安全性試験実施の許可を求める。

参考文献

1. Alexander, D.J. (1997) Newcastle Disease and other avian paramyxoviridae infections. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif (Eds), Diseases of Poultry, 10th ed., pp. 541-569. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
2. Cho, S.R. (1975). Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. Avian Diseases, 19: 136-141.
3. Henderson, L.M., Katz, J.B., Erickson, G.A. and Mayfield, J. E. (1990). In vivo and in vitro genetic recombination between conventional and gene-deleted vaccine strains of pseudorabies virus. Am. J. Vet. Res. 51: 1656-1662.
4. Henderson, L.M., Levings, R.L., Davis, A.J., and Sturtz, D.R. (1991). Recombination of pseudorabies virus vaccine strains in swine. Am. J. Vet. Res. 52: 820-825.
5. Hirai, K., Yamada, M., Aral, Y., Kato, S. and Nii, s. (1990). Replicating Marek's disease virus (MDV) serotype 2 DNA with inserted MDV serotype 1 DNA sequences in a Marek's disease lymphoblastoid cell line MSB1-41C. Archives of Virology 114, 153-165.
6. Katz, J.B., Henderson, L.M. and Erickson, G.A. (1990). Recombination in vivo of pseudorabies vaccine strains to produce new virus strains. Vaccine 8: 286-288.
7. Sondermeijer, P.J.A., Claessens, J.A.J., Jenniskens, P.E., Mockett, A.P.A., Thijssen, R.A.J, Willemse, M.J. and Morgan, R.W. (1993). Avian herpesvirus as a live viral vector for the expression of heterologous antigens. Vaccine 11: 349-358.
8. Witter, R.L., Nazerian, K., Purchase, H.G. and Burgoyne, G.H. (1970). Isolation from turkeys of cell associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. American Journal of Veterinary Research 31, 525-538.
9. Zygraich, N. and Huygelan, C. (1972). Inoculation of one-day-old chicks with different strains of turkey Herpesvirus. II Virus replication in tissues of inoculated animals. Avian Diseases 16: 793-798.

別添 34 HVT-NDV/F 株のカナダにおけるリスク評価書（米国農務省 許可番号 17H1.R2）

要約

ニューカッスル病・マレック病（マレック病ウイルス 2 型、七面鳥ヘルペスウイルスベクター）生ワクチンは、マレック病ウイルス 2 型及びニューカッスル病ウイルス由来の遺伝子を導入した七面鳥ヘルペスウイルスの生ワクチンである。本ワクチンは、鶏の超強毒マレック病及びニューカッスル病を予防するために 18 日齢発育鶏卵の卵内に接種して使用する。

本ワクチンの評価は、カナダ食品検査庁（CFIA）のカナダ動物用生物学的製剤センター（CCVB）が行った。カナダにおける製品の販売承認の要件の一部として環境影響評価を実施した。本環境影響評価は、生きた組換えウイルスの分子的及び生物学的性状、適用対象及び非対象動物への安全性、人への安全性、環境への配慮及びリスク軽減策を含む公開文書である。

本環境影響評価は、製造業者（Intervet Inc, デラウェア州ミルズボロ、米国の動物用生物学的製剤製造業者認可番号 165A）により提供された情報だけでなく、CCVB の審査官が独自に入手した情報に基づいている。

1. 緒言

1.1 審査の申請

カナダ食品検査庁（CFIA）陸生動物衛生課 カナダ動物用生物学的製剤センター（CCVB）は、動物衛生法および規則の下で法的権限によりカナダの動物用生物学的製剤の使用を規制する責任を有す。

カナダで製造、販売又は使用される動物用生物学的製剤は、製品の安全性、純粋性、効能及び効果に関して CFIA が指定した基準を遵守しなければならない。Intervet Inc.（米国デラウェア州ミルズボロ）は、Intervet Canada Corp（カナダ国ケッベック州ケルクラン）を通じて下記のワクチンの承認申請を行った。

- ・ニューカッスル病・マレック病（マレック病ウイルス 2 型、七面鳥ヘルペスウイルスベクター）生ワクチン（商品名「INNOVAX-ND-SB」、米国農務省製品コード番号 17H1.R2、CCVB 登録番号 800VV/M10.0/I6.2）

本環境影響評価書は、カナダにおける上記ワクチンの承認審査の一部として CCVB が作成したものである。

1.2 背景

ニューカッスル病・マレック病（マレック病ウイルス 2 型、七面鳥ヘルペスウイルスベクター）生ワクチンは、Intervet Inc. により製造され、米国で販売されている。この組換えワクチンは、マレック病ウイルス 2 型及びニューカッスル病ウイルスの遺伝子を挿入した七面鳥ヘルペスウイルスを成分とする。

ニューカッスル病（ND）は、非常に伝染性の高い鳥類のウイルス性疾病で世界の多くの地域に存在する。ウイルスの病原性は株によって異なり、無症状感染を起こす低病原性株から 100% の死亡率をもたらす内臓強毒型の株が存在する（King, 2006）。

マレック病（MD）は、腫瘍性の家禽のウイルス性疾病であり、世界中に認められる。本症は偏在していると考えられ、厳格な SPF 管理以外のすべての鶏群に存在すると想定される。MD ウイルスを鶏群から撲滅するのはいくつかの理由により非常に困難である。ウイルスは、ワクチン接種の有無に関わらず非常に速く個体間で伝染が起こり、感染は長期間持続し、排泄されたウイルスは環境中で数か月も存続する（Fadly, 2006）。

2. 目的及び審査の必要性

2.1 意義

INNOVAX-ND-SB ニューカッスル病・マレック病生ワクチンのラベル表示には、「超強毒マレック病及びニューカッスル病の予防のため 18 日齢発育鶏卵に接種する。」と書かれている。

2.2 経緯

CCVB は、動物用生物学的製剤の承認申請を動物衛生法及び規則の下に審査する。承認の一般的基準は以下の項目である。1) 製品は純粋で安全で効能及び効果を有すること、2) 製品は製

資料 2. 審査データの概要

造国で認可を受けていること、3) ワクチンの成分はカナダにおける疾病発生状況に適したものであること、4) 製品は一般に認められている GMP 基準したがって製造及び品質管理されていること。米国産のワクチンは、これらの一般的基準に適合し、受理不可能な輸入のリスクのない状態で申請が提出されたため、CCVB は承認のための審査を行った。

この製品は、クラス 2 に分類されるバイオテクノロジー応用ワクチンであるため、CCVB は、この製品が環境中に放出される可能性が生じる前に環境影響評価を実施する必要がある。環境影響評価は、製品の放出が、動物、公衆衛生又は環境に安全上のリスクを生じるかを判定するために実施されている。

3. 選択肢

2 つの選択肢が考えられる。1 つ目は、もしすべての承認の要件が満たされれば、Intervet Canada Corp に INNOVAX-ND-SB を輸入するための動物用生物学的製剤の輸入許可を発行する。2 つ目は、承認の要件が満たされなければ、動物用生物学的製剤の輸入許可を発行しない。

4. 宿主及び組換え微生物の分子的及び生物学的性状

4.1. 宿主の分類、由来、株

申請されたワクチンは、クラス 2 生物学的製剤（免疫抗原又は免疫刺激性物質をコードする 1 つ以上の外来遺伝子を持つ生体の発現ベクター）に該当する。組換えワクチンの遺伝子構築物はニューカッスル病ウイルス（NDV）由来の蛋白質を発現する遺伝子を非病原性の七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）ベクターに挿入したものである。ワクチンには、非腫瘍原生のマレック病ウイルス 2 型（MDV2）も含まれている。

4.2 外来性遺伝子の由来及び機能

NDV の遺伝子配列は、鶏の防御免疫を刺激しそうなものの中から選ばれたものである。実際の配列の詳細は、CCVB に保管されている。

4.3 遺伝的改変の達成方法

本組換え微生物の構築に用いた方法の詳細は CCVB に保管されている。製造用原株は、米国連邦規則第 9 条に記載される方法に従って、迷入ウイルス否定、純粋性、安全性について検査されている。CCVB は、これらの検査結果を審査し、保管している。

4.4 ワクチン微生物の遺伝子及び表現型の安定性

サザンブロットによる解析では、組換え微生物の遺伝子は細胞で 5 代継代しても安定であった。生体で継代した場合にも表現型及び遺伝子型が安定であることが、蛍光抗体法及びサザンブロットにより確認された。適用動物種である鶏で 5 代継代しても遺伝子及び表現型に変化は認められなかった。

4.5 遺伝子の水平伝達及び組換えの可能性

ワクチンは、組換え微生物と他のヘルペスウイルスを混合したものであり、その遺伝子には明らかな相同性がある（Alfonso et al., 2000; Fukuchi et al., 1984; Gibbs et al., 1984）。細胞や生体にヘルペスウイルスを重感染させ実験的な組換えを行った文献から推察すると、2 つのウイルス間で遺伝子の伝達や組換えを起こすという論理的リスクがある。しかし、他の多価混合ワクチンと比較して、この製品が組換えを起こすリスクが特別に高いとは考えられない。

病原性は、組換えが起こった時に変化するウイルスの性状の 1 つである。どちらのヘルペスウイルスの株も非病原性と考えられているが、他のヘルペスウイルスの研究で認められる様に新しい組換え体が生じて病原性が増すという論理的リスクがある（Henderson et al., 1990; Kats et al., 1990）。この MDV2 の株と HVT の異なる株は、既承認の多価混合ワクチンとして何年も使用されているが病原性を獲得した兆候は認められない。この製品に関して、どちらのウイルスも組換えによって病原性を獲得するリスクは、ごく僅かであると考えられる。

4.6 感受性動物の範囲、特異性、組織親和性、排泄及び拡散能力

組換え体の感受性動物の範囲、組織親和性及び排泄並びに拡散能力について製造業者により生体実験が実施された。組換え体の複製は鶏及び七面鳥からしか検出されておらず、鳩やあひるなどの他の鳥類では複製しなかった。組換え体の体内分布は、宿主の HVT から変化していないことが示された。ワクチン接種した鶏から接種していない鶏やあひるへの組換え微生物の伝播は認められなかった。しかし、七面鳥には伝播した。七面鳥は、組換え体の作出に使用した

ウイルスの天然の保有動物であることから予想された通りの結果である。

NDV は人や哺乳動物に軽度の結膜炎を起こすという報告があるため、組換えウイルスをウサギの目に接種したが、複製は起こらず症状も示さなかった。

4.7 組換え体と宿主の性状比較

組換え体の感受性動物の範囲、組織親和性、排泄及び拡散能力は宿主である HVT のワクチン株と同様であると考えられる。

4.8 侵入門戸、伝播

鳥類のヘルペスウイルスは、主にフケから排泄されて拡散する。しかし、野生型の HVT を初生鶏に接種した場合、頻繁には拡散しないことが報告されている (Cho and Kenzy, 1975)。宿主と同様に組換え微生物は、ワクチン接種した鶏から同居している非接種の鶏に拡散しなかった。野生型の HVT は環境中で存続することが知られているが、製造業者が実施した細胞随伴性ウイルスの環境中での生存は 7 日以内であった。

5. 人に対する安全性

5.1 過去の安全な使用

組換え体のカナダでの使用歴はないが、米国では 2007 年から使用されている。作出に使用した HVT はマレック病をコントロールするワクチンとして、数十年間安全に使用されている。NDV の遺伝子挿入は、完全なウイルスから 1 つの蛋白質を発現する部分だけを取り出したものであり、安全性に懸念があるとは考えられない。製品に使用されている溶解用液や保存剤は、他の製品で使用されており安全性の懸念はない。

5.2 人への暴露の可能性

ワクチン（細胞随伴性ウイルス）が直接人に暴露される可能性は、獣医師、農場従事者及び動物技術者による接種作業中に限られると考えられる。他の組換え HVT ワクチン観察されているのと同様に、ウイルスは接種した動物から限られた頻度で排泄されるかもしれない。従って、羽包上皮から排泄された成熟ウイルスが、人に暴露される可能性がある。

文献情報からは、ヘルペスウイルスは持続感染能を有しており、HVT は鳥の体内で長期間あるいは無期限に複製すると考えられるので (Calnek and Witter, 1991; Cho 1974)、食鳥処理場で働く人たちが組換えウイルスに暴露される機会がある。

組換えウイルスは内臓器官のリンパ球と羽包に局在しており、人の消費に供される主要な部分である肉には存在しないため、ワクチン接種鶏に由来する食肉を通じて人が暴露される可能性は、食肉処理後には減少している。さらに、もし鶏肉に組換えウイルスが残存していたとしても、摂取された核酸の大部分は人の消化管の中で分解されてしまう (Jonas et al., 2001)。

以上の様に人への暴露の機会はあるが、健康に悪影響があるとは考えられない。

5.3 人への暴露により起こりうる結果

HVT が鶏及び七面鳥以外の種に感染したという報告は無い。これらの種においても、ウイルスが複製しても臨床症状は起こさない。ニューカッスル病は人獣共通感染症とみなされており、暴露された人に一過性の結膜炎を引き起こすが、このワクチンの遺伝子挿入に使用した NDV の成分は暴露された人の健康に悪影響は与えないと思われる。このワクチンの誤注射を含む人への暴露は、深刻な悪影響を起こさないと考えられる。

5.4 作出に使用した微生物の人に対する病原性

上記したように、作出に使用した HVT は人に対して病原性は無いが、NDV は軽度の人獣共通感染症の病原体である。このワクチンは NDV の 1 つの蛋白質の遺伝子を含んでいるが、人に病原性は無いと思われる。

5.5 遺伝子操作が人への病原性に与える影響

NDV の遺伝子挿入は HVT の病原性に変化をもたらすことはないと考えられる。

5.6 ワクチンの広範な使用によるリスク

このワクチンの広範な使用により、深刻な公衆衛生上の問題は起きないと思われる。

6. 動物に対する安全性

6.1 過去の使用

組換え微生物は、対象動物種である鶏に 1 羽分又は 10 羽分使用しても安全であることが実験

資料 2. 審査データの概要

的に確認されている。非対象動物である鳥類（七面鳥、鳩、あひる）及び哺乳類（兎）においても同様に安全が確認されている。INNOVAX-ND-SB は、製造業者によって実施された野外安全性試験で 300 万羽以上の鶏に接種され、2007 年に米国で承認された。作出に使用した HVT は、マレック病をコントロールする鶏用ワクチンとして数十年使用されている。

6.2 対象動物種及び非対象動物種におけるワクチンウイルスの運命

野生型の HVT はどのような動物種に対しても臨床疾患を起こすとの報告はない。鶏における戻し継代では、組換え体が病原性を獲得する兆候は認められなかった。

対象動物及び非対象動物を用いた試験により、組換えワクチン株の感受性動物の範囲と親和性は、作出に使用した HVT の株から変化していなかった。またこの実験により鶏及び七面鳥で 21 日間（実験期間終了まで）感染が持続することが示され、文献的な情報から推察すると終世感染が持続すると考えられた (Calnek and Witter, 1991; Cho 1974)。

適用対象種である鶏又は非対象種である七面鳥におけるこの製品の長期に亘る安全性の試験は実施されていない。

6.3 接種動物から対象動物及び非対象動物への拡散能力

文献によると、HVT はワクチン接種した鶏のフケから散発的に排泄される。製造業者による実験では、組換え体は七面鳥以外の種に拡散することはなかった (Zygraich and Huygelan, 1972; Cho 1974)。七面鳥は作出に使用したウイルスの天然の保有動物である。

6.4 戻し継代による病原性の獲得

製造用原株は遺伝子型及び表現型において 5 代継代しても安定であった。米国連邦規則第 9 条 133.300 項に規定される外来性因子は存在しなかった。対象動物種である鶏における戻し継代では、組換えウイルスは病原性を獲得しないことが示された。

6.5 適用対象及び非対象動物に対する過剰接種の影響

ワクチン 1 羽分の 10 倍量を発育鶏卵に接種しても孵化率及び育成率に有害な影響はなく病変も認められなかったことを製造業者は報告している。

6.6 感受性動物の範囲及びベクターの移動性

HVT の感受性動物の範囲は非常に狭く、七面鳥と鶏に限られる。組換えウイルスは作出に使用したウイルスと同様に排泄され、鶏間では水平感染を起こさないが、同居飼育している七面鳥には水平感染する。

7. 環境への影響

7.1 環境への放出が起こる頻度

組換えウイルスはワクチン接種した鶏の羽包から排泄される。ワクチン接種された鶏の大部分は、バイオセキュリティの施された室内で飼育されるため、環境への直接の暴露は少ない。しかし、換気を行うときや鶏舎の清掃をするときには組換えウイルスの放出が起きるかもしれない。HVT に汚染されたゴミや空気（埃）は七面鳥に感染する能力があると思われる (Witter and Solomon, 1971)。

日常的なワクチンの使用において、事故的な流出、意図しない注射筒からのエアロゾル又は接種現場の汚染により環境中に放出される可能性がある。

7.2 環境中でのベクターの残存及び累積の影響

HVT は、ワクチン接種した鶏群の環境から接種後 8 週目に回収されるかもしれないことが研究により示されており、おそらくさらに長く残存するものと思われる (Islam and Walkden-Brown, 2007)。鶏の羽包から排泄された MD ウイルスは、環境中で 12 か月残存することが示されている (Schat, 1985)。

組換えウイルス（細胞随伴性ウイルス）は、環境中では 7 日以上生存できないことが製造業者により示されている。羽包から排泄された成熟ウイルスの生存期間や自然環境中でのウイルスの残存（羽包上皮から排泄され、鶏舎のゴミや埃に存在するものが、鶏舎の清掃後に堆肥中や日光照射によりどうなるかなど）については試験されていない。

ヘルペスウイルスは、一般に日光の紫外線により不活化されるのが典型的である (Lytle and Sagripanti, 2005)。しかし、乾燥した羽や鶏舎の埃に含まれる MD ウイルスは、一年以上感染性が残存することが報告されている (Jurajda and Klimes, 1970; Schat, 1985)。

7.3 対象動物以外の種への暴露の範囲

ヘルペスウイルスの感受性動物の範囲は非常に狭いため、対象動物以外の哺乳動物へ拡散するリスクは低い。ワクチン接種した鶏又は七面鳥の近くで飼養されている七面鳥は、鶏の飼養区域からの糞料や廃棄物あるいは直接鶏と接触するリスクがある。

組換えワクチンのウイルスは七面鳥に対して病原性がないことが製造業者により試験されているが、七面鳥の個体群にウイルスが拡散する可能性を減らす予防措置を講じるべきである。このために INNOVAX-ND-SB のラベル表示には特別な注意喚起として「この製品は、直接又は間接的に七面鳥に暴露される可能性がある鶏群には使用するべきではない。」と表示することに製造業者は同意した。

7.4 ベクター及び作出に使用したウイルスの非適用動物における習性

製造業者の実施した試験から、組換えウイルスは七面鳥を含む非対象動物に直接接種しても安全と考えられる。このウイルスが、長い時間をかけてどのように振舞うか、天然の七面鳥の中に定着するかについて調べる現実的な方法はない。

8. 環境に関する結論

8.1 リスクと利益

このワクチンは、移行抗体陽性鶏に接種した場合にも免疫を誘導する効果があるとみなされる。移行抗体に打ち勝つ免疫誘導力は、現在使用可能な多くの ND ワクチンにとっての課題である。さらに、免疫原性が非常に高いが病原性が残っている ND 生ワクチンに認められるような副作用は、この組換えワクチンにはないと見なされる。

INNOVAX-ND-SB に認められた最初リスクは、どのようなワクチンにも認められるような、副作用を起こす可能性があることである。製品の一般的な安全性は、製造業者が実施した鶏での臨床試験により確認されている。

さらに論理的なリスクとして七面鳥の個体群（及び他のキジ科鳥類）に拡散して環境中に定着する可能性がある。しかしながら重要なことは、仮に七面鳥に拡散したとしても、この組換えウイルスは七面鳥に病原性を示さないと考えられることである。製造業者が実施した試験の中で、組換えウイルスを感染させた七面鳥は（直接接種及び水平感染ともに）、約 4 週齢までの試験期間中、野生型の HVT を感染させた七面鳥と同様に健康であった。それでもさらに七面鳥に拡散するリスクを軽減するため、INNOVAX-ND-SB のカナダ用のラベル表示には、ワクチン接種した鶏と七面鳥の接触を避ける措置を取るべきであるとの予防的な記述がなされている。

結論として、七面鳥がワクチンウイルスに意図せずに感染してしまう論理的リスクがあるが、そのような現象が七面鳥に起きても確認できる方法はなく、鶏の健康を促進するためにワクチンを使用する利益は、七面鳥にワクチンウイルスが拡散するリスクを上回ると考えられる。

8.2 他のワクチンと比較した相対的安全性

このワクチンは、2 種類の非病原性の生きた MD ウイルスと ND ウイルスの遺伝子からなり、これらはすべて病原体ではない。このワクチンは、従来の MD ワクチンと同様に対象動物及び非対象動物に対して安全である。病原性を獲得する可能性がないこと、典型的な不活化ワクチンに使用されるアジュバントを使用していないことが、このワクチンの安全性の特徴である。

9. 軽減措置

9.1 労働者の安全

獣医師、養鶏従事者及び動物技術者は、ワクチン接種作業中に生きた組換えウイルスに暴露されうる。上記 5 節で論じたように、そのような暴露による安全上の懸念はない。INNOVAX-ND-SB の推奨されるワクチン経路である卵内接種は、ひなへの接種と比較して接種者への誤注射の発生が少ない方法である。さらに、ワクチンはアジュバントを含んでいないため、誤注射時にアジュバントによる臨床的問題も起きない。それでもなお、製品の添付文章に従って作業者を暴露から守る措置を取るべきである。

9.2 ワクチン接種又は暴露された動物の扱い

鶏はバイセキュリティの施された施設で飼養され人の手で扱うことは頻繁でなく、養鶏従事者は予防的なバイオセーフティの措置が講じられており、ワクチン接種したひなを扱うことによる暴露は多いとは考えられない。しかし、フケとともに排泄されたワクチンウイルスに

資料 2. 審査データの概要

汚染された鶏舎の空気や埃を通じて、養鶏従事者はワクチンウイルスに暴露されるかもしれない。それでも、ワクチンウイルスは人に対して病原性があるとは考えられない。

10. モニタリング

10.1 一般

カナダにおけるワクチン承認の法的要求として、製造業者はすべての深刻で明らかな副作用について所有者や獣医師から情報を提供されてから 15 日以内に CFIA に届け出なければならない。獣医師は、副作用と疑われる有害事象を CIFA に直接報告するかもしれない。CCVB は副作用報告を受け取ると、製造業者に対して、調査を実施し所有者の獣医師と CIFA に報告をするように求める。獣医師と所有者が満足するように問題が解決されれば、CCVB はそれ以上の要求は行わない。しかし、調査の結果が不満であれば、CCVB は状況により、更なる安全性の試験、一時的な出荷停止又は承認取消し含む規制を行う。

10.2 人

この製品の人に対するモニタリングは行わない。

10.3 動物

上記したように、獣医師はいかなる副作用の疑いも CCVB に報告しなければならない。副作用の疑いの報告は、様式 CFIA/ACIA2205「動物用生物学的製剤の副作用の疑いの届出」を用いる。

11. 問い合わせ及び連絡先

輸入者： Intervet Canada Corp.
16750, route Transcanadienne
Kirkland, QC H9H 4H7

製造業者： Intervet Inc.
29160 Intervet Lane, Box 318
Millsboro, Delaware USA 19966-0318

12. 結論

入手可能な情報に基づく影響評価により、ニューカッスル病・マレック病（マレック病ウイルス 2 型、七面鳥ヘルペスウイルスベクター）生ワクチンのカナダにおける輸入及び使用は、製品が承認された製造工程に従って生産され、使用書に従って使用される限りにおいて環境に悪影響を及ぼさないと、CCVB は結論する。

この影響評価及びカナダの動物用生物学的製剤の承認審査の終了により、Intervet Canada Corp. に対し下記の製品をカナダで輸入及び販売を許可するための動物用生物学的製剤の輸入許可は修正され则认为られる。

・ニューカッスル病・マレック病（マレック病ウイルス 2 型、七面鳥ヘルペスウイルスベクター）生ワクチン（商品名「INNOVAX-ND-SB」、米国農務省製品コード番号 17H1.R2、CCVB 登録番号 800VV/M10.0/I6.2）

この製品のすべてのバッチは、カナダへの輸入の前に米国農務省により検定が行われる。動物用生物学的製剤の輸入許可に記載されているすべての条件に従って、この製品の輸入及び販売が行われる。

13. 参考文献

- Alfonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Rock D.L., Kutish G.F. (2001). The Genome of Turkey Herpesvirus. *Journal of Virology* 75:971-978
- Baigent S.J., Smith L.P., Nair V.K., Currie R.J.W. (2006). Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges and future strategies to maximize protection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112:78-86.

資料 2. 審査データの概要

- Calnek B.W., Witter R.L. (1991). Marek's Disease. In *Diseases of Poultry*, edited by B.W. Calnek et al., Iowa State University Press, Iowa, pages 342-385.
- Cho B.R. (1974). Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens IV. Maturation in the feather follicle epithelium. *Avian Diseases* 19:136-141.
- Cho B.R., Kenzy S.G. (1975). Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 3. Transmission in three different lines of chickens. *Poultry Science* 54:109-115.
- Fadly, A.M. (2006). Marek's Disease. In *The Merck Veterinary Manual*, 9th edition, edited by C.M. Kahn, S. Line, S.E. Aiello, Merck & Co., Inc., New Jersey.
- Fukuchi K., Sudo M., Tanaka A., Nonoyama M. (1985). Map locations of homologous regions between Marek's disease virus and herpesvirus of turkey and the absence of detectable homology in the putative tumour-inducing gene. *Journal of Virology* 53:994-997.
- Gibbs C.P., Nazerian K., Velicer L.F., Kung H. (1984). Extensive homology exists between Marek's disease herpesvirus and its vaccine virus, herpesvirus of turkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:3356-3369.
- Glaser L.C., Barker I.K., Weseloh D.V.C., Ludwig J., Windingstad R.M., Key D.W., Bollinger T.K. (1999). The 1992 epizootic of Newcastle disease in double-crested cormorants in North America. *Journal of Wildlife Diseases* 35:319-330.
- Islam A., Walkden-Brown S.W. (2007). Quantitative profiling of the shedding rate of the three Marek's disease virus (MDV) serotypes reveals that challenge with virulent MDV markedly increases shedding of vaccinal viruses. *The Journal of General Virology* 88:2121-2128.
- Jonas, D.A., Elmadfa, I., Engel, K.-H., Heller, K. J., Kozianowski, G., König, A., Müller, D., Narbonne, J. F., Wackernagel, W. and Kleiner, J. (2001). Safety considerations of DNA in food. *Annals of Nutrition & Metabolism* 45(6): 235-254.
- Jurajda, V. and Klimes, B. (1970). Presence and survival of Marek's disease agent in dust. *Avian Diseases* 14(1):188-190.
- Karaca G., Anobile J., Downs D., Burnside J., Schmidt C. (2004). Herpesvirus of turkeys: microarray analysis of host gene responses to infection. *Virology* 318:102-111.
- Kinde H., Hullinger P.J., Charlton B., McFarland M., Hietala S.K., Velez V., Case J.T., Garber L., Wainwright S.H., Mikolon A.B., Breitmeyer R.E., Ardans A.A. (2005). The isolation of exotic Newcastle disease (END) virus from non poultry avian species associated with the epidemic of END in chickens in southern California: 2002-2003. *Avian Diseases* 49:195-198.
- King, D.J. (2006). Newcastle Disease. In *The Merck Veterinary Manual*, 9th edition, edited by C.M. Kahn, S. Line, S.E. Aiello, Merck & Co., Inc., New Jersey.
- Lytle, C. D. and Sagripanti, J.-L. (2005). Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *Journal of Virology* 79(22): 14244-14252.
- Powell P.C. (1986). Marek's Disease – A world poultry problem. *World's Poultry Science Journal* 14:205-218.
- Schat K.A. (1985). Characteristics of the virus. In *Marek's Disease*, edited by L.N. Payne, Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
- Weingartl H.M., Riva J., Kumthekar P. (2003). Molecular characterization of avian paramyxovirus 1 isolates from cormorants in Canada from 1995 to 2000. *Journal of Clinical Microbiology* 41:1280-1284.
- Witter, R. L. and Solomon, J. J. (1971). Epidemiology of a herpesvirus of turkeys: Possible sources and spread of infection in turkey flocks. *Infection and Immunity* 4(4): 356-361.
- Wobeser G., Frederick A.L., Normal R., Myers D.J., Onderka D., Pybus M.J., Neufeld J.L., Fox G.A., Alexander D.J. (1993). Newcastle disease in wild water birds in western Canada, 1990. *Canadian Veterinary Journal* 34:353-359.
- Zygraich N., Huygelen C. (1972). Inoculation of one-day-old chicks with different strains of turkey herpesvirus. II. Virus replication in tissues of inoculated animals. *Avian Diseases* 16:793-798.

一般公開されている原文の URL

<http://epe.lac-bac.gc.ca/100/206/301/cfia-acia/2011-09-21/www.inspection.gc.ca/english/anima/vetbio/eae/vbeanewcaste.shtml>

別添 35 食鳥処理後の鶏の可食部位における HVT-NDV/F 株の感染性ウイルスの残存（海外試験）**目的：**

HVT-NDV/F 株を接種した鶏の食鳥処理後の筋肉及び可食臓器における安定性を評価する。

方法：

5 日齢の鶏に高用量の HVT-NDV/F 株を接種した。4 週齢時にすべての試験鶏をと畜し、筋肉（胸及び大腿）、肝臓、心臓、筋胃、を採取し 4℃及び-20℃に保存した。と畜後 24、48 及び 72 時間目に臓器サンプルからウイルス回収を試みた。

結果：

感染性の HVT-NDV/F 株は、4℃で 24 時間保存した心臓及び肝臓から検出された。大腿筋、胸筋及び筋胃からは、どの時点においてもウイルスを回収できなかった。と畜後 48 及び 72 時間目には、どの臓器サンプルからもウイルスは回収されなかった。-20℃に保存した臓器からは、どの時点においてもウイルスは回収されなかった（表 1）。

表 1 4℃及び-20℃保存後の筋肉及び可食臓器における感染性ウイルスの存在

検査部位	24 時間		48 時間		72 時間	
	4℃	-20℃	4℃	-20℃	4℃	-20℃
胸筋（胸肉）	—	—	—	—	—	—
大腿筋（もも肉）	—	—	—	—	—	—
肝臓（レバー）	+	—	—	—	—	—
心臓（ハツ）	+	—	—	—	—	—
筋胃（砂肝）	—	—	—	—	—	—

結論：

HVT-NDV/F 株の安定性は、肝臓及び心臓においてと畜後 24 時間から 48 時間の間である。筋肉及び筋胃ではと畜後 24 時間目に感染性のウイルスは検出されなかった。-20℃での凍結により、ウイルスの感染性は失活する。

別添 36 日本国内におけるキジ科野鳥の死亡事例に関する調査

日本国内においては、野生鳥獣の大量死や異常死等が発見された場合、管轄の都道府県に報告が寄せられ、必要に応じて報道や家畜保健衛生所での検査が行われる。鳥類の大量死に関わる最も大きな関心事は鳥インフルエンザであり、鳥インフルエンザの検査結果は環境庁が取りまとめている。平成 22 年以降は、検査に供試された野鳥の種類が公開されているので、供試されたキジ科鳥類について表 1 にまとめた。

鳥インフルエンザの死亡野鳥等調査に供試されたキジ科鳥類は、合計 6 羽であった。死亡状況について不明であるが、これらキジ科鳥類は高病原性及び低病原性インフルエンザウイルス共に陰性であった。

鳥インフルエンザの検査以外の野鳥の死亡について、報道資料や学術報告から検索を行った（結果は社外秘につき非公開）。64 の死亡事例について調べたが、このうちキジ科鳥類の死亡事例は 1 例であった。事例 23 のヤマドリ 1 羽の死亡原因は、外傷であった。

この他に、キジ科野鳥の死亡又は発症に関する事例について見出すことは出来なかった。収集出来なかった情報もあるかもしれないが、キジ科野鳥の死亡や発症の頻度は低いと考えられた。また、養鶏場とキジ科野鳥の死亡との関連を示す事例も見出すことは出来なかった。

表 1 鳥インフルエンザの死亡野鳥等調査に供試されたキジ科鳥類の羽数

死亡野鳥等調査	調査シーズン			合計
	平成 22～23 年 ¹⁾	平成 23～24 年 ²⁾	平成 24～25 年 ³⁾	
検査総数	5649	444	370	6463
キジ科鳥類	キジ 4* コジュケイ 1	なし	ヤマドリ 1	6

*数値は検体数を表し、例数は不明である。

- 1) 昨シーズン（22-23 年度）の野鳥における高病原性鳥インフルエンザの発生に関する考察（平成 23 年 9 月 9 日、環境省自然環境局）
- 2) 平成 23-24 年シーズンの鳥インフルエンザウイルス保有状況調査の結果について（平成 24 年 8 月 22 日、環境省自然環境局鳥獣保護業務室）
- 3) 平成 24-25 年シーズンの鳥インフルエンザウイルス保有状況調査の結果について（平成 25 年 9 月 6 日、環境省自然環境局鳥獣保護業務室）

別添 37 米国におけるキジ科野鳥の死亡事例に関する調査

米国においては、国内で起きた野生動物の死亡事例について米国立野生動物保護センター (National Wildlife Health Center) が情報を収集しており、死亡事例の発生場所、動物種、死亡原因について取りまとめている。集められた情報は、自然資源管理者、研究者、公衆衛生当局、病気の予防と低減に関する法律の制定、人と家畜と野生動物の共通疾病への対処及び通常の病気とバイオセキュリティの識別に利用されることを目的として公開されている。このレポートから七面鳥以外のキジ科野鳥の死亡事例について抜粋した (表 1)。

米国におけるキジ科野鳥の死亡事例は、6 件確認された。このうちの 5 件については原因が明らかであったが、2012 年のキジオライチョウの件については原因不明であった。2012 年のキジオライチョウの件の発生場所は、カリフォルニア州北部のクリア・レイク国立野生動物保護区内にあり、その地理的位置を図 1 に示した。米国内での七面鳥、肉用鶏及び採卵鶏の飼養地域を図 2、3 及び 4 にそれぞれ示した。クリア・レイクから最も近い七面鳥の農場は、カリフォルニア州の中部にあり、200km 以上の距離がある。また、最も近い養鶏場は、オレゴン州南部の採卵農場であるが、100km 程の距離がある。地理的位置関係から、2012 年のキジオライチョウの死亡事件の原因は、七面鳥や鶏の飼養とは関連がないと考えられた。

この他に、七面鳥の飼養地域周辺でキジ科鳥類が死亡あるいは症状を示した事例を見つけることは出来なかった。

表 1 米国におけるキジ科野鳥の死亡事件

発生年月日	場所	種	原因
2012/9/3 ～11/30	カリフォルニア (クリア・レイク)	キジオライチョウ (Greater sage grouse) 約 40 羽	不明 (消瘦)
2006/8/7 ～9/16	オレゴン	キジオライチョウ (Sage grouse) 69 羽	ウイルス感染: ウェストナ イルウイルス
2003/8/1 ～8/31	ワイオミング、モ ンタナ	キジオライチョウ (Sage grouse) 約 22 羽	ウイルス感染: ウェストナ イルウイルス
2001/8/14 ～8/31	ノースダコタ	コウライキジ (Ring-necked Pheasant)、アメリカシロベ リカン、未確認のカモ類、未確 認のカモメ類 136 羽	C 型ボツリヌス毒素
1992/4/16 ～4/17	テキサス	コウライキジ (Ring-necked pheasant)、ソリハシセイタカ シギ、ミカヅキシマアジ、マキ バシギ 約 100 羽	外傷 (雹)
1986/8/2 ～8/11	アイダホ	キジオライチョウ Sage grouse 50 羽	中毒 (有機リン剤)

出典: Quarterly Mortality Reports, National Wildlife Health Center

※七面鳥の死亡事例は表に含めなかった。

※米国産のウズラ類は、ナンバイウズラ科 Odontophoridae に属し、キジ科 Phasianidae とは異なるため、表に含めなかった。

資料 2. 審査データの概要

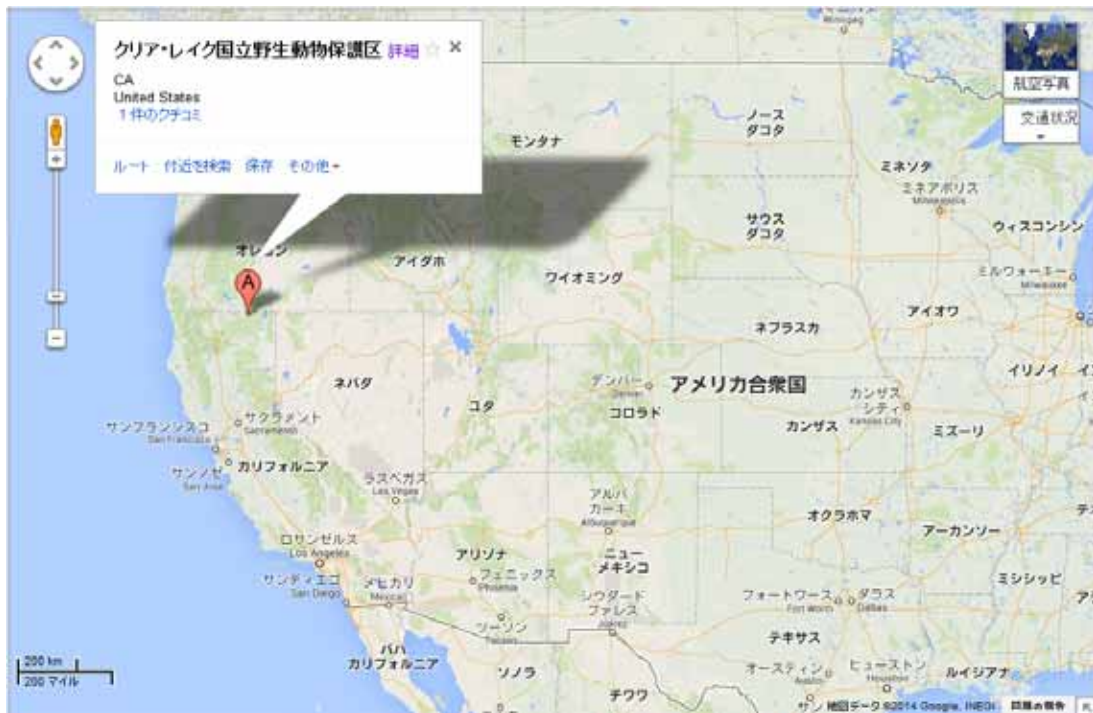


図 1 クリア・レイク国立野生動物保護区の地理的位置

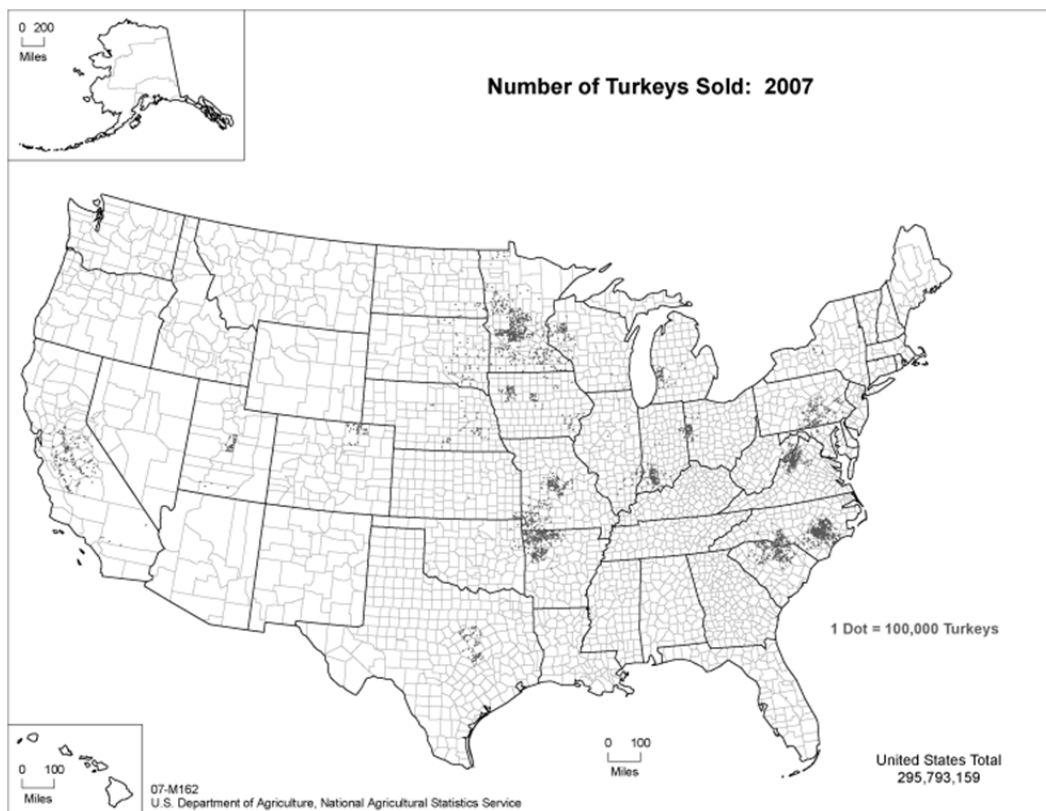


図 2 七面鳥の飼養地域の地理的位置

資料 2. 審査データの概要

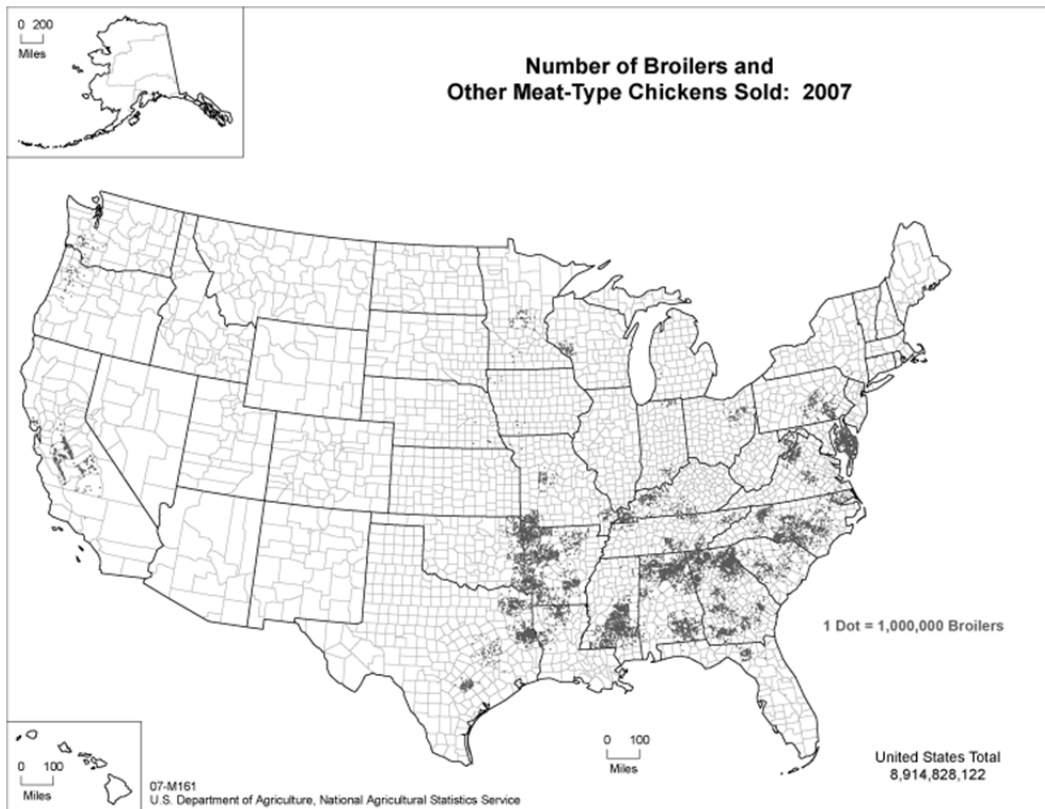


図 3 肉用鶏の飼養地域の地理的位置

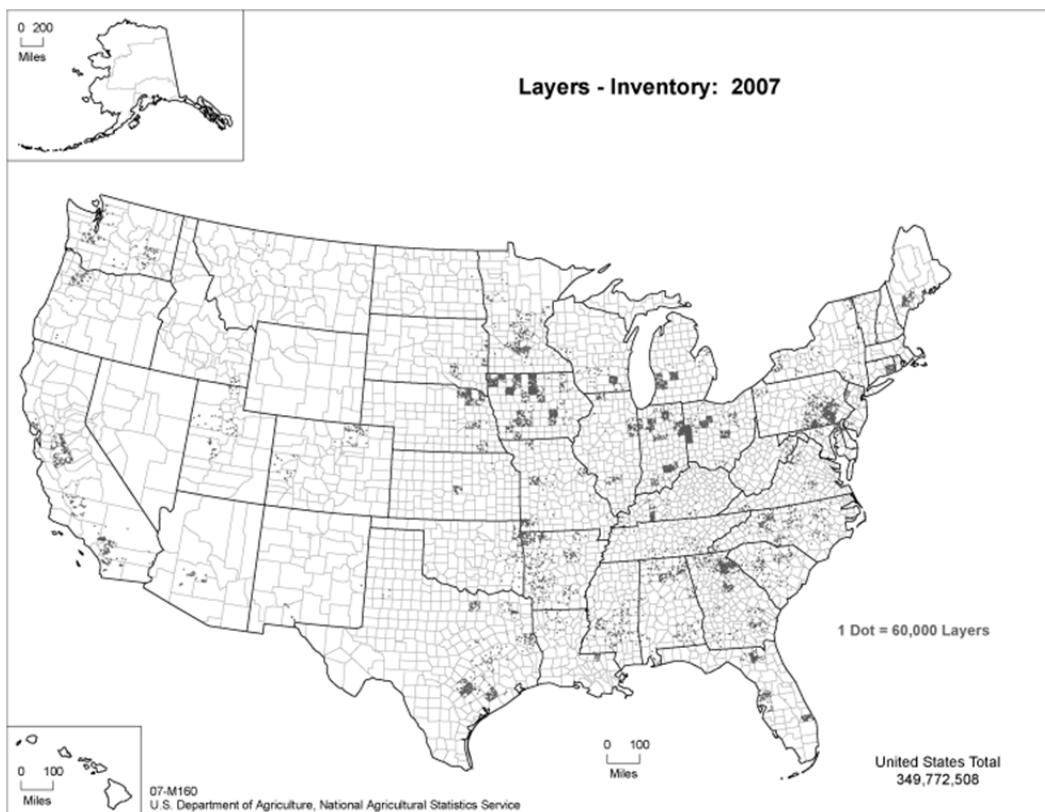


図 4 採卵鶏の飼養地域の地理的位置

別添 38 七面鳥ヘルペスウイルスの感受性鳥類及び自然界における維持

マレック病は、病原性のマレック病ウイルス 1 型（以下「MDV1」）の感染により起こるリンパ腫瘍及び神経障害を特徴とした鶏の疾病で、養鶏産業上重要な疾病の 1 つである。マレック病の予防には生ワクチンが有効であり、弱毒化した MDV1、非病原性のマレック病ウイルス 2 型（以下「MDV2」）及び七面鳥ヘルペスウイルス（以下「HVT」）が生ワクチンとして使用されている。

HVT は、健康な七面鳥に由来し、七面鳥の飼育群に広く分布している。野生の七面鳥からの分離例もある。HVT の異名としてマレック病ウイルス 3 型（以下「MDV3」）があり、抗原的に MDV1 及び MDV2 と類似しているが、MDV1 は病原性を示すのに対し、MDV2 及び本ウイルスは非病原性である。

組換え体の宿主として用いた PB1 株は、1969 年頃に英国の Norfolk で健康な七面鳥の血液から分離された株である¹⁾。

HVT の自然界における保有動物は、七面鳥である。本来の保有動物以外に実験的に HVT の感染が確認されている鳥類は、鶏¹⁾、うずら²⁾及びコウライキジ⁹⁾であり、感染が否定されているのは、あひる¹⁰⁾、鳩¹⁰⁾、コリンウズラ⁹⁾である。感染が成立する鶏、うずら及びコウライキジはキジ科の鳥であり、同じキジ科のきじ、やまどり、ライチョウは HVT に感受性を示す可能性があるが、本来の保有動物との系統的な遠さにより感染の可能性は低くなると考えられる。

本来の保有動物である七面鳥は、HVT の存在する地域で飼育を行うと自然感染し、10 週齢までに群内のすべての個体がウイルス及び抗体を保有するようになる³⁾。HVT を七面鳥に接種した場合、接種した個体はすべて感染し、接種した個体と同居している個体もすべて感染する⁴⁾。他のキジ科鳥類での HVT 感受性を調べたデータは少ないが、鶏では接種した個体はすべて感染するものの、同居している個体は感染しないか又は感染しても一部の個体に限られる^{5, 6, 7, 8, 11)}。うずらでは、感染率を示すデータはないが接種すると抗体が産生され感染が成立する。また、養鶉において HVT は養鶏と同様にマレック病ワクチンとして使用されている²⁾。コウライキジでは、HVT を接種した個体の一部しかウイルスを保有しておらず、HVT の感受性が低いことが示唆されている⁹⁾。これらの知見から、七面鳥は本来の保有動物であり、他のキジ科鳥類の感受性は低いと考えられる。きじ、やまどり、ライチョウ等のキジ科鳥類が HVT に感受性を示したとしても、これらの鳥類における HVT の感受性は七面鳥に比べ低いと考えられることから、一部の個体に感染が成立したとしても群内に感染が拡大し、維持されることはないと推察される。

七面鳥と鶏における HVT 感染の異なる点は水平感染の起こりやすさである。

HVT は、羽包で増殖し体外に排泄されたものが感染源になると考えられるが、鶏に感染した場合、羽包での増殖は感染後 2～3 週後の一過性の経過を示し^{7, 8)}、排泄が短い期間で終息することが、HVT の鶏での水平感染が一部の個体に限定される理由と考えられる。

資料 2. 審査データの概要

HVT を鶏に接種すると、接種後 1～4 日間、肺、胸腺、ファブリキウス嚢、脾臓等のリンパ組織で増殖し、その後白血球が感染することにより他の臓器に拡がっていく。早い個体で 6 日、3～4 週後にはほとんどの個体でウイルス血症を起こす⁷⁾。

HVT は細胞随伴性であるため、生存には生きた細胞が必須であり、細胞外の環境で増殖又は生存することはできない。しかし、HVT に感染した七面鳥の皮膚の乳剤は感染性を有しているため、HVT は羽包上皮で成熟しセelfリーのウイルスとして排泄されたものが感染源になると考えられている^{7,8)}。セelfリーのウイルスは、鶏では感染後 2～3 週目に羽包から検出され、その時期を過ぎると検出されにくくなる。排泄が終息しても、鶏は体内で持続感染に陥り長期間免疫が持続する⁷⁾。

体外に排泄された HVT の感染経路に関しては、鶏では事例が限られているが、鶏及び七面鳥において空気感染（塵埃感染）することが確認されている^{4,5,6)}。接触により感染するとの文献^{7,8)}もあるが、同居により感染したという観察に基づくものであり、皮膚や粘膜の接触による感染や排泄されたウイルスに汚染された餌や水からの経口的な感染の有無について実証されたデータは含まれておらず、接触感染が成立することは十分に実証されていない。その他に、口腔や糞便からの排泄は認められないため^{12,13)}、飛沫感染及び飛沫核感染はないと考えられる。また、垂直感染は起こさないことが確認されている^{7,8)}。

以上のことから、HVT の主な感染経路は、対外に排泄されたウイルスを呼吸により吸い込むことで感染を生じる空気感染（塵埃感染）であると考えられる。

同種のウイルス内での株間の組換えについては、HVT においても異なる株との重感染の機会があれば相同組換えを起こすであろうと考えられるが、HVT はワクチンを接種していない鶏から分離された例はないこと⁷⁾、日本国内に野生の保有動物はいないことから野外感染による重感染の機会はほとんど無いと考えられる。

引用資料

- 1) “Viraemia and antibody development in chicks following the administration of turkey herpesvirus.” Churchill A.E. *et al.*, 1973, Veterinary Record 92(13):327-334 (文献 1)
- 2) “The effect of HVT vaccine in Japanese Quail I.” Sugiura R. *et al.*, 1982, Research Bulletin of Aichi Agricultural Research Station 14:450-455 (文献 2)
- 3) “Epidemiology of a herpesvirus of turkeys: Possible sources and spread of infection in turkey flocks” Witter R. L. and Solomon J. J., 1971, Infection and Immunity 4(4):356-361 (文献 3)
- 4) “Experimental infection of turkeys and chickens with a herpesvirus of turkeys (HVT)” Witter R. L. and Solomon J. J., 1972, Avian Diseases 16(1):34-44 (文献 4)
- 5) “Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 1. Preliminary observation” Cho B. R. *et al.*, 1971, Poultry Science 50(3):881-887 (文献 5)
- 6) “Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens 5. Airborne transmission between chickens” Cho B. R., 1976, Poultry Science 55:1830-1833 (文献 6)
- 7) “Turkey herpesvirus and Marek’s disease virus. A comparative appraisal” Prasad L. B. M., 1979, Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease 2(2-3):335-358. (文献 7)

資料 2. 審査データの概要

- 8) “Nononcogenic turkey and chicken herpesvirus (HVT)” Schat K. A. and Nair V., 2008, in “Disease of Poultry 12th Edition” (Sarif Y. M. ed.) p491-492, Backwell Publishing Professional. Iowa. (文献 8)
- 9) The effect of HVT/ILT-138 on non-target species (別添 1 の原資料)
- 10) *In-vivo* growth after intramuscular inoculation of the recombinant herpesvirus of turkey HVT-NDV/F and its parent strain PB1 in various avian species (別添 2 の原資料)
- 11) Spread of the recombinant herpesvirus of turkey HVT-NDV/F and of the parent HVT Strain PB1 to in-contact chickens (別添 3 の原資料)
- 12) Dissemination of the recombinant herpesviruses of turkey HVT-NDV/F and HVT-NDV/HN in SPF chickens after inoculation by the subcutaneous route (別添 6 の原資料)
- 13) Dissemination of the recombinant herpesviruses of turkey HVT-NDV/F and HVT-NDV/HN in SPF chickens after inoculation by the intramuscular route (別添 7 の原資料)

資料 2. 審査データの概要

資料 3 . 緊急措置計画書

緊急措置計画書

平成27年 6月 4日

氏名 株式会社インターベット
代表取締役社長 武本 行弘

住所 大阪府中央区平野町二丁目3番7号

第一種使用規程の承認を申請しているニューカッスル病ウイルス由来F蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルスHVT-NDV/F株(以下「本組換え微生物」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 (株式会社インターベット 開発本部長)

実施責任者は、米国で製造されて日本に輸入される本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、本組換え体を製造した米国の法人(以下「米国法人」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組換え微生物の製造状況、輸入業者等の情報提供を米国法人に依頼するとともに、本組換え微生物の治験の受託機関、実施機関、販売先の使用者、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の受託機関、実施機関、販売先、販売実績のある販売代理店に対して、販売先の情報提供を依頼し、本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

米国法人に、本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、米国法人のホームページにおいても、本件についてのお知らせを掲載するとともに、問合せ窓口を設置することを協議する。

日本国内においてはプレスリリースを行う等メディアを通じて広く使用者に周知するとともに、2で把握した関係者に対して、電話や文章などにより連絡を取る。また、当社のホームページにおいても、本件についてのお知らせを掲載するとともに、問い合わせ専用窓口を設置する。

資料３．緊急措置計画書

ただし、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) 米国法人に対して、本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組換え微生物が治験に使用されている場合は、本組換え微生物が自然環境に拡散しないように必要な拡散防止措置(本組換え微生物によって汚染されたおそれのある施設、糞や敷料等の資材や死体等の消毒も含む)を直ちに執るよう治験の受託機関及び実施機関に要請するとともに、本組換え微生物を含む使用残の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直ちに執るよう治験の受託機関に要請する。
- (３) 日本国内において販売され流通過程にある場合には、本組換え微生物の販売中止及び回収を行い、回収した本組換え微生物は密封容器に保管の上、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、密封容器に本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組換え微生物が動物に接種されている場合には、隔離飼育又は安楽死等の措置を実施することを関係者に要請する。

５ 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

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

資料 3 . 緊急措置計画書

(別添1)

・実施体制

業務安全委員会

委員長 開発本部長

委員 開発本部 薬事グループ

委員 開発本部 R&Dグループ

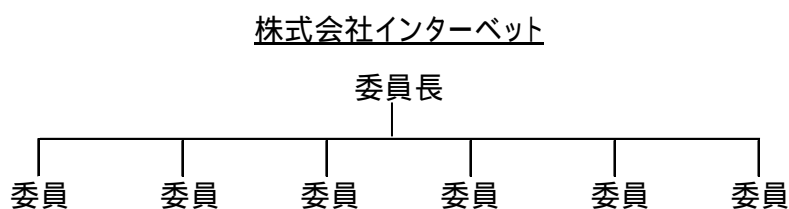
委員 開発本部 R&Dグループ

委員 キャトル&スワイン事業部

委員 ポートリー & アクア事業部

委員 コンパニオンアニマル事業部

・実施体制図



	氏名	職名
委員長	【個人情報につき非開示】	開発本部 開発本部長
委員	【個人情報につき非開示】	開発本部 薬事グループ
委員	【個人情報につき非開示】	開発本部 R&Dグループ
委員	【個人情報につき非開示】	開発本部 R&Dグループ
委員	【個人情報につき非開示】	キャトル&スワイン事業部
委員	【個人情報につき非開示】	ポートリー & アクア事業部
委員	【個人情報につき非開示】	コンパニオンアニマル事業部

引用文献（文献として添付）

- 文献 1 “Viraemia and antibody development in chicks following the administration of turkey herpesvirus.” Churchill A.E. *et al.*, 1973, Veterinary Record 92(13):327-334
- 文献 2 “The effect of HVT vaccine in Japanese Quail I.” Sugiura R. *et al.*, 1982, Research Bulletin of Aichi Agricultural Research Station 14:450-455
- 文献 3 “Epidemiology of a herpesvirus of turkeys: Possible sources and spread of infection in turkey flocks” Witter R. L. and Solomon J. J., 1971, Infection and Immunity 4(4):356-361
- 文献 4 “Experimental infection of turkeys and chickens with a herpesvirus of turkeys (HVT)” Witter R. L. and Solomon J. J., 1972, Avian Diseases 16(1):34-44
- 文献 5 “Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 1. Preliminary observation” Cho B. R. *et al.*, 1971, Poultry Science 50(3):881-887
- 文献 6 “Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens 5. Airborne transmission between chickens” Cho B. R., 1976, Poultry Science 55:1830-1833
- 文献 7 “Turkey herpesvirus and Marek's disease virus. A comparative appraisal” Prasad L. B. M., 1979, Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease 2(2-3):335-358.
- 文献 8 “Nononcogenic turkey and chicken herpesvirus (HVT)” Schat K. A. and Nair V., 2008, in Disease of Poultry 12th Edition” (Sarif Y. M. ed.) p491-492, Backwell Publishing Professional. Iowa.
- 文献 9 “The genome of turkey herpesvirus” Afonso C.L. *et al.*, 2001, Journal of Virology 75(2):971-978.
- 文献 10 “Public health implications of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys. Studies on human and subhuman primates” Sharma J. M. *et al.*, 1973, Journal of The National Cancer Institute 51(4):1123-1128.
- 文献 11 “Lack of pathogenicity of Marek's disease virus and herpesvirus of turkey in marmoset monkeys” Sharma J. M. *et al.*, 1972, Journal of The National Cancer Institute 49(4):1191-1197.

資料 4 . その他

- 文献 12 “Characterization of non-oncogenic Marek’s disease virus-infected and turkey herpesvirus -infected lymphocytes” Sheck W. S. *et al.*, 1982, Journal of General Virology 63:333-341
- 文献 13 “Latent turkey herpesvirus infection in lymphoid nervous, and feather tissue of chickens” Holland M. S. *et al.*, 1998, Avian Diseases 42(2):292-299.
- 文献 14 “Budding events in herpesvirus morphogenesis” Mettenleiter T.C., 2004, Virus research 106 : 167-180
- 文献 15 “Herpesvirus assembly: An update” Mettenleiter T.C. *et al.*, 2009, Virus research 143 : 222-234
- 文献 16 “Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences.” Marcos P-L. *et al.*, 2015, Infection, Genetics and Evolution 30:296-307
- 文献 17 “Characterization of interspecific recombinants generated from closely related bovine herpesviruses 1 and 5 through multiple PCR sequencing assays” Maria P.D.M.Z. *et al.*, 2009, Journal of Virological Methods, 161: 75-83
- 文献 18 “Recombination of Globally circulating varicella-zoster virus” Peter N, *et al.*, 2015, Journal of Virology. 89(14):7133 -7146
- 文献 19 “Herpesviruses and chromosomal Integration” Morissette G. and Flamand L., 2010, Journal of Virology 84(23):12100-12109
- 文献 20 “Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in White Leghorn chickens” Bacon L. D. *et al.*, 2001, Avian pathology. 30(4):487-499
- 文献 21 “Herpesvirus Connection in the Expression of Auto immune Vitiligo in Smyth Line Chickens” Ref G. F., *et al.*, 2015, Pigment Cell Res. 14(1):40-46
- 文献 22 “Dynamics of Marek’s disease virus and herpesvirus of turkey shedding in feather dander of broiler chickens” Islam A. F. M. F. *et al.*, 2005, Proceedings of the Australian poultry science symposium, 17:105-108
- 文献 23 “The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection.” Gorman C. M. *et al.*, 1982, Proceedings of National Academy of Science 79(22):6777-6781

資料4 . その他

- 文献 24 “Mutations in the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein in the promotion of fusion.” Deng R. *et al.*, 1999, *Virology* 253(1):43-54
- 文献 25 “The characterization of monoclonal antibodies to Newcastle disease virus” Russell P. H. *et al.*, 1983, *Journal of General Virology* 64(9):2069-2072.
- 文献 26 “Technical Bulletin. pGEM-3Z Vector” Promega
- 文献 27 “Avian herpesvirus as a live viral vector for the expression of heterologous antigens.” Sondermeijer P. J. A. *et al.*, 1993, *Vaccine* 11(3):349-358.
- 文献 28 “Protection of chickens from Newcastle and Marek’s diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein.” Morgan R. W. *et al.*, 1992, *Avian Diseases* 36(4):858-870.
- 文献 29 “Quantitative pathogenicity of Marek’s disease virus and vaccine virus strains in chicken: Macroscopical aspects” Mass H. J. L. *et al.*, 1978, *Avian Pathology* 7(1):61-78
- 文献 30 “ウイルス発癌の新しい分子機構” 前田直良、吉開泰信、2007 年、*ウイルス* 57(2): 159-170
- 文献 31 “Retroviral DNA integration.” Hindmarsh P. and Leis J., 1999, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(4):836-843
- 文献 32 “Evidence of avian leukosis virus subgroup e and endogenous avian virus is measles and mumps vaccines derived from chicken cell: Investigation of transmission to vaccine recipients.” Tsang S. X. *et al.*, 1999, *Journal of Virology* 73(7):5843-5851
- 文献 33 “Isolation and characterization of an adventitious avian leukosis virus isolated from commercial Marek’s disease vaccines” Fadly A. *et al.*, 2006, *Avian Disease* 50:380-385
- 文献 34 “Reticuloendotheliosis group virus pathogenic to chicken isolated from material infected with turkey herpesvirus (HVT)” Koyama H. *et al.*, 1976, *Avian Disease* 20(2):429-434
- 文献 35 “Differential amplification and quantification of Marek’s disease virus using real-time polymerase chain reaction.” Islam, A., *et al.* 2004. *J. Virol. Methods* 119, 103-113

資料 4 . その他

本申請書で使用する略語・専門用語

略語・専門用語	正式名称・英名	説明
HVT	Herpesvirus of turkey	七面鳥ヘルペスウイルス。健康な七面鳥に由来し病原性を持たない。
MDV1	Marek's disease virus serotype 1	マレック病ウイルス 1 型。マレック病の病原体。株により病原性は異なり、病原性のない株もある。
MDV2	Marek's disease virus serotype 2	マレック病ウイルス 2 型。健康な鶏に由来し病原性を持たない。
MDV3	Marek's disease virus serotype 3	マレック病ウイルス 3 型。HVT（七面鳥ヘルペスウイルス）の同物異名
ゲノム	Genome	細胞又はウイルスの遺伝情報
カプシド	Capsid	ウイルス核酸とそれに結合している蛋白質をとりまく蛋白質殻。
カプソメア	Capsomere	カプシドを構成する単位
エンベロープ	Envelope	細胞膜を通して出芽成熟するウイルスのリボ蛋白外皮。大型ウイルスの外皮を指す場合もある。
HSV1	Herpes simplex virus 1	単純ヘルペスウイルス 1 型 アルファヘルペスウイルス亜科 Simplexvirus 属の基準種。口唇ヘルペスの原因となる。
ORF	Open Reading Frame	オープンリーディングフレーム。終止コドンに中断されずにアミノ酸のコドンが続く遺伝子暗号の読み枠。蛋白質の遺伝情報をコードしている可能性がある領域。
テグメント物質	Tegument	ヘルペスウイルス科のエンベロープとカプシドの間にある構造。転写因子、核酸分解酵素、プロテインキナーゼ等が含まれており効率的な感染成立に寄与していると考えられている。
エピソーム	Episome	遺伝因子。プラスミドのように染色体外で独立に増殖するか又は染色体に組み込まれて増殖する。
HHV4	Human herpesvirus 4	Epstein-Barr virus の同物異名。バーキットリンパ腫を起こすと考えられている。
HHV6	Human herpesvirus 6	乳児期に発症する突発性発疹の原因となる。染色体に組み込まれた形で遺伝的に伝播するケースがある。
RSV	Rous sarcoma virus	ラウス肉腫ウイルス。トリ白血病肉腫ウイルス群の亜種。
NDV	Newcastle disease virus	ニューカッスル病ウイルス。ニューカッスル病の病原体。病原性は株により異なる。人獣共通感染症でもあり人の症状は結膜炎。
F 蛋白質	Fusion protein	NDV のエンベロープを構成する糖蛋白質。HN 蛋白質との共存下で感染時の細胞融合に必要とされる。
HN 蛋白質	Hemagglutinin-neuraminidase protein	NDV のエンベロープを構成する糖蛋白質。F 蛋白質との共存下で感染時の細胞融合に必要とされる。血球凝集及びノイラミニダーゼ活性を有する。
シンシチウム	Syncytium	複数の細胞が融合して生じた多核細胞。
コトランスフェクシ	Co-transfection	真核細胞の培養細胞に複数種類の外来遺伝子を試薬や電気穿孔法等を用いて導入すること。

資料 4 . その他

FITC	Fluorescein Isothiocyanate	フルオレセインは緑色の蛍光色素（極大蛍光波長 519nm）。FITC はその誘導体で、標識に用いられる。
ホモログ	Homolog	相同遺伝子。共通の祖先に由来すると考えられる遺伝子
クロアカ	Cloaca	総排泄口腔。直腸、排尿口、生殖口を兼ねる器官
プロウイルス	Provirus	細胞ゲノムに組み込まれて、細胞ゲノムとともに複製されるウイルスゲノム。
フレーム	Frame	読み枠。遺伝暗号は3塩基で 1 アミノ酸をコードしていることから、1つのDNA配列には相補鎖を合わせて6つの読み枠がある
ALV	Avian leukosis virus	トリ白血病ウイルス。トリ白血病肉腫ウイルス群には、A～J の亜群があり、リンパ性白血病の原因となるウイルスは A、B 及び J 亜群に属する。内在性ウイルスは E 亜群に属する。
EAV	Endogenous avian virus	内在性トリウイルス。粒子の存在について間接的な証拠が示されている。すべての系統の鶏のゲノムに含まれる。
REV	Reticuloendotheliosis virus	細網内皮症ウイルス。鶏に発育不全、翼羽異常（中抜け）、腫瘍などの症状を起こす。