

第一種使用規程承認申請書

令和 元 年 11 月 29 日

農林水産大臣 江藤 拓 殿

環境大臣 小泉 進次郎 殿

氏名	ゾエティス・ジャパン株式会社
申請者	代表取締役社長 加藤 克利
住所	東京都渋谷区代々木三丁目 22 番 7 号



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

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	CSF ウイルス由来 E2 遺伝子導入牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 CP7_E2alf 株 (E2, <i>Bovine viral diarrhea virus type 1</i>) (Suvaxyn CSF Marker)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	① 運搬及び保管（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の運搬及び保管を含む。） ② 医薬品医療機器等法第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験（以下「治験」という。）に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年農林水産省令第 75 号）第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用 ③ 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 家畜伝染病予防法（昭和 26 年法律第 166 号）第 3 条の 2 に基づく特定家畜伝染病防疫指針に従った接種（豚（妊娠豚以外）への接種） ⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残さの廃棄 ⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む。） ⑦ ①～⑥に付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	—

CSF ウイルス由来 E2 遺伝子導入牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 CP7_E2alf 株
(*E2, Bovine Viral Diarrhea Virus type 1*) (Suvaxyn CSF Marker) の
生物多様性影響評価書

目次

CSF ウイルス由来 E2 遺伝子導入牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 CP7_E2alf 株
(*E2, Bovine Viral Diarrhea Virus type 1*) (Suvaxyn CSF Marker) の生物多様性影響評価書

I 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	1
(2) 使用等の歴史及び現状	1
(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性	1
イ 基本的特性	1
ロ 生息又は生育（増殖）可能な環境の条件	3
ハ 捕食性又は寄生性	4
ニ 繁殖又は増殖の様式	4
ホ 病原性	4
ヘ 有害物質の産生性	5
ト その他の情報	5

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に供する情報	6
イ 構成及び構成要素の由来	6
ロ 構成要素の機能	6
(2) ベクターに関する情報	6
イ 名称及び由来	7
ロ 特性	7
(3) 遺伝子組換え生物の調製方法	7
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	7
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	7
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	10
(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	11
(5) 遺伝子組換え微生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	14
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	14
イ 遺伝子組換え微生物と、その調製に利用した宿主又はこれに属する生物種との特性の違い	14
ロ 遺伝子組換え微生物の宿主との識別を可能とするコロニー形成性、発色性等の特徴	20

3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	
(1)	使用等の内容	20
(2)	使用等の方法	20
(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	20
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	20
(5)	実験室等で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	20
(6)	国外における使用等に関する情報	21
(7)	接種動物の体内における挙動に関する情報	21
II	項目ごとの生物多様性影響評価	
1	他の微生物を減少させる性質（競合、有害物質の産生等により他の微生物を減少させる性質）	
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	23
(2)	影響の具体的内容の評価	24
(3)	影響の生じやすさの評価	24
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無	24
2	病原性（野生動物に感染し、それらの野生動物の生息又は育成に支障を及ぼす性質）	
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	25
(2)	影響の具体的内容の評価	26
(3)	影響の生じやすさの評価	26
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無	26
3	有害物質の産生性（野生動物の生息又は育成に支障を及ぼす物質を産生する性質）	
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	26
(2)	影響の具体的内容の評価	26
(3)	影響の生じやすさの評価	26
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無	26
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動植物に伝播する性質）	
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	27
(2)	影響の具体的内容の評価	27
(3)	影響の生じやすさの評価	27
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無	27
5	その他の性質（生態系の基盤を変化させることを通じて間接的に野生動植物等に影響を与える性質等生物多様性影響評価を行うことが適切であると考えられるもの）	28
III	生物多様性影響の総合評価	29

別添資料リスト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

本申請書で使用する略号・用語表・・・・・・・・・・・・ 32

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

添付資料
緊急措置計画書
別紙

CSF ウイルス由来 E2 遺伝子導入牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 CP7_E2alf 株
(E2, Bovine Viral Diarrhea Virus type 1) (Suvaxyn CSFMarker) の
生物多様性影響評価書

I 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 学名（属及び種）及び株名

フラビウイルス科

ペスチウイルス属

牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 CP7 株

牛ウイルス性下痢ウイルス（以下「BVDV」という。）は、5'末端非翻訳領域（5'UTR）の違いから、遺伝子型 1 及び 2 に分けられる（文献 1）。BVDV CP7 株は遺伝子型 1 である（以下「BVDV1 型 CP7 株」という。）。

② 公的な微生物保存機関から分与されたものである場合には、当該機関の名称と株番号

宿主 pA/BVDV は、ドイツ連邦動物ウイルス病研究センター（Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals）の G. Meyers 博士が BVDV1 型 CP7 株から作出した感染性クローンである。（文献 2）。

③ 自然環境における分布状況（宿主として野生株を用いる場合）

BVDV による感染は世界各国で発生が認められており、主な感受性動物である牛では牛ウイルス性下痢・粘膜病の原因となり、牛における抗体保有率が高い。

国内では各地方で牛からウイルスが分離され、収集された分離株の亜型分布状況の解析において、分離した 47 株中 87.2%が BVDV1 型（1a 型 36.2%、1b 型 40.4%、1c 型 8.5%、1j 型 2.1%）で、BVDV 2 型（2a 型）は 12.8%であった（文献 3）。

野生動物では海外において山羊（文献 4、5、6、7、8、9）、鹿（文献 4、7、8、10、11、12、13、14 及び 15）、兎（文献 16）及び猪（文献 17 及び 18）における感染事例が報告されている。

(2) 使用等の歴史及び現状

BVDV 1 型 CP7 株は、米国コーネル大学が牛の血液・組織サンプルから分離した BVDV の野外株である（文献 19）。

その後、ドイツ連邦動物ウイルス病研究センターにおいて BVDV1 型 CP7 株のゲノムがクローニングされ、感染性クローン pA/BVDV が構築され（文献 20）、pA/BVDV は Reimann らに分与された（文献 2）。

なお、BVDV1 型 CP7 株は研究材料として広く使用されているが、それ自体の産業利用は行われていない。

(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性

イ) 基本的特性

① ペスチウイルスの基本的性状

フラビウイルス科ペスチウイルス属には BVDV、CSF ウイルス（以下「CFSV」という。）、ボーター病ウイルスが含まれ、直径 40～60 nm のエンベロープを有する約 12.3 kb の一本鎖プラス RNA を核酸として有する（文献 1）。

② 遺伝子学的性状

宿主及び供与核酸の由来ウイルスが属するフラビウイルス科ペスチウイルス属のウイルス粒子は、4 つの構造タンパク質、コア蛋白（C）及びエンベロープ糖タンパク質の E1、E2 及び E^{ms} から構成され（文献 21、22、23）、E^{ms} 及び E2 に対する抗体が中和活性を持つことが知られている（文献 24、25）。遺伝子は N^{pro}-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B の順にコードされ（図 1-1、文献 23、26）、非構造タンパク質の N^{pro} 及び構造タンパク質の E^{ms} をもつことが他のフラビウイルス科の属とは異なるペスチウイルスの特徴である。5'末端及び 3'末端側にそれぞれ非翻訳領域（UTR）を有し、Internal ribosomal entry site（IRES）を含む。非構造タンパク質はプロテアーゼ活性等、ウイルス複製において様々な機能を有する。

また、BVDV は 5'UTR、N 末端の自家プロテアーゼ（N^{pro}）あるいはエンベロープ糖タンパク質（E2）遺伝子領域の解析（文献 27）又はモノクローナル抗体による反応性から、1 型及び 2 型に分けられる（文献 28）。



図 1-1 ペスチウイルス属のゲノム構造

③ 生化学的・生物学的性状

BVDV には病気の発症に重要な意味を持つ 2 つの生物型があり、培養細胞に細胞変性効果（以下、「CPE」という。）を示す細胞病原性株（以下、「CP 株」という。）と CPE を示さない非細胞病原性株（以下、「NCP 株」という。）が存在する。急性感染は 2 つの生物型の両方が関与するが、持続感染（以下「PI」という。）は NCP 株のみが引き起こす（文献 23）。CP 株は非構造タンパク質 NS3 の発現と関連している（文献 20）。両生物型は本病の診断に重要な 2 つの遺伝子型の 1 型及び 2 型にそれぞれ細分化される。さらに 1 型では a から o まで、2 型では a、b の亜型に区分される。1 型と 2 型には抗原性の差があり、亜型にはある程度の交差性があるとされている（文献 29）。

NCP 株が妊娠牛に感染するとウイルスは胎盤を通過し（文献 30）、死産又は流産が起こる。また、胎子の免疫機能が形成される前後に感染が成立すると、ウイルスに対して免疫学的に寛容な子牛が生まれ、PI 牛となる（文献 19、31、32、33、34）。さらに、NCP 株が PI 牛の体内で変異して CPE を示すようになると牛は粘膜病を発症する（文献 1）。一方、CP 株は牛に軽度な一過性の症状を起こすが、妊娠牛に感染しても胎盤を通過しないため垂直感染せず、持続感染等の病態は起こさない。現在、BVD 生ワクチンとして使用されているウイルス株は全て CP 株であり、BVDV 1

型 CP7 株も CP 株である。

BVDV 遺伝子は前段の②で示した遺伝子構造で構成されている。ウイルス感染の最初の段階である細胞表面への吸着には糖タンパク質 E^{ms} が介在し、牛の細胞上に存在する CD46 をレセプターとして E2 が結合し（文献 25、35）、ウイルスはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる（文献 12）。NCP 株が感染した細胞では N^{pro} や E^{ms} の機能によりアポトーシスが抑制されている（文献 36、37、38）。N^{pro} と E^{ms} はペスチウイルスに特有のタンパク質であり、これらはペスチウイルスの病原性に大きな役割を果たすと考えられている。N^{pro} はオートプロテアーゼ活性を有するとともに、I 型インターフェロン（以下、「IFN」という。）の産生を阻止する機能を有し（文献 39、40）、宿主の自然免疫を抑制することによりウイルスが増殖しやすい環境を作る。E^{ms} も N^{pro} とは異なる作用機序により I 型 IFN の誘導を抑制する作用を持つことが示されており（文献 38、41）、これにより BVDV は I 型 IFN の有害な影響を回避し、先天的免疫寛容を持続させることにより持続感染性を確立し、株特異的な B 細胞及び T 細胞耐性を維持すると考えられている（文献 42）。また、E^{ms} は E2 とともにウイルスの外殻を構成する構造タンパク質の一つであり、感染動物に抗原として認識され、中和抗体の結合部位とされている（文献 24、25、43）。

④ 感受性動物、感染経路、感染様式等

BVDV は牛における感受性が最も高いが、牛以外では I の 1 の (1) の③で述べた野生動物の他、ラクダ（文献 13、44 及び 45）、羊（文献 5 及び 46）、ラマ（文献 47、48 及び 49）、アルパカ（文献 47 及び 48）、豚（文献 14）、水牛（文献 50）ビクーニャ（文献 51）等における感染例が報告されている。

BVDV は唾液、鼻汁、糞便、尿、乳汁あるいは精液等の分泌液から排出されるため、牛では接触により容易に経口、経鼻感染するが、血流を介して胎盤に到達し、妊娠牛から胎子への垂直感染も引き起こす。

呼吸器あるいは生殖器の粘膜細胞に吸着し、動物体内に侵入したウイルスは、白血球、血小板、上皮細胞、線維芽細胞等の膜表面に存在する CD46 レセプターに結合して細胞内に取り込まれ、血行又はリンパ行を介して全身へ分布する。

ロ) 生息又は生育（増殖）可能な環境の条件

BVDV の自然界におけるもっとも主要な感受性動物は牛である。

実験室内では、牛由来培養細胞において増殖し、CPE を示す株（CP 株）と、CPE を示さない株（NCP 株）が存在する。BVDV1 型 CP7 株は牛由来細胞において最も増殖性が高く、接種後 36～48 時間後に明らかな CPE を引き起こす。

牛腎培養細胞で増殖させた BVDV ($1 \times 10^{8.4}$ TCID₅₀/mL) に紫外線（波長）254 nm を照射し、経時的なウイルス量を調査した結果、明らかな低下が認められ、 $1 \times 10^{7 \sim 8}$ TCID₅₀/mL の BVDV が 300 mJ/cm² の照射により検出限界以下にまで減少すると結論づけた報告があり（文献 52）、紫外線により不活化されると考えられる。

CSFV の環境中における生存能力は、温度、湿度、pH、有機物の存在及びその他様々な化学物質により影響され、pH 5～10 では比較的安定であるが、3 以下あるいは 10 以上で急速に不活化される。また、エーテルやクロロホルムなどの有機溶剤のほか、中性洗剤（Nonidet P40、デオキシコール酸塩、サポニン等）によって不活化される（文献 53）。同じペスチウイルス属である BVDV も同様の性質を

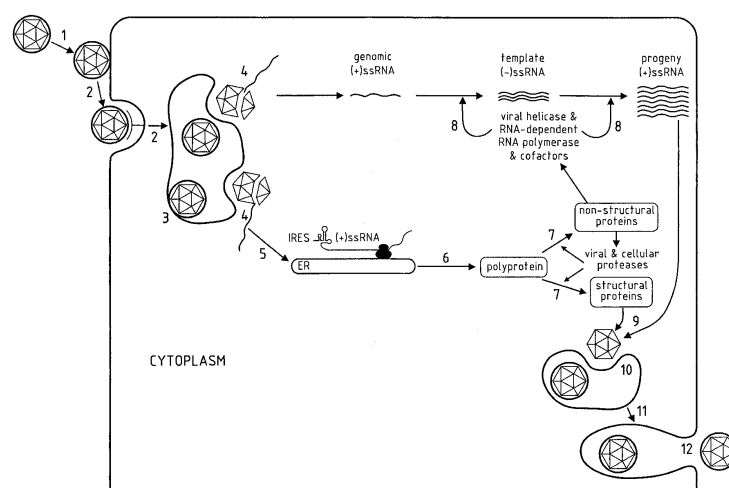
示すと考えられる。

ハ) 捕食性又は寄生性

—

ニ) 繁殖又は増殖の様式

BVDV は、プラス一本鎖 RNA ウイルスであり、牛細胞の細胞質内で増殖する。(文献 1)



(文献 26 ; Leyssen et al. Clin Microbiol. Reviews, 67-82, 2000 の図 2A)

図 1-2. ペスチウイルスの増殖様式

ウイルス粒子は、細胞表面に存在するレセプターとウイルス膜タンパク質が結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、膜が融合して脱核する。ウイルス由来プラス鎖 RNA が mRNA としてウイルスタンパク質前駆体が合成される。ウイルスあるいは細胞由来のプロテアーゼによってウイルスタンパク質前駆体が切断される。一方、核酸はゲノム RNA から一度マイナス鎖 RNA に転写され、プラス鎖 RNA が複製される。細胞質内で合成されたウイルスタンパク質からヌクレオカプシドが形成され、複製された RNA を取り込んでウイルス粒子となる。ER にウイルスが出芽し、最終的にゴルジ体を通してエキソサイトーシスにより細胞外へ放出される (文献 26、54)。

BVDV 1 型 CP7 株は、米国コーネル大学が牛の血液・組織サンプルから分離した BVDV の野外株である (文献 19)。その後、ドイツ連邦動物ウイルス病研究センターにおいて BVDV 1 型 CP7 株ゲノムがクローニングされ、構築された感染性クローン pA/BVDV (文献 25) は Reimann らに分与された (文献 2)。なお、BVDV 1 型 CP7 株は研究材料として広く使用されているが、それ自体の産業利用は行われていない。BVDV 1 型 CP7 株は CP 株であり、基本的に持続感染を起こさず、粘膜病の一次的要因とはならない。また、BVDV 1 型 CP7 株の豚への接種試験の結果、豚に対する病原性が弱いことが確認されており (文献 2)、自然環境下で牛以外の動物に病原性を示すことはないと考えられる。以上より、BVDV 1 型 CP7 株の感染動物における増殖能は野外株と同等以下、細胞においては、牛培養細胞 KOP-R 株において効率的に増殖する (文献 2)。

ホ) 病原性

BVDV の感受性動物は牛である。牛以外の動物については、豚、羊、鹿、キリン等からウイルスが

分離されており（文献 1）、野生動物では山羊（文献 4）、鹿（文献 7）、兎（文献 16）及び猪（文献 17）において抗体検出による感染事例が報告されている。

BVDV は CP 株と NCP 株に分けられる。健康な牛が CP 株又は NCP 株に感染すると、一過性の発熱、下痢、鼻汁等の症状を呈するが、牛の免疫応答に伴い治癒することが多い。NCP 株が妊娠牛に感染するとウイルスは胎盤を通過し、胎子へのウイルス感染による死産・流産が起こるほか、ウイルスに対して免疫学的に寛容な持続感染牛が生まれ、周りの牛への慢性的な感染源となる。また、NCP 株が体内で変異して CP 株になると、全身粘膜のびらんや潰瘍、食欲の廃絶、元氣消失、水溶性下痢、血便などの重篤な症状を呈して、100%死に至る（文献 1）。

CP 株のマーカータンパク質は非構造タンパク質 NS3 であるとされている一方、NCP 株は NS3 ではなく NS2-3 を発現する。すなわち、BVDV1 型 CP7 株のゲノム解析により、当該株の変異前の株である BVDV1 型 NCP7 株の RNA には存在しない 27 ヌクレオチドの挿入が同定されており、この挿入が NS2-3 の切断、すなわち NS3 生成の要因となっている。感染性 BVDV クローンの分析により、NS3 の発現を導く変異が CP 株の表現型（培養細胞における CPE 発現）の唯一の前提条件であることが確認されている（文献 20）。また、CP 株は持続感染を起こすことができず、発生すると「行き止まり」（dead end）になると言われており（追加文献 3）、CP 株が NCP 株に変異することはないと考えられている。

牛における粘膜病は NCP 株による持続感染牛にのみ発生し、粘膜病の牛からは NCP 株と CP 株の両方が分離される。これは、免疫寛容状態となっている NCP 株持続感染牛に CP 株が重感染することにより発症する（文献 29）、とされているが、この CP 株による重感染は外部からの感染によるものではなく、持続感染している NCP 株が変異することで CP 株が出現し、それが増殖することによって粘膜病が発症することが示唆されている（文献 19、32）。

理論的には持続感染している NCP 株と抗原性が同一の CP 株が重感染しても粘膜病は発症するが、牛群内へ CP 株が侵入する経路が明らかにされたことはなく、現実的には重感染する可能性は極めて低いと考えられている。（追加文献 4） BVDV1 型 CP7 株は、持続感染を起こさない CP 株であり、接種試験の結果、豚に対する病原性が弱いことが確認されている（文献 2）。

へ) 有害物質の産生性

BVDV の N^{pro} の遺伝子産物は、ペスチウイルス属に特有の 168 個のアミノ酸からなる非構造タンパク質で、インターフェロン制御因子-3 (interferon regulatory factor-3: IRF-3) に結合して豚の 1 型 IFN の産生を阻止する機能を有する（文献 54、55）。 E^{ns} も N^{pro} とは異なる作用機序により 1 型 IFN の誘導を抑制する作用を持つことが示されており（文献 38、41）、これにより BVDV は 1 型 IFN の強力な影響を回避し、先天的免疫寛容を持続させることにより持続感染性を確立し、株特異的な B 細胞及び T 細胞耐性を維持すると考えられている（文献 42）。これらのタンパク質以外の有害物質の産生の可能性は低いと考えられる。

また、BVDV 1 型 CP7 株の遺伝子配列について、既知のアレルギー物質とのアミノ酸配列相同性解析¹⁾を行った結果、相同性の高い配列は認められず、アレルギー物質の産生性は低いと考えられた。

ト) その他の情報

BVDV1 型 CP7 株の感受性動物は反すう動物の牛で、ウイルス性下痢・粘膜病の原因ウイルスである

¹⁾ 3 種のデータベース（SDAP Allergen Database、AllerBase protein、Allergen Online）を利用して解析を行った。

が、CP 株のため粘膜病の一次的な要因とはならない。

本遺伝子組換えウイルスの安全性と有効性を確認する試験において、対照の一つとして BVDV 1 型 CP7 株を投与された豚において異常な臨床症状は認められず、白血球減少及び発熱は観察されなかった。また、投与後 4 日目に 5 頭中 2 頭からのみウイルスが分離されたが、7 日目以降はいずれの動物からも分離されなかった（文献 2）。これらの結果から豚に対する病原性は極めて弱いと思われ、自然環境下で牛以外の動物に病原性を示すことはないと考えられる。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ) 構成及び構成要素の由来

供与核酸は、CSFV Alfort/187 株 (GenBank アクセション番号 X87939.1) の E2 領域である。Alfort/187 株は Alfort 株の感染試験で死亡した豚から分離された株で、毒性は中程度 (moderate-virulent strain) とされている（文献 56）。離乳子豚においては 20 日以内に死亡率が 100%に達する場合があるが（文献 57）、E2 タンパク質はそれ自身が主要な免疫原であり特に中和抗体を誘導するが、病原性を伝達することはできない。

ロ) 構成要素の機能

E2 領域は、糖タンパク質 E2 をコードする。E2 はウイルス粒子表面に局在しており、動物細胞の受容体タンパク質 CD46 に吸着することで、ウイルスの感染初期段階で機能する。また、E2 は中和抗体の標的となっている（文献 1）。

データベースに登録されている CSFV Alfort/187 株のゲノム及びアミノ酸配列 (CAA61161) の E2 に該当する領域（塩基：2444～3553 及びアミノ酸：691～1060）について blastn と blastp を用いて検索した結果、CSFV E2 以外のタンパク質は検出されなかった（図 1-3）。したがって、E2 の塩基配列及びアミノ酸配列について、既知の有害タンパク質と類似性は認められない。また、E2 は膜タンパク質であることから、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性は極めて低いと考えられる。

① E2 領域の塩基配列

TTAATTAACCAGCTAGCCTGCAAGGAAGATTACAGGTACGCAATATCATCAACCAATGAGATAGGGCTACTCGGGGCCGGAG
GTCTCACCACCACCTGGAAAGAATACAACCACGATTGCAACTGAATGACGGGACCGTTAAGGCCATTTGCGTGGCAGGTTCC
TTTAAAGTCACAGCACTTAATGTGGTCAGTAGGAGGTATTTGGCATCATTGCATAAGGAGGCTTTACCCACTTCCGTGACATTC
GAGCTCCTGTTGACGGGACCAACCCATCAACTGAGGAAATGGGAGATGACTTCGGGTTCCGGGCTGTGCCGTTTGATACGA
GTCCTGTTGTCAAGGGAAAGTACAATAACACCTTGTGAACGGTAGTGCTTCTATCTTGTCTGTCCAATAGGGTGGACGGGT
GTTATAGAGTGCACAGCAGTGAGCCCAACAACCTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACCTTCAGGAGGGACAAGCCCTTTCCGC
ACAGAATGGATTGTGTGACCACAACAGTGGAATGAAGATTTATTCTACTGTAAGTTGGGGGGCAACTGGACATGTGTGAA
AGGTGAACCAAGTGGTCTACACGGGGGGGGCTAGTAAACAATGCAGATGGTGTGGCTTTGACTTCAATGAGCCTGACGGACTC
CCACACTACCCCATAGGTAAGTGCAATTTGGCAAATGAGACAGGTTACAGAATAGTGGATTCAACAGACTGTAACAGAGACG
GTGTTGTAATCAGCACAGAGGGGAGTCATGAGTGCTTGATCGGTAACACAACCTGTCAAGGTGCATGCATCAGATGAAAGACT
GGGCCCCATGCCATGCAGACCTAAAGAGATCGTCTCTAGTGACGAGCTGTAAAGGAAAATTCCTGTACATTCAACTACGCAA
AACTTTGAAGAACAAGTACTATGAGCCCAGGGACAGCTACTTCAGCAATATATGCTTAAGGGCGAGTATCAGTACTGGTTT
GACCTGGACGTGACTGACCGCCACTCAGATTACTTCGCAAGAATTTGTTGTCTTGGTGGTGGTAGCACTGTTAGGAGGAAGATA
TATCCTGTGGCTAATAGTGACCTACATAGTTTTAACAGAACAACTCGCCGCTGGTTACGTA

下線部はプライマー結合部位を示し、TTAATTAAと TACGTAは、それぞれ *PacI* と *SnaBI* 認識配列。
矢印内が、E2 アミノ酸コード領域。

Blastn による相同性検索は CSFV のみを検出した。

② E2 領域のアミノ酸配列

```
LACKEDYRYAISSTNEIGLLGAGGLTTTWKEYNHDLQLNDGTVKAICVAGSFKVTALNVVSRRYLASLHKEALPTSVTPELLFDGTNP  
STEEMGDDFGFGLCPFDTSPPVVKGYNTTLLNGSAFYLVCPIGWTGVIECTAVSPTTLRTEVVKTFRDKPFPHRMDCVTTTVE  
DLFYCKLGGNWTVCVKGEPPVYTGGVLKQCRWCGDFNEPDGLPHYPGKILANETGYRIVDSTDCNRDGVVISTEGSHECLIGNT  
TVKVHASDERLGPMPKPCRPKEIVSSAGPVRKTSCTFNAYAKTLKNKYEPDRSYFQYMLKGEYQYWFDLVDVDRHSDYFAEFVVLVV  
VALLGGRYILWLIVTYIVLTEQLA
```

Blastp による同源性検索は CSFV のみを検出した。

図 1-3. CSFV Alfort/187 株の E2 領域

(2) ベクターに関する情報

イ) 名称及び由来

該当しない。

ロ) 特性

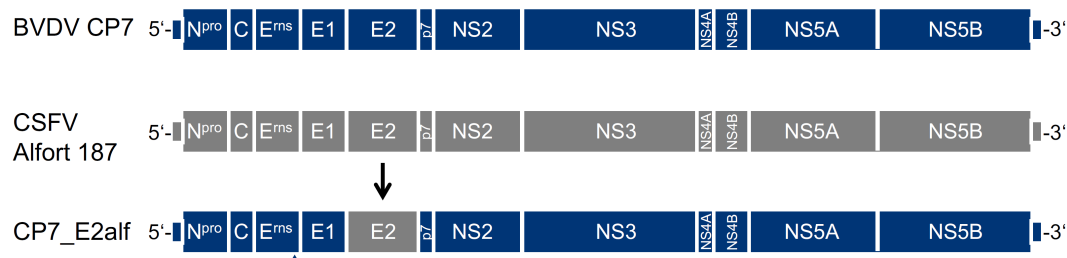
該当しない。

(3) 遺伝子組換え生物の調製方法

イ) 宿主内に移入された核酸全体の構成

本遺伝子組換え微生物と宿主のゲノム構成の概略を図 1-4 に示す。

BVDV1 型 CP7 株の感染性 cDNA クローンのエンベロープ糖タンパク質 E2 コード領域を削除後、供与核酸 CSFV Alfort 187 株の同領域の配列を挿入し、本遺伝子組換えウイルス CP7_E2alf 株を作出した。



文献 23；Blome et al (2017) Vet Res 48:51

図 1-4. 本遺伝子組換えウイルスと宿主の概略図

上段（青色）：宿主である BVDV1 型 CP7 株

中段（灰色）：CSFV Alfort/187 株

下段：本組換えウイルス CP7_E2alf 株（矢印は E2 領域の位置を示す）

ロ) 宿主内に移入された核酸の移入方法

① バックボーンの調製

1) pA/CP7_ΔE2p7 の調製

図 1-5 に示すように、BVDV1 型 CP7 株の感染性クローン pA/BVDV を制限酵素 *KpnI* で切断し、E2 領域の全部と p7 領域の一部を除去した。

切断部位同士を再連結し、pA/CP7_ΔE2p7 を調製した（文献 58）。

2) pA/CP7_ΔE2PacI の調製

①で除去した *p7* 領域に連結するポリリンカー (*PacI*、*RsrII*、*SnaBI*) を調製するため、プライマー *p7-PacI* 及び *p7R-KpnI* (表 1-1) を使用して PCR 断片を調製した。

図 1-5 に示すように、当該 PCR 断片を *KpnI* で切断したのち、①の *KpnI* 部位に挿入し、pA/CP7_ΔE2PacI を調製し、これを本組換えウイルスのバックボーンとした（文献 2）。

② 供与核酸 *E2* 領域の調製

CSFV Alfort/187 株を感染させた培養細胞 PK15 株から抽出した全 RNA 鋳型として、表 1-1 に示した *E2-Alfort-PacI* 及び *E2R-Alfort-R-SnaBI* のプライマーを用い RT-PCR によって増幅した。得られた PCR 断片を *PacI* 及び *SnaBI* で切断し、供与核酸 *E2* 領域とした（文献 2）。

③ 感染性クローン pA/CP7_E2alf の調製と本組換えウイルスの回収

②で調製した *E2* 領域を、①で調製した pA/CP7_ΔE2PacI のポリリンカー部位に、フレームシフトが生じないように連結し、図 1-5 に示すように本組換えウイルス pA/CP7_E2alf を作製した。

pA/CP7_E2alf から転写された RNA を、エレクトロポレーション法によって培養細胞 PK15 株に導入し、24 時間後に得られた上清中から本組換えウイルス CP7_E2alf 株を回収した（文献 2）。

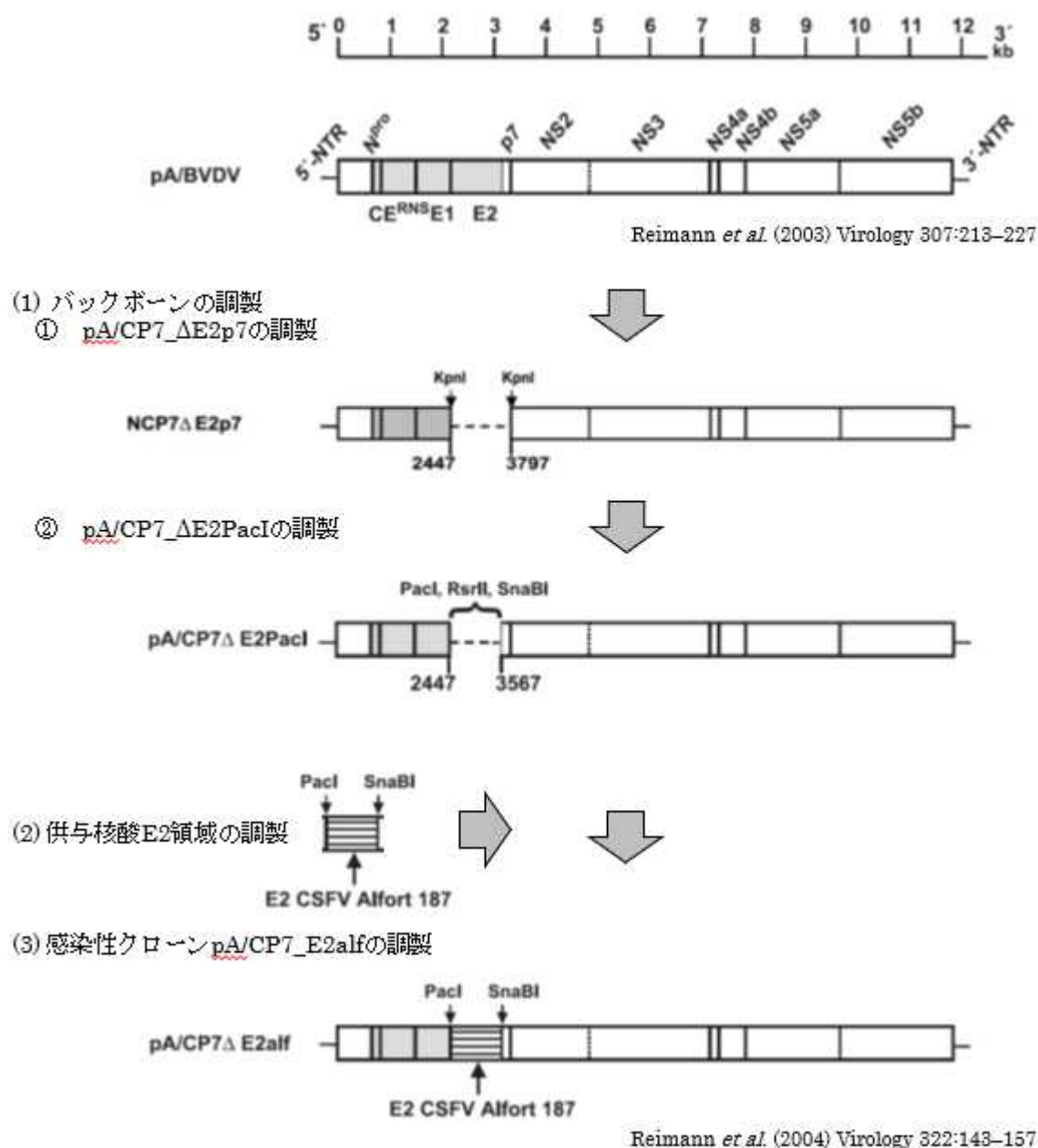


図 1-5. 本遺伝子組換えウイルスの調製方法

表 1-1. 本遺伝子組換えウイルスの調製に使用したプライマー

PCR primers used for plasmid construction

Primer	Sequence (5' to 3') ^a	Genomic region (nucleotides)
E2Alf_PacI	<i><u>GCATTAATTA</u></i> ACCAGCTAGCCTGCAAGGAAGATT	2441–2462 (+ sense) ^b
E2AlfR_SnaBI	GACCTACGTAACCAGCGGCGAGTGTCTGTT	3538–3559 (– sense) ^b
p7_PacI	CAAGGGTACCCATTAATTAACGGTCTACGTAAGTCCAGTATGGGGCAGGTGA	3567–3586 (+ sense) ^c
p7R	GCTCTAGGTACCCCTGGCA	3785–3804 (– sense) ^c

^a Restriction enzyme sites are underlined, overlaps to facilitate restriction enzyme digestion are in italics and additional nucleotides for in-frame ligation are in bold.

^b Nucleotide position in CSFV Alfort 187 sequence.

^c Nucleotide position in BVDV CP7 sequence.

文献 2 ; Reimann *et al.* (2004) Virology 322:143–157

ハ) 遺伝子組換え生物等の育成の過程

上記により回収された3バイアルの遺伝子組換えウイルス CP7_E2alf 株について、2005年1月にドイツ連邦動物衛生研究所の Friedrich-Loeffler-Institute (FLI) より分与を受けた。そのうちの1本をダルベッコ変法イーグル MEM (DMEM) で10倍希釈したものをプレマスターシードウイルスとした。

プレマスターシードウイルスについてエンドポイント希釈法により3回クローニングを行った後、2006年11月に豚腎 (SK) 細胞で4回継代したものをマスターシードウイルスとした (MSV)。

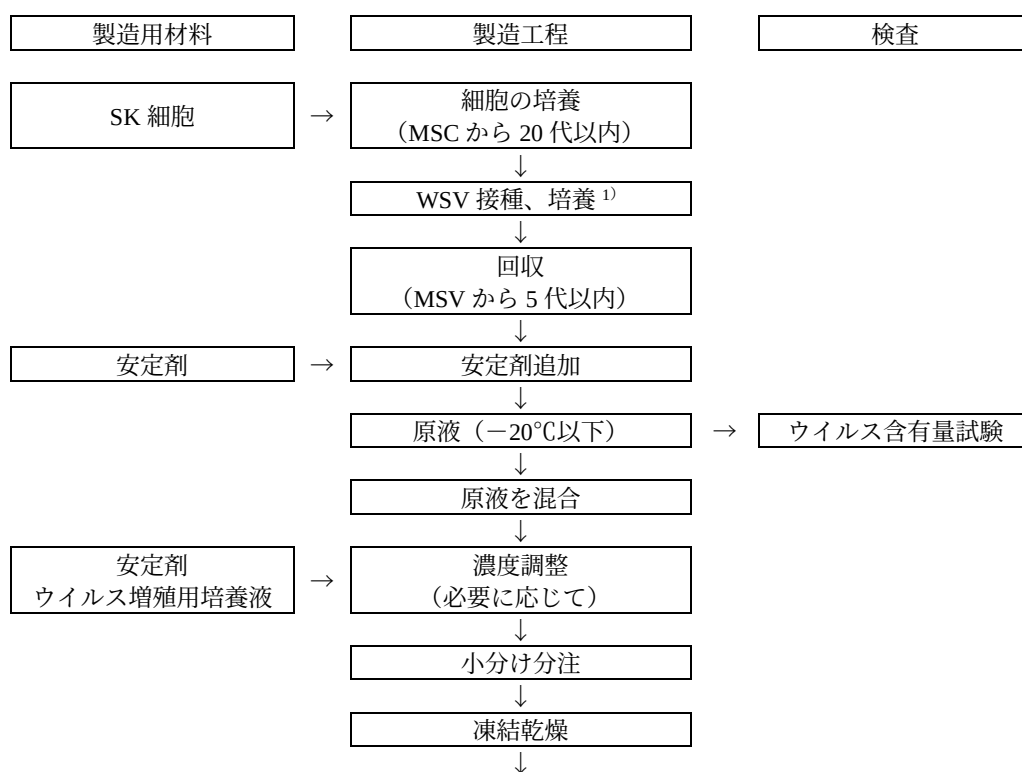
本 MSV について、同定、無菌、マイコプラズマ否定、外来性物質否定ならびにウイルス含有量の各試験を実施し、いずれも規格に適合した。

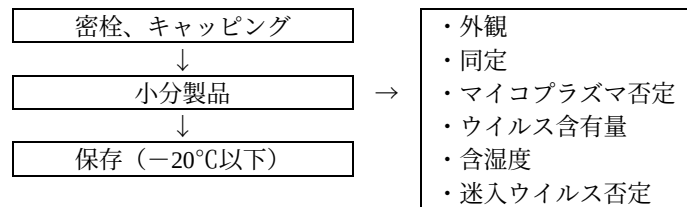
MSV を製造用細胞である SK 細胞で培養して得た培養上清を小分け分注して -70°C 以下で保存したものをワーキングシードウイルス (WSV) とした。WSV は無菌、マイコプラズマ否定および迷入ウイルス否定試験に適合するものとし、MSV から原液作製までの継代数は欧州における製造販売承認の登録内容として5代以内と規定している。WSV は作製ごとに上記規格適合試験を実施している。

ワクチンの製造では、SK 細胞に WSV を接種し、 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ で3～5日間培養した後の培養上清をフィルターろ過し、安定剤を加えたものを原液とする。原液を保存する場合は -40°C 以下で保存し、原液に必要な応じて安定剤あるいはウイルス増殖用培養液を添加し、無菌的に小分け分注した後、凍結乾燥したものを最終製剤とする。

製造工程中の継代数を最小限に制限していることから、製造工程中において、生物多様性に影響を与えるような細胞指向性、病原性等の変異は既知の報告には認められない。

品質検査として、原液でウイルス含有量試験、小分製品で外観、同定、マイコプラズマ否定、ウイルス含有量、含湿度ならびに迷入ウイルス否定の各試験を実施している。ウイルス含有量試験は CPE を指標として判定するものであり、CPE の抑制により低含有量値が認められた場合に、万一の NCP 株の混入、増殖の疑いを検知できると考えられる。





¹⁾：培養スケールは最大 360 L

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

① 移入した核酸の遺伝子組換え生物における存在状態

BVDV 1 型 CP7 株に移入した CSFV Alfort 187 株の E2 コード領域は、宿主の核酸に安定的に存在し（文献 59、60、61）、CSFV E2 糖タンパク質を発現する。マスターシードウイルスと製造用原液との間で E2 遺伝子に 1 塩基の変異が認められたが、これは製造過程において培養細胞によりアダプトしたことによるもので、中和抗体の産生に影響を与えない（文献 59）。本遺伝子組換えウイルスは豚細胞でのみ効率的に増殖し、宿主がよく増殖する牛細胞では増殖効率が悪い（文献 2）。また、本遺伝子組換えウイルス抗血清は CSFV 株を中和したが、BVDV は中和しなかった（文献 2）。CSFV E2 コード領域の移入により、本遺伝子組換えウイルスの細胞株における増殖性や抗体については、CSFV Alfort 187 株に非常によく似た性状となり、BVDV1 型 CP7 株の特性に顕著な変化をもたらした。

表 1-2. 豚腎細胞継代における BVDV CP7_E2alf 株のマスターシードウイルスと製造用原液のアミノ酸配列の比較

Nucleotide position	Nucleotide exchange	Amino acid substitution	UTR or protein coding sequence
78	Insertion of A	—	5'UTR
330	C → T	—	5'UTR
1068	G → A	D → N	Capsid
1800	C → T	L → F	E ^{ms}
3309	T → C	S → P	E2-Alfort
3580	A → G	Y → C	p7
5049	G → T	V → L	NS2
7737	A → G	M → V	NS4B
10393	G → T	S → I	NS5B
12022	C → A	T → K	NS5B

ポジション番号は BVDV 1 型 CP7 株（アクセッション番号 U63479）に基づく。

（文献 59；Leifer et al., Vaccine 27, 6522-6529, 2009）

② 培養細胞における継代及び接種動物体内でのウイルスゲノムの安定性

CP7_E2alf 株マスターシードウイルスを豚腎培養細胞（PK15）で 10 回継代培養して得たウイルスの遺伝子には数塩基の差異などは見受けられたが、ウイルスの性状に影響を及ぼすような差異は認められなかった（文献 61）。

成体猪に 10⁷ TCID₅₀（ワクチン接種用量の 10 倍量）を筋肉内接種し、4 日後に体内分布を調査した結果、扁桃と耳下腺からのみ本ウイルスが分離され、他の臓器、体液、精液、尿・糞便等からは検出されなかった。扁桃から検出したウイルス由来 RNA の配列を、接種に用いたウイルスと比較したところ、NS5B 領域に 1 塩基の非同義置換が認められた。この置換は、バックボーン領域の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ遺伝子領域内の変異であった。この変異は本遺伝子組換えウイルスの抗原特性に影響を

与えると考えられる領域ではない（文献 61、67）。

また、本遺伝子組換えウイルス（ $10^{6.7}$ TCID₅₀/頭）を CSFV 及び BVDV に対する抗体陰性の 6 週齢の豚 6 頭ずつに筋肉内及び経口投与した。試験期間を投与後 45 日間とし、試験期間中、1 日に 1 回、直腸温の測定および臨床症状の観察を行った。経時的（投与後 3、7、10、14、21 及び 45 日）に鼻腔及び咽頭スワブを採取するとともに、各採取時点で各群 1 頭ずつ安楽殺して扁桃、リンパ節、脾臓、腎臓、唾液腺ならびに筋肉組織を採取し、ウイルス分離を試みた。

表 1-3. 試験設計

群	投与経路	投与量/頭	投与回数	供試頭数	採材日
T01	筋肉内	$10^{6.7}$ TCID ₅₀	1 回	6 頭	投与後 3、7、10、14、21 及び 45 日に
T02	経口	$10^{6.7}$ TCID ₅₀	1 回	6 頭	各群 1 頭ずつ

また、各検体から全 RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法によりペスチウイルス遺伝子の検出を試みた。すなわち、各臓器および組織から抽出した RNA から cDNA を合成し、下記のプライマーを用いて所定の条件（95℃ 15 秒間、56℃ 30 秒間、72℃ 30 秒間、82℃ 15 秒間を 40 サイクル）で反応させ、SYBR Green 法により増幅産物の定量を行った（追加文献 5）。

供試プライマーの概要

プライマー	塩基配列（5'→3'）	BVDV NADL 株における位置	サイズ
324	ATG CCC TA ^(T_A) GTA GGA CTA GCA	108-128	288 bp
326 ^a	TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC	395-375	

^a アンチセンスプライマー

その結果、筋肉内投与群の 3 頭及び経口投与群の 1 頭で軽微な熱発（40～40.2℃）が認められた以外に異常な所見は認められず、試験期間を通じて健康であり、CSF に関連する兆候も認められなかった。経口投与した豚の鼻腔及び咽頭スワブからウイルスは分離されなかったものの、投与後 3 日目から 10 日目までの間にペスチウイルス遺伝子が検出された。また、投与後 3 あるいは 7 日目の白血球、唾液腺ならびに扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出され、投与後 7 日目の扁桃からはウイルスも分離された。一方、筋肉内投与した豚では、投与後 14 日目の 1 検体の扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出された以外は、投与後 45 日までのいずれも検体からもペスチウイルス遺伝子は検出されなかった。すなわち、豚に投与されたペスチウイルスゲノムの存在は投与後 14 日目まで確認され、ウイルスの分離は経口投与群のみ投与後 7 日目の扁桃部分に限定されたことが確認された（表 1-4、表 1-5）（別紙 1）。

表 1-4. CP7_E2alf 株マーカーワクチンの筋肉内及び経口接種後の体内分布試験

－鼻腔及び咽頭スワブサンプルからのペスチウイルス遺伝子検出

投与後日数	経口投与群		筋肉内投与群	
	陽性頭数/ 検査頭数	qRT-PCR 結果 (ct ¹⁾ / c/well ²⁾)	陽性頭数/ 検査頭数	qRT-PCR 結果 (ct / c/well)
3 日	5 / 6	33.36 / 9.25 29.8 / 102.6	0 / 6	NA

		33.49 / 8.48 29.62 / 115.4 34.05 / 5.79		
7 日	1 / 5	34.74 / 3.61	0 / 5	NA
10 日	1 / 4	36.36 / 1.06	0 / 4	NA
14 日	0 / 3	NA	0 / 3	NA
21 日	0 / 2	NA	0 / 2	NA
45 日	0 / 1	NA	0 / 1	NA

¹⁾ Ct 値 (cycle threshold in qRT-PCR)

²⁾ コピー数/well (calculated number of genome copies per reaction tube in qRT-PCR with standard curve method)

NA (Not Applicable) : 該当せず

表 1-5. CP7_E2alf 株マーカーワクチンの筋肉内及び経口接種後の体内分布試験

ー白血球、臓器及び組織からのペスチウイルス遺伝子検出

投与後日数	経口投与群 (6 頭)		筋肉内投与群 (6 頭)	
	検出されたサンプル (検出頭数)	qRT-PCR 結果 (ct ¹⁾ / c/well ²⁾)	検出されたサンプル (検出頭数)	qRT-PCR 結果 (ct / c/well)
3 日	扁桃 (1) 唾液腺 (1)	36.37 / 1.04 36.99 / <1	検出されず	NA
7 日	白血球 (1) 扁桃 (1)	36.89 / 1.03 30.22 / 150.9	検出されず	NA
10 日	検出されず	NA	検出されず	NA
14 日	検出されず	NA	扁桃 (1)	34.71 / 1.78
21 日	検出されず	NA	検出されず	NA
45 日	検出されず	NA	検出されず	NA

¹⁾ Ct 値 (cycle threshold in qRT-PCR)

²⁾ コピー数/well (calculated number of genome copies per reaction tube in qRT-PCR with standard curve method)

NA (Not Applicable) : 該当せず

③ 共感染時にウイルスゲノムの組換えが起こる可能性

多くのウイルスは、細胞に感染した場合、同種のウイルスの二次感染が阻害されるという性質を有する。BVDV を牛腎培養細胞に接種して重感染阻害のメカニズムについて調査した実験において、BVDV 感染後 30～60 分間以内に同種の BVDV による重感染の阻害が確立し、これにはウイルスの侵入時における E2 糖タンパク質の発現が必要であることが示唆された。この性質は持続感染細胞の継代によって喪失されることが確認されたが、BVDV 感染細胞に別の BVDV の RNA をトランスフェクトした実験において、RNA の複製が阻害されることが確認された。これらの結果から、ペスチウイルス属には細胞への侵入レベルおよびウイルス RNA 複製レベルの 2 段階の重感染阻害メカニズムが存在することが示唆された (文献 62)。

豚培養細胞に、本遺伝子組換えウイルス及び CSFV 野外株または BVDV 1 型野外株を同時及び連続

感染させ、その培養上清からシーケンスライブラリーを調製し、読み取りを行った結果、ウイルス間のゲノムの組換えの可能性を示す所見は認められなかった。この結果は、上記実験結果から示唆されたペスチウイルス属間の非常に強い干渉現象の存在を裏付けるものと考えられる。また、アジア各国をはじめ、CSFV 及び BVDV が同時に存在する国がいくつかあるにもかかわらず、BVDV にも感受性である豚において組換えが発生していないことから、2 種のペスチウイルス属の株が同じ細胞に感染し、組換えが発生する可能性が非常に低いことを強く示唆している。(文献 61)。

また、出生 24 時間後に一次感染用 CSFV 株の鼻腔内投与により持続感染した 6 週齢の猪に対して、二次感染用 CSFV 株(強毒株)投与したところ、異常な臨床徴候および発熱は認められず、経時的に採取した血清、鼻腔スワブ、直腸スワブならびに実験終了後に採取した臓器及び組織サンプルのいずれからも強毒株の RNA は検出されなかった。供試した CSFV 持続感染猪は、抗 CSFV 抗体及び INF- α を産生していないことから CSFV に対する液性及び細胞性免疫を獲得していないことが証明されている。これらの結果から、猪において CSFV の重感染は起こらないことが確認された(文献 63)。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスのゲノムは *in vitro* 及び *in vivo* の両条件下で安定して維持されていると考えられる。

(5) 遺伝子組換え微生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本遺伝子組換えウイルスは BVDV E2 の代わりに CSFV E2 を発現することから、CSFV E2 モノクローナル抗体による免疫染色やウェスタンブロットにより識別可能である(文献 2)。また、特異的 qRT-PCR により検出可能である(文献 59)。これらの方法は国際的にペスチウイルス野外株による自然感染の標準的な検査法として使用されている(文献 64)。

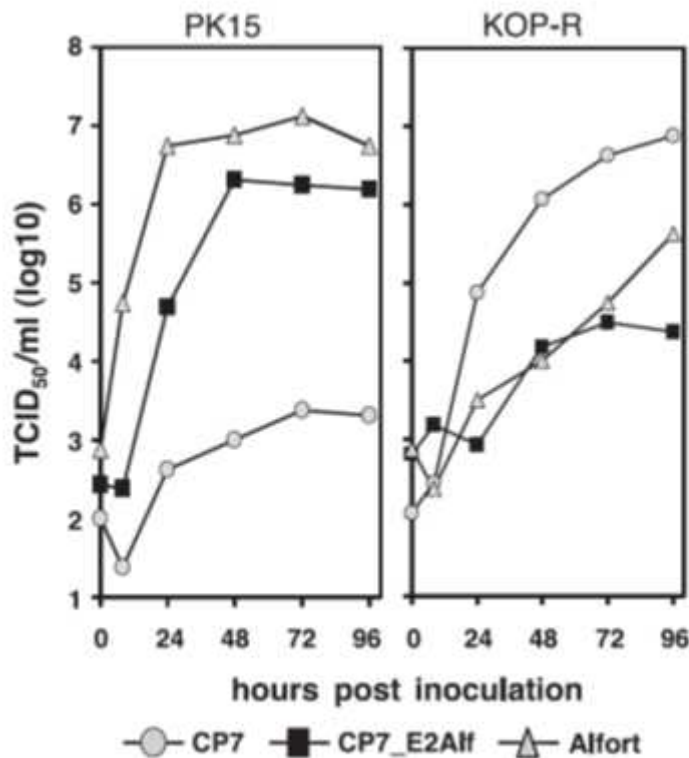
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

① 増殖様式

図 1-6 に示すように、BVDV1 型 CP7 株に比して、牛培養細胞株 KOP-R での増殖能力が低下しており効率的な増殖ができない。CSFV 由来の E2 タンパク質コード領域を導入したことにより、豚培養細胞株 PK15 での増殖能力が高い傾向があるが、供与核酸ドナー野外株 Alfort 187 株の増殖能を下回っている(文献 55)。

一方、本遺伝子組換えウイルスを豚に対して筋肉内及び経口投与した体内動態試験においては、経口投与では投与後 3 日目までに鼻腔及び咽頭スワブ、白血球、唾液腺ならびに扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出され、筋肉内投与では 14 日目に 6 頭中 1 頭の扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出されたものの、それ以降のいずれの組織からも検出されなかった。すなわち、本遺伝子組換えウイルスは豚の体内では一過性に増殖するものの、増殖箇所は極めて限定的であり、一定期間後に増殖が収束、抑制されることが確認されたことから、その増殖性は体外に排出されるレベルではないと考えられる(別紙 1)。



Reimann *et al.* (2004) Virology 322:143-157

図 1-6. 本遺伝子組換えウイルスと宿主の増殖曲線
豚培養細胞 PK15 及び牛培養細胞 KOP-R における増殖曲線

- 宿主である BVDV1 型 CP7 株
- 本組換えウイルス CP7_E2alf 株
- △ CSFV Alfort 187 株

PK15 及び KOP-R の confluent monolayer に、1 m.o.i.で感染させ、接種後 0、8、24、48、72、96 時間で全凍結/融解ライセートを測定した。
ウイルス力価を TCID₅₀/ml (log₁₀) として示す

② 遺伝的特性

本遺伝子組換えウイルスは、宿主である BVDV1 型 CP7 株のエンベロープ糖タンパク質 E2 コード領域を CSFV Alfort 187 株の同領域で置換して作出したものである。これにより豚由来細胞における増殖性が高く、牛由来細胞における増殖性は BVDV1 型 CP7 株より低い特性を獲得しているが、E2 コード領域以外の領域はすべて BVDV1 型 CP7 株のゲノム構成が維持されており、標的動物である牛以外の動物における病原性は低く、その特性は維持されている（文献 2）。

③ 病原性

1) 反すう動物に係る知見

本遺伝子組換えウイルスを、3～5 か月齢の牛、山羊、めん羊及び兔に高力価で経口投与した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、試験期間を通じて発熱及び白血球減少は認められず、白血球及び鼻腔スワブあるいは直腸スワブからもウイルスは分離されなかった。また、ワクチン投与動物及び同居動物のいずれにも抗体陽転は見られず、ウイルス血症及びウイルス排泄も認められなかった。（文献 65）。

2) 豚及び猪に係る知見

本遺伝子組換えウイルスを標的動物である豚及びその近縁野生種である猪に対し経口投与($10^{6.7}$ TCID₅₀/頭)した試験(文献 65)及び筋肉内接種した試験(文献 66)では、局所症状や全身症状は認められず、同居動物への感染も認められていないが、接種豚の血液からは最長 14 日目までウイルスゲノムが分離でき(文献 66)、扁桃からは最長 63 日目までウイルスゲノムが検出可能(文献 23)との報告がある。

CSFV 及び BVDV に対する抗体陰性の 6 週齢の豚を用いた常用量 2 回投与安全性試験では、本遺伝子組換えウイルスを 10 頭ずつの豚に 2 週間隔で筋肉内($10^{6.0}$ TCID₅₀/頭/回)及び経口投与($10^{6.8}$ または $10^{6.5}$ TCID₅₀/頭/回)し、初回投与後 4 週間観察した。その結果、アナフィラキシー等、投与に関連すると考えられる異常な臨床症状及び筋肉内投与における投与部位反応は認められず、各回投与後の体温及び試験期間中の増体量についてもリン酸緩衝食塩液を投与した対照群との統計学的な有意差は認められなかった。さらに試験終了後の病理学的検査においても異常所見は認められなかった。なお、試験期間中に筋肉内投与群の 9 頭及び経口投与の 10 頭全頭で CSFV に対する抗体が陽転した。以上のことから、本遺伝子組換えウイルスの常用量を 6 週齢の抗体陰性豚に 2 週間隔で 2 回投与したときに安全性が確認された(別紙 2)。

また、CSFV 及び BVDV に対する抗体陰性の 6~7 週齢の豚を用いた高用量単回投与による安全性試験では、本遺伝子組換えウイルスを 11 頭ずつの豚に($10^{7.5}$ TCID₅₀/頭)及び経口投与($10^{7.7}$ TCID₅₀/頭)し、投与後 3 週間観察した。その結果、アナフィラキシー等、投与に関連すると考えられる異常な臨床症状及び筋肉内投与における投与部位反応は認められず、各回投与後の体温及び試験期間中の増体量についてもリン酸緩衝食塩液を投与した対照群との明らかな差は認められなかった。さらに試験終了後の病理学的検査においても異常所見は認められなかった。なお、試験期間中に投与群全頭で CSFV に対する抗体が陽転した。以上のことから、本遺伝子組換えウイルスの高用量を 6~7 週齢の抗体陰性豚に単回投与したときに安全性が確認された(別紙 3)。

さらに、CSFV 及び BVDV に対する抗体陰性の 6 週齢の豚を用いた同居感染試験では、本遺伝子組換えウイルス接種豚からのウイルスの排泄及び同居感染が認められないことが確認されている。すなわち、本遺伝子組換えウイルス($10^{6.7}$ TCID₅₀/頭)を 8 頭ずつの豚に筋肉内及び経口投与し、それぞれ 8 頭ずつのウイルス非投与対照豚を投与後 24 時間以降、45 日間同居させて観察した。さらに投与後 45 日に対照豚の扁桃を採取し、定量的 RT-PCR 法により CSFV 遺伝子の検出を試みた。その結果、いずれの動物とも投与に起因する異常な臨床症状は認められず、非投与対照豚の扁桃から CSFV 遺伝子は検出さなかったことから、本遺伝子組換えウイルスを豚に投与したとき、ウイルスの排泄及び同居感染は認められないことが確認された(別紙 4)。

また、本組換えウイルスの胎盤を介した産子への感染が認められないとの試験報告(文献 23)がある。

以上から、本遺伝子組換えウイルスは豚、猪において病原性がないと考えられる。

④ 有害物質の産生性

本遺伝子組換えウイルスの宿主である BVDV において有害物質の産生性は認められない(I の 1 の (3) のへ) 参照)。

本遺伝子組換えウイルスは CSFV 由来の E2 タンパク質コード領域を導入したことにより、BVDV 1 型 CP7 株に比して牛培養細胞株 KOP-R での増殖能力が低下しており、ブタ培養細胞株 PK15 での

増殖能力が高い傾向がある。供与核酸ドナーの野外株 CSFV Alfort/187 株より増殖能力は低い（文献 2）という特徴はあるが、ウイルスとしての性状は基本的に BVDV 1 型 CP7 株と同じである。

「2 (1) ロ」構成要素の機能」で述べたように、供与核酸である Alfort/187 株の E2 領域（塩基：2444～3553 及びアミノ酸：691～1060）について検索した結果、CSFV E2 以外のタンパク質は検出されず、E2 の塩基配列及びアミノ酸配列について、既知の有害タンパク質と類似性は認められない。また、E2 は膜タンパク質であることから、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性は極めて低いと考えられる。

⑤ 感染性

一般的に BVDV は他の反芻動物や豚に感染し得るが、通常は牛以外の種で疾病を引き起こすことはない。兎で BVDV に対する抗体が存在していたという報告があるが、妊娠 7 または 12 日の兎に対する実験感染において感染兎に臨床症状、流産及び死産は認められず、BVDV 感染を示唆する病理所見も認められていない。しかしながら、一部の産子の組織または体液から RT-PCR 法により BVDV 遺伝子が検出され、一部の産子の血清または尿から BVDV に対する抗体が検出されたことから、経胎盤感染が成立していることが確認され、産子が感染源となるリスクはゼロではないことが示唆されている（文献 16）。

一方、本遺伝子組換えウイルスは BVDV 1 型 CP7 株に比して、牛培養細胞株 KOP-R での増殖能力が低下しており効率的な増殖ができない（図 1-6）。CSFV 由来の E2 タンパク質コード領域を導入したことにより、ブタ培養細胞株 PK15 での増殖能力が高い傾向がある（文献 2）。

本遺伝子組換えウイルスの宿主である BVDV 1 型 CP7 株は、牛に軽度な一過性の疾病を引き起こすが、先天的に持続感染子牛となるような感染を成立させることはできず、接種試験の結果、豚に対する病原性が弱いことが確認されている。すなわち、6 週齢の子豚を用いた筋肉内接種試験において、BVDV 1 型 CP7 株接種豚からはウイルスが分離され、同居非接種豚において中和抗体が検出されたのに対し、本遺伝子組換えウイルス接種豚からはウイルスは分離されず、同居感染も認められなかった（文献 2）。

本遺伝子組換えウイルスを、3～5 か月齢の牛、山羊、めん羊及び兎に高力価で経口投与した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、試験期間を通じて発熱及び白血球減少は認められず、白血球及び鼻腔スワブあるいは直腸スワブからもウイルスは分離されなかった。また、ワクチン投与動物及び同居動物のいずれにも抗体陽転は見られず、ウイルス血症及びウイルス排泄も認められなかった。（文献 65）。

本遺伝子組換えウイルスを標的動物である豚及びその近縁野生種である猪に対し経口投与した試験及び筋肉内接種した試験では、局所症状や全身症状は認められず、同居動物への感染も認められなかった（文献 65、66）。

本遺伝子組換えウイルスを豚に筋肉内接種し、4 日後に体内分布を調査した結果、血液、脾臓及び扁桃を含むリンパ節からは本ウイルスが分離されたが、他の臓器、精液、尿・糞便等からは検出されなかった（文献 67）。

なお、豚の血液からは最長 14 日目までウイルスゲノムが分離でき（文献 66）、扁桃からは最長 63 日目までウイルスゲノムが検出可能であった（文献 23）。一方、本遺伝子組換えウイルスを豚に筋肉内及び経口投与し、非投与対照豚を投与後 24 時間以降、45 日間同居させて観察した結果、いずれの動物とも投与に起因する異常な臨床症状は認められず、非投与対照豚の扁桃から CSFV 遺伝

子は検出されなかったことから、本遺伝子組換えウイルス接種豚からのウイルスの排泄及び同居感染が認められないことが確認されている（別紙 4）。

本遺伝子組換えウイルスの胎盤を介した産子への感染は認められなかった（文献 23）。

妊娠 55～80 日の母豚 13 頭に対して、高用量（ $10^{7.7}$ TCID₅₀/頭）の本遺伝子組換えウイルスを筋肉内投与後、分娩まで観察するとともに、その産子の状況を調査した。調査期間中、いずれの母豚においても異常な臨床症状及び流産は認められなかった。また、いずれの母豚においても分娩までに CSFV に対する抗体応答が認められた。いずれの母豚とも正常な分娩が認められ、産子の 97.2% は健康であった。初乳摂取前に採取した産子の血清について CSFV に対する抗体価を測定したところ、いずれも陰性であり、死産した 1 頭の産子の扁桃からもウイルス遺伝子は検出されなかった（別紙 5）。

また、妊娠中の母豚を 3 群に分け、常用量（ $10^{6.7}$ TCID₅₀/頭）の本遺伝子組換えウイルスをそれぞれ妊娠前期（10 頭）、中期（12 頭）ならびに後期（13 頭）に筋肉内投与後、分娩まで観察するとともに、その産子の状況を調査した。調査期間中、いずれの母豚においても投与に起因すると考えられる異常な臨床症状は認められなかった。妊娠中期及び後期に投与を受けた各 1 頭で流産が認められたが、いずれも投与に起因するものではないと判断された。その他、各群で死産、ミイラ胎子が散見されたが、通常の農場の繁殖状況の範囲内であった。また、4 頭を除くすべての母豚において分娩までに CSFV に対する抗体応答が認められた。初乳摂取前に採取した産子の血清について CSFV に対する抗体価を測定したところ、いずれも陰性であり、死産した 1 頭の産子の扁桃からもウイルス遺伝子は検出されなかった（別紙 6）。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスを豚に接種したとき、経胎盤感染が認められないことが確認された。

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

BVDV および牛腎培養細胞を用いて重感染の阻害メカニズムについて調査した実験において、ペスチウイルス属には細胞への侵入段階およびウイルス RNA 複製段階の 2 段階の重感染阻害メカニズムが存在することが示唆されている（文献 62）。

豚培養細胞に、本遺伝子組換えウイルス及び CSFV 野外株または BVDV1 型野外株を同時及び連続感染させ、その培養上清からシーケンスライブラリーを調製し、読み取りを行った結果、ウイルス間のゲノムの組換えの可能性を示す所見は認められなかった。この結果は、上記実験結果から示唆されたペスチウイルス属間の非常に強い干渉現象の存在を裏付けるものと考えられる。また、アジア各国をはじめ、CSFV 及び BVDV が同時に存在する国がいくつかあるにもかかわらず、BVDV にも感受性である豚において組換えが発生していないことから、2 種のペスチウイルス株が同じ細胞に感染し、組換えが発生する可能性が非常に低いことを強く示唆している（文献 61）。

さらに、CSFV 持続感染豚に対して CSFV 強毒株を筋肉内投与した実験において、供試猪が強毒株の攻撃から防御され、重感染が阻害されたことが確認されている（文献 63）。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスが感染することによって内在性ウイルスの活性や病原性に影響を与えることはなく、接種された動物に免疫抑制を引き起こ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

「③ 病原性」及び「⑤ 感染性」に記載した通り、本遺伝子組換えウイルスの豚における体内分布試験の結果において体外へのウイルス排泄は認められず（文献 65、66）、同居動物への感染や胎盤を介した産子への感染に関しても認められなかった（文献 23、67）。

本遺伝子組換えウイルスを豚に対して筋肉内及び経口投与した体内動態試験において、経口投与では投与後 3 日目から 10 日目までの間に鼻腔及び咽頭スワブ、白血球、唾液腺ならびに扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出され、筋肉内投与では 14 日目に 6 頭中 1 頭の扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出されたものの、それ以降のいずれの組織からも検出されなかった。すなわち、本遺伝子組換えウイルスは豚の体内では一過性に増殖するものの、増殖箇所は極めて限定的であり、一定期間後に増殖が収束、抑制されることが確認されたことから、その増殖性は体外に排出されるレベルではないと考えられる（別紙 1）。

また、本遺伝子組換えウイルスを豚に筋肉内及び経口投与し、非投与対照豚を投与後 24 時間以降、45 日間同居させて観察した結果、いずれの動物とも投与に起因する異常な臨床症状は認められず、非投与対照豚の扁桃から CSFV 遺伝子は検出されなかったことから、本遺伝子組換えウイルス接種豚からのウイルスの排泄及び同居感染が認められないことが確認されている（別紙 4）。

⑧ 自然界での生存能力

宿主 BVDV が属するフラビウイルス科ペスチウイルス属は、ウイルスの粒子径が 40～60 nm であり、エンベロープを有する一本鎖 (+) RNA を核酸として有するウイルスであり（文献 1）、逆性、両性石鹼液、アルコール系消毒液、あるいは塩素系消毒液などの消毒液により十分不活化可能である（文献 29）。また、同じペスチウイルス属である CSFV の生存能力は、温度、湿度、pH、有機物の存在及びその他様々な化学物質により影響されるほか、エーテルやクロロホルムなどの有機溶剤や中性洗剤（Nonidet P40、デオキシコール酸塩、サポニン等）によって不活化される（文献 53）ことから、BVDV も同様の性質を有すると考えられ、特に pH および温度に対する抵抗性において CSFV と同様の性質を有することが確認されている（追加文献 1）。本遺伝子組換えウイルスは、増殖性、病原性等以外は宿主の特性を受け継いでいると考えられることから、紫外線（文献 52）や上記の化学物質に対する感受性が比較的高く自然界での生存能力は低いと考えられる。

⑨ 交雑性等

「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」の項に記載したとおり、ペスチウイルス属には細胞への侵入段階およびウイルス RNA 複製段階の 2 段階の重感染阻害メカニズムが存在することが示唆され（文献 62）、2 種のペスチウイルス株が同じ細胞に感染し、組換えが発生する可能性が非常に低いことが強く示唆され（文献 61）、さらに、CSFV 持続感染豚に対して CSFV 強毒株を筋肉内投与した実験において、供試豚が強毒株の攻撃から防御され、重感染が阻害されたことが確認されている（文献 63）。

以上のことから、ワクチン接種動物区域において野外ウイルス株の循環量は少ないと考えられる。本遺伝子組換えウイルスの使用対象が CSFV 未感染の健康な飼育豚群であると想定すると、本遺伝子組換えウイルスと CSFV 野外株との間に新たな変異ウイルスが出現するリスクは極めて低く、これによる感染で影響を受ける近隣野生動物等は極めて少ないと考えられる。

- ロ) 遺伝子組換え微生物等の宿主との識別を可能とするコロニー形成性、発色性等の特徴
該当なし

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

- ① 運搬及び保管(生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の運搬及び保管を含む。)
- ② 医薬品医療機器等法第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験(以下「治験」という。)に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成 9 年農林水産省令第 75 号)第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用
- ③ 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 家畜伝染病予防法(昭和 26 年法律第 166 号)第 3 条の 2 に基づく特定家畜伝染病防疫指針に従った接種(妊娠豚以外の豚への接種)
- ⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律(昭和 45 年法律第 137 号)第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残さの廃棄
- ⑥ ⑤以外の廃棄(生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む。)
- ⑦ ①～⑥に付随する行為

(2) 使用等の方法

—

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

—

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

(5) 実験室等で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

ドイツにおいて実施された実験的臨床試験において、7～8 週齢の豚 20 頭に対して $10^{5.8}$ TCID₅₀ の本遺伝子組換えウイルスを筋肉内投与し、生理食塩液を投与した対照豚 10 頭とともに 4 週間観察した。その結果、いずれの動物においても投与局所反応及び投与に起因する臨床所見ならびに副反応は認められず、また、一過性の体温上昇が認められたものの、対照群でも同等の傾向が認められ、2 日以内に終息した。投与後 2 及び 4 週後に採取した血清について E^{ms} 及び E2 特異的 ELISA 法ならびに CSFV Alfort 株に対する中和試験により抗体価を測定した。その結果、いずれの動物のいずれの時点においても E^{ms} に対する ELISA 抗体価は陰性であった。一方、試験群の E2 に対する ELISA 抗体価及び CSFV Alfort 株に対する中和抗体価は、それぞれ投与後 2 週に 65%及び 55%、投与後 4 週に 90%及び 100%で抗体応答が認められた。これらの抗体応答率は他の実験室内試験で認められたものと同等レベルであった。以上のことから、野外と類似の環境下において本遺伝子組換えウイルスを豚に投与したときの安全性及び有効性が確認された(別紙 7)。

(6) 国外における使用等に関する情報

欧州医薬品庁 EMA は、本遺伝子組換えウイルスを有効成分とする弱毒マーカー生ワクチン Suvaxyn® CSF Marker (Zoetis) を承認している (2014 年)。

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/suvaxyn-csf-marker>

オランダ及び米国で、政府の備蓄ワクチンとして採用されている。

(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報

① 接種動物の体内における遺伝子組換え生ワクチンの消長に関する情報

本遺伝子組換えウイルスは CSFV 由来の E2 タンパク質コード領域を導入したことにより、BVDV1 型 CP7 株に比して牛培養細胞株 KOP-R での増殖能力が低下しており、ブタ培養細胞株 PK15 での増殖能力が高い傾向があるが、供与核酸ドナー野外株 CSFV Alfort/187 株より増殖能力は低い (文献 2)。

一方、本遺伝子組換えウイルスを豚に筋肉内接種し、4 日後に体内分布を調査した結果、血液、脾臓及び扁桃を含むリンパ節からは本ウイルスが分離されたが、他の臓器、精液、尿・糞便等からは検出されなかった (文献 66)。

また、本遺伝子組換えウイルスを標的動物である豚及びその近縁野生種である猪に対し経口投与した試験 (文献 65) 及び筋肉内接種した試験 (文献 66) では、局所症状や全身症状は認められず、同居動物への感染も認められていないが、接種豚の血液からは最長 14 日目までウイルスゲノムが分離でき (文献 66)、扁桃からは最長 63 日目までウイルスゲノムが検出可能であった (文献 23)。

本遺伝子組換えウイルスを豚に対して筋肉内及び経口投与した体内動態試験においては、経口投与では投与後 3 日目から 10 日目までの間に鼻腔及び咽頭スワブ、白血球、唾液腺ならびに扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出され、投与後 7 日目にはウイルスも分離された。一方、筋肉内投与では 14 日目に 6 頭中 1 頭の扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出されたものの、それ以降のいずれの組織からも検出されなかった。すなわち、豚に投与されたペスチウイルスゲノムの存在は投与後 14 日目まで確認され、ウイルスの単離は経口投与群のみ投与後 7 日目の扁桃部分に限定されたことが確認された (別紙 1)。

CSFV 及び BVDV に対する抗体陰性の 6 週齢の豚を用いた病原性復帰否定試験では、本遺伝子組換えウイルスを 7 頭の豚に筋肉内投与 ($10^{6.2}$ TCID₅₀/頭) し、投与後 6 日目に採取、調製したプール血漿 0.5 mL ずつを 10 頭の子豚に経口及び経鼻投与し、それぞれ投与後 7 日間観察した。その結果、初代及び 2 代目のいずれの豚においても投与に関連すると考えられる異常な臨床症状及び体温の上昇は認められず、試験終了後の病理学的検査においても異常所見は認められなかった。また、各回投与後 2～7 日に採取して採取日ごとにプールした血漿サンプルのいずれからもウイルスは分離されず、RT-PCR 法において初代の筋肉内投与後 6 日目のサンプル以外からはウイルス遺伝子は検出されなかった。以上のことから、本遺伝子組換えウイルスを 6 週齢の豚に筋肉内投与したとき、体内でウイルスの病原性が増強されないことが確認された (別紙 8)。

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

本遺伝子組換えウイルスの接種動物体外への排泄はないことが確認されている (I 2 (6) イ) ③、⑤)。なお、本遺伝子組換えウイルス接種豚の血液からは最長 14 日目までウイルスゲノムが分離でき (文献 66)、扁桃からは最長 63 日目までウイルスゲノムが検出可能であった (文献 23) が、同居感染

性は認められていない（文献 65、66）。

本遺伝子組換えウイルスを豚に投与した体内動態試験において、筋肉内投与後 14 日目に 6 頭中 1 頭の扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出されたものの、それ以降のいずれの組織からも検出されなかった。すなわち、本遺伝子組換えウイルスは豚の体内では一過性に増殖するものの、増殖箇所は極めて限定的であり、一定期間後に増殖が収束、抑制されることが確認されたことから、その増殖性は体外に排出されるレベルではないと考えられる（別紙 1）。

また、本遺伝子組換えウイルスを豚に筋肉内及び経口投与し、非投与対照豚を投与後 24 時間以降、45 日間同居させて観察した結果、いずれの動物とも投与に起因する異常な臨床症状は認められず、非投与対照豚の扁桃から CSFV 遺伝子は検出されなかったことから、本遺伝子組換えウイルス接種豚からのウイルスの排泄及び同居感染が認められないことが確認されている（別紙 4）。

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

本遺伝子組換えウイルスの胎盤を介した産子への感染は認められなかった（文献 23）。

また、妊娠豚に対する本遺伝子組換えウイルスの常用量、高用量投与試験においても経胎盤感染が認められないことが確認された（別紙 5、別紙 6）。

④ 野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

BVDV は山羊、鹿、兎、猪等の野生動物にも感染する可能性があるが、子牛、子山羊、子羊及び兎に対して本遺伝子組換えウイルスを経口投与した実験では、体温上昇、白血球減少の徴候を含め、臨床的な異常は認められていない。また、白血球、鼻腔スワブ及び糞便からウイルスは分離されず、投与後 49 日目においても本遺伝子組換えウイルスに対する中和抗体及び BVDV と CSFV の E2 特異的 ELISA 抗体は検出されなかった。さらに同居動物においても抗体応答が認められず、これらの非標的動物において無害であり、感染源にもなり得ないことが確認されている（文献 65）。

⑤ その他必要な情報

本遺伝子組換えウイルスは CSF に対する生ワクチンとして使用するが、使用に当たっては「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針」に従う必要がある。

本ワクチンは、6 週齢以上の豚に 1 頭当たり 1 mL を筋肉内接種し、追加免疫のために 6 か月間隔で 1 mL を筋肉内接種することで欧州において承認されている。

なお、本遺伝子組換えウイルスを接種した妊娠豚に対する CSFV 野外株による攻撃試験において、CSFV の経胎盤感染が阻止され、その有効性が示唆されているが（追加文献 2）、現時点ではこれ以上の検証は行われていないことから、妊娠豚に接種した場合の持続感染子豚からのウイルス排泄のリスクを考慮し、第一種使用規程にもあるように、妊娠豚への接種は禁止することとしている。

II 項目ごとの生物多様性影響評価

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

BVDV1 型 CP7 株は、米国コーネル大学が牛の血液・組織サンプルから分離した BVDV の野外株である。その後、BVDV1 型 CP7 株のゲノムがクローニングされ感染性クローン pA/BVDV が構築された。本遺伝子組換えウイルスの遺伝子は安定しており、マスターシードウイルスを PK15 株で 10 回継代培養して得たウイルスの性状に影響を及ぼすような差違は認められなかった。

本遺伝子組換えウイルスは CSFV 由来の E2 タンパク質コード領域を導入したことにより、BVDV1 型 CP7 株に比して牛培養細胞株 KOP-R での増殖能力が低下し、ブタ培養細胞株 PK15 での増殖能力が高い傾向があるが、供与核酸ドナー野外株 CSFV Alfort/187 株より増殖能力は低い。

本遺伝子組換えウイルスを猪に筋肉内接種し、4 日後に体内分布を調査した結果、血液、脾臓及び扁桃を含むリンパ節からは本ウイルスが分離されたが、他の臓器、精液、尿・糞便等からは検出されなかった。また、分離されたウイルスの遺伝子には変異が認められなかった。

本遺伝子組換えウイルスを豚に投与した体内動態試験において、筋肉内投与後 14 日目に 6 頭中 1 頭の扁桃からペスチウイルス遺伝子が検出されたものの、それ以降のいずれの組織からも検出されなかったことから、体内では一過性に増殖するものの、増殖箇所は極めて限定的であり、一定期間後に増殖が収束、抑制されることが確認された。

本遺伝子組換えウイルスを、3～5 か月齢の牛、山羊、めん羊及び兎に高力価で経口投与した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、試験期間を通じて発熱及び白血球減少は認められず、白血球及び鼻腔スワブあるいは直腸スワブからもウイルスは分離されなかった。また、ワクチン投与動物及び同居動物のいずれにも抗体陽転は見られず、ウイルス血症及びウイルス排泄も認められなかった。

標的動物である豚及びその近縁野生種である猪に対し経口投与した試験及び筋肉内接種した試験では、局所症状や全身症状は認められず、同居動物への感染も認められない。なお、豚の血液からは最長 14 日目までウイルスゲノムが分離でき、扁桃からは最長 63 日目までウイルスゲノムが検出可能であったが、豚を用いた同居感染試験においてはウイルスの排泄及び同居感染が認められないことが確認されている。また、本組換えウイルスの胎盤を介した産子への感染は認められなかった。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスの増殖能力の増大はみられないと結論される。

本遺伝子組換えウイルスの供与核酸は、CSFV Alfort/187 株(X87939.1)の E2 領域の塩基配列である。Alfort/187 株は Alfort 株の感染試験で死亡した豚から分離された株で、毒性は中程度（moderate-virulent strain）である。

E2 領域は、糖タンパク質 E2 をコードする。E2 はウイルス粒子表面に局在しており、動物細胞の受容体タンパク質 CD46 に吸着することで、ウイルスの感染初期段階で機能する。また、E2 は中和抗体の標的となっている。

Alfort/187 株のゲノム及びアミノ酸配列（CAA61161）の E2 に該当する領域（塩基：2444～3553 及びアミノ酸：691～1060）について検索した結果、CSFV E2 以外のタンパク質は検出されなかったことから、本遺伝子組換えウイルスの供与核酸である CSFV の E2 の塩基配列及びアミノ酸配列について、既知の有害タンパク質と類似性は認められないと考えられる。また、E2 は膜タンパク質であることから、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性は極めて低いと考えられる。

以上のことから、他の微生物に対する有害物質を産生する可能性は低いと結論される。

BVDV および牛腎培養細胞を用いて重感染の阻害メカニズムについて調査した実験において、ペスチウイルス属には細胞への侵入段階およびウイルス RNA 複製段階の 2 段階の重感染阻害メカニズムが存在することが示唆されている。

豚培養細胞において、本遺伝子組換えウイルスと CSFV 野外株または BVDV1 型野外株との同時及び連続感染試験では、ウイルス間のゲノムの組換えは認められず、ペスチウイルス属のウイルス間には非常に強い干渉状態が存在すると考えられる。また、アジア各国をはじめ、CSFV 及び BVDV が同時に存在する国がいくつかあるにもかかわらず、BVDV にも感受性である豚において組換えが発生していない。

CSFV 持続感染豚に対して CSFV 強毒株を筋肉内投与した実験において、供試豚が強毒株の攻撃から防御され、重感染が阻害されたことが確認されている。

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスのゲノムは *in vitro* 及び *in vivo* の両条件下で安定して維持され、共感染によるウイルスゲノムの組換えが起こる可能性は低いと考えられる。

本遺伝子組換えウイルスの形質発現の安定性は確認されており、病原性及び動物体内における増殖性以外は宿主である BVDV の特性をほぼ受け継いでいることを考慮すると、

- ① 有害物質を産生して他の微生物に影響を与える可能性は宿主と同等であると考えられる。
- ② 紫外線や消毒薬に対する感受性が比較的高く自然界での生存能力は宿主と同程度で低く、他の微生物に影響を与える可能性は宿主と同等であると考えられる。
- ③ BVDV と他の微生物との交雑性は報告されていないと考えられる。

本遺伝子組換えウイルスの宿主 BVDV1 型 CP7 株が野外株として分離された地域において現状で BVDV 発生による他の微生物への影響は報告されていない。

以上のことから、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微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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又は生育に支障を及ぼす性質）

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換えウイルスは BVDV を宿主としており、病原性及び動物体内における増殖性以外は宿主の特性をほぼ受け継いでいる。

BVDV の感受性動物は主に牛だが、本遺伝子組換えウイルスの BVDV1 型 CP7 株のような CP 株は牛に軽度な一過性の疾病を引き起こすが、先天的に持続感染子牛となるような感染を成立させることはできない。野生動物では山羊、鹿、兎ならびに猪が影響を受ける可能性があるが、野生種山羊の生息数は少ないと考えられ、また、牛のウイルス性疾病が鹿に伝搬する可能性も高いとは言えない。さらに、兎の実験感染においては臨床症状が認められず、豚及び猪に対して経口及び筋肉内接種した試験では、局所症状や全身症状は認められず、同居動物への感染も認められていない。

本遺伝子組換えウイルスを、3～5 か月齢の牛、山羊、めん羊及び兎に高力価で経口投与した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、試験期間を通じて発熱及び白血球減少は認められず、白血球及び鼻腔スワブあるいは直腸スワブからもウイルスは分離されなかった。また、ワクチン投与動物及び同居動物のいずれにも抗体陽転は見られず、ウイルス血症及びウイルス排泄も認められなかった。

本遺伝子組換えウイルスを豚に筋肉内接種し、4 日後に体内分布を調査した結果、血液、脾臓及び扁桃を含むリンパ節からは本ウイルスが分離されたが、他の臓器、精液、尿・糞便等からは検出されなかった。

なお、豚の血液からは最長 14 日目までウイルスゲノムが分離でき、扁桃からは最長 63 日目までウイルスゲノムが検出可能であったが、体外への排出は確認されなかった。

本遺伝子組換えウイルスを豚に投与した体内動態試験では、筋肉内投与後に体内で一過性に増殖するものの、増殖箇所は極めて限定的であり、一定期間後に増殖が収束、抑制されることが確認されたことから、その増殖性は体外に排出されるレベルではないと考えられた。

豚への常用量 2 回及び高用量単回投与による本遺伝子組換えウイルスの安全性試験では、投与に関連する異常な臨床症状、筋肉内投与における投与部位反応は認められず、投与後の体温及び増体もリン酸緩衝食塩液を投与した対照群と同等であった。また、病理学的検査においても異常所見は認められず、安全性が確認された。

豚を用いた病原性復帰否定試験では、筋肉内投与した豚の血漿を別の豚に経口及び経鼻投与したとき、異常な臨床症状及び試験終了後の病理学的検査においても異常所見は認められず、血漿からもウイルス遺伝子は検出されなかったことから、筋肉内投与された豚の体内でウイルスの病原性は増強されないことが確認された。

豚への筋肉内及び経口投与による同居感染試験では、本遺伝子組換えウイルス接種豚からのウイルスの排泄及び同居感染が認められなかった。

妊娠豚における安全性試験では、経胎盤感染は認められなかった。

一方、本遺伝子組換えウイルスを接種した妊娠豚に対する CSFV 野外株による攻撃試験において、CSFV の経胎盤感染が阻止され、その有効性が示唆されているが（追加文献 2）、現時点ではこれ以上の検証は行われていないことから、妊娠豚に接種した場合の持続感染子豚からのウイルス排泄のリスクを考慮し、現時点では妊娠豚に対する接種は禁止することとしている。

以上のことから、病原性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

BVDV において有害物質の産生性は認められていない。

供与核酸は、CSFV Alfort/187 株（X87939.1）の E2 領域である。Alfort/187 株は Alfort 株の感染試験で死亡した豚から分離された株で、毒性は中程度（moderate-virulent strain）とされている。離乳子豚においては、20 日以内に死亡率が 100%に達する場合がある。胎子期の感染及び出生後の慢性感染が持続感染の原因になり得る。

Alfort/187 株のゲノム及びアミノ酸配列（CAA61161）の E2 に該当する領域（塩基：2444～3553 及びアミノ酸：691～1060）について検索した結果、CSFV E2 以外のタンパク質は検出されなかったことから、本遺伝子組換えウイルスの供与核酸である CSFV E2 の塩基配列及びアミノ酸配列について、既知の有害タンパク質と類似性は認められないと考えられる。

E2 タンパク質はそれ自身が主要な免疫原であり、特に中和抗体を誘導するが病原性を伝達することはできない。

また、CSFV E2 領域の挿入箇所は安定していて、新たなオープンリーディングフレーム発生による有害物質産生の可能性もない。

以上のことから、有害物質の産生性によって影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

BVDV の核酸が感受性動物の核酸に組み込まれたという報告はない。

宿主である BVDV 及び供与核酸として E2 領域の組換えに使用した CSFV については、同じペスチウイルス属であり、一本鎖プラス RNA ウィルスである。両 RNA ウィルスの増殖様式は同じで、細胞質内で核酸の複製が行われて増殖すること、核酸の複製過程に DNA を介さないことから、核酸の一部または全部が感染動物の染色体に含まれる可能性はないと考えられる。

豚培養細胞において、本組換えウィルスを CSFV 野外株または BVDV 1 型野外株と同時に及び連続感染させた試験では、ウィルス間のゲノムの組換えは認められていない。

豚及び猪に対し経口または筋肉内接種し、非接種の豚及び猪を同居させた試験では、同居動物の白血球及びスワブサンプルからウィルス及びウィルス遺伝子は分離、検出されず、抗体も検出されていない。

また、豚に対して筋肉内および経口投与後、非接種豚を投与後 24 時間以降、45 日間同居させた試験では、接種後 45 日に採材した同居動物の扁桃から CSFV 遺伝子は検出されず、CSFV 及び BVDV に対する抗体も検出されなかった。

本遺伝子組換えウィルスを豚に投与した体内動態試験では、筋肉内投与後に体内で一過性に増殖するものの、増殖箇所は極めて限定的であり、一定期間後に増殖が収束、抑制されることが確認されたことから、その増殖性は体外に排出されるレベルではないと考えられた。

豚を用いた病原性復帰否定試験では、筋肉内投与した豚の血漿を別の豚に経口及び経鼻投与したとき、異常な臨床症状及び試験終了後の病理学的検査においても異常所見は認められず、血漿からもウィルス遺伝子は検出されなかったことから、筋肉内投与された豚の体内でウィルスの病原性は増強されないことが確認された。

妊娠豚における安全性試験では、経胎盤感染は認められなかった。

以上のことから、近隣感受性動物または近隣野生動物に対しても悪影響を与える可能性はないと考えられ、本組換えウィルスが他の野生動植物等の核酸に水平伝播する機会はないものと考えられる。すなわち、核酸を水平伝達する性質によって影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

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

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

III 生物多様性影響の総合的評価

他の微生物を減少させる性質については、

- ① 本遺伝子組換えウイルスの遺伝子は *in vitro* 及び *in vivo* において安定しており、ウイルス遺伝子に生物多様性に影響すると考えられる変異は生じていないこと、豚における体内動態試験において、増殖が一過性かつ限局的であったこと、
- ② 豚培養細胞において、本遺伝子組換えウイルスと CSFV 野外株または BVDV1 型野外株との同時及び連続感染試験では、同じペスチウイルス間のゲノムの組換えは認められなかったことから有害物質を産生する可能性は低いこと、
- ③ 牛、山羊、めん羊及び兎に投与してもワクチン投与動物及び同居動物のいずれにも抗体陽転は見られず、ウイルス血症及びウイルス排泄も認められないこと、豚及び猪に投与しても、局所症状や全身症状は認められず、同居動物への感染も認められないこと、
- ④ 自然界での生存能力は宿主である BVDV と同程度で紫外線や消毒薬に対する感受性が比較的高く自然界での生存能力は低く、他の微生物に影響を与える可能性は宿主と同等であること、
- ⑤ BVDV の他の微生物との交雑性は報告されておらず、本遺伝子組換えウイルスについても報告はなく他の微生物に影響を与える可能性は宿主と同等であると考えられることから、

第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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、

- ① 本遺伝子組換えウイルスの野生動物に対する伝播力及び病原性は低いと考えられ、牛、山羊、めん羊及び兎に高用量投与しても症状を示さず、ウイルス血症やウイルス排泄も認められていないこと、
- ② 豚における体内動態試験において増殖箇所が極めて限定的であり、体外に排出されるレベルの増殖性が認められなかったこと、
- ③ 子豚への常用量単回及び2回投与、ならびに高用量投与試験において安全性が確認されていること、
- ④ 病原性復帰試験において豚の体内でウイルスの病原性は増強されないことが確認されたこと、
- ⑤ 豚における同居感染試験においてウイルス排泄及び同居感染が認められなかったこと、
- ⑥ 妊娠豚において接種した本遺伝子組換えウイルスの経胎盤感染が認められなかったが CSFV 野外株による経胎盤感染に十分に対処するため妊娠豚への接種は禁止するとしたことから、

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

有害物質の産生性については、

- ① データベース検索により、本遺伝子組換えウイルスの E2 領域から産生されるタンパク質は CSFV E2 タンパク質のみであり、既知の有害タンパク質との類似性は認められないこと、
- ② E2 は膜タンパク質であることから、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性は極めて低いと考えられること、
- ③ CSFV E2 領域の挿入箇所は安定していて、新たなオープンリーディングフレーム発生による有害物質産生の可能性もないと考えられることから、

第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、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。

核酸を水平伝達する性質については、

- ① 宿主ウイルスと核酸を供与したウイルスが、同じペスチウイルス属の一本鎖プラス RNA ウィルスであり、細胞質内で核酸の複製が行われて増殖すること、
- ② 核酸の複製過程に DNA を介さないことから、供与核酸が感染動物の染色体に組み込まれる可能性が低いこと、
- ③ 豚培養細胞において、本遺伝子組換えウイルスと CSFV 野外株または BVDV1 型野外株との同時及び連続感染試験では、ウイルス間のゲノムの組換えは認められていないこと、
- ④ 豚への投与による体内動態試験では体内における増殖性が一過性かつ限局的であり、体外に排出されるレベルではなく、豚及び猪に経口または筋肉内接種した試験において非接種動物への同居感染が認められていないこと、
- ⑤ 妊娠豚における安全性試験では、経胎盤感染が認められなかったが、CSFV 野外株による経胎盤感染に十分に対処するため妊娠豚への接種は禁止することとしたこと等から、

第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

以上を総合的に評価し、当該遺伝子組換え微生物を第一種使用規定に従った使用を行うかぎり、生物多様性影響が生ずる恐れはないものと判断した。

別添資料リスト

- 別紙 1 CP7_E2alf 株マーカーワクチンの 6 週齢子豚への筋肉内及び経口接種後の体内分布
Dissemination of CP7_E2alf vaccine in 6 week-old piglets after intramuscular or oral vaccination
Study Report No. 9425R-10-11-357
- 別紙 2 CP7_E2alf 株マーカー生ワクチンの豚への常用量及び常用量反復投与の安全性 投与部位の死後分析
Safety of one dose and repeated administration of one dose of the CP7_E2alf live marker vaccine to pigs.
Postmortem analysis of the injection sites
Study Report No. 9425N-08-11-358
- 別紙 3 CP7_E2alf 株マーカー生ワクチンの豚への高用量投与の安全性
Safety of the administration of an overdose of the CP_E2alf live marker vaccine to pigs
Study Report No. 9425N-08-12-378
- 別紙 4 CP7_E2alf 株の豚における排泄及び同居感染試験
Non-transmissibility (shedding) study after the administration of CP7_E2alf first passage from the Master Seed Virus (MSV+1) to pigs
Study Report No. 9425N-08-12-382
- 別紙 5 妊娠豚における CP7_E2alf 株マーカーワクチンの高用量接種による安全性
Safety of the administration of an overdose of the CP7_E2alf live marker vaccine to pregnant sows
Study Report No. 9426N-08-11-374
- 別紙 6 妊娠豚の CP7_E2alf 株マーカーワクチンの妊娠各期における高用量接種による安全性
Safety of the administration of an overdose of the CP7_E2alf live marker vaccine to pregnant sows at different stages of gestation
Study Report No. 9425N-08-11-363
- 別紙 7 CSF ワクチンの安全性評価：ドイツの野外環境における約 6 週齢子豚への CP7_E2alf 株投与
Evaluation of the safety of a classical swine fever (CSF) vaccine. CP7_E2alf, administered to piglets aged approximately six weeks under field conditions in Germany
Study Report No. 9425C-10-12-379
- 別紙 8 6 週齢子豚に投与した CP_E2alf 株マスターシードウイルス (MSV+1) の 1 回継代における病原性復帰
Reversion to virulence of CP_E2alf first passage from the master seed virus (MSV+1) administered to 6 week-old piglets
Study Report No. B922N-ES-12-004

本申請書で使用する略号・用語表

略号・用語	正式名称・英名	簡単な解説
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus	牛ウイルス性下痢ウイルス
RNA	Ribonucleic Acid	リボ核酸
UTR	Untranslated Region	非翻訳領域
IRES	Internal Ribosomal Entry Site	内部リボゾーム進入部位
CP 株	Cytopathic strain	細胞病原性株
NCP 株	Noncytopathic strain	非細胞病原性株
PI	Persistent infection	持続感染
IFN	Interferon	インターフェロン
CPE	Cytopathic effect	細胞変性効果
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
DMEM	Dulbecco's minimum essential media	ダルベッコ最少必須培地
TCID ₅₀	Tissue culture infection dose 50	50%組織培養感染量
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	固相酵素免疫吸着法
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁

引用文献

- 文献 1 迫田 義博 (2011) 6.ペスチウイルス. ウイルス 第 61 巻 第 2 号: 239-249
- 文献 2 Reimann I, Depner K, Trapp S, Beer M (2004) An avirulent chimeric pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology* 322:143–157
- 文献 3 亀山ら, 平成 24 年 3 月; 牛ウイルス性下痢ウイルスの国内分布及び牛ウイルス性下痢・粘膜病の迅速診断に関する研究, 動衛研研究報告第 118 号, 19-22
- 文献 4 Bachofen C, Vogt HR, Stalder H, Mathys T, Zanoni R, Hilbe M, Schweizer M, Peterhans E (2013) Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhea virus from cattle to goats and among goats. *Vet Res* 44:32
- 文献 5 Nelson DD, Dark MJ, Bradway DS, Ridpath JF, Call N, Haruna J, Rurangirwa FR, Evermann JF (2008) Evidence of persistent *Bovine viral diarrhea virus* infection in a captive mountain goat (*Oreamnos americanus*). *J Vet Diag Invest* 20:752-759
- 文献 6 Nelson DD, Duprau JL, Wolff PL, Evermann JF (2016) Persistent Bovine Viral Diarrhea virus infection in domestic and wild small ruminants and camelids including the mountain goat (*Oreamnos americanus*). *Front Microbiol* 6:1415
- 文献 7 Paniagua J, Garcia-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Berriatua E, Espunyes J, Carbonero A, Rosell R, Marco I, Cabezón O (2016) Absence of circulation of Pestivirus between wild and domestic ruminants in southern Spain. *Vet Rec* 178:215
- 文献 8 Casaubon et al., 2012; Bovine viral diarrhea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock.
- 文献 9 Martin et al., 2011; Epidemiology of Pestivirus infection in wild ungulates of the French South Alps. *Vet Microbiol.*, 147 320-328.
- 文献 10 Ilha MRS, Coarsey M, Whittington L, Rajeev S, Ramamoorthy S (2016) The occurrence of Bovine viral diarrhea virus in hunter-harvested white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the state of Georgia, southeastern United States. *J Vet Diag Invest* 24:1052-1056
- 文献 11 Passler T, Ditchkoff SS, Walz PH (2016) Bovine viral diarrhea virus (BVDV) in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Front Microbiol* 7:945
- 文献 12 Kirchgesner MS, Dubovi EJ, Porter WF, Zylich NC, Whipps CM (2012) Prevalence and spatial distribution

of antibodies to bovine viral diarrhea virus and *Coxiella burnetii* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in New York and Pennsylvania. *J Zoo Wildl Med* 43: 466-472

- 文献 13 Gao S, Luo J, Du J, Lang Y, Cong G, Shao J, Lin T, Zhao F, Belak S, Liu L, Chang H, Yin H (2013) Serological and molecular evidence for natural infection of bacterin camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhea virus in western China. *Vet Microbiol* 163: 172-176
- 文献 14 Deng Y, Shan TL, Tong W, Zheng XC, Guo YY, Zheng H, Cao SJ, Wen XT, Tong GZ (2014) Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus 1 isolate from swine. *Arch Virol* 159: 2513-2517
- 文献 15 Glawischnig W, Schoepf K, Matt M, (2010) Monitoring for bovine viral diarrhea virus in Austrian red deer (*Cervus elaphus elaphus*) by using ear-notch samples. *J Wildl Dis* 46: 1269-1273
- 文献 16 Grant DM, Dagleish MP, Bachofen C, Boag B, Deane D, Percival A, Zadoks RN, Russell GC (2015) Assessment of the rabbit as a wildlife reservoir of bovine viral diarrhea virus: serological analysis and generation of trans-placentally infected offspring. *Front Microbiol* 6:1000
- 文献 17 Sedlak K, Bartove E, Machova J (2008) Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J Wildl Dis* 44:777-780
- 文献 18 Milicevic V, Maksimovic-Zoric J, Veljovic LJ, Kureljusic B, Savic B, Cvetojevic D, Jezdimirovic N, Radosavljevic V (2018) Bovine viral diarrhea virus infection in wild boar. *Res Vet Sci* 119:76-78
- 文献 19 Corapi WV, Donis RO, Dubovi EJ (1988) Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *J Virol* 62:2823–2827
- 文献 20 Meyers G, Tautz N, Becher P, Thiel HJ, Kümmerer BM (1996) Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J Virol* 70:8606–8613
- 文献 21 Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rumenapf T, Meyers G (1991) Hog Cholera virus: Molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* 65:4705-4712
- 文献 22 Weiland F, Weiland E, Unger G, Saalmuller A, Thiel HJ (1999) Localization of pestiviral envelope proteins E^{ms} and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J Gen Virol* 80:1157-1165
- 文献 23 Blome S, Wernike K, Reimann I, König P, Moß C, Beer M (2017) Review: A decade of research into classical swine fever marker vaccine CP7_E2alf (Suvaxyn® CSF Marker): a review of vaccine properties. *Vet Res* (2017) 48:51
- 文献 24 Weiland E, Stark R, Haas B, Rumenapf T, Meyers G, Thiel HJ (1990) Pestivirus glycoprotein which induces

neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. J Virol 64:3563-3569

- 文献 25 Weiland E, Ahl R, Stark R, Haas B, Weiland F, Thiel HJ (1992) A second envelope glycoprotein mediated neutralization of a pestivirus, Hog Cholera virus. J Virol 66:3677-3682
- 文献 26 Leyssen P, De Clercq E, Neyts J (2000) Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. Clin Microbiol Rev 13:67-82
- 文献 27 Giangaspero M, Harasawa R (2007) Numerical taxonomy of the genus Pestivirus based on palindromic nucleotide substitutions in the 5' untranslated region. J Virol Methods 146:375-388
- 文献 28 Meyer C, von Freyburg M, Elbers K, Meyers G (2002) Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine diarrhea viruses from infectious cDNA clones. J Virol 76:8494-8503
- 文献 29 公益社団法人 中央畜産会 (2017) 牛ウイルス性下痢・粘膜病. 日本中央競馬会特別振興資金助成事業
- 文献 30 Browlie J, Clarke MC, Howard CJ (1989) Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhea virus. Res Vet Sci 46: 307-311
- 文献 31 Browlie J, Clarke MC, Howard CJ (1984) Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. Vet Rec 114: 535-536
- 文献 32 Howard CJ, Brownlie J, Clarke MC (1987) Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhea virus isolated from cases of mucosal disease. Vet Microbiol 13: 361-369
- 文献 33 Kameyama K, Sakoda Y, Matsuno K, Ito A, Tajima M, Nakamura S, Kida H (2008) Cleavage of the NS2-3 protein in the cells of cattle persistently infected with non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. Microbiol Immunol 52: 277-282
- 文献 34 Kameyama K, Sakoda Y, Tamai K, Nagai M, Akashi H, Kida H (2006) Genetic recombination at different points in the N^{PRO}-coding region of bovine viral diarrhea viruses and the potentials to change their antigenicities and pathogenicities. Virus Res 116: 78-84
- 文献 35 Hulst MM, van Gennip HGP, Vlot AC, Schooten E, de Smit AJ, Moormann RJM (2001) Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: Role for virus replication in vivo and virulence. J Virol 75: 9585-9595
- 文献 36 Ruggli N, Bird BH, Liu L, Bauhofer O, Tratschin JD, Hofmann MA (2005) N^{PRO} of classical swine fever

virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN- α/β induction. Virol 340: 265-276

- 文献 37 Johns HL, Bensaude E, La Rocca SA, Seago J, Charleston B, Steinbach F, Drew TW, Crooke H, Everett H (2010) Classical swine fever virus infection protects aortic endothelial cells from plpC-mediated apoptosis. J Gen Virol 91: 1038-1046
- 文献 38 Iqbal M, Poole E, Goodbourn S, McCauley JW (2004) Role of bovine viral diarrhea virus N^{PRO} glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. J Virol 78: 136-145
- 文献 39 Seago J, Goodbourn S, Charleston B (2010) The classical fever virus N^{PRO} product is degraded by cellular proteasomes in a manner that does not require interaction with interferon regulatory factor 3. J Gen Virol 91: 721-726
- 文献 40 Bauhofer O, Summerfiels, Sakoda Y, Tratschin JD, Hofmann MA, Ruggli N (2007) Classical swine fever virus NPRO interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. J Virol 81: 3087-3096
- 文献 41 Magkouras I, Matzener P, Rumenapf T, Peterhans E, Schweizer M (2008) RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by E^{rns} of pestivirus. J Gen Virol 89: 2501-2506
- 文献 42 Zurcher C, Sauter KS, Mathys V, Wyss F, Schweizer M (2014) Prolonged activity of the pestiviral RNase E^{rns} as an interferon antagonist after uptake by clathrin-mediated endocytosis. J Virol 88: 7235-7243
- 文献 43 Hulst MM, Westra DF, Wensvoort G, Moormann RJM (1993) Glycoprotein E1 of Hog Cholera virus expressed in insect cells protects swine from Hog Cholera. J Virol 67: 5435-5442
- 文献 44 Wernery U (2012) Bovine viral diarrhea-an emerging disease in camelids a review. Am J Virol 1: 9-17
- 文献 45 EI Bahgy HEK, Abdelmegeed HK, Marawan MA (2018) Epidemiological surveillance of bovine viral diarrhea and rift valley fever infections in camel. Vet World 11: 1331-1337
- 文献 46 Mishra N, Pitale SS, Rajukumar K, Prakash A, Behera SP, Nema RK, Dubey SC (2012) Genetic variety of bovine viral diarrhea virus 1 strains isolated from sheep and goats in India. Acta Virologica 56: 209-215
- 文献 47 Aguirre IM, Fuentes R, Celedon MO (2014) Genotypic characterization of Chilean llama (*Lama glama*) and alpaca (*Vicugna pacos*) pestivirus isolates. Vet Microbiol 168: 312-317
- 文献 48 Aguirre IM, Quezada MP, Celedon MO (2014) Antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV)

isolates from alpaca (*Vicugna pacos*), llama (*Lama glama*) and bovines in Chile. Vet Microbiol 168: 324-330

- 文献 49 Marcoppido G, Olivera V, Bok K, Parreno V (2011) Study of kinetics of antibodies titres against viral pathogens and detection of rotavirus and parainfluenza 3 infections in Captive Crias of Guanacos (*Lama guanicoe*). Transbound Emerg Dis 58: 37-43
- 文献 50 Soltan MA, Wilkes RP, Elsheery MN, Elhaig MM, Riley MC, Kennedy MA (2016) Circulation of bovine viral diarrhea virus-1 (BVDV-1) in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia province, Egypt. J Infect Dev Ctries 9: 1331-1337
- 文献 51 Marcoppido G, Parreno V, Vila B (2010) Antibodies to pathogenic livestock viruses in a wild vicuna (*Vicugna vicugna*) population in the Argentinean Andean altiplano. J Wildl Dis 46: 608-614
- 文献 52 Cutler T, Wang C, Qin Q, Zhou F, Warren K, Yoon KJ, Hoff SJ, Ridpath J, Zimmerman J (2011) Kinetics of UV₂₅₄ inactivation of selected viral pathogens in a static system. J Appl Microbiol 111: 389-395
- 文献 53 Edwards S (2000) Survival and inactivation of classical swine fever virus. Vet Microbiol 73: 175-181
- 文献 54 Gil LHV, Ansari IH, Vassilev V, Liang D, Lai VCH, Zhong W, Hong Z, Dubovi EJ, Donis RO (2006) The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus N^{PRO} protein is necessary for alpha-beta interferon antagonism. J Virol 80: 900-911
- 文献 55 Hilton L, Monganerad K, Zhang G, Chen YH, Randall RE, McCauley JW, Goodbourn S (2006) The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. J Virol 80: 11723-11732
- 文献 56 Ruggli N, Tratschin JD, Mittelholzer C, Hofmann MA (1996) Nucleotide sequence of classical fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. J Virol 70: 3478-3487
- 文献 57 Floegel-Niesmann G, Bunzenthall C, Fischer S, Moennig V (2003) Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs. J Vet Med 50: 214-220
- 文献 58 Reimann I, Meyers G, Beer M (2003) Trans-complementation of autonomously replicating bovine viral diarrhea virus replicons with deletions in the E2 coding region. Virology 307: 213-227
- 文献 59 Leifer I, Lange E, Reimann I, Blome S, Juanola S, Duran IP, Beer M (2009) Modified live marker vaccine candidate CP_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization. Vaccine 27: 6522-6529

- 文献 60 Reimann I, Depner K, Utke K, Leifer I, Lange E, Beer M (2010) Characterization of a new chimeric marker vaccine candidate with a mutated antigenic E2-epitope. *Vet Microbiol* 142: 45-50
- 文献 61 Goller KV, Drager C, Hoper D, Beer M, Blome S (2015) Classical swine fever virus marker vaccine strain CP7_E2alf: genetic stability in vitro and in vivo. *Arch Virol* 160: 3121-3125
- 文献 62 Lee YM, Tscherne DM, Yun SI, Frolov I, Rice CM (2005) Dual mechanism of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNS replication. *J Virol* 79: 3231-3242
- 文献 63 Gonzalez SM, Simo MP, Cadena AC, Cabezon O, Bohorquez JA, Rossel R, Perez LJ, Marco I, Lavin A, Domingo M, Ganges L (2016) Classical swine fever virus vs. classical fever virus: The superinfection exclusion phenomenon in experimentally infected wild boar. *PLOS ONE* 10: 1371
- 文献 64 Blome S, Meindl-Bohmer A, Loeffen W, Thuer B, Moennig (2006) Assessment of classical swine fever diagnostic and vaccine performance. *Rev sci Off int Epiz* 25: 1025-1038
- 文献 65 Konig P, Blome S, Babriel C, Reimann I, Beer M (2011) Innocuousness and safety of classical swine fever marker vaccine candidate CP7_E2alf in non-target and target species. *Vaccine* 30: 5-8
- 文献 66 Konig P, Hoffmann B, Depner KR, Reimann I, Teifke JP, Beer M (2007) Detection of classical swine fever vaccine virus in blood and tissue samples of pigs vaccinated either with a conventional C-strain vaccine or a modified live marker vaccine. *Vet Microbiol* 120: 343-354
- 文献 67 Drager C, Petrov A, Beer M, Teifke JP, Blome S (2015) Classical swine fever virus marker vaccine strain CP7_E2alf: Shedding and dissemination studied in boars. *Vaccine* 33: 3100-3103
- 追加文献 1 Depner K, Bauer TH, Liess B (1992) Thermal and pH stability of pestivirus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epz* 11: 885-893
- 追加文献 2 Henke J, Carlson J, Zani L, Leidenberger S, Schwaiger T, Schlottau K, Teifke JP, Schroder C, Beer M, Blome S (2018) Protection against transplacental transmission of moderately virulent classical swine fever virus using live marker vaccine “CP7_E2alf”. *Vaccine* 36 4181-4187
- 追加文献 3 Strauss JH, Strauss EG (1992) Chapter 3 - Plus-Stranded RNA viruses. *Viruses and Human diseases*. 2nd Edition: 63-136
- 追加文献 4 田島 誉士 (2012) 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, *日本獣医師会雑誌* 65:111-117
- 追加文献 5 Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lawings JP, Paton DJ (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction

and restriction endonuclease analysis. Arch Virol 136:309-323

緊急措置計画書

令和元年 11 月 29 日

氏名 ゾエティス・ジャパン株式会社
代表取締役社長 加藤 克利
住所 東京都渋谷区代々木三丁目 22 番 7 号

第一種使用規程の承認を申請している CSF ウイルス由来 E2 遺伝子導入牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 CP7_E2alf 株 (E2, *Bovine viral diarrhea virus type 1*) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置を執ることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を執るための実施体制及び責任者

実施体制 (別添 1 として添付)

実施責任者 (ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部長)

実施責任者は、欧州で製造されて日本に輸入される CSF ウイルス由来 E2 遺伝子導入牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 CP7_E2alf 株 (E2, *Bovine viral diarrhea virus type 1*) (以下、本組換え微生物という) が生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められたとき、本組換え微生物を開発した米国の法人 (以下、米国開発法人) 及び日本国内に設置した業務安全委員会に連絡する。業務安全委員会は、緊急措置を執るための社内体制及び連絡窓口を通じて、実施責任者とともに緊急措置を執る。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 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開発法人に依頼するとともに、家畜伝染病予防法 (昭和 26 年法律第 166 号) 第 3 条の 2 に基づく「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針」に基づき、該当する都道府県の協力のもとに接種を行うこととされているため、本組換え微生物を使用する治験の実施機関、本組換え微生物の都道府県の各配布先及び国内販売代理店等に関する情報を把握し、その情報を整理して記録する。
- (2) 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、(1)により把握している治験の実施機関、都道府県の各配布先及び国内販売代理店等に情報提供を依頼し、本組換え微生物を保有している者及び使用状況の把握に努め、得られた情報を整理して記録する。

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

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

日本国内においては、プレスリリースを行う等メディアを通じて広く使用者に周知するとともに、

2 で把握した関係者に対して電話や文書などにより連絡を取る。また、当社のホームページにおいても本件についてのお知らせを掲載するとともに、問い合わせ窓口を設置する。

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

- (1) 欧州の製造所に対して、本組換え微生物の日本への輸出の自粛を直接あるいは米国開発法人を通じて要請する。
- (2) 日本国内において本組換え微生物が配布されている場合は、本組換え微生物の配布を中止し、都道府県の協力を得て、回収を行い、回収した本組換え微生物は密閉容器に保管の上、高圧滅菌等の不活化措置を執る。
- (3) 日本国内において本組換え微生物が使用されている場合は、密閉容器に本遺伝子組換え微生物を保管の上、高圧滅菌等の不活化措置を執るよう都道府県関係者に要請する。
- (4) 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は、自然環境に本組換え微生物が拡散しないよう、接種された豚及び感染している可能性の高い動物（例えば同居動物）の隔離飼育又は安楽死、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等の適切な措置を執るよう都道府県関係者を介して、接種動物の所有者に要請する。
- (5) 万が一、接種された農場周辺における野生動物を対象としたモニタリングの必要性が出てきた場合には、農林水産省及び環境省の担当者の指導を受け、行うこととする。

5 農林水産大臣及び環境大臣への速やかな連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省農産安全管理課（TEL：03-3591-6585）及び環境省野生生物課（TEL：03-5521-8282）に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口に報告する。

6 その他必要な事項

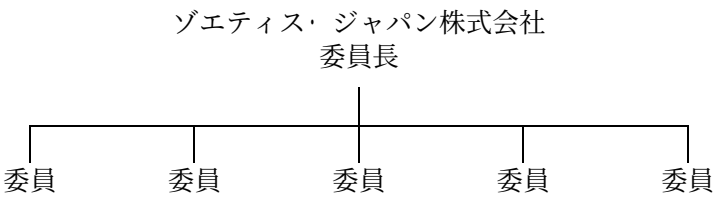
—

実施体制

業務安全委員会

委員長	ゾエティス・ジャパン株式会社	製品開発・薬事統括部長
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	製品開発・薬事統括部
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	製品開発・薬事統括部
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	製品開発・薬事統括部
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	ライブストック・ビジネス統括部
委員	ゾエティス・ジャパン株式会社	カスタマーサービス&オペレーション管理部

実施体制図



	氏 名	職 名
委員長	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部長
委員	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部
委員	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部
委員	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部
委員	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社 ライブストック・ビジネス統括部
委員	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社 カスタマーサービス&オペレーション管理部

CSF ウイルス由来 E2 遺伝子導入牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 CP7_E2alf 株
(*E2, Bovine Viral Diarrhea Virus type 1*) (Suvaxyn CSF Marker) の
生物多様性影響評価書

別紙概要

別紙 1 CP7_E2alf 株マーカーワクチンの 6 週齢子豚への筋肉内及び経口接種後の体内分布

Dissemination of CP7_E2alf vaccine in 6 week-old piglets after intramuscular or oral vaccination, Study Report No. 9425R-10-11-357

本研究の目的は、6週齢の子豚にCP7_E2alfワクチンを筋肉内又は経口接種したときの伝播及び体内分布パターンを確認することである。本目的のため、ワクチンの最大投与量の1用量を6週齢の子豚2群に対し、筋肉内又は経口接種した。接種後3、7、10、14、21及び45日目に、血液サンプル、鼻腔スワブ及び咽頭スワブを採取し、ウイルス学的及び血清学的検査に供した。各採材日に、各群1頭ずつを安楽殺した。すべての子豚の直腸温及び臨床徴候を、ワクチン接種3日前から安楽殺まで毎日記録した。

ワクチン接種後、すべての動物でCSFに関連する臨床徴候は認められず、1頭のみが1又は2日間、40°Cを超す体温上昇を示した。CSFV E2特異的抗体ELISAにおいて、筋肉内接種した動物は、接種後2週間以内に抗体が陽転した。免疫応答のわずかな遅延が、経口接種動物で認められた。ワクチン接種後21日で見残っている動物すべてが血清反応陽性となった。血液サンプルでは、経口接種群の1頭から得た接種後7日の白血球サンプル中でのみ、ペスチウイルスゲノムがqRT-PCTで検出可能であった。しかし、ペスチウイルスゲノムはワクチン接種後最初の10日以内に経口接種した動物の鼻腔及び咽頭スワブに一貫して検出された。その一方で、これらのサンプルからのウイルス分離は陰性であった。ペスチウイルスゲノムは筋肉、脾臓、リンパ節及び腎臓サンプルからは検出されなかった。一方、経口接種群の3頭の扁桃及び1頭の唾液腺からはウイルスが検出された。ワクチン接種後7日の扁桃サンプル1例のみで、細胞培養によるウイルス分離が陽性であった。

以上、本試験から、ワクチンウイルスの主な増殖部位は、既報告（Tignon et al., 2010; Koenig et al., 2007）と同様、扁桃であることが示された。ウイルスゲノムの存在がワクチン接種後14日間、観察され、感染性ウイルスの分離は、経口接種群のワクチン接種後7日の扁桃サンプル1例に限定された。

経口接種群の接種後3～10日のウイルスゲノム検出は鼻咽頭スワブからであり、検出部位とワクチン接種経路と一致した。しかし、スワブサンプルからのウイルス分離は陰性であった。経口接種した動物から、感染性ウイルスは検出可能な濃度で排出されなかった。

さらに、血清学的検査の結果から、CP7_E2alf ワクチン接種に対する効果的な免疫応答が示され、経口接種後の抗体検出は、筋肉内接種と比較してわずかに遅延することが示された。

別紙2 CP7_E2alf 株マーカー生ワクチンの豚への常用量及び常用量反復投与の安全性 投与部位の死後分析

Safety of one dose and repeated administration of one dose of the CP7_E2alf live marker vaccine to pigs.

Postmortem analysis of the injection sites, Study Report No. 9425N-08-11-358

本研究の目的は、6週齢の豚にCP7_E2alfを（経口又は筋肉内経路で）単回又は反復投与したときの安全性を明らかにすることであった。豚は、本ワクチンの対象動物種である。CP7_E2alfワクチン（MSV+3）のバッチ020211を供試し、濃度は経口で $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL、筋肉内で $10^{6.0}$ TCID₅₀/mLであった。

合計40頭の豚を本研究に供試した。10頭の豚の筋肉内にワクチン1 mLを接種し、2週間後に再度接種し、別の10頭を対照豚として同じ経路でプラセボ（PBS）1 mLを接種した。さらに、10頭の豚にワクチン1.6 mLを経口接種し、2週間後に再度接種し、別の10頭を対照豚として同じ経路でプラセボ（PBS）1.6 mLを接種した。

ワクチン又はプラセボを投与後、豚のアナフィラキシー反応の有無を観察し、各ワクチン接種の前日から接種後4日まで、直腸温をモニターした。筋肉内接種した動物では、注射部位の局所反応の出現を各接種後14日間モニターした。

2回目のワクチン接種後2週間で、すべての動物を安楽殺した。筋肉内にワクチン又はプラセボを接種した豚についてのみ、注射部位の肉眼的及び顕微鏡的検査を実施した。

その結果、6週齢の豚に対するCP7_E2alf（MSV+3）の反復投与（1回用量は投与経路により1 mL又は1.6 mL）は、以下の通り安全であることが示された。

- アナフィラキシー反応を引き起こさなかった。
- 豚で異常高熱を引き起こさなかった。ワクチン接種豚と対照豚との間で、平均直腸温の差が認められなかった。
- 注射部位において腫脹又は発赤等の局所反応を引き起こさなかった。すべてのワクチン接種動物で、剖検時にワクチン接種部位の肉眼的及び顕微鏡的組織病変が認められなかった。

別紙3 CP7_E2alf 株マーカ生ワクチンの豚への高用量投与の安全性

Safety of the administration of an overdose of the CP_E2alf live marker vaccine to pigs, Study Report No. 9425N-08-12-378

本研究の目的は、6～7週齢の豚にCP7_E2alfワクチンを（経口又は筋肉内経路で）過量投与したときの安全性を明らかにすることであった。豚は本ワクチンの対象動物種である。CP7_E2alfワクチン（MSV+3）のバッチ020211を供試した。1回用量のワクチンに含まれる最大ウイルス量の10倍と等価のワクチン量を接種した〔筋肉内で $10^{7.5}$ TCID₅₀/個体（ $10 \times 1 \text{ mL} \times 10^{6.5}$ TCID₅₀）、経口で $10^{7.7}$ TCID₅₀/個体（ $10 \times 1.6 \text{ mL} \times 10^{6.5}$ TCID₅₀）〕。

合計47頭の豚を供試した。11頭の豚に筋肉内経路でワクチン4 mLを接種し、別の12頭を対照豚として同じ経路でプラセボ（PBS）4 mLを接種した。

12頭の豚に経口経路で同じワクチン6 mLを接種し、別の12頭を対照豚として同じ経路でプラセボ（PBS）6 mLを投与した。

ワクチン又はプラセボを投与後、豚のアナフィラキシー反応の有無を観察し、ワクチン接種の7日前から過量接種後14日まで、直腸温をモニターした。一部の動物で下痢が生じてワクチン接種がわずかに遅れたため、直腸温登録が要求されたよりも長くなった（ワクチン接種の3日目ではなく7日前に登録を開始した）。

筋肉内接種した動物では、注射部位の局所反応の出現を接種後14日間モニターした。

ワクチン接種後3週間で、すべての動物を安楽殺した。

その結果、6～7週齢の豚に対するCP7_E2alf（MSV+3）の過量投与（投与経路により4 mL又は6 mL）は、以下の通り安全であることが示された。

- アナフィラキシー反応を引き起こさなかった。
- 豚で異常高熱を引き起こさなかった。ワクチン接種豚と対照豚との間で平均直腸温は同等であった（筋肉内又は経口経路のいずれにおいても）。
- 筋肉内接種した豚で、注射部位において腫脹又は発赤等の局所反応を引き起こさなかった。
- 体重増加に群間差が認められなかった。

別紙 4 CP7_E2alf 株の豚における排泄及び同居感染試験

Non-transmissibility (shedding) study after the administration of CP7_E2alf first passage from the Master Seed Virus (MSV+1) to pigs, Study Report No. 9425N-08-12-382

本研究の目的は、6週齢の豚にCP7_E2alf（MSV+1）ワクチンの単回投与を筋肉内又は経口経路で行ったときにウイルス排出がないことを明らかにすることであった。これらの投与経路はワクチン接種の推奨経路であり、筋肉内は家畜豚向け、経口はイノシシ向けである。豚は、本ワクチンの対象動物種である。

供試ワクチンとしてCP7_E2alfウイルス（MSV+1）（ref：210212）を用い、1回用量のワクチンに含まれる最大ウイルス量と等価のワクチン量を供試豚に接種した〔筋肉内で $10^{6.5}$ TCID₅₀/個体（1 mL × $10^{6.5}$ TCID₅₀）、経口で $10^{6.7}$ TCID₅₀/個体（1.6 mL × $10^{6.5}$ TCID₅₀）〕。

合計32頭の豚を供試し、8頭に2.5 mLのワクチンウイルス（ $10^{6.5}$ TCID₅₀）を筋肉内経路で接種後、8頭の接触対照豚を24時間混飼した。また別の8頭に4 mLの同じワクチンウイルス（ $10^{6.7}$ TCID₅₀）を経口経路で接種後、8頭の接触対照豚を24時間混飼した。

ワクチンウイルスの投与後、動物の全身反応を観察し、すべての試験期間中、動物の排出に関連する臨床徴候を観察した。

ワクチンウイルス接種後45日に、すべての豚を安楽殺し、ワクチン接種した動物中のCSFウイルスに対する抗体及び対照動物中の扁桃におけるCSFウイルスを検出するのに適切な検査を実施した。

その結果、6週齢の豚にマスターシードウイルス由来の初代継代CP7_E2alfを投与（経路により2.5 mL又は4 mL）した後、以下の通りウイルス排出は示されなかった。

- どの経路でワクチン接種した後も、ウイルス排出に関連する臨床徴候は認められなかった。
- 経口接種群の3頭を除き、すべてのワクチン接種動物が試験終了時に抗体陽性となったが、接触対照には抗体が認められなかった（T01群及びT02群）。
- 経口接種群の3頭で抗体が認められなかった原因として、接種されたワクチンが吐出された可能性が考えられ、経口経路は筋肉内経路ほど効果的ではないと考えられた。

-CP7_E2alf 特異的リアルタイム RT-PCR で、接触対照から採取した扁桃中にウイルスは検出されなかった。

別紙 5 妊娠豚における CP7_E2alf 株マーカーワクチンの高用量接種による安全性

Safety of the administration of an overdose of the CP7_E2alf live marker vaccine to pregnant sows, Study Report No. 9426N-08-11-374

本研究の目的は、CP7_E2alf ワクチンを妊娠豚の筋肉内に過量投与したときの安全性を明らかにすることであった。豚は本ワクチンの対象動物種である。ワクチン接種は妊娠あるいはその産子に影響を及ぼす可能性があり、妊娠豚はあらゆるワクチン接種に対して特に感受性が高い。本研究には CP7_E2alf ワクチン

(MSV+3) のバッチ 020211 を供試した。1 回用量のワクチンに含まれる最大ウイルス量の 10 倍と等価のワクチン量を筋肉内に接種した [$10^{7.7}$ TCID₅₀/個体 ($10 \times 1.6 \text{ mL} \times 10^{6.5}$ TCID₅₀)。本試験で用いた用量及びウイルス濃度は経口ワクチン接種した場合に用いた最高濃度であった]。合計 15 頭の雌豚を供試し、13 頭の雌豚の筋肉内に $10^{6.9}$ TCID₅₀/mL のワクチン 6 mL を接種し、別の 2 頭に同じ経路でプラセボ (PBS) 6 mL を投与した。

ワクチン又はプラセボの投与後、動物の全身反応を観察した。各ワクチン接種の 3 日前から接種後 15 日まで、直腸温をモニターした。注射部位の局所反応の有無を接種後 14 日間、観察した。出産時に生殖パラメータを評価した。

その結果、妊娠豚に対する CP7_E2alf ワクチン (MSV+3) の過量投与 (筋肉内経路で 6 mL) は以下の通り安全であることが示された。

- 全身性反応を引き起こさなかった。
- 母豚で異常高熱を引き起こさなかった。ワクチン接種群と対照群との間で、平均直腸温に有意差が認められなかった。
- 注射部位において腫脹あるいは発赤等の局所反応を引き起こさなかった。
- 母豚の生殖パラメータに影響しなかった。具体的には、妊娠豚又は子豚にワクチンに起因する異常が認められなかった。
- 初乳の摂取前に出生子豚には抗体が存在しなかったことから、経胎盤感染は認められなかった。

別紙 6 妊娠豚の CP7_E2alf 株マーカーワクチンの妊娠各期における高用量接種による安全性
Safety of the administration of an overdose of the CP7_E2alf live marker vaccine to pregnant sows at
different stages of gestation, Study Report No. 9425N-08-11-363

本研究の目的は、CP7_E2alf ワクチンを筋肉内経路で妊娠期の異なる段階で妊娠豚に単回投与したときの安全性を明らかにすることであった。

豚は本ワクチンの対象動物種である。ワクチン接種は妊娠又はその産子に影響を及ぼす可能性があるため、妊娠豚はあらゆるワクチン接種に対して特に感受性が高い。

本研究には CP7_E2alf ワクチン (MSV+3) のバッチ 020211 を供試した。1 用量中に含まれる想定最大ウイルス量を筋肉内経路で接種した [理論的には、最大濃度 ($10^{6.5}$ TCID₅₀/mL) で混合したワクチン 1.6 mL に含まれるワクチンウイルス量に対応する $10^{6.7}$ TCID₅₀]。

異なる妊娠段階にある合計 41 頭の雌豚にワクチン接種した。雌豚 35 頭の筋肉内にワクチン 1.6 mL を接種し、別の 6 頭に同じ経路でプラセボ (PBS) 1.6 mL を同時接種した。

ワクチン又はプラセボの投与後、供試豚の全身反応を観察し、各ワクチン接種の 3 日前から接種後 15 日まで、直腸温をモニターした。また、注射部位の局所反応の有無を接種後 14 日間、観察した。

出産時に生殖パラメータ及び経胎盤感染を評価した。

その結果から、異なる妊娠段階において、妊娠豚に対する CP7_E2alf ワクチン (MSV+3) の単回投与 (筋肉内経路で 1.6 mL) は以下の通り安全であることが示された。

- 全身性反応を引き起こさなかった。
- 母豚で異常高熱を引き起こさなかった。ワクチン接種群と対照群との間で、平均直腸温に考慮すべき差が認められなかった。
- 注射部位において腫脹又は発赤等の局所反応を引き起こさなかった。
- 異なる妊娠段階における母豚の繁殖成績に影響しなかった。具体的には、ワクチン接種母豚の繁殖成績は対照動物と同等であり、妊娠豚又は子豚におけるワクチンに起因する異常は認められなかった。
- 初乳の摂取前に出生子豚には抗体が存在しなかったことから、経胎盤感染は認められなかった。一方で、すべてのワクチン接種母豚で血清抗体が陽転した。

別紙7 CSF ワクチンの安全性評価：ドイツの野外環境における約 6 週齢子豚への CP7_E2alf 株投与
Evaluation of the safety of a classical swine fever (CSF) vaccine. CP7_E2alf, administered to piglets aged approximately six weeks under field conditions in Germany, Study Report No. 9425C-10-12-379

本研究の目的は、コンベンショナル豚におけるCSF（豚コレラ）ワクチンの安全性を示すことであった。約 8 週齢の市販子豚30頭を、体重に基づいて無作為に割り付け、生理食塩水（n = 10）又はCP7_E2alfワクチン（n = 20）のいずれかを筋肉内接種した。

ワクチン接種前に、すべての動物にペスチウイルス抗体及びペスチウイルスが存在しないことを確認した。安全性の観察として、接種前3日目から接種後7日目の直腸温及び臨床徴候の測定並びに接種日から接種後7日目及び屠殺日における注射部位の評価を行った。接種前13日目及び屠殺日に体重を記録した。試験中の有害な健康事象及び死亡並びに一般状態を毎日モニターし、試験期間を通して記録した。さらに、ワクチンに対する抗体応答を明らかにするため、血液サンプルを14日目及び屠殺日に採取した。すべての動物を屠殺した29日目に試験を終了した。

その結果、試験中にいずれの供試豚も死亡又は試験中止することはなく、被験物質の投与に関連する有害事象は認められなかった。いずれの投与群においても、ワクチン接種後に臨床徴候又は注射部位反応は認められなかった。ワクチン接種の前日及び翌日に、両群で一過性の直腸温上昇が認められた。発熱（40℃以上の直腸温が2日以上連続すると定義）は、対照豚1頭（4日間持続）及びワクチン接種豚3頭（2日間持続）で認められた。ELISA抗体及び中和抗体ともに、全ての対照動物において陰性で推移した。1頭を除く全ワクチン接種豚において、29日目又はそれ以前に中和抗体が陽転した。1頭で陽転しなかったのは、非特異反応あるいは免疫応答の遅延が要因であると考えられた。ELISA抗体についてはワクチン接種豚2頭において、29日目に擬陽性であったが、その他のワクチン接種豚すべて中和抗体が陽性となった。

CP7_E2alf接種豚において、注射部位反応、臨床徴候又は投与に関連する有害事象は認められなかった。両処置群で、一過性の直腸温上昇が認められ、ワクチン接種群では上昇した温度が最高2日間まで持続した。以上のことから、CSFワクチンであるCP7_E2alfは、コンベンショナル子豚に投与したとき安全であることが示された。

別紙 8 6 週齢子豚に投与した CP_E2alf 株マスターシードウイルス（MSV+1）の 1 回継代における病原性復帰

Reversion to virulence of CP_E2alf first passage from the master seed virus (MSV+1) administered to 6 week-old piglets, Study Report No. B922N-ES-12-004

本研究の目的は、マスターシードウイルス（MSV+1）由来の初代継代 CP7_E2alf から、6 週齢豚で連続継代して病原性を復帰しないことを明らかにすることであった。

CP7_E2alf ウイルス（MSV+1）（ref：210212）を供試し、1 回用量のワクチンに含まれる最大ウイルス抗体価と等価のワクチン量を筋肉内経路で動物に接種した（ $1.6 \text{ mL} \times 10^{6.5} \text{ TCID}_{50} = 10^{6.7} \text{ TCID}_{50}/\text{個体}$ ）。

病原性復帰がないことを証明するには、さらに継代が必要であったため、病原性復帰を最も引き起こす可能性が高い感染の通常経路である口腔鼻を用いて、2 代継代を実施した。筋肉内接種後 6 日に採取したプール血清を接種に用い、そのサンプル中のゲノムの有無をリアルタイム RT-PCR で検出した。

合計 17 頭の豚を供試し、第一群（T01）では、豚 7 頭に 4 mL の CP7_E2alf（MSV+1）（ $10^{6.8} \text{ TCID}_{50}$ と等価）を筋肉内接種した。第二群（T02）の豚 10 頭に、初代の継代培養から得た接種材料 2 mL を口腔鼻経路で接種した〔1 継代から得た接種物 1 mL（ref. 0.6）、接種後の継代から得た血漿 1 mL（2012 年 6 月 29 日）〕。

接種後、供試豚の全身反応を観察し、試験期間中、病原性復帰に関連する臨床徴候を観察した。接種後 2～7 日に、ウイルスの有無を検出するため、供試豚から採血し、ワクチン又は接種物の接種後 7 日に、すべての豚を安楽殺し、サンプルを分析した。

その結果から、6 週齢の豚にマスターシードウイルス由来の初代継代 CP7_E2alf を 4 mL 投与した後、病原性復帰は示されなかった。

- 病原性復帰に関連する臨床徴候が、2 回の継代後に認められなかった。
- 抗体価（SK 細胞の細胞培養）と CP7_E2alf 特異的リアルタイム RT-PCR のいずれによっても、2 代継代後の豚の血液及び血漿中に、ウイルスが検出されなかった。