

第一種使用規程承認申請書

令和 6 年 9 月 4 日

農林水産大臣 坂本 哲志 殿
環 境 大 臣 伊藤 信太郎 殿

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

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項（同法第 9 条第 4 項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子及びニューカッ スル病ウイルス由来 F 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2 株 (IBDV VP2-NDV F, <i>Meleagrid herpesvirus 1</i>)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	① 運搬及び保管（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の運搬及び保管を含む。） ② 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（以下「薬機法」という。）第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験（以下「治験」という。）に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年農林水産省令第 75 号）第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用 ③ 薬機法第 14 条第 1 項に基づく承認申請書に従った使用（④に該当する行為は除く。） ④ 接種（鶏への接種） ⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残さの廃棄 ⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む。） ⑦ ①～⑥に付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	—

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子及びニューカッスル病
ウイルス由来 F 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD-ND
#42-#30 LP C2 (IBDV VP2-NDV F, *Meleagrid herpesvirus 1*) の
生物多様性影響評価書

目次

I 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	1
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	1
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性.....	3
イ) 基本的特性.....	3
ロ) 生息又は生育（増殖）可能な環境の条件	7
ハ) 捕食性又は寄生性	8
ニ) 繁殖又は増殖の様式.....	8
ホ) 病原性.....	9
ヘ) 有害物質の産生性	10
ト) その他の情報	10
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	11
(1) 供与核酸に関する情報	11
イ) 構成及び構成要素の由来.....	11
ロ) 構成要素の機能.....	13
(2) ベクターに関する情報	15
イ) 名称及び由来	15
ロ) 特性	17
(3) 遺伝子組換え生物の調製方法.....	17
イ) 宿主内に移入された核酸全体の構成	17
ロ) 宿主内に移入された核酸の移入方法	17
ハ) 遺伝子組換え生物等の育成の過程.....	18
(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	20
(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.....	24
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	25
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	25
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	30
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	31
(1) 使用等の内容	31

(2) 使用等の方法	31
(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	31
(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	31
(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	31
(6) 国外における使用等に関する情報	31
(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報	32
II 項目ごとの生物多様性影響評価	34
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）	34
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	34
(2) 影響の具体的内容の評価	35
(3) 影響の生じやすさの評価	35
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	35
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）	36
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	36
(2) 影響の具体的内容の評価	36
(3) 影響の生じやすさの評価	36
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	36
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）	37
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	37
(2) 影響の具体的内容の評価	37
(3) 影響の生じやすさの評価	37
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	37
4 核酸を水平伝達する性質（法が対象とする技術により移入された核酸を野生動植物又は他の微生物に伝播する性質）	38
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	38
(2) 影響の具体的内容の評価	38
(3) 影響の生じやすさの評価	39
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	39
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）	39
III 生物多様性影響の総合的評価	40
別紙リスト	42

本申請書で使⽤した略号・用語表.....	43
----------------------	----

参考文献.....	44
-----------	----

緊急措置計画書

添付資料

- 別紙 1～11
- 参考文献の写し

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子及びニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2 (IBDV VP2-NDV F, *Meleagrid herpesvirus 1*) 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 分類学上の位置・学名（属及び種）及び株名

科：ヘルペスウイルス科 (*Herpesviridae*)

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

属：マルディウイルス属 (*Mardivirus*)

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

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

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

該当せず。

③ ②でない場合には、同定の根拠となる事項

宿主ウイルス HVT FC126 株は、ソルベイ・アニマルヘルス社が ATCC (American Type Culture Collection) から入手した HVT を起源とし、鶏胚線維芽細胞 (Chicken Embryo Fibroblast、以下「CEF 細胞」という。) で継代してマレック病 (Marek's Disease、以下「MD」という。) 生ワクチン製造用 HVT マスターシードウイルスとした。この株は 1987 年に米国農務省 (U.S. Department of Agriculture、以下「USDA」という。) により MD ワクチン製造用株として承認されている (承認番号 MS1611786)。この MD 生ワクチン製造用マスターシードウイルス HVT FC126 株を CEF 細胞で 2 代継代したものを、今回の申請対象である遺伝子組換えウイルス「伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子及びニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2」(以下「本遺伝子組換えウイルス」という。) の宿主ウイルス HVT FC126 株とした。

④ 宿主を誘導するために用いた遺伝的改変の内容

該当せず。

⑤ 宿主として野生株を用いる場合には、自然環境における分布状況

該当せず。

(2)使用等の歴史及び現状

HVT は 1969 年に Kawamura ら[25]、Witter ら[43]によって健康な七面鳥から分離された、七面鳥を自然宿主とするウイルスである。HVT はマレック病ウイルス（以下「MDV」という。）と抗原的に関連性があり、MDV と血清学的交差性を示すことから、MDV 血清型 3 に分類される。HVT はウイルス種としては七面鳥ヘルペスウイルス 1 型 (*Meleagrid herpesvirus 1*; MeHV1) であるが、MDV 血清型 1 及び 2 はそれぞれ鶏ヘルペスウイルス 2 型 (*Gallid herpesvirus 2*; GaHV-2) 及び鶏ヘルペスウイルス 3 型 (*Gallid herpesvirus 3*; GaHV-3) である[40, 49]。MDV 血清型 1 は腫瘍原性、MDV 血清型 2 は非腫瘍原性ウイルスで、HVT は非病原性ウイルスである[40, 49]。HVT は自然宿主の七面鳥間で水平感染するが、鶏間での自然感染は限定的である[13]。以降、MDV の血清型を明記しない場合は MD 発病の原因となる MDV 血清型 1（腫瘍原性株）のことを指し、MDV 血清型 3 は HVT という。

MD は、MDV 感染に起因する鶏のリンパ系細胞の腫瘍性増殖を主徴とする疾病であり、末梢神経や様々な臓器/組織における単核細胞浸潤を特徴とする[12, 40, 48, 49]。MDV は病原型によって、弱毒型 (mild; mMDV)、強毒型 (virulent; vMDV)、超強毒型 (very virulent; vvMDV) 及び超強毒+型 (very virulent plus; vv+MDV) の 4 種類に分類され、MDV 血清型 3 のワクチン株は弱毒化 MDV (attenuated; atMDV) といわれる[12, 40, 49]。MDV 血清型 2 は病原型分類に含まれない[49]。MDV はリンパ球に指向性を有し、全身へウイルスが移行する急性期を過ぎると T 細胞に持続感染する。末梢神経に病変が形成されると、翼麻痺、脚麻痺、斜頸といった神経症状が認められる。内臓に腫瘍が形成される急性型では死亡率が 10～50%になる。ウイルスは羽包上皮で増殖し、感染性ウイルスが羽やフケとともに体外に排泄され、これを鶏が吸入して感染することによって鶏群での感染が維持される。HVT についても MDV と同様に羽包上皮から排泄された感染性ウイルスの吸引により感染し、ウイルスはリンパ球指向性を示すが潜伏感染を起こさず病原性はない。

HVT は鶏、七面鳥及びウズラに感染することが確認されている。一方、MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等、多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている[40]。HVT は MDV と近縁で血清学的交差性を示し、MD の発症防御効果が認められることから、MD を予防するワクチンとして実用化されている。日本においても HVT は 1972 年から MD ワクチンとして長く使用されている[49]。

HVT ウイルス株の中で FC126 株は MD 生ワクチンとして最も一般的な株であり、1970 年代の初頭から現在まで安全に使用されている[40, 49]。本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株は、MD 生ワクチン製造用株として USDA に承認されている HVT FC126 株マスターシードウイルス MS1611786 を CEF 細胞で 2 代継代したものである。この USDA 承認マスターシードウイルスは、我が国の既承認マレック病生ワクチン「イノボプレックス MD CVI+HVT」（ゾエティス・ジャパン株式会社）の HVT マスターシードウイルスである。HVT FC126 株は長年にわたる生ワクチンとしての使用実績に加え、海外において強毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（以下「IBDV」という。）由来 VP2 蛋白質を発現するベクターワクチンとしてコマーシャル鶏に安全に使用されている[29]。

伝染性ファブリキウス嚢病（以下「IBD」という。）は若齢鶏において伝染性の高い疾病で、IBDV はリンパ組織、特にファブリキウス嚢（B 細胞）を標的とする。IBDV に感染すると斃死率が上昇するほか、雛に感染した場合には定型的な発病がなくても長期間にわたって免疫抑制の状態になり、日和見感染やワクチンの効果（抗体産生）を抑制することから養鶏経営に経済的損失を与えている。IBDV は主に鶏に病原性を示す血清型 1 と、七面鳥由来で鶏には病原性の低い血清型 2 に分けられる。血清型 1 は病原性及び抗原性の違いにより従来型 (classical virulent; cvIBDV)、強毒型 (very virulent; vvIBDV) 及び抗原変異型 (antigenic variant;

avIBDV) に大別される[16]。いわゆる従来型 IBDV は 1962 年に米国デラウェア州のガンボロで初めて報告され、1970 年代までに米国内や欧州に広がった。そのため IBD は「ガンボロ病」と呼称されることがある。その後、1986 年にオランダで 90% の致死率を示す強毒型 IBDV が発生し、現在では強毒型 IBDV は日本を含めほぼ世界中に広がっている[15]。

IBDV は血清型 1 及び 2 ともに鶏、七面鳥、アヒル、ホロホロチョウ及びダチョウに自然感染するが、血清型 1 は鶏にのみ病原性を示し、血清型 2 は鶏に対し病原性がない[17]。vvIBDV と遺伝子的に関連性のあるウイルスが東アフリカの外見上健康なハト及びホロホロチョウから RT-PCR によって検出されたとの報告がある[19]。また、キジ、ヤマウズラ、ウズラ、ホロホロチョウで vvIBDV 実験感染を行ったところ、ウズラにのみ感染が認められたとの報告がある[17]一方で、鶏由来ウイルスの実験感染ではウズラ[17]やホロホロチョウ[37]において感染がみられなかったとの報告もあり、鶏由来 IBDV は野生鳥類への感染性が低いことが推察される。

国内では、HVT を宿主ウイルスとする遺伝子組換えウイルスとして「ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F 株」及び「伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHVT013-69 株」が第一種使用規程の承認を受けている。また、後者は本遺伝子組換えウイルスと同様に HVT FC126 株を宿主ウイルスとしており「バキシテック® HVT+IBD」(ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社)の商品名で鶏の IBD 及び MD の予防を効能効果とする鶏用生ワクチンとして 2020 年 11 月 25 日付けで動物用医薬品製造販売承認を得て 2021 年 10 月から国内販売されている。

なお、本遺伝子組換えウイルスの宿主、宿主ウイルス HVT FC126 株は、別途当社が開発した「伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD #9 (IBDV VP2, *Meleagrid herpesvirus 1*)」の宿主と同じものである。

(3) 生理学的及び生態学(生物学)的特性

イ) 基本的特性

① HVT の基本的性状

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

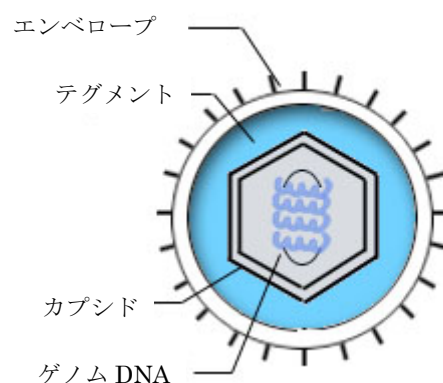


図 1. ヘルペスウイルスの基本構造

② 遺伝子学的性状

各血清型 MDV ゲノムサイズは約 160～180 kb の線状 2 本鎖 DNA で、ゲノム構造は全ての血清型で共通している（図 2）。ウイルスは感染鳥ゲノムから独立しているときには環状構造（エピソーム）をとることが多い。各血清型 MDV ゲノムは末端反復配列（Terminal Repeats Long: TR_L 及び Terminal Repeats Short: TR_S）及び内部反復配列（Internal Repeats Long: IR_L 及び Internal Repeats Short: IR_S）に隣接する Unique Long（U_L）及び Unique Short（U_S）と呼ばれる固有の長短の領域から構成される（図 2）[33]。

MDV 血清型 1 の腫瘍原性株は *Meq* 腫瘍原性遺伝子や vTR のような特徴的な遺伝子が、反復配列、特に TR_L 領域に存在する（表 1）[33]。これらの遺伝子は、活性化 T リンパ球を標的に形質転換するといった病原性 MDV 独特の生物学的特徴に大きく関与している。

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

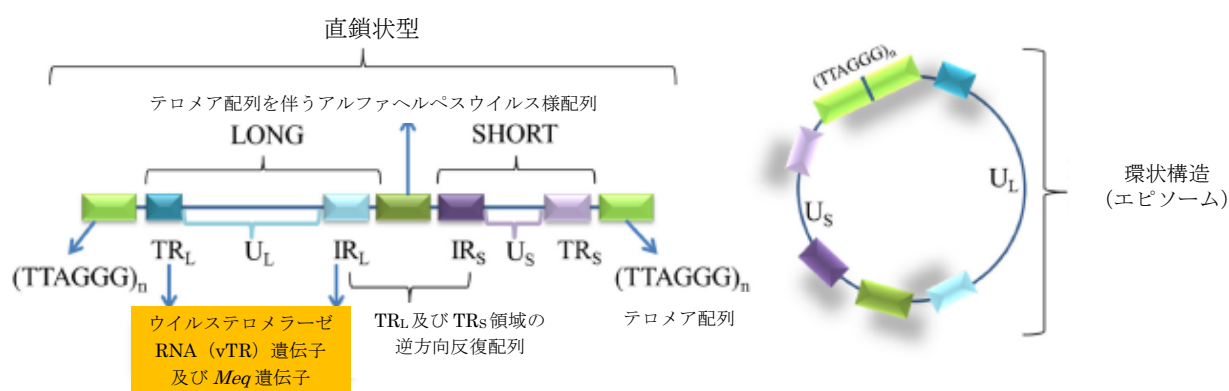


図 2. 細胞遊離型（非統合型）直鎖状及び環状 MDV ゲノムの模式図

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

緑：テロメア配列 濃青/青：U_L ブロック配列（TR_L/IR_L） 濃紫/紫：U_S ブロック配列（IR_S/TR_S）

[出典 33]

表 1. マレック病ウイルス血清型及びその特徴

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

ORFs：オープンリーディングフレーム vTR：ウイルステロメラーゼ RNA

＋：あり —：なし + / NF：存在するが機能なし

[出典 33]

③ 生化学的・生物学的性状

HVT は健康な七面鳥から分離された非病原性ウイルスであり[40, 44]、MDV 血清型 1 のような腫瘍原性や病原性はない。

④ 感受性動物、感染経路、感染様式等

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

HVT は細胞随伴性ウイルスで、鳥類の白血球に指向性を示す。図 3-1 及び図 3-2 に HVT を含む弱毒 MDV 及び強毒 MDV 感染様式の模式図を示す。MDV 各血清型の感染は、感染鶏から排泄された落屑中の感染性ウイルス粒子を吸引することにより、呼吸器を介して開始される。リンパ球細胞に侵入・増殖後、他の臓器・組織へ運ばれる。HVT は脾臓、ファブリキウス嚢、胸腺及び羽髄等で確認される[6, 11, 20]。由来の異なる 7 株の HVT について組織指向性を確認したところ、体内分布パターンに差は認められなかった[46]。MDV は全ての血清型で羽包上皮以外の全ての組織において細胞随伴性で[40]、直接接触する細胞のみに感染を広げ、細胞が破壊される（細胞外に放出される）とウイルスは感染性を失う[48]。感染性を有する細胞遊離型ウイルス粒子は羽包上皮細胞で産生され、細胞から放出される際にエンベロープを伴う[11, 40, 44]。これらの上皮細胞は落屑（フケ）として環境中に排泄されるが[21]、鶏間の水平伝播は限定的である（図 3-1）[14, 42]。HVT は一般的に多種の組織から調製したリンパ球から分離可能である。リンパ球は HVT の主要な感染細胞であり、他の組織へ分布する役割を担う。

強毒 MDV には潜伏感染や病原性に関連する 4 つの感染ステージ（初期細胞溶解期、潜伏感染期、後期細胞溶解期及び形質転換期）がある（図 3-2）[12, 33, 49]。最初の感染臓器である肺へウイルスが到達すると、そこでウイルスが増殖するとともにマクロファージに取り込まれ、ファブリキウス嚢、胸腺、脾臓などのリンパ系組織に移行し、初期のウイルス増殖が行われる。これら組織において MDV はリンパ球と接触し、初期の細胞溶解性感染が起こる。この間に増殖するウイルスは細胞随伴性で、細胞間を伝播して感染が広がる。リンパ組織での感染は、感染後約 7～8 日で潜伏感染（非複製性）に移行し、末梢リンパ球でウイルスが検出される。感染した末梢血リンパ球は各上皮系組織にウイルスを伝播し、そこで再活性化されたウイルスは後期の細胞溶解性感染を起こす。また、潜伏感染したリンパ球の内、主に CD4+ヘルパーT 細胞は形質転換能を有し 14～21 日後には内臓にリンパ腫を形成させる。後期細胞溶解期には、血液中の循環末梢血リンパ球を経て羽包上皮（FFE）に感染し、FFE で再活性化した MDV は細胞遊離型ウイルス粒子を産生、環境中に排泄し、感染源となる（図 3-2）。

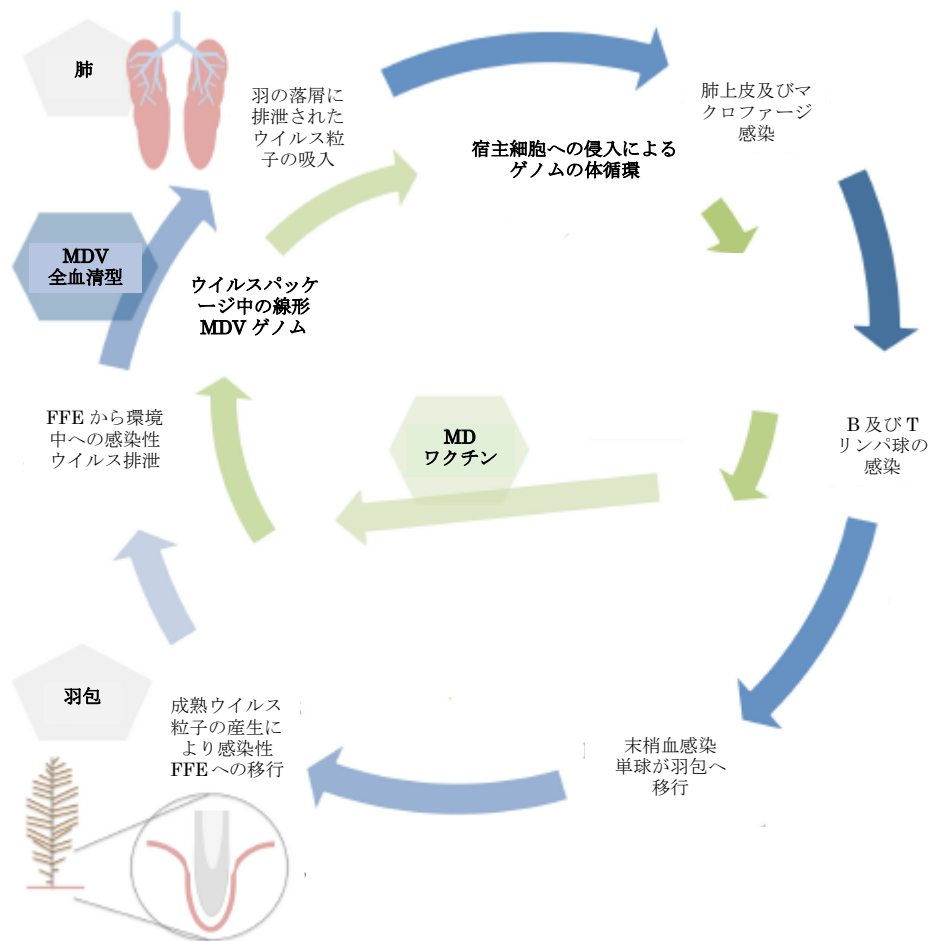


図 3-1. HVT を含む弱毒 MDV の感染様式模式図

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

緑色矢印：感染鳥ゲノムの状態

FFE：羽包上皮

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

[出典 33]

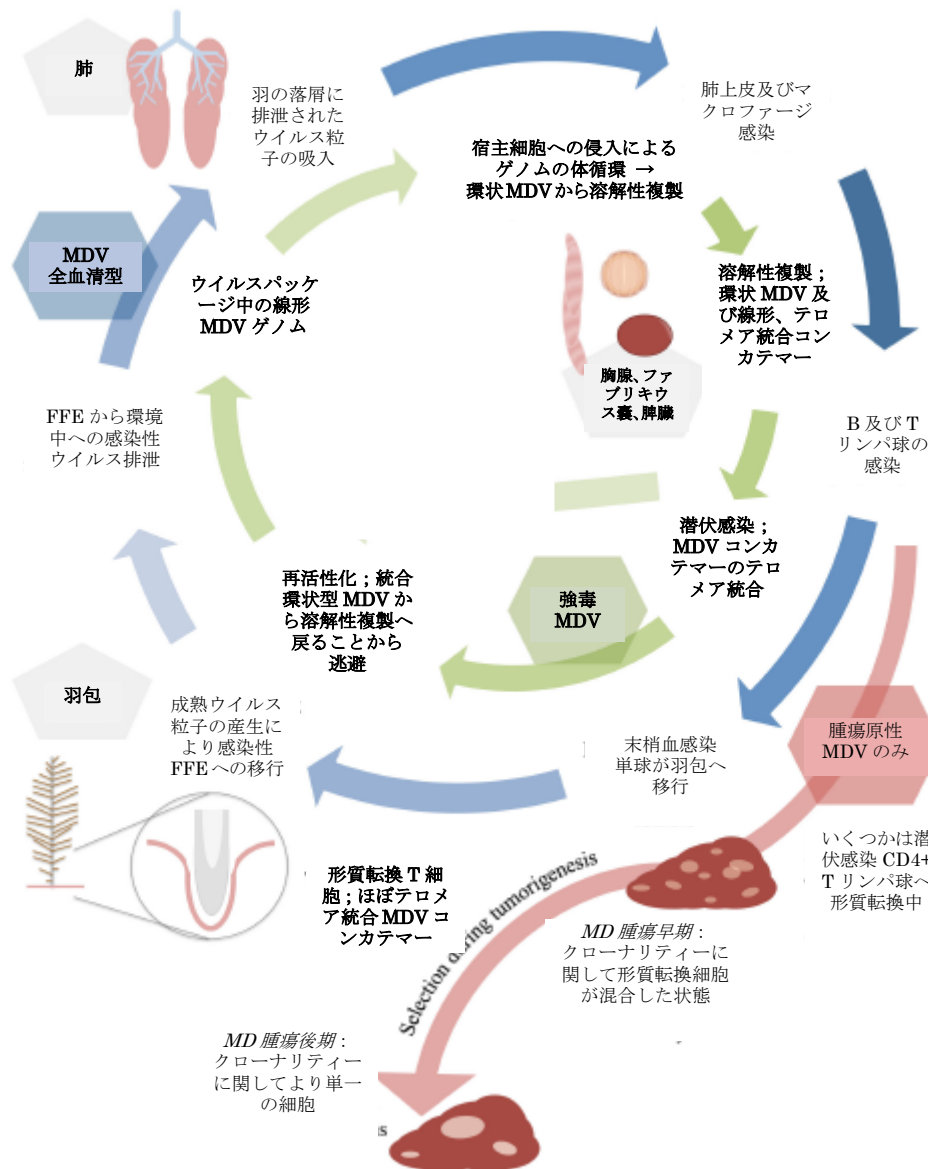


図 3-2. 強毒 MDV の感染様式模式図

青色矢印：鳥体内（感染細胞及び組織）及び外部（環境中の落屑）のウイルスの動き
 緑色矢印：感染鳥ゲノムの状態 赤色矢印：形質転換及び腫瘍原性 FFE：羽包上皮
 五角形（灰色）：疾病に関与する臓器

六角形：MDV 血清型の経路（青色：MDV 全血清型、緑色：強毒 MDV、赤色：腫瘍原性 MDV）

感染ステージ（細胞溶解期、潜伏感染期、再活性化、形質転換期）と鳥ゲノムの状態が重なるものは太字で示した

[出典 33]

ロ) 生息又は生育（増殖）可能な環境の条件

HVT は七面鳥を自然宿主とするウイルスで、鶏やウズラに感染することが確認されている。一方、MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等、多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている[40]。一般的に多種の組織から調製したリンパ球から分離可能である。リンパ球は HVT の主要な感染細胞であり、他の組織へ分布する役割を担う。ウイルスは羽包上皮以外の全ての組織において細胞随伴性である[40]。

HVT は二本鎖 DNA ウイルスであり核内で複製する。HVT を接種した鶏又は七面鳥の白血球から回収することが可能である[11, 21]。HVT は CEF 細胞での増殖性が最もよく、その他、七面鳥胚線維芽細胞

(TEF 細胞)、鶏腎細胞 (CK 細胞)、DF-1 株化細胞等の鳥類の細胞で、通常の培養条件 (37℃、5% CO₂) で増殖する。HVT は MDV 血清型 1 及び血清型 2 と比較して培養細胞で増殖するスピードが速く、大きな CPE を形成するが、腫瘍原性ウイルスである MDV 血清型 1 では培養細胞での増殖が遅く、形成される CPE は小さい[40]。MDV のウイルス分離は CKC 細胞又はアヒル胚線維芽細胞 (DEF 細胞) を用いる方が CEF 細胞より効率が良い。CEF 細胞への順化は弱毒化の傾向を示す。MDV 血清型 1 は培養細胞で 30~70 代継代して順化させることにより弱毒化される。弱毒化された株は *in vitro* での増殖性が高まるが、*in vivo* におけるウイルス量は減少する[40]。

哺乳類の細胞は一般的に HVT に対する感染性が低いものの[41]、ハムスター腎細胞 (BHK21) やアフリカミドリザル腎細胞 (Vero) 等、一部の哺乳類細胞には感染可能であることが報告されている[7, 22]。ただし、CPE の確認には当該細胞への順化が必要であり、HVT の哺乳類細胞における増殖性はほとんどない又は鳥類細胞と比較して非常に低いと考えられる。

ハ) 捕食性又は寄生性

—

ニ) 繁殖又は増殖の様式

① 宿主を誘導するために用いた遺伝的改変の内容

該当せず

② 生存能力又は増殖能力

宿主ウイルス HVT FC126 株の繁殖又は増殖の様式は上記 HVT 一般の性状と同一であり、二本鎖 DNA ウイルスで、核内で複製する。CEF 細胞、TEF 細胞、CK 細胞、DF-1 株化細胞等の鳥類の細胞で、通常の培養条件 (37℃、5% CO₂) で増殖することが知られている。また、鶏又は七面鳥に接種して白血球から回収することも可能である[11, 21]。哺乳類の細胞は一般的に HVT に対する感染性が低いものの[40]、BHK21 細胞や Vero 細胞等、一部の哺乳類細胞には感染可能であることが報告されている[7, 21]。ただし、CPE の確認には当該細胞への順化が必要であり、HVT の哺乳類細胞における増殖性はほとんどない又は鳥類細胞と比較して非常に低いと考えられる。HVT は細胞随伴性ウイルスで、細胞-細胞間で接触伝播し、細胞外に放出されない[40, 48, 49]。感染性を有する細胞遊離型ウイルス粒子は羽包上皮細胞のみで産生され、細胞から放出される際にエンベロープが形成される (図 4)。それ以外の細胞遊離型ウイルスは環境中で感染性がない[48]。

③ 生殖の様式及び交雑性

HVT 及び MDV の複製サイクルを図 4 に示す[31]。HVT 及び MDV はエンベロープと細胞膜との融合により細胞内に侵入する。ウイルスは少なくともテグメント部まで融合後、ヌクレオカプシドと分離する。テグメント蛋白質は細胞をウイルス複製に都合が良い環境に調節していると考えられている。侵入したヌクレオカプシドは微小管を経て核膜孔に移行する。ウイルスゲノム DNA は核内に放出され、ウイルスゲノムの転写がカスケード方式で行われる (最初期、初期及び後期ウイルス mRNA の形成)。後者は主にウイルス粒子の構造蛋白質をコードする。カプシド蛋白質は細胞質内で翻訳され、核内に輸送され、カプシドアッセムブリが行われる。直鎖状多量体 (コンカテマー) ウイルス DNA の複製後、カプシド形成期にユニット長に開裂しカプシド前駆体が形成される。カプシドは核膜出芽時に一次エ

ンベロープが形成され、細胞質内でテグメント物質を得た後、ゴルジネットワークの小胞に出芽時に二次エンベロープ化される。小胞内ウイルスが細胞膜と融合することにより、成熟ウイルス粒子は細胞外に放出される。

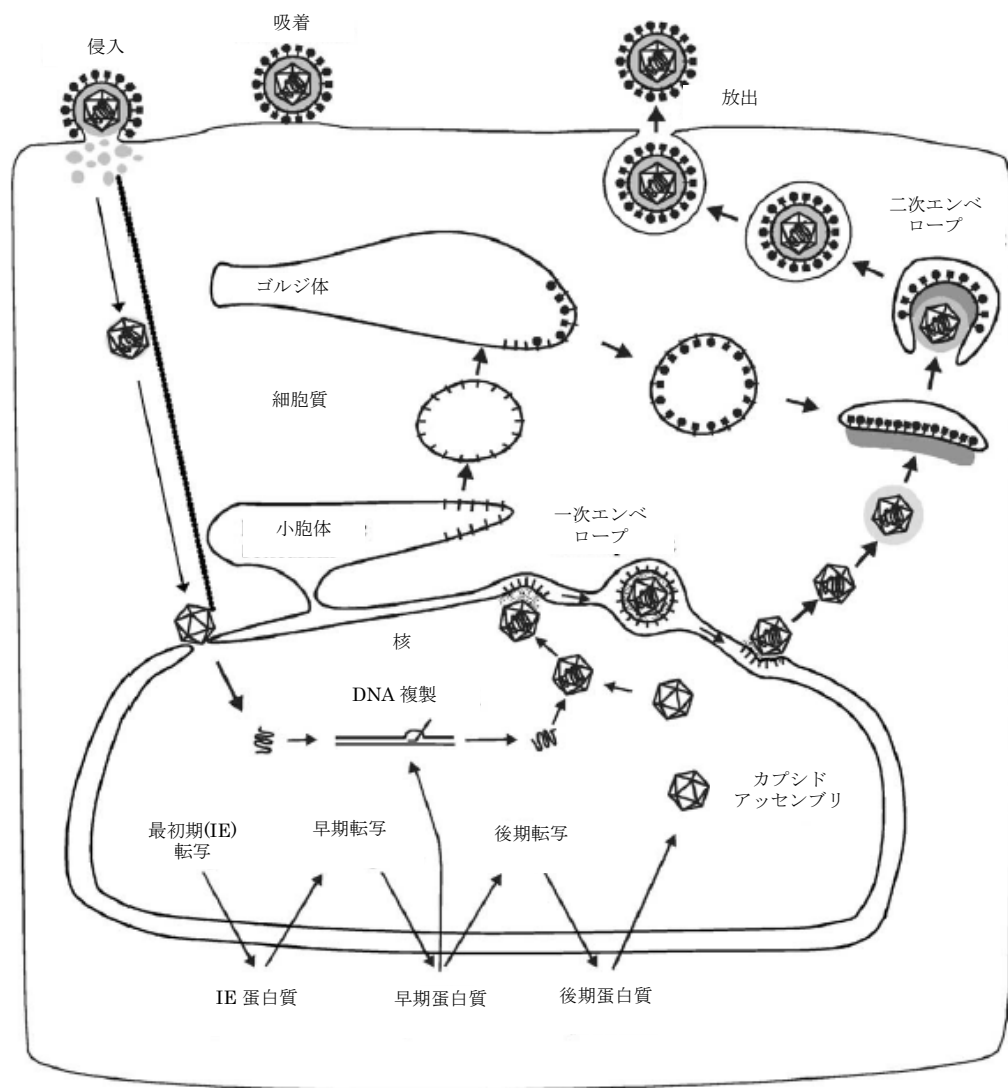


図 4. HVT 及び MDV の複製サイクル

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

[出典 31]

ホ) 病原性

HVT は健康な七面鳥に由来する非病原性ウイルスであり[40, 44]、腫瘍原性や病原性はない。

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

対象動物に感染したウイルスは、ウイルス粒子の産生を伴う細胞溶解感染の後、ウイルス粒子が産生されない潜伏感染に移行するが、MDV 血清型 1 が潜伏感染した CD4+ヘルパー T 細胞のみが T 細胞性リンパ腫に形質転換する。MDV 血清型 1 ゲノムは *meq* に代表される腫瘍原性・形質転換に関わる遺

伝子配列を有する[12, 40, 49]。

HVT ゲノムは腫瘍原性・形質転換に係る遺伝子配列を持たない[2, 40]。

HVT ゲノムは既に鶏染色体テロメア反復配列のホモログを有しているが[3, 33]、それらは進化の過程で感染鶏のゲノムから獲得したと考えられている[33]。テロメア領域は遺伝子発現に関して直接的な機能を有さないことから、HVT が鶏ゲノム染色体末端のテロメア領域へ組込まれたとしても、HVT の遺伝子調節因子が鶏ゲノム上の主要な遺伝子と隣接していないため、鶏ゲノム遺伝子の発現を変化させる可能性は低い[3]。

HVT は 1970 年代の初頭から MD を予防するワクチンとして市販され、MDV 血清型 1 又は血清型 2 との 2 価ワクチンや HVT をバックボーンとするベクターワクチンを含め、現在まで安全に使用されている[40]。

宿主ウイルス HVT FC126 株は、HVT 生ワクチンとして最も一般的な株であり、上記 HVT 一般の性状と同様に病原性がない[40]。

へ) 有害物質の産生性

HVT は病原性に関わる遺伝的要素や毒素遺伝子を含まない[40]。また、アレルゲンデータベース（国立医薬品食品衛生研究所）のカテゴリーサーチにおいて、Food Animal にリストされているアレルゲン 259 種中、鶏関連のアレルゲン 13 種にウイルス由来のものは含まれていなかったこと、HVT FC126 株の長年にわたるワクチンとしての野外での使用実績においてアレルゲンに関連する問題は報告されていないことから有害物質を産生する可能性はない [別紙 1-1 : 23 頁 III. B.]。

宿主ウイルス HVT FC126 株は生ワクチン製造用株マスターシードウイルスから培養細胞で 2 代継代が行われたのみで HVT 一般の性状と同様に有害物質を産生する可能性はない。

ト) その他の情報

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

宿主 HVT FC126 株は細胞随伴性ウイルスであり、羽包上皮細胞から放出されるウイルス粒子以外の細胞遊離型ウイルスは感染性がない。一方、羽包上皮細胞から放出される感染性を有するウイルス粒子は、脂質二重膜から成るエンベロープを有することから、次亜塩素酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム及びヨード剤など多くの一般的な消毒剤により容易に不活化でき[10]、紫外線に対しても感受性である。

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

本遺伝子組換えウイルスの作出に用いられた供与核酸「IBDV VP2 遺伝子発現カセット」及び「ニューカッスル病ウイルス（Newcastle Disease virus: NDV）F 遺伝子発現カセット」の構成並びに構成要素の由来は以下の通りである。

イ-1) 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの構成及び構成要素の由来

本遺伝子組換えウイルスの作出に用いられた供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの構成及び構成要素の由来は図 5 及び表 2 に示した通りである。

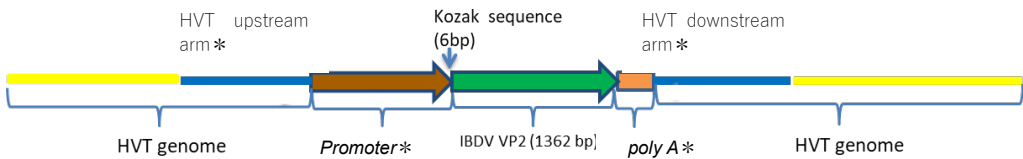


図 5. 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの構造

*：社外秘につき一部非開示

表 2. 本遺伝子組換えウイルスの作出に用いられた供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの各構成要素

構成要素	サイズ	構成要素の由来
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接上流領域	【社外秘につき非開示】	HVT ゲノム上の IBDV VP2 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する上流領域（【社外秘につき非開示】）
プロモーター*		【社外秘につき非開示】
IBDV VP2 遺伝子	1,368 bp (453aa)	IBDV ¹⁾ 【社外秘につき非開示】を由来とする VP2 蛋白質コード遺伝子 (1,362 bp、但しストップコドン 3 bp を含む) コザック配列 6 bp
ポリアデニル化配列*	【社外秘につき非開示】	【社外秘につき非開示】由来のポリアデニル化 (poly A) 配列
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接下流領域		HVT ゲノム上の IBDV VP2 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する下流領域（【社外秘につき非開示】）

1) 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV)

科：ビルナウイルス科 (Birnaviridae)

属：アビビルナウイルス属 (Avibirnavirus)

種：伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

*：社外秘につき一部非開示

IBDV は約 6.1 kb の 2 本鎖 RNA ウイルスであり、ウイルスゲノムは VP2～VP5 及び VP1 ウイルス蛋白質をコードするセグメント A 及び B から構成される（図 6）。構造蛋白質である VP2 と VP3 及びセリンプロテアーゼである VP4 は一つのポリ蛋白質として翻訳され、自己切断される。VP5 は非構造蛋白質で、感染初期の抗アポトーシス作用及びウイルス放出や分布に関する調節機能を有する[17]。セグメント B は RNA ポリメラーゼである VP1 をコードしている[15, 28]。

IBDV VP2 遺伝子は【社外秘につき非開示】に由来する。【社外秘につき非開示】。

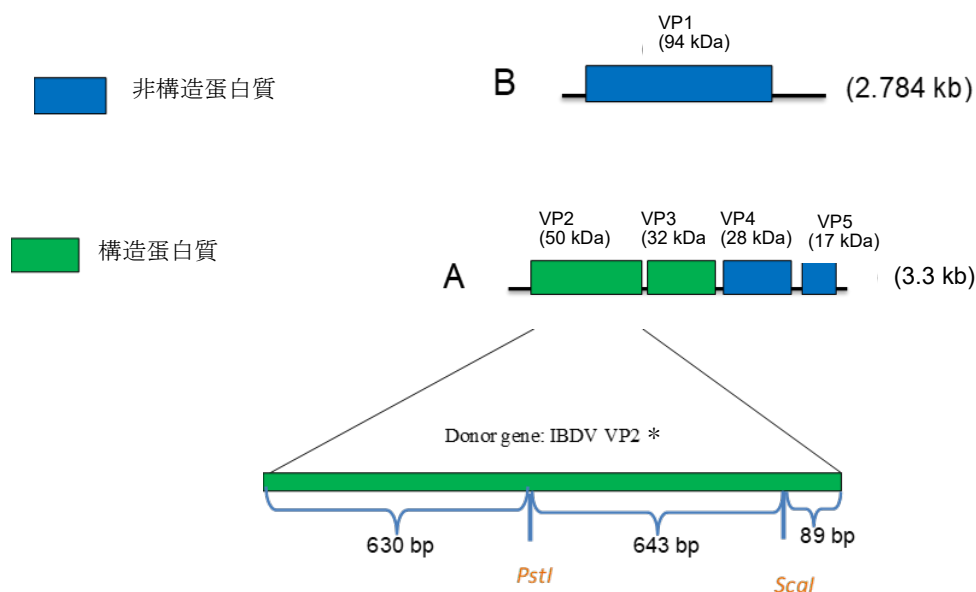


図 6. IBDV ウイルスゲノム構造及び供与核酸 IBDV VP2 遺伝子
*：社外秘につき一部非開示

イ-2) 供与核酸 NDV F 遺伝子発現カセットの構成及び構成要素の由来

本遺伝子組換えウイルスの作出に用いられた供与核酸 NDV F 遺伝子発現カセットの構成及び構成要素の由来は図 7 及び表 3 に示した通りである。

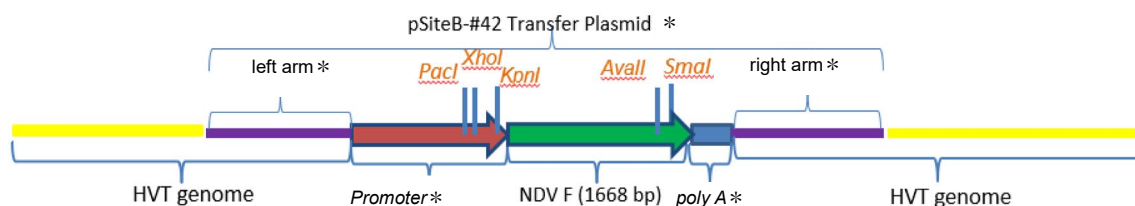


図 7. 供与核酸 NDV F 遺伝子発現カセットの構成
*：社外秘につき一部非開示

表 3. 本遺伝子組換えウイルスの作出に用いられた供与核酸 NDV F 遺伝子発現カセットの各構成要素

構成要素	サイズ	構成要素の由来
遺伝子挿入サイト HVT ゲノム隣接上流領域	【社外秘につき非開示】	HVT ゲノム上の NDV F 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する上流領域 (【社外秘につき非開示】)
プロモーター*		【社外秘につき非開示】
NDV F 遺伝子	1,668 bp (553 aa)	NDV ¹⁾ 【社外秘につき非開示】を由来とする F 蛋白質コード遺伝子(1,662 bp、但しストップコドン 3 bp を含む) コザック配列 6 bp (本遺伝子発現カセットでは開始点の前 6 bp を当該配列として追加した。)
ポリアデニル化配列*	【社外秘につき非開示】	【社外秘につき非開示】由来のポリアデニル化 (poly A) 配列
遺伝子挿入サイト HVT ゲノム隣接下流領域		HVT ゲノム上の NDV F 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する下流領域 (【社外秘につき非開示】)

¹⁾ ニューカッスル病ウイルス (NDV)

科：パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae)

属：ルブラウイルス属 (Rubulavirus)

種：ニューカッスル病ウイルス

*：社外秘につき一部非開示

NDV は約 15 kb の非分節マイナス 1 本鎖 RNA ウイルスであり、ウイルスゲノムは NP（主要ヌクレオカプシド蛋白質）、P（リン酸化 ヌクレオカプシド関連蛋白質）、M（非グリコシル化基質蛋白質）、F（融合糖蛋白質）、HN（ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ糖蛋白質）及び L（ラージヌクレオカプシド関連蛋白質）の 6 つのウイルス蛋白質をコードする（図 8）。

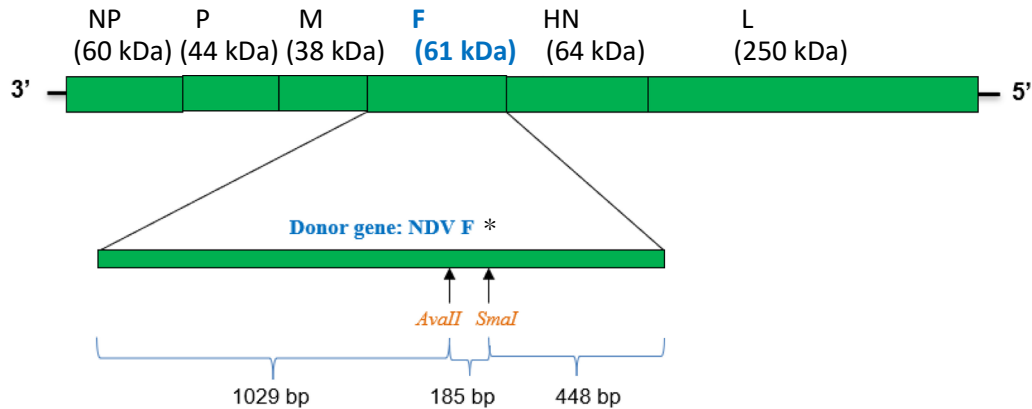


図 8. NDV ウイルスゲノム構造及び供与核酸 NDV F 遺伝子

*：社外秘につき一部非開示

NDV F 遺伝子は【社外秘につき非開示】に由来する。【社外秘につき非開示】。

ロ-1) 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの構成要素の機能

供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの各構成要素の機能は表 4 の通りである。供与核酸部分は全合成された。

表 4. 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子発現カセットの各構成要素の機能

構成要素	構成要素の機能
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接上流領域	HVT ゲノム上の IBDV VP2 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する上流領域。HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置し、その特性について解析されている[27]。 【社外秘につき非開示】。 よって、HVT の翻訳領域（オープンリーディングフレーム、ORF）に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない。
プロモーター*	非常に高い転写活性を持つことから、遺伝子発現用に一般的によく使用され、分子学的特性が明らかなプロモーター。
IBDV VP2 遺伝子	VP2 蛋白質は主要なウイルス構造蛋白質で、ウイルス蛋白質の約 50%を占める。VP2はウイルス粒子の表面に露出し、中和抗体を誘導するウイルス蛋白質である[5]。VP2 は露出部に位置する親水性の可変領域を持つ。VP2 の露出部はアミノ酸 206-350 の間の蛋白質に認められ、IBD 感染動物体内の中和抗体応答誘導を担う[30]。 コザック配列：蛋白質発現量に影響を与えている翻訳開始点近傍の配列で、本遺伝子発現カセットでは開始点の前 6 bp を当該配列として追加した。
ポリアデニル化配列 (poly A) *	ポリアデニル化 (poly-A tail の付加) により、mRNA の安定性を向上させ、RNA の核外輸送、翻訳が促進される。
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接下流領域	HVT ゲノム上の IBDV VP2 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する下流領域。HVT ORF に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない。

【社外秘につき非開示】

*：社外秘につき一部非開示

ロ-2) 供与核酸 NDV F 遺伝子発現カセットの各構成要素の機能

供与核酸 NDV F 遺伝子発現カセットの各構成要素の機能は表 5 の通りである。供与核酸部分は全合成された。

表 5. 供与核酸 NDV F 遺伝子発現カセットの各構成要素の機能

構成要素	構成要素の機能
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接上流領域	HVT ゲノム上の NDV F 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する上流領域。HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置し、その特性について解析されている[27]。 【社外秘につき非開示】。 よって、HVT のオープンリーディングフレーム (ORF) に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない。
プロモーター*	非常に高い転写活性を持つことから、遺伝子発現用に一般的によく使用され、分子学的特性が明らかなプロモーター。
NDV F 遺伝子	F 蛋白質は膜通過型の糖蛋白質である。F 蛋白質はプロテアーゼによって開裂され、HN 蛋白質の存在下でウイルスエンベロープと細胞膜の融合、すなわち感染の成立に寄与する。F 蛋白質単独では膜融合活性は発現されない[18]。 当該遺伝子は他の蛋白質発現の影響を受けないように、単独発現となるように組み込まれている。 コザック配列：蛋白質発現量に影響を与えている翻訳開始点近傍の配列で、本遺伝子発現カセットでは開始点の前 6 bp を当該配列として追加している。
ポリアデニル化配列 (<i>poly A</i>) *	転写終結及びポリアデニル化に必要なシグナルをもたらす[26]。
遺伝子挿入サイトの HVT ゲノム隣接下流領域	HVT ゲノム上の NDV F 遺伝子発現カセット挿入サイトに隣接する下流領域。HVT ORF に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない。

【社外秘につき非開示】

*：社外秘につき一部非開示

(2) ベクターに関する情報

イ-1) IBDV VP2 遺伝子発現カセット作成に用いたベクターの名称及び由来

名称：pj201 クローニングベクター

由来：市販のクローニングベクター（ATUM）（図 9）

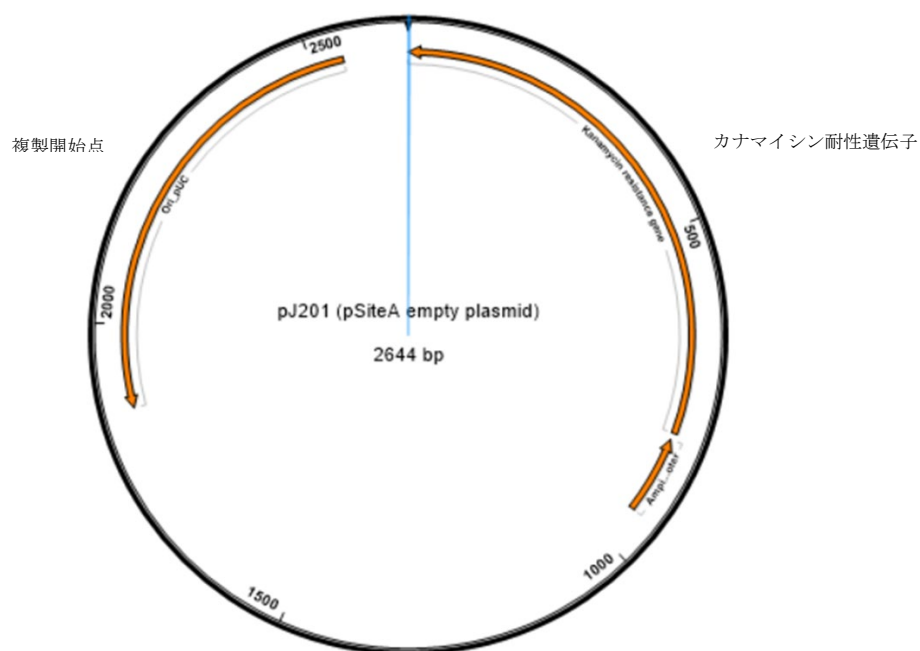


図 9. 市販クローニングベクターpj201 の構成

名称：pMA-RQ-Bs クローニングベクター

由来：市販のクローニングベクター（GeneArt）（図 10）

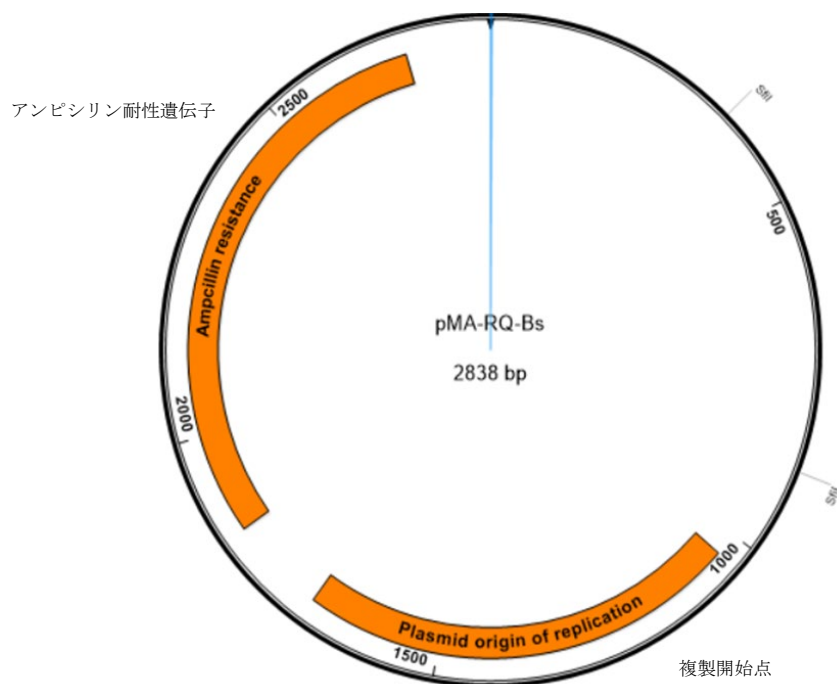


図 10. 市販クローニングベクターpMA-RQ-Bs の構成

イ-2) NDV *F* 遺伝子発現カセット作成に用いたベクターの名称及び由来

名称：pJ151 クローニングベクター

由来：市販のクローニングベクター（ATUM）（図 11）

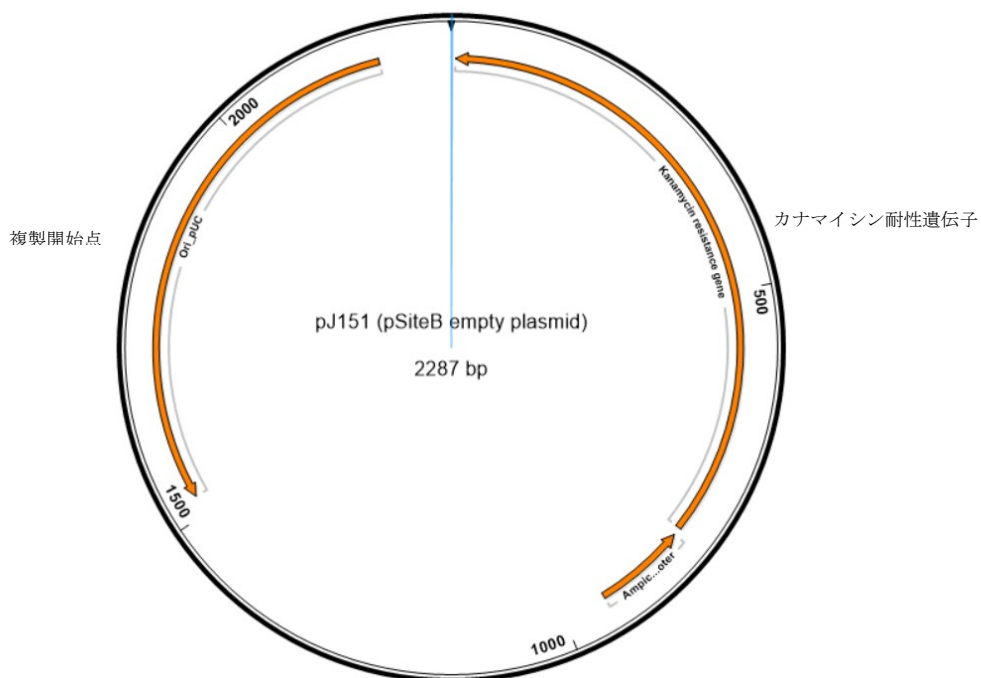


図 11. 市販クローニングベクターpJ151 の構成

名称：pUC57 クローニングベクター

由来：市販のクローニングベクター（BioBasic）（図 12）

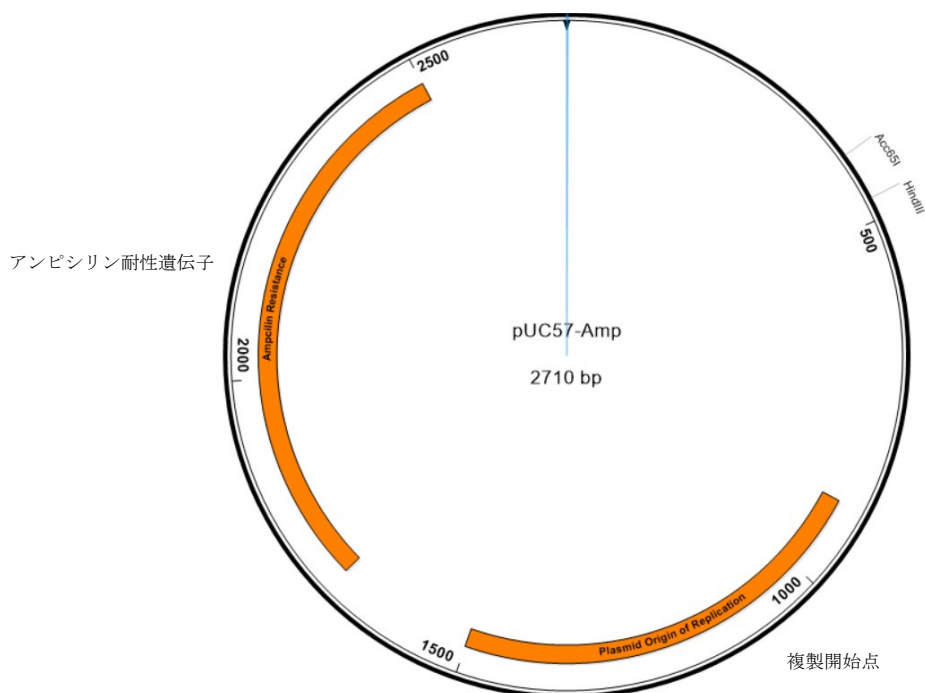


図 12. 市販クローニングベクターpUC57 の構成

ロ-1) IBDV VP2 遺伝子発現カセット作成に用いたベクターの特性

pj201 クローニングベクターは、実験用クローニングベクター（ATUM）として市販されているもので、全遺伝子配列が決定されており、複製開始点及びカナマイシン耐性遺伝子を有するが、病原性や伝達性に関与する遺伝子は保有しない。

pMA-RQ-Bs クローニングベクターは、実験用クローニングベクター（GeneArt）として市販されているもので、全遺伝子配列が決定されており、複製開始点及びアンピシリン耐性遺伝子を有するが、病原性や伝達性に関与する遺伝子は保有しない。

ロ-2) NDV F 遺伝子発現カセット作成に用いたベクターの特性

pj151 クローニングベクターは、実験用クローニングベクター（ATUM）として市販されているもので、全遺伝子配列が決定されており、複製開始点及びカナマイシン耐性遺伝子を有するが、病原性や伝達性に関与する遺伝子は保有しない。

pUC57 クローニングベクターは、実験用クローニングベクター（BioBasic）として市販されているもので、全遺伝子配列が決定されており、複製開始点及びアンピシリン耐性遺伝子を有するが、病原性や伝達性に関与する遺伝子は保有しない。

(3) 遺伝子組換え生物の調製方法

イ) 宿主内に移入された核酸全体の構成

本遺伝子組換えウイルス全体の構成を図 13 に示した。

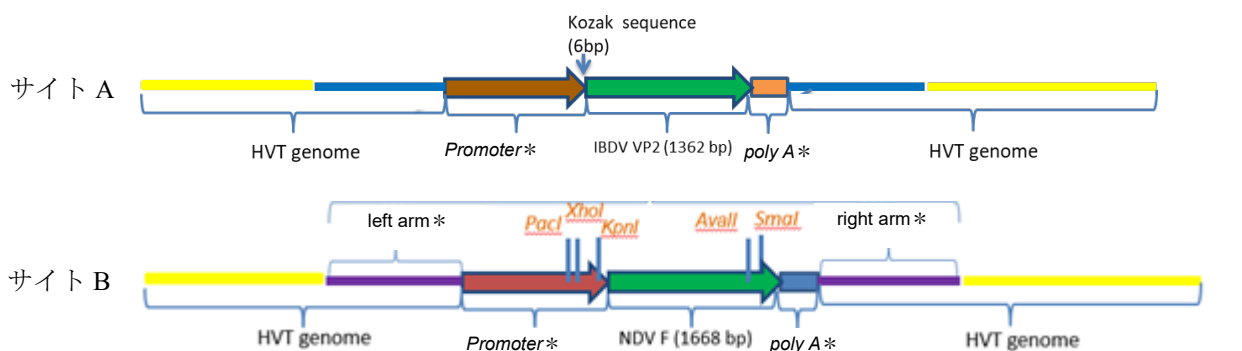


図 13. 本遺伝子組換えウイルス「HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2」の構成

*：社外秘につき一部非開示

ロ) 宿主内に移入された核酸の移入方法

- ① IBDV VP2 遺伝子発現カセットトランスファープラスミド「pSiteA-#30」の作製
【社外秘につき非開示】
- ② NDV F 遺伝子発現カセットトランスファープラスミド「pSiteB-#42」の作製
【社外秘につき非開示】
- ③ 【社外秘につき非開示】

④ 遺伝子組換えウイルス「HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2」の作製方法

【社外秘につき非開示】

ハ) 遺伝子組換え生物等の育成の過程

【社外秘につき非開示】。

遺伝子組換えウイルス HVT-IBD-ND ウイルスにおける IBDV VP2 蛋白質の発現を確認するため、遺伝子組換えウイルス HVT-IBD-ND ウイルス感染細胞について抗 IBDV 抗体又は抗 HVT 抗体を反応させたところ、いずれも蛍光が認められた（図 24）。また、IBDV VP2 遺伝子挿入部位を確認するため、挿入遺伝子の外側に対応するプライマー（2 組はプラスミドに含まれた HVT 配列、他の 2 組はその外側の HVT 配列に対応するプライマー）で PCR を行ったところ予想された長さの産物が検出された（図 25）。

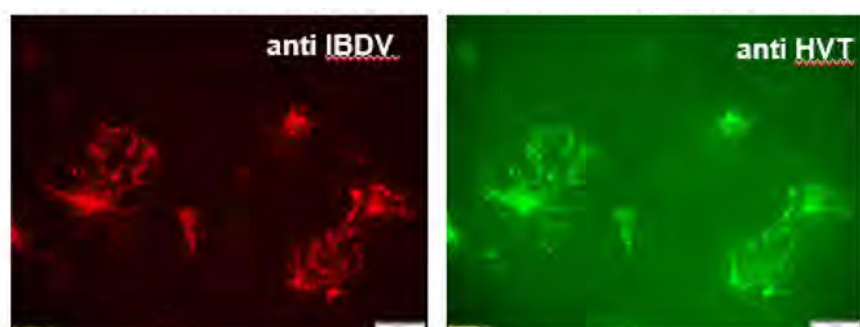
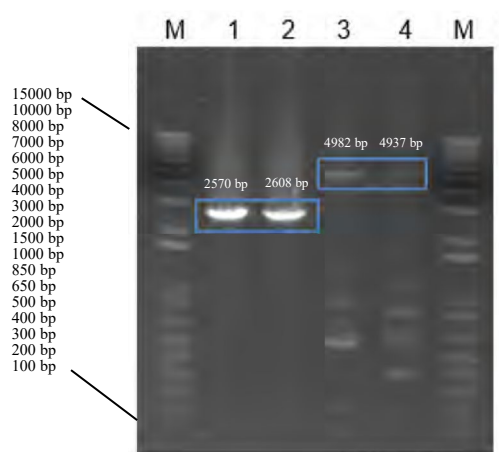


図 24. 抗 IBDV 及び抗 HVT 抗体染色による挿入遺伝子（IBDV VP2 遺伝子）発現の確認



レーン	プライマーセット	推定サイズ
M	サイズマーカー	
1	A1 (SiteA-F1+SiteA-R1)	2,570 bp
2	A2 (SiteA-F2+SiteA-R2)	2,608 bp
3	A3 (SiteA FL-F1+SiteA FL-R1)	4,982 bp
4	A4 (SiteA FL-F2+SiteA FL-R1)	4,937 bp

【各プライマーの配列については社外秘につき非開示】

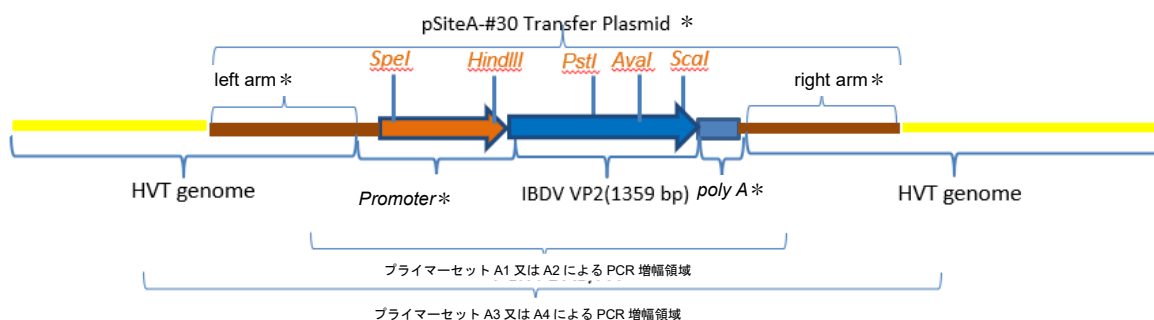


図 25. PCR による挿入遺伝子（IBDV VP2 遺伝子）の確認

*：社外秘につき一部非開示

IBDV VP2 遺伝子発現カセットの外側に位置するプライマーセット（全 VP2 遺伝子発現カセット領域をカバーする）を用いて PCR を実施し、その産物に制限酵素切断解析を行った。2,570 bp の PCR 産物を 9 種の制限酵素で切断したところ、それぞれ推定される DNA 断片が認められた（図 26、27）。

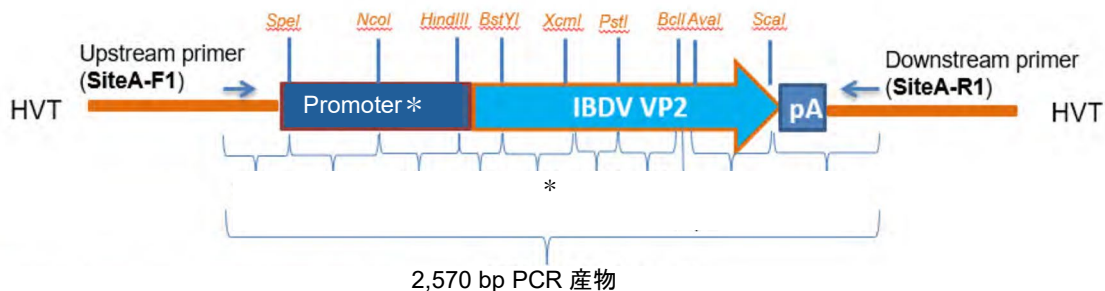
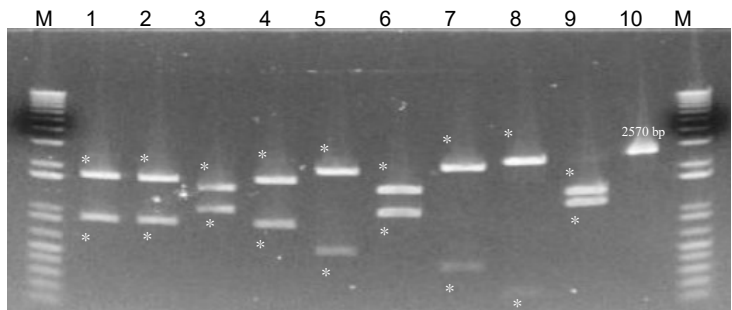


図 26. IBDV VP2 遺伝子挿入部分の制限酵素地図
*：社外秘につき一部非開示



レーン	制限酵素	断片サイズ (bp)	
M	サイズマーカー		
1	<i>Ava</i> I	【社外 秘につ き非開 示】	【社外 秘につ き非開 示】
2	<i>Bcl</i> I		
3	<i>Bst</i> YI		
4	<i>Hind</i> III		
5	<i>Sca</i> I		
6	<i>Pst</i> I		
7	<i>Nco</i> I		
8	<i>Spe</i> I		
9	<i>Xcm</i> I		
10	未切断産物 (2,570 bp)		

PCR プライマーセット
- 【社外秘につき非開示】
- 【社外秘につき非開示】

図 27. PCR 産物及びその制限酵素切断産物
*：社外秘につき一部非開示

NDV F 遺伝子発現カセットの外側に位置するプライマーセット（全 F 遺伝子発現カセット領域をカバーする）を用いて PCR を実施し、その産物に制限酵素切断解析を行った。3,625 bp の PCR 産物を 5 種の制限酵素で切断したところ、それぞれ推定される DNA 断片が認められた（図 28、29）。

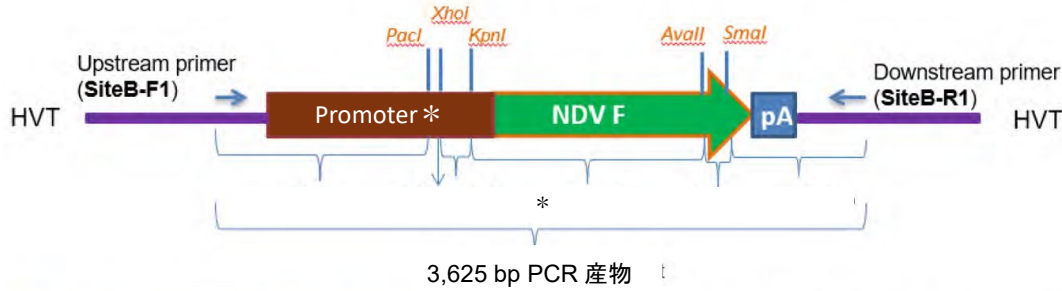


図 28. NDV F 遺伝子挿入部分の制限酵素地図
*：社外秘につき一部非開示

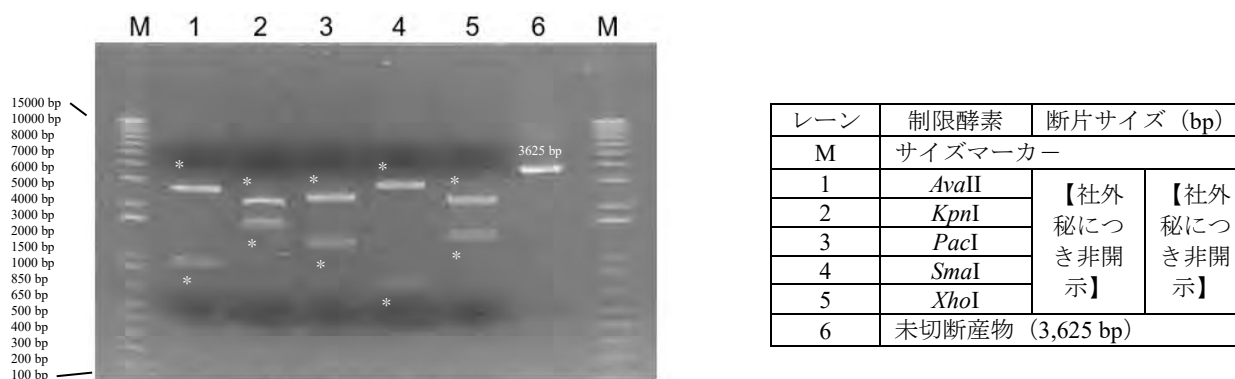


図 29. PCR 産物及びその制限酵素切断産物

* : 社外秘につき一部非開示

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

① 移入した核酸の遺伝子組換え微生物における存在状態

移入した IBDV VP2 遺伝子は、宿主ウイルス HVT FC126 株ゲノムの【社外秘につき非開示】の非翻訳領域に、宿主核酸の欠損なしに挿入されている。【社外秘につき非開示】。供与核酸挿入位置に宿主遺伝子の改変はなく [別紙 1-1 : 23 頁 III. B.]、【社外秘につき非開示】。よって、HVT の翻訳領域 (ORF) に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない [別紙 1-1 : 22 頁 II. C. 5] ことから、IBDV VP2 遺伝子発現カセットは、宿主遺伝子の発現には影響を与えず、他の蛋白質発現の影響は受けずに単独発現となるように組み込まれている。

移入した NDV F 遺伝子は、宿主ウイルス HVT FC126 株ゲノムの【社外秘につき非開示】の非翻訳領域に挿入されている。【社外秘につき非開示】。供与核酸挿入位置に宿主遺伝子の改変はなく [別紙 1-1 : 23 頁 III. B.]、【社外秘につき非開示】。よって、HVT の翻訳領域 (ORF) に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない [別紙 1-1 : 22 頁 II. C. 5] ことから、NDV F 遺伝子発現カセットは、宿主遺伝子の発現には影響を与えず、他の蛋白質発現の影響は受けずに単独発現となるように組み込まれている。

② 移入された核酸の複製物の世代交代時における伝達の安定性 (培養細胞での継代及び接種動物体内)

移入された核酸の培養細胞における複製物の安定性は、宿主に移入された IBDV VP2 遺伝子又は NDV F 遺伝子の外側 (宿主ゲノム上) に設計された 4 組のプライマーセット (表 8) を用い、マスターシードウイルス (MSV ; 継代数 = n) 及びその細胞継代 (n+1~5) について PCR により確認した (図 30、31)。全ての継代についてそれぞれ予想されるバンドのみが確認された。遺伝子挿入前の宿主 HVT ウイルスについても予想されるバンドが確認された。また、プライマーセット A1 (SiteA-F1 + SiteA-R1) 及び B2 (SiteB-F2 + SiteB-R2) を用いた MSV と MSV+5 の PCR 産物 (【社外秘につき非開示】) について比較したところ、それぞれ一致していることが確認された。さらに、これらの PCR 産物の遺伝子配列を比較したところ MSV と MSV+5 とで 100%一致した。マスターシードウイルス及び継代したものの PCR 産物は全て、全長バンドのみが確認され、移入された核酸が脱落した宿主ウイルス (HVT FC126 株) で想定されるバンドは認められなかったことから、複製物の培養細胞での継代における安定性が確認された [別紙 1-1 : 19~22 頁 II. C. 3. c.、48 頁 Figure 10]。

表 8. 遺伝的安定性の評価に用いた PCR プライマー

プライマーセット	プライマー名	配列
A1	SiteA-F1	【社外秘につき非開示】
	SiteA-R1	
A4	SiteA-FL-F2	
	SiteA-FL-R1	
B2	SiteB-F2	
	SiteB-R2	
B4	SiteB-FL-F2	
	SiteB-FL-R2	

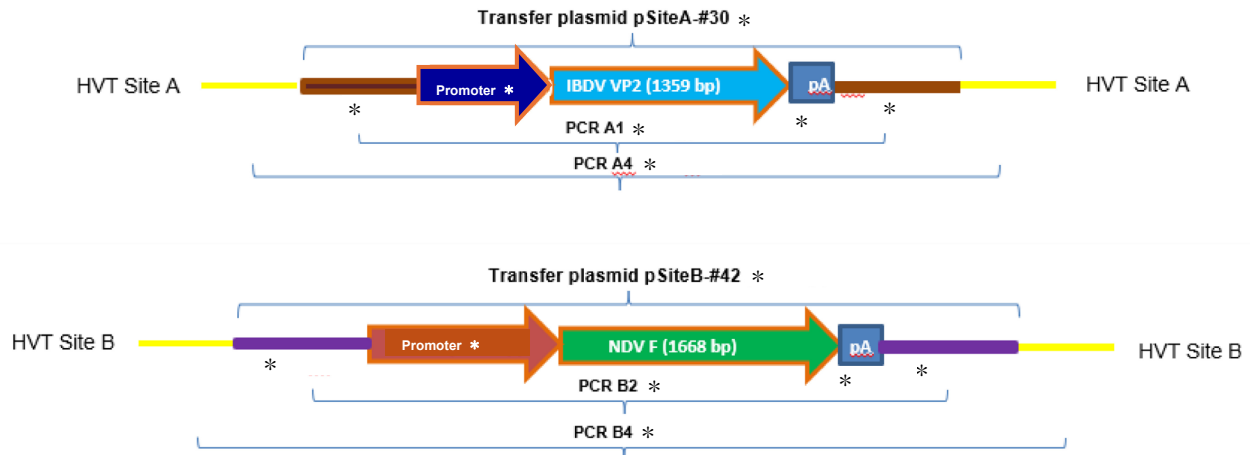
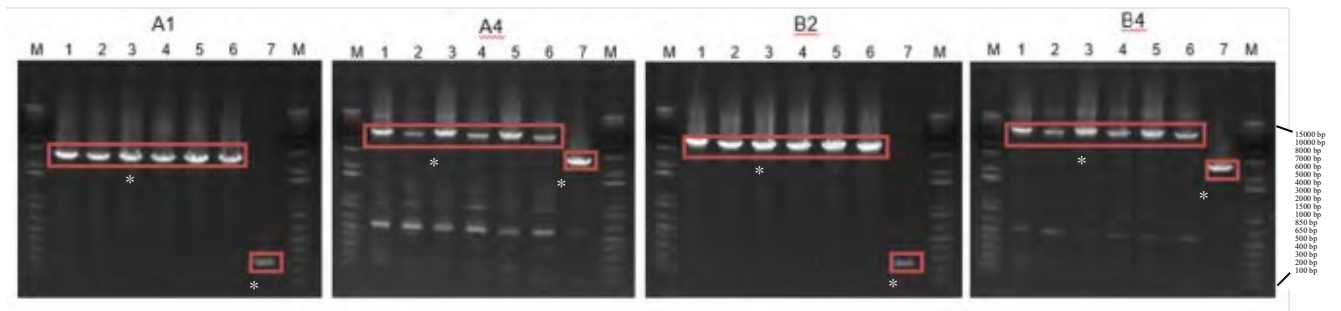


図 30. PCR プライマーの位置及びその推定産物

* : 社外秘につき一部非開示



図番号	プライマーセット	推定 PCR 産物 (bp)		レーン	サンプル
		HVT-IBD-ND	HVT		
A1	SiteA-F1 + SiteA-R1	【社外秘につき非開示】	【社外秘につき非開示】	1	MSV
A4	SiteA-FL-F2 + SiteA-FL-R1			2	MSV+1
B2	SiteB-F2 + SiteB-R2			3	MSV+2
B4	SiteB FL-F2 + SiteB FL-R2			4	MSV+3
				5	MSV+4
				6	MSV+5
				7	HVT

図 31. 本遺伝子組換えウイルスにおける供与核酸の PCR による遺伝的安定性

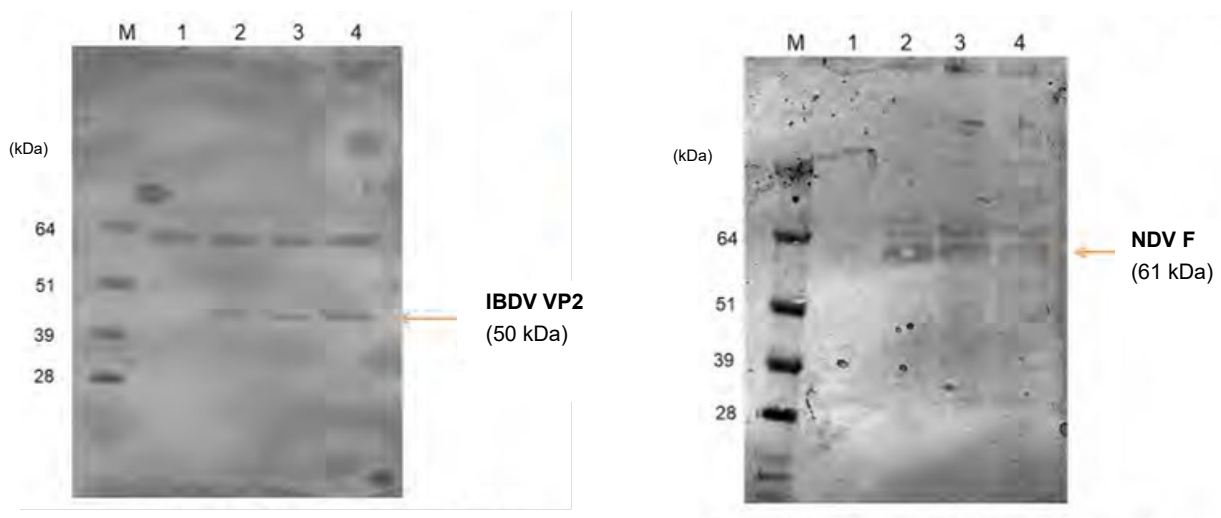
* : 社外秘につき一部非開示

また、発現蛋白質 IBDV VP2 及び NDV F の安定性に関しては、マスターシードウイルス及び継代 1～5 代目の培養細胞を用いて、抗 HVT モノクローナル抗体、並びに抗 IBDV 鶏ポリクローナル抗体又は抗 NDV 鶏ポリクローナル抗体の二重免疫染色により確認した。各継代の全てのプラークが HVT 陽性かつ目的抗原陽性であることが確認された（表 9）。〔別紙 1-1：19～22 頁 II. C. 3. c.〕。

表 9. 本遺伝子組換えウイルスにおける目的抗原の発現安定性（免疫染色法）

継代数	陽性率（陽性プラーク数／検査プラーク数）	
	HVT 及び IBDV 陽性	HVT 及び NDV 陽性
MSV (n)	100% (814/814)	100% (824/824)
n+1	100% (487/487)	100% (521/521)
n+2	100% (757/757)	100% (825/825)
n+3	100% (135/135)	100% (144/144)
n+4	100% (669/669)	100% (707/707)
n+5	100% (774/774)	100% (781/781)

発現蛋白質 IBDV VP2 及び NDV F の安定性に関しては、さらに本遺伝子組換えウイルスのマスターシードウイルス感染細胞破碎液及び 5 代継代ウイルス感染細胞破碎液について抗 IBDV 及び抗 NDV 鶏ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング法で確認したところ、比較対照に用いた市販ワクチン株感染細胞破碎液（IBD ワクチンは「Vaxxitek」、ND ワクチンは「Vectormune ND」）と同様に IBDV VP2 蛋白質に関しては 50 kDa、NDV F 蛋白質については 61 kDa にバンドが確認された（図 32）。〔別紙 1-1：19～22 頁 II. C. 3. c.、53 頁 Figure 13a、54 頁 Figure 13b〕。



レーン	サンプル
M	分子量マーカー
1	HVT 感染細胞破碎液
2	HVT-IBD-ND MSV 感染細胞破碎液
3	HVT-IBD-ND MSV の 5 継代株感染細胞破碎液
4	市販 IBD ワクチン株感染細胞破碎液

レーン	サンプル
M	分子量マーカー
1	HVT 感染細胞破碎液
2	HVT-IBD-ND MSV 感染細胞破碎液
3	HVT-IBD-ND MSV の 5 継代株感染細胞破碎液
4	市販 ND ワクチン株感染細胞破碎液

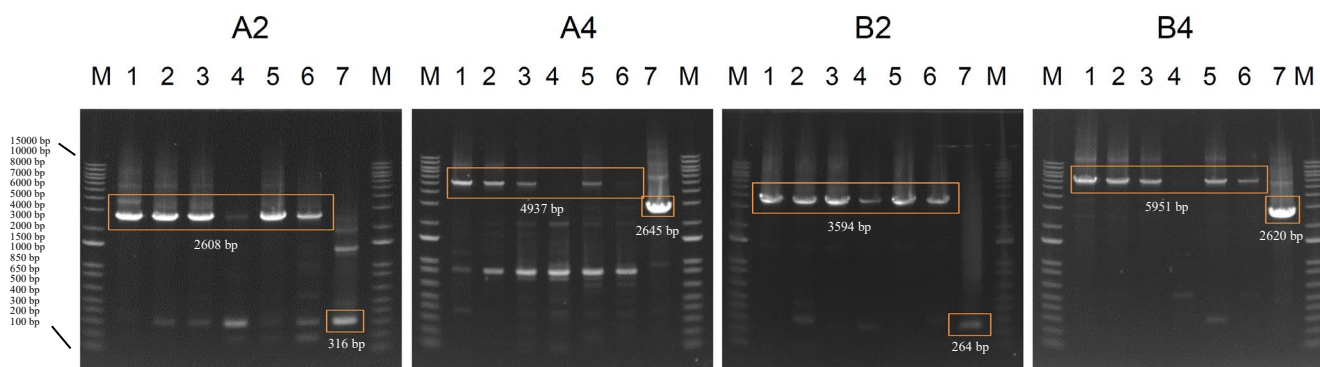
図 32. 本遺伝子組換えウイルスにおける目的抗原の発現安定性（ウエスタンブロッティング法）

IBDV VP2 遺伝子及び NDV F 遺伝子の接種動物体内での複製物の安定性は、マスターシードウイルスを SPF 発育鶏卵に卵内接種し、孵化後 7 日に、脾臓及び血液中からウイルスを回収し、次代に継代することで確認した〔別紙 5〕。鶏での継代を 5 代目まで行ったところ、臨床症状及び剖検において

MD、ND 又は IBD に関連する所見を示す鶏は認められず、病原性を復帰しなかったことが示された。また、回収ウイルスのウイルス定量時に実施した二重免疫染色により、全てのプラークに IBDV VP2 蛋白質及び NDV F 蛋白質が発現していることが確認された（表 10）。各継代で回収されたウイルスを CEF 細胞で培養し、DNA を抽出して挿入遺伝子の安定性について 4 組のプライマーセットを用い PCR により確認した（図 33）。その結果、各継代の回収ウイルスに IBDV VP2 遺伝子及び NDV F 遺伝子の挿入が確認され、挿入遺伝子が欠損したバンドは認められなかったことから、接種動物の継代においても移入された核酸の複製物の発現が安定していることが確認された。

表 10. 遺伝子組換えウイルスにおける目的抗原の発現

群	ウイルス回収元	IFA 結果 (HVT、IBD、ND)	PCR 結果 (HVT、IBD、ND)
P02 接種材料	P01	陽性	陽性
P03 接種材料	P02	陽性	陽性
P04 接種材料	P03	陽性	陽性
P05 接種材料	P04	陽性	陽性
P05 回収ウイルス	P05	陽性	陽性



レーン	試料
M	マーカー
1	MSV
2	P02 接種材料
3	P03 接種材料
4	P04 接種材料
5	P05 接種材料
6	P05 回収ウイルス
7	HVT

プライマー セット	プライマー	PCR 産物長 (bp)	
		HVT-IBD-ND	HVT
A2	SiteA-F2+SiteA-R2	2608	316
A4	SiteA FL-F2+SiteA FL-R1	4937	2645
B2	SiteB-F2+SiteB-R2	3594	264
B4	SiteB FL-F2+SiteB FL-R2	5951	2620

図 33. 本遺伝子組換えウイルスの接種動物（鶏）体内での継代における供与核酸の PCR による遺伝的安定性
レーン 1 はマスターシードウイルス（MSV）を用いた。レーン 2 は MSV を 18 日齢発育鶏卵に接種後孵化した鶏について 7 日齢時に血液及び脾臓を採取し、それぞれの試料から白血球を回収しプールして 2 代目鶏継代接種材料（P02 接種材料）とした。PCR には接種材料を CEF 細胞で増殖させたものを用いた。レーン 3～5 の P03～P05 接種材料も P02 接種材料と同様に準備した。レーン 6 の P05 回収ウイルスは、P05 接種材料を 18 日齢発育鶏卵に接種後孵化した鶏から 7～8 日齢時に血液及び脾臓から回収した白血球を CEF 細胞で増殖させたものを用いた。レーン 7 は宿主ウイルスである。

[別紙 5]

③ 共感染時にウイルスゲノムの組換えが起こる可能性

細胞にあるウイルスが感染すると、次のウイルスによる感染が阻害される重感染 (superinfection) 阻害は多くのウイルスで報告されている[24, 34, 35]。ウイルス間で遺伝子組換えが起こるには、第一に遺伝子レベルで 2 つのウイルス間に有意な相同性があること、第二に両ウイルスが同じ宿主に感染すること、第三に両ウイルスが同じ細胞に感染する必要がある[23]。MDV 血清型 1 及び 2 を実験的に細胞に同時感染させた場合、重感染の抑制と共に同時感染 (coinfection) が起こることが報告されたが[23]、動物の体内においてはウイルス側だけでなく動物側の要因も関与するため、その頻度は *in vitro* より極めて低いと考えられる。MD の予防のため、HVT は 1970 年代から、その後、各血清型の単価若しくは多価の MD 生ワクチンが世界中で広く用いられているが、長年にわたるコマーシャル養鶏での使用実績において *in vivo* で自然組換えが生じたとの報告はない[8, 40]。HVT と MDV とは遺伝子配列の相同性が比較的低いことが、両者の組換えの可能性が低い一つの要因と考えられる[38]。MDV 血清型 1 及び 2 の混合感染の報告はあるが、実際に組換えが起こった事例としては、実験室内試験で 1 件が報告されているのみである[40]。また、HVT は既に IBDV VP2 遺伝子のベクターとしても実用化されているが組換えが起こったという報告はない。[別紙 1-1 : 25、26 頁 III. E.]

HVT、IBDV 及び NDV はともに鶏、七面鳥及びウズラに感染する。宿主ウイルス HVT FC126 株は 2 本鎖 DNA ウイルスであり核内で複製するのに対し、IBDV は 2 つのセグメントからなる 2 本鎖 RNA ウイルスで、NDV はセグメントのないネガティブ鎖 RNA ウイルスであり、ともに細胞質内で複製する。本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルス HVT FC126 株と同じく核内で複製することから、本遺伝子組換えウイルスと野外 IBDV あるいは野外 NDV 間での組換えが起こる可能性はほぼないと考えられる。また、IBDV と異なり、NDV はネガティブ鎖 RNA ウイルスであることから、その蛋白質発現には相補的な RNA が合成される必要があるため、これによる蛋白質発現の違いから IBDV、NDV の双方で影響しあうことはないと考えられる。[別紙 1-1 : 25、26 頁 III. E.]

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

本遺伝子組換えウイルスは、感染細胞において HVT に対するモノクローナル抗体、IBDV に対するポリクローナル抗体及び NDV に対するポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により検出され、かつ宿主感染細胞と識別される。本遺伝子組換えウイルス感染細胞は上記の 3 種の抗体に反応し、宿主ウイルス HVT FC126 株感染細胞は HVT モノクローナル抗体のみに反応する。この方法は感染単位 (PFU、Plaque Forming Unit) を測定する方法としても用いられており、感度は 1 感染細胞であり、非感染細胞は検出されない。[別紙 1-1 : 15、16 頁 II. C. 1. e]。

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

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

① 増殖様式（ウイルス血症及び新たな感染性ウイルスの発生を含む）

本遺伝子組換えウイルスと宿主ウイルス HVT FC126 株の培養細胞における増殖性について比較するため、培養細胞のウイルス量を経時的に測定した [別紙 10]。宿主ウイルス HVT FC126 株は 45 時間後に、本遺伝子組換えウイルスは 50 時間後にウイルス価のピークを示し、以降のウイルス価は宿主ウイルスと同様に減衰した。ピーク時のウイルス価は宿主ウイルス HVT FC126 株の 8.03×10^6 PFU/mL に対して、本遺伝子組換えウイルスでは 4.69×10^6 PFU/mL であり (図 34)、本遺伝子組換えウイルスの増殖能は宿主ウイルス HVT FC126 株と同等又はそれ以下であることが示された。宿主ウイルス HVT FC126 株への IBDV VP2 遺伝子及び NDV F 遺伝子の挿入によってウイルスの増殖性が高まっていないことが確認された。

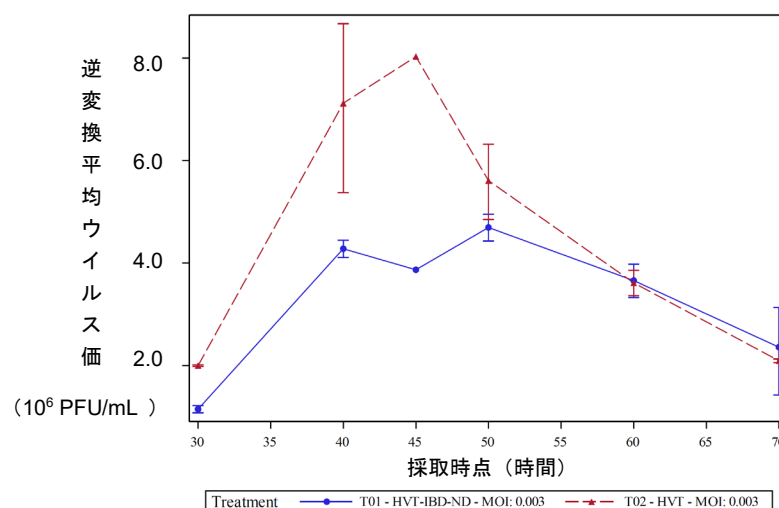


図 34. 宿主ウイルス HVT FC126 株及び本遺伝子組換えウイルスの培養細胞における増殖性

本遺伝子組換えウイルスの鶏体内における組織指向性及び環境中へのウイルス排泄についても宿主ウイルス HVT FC126 株と同等又はそれ以下であると考えられる [別紙 7、8、11]。HVT は感染性を有する細胞遊離型ウイルス粒子を羽包上皮細胞で産生し、これらの細胞はフケとして環境中に排泄される。細胞遊離型ウイルスの感染性は環境中で約 1 年間保持されるが [10]、消毒剤での清掃が定石である養鶏の飼育環境では、HVT についても容易に不活化されと考えられ、宿主ウイルス HVT FC126 株についても同様である。感染した動物の中和抗体誘導を担う、IBDV VP2 遺伝子発現カセット及び NDV F 遺伝子発現カセットが挿入された本遺伝子組換えウイルスについても消毒剤への耐性が上昇するとは考えられず、同様に不活化されと考えられる。

② 遺伝的特性

本遺伝子組換えウイルスは、宿主ウイルス HVT FC126 株ゲノムの【社外秘につき非開示】の非翻訳領域に、IBDV VP2 発現遺伝子が、【社外秘につき非開示】の非翻訳領域に、NDV F 発現遺伝子が挿入されている (I の 2 の (4) の①参照)。これらは、HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置し、その特性について解析されている [27]。IBDV VP

遺伝子挿入サイトは、【社外秘につき非開示】で、宿主核酸の欠損はない。また、NDV F 遺伝子挿入サイトは、【社外秘につき非開示】。挿入された核酸の隣接領域には調節因子の存在は知られていない。また、挿入サイトはこれらの遺伝子に隣接していない。よって、HVT の ORF に改変はなく、挿入遺伝子座への操作による生物学的な影響は予測されない [別紙 1-1 : 22 頁 II. C. 5]。

③ 病原性（発がん性を含む）

HVT は健康な七面鳥から分離された非病原性ウイルスであり[40, 44]、1970 年代初頭から MD の予防のため安全で有効な生ワクチンとして使用されている（I の 1 の（3）のホ）、へ）参照）。また、FC126 株は HVT 生ワクチンとして最も一般的な株である[40]。本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株は HVT 生ワクチンのマスターシードウイルスを培養細胞で 2 代継代したもので、ウイルスゲノムは腫瘍原性・形質転換に係る遺伝子配列を持たない。本遺伝子組換えウイルスは IBDV VP2 蛋白質及び NDV F 蛋白質を発現する以外、基本的な生物学的性状は宿主ウイルス HVT FC126 株と同一であり、病原性への影響はないと考えられる。

IBDV VP2 蛋白質は IBDV の主要なウイルス構造蛋白質で、ウイルス蛋白質の約 50%を占める。VP2 はウイルス粒子の表面に露出し、中和抗体を誘導するウイルス蛋白質である[5]。VP2 は露出部に位置する親水性の可変領域を持つ。VP2 の露出部はアミノ酸 206－350 の間の蛋白質に認められ、中和抗体応答誘導を担う[30]。IBDV VP2 蛋白質自体には毒性や病原性がないことから、植物発現系等に発現させた VP2 蛋白質がワクチン抗原とする試みも行われている[1]。

NDV F 蛋白質は膜通過型の糖蛋白質である。F 蛋白質はプロテアーゼによって開裂され、HN 蛋白質の存在下でウイルスエンベロープと細胞膜の融合、すなわち感染の成立に寄与する。F 蛋白質の膜融合活性発現には、共発現された HN 蛋白質との相互作用が必要であることから、F 蛋白質単独では発現されない[18]。

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

本遺伝子組換えウイルスの鶏における安全性を確認するため、約 $7 \times 10^{5.0}$ PFU/羽（ワクチンとして使用する最大量の約 10 倍量）を SPF 初生ひなへ皮下接種及び 18 日齢発育鶏卵へ卵内接種し、120 日齢まで臨床症状を観察後、剖検したところ、被験薬に起因すると考えられる病変は認められず、本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルス HVT FC126 株と同様に病原性及び腫瘍原性がないことが確認された [別紙 5、別紙 6]。

④ 有害物質の産生性

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

本遺伝子組換えウイルスは、宿主ウイルス HVT FC126 株の遺伝子発現を変化せず、IBDV VP2 蛋白質及び NDV F 蛋白質を発現する以外、基本的な生物学的性状は宿主ウイルス HVT FC126 株と同一である。前項の通り、IBDV VP2 蛋白質及び NDV F 蛋白質自体に毒性や病原性はなく、アレルギーについても問題はないと考えられるが、アレルギーデータベースにおいて IBDV VP2 アミノ酸配列及び NDV F アミノ酸配列と有意な相同性を示す配列は認められなかったため、本遺伝子組換えウイルスに有害物質の産生性はないと考えられる。また、鶏への接種試験において、本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルス HVT FC126 株と同様に有害物質の産生性がないことが確認

された〔別紙 6〕。

⑤ 感染性

本遺伝子組換えウイルスの体内分布（組織指向性）について SPF 鶏を用いて確認した〔別紙 7〕。HVT は血液、ファブリキウス嚢、脾臓、胸腺及び羽髄からウイルスが検出されることが知られている〔11, 20〕。約 10^4 PFU の本遺伝子組換えウイルス又は宿主ウイルス（HVT FC126 株）を 18 日齢 SPF 発育鶏卵に卵内接種し、それぞれ T02 及び T03 とした。また、非投与群を T01 とした。鶏の孵化日を Day 0 として 11 日齢（Day 11）及び 22 日齢（Day 22）の各群の鶏から血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓、胸腺及び羽髄サンプルを採取した。血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓及び胸腺について白血球を回収し、ウイルス分離を行った。羽髄サンプルについては qPCR によって HVT DNA の検出を試みた。結果を表 11-1 に示す。本遺伝子組換えウイルス接種群（T02）の 11 日齢の各サンプルからウイルスが検出されたが 22 日齢では検出率が低下する傾向にあり、宿主ウイルス HVT FC126 株に関しても同様の傾向が認められたが、宿主ウイルス HVT FC126 株のほうがウイルス検出率低下傾向は緩やかであった。

さらにペンフィルターの塵埃からのウイルス検出を行った（表 11-2）。Day 11 及び 22 にペンフィルターの塵埃を採取し、抗菌剤及び抗真菌剤を添加したトリプトースフォスフェイトブロス (TPB) に浮遊させ、CEF 細胞に接種してウイルスの検出を試みた。また、Day 22 のペンフィルターは 4 分割し、採取日（Day 22）、翌日（Day 23）、3 日後（Day 25）及び 7 日後（Day 29）まで 20～28℃ で保管してからウイルスの検出を行った。その結果、本遺伝子組換えウイルス及び宿主ウイルス HVT FC126 株は Day 11 のみ陽性を示したため、羽髄への分布（排泄性）が同程度であると考えられる。

以上の結果から、本遺伝子組換えウイルスの鶏における体内分布及びウイルス排泄は、宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度と考えられる〔別紙 7〕。

表 11-1. 宿主ウイルス HVT FC126 株及び本遺伝子組換えウイルスの体内分布

群	HVT ウイルス陽性率 (%)											
	血液		ファブリキウス嚢		肺		脾臓		胸腺		羽髄 ¹	
	11 ²	22	11	22	11	22	11	22	11	22	11	22
T01	0 (0/6) ³	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/18)	0 (0/18)
T02	100.0 (6/6)	0 (0/6)	100.0 (6/6)	16.67 (1/6)	83.33 (5/6)	16.67 (1/6)	100.0 (6/6)	0 (0/6)	83.33 (5/6)	0 (0/6)	83.33 (15/18)	11.11 (2/18)
T03	100.0 (6/6)	83.33 (5/6)	83.33 (5/6)	33.33 (2/3)	100.0 (6/6)	50.00 (3/6)	83.33 (5/6)	66.67 (4/6)	83.33 (5/6)	83.33 (5/6)	100.0 (18/18)	94.44 (17/18)

¹ 羽髄は qPCR、他の臓器はウイルス分離によるウイルス検出

² 鶏日齢 ³ 陽性数/供試数

T01：非接種群 T02：本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD-ND 接種群 T03：宿主ウイルス HVT FC126 株接種群
〔別紙 7-1〕

表 11-2. 供試鶏飼育ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス検出

群	ペン 番号	HVT ウイルス分離結果				
		Day 11	Day 22	Day 23*	Day 25*	Day 29*
T01 (非投接種)	01B	—	—	—	—	—
	02B	—	—	—	—	—
T02 (HVT-IBD-ND 接種群)	02A	+	—	—	—	—
	03A	+	—	—	—	—
T03 (HVT FC126 株 接種群)	01A	+	—	—	—	—
	03B	+	—	—	—	—

*Day 22 のサンプルを 20～28℃で 1 日 (Day 23)、3 日 (Day 25) 及び 7 日 (Day 29) 保存したサンプル

＋：HVT 陽性 —：HVT 陰性

[別紙 7-1]

⑥ 内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性

HVT (MDV 血清型 3) と MDV 血清型 1 及び 2 の複製サイクルは類似していることから理論的にはウイルス間の組換えの可能性が考えられるが、実際には実験室内において MDV 血清型 1 と MDV 血清型 2 の組換えが 1 件報告されているのみで[40]、それ以外については、長年にわたる各種血清型マレック病ワクチンの野外使用実績においてそのような事象は報告されていない。HVT と MDV 血清型 1 及び MDV 血清型 2 とは遺伝子配列の相同性が低いことが、両者の組換えの可能性が低い一つの要因と考えられる[38]。また、HVT と MDV 間の組換えは重感染阻害（既に感染した細胞への同種のウイルスの再感染を防ぐこと）によっても妨げられると考えられる[24]。HVT と MDV 野外強毒型 (MDV 血清型 1) との組換えは、HVT 間よりその可能性が低いと考えられる。仮に、野外 HVT と本遺伝子組換えウイルス間で組換えが起こった場合に想定される事象は、本遺伝子組換えウイルスと同様の IBDV VP2 又は NDV F をコードする遺伝子を含むウイルスの産生であり、病原性付与の可能性はない。本遺伝子組換えウイルスは DNA ウイルスであり核内で複製されるが、IBDV 及び NDV は RNA ウイルスであり細胞質内で複製されるため、野外 IBDV 又は NDV と本遺伝子組換えウイルスの IBDV VP2 コード遺伝子配列又は NDV F コード遺伝子配列の交換の可能性は極めて低いと考えられる。IBDV VP2 蛋白質及び NDV F 蛋白質はどちらも中和抗体の誘導を担い、それ自体に病原性はない。

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

⑦ 接種動物からの排泄量、自然界での生存能及び同居感染性

HVT は鶏における排泄及び水平伝播が限定的であり[14, 42]、感染性を有する細胞遊離型 HVT は羽包上皮細胞のみから排泄される[9]。18 日齢 SPF 発育鶏卵に本遺伝子組換えウイルス又は宿主ウイルス HVT FC126 株を卵内接種して孵化させ、孵化日を 0 日齢として、各群に非接種発育鶏卵由来の鶏を同居させて排泄及び伝播について試験した [別紙 8]。その結果、本遺伝子組換えウイルス接種群及び宿主ウイルス HVT FC126 株接種群の両群において、全試験日 (8、15 及び 22 日齢時) で脾臓からウイルスが回収された。血液白血球及び咽頭スワブでは両群とも陽性例が認め

られたが、クロアスワブでは 15 日齢に本遺伝子組換えウイルス接種群のみから回収された。同居鶏では、どの時点のどのサンプルからもウイルスは回収されなかった。本遺伝子組換えウイルスを発育鶏卵に接種後孵化した鶏から限定的なウイルスの排泄は認められたが、その程度は宿主ウイルス HVT FC126 株と同等であることが示され、HVT での既知の程度と同等であると考えられる（表 12）。なお、両ウイルスともに同居鶏への水平伝播は認められなかった（表 12）。

表 12. 宿主ウイルス HVT FC126 株及び本遺伝子組換えウイルスの鶏における排泄及び同居感染性

群	ペン	HVT ウイルス分離陽性率 (%)											
		血液白血球			脾臓			クロアスワブ			咽頭スワブ		
		8*	15	22	8	15	22	8	15	22	8	15	22
T01	01A	0 (0/6) **	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T02		100.0 (6/6)	66.67 (4/6)	0 (0/6)	100.0 (6/6)	33.33 (2/6)	50.0 (3/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)
T01	01B	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T03		33.33 (2/6)	0 (0/6)	50.0 (3/6)	100.0 (6/6)	66.67 (4/6)	33.33 (2/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)

*鶏日齢

**陽性数/供試数

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

[別紙 8-1：16 頁 14.11. Virus Isolation]

⑧ 自然界での生存能力

本遺伝子組換えウイルスの環境中の生存性を調べるため、飼育アイソレーターの排気口の HEPA フィルターから塵埃を採取し、CEF 細胞によるウイルス分離を行った。その結果、本遺伝子組換えウイルス及び宿主ウイルス HVT FC126 株ともに塵埃サンプルから 8、15 及び 22 日齢時いずれにおいても感染性ウイルスは検出されなかった（表 13）。そのため、本遺伝子組換えウイルスの排泄は、宿主ウイルス HVT FC126 株と同等又はそれ以下であり、既知の HVT の性状と同程度と考えられる [別紙 8]。また、実験室内において 10^5 PFU/mL に調製した遺伝子組換えウイルス及び宿主ウイルス HVT FC126 株を室温で 2 時間乾燥後、継時的に CEF 細胞を用いてウイルス量を測定したところ、両ウイルスとも乾燥時間中にほとんど感染性を失い、その 8 時間後には検出限界以下となった [別紙 9]。

表 13. 飼育アイソレーターの排気口フィルター塵埃からの HVT ウイルス分離

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

* 日齢 +：陽性 —：陰性

[別紙 8-1：16、17 頁 14.11. Virus Isolation]

⑨ 交雑性等

HVT と MDV 間で遺伝子の水平伝播が鶏あるいは鶏以外の動物で起こったという報告はない。HVT は MDV と遺伝子配列の相同性が比較的低く、これまで両ウイルス間の組換えは認められていない [32]。HVT は 1970 年代から MD ワクチンとして世界中で広く用いられているが、長年にわたる各種血清型マレック病ワクチンの野外使用実績においてそのような事象は報告されていない。また、

既に IBDV VP2 遺伝子のベクターとしても実用化されているが、これらの間で組換えが起こったという報告はない。[別紙 1-1 : 25、26 頁 III. E.]

HVT と IBDV 及び NDV はともに鶏、七面鳥及びウズラに感染する。宿主ウイルス HVT FC126 株は 2 本鎖 DNA ウイルスであり核内で複製するのに対し、供与核酸を含む IBDV は 2 本鎖 RNA ウイルスで、NDV はネガティブ鎖 RNA ウイルスであり、ともに細胞質内で複製する。本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルスと同じく核内で複製することから、本遺伝子組換えウイルスと野外 IBDV 間での組換えが起こる可能性はほぼないと考えられる。[別紙 1-1 : 25、26 頁 III. E.]

本遺伝子組換えウイルスと MDV、HVT、IBDV あるいは NDV との間で組換えが起こる可能性は極めて低いと考えられる。

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 薬機法第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験（以下「治験」という。）に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年農林水産省令第 75 号）第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用
- ③ 薬機法第 14 条第 1 項に基づく承認申請書に従った使用（④に該当する行為は除く。）
- ④ 接種（鶏への接種）
- ⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残さの廃棄
- ⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む。）
- ⑦ ①～⑥に付随する行為

(2)使用等の方法

—

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

—

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

緊急措置計画書を参照

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

—

(6)国外における使用等に関する情報

本遺伝子組換えウイルスを有効成分とする鶏用生ワクチンは「Poultvac Procerta HVT-IBD-ND」の名称で米国において承認されている他、カナダ、エジプト及びボリビアにおいても承認されている。これまでに少なくとも 2 億 5000 万ドースが供給されたが、有害事象の報告はない。

(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報

① 接種動物の体内における遺伝子組換え微生物の消長に関する情報

HVT は一般的に血液、ファブリキウス嚢、脾臓、胸腺及び羽髄からウイルスが検出されることが知られており[11, 20]、多種の組織から調製したリンパ球から分離可能である。リンパ球は HVT の主要な感染細胞であり、他の組織へ分布する役割を担う。ウイルスは羽包上皮以外の全ての組織において細胞随伴性である[40]。本遺伝子組換えウイルス接種動物における体内分布及び消長について SPF 鶏を用いて確認した。約 10^4 PFU を 18 日齢 SPF 発育鶏卵に卵内接種し、11 日齢及び 22 日齢の血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓、胸腺及び羽髄サンプルを採取した。血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓及び胸腺について白血球を回収し、ウイルス分離を行った。羽髄サンプルについては qPCR によって HVT DNA の検出を試みた。その結果、本遺伝子組換えウイルス接種群の 11 日齢の各サンプルからウイルスが検出されたが、22 日齢では検出率が低下する傾向にあり、宿主ウイルス HVT FC126 株に関しても同様の傾向が認められた [別紙 7]。宿主ウイルス HVT FC126 株の血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓、胸腺及び羽髄サンプルにおける検出率の低下傾向は本遺伝子組換えウイルスと比較して緩やかであり、宿主ウイルス HVT FC126 株は本遺伝子組換えウイルスより羽髄における検出率がやや高く、ウイルス排泄では本遺伝子組換えウイルスの方が低い傾向を示した。本遺伝子組換えウイルスの接種鶏における体内分布及び消長は、宿主ウイルスと同程度であることが確認され [別紙 11]、HVT 一般の性状と同等と考えられた。

② 接種動物体内及び接種動物の排泄物、血液・体液、卵等からの遺伝子組換え微生物の環境への拡散の有無に関する情報

HVT は鶏における排泄及び水平伝播が限定的であり[14, 42]、感染性ウイルス粒子は羽包上皮細胞のみから排泄される[9]。18 日齢 SPF 発育鶏卵に本遺伝子組換えウイルス又は宿主ウイルス HVT FC126 株を卵内接種して孵化させ、孵化日を 0 日齢として各群に非接種の発育鶏卵由来の鶏を同居させて排泄及び伝播について試験した [別紙 8]。その結果、本遺伝子組換えウイルス接種群及び宿主ウイルス HVT FC126 株接種群の両群において、全試験日（8、15 及び 22 日齢時）で脾臓からウイルスが回収された。血液白血球及び咽頭スワブでは両群とも陽性例が認められたが、クロアカスワブでは 15 日齢に本遺伝子組換えウイルス接種群のみから回収された。同居鶏では、どの時点のどのサンプルからもウイルスは回収されなかった。本遺伝子組換えウイルスを発育鶏卵に接種後孵化した鶏から限定的なウイルスの排泄は認められたが、その程度は既知の範囲で、宿主ウイルス HVT FC126 株と同様であることが確認された [別紙 8]。

本遺伝子組換えウイルス及び宿主ウイルス HVT FC126 株接種鶏から環境中への排泄を調べるため、18 日齢発育鶏卵に各ウイルスを卵内接種して孵化させ、11 日齢及び 22 日齢時に各群のペンフィルターから採取した塵埃サンプル中のウイルスを分離することによって評価した。22 日齢時のフィルターは 4 分割し、採取日及び室温で 1、3 及び 7 日間保存後のサンプルについても試験し、環境中の生残性について評価した。その結果、本遺伝子組換えウイルス及び宿主ウイルス HVT FC126 株ともに 11 日齢時の塵埃サンプルからウイルスが分離されたが、22 日齢時には両群ともウイルスは分離されなかった [別紙 7]。そのため、HVT の既知の性状[13, 14]と同じく、宿主ウイルス HVT FC126 株は限定的ではあるが排泄されると考えられる。フケ中の感染性羽包細胞の落屑は、代表的な MDV 排泄メカニズムである。宿主ウイルス HVT FC126 株と本遺伝子組換えウイルスのこれらのデータは、環境中に宿主ウイルス HVT FC126 株の排泄が予想されることと一致している [別紙 7]。

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

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

MDV の垂直感染は起こらないとされている[40, 45]。また HVT についても垂直感染に関する報告はなく[39]、MDV と同様にその可能性は極めて低いと考えられる。本遺伝子組換えウイルスも宿主ウイルス HVT FC126 株と同様の性状を示すことから、垂直感染の可能性は極めて低いと考えられる。

④ 野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

本遺伝子組換えウイルスの宿主ウイルス HVT FC126 株は、七面鳥を自然宿主とする非病原性ウイルスで、七面鳥の他、鶏及びウズラに感染することが確認されている。一方、MDV はウズラ、七面鳥、キジ、数種のカモ、ガン等の野生水禽にも感染するが、スズメ、ヤマウズラ、ハト、クジャク等、多くの他の鳥類及び哺乳類には感染しないとされている[40]。本遺伝子組換えウイルスを七面鳥、ウズラ及びマウスに接種した非対象動物安全性試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、異常は認められなかった [別紙 2、3、4]。

MDV が感染する動物には HVT も感染する可能性がないとは言えないが、宿主ウイルスの感染性が確認されていない動物種において、感受性の高い鶏と同等以上に本遺伝子組換えウイルスが排泄されるとは考えられず、感染源になり得ないと考えられる。HVT は細胞随伴性ウイルスで、鳥類の白血球に指向性を示し、リンパ球に侵入・増殖後、他の臓器・組織に運ばれる。HVT は脾臓、ファブリキウス嚢、胸腺及び羽髄等で認められる[6, 11, 20]。感染鳥内において HVT は細胞随伴性であり細胞外へ放出されず、細胞の破壊等により細胞から遊離したウイルスは感染性がない[49]。感染性を有する細胞遊離型ウイルス粒子は羽包上皮で産生され[11, 40, 44]、これらの上皮細胞は落屑（フケ）として環境中に排泄されるが[21]、鶏間の水平伝播は限定的である[14, 42]。

⑤ その他必要な情報

—

II 項目ごとの生物多様性影響評価

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

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

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

NDV F 蛋白質コード遺伝子は、宿主 HVT FC126 株ゲノムの【社外秘につき非開示】の非翻訳領域に挿入されている。HVT ゲノムの中で特に保存性の高い領域である【社外秘につき非開示】に位置し、【社外秘につき非開示】に隣接しておらず、調節因子の存在は知られていない。

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

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

NDV F 蛋白質は膜通過型の糖蛋白質である。F 蛋白質はプロテアーゼによって開裂され、ウイルスエンベロープと細胞膜の融合に寄与するが、F 蛋白質単独では膜融合活性は発現されず、感染も成立しないことから、NDV F 蛋白質遺伝子は、HVT をベクターとする NDV ワクチンにおいて安全に使用されている。

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

本遺伝子組換えウイルスの培養細胞における増殖性に関する試験では、本遺伝子組換えウイルスは 50 時間後にピーク (4.69×10^6 PFU/mL) を示したのに対し、宿主ウイルス HVT FC126 株は 45 時間後にピーク (8.03×10^6 PFU/mL) を示し、本遺伝子組換えウイルスの増殖性は、宿主ウイルス HVT FC126 株と比較して同等以下であった。

また、本遺伝子組換えウイルスを培養細胞で 5 代継代培養して得たウイルスと継代前のウイルスの性状に差は認められず、本遺伝子組換えウイルスの供与核酸の安定性が確認されている。

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

ウイルスに IBDV VP2 遺伝子及び NDV F 遺伝子の挿入が確認され、遺伝子欠損のバンドは認められなかった。

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

HVT は鶏、七面鳥及びウズラに感染することが知られているが、本遺伝子組換えウイルスを鶏、七面鳥、ウズラ及びマウスに接種した試験では、いずれの供試動物とも臨床的に健康であり、異常は認められなかった。MDV はそれら以外にもキジや野生水禽に感染すると報告されている。MDV が感染する動物には HVT も感染する可能性がないとは言えないが、宿主ウイルスの感染性が確認されていない動物種において、本ウイルスに感受性の高い鶏と同等以上に、他の野生動物においてウイルスが感染、増殖、体外に排泄されるとは考えられず、感染源になり得ないと考えられる。

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

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

以上のことから、本遺伝子組換えウイルスによる他の微生物を減少させる性質（競合、有害物質の産生性等により他の微生物を減少させる性質）に起因して影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質（競合、有害物質の産生性等により他の微生物を減少させる性質）に起因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 IBDV VP2 蛋白質及び NDV F 蛋白質を発現すること以外は、宿主ウイルス HVT FC126 株の特性を受け継いでいる。

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

IBDV VP2 蛋白質は主要なウイルス構造蛋白質で、中和抗体応答誘導を担う。IBDV VP2 蛋白質自体には毒性や病原性がないことから大腸菌、バキュロウイルス又は植物等に発現させた VP2 蛋白質がワクチン抗原として用いられている。NDV F 蛋白質遺伝子は、HVT をベクターとする NDV ワクチンにおいて安全に使用されている。

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

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

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性（野生動植物に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質）に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

本遺伝子組換えウイルスは、宿主ウイルス HVT FC126 株の遺伝子発現に変化はなく、IBDV VP2 蛋白質及び NDV F 蛋白質を発現する以外は基本的な生物学的性状は宿主ウイルス HVT FC126 株と同一である。また、IBDV VP2 蛋白質及び NDV F 蛋白質自体に毒性や病原性はなく、既知のアレルゲンとの相同性がないことから、本遺伝子組換えウイルスに有害物質の産生性はないと考えられる。

前項に示した通り、鶏への高用量接種試験において、接種材料に起因した異常が認められなかったことにより、本遺伝子組換えウイルスは宿主ウイルス HVT FC126 株と同様に有害物質の産生性がないことが確認された。

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

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

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

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性（野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質）に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

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

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

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

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

以上より、本遺伝子組換えウイルスの核酸が他の野生動植物等に水平伝播する性質（法が対象とする技術により移入された核酸を野生動植物又は他の微生物に伝達する性質）はないものと考えられる。すなわち、核酸を水平伝達する性質によって影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質（法が対象とする技術により移入された核酸を野生動植物又は他の微生物に伝播する性質）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 その他の性質（生態系の基盤を変化させることを通じて間接的に野生動植物等に影響を与える性質等生物多様性影響評価を行うことが適切であると考えられるもの）

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

III 生物多様性影響の総合的評価

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

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

第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

病原性（野生動植物に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質）については、

本遺伝子組換えウイルスの野生動物に対する伝播力は宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度であり、宿主ウイルス HVT FC126 株と同様に病原性はないと考えられること、鶏への接種試験においてウイルスの排泄及び同居感染性は宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度で限定的であり、安全性が確認されていること、病原性復帰の評価に係る試験において鶏の体内でウイルスの病原性は復帰されることが確認されたことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

有害物質の産生性（野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質）については、

宿主ウイルス HVT FC126 株の【社外秘につき非開示】非翻訳領域に宿主ゲノムの欠損なしに、IBDV VP2 蛋白質コード遺伝子及び NDV F 蛋白質コード遺伝子が挿入されており、遺伝子の発現等を調節する機能を有する可能性は極めて低いと考えられること、かつ、IBDV VP2 蛋白質コード遺伝子及び NDV F 蛋白質コード遺伝子の挿入サイトは安定していて、新たな ORF による有害物質産生の可能性はなく、挿入遺伝子により発現するアミノ酸配列にアレルゲンと相同な配列がないこと、鶏への接種試験においてウイルスの排泄及び同居感染性は宿主ウイルス HVT FC126 株と同程度で限定的であることから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、アレルゲンを含め有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

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

MDV と HVT 間の遺伝子配列の相同性は比較的低いため、これまで両ウイルス間の組換えは認められていない。IBDV 及び NDV は 2 本鎖 RNA ウイルス及びネガティブ鎖 RNA ウイルスで、ともに細胞質

で複製するのに対し、宿主ウイルス HVT FC126 株は 2 本鎖 DNA ウイルスで核内で複製する。本遺伝子組換えウイルスも宿主ウイルス HVT FC126 株と同じく核内で複製することから、野外 IBDV 又は野外 NDV と本遺伝子組換えウイルスとの間で組換えが起こるとは考えにくい。

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

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

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

別紙リスト

- 別紙 1 1-1. Summary Information Format: Infectious Bursal Disease-Marek's Disease-Newcastle Disease Vaccine Serotype 3, Live Marek's Disease Vector (Product Code: 1A89.R0)
1-2. 伝染性ファブリキウス嚢病-マレック病-ニューカッスルワクチン病血清型 3、生マレック病ウイルスベクター（製品コード：1A89.R0）
- 別紙 2 2-1. Non-target animal safety for HVT-IBD-ND in Mice (Study No. 【社外秘につき非開示】)
2-2. マウスにおける HVT-IBD-ND の非対象動物安全性試験（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 3 3-1. Non-target animal safety for HVT-IBD-ND in Quail (Study No. 【社外秘につき非開示】)
3-2. ウズラにおける HVT-IBD-ND の非対象動物安全性試験（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 4 4-1. Non-target animal safety for HVT-IBD-ND in Turkeys (Study No. 【社外秘につき非開示】)
4-2. 七面鳥における HVT-IBD-ND の非対象動物安全性試験（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 5 5-1. Backpassage of HVT-IBD-ND and Assessment of Reversion to Virulence (Study No. 【社外秘につき非開示】)
5-2. HVT-IBD-ND の戻し継代による病原性復帰の評価（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 6 6-1. 10×Target animal safety – HVT-IBD-ND (Study No. 【社外秘につき非開示】)
6-2. HVT-IBD-ND の高用量（×10）対象動物安全性試験（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 7 7-1. Dissemination within the animal and environmental survival of HVT-IBD-ND (Study No. 【社外秘につき非開示】)
7-2. HVT-IBD-ND の体内分布及び環境中における生残性（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 8 8-1. Evaluation of the Shed and Spread of HVT-IBD-ND (Study No. 【社外秘につき非開示】)
8-2. HVT-IBD-ND の排泄及び拡散性の評価（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 9 9-1. Herpes Virus of Turkeys - Infectious Bursal Disease Viral -Newcastle Disease Viral (HVT-IBD-ND) Survivability at 25°C and 30°C (Study No. 【社外秘につき非開示】)
9-2. 七面鳥ヘルペスウイルスー伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（HVT-IBD-ND）の 25°C及び 30°Cにおける生存性（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 10 10-1. HVT-IBD-ND to HVT Backbone Growth Comparison (Study No. 【社外秘につき非開示】)
10-2. 遺伝子組換えウイルス HVT-IBD と宿主ウイルス HVT FC126 株の培養細胞における増殖性の比較（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 11 遺伝子組換えウイルス HVT-IBD-ND と宿主ウイルス HVT FC126 株との増殖能の比較

本申請書で使⽤した略号・用語表

略語	正式名称（英名）	和名・説明
ATCC	American Type Culture Collection	細胞、微生物等の収集、保管、配布機関
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
CEF	Chicken Embryo Fibroblast	鶏胚線維芽細胞
CPE	Cytopathic effect	細胞変性効果
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	固相酵素免疫吸着法
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
FFE	Feather follicle epithelium	羽包上皮
GFP	Green Fluorescent Protein	緑色蛍光蛋白質
HVT	Herpesvirus turkey	七面鳥ヘルペスウイルス
IBD	Infectious bursal disease	伝染性ファブリキウス嚢病
IBDV	Infectious bursal disease virus	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス
IR _L	Internal Repeats Long	内部反復配列ロング
IR _S	Internal Repeats Short	内部反復配列ショート
MD	Marek's disease	マレック病
MDV	Marek's disease virus	マレック病ウイルス
MDV1	Marek's disease virus serotype 1	マレック病ウイルス血清型1
MDV2	Marek's disease virus serotype 2	マレック病ウイルス血清型2
MDV3	Marek's disease virus serotype 3	マレック病ウイルス血清型3
ND	Newcastle disease	ニューカッスル病
NDV	Newcastle disease virus	ニューカッスル病ウイルス
ORF	Open Reading Frame	翻訳領域 オープンリーディングフレーム
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PFU	Plaque forming unit	プラーク形成単位
qPCR	quantitative PCR	定量的PCR
RNA	Ribonucleic Acid	リボ核酸
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
TCID ₅₀	Tissue culture infection dose 50	50%組織培養感染量
TR _L	Terminal Repeats Long	末端反復配列ロング
TR _S	Terminal Repeats Short	末端反復配列ショート
U _L	Unique Long	ユニークロング配列
U _S	Unique Short	ユニークショート配列
USDA	U.S. Department of Agriculture	米国農務省
UTR	Untranslated Region	非翻訳領域

参考文献

1. Adino GW and Bayu MD, 2022. Review of diagnostic and vaccination approaches of infectious bursal disease of poultry. *Vet. Med. Open J.* 7: 22-28.
2. Afonso CL, *et al.* 2001. The genome of turkey herpesvirus. *J. Virol.* 75: 971-978.
3. Anonymous, 2012, Bursal disease – Marek's disease vaccine, Serotype 3, Live Marek's disease vector – Environmental assessment for licensing in Canada. Canadian Food Inspection Agency, *In:* www.inspection.gc.ca/animals/veterinary-biological/
4. Atasoy MO, 2021. Herpesvirus of Turkeys as a vaccine vector in viral diseases: Pros and Cons. *Hosts and Viruses* 8: 13-20.
5. Azad AA, *et al.* 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161: 145-152.
6. Baigent SJ, *et al.* 2005. Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation. *J. Gen. Virol.* 86: 2989-2998.
7. Bedigian HG and Sevoian M, 1972. Susceptibility of mammalian (hamster) cell culture to infection with herpesvirus of turkeys. *Am. Soc. Microbiol.* 24: 275-280.
8. Biggs PM. 2001. The history and biology of Marek's disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 255 1-24.
9. Calnek BW, *et al.* 1970. Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.* 14: 219-233.
10. Calnek BW and Hitchner SB, 1973. Survival and disinfection of Marek's disease virus and the effectiveness of filters in preventing airborne dissemination. *Poult. Sci.* 52: 35-43.
11. Calnek BW, *et al.* 1979. Comparative pathogenesis studies with oncogenic and nononcogenic Marek's disease viruses and turkey herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 40: 541-548.
12. Calnek BW, 2001. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*
13. Cho BR, *et al.* 1971. Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 1. Preliminary observation. *Poult. Sci.* 50: 881-887.
14. Cho BR and Kenzy SG, 1975. Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 3. Transmission in three different lines of chickens. *Poult. Sci.* 54: 109-115.
15. Dey S, *et al.* 2019. Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Vet. Med.: Research and Reports*, 10: 85-97.
16. Domanska K, *et al.* 2004. Antigenic and genetic diversity of early European isolates of *Infectious bursal disease virus* prior to the emergence of the very virulent viruses: early European epidemiology of *Infectious bursal disease virus* revisited? *Arch. Virol.* 149: 465-480.
17. Etteradossi N and Saif YM, 2013. Chapter 7. Infectious bursal disease. *In:* Diseases of Poultry, 13th edition, Swayne DE. *et al.* eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp219-246.
18. Gravel KA and Morrison TG, 2003. Interacting domains of the HN and F proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 7: 11040-11049.
19. Hall RN *et al.* 2015. Identification of non-essential loci within the *Meleagrid herpesvirus 1* genome. *Virol. J.* 1-12.
20. Islam A, *et al.* 2006. Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J. Virol. Methods* 132: 127-134.

21. Islam A and Walkden-Brown SW, 2007. Quantitative profiling of the shedding rate of the three Marek's disease virus (MDV) serotypes reveals that challenge with virulent MDV markedly increases shedding of vaccinal viruses. *J. Gen. Virol.* 88: 2121-2128.
22. Jaikumar D, *et al.* 2001. Adaptation of Marek's disease virus to the Vero continuous cell line. *Vet. Microbiol.* 79: 75-82.
23. Jarosinski KW. 2012. Dual infection and superinfection inhibition of epithelial skin cells by two alphaherpesviruses co-occur in the natural host. *PLoS One*, 7, 1-15.
24. Karpf AR, *et al.* 1997. Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with Sindbis virus. *J. Virol.* 71, 7119-7123.
25. Kawamura H, *et al.* 1969. A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. *Avian Dis.* 13: 853-863.
26. Kim SJ, *et al.* 2003. Poly(A)-dependent Transcription Termination. *J. Biol. Chem.* 278: 41691-41701.
27. Kingham BF, *et al.* 2001. The genome of herpesvirus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses. *J. Gen. Virol.* 82: 1123-1135.
28. Lee S-I, *et al.* 2000. Difference in the *meq* gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 287-292.
29. Le Gros FX, *et al.* 2009. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* 27: 592-596.
30. Letzel T, *et al.* 2007. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 81: 12827-12835.
31. Mettenleiter TC, 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 106: 167-180.
32. McPherson MC, *et al.* 2016. Marek's disease herpesvirus vaccines integrate into chicken host chromosomes yet lack a virus-host phenotype associated with oncogenic transformation. *Vaccine* 34: 5554-5561.
33. McPherson MC and Delany ME, 2016. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. *Poult. Sci.* 95, 412-429.
34. Meurens F. *et al.* 2004. Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 78, 3872-3879.
35. Muylkens B, *et al.* 2009. Coinfection with two closely related alphaherpesviruses results in a highly diversified recombination mosaic displaying negative genetic interference. *J. Virol.* 83, 3127-3137.
36. Nagai Y *et al.* 1980. The Pathogenicity of Newcastle Disease Virus Isolated from Migrating and Domestic Ducks and the Susceptibility of the Viral Glycoproteins to Proteolytic Cleavage. *Microbiol. Immunol.* 24: 173-177.
37. Okoye JOA and Okpe GC, 1989. The pathogenicity of an isolate of infectious bursal disease virus in guinea fowls. *Acta Vet Brno*, 58: 91-96.
38. Osterrieder K and Vautherot J-F, 2004. The genome content of Marek's disease-like viruses. In F. Davidson & V. Nair (Eds.) Marek's Disease. An Evolving Problem, Elsevier Academic Press, pp 17-31.
39. Prem Paul CT, Kumar MC and Pomeroy BS, 1972. Preliminary observations on egg transmission of turkey herpesvirus (HVT) in turkeys. *Avian Dis.* 16, 27-33.
40. Schat KA and Nair V, 2013. Chapter 15. Marek's Disease. In: Diseases of Poultry, 13th edition, Swayne DE *et al.* eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp515-645.
41. Sharma JM, *et al.* 1972. Lack of pathogenicity of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys in marmoset

monkeys. *J. Natl. Cancer Inst.* 49: 1191-1197.

42. Tink KJ, *et.al.* 2005. Effects of *in ovo* vaccination with herpes virus of turkeys against Marek's disease on chicken performance in the absence of a challenge with Marek's disease virus. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 15: 77-86.
43. Witter RL and Solomon JJ, 1971. Epidemiology of a herpesvirus of turkeys: possible sources and spread of infection in turkey flocks. *Infect. Immun.* 4: 356-361.
44. Witter RL and Solomon JJ, 1972. Experimental infection of turkeys and chickens with a herpesvirus of turkeys (HVT). *Avian Dis.* 16: 34-44.
45. Witter RL, 1998. Control strategies for Marek's disease: A perspective for the future. *Poult Sci.* 77: 1197-1203.
46. Zygraich N and Huygelen C, 1972. Inoculation of one-day-old chicks with different strains of turkey herpesvirus. II. Virus replication in tissues of inoculated animals. *Avian Dis.* 16: 793-798.
47. Yamane N, *et.al.* 1978. Isolation of orthomyxoviruses from migrating and domestic ducks in northern Japan in 1976-1977. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 31: 407-415.
48. 山本 佑, 2016. — 最新の家畜疾病情報 (XIV) — マレック病. *日獣会誌*, 69, 114-117.
49. 湯浅 襄, 2012. マレック病の病理発生と防疫対策上の問題点. *鶏病研報*, 47, 211-222.

別紙 1-2. Summary Information Format

**Infectious Bursal Disease-Marek's Disease-Newcastle Disease Vaccine Serotype 3, Live
Marek's Disease Vector
(Product Code: 1A89.R0)**

**伝染性ファブリキウス嚢病 - マレック病 - ニューカッスル病ワクチン血清型 3、生マレック病ウイルス
スペクター
(製品コード : 1A89.R0)**

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

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

1. 遺伝子組換え微生物「伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子及びニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質発現遺伝子挿入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2」の作出過程

1-1. IBDV VP2 遺伝子発現カセットトランスファープラスミド「pSiteA-#30」及び NDV F 遺伝子発現カセットトランスファープラスミド「pSiteB-#42」の作製方法と本遺伝子組換えウイルス HVT-IB-ND #42-#30 LP C2 の作出方法

(1) IBDV VP2 遺伝子トランスファープラスミド pSiteA-#30 の作製（図 1-1）
【社外秘につき非開示】

(2) NDV F 遺伝子トランスファープラスミド pSiteB-#42 の作製（図 1-7）
【社外秘につき非開示】

(3) 【社外秘につき非開示】

(4) 【社外秘につき非開示】

(5) 本遺伝子組換えウイルス HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2 の作製
【社外秘につき非開示】

1-2. 供与核酸遺伝子の情報

(1) 供与核酸 IBDV VP2 遺伝子の情報

学名	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（Infectious Bursal Disease Virus） ビルナウイルス科（Birnaviridae） アビビルナウイルス属（Avibirnavirus）
株名	【社外秘につき非開示】
供与核酸	VP2蛋白質コード遺伝子（1,362 bp、453 aa）

供与核酸の由来である IBDV は、2 分節から成る全長 6.1 kb の 2 本鎖 RNA ウィルスで、VP1～VP5 のウィルス蛋白質をコードする（図 1-15）。HVT に挿入した供与核酸は VP2 蛋白質をコードする（図 1-16）。VP2 は主要なウィルス構造蛋白質であり、ウィルス蛋白質の約 50% を占める。VP2 は表面に露出し、中和抗体応答を誘導する唯一のウィルス蛋白質である[1]。VP2 は親水性の変域を有し、最も露出する部分に位置する。IBDV VP2 遺伝子発現カセットは、宿主遺伝子の発現には影響を与えず、他の蛋白質発現の影響は受けずに単独発現となるように組み込まれている。VP2 の露出領域はアミノ酸 206～350 の間にあり、宿主の中和抗体応答の誘導に関与する[2]。VP2 遺伝子発現カセットは、本遺伝子組換えウィルス作出に当たって、HVT ゲノムの【社外秘につき非開示】に挿入するために使用された。VP2 遺伝子は主要構造蛋白質をコードし、主要な防御抗原であることが示されている。また、米国既承認の HVT ベクター IBD ワクチンに用いられ、安全に使用されている[3]。

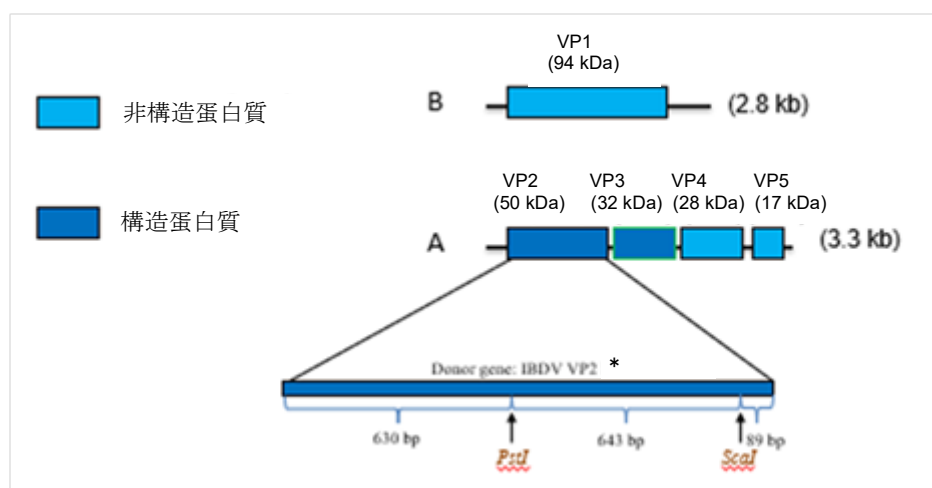


図 1-15. 供与核酸 IBDV 【社外秘につき非開示】由来 VP2 遺伝子

供与核酸はトランスファープラスミド pSite A#30 の一部として合成された。IBDV VP2 蛋白質は 453 アミノ酸（1,362 bp）から成る。

*：社外秘につき一部非開示

【社外秘につき非開示】

図 1-16. 供与核酸 IBDV 【社外秘につき非開示】VP2 遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列

(2) 供与核酸 NDV F 遺伝子の情報

学名	ニューカッスル病ウイルス、トリパラインフルエンザウイルス1型 (Newcastle Disease Virus, avian parainfluenza virus type 1) モノネガウイルス目（Mononegavirales） パラミクソウイルス科（Paramyxoviridae） ルブラウイルス属（Rubulavirus）
株名	【社外秘につき非開示】
供与核酸	F蛋白質コード遺伝子（1,662 bp、553 aa）

供与核酸の由来である NDV は、分節のない全長約 15 kb のマイナス 1 本鎖 RNA ウィルスで、6 つのウイ

ルス蛋白質 (NP 蛋白質[主要ヌクレオカプシド蛋白質]、P 蛋白質[リン酸化ヌクレオカプシド関連蛋白質]、M 蛋白質[非グリコシル化基質蛋白質]、F 蛋白質[融合糖蛋白質]、HN 蛋白質[ヘマグルチニンノイラミダーゼ糖蛋白質]及び L 蛋白質[ラージヌクレオカプシド関連蛋白質]) をコードする (図 1-17)。HVT に挿入した供与核酸は F 蛋白質をコードする (図 1-18)。F 蛋白質は膜通過型の糖蛋白質であり、膜融合蛋白質としてウイルスの細胞内侵入とシンシチウムの形成に介在する F 遺伝子発現カセットは、本遺伝子組換えウイルス作出に当たって、HVT ゲノムの【社外秘につき非開示】に挿入するために使用された。NDV F 遺伝子発現カセットは、宿主遺伝子の発現には影響を与えず、他の蛋白質発現の影響は受けずに単独発現となるように組み込まれている。また、F 蛋白質は主要な防御に関わる抗原で、米国既承認の HVT をベクターとした NDV ワクチンに用いられ、安全に使用されている。

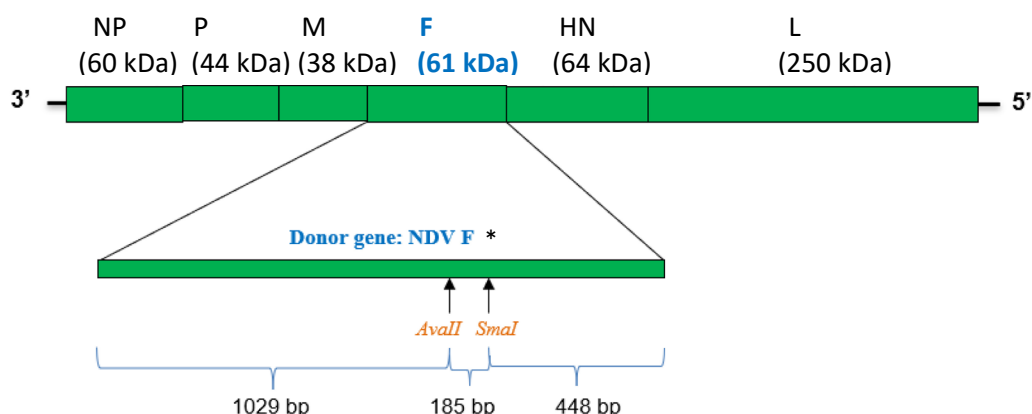


図 1-17. 供与核酸 NDV 【社外秘につき非開示】由来 F 遺伝子

供与核酸はトランスファープラスミド pSiteA #42 の一部として合成された。NDV F 蛋白質は 553 アミノ酸 (1,662 bp) から成る。

* : 社外秘につき一部非開示

【社外秘につき非開示】

図 1-18. 供与核酸 NDV 【社外秘につき非開示】由来 F 遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列 (【社外秘につき非開示】)

2. 遺伝子組換えウイルスにおける挿入遺伝子の確認

2-1. 抗体染色及び PCR による挿入遺伝子の確認

(1) 【社外秘につき非開示】

【社外秘につき非開示】

(2) 遺伝子組換え HVT-IBD-ND ウイルスにおける蛍光抗体法による IBDV VP2 蛋白質発現及び PCR による IBDV VP2 遺伝子挿入の確認

遺伝子組換え HVT-IBD-ND ウイルス感染細胞を抗 IBDV 抗体又は抗 HVT 抗体を反応させたところ、いずれも蛍光が認められた（図 2-3）。また、挿入遺伝子の外側に対応するプライマー（2 組はプラスミドに含まれた HVT 配列、他の 2 組はその外側の HVT 配列に対応するプライマー）で PCR を行ったところ予想された長さの産物が検出された（図 2-4）。

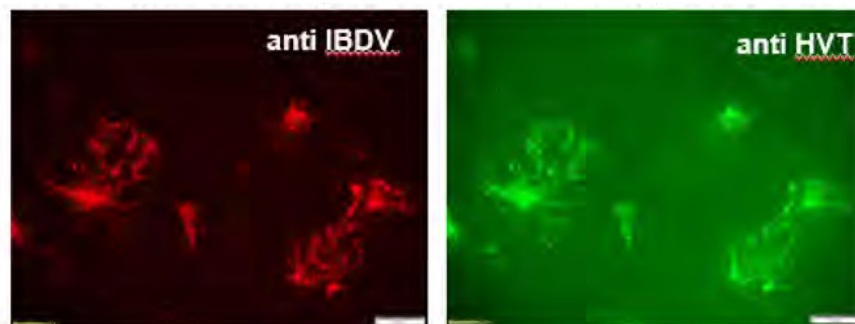
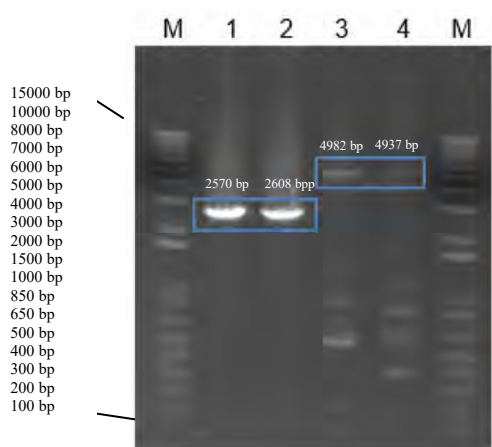


図 2-3. 抗 IBDV 及び抗 HVT 抗体染色による挿入遺伝子発現の確認



レーン	プライマーセット	推定サイズ
M	サイズマーカー	
1	A1 (SiteA-F1+SiteA-R1)	2,570 bp
2	A2 (SiteA-F2+SiteA-R2)	2,608 bp
3	A3 (SiteA FL-F1+SiteA FL-R1)	4,982 bp
4	A4 (SiteA FL-F2+SiteA FL-R1)	4,937 bp

【各プライマーの配列については社外秘につき非開示】

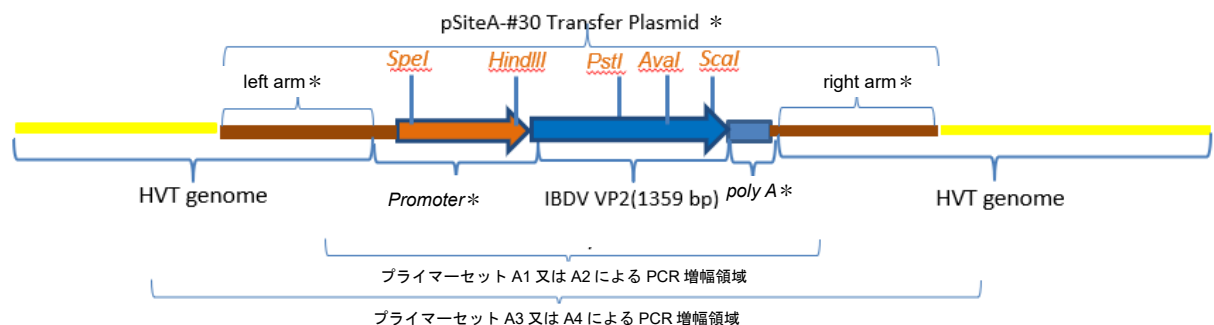


図 2-4. PCR による挿入遺伝子の確認

* : 社外秘につき一部非開示

2-2. PCR 及び PCR 産物の制限酵素切断による挿入遺伝子の確認

(1) PCR 及び PCR 産物の制限酵素切断によるサイト A 挿入遺伝子（IBDV VP2 遺伝子）の確認
IBDV VP2 遺伝子発現カセットの外側に位置するプライマーセット（全 VP2 遺伝子発現カセット領域をカバーする）を用いて PCR を実施し、その産物に制限酵素切断解析を行った。2,570 bp の PCR 産物を 9 種の制限酵素で切断したところ、それぞれ推定される DNA 断片が認められた（図 2-5、2-6）。

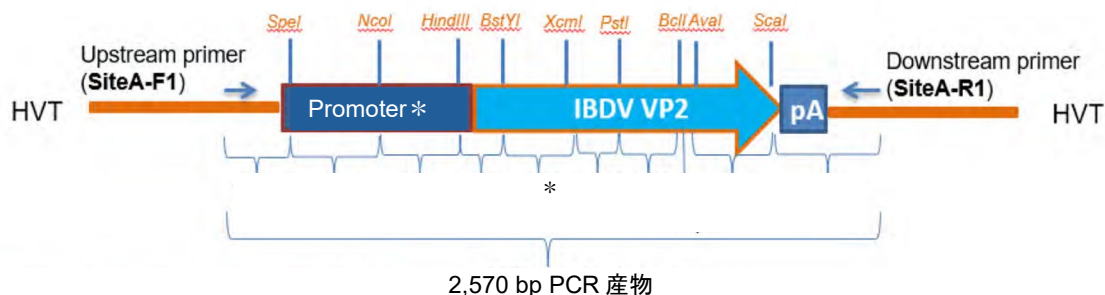
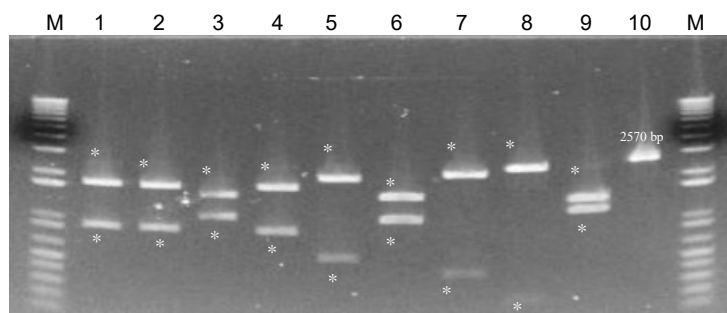


図 2-5. IBDV VP2 遺伝子挿入部分の制限酵素地図

*：社外秘につき一部非開示



レーン	制限酵素	断片サイズ (bp)	
M	サイズマーカー		
1	<i>Ava</i> I	【社外 秘につ き非開 示】	【社外 秘につ き非開 示】
2	<i>Bcl</i> II		
3	<i>Bst</i> YI		
4	<i>Hind</i> III		
5	<i>Sca</i> I		
6	<i>Pst</i> I		
7	<i>Nco</i> I		
8	<i>Spe</i> I		
9	<i>Xcm</i> I		
10	未切断産物 (2,570 bp)		

PCR プライマーセット

- 【社外秘につき非開示】
- 【社外秘につき非開示】

図 2-6. PCR 産物及びその制限酵素切断産物

*：社外秘につき一部非開示

(2) PCR 及び PCR 産物の制限酵素切断によるサイト B 挿入遺伝子（NDV F 遺伝子）の確認
NDV F 遺伝子発現カセットの外側に位置するプライマーセット（全 F 遺伝子発現カセット領域をカバーする）を用いて PCR を実施し、その産物に制限酵素切断解析を行った。3,625 bp の PCR 産物を 5 種の制限酵素で切断したところ、それぞれ推定される DNA 断片が認められた（図 2-7、2-8）。

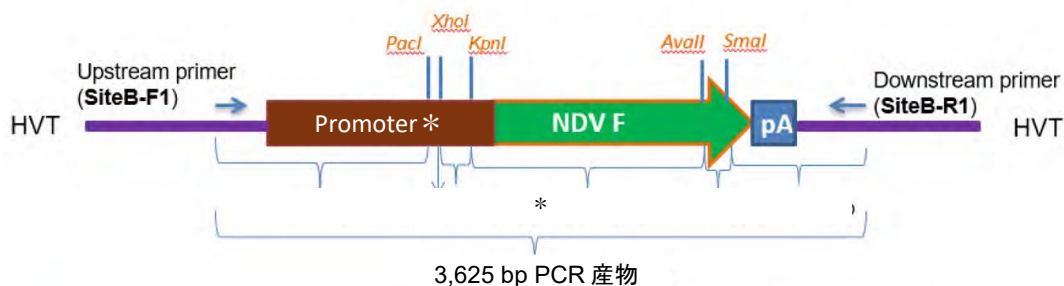
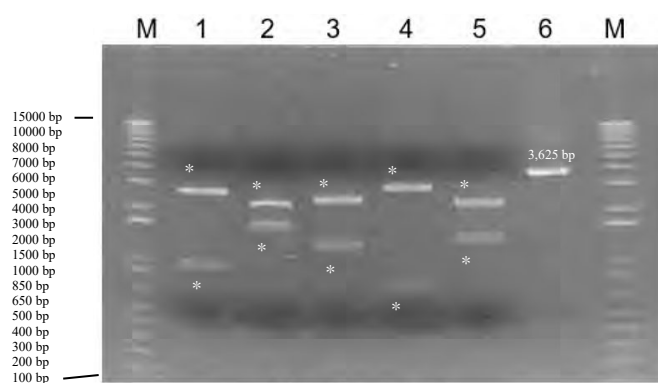


図 2-7. NDV F 遺伝子挿入部分の制限酵素地図

*：社外秘につき一部非開示



レーン	制限酵素	断片サイズ (bp)	
M	サイズマーカー		
1	<i>Ava</i> II	【社外 秘につ き非開 示】	【社外 秘につ き非開 示】
2	<i>Kpn</i> I		
3	<i>Pac</i> I		
4	<i>Sma</i> I		
5	<i>Xho</i> I		
6	未切断産物 (3,625 bp)		

図 2-8. PCR 産物及びその制限酵素切断産物
* : 社外秘につき一部非開示

3. 遺伝子組換えウイルスにおける供与核酸の安定性

3-1. 遺伝的安定性

本遺伝子組換えウイルスの遺伝的安定性を、マスターシードウイルス（MSV；継代数 = n）及びその細胞継代（n+1～5）について、表 3-1 の 4 種の PCR プライマーセットを用いて評価した。これらの位置を図 3-1 に示す。全ての継代についてそれぞれ予想されるバンドのみが確認された。遺伝子挿入前の宿主 HVT ウイルスについても予想されるバンドが確認された（図 3-2）。また、プライマーセット A1（SiteA-F1 + SiteA-R1）及び B2（SiteB-F2 + SiteB-R2）を用いた MSV と MSV+5 の PCR 産物（【社外秘につき非開示】）について比較したところ、それぞれ一致していることが確認された。さらに、これらの PCR 産物の遺伝子配列を比較したところ MSV と MSV+5 とで 100%一致した。

表 3-1. 遺伝的安定性の評価に用いた PCR プライマー

プライマーセット	プライマー名	配列
A1	SiteA-F1	【社外秘につき非開示】
	SiteA-R1	
A4	SiteA-FL-F2	
	SiteA-FL-R1	
B2	SiteB-F2	
	SiteB-R2	
B4	SiteB-FL-F2	
	SiteB-FL-R2	

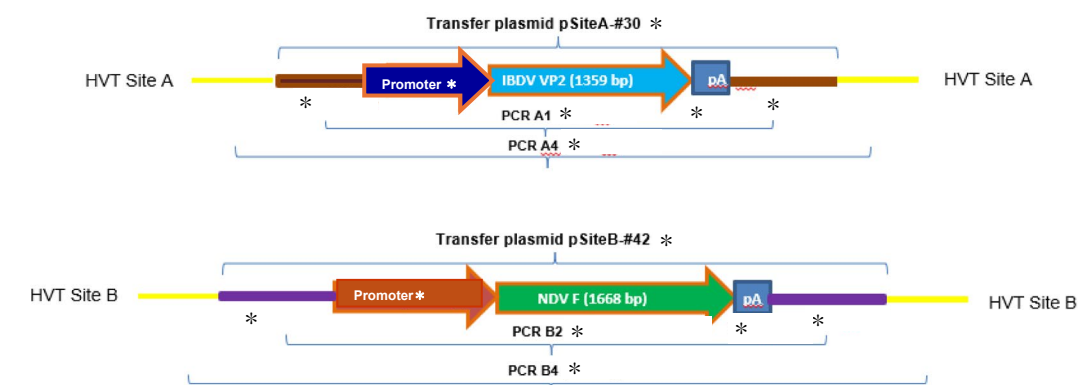
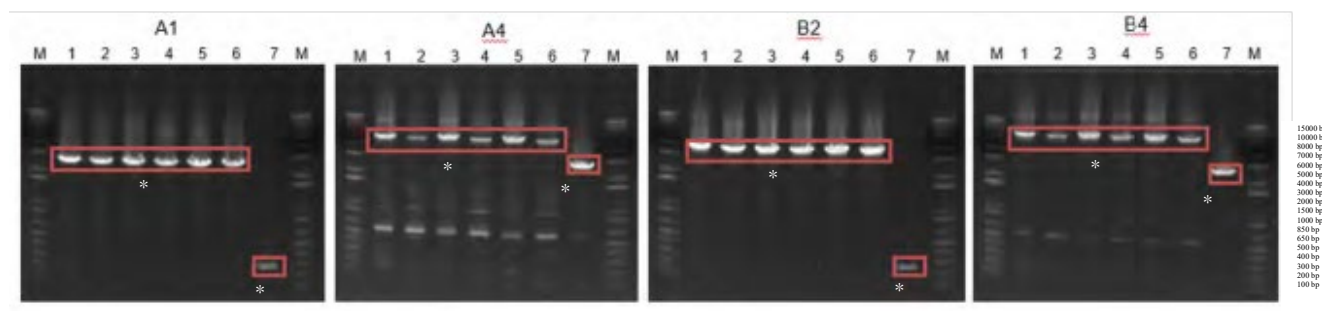


図 3-1. PCR プライマーの位置及びその推定産物
*：社外秘につき一部非開示



図番号	プライマーセット	推定 PCR 産物 (bp)		レーン	サンプル
		HVT-IBD-ND	HVT		
A1	SiteA-F1 + SiteA-R1	【社外秘につき非開示】	【社外秘につき非開示】	1	MSV
A4	SiteA-FL-F2 + SiteA-FL-R1			2	MSV+1
B2	SiteB-F2 + SiteB-R2			3	MSV+2
B4	SiteB FL-F2 + SiteB FL-R2			4	MSV+3
				5	MSV+4
				6	MSV+5
				7	HVT

図 3-2. 遺伝子組換えウイルスにおける供与核酸の PCR による遺伝的安定性
*：社外秘につき一部非開示

3.2. 表現型の安定性

(1) IBDV 抗原及び NDV 抗原の発現安定性の重蛍光抗体染色による確認

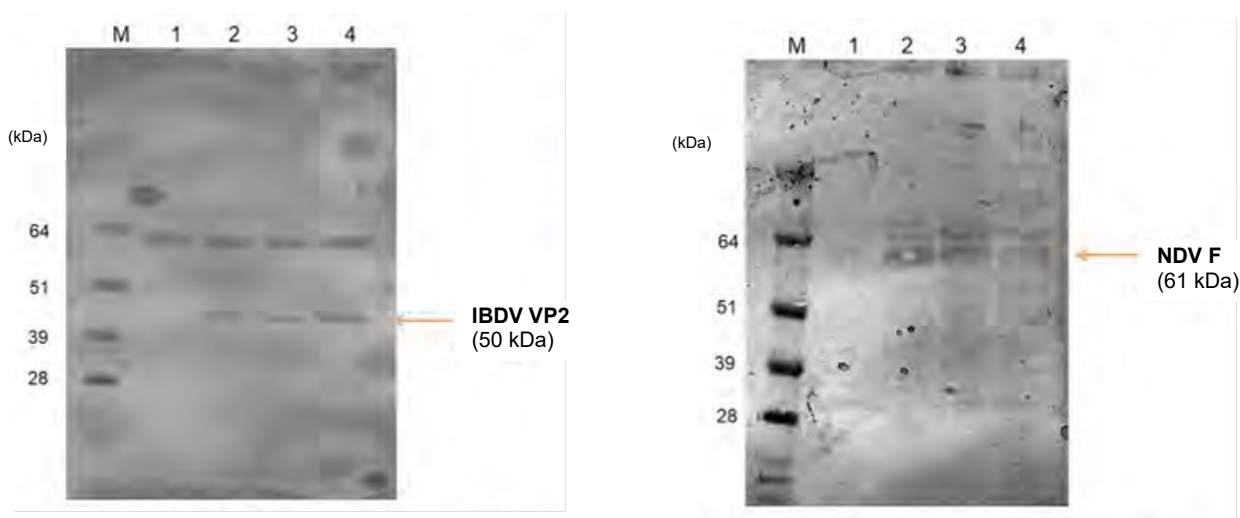
本遺伝子組換えウイルスのマスターシードウイルス及び 1～5 代継代ウイルスについて抗 HVT モノクローナル抗体、抗 IBDV 及び抗 NDV 鶏ポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で確認したところ、検査したすべてのサンプルで、全てのプラークが HVT 陽性かつ目的抗原陽性であることが確認された（表 3-2）。

表 3-2. 遺伝子組換えウイルスにおける目的抗原の発現安定性

継代数	陽性率（陽性プラーク数／検査プラーク数）	
	HVT 及び IBDV 陽性	HVT 及び NDV 陽性
MSV (n)	100% (814/814)	100% (824/824)
n+1	100% (487/487)	100% (521/521)
n+2	100% (757/757)	100% (825/825)
n+3	100% (135/135)	100% (144/144)
n+4	100% (669/669)	100% (707/707)
n+5	100% (774/774)	100% (781/781)

(2) IBDV 抗原及び NDV 抗原の発現安定性のウエスタンブロッティング法による確認

本遺伝子組換えウイルスのマスターシードウイルス感染細胞破砕液及び 5 代継代ウイルス感染細胞破砕液について抗 IBDV 及び抗 NDV 鶏ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング法で確認したところ、比較対照に用いた市販ワクチン株感染細胞破砕液と同様に（IBD ワクチンは「Vaxxitek」、ND ワクチンは「Vectormune ND」）IBDV VP2 蛋白質に関しては 50 kDa、NDV F 蛋白質については 61 kDa にバンドが確認された（図 3-3）。



レーン	サンプル
M	分子量マーカー
1	HVT 感染細胞破砕液
2	HVT-IBD-ND MSV 感染細胞破砕液
3	HVT-IBD-ND MSV の 5 継代株 感染細胞破砕液
4	市販 IBD ワクチン株感染細胞破砕液

レーン	サンプル
M	分子量マーカー
1	HVT 感染細胞破砕液
2	HVT-IBD-ND MSV 感染細胞破砕液
3	HVT-IBD-ND MSV の 5 継代株 感染細胞破砕液
4	市販 ND ワクチン株感染細胞破砕液

図 3-3. 遺伝子組換えウイルスにおける目的抗原の発現安定性

参考文献

1. Azad, A. A. *et al.*, 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 161: 145-152.
2. Letzel, T. *et al.*, 2007. Molecular and structural basis for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, 81: 12827-12835.
3. Le Gros, F. X. *et al.*, 2009. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine*, 27: 592-596.

別紙 2-2. Non-target animal safety for HVT-IBD-ND in Mice

マウスにおける HVT-IBD-ND の非対象動物安全性（試験番号：【社外秘につき非開示】）

目的：

HVT-IBD-ND マスターシードウイルス（MSV）の安全性を、非対象動物であるマウスにおいて確認する。
[3 頁 1. OBJECTIVES]

材料及び方法：

7 週齢のマウス 24 匹を供試し、10 倍用量の HVT-IBD-ND MSV を 8 匹のマウスに 0.2 mL ずつ皮下接種した（T02）。同様に溶解用液を接種した 12 匹を対照群（T01）とした。1 ボックス当たり 3 匹を飼育し、T02 の 2 匹に対し非接種群（T03）の 1 匹を同居させた。D21 まで観察し、D21 に剖検し病理学的検査を実施した。[7、8 頁 6. STUDY DESIGN、8 頁 7. PROCEDURES]

群設定

群	接種材料	用量 (PFU/0.2mL)	投与経路	ボックス 数	マウス匹数 /ボックス	供試頭数
T01	溶解用液	-	皮下	4	3	12
T02	HVT-IBD-ND (K040519MSV)	57,200	皮下	4	2	8
T03	非接種同居	-	-		1	4

[5 頁 4. INVESTIGATIONAL VETERINARY AND CONTROL PRODUCTS、7 頁 6.1. Study Design Summary]

試験スケジュール

試験日	実施項目
D-4	6.4 週齢マウスを導入
D0	個体識別、皮下投与及び配置
D0-21	臨床症状の観察
D21	剖検及び病変の観察

[8 頁 7.1. Schedule of Events]

結果：[10、11 頁 14. RESULTS]

死亡

観察期間中、死亡は認められなかった。

剖検

D21 の剖検において何れの群においても肉眼病変は認められなかった。

臨床症状

21 日間の観察期間中、何れの群においても異常は認められなかった。

考察・結論結果：[11 頁 15. DISCUSSION/ CONCLUSION]

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

別紙 3-2. Non-target animal safety for HVT-IBD-ND in Quail

ウズラにおける HVT-IBD-ND の非対象動物安全性試験（試験番号：【社外秘につき非開示】）

目的

HVT-IBD-ND マスターシードウイルス（MSV）の安全性を、非対象動物であるウズラにおいて確認する。
[3 頁 STUDY SUMMARY、4 頁 1. OBJECTIVES]

材料及び方法

17 日齢のウズラ 50 羽を供試し、10 倍用量の HVT-IBD-ND MSV を 20 羽のウズラに 0.2 mL ずつ皮下接種した（T02）。同様に溶解用液を 0.2 mL ずつ接種した 25 羽を対照群（T01）とした。T02 には非接種の 5 羽（T03）を同居させた。D35 まで観察した後、剖検し、病理学的検査を実施した。[5 頁 4. INVESTIGATIONAL VETERINARY AND CONTROL PRODUCTS、7、8 頁 6. STUDY DESIGN、8、9 頁 7. PROCEDURES]

群設定

群	接種材料	用量 (PFU/0.2mL)	投与経路	ペン数	羽数/ペン	供試羽数
T01	溶解用液	-	皮下	1	25	25
T02	HVT-IBD-ND (K040519MSV)	57,200	皮下	1	20	20
T03	非接種同居	-	-		5	5

試験スケジュール

試験日	実施項目
D-3	2 週齢ウズラを導入、個体識別
D0	皮下投与及び配置
D0 - D35	臨床症状の観察
D35	剖検及び病変の観察

結果 [11-13 頁 14. RESULTS]

死亡

T01（非接種対照）群及び T02（試験）群では観察期間中、死亡は認められなかった。T03（同居）群の 1 羽（番号 109）に脚の過伸展が観察され、餌及び水に適切に到達できないと判断されたため、Day 4 に脱落させた。剖検時にマレック病又は伝染性ファブリキウス嚢病に関連した病変は観察されなかった。

剖検

マレック病に関しては、胸筋、皮膚、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、腺胃、脾臓、生殖腺、ファブリキウス嚢、腸の病変、虹彩における色素の欠乏（gray eye）、並びに神経（迷走神経、腕神経叢及び坐骨神経叢）の炎症について観察した。

伝染性ファブリキウス嚢病については、ファブリキウス嚢の病変を観察した。

D35 の剖検においてどの群においても病変は認められなかった。T03 群の 1 羽（番号 109）は、脚の過伸展が観察され、餌及び水に適切に到達できないと判断されたため、Day 4 に脱落させ、剖検しところ、マレック病又は伝染性ファブリキウス嚢病に関連した病変は観察されなかった。

臨床症状

T01 群及び T02 群では観察期間中、臨床症状は観察されなかった。T03 群の 1 羽（番号 109）は虚弱のた

め臨床症状有と判断した。病理組織学的には異常がないことが確認された。

考察・結論 [13 頁 15. DISCUSSION/ CONCLUSION]

- ・ T03 群の 1 羽（番号 109）は、脚の過伸展が観察され、餌及び水に適切に到達できないと判断されたため、Day 4 に脱落させ、剖検しところ、マレック病又は伝染性ファブリキウス嚢病に関連した病変は観察されなかった。また、病理組織学的には異常がないことが確認された。
- ・ いずれの群においても HVT-IBD-ND MSV に起因した臨床症状及び肉眼病変は観察されなかった。
- ・ 接種群及び同居群において病理学的変化は観察されなかったことから、HVT-IBD-ND MSV はウズラ及び同居ウズラにおいて安全であると考えられた。

別紙 4-2. Non-target animal safety for HVT-IBD-ND in turkeys

七面鳥における HVT-IBD-ND の非対象動物安全性試験（試験番号：【社外秘につき非開示】）

目的

HVT-IBD-ND マスターシードウイルス（MSV）の安全性を、非対象動物である七面鳥において確認する。
[3 頁 STUDY SUMMARY、4 頁 1. OBJECTIVES]

材料及び方法

4.5 週齢の七面鳥 60 羽を供試し、10 倍用量の HVT-IBD-ND MSV を 20 羽の七面鳥に 0.2 mL ずつ皮下接種した（T02）。同様に溶解用液を 0.2 mL ずつ接種した 30 羽を対照群（T01）とした。T02 には非接種の 10 羽（T03）を同居させた。D35 まで観察した後、剖検し、病理学的検査を実施した。[5 頁 4. INVESTIGATIONAL VETERINARY AND CONTROL PRODUCTS、6、7 頁 6. STUDY DESIGN、7、8 頁 7. PROCEDURES]

群設定

群	接種材料	用量 (PFU/0.2mL)	投与経路	ペン数	羽数/ ペン	供試羽数
T01	溶解用液	-	皮下	1	30	30
T02	HVT-IBD-ND (K040519MSV)	73,667	皮下	1	20	20
T03	非接種同居	-	-		10	10

試験スケジュール

試験日	実施項目
D -34	1 日齢七面鳥を導入
D -1	4.5 週齢の七面鳥に個体識別
D0	皮下投与及び配置
D0 - D35	臨床症状の観察
D35	剖検及び病変の観察

結果 [10-12 頁 14. RESULTS]

死亡

観察期間中、死亡は観察されなかった。共食いのため、T02 群の 1 羽（番号 649）を脱落させ、死亡率の対象から除外した。剖検の結果、共食いによる皮膚の損傷が認められたが、マレック病またはファブリキウス嚢病に由来すると思われる病変なかった。

臨床症状

35 日間の観察期間中、脱落させた 1 羽を除き、異常は認められなかった。

有害事象・脱落

観察期間中、共食いのため、T02 群の 1 羽（番号 649）を D24 に脱落させた。それ以外の有害事象及び脱落は認められなかった。

剖検

マレック病病変に関しては、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、腺胃、脾臓、生殖腺、ファブリキウス嚢及び腸を含む内臓、並びに胸筋及び皮膚の表面又は内部の腫瘍、虹彩における色素の欠乏（gray eye）、神経（迷

走神経、腕神経叢及び坐骨神経叢)の炎症、並びに胸腺の萎縮について観察した。

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

試験期間中に除外した1羽(T02群、番号649)及びD35の剖検において、何れの群においてもマレック病又はファブリキウス嚢病に関連する病変は認められなかった。

考察・結論 [12頁 15. DISCUSSION/ CONCLUSION]

観察期間中、T02群の1羽(番号649)をD24に共食いのため脱落させたが、その他の死亡及び臨床症状は観察されなかった。また、マレック病及びファブリキウス嚢病に関連した病変、臨床症状又は死亡は観察されなかったことから、HVT-IBD MSVは七面鳥及び同居七面鳥において安全であると考えられた。

別紙 5-2. Backpassage of HVT-IBD-ND and Assessment of Reversion to Virulence

HVT-IBD-ND の戻し継代による病原性復帰の評価（試験番号：【社外秘につき非開示】）

目的

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

材料及び方法

マスターシードウイルス（MSV）を 18 日齢発育鶏卵（E18）20 個に接種（13,600 PFU/卵）し、孵化後 7 日に 15 羽から血液及び脾臓からウイルスを回収し、次代継代用材料とした。18 日齢発育鶏卵（E18）20 個に次代継代用材料を接種し、同様に孵化後 7～8 日の雛からウイルスを回収し、さらに 4 代継代を行った。継代 5 代目（P05）について、ウイルスを回収後、10 羽について Day 21 まで臨床症状を観察し、剖検して病原性復帰について評価した。剖検ではマレック病（MD）、ファブリキウス嚢病（IBD）及びニューカッスル病（ND）について関連肉眼病変を評価した。各サンプルに関して、PCR による挿入遺伝子 IBD ウイルス（IBDV）VP2 及び ND ウイルス（NDV）F の確認並びに両抗原の発現を確認した。[3 頁 STUDY SUMMARY]

接種材料

継代数（群）	P01	P02	P03	P04	P05
接種材料	HVT-IBD-ND MSV	継代 1 代目の脾臓及び血液	継代 2 代目の脾臓及び血液	継代 3 代目の脾臓及び血液	継代 4 代目の脾臓及び血液
ロット番号	K040519MSV	P02 inoculum	P03 inoculum	P04 inoculum	P05 inoculum
接種時齢	18 日齢発育鶏卵（E18）				
接種経路	卵内				
接種量	0.1 mL/卵	0.1 mL/卵	0.1 mL/卵	0.1 mL/卵	0.1 mL/卵
保存条件	≤ -100℃（液体窒素気相）	継代材料（脾臓及び血液白血球）は次代継代用に E18 の胚へ接種する前に保存しなかった。残りの材料は ≤ -100℃（液体窒素気相）で保存した。			

[5,6 頁 4. INVESTIGATIONAL VETERINARY AND CONTROL PRODUCTS]

群設定

継代数（群 ¹⁾ ）	接種材料	接種卵数	供試羽数	サンプル採取羽数（Day 7/8）	個体番号（ペン番号）
P01	HVT-IBD-ND MSV	20	20	15	101-115（1B）
P02	P02 inoculum	20	20	15	116-130（1A）
P03	P03 inoculum	20	20	15	131-145（2B）
P04	P04 inoculum	20	20	15	146-160（2A）
P05	P5 inoculum	30	24 ²⁾	14 ³⁾	161-184（3A）

1) 孵卵器における温度及び湿度の安定化を目的として、空きスペースを補充するため、各継代時（P01～P04 については 40 個ずつ、P05 については 50 個）において非接種対照卵をあわせて孵卵器に入れ、非接種対照卵の孵化率の評価に用いた。

2) 孵化した健康な雛に番号を付けた。孵化時に 10 羽を Day 21 までの観察用とした。

3) 観察用としなかった雛は Day 7/8 のサンプル採取用とした。

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

試験スケジュール

試験日	群	実施項目
D-3	P01-P05	E18 に卵内接種（P01-04：20 個、P05：30 個）
D0		孵化、個体識別（P01-04：15 羽、P05：24 羽）、ペンに収容
D0 - D7/D8		臨床症状の観察
D7/D8		ヒナを安楽殺し、採血及び脾臓サンプルの無菌的採取

D21	P05	MD、IBD 及び ND の観察用に残しておいた雛（10 羽）の剖検
-----	-----	------------------------------------

[9～11 頁 7.1. Schedule of Events]

試験の概要

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

[11～13 頁 7.2. Summary of Procedures]

サンプル及び分析

サンプル	数	試験
接種材料（P01-P05）	5	PCR：各接種材料を CEF 培養で増殖した。DNA を抽出し、遺伝子挿入部位の外側に位置するプライマーセットを用いて PCR を実施した。
		P01：プラークアッセイによりウイルス量を測定した（3 反復）。
		P02-P05：IFA にてウイルスを検出した。
P05 回収ウイルス（白血球）	1	PCR：継代 5 代目の回収ウイルスを CEF 培養で増殖させた。DNA を抽出し、遺伝子挿入部位の外側に位置するプライマーセットを用いて PCR を実施した。
		IFA によりウイルスを検出した。
		残りのウイルスは凍結用培地中で凍結保存した。

血液及び脾臓	5	継代ごとに白血球をプールし、次代用接種材料とした。
--------	---	---------------------------

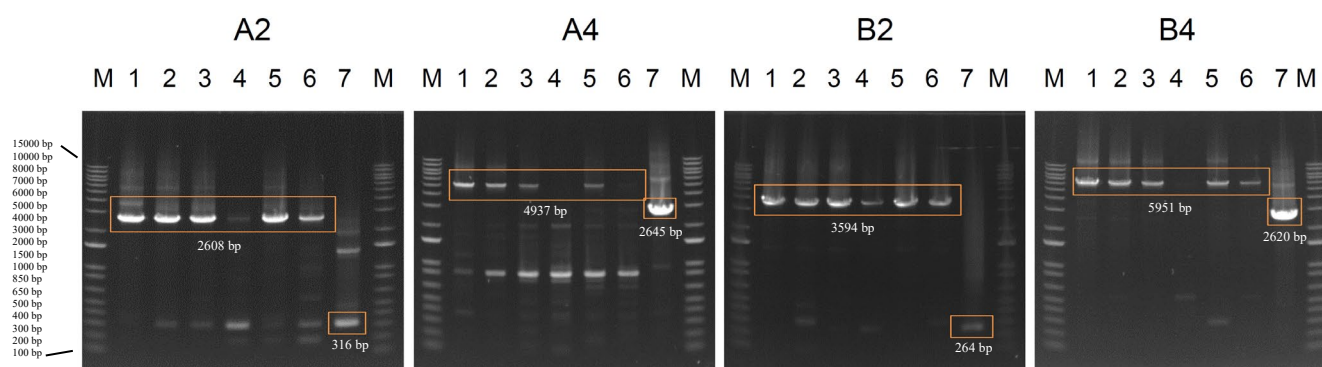
[13 頁 8. SAMPLE AND LABORATORY TESTING]

結果

挿入遺伝子の発現及び安定性 [15 頁 14.1.1. Virus Recovery、16 頁 14.4.2. Insert Stability]

IFA によって各抗原の発現が、PCR によって挿入遺伝子が陽性であることが確認された。

群	ウイルス回収元	IFA 結果 (HVT、IB、ND)	PCR 結果 (HVT、IB、ND)
P02 接種材料	P01	陽性	陽性
P03 接種材料	P02	陽性	陽性
P04 接種材料	P03	陽性	陽性
P05 接種材料	P04	陽性	陽性
P05 回収ウイルス	P05	陽性	陽性



プライマーセット	プライマー	PCR 産物長 (bp)	
		HVT-IBD-ND	HVT
A2	SiteA-F2+SiteA-R2	2608	316
A4	SiteA FL-F2+SiteA FL-R1	4937	2645
B2	SiteB-F2+SiteB -R2	3594	264
B4	SiteB FL-F2+SiteB FL-R2	5951	2620

レーン	試料
M	マーカー
1	MSV
2	P02 接種材料
3	P03 接種材料
4	P04 接種材料
5	P05 接種材料
6	P05 回収ウイルス
7	HVT

死亡 [17 頁 14.4.4. Mortality]

観察期間中いずれの群において死亡は観察されなかった。

臨床観察 [17 頁 14.4.5. Clinical Observations]

臨床症状について正常でないと記録された鶏は存在しなかった。

孵化率 [18 頁 14.4.5. Percent Hatch]

孵化率は、(正常ヒナ数 / (孵化器に入れた卵数 - 異常胚数)) × 100 の式により計算した。試験卵の孵化率は 82.8~100%、非接種対照卵の孵化率は 70.0~100%であった。

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

MD によると考えられる肉眼病変が組織/臓器に認められた場合、MD 陽性とした。D21 に剖検した P05 について確認したところ、剖検した 10 羽のいずれにも病変は認められなかった。

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

ファブリキウス嚢の肉眼病変（浮腫、出血、浮腫及び出血、委縮）の有無について P05 を評価した。D21 に剖検した 10 羽のいずれにも病変は認められなかった。

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

- 本試験は規定の条件に P04 における非接種対照卵の孵化率以外は合致した。P04 における非接種対照卵の孵化率は 70% であり、規定の非接種対照卵における孵化率（ $\geq 80\%$ ）を満たさなかったが、P04 試験卵の孵化率は 90% であり、評価に十分な数が確保されたことから、本試験はバリデートされたと判断した。
- P01 の接種材料についてウイルス量を測定した。各継代で回収したウイルスを IFA により HVT、IBDV 及び ND 抗原の発現を確認したところすべてが陽性を示した。PCR 結果により PCR 産物の全長のみが各継代で観察された。欠失や組換えは確認されなかった。A2 PCR におけるレーン 1-6 の 300 bp のバンドは特定のプライマーセットにおけるアーティファクトと考えられた。もしこのバンドが正しい増幅物を示しているのであれば 2645 bp のバンド（HVT ベクター対照のレーン 7 と同じ長さ）が A4 PCR の同レーンでも観察されるはずである。実際には、A4 PCR ではレーン 1-3 レーン 5-6 で完全長の 4937 bp が明瞭に観察され、2645 bp のバンドは観察されないことから、A2 PCR におけるレーン 1-6 の 300 bp のバンドはアーティファクトであることを示している。A2/A4/B2/B4 PCR のレーン 4 において目的とするバンドのシグナルが弱かったことについては、継代操作から得られたウイルス量が他に比べ少なかったためと考えられるが、それぞれ目的とするバンドが確認された。
- すべての群で剖検時に臨床症状や病変は観察されなかった。
- 各継代ウイルスは病変を誘導しなかった。P05 について、D21 の剖検で MD 又は IBD に関連する肉眼病変を示した鶏はいなかった。病原性復帰を示すような観察はされなかった。これらのことは、VICH GL41 に準拠して、ウイルスを SPF 鶏で継代しても病原性が復帰しなかったことを示している。
- 各継代の回収ウイルスについて、IFA によって表現型を、PCR によって遺伝的性状を解析した。すべての継代において、完全長の IBD インサートを含んだバンドが 4 セットのプライマーを用いたすべての PCR で観察され、プラークの 100% で HVT 及び IBDV の発現がみとめられた。VSM800.201（米国農務省の Veterinary Services Memorandum、800.201 は病原性復帰に関するガイドライン）に準じて、最終継代（P05）と MSV（P01 接種材料）を比較し、当該株の表現型及び遺伝的安定性が示された。
- 完全長の NDV F 遺伝子及び IBDV VP2 発現カセットが 5 代の継代中に HVT のゲノムに安定して挿入されていることが確認された。
- ND、MD 又は IBD の臨床症状や病変が認められず、副反応が発生しなかったことから、MSV は安全かつ安定であり、ワクチン製造の目的に適合していると考えられる。

別紙 6-2. 10× Target animal safety - HVT-IBD-ND**HVT-IBD-ND の高用量（×10）対象動物安全性試験（試験番号：【社外秘につき非開示】）****目的：**

HVT-IBD-ND マスターシードウイルス（MSV）の高用量（×10）の安全性を 9CFR 113.330(b) に準じて卵内又は初生時に皮下接種して評価する。[4 頁 1. OBJECTIVES]

試験方法：

孵卵 18 日齢（E18、Day-3）の発育鶏卵に T01 群は溶解用液を、T02 群は 10 用量の HVT-IBD-ND を 1 発育鶏卵当たり 0.1mL ずつ投与した。T03 群には 1 羽当たり 0.2mL のワクチンを孵化日（Day 0）に皮下投与した。T04 群にはマレック病ウイルス強毒株である RB1B 株を 1 羽当たり 0.2 mL ずつ 5 日齢時（Day 5）に腹腔内投与した。

1 群当たり 60 羽を選定し、個体識別した後、所定のペン又はアイソレーターに、それぞれ 30 羽又は 15 羽ずつ配置した。T04 群の鶏は Day 50 まで飼育し、剖検してマレック病病変を観察した。T01～T03 群の鶏は Day 120 まで飼育してから剖検した。[3 頁 STUDY SUMMARY]

投与材料、投与経路及び投与量

群	投与材料	投与日齢	投与経路	投与量	用量
T01	溶解用液	孵卵 18 日	卵内	0.1 mL/卵	
T02	10X HVT-IBD-ND MSV (K040519MSV)	孵卵 18 日	卵内	0.1 mL/卵	65,139 PFU/卵
T03		初生	皮下	0.2 mL/鶏	68,833 PFU/鶏
T04	RB1B 株 (040414KZO)	5 日齢	腹腔内	0.2 mL/鶏	100 倍希釈脾臓乳剤

[5 頁 4. INVESTIGATIONAL VETERINARY AND CONTROL PRODUCTS、6 頁 5. CHALLENGE MATERIAL]

試験群の設定

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

[6 頁 6. ANIMALS 、 8 頁 7.1. Study Design Summary 、 7.2. Experimental Unit 、 8 、 9 頁 7.3. Allotment/Randomization/Replicattion]

試験方法概要

試験日	作業内容
Day -3 (E18)	発育鶏卵の状態確認、発育停止卵の除去 T01 群に溶解用液の卵内接種、T02 群に HVT-IBD-ND の卵内接種 各群 100 個を孵化器に移動
Day 0	孵化しなかった卵の開卵 発育不全ヒナの除外及び除外理由の記録 T03 群への HVT-IBD-ND の皮下接種 試験デザイン及び無作為化表に基づくヒナの識別及び配置
Day 0 - Day 120	毎日の臨床観察、死亡又は安楽殺個体の剖検*
Day 5	T04 群への攻撃
Day 50	T04 群の観察終了、剖検 外部及び内部の腫瘍の検査
Day 120	観察終了、体重測定、T01～T03 群の全羽の剖検 マレック病に相当する病変の有無の観察*

* 性別及びマレック病特異的肉眼病変を観察した。胸筋及び皮膚の肉眼病変、虹彩の色素欠乏（グレーアイ）及び下記の器官について検査し、病変を記録した：胸腺、肝、脾、腎、心、肺、腺胃、脾、生殖腺、ファブリキウス嚢及び腸。神経（迷走、並びに上腕及び座骨神経叢）は炎症について検査した。ファブリキウス嚢及び胸腺は萎縮について検査した。

[10 頁 8.1. Schedule of Events]

結果：[14～16 頁 15.4. Results]

卵内接種群の孵化率は T01 群（溶解用液）で 94.9%、T02 群（HVT-IBD-ND）で 97.0%であり、10 用量を卵内に接種したときの HVT-IBD-ND の安全性が確認された。

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

T04 群ではマレック病に相当する肉眼病変は 98.31%の鶏に認められた。これは 80%以上の鶏がマレック病に感受性があると規定した本試験の試験成立基準に合致した。

T01、T02 及び T03 群では Day 120 の剖検時まで少なくとも 98%以上（≥59 羽）の鶏が生存し、剖検によるマレック病の肉眼病変は観察されなかった。

体重測定において各群間に有意な差は認められなかった。

T01 及び T03 群において、マレック病の症状（脚麻痺又は沈鬱）を示した鶏は認められなかった T04 群は 41.67%の鶏にマレック病の症状が認められた。

孵化率、死亡率、マレック病肉眼病変率及び体重

群	孵化率 ¹⁾	臨床症状	死亡率	肉眼病変	体重
T01 (溶解用液)	94/99 (94.9%)	0/60 (0.0%)	0/60 (0.0%)	0/60 (0.0%)	T01 群と T02 又は T03 群と の間に 有意差なし
T02 (10 × HVT-IBD-ND/卵内)	96/99 (97.0%)	0/60 (0.0%)	0/60 (0.0%)	0/60 (0.0%)	
T03 (10 × HVT-IBD-ND/皮下)	189/199 (95.0%)	0/60 (0.0%)	1*/60 (1.67%)	0/60 (0.0%)	
T04 (非接種/攻撃)		25/60 (41.67%)	53/60 (88.33%)	58/59 (98.31%)	(対象外)

1) 未授精、孵卵早期及び中期の死亡、腐敗卵、位置異常胚、孵化時の異常を対象から除外した。

* Day 116 に 1 羽 (No. 225、T03 群) が原因不明で死亡しているのが見つかった。剖検を行ったところ、マレック病又はファブリキウス嚢病に関連する病変あるいはその他の異常は認められなかった。

[14～16 頁 15.4. Results]

まとめ及び考察：[16、17頁 16. DISCUSSION/ CONCLUSION]

卵内接種した群の孵化率は 97%であり、HVT-IBD-ND は臨床使用量の 10 倍量の卵内接種において安全であることが示された。

強毒株の攻撃 (Day 5) 前に死亡した鶏はいなかった。T01、T02 及び T03 群では少なくとも 98.33%の鶏 (≥59 羽) が観察期間終了 (Day 120) まで生存していた。

攻撃対照群 (T04) においては 98.31%の鶏がマレック病病変陽性であったのに対し、T01、T02 及び T03 群ではマレック病病変陽性例はなかった。

Day 120 における各群の平均体重に有意な差はなかった。

T01、T02 及び T03 群において試験期間中マレック病の症状を示した鶏はいなかった。

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

別紙 7-2. Dissemination within the animal and environmental survival of HVT-IBD-ND
HVT-IBD-ND の体内分布及び環境中における生残性（試験番号：【社外秘につき非開示】）

目的：

1. HVT-IBD-ND のマスターシードウイルス（MSV）を卵内接種した場合の鶏における体内分布を確認する。
2. HVT-IBD-ND MSV 接種鶏からの環境への排泄及び生残性を評価する。
[3 頁 STUDY SUMMARY、5 頁 1.2. Study Objectives]

材料及び方法：

HVT-IBD-ND MSV（T02 群）及び遺伝子組換えウイルスの親株である HVT（T03 群）をそれぞれ 70 個の 18 日齢発育鶏卵に 0.1mL（約 10^4 PFU）ずつ卵内投与した。T01 群は非投与とした。孵化日（0 日齢、Day 0）に健康な 38 羽を 1 群として選別し、19 羽ずつアイソレーターペンに収容した。Day 11 及び 22 に各群から 6 羽（3 羽/ペン）ずつ無作為に抽出し、血液、脾臓、ファブリキウス嚢、胸腺及び羽髄を採取し、剖検した。また、Day 22 に、全ての残りの鶏を剖検した。試験期間中、毎日臨床症状を観察した。Day 11 及び 22 に、塵埃採取用に各ペンのフィルターを保存した。[3 頁 STUDY SUMMARY、8 頁 6.3. Allotment/ Randomization/Replication、9 頁 7.1. Schedule of Events]

Day 22 に採取した血液の血清サンプルについて伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（IBDV）及びニューカッスル病ウイルス（NDV）に対する抗体応答を ELISA により測定した。また、Day 11 及び 22 の血液、脾臓、ファブリキウス嚢及び胸腺から白血球を分取し、鶏胚線維芽（CEF）細胞を用いてウイルス分離を行った。Day 11 及び 22 の羽髄サンプルについては、qPCR による HVT の検出を実施した。Day 22 にフィルターを 4 分して 20～28℃に保存し、Day 22（採取時）、23、25 及び 29 に塵埃を採取し、CEF 細胞を用いてウイルス分離を行った。[11、12 頁 7.2. Summary of Procedures、12、13 頁 8. SAMPLE AND LABORATORY TESTING]

群設定

群	投与材料	発育鶏卵数	投与量	アイソレーターペン数	羽数/ ペン	羽数/ 群
T01	非投与	70	—	2	19	38
T02	HVT-IBD-ND ¹⁾	70	0.1 mL/卵 (15,089 PFU) ³⁾	2	19	38
T03	HVT ²⁾	70	0.1 mL/卵 (11,550 PFU) ³⁾	2	19	38
総数		210		6		114

¹⁾ HVT-IBD-ND MSV（ロット K040519MSV） 5.67×10^6 PFU/mL

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

³⁾ 20,000 PFU を目標値とした。実測値で示した。

[6 頁 4. INVESTIGATIONAL VETERINARY AND CONTROL PRODUCTS、8 頁 6.1. Study Design Summary]

結果：

孵化率は、（正常ヒナ数／（孵化器に入れた卵数 - 異常胚数））× 100 の式により計算した。各群の孵化率は、非投与群（T01）、HVT-IBD-ND 群（T02）及び HVT 群（T03）の順に 98.6%（69/70）、95.7%（67/70）及び 97.1%（67/69）であった。[15 頁 14.4.2. Hatch]

Day 17 及び 20 に T01 で 1 羽ずつ、Day 10 に T02 で 1 羽、Day 13 に T03 で 1 羽の鶏が死亡し、さらに T03 では怪我により 1 羽を除外した。剖検時にマレック病（MD）又は伝染性ファブリキウス嚢病（IBD）に関連する病変を示した鶏はいなかった。[16 頁 14.4.3. Mortality]

試験期間中、MD、ニューカッスル病（ND）又は IBD の臨床症状を示した鶏はいなかった。[16 頁 14.4.4. Clinical Signs]

抗体検査では検査キットの基準により、IBD ウイルス（IBDV）抗体では 1002 以上を陽性、ND ウイルス（NDV）抗体では 345 以上を陽性と判定した。その結果、T02 は 100%が IBDV 抗体陽性で、33.33%が NDV 抗体陽性、T01 及び T03 は全羽が両抗体陰性であることが確認された。[16 頁 14.5.5. Serology]

抗体応答

群	IBDV			NDV		
	幾何平均	標準偏差	陽性率(%)	幾何平均	標準偏差	陽性率(%)
T01 (非投与)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T02 (HVT-IBD-ND)	6693.54	3031.51	100.00	176.10	271.43	33.33
T03 (HVT)	2.22	44.49	0.00	0.00	0.00	0.00

T01 の鶏からウイルスは分離されなかった。T02 及び T03 の鶏では、血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓及び胸腺の白血球からウイルスが分離された。[17 頁 14.4.6. Virus Presence]

各サンプルからのウイルス検出

群	ウイルス陽性率 (%)									
	血液		ファブリキウス嚢		肺		脾臓		胸腺	
	D11	D22	D11	D22	D11	D22	D11	D22	D11	D22
T01 (非投与)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)
T02 (HVT-IBD-ND)	100.0 (6/6)	0.00 (0/6)	100.0 (6/6)	16.67 (1/6)	83.3 (5/6)	16.67 (1/6)	100.0 (6/6)	0.00 (0/6)	83.33 (5/6)	0.00 (0/6)
T03 (HVT)	100.0 (6/6)	83.33 (5/6)	83.33 (5/6)	33.33 (2/6)	100.0 (6/6)	50.00 (3/6)	83.33 (5/6)	66.67 (4/6)	83.33 (5/6)	83.33 (5/6)

[17 頁 14.4.6. Virus Presence]

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

ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス検出

群	ペン番号	ウイルス分離結果				
		D11	D22	D23*	D24*	D29*
T01 (非投与)	01B	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	02B	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
T02 (HVT-IBD-ND)	02A	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	03A	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性
T03 (HVT)	01A	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性
	03B	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性

*Day 22 のサンプルを 20~28℃で 1 日 (Day 23)、3 日 (Day 25) 及び 7 日 (Day 29) 保存したサンプル。

[17 頁 14.4.6. Virus Presence]

qPCR による HVT の検出では、T02 の Day 11 及び D22 でそれぞれ 83.33% (15/18 検体 (6 羽×3 検体)) 及び 11.11% (2/18 検体 (6 羽×3 検体))、T03 の Day 11 及び D22 でそれぞれ 100.00% (18/18 検体 (6 羽×3 検体)) 及び 94.44% (17/18 検体 (6 羽×3 検体)) が陽性となった。T01 では検出されなかった。[18 頁 14.4.7. HVT Detection by qPCR]

Day 11 及び D22 の剖検においてマレック病変陽性となった鶏はどの群においても観察されなかった。[18 頁 14.4.8. Marek's Leisions]

Day 11 及び D22 の剖検において急性のファブリキウス嚢病変陽性となった鶏はどの群においても観察されなかった。[19 頁 14.4.9. Acute Bursal Leisions]

考察及び結論：

- 孵化率は 95.7%以上を示した。
- 試験期間中、MD、ND や IBD の臨床症状を示した鶏は認められず、剖検において MD や IBD に関連する病変のある鶏は認められなかった。よって、HVT-IBD-ND の卵内投与は安全であると考えられた。
- HVT ウイルスは T02 及び T03 の血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓及び胸腺の白血球から分離されたが、T01 では分離されなかった。羽髄において HVT DNA は Day 11 及び Day 22 に T02 および T03 で検出されたが、T01 では検出されなかった。
- HVT-IBD-ND MSV 接種鶏からの環境への排泄は、Day 11 及び 22 に採取した塵埃サンプルからのウイル

ス分離によって評価した。また、Day 22 のサンプルは室温（20～28℃）で 1、3 及び 7 日間保存して環境中の生残性について評価した。T02 の 2 ペン中 1 ペン、T03 では 2 ペン中 2 ペンから Day 11 にウイルスが分離されたが、Day 22 及びそれ以降のサンプルからは両群からウイルスは分離されなかった。限定的ではあるが HVT は排泄され（Cho et al, 1971、Cho and Kenzy, 1975）、その際の感染性 HVT の排泄源は羽包の上皮細胞であると考えられている（Calnek et al, 1979）。フケ中の感染羽包細胞の落屑は、代表的な MD ウイルス排泄メカニズムである。HVT 親株と HVT-IBD-ND のこれらのデータは、環境中に HVT 親株の排泄が予想されることと一致している。

- 結論として、本試験データから HVT と HVT-IBD は両者とも環境への排泄が同様に限定的であることが示され、ウイルスは両群とも羽髄において検出可能であった。HVT-IBD MSV の組織指向性、排泄、及び環境へのウイルス排泄は親株である HVT の性状と一致していることが確認された。

[19 頁 15. DISCUSSION / CONCLUSION]

参考文献

1. Cho B.R.et al. 1971. Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 1. Preliminary observation. Poultry Sci. 50: 881-887.
2. Cho B. R. and S. G. Kenzy. 1975. Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 3. Transmission in three different lines of chickens. Poultry Sci. 54: 109-115.
3. Calnek B W et al. 1979. Comparative pathogenesis studies with oncogenic Marek's disease virus and turkey herpesvirus. Am. J. Vet. Res. 40: 541-548.

別紙 8-2. Evaluation of the Shed and Spread of HVT-IBD-ND

HVT-IBD-ND の排泄及び拡散性の評価（試験番号：【社外秘につき非開示】）

目的：

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

材料及び方法：

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

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

[3 頁 STUDY SUMMARY、5 頁 5. ANIMALS、6～8 頁 6. STUDY DESIGN、8～11 頁 7. PROCEDURES、11 頁 8. SAMPLE AND LABORATORY TESTING]

群設定

群	投与材料	発育鶏卵数	投与量	孵化器数	ペン番号	羽数/ ペン	羽数/ 群
T01	非投与	90	—	1	01A/01B	18	36
T02	HVT-IBD-ND ¹⁾	90	0.1 mL/卵 (19,413 PFU) ³⁾	1	01A	18	18
T03	HVT ²⁾	90	0.1 mL/卵 (10,507 PFU) ³⁾	1	01B	18	18
総数	-	270		3	2	-	72

¹⁾ HVT-IBD-ND MSV（ロット K040519MSV）、 5.67×10^6 PFU/mL

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

³⁾ 20,000 PFU を目標値とした。実測値で示した。

結果：

孵化率は、（正常ヒナ数／（孵化器に入れた卵数 - 異常胚数））×100 の式により計算した。各群の孵化率は、非投与群（T01）、HVT-IBD-ND 群（T02）及び HVT 群（T03）の順に 94.4%（85/90）、94.3%（83/88）及び 91.1%（82/90）であり、全群 90%以上を示した。[14 頁 14.6. Percent Hatch]

試験期間中、臨床症状を示した鶏及び死亡した鶏は認められなかった。剖検時に MD 又は IBD に関連する肉眼病変を示した鶏はいなかった。[14 頁 14.7. Clinical Signs、14.8. Mortality、15 頁 14.9. Marek's Lesions、14.10. Acute Bursal Lesions]

ワクチン接種した T02 及び T03 について、脾臓から試験期間を通じてウイルスが検出され、血液白血球及び咽頭スワブからは少なくとも 1 回はウイルスが検出された。T02 ではクロアカスワブからも D15 にウイルスが検出されたが、T03 では検出されなかった。T01 では試験期間を通じてウイルスは検出されなかった。[16、17 頁 14.11. Virus Isolation、18 頁 15. DISCUSSION/ CONCLUSION]

血液白血球、脾臓、クロアカスワブ及び咽頭スワブからのウイルス分離陽性率

群	ペン	ウイルス分離陽性率 (%) (陽性羽数/供試羽数)											
		血液白血球			脾臓			クロアカスワブ			咽頭スワブ		
		D8	D15	D22	D8	D15	D22	D8	D15	D22	D8	D15	D22
T01 (非投与)	01A	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T02 (HVT-IBD-ND)		100.0 (6/6)	66.67 (4/6)	0 (0/6)	100.0 (6/6)	33.33 (2/6)	50.0 (3/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)
T01 (非投与)	01B	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T03 (HVT)		33.33 (2/6)	0 (0/6)	50.0 (3/6)	100.0 (6/6)	66.67 (4/6)	33.33 (2/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)

[16 頁 14.11. Virus Isolation]

上記の他、孵化器デブリ (Day 0) からウイルスは分離されなかった。ペンフィルターから採取した塵埃について、T02 及び T03 とともに試験期間を通じてウイルスは分離されなかった。

孵化器デブリにおけるウイルス分離

群	孵化器	ウイルス分離
T01 (非投与)	A	陰性
T02 (HVT-IBD-ND)	B	陰性
T03 (HVT)	C	陰性

[16、17 頁 14.11. Virus Isolation]

ペンフィルター塵埃における T ウイルス分離

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

[16、17 頁 14.11. Virus Isolation]

HVT-IBD-ND 投与 (T02) のすべての鶏は IBDV 抗体陽性となったが、NDV 抗体陽性率は 50%であった。HVT 投与鶏 (T03) 及び同居鶏 (T01) は両ペンとも陰性であった。[17 頁 14.12. Serology]

D22 における IBDV 及び NDV 抗体陽性率 (%)

群	IBDV 抗体陽性率%	NDV 抗体陽性率%
T01 (非投与)	0 (0/12)	0 (0/12)
T02 (HVT-IBD-ND)	100.0 (6/6)	50.0 (3/6)
T03 (HVT)	0 (0/6)	0 (0/6)

[17 頁 14.12. Serology]

HVT ウイルス DNA はワクチン接種鶏 (T02 及び T03) の Day 8、15 及び 22 の羽髄で認められた。T01 の羽髄サンプルでウイルス DNA の陽性例はなかった。[17 頁 14.13. HVT Detection by qPCR]

羽髄における qPCR による HVT DNA の検出

群	ペン	Day 8	Day 15	Day 22
T01 (非投与)	01A	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T02 (HVT-IBD-ND)		100.0 (6/6)	66.67 (4/6)	50.0 (3/6)
T01 (非投与)	01B	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T03 (HVT)		100.0 (6/6)	100.0 (6/6)	100.0 (6/6)

[17 頁 14.13. HVT Detection by qPCR]

考察／結論：

- ワクチンの安全性は孵化率、臨床観察、斃死率及び剖検データによって示された。すなわち、孵化率はいずれの群も 90%以上を示し、各群の鶏はすべて試験期間を通じて異常は認められず、剖検時に MD 又は IBD と関連する病変を示した鶏は認められず、その他の病変や異常を示した鶏も認められなかった。また、観察終了時まで死亡した鶏は観察されなかった。
- 孵化器デブリ及びペンフィルターから採取した塵埃からウイルスは分離されなかった。このことは、HVT-IBD-ND および HVT とともに環境への検出可能なレベルでの排泄がなかったことを示している。
- HVT-IBD-ND 群（T02）の半数の個体が NDV に対する抗体陽性となり、全ての個体が IBDV に対する抗体陽性となったが、HVT 群（T03）の鶏はどちらのウイルスに対しても抗体陰性であった。
- どの採取日においても HVT-IBD-ND 群（T02）及び HVT 群（T03）の羽髄から HVT のウイルス DNA が検出されたが、同居鶏群（T01）からは検出されなかった。
- HVT-IBD-ND MSV は、ワクチン鶏において Day 8 及び Day22 の血液、Day8、Day15 及び Day22 の脾臓、並びに Day15 のクロアカ及び咽頭スワブで検出されたが、同居鶏においてはどの時点のどのサンプルからも検出されなかった。
- 親株の HVT では、ワクチン鶏において Day 8 及び Day22 の血液、Day8、Day15 及び Day22 の脾臓、並びに Day8 の咽頭スワブで検出されたが、同居鶏においてはどの時点のどのサンプルからも検出されなかった。
- 結論として、HVT-IBD-ND および HVT は両者ともに血液、脾臓、クロアカ及び咽頭で検出されうるが、同居鶏には拡散（感染）せず、環境にも検出可能なレベルでは排泄されないことが示された。

[18 頁 15. DISCUSSION/ CONCLUSION]

別紙 9-2 Herpes Virus of Turkeys – Infectious Bursal Disease Viral – Newcastle Disease Viral (HVT-IBD-ND) Survivability at 25°C and 30°C

七面鳥ヘルペスウイルスー伝染性ファブリキウス嚢ウイルスーニューカッスル病ウイルス (HVT-IBD-ND) の 25°C 及び 30°C における生存性 (試験番号：【社外秘につき非開示】)

目的：

室温 (25°C) 及び一般的な養鶏場の温度 (30°C) を模した環境条件に HVT-IBD-ND 組換えウイルスを暴露し、その生存性を確認する。[1 頁 OBJECTIVE]

方法：

HVT-IBD-ND 組換えウイルス X+5 (ロット番号 K051719TB1)、及び組換えウイルスのバックボーンである HVT ワクチン (ロット番号 082114KZO) を、ポールバック溶解用液を用いて 10⁵ PFU/mL に希釈した。溶解後すぐに含有量を測定し、無処置対照 (それぞれ、NT1 および NT2) とした。溶解したサンプルを 0.05 mL ずつ 35 mm 径のプラスチックプレートに入れ (3 反復/群)、安全キャビネット内で 2 時間、室温で乾燥させた。2 時間後にプレートに蓋をして、この時点を 0 時間 (T0) とした。プレートは 25°C 又は 30°C に静置する群に分けた。各時点 (0、2、5、8、24、48、72、96 及び 168 時間 (7 日間)) に、各群 3 枚のプレートに培地 (5%TPB 及び 2%牛胎子血清を含む F10/199 培地) 1 mL を加え、初代鶏胚線維芽細胞 (CEF) を用いて IFA により PFU を測定した。[4 頁 1. INTRODUCTION、2. MATERIALS AND METHOD、5 頁 3. EXPERIMENTAL DESIGN]

試験設計

群	ワクチン	温度	時点	反復	サンプル数
NT1	HVT-IBD-ND	調製後氷上で保管（2 時間以内）	該当なし	3	3
NT2	HVT		該当なし	3	3
T01	HVT-IBD-ND	室温（25℃）	0 hr, 2 hr, 5 hr, 8 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr, 168 hr	3	27
T02		30℃		3	27
T03	HVT	室温（25℃）		3	27
T04		30℃		3	27
総サンプル数					114

[5 頁 3. EXPERIMENTAL DESIGN]

結果：

各群の各温度、各時点における平均ウイルス量を表にまとめた。[6 頁 4. RESULTS]

経過時間によるウイルス量

処理		平均ウイルス量(PFU/ mL)	
		HVT-IBD-ND	HVT
NT1 または NT2 ¹	NA	6,930	6,770
0 時間	25℃	302.22	181.33
	30℃	177.78	309.33
2 時間	25℃	76.44	106.67
	30℃	53.34	117.33
5 時間	25℃	0.00	37.33
	30℃	0.00	48.00
8 時間	25℃	0.00	0.00
	30℃	0.00	0.00
24 時間	25℃	0.00	0.00
	30℃	0.00	0.00
48 時間	25℃	0.00	0.00
	30℃	0.00	0.00
72 時間	25℃	0.00	0.00
	30℃	0.00	0.00
96 時間	25℃	0.00	0.00
	30℃	0.00	0.00
168 時間	25℃	0.00	0.00
	30℃	0.00	0.00

¹ 無処置対照

考察／結論：

- HVT-IBD-ND は 25℃及び 30℃で T0 から 2 時間後まで、HVT は 5 時間後まで生存していた。
- HVT-IBD-ND 及び HVT は 25℃及び 30℃ともに、8 時間後以降、検出されなくなった。
- HVT-IBD-ND 及び HVT は T0 前の 2 時間の乾燥時間中にほとんど感染性を失い、8 時間後までに室温（25℃）又は一般的な養鶏場の温度（30℃）の何れでも感染性がなくなったと結論づけることができる。

[7 頁 5. DISCUSSION AND CONCLUSIONS]

別紙 10-2 遺伝子組換えウイルス HVT-IBD-ND と宿主ウイルス HVT FC126 株の培養細胞における増殖性の比較

HVT-IBD-ND to HVT Backbone Growth Comparison (【社外秘につき非開示】)

目的：

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

方法：

1. ウイルス培養

表 1 に試験設計の概要を示す。SPF 発育鶏卵由来の鶏胚線維芽（CEF）細胞に、HVT-IBD-ND 遺伝子組換えウイルス（MSV+4）又は HVT-IBD-ND の宿主である HVT ワクチンウイルス（MSV+3）を、MOI が 0.003 となるように混合し、それぞれ 12 本のローラーボトルに分注して 39℃で培養した。培養 30、40、45、50、60 及び 70 時間後に、1 時点当たり各群 2 本のローラーボトルについて細胞変性効果（CPE）を観察し、ウイルス価を測定した。

表 1. 試験設計

群	ウイルス	MOI	温度	1 時点当たりの サンプリングした ローラーボトル数*	採取時点 (培養後時間)
T01	HVT-IBD-ND (ロット K051019TB1)	0.003	39℃	2	30, 40, 45, 50, 60, 70
T02	HVT (ロット 082114KZO)	0.003	39℃	2	30, 40, 45, 50, 60, 70

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

2. 評価方法

CPE は、0 = 0%、1 = 1-25%、2 = 26-50%、3 = 51-75%、4 = 76-100% の 5 段階のスコアで評価した。また、各観察時点においてローラーボトルからトリプシン処理により剥離した細胞を遠心後、再浮遊した懸濁液を小分けして保存した。ウイルス価の測定には凍結した小分け試料を融解して使用し、凍結しなかった試料は生細胞率（% = (生細胞数 / 総細胞数) × 100）を確認した。ウイルス価は CEF 細胞におけるプラーク形成単位（PFU）を、間接蛍光抗体法（IFA）を用いて測定した。ただし、培養 45 時間後に採取した各群 1 本ずつのローラーボトルでトリプシン処理による剥離ができておらず、相関して生細胞数が少なかった。よって、これらのデータは評価から除外した。[5 頁 1. INTRODUCTION、6～7 頁 2.2.2. Harvest, Sampling and Data Collection、7 頁 2.3. Data Summary and Analysis]

結果：

1. ウイルス価 [9 頁 3.1. Potency (PFU/mL)]

各群の培養後各時点における平均ウイルス価を表 2 及び図 1 にまとめた。

表 2. 各時点におけるウイルス価

採取時点 (時間)	平均ウイルス価 ± 標準偏差 (PFU/ mL) (最小値, 最大値)	
	T01 : HVT-IBD-ND	T02 : HVT
30	1.15 x 10 ⁶ ± 7.07 x 10 ⁴ (1.10 x 10 ⁶ , 1.20 x 10 ⁶)	2.00 x 10 ⁶ ± 1.41 x 10 ⁴ (1.99 x 10 ⁶ , 2.01 x 10 ⁶)
40	4.28 x 10 ⁶ ± 1.70 x 10 ⁵ (4.16 x 10 ⁶ , 4.40 x 10 ⁶)	7.02 x 10 ⁶ ± 1.65 x 10 ⁶ (5.95 x 10 ⁶ , 8.29 x 10 ⁶)
45	3.87 x 10 ⁶ (3.87 x 10 ⁶ , 3.87 x 10 ⁶)	8.03 x 10 ⁶ (8.03 x 10 ⁶ , 8.03 x 10 ⁶)
50	4.69 x 10 ⁶ ± 2.62 x 10 ⁵ (4.51 x 10 ⁶ , 4.88 x 10 ⁶)	5.59 x 10 ⁶ ± 7.34 x 10 ⁵ (5.09 x 10 ⁶ , 6.13 x 10 ⁶)
60	3.65 x 10 ⁶ ± 3.25 x 10 ⁵ (3.43 x 10 ⁶ , 3.89 x 10 ⁶)	3.61 x 10 ⁶ ± 2.47 x 10 ⁵ (3.44 x 10 ⁶ , 3.79 x 10 ⁶)
70	2.28 x 10 ⁶ ± 8.53 x 10 ⁵ (1.75 x 10 ⁶ , 2.97 x 10 ⁶)	2.09 x 10 ⁶ ± 3.54 x 10 ⁴ (2.07 x 10 ⁶ , 2.12 x 10 ⁶)

[9 頁 Table 1]

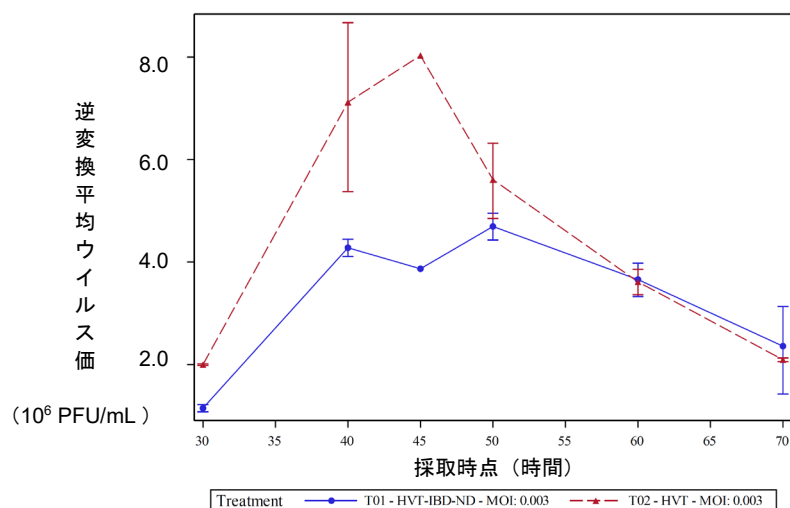


図 1. 経過時間によるウイルス価の推移

2. CPE スコア [10 頁 3.2. CPE Scores]

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

表 3. 各時点における CPE スコア*

採取時点 (時間)	平均CPEスコア (最小値, 最大値)	
	T01 : HVT-IBD-ND	T02 : HVT
30	1.0 (1, 1)	1.0 (1, 1)
40	1.0 (1, 1)	1.0 (1, 1)
45	2.0 (2, 2)	2.0 (2, 2)
50	3.0 (3, 3)	3.0 (3, 3)
60	4.0 (4, 4)	4.0 (4, 4)
70	4.0 (4, 4)	4.0 (4, 4)

*スコア 0 = 0%、1 = 1-25%、2 = 26-50%、3 = 51-75%、4 = 76-100% [10 頁 Table 2]

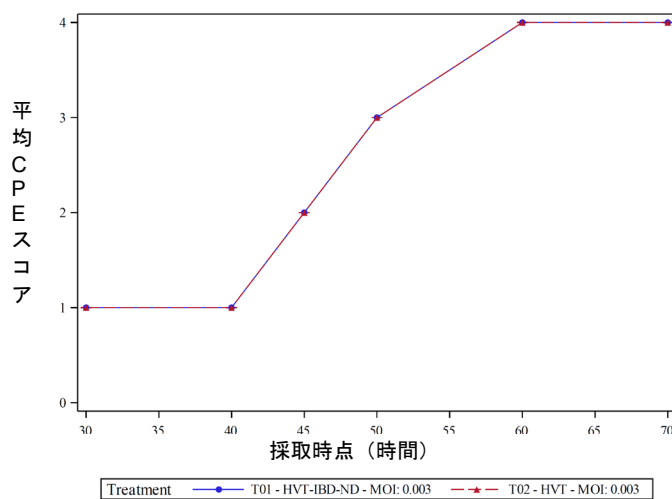


図 2. 経過時間による平均 CPE スコアの推移

3. 生細胞率 [11~12 頁 3.3 Vicell Data]

3.1. 総細胞数

各群の培養後各時点における平均総細胞数を表 4 にまとめた。

表 4. 各時点における総細胞数

採取時点 (時間)	平均± 標準偏差 (cells)	
	T01 : HVT-IBD-ND	T02 : HVT
30	$54.05 \times 10^6 \pm 7.410 \times 10^6$	$46.92 \times 10^6 \pm 5.367 \times 10^6$
40	$42.25 \times 10^6 \pm 1.775 \times 10^6$	$42.28 \times 10^6 \pm 0.728 \times 10^6$
45	41.85×10^6	31.11×10^6
50	$28.37 \times 10^6 \pm 2.213 \times 10^6$	$26.41 \times 10^6 \pm 9.129 \times 10^6$
60	$21.37 \times 10^6 \pm 1.732 \times 10^6$	$21.19 \times 10^6 \pm 1.595 \times 10^6$
70	$23.07 \times 10^6 \pm 2.100 \times 10^6$	$20.49 \times 10^6 \pm 6.208 \times 10^6$

[11 頁 Table 3]

3.2. 生細胞率

各群の培養後各時点における生細胞率を表 5 にまとめた。

表 5. 各時点における生細胞率

採取時点 (時間)	平均± 標準偏差 (%)	
	T01 : HVT-IBD-ND	T02 : HVT
30	97.3 ± 0.14	98.0 ± 0.21
40	97.0 ± 0.49	96.9 ± 0.14
45	96.1	96.5
50	94.2 ± 0.42	93.2 ± 1.41
60	86.6 ± 1.41	75.7 ± 2.62
70	77.3 ± 5.16	60.5 ± 3.04

[12 頁 Table 4]

考察 [13～14 頁 4. DISCUSSION] :

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

ウイルス価は、HVT-IBD-ND は 50 時間後に、宿主ウイルスである HVT FC126 株は 45 時間後にピークを示した。試験期間中、全時点において HVT-IBD-ND は宿主ウイルス HVT FC126 株と同等又はそれ以下であった。

CPE スコアは両群とも経時的に上昇し、全時点において同程度であった。

細胞数は、両群とも経時的に減少した。全時点において HVT-IBD-ND は宿主ウイルス HVT FC126 株と同等又はそれ以上であり、宿主ウイルス HVT FC126 株より速く感染していないと考えられた。生細胞率は、培養 30～50 時間後での 93.2～98.0% から、60 及び 70 時間後で HVT-IBD-ND が 86.6 及び 77.3%、宿主ウイルス HVT FC126 株が 75.7 及び 60.5% と低下した。宿主ウイルス HVT FC126 株で HVT-IBD-ND より大きく低下していることから、HVT-IBD-ND は、宿主ウイルス HVT FC126 株より多くの細胞に感染していないと考えられた。

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

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

目的

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

- 別紙 7：HVT-IBD-ND の体内分布及び環境中における生残性（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 8：HVT-IBD-ND の排泄及び拡散性の評価（試験番号：【社外秘につき非開示】）
- 別紙 9：HVT-IBD-ND の 25℃及び 30℃における生存性（試験番号：【社外秘につき非開示】）

ウイルスの体内分布

1) 別紙 7 の試験におけるウイルスの体内分布

- ・ 遺伝子組換えウイルス HVT-IBD-ND MSV (T02群) 及び遺伝子組換えウイルスの親株である HVT (T03群) をそれぞれ70個の18日齢発育鶏卵に0.1mL (約10⁴ PFU) ずつ卵内投与した。T01群は非投与とした。
- ・ 孵化日 (0日齢、Day 0) に健康な38羽を1群として選別し、19羽ずつアイソレーターペンに収容した。
- ・ Day 11及び22に各群から6羽 (3羽/ペン) ずつ無作為に抽出し、血液、脾臓、ファブリキウス嚢、胸腺及び羽髄を採取し、羽髄については、qPCRによるHVTの検出を実施した。それ以外のサンプルについては、鶏胚線維芽 (CEF) 細胞を用いてウイルス分離を行った。
- ・ Day 11及び22に、塵埃採取用に各ペンのフィルターを保存した。
- ・ Day 22に採取したフィルターは4分し、Day 22、23、25及び29 (フィルター採取後0、1、3及び7日) に塵埃を採取した。これらについてDay 11の塵埃サンプルと共に、CEF細胞を用いてウイルス分離を行った。表1及び図1に各サンプルからのウイルス検出結果を示す。T01の鶏からウイルスは分離されなかった。
- ・ T02及びT03の鶏では、血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓及び胸腺の白血球からウイルスが分離された。

表1. 各サンプルからのウイルス検出率 (別紙7)

群	ウイルス陽性率 (%)					
	血液		ファブリキウス嚢		肺	
	D11	D22	D11	D22	D11	D22
T01 (非投与)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)
T02 (HVT-IBD-ND)	100.0 (6/6)	0.00 (0/6)	100.0 (6/6)	16.67 (1/6)	83.3 (5/6)	16.67 (1/6)
T03 (HVT)	100.0 (6/6)	83.33 (5/6)	83.33 (5/6)	33.33 (2/6)	100.0 (6/6)	50.00 (3/6)
群	ウイルス陽性率 (%)					
	脾臓		胸腺		羽髄 ¹⁾	
	D11	D22	D11	D22	D11	D22
T01 (非投与)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/18)	0.00 (0/18)
T02 (HVT-IBD-ND)	100.0 (6/6)	0.00 (0/6)	83.33 (5/6)	0.00 (0/6)	83.33 (15/18)	11.11 (2/18)
T03 (HVT)	83.33 (5/6)	66.67 (4/6)	83.33 (5/6)	83.33 (5/6)	100.0 (18/18)	94.44 (17/18)

1)：羽髄は qPCR、他の臓器はウイルス分離によるウイルス検出

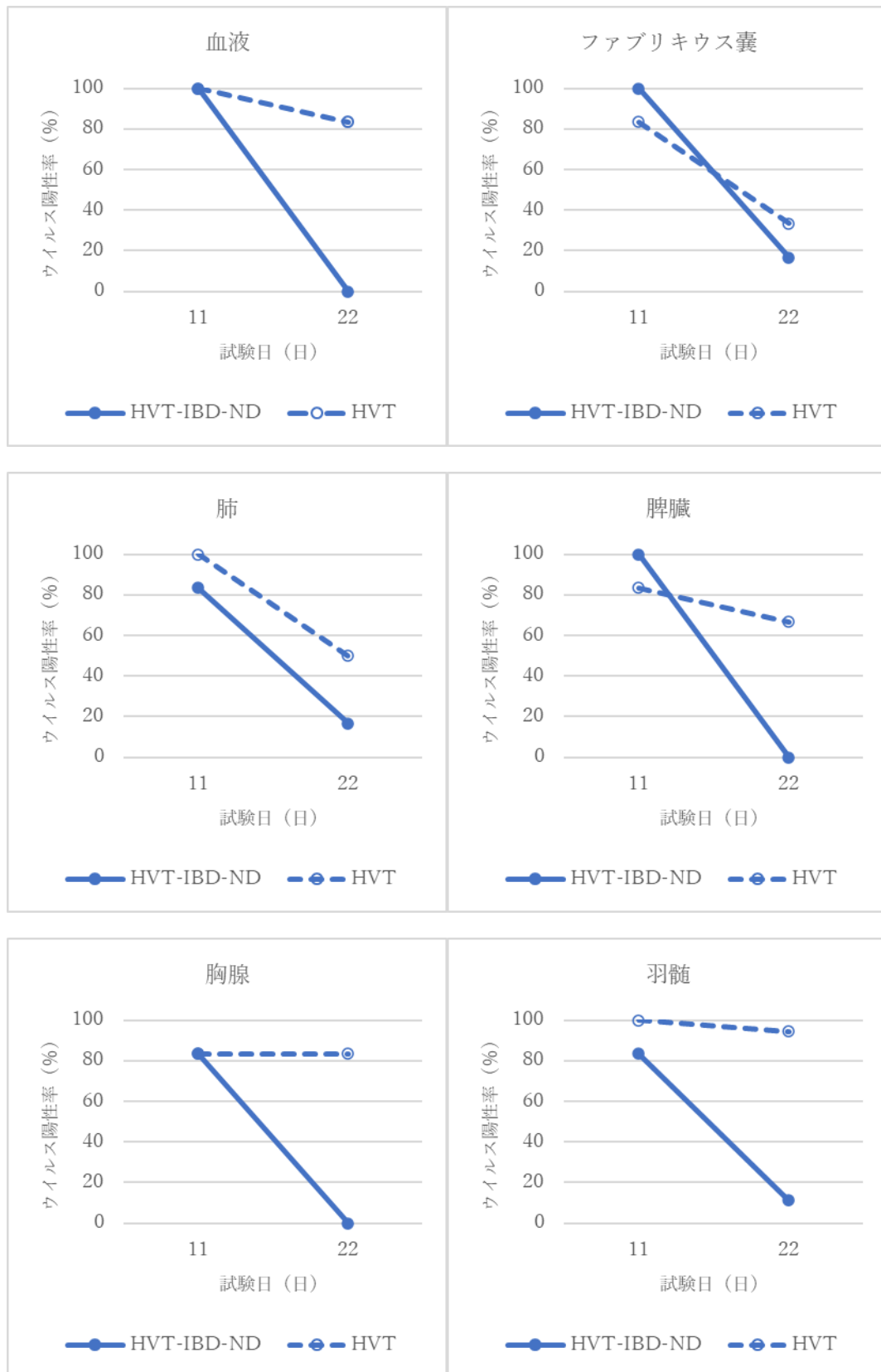


図1. HVT-IBD-ND及びHVT投与群の各サンプルにおけるウイルス陽性率（別紙7）

2) 別紙 8 の試験におけるウイルスの体内分布

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

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

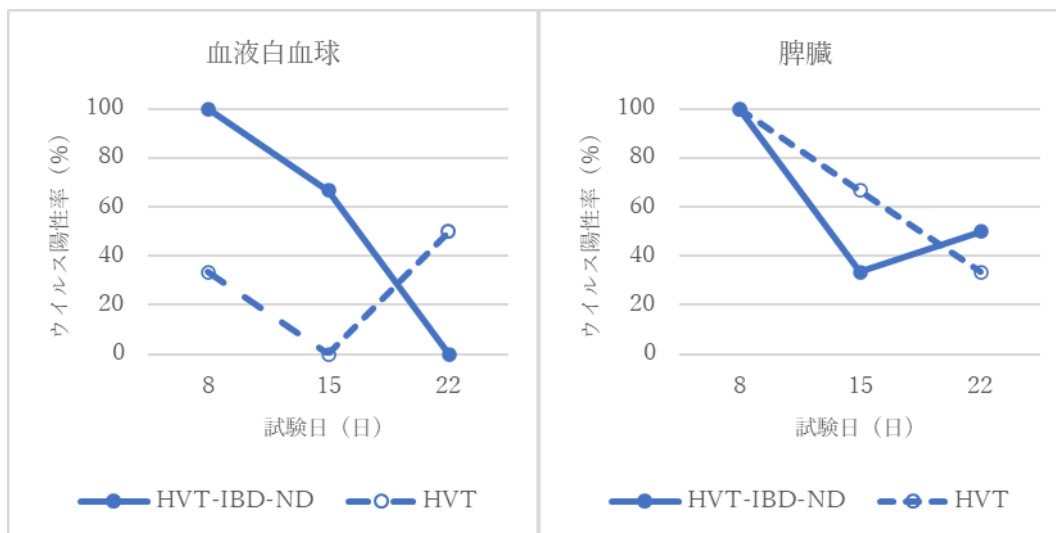
表2及び図2に各サンプルからのウイルス分離陽性率を示す。

ワクチン接種したT02及びT03について、脾臓から試験期間を通じてウイルスが検出され、血液白血球及び咽頭スワブからは少なくとも1回はウイルスが検出された。T02ではクロアカスワブからもD15にウイルスが検出されたが、T03では検出されなかった。T01では試験期間を通じてウイルスは検出されなかった。

表2. 各サンプルからのウイルス検出率（別紙8）

群	ペン	血液白血球			脾臓		
		8*	15	22	8	15	22
T01 (非投与)	01A	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T02 (HVT-IBD-ND)		100.0 (6/6)	66.67 (4/6)	0 (0/6)	100.0 (6/6)	33.33 (2/6)	50.0 (3/6)
T01 (非投与)	01B	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T03 (HVT)		33.33 (2/6)	0 (0/6)	50.0 (3/6)	100.0 (6/6)	66.67 (4/6)	33.33 (2/6)
群	ペン	クロアカスワブ			咽頭スワブ		
		8*	15	22	8	15	22
T01 (非投与)	01A	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T02 (HVT-IBD-ND)		0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)
T01 (非投与)	01B	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
T03 (HVT)		0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.67 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)

* 日齢



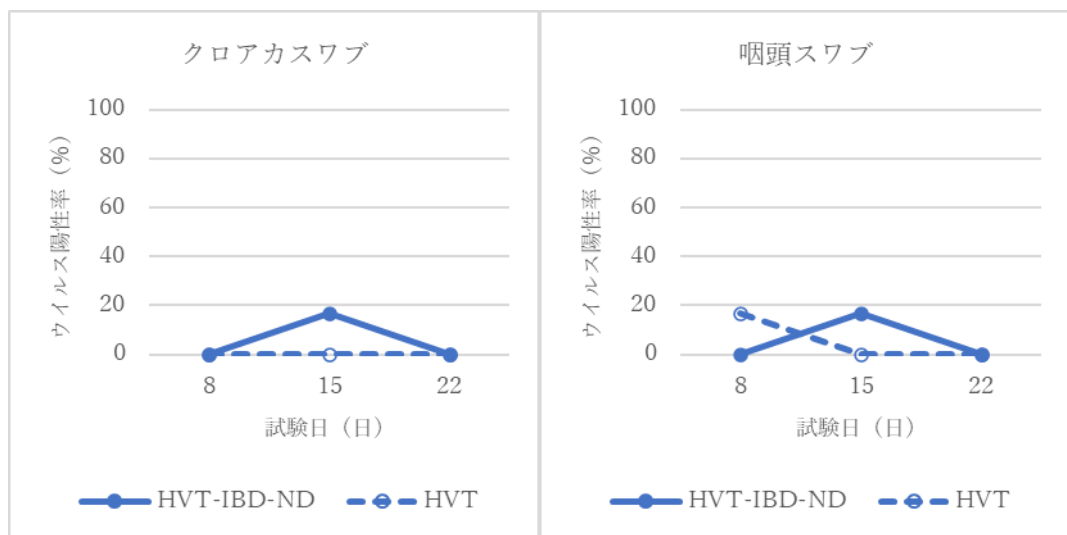


図2. HVT-IBD-ND及びHVT投与群の各サンプルにおけるウイルス陽性率（別紙8）

環境中への排泄性、生残性

1) 環境中への排泄性

① 羽髄サンプルのウイルス陽性率

別紙7の試験において、ウイルスDNAは11及び22日齢のワクチン接種鶏（T02及びT03）の羽髄に存在することが確認された（表1、図3）。

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

表3. 羽髄におけるqPCRによるHVT DNAの検出（別紙8）

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

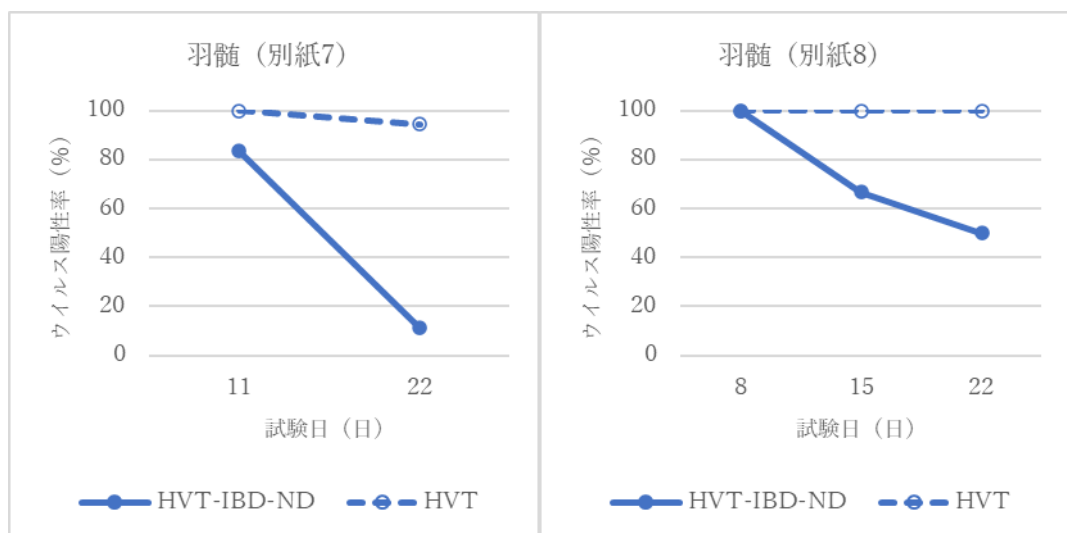


図3. 羽髄サンプルからのウイルスDNA陽性率（別紙7及び8）

② ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス陽性率

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

別紙8の試験において、ペンフィルターから採取した塵埃について、T02及びT03ともに試験期間を通じ

てウイルスは分離されなかった（表5）。

表4. ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス検出（別紙7）

群	ペン番号	ウイルス分離結果				
		D11	D22	D23*	D24*	D29*
T01 (非投与)	01B	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	02B	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
T02 (HVT-IBD-ND)	02A	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	03A	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性
T03 (HVT)	01A	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性
	03B	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性

*Day 22 のサンプルを 20～28℃で 1 日（Day 23）、3 日（Day 25）及び 7 日（Day 29）保存したサンプル。

表5. ペンフィルター塵埃サンプルにおけるウイルス分離（別紙8）

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

2) 環境中での生残性（別紙 9）

遺伝子組換えウイルスHVT-IBD-ND又はその宿主HVTを含むそれぞれのウイルス溶液について、実験室内において25℃（室温）及び30℃（養鶏場の気温）における経時的な含有量の推移について確認したところ、HVT-IBD-NDは両条件で2時間後まで、HVTは両条件で5時間後までウイルスが検出されたが、8時間以降は検出されなくなった（図4）。

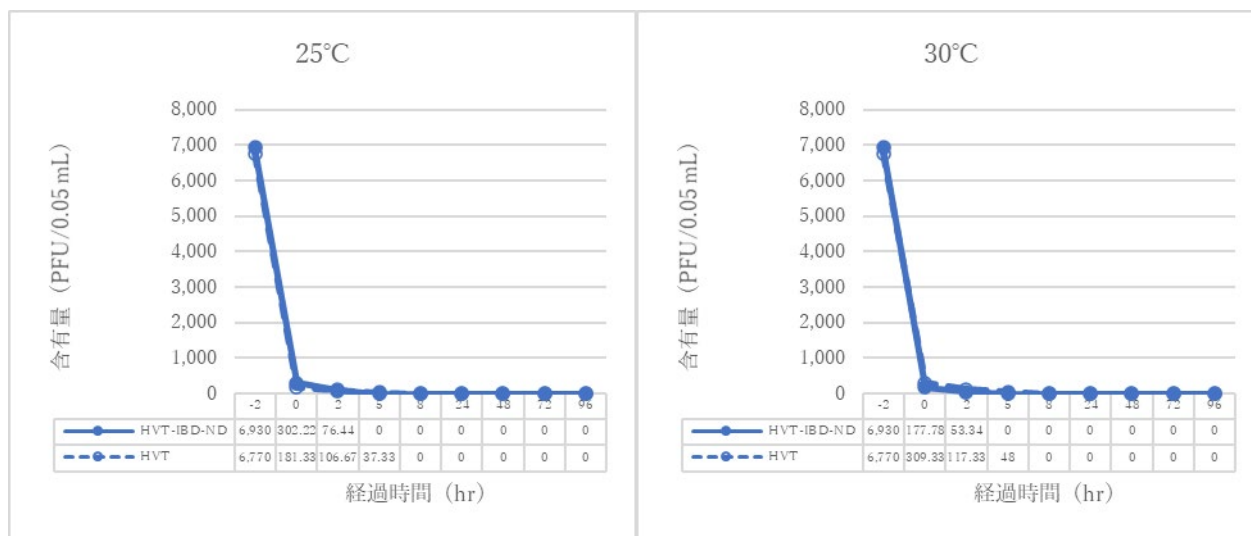


図4. 25℃及び30℃におけるウイルス含有量の推移（別紙9）

考察及び結論

- ウイルスはHVT-IBD-ND及びHVT接種群の血液、ファブリキウス嚢、肺、脾臓及び胸腺から分離された。ウイルス陽性率はHVT接種群の胸腺を除き、Day 11以降、減少傾向を示した。
- クロアカスワブ及び咽頭スワブではHVT-IBD-ND接種群において15日齢に1羽のウイルス陽性例が認められたが、HVT接種群は試験期間中陰性であった。
- 羽髄におけるHVT DNAの陽性率は、両試験ともにHVT接種群よりHVT-IBD-ND接種群の方が低い傾向にあった。
- ペンフィルター塵埃サンプルからのウイルス分離において、HVT-IBD-ND接種群及びHVT接種群ともにDay 11（別紙7）に陽性を示したが、Day 22のサンプルのサンプル、ならびにDay 22のサンプルを室温（20～28℃）で1、3及び7日間保存したサンプルからウイルスは分離されなかった（別紙7）。
- HVT-IBD-ND及びHVTウイルス溶液の25℃及び30℃における生残性は同程度であり、いずれも8時間以降、検出されなかった。
- 以上の結果から、HVT-IBD-NDの体内分布はHVTと同様であり、ウイルス陽性率についても同程度以下であったことから、HVT-IBD-NDの体内における増殖能はHVTと同等又はそれ以下と考えられる。

また、両群について羽髄からHVT DNAが検出され、一部の塵埃サンプルにおいてもウイルスが分離された。感染性HVTの排泄源は羽包の上皮細胞であり、フケ中の感染羽包細胞の落屑は、代表的なウイルス排泄メカニズムである。

HVT-IBD-NDについてもHVTと同様に排泄が予想されるが、その程度は限定的であり、宿主HVTと同等以下と考えられた。

25℃/30℃におけるウイルス含有量の推移はHVT-IBDとHVTで同様であり、いずれのウイルスもペンフィルター保存後にウイルス分離陰性であったことから、環境中での生残は確認できなかった。

また、HVT-IBD-ND及びHVTともに同居鶏への感染は認められなかった。

これらのデータから、組換えウイルスHVT-IBD-NDの組織指向性及び環境へのウイルス排泄性・生残性は宿主であるHVTの性状と一致していることが確認され、その程度はHVTと同様又はそれ以下と考えられる。

緊急措置計画書

令和 6 年 9 月 4 日

氏名 ゴエティス・ジャパン株式会社

代表取締役社長 加藤 克利

住所 東京都渋谷区代々木三丁目 22 番 7 号

第一種使用規程の承認を申請している伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子及びニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2 株 (IBDV VP2-NDV F, *Meleagrid herpesvirus 1*) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置を執ることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を執るための実施体制及び責任者

実施体制 (別添 1 として添付)

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

実施責任者は、米国又は欧州にて製造され日本に輸入される伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白質発現遺伝子及びニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-IBD-ND #42-#30 LP C2 株 (IBDV VP2-NDV F, *Meleagrid herpesvirus 1*) (以下、「本遺伝子組換えウイルス」という。) が生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められたとき、本遺伝子組換えウイルスを開発した米国の法人 (以下、米国開発法人)、輸出国である米国又は欧州の本遺伝子組換えウイルス製造法人及び日本国内に設置した業務安全委員会に連絡する。業務安全委員会は、緊急措置を執るための社内体制及び連絡窓口を通じて、実施責任者とともに緊急措置を執る。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、日本向けに輸出される本遺伝子組換えウイルスの製造状況、輸出業者等の情報提供を米国開発法人に一元的に依頼するとともに、本遺伝子組換えウイルスを使用する治験の実施機関、本遺伝子組換えウイルスの販売先及び国内販売代理店等に関する情報を把握し、その情報を整理して記録する。
- (2) (1) により把握した治験の実施機関、販売先及び国内販売代理店等に情報提供を依頼し、本遺伝子組換えウイルスを保有している者及び使用状況の把握に努め、得られた情報を整理して記録する。

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

米国開発法人に、本遺伝子組換えウイルスが日本において生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められたことを連絡する。また、米国開発法人及び輸出国である米国又は欧州の本遺伝子組換えウイルス製造法人のホームページにおいても、本件についてのお知らせを掲載するとともに、問い合わせ窓口

を設置することを協議する。

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

ただし、日本国内で実施の治験において生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、この限りではない。

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

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

5 農林水産大臣及び環境大臣への速やかな連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、速やかに農林水産省農産安全管理課（TEL：03-6744-2102）及び環境省野生生物課（TEL：03-5521-8282）に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口に報告する。

6 その他必要な事項

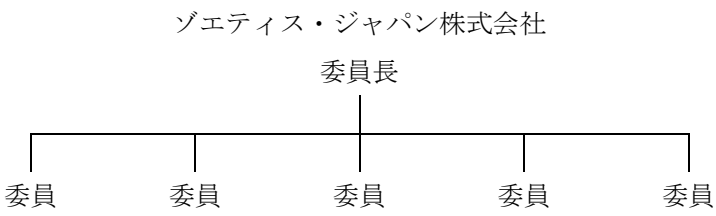
—

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

実施体制図



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