

第一種使用規程承認申請書

令和 7 年 1 月 31 日

農林水産大臣 殿
環境大臣 殿

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

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性フ ァブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥 ヘルペスウイルス HVP360 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（昭和 35 年法律第 145 号。以下「医薬品医療 機器等法」という。）第 14 条第 3 項の規定に基づき提出 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 項の規定に基づき届け出る治 験計画届及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関す る省令（平成 9 年農林水産省令第 75 号）第 7 条に基づき 作成される治験実施計画書に従った使用 ③ 医薬品医療機器等法第 14 条第 1 項の規定に基づく承認申 請に従った使用（④に該当する行為を除く。） ④ 接種（採卵鶏及び肉用鶏への接種） 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 の規定に基づき定める感染性産業廃 棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残渣の廃棄 ⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを 保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む。） ⑦ ①～⑥に付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び
伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入
七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株
(IBDV VP2、NDV F、*Meleagrid herpesvirus 1*)

生物多様性影響評価書

MSD アニマルヘルス株式会社

ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2
蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株
(IBDV VP2、NDV F、*MELEAGRID HERPESVIRUS 1*)
生物多様性影響評価書

目次

I	生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(1)	分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	1
イ	分類学上の位置・学名（属及び種）	1
ロ	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	1
ハ	宿主を誘導するために用いた遺伝子の改変の内容	1
ニ	宿主として野生株を用いる場合には、自然環境における分布状況	1
(2)	使用等の歴史及び現状	1
(3)	生理学的及び生態学（生物学）的特性	2
イ	HVT の基本的特性	2
ロ	生息又は育成（増殖）可能な環境の条件	4
ハ	捕食性又は寄生性	5
ニ	繁殖又は増殖の様式	5
ホ	病原性	6
ヘ	有害物質の産生性	6
ト	その他の情報（不活化条件等を含む。）	7
2	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	7
(1)	供与核酸に関する情報	7
イ	構成及び構成要素の由来	7
ロ	構成要素の機能	9
(2)	ベクターに関する情報	12
イ	名称及び由来	12
ロ	特性	12
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法	13
イ	宿主内に移入された核酸全体の構成	13
ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法	16
ハ	遺伝子組換え生物等の育成の過程	16
(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	18
イ	目的遺伝子が宿主の染色体に組み込まれているかプラスミドとして存在しているか等	18
ロ	移入された核酸の複製物の世代交代時における伝達の安定性	18
ハ	目的遺伝子の動物内での発現の安定性	18
(5)	遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	19
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	19
イ	遺伝子組換え微生物と、その調製に利用した宿主又はこれらの属する生物種との特性の違い	19
ロ	遺伝子組換え微生物等の宿主との識別を可能にするコロニー形成性、発色性等の特徴	23
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	23
(1)	使用等の内容	23
(2)	使用等の方法	24

(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	24
(4) 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	24
(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	24
(6) 国外における使用等により得られた情報	24
(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報	25
イ 接種動物の体内における遺伝子組換え生ワクチンの消長に関する情報	25
ロ 接種動物体及び接種動物の排泄物、血液・体液、卵等からの遺伝子組換えワクチンの環境への拡散の有無に関する情報	25
ハ 接種動物において当該遺伝子組換えワクチンの垂直感染の可能性の有無に関する情報	25
ニ 野生動物への伝播の可能性の有無に関する情報	26
ホ その他必要な情報	26
II 項目ごとの生物多様性影響評価	26
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）	26
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）	27
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）	28
4 核酸を水平伝播する性質	29
III 生物多様性影響の総合的評価	29

I 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ 分類学上の位置・学名（属及び種）

ヘルペスウイルス科 (Family: *Herpesviridae*)

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

マルディウイルス属 (Genus: *Mardivirus*)

七面鳥ヘルペスウイルス 1 型 (Species: *Meleagrid herpesvirus 1*; MeHV 1) (学名)

(英名: 七面鳥ヘルペスウイルス (Herpesvirus of Turkey; HVT) 又はマレック病ウイルス 3 型 (Marek's Disease virus 3; MDV 3))

ロ 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

七面鳥ヘルペスウイルス FC-126 株 (strain FC-126)

保存機関名称: アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC)

株番号: VR-584C

本遺伝子組換え微生物の親株として用いたウイルスは、七面鳥ヘルペスウイルス（以下「HVT」という。）であり、マレック病（以下「MD」という。）生ワクチン製造用株として使用される FC-126 株（以下、「HVT FC-126 株」という。）である。クローニングにおけるコスミドライブラリー作製のために用いられた HVT FC-126 株は、ATCC より入手した。

HVT FC-126 株はアメリカにおいて、1960 年代後半に七面鳥群から分離されたウイルスを由来とする[1]。ゲノムは線状二本鎖 DNA で、塩基数は約 165 kbp である[2]。

ハ 宿主を誘導するために用いた遺伝子的改変の内容

該当せず。

二 宿主として野生株を用いる場合には、自然環境における分布状況

—

(2) 使用等の歴史及び現状

HVT は、米国 Regional Poultry Research Laboratory（現在の Avian Disease and Oncology Laboratory）において 1968 年頃七面鳥より分離された。また、HVT は非病原性で、臨床症状を示さず、一般に七面鳥の飼育群に広く分布している。Witter らは、血清学的評価に基づき、HVT と MDV は交差反応性を有することを認めた[3]。これを契機に、HVT の非病原性、及び MDV との交差反応性を示す特性は MDV に対するワクチン株としての有力な候補となりうることが認識された。1970 年に Okazaki らにより、初生鶏への HVT FC-126 株の接種後、MD JM 株による攻撃を防御する成績が報告され[4]、1971 年に MDV に対する初めての HVT ワクチンが USDA に承認され、販売された[5]。以来、現在に至るまで HVT FC-126 株は、海外及び国内において MD 予

防のための生ワクチンに用いられ、市販されている（別添資料 1）。

MD は、病原性のマレック病ウイルス（Marek's disease virus、以下、「MDV」という。）の感染により起こるリンパ腫瘍及び神経障害を特徴とした鶏の疾病で、欧米では 1950～1960 年代から、日本では 1963 年頃より顕著化し、養鶏産業に損害をもたらす重要な疾病の 1 つである。MD の予防には生ワクチンが有効である。

HVT は、MDV に対する血清学的交差性を示すが、非病原性であることから、生ワクチンの製造に適しており、今に至るまで広く一般的に使用されている。また HVT を宿主として用いたベクターワクチンは多く開発されており、これまでニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV）、鶏伝染性喉頭気管炎ウイルスなどの遺伝子を導入することで様々な鶏の病原体に対する有効性が示され、世界各国において市販されている。

HVT ベクターワクチンの有用性は、非病原性で安全性が確立されていることに加え、ワクチン接種時に移行抗体の影響を比較的受けにくく、一回の接種で数種の病原体への免疫を付与できることが挙げられる。

日本においても、HVT を宿主とし IBDV VP2 遺伝子を導入した遺伝子組換え生ワクチン「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）が 2020 年に製造販売承認されている。

(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性

イ HVT の基本的特性

HVT は七面鳥由来の非病原性ウイルスである[1]。HVT は七面鳥において、経卵感染はしないが、空気感染・同居感染による水平感染を起こす。鶏間においての伝播は非常に僅か、またはほとんど見られない。HVT ワクチンを接種していない鶏群において、HVT 感染はほとんどみられないことから、自然状態においての七面鳥から鶏への異種間伝播はほとんど起こらないものと考えられている[6]。

HVT の自然状態における、主要感染経路や感染後の細胞における増殖動態は不明な点が多いが、遊離型ウイルスは七面鳥において羽包または皮膚のみでしか認められない[6]ことから、羽毛やフケを介した伝播が主要経路と考えられている。

HVT は二本鎖 DNA ウイルスであり、核内で複製する。病原性を有するマレック病ウイルス 1 型（以下、「MDV1」という。）及び非病原性のマレック病ウイルス 2 型（以下、「MDV2」という。）と血清学的交差性が認められることから、血清型 3（MDV3）に分類されるが、HVT の非病原性の特性からも、近年は MDV3 という呼称を用いることは少ない。

複製サイクルは以下のとおり[7]。

- ① 【吸着・侵入】HVT は、エンベロープ（図 1、A）表面の糖蛋白質（図 1、B）を介して細胞表面に吸着し、宿主細胞膜とエンベロープが膜融合して侵入、または、一旦エンドサイトーシスされた後、エンドソーム膜とエンベロープが膜融合して侵入すると考えられている。エンベロープが細胞膜に融合し、カプシド（図 1、D）が細胞内に侵入する際に、一部のテグメント物質（図 1、C）が細胞質に放出される。

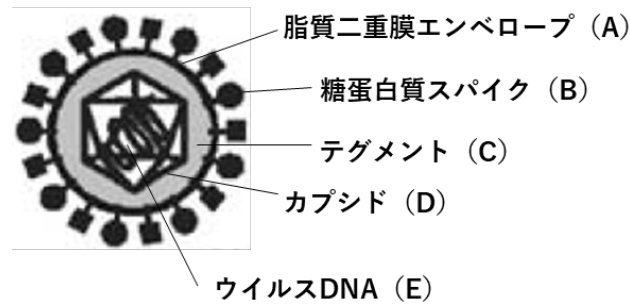


図 1 七面鳥ヘルペスウイルス粒子模式図([8]改変)

- ② 【核への輸送】細胞内に侵入したカプシドは微小管に沿って核膜孔に輸送される。核膜孔に到達したカプシドは、そこでウイルス DNA (図 1、E) を核内に注入する。核内でウイルス DNA は環状化する。
- ③ 【ウイルス DNA の複製】核内で α 遺伝子、 β 遺伝子の転写と各蛋白質の生成を経て、ウイルス DNA の複製が生じる。ウイルス DNA の複製に伴い、 γ 遺伝子群が発現し、空のカプシドが生成される。
- ④ 【DNA のパッケージング・核膜通過】ウイルスゲノムは多量体として複製された後に一定の長さに切断されてカプシド内にとりこまれる (ヌクレオカプシド)。ヌクレオカプシドは核膜内膜で一旦、一次エンベロープを獲得することによって核内外膜間に出芽し、次に一次エンベロープと核外膜が融合することによってヌクレオカプシドが細胞質に放出される。
- ⑤ 【テグメントとエンベロープ獲得】ヌクレオカプシドは細胞質でテグメント物質を獲得し、細胞質内のトランスゴルジネットワークで最終エンベロープを獲得する。
- ⑥ 【出芽】最終エンベロープを獲得したウイルス粒子はエクソサイトーシスで細胞外へ放出される。

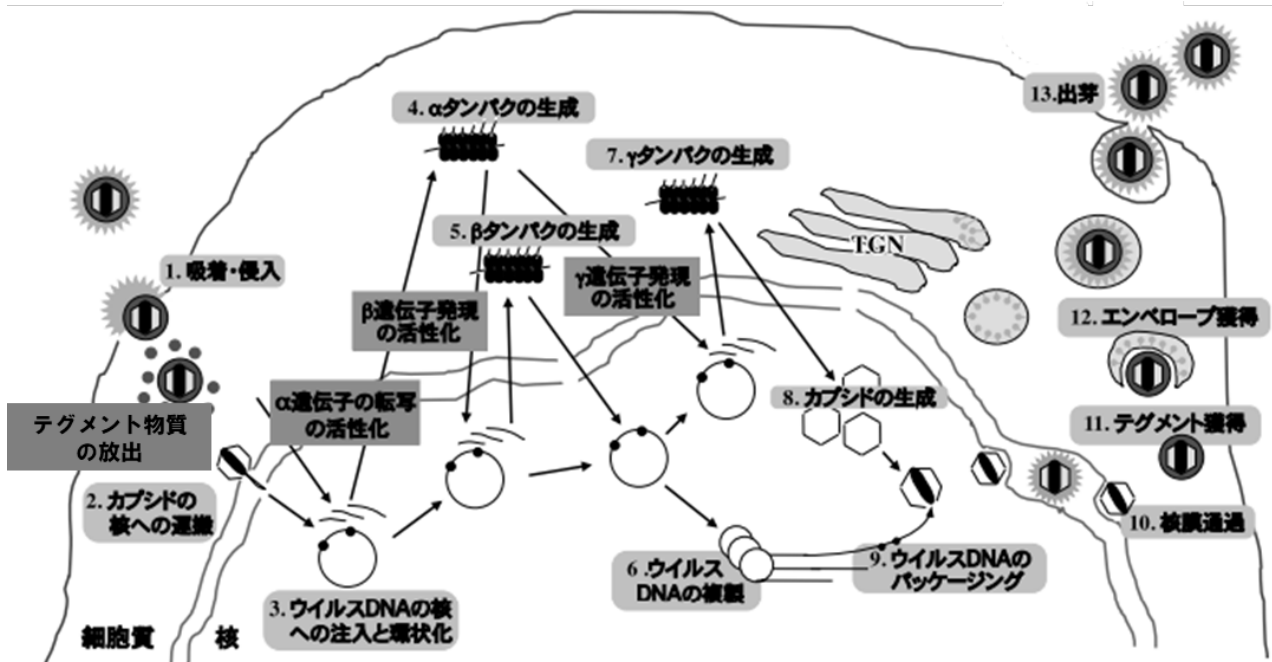


図 2 七面鳥ヘルペスウイルスを含むヘルペスウイルスの複製サイクル模式図([7]改変)

HVT のゲノム構成は、アルファヘルペスウイルス亜科のウイルスで一般的に認められる構造となっており、MDV1、MDV2、又は単純ヘルペスウイルス（HSV1）と類似している（図 3）。

ゲノムは 6 つの領域から構成されており、主な遺伝子をコードする U_L（Unique Long）領域及び U_S（Unique Short）領域があり、U_L 領域と U_S 領域の両端にそれぞれ反復配列が認められる。すなわち、U_L 領域は二つの R_L（Repeat Long）；TR_L（Terminal Repeat Long）及び IR_L（Internal Repeat Long）に挟まれており、U_S 領域は二つの R_S（Repeat Short）；IR_S（Internal Repeat Short）及び TR_S（Terminal Repeat Short）に挟まれている[9]。

HVT は MDV1 のがん蛋白質 MEQ、Cx₂C ケモカイン及び発がん性関連リン酸化蛋白質 pp24 を含まないが、リン酸化蛋白質 pp38 の領域は認められる。それぞれの反復配列である R_S 及び R_L の U_L あるいは U_S 隣接部及び領域内における著しいゲノムの相違が認められ、それらが非病原性である HVT と高病原性である MDV1 での宿主域、病原性あるいは発がん性の違いの原因であると考えられる[9]。MDV2 は MDV1 同様に鶏に分布するが、非腫瘍原性であり、T 細胞の腫瘍化に重要な役割を果たすと考えられている MEQ 遺伝子を有さない[10]。

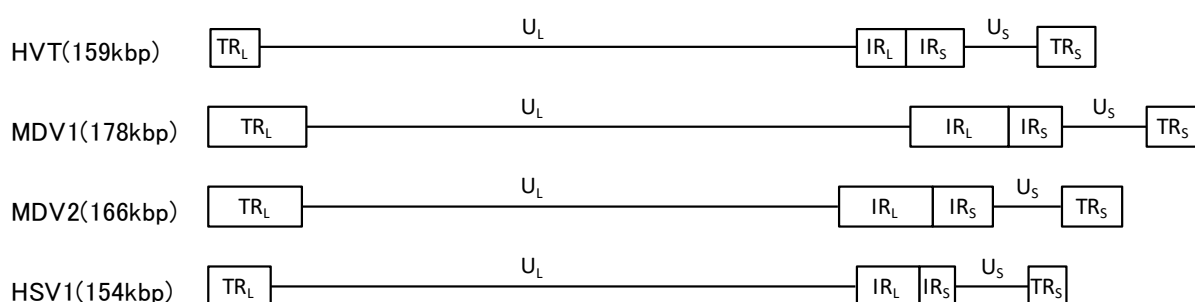


図 3 アルファヘルペスウイルス亜科のゲノム構成

HVT (MDV3)、MDV1、MDV2 及び単純ヘルペスウイルス (HSV1) の構造の模式図を示した。

ロ 生息又は育成（増殖）可能な環境の条件

HVT は健康な七面鳥由来の非病原性ウイルスで、自然界における主な保有動物は七面鳥であり、一般に七面鳥の飼育群に広く分布している。

国際鳥類学会議の World Bird List によると、七面鳥はキジ目 *Galliformes* キジ科 *Phasianidae* に属する。HVT は細胞への随伴性が高く、白血球、特にリンパ球に指向性を示し、増殖して血流によって運ばれる。そのため、HVT はリンパ球が多い臓器である脾臓、ファブリキウス嚢、胸腺及び羽包（上皮細胞）等で分離される。

七面鳥以外に実験的に HVT の感染が確認されている鳥類は、鶏[11]及びコウライキジ（別添資料 2）であり、ウズラ（ニホンウズラ）ではウズラ胚線維芽細胞への接種で HVT が感染することが報告されている[12]。感染が否定されているのは、アヒル、ハト及びコリンウズラである（別添資料 2）。コリンウズラ（キジ目ナンベイウズラ科コリン属）は、ニホンウズラ（キジ目キジ科ウズラ属）とは分類学的に大きく異なっている。

HVT に感染するキジ科の鳥類で、日本に生息するのはニホンキジ、ヤマドリ、コジュケイ、

ライチョウ等であるが、七面鳥以外に対する自然感染率は低いと考えられる。一般的に、HVT は哺乳類細胞へ感染しないとされる[13, 14]。また、HVT に他の微生物を減少させるような性質は報告されていない。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 宿主を誘導するために用いた遺伝的改変の内容

該当なし。

② 生存能力又は増殖能力

HVT は二本鎖 DNA ウイルスであり、核内で複製する（図 2）。HVT は、鶏胚線維芽（Chicken Embryo Fibroblast; CEF）細胞、七面鳥胚線維芽細胞、鶏腎細胞、DF-1 株化細胞等の鳥類の細胞で、37℃、5 % CO₂ の通常の培養条件で増殖することが知られている。

HVT は細胞への随伴性が高く、白血球、特にリンパ球に指向性を示す。リンパ球やその他の感染細胞において増殖し、感染動物においてはウイルス血症を呈す。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[15, 16]。羽包の上皮細胞では細胞遊離型ウイルスが産生され羽毛とともに脱落して環境中に放出されることで、感受性動物では水平感染が起こる[17]。自然界での主な宿主である七面鳥とは異なり、HVT が鶏に感染した際には、上皮細胞での増殖が僅か、または短期間しかみられない場合も多く、水平感染を引き起こすレベルの排泄量とならないため、鶏間の水平感染は限定的であることが知られている[17]。鶏の上皮細胞の増殖の程度はウイルス株の特性や個体の状態（健康状態、ストレス、移行抗体等）によると考えられるが、具体的には明らかにされていない。HVT は一次感染後、ヘルペスウイルスに特徴的にみられる持続的な潜伏感染状態となり、ウイルス粒子が産生されない状態となる。

鶏では垂直感染は認められない[6]。HVT FC-126 株を鶏に接種すると、早い個体で 6 日、ほとんどの個体は 3～4 週間でウイルス血症を起こす。細胞随伴性のウイルスは、接種後 1～4 日間で、肺、胸腺、ファブリキウス囊、脾臓等のリンパ組織で増殖し、その後白血球が感染することにより他の臓器に拡がっていく[15, 18, 19]。

③ 生殖の様式及び交雑性

生殖の様式

HVT は細胞への随伴性が高いが、水平感染が起こる場合、MDV と同様に鶏の羽包の上皮細胞で細胞遊離型の成熟したウイルスが産生され羽毛とともに脱落して環境中に放出されることで伝播されると考えられている。すなわち鶏間ではフケとして排泄された細胞遊離型ウイルスを吸い込むことによって感染し[20]、感染動物の体内において、胸腺、ファブリキウス囊、脾臓等のリンパ組織で増殖し、ウイルス血症を呈する。

しかし、鶏における HVT FC-126 株の感染試験において羽包の上皮細胞でウイルスが検出されるのは、接種後約 2～3 週目に認められることがあるのみであった。これは、MDV の場合では接種後短くても 6 週間（接種後 1～7 週目）で鶏の羽包の上皮細胞でウイルスが検出さ

れる[21]ことと比較すると、短期間であった。このことは、鶏から鶏への HVT の水平感染成立が乏しい理由であると考えられる[22]。

交雑性

HVT はゲノムが二本鎖 DNA であることから、構造上は安定しており、このようなウイルスにおける交雑性は相同組換えによると考えられる。アルファヘルペスウイルス科の中で極めて近縁な種同士の間（単純ヘルペスウイルスの 1 型と 2 型、馬ヘルペスウイルスの 1 型と 4 型及び牛ヘルペスウイルスの 1 型と 5 型）で交雑が起こることが知られている[23, 24]。しかしながら、HVT は、MDV1 及び MDV2 との塩基配列の相同性は低く、組換えが起こる可能性は極めて低いと考えられる。実際、MDV の多価ワクチンは世界中で多く使用されているが、HVT と MDV1 又は MDV2 との間で相同組換えが起こったという報告はない[25]。

ホ 病原性

HVT は健康な七面鳥から分離されたウイルスであり、七面鳥及び鶏に病原性を示さない[1]。HVT に感染した鶏ではウイルス粒子が産生されない状態で、持続感染状態となり、抗体が生涯持続する[26]。本来の保有動物以外に実験的に HVT の感染が確認されている鳥類は、鶏[11]、ウズラ（ニホンウズラ）[26]及びコウライキジ（別添資料 2、日本に生息するキジの近縁種）であり、感染が否定されているのは、アヒル（別添資料 3）、ハト（別添資料 2、3）、コリンウズラ（別添資料 2）である。また HVT FC-126 株はマウスへの接種試験において、増殖せず、臨床症状を示さなかったことが確認されている（別添資料 4）。

前述の通り、HVT は MDV1 と血清学的に交差するものの、MDV1 のがん蛋白質 MEQ、CxC ケモカイン及び発がん性関連リン酸化蛋白質 pp24 を含まない。それぞれの反復配列である Rs 及び RL の UL あるいは US 隣接部及び領域内における著しいゲノムの相違が認められ、それらが非病原性である HVT と高病原性である MDV1 での宿主域、病原性あるいは発がん性の違いの原因であると考えられる[9]。

へ 有害物質の産生性

HVT が有害物質を生産するとの報告はない*。

HVT FC-126 株の全塩基配列（アクセッション番号：AF291866）から予測されるアミノ酸配列からアレルゲンデータベース ADSF（Allergen Database for Food Safety (nih.go.jp)）によって検索しても FAO/WHO の方法で推奨される 35%以上の相同性のあるアレルゲンは検索されなかった。また、HVT は鶏のマレック病に対するワクチンとして 1970 年から使用されているが、野生動植物の生育に問題を生じさせるような報告は認められなかったことから、有害物質の産生性はないと考えられる。

*製造元における申請書記載内容並びに 2023 年 5 月以前の PubMed による文献検索を実施。

キーワード：NDV F protein, IBDV VP2, turkey herpesvirus, avian, allergy

ト その他の情報（不活化条件等を含む。）

宿主 HVT は細胞随伴性が高いウイルスであるため、環境水中で細胞が破壊されると複製できなくなると考えられる。また、ヘルペスウイルスはエンベロープを有するウイルスであり、陽イオン活性剤系、両性界面活性剤系、ピグアナイド系、アルデヒド系及びハロゲン系消毒剤で不活化される[27]。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本遺伝子組換え微生物は、マレック病生ワクチン製造用株として使用される HVT FC-126 株を宿主として、NDV 由来 F 蛋白質をコードする *F* 遺伝子（以下、「*F* 遺伝子」という。）と IBDV 由来 VP2 蛋白質をコードする *VP2* 遺伝子（以下、「*VP2* 遺伝子」という。）が挿入されたウイルスである。

供与核酸のうち発現させるコード領域の由来となった供与体のニューカッスル病ウイルス（Newcastle Disease Virus; NDV）及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（Infectious Bursal Disease Virus; IBDV）の性状の概要については以下のとおりである。

NDV：パラミクソウイルス科（*Paramyxoviridae*）ルブラウイルス属（*Rubulavirus*）に分類される非分節線状マイナス一本鎖 RNA ウイルスである。ウイルスゲノムは約 15 kb で、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している[28]。

IBDV：ビルナウイルス科（*Birnaviridae*）アビビルナウイルス属（*Avibirnavirus*）に分類される二分節線状二本鎖 RNA ウイルスである。セグメント A は構造蛋白質である VP2 と VP3 及びセリンプロテアーゼである VP4 をコードしている。これら 3 つの蛋白質は 1 つのポリ蛋白質として翻訳され、自己切断される。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[29]。

NDV 由来 *F* 遺伝子及び IBDV 由来 *VP2* 遺伝子のそれぞれを導入した七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株の作出に用いられた供与核酸 *F* 遺伝子及び *VP2* 遺伝子を含む発現カセット（一部 HVT ゲノム配列を含む。以下、「*F-VP2* 発現カセット」という。）の構成（図 4）及び構成要素（表 1）は以下のとおりである（別添資料 5）。

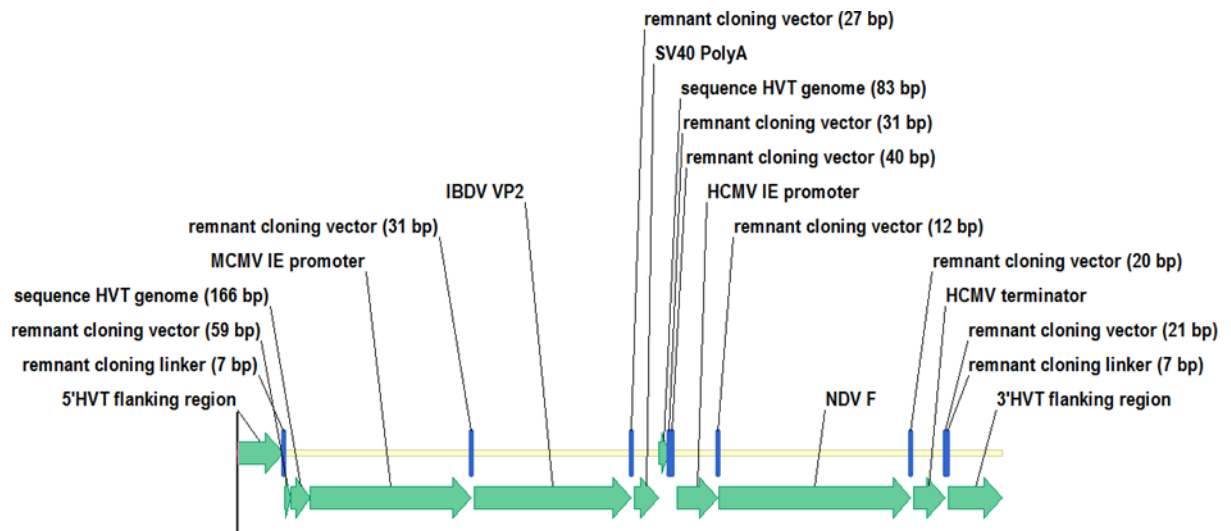


図4 供与核酸 *F* 遺伝子及び *VP2* 遺伝子を含む発現カセット (*F-VP2* 発現カセット) の構成

発現カセットを構成する各遺伝子 (薄青緑色の矢印) を示している。発現カセット構築時に生じたクローニングサイト及びリンカーの残存配列 (青色) 並びに残存 HVT 遺伝子を示している (上段)。なお、この塩基配列 (6,674 bp) についてはアクセッション LQ585128 として登録されている。

表 1 供与核酸 *F-VP2* 発現カセットの各構成要素(図 4 の左から順に記載)

構成要素	サイズ	構成要素の由来
クローニング配列 及びリンカー配列	59 bp 及び 7 bp	【社外秘につき非開示】の残存クローニング配列及びプラスミドベクター pSC-A 由来のマルチクローニングサイト(MCS) 残存配列並びに残存 <i>HindIII</i> リンカー配列
HVT ゲノム配列	166 bp	【社外秘につき非開示】で IBDV <i>VP2</i> 発現カセット挿入部位である HVT FC-126 株 <i>UL</i> 領域のオープンリーディングフレーム (Open Reading Frame; ORF) HVT065 (<i>UL55</i>) から ORF HVT066 の一部配列
マウスサイトメガロウイルス 早初期遺伝子プロモーター配列	1,391 bp	【社外秘につき非開示】のマウスサイトメガロウイルス (mCMV) 早初期遺伝子 (Immediate early gene; <i>IE</i>) のプロモーター配列
クローニング配列	31 bp	【社外秘につき非開示】の残存 MCS 制限酵素認識配列
IBDV <i>VP2</i> 配列	1,359 bp	【社外秘につき非開示】で、IBDV Faragher 52/70 株の <i>VP2</i> [30]
クローニング配列	27 bp	【社外秘につき非開示】の残存 MCS 制限酵素認識配列
SV40 ポリ(A)シグナル配列	210 bp	【社外秘につき非開示】で、プラスミドベクター pSP64 <i>PolyA</i> (別紙図 2) の SV40 <i>PolyA</i> シグナル配列 (<i>PolyA</i> ; <i>dA:dT</i>)
HVT ゲノム配列	83 bp	【社外秘につき非開示】で IBDV <i>VP2</i> 発現カセット挿入部位である HVT FC-126 株 <i>UL</i> 領域の ORF HVT065 (<i>UL55</i>) の一部配列
クローニング配列	31 bp 及び 40 bp	【社外秘につき非開示】の残存 MCS 制限酵素認識配列及びその他残存制限酵素認識配列
ヒトサイトメガロウイルス 早初期プロモーター配列	357 bp	プラスミドベクター pI.18 の PCR を行ってクローニングしたヒトサイトメガロウイルス (Human cytomegalovirus; hCMV) AD169 株の <i>IE</i> プロモーター配列
クローニング配列	12 bp	残存制限酵素認識配列
NDV <i>F</i> 配列	1,662 bp	NDV ワクチン株 Clone30 の <i>F</i> 遺伝子を挿入したプラスミドクローン pNDV04 (別紙図 14) から PCR を行って得られた <i>F</i> 配列
クローニング配列	20 bp	残存制限酵素認識配列
hCMV ターミネーター配列	273 bp	プラスミドベクター pI.18 からクローニングした hCMV AD169 株のターミネーター配列
クローニング配列 及びリンカー配列	21 bp 及び 7 bp	残存制限酵素認識配列及び残存 <i>NcoI</i> リンカー配列

ロ 構成要素の機能

供与核酸 *F-VP2* 発現カセット (図 5) は、mCMV *IE* プロモーター (「mIE」) と SV40 *PolyA* によって IBDV *VP2* のコード領域を転写発現させるカセット及び hCMV *IE* プロモーター (「hIE」) と hCMV *IE* ターミネーター (「term.」) によって NDV *F* を転写発現させるカセット

を連結したものである。詳細な構成要素については表 2 に示した。

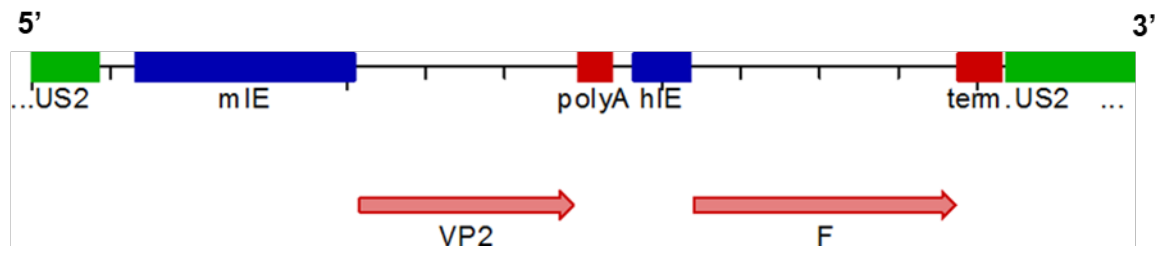


図 5 *F-VP2* 発現カセットの構成要素

プロモーター配列：青色、ターミネーター配列：赤色、発現遺伝子の開始コドンから終止コドンまでの ORF 含むコード領域：赤矢印、宿主ゲノムのオーバーラップ領域である *US2* 遺伝子：緑色。黒線の 1 目盛りは 500 塩基相当を示す。mIE:mCMV *IE* プロモーター、hIE:hCMV *IE* プロモーター、term.:hCMV *IE* ターミネーター、PolyA:SV40 *PolyA*

表 2 供与核酸 F-VP2 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
クローニング配列 及びリンカー配列	残存マルチクローニングサイト(MCS)配列等であり、発現プロモーター等の遺伝子発現調節に関わる配列を含まず、鳥類を含め動物の真核細胞においては何も機能しない。
HVT ゲノム配列	残存 HVT 配列であって、ORF やプロモーター等の遺伝子として必要な単位を有しておらず、何も機能しない。
mCMV <i>IE</i> プロモーター配列	鳥類を含め動物の真核細胞において、安定的な転写活性作用を持つ。分子学的研究における遺伝子発現用プロモーターとして一般的に用いられる。
クローニング配列	残存 MCS 配列等であり、発現プロモーター等の遺伝子発現調節に関わる配列を含まず、鳥類を含め動物の真核細胞においては何も機能しない。
IBDV <i>VP2</i> 配列	mCMV <i>IE</i> プロモーター制御下で発現させるための IBDV <i>VP2</i> の ORF。IBDV <i>VP2</i> 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。 <i>VP2</i> 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[31]。 <i>VP2</i> は露出部に位置する親水性の可変領域を持つ。 <i>VP2</i> の露出部はアミノ酸 206-350 の間の蛋白質に認められ、宿主の中和抗体応答誘導を担う[32]。
クローニング配列	残存 MCS 配列等であり、発現プロモーター等の遺伝子発現調節に関わる配列を含まず、鳥類を含め動物の真核細胞においては何も機能しない。
SV40 ポリ(A)シグナル配列	鳥類を含め動物の真核細胞において、mRNA 転写終了作用及び mRNA の 3' 端に <i>PolyA</i> 配列を付加するポリアダニレーション活性を有する[33]。
HVT ゲノム配列	残存 HVT 配列であって、ORF やプロモーター等の遺伝子として必要な単位を有しておらず、何も機能しない。
クローニング配列	残存 MCS 配列等であり、発現プロモーター等の遺伝子発現調節に関わる配列を含まず、鳥類を含め動物の真核細胞においては何も機能しない。
hCMV <i>IE</i> プロモーター配列	鳥類を含め動物の真核細胞において、安定的な mRNA 転写開始作用を持つ。分子学的研究における遺伝子発現用プロモーターとして一般的に用いられる。
クローニング配列	残存 MCS 配列等であり、発現プロモーター等の遺伝子発現調節に関わる配列を含まず、鳥類を含め動物の真核細胞においては何も機能しない。
NDV <i>F</i> 配列	hCMV <i>IE</i> プロモーター制御下で発現させるための NDV <i>F</i> の ORF。 <i>F</i> 蛋白質は膜通過型の糖蛋白質である。 <i>F</i> 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。 <i>F</i> 蛋白質単独では膜融合活性を発現しない[34]。
クローニング配列	残存 MCS 配列等であり、発現プロモーター等の遺伝子発現調節に関わる配列を含まず、鳥類を含め動物の真核細胞においては何も機能しない。
hCMV ターミネーター配列	鳥類を含め動物の真核細胞において、mRNA 転写終了作用及び mRNA の 3' 端に <i>PolyA</i> 配列を付加するポリアダニレーション活性を有する。
クローニング配列 及びリンカー配列	残存 MCS 配列等であり、発現プロモーター等の遺伝子発現調節に関わる配列を含まず、鳥類を含め動物の真核細胞においては何も機能しない。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

① HVT ゲノムの再構築（後述）に用いたコスミド又はプラスミドクローン

【社外秘につき非開示】

② サブゲノムクローンを作成するために用いたコスミド及びプラスミドベクター

i コスミド pWE15（別紙図 1）

pWE15 は Addgene ; ATCC (37503) 等から入手できる一般的なクローニング用コスミドベクターで、全塩基配列が決定されている (X65279, M99569)。

ii プラスミド pSP64 Poly(A)（略表記 pSP64、別紙図 2）

pSP64 は Promega 等から入手できるクローニングベクターで、全塩基配列が決定されている (X65328)。

iii コスミド pSY1005

pSY1005 は pHC79（別紙図 3）から主にテトラサイクリン耐性遺伝子を含む *HindIII-AvaI* 断片を除去し平滑化後、pWE15 の *EcoRI-EcoRI* 平滑化ポリリンカー（68bp）をライゲーションしたものである。pHC79 は Bethesda Research Labs (BRL) 等のほか Addgene ; ATCC (37030) 等から入手できる一般的なクローニング用コスミドベクターで、全塩基配列が決定されている (L08873)。

iv プラスミド pBR322（別紙図 4）

pBR322 は BRL 及び Promega 等から入手できる古くから使われてきているクローニング用ベクターの 1 つで、全塩基配列が決定されている (M10785, M10786, M33694)。

v プラスミド pSC-A-amp/kan（略表記 pSC-A、別紙図 5）

pSC-A-amp/kan は Agilent Technologies 等から入手できる PCR 産物のクローニング用ベクターで、全塩基配列が決定されている。

vi プラスミド pI.18（別紙図 6）

pI.18 は National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) 等から入手できる動物細胞発現ベクターで、全塩基配列が決定されている。

ロ 特性

i コスミド pWE15

pWE15 は、ファージに取り込まれるための COS 領域（cos : 別紙図 1、①）、大腸菌の複製開始点（Col E1 ori : 別紙図 1、②）やシミアンウイルス 40 複製開始点（SV40 ori : 別紙図 1、③）を持つほか、アンピシリン耐性遺伝子¹（Amp^r : 別紙図 1、④）及びネオマイシン/カナマイシン耐性遺伝子²（Neo^r : 別紙図 1、⑤）並びに *in vitro* RNA 転写反応用に *T3/T7* プロモーター（別紙図 1、⑥及び⑦）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。

ii プラスミド pSP64

¹ アンピシリン耐性遺伝子:アンピシリン含有培地で遺伝子導入大腸菌の選択マーカーとして使用される耐性遺伝子である。ベクターマップ内に、Amp^r、AP^r、amp、ampicillin、bla の表記で示す。

² ネオマイシン/カナマイシン耐性遺伝子:アンピシリン含有培地で遺伝子導入大腸菌の選択マーカーとして使用される耐性遺伝子である。ベクターマップ内に、Neo^r の表記で示す。

pSP64 は、大腸菌の複製開始点 (ori : 別紙図 2、①) を持つほか、アンピシリン耐性遺伝子¹ (Amp^r : 別紙図 2、②) や *in vitro* RNA 転写反応に *SP6* プロモーター (SP6 : 別紙図 2、③) 及び SV40 由来 *poly(A)* (dA:dT : 別紙図 2、④) シグナル配列を有するが、病原性や伝達性に関与する遺伝子は保有しない。

iii コスミド pSY1005

pSY1005 は pHC79 から作製されたコスミドであり、その特性の違いはテトラサイクリン耐性ではない点で、それ以外は pHC79 と同一である。

pHC79 は、ファージに取り込まれるための COS 領域 (cos : 別紙図 3、①) や大腸菌の複製開始点 (ori : 別紙図 3、②) を持つほかアンピシリン耐性遺伝子¹ (APr : 別紙図 3、③) 及びテトラサイクリン耐性遺伝子² (TCr : 別紙図 3、④) 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。

iv プラスミド pBR322

pBR322 は、大腸菌の複製開始点 (ori : 別紙図 4、①)、アンピシリン耐性遺伝子¹ (amp : 別紙図 4、②) 及びテトラサイクリン耐性遺伝子² (tet : 別紙図 4、③) 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。

v プラスミド pSC-A-amp/kan

pSC-A-amp/kan は、大腸菌の複製開始点 (pUC ori : 別紙図 5、①) やカラー選択用の *LacZ* (lacZ : 別紙図 5、②) を持つほか、アンピシリン耐性遺伝子¹ (ampicillin : 別紙図 5、③) 及びカナマイシン耐性遺伝子³ (kanamycin : 別紙図 5、④) 並びに *in vitro* RNA 転写反応に *T3/T7* プロモーター (T3/T7 primer binding site : 別紙図 5、⑤及び⑥) 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。

vi プラスミド pL18

pL18 は National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) 等から入手できる動物細胞発現ベクターで、全塩基配列が決定されている。遺伝子発現のためのヒトサイトメガロウイルス AD169 株 (X17403) 由来の *IE* プロモーター (IE : 別紙図 6、①)、エンハンサーであるイントロン A 遺伝子 (intronA : 別紙図 6、②)、ターミネーター (term. : 別紙図 6、③) 及びアンピシリン耐性遺伝子¹ (bla : 別紙図 6、④) 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) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

供与核酸 F-VP2 発現カセットを挿入するため、トランスファーベクター 435VEC60 (図 8) を用いた。435VEC60 は、HVT ゲノム断片 (HVT US 領域の大部分を含む 7.3kb の *EcoRI* 断

¹ アンピシリン耐性遺伝子:アンピシリン含有培地で遺伝子導入大腸菌の選択マーカーとして使用される耐性遺伝子である。ベクターマップ内に、Amp^r、APr、amp、ampicillin、bla の表記で示す。

² テトラサイクリン耐性遺伝子:アンピシリン含有培地で遺伝子導入大腸菌の選択マーカーとして使用される耐性遺伝子である。ベクターマップ内に、TCr、tet の表記で示す。

³ カナマイシン耐性遺伝子:カナマイシン含有培地で遺伝子導入大腸菌の選択マーカーとして使用される耐性遺伝子である。ベクターマップ内に、kanamycin の表記で示す。

片) を pSP64 ベクターにクローニングすることによって構築した。F 遺伝子、VP2 遺伝子、及びその制御配列は、数段階のクローニングステップを経て、435VEC60 に挿入された。以下にクローニング詳細を記載する。

① 調製方法の概要

本遺伝子組換え微生物を作成するにあたっては、オーバーラッピングクローン共導入法を用いた。宿主ゲノムサブクローンを線形化して培養細胞に共トランスフェクトすると、オーバーラップした領域で相同組換えが起き、完全長の宿主ゲノムが再構成されて宿主が復元される[35]。

まず、宿主ゲノム全長をカバーする 5 断片のサブゲノムクローンを作製し、隣接する断片同士がオーバーラップするようにコスミド又はプラスミドにクローニングした (図 6)。サブゲノムクローンのうち 1 つから、挿入の目的部位を含む断片をさらにオーバーラップ配列を付加した三分割にし、その中央断片に遺伝子発現カセットを挿入したクローンを作成した。これら 3 クローンとともに残りの 4 クローンを培養細胞に共トランスフェクトする。これにより、完全長のゲノムが再構築されるため、産生されるウイルスはすべて遺伝子組換え微生物であり、通常の相同組換え法よりも効果的に遺伝子組換えを行うことができる。

② 調整方法の詳細

i 宿主 HVT FC-126 株のサブゲノムクローンの構築

【社外秘につき非開示】

ii VP2 遺伝子挿入断片

表 3 IBDV VP2 遺伝子供与配列の詳細【社外秘につき非開示】

Start	End	名称	説明
1	21	HVT66A-R	FC126 株ゲノムのプライマー配列
1	166	HVT ゲノム配列	【社外秘につき非開示】で IBDV VP2 発現カセット挿入部位である HVT FC-126 株 U_L 領域のオープンリーディングフレーム (Open Reading Frame; ORF) HVT065 (U_L55) から ORF HVT066 の一部配列
167	1557	マウスサイトメガロウイルス早初期遺伝子プロモーター配列	【社外秘につき非開示】のマウスサイトメガロウイルス (mCMV) 早初期遺伝子 (Immediate early gene; IE) のプロモーター配列
1558	1588	クローニング配列	【社外秘につき非開示】の残存 MCS 制限酵素認識配列
1589	2947	IBDV VP2 配列	【社外秘につき非開示】で、IBDV Faragher 52/70 株の VP2[30]
2951	2977	クローニング配列	【社外秘につき非開示】の残存 MCS 制限酵素認識配列
2978	3187	SV40 ポリ(A)シグナル	【社外秘につき非開示】で、プラスミドベクター pSP64 PolyA (別紙図

		配列	2) の SV40 <i>PolyA</i> シグナル配列 (<i>PolyA</i>)
3188	3270	HVT ゲノム配列	【社外秘につき非開示】で IB DV VP2 発現カセット挿入部位である HVT FC-126 株 U _L 領域の ORF HVT065 (<i>UL55</i>) の一部配列
3252	3270	UL55 3' end	FC126 株ゲノムのプライマー配列

iii *F*遺伝子挿入断片

【社外秘につき非開示】

表 4 NDV *F* 遺伝子供与配列の詳細

Start	End	名称	説明
1	46	クローニング配列	残存制限酵素認識配列
47	403	ヒトサイトメガロウイルス 早初期プロモーター 配列	プラスミドベクターpI.18 の PCR を行ってクローニングしたヒトサイト メガロウイルス (Human cytomegalovirus; hCMV) AD169 株の <i>IE</i> プロ モーター配列
404	415	クローニング配列	残存制限酵素認識配列
416	2077	NDV <i>F</i> 配列	NDV ワクチン株 Clone30 の <i>F</i> 遺伝子を挿入したプラスミドクローン pNDV04 (別紙図 14) から PCR を行って得られた <i>F</i> 配列
2078	2097	クローニング配列	残存制限酵素認識配列
2098	2370	hCMV ターミネーター 配列	プラスミドベクターpI.18 からクローニングした hCMV AD169 株のタ ーミネーター配列
2371	2391	クローニング配列	残存制限酵素認識配列

【社外秘につき非開示】

iv *F-VP2*発現カセットの構築

【社外秘につき非開示】

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

【社外秘につき非開示】し、蛍光抗体法により、*F* 蛋白質及び *VP2* 蛋白質の発現を確認した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の過程

増殖ウイルスは明瞭な細胞変性効果を示しプラックを形成することから、いくつかのプラックを純化し、蛍光抗体法で *F* 蛋白質及び *VP2* 蛋白質の発現を確認しつつ2つの遺伝子組換え微生物 HVP360 株の候補 (A1 及び B1) を選抜した。さらに遺伝子組換え微生物の安定性等を確認したもののうち、HVP360 株 A1 を最終的な HVP360 株とした (別添資料 5)。

このウイルスを CEF で培養して、凍結保管したものを 1 継代目とした。これを用いて、【社外秘につき非開示】に牛血清と DMSO を加えて液体窒素内に保存した。トランスフェクションによる組換え体作出から HVP360 株 MSV 確立までの過程を図 10 に記載した。

MSV の DNA 配列分析を実施し、*F-VP2*発現カセット、相同組換え領域、及びその周辺 HVT 領域の解析によって、MSV において発現カセットが HVT ゲノムの US2 領域に正しく組み込まれていることが確認された。また、相同組換え領域の 5'及び 3'領域、ならびに HVT 隣接

領域の DNA 配列は 親ベクターと同一であり、組換えが意図した通りに起こったことが示された（別添資料 6）。

【社外秘につき非開示】

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

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

本遺伝子組換え微生物を作製するにあたっては、宿主である HVT FC-126 株のゲノム内に取り込まれるように設計され、目的の場所に挿入された遺伝子組換え微生物を選択した。

オーバーラッピングクローン共導入法によって再構築された本遺伝子組換え微生物は、そのゲノム DNA のサザンブロット解析により、HVT のゲノムが再構築され、期待通りに *US2* 内に供与核酸 *F-VP2* 発現カセット 1 コピーが正しい方向に挿入されたことが確認された（別添資料 7）。また、DNA 配列分析においても、*F-VP2* 発現カセットが HVT ゲノムの *US2* 領域に正しく組み込まれていることが確認された（別添資料 6）。

ロ 移入された核酸の複製物の世代交代時における伝達の安定性

2 つのブラック純化した HVP360 株候補である A1 及び B1 は CEF 細胞で 15 回継代し、VP2 蛋白質及び F 蛋白質の発現について免疫蛍光抗体法（IFA）¹により調べた。その結果、5 代継代、10 代継代及び 15 代継代で分析したブラック（100 ブラック以上）の 100%において F 蛋白質及び VP2 蛋白質が同時に発現していることを確認した（別添資料 5）。

また、MSV を CEF 細胞で 6 回継代して製造したワクチン 3 ロットの DNA 配列分析において、3 ロットの発現カセット及び隣接領域の配列はいずれも MSV における配列と変わらず同一であり、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が確認されている（別添資料 7）。

ハ 目的遺伝子の動物内での発現の安定性

18 日齢の SPF 発育鶏卵に HVP360 株の MSV を 2 代継代したものを卵内（*in ovo*）接種し、孵化させた後、最長 5 週齢まで飼養した鶏の白血球、脾臓及びファブリキウス囊から経時的に分離されたすべての HVP360 株が F 蛋白質及び VP2 蛋白質を発現することを IFA によって確認した（別添資料 8）。

F-VP2 発現カセット内の 2 つの目的遺伝子は宿主内で発現しないが、HVT 感受性細胞等に本遺伝子組換え微生物が感染した場合は、細胞内でそれら目的遺伝子が発現する。*F-VP2* 発現カセットの *F* 遺伝子及び *VP2* 遺伝子は、それぞれ mCMV *IE* プロモーター及び hCMV *IE* プロモーターで制御され、宿主 HVT にコードされているポリメラーゼによる遺伝子転写の制御系列とは異なるため、宿主遺伝子の発現には影響を与えないと考えられる。また、F 蛋白質及び VP2 蛋白質は各供与体における他の蛋白質の影響は受けないようにそれぞれ単独発現となるようにプロモーターとターミネーターを選択しており、いずれの蛋白質も細胞膜を貫通するためのシグナルペプチド配列を含んでいないことから、HVT のエンベロープ等ウイルス粒子に取り込まれることはないと考えられる。

以上のことから、*in vitro* 及び *in vivo* いずれにおいても、HVP360 株の供与核酸 *F-VP2* 発現カセットは HVT のゲノム中に安定的に存在していることが明らかとなった。

¹ IFA(間接蛍光抗体法): 特異的な抗原試料に対する抗体を蛍光顕微鏡下で検出する方法であり、抗原特異的な一次抗体と蛍光色素で標識付けした二次抗体を用いる。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本遺伝子組換え微生物については PCR によって検出する方法が確立されており（別添資料 9）、宿主とは挿入遺伝子の検出によって識別が可能である。プライマーの設計は図に示した通りで、宿主由来遺伝子領域、*VP2* 遺伝子終末部から *F* 遺伝子開始部の遺伝子領域、*F* 遺伝子終末部から宿主遺伝子に結合する領域を検出する。図 11 内の 3-F 及び 4-R のプライマーを用いた際の感度は、0.02 PFU で検出可能であったことが確認されている。

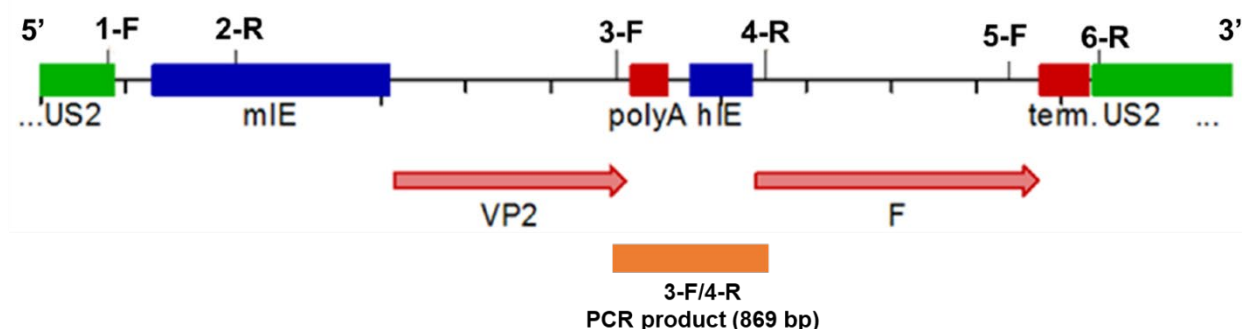


図 11 F-VP2 発現カセットとプライマーの位置

プライマー 3-F (VP2-F-FW: GAAGATTGCAGGAGCATTTG) 及び 4-R (VP2-F-REV: TCGGACAGTCAGCATCATAG) の産物は 869 bp となる。

(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らの属する生物種との特性の違い

① 増殖様式（ウイルス血症及び新たな感染性ウイルスの発生の有無）

F-VP2 発現カセットが挿入された HVT *US2* 遺伝子の HVT における機能は明らかになっていない[9]。MDV においては、水平感染成立機序への関連を示唆する報告[36]もあるが、*US2* 遺伝子は少なくとも培養細胞におけるウイルス増殖に必須の遺伝子ではないと考えられている[37, 38]。本遺伝子組換え微生物は、*US2* 遺伝子以外の ORF の発現を妨げていないことから、増殖様式は宿主 HVT FC-126 株と同等の性質であると考えられる。

18 日齢発育鶏卵に、本遺伝子組換え微生物及び宿主をそれぞれ $10^{5.1}$ PFU/用量及び $10^{4.9}$ PFU/用量接種し、ふ化後 1 週間隔で 5 週目まで、白血球、脾臓、ファブリキウス嚢、気管及び羽毛を各時点で採材し、CEF 細胞にて、抗 HVT 抗体を用いた蛍光抗体染色法でウイルスを定量的に確認した。ウイルスの体内分布推移（図 12）をみると、気管からはいずれも検出されず、白血球、脾臓及びファブリキウス嚢においては宿主と同様に本遺伝子組換え微生物は減衰傾向が認められ、羽毛では宿主では検出されてから減衰したのに対し、本遺伝子組換え微生物は試験中いずれの時点でも非常に微量なレベルで推移した（別添資料 8）。

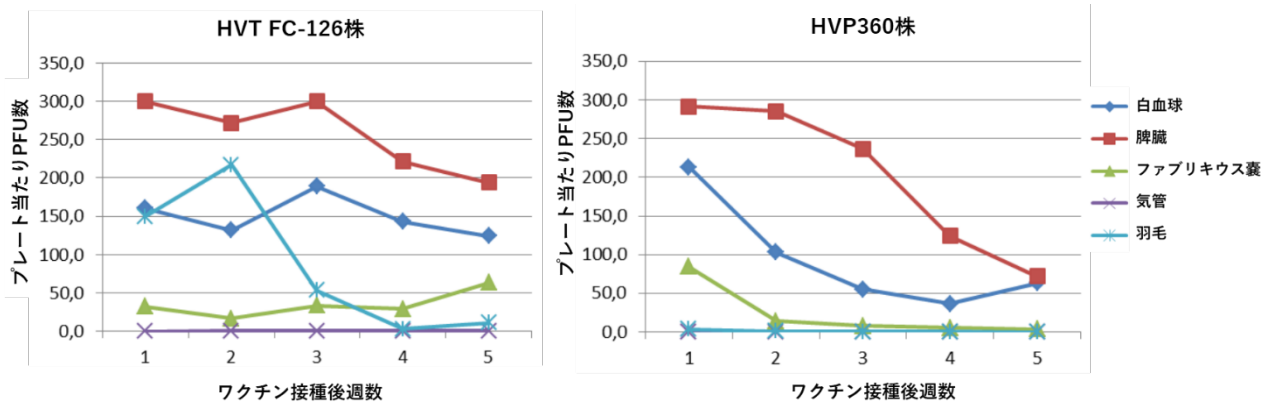


図 12 本遺伝子組換え微生物及び宿主を 18 日齢発育鶏卵に接種した時の経時的な体内分布

左図: 宿主 HVT FC-126 株、右図: 遺伝子組換え微生物 HVP360 株

② 遺伝的特性

本遺伝子組換え微生物は、宿主 HVT FC-126 株のウイルス増殖に必須ではない *US2* のコード領域に、*F-VP2* 発現カセットを挿入した遺伝子組換え微生物である。*US2* は *F-VP2* 発現カセットの挿入配列により、そのプロモーターとターミネーターが分断され、本来の遺伝子としては機能せず、復元の可能性もない。したがって、本遺伝子組換え微生物は *US2* ORF が消失したこと及び供与核酸から F 蛋白質と VP2 蛋白質が産生されること以外に宿主との差異はない。なお、供与核酸には強毒として知られている遺伝子学的要素や毒素遺伝子を含まない。

③ 病原性

HVT は七面鳥由来の非病原ウイルスであり、マレック病生ワクチン製造用株として使用されている。ウイルスゲノムはがん蛋白質や発がん性に関連する蛋白質に係る配列を含まない。本遺伝子組換え微生物は挿入された *F-VP2* 発現カセット以外の特性は HVT と同等であると考えられる。

また、本遺伝子組換え微生物を対象動物である鶏に接種した試験において、病原性を示すような所見は認められなかった（別添資料 8、10、12）。

したがって、本遺伝子組換え微生物は病原性がないと考えられる。

④ 有害物質の産生性

HVT は、鶏のマレック病に対するワクチンとして 1970 年から使用されており、野生動植物の生育に問題を生じさせるような報告は認められなかったことから、有害物質の産生性はないと考えられる。

供与核酸 *F-VP2* 発現カセットは、HVT *US2* (HVT088) 遺伝子のほぼ中央の *StuI* サイトに挿入される。すなわち、*US2* が分断されるが、それら配列と供与核酸の遺伝子配列と融合して新たな遺伝子が生じる可能性がある。また、供与核酸の配列中にも予期しない新たな遺伝子が生じている可能性がある。このため、プラスミドクローン 435VEC60 の挿入配列 6,674 bp（アクセッション番号 LQ585128）に、本配列に含まれ

ていなかった *US2* 配列 78 bp を加えた配列 (6,752 bp) において予想されるアミノ酸配列をアレルゲンデータベース ADSF にて FAO/WHO で推奨されている方法で検索したところ、既知アレルゲンのアミノ酸配列と 35%以上の相同性のある配列は確認されなかった。また、この配列 (6,752 bp) における推定 ORF の解析(別添資料 16)を実施し、推定 ORF と相同性を持つ遺伝子の検索を行った。この結果、有害な既知の蛋白質又はポリペプチドをコードする DNA を含まないことを確認した。

さらに、対象動物及び非対象動物を用いた接種試験においても有害物質の産生性を示す所見は認められなかった(別添資料 8、10、11、12)ことから、有害物質の産生又は意図しない性質の発現はないものと考えられる。また、本遺伝子組換え微生物を含む鶏用ワクチンは、海外においては 2017 年から販売され、多くの国で野外使用されているが接種した鶏や周辺の自然環境又は食肉として消費した人に問題を起こしたとの報告はなく、安全性が確認されている。

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

⑤ 感染性（組織親和性及び持続感染性）

①に記載の通り、本遺伝子組換え微生物を対象動物に接種した試験成績では、組織親和性及び感染性について、白血球、脾臓及びファブリキウス嚢においては宿主と同様の推移を示した。なお、宿主である HVT は七面鳥の羽包の上皮細胞では細胞遊離型の成熟したウイルスが産生され羽毛とともに脱落して環境中に放出されるが、鶏における HVT 感染では七面鳥間とは異なり、鶏間での伝播は僅かであることが報告されている。さらに、本遺伝子組換え微生物においては接種後の鶏の羽包でほとんど検出されなかったことから感染性は無い、又は極めて低いと考えられる(別添資料 8)。この理由の 1 点目として、本遺伝子組換え微生物の鶏体内における増殖が HVT FC-126 株に比べてやや低いことが認められており、羽包の上皮細胞での遊離ウイルス産生量も低下した可能性が考えられる。2 点目として、*US2* を欠損した MDV においては鶏の羽包に遊離ウイルスは認められるものの放出されなかったことが報告されている。HVT の *US2* 領域の機能については未だに不明なことが多いが、本遺伝子組換え微生物においては HVT *US2* 遺伝子領域への発現カセットの挿入により *US2* 遺伝子が失活したことの影響も潜在的には考えられる。

本遺伝子組換え微生物を七面鳥、アヒル、キジ、及びニホンウズラに接種し、さらに同居感染性を評価した試験成績において、七面鳥、鶏、キジ、ニホンウズラで感染・増殖し、アヒルでは増殖しなかった。また、同居感染性は七面鳥のみで認められた。(別添資料 11)

また、対象動物である鶏へ接種後の同居感染性を確認するため、本遺伝子組換え微生物を皮下接種した 1 日齢鶏と、非接種の 1 日齢鶏又は 1 日齢七面鳥を 49 日間同居させ、経時的に採血しウイルスの有無を確認した。その結果、同居感染性は認められなかった(別添資料 10、表 5)。

本遺伝子組換え微生物を Vero 細胞、MDBK 細胞及び BHK-21 細胞に接種し、4～5 日ごとに継代を 5 回行っても、本遺伝子組換え微生物は検出されなかったことから、本遺伝子組換え微生物の哺乳動物由来細胞における感染性は無いと考えられる（別添資料 15）。

表 5 HVP360 株接種鶏群と同居させた鶏群及び七面鳥群の感染状態の推移

群	動物種	1 日目 (接種時)	15 日目		29 日目		49 日目	
			陽性率	平均プラック数 ⁴⁾	陽性率	平均プラック数	陽性率	平均プラック数
第 1 群:HVP360 株接種 ¹⁾	鶏	陰性 ²⁾	5/5 ³⁾	35.7	5/5	16.6	7/7	17.6
第 2 群:同居群	鶏		0/5	–	0/5	–	0/7	–
第 3 群:HVP360 株接種 ¹⁾	鶏		5/5	39.7	5/5	24.5	7/7	11.4
第 4 群:同居群	七面鳥	陰性 ²⁾	0/5	–	0/5	–	0/6	–

–:陰性

¹⁾ 1 羽当たり HVP360 株 $10^{5.6}$ PFU/0.2 mL を接種。

²⁾ 第 1 群～第 3 群及び第 4 群の各 5 羽についてプールした検体で実施した成績。

³⁾ 陽性検体/供試検体(各検体は、同群の 2 個体分の血液検体から分離した白血球をプールしたもの)

⁴⁾ 1 シャーレ当たりの平均プラック数

⑥ 内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性の有無

HVT が内在性ウイルスを活性化すると報告はない。また、NDV、IBD にも同様の報告はない。よって、本遺伝子組換え微生物も宿主同様、内在性ウイルスの活性化および病原性付与の可能性はないものと考えられた。

また、HVP360 株はマスターシードウイルスの試験としてトリ白血病ウイルス (ALV) 及び細網内皮症ウイルス (REV) の存在が否定されている（別添資料 13）。

⑦ 接種動物からの排泄及び同居感染性

①に記載の通り、HVT の主な排泄経路として考えられる羽包で本遺伝子組換え微生物はほとんど検出されず（別添資料 8）、同居感染性を確認する試験では、本遺伝子組換え微生物を接種した鶏群と、プラセボ接種し同居させた鶏及び七面鳥いずれにおいても、同居群には感染が認められなかった（別添資料 10）。

このことから、接種鶏から本遺伝子組換え微生物が排泄される可能性、及び同居感染する可能性は極めて低いと考えられる。

⑧ 自然界での生存能力

本遺伝子組換え微生物は、細胞随伴性が高いため、感染細胞が生存している間のみ感染性を保つ。ワクチンとして使用される本遺伝子組換え微生物は、環境中では速やかに失活し、鶏への接種後にのみ体内で増殖・生存すると考えられる。また、①で記載の通り、接種鶏において本遺伝子組換え微生物は排泄経路と考えられる羽包で検出されないことから、接種後に本遺伝子組換え微生物が自然界へ排泄される可能性は非常に低いと

考えられる。

以上より、本遺伝子組換え微生物が自然界で生存を続ける可能性は極めて低い。

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

本遺伝子組換え微生物と宿主において、コロニー形成性、発色性等の違いは認められない。

HVP360 株は宿主に *F-VP2* 発現カセットを挿入していることから、PCR あるいは F 蛋白質及び VP2 蛋白質に対する特異的抗体によって宿主との識別が可能である。

設計した PCR のプライマーで PCR を実施することで、0.02 PFU まで検出可能であった（別添資料 9）。抗体による検出法に関しては、ウイルス含有量試験において用いられる蛍光標識抗体を用いる方法が利用可能である（別添資料 14）。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

NDV 感染によって引き起こされるニューカッスル病（ND）は、強い感染性を示し、呼吸器症状、神経症状、下痢を伴う法定伝染病であり、経済的にも問題となる病気である。NDV の病原性は、週齢や管理状態にかかわらず、株によって異なる。肉用鶏においては死亡による損耗や体重増加率の低下、採卵鶏においては産卵率低下、卵殻及び卵白の品質低下、種鶏においては受精率及びふ化率の低下が認められる。

IBDV 感染によって引き起こされる伝染性ファブリキウス嚢病（IBD）は届出伝染病であり、免疫抑制ウイルス性疾病で、2～10 週齢の若齢鶏に突発的に元気消失、水様下痢が臨床症状として認められる。ファブリキウス嚢に集簇する B リンパ球を標的として増殖するため、リンパ性臓器の炎症、壊死による免疫抑制が引き起こされ、死亡には至らない個体でも他の病原体に感染しやすい状態になる。

MDV1 感染によって引き起こされる MD は免疫抑制ウイルス性疾病で届出伝染病であり、臨床症状は体重減少、腫瘍形成等が特徴で、多くは 10～20 週齢頃に発症し、若齢鶏では脚麻痺が認められる。

本遺伝子組換え微生物は、ND、IBD 及び MD を予防する目的で開発された生ワクチンの主剤として使用されるもので、製品は 2 mL アンフルに 2000 羽分又は 4000 羽分を分注された凍結生ワクチンである。本ワクチンの用法及び用量は、皮下接種及び発育鶏卵接種を想定し、「皮下接種の場合、凍結ワクチンを融解後、溶解用液で 1 羽分が 0.2 mL となるように溶解し、初生鶏の皮下に 0.2 mL を接種する。発育鶏卵接種の場合、凍結ワクチンを融解後、溶解用液で 1 羽分が 0.05 mL となるように溶解し、18～19 日齢の発育鶏卵内に 0.05 mL を接種する。」とすることを予定している。

MSD アニマルヘルス株式会社では、HVT に NDV の *F* 遺伝子を導入した遺伝子組換え微生物を主剤とした生ワクチンを開発した経緯があり、今回はさらに IBDV の *VP2* 遺伝子を導入することで、1 回の接種によって 3 つの抗原に対する免疫を付与できる生ワクチン開発に至った。

(1) 使用等の内容

- ① 運搬及び保管（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の運搬及び保管を

含む。)

- ② 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号。以下「医薬品医療機器等法」という。）第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験（以下「治験」という。）に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項の規定に基づき届け出る治験計画届及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年農林水産省令第 75 号）第 7 条に基づき作成される治験実施計画書に従った使用
- ③ 医薬品医療機器等法第 14 条第 1 項の規定に基づく承認申請に従った使用（④に該当する行為を除く。）
- ④ 接種（採卵鶏及び肉用鶏への接種）
- 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 の規定に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残さの廃棄
- ⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む。）
- ⑦ ①～⑥に付随する行為

(2) 使用等の方法

—

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

—

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

緊急措置計画書（別添資料 19）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

鶏における in vivo 継代試験においては、本遺伝子組換え微生物を発育鶏卵内接種した鶏群から採材しプールした白血球を別の 1 日齢鶏群に皮下接種することを 4 回繰り返しても、5 継代目の鶏群は臨床徴候を示さず、本遺伝子組換え微生物が非病原性である特性が変わらないことを確認している（別添資料 17）。

国外（オランダ）において実施された野外試験においては、本遺伝子組換え微生物を 8,550 羽の 1 日齢鶏に皮下接種した試験（別添資料 18）においても安全性が確認されている。

国内における類縁株を用いた臨床データは遺伝子組換え微生物「バキシテック HVT+IBD」の臨床試験が該当する（令和元年 12 月 4 日、薬事・食品衛生審議会薬事分科会動物用医薬品等部会議事録）。

(6) 国外における使用等により得られた情報

本遺伝子組換え微生物を含む製品は、欧州・米国を含む海外において主に製品名「Innovax-

ND-IBD」として市販されている。欧州においては、2017 年 8 月 22 日に中央審査方式（Centralized procedure）によって承認を取得している。現在までに 78 か国で承認が取得されている（令和 4 年 11 月時点）。

主要 10 か国の販売実績を表 6 に示した。過去 3 年間の総販売数量は、2020 年が【社外秘につき非開示】ドーズ、2021 年が【社外秘につき非開示】ドーズ、2022 年が【社外秘につき非開示】ドーズであった。

表 6 過去 3 年間における主要 10 か国の販売量(千ドーズ)*

国名	2020 年	2021 年	2022 年
ドイツ	【社外秘につき非開示】		
イタリア			
オランダ			
ポーランド			
スペイン			
アルゼンチン			
ブラジル			
エジプト			
米国			
タイ			

*販売量は1月から12月の数値として記載。

(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報

イ 接種動物の体内における遺伝子組換え生ワクチンの消長に関する情報

本遺伝子組換え微生物を発育鶏卵に接種した時の体内分布については、I 2 (6) イ ①の図 19 に示した通り、気管からは検出されず、白血球、脾臓及びファブリキウス囊においては宿主と同様に減衰傾向が認められ、羽包ではほとんど検出されなかった（別添資料 8）。

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

接種鶏（鶏卵）において、体外への排泄経路と考えられる羽包ではほとんど検出されず（別添資料 8）、同居感染性も認められなかった（別添資料 10）ことから、接種鶏から環境中への拡散する可能性は非常に低いと考えられる。

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

宿主である HVT において、垂直感染（介卵感染）は認められない。本遺伝子組換え微生物の体内での増殖能は宿主株と比較して高くない（別添資料 8）ことから、垂直感染する可能性は宿主以下であると考えられる。このため、本遺伝子組換え微生物も HVT と同様に介卵感染しないと考えられる。

ニ 野生動物への伝播の可能性の有無に関する情報

前項(1)～(3)に示したとおり、接種動物の体内における消長が速やかであり、接種動物の主な環境への排泄経路である羽包で本遺伝子組換え微生物がほとんど検出されず（別添資料 8）、接種鶏からの同居感染の可能性も極めて低い又は認められないこと、また垂直感染性もないと考えられることから、野生生物への伝播の可能性は非常に低いと考えられる。

また、七面鳥、アヒル、キジ及びウズラ（ニホンウズラ）に本遺伝子組換え微生物を接種して非接種の同種動物と同居させた試験で、同居感染性が認められたのは七面鳥のみであった（別添資料 11）。

以上のことから、本遺伝子組換え微生物を対象動物である鶏に接種後、野生動物において伝播する可能性は非常に低いと考えられる。

ホ 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

宿主である HVT FC-126 株は、長年生ワクチンとして使用されている株であり、他の微生物を減少させるような性質は報告されておらず、安全に使用され続けている。本遺伝子組換え微生物は、NDV の F 蛋白質及び IBVDV の VP2 蛋白質を発現すること以外については、宿主の性質を引き継いでいると考えられ、細胞随伴性、増殖様式等は保存されているため、細胞の生存のできる環境が本遺伝子組換え微生物の複製には必須条件となり、環境中での生存性は宿主 HVT を超えるものではない。

I2(6)イ①に示したように、本遺伝子組換え微生物及び宿主の 18 日齢発育鶏卵における体内分布評価試験において、気管からはいずれも検出されず、白血球、脾臓及びファブリキウス囊においては宿主と同様に本遺伝子組換え微生物は減衰傾向が認められ、羽毛では宿主では検出されてから減衰したのに対し、本遺伝子組換え微生物は試験中いずれの時点でも非常に微量なレベルで推移した。本遺伝子組換え微生物においては、接種動物から他の動物への拡散経路となりうる羽包でもウイルスがほとんど検出されておらず、接種動物体内での減衰も宿主よりも早く認められていることから、環境中への排泄量は無い、又は極めて少なく、他の微生物を減少させる性質に関しては、宿主以下であると考えられる。NDV の F 蛋白質及び IBVDV の VP2 蛋白質が他の微生物を減少させたという報告はなく、また発現カセット挿入領域及びその近隣の塩基配列における推定 ORF の相同性検索の結果、有害な既知の蛋白質又はポリペプチドをコードする DNA を含まないことを確認している。

以上のことから、他の微生物を減少させる性質については、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容評価

—

(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

本遺伝子組換え微生物については、第一種使用規程に従った使用を行う限りにおいて、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

2 病原性（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

本遺伝子組換え微生物は、非病原性の HVT を宿主としており、NDV の F 蛋白質及び IBDV の VP2 蛋白質を発現すること以外については、宿主の性質を引き継いでいると考えられる。このため、細胞随伴性、増殖様式等は保存されており、細胞の生存のできる環境が本遺伝子組換え微生物の複製には必須条件となり、環境中での生存性は非常に低い。

宿主である HVT の感染域に関しては、I1(3)ロに記載のように、七面鳥、鶏、キジ、ニホンウズラで感染・増殖するが、アヒルでは増殖しないことが報告されており、七面鳥以外に対する自然感染率は低いと考えられる。本遺伝子組換え微生物を接種した実験においても、宿主同様に、七面鳥、鶏、キジ、ニホンウズラで感染・増殖し、アヒルでは増殖しなかった。また、同居感染性は七面鳥のみで認められた。この結果からも、組換え体の野生動物への感染域について、宿主から変化はないと考えられる。

本遺伝子組換え微生物の同居感染試験においては、七面鳥から七面鳥への同居感染のみ認められ、鶏から鶏、鶏から七面鳥への同居感染は認められなかった。

宿主である HVT は七面鳥の羽包の上皮細胞では細胞遊離型の成熟したウイルスが産生され羽毛とともに脱落して環境中に放出されるが、鶏における HVT 感染では七面鳥間とは異なり、鶏間での伝播は僅かであることが報告されている。さらに、本遺伝子組換え微生物においては接種後の鶏の羽包でほとんど検出されなかったことから感染性は無い、又は極めて低いと考えられる。この理由としては、1点目として、本遺伝子組換え微生物の鶏体内における増殖が HVT FC-126 株に比べてやや低いことが認められており、羽包の上皮細胞での遊離ウイルス産生量も低下した可能性が考えられる。2点目として、US2 を欠損した MDV においては鶏の羽包に遊離ウイルスは認められるものの放出されなかったことが報告されており、本遺伝子組換え微生物においては HVT US2 遺伝子領域への発現カセットの挿入により US2 遺伝子が失活したことの影響も潜在的には考えられるが、HVT の US2 領域の機能については未だ不明なことが多い。

本遺伝子組換え微生物の病原性評価試験において、本遺伝子組換え微生物を鶏に接種し、5代継代しても HVT の非病原性の特性に変化はなかった。

NDV の F 蛋白質及び IBDV の VP2 蛋白質が病原性をもつという報告はない。さらに宿主である HVT FC-126 株は、1970 年代からマレック病に対する生ワクチンとして鶏に対して世界中

で用いられており、日本においても使用されているが、これまでに野生動植物に対する病原性は報告されていない。また、哺乳動物に対しては体内で複製できず病原性はないことを確認している。

以上のことから、病原性について影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容評価

—

(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

本遺伝子組換え微生物については、第一種使用規程に従った使用を行う限りにおいて、野生動植物の生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

3 有害物質の産生性（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

本遺伝子組換え微生物は、非病原性の HVT を宿主としており、NDV の F 蛋白質及び IBDV の VP2 蛋白質を発現すること以外については、宿主の性質を引き継いでいると考えられる。

本遺伝子組換え微生物を接種対象動物である鶏、及び非対象動物である他の鳥類（七面鳥、アヒル、キジ及びウズラ）に高用量接種し観察を行ったが、いずれの鳥類においても有害事象は認められず、有害物質の産生を示唆するような事象は観察されなかった（別添 12）。また、NDV の F 蛋白質及び IBDV の VP2 蛋白質は既知の有害アレルゲン物質と相同性を有しておらず、発現カセット挿入領域及び近隣配列の検索においても、有害な既知の蛋白質又はポリペプチドをコードする DNA を含まないことを確認している。

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

(2) 影響の具体的内容評価

—

(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

本遺伝子組換え微生物については、第一種使用規程に従った使用を行う限りにおいて、有害物質の産生性によって生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4 核酸を水平伝播する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え微生物は、NDV の F 蛋白質及び IBVDV の VP2 蛋白質を発現すること以外については、宿主の性質を引き継いでいると考えられる。HVT はヘルペスウイルスで、通常、ゲノムを感染動物の染色体に組込む性質は持たない。MDV との相同組換えの可能性については、鶏に対して HVT を含む多価ワクチンが使用されているが、血清型間で組換えが起きたとの報告はない。また、同種のウイルスとの相同組換えの可能性については、接種対象動物である鶏から同居鶏への伝播はないため、野外において重複感染の機会は考えにくく、本遺伝子組換え微生物は相同組換えリスクは極めて低い。さらに、種特異性、細胞随伴性、増殖様式等は保存されているため、細胞の生存のできる環境が本遺伝子組換え微生物の複製には必須条件となり、環境中での生存性は非常に低い。なお、宿主である HVT は七面鳥の羽包の上皮細胞では細胞遊離型の成熟したウイルスが産生され羽毛とともに脱落して環境中に放出されるが、鶏における HVT 感染では七面鳥間とは異なり、鶏間での伝播は僅かであることが報告されている。さらに、本遺伝子組換え微生物においては動物体内での減衰も宿主よりも早く認められており、接種後の鶏の羽包でほとんど検出されなかったことから感染性は無い、又は極めて低いと考えられることから、他の野生動植物に影響を与える可能性は、宿主以下であると考えられる。

以上のことから、核酸を水平伝播する性質に関して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容評価

—

(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

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

III 生物多様性影響の総合的評価

本遺伝子組換え微生物の性質として、生物多様性影響に係る 4 つの項目の総合評価は以下のとおりである。

1. 他の微生物を減少させる性質について、宿主である HVT FC-126 株は、長年生ワクチンとして使用されている株であり、他の微生物を減少させるような性質は報告されておらず、安全に使用され続けている。本遺伝子組換え微生物は宿主と同様に非病原性であり、鶏に接種しても、また更に鶏で継代を繰り返しても、非病原性の特性が変わることはなく、安全であることが確認されて

いる。本遺伝子組換え微生物は NDV の F 蛋白質及び IBDV の VP2 蛋白質を発現すること以外は宿主である HVT の性質を引き継いでいると考えられ、細胞随伴性であるため、宿主同様に細胞の生存できる環境が本遺伝子組換え微生物の複製には必須条件である。このためワクチンとして使用される本遺伝子組換え微生物は、環境中では速やかに失活し、鶏への接種後にのみ体内で増殖・生存すると考えられる。また試験結果より、体内分布及び増殖性は、宿主と同等又はそれ以下である。さらに、接種動物から他の動物への拡散経路となりうる羽包でほとんどウイルスが検出されなかったことから、環境中への排泄する可能性は無い又は極めて低いと考えられ、本遺伝子組換え微生物が自然界で生存を続ける可能性は非常に低いと考えられる。NDV の F 蛋白質及び IBDV の VP2 蛋白質が他の微生物を減少させたという報告はない。また、発現カセット挿入領域及びその近隣の塩基配列における推定 ORF の相同性検索の結果、有害な既知の蛋白質又はポリペプチドをコードする DNA を含まないことを確認している。このため、第一種使用規程に従った使用を行う限り、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

2. 病原性について、本遺伝子組換え微生物は宿主と同様に非病原性であり、鶏に接種しても、また更に鶏で継代を繰り返しても、非病原性の特性が変わることはなく、安全であることが確認されている。さらに、接種動物から他の動物への拡散経路となりうる羽包でほとんどウイルスが検出されず、本遺伝子組換え微生物を接種した鶏群から、鶏群及び七面鳥群のいずれにおいても同居感染は認められなかった。このことから、接種鶏から本遺伝子組換え微生物が自然界に排泄される可能性、及び同居感染する可能性は極めて低いと考えられる。このため、第一種使用規程に従った使用を行う限り、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。
3. 有害物質の産生性について、対象動物の鶏及びその他の鳥類に接種しても有害物質を産生するような事象は観察されず、遺伝子レベルの検索でも認められなかった。NDV の F 蛋白質及び IBDV の VP2 蛋白質が病原性をもつという報告はなく、また発現カセット挿入領域及びその近隣の塩基配列における推定 ORF の相同性検索の結果、有害な既知の蛋白質又はポリペプチドをコードする DNA を含まないことを確認している。このため、第一種使用規程に従った使用を行う限り、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。
4. 核酸を水平伝達する性質について、ワクチンの対象動物である鶏への接種で、接種動物から他の動物への拡散経路となりうる羽包でほとんどウイルスが検出されず、本遺伝子組換え微生物を接種した鶏群から鶏及び七面鳥いずれにおいても、同居感染は認められず、本遺伝子組換え微生物が自然界へ拡散して核酸を水平伝達する可能性は非常に低いと考えられる。交雑性について、HVT は、MDV1 及び MDV2 との塩基配列の相同性は低く、組換えが起こる可能性は極めて低いと考えられる。実際、HVT と MDV1 又は MDV2 の混合ワクチンは世界中で多く使用されているが、HVT と MDV1 又は MDV2 との間で相同組換えが起こったという報告はない。また、本遺伝子組換え微生物の海外での使用実績からも第一種使用規程に従った使用を行う限り、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

したがって、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限り、生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

本申請で使用する略語・専門用語

HVT	七面鳥ヘルペスウイルス (Herpesvirus of turkey)、MDV3 (Marek's disease virus serotype 3)
MDV	マレック病ウイルス、Marek's disease virus
MDV1	マレック病ウイルス 1 型 (Marek's disease virus serotype 1)
MDV2	マレック病ウイルス 2 型 (Marek's disease virus serotype 2)
U _L	Unique Long
U _S	Unique Short
R _L	Repeat Long
R _S	Repeat Short
TR _L	Terminal Repeat Long
IR _L	Internal Repeat Long
IR _S	Internal Repeat Short
TR _S	Terminal Repeat Short
CPE	細胞変性効果 (Cytopathic Effect)
CEF	鶏胚線維芽 (Chicken Embryo Fibroblast)
NDV	ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)
IBDV	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (Infectious bursal disease virus)
mCMV	マウスサイトメガロウイルス (Mouse cytomegalovirus)
hCMV	ヒトサイトメガロウイルス (Human cytomegalovirus)
MCS	マルチクローニングサイト (Multi cloning site)
ORF	オープンリーディングフレーム (Open reading frame)
ND	ニューカッスル病
IBD	伝染性ファブリキウス嚢病
MD	マレック病
EU	欧州連合

別添資料一覧

- 別添資料 1 HVT を有効成分として含む製剤について
- 別添資料 2 01-0258: 鶏以外の鳥類における HVT の感受性に関する資料
- 別添資料 3 00R/0442: 様々な鳥類における、組換え七面鳥ウイルス HVT-NDV/F 及び宿主 PB1 株の筋肉内接種後の in vivo 増殖に関する試験
- 別添資料 4 13R/0276: 高用量 Innovax-ILT のマウスにおける皮下接種後の安全性及び拡散に関する試験
- 別添資料 5 15R/0123: HVT ベクターワクチン Innovax-ND-IBD(HVP360)の構築
- 別添資料 6 15R/0124: HVT ベクターワクチン株 HVP360 のサザンブロット分析
- 別添資料 7 16R/0091: マスターシードウイルス、5継代目及び最終製品の HVP360 シークエンス分析
- 別添資料 8 15R/0154: HVT-ND-IBD のマスターシードウイルス継代株(MSV+2)の、卵内接種による SPF 鶏での組織指向性に関する試験
- 別添資料 9 PCR 法による HVT-ND-IBD の検出
- 別添資料 10 15R/0276: 一日齢鶏への高用量 HVT-ND-IBD の皮下接種後の鶏及び七面鳥への拡散に関する試験
- 別添資料 11 16R/0034: 高用量 HVT-ND-IBD の七面鳥、アヒル、キジ、及びウズラへの皮下接種後の増殖及び拡散に関する試験
- 別添資料 12 15R/0270: 18 日齢 SPF 鶏卵への卵内接種(0.05mL)又は1日齢 SPF 鶏への皮下接種(0.2mL)における高用量 HVT-ND-IBD の安全性試験
- 別添資料 13 マスターシードウイルスの外来性ウイルス否定試験の成績
- 別添資料 14 15R/0119: Innovax-ND-IBD のウイルス含有量試験における PFU 検出に用いられるモノクローナル抗体の同等性試験
- 別添資料 15 GNI-053R: 哺乳類細胞株における、HVT-ND-IBD のマスターシードウイルス継代株(MSV+2)の感染感受性の評価試験
- 別添資料 16 発現カセット及び近隣配列における推定 ORF 解析
- 別添資料 17 16R/0032: HVT-ND-IBD の病原性評価試験:in-ovo 接種 SPF 鶏のバックパッセージ
- 別添資料 18 16R/0194: オランダにおける、1日齢ブロイラー鶏への Innovax-ND-IBD ワクチンの皮下接種による臨床試験
- 別添資料 19 緊急措置計画書

文献一覧

1. Witter, R.L., K. Nazerian, and J.J. Solomon, *Studies on the in vivo replication of turkey herpesvirus*. J Natl Cancer Inst, 1972. **49**(4): p. 1121-30.
2. Schat, K.A., *Marek's disease: a model for protection against herpesvirus-induced tumours*. Cancer Surv, 1987. **6**(1): p. 1-37.
3. Witter, R.L., et al., *Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus*. Am J Vet Res, 1970. **31**(3): p. 525-38.
4. Okazaki, W., H.G. Purchase, and B.R. Burmester, *Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys*. Avian Dis, 1970. **14**(2): p. 413-29.
5. Schat, K.A., *History of the First-Generation Marek's Disease Vaccines: The Science and Little-Known Facts*. Avian Dis, 2016. **60**(4): p. 715-724.
6. Prasad, L.B., *Turkey herpesvirus and Marek's disease virus. A comparative appraisal*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1979. **2**(2-3): p. 335-58.
7. 川口, 寧., ヘルペスウイルスの感染機構. 生化学, 2012. **84**(5): p. 343-351.
8. Mettenleiter, T.C., *Budding events in herpesvirus morphogenesis*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 167-80.
9. Afonso, C.L., et al., *The genome of turkey herpesvirus*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 971-8.
10. Lee, S.I., et al., *Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1*. J Vet Med Sci, 2000. **62**(3): p. 287-92.
11. Churchill, A.E., W. Baxendale, and G. Carrington, *Viraemia and antibody development in chicks following the administration of turkey herpesvirus*. Vet Rec, 1973. **92**(13): p. 327-34.
12. Colwell, W.M., D.G. Simmons, and K.E. Muse, *Use of Japanese quail embryo fibroblast cells for propagation and assay of turkey herpesvirus FC-126*. Appl Microbiol, 1974. **27**(1): p. 218-23.
13. Hložánek, I. and V. Sovová, *Lack of pathogenicity of Marek's disease herpes virus and herpes virus of turkeys for mammalian hosts and mammalian cell cultures*. Folia Biol (Praha), 1974. **20**(1): p. 51-8.
14. Meulemans, G., et al., *Susceptibility of mammalian and avian cell cultures to infection with cell-free turkey herpes virus*. J Comp Pathol, 1973. **83**(4): p. 605-8.
15. Calnek, B.W., et al., *Comparative pathogenesis studies with oncogenic and nononcogenic Marek's disease viruses and turkey herpesvirus*. Am J Vet Res, 1979. **40**(4): p. 541-8.
16. Islam, A., et al., *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, 2006. **132**(1-2): p. 127-34.
17. Cho, B.R., *Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens. 5. Airborne transmission between chickens*. Poult Sci, 1976. **55**(5): p. 1830-3.

18. Baigent, S.J., et al., *Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 11): p. 2989-2998.
19. Eterradossi, N. and Y.M. Saif, *Infectious Bursal Disease*, in *Diseases of Poultry*. 2013. p. 219-246.
20. Witter, R.L. and J.J. Solomon, *Experimental infection of turkeys and chickens with a herpesvirus of turkeys (HVT)*. Avian Dis, 1972. **16**(1): p. 34-44.
21. Nazerian, K. and R.L. Witter, *Cell-free transmission and in vivo replication of Marek's disease virus*. J Virol, 1970. **5**(3): p. 388-97.
22. Zygraich, N. and C. Huygelen, *Inoculation of one-day-old chicks with different strains of turkey herpesvirus. II. Virus replication in tissues of inoculated animals*. Avian Dis, 1972. **16**(4): p. 793-8.
23. Pérez-Losada, M., et al., *Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences*. Infect Genet Evol, 2015. **30**: p. 296-307.
24. Del Médico Zajac, M.P., et al., *Characterization of interspecific recombinants generated from closely related bovine herpesviruses 1 and 5 through multiple PCR sequencing assays*. J Virol Methods, 2009. **161**(1): p. 75-83.
25. Biggs, P.M., *The history and biology of Marek's disease virus*. Curr Top Microbiol Immunol, 2001. **255**: p. 1-24.
26. 加藤, 四., マレック病ウイルス及び七面鳥ヘルペスウイルスについて. 鶏病研究会報, 1972. **8**(2): p. 44 - 60.
27. Noda, M., S. Matsuda, and M. Kobayashi, *[Virucidal activity of disinfectants. Influence of the serum protein upon the virucidal activity of disinfectants]*. Kansenshogaku Zasshi, 2000. **74**(8): p. 664-9.
28. Ganar, K., et al., *Newcastle disease virus: current status and our understanding*. Virus Res, 2014. **184**: p. 71-81.
29. Chen, F., et al., *Complete genome sequence analysis of a natural reassortant infectious bursal disease virus in China*. J Virol, 2012. **86**(21): p. 11942-3.
30. Domanska, K., et al., *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, 2004. **149**(3): p. 465-80.
31. Azad, A.A., et al., *Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavirus*. Virology, 1987. **161**(1): p. 145-52.
32. Letzel, T., et al., *Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus*. J Virol, 2007. **81**(23): p. 12827-35.
33. Kim, S.J. and H.G. Martinson, *Poly(A)-dependent transcription termination: continued communication of the poly(A) signal with the polymerase is required long after extrusion in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41691-701.

34. Gravel, K.A. and T.G. Morrison, *Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus*. J Virol, 2003. **77**(20): p. 11040-9.
35. van Zijl, M., et al., *Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments*. J Virol, 1988. **62**(6): p. 2191-5.
36. Jarosinski, K.W., et al., *Horizontal transmission of Marek's disease virus requires US2, the UL13 protein kinase, and gC*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10575-87.
37. Cantello, J.L., et al., *Isolation of a Marek's disease virus (MDV) recombinant containing the lacZ gene of Escherichia coli stably inserted within the MDV US2 gene*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1584-8.
38. Gao, H., et al., *Expression of HA of HPAI H5N1 virus at US2 gene insertion site of turkey herpesvirus induced better protection than that at US10 gene insertion site*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22549.

別添資料 1 HVT を有効成分として含む製剤について

動物用医薬品データベース調べ(2023 年 4 月)

有効成分	品名	製造販売業者	承認年月日
HVT	日生研マレック乾燥ワクチン	日生研株式会社	1972 年 6 月 21 日
	日生研マレックワクチン Q	日生研株式会社	1972 年 6 月 21 日
	マレック病生ワクチン	ワクチノーバ株式会社	1973 年 10 月 2 日
	MD 生ワクチン(2H)	ワクチノーバ株式会社	1991 年 11 月 28 日
	MD 生ワクチン(HVT)	ワクチノーバ株式会社	2005 年 3 月 9 日
	ポールバック MD HVT	共立製薬株式会社	2008 年 9 月 9 日
	アビテクト HVT	KM バイオロジクス株式会社	2012 年 7 月 4 日
HVT+MDV2	2 価 MD 生ワクチン(HVT+SB-1)	ワクチノーバ株式会社	1988 年 3 月 1 日
	2 価 MD 生ワクチン(H+S)2000	ワクチノーバ株式会社	2002 年 7 月 18 日
	2 価 MD 生ワクチン(H+S)	ワクチノーバ株式会社	2005 年 3 月 15 日
	ポールバック MD HVT+SB-1	共立製薬株式会社	2009 年 6 月 15 日
HVT+MDV1	2 価 MD 生ワクチン(H+C)	ワクチノーバ株式会社	2008 年 7 月 16 日
	ボックスオン MD(HVT+CVI)-N	ワクチノーバ株式会社	2014 年 11 月 21 日
	イノボブレックス MD CVI+HVT	ゾエティス・ジャパン株式会社	2017 年 10 月 27 日
HVT+MDV2+APV ¹	イノボ鶏痘／2 価MD生ワクチン(H+S)	ワクチノーバ株式会社	2008 年 10 月 28 日

¹ APV: 鶏痘ウイルス

カルタヘナ法に基づき第一種使用規程を承認した遺伝子組換え生ワクチン一覧調べ(2023 年 4 月)

有効成分	品名	製造販売業者	第一種使用規程承認 年月日	備考
HVT を宿主 とした GMO	ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子導入 七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F 株(NDV-F, <i>Meleagrid herpesvirus 1</i> (Herpesvirus of turkey, Turkey Herpesvirus, Marek's disease virus serotype 3))	MSD アニマルヘルス株式会社	2016 年 1 月 26 日	宿主 HVT に NDV-F 遺伝 子を導入 2020 年に動物医薬品とし ての製造販売承認
	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白発 現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHVT013- 69 株(IBDV VP2, <i>Meleagrid herpesvirus 1</i>)	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	2016 年 9 月 23 日	宿主 HVT に IBDV-VP2 遺 伝子を導入 2020 年に動物医薬品とし ての製造販売承認

別添資料 2

報告書番号:01-0258

鶏以外の鳥類における HVT の感受性に関する資料¹

要約

非対象鳥類であるハト、コリンウズラ、キジ及び七面鳥における HVT の感受性を評価した。

HVP360 株と異なる HVT ワクチン(HVT FC-126 株生ワクチン)を 0.2mL 皮下接種した。それぞれのワクチン投与時の年齢は、ハトは成体、コリンウズラは 38 日齢、キジは 16 日齢及び七面鳥は 16 日齢であった。各群において、投与3週間目に採血し、白血球試料についてウイルス分離を実施した。

HVP360 株と異なる HVT ワクチンを接種した非対象鳥類において、ハト及びコリンウズラではウイルスが分離されず、キジ及び七面鳥ではウイルスが分離された。投与8週目に実施した剖検において、いずれの鳥類においても肉眼病変を認めなかった。

HVP360 株と異なる HVT のワクチンは、非対象鳥類に拡散したとしても臨床症状や病変を示さず、安全と考えられる。

申請者注釈

本資料は、HVT 対照群として供試された HVP360 株と異なる HVT ワクチン(マレック病生ワクチン)投与の結果について参照するために添付した。なお、本試験の試験品の一つである HVT/ILT-138²は、本申請の組換え体とは異なるため、HVT/ILT-138 の試験成績を本申請の組換え体との関連として参照することは意図していない。

¹ 原題(英文)は、The effect of HVT/ILT-138 on non-target species である。

² HVT/ILT-138:MD 及び ILT (鶏伝染性咽頭気管炎)予防用のワクチンであり、HVT FC-126 株に ILT の糖たんぱく質 gD 及び gI 遺伝子を導入した組換え微生物である。

別添資料 3

報告書番号:00R/0442

様々な鳥類における、組換え七面鳥ウイルス HVT-NDV/F 及び宿主 PB1 株の筋肉内接種後の in vivo 増殖に関する試験

(In-vivo growth after intramuscular inoculation of the recombinant herpesvirus of turkey HVT-NDV/F and its parent strain PB1 in various avian species.)

要約

本試験では、ニューカッスル病ウイルスの F 遺伝子を発現する HVP360 株と異なる組換え七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F¹株及びその親株である HVT PB1 株²が様々な鳥類(アヒル、ハト、及び七面鳥)において増殖するかを調査した。

この目的のために 10 羽のハト(5～7週齢)、10 羽の七面鳥(1日齢)及び 10 羽のアヒル(2日齢)に高用量の HVT-NDV/F 株を1回筋肉内接種した。さらに、各 10 羽のハト(A2 群)、七面鳥(B2 群)及びアヒル(C2 群)に高用量の PB1 株を1回筋肉内接種した。接種3、及び4週間後に全ての動物から採血し、末梢白血球を分離した。血液標本に HVT-NDV/F 株及び HVT PB1 株が存在するかを調べた。

その結果、HVP360 株と異なる組換え七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F 株を筋肉内に直接注射した場合、ハト及びアヒルの体内では増殖しないことが示された。同様に、HVT PB1 株もハト及びアヒルの体内では増殖しなかった。七面鳥において HVP360 株と異なる HVT-NDV/F 株は、接種動物9羽中7羽で増殖した。HVT PB1 株は接種動物 10 羽中8羽で増殖した。

結論として、HVP360 株と異なる組換え体である HVT-NDV/F 株と宿主である HVT PB1 株を比較して、試験した種における遺伝子組換えによる宿主域の変化は認められなかった。

申請者注釈

本資料は、鶏以外の非対象鳥類における HVT 増殖性に関する資料として参照するために添付した。なお、供試された HVT PB1 株は、本申請組換え生物 HVP360 株の宿主 HVT FC-126 株とは異なる株であるが、HVT としての宿主域は HVT FC-126 株も PB1 株も同様であると考えられる。本試験の試験品の一つである HVT-NDV/F は、本申請の組換え体とは異なるため HVT-NDV/F の試験成績を本申請の組換え体との関連として参照することは意図していない。

¹ HVT-NDV/F: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(2016 年1月 26 日付第一種使用規定承認遺伝子組換え生ワクチン)

² HVT PB1 株:HVT-NDV/F の宿主として用いた七面鳥ヘルペスウイルスであり、マレック病生ワクチン製造用株として使用されていた PB1 株である。

別添資料 4

報告書番号:13R/0276

高用量 Innovax-ILT のマウスにおける皮下接種後の安全性及び拡散に関する試験

(Safety and spreading of an overdose of INNOVAX-ILT administered subcutaneously to mice.)

要約

【試験設計】

本試験は、哺乳類における Innovax-ILT¹の高用量における安全性確認を目的として設計された。安全性について、ワクチンを接種したマウスにおける感染、臨床症状及び肉眼的所見と、ワクチン株が接触したマウスに拡散する可能性があるかの確認によって評価した。

本試験の設定は以下の通りである：

- 第1群(マウス8匹)に Innovax-ILT 高用量を皮下注射した。
- 第2群(マウス8匹)に HVT FC-126 株(Nobilis Marexine CA 126)高用量を皮下注射した。
- 第3群(マウス4匹)にプラセボを皮下注射した。
- 第4群(マウス8匹)は非接種とし、接触させるマウスとした。4匹は第1群、残りの4匹は第2群と同居させた。
- 第5群(マウス4匹)を非接種対照群とした。

試験開始時に、血液及び脾臓を第5群のマウスから採取し、試験 14 日目に全ての残りのマウス(全群)から血液及び脾臓を採取した。白血球及び脾細胞を分離し、1群4検体ずつにプールした。分離した白血球及び脾細胞におけるウイルスの有無を分析した。

試験 14 日目に血液を採取した後、すべてのマウスを安楽殺し、剖検して肉眼的所見について観察を行った。

【結果】

Innovax-ILT 及び HVT FC-126 株の接種はマウスにおいて安全であることが確認された。いずれのワクチンを接種したマウスにおいても、臨床症状及び肉眼的異常所見は認められなかった。さらに、両ワクチンとも皮下接種において高用量を接種した時、マウスにおける増殖は認められず(表 4-1、表 4-2)、そのため接触させた マウスへも拡散し得なかった。

¹ HVT/ILT-138: HVT(FC-126 株)に ILT (鶏伝染性咽頭気管炎)ウイルスの糖たんぱく質 gD 及び gI 遺伝子を導入した組換え微生物を主剤とする MD-ILT ワクチン

表 4-1: 白血球懸濁液のウイルス含有量試験¹⁾結果 (別添資料 4、16 ページ、表 1)

群	匹数	処置	0 日目		14 日目	
			陽性プール ⁴⁾ 数/ 合計プール数	平均ブラック数 ³⁾ /プレート	陽性プール数/ 合計プール数	平均ブラック数/ プレート
第 1 群	8	Innovax-ILT	—		0/2	0
第 2 群	8	HVT FC-126 株	—		0/2	0
第 3 群	4	プラセボ	—		0/1	0
第 4 群	4	非接種(第 1 群と同居)	—		0/1	0
	4	非接種(第 2 群と同居)	—		0/1	0
第 5 群	4	非接種対照群	0/1	0	—	—

1) 白血球懸濁液を CEF 細胞に接種し、培養後、ブラック数をカウントした。

2) 4 匹のマウスの血液より得た白血球を 1 プールとした。

3) プレートごとの平均ブラック数を示す。

表 4-2: 脾細胞懸濁液のウイルス含有量試験¹⁾結果 (別添資料 4、16 ページ、表 2)

群	匹数	処置	0 日目		14 日目	
			陽性プール ⁴⁾ 数/ 合計プール数	平均ブラック数 ³⁾ /プレート	陽性プール数/ 合計プール数	平均ブラック数/ プレート
第 1 群	8	Innovax-ILT	—		0/2	0
第 2 群	8	HVT FC-126 株	—		0/2	0
第 3 群	4	プラセボ	—		0/1	0
第 4 群	4	非接種(第 1 群と同居)	—		0/1	0
	4	非接種(第 2 群と同居)	—		0/1	0
第 5 群	4	非接種対照群	0/1	0	—	—

1) 脾細胞懸濁液を CEF 細胞に接種し、培養後、ブラック数をカウントした。

2) 4 匹のマウスの血液より得た脾細胞懸濁液を 1 プールとした。

3) プレートごとの平均ブラック数を示す。

【結論】

Innovax-ILT はマウスにおいて安全であり、増殖及び拡散しないことが示された。

申請者注釈

本資料は、哺乳類における HVT 増殖性及び安全性について、第 2 群に供試された HVT FC-126 株の結果を参照するために添付した。本試験の試験品の一つである Innovax-ILT は、本申請の組換え体とは異なるため Innovax-ILT の試験成績を本申請の組換え体との関連として参照することは意図していない。

別添資料 5

報告書番号:15R/0123

HVT ベクターワクチン Innovax-ND-IBD (HVP360) の構築

(Construction of HVT vector vaccine Innovax-ND-IBD (HVP360))

要約

本報告書は、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) *VP2* 遺伝子とニューカッスル病ウイルス (NDV) *F* 遺伝子の双方を発現する、七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) ベクターワクチンである HVP360 株の構築について報告するものである。

【試験設計】

宿主 HVT ゲノムに相同性を有するベクター435VEC60 由来の *VP2-F* 発現カセットを HVT ゲノムの *US2* 領域に挿入するため、HVT FC-126 株由来コスミドセットを使用した。鶏胚線維芽細胞へのトランスフェクションによる組換えウイルス構築の詳細を、本報告書に記載した。トランスフェクション、ブラック純化の後、2つの独立した分離株である A1 株と B1 株を 15 回継代し、モノクローナル抗体を使用した蛍光抗体法で IBDV *VP2* 蛋白質及び NDV *F* 蛋白質の発現を分析した。それぞれ最低 100 個のブラックを評価した。

【結果】

A1 株と B1 株いずれも、鶏胚線維芽細胞における5継代目、10 継代目、15 継代目において IBDV *VP2* 蛋白質及び NDV *F* 蛋白質いずれも分析したブラックの 100%において発現することが確認された(表 5-1)。

表 5-1: 5、10、15 継代目の CEF 細胞における IBDV-*VP2* 及び NDV-*F* 発現結果 (別添資料 5、16 ページ、表 1)

分離株	5 継代目		10 継代目		15 継代目	
	VP2	F	VP2	F	VP2	F
HVP360 A1	100%	100%	100%	100%	100%	100%
HVP360 B1	100%	100%	100%	100%	100%	100%

【結論】

A1 株と B1 株いずれの分離株においても最低 15 継代しても IBDV *VP2* 蛋白質及び NDV *F* 蛋白質が安定して発現していることが示された。分離株 A1 株がマスターシードウイルスの製造用を選択された。

【社外秘につき非開示】

別添資料 6

報告書番号:15R/0124

HVT ベクターワクチン株 HVP360 のサザンブロット分析

(Southern blot characterization of HVT vector vaccine strain HVP360)

要約

【試験設計】

サザンブロット法により挿入遺伝子及びゲノムの詳細な分析を実施した。

発現カセットは 435-47 挿入ベクターにクローンされ、相同ベクター435VEC60 が作製され、HVP360 株 A1 及び B1 の作製にはこのベクターが使用されている。本試験では、この挿入ベクター435-47 に遺伝子を挿入しないことにより、FC-126/435 を作製した。

HVP360 株 A1、B1、FC-126/435 の各ウイルス DNA、及び 435VEC60、435-47 の各プラスミド DNA を制限酵素で消化し、断片を分離・回収した。

• pBR322 及び F1R10(US2)プローブを用いた解析

電気泳動後、以下のプローブを用いてハイブリダイゼーションし、解析した。

- プラスミドプローブ pBR322: プラスミド pBR322 の消化により作製したプローブである。HVT 再構築に用いた全クローニングベクターはプラスミド pBR322 を由来としており、ベクター由来の塩基配列を有する場合は本プローブで検出される。
- F1R10(US2)プローブ: US2 挿入部位を特異的に検出するプローブである。

制限酵素 PvuI 及び AatII で切断・分離し、pBR322 プローブとハイブリダイズした。さらに、F1R10(US2) プローブをハイブリダイズした。制限断片は表 6-1 の通りに予測された。

【社外秘につき非開示】

• オーバーラッピング領域及びリピート領域の HVT 配列を検出するプローブを用いた解析

HVP360 及び FC126/435 ウイルス株はいずれも、7 つのゲノム HVT 断片(いずれかの末端にオーバーラッピング領域を含む)を CEF 細胞に導入することにより作製した。これらの組換え領域にプライマー対を設計し、感染 CEF 細胞培養から調製した HVT-FC126/435 ウイルス DNA 上の PCR によってプローブを得た。これらのプローブにより検出される領域を図 6-1 に示す。HVT FC-126 株の公表配列(GenBank アクセス番号 AF291866)に基づき、BamHI、KpnI、BglII 及び EcoRI で切断したウイルス DNA をハイブリダイズした際、各プローブにより検出されると予想される制限断片の長さを表 6-2 に示す。

【社外秘につき非開示】

括弧内の数値は、サザンブロット分析における限定的な検出性を示すバンドであることを意味する。これは特定の断片におけるプローブのハイブリダイゼーション能力が限定的である(プローブと配列のオーバー

ラップが限定的など)ことによる。

【結果】

• pBR322及びF1R10(US2)プローブを用いた解析

HVP360 及び FC-126/435 から得た DNA はプラスミドプローブのシグナルを示さず、トランスファープラスミドの DNA からはプラスミドバックボーン特有のシグナルを示した。FC126-AatII及び435-47-AatIIのレーンにおける僅かなバンドは非特有のものであり、バックグラウンドと考えられる。

【社外秘につき非開示】

A1 及び B1 のサザンブロットパターンは同一であり、これらの均一性と安定性が確認された。バンドの濃さの違いは、CEF細胞回収時のウイルス量の違いによるものであると考えられる。HVP360 株のウイルスゲノムは適切に再配置され、HVT コスミド再構築株である FC-126/435 で認められたパターンと一致した。また、予想通り、発現カセット挿入領域でのバンドパターンは異なっていた。

• 相同組換え領域及びリピーター領域のHVT配列を検出するプローブを用いた解析

結果を図5及び図6に示す。

HVP360分離株A1およびB1のサザンブロット発現パターンは同一であった。

バンド強度の差は、CEFハーベストにおけるウイルス量の差に起因すると考えられる。

HVP360株及びFC126/435のハイブリダイゼーションパターンは、US#6、US#7及びF1R10(US2)プローブとのハイブリダイゼーションにより示された発現カセット挿入領域を除き、同一であった。また、これらのパターンは、UL領域と反復領域(プローブUI#1及びUI#5)の接合部(プローブUI#1及びUI#5)において、Genbankアクセッション番号AF291866に基づく予想パターンとわずかに異なっていた。

HVT(および一般に単純ヘルペスウイルス)のゲノムのこれらの領域では、ゲノム構造(逆方向反復配列の数および方向)の変異体(異性体と呼ばれる)間で構造的なばらつきが認められることが報告されている(Mahiet, Ergani et al. 2012)。これは、ゲノムの複製により、逆方向反復配列間で相同組換えが起こる鎖状体分子が生じることに起因すると考えられている。

接合部におけるFC126/435のパターンがHVP360 A1及びB1のパターンと同一であったことから、ハイブリダイゼーションパターンの差は、公表されているゲノムと比較した場合のコスミドセットのゲノムにおける変異に起因するものであり、コスミド再構築時の組換えウイルス作出段階における再構成によるものではないと結論した。

【社外秘につき非開示】

【結論】

サザンブロット解析より、HVP360 株 A1 及び B1 において *US2* 領域への発現カセット挿入は正しいことが示された。挿入カセット1コピーが *US2* 領域に正しい方向で挿入されていた。一連の HVT ゲノムプローブを用いてサザンブロットハイブリダイゼーションからのパターン解析による検出において、欠失や追加の外来配列の挿入は認められず、HVP360 株 A1、B1、及び FC-126/435 の全ウイルスゲノムの組換えプロセスは適切であった。分離株 A1 がマスターシードウイルス製造用を選択された。

別添資料6 別紙図:

別添資料6 別紙図1:プラスミド435VEC60の制限酵素地図 (PvuI、AatII)

別添資料6 別紙図2:プラスミド435-47の制限酵素地図 (PvuI、AatII)

別添資料6 別紙図3:ウイルスHVP360株US2近隣領域の制限酵素地図 (PvuI、AatII)

別添資料6 別紙図4:ウイルスFC126/435株US2近隣領域の制限酵素地図 (PvuI、AatII)

別添資料6 別紙図5:ウイルスHVP360株US近隣領域の制限酵素地図 (BamHI、KpnI、BglII、EcoRI)

別添資料6 別紙図6:ウイルスFC126/435株US近隣領域の制限酵素地図 (BamHI、KpnI、BglII、EcoRI)

参考文献:

Mahiet, C., A. Ergani, N. Huot, N. Alende, A. Azough, F. Salvaire, A. Bensimon, E. Conseiller, S. Wain-Hobson, M. Labetoulle and S. Barradeau (2012). "Structural variability of the herpes simplex virus 1 genome in vitro and in vivo." J Virol **86**(16): 8592-8601.

【社外秘につき非開示】

別添資料 7

報告書番号:16R/0091

マスターシードウイルス、5 継代目及び最終製品の HVP360 シークエンス分析

(Sequence analysis of HVP360 MSV, passage 5 and final product batches - Inserted cassette and flanking HVT vector regions.)

要約

Innovax-ND-IBD (HVP360 株) は、伝染性ファブリキウス囊病ウイルス (IBDV) VP2 遺伝子とニューカッスル病ウイルス (NDV) F 遺伝子の双方を発現するように構築された七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) を宿主とした組換えワクチン株である。

【試験設計】

マスターシードウイルス (HVP360 (A1) 株。以下、MSV という。)、MSV から5代鶏で継代した株 (Back passage 5: BP5)、HVP360 株を含有する最終製品3ロット、及び相同ベクター435VEC60 の DNA 配列分析について記載する。

DNA 分離は次の試料を用いた。MSV、最終製品については、ウイルス感染 CEF 細胞を含むバイアルを用いた。BP5 について、鶏での継代は HVP360 株を接種した鶏から白血球を分離し、さらに別の鶏に白血球懸濁液を接種することにより継代した (いわゆる Back passage を実施する)。これを繰り返し、5継代目の白血球を CEF 細胞にて培養し、これを試料とした。435VEC60 については、435VEC60 導入形質転換大腸菌から分離した。発現カセット、HVT ゲノムの相同組換え領域並びにフランキング領域の 5'末端側と 3'末端側の DNA 配列を確認した。その後、MSV、BP5 及び最終製品3ロットの配列を相同ベクター435VEC60 及び宿主と比較した。

【結果】

各ウイルスDNAと、組換え領域コンセンサス配列及び、435VEC60における組換え領域配列とのシーケンス比較の結果を表7-1に示す。

表 7-1: DNA 塩基配列の比較 (別添資料 7、9 ページ、3.2 Viral sequence)

HVT DNA	組換え領域コンセンサス配列 ¹⁾	435VEC60 における組換え領域配列 ²⁾
HVP360 MSV ³⁾	一致	一致
HVP360 BP5 ⁴⁾	一致	一致
HVP360 batch 1 (AI001) ⁵⁾	一致	一致
HVP360 batch 2 (AI002) ⁵⁾	一致	一致
HVP360 batch 3 (AI003) ⁵⁾	一致	一致

1) フォワード及びリバースプライマーの両方の読み出しを用いて配列結果のコンティグ解析により得られた、組換え領域 (US2 遺伝子及びその近隣配列) におけるコンセンサス配列。

2) プラスミド 435VEC60 の組換え領域 (US2 遺伝子及びその近隣配列) における配列

3) MSV: Innovax-ND-IBD マスターシードウイルス, batch 05I14 を CEF 細胞へ接種し、分離した DNA である。

4) 鶏に HVP360 株を接種後、採取した白血球を別の鶏群へ接種する (バックパッセージと呼ぶ)。これを4回繰り返し、バックパッセージ 5 代目の鶏から採取した白血球を CEF 細胞へ接種し、分離した DNA である。

5) Innovax-ND-IBD 最終製品を CEF 細胞へ接種し、分離した DNA である。

【結論】

MSV、BP5 及び最終製品ロットの HVT ゲノム内の挿入発現カセット並びに 5'及び 3'フランキング領域の DNA 配列は相同ベクター435VEC60 と一致したことから、組換えが予想通りに行われ、鶏で継代された場合又は最終製品レベルまで培養された際にウイルスが安定であることが示された。

【社外秘につき非開示】

別添資料 8

報告書番号:15R/0154

HVT-ND-IBD のマスターシードウイルス継代株 (MSV+2) の、卵内接種による SPF 鶏での組織指向性に関する試験

(Dissemination of HVT-ND-IBD MSV+2 in SPF chickens vaccinated by the *in ovo* route.)

要約

【試験設計】

本試験の目的は、鶏における HVT-ND-IBD¹のマスターシードウイルス継代株 (MSV+2) の増殖性と組織指向性を評価することである。本組換え株の増殖性と組織指向性を、陰性対照として鶏胚線維芽細胞 (CEF 細胞) 懸濁液を使用し、宿主 HVT FC-126 株と比較した。

18 日齢 SPF 発育鶏卵に、(1) HVT-ND-IBD、(2) Nobilis Marexine CA126 (HVT FC-126 株) 又は (3) CEF 細胞懸濁液を接種した。血液 (白血球懸濁液) と組織検体 (脾臓、ファブリキウス嚢、気管及び羽毛) を、接種後、5 週間、毎週連続して採材した (表 8-1)。各組織及び血液検体のウイルス含有量を 2 代目 CEF 細胞でのウイルス測定により確認した。ウイルス同定は、抗 VP2 蛋白質抗体及び抗 F 蛋白質抗体を用いたプラック形成単位 (PFU) の抗体染色によって実施した。

表 8-1: 採材スケジュール (別添資料 8、15 ページ、表 3)

ウイルス分離用試料	採材時点 (日齢)				
	8 日齢	15 日齢	22 日齢	29 日齢	36 日齢
白血球	○	○	○	○	○
脾臓	○	○	○	○	○
ファブリキウス嚢	○	○	○	○	○
気管	○	○	○	○	○
羽毛	○	○	○	○	○

【結果】

HVT-ND-IBD 及び HVT FC-126 株 (Marexine CA126) は白血球及び組織 (脾臓、ファブリキウス嚢及び羽毛) の、気管を除く全ての検体から分離可能であった。

ウイルスは同定試験で確認された。HVT-ND-IBD のプラックは、全ての時点で分離された全ての白血球及び組織検体において抗 VP2 蛋白質抗体及び抗 F 蛋白質抗体で染色され陽性であり、HVT FC-126 株のプラックは抗 VP2 蛋白質抗体及び抗 F 蛋白質抗体で染色されなかった (表 8-2)。

¹HVT-ND-IBD: 本組換え微生物 (ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株)

表 8-2: ウイルス同定試験結果¹⁾ (別添資料 8、38 ページ、別添 14)

接種		HVT-ND-IBD			HVT FC-126 株			対照群 ²⁾							
接種後週数(週目)		1													
プール試料 ³⁾		1	2	3	1	2	3	1							
白血球	VP2	+ ⁵⁾	+	+	— ⁶⁾	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
脾臓	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
F 囊 ⁴⁾	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
接種後週数(週目)		2													
プール試料		1	2	3	1	2	3	1							
白血球	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
脾臓	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
F 囊	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
接種後週数(週目)		3													
プール試料		1	2	3	1	2	3	1							
白血球	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
脾臓	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
F 囊	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
接種後週数(週目)		4													
プール試料		1	2	3	1	2	3	1							
白血球	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
脾臓	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
F 囊	VP2	+	+	+	—	—	—	—							
	F	+	+	+	—	—	—	—							
接種後週数(週目)		5													
接種		HVT-ND-IBD				HVT FC-126 株						対照群 ²⁾			
プール試料		1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
白血球	VP2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	F	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
脾臓	VP2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	F	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F 囊	VP2	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	F	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1) 上記は HVT-ND-IBD、HVT FC126 株、又は CEF 細胞懸濁液の接種後、8、15、22、29、36 日目に採材した白血球、脾臓、及びファブリキウス囊を CEF 細胞に感染後にブラックを抗体染色した結果である。

2) 対照群として、CEF 細胞懸濁液を接種した。

3) 2 個体からのプール試料を用いた。

4) ファブリキウス囊

5) +: 抗体染色陽性

6) -: 抗体染色陰性

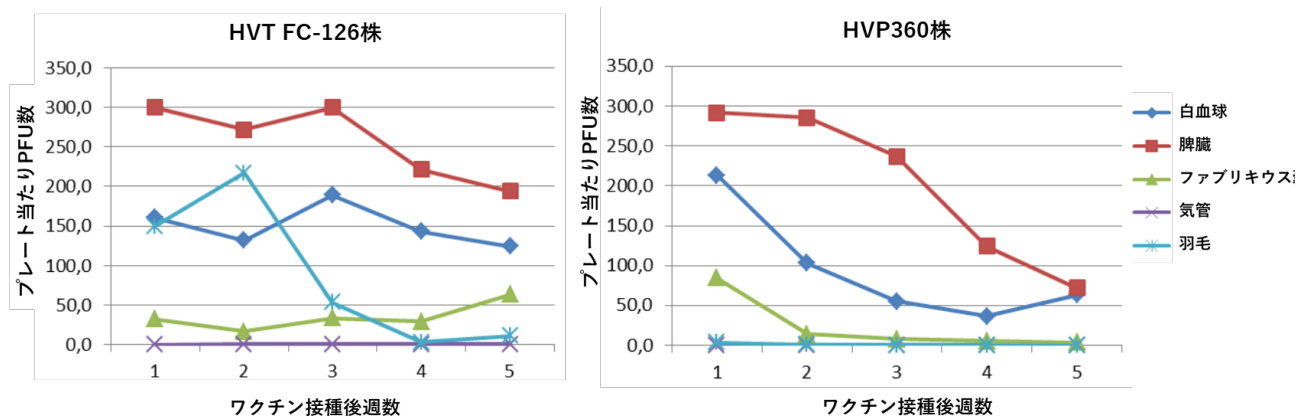
HVT-ND-IBD と HVT FC-126 株のいずれも、白血球及び脾臓細胞ではよく増殖し、ファブリキウス囊ではほとんど増殖せず、気管では増殖しなかったことが示された(表 8-3 及び図 8-1)。また、HVT-ND-IBD は、分析したほとんどの組織でより少なく増殖することが示された。白血球及び脾臓における増殖は HVT-ND-IBD 接種後1週から2週で最も高く、その後は減少した。HVT FC-126 株接種鶏では、5週間の観察期間中、白血球と脾臓のウイルス量はほぼ一定であった。

HVT FC-126 株接種鶏の羽包で、高いウイルス増殖性が認められた(接種後1週目及び2週目で高く、その後、急速に低下した。)一方、HVT-ND-IBD 接種後、羽包でウイルス増殖はほとんど認められなかった。これは、

HVT-ND-IBD が接種された鶏から排出されない可能性を示唆している。

【社外秘につき非開示】

図 8-1: 本遺伝子組換え微生物及び宿主を 18 日齢発育鶏卵に接種した時の経時的な体内分布 (別添資料 8、35 ページ、別添 12)



【結論】

ウイルスは同定試験にて確認された。HVT-ND-IBD プラックは抗 IBDV VP2 抗体及び抗 ND F 抗体で染色され陽性を示し、HVT FC126 株プラックはいずれの抗体にも染色されなかった。

HVT-ND-IBD と HVT FC-126 株の双方は、白血球と脾臓において高い増殖性を示し、ファブリキウス囊において低い増殖性を示し、気管では増殖性が認められなかった。HVT-ND-IBD 接種鶏における増殖性は、HVT FC-126 株接種と比較して低く、ウイルス量は早く低下した。また、羽包での HVT-ND-IBD の増殖性はほとんど認められなかった。

したがって HVT-ND-IBD の増殖性は、全般的にやや低く、羽包に含まれる上皮細胞ではほとんどみられなかったが、生物学的特性と組織指向性は宿主である HVT FC-126 株と同等であることが示された。

別添資料 9

PCR 法による HVT-ND-IBD の検出
(Detection of HVT-ND-IBD by PCR.)

要約

【試験設計】

VP2 遺伝子領域に位置する配列のプライマーと F 遺伝子領域に位置する配列のプライマーを用いて HVT- ND-IBD ワクチン¹を検出する特異的 PCR 法を開発した。表9-1に示す試験品を用いて、感度と特異性を評価した。

表 9-1: 使用した試験品 ¹⁾ (別添資料 9、2 ページ、表 1)

試験品	バッチ番号	ウイルス含有量 (10 log PFU/vial)
HVP360 株 ²⁾	AI001	7.2
FC-126 株 ³⁾	A543A	6.9
Innovax-ILT ⁴⁾	91320003	7.2
Innovax-ND ⁵⁾	91790087	7.0

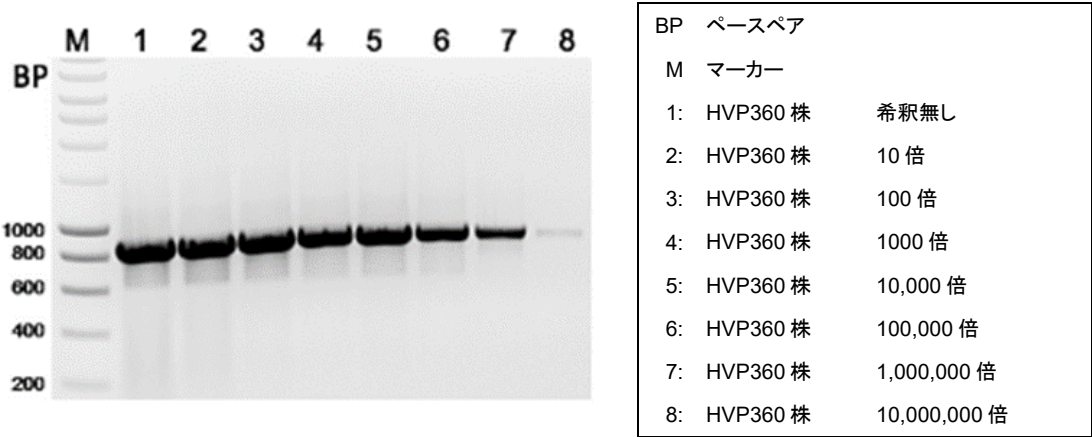
- 1) 各試験品を感染させた CEF 細胞を DMSO 凍結用培地で凍結保存したものを供試した。
2) Innovax-ND-IBD 最終製品である。
3) Nobilis Marexine 最終製品である。
4) ILT 遺伝子導入ベクターワクチンで、HVT FC-126 株を宿主とする。
5) ND 遺伝子導入ベクターワクチンで、HVT PB-1 株を宿主とする。

【結果】

VP2-F 挿入部位内に位置する配列に対応するプライマーセット(PCR産物サイズ:869bp)を用いて、PCR を実施した。

- 感度の検討において、ワクチンを10,000,000 倍(0.02 PFU)まで段階希釈し、それぞれ分離した DNAを用いてPCRを実施した。図9-1に示す通り、ワクチンを 10,000,000 倍(0.02 PFU)まで希釈しても検出することが可能であった。

図 9-1: VP-2-F プライマーセットを用いた異なる希釈倍率の HVP360 株 DNA 増幅像 ¹⁾(別添資料 9、4 ページ、図 3)

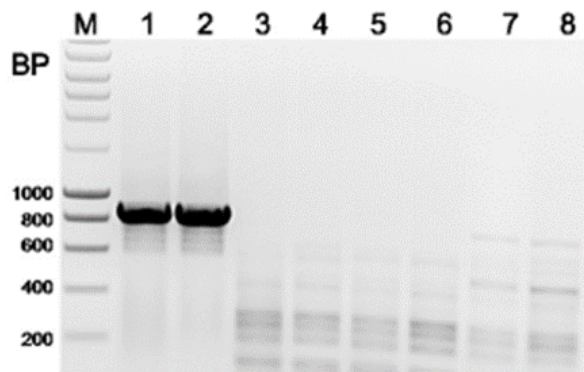


1) DNA は MagNa Pure 96 キットを用いて分離し、VP-2-F プライマーセットを用いて増幅した。869bp の PCR 産物は 1.0% アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により造影した。

¹ HVT-ND-IBD: 本組換え微生物(ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株)

- 特異性の検討において、HVP360株以外に HVT FC-126株 (Nobilis Marexine)及び異なる Innovax ワクチン (Innovax-ILT、Innovax-ND)から DNA を分離し、PCR を実施した。図9-2に示す通り、特異的増幅は HVT-ND-IBD ワクチンのみで検出された。

図 9-2: HVP360 株、FC-126 株、Innovax-ILT 及び Innovax-ND のウイルス DNA の、VP-2-F プライマーセットを用いた、PCR 反応 ¹⁾ (別添資料 9、4 ページ、図 3)



BP	ペースペア
M	マーカー
1:	HVP360 株 希釈無し
2:	HVP360 株 10 倍
3:	FC-126 株 希釈無し
4:	FC-126 株 10 倍
5:	Innovax-ILT 希釈無し
6:	Innovax-ILT 10 倍
7:	Innovax-ND 希釈無し
8:	Innovax-ND 10 倍

【結論】

設計した VP2-F プライマーセットを用いた PCR 法は、HVT-ND-IBD ワクチンを10,000,000 倍 (0.02 PFU)まで希釈しても検出可能であった。また、HVT-ND-IBD ワクチンを特異的に検出し、HVT FC-126 株や、異なる Innovax ワクチンの配列を増幅しなかった。以上より、本 PCR 法の感度及び特異性が示された。

別添資料 10

報告書番号:15R/0276

高用量 HVT-ND-IBD の1日齢鶏への皮下接種後の鶏及び七面鳥への拡散に関する試験

(Spreading of HVT-ND-IBD to chickens and turkeys after subcutaneous administration of an overdose of HVT-ND-IBD to day old chickens.)

要約

【試験設計】

本試験は、1日齢 SPF 鶏に HVT-ND-IBD¹を高用量(10^{5.6} PFU/用量)皮下投与し、これをワクチン未投与の鶏または七面鳥と同居飼育した場合のワクチンの拡散について評価する目的で実施された。

各 34 羽を割り付けた2つの試験群(第1群及び第3群)の1日齢鶏に、HVT-ND-IBD を高用量頸部皮下接種した。さらに、同居鶏群とする第2群の 34 羽にはプラセボ(ノビリスディルエント CA)を投与し、第1群と同居させて飼育した。また、同居七面鳥群とする第4群のプラセボ投与の1日齢七面鳥を、第3群のワクチン投与鶏と同居させて飼育した。

投与時(試験1日目)に鶏及び七面鳥各5羽から採血し、白血球を分離した。試験 15 日目及び 29 日目の各試験群から 10 羽ずつ採血し、49 日目には残り全ての供試動物から採血し、全ての血液試料について、ウイルスの有無を分析した。

【結果】

本試験に使用した七面鳥は白血球試料を鶏胚線維芽細胞(CEF 細胞)に接種して、HVT の有無を確認した。第5群の対照の七面鳥では、試験8日目の血液試料の検査において、HVT 感染が無いことが確認された。

ワクチン接種鶏においては、試験 15、29 及び 49 日目に白血球から HVT-ND-IBD が分離された。一方、同じ時点において、同居鶏又は同居七面鳥の白血球からウイルスは分離されなかった。

加えて、全ての群(投与動物及び同居動物)においてワクチン投与後の観察期間中、臨床症状は認められず、観察期間終了時である 49 日目での剖検時に肉眼病変は認められなかった。

【社外秘につき非開示】

【結論】

HVT-ND-IBD は、同居鶏及び七面鳥に拡散しないことが示された。また、本ワクチンは1日齢の鶏への投与において、試験期間の 49 日間観察し、安全であることが示された。

¹ HVT-ND-IBD:本組換え微生物(ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株)

別添資料 11

報告書番号:16R/0034

高用量 HVT-ND-IBD の七面鳥、アヒル、キジ、及びウズラへの皮下接種後の増殖及び拡散に関する試験
(Replication and spreading of HVT-ND-IBD after subcutaneous administration of an overdose HVT-ND-IBD to turkeys, ducks, pheasants and quails.)

要約

【試験設計】

本試験は、HVT-ND-IBD¹ を本製品の非対象動物である七面鳥（宿主ウイルスの自然宿主動物）、アヒル、キジ及びウズラ（ニホンウズラ）に投与した時の増殖性、拡散及び安全性を確認することを目的として実施された。

七面鳥 26 羽、アヒル 26 羽、キジ 26 羽及びウズラ 26 羽の4群に対して、0～3週齢の時点で HVT-ND-IBD を頸部皮下に高用量（10^{5.6} PFU/用量）投与した。それぞれの動物種について、投与動物と同数の非投与動物を同一のペンで飼育した。

試験開始時に、七面鳥、アヒル、キジ及びウズラの各5羽から採血し、白血球を分離してウイルスの有無を確認した。投与後15、29及び57日目に七面鳥、キジ及びウズラから、投与後15及び29日目にアヒルからそれぞれ採血し、白血球を分離してウイルスの有無を確認した。

【結果】

HVT-ND-IBDウイルスの増殖は、ワクチン投与七面鳥及びワクチン投与ウズラでは投与後15、29及び57日目、ワクチン投与キジでは投与後29日目に認められた（表11-1）。ワクチン投与アヒルではウイルスは分離されなかった。非接種動物への同居感染は、七面鳥でのみ投与後8週目で認められた。アヒル、キジ及びウズラでは同居感染性は認められなかった。

表11-1: ウイルス含有量試験結果（別添資料11、29ページ、別添3）

種	処置	1日目		15日目(2週)		29日目(4週)		57日目(8週)	
		陽性率 ³⁾	平均ブラック数 ⁴⁾	陽性率	平均ブラック数	陽性率	平均ブラック数	陽性率	平均ブラック数
七面鳥	—	【社外秘につき非開示】							
	HVT-ND-IBD ¹⁾								
	同居群 ²⁾								
アヒル	—								
	HVT-ND-IBD								
	同居群 ²⁾								
キジ	—								
	HVT-ND-IBD								
	同居群 ²⁾								
ウズラ	—								
	HVT-ND-IBD								
	同居群 ²⁾								

1) 1羽当たり HVP360 株 10^{5.6} PFU/0.2 mL を接種。

2) プラセボ（ワクチン溶解液）0.2mLを投与

3) 陽性検体/供試検体（各検体は、原則として同群の2個体分の血液検体から分離した白血球をプールしたもの）

¹ HVT-ND-IBD: 本組換え微生物（ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株）

- 4) 1プレート当たりの平均ブラック数
- 5) 測定していないことを示す。

さらに、安全性を評価する目的で、七面鳥、キジ及びウズラについて投与後 120 日間、マレック病に関連する臨床症状及び肉眼病変の有無を観察した。アヒルでは、投与後 15 及び 29 日目でウイルスが検出されなかったため、投与後の観察期間は 50 日間とした。投与動物及び同居動物に、マレック病に関連する臨床症状及び肉眼病変は認められなかった。

【結論】

HVT-ND-IBD ワクチンは七面鳥、キジ及びウズラで増殖するが、アヒルでは増殖しないことが確認された。同居感染性は七面鳥でのみ認められ、アヒル、キジ及びウズラでは認められなかった。さらに、本試験において HVT-ND-IBD を七面鳥、アヒル、キジ及びウズラに高用量投与した場合に安全であることも示された。

別添資料 12

報告書番号:15R/0270

18 日齢 SPF 鶏卵への卵内接種(0.05mL)又は1日齢 SPF 鶏への皮下接種(0.2mL)における高用量 HVT-ND-IBD の安全性試験

(Safety testing of an overdose HVT-ND-IBD virus by the in-ovo (0.05 mL) or the subcutaneous (0.2 mL) route in 18 day embryonated SPF eggs or one day old SPF chickens respectively.)

要約

【試験設計】

本試験は、HVT-ND-IBD ワクチン¹を 18 日齢の発育鶏卵、又は1日齢の SPF 鶏に高用量投与した時の安全性を評価することを目的として実施された。

18 日齢発育鶏卵及び1日齢 SPF 鶏を5群に割り付けた。発育鶏卵では、高用量($10^{5.1}$ PFU/用量)の HVT-ND-IBD ワクチンを卵内接種する群(第1群)及びノビリスディルエント CA(溶解用液)のみを卵内接種する群(第4群)、無投与対照群(第3群)を設定した。1日齢鶏では、高用量($10^{5.6}$ PFU/用量)の HVT-ND-IBD ワクチンを皮下投与する群(第2群)、鶏でのマレック病感受性を確認するために高病原性マレック病ウイルス(MDV RB1B 株)で攻撃する群(第5群)を設定した。

表 12-1: 試験設計及びスケジュール(別添資料 12、16 ページ、表 2)

群	接種	n (羽数・鶏卵数)	接種			攻撃日齢
			日齢	投与経路	ドーズ	
1	HVP360 株	70	-3 日	卵内	$10^{5.1}$ PFU/0.05mL	—
2	HVP360 株	50	1 日	皮下	$10^{5.6}$ PFU/0.2mL	—
3	— ¹⁾	70	—	—	—	—
4	プラセボ ²⁾	70	-3 日	卵内	0.05 mL	—
5	—	50	—	—	—	8 日

1) —: 該当しないことを示す。

2) プラセボとして、マレックワクチン用溶解液(Diluent CA)を投与

【結果】

高用量卵内接種群(第1群)の孵化率を無投与対照群(第3群)及び溶解用液投与群(第4群)と比較した。第1群の孵化率(91%)は、第3群(93%)及び第4群(93%)と比べ統計学的に有意な差は認められなかった($p=1.000$)。

ワクチン投与後(あるいは孵化後)、第1群、第2群及び第4群については 124 日間、一般状態及び臨床徴候の有無を観察した。124 日目の観察期間終了後、全ての生存個体について安楽死処置、体重測定し、剖検してマレック病に関連する肉眼病変の有無を観察した。第5群については、8日目(8日齢)に MDV RB1B 株で攻撃し、攻撃後 50 日間、マレック病に関連する特異的臨床徴候の有無を観察した。観察期間中の死亡鶏及び殺処分鶏について、マレック病に関連する肉眼病変の有無を観察した。

¹ HVT-ND-IBD: 本組換え微生物(ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株)

第1群、第2群及び第4群の鶏において一般状態は全て良好に推移し、いかなる臨床徴候も認められなかった。いずれの群においても剖検時にマレック病の肉眼所見は認められず、ワクチン投与に関連する死亡も認められなかった。MDV RB1B 株で攻撃した群では、98%の個体でマレック病の症状が認められ、供試鶏が MDV 感受性であることが確認された。

HVT-ND-IBD ワクチンを接種された鶏群の第1群及び第2群では、雌の体重が第4群と比較して統計学的に有意に高かった(表 12-2、図 12-1)。第1群と第4群の体重の差は 94 g、第2群と第4群の体重差は 105 g であった。雄では群間の体重に統計学的有意差は認められなかった(表 12-3)。

表12-2: 第1群(HVP360 株卵内接種)、第2群(HVP360 株皮下接種)及び第4群(プラセボ)の体重指標(別添資料12、22ページ、表3)

群	接種試料	性別	体重 (g)					
			個体数 ¹⁾	平均値	標準偏差	最小値	中央値	最大値
1	HVP360 株(卵内)	雌	【社外秘につき非開示】					
		雄						
2	HVP360 株(皮下)	雌						
		雄						
4	プラセボ ²⁾	雌						
		雄						

1) 体重測定した個体数

2) プラセボとして、マレックワクチン用溶解液(Diluent CA)を投与

【社外秘につき非開示】

【結論】

HVT-ND-IBD ワクチンは、18 日齢 SPF 発育鶏卵(卵内接種)及び1日齢 SPF 鶏(皮下接種)に高用量(それぞれ $10^{5.1}$ PFU/用量及び $10^{5.6}$ PFU/用量)投与しても安全であることが確認された。

別添資料 13

マスターシードウイルスの外来性ウイルス否定試験の成績

概要

項目名		結果
発育鶏卵による外来性ウイルス否定試験	卵黄嚢内接種 (5～6日齢発育鶏卵)	観察:異常なし HA凝集:陰性
	尿膜腔内接種 (9～11日齢発育鶏卵)	観察:異常なし EIA-IB:陰性 HA凝集:陰性
	漿尿膜上接種 (9～11日齢発育鶏卵)	観察:異常なし
鶏胚線維芽細胞(CEF細胞)培養による白血病ウイルス否定試験		MSV:陰性 陽性対照(RSV-jの10 TCID ₅₀ 及び100 TCID ₅₀ 、RSV-a、RSV-b):陽性、陰性対照:陰性
鶏貧血ウイルス(CAV)否定試験		MSV:陰性 陽性対照:陽性、陰性対照:陰性
鶏胚腎(CEK)細胞培養による外来性ウイルス否定試験		細胞変性:陰性 赤血球吸着(0.5%鶏赤血球):陰性 赤血球凝集(1%鶏赤血球):陰性 ギムザ染色:陰性 陽性対照:陽性、陰性対照:陰性
CEF細胞培養による細網内皮ウイルス(REV)否定試験		MSV:陰性 陽性対照:陽性 陰性対照:陰性

(次ページに続く)

	項目名	試験方法	結果
鶏接種による 外来性ウイルス 否定試験	<i>Salmonella pullorum</i>	凝集	陰性
	産卵低下症候群(EDS)ウイルス	赤血球凝集抑制	陰性
	伝染性喉頭気管炎(ILT)ウイルス	ELISA	陰性
	トリアデノウイルス(FAV)	ELISA	陰性
	鶏貧血ウイルス(CAV)	ELISA	陰性
	トリ腎炎ウイルス(ANV)	ELISA	陰性
	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)	ELISA	陽性
	トリオルソレオウイルス	ELISA	陰性
	マレック病ウイルス(MDV)	ELISA	陽性
	ニューカッスル病ウイルス(NDV)	ELISA	陽性
	七面鳥鼻気管炎ウイルス(TRT)	ELISA	陰性
	トリインフルエンザウイルス	ELISA	陰性
	細網内皮症ウイルス(REV)	蛍光抗体法	陰性
	トリ脳脊髄炎ウイルス(AEV)	ELISA	陰性
	トリ白血病ウイルス(ALV ab)	ELISA	陰性
	伝染性気管支炎ウイルス(IBV)	蛍光抗体法	陰性

別添資料 14

報告書番号:15R/0119

Innovax-ND-IBD のウイルス含有量試験における、PFU 検出用モノクローナル抗体の同等性試験 (Equivalence testing of monoclonal antibodies used for the detection of plaque forming units in the Innovax-ND-IBD titration assay.)

要約

【試験設計】

本報告書では、Innovax-ND-IBD¹ のウイルス含有量測定に、異なるモノクローナル抗体を用いたときの同等性について検討した結果を記載する。供試したモノクローナル抗体は、抗 VP2 (IBDV) モノクローナル抗体 (試験法 A)、抗 F (NDV) モノクローナル抗体 (試験法 B) 及び抗 HVT モノクローナル抗体 (試験法 C) である。Innovax-ND-IBD ワクチンに対して作成されたこれら3種の抗体を、試験実施時の標準操作手順書 (SOP) に従って、24 回ウイルス含有量を測定して確認した。それぞれの試験検体を、別々のバイアルでそれぞれ希釈系列を作って同じ日に2回測定するのを1試験とした。それぞれの方法について、6試験を2名の担当で実施し、1週間で最大2試験実施した。ウイルス測定結果を ANOVA モデルによって比較し、統計学的に解析した。

【結果】

試験法 B 及び試験法 A の間での予測された差は、90%の信頼区間において-0.009 で、-0.024～0.006 の範囲であった。試験法 C 及び試験法 A の間で予測された差は、90%の信頼区間において-0.016 で、-0.031～-0.001 の範囲であった。いずれも、同等性について、 $[-0.2; 0.2] \log_{10}$ PFU/バイアルの範囲内に収まるという条件によく合致した。よって、Innovax-ND-IBD の検体のウイルス含有量には影響を及ぼすことなく、試験法 A に用いる抗 VP2 モノクローナル抗体は、抗 F モノクローナル抗体又抗 HVT モノクローナル抗体で置き換えることが可能であると結論した。

【社外秘につき非開示】

本同等性解析から得られたデータは試験方法の精度の決定にも用いられた。

結果を ANOVA で解析して、推定された分散成分を再現性と中間精度の計算に用いた。変動係数として表すと、再現性に関する標準偏差の最高推定値は、全ての試験法で 0.053 となり、中間精度の標準偏差は3つの試験方法全てで 0.071 であった。これは、 $0.3 \log_{10}$ PFU/バイアルの許容基準未満であり、適合していた。

【社外秘につき非開示】

【結論】

試験における同等性は試験方法Aと試験方法C間、及び、試験方法Aと試験方法B間で確認された。すなわ

¹ Innovax-ND-IBD: 本組換え微生物 (ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株) を主剤とするワクチン

ち、抗IBDVモノクローナル抗体を用いた適正SOP(試験A)は、HVT-ND-IB試験品の含有量に影響することなく、抗NDVモノクローナル抗体(試験B)又は抗HVTモノクローナル抗体(試験C)へ変更できる。また、いずれの試験方法においても、再現性及び中間精度における変動係数は要件(0.3 log₁₀ PFU/mL未満)の範囲内であった。

別添資料 15

報告書番号:GNI-053R

哺乳細胞株における、HVT-ND-IBD のマスターシードウイルス継代株 (MSV+2) の感染感受性の評価試験
(Study to evaluate the susceptibility of mammalian cell lines to infection with a HVT-NDV-IBDV
MSV+2 vaccine.)

要約

【試験設計】

本試験は、HVT-ND-IBD¹ ワクチン (MSV+2) (ロット番号 031215) のワクチン株が哺乳動物由来細胞に感染感受性を有するかを評価することを目的として実施された。

HVT-ND-IBD ワクチンを鶏胚線維芽 (CEF) 細胞、Vero 細胞 (Vero-SPAH)、MDBK 細胞 (MDBK/KC)、BHK-21 細胞に接種し、各細胞を5代目まで継代した。各継代時に、哺乳動物細胞を光学顕微鏡で観察し、細胞変性 (CPE) の有無、その他異常の有無について評価した。5代継代目に、蛍光抗体法によりワクチン株の有無を観察した。

【結果】

HVT-ND-IBD ワクチン MSV+2 を接種した CEF には CPE 及び HVT 特異蛍光が認められた。今回の試験に用いた哺乳動物由来細胞では、ウイルス感染あるいは増殖の所見は、いずれの継代数においても認められなかった。本試験結果より、HVT-ND-IBD ウイルスの宿主域は限定されており、哺乳動物由来細胞には感染感受性がないことが示唆された。

表 15-1: 蛍光抗体¹⁾染色結果 (5継代目) (別添資料 15、11ページ、表 2)

細胞株	継代	陰性対照フラスコ ²⁾	プラセボフラスコ ³⁾	HVT-ND-IBD接種フラスコ
Vero細胞	5継代目	— ⁴⁾	—	—
MDBK細胞	5継代目	—	—	—
BHK-21細胞	5継代目	—	—	—
CEF細胞	5継代目	—	—	+ ⁵⁾

1) 抗HVT抗体／FITC標識ウサギ抗マウスIgG抗体染色

2) 1mLの各細胞株の非感染細胞を接種したフラスコ。

3) 1mLの非感染CEFを接種したフラスコ。

4) 抗体染色陰性

5) 抗体染色陽性

¹ HVT-ND-IBD: 原文では HVT-NDV-IBDV。本組換え微生物 (ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ブアブリキウス囊病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株) を主剤とするワクチン

別添資料 16

発現カセット及び近隣配列における推定 ORF 解析

供与核酸 F-VP2 発現カセットは、HVT US2 (HVT088) 遺伝子のほぼ中央の StuI サイトに挿入される。すなわち、US2 が分断されるが、それら配列と供与核酸の遺伝子配列と融合して新たな遺伝子が生じる可能性がある。また、供与核酸の配列中にも予期しない新たな遺伝子が生じている可能性がある。このため、トランスファクター【社外秘につき非開示】において遺伝子解析を行った。解析・検索には、遺伝子解析ソフト Geneious Prime (Ver. 2023.0.3, Dotmatics 社)、NCBI ORF 検索サイト(ORF finder, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)、及び NCBI Blast 検索サイト(Protein BLAST)を用いた。

【社外秘につき非開示】

発現カセット及び近隣配列における推定ORF解析結果を図17-1に示した。発現カセットにおける制御配列 mIE、polyA、hIE、term.は、いずれも報告書(別添資料5)に記載の通りの配列、位置及びサイズであることを確認した。解析の結果、7個の推定ORFが示され、これら遺伝子配列をNCBI Blast検索サイトにて相同性検索した。図17-1に示す通り、ORF1、ORF3はF及びVP2の挿入遺伝子配列、ORF6、ORF8はHVT US2領域の配列であった。これは、意図した通りUS2領域へF及びVP2遺伝子が挿入されていることを確認するものである。

【社外秘につき非開示】

以上のことから、発現カセットの挿入による、有害な既知の蛋白質又はポリペプチドをコードする遺伝子の含有及び出現はないことを確認した。

参考文献:

- Angulo, A., M. Messerle, U. H. Koszinowski and P. Ghazal (1998). "Enhancer requirement for murine cytomegalovirus growth and genetic complementation by the human cytomegalovirus enhancer." J Virol **72**(11): 8502-8509.
- Spatz, S. J., L. Petherbridge, Y. Zhao and V. Nair (2007). "Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispen) strains of Marek's disease virus." J Gen Virol **88**(Pt 4): 1080-1096.

別添資料 17

報告書番号:16R/0032

HVT-ND-IBD の病原性評価試験:in ovo 接種 SPF 鶏のバックパッセージ

(Increase in virulence of HVT-ND-IBD: back passage in SPF chickens by *in ovo* route)

要約

【試験設計】

本試験の目的は、SPF 鶏における HVT-ND-IBD¹ の非病原性特性における、in vivo 継代の影響を評価することであった。

ワクチンを 18 日齢 SPF 発育鶏卵に卵内接種した(第1群)。7日齢(接種後 10 日目)において、全ての鶏から白血球を分離し、プールした。この白血球懸濁液を1日齢 SPF 鶏に皮下接種(0.2mL/鶏;10⁷ 白血球数/鶏)し、この継代手順を4回繰り返して実施した(第2群～第5群)。各継代で得られた白血球懸濁液におけるウイルス分離は、鶏胚線維芽(CEF)細胞でのウイルス含有量試験にて実施した。継代中に、ウイルス同定試験も実施した。

5継代目で、ウイルス含有量と同定試験に加え、残留病原性についても評価した。4継代目の白血球懸濁液を 18 日齢発育鶏卵(第 5B 群)に接種した。接種鶏卵の孵化率を評価した。接種後の鶏を 123 日間観察することにより、残留病原性を評価(一般状態と臨床症状の観察)した。第 5B 群の孵化率を HVT-ND-IBD を接種した群(第1群)と比較した。

【結果】

HVT-ND-IBD は各継代の白血球懸濁液いずれにおいても分離が確認され、鶏において適切に5回継代されたことを確認した。ウイルス同定も確認(VP2 及び F 蛋白質の発現)され、ウイルスの安定性が示された。

5継代目の群(第 5B 群)と HVT-ND-IBD 接種群(第1群)の孵化率は、両群において 80%であった。また、5継代目群の鶏において、123 日の観察期間中、臨床症状やマレック病に関連した肉眼病変は認められなかった。

表 17-1: 孵化率¹⁾の結果(別添資料 17、29 ページ、別添 5)

群	接種(卵内)	鶏卵数	孵化鶏卵数	平均孵化率(%)
1	HVT-ND-IBD 株	30	24	80
5B	BP4 ²⁾ からの白血球	70	56	80

1) HVT-ND-IBD 株(10^{5.1} PFU/dose)又はバックパッセージ試料の卵内接種後の孵化率

2) BP4(バックパッセージ 4継代目)から採取した白血球

【結論】

HVT-ND-IBD ワクチンを鶏において5継代しても、完全に非病原性であることが示された。

¹ HVT-ND-IBD: 本組換え微生物(ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株)を主剤とするワクチン

別添資料 18

報告書番号:16R/0194

オランダにおける、1日齢ブロイラー鶏への Innovax-ND-IBD ワクチンの皮下接種による臨床試験
(A controlled field trial in The Netherlands with subcutaneous vaccination of Innovax-ND-IBD in day-old broiler chickens)

要約

【試験設計】

本野外試験は、オランダのブロイラー農場で実施された。本試験の目的は、1日齢ブロイラー鶏への皮下接種により Innovax-ND-IBD¹ワクチンの、野外における安全性を評価することであった。本試験は、マッチした対照群を用いた比較試験計画に基づいて実行された。すなわち同じ親鶏群からの鶏を用いて、同時に孵化させた2つの類似鶏舎にて実施した。

第一の鶏舎における 8,550 羽の1日齢鶏に Innovax-ND-IBD を農場にて接種(試験群)し、第二の鶏舎における 13,050 羽の1日齢鶏に溶解液のみを投与(対照群)した。両鶏舎は、類似デザインであり、平方メートル当たりの鶏数及び飼料は同じであった。

安全性を評価するため、両群の一般健康状態、飼料摂取、及び投与部位(局所反応のため)を1日齢から投与後 14 日目まで毎日観察した。加えて、死亡率、医薬品の使用状況、及び主要パフォーマンス指標も記録し、群間で比較した。試験は、孵卵後6週間で終了した。

対照群からランダムに選択された 20 羽の鶏から試験0日目に、また試験群から 20 羽の鶏から接種3週間目及び試験最終日に、採血した。血清において、NDV 及び IBDV に対する抗体を試験した。

【結果】

即時の全身及び局所反応

ワクチン中及び直後の即時反応は認められなかった。対照群及び試験群において、試験0～14 日目の毎日の観察において、一般健康状態、飼料摂取スコアは正常であった。局所反応も、両群において認められなかった。

死亡率及び医薬品使用状況

日別死亡率は正常範囲内であったが、試験群の鶏舎と比較し対照群の鶏舎において全般的にわずかに高かった。

ルーチンのワクチン接種以外は、治療薬は投与されなかった。

パフォーマンス結果

¹ 本組換え微生物(ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株)を主剤とするワクチン

パフォーマンスは群間で同様であった。対照群の平均飼料摂取量(ADWG)は、59.9g／日で、試験群は 59.3g／日であった。飼料効率は、対照群で 1.67、試験群で 1.70 であり、欧州生産指数(EPI)は対照群で 348、試験群で 343 であった。

【社外秘につき非開示】

血清学的試験

NDV 及び IBDV に対する抗体価において、Innovax-ND-IBD のワクチン接種に対する明確な反応が示された。

【結論】

本試験の結果より、Innovax-ND-IBD ワクチンの皮下接種は1日齢ブロイラー鶏に安全であると結論した。

別添資料 19

緊急措置計画書

令和 7 年 1 月 31 日

氏名 MSD アニマルヘルス株式会社

代表取締役社長 土田 拓史

住所 東京都千代田区九段北一丁目 13 番 12 号

第一種使用規程の承認を申請しているニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVP360 株（以下「本遺伝子組換え微生物」という。）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置をとるための実施体制及び責任者

実施体制 別添 1 として添付

実施責任者 【個人情報につき非開示】製品開発・薬事部門 部門長

実施責任者は、オランダで製造されて日本に輸入される本組換え遺伝子微生物が生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合には、本遺伝子組換え微生物を製造したオランダの法人（以下「オランダ法人」という。）及び日本国内に設置した業務安全委員会に報告する。業務安全委員会は緊急措置対応のための社内体制及び連絡窓口を通じて、実施責任者とともに緊急措置を講じる。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 日本向けに輸出される本遺伝子組換え微生物の製造状況、他国における状況等の情報提供をオランダ法人に依頼するとともに、本組換え微生物の治験実施機関、販売先、又は国内販売代理店等に関する情報を把握し、その情報を整理して記録する。
- (2) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合には、(1) により把握している治験実施機関、販売先、販売実績のある販売代理店に対して情報提供を依頼し、本遺伝子組換え微生物を保有している者の把握に努め、得られた情報を整理して記録する。

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

オランダ法人に、本遺伝子微生物が日本において生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められたことを連絡する。また、オランダ法人と、本件について問合せ窓口の設置等について協議する。

日本国内においては広く使用者に周知するとともに、2 で把握した関係者に対して、電話や文章などに

より連絡を取る。

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

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

- (1) オランダ法人に対して、本遺伝子組換え微生物の日本への輸出の自粛及び日本向け輸入業者等への販売を自粛してもらうよう要請する。
- (2) 日本国内において本遺伝子組換え微生物が治験に使用されている場合は、本遺伝子組換え微生物が自然環境に拡散しないように必要な拡散防止措置（本遺伝子組換え微生物によって汚染されたおそれのある施設、糞や敷料等の資材や死体等の消毒も含む）を直ちに執るよう治験実施機関に要請するとともに、本遺伝子組換え微生物を含む使用残の治験薬を実施機関から速やかに回収し、高圧蒸気滅菌等により不活化措置を実施する。
- (3) 日本国内において販売され流通過程にある場合には、本遺伝子組換え微生物の販売中止及び回収を行い、回収した本遺伝子組換え微生物は密閉容器に保管の上、高圧蒸気滅菌等の不活化措置を実施する。
- (4) 日本国内において販売され使用者の元にある場合には、密閉容器に本遺伝子組換え微生物を保管の上、高圧蒸気滅菌等の不活化措置を執るよう使用者に要請する。
- (5) 日本国内において本遺伝子組換え微生物が動物に接種されている場合には、接種された動物及び同居等で感染している可能性の高い動物の隔離飼育又は安楽死等の措置を実施することを関係者に要請する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合は、速やかに、農林水産省農産安全管理課（03-6744-2102）、及び環境省野生生物課（03-5521-8344）に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

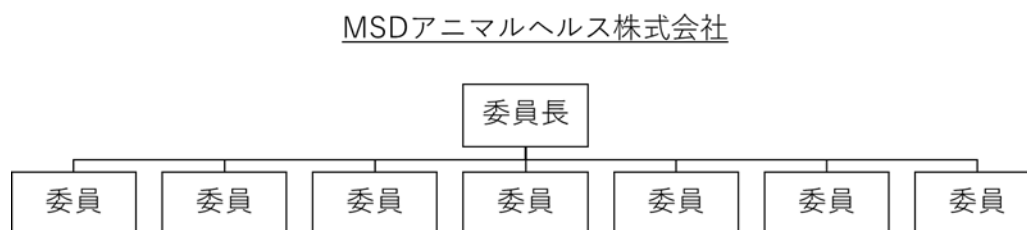
(別添 1)

・実施体制

業務安全委員会

委員長	製品開発・薬事部門 部門長
委員	品質保証部 部長
委員	ポートリー&アクアカルチャー事業部 事業部長
委員	コンパニオンアニマル事業部 事業部長
委員	製品開発・薬事部門 製品開発部 部長
委員	グローバルサプライヤーマネジメント部
委員	製品開発・薬事部門 薬事部
委員	製品開発・薬事部門 製品開発部

・実施体制図



役職	氏名	職名
委員長	【個人情報につき非開示】	製品開発・薬事部門 部門長
委員	【個人情報につき非開示】	品質保証部 部長
委員	【個人情報につき非開示】	ポートリー&アクアカルチャー事業部 事業部長
委員	【個人情報につき非開示】	コンパニオンアニマル事業部 事業部長
委員 (連絡窓口)	【個人情報につき非開示】	製品開発・薬事部門 製品開発部 部長
委員	【個人情報につき非開示】	グローバルサプライヤーマネジメント部
委員	【個人情報につき非開示】	製品開発・薬事部門 薬事部
委員 (連絡窓口)	【個人情報につき非開示】	製品開発・薬事部門 製品開発部