

別紙リスト

- 別紙1 Witter R. L. et al., Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *American Journal of Veterinary Research*, 1970, 31, 525-538
- 別紙2 vHVT の系統図
- 別紙3 99.1034.R : 組換え体 vHVT013-69 の構築
- 別紙4 VAXXITEK HVT+IBD 承認取得国一覧
- 別紙5 Afonso C. L., et al., The genome of Turkey Herpesvirus, *Journal of Virology*, 2001, 75(2):971-978
- 別紙6 98.356 : SPF 七面鳥における組換えワクチン及び親株 HVT の安全性評価
- 別紙7 98.189 : マウスにおける組換えワクチン及び親株 HVT の非特異的安全性
- 別紙8 98.190 : モルモットにおける組換えワクチン及び親株 HVT の非特異的安全性
- 別紙9 Kibenge et al., *Biochemistry and Immunology of Infectious Bursal Disease Virus*. *J.gen.Virol*, 1988, 69:1757-1775
- 別紙10 Bublot M et al., Non-essential loci in the BamHI-I and -F fragments of the HVT FC126 genome. *Acta Virol*. 1999, 43:181-185
- 別紙11 プラスミド pBSII SK+の配列
- 別紙12 宿主ウイルス vHVT の *Bam* HI-I フラグメントと「挿入遺伝子 1」遺伝子座の位置
- 別紙13 98.132 : 鶏胚線維芽細胞培養で 10 代継代後の組換えウイルス vHVT013-69 (ガンボロ病ウイルス VP2 遺伝子発現 HVT 組換えウイルス) の *in vitro* における遺伝子学的安定性
- 別紙14 99.0262 : *in vitro* で 3 代あるいは 8 代継代した後の発現安定性
- 別紙15 98.133 : 組換えウイルス vHVT013-69 の *in vivo* における遺伝子安定性の分析 (鶏 (接種対象動物) で 5 代あるいは 9 代継代後の伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (ガンボロ病ウイルス) の VP2 遺伝子を発現する HVT 組換え体ウイルス)
- 別紙16 97.359 : SPF 鶏における伝染性ファブリキウス嚢病に対する用量依存性
- 別紙17 99.1047.R : SPF 初生雛に対するマレック病ワクチン皮下投与の最小有効量
- 別紙18 99.016 : 免疫蛍光法を用いた組換え体 vHVT013 ワクチンの同定試験
- 別紙19 98.154 : vHVT013-69 遺伝子組換え体 : ワクチン接種鶏の体内でのワクチンウイルス株の分布
- 別紙20 97.361 : ワクチン株及び親株における鶏から鶏への伝播
- 別紙21 98.183 : ワクチン株及び親株における鶏から七面鳥への伝播
- 別紙22 98.255 : vHVT013-69 遺伝子組換え生ワクチンを接種した SPF 鶏での残存性
- 別紙23 98.254 : 遺伝子組換え生ワクチン vHVT013-69 株のコウライキジ (*Phasianus colchicus*) における安全性試験

- 別紙24 98.007 : 鶏で連続継代後の特性 病原性復帰試験の一環として
- 別紙25 98.334 : ワクチン及び継代株 (鶏で9代継代後) のマレック病に関する安全性
- 別紙26 98.294 : 鶏で9代継代後の組換え領域のシークエンスによる vHVT013-69 の *in vivo* 遺伝子学的安定性
- 別紙27 99.0548.R : vHVT013-69 遺伝子組換え生ワクチン
HVT ウイルスの存在下でのコンベンショナル七面鳥における伝播
- 別紙28 七面鳥ヘルペスウイルス成分を含有する既承認ワクチン
- 別紙29 01.0440 : ワクチンウイルス及び HVT の環境における拡散性 SFP 鶏接種後の粉塵及び敷き藁に関連するウイルスの追跡
- 別紙30 01.0486 : 七面鳥における安全性 ワクチンウイルス及び HVT の敷き藁を通じた鶏から七面鳥への伝播 七面鳥間の伝播
- 別紙31 01.0856 : 七面鳥及び鶏におけるワクチン感染性の比較 用量依存性
- 別紙32 98.355 : マレック病血清型1及び2との組換えリスク
- 別紙33 00.0897 : 野外試験 発育鶏卵内接種 - ガンボロ病に対する力価及び免疫持続
- 別紙34 RW-14-06-003 : 独立プラークにおけるマレックウイルスベクターと導入遺伝子ウイルス含有量における相違の検討
- 別紙35 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の VP2 タンパクのアレルゲンとしての可能性

別紙 1

Witter R. L. et al.,

Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus.

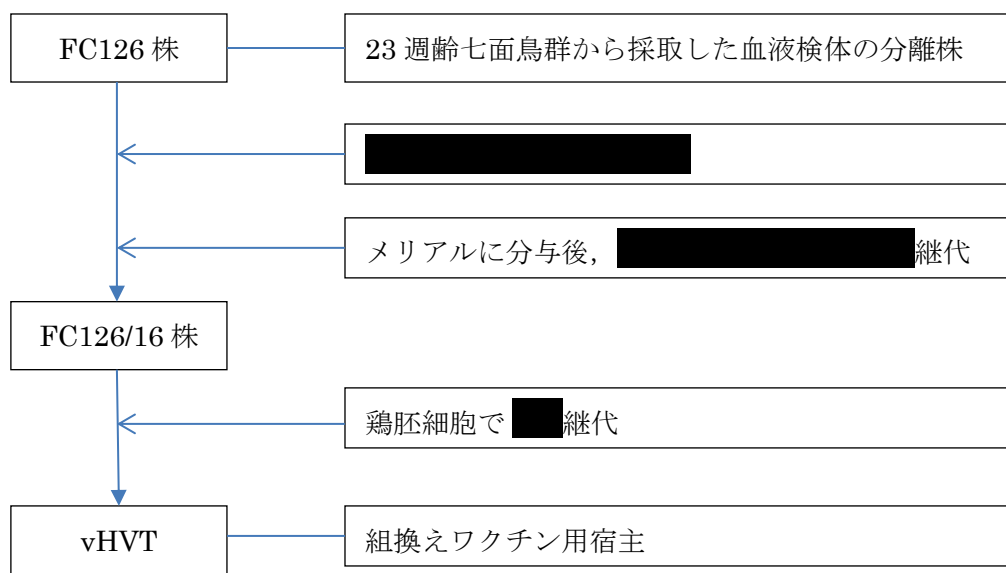
American Journal of Veterinary Research, 1970, 31, 525-538

要旨

細胞変性ヘルペスウイルス（HVT）はインディアナ及びジョージアにて 3 群の七面鳥の血液及び腎臓から鶏腎細胞及びアヒル胚線維芽細胞を用いて分離された。これら分離株の *in vitro* の特徴は、高い細胞随伴性の感染性、合胞体形成細胞変性、タイプ A 核内封入体、5-BUDR によるプラーク形成阻害及びヘルペスウイルスタイプ粒子の存在を含め、類似していた。HVT 分離株は血清学的に同一であったが、以前に七面鳥より分離された他のウイルスとは区別された。このウイルスは 8 週間、七面鳥と鶏の両方に病原性は示さなかったが、ウイルスの回復や抗体の存在によってこれらの宿主は感受性であることを示した。HVT はマレック病ヘルペスウイルス（MDHV）の強毒株及び弱毒株とは異なるが、寒天ゲル沈降素、蛍光抗体そして中和試験の結果から HVT と MDHV には抗原の交差性が確認された。

別紙 2

vHVT の系統図



別紙 3

99.1034.R : 組換え体 vHVT013-69 の構築

要旨

本報告書では vHVT013 (クローン vHVT013-69 株) として特定された HVT/IBDV VP2 遺伝子組換えウイルスの作製について記載する。本組換えウイルスは、HVT FC126 株ゲノムの *Bam*HI I フラグメント内の遺伝子座 1 に、HVT ゲノム DNA と挿入する MCMV-IE/IBDV VP2 発現カセットのドナープラスミドを相同 *in vitro* 組換え (IVR) することによって作製された。

本報告書で以下について記載する：

- a) HVT の *Bam*HI I フラグメントの配列と遺伝子座 1 の位置
- b) ドナープラスミド pEL098 の構築のステップ
 - HVT *Bam*HI-I フラグメントの構築 (プラスミド pRD069)
 - 遺伝子座 1 への挿入プラスミドの構築 (プラスミド pEL079)
 - IBDV VP2 遺伝子のクローニング (プラスミド pEL024)
 - MCMV-IE/IBDV VP2/SV40 poly A 発現カセットの構築 (プラスミド pEL070)
 - 供与プラスミドの構築 (プラスミド pEL098)
- c) IVR 後のクローニングのステップと、組換え体 vHVT013-69 ウイルスの遺伝子構造が期待通りであるか、またこのウイルスの発現カセットが機能しているかを確認するための品質管理

選択した vHVT013 クローンの最初のストック (vHVT013-69/31/CEP1/96.10.17) における最終品質管理では以下が示された：

- vHVT013-69 ストックウイルスが純粋であること (親株 HVT のウイルスの欠如)
- vHVT013-69 は組換え領域に予想通りの遺伝子構造を持っている
- vHVT013-69 は TRL 及び IRL 反復領域が欠けていない
- vHVT013-69 ストックは IBDV VP2 発現に関して均一である (約 1000 プラックのうち全てが IBDV VP2 特異的タンパク質を発現している)

結論として、選択した vHVT013 組換え体クローンで実施した分析結果全てについて、HVT FC126 株ゲノム DNA とドナープラスミド pEL098 の IVR が期待通りに行われ、vHVT013 の最初のストックが IBDV VP2 免疫抗原の発現について純粋で機能的であることが示された。

別紙 4

VAXXITEK HVT+IBD 承認取得国一覧

表：VAXXITEK HVT+IBD 承認取得国名と承認年月日

	国名	承認年月日
1	アルゼンチン	2008年7月18日
2	ベラルーシ	2010年11月3日
3	ボリビア	2007年3月6日
4	ブラジル	2006年8月24日
5	カナダ	2008年7月15日
6	中国	2010年10月19日
7	コロンビア	2007年11月8日
8	コスタリカ	2011年3月3日
9	ドミニカ共和国	2008年7月2日
10	エクアドル	2008年7月20日
11	エジプト	2009年7月1日
12	エルサルバドル	2006年11月20日
13	グアテマラ	2007年8月9日
14	ヨルダン	2009年10月21日
15	レバノン	2010年10月11日
16	メキシコ	2008年4月18日
17	ナミビア	2011年10月24日
18	ナイジェリア	2011年7月29日
19	パキスタン	2009年5月9日
20	パナマ	2009年3月19日
21	パラグアイ	2010年10月29日
22	ペルー	2006年9月25日
23	フィリピン	2008年3月5日
24	プエルトリコ	2007年1月24日
25	ロシア	2008年10月20日
26	マレーシア (サラワク)	2007年2月14日
27	サウジアラビア	2009年2月4日
28	シンガポール	2009年7月31日
29	南アフリカ	2009年10月22日
30	韓国	2009年7月13日

	国名	承認年月日
31	タイ	2007年10月10日
32	トルコ	2011年6月11日
33	ウクライナ	2007年10月5日
34	アメリカ合衆国	2004年11月23日
35	ウルグアイ	2009年1月29日
36	ベネズエラ	2006年11月1日
37	ベトナム	2011年3月23日
38	アルジェリア	2009年6月2日
39	オーストリア	2002年8月9日
40	ベルギー	2002年8月9日
41	ブルガリア	2007年1月1日
42	キプロス (ギリシア)	2004年5月1日
43	チェコ共和国	2004年5月1日
44	デンマーク	2002年8月9日
45	エストニア	2004年5月1日
46	フィンランド	2002年8月9日
47	フランス	2002年8月9日
48	ドイツ	2002年8月9日
49	ギリシア	2002年8月9日
50	ハンガリー	2002年8月9日
51	アイルランド	2002年8月9日
52	イタリア	2002年8月9日
53	ラトビア	2004年5月1日
54	リトアニア	2004年5月1日
55	ルクセンブルグ	2002年8月9日
56	マルタ	2004年5月1日
57	モロッコ	2008年7月16日
58	オランダ	2002年8月9日
59	ノルウェー	2002年8月9日
60	ポーランド	2004年5月1日

	国名	承認年月日
61	ポルトガル	2002年8月9日
62	ルーマニア	2007年1月1日
63	スロバキア	2004年5月1日
64	スロベニア	2004年5月1日
65	スペイン	2002年8月9日
66	スウェーデン	2002年8月9日
67	チュニジア	2008年12月16日
68	イギリス	2002年8月9日
69	アラブ首長国連邦	2011年1月9日
70	クロアチア	2010年7月7日
71	アイスランド	2002年8月9日
72	マダガスカル	2012年6月8日
73	ブルガリア	2007年1月1日

別紙 5

Afonso C. L., et al.,

The genome of Turkey Herpesvirus

Journal of Virology, 2001, 75(2):971-978

我々は七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) としても知られるマレック病ウイルス血清型 3 型 (MDV3) の完全長ゲノム塩基配列を世界で初めて解析したのでここに報告する。全長 159,160 bp のゲノムは約 99 の推定タンパク質をコード化し、ゲノム構成とゲノム含量においてアルファヘルペスウイルスに類似している。HVT は、MDV1 および MDV2 のユニークロング (UL) 及びユニークショート (US) ゲノム領域内において非常に類似しており、相同遺伝子領域は高度の同直線性を共有し、それらの蛋白領域は高度のホモログなアミノ酸を共有する。UL 遺伝子領域において、HVT は単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) とホモログな 57 つの遺伝子を持ち、6 遺伝子は MDV にのみにホモログで、2 遺伝子 (HVT068 と HVT070 遺伝子) は HVT 独自の遺伝子である。HVT の US 領域は MDV1 (Md5 株) の US 領域よりも 2.2 kb 短い、それは MDV096 (SORF4) ホモログの欠如と UL/short repeat (RS) 境界領域における違いのためである。HVT は、MDV1 (Md5) の UL/RS 境界領域の蛋白をコードする MDV087 のホモログを欠き、RS において MDV096 (糖タンパク E) のホモログを二つ持つ。HVT の RS は MDV1 の RS よりも 1,039 bp 長く、ICP4 遺伝子ホモログの例外を持ち、その遺伝子含量は MDV1 とは異なる。HVT には抗アポトーシス遺伝子である *Bcl-2* のホモログを含めて 6 つのユニークな遺伝子が RS 領域に確認されている。これはアルファヘルペスウイルスにおいて *BCL-2* 遺伝子ホモログの初めての報告である。HVT long repeat (LR) は MDV1 のそれより 7,407 bp 短く、病原性、癌原性、そして免疫回避を引き起こす機能を持つ MDV1 遺伝子のホモログを含まない。HVT は MDV1 の癌蛋白 MEQ、CxC ケモカイン、そして発癌性関連リン酸化蛋白 pp24 を含まないが、リン酸化蛋白 pp38 の領域は保存している。RS 及び RL 領域内・隣接部における著しいゲノムの相違が、おそらく非病原性である HVT と高病原性である MDV1 間の宿主域、病原性、発癌性に違いを与える原因であると考えられる。

別紙 6

98.356 : SPF 七面鳥における組換えワクチン及び親株 HVT の安全性評価

要旨

本試験は七面鳥において組換えワクチンの安全性を評価するために設定された。11 日齢 SPF 七面鳥 16 羽の 3 群を体重による無作為化によって D0 に構成した。D0 に動物を以下の通りに免疫した：

- G1 群：組換えワクチン
- G2 群：親株 HVT
- G3 群：滅菌溶解用液

余剰の七面鳥 5 羽については D0 に HVT の血清学的検査のために採血した。

D0 から D42 まで、臨床検査を毎日実施した。D42 に動物を安楽死させ、性別を判定して、剖検した。マレック病の症状について特に留意した。全ての七面鳥を D7 及び D21 に体重測定して、日増体重を評価した。それぞれの群における平均体重について、群と性別の因子を考慮して多重分散分析法により比較した。

それぞれの群で 1 羽ずつ、試験の開始時 (D2 から D4 まで) につつきによって死亡した。これらの動物にはその他に肉眼的異常は認められなかった。つつきは対照群の動物 2 羽についても認められた。D7 に、親株 HVT で免疫した 1 羽に呼吸器症状が認められた。これらの観察は組換えワクチンによるものではなかった。

安楽死後の D42 に、肉眼的な異常は認められなかった。

D21 までの 3 群における日増体重に有意さは認められなかった。

抗 HVT 抗体が組換えワクチン及び親株 HVT を免疫した動物全てに認められた。D0 に血液採取した動物及び G3 群の動物は全て抗体陰性であった。

組換えワクチンの七面鳥における安全性が明らかに示された。また、組換えによって HVT の自然宿主である七面鳥におけるウイルス株の安全性に変化は認められなかった。

別紙 7

98.189 : マウスにおける組換えワクチン及び親株 HVT の非特異的安全性

要旨

ワクチンである組換え体ウイルス vHVT013-69 と親株である HVT FC126 株について非特異的な安全性をマウスで試験した。

SPF マウス 10 匹の 3 群を構成した。1 群には組換えワクチン株を接種し (G1 群)、第 2 群には親株を接種した (G2 群)。第 3 群には溶解用液を接種し、対照群とした (G3 群)。

ワクチン接種後 7 日間の毎日の臨床観察 (一般及び局所の症状) を実施し、全ての動物について体重測定で成長を確認した。

全ての群で斃死は観察されず、一般症状及び局所の症状も認められなかった。

成長については観察期間中 3 群で同等であった。

試験条件下で、組換えワクチン株及び親株のマウスに対する異常毒性の兆候は認められなかった。

別紙 8

98.190 : モルモットにおける組換えワクチン及び親株 HVT の非特異的安全性

要旨

ワクチンである組換え体ウイルス vHVT013-69 と親株であるヘルペスウイルスの HVT FC126 株について非特異的な安全性を、ヨーロッパ薬局方, 1997, § 2.6.9 に準じてモルモットで試験した。

SPF モルモット 4 匹の 3 群を構成した。1 群には組換えワクチン株を接種し (G1 群), 第 2 群には親株を接種した (G2 群)。第 3 群には溶解用液を接種し, 対照群とした (G3 群)。

ワクチン接種後 7 日間の毎日の臨床観察 (一般及び局所の症状) を実施し, 全ての動物について体重測定で成長を確認した。

全ての群で斃死は観察されず, 一般症状及び局所の症状も認められなかった。

成長については観察期間中 3 群で同等であった。

試験条件下で, 組換えワクチン株及び親株のモルモットに対する異常毒性の兆候は認められなかった。

別紙 9

Kibenge et al.,

Biochemistry and Immunology of Infectious Bursal Disease Virus.

J.gen.Virol, 1988, 69:1757-1775

総説

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの生化学及び免疫学

緒論

伝染性ファブリキウス嚢病 (Infectious Bursal Disease: IBD) とは、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBD virus: IBDV) 感染を原因とする感染症であり、ガンボロ病とも呼ばれる。IBDV はビルナウイルス科アピビルナウイルス族に属する RNA ウイルスである。本総説は、IBDV の構造および免疫学的観点における記載を主にまとめたものである。

IBD は若齢鶏において非常に感染性の強いウイルス性疾患であり、免疫器官の炎症と壊死を特徴とし、特にファブリキウス嚢におけるリンパ球 (B 細胞) の破壊を特徴としている。感受性鶏群 (3~6 週齢) に免疫抑制を誘導し、著しい成長阻害と高い致死率を示す。IBD によって免疫抑制が生じることにより他の疾病の感受性を高め、ニューカッスル病、マレック病そして伝染性気管支炎のワクチネーションに対する効果を減じ、多大な経済的損失を養鶏産業に与える要因の一つとして考えられている。

また、IBDV は、自然環境下で長時間生存でき消毒薬にも強いため、ワクチン接種による予防が IBD を制御する上で非常に重要となる。IBDV には、二つの血清型が知られており、血清型 I は鶏に対して病原性があり、血清型 II は鶏と七面鳥に感染はするものの臨床的意義は不明である。現在、血清型 I が野外株として認知されており、養鶏エリアは IBDV 血清型 I を含む生ワクチンや不活化ワクチンによってコントロールされている。

別紙 10

Bublot M et al.,

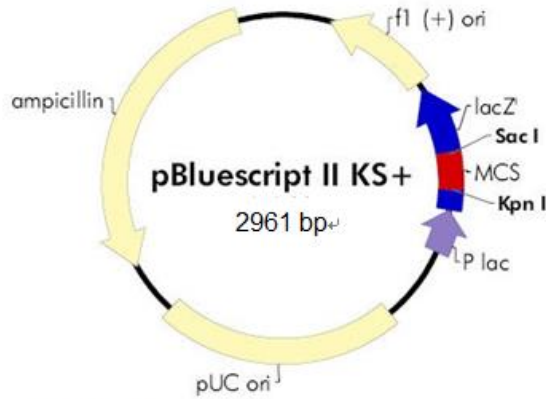
Non-essential loci in the BamHI-I and -F fragments of the HVT FC126 genome.

Acta Virol. 1999, 43:181-185

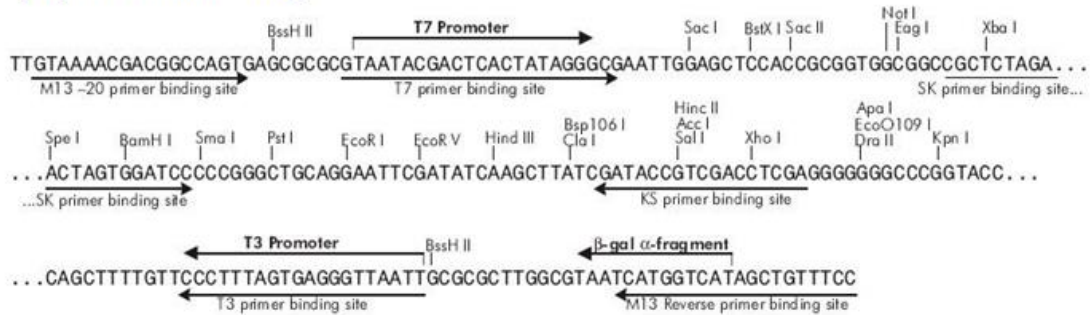
七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) FC126 株 DNA の *Bam*HI-I の配列に機能部位である ORF が存在する可能性を検討した。4 つの完全長 ORF 領域 (ORF 2~5) と 2 つの部分的な ORF 領域 (ORF 1 及び 6) が検出された。ORF 2 及び 3 には、それぞれ HSV-1 UL55 及び EHV-1 遺伝子 3 の相同性が確認された。ORF6 はすでにスミス等によって部分的な配列の決定が行われており (Virology 207, 205-216, 1995)、マレック病ウイルス (MDV) の同様のポジションに位置する ORF と相同性があることが明らかとなった (ORF 21; Ross et al., Virus Genes 7, 33-51, 1993a)。他の ORF に明確な相同性は確認されなかった。ORF4 は ORF3 の相補的な配列となっている。二つの挿入遺伝子座に発現カセットを持つ二つの HVT 組換え体が作製され、鶏におけるウイルス血症が確認された。その結果、それらの二つの挿入遺伝子座は *in vitro* および *in vivo* における HVT の複製に本質的で無い事が明らかとなった。U_L に隣接する反復配列 (TR_L と IR_L (*Bam*HI-F)) において 650 bp の遺伝子欠損が、HVT FC126 株のいくつかの DNA において確認された。この遺伝子欠損は、切断された pp38 とホモログの ORF をカバーし、小さな ORF の N 末端に相同性は検出されなかった。我々の結果は以下の事を示している。(1) HVT pp38 ホモログを含む遺伝子領域は、*in vitro* 及び *in vivo* における HVT の増殖に本質的では無く、そして (2) この遺伝子欠損は HVT による誘導されるマレック病 (MD) に対する感染防御機能に影響を与えるものでは無かった。

別紙 11

プラスミド pBSII SK+の配列



pBluescript II KS (+) Multiple Cloning Site Region⁺
(sequence shown 657-759)⁺



pBluescript II KS (+), 2961 bp、Accession X52327.1

1 ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgta aattttgtt aatcagetc

61 atttttaac caatagccg aatcggcaa aatccctat aatcaaaag aatagaccga
 121 gatagggttg agtgtgttc cagtttgaa caagatcca ctattaaaga acgtggactc
 181 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtetatca gggcgatgpc cactacgtg aaccatcacc
 241 ctaatcaagt ttttggggt cgaggtgccc taaagcaeta aatcggaacc ctaaaggag
 301 cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggccaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa
 361 agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgtgpc gcgtaaccac
 421 cacaccgcc gcgettaatg cgccgtaca gggcgctcc cattcgccat tcaggtgpc
 481 caactgttg gaagggcgat cggtgcccgc ctcttgceta ttacgccagc tggcgaaagg
 541 gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttccagt cagcagttg
 601 taaaacgagc gccagtgagc gcgcgtaata cgactcaeta tagggcgaaat tggagctcca
 661 ccgggtggc ggccgcteta gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat tcgatataa
 721 gcttatcgat accgtgacc tcgagggggg gcccgtacc cagcttttgt tcccttagt

781 gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctctgtg tgaattgtt
841 atccgctcac aattccacac aacatacagag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg
901 cctaatgagt gagctaacte acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt tccagtcgg
961 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcgggggaga ggcggtttgc
1021 gtattgggcg ctcttcgct tctcgtctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc
1081 ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata
1141 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaacctg aaaaaggcgg
1201 cgttgcctggc gttttccat aggetccgcc ccctgacga gcatacaaaa aatcgaacct
1261 caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa
1321 gctcctctgt gcgctctct gttccgacct tcccgttac cggatactg tccgctttc
1381 tccctcggg aagegtggcg ctttctcata gctcagctg taggtatctc agttcgggtg
1441 aggtcgttcg ctccaagctg ggtgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gacctgctg
1501 cttatccgg taactatctg cttgagtcca acccgtaag acacgactta tcgccactgg
1561 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct
1621 tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc
1681 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccccg
1741 ctggtagcgg tggtttttt gtttgaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc
1801 aagaagatec tttgatctt tctacggggt ctgacctca gtggaacgaa aactcagtt
1861 aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatctt ttaaattaa
1921 aatgaagttt taaatcaate taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat
1981 gcttaatcag tgaggacct atctcagcga tetgtctatt tegtctatcc atagttgct
2041 gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggett accatctggc cccagtctg
2101 caatgatacc gcgagacca cgtcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag
2161 ccggaagggc cgagcgcaga agtggtctct caactttatc gcctccatc cagtctatta
2221 attgttccg ggaagctaga gtaagtagtt cggcagttaa tagtttgcgc aacgttgtg
2281 ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgtc cgtcgtttgg tatggettca ttcagctccg
2341 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct
2401 ccttcggctc tccgacgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta
2461 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg
2521 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtagcgc gcgaccgagt tgctcttgc
2581 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg
2641 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga
2701 tgtaaccac tegtgcacc aactgatctt cagcatctt tactttcacc agcgtttctg
2761 ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataaggcgc acacggaaat
2821 gttgaatact catactctc cttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgc
2881 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca

2941 catttccccg aaaagtcca c

別紙 12

宿主ウイルス vHVT の *Bam* HI-I フラグメントと「挿入遺伝子 1」遺伝子座の位置

宿主ウイルスは、1970 年 R. L. Witter (Regional Poultry Research Laboratory, USDA, East Lansing, MI, USA) によって七面鳥から分離された七面鳥ヘルペスウイルス HVT FC-126 株で、ヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス亜科、Meleagrid ヘルペスウイルス属、七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) (Meleagrid ヘルペスウイルス 1) に属し、マレック病ウイルス感染に対する一般的なワクチンとして世界中で用いられている。

ヘルペスウイルスの特性を有し、162 カプソメアからなる直径 150~170nm のエンベロープを有するウイルスである。カプソメアは直径 90~100nm で、約 165 kbp の二本鎖 DNA を有する。DNA は 106 kbp の固有の長い配列 (UL; A unique long sequence) と 6 kbp の固有の短い配列 (US; A unique short sequence) を有する。

宿主ウイルス vHVT の遺伝子における「挿入遺伝子 1」遺伝子座の位置すなわち *Bam*HI-I 遺伝子座は、特異的で大きなゲノム遺伝子部分 UL に存在する (図 1)。*Bam*HI-I 遺伝子座内で想定されるオープンリーディングフレーム (orf) については表 1 に、*Bam*HI-I フラグメントにおける「挿入遺伝子 1」遺伝子座の位置は図 2 に示したとおりである。

図 1 宿主ウイルス vHVT の遺伝子における「挿入遺伝子 I」遺伝子座の位置

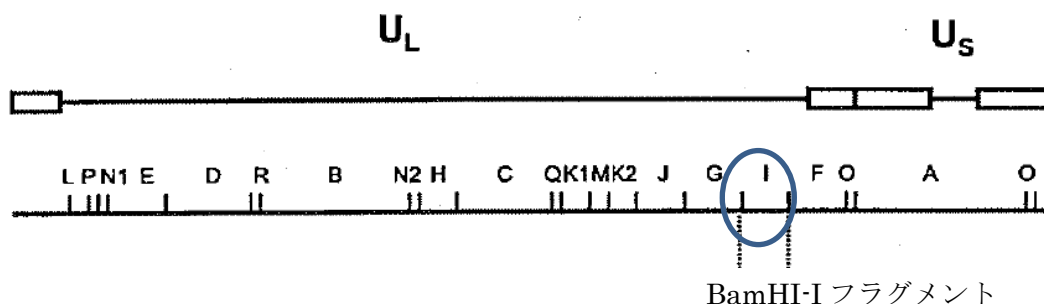


表1 *Bam*HI-I 遺伝子座で想定されるオープンリーディングフレーム

Table 1: Putative open reading frames present in the cloned *Bam*HI I fragment of HVT

Name ^a	Orientation	ATG	STOP	orf length	Poly-A ^b	Homology
(orf1)	Leftward	479	-	(>159)	NA	not found
orf2	Rightward	676	1185	169	1236	HSV-1 UL55 ^c
orf3	Leftward	1941	1384	185	1281	EHV-1 gene 3 ^d
orf4	Rightward	1403	1960	185	2176	not found
orf5	Leftward	3081	2284	265	2210/2036	not found
(orf6)	Leftward	-	3570	(>755)	3553	MDV orf21 ^e

^a an orf between brackets is a partial orf

^b potential poly-adenylation site sequence AATAAA (or ATTAAA)

^c McGeoch *et al.* (1988)

^d Telford *et al.* (1992)

^e Ross *et al.* (1993)

Orientation : 転写方向 (leftward: マイナス鎖側, rightward: プラス鎖側)

ATG: 開始コドンの位置

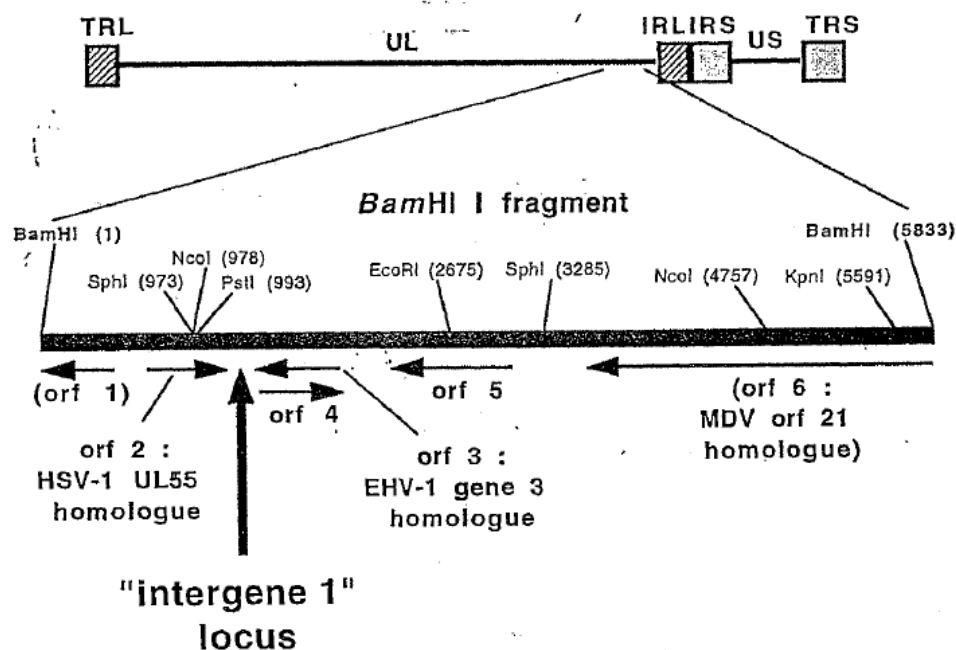
STOP : 終止コドンの位置

orf length: オープンリーディングフレームの長さ

Poly-A : Poly-A 配列の有無 (ある場合にはその位置)

Homology : 同定配列の有無 (ある場合にはその種類)

図2 HVT *Bam*HI I フラグメントにおける「挿入遺伝子 1」遺伝子座の位置



別紙 13

98.132 : 鶏胚線維芽細胞培養で連続継代後の組換えウイルス vHVT013-69 (ガンボロ病ウイルス VP2 遺伝子発現 HVT 組換えウイルス) の *in vitro* における遺伝子学的安定性

要旨

in vitro における組換えウイルス vHVT013-69 の遺伝子学的安定性について、鶏胚線維芽細胞 (CEF) で 5 代及び 10 代継代を行った後、分子生物学手法を用いて解析を行った。

遺伝子組換え領域の安定性は以下の結果より確認された :

- 1) 幾つかの組換え領域特異的なプライマーを用いた PCR 解析の結果 : 継代前、5 代及び 10 代継代したウイルスの遺伝子発現に変化は確認されなかった。PCR の結果は、調べられたウイルスサンプルにおいて、親株 HVT ウイルスの混入が無い事も確認された。
- 2) 組換え領域特異的なプローブ (IBDV VP2 発現カセットプローブ、HVT *Bam*HI I フラグメントプローブ) を用いたハイブリダイゼーションの結果 : 組換え前、連続継代したウイルスの結果に違いは確認されなかった。

継代前、10 代継代したウイルスの組換え領域特異的プローブを用いてハイブリダイゼーションを行ったところ、全領域において vHVT013-69 ゲノムの高い遺伝子学的安定性が示された。これらの結果は、組換えウイルス vHVT013-69 が CEF 細胞において *in vitro* で 10 代継代後に、ゲノムに再変異が無く、組換え遺伝子領域が安定であったことを明確に示している。

挿入遺伝子座 I に IBDV VP2 発現カセットを挿入することによって他のゲノムの安定性に影響を与えなかった。組換えウイルス vHVT013-69 は、少なくとも CEF での製造時に用いられる最大継代数よりも高い継代培養後も、高い安定性があることが明らかとなった。

別紙 14

99.0262 : *in vitro* で連続継代した後の発現安定性

要旨

本試験の目的は、組換えウイルス vHVT013-69 に挿入された IBDV (伝染性ファブリキウス囊病ウイルス) VP2 遺伝子の発現に関する安定性を、CEF (鶏胚線維芽細胞) で *in vitro* で継代した後、確認することであった。

組換えウイルスで感染させた全てのプレート (CEF で 3 代あるいは 8 代継代後のもの) を抗 HVT 血清及び抗 IBDV VP2 モノクローナル抗体で処理した。その後、2 種類の標識抗体、すなわち、抗鶏血清蛍光標識抗体及び抗マウス Cy3 血清蛍光標識抗体を加えた。

CEF で 3 代及び 8 代継代した後の組換えウイルスに HVT 蛋白質及び VP2 蛋白質の発現が観察された。

結論として、CEF での *in vitro* における連続継代後に、vHVT013-69 の 100% のウイルスで、IBDV VP2 蛋白質が発現していた。

組換えウイルス vHVT013-69 は製造時に用いられる最大継代数よりも高い継代数においても IBDV VP2 蛋白質の発現が安定であった。

別紙 15

98.133 : 組換えウイルス vHVT013-69 の *in vivo* における遺伝子安定性の分析 (鶏 (接種対象動物) で 5 代あるいは 9 代継代後の伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (ガンボロ病ウイルス) の VP2 遺伝子を発現する HVT 組換え体ウイルス)

要旨

生体内における組換えウイルス vHVT013-69 の遺伝的安定性について、鶏で 9 代継代を行った後、分子生物学手法を用いて解析を行った。

各材料からウイルス DNA を抽出し、サザンブロッティングおよび PCR により遺伝子組み換え部位を解析し、遺伝的安定性の評価を行った。

サザンブロッティングによる組換え領域の解析

継代前、鶏 5 代及び 9 代継代後のウイルスから調製した DNA を、4 つの制限酵素 (*Bam*HI、*Pst*I、*Nco*I 及び *Sty*I) により処理したところ、組換え領域のサイズが全ての群で完全な相同性を示した。また、組換え領域解析用プローブでのハイブリダイゼーションによって検出されたフラグメントのサイズは理論値と完全に一致していた。しかし、当然の事ながら、サザンブロッティングでは、0.3kb より小さいフラグメントについて検出限界以下であった。

サザンブロッティングによる全ゲノム構造解析

継代前、鶏 5 代継代後、鶏 9 代継代後及び CEF 10 代継代後の 4 種類のウイルス由来の DNA 抽出物を、*Bam*HI、*Pst*I 及び *Hind*III 制限酵素で切断し、サザンブロットした後に、「総 HVT DNA」及び「Bam F」プローブでハイブリダイゼーションを行った。

総 HVT DNA プローブにおけるサザンブロッティングの結果では、*in vivo* における継代前及び鶏 9 代継代後 vHVT013-69 の *Bam*HI、*Pst*I 及び *Hind*III 制限酵素切断プロファイルに想定以外の相違は認められなかった。Bam F プローブにおけるサザンブロッティングの結果では、*in vivo* における継代前及び鶏 9 代継代後の *Bam*HI、*Pst*I 及び *Hind*III 制限酵素切断プロファイルに想定以外の相違は認められなかった。

PCR を用いた組換え領域の分析

親株 HVT FC126 株、vHVT013-69 継代前、鶏における連続継代、CEF における連続継代のウイルス DNA を PCR 反応のテンプレートとして用いた。全ての PCR フラグメントは予想通りの大きさであった。

サザンブロットの結果から、組換え領域の遺伝子構造は、vHVT013-69の鶏9代継代後に変化しなかったことが示された。また、特異的プライマーで得られたPCRの結果から、*in vivo*の遺伝学的安定性が確認され、供試された全ての継代ウイルス(継代前、n+5及びn+9)の中に親株が存在しないことが確認された。

別紙 16

97.359 : SPF 鶏における伝染性ファブリキウス嚢病に対する用量依存性

要旨

1 日齢 SPF 鶏 20 羽の 4 群に対して用量依存性を確認するために、低用量から常用量のワクチンを皮下接種した。また陰性対照群として、ワクチンを接種しない群を設定した。14 日齢時に、全ての鶏を強毒伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) ウイルスで攻撃した。全ての鶏について臨床観察を行い、試験終了時に全ての生存動物を安楽死させ、剖検し、ファブリキウス嚢を組織学的検査のために収集した。ワクチン接種も攻撃も実施しなかった同一日齢で同一由来の 10 羽の鶏については安楽死させて同様の方法で検体を採取し、組織学的検査の対照として用いた。

攻撃によって斃死あるいは重篤な組織学的病変が攻撃対照群の全ての鶏において認められた。対照的に、ワクチン投与群では用量依存的な防御率の上昇が確認され、消瘦変化のパーセンテージは用量依存的であった。これらの結果分析における直線回帰は防御率と用量の対数間の強い相関性を示すものであった。

別紙 17

99.1047.R : SPF 初生雛に対するマレック病ワクチン皮下投与の最小有効量

要旨

本試験の目的は SPF 初生雛に皮下投与した際のマレック病に対する組換えワクチンの用量依存性の効果を評価することである。

D0 に各群 35 羽で構成された 4 群を設定し、各初生雛にそれぞれ 500、750、1000 及び 1500 PFU (2.70、2.88、3.0 及び 3.18 log₁₀ PFU) に調製された組換えワクチンを皮下投与した。またこれら以外に 35 羽をワクチン未接種として維持し、攻撃対照群として設定した。さらに同日に 25 羽を陰性対照群として設定した。

5 日齢 (D4) に陰性対照群以外の全てのワクチン接種群に対してマレック病ウイルス攻撃株を接種した。ウイルス接種後 70 日間 (D4~D74) 観察し、その後 D74 で安楽殺し、マレック病の症状 (主要臓器・神経の肥大・腫瘍形成) について剖検を行った。試験終了前に死亡した供試鶏については MD ウイルスの感染を確認するため剖検を行った。

ウイルス接種によって攻撃種対照群の 94.3% で特徴的な症状 (MD による死亡または傷害) を引き起こした。この結果は欧州薬局方のマレック病生ワクチン (1997:0589) で規定された最小率 (70%) を超えた。この結果は本試験の成立を保証し、接種ウイルス株の病原性と供試鶏の感受性を示した。予想通り、ワクチン未接種・ウイルス株未接種の陰性対照群は未感染のままであった。

ワクチン接種群の比較防御スコアはそれぞれ 66.7%、93.6%、97.0% 及び 100% であった。したがって 750 (2.88 log₁₀) PFU 以上の組換えワクチンのワクチネーションによって欧州薬局方が求める最小率 (80%) を超える MD に対する防御率が得られた。

したがって本試験の条件下では、SPF 初生雛に皮下投与した組換えワクチンの最小有効量は 750 (2.88 log₁₀) PFU と規定された。この接種量によって病原性マレック病ウイルス接種に対して 80% 以上の防御が得られた。

別紙 18

99.016：免疫蛍光法を用いた組換え体 vHVT013 ワクチンの同定試験

要旨

ベクターウイルス（HVT）と組換え蛋白（IBD ウイルスの VP2）を明らかにするため、二重免疫蛍光法を実施する。

同定試験は力価測定で使用した、1 シャーレ当たり 50～100PFU を示す希釈液のシャーレを用いる。シャーレは抗 HVT 血清及び抗 VP2 モノクローナル抗体を用いて二重免疫蛍光法を用いて染色後、蛍光顕微鏡下で観察を行う。

- ・ PBS でシャーレを洗浄する。
- ・ -20℃で 20 分もしくは室温で 5 分、アセトンで固定する。
- ・ すぐに使用するか、使用まで-20℃で保管する。
- ・ PBS で洗浄する。
- ・ 希釈した抗 HVT 血清 1mL を加える。
- ・ 希釈した抗 VP2 モノクローナル抗体 1mL を加える。
- ・ 38℃で 30 分反応させる。
- ・ PBS で洗浄する。
- ・ 希釈した抗マウス IgG 標識抗体 1mL 加える。
- ・ 希釈した抗鶏 IgG 標識抗体を加える。
- ・ 38℃で 30 分反応させる。
- ・ PBS で洗浄する。
- ・ 脱イオン水で洗浄する。
- ・ シャーレを乾燥させる。
- ・ 蛍光顕微鏡下でシャーレを観察する。

同じプラークに緑色蛍光発色（ベクターウイルスに対する）と赤色蛍光発色（IBD VP2 発現産物に対する）が見られることが特異的反応である。

別紙 19

98.154 : vHVT013-69 遺伝子組換え体 : ワクチン接種鶏の体内でのワクチンウイルス株の分布

要旨

70羽の1日齢SPF鶏を交互分配によって以下の4群に分けた :

- G1 : 組換えワクチン株 1用量を接種。
- G2 : 親株である HVT 株 1用量を接種。
- G3 : マレック溶解用液を接種
- G4 : 強毒マレック病ウイルスで攻撃。

G1, G2 及び G3 の 5羽ずつを, D14, D21 及び D28 に安楽死させ、ファブリキウス嚢を採取してウイルス学的検査に供した。5羽中 2羽の羽毛検体を用いて, 毛胞中のウイルス検査を実施した。同様に各検体採取日に G4 の 2羽ずつを安楽死させた。D14, D21 及び D28 に, G1, G2 及び G3 の生存鶏について気管スワブ及び総排泄腔スワブの採取を行い, ウイルス学的検査に供した。試験終了日に, G1, G2 及び G3 のそれぞれの生存鶏から血清を採取して特異的血清学的検査の評価に供した。

全ての総排泄腔及び気管のスワブ検体は陰性で, ファブリキウス嚢も同様に陰性であった。マレック病ウイルスが G1 及び G2 の D14 及び D21 採取毛胞で同定され, D28 では量が減少していた。D14 で G4 にもウイルスが検出された。HVT ウイルスに対する血清学的抗体応答が蛍光抗体法によって G1 及び G2 の全ての鶏で確認された。

試験環境下で, ワクチン株を接種鶏の体内に分布させた。毛胞のみでウイルスが確認された。七面鳥ヘルペスウイルスへの IBDV 遺伝子導入後, 組換え体と親株 HVT 株との結果の相同性から, 性状変化がないことも示された。

別紙 20

97.361 : ワクチン株及び親株における鶏から鶏への伝播

要旨

1 日齢 SPF 鶏 6 羽ずつの 3 群を設定した。

第一群及び第二群の鶏に vHVT013-69 組換え体ワクチン株と親株 HVT をそれぞれ 10^5 PFU 皮下接種した。第三群にはマレック溶解用液を注射した。

それぞれの群について、アイソレーター内で同じ由来と日齢の 4 羽の鶏を 56 日間同居させた。

試験中 (D29) ならびに試験終了時 (D56) に、鶏の白血球について鶏胚線維芽細胞による分離試験によってウイルスの有無を試験した。その結果、ウイルスは双方の接種群において確認された。同居群ならびに対照群 (マレック溶解用液接種) の個体は抗体陰性のままであった。

vHVT013-69 株及び親株 HVT の伝播性は認められなかった。

別紙 21

98.183 : ワクチン株及び親株における鶏から七面鳥への伝播

要旨

1 日齢 SPF 鶏の 3 群を設定した。第一群は鶏 12 羽で、第二群及び第三群はそれぞれ 6 羽であった。第一群の鶏に vHVT013-69 組換えワクチン株を接種し、第二群には親株 HVT を接種し、第三群にはマレック溶解用液を接種した。

それぞれの群について 1 日齢 SPF 七面鳥を同居させた：第一群には 8 羽の七面鳥、第二群及び第三群にはそれぞれ 4 羽の七面鳥を同居させた。

鶏と七面鳥の同居 28 日後（すなわち D28 に）、鶏は安楽死させて、七面鳥についてはさらに 14 日間（すなわち D42 まで）飼育した。

同居終了時点（D28）及び試験終了時（D42）に、鶏胚線維芽細胞を用いてウイルス分離試験を行った。ウイルスは、ウイルスを接種された鶏とそれらと同居していた七面鳥群の双方から検出された。一方、対照群の鳥（マレック溶解用液を注射した鶏及びその後同居した七面鳥）から採取された検体は陰性のままであった。

同様にウイルスに対する特異的な抗体について試験したところ、D28 にウイルスを接種された鶏及び D28 及び D42 に同居させた七面鳥で検出された。一方、対照鳥は抗体陰性であった。

よって、vHVT013-69 株は、親株 HVT と同一のウイルス量で接種したとき、鶏から SPF 七面鳥に伝播することが確認された。

別紙 22

98.255 : vHVT013-69 遺伝子組換えワクチンを接種した SPF 鶏での残存性

要旨

組換えワクチンの SPF 鶏における残存性を確認するため、1 日齢 SPF 鶏を 10 羽ずつ供試し、以下の 4 群を設定した。:

- G0 : 血清学的コントロールとして D0 で安楽殺し、血清学的試験を実施した。
- G1 : 遺伝子組換えワクチン vHVT013-69 を接種した群。
- G2 : HVT FC126 株を接種した群。
- G3 : コントロール、ワクチン未接種。

試験期間中、ウイルス血症を観察した。G1、G2 および G3 すべての鶏から継時的に採血を行った。各サンプルから白血球を分離し、鶏胚細胞(CEC)に接種した。ウイルスの有無は細胞変性効果によって評価した。試験最終日に得られたサンプルにおいて、ウイルス量を定量するため培養細胞上で PFU 数を計測した。

血清学的モニタリングも実施した。まず D0 において G0 を試験し、G1 および G3 について継時的に採血を行った。すべての血清を抗 IBDV 中和抗体価測定に供試した。

ウイルスの存在が G1 で観察期間後半にすべての鶏で確認されたのに対し、G2 ではすべての時点においてすべての鶏がウイルス陽性であった。予想通りコントロール (G3) ではウイルスは分離されなかった。観察終了日における PFU 数は、G2 は G1 の 4 倍を示した。

D0 において G0 のすべての鶏が抗 IBDV 抗体陰性であることが示された。試験期間中、G3 も陰性であった。G1 では D21 においてすべての血清で陽性を示し、抗体価は試験が終了するまで上昇した。

本試験において SPF 鶏における HVT ウイルスの残存は、HVT FC126 株および組換え体どちらについても少なくとも 8 週間は続くことが示された。また本試験においては、組換えワクチンを接種した鶏のウイルス量は、HVT FC126 株を接種した鶏と比較して少ないことが示された。組換えワクチン接種後、ガンボロ病に対する抗体価が安定的に上昇することも証明された。

別紙 23

98.254 : 遺伝子組換え生ワクチン vHVT013-69 株のコウライキジ (*Phasianus colchicus*) における安全性試験

本遺伝子組換え生ワクチンは、伝染性ファブリキウス囊病ウイルス (IBDV) の VP2 遺伝子を発現する HVT ベクターから構成される遺伝子組み換え生ワクチンである。コウライキジは本剤の対象動物ではないが、野鳥における安全性を確認する試験の一つとして本試験を実施した。

試験開始時 (D0) に、7 日齢のコウライキジ (コンベンショナル) および 12 日齢の SPF 鶏に以下の表の通りに接種を行った。なおワクチン接種群では、安全性試験用に適した高用量ワクチンを用いた。

群	動物種	日齢	被験薬	経路
G0	コウライキジ	7	- (D0 の血清検査用非接種対照)	-
G1	コウライキジ	7	組換えワクチン	皮下
G2	コウライキジ	7	溶解用液 (非接種対照)	皮下
G3	鶏	12	組換えワクチン	皮下

D0 に血清学的検査の為に G0 の全羽から採血し、その後安楽殺した。

D0 から試験終了 (D42) まで、G1、G2 および G3 に対して毎日臨床観察を実施し、病気または瀕死のものは安楽殺した。死亡および安楽殺したものについては剖検を行った。

試験終了時 (D42) に G1、G2、G3 の全羽から採血し、その後安楽殺し剖検を行った。剖検時には特にマレック病によって引き起こされる病変について注意を払った。

D0 (G0) および D42 (G1、G2 及び G3) に採取した血清について抗 IBDV 抗体価を個体ごとに中和試験法によって測定した。

試験中に観察された臨床症状および剖検所見は G2 の 2 羽でみられた跛行およびそれに伴う肉眼的病変のみであった。この症状は非特異的なものであり、先天性奇形またはアイソレーターにおける飼育環境によって引き起こされたものであると考えられた。また全試験期間中、G1、G2、G3 のその他のコウライキジおよび鶏では臨床症状および剖検所見の異常を示すものはいなかった。従って、試験期間中に死亡ならびにマレック病および IBD による明らかな兆候は認められなかった。

D0 の中和試験では、7 日齢のコウライキジ (G0) において抗 IBDV 抗体は認められなかった。

D42において、溶解用液を接種したコウライキジの群（G2）では抗IBD抗体価は陰性のままであった。組換えワクチン投与群（G1およびG3）では抗IBD抗体価が陽転し、ワクチン接種が立証された。G3（鶏）では高い抗体価を示したのに対し、G1（コウライキジ）はD0の値より有意に高かったものの鶏よりも低い抗体価であった。

以上のことから、本試験環境下でのコウライキジに対する組換えワクチンの安全性が示された。

別紙 24

98.007：鶏で連続継代後の特性 病原性復帰試験の一環として

要旨

本試験は、鶏における継代後のワクチン株の特性を知るために病原性復帰試験の一環として実施された。

第 1 群として 10 羽の SPF 初生雛に、vHVT013-69 遺伝子組換え生ワクチンを筋肉内接種した。7 日後に、血液サンプルを各雛より採取し、白血球を分離し、プールした。鶏でウイルスを次代に継代をするため、白血球懸濁液の一部を第 2 群として 10 羽の初生 SPF 雛に 1mL 腹腔内接種した。残りの白血球懸濁液は液体窒素内に保管された。

鶏において 9 代の継代を行うため上記手順を同じタイプの鶏で繰り返した。最終継代は大量の白血球を得るために 20 羽の鶏において行われ、14 日齢の時点で採血された。

本試験における規定された観察期間の間（1 週間または 2 週間）において、臨床症状及び死亡は確認されなかった。

ウイルスは継代ごとに鶏胚継代細胞での分離によって検出され、また試験終了時に、鶏における 9 代継代目に相当するウイルスの分離によって検出された。後者のウイルスは分子生物学的手法を用いた遺伝子学的安定性試験に最初に用いられ、次に病原性復帰試験に用いられた。

遺伝子組換え生ワクチン vHVT013-69 を鶏で 9 代継代を行い、ウイルスを採取した。この株は、継代を通して病原性を獲得するような傾向は確認されなかった。

別紙 25

98.334 : ワクチン及び継代株のマレック病に関する安全性

要旨

初生雛 40羽の 6群を D0 に設定し、組換えワクチン及び継代株の安全性をマレック病 (MD) について、欧州薬局方 (1997:0589) に即して評価した。

- G1: 非接種対照群、D9 に攻撃
- G2a: 組換えワクチン、継代レベル MSV+2
- G2b: 組換えワクチン、継代レベル MSV+5 (最終製品の継代レベル)
- G2c: 鶏において継代した組換えワクチン株を接種、継代レベル MSV+2 を鶏で 9 代継代後
- G2d: 鶏胚細胞 (CEC) で増幅した継代株を接種
- G3: 非接種対照群、非攻撃

接種は脚部 (脛末節) 皮下に行った

D9 に、G1 の雛を攻撃株でチャレンジし、D78 まで臨床的に評価した。生存鶏は安楽死し、MD の兆候 (主要臓器又は神経叢の肥大又は腫瘍病変) について剖検を行った。

その他の全ての群 (G2 及び G3) は少なくとも接種後 120 日 (D120 又は D121) まで臨床的に観察した。この期間中、死亡が記録された。試験終了時に、生存鶏は全て安楽死し、MD の兆候について剖検した。上腕及び坐骨神経叢及び生殖腺を組織学的検査のためにサンプリングした。MD に一致する肉眼病変を全てのサンプルについて検索した。

D28 に、G2 の各群及び G3 の 5 羽から抗 IBDV 抗体検査用に血液をサンプリングした。

D120 に、G2 の各群 10 羽及び G3 の全羽から採血を行った: 各個体の血清について抗 HVT 抗体を免疫蛍光法によって検査した。

試験の妥当性は、欧州薬局方の MD 生ワクチン安全性試験の要件 (1997:0589) に合致し、使用した鶏の感受性等がバリデートされた。

ワクチン株 (継代レベル MSV+2 及び MSV+5) 接種群において試験終了時の生存数は非攻撃対照と同等であり、MD 肉眼病変を示したものもなかった。これらの群は全ての鶏において抗 HVT 及び抗 IBDV 抗体の存在が確認された。これらの群において MD に一致する組織学的傷害は観察されず、追加的な安全性の基準と考えることができる。

G2d の全ての鶏は抗 HVT 及び抗 IBDV 抗体を示し、これはウイルスがテイクされたことを示しており、また、MD の肉眼病変を示した鶏はいなかった。非継代ウイルスと比較して継代ウイルスの病原性の増加を示唆するものはなかった。継代ウイルス (増幅又は増幅なし) を接種された群の組織学的結果は、非継代ウイルスを接種された群と統計学的に有意差はなかった。

組換えワクチンの MD に関する安全性及びウイルス株の病原性復帰がないことは欧州薬局
方モノグラフ MD 生ワクチン (1997:0589) の要件に関して証明された。

別紙 26

98.294 : 鶏で連続継代後の組換え領域のシーケンスによる vHVT013-69 の *in vivo* 遺伝子学的安定性

要旨

vHVT013-69 遺伝子組換えウイルスの組換え領域（フランキング領域及び MCMV-IE / IBDV VP2 発現カセット）のシーケンスの安定性を鶏での *in vivo* 継代後に試験した。

鶏で9代 *in vivo* 継代した vHVT013-69 遺伝子組換えウイルスから抽出した DNA について、ドナープラスミドの組換え領域のシーケンスと比較するためにシーケンスを行った。

この試験によりさらに vHVT013-69 の組換え領域（MCMV-IE/IBDV VP2 発現カセット及び周囲の領域（フランキングアーム））の安定性を分子生物学レベルで評価した。

鶏で 9 代継代及び鶏胚線維芽細胞で 3 代継代増幅後に得られた組換え領域のシーケンスは、組換えウイルスを作成するために使用したドナープラスミド pEL098 のシーケンスと完全に同一であることが示された。

この試験により、鶏における複数の連続継代後の遺伝子組換えウイルス vHVT013-69 の高い安定性が証明された。

別紙 27

99.0548.R : vHVT013-69 遺伝子組換え生ワクチン

HVT ウイルスの存在下でのコンベンショナル七面鳥における伝播

目的

本試験の目的は、HVT ウイルスに感染した七面鳥の存在下で、組換えワクチンの伝播性を評価することであった。

供試動物

1 日齢コンベンショナル七面鳥 (D0 及び D28 の 2 群を設定した)

群設定

D0 における群設定

- G0a : 血清対照 (D0 にサンプル採取)
- G1 : 組換えワクチンを D0 に接種
- G2 : HVT を D0 に接種 (G1 と同居)
- G3 : 非接種 (D0 に G1 及び G2 と同居)
- G4 : 組換えワクチンを D0 に接種
- G5 : 非接種 (D0 に G4 と同居)
- G11 : 無処置 (ウイルス血症陰性対照)

D28 における群設定

- G0b : 血清対照 (D28 に 1 日齢雛よりサンプル採取)
- G6 : HVT を 1 日齢雛に D28 に接種 (D28 に G2 と同居)
- G7 : 非接種 (1 日齢雛を G2 及び G6 と D28 に同居)
- G8 : HVT を 1 日齢雛に D28 に接種
- G9 : 非接種 (1 日齢雛を D28 に G8 と同居)
- G10 : 非接種 (1 日齢雛を D28 に G3 及び G5 に同居)
- G12 : 無処置 (ウイルス血症陰性対照)

初代 (D0~D28)

D0 に 65 羽の 1 日齢雛を設定した群に割り付け、G1 及び G4 に組換えワクチン、G2 に HVT を接種した。G1、G2 及び G3 を部屋 A に、G4 及び G5 を部屋 B に入れて 28 日間同居させた。D28 に G1 及び G4 を安楽殺し、他の群は 2 代目継代に使用した。

2 代目継代 (D28～D57)

D28 に初代と同様の操作を 65 羽の 1 日齢雛に対して実施した。G6 及び G7 は G2 と同じ部屋 A で、G10 は G3 及び G5 と部屋 B で、G8 及び G9 は部屋 C で 29 日間飼育した。D57 に G2、G3 及び G5 は安楽殺し、G6、G7、G8、G9 及び G10 は D77 までそれぞれの部屋で維持した。

HVT 及び組換えワクチンの実際の継代は、各継代開始時及び終了時に、HVT 蛍光抗体 (IF) 法及び IBD 中和試験を用い、血清学的に評価した。G11 及び G12 については HVT 感染に関して鳥の状態を確認するため、初代及び 2 代目継代終了時にウイルス分離を実施した。

結果及び考察

G11 及び G12 からのウイルス分離の結果、試験に使用した七面鳥は HVT に自然感染しなかったことが示された。

非感染七面鳥における HVT 単独の伝播

G8 (HVT) 及び G9 (非接種) の評価によって HVT の七面鳥間の伝播性を確認できる。G8 との同居 29 日後に、G9 の 9 羽中 7 羽に抗体が認められた。また、同居 49 日後には G9 の全羽に HVT 抗体が確認された。これにより、HVT 接種七面鳥から非接種七面鳥への伝播が示された。

非接種七面鳥における組換えワクチン単独の伝播

G4 (組換えワクチン) 及び G5 (非接種) の評価によってワクチンの七面鳥間の伝播性を確認できる。D28 に G5 に IBDV の抗体陽転は確認されなかったが、9 羽中 5 羽半数以上に HVT 抗体が確認された。D57 には 9 羽中 2 羽数羽に IBDV 抗体が確認された。これは G4 から組換えワクチンが伝播したことによると考えられた。

HVT 感染七面鳥における組換えワクチンの継代

初代

G2 (HVT) を G1 (組換えワクチン) に D0 から D28 まで同居させた。D28 に G2 の 1 羽にわずかな IBDV 抗体が認められ、D57 に 3 羽に同様に認められた。この抗体価レベルは特異的ではないが、HVT 接種七面鳥に組換えワクチンが感染したことを示すものかもしれない。

2 代目継代

2 代目継代として G2 を G7 (非接種) と G6 (HVT) に同居させた。G6 の全羽は試験終了時 (D77) まで IBDV 抗体陰性であった。G7 の全羽は D57 に HVT に対する IF 反応

を強く示したが、それらは IBD に対しては試験終了時まで陰性であった。

以上の結果から、組換えワクチンの HVT 感染七面鳥における伝播はあまり起こりえず、起こったとしても HVT 感染七面鳥において 2 代目には継代されないことが示された。

HVT 存在下での非感染七面鳥における組換えワクチンの伝播

初代

G1 (組換えワクチン)、G2 (HVT) 及び G3 (非接種) の D0 から D28 の同居によって HVT 存在下での非感染七面鳥の組換えワクチンの伝播性を評価できる。G3 の 10 羽中 2 羽にわずかな IBD 抗体が認められ、3 羽に HVT 抗体が認められた。D57 には G3 に IBD 抗体陽性個体は認められなかったが、HVT 抗体は強い反応が認められた。これらのことから、HVT は G2 から G3 に広がり、組換えワクチンは HVT 存在下で G3 に広がらないことが示された。

2 代目継代

HVT 存在下での組換えワクチンの潜在的な継代を、G3、G5 及び G10 間の同居によって評価した。これらの群は何れも直接ウイルスの接種を受けていない。D57 に G10 の 10 羽中 1 羽に非特異的な IBD 抗体が認められ、6 羽に HVT 抗体が認められた。この結果より、HVT ウイルスは G10 にのみ広がったことを示している。HVT 存在下で非接種七面鳥に組換えワクチンの伝播がなかったことが確認された。

HVT は本試験条件で接種七面鳥から非接種七面鳥へ伝播したことが血清学的に証明された。組換えワクチンも七面鳥で伝播可能であることが確認されたが、HVT 感染七面鳥の存在下では組換えワクチンは七面鳥間の伝播が起こらないことが示された。

別紙 28

七面鳥ヘルペスウイルス成分を含有する既承認ワクチン

表 日本で承認されている七面鳥ヘルペスウイルス成分を含有するワクチン

製品名称	製造販売業者	製造用株	承認年月日
2 価 MD 生ワクチン(H+C)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV CVI 988 株	平成 20 年 7 月 16 日
2 価 MD 生ワクチン (HVT+ SB-1)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	昭和 63 年 3 月 1 日
MD (HVT) 1000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株	平成 25 年 5 月 14 日
MD (HVT) 2000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株	平成 25 年 5 月 14 日
MD (HVT+SB-1) 1000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	平成 25 年 5 月 14 日
MD (HVT+SB-1) 2000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	平成 25 年 5 月 14 日
MD 生ワクチン (2H)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株	平成 3 年 11 月 28 日
MD 生ワクチン (HVT)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC 126 株	平成 17 年 3 月 9 日
アビテクト HVT	一般財団法人化学及血 清療法研究所	HVT YT-7 株	平成 24 年 7 月 4 日
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	APV TL 株 HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	平成 20 年 10 月 28 日
2 価 MD 生ワクチン (H+S)	ワクチノーバ株式会社	HVT FC 126 株 MDV SB-1 株	平成 17 年 3 月 15 日
2 価 MD 生ワクチン (H+S) 2000	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株 MDV SB-1 株	平成 14 年 7 月 18 日
日生研マレック乾燥ワクチン	日生研株式会社	HVT H2 株	平成 15 年 4 月 2 日
日生研マレックワクチン Q	日生研株式会社	HVT H2 株	昭和 47 年 6 月 21 日
バックスオン MD (HVT+CVI) -N	ワクチノーバ株式会社	HVT FC 126 株 MDV CVI988-N	平成 26 年 11 月 21 日

		株	
ポールバック MD HVT+SB-1	共立製薬株式会社	HVT FC-126 ・ KS 株 MDV SB-1 ・ KS 株	平成 21 年 6 月 15 日
ポールバック MD HVT	共立製薬株式会社	HVT FC-126 ・ KS 株	平成 20 年 9 月 9 日
マレック病生ワクチン	ワクチノーバ株式会社	HVT FC-126 株	昭和 48 年 10 月 2 日
マレック病生ワクチン “化血研”	一般財団法人化学及血 清療法研究所	HVT YT-7 株	平成 1 年 4 月 21 日

別紙 29

01.0440 : ワクチンウイルス及び HVT の環境における拡散性 SPF 鶏接種後の粉塵及び敷き藁に関連するウイルスの追跡

要旨

本試験の目的は、組換えワクチン及び HVT 接種 SPF 鶏の粉塵及び敷き藁におけるウイルス感染価を評価することであった。

1 日齢 SPF 鶏 15 羽ずつを G1、G2 及び G3 に D0 に設定し、下記のように皮下接種した。

- G1 : 組換えワクチン
- G2 : HVT FC126
- G3 : 溶解用液

各群を別々のアイソレーターに設置し、飼育後、各アイソレーターから粉塵及び敷き藁から採材し、鶏胚培養細胞に接種してウイルスを検出した。

本試験条件で、分離ウイルスは認められなかった。仮に接種鶏から排泄された組換えワクチンウイルス又は HVT が粉塵及び敷き藁に存在していても、排泄レベルは分離可能なレベルより低い。

別紙 30

01.0486 : 七面鳥における安全性 ワクチンウイルス及び HVT の敷き藁を通じた鶏から七面鳥への伝播 七面鳥間の伝播

要旨

本試験の目的は、(i) 組換えワクチン及び HVT の敷き藁を通じた鶏から七面鳥への伝播、(ii) 七面鳥におけるワクチンウイルスの複製及び持続能、及び HVT のそれとの比較であった。

本試験は 3 つのフェイズから成る。

- 高用量の組換えワクチン (G1) 又は HVT (G2) を皮下接種、又は非接種 (G3) の SPF 鶏の 3 群を 21 日間飼育する。
- それらの鶏の敷き藁の上で SPF 七面鳥 4 群を 20 日間飼育した後、敷き藁を除き、更に 22 日間飼育する。(G1 の敷き藁、G2 の敷き藁、G1+G2 の敷き藁、G3 の敷き藁)
- 敷き藁を除いたとき、これらの潜在的に感染した七面鳥を非接種の七面鳥と同居させ 22 日間飼育し、それらの同居七面鳥を更に 21 日間飼育する。

これらの群の IBD 中和抗体、HVT 蛍光抗体について血清学的に観察した。採血までの期間は完全に血清転換するのに十分な長さであった。

結果

- 接種群 (G1、G2) は血清陽転し、最初のウイルスがテイクされたことが証明された。
- 対照群 (G3、G7、G11) において血清転換はなく、操作の適正が証明された。
- HVT の伝播 : G5 及び G9 の全ての七面鳥は HVT 陽性に血清転換し、敷き藁からウイルスが伝播したことが証明された。
- 組換えワクチンの伝播 : G4 において、IBDV 陽性になった七面鳥は非常に低い抗体価の数羽のみであり、それらの抗体価レベルはある採取日と他の日に一貫性がなかった。G8 において、採取日当たり多くて 1 羽 (各日によって異なる鳥) に IBD 抗体が認められた。同様の血清学的パターンが HVT についても認められた。IBD と HVT 抗体応答の間に一貫性は認められなかった。七面鳥の初代継代後にウイルス回収ができなかったこと、低い抗体応答と一貫性のなさは、組換えワクチンが鶏から七面鳥に敷き藁を通じて伝播しなかったことを示唆している。
- HVT+組換えワクチンの伝播 : 結果は組換えワクチン伝播について認められたのと同様であった。HVT ウイルスが G2-G5-G9 で認められたのと同様に伝播しなかった理由は明らかではなかった ; おそらく、G1 と G2 の敷き藁を混合したことによって「ウイル

スが希釈された」ことと関連する（ウイルス濃度が全体的に低くなり、最小感染量に近かった）。しかしながら、データによって、鶏の敷き藁を通じた七面鳥に対する組換えワクチンの感染性が低いことが確認された。

本試験条件下で、

- HVT は鶏から七面鳥に敷き藁を通じて伝播した。
- 組換えワクチンの鶏から七面鳥への敷き藁を通じた伝播は認められなかった。

別紙 31

01.0856 : 七面鳥及び鶏におけるワクチン感染性の比較 用量依存性

要旨

本試験は、用法でない自然感染経路、及び皮下接種の場合の、七面鳥及び鶏における組換えワクチンの感染性を比較するために設定された。

組換えワクチンは、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の VP2 遺伝子を発現する HVT ベクターから構成される遺伝子組換え生ワクチンである。

D0 に、8 日齢コンベンショナル七面鳥及び 6 日齢 SPF 鶏に低用量から高用量の組換えワクチン接種を行った後、血清を採取し、抗 IBDV 抗体及び抗 HVT 抗体の有無を確認した。

本試験条件において、以下の結果が示された。

- 鶏及び七面鳥の両方とも、組換えワクチン低用量の皮下接種によって感染した。
- 七面鳥は用法外の接種経路で高用量のワクチン接種によって部分的に感染したが、鶏は用法外の経路ではワクチンに感染しなかった。

この結果から、ワクチンは鶏に伝播せず、七面鳥には伝播する可能性があることが示唆された。また、七面鳥は鶏と比較して用法外の投与により感染しやすいが、部分的な陽転を誘導するにはかなりの高用量が必要である。

別紙 32

98.355 : マレック病血清型 1 及び 2 との組換えリスク

要旨

本試験の目的は、組換えワクチンと異なるマレック病 (MD) ウイルス血清型 1 型及び 2 型との組換えリスクを臨床的に評価することであった。様々な病原性の 3 種の MD ウイルスを使用した : GA22 株 (低病原性、血清型 1)、SB1 株 (血清型 2) 及び Rispens 株 (ワクチンとして一般的に使用される非病原性株、血清型 1)。D0 に SPF 初生鶏を含む 8 群が設定され、以下のように接種された。

- G1 組換えワクチン及び GA22 株接種群
- G2 組換えワクチン及び SB1 株接種群
- G3 組換えワクチン接種群
- G4 GA22 株接種群
- G5 SB1 株接種群
- G6 組換えワクチン及び Rispens 株接種群
- G7 Rispens 株接種群
- G8 非接種群

D0 に、群分け前に同一鶏群の 10 羽から血清学的対照としてサンプルを採取した。D120 に、各群 10 羽から血液サンプルを採取した。血清はマレック病について検査した。

全ての鶏の体重を D7、D21 及び D120 に測定した。

120 日間毎日臨床観察を実施した。異常及び死亡鶏を記録し、瀕死の鶏は安楽殺した。死亡又は安楽殺した鶏はマレック病の徴候がないか剖検し、組織学的検査のためにサンプル採取した。

D120 に、全ての生存鶏を安楽殺し、マレック病の徴候がないか剖検した。同日、G1 及び G4 から 10 羽を無作為に抽出し、組織学的検査に供した。

血清学的結果より、G1 から G7 における接種が適正であることがわかった。対照 (G8) は MD に対して血清陰性のままであった。

D120 の体重を統計学的に比較した。この分析で、ウイルス単独接種との比較において、組換えワクチンとどのタイプの MD ウイルスを組み合わせても体重に有害な影響がないことが示された。

G1 及び G4 で斃死率が高かったが、これらの群は低病原性 GA22 株を接種されていた。これらの群の斃死鶏のほとんどは、肉眼的及び組織学的にマレック病に一致する病変が認め

られた。試験終了時、MD 肉眼病変を示した鶏がこれら 2 群に 4 羽ずつ認められた。D120 の組織サンプルの多くは MD の徴候を示した。G1 及び G4 の累積斃死曲線はまた、GA 株と組換えワクチンの両方を接種することによって MD が遅延することを示している。

他の群ではほとんど斃死はなかった。これらの群の斃死鶏で肉眼的に MD 病変を示した例はなく、D120 に生存していた鶏で最終剖検時に MD 肉眼病変を示した例はなかった。SB1 株を接種した群において、2 羽が試験期間中に死亡したが（1 羽は G2、もう 1 羽は G5）、神経に軽度なリンパ球浸潤が認められた。この種の病変は MD ワクチン接種後に通常観察され、SB1 株は非病原性であることが知られている。つまり、MD はおそらくこれら 2 羽の死亡の原因ではない。

組換えワクチンと組み合わせても MD ウイルス株の病原性に変化はなかった。本試験条件において、組換えワクチンとマレック病ウイルス血清型 1 及び 2 の同時接種で、潜在的な組換えによる病原性の増加の傾向はなかった。

別紙 33

00.0897：野外試験 発育鶏卵内接種 — ガンボロ病に対する力価及び免疫持続

要旨

本試験は、組換えワクチンを野外で発育鶏卵内接種した際の力価を試験することを目的とした。力価は血清学的に評価し、動物舎に移送した鶏について超強毒 IBD ウイルス (vvIBDV) で攻撃試験を行った。

各鶏群について 2 群を設定した：

G1：組換えワクチンを卵内接種したブロイラー

G2：溶解用液を卵内接種した対照ブロイラー

18 日齢以上の発育鶏卵に孵化場で接種機を用いて卵内接種を実施した。孵化日を本試験の Day 0 (D0) とした。最初の 2 鶏群からの約 300 羽 (150 羽/群) の雛を、その後の攻撃のため D0 に施設に移動した。他の雛はその農場の標準的な手順に従って飼育した。野外で採血された G2 の鶏は、標準的なワクチネーションプログラムに従って、一般的に野外で使用されている IBDV 中等毒株に対する生ワクチンを 2 週齢時までに接種された。

3 農場の鶏は畜産の観点からモニターした — 斃死率、平均体重及び各群の出荷時廃棄率。全飼育期間中、中和試験によって IBD の血清学的追跡を実施した。

F1 及び F2 鶏群について、動物飼育施設において vvIBDV 株を用いて 2 回の攻撃試験を実施した。：早期の攻撃として 3 週齢 (D21 又は D22)、後期の攻撃として 6 週齢 (D40 又は D42)。各群各日において少なくとも 20 羽が攻撃された。10 羽の非攻撃陰性対照を各攻撃について設定した。各攻撃時、死亡、若しくは攻撃後 10 日にファブリキウス嚢に重度な組織学的病変があった場合、その鶏は陽性と考えられた。

畜産データは組換えワクチン接種群と対照群で同等であり、出荷時の経済学的結果についても問題なかった。

血清学的結果により、ブロイラーは孵化時に高い IBD 移行抗体価があることが確認された。抗体価レベルは、移行抗体の減少により、その後およそ 3 週齢まで減少した。施設で維持された非ワクチン接種群の G2 の鶏の IBD 抗体価は、その後 6 週齢時の最後の血液採取時まで減少し続けた。組換えワクチン接種群 (野外+施設内) において、D20 から D25 に、IBD 抗体価の上昇又は安定が観察された。

標準的な IBD ワクチン接種を受けた G2 のワクチンテイクは最初の 2 鶏群において満足いくものではないようであったが、F3 において明らかな陽転が認められた。標準的なワクチ

ン接種を受けた G2 の抗体価レベルは組換えワクチン接種を受けた鶏で観察されたよりも低かった。

後期の攻撃後 (D40/42)、G1 及び G2 の防御数の間に大きな有意差が認められた
2 鶏群の攻撃後に得られた結果は同等であり、収集したデータの再現性及び信頼性があることを示している。

野外条件下における 18 日齢コンベンショナル発育鶏卵に対する組換えワクチン接種後の力価及び免疫持続が vvIBDV 攻撃に対して証明された。免疫は、少なくともブロイラーの経済寿命の間維持することが示された。

工業スケールで実施した試験において、対照は農場で非接種として維持できなかった。すなわち、IBD ワクチンとして野外で広く使用されている IBD ワクチンを対象として接種した。動物舎内で飼育した対照は非接種で維持し、それらによって攻撃に使用する感受性動物として供試でき、また、移行抗体減衰を血清学的にモニター可能になった。

2 回の攻撃試験の実施は欧州薬局方における IBD 生ワクチンの力価試験モデル (モノグラフ 1997 :0587) に基づいて実施された。

各群はワクチンテイクを確認するため、血清学的に検査された。

農場で試験期間を通じてモニターした項目 (体重、死亡率、出荷維持の畜産学的データ) によって、本試験が通常の野外モデルに準じていることを確認できる。それらはまた、野外環境におけるワクチンの安全性を示すことができる。

畜産学的データ

組換えワクチン接種群 (G1) 及び参照 IBD ワクチン接種群 (G2) の畜産学的データは鶏群及び群間で同等であった。

全ての鶏群の死亡率は中程度で、全体的に群間で同等であり、鶏群ごとについても同等であった。

出荷時の経済学的結果は、全ての鶏群で問題なく、その鶏種で予想されるものに合致していた。

別紙 34

RW-14-06-003 : 独立プレートにおけるマレックウイルスベクターと導入遺伝子ウイルス含有量における相違の検討

要旨

本試験は、七面鳥ヘルペスウイルス（HVT）ウイルスベクターと導入遺伝子の含有量（発現）の相違を確認するために実施された。

独立したプレートを測定し、平均値を数理生物学（BioMath）解析することによってベクターと導入遺伝子の発現の相違の評価が行われた。正確な試験結果を得るため、試験は同じ品質管理認定技師によって測定され、十分なサンプル数についてを繰り返し測定した平均値から解析を実施した。測定時におけるアンプルセットは、測定ごとに別のアンプルが使用され、それぞれのアンプル測定結果は 5 回測定されたものの平均値（PFU/Dose）として報告された。BioMath 解析は、Log 変換された測定結果である HVT ベクター含有量の平均値（PFU/Dose）から導入遺伝子の発現の平均値を割った値で実施され、統計解析が実施された。

HVT ベクターと導入遺伝子の発現の分散の階層分解解析の結果、製品コードとそれぞれのロットに有意差が無く、またベクターと導入遺伝子の発現に関しても相違が無い事を示している。また、小分け製品における本試験で用いられたすべてのアンプルにおいて、ベクターと導入遺伝子の発現の同一性が確認された。

別紙 35

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の VP2 タンパクのアレルゲンとしての可能性

伝染性ファブリキウス嚢病 (IBDV) の VP2 タンパクのシークエンスは GeneBank より vHVT013-69 株供与核酸の構成要素である Faragher 52/70 株の VP2, VP4, VP3 の Fusion タンパクを使用した (Accession no. HG974565)。

このシークエンスをアレルゲン検索サイトである AllergenOnline (University of Nebraska-Lincoln: <http://www.allergenonline.com/index.shtml>) でアレルゲンとなるシークエンスが存在するかどうかを検索した。1897 のアレルギー物質のライブラリーシークエンスからアレルゲンシークエンスと考えられる 443551 アミノ酸残基とホモロジー検索を実施し、全シークエンスアライメントで 50%を超える交差反応性で一致するアレルゲンシークエンスの探索、及び各タンパク質の 80 アミノ酸セグメントのスライディングウィンドウ検索 (80 アミノ酸ごとの相同性検索) を使用して 35%よりもホモロジーの大きいものを探索した (CODEX Alimentarius guidelines, 2003 に従う)。結果、IBDV VP2 タンパクシークエンスと、登録されているアレルゲンシークエンスに相同性のあるシークエンスは存在しなかった。