

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 3 月 3 日

農林水産大臣 林 芳正 殿
環境大臣 石原 伸晃 殿

氏名 ゾエティス・ジャパン株式会社
申請者 代表取締役社長 ホルヘ・ペレスマルチネス
住所 東京都渋谷区代々木三丁目 22 番 7 号

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

<p>遺伝子組換え生物等の 種類の名称</p>	<p>aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株 (ポールバック <i>E.coli</i>) (<i>Escherichia coli</i>)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容</p>	<p>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。)</p> <p>薬事法(昭和 35 年法律第 145 号) 第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験(以下「治験」という。) に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成 9 年農林水産省令 75 号) 第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用</p> <p>薬事法第 14 条第 1 項に基づく承認申請書に従った使用(に該当する行為は除く。)</p> <p>接種(鶏への接種)</p> <p>廃棄物の処理及び清掃に関する法律(昭和 45 年法律第 137 号) 第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残さの廃棄</p> <p>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を伴う場合を含む。)</p> <p>~ に付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法</p>	<p>-</p>

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株 (ポールバック *E.coli*)
(*Escherichia coli*)
の生物多様性影響評価書

目次

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株 (ポールバック *E.coli*) (*Escherichia coli*) の生物多様性影響評価書

I	生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	1
1	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	1
(1)	分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	1
(2)	使用等の歴史及び現状	1
(3)	生理学的及び生態学(生物学)的特性	2
イ	基本的特性	2
ロ	生息又は生育(増殖)可能な環境の条件	4
ハ	捕食性又は寄生性	4
ニ	繁殖又は増殖の様式	4
ホ	病原性	6
ヘ	有害物質の産生性	7
ト	その他の情報	8
2	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	8
(1)	供与核酸に供する情報	8
イ	構成及び構成要素の由来	8
ロ	構成要素の機能	10
(2)	ベクターに関する情報	11
イ	名称及び由来	11
ロ	特性	11
(3)	遺伝子組換え生物の調製方法	11
イ	宿主内に移入された核酸全体の構成	11
ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法	12
ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過	13
(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	14
(5)	遺伝子組換え微生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	14

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	15
イ 遺伝子組換え微生物と、その調製に利用した宿主又はこれに属する生物種との特性の違い	15
ロ 遺伝子組換え微生物の宿主との識別を可能とするコロニー形成性、発色性等の特徴	19
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	19
(1) 使用等の内容	20
(2) 使用等の方法	21
(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	21
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	21
(5) 実験室等で使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果	21
(6) 国外における使用等に関する情報	21
(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報	22
II 項目ごとの生物多様性影響評価	24
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）	24
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	24
(2) 影響の具体的内容の評価	24
(3) 影響の生じやすさの評価	24
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無	24
2 病原性（野生動物に感染し、それらの野生動物の生息又は育成に支障を及ぼす性質）	24
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	24
(2) 影響の具体的内容の評価	25
(3) 影響の生じやすさの評価	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無	25
3 有害物質の産生性（野生動物の生息又は育成に支障を及ぼす物質を産生する性質）	26
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	26
(2) 影響の具体的内容の評価	26
(3) 影響の生じやすさの評価	26
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無	26
4 核酸を水平伝播する性質（法が対象とする技術により移入された核酸を野生動植物又は他の動植物に伝播する性質）	26
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	26

(2) 影響の具体的内容の評価	27
(3) 影響の生じやすさの評価	27
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無	27
5 その他の性質（生態系の基盤を変化させることを通じて間接的に野生動植物等に影響を与える性質等生物多様性影響評価を行うことが適切であると考えられるもの）	27
III 生物多様性影響の総合評価	28
本申請書で使用する略号・用語表	29
引用文献	33

緊急措置計画書

モニタリング計画書

別添資料

別紙

参考資料

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株 (ポールバック *E.coli*)
(*Escherichia coli*)
の生物多様性影響評価書

I 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

大腸菌 (鶏大腸菌を含む)

大腸菌は、原核生物であり、真正細菌ドメイン (バクテリア)、細菌界 (バクテリア)、ネジバクテリア亜界、グリコバクテリア下界、プロテオバクテリア門 (ガンマサブグループ)、腸内細菌科 (エンテロバクター)、エシエリヒア属、大腸菌 (*Escherichia coli*; *E.coli*) に分類される細菌の種の一つである。大腸菌は、グラム陰性桿菌で通性嫌気性菌に属し、環境中に存在する腸内細菌で温血動物 (鳥類あるいは哺乳動物) の消化管内、特に大腸に生息する。大腸菌は、それぞれの特徴によって株 (strain) と呼ばれる群に分類ことができ、さらに、それぞれ異なる動物の腸内に生息することから、非常に多くの株が存在し血清型 (O 抗原; 154 種類以上、H 抗原; 49 種類以上) も多岐にわたる (文献 1, 5, 6, 7)。

大腸菌は鶏の腸管内に正常細菌叢として常在するが、鶏に対して病原性を示す大腸菌を特に鶏大腸菌 (APEC: avian pathogenic *Escherichia coli*) と呼ぶ (文献 7, 8, 10, 15)。鶏大腸菌は世界的に分布する (文献 10)。

宿主鶏大腸菌 EC34195 株

遺伝子組換え大腸菌の宿主として用いた宿主鶏大腸菌 EC34195 は、英国において鶏大腸菌症の臨床例から分離された野生株で、1995 年に英国獣医学研究所 (Veterinary Laboratories Agency; Weybridge, UK) において血清型 O78:K80、コロニー形態 (L) 及び血球凝集能等が決定された (参考資料 1, 10)。

(2) 使用等の歴史及び現状

宿主鶏大腸菌 EC34195 株: 上述した宿主鶏大腸菌 EC34195 株は、ワクチン候補株として 2000 年から英国獣医学研究所において研究開発が行われ (参考資料 1) 2007 年 1 月に米国 (フォートダッジ・アニマルヘルス社) が *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株 (ポールバック *E.coli*) として承認を取得した。

(3) 生理学的及び生態学 (生物学) 的特性

イ 基本的特性

大腸菌（鶏大腸菌を含む）

大腸菌は、グラム陰性の通性嫌気性桿菌で、運動性を有し、赤血球を凝集するが、マンノース存在下で赤血球凝集が阻止される菌株が多数を占める（文献6, 7）。

大腸菌の多くは、性線毛、菌体線毛及び鞭毛を保有する（文献16）。菌体線毛には、マンノース結合性のI型線毛、K88線毛、K99線毛、P線毛、S線毛、IV型線毛、Curli線毛等が知られている（文献6, 15）。鶏大腸菌ではI型線毛を保有する菌株が70～100%と高率で存在し、P線毛を保有する菌株は25%程度とされる（文献15）。この他の線毛に関しては、鶏大腸菌株でS型線毛やIV型線毛が保有されていることもある。また、Curli線毛は鶏大腸菌を含む大半の大腸菌で保有されている。

至的増殖温度は37℃で、18～44℃またはそれよりも低温で発育する（文献7）。普通寒天培地でよく発育し、コロニーを形成する。コンゴレッドを添加した寒天培地上でコンゴレッド吸着性を示す菌株が存在する。

HEp-2細胞及びHT2916E細胞等の株化細胞、並びに特定の器官外植片に付着性を示す菌株が存在する。

血清学的性状：

大腸菌の血清型は、細胞壁由来で糖脂質のO抗原（154種類以上）、形態学的には莢膜として認められるK抗原（80種類以上）及び鞭毛由来のH抗原（49種類以上）に基づき分類される（文献6, 7）。

鶏大腸菌症例では、O1、O2及びO78が分離されることが多いが、その他の血清型や血清型別不能の鶏大腸菌も多い（文献8, 9, 10）。

生化学的性状（文献6, 7, 10）：

定型的な生化学的性状は、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性で、ブドウ糖及び他の糖を発酵し、IMViC検査では、インドール産生能陽性、メチールレッド反応陽性、Voges-Proskauer（VP）反応陰性、クエン酸利用能陰性を示す。

遺伝子学的性状：

大腸菌株の遺伝子型の鑑別には、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE法）、multilocus sequence typing（MLST）法等の分子遺伝学的手法が利用される。

MLST法による遺伝子型の鑑別では、日本で分離された鶏大腸菌血清型O78の54.3%はST23であり、これ以外では、ST117、ST155、ST369、ST1645が確認されている（文献17）。

上述の手法以外にも、鶏大腸菌を鑑別するとき、保有率の高い遺伝子を菌株のマーカーとして利用することがある（参考資料1, 文献1, 10）。

感受性動物、感染経路及び感染様式：

大腸菌はヒトを含む哺乳類及び鳥類の全般に感染し、その宿主域は極めて広い。血清型によって菌分離される宿主動物にある程度の偏向性が認められる。

大腸菌は、哺乳類及び鳥類の消化管内で保菌され、糞便によって体外に排泄され、汚染された食物や水等から主に経口感染する。呼吸器や創傷から感染することもある。鶏では、上記の感染経路に加えて、介卵感染により垂直感染する（文献10）。その様式には、種卵表面が糞便に汚染され、大腸菌が卵殻を通過して侵入することにより起こるon eggの感染と、種鶏の卵巣や卵管が大腸菌に汚染され、そのとき形成された卵の内部に大腸菌が侵入することによるin eggの感染がある。

宿主鶏大腸菌EC34195株

生物学的性状（参考資料1）：

宿主鶏大腸菌EC34195株は、グラム陰性の桿菌で、運動性を有し、赤血球を凝集するが、マンノース存在下で赤血球凝集は阻止された。また、透過型電子顕微鏡下でI型線毛、Curli線毛及び鞭毛が認められた。宿主鶏大腸菌EC34195株は、CFA寒天培地で発育し、I型コロニーを形成した。当該菌株のコロニーは、コンゴレッドを吸着した。そして、HEp-2細胞、HT2916E細胞、鶏の気管外植片及び近位腸管外植片に付着した。

血清学的性状（参考資料1，17）：

宿主鶏大腸菌EC34195株の血清型は、O78:K80であった。

生化学的性状：

宿主鶏EC34195株は鶏大腸菌の野生株であることから、大腸菌の生化学的性状を有するものと考えられる。

遺伝子学的性状：

宿主鶏大腸菌EC34195株の遺伝子学的性状は、MLST法による鑑別（参考資料17）、PCR法によるマーカー遺伝子の検査（参考資料1）により明らかにされている。

感受性動物、感染経路及び感染様式：

宿主鶏大腸菌EC34195株は、鶏に感染する。宿主鶏大腸菌EC34195株の感染経路及び感染様式は、鶏大腸菌の野生株であることから、他の鶏大腸菌株と同様と考えられる。

ヒト及び他の動物への感染性に関しては、大腸菌の宿主域が極めて広いことを考慮すると、その可能性は否定できない。

□ 生息又は生育（増殖）可能な環境の条件

大腸菌（鶏大腸菌を含む）

大腸菌は、土壌及び水等の環境中を生息域としなが、生存することはできる。土壌及び堆肥中での大腸菌の生存期間は、温度、水、酸素濃度、pH、土質、溶存有機炭素、微生物群落等の複雑な要因の影響を受け、数日～1年程度と幅広いが、大腸菌の生存菌数は経時的に減少する（文献18, 33）。水中での生存期間は、温度の影響を強く受ける。

高温より低温の方が生存期間が長く、高圧蒸気滅菌された水道水、貯水及び湖水で数週間（8 または 25 ） 泉水（15 ）で 234 日で消失することが確認されている（文献 33）。塩素消毒された飲水中では、他のグラム陰性細菌と同様に速やかに消失する。

鶏舎内では、糞、敷料、土壌、鶏舎内の粉塵、孵卵機内の綿毛、卵殻片等に付着して長期間生存すると考えられている（文献 10）。乾燥状態では長期生存するが、粉塵を水で湿らせると 7 日で 84～97%減少したという報告がある（文献 7）。

宿主鶏大腸菌 EC34195 株

生息又は生育（増殖）可能な環境は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株が鶏大腸菌の野生株であることから、他の大腸菌株と同様と考えられる。

八 捕食性又は寄生性

二 繁殖又は増殖の様式

大腸菌（鶏大腸菌を含む）

増殖様式：

大腸菌を含めて細菌は、増殖に必要な条件が揃っていれば永遠に分裂増殖を繰り返すが、増殖するためには、炭素原、窒素原、無機イオン及び水を必要とし、温度、酸素、pH及び浸透圧等の条件の影響を受ける（文献19）。大腸菌は、通性嫌気性細菌であるため、好氣的にも嫌氣的にも発育できる。温度条件に関しては、18～44℃、またはそれ以下の温度で発育する（文献7）。

液体培地で好気培養した場合、その増殖曲線は、誘導期、対数増殖期を経て、定常期（静止期）、衰退期（死滅期）へと移行する。対数増殖期から定常期及び衰退期への移行は、温度、栄養、菌の密度等の影響を受ける。一般的に大腸菌では至適条件で約20分程度で細胞分裂するといわれている。

寒天培地で培養した場合、寒天の表面に付着・増殖して定着し、肉眼観察可能な集落（コロニー）を形成する。

体内動態：

大腸菌は、汚染された食物や飲水等を介して経口感染する。創傷や呼吸器から感染することもある。大腸菌は主に鳥類及び哺乳類の腸管内で付着・増殖して保菌され、主に糞便を介して体外へ排菌される。腸管以外の臓器、例えば胆道、尿路、呼吸器等に異所性に迷入することがある。

鶏大腸菌については、鶏大腸菌症の主病変が腸管に見られる例は少なく、主に呼吸器感染したとき、気嚢や肺で付着・増殖して炎症を起こし、やがて血流に乗って種々の臓器に感染すると考えられている（文献7, 8, 9, 10）。初生ヒナの大腸菌性敗血症例では介卵感染に起因した例も多い。

核酸の水平伝達：

大腸菌は、接合、形質転換及び形質導入により大腸菌株または他の細菌との間で遺伝子の水平伝達をおこなう（文献20）。

自然界において原核生物である細菌の核酸が真核生物の核酸に組み込まれる事例は、節足動物の体内に生息するボルバキアのような細胞内共生細菌で認められている（文献34）。しかし、大腸菌は細胞内共生細菌ではなく、大腸菌の核酸が感染動物の核酸へ組み込みこまれるという報告は現在のところない。また、主にヒトの遺伝子を対象とした系統解析結果から細菌の核酸が脊椎動物の核酸に組み込まれる可能性は支持されていない（文献34, 35）。従って、大腸菌の核酸が感染動物の核酸へ組み込みこまれる可能性は極めて低い。

宿主鶏大腸菌EC34195株

増殖様式及び体内動態：

宿主鶏大腸菌EC34195株は大腸菌の野生株であることから、他の大腸菌と同様の増殖様式及び体内動態を示す。増殖様式については、液体培地及び寒天培地での増殖が確認されており、体内動態については、初生のSPF鶏ヒナに胃内投与したとき、腸管（盲腸）に定着し、さらに肝臓及び脾臓に侵入・定着して5週以上保菌されたことから確認されている（参考資料1）。

核酸の水平伝達：

宿主鶏大腸菌 EC34195 株は、鶏大腸菌の野生株であることから、他の大腸菌と同様に、接合、形質転換及び形質導入により他の大腸菌株または細菌との間で核酸の水平伝達をおこなう。なお、大腸菌の遺伝子が、感染動物の核酸へ組み込みこまれる可能性は極めて低い。

ホ 病原性

鶏大腸菌

鶏大腸菌の病原性は、鶏（肉用鶏及び採卵鶏）、七面鳥等の家禽においてよく確認されている（文献7）。鶏大腸菌は、鶏の腸管内に常在し、通常無害で健康な鶏では発病しないが、環境によるストレスがかかった時や一部病原性を示す鶏大腸菌の呼吸器等からの異所性感染によって気嚢炎、敗血症（大腸菌性敗血症）を起こし、耐過生存した個体で心膜炎、肝包膜炎、卵管炎及び眼球炎等を発症して重篤な場合は死亡する（文献7, 8, 9, 10）。鶏大腸菌は、鳥にのみ病原性を示すと長らく考えられてきたが、K1抗原を持つ系統（O1:K1、O2:K1及びO18:K1）の鶏大腸菌株は、ヒトの尿路感染症及び新生児髄膜炎の患者から分離された腸管外病原性大腸菌株と遺伝子型及び保有病原遺伝子において区別がなく、ヒトに対して腸管外感染症を引き起こす可能性が示唆されている（文献26）。宿主鶏大腸菌EC34195株と血清型及び遺伝子型が同じ鶏大腸菌株は、コアゲノ

ムを比較したとき、腸管毒素原性大腸菌の血清型O78に遺伝子的に近縁で、K1抗原を持つ菌株とは系統が異なり、また病原遺伝子座の欠落及び保有する病原遺伝子の違いが認められていることから、腸管外病原性大腸菌とは区別できるものとされる（文献27）。

大腸菌の病原性には、宿主細胞・組織への付着、侵入、鉄の獲得、血清（補体）抵抗性、抗食菌性、毒素産生等が関与するが（文献15）、鶏大腸菌を特徴付ける病原因子は明らかではない。一般的に鶏大腸菌は易熱性腸管毒及び耐熱性腸管毒といった外毒素を産生せず、発症への関与が比較的大きいと考えられているものは、付着因子、鉄獲得機構および血清抵抗性である（文献8）。

発症を促進する要因は、鶏舎内空気中のアンモニア、炭酸ガス等の有害ガス濃度の上昇、汚染空気中の粉塵粒子による呼吸器粘膜の刺激等である（文献10）。栄養の不均衡、特にビタミンA及びEの不足は本病に対する抵抗性を弱める。一般にマイコプラズマや比較的病原性の弱いウイルスの感染例では、大腸菌をはじめ種々の微生物が複合感染することが多く、特に大腸菌の感染例ではその病勢が増悪される例が目立つとされる。

宿主鶏大腸菌EC34195株

宿主鶏大腸菌EC34195株は鶏大腸菌の野生株であり、鶏ヒナの気管外移植片への付着性を示し（参考資料1 図5）、鶏に胃内接種したときに盲腸（腸管）のみならず、鶏大腸菌症を発症する可能性が生じる脾臓及び肝臓に迷入して5週以上感染し続けたことから、鶏の腸管外組織への付着及び侵入と関連した病原因子を保有している。このため、一般的な鶏大腸菌同様、ストレス等にさらされている鶏に宿主鶏大腸菌EC34195株が感染した場合鶏大腸菌症を発症するリスクが高い。

野生動物については、鳥類に感染したとき鶏大腸菌症様の症状を呈する可能性がある。それ以外の動物に対しては、病原性を示す、あるいはそれを示唆する報告はない。

ヒトに対しては、宿主鶏大腸菌EC34195株が病原性を示す、あるいはそれを示唆する報告はない。

治療方法として、宿主鶏大腸菌EC34195株が感受性を有する抗生物質が明らかにされていることから、抗生物質の投与が有効であると考えられる。宿主鶏大腸菌EC34195株が感受性を有する抗生物質は、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、アモキシシリン、クロラムフェニコール及びストレプトマイシン等である（参考資料1. 表8, 参考資料18）。

ハ 有害物質の産生性

大腸菌（鶏大腸菌を含む）

大腸菌が産生する有害物質（毒素）は、グラム陰性細菌の細胞壁外膜の構成成分の1つである内毒素（エンドトキシン）及び菌体外に分泌される外毒素（エンテロトキシン）に大別される（文献3, 4）。

内毒素は、グラム陰性細菌の細胞壁外膜を構成するリポポリサッカライド（LPS;リポ

多糖体)である。LPSの多糖成分は、グラム陰性細菌のO抗原である。内毒素の生物活性(毒性)のほとんどは、リポドAと呼ばれる脂質が担う。敗血症のうち、大腸菌等のグラム陰性細菌に起因するものは、内毒素の作用によって血管内凝固症候群を呈し、エンドトキシンショックと呼ばれるショック症状を呈する(文献3, 28)。内毒素の生物活性は多彩であるが、菌種によって大きな差はなく、病原性細菌の示す特異な症状は内毒素によるものではないとされる(文献28)。鶏大腸菌の病原性とも関連はないと考えられている(文献7)。

外毒素には、毒素原性大腸菌の易熱性腸管毒及び耐熱性腸管毒、腸管出血性大腸菌のベロ毒素(または志賀毒素)が一般的に知られている(文献4)。これらの外毒素を産生する大腸菌は、軽度~重度の下痢を主徴とする腸管感染症を豚、牛等の家畜及びヒトといった哺乳動物に引き起こす。これらの外毒素を産生する、または外毒素遺伝子を保有する大腸菌の保菌源は野生の鳥類、豚、牛等の反すう動物であり(文献22, 23, 24, 25)、鶏が保菌源であるとは一般的に考えられていない。また、鶏大腸菌で細胞毒性を示す外毒素を産生する菌株の存在が報告されているものの、鶏大腸菌の病原性を特徴付ける外毒素は知られていない(文献15)。上記の他に、細菌を殺傷するコリシンを産生する大腸菌株が自然界に普遍的に存在する。

宿主鶏大腸菌EC34195株

宿主鶏大腸菌EC34195株は大腸菌であるため、内毒素を産生する。しかし、他の病原細菌と同様に、宿主鶏大腸菌EC34195株の内毒素は、当該菌株の病原性と関連がないとされている。

宿主鶏大腸菌EC34195株の外毒素産生性については、コリシンを産生すること(参考資料1)を除き、それを示唆する報告はない。

ト その他の情報

一般に鶏大腸菌自体は熱に対する抵抗性が弱く、加熱により菌体構成タンパク質の水素結合が破壊され、タンパク質の変性を起こして死滅する。外毒素についても、加熱によって失活する。また、消毒薬に対する抵抗性も弱く、消毒用エタノールをはじめ、次亜塩素酸ナトリウム、ポビドンヨード、逆性石けん液(ベンザルコニウム塩化物液)等のほとんどの消毒薬が有効である(文献2)。ただし、内毒素LPSは、耐熱性で化学的にも安定しておりホルマリン処理でも無毒化しない(文献4)。

宿主鶏大腸菌EC34195株は、鶏大腸菌の野生株であるため、これらの性質は鶏大腸菌と同等である。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本遺伝子組換え操作は、宿主鶏大腸菌が有する*aroA*遺伝子1284塩基対(bp)を用いて改

変を加えたものである。*aroA*欠損遺伝子 (*aroA*) は、*aroA*遺伝子 (菌の増殖代謝に関与する芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を司る酵素の1つである5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素をコードする遺伝子) の593bp目から693 bp目までの101 bp部位を欠損し、欠損させた部位に遺伝子欠損させるために使用した合成オリゴヌクレオチドプライマーの中の配列のGCCCGGGCTAAAGATCTTAAGAATTCの26bpが存在している。この26bp中には、3つの制限酵素切断配列 (*Srf*、*Bgl*、*EcoR*) 及び2つの終止コドンを含む。塩基対は、1187bp [1284 bp - 101 bp + 26 bp - 22bp (*aroA*遺伝子オリジナル部分の5'-3'各末端の5'-atgga / ttagccaggcagcctga-3'の配列22bp)] の核酸である。

供与核酸の全塩基配列を図1-1に示し、また、その制限酵素地図を図1-2に示した。この組換え操作に使用した合成オリゴヌクレオチドプライマー配列を表1に示した (文献11)。

供与核酸は、*aroA*遺伝子 (1284 bp) の一部 (101 bp) を欠損 (*aroA*遺伝子の593~693番目の塩基対) させるために合成オリゴヌクレオチドプライマー (表1: *aroA*-1及び*aroA*-2並びに*aroA*-3及び*aroA*-4のペアプライマー) を用いて*aroA*遺伝子の1部を欠失させながら分割する2つのPCR増幅産物を作製した。これをライゲーションによって連結させ供与核酸 (*aroA*欠損遺伝子) を準備した (別紙1. 図3)。

準備した供与核酸は、次の供試ベクターに組み込むため操作の前段階として、市販のTOPO TAクローニングベクター (Invitrogen社: pCR2.1 TOPO; 大腸菌JM109を由来とするプラスミド: pUC19, pBR322と類似) (参考資料2) を用いて、供与核酸をクローニングベクターのマルチクローニングサイトに挿入した (別紙1. 図4)。なお、pCR2.1 TOPOベクターは、供与核酸の調製過程で使用した。

表1. 合成オリゴヌクレオチドプライマー配列

Primer ID	Primer sequence '5-3'
<i>aroA</i> -1	atccctgacgttacaacc
<i>aroA</i> -2	aaaagatcttagccgggctagaaaccagatcgctt
<i>aroA</i> -3	ttagatcttaagaattcagctcgggtacttat
<i>aroA</i> -4	tccgcgccagctgctcga

□ *Bgl* II restriction sites □ *Srf*I restriction site □ Stop codons □ *Eco*RI restriction site

図1-1. 供与核酸の塩基配列 (社外秘のため非公開)

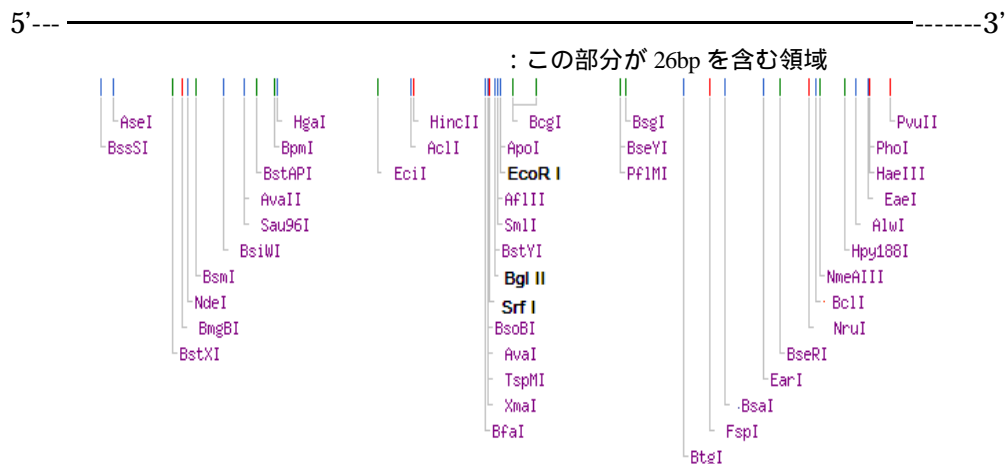


図 1-2. 供与核酸の制限酵素地図

(注：本来は各制限酵素名は微生物由来の部分がイタリックとなる。)

□ 構成要素の機能

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は *aroA* 遺伝子 (5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素をコードする遺伝子) の一部を欠損させ、26 bp の合成オリゴヌクレオチドを導入している。5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素は、芳香族代謝物質の生合成経路であるシキミ酸経路を司る酵素の 1 つである (文献14)。一般に、*aroA* 遺伝子の機能が欠損した細菌株は、芳香族アミノ酸 (トリプトファン、フェニルアラニン及びチロシン) 及び *p*-アミノベンゾエート (PABA: パラアミノ安息香酸) といった芳香族代謝物質要求性となり、人工培地や生体内での増殖及び生存に制限を受けるようになる (参考資料6, 7, 20, 21, 文献29)。

26 bp の合成オリゴヌクレオチドは、3つの制限酵素切断配列 (*Srf*、*Bgl*、*EcoR*) 及び2つの終止コドンを含む。制限酵素切断配列は、他の大腸菌株との識別のために利用される。終止コドンはアミノ酸配列のC末端側半分がフレームシフト変異したキメラタンパク質の生合成を防ぐ役割を持つ。この26 bp の合成オリゴヌクレオチドを対象としたホモロジー検索の結果 (別紙7)、原核生物の中において全塩基配列が一致するものはなかった。

5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素の結晶構造解析から、当該酵素中で基質と結合する15個のアミノ酸は、アミノ酸配列中に広く分布していることが明らかにされている (文献36)。*aroA* 欠損遺伝子においては、ほぼ中央に終止コドンが存在することを考慮すると、*aroA* 欠損遺伝子から生合成されるタンパク質は基質結合部位を形成することは

できず、5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素としての機能を失う。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

供試ベクター：pKNG101G（参考資料4）

本ベクターは、大腸菌R6K由来のpKNG101プラスミド（口、 -1 pKNG101を参照）を由来とし、プラスミドpBSL141由来のゲンタマイシン耐性遺伝子をコードする領域を含む *Not* I制限酵素断片をpKNG101の*Not* I制限酵素部位にクローニングして作製したものである。本ベクターのゲンタマイシン耐性能は、形質転換した大腸菌の選択マーカーとして利用する。

ロ 特性

供試ベクターpKNG101Gは全長7911bpの塩基対で、ベクターpKNG101の塩基2297bp目から始まる*Not* I制限酵素切断部位(gcgggccgc)に、上記で述べたゲンタマイシン耐性遺伝子を含む遺伝子925bpを挿入したものである(参考資料3及び4)。その特性は、pKNG101（下記、 -1）の特性及び上記で述べたとおりゲンタマイシン耐性能を持ち合わせ、*aroA*遺伝子欠損株の作出に用いた。さらに、本ベクターの遺伝子が最終的に*aroA*遺伝子欠損鶏大腸菌EC34195株に導入されることはないことが確認された（別紙1及び3）。また、本供試ベクターは、公開データベースには登録されていない。

なお、ベクター「pKNG101」は、供試ベクター「pKNG101G」作製のための材料として位置づける。その特性は、以下、 -1に示す。

-1 pKNG101（大腸菌R6Kを由来とするプラスミド）（参考資料3及び文献12）

グラム陰性菌の染色体挿入または染色体欠損変異の誘発によく使用される自殺ベクターで、以下の遺伝的要素を有する。

複製に π タンパク質を必要とする*pir*- R6K複製起点を有する。*strAB*遺伝子を有し、ストレプトマイシン耐性（Sm^R）である。また、レバンスクララーゼをコードする*sacB*遺伝子を有し、ショ糖の加水分解及びレバンの合成を触媒する。プラスミドpKNG101では*sacB*遺伝子産物がショ糖感受性をもたらし、ショ糖感受性を指標に識別される。ストレプトマイシンフォスフォトランスフェラーゼを菌中の本プラスミドの存在の選択マーカーとして利用する。

(3) 遺伝子組換え生物の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

pKNG101G- *aroA*の作製（参考資料15）

2.(1)のイの項で説明したpCR2.1 TOPOベクターに挿入した供与核酸の*aroA*遺伝子全長を制限酵素*Spe* I 及び*EcoR* Vを用いて切り出し精製したもの（1239bp）、制限酵素*Spe* I

で前消化した自殺ベクター (*SacB*, pKNG101G) に対して、ともに平滑末端処理して脱リン酸化処理を行った後、ライゲーションを行って、全長9154bp のpKNG101G- *aroA* を作製した (図2及び別紙1.図5)。

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌EC34195株の作製

pKNG101G- Δ *aroA*を大腸菌K12 S17 λ *pir*にエレクトロポレーション法で導入し、最小培地では生育できない形質転換した供与菌株とした (別紙1.図5)。

供与菌株と受容菌株 (宿主鶏大腸菌EC34195株 (親株)) を栄養寒天培地上に重ねたニトロセルロースメンブラン上で接合させた株を選択し、さらに一重及び二重交差の相同組換えをおこない、組換え大腸菌を作製した (別紙1.図6,7,8及び9)。

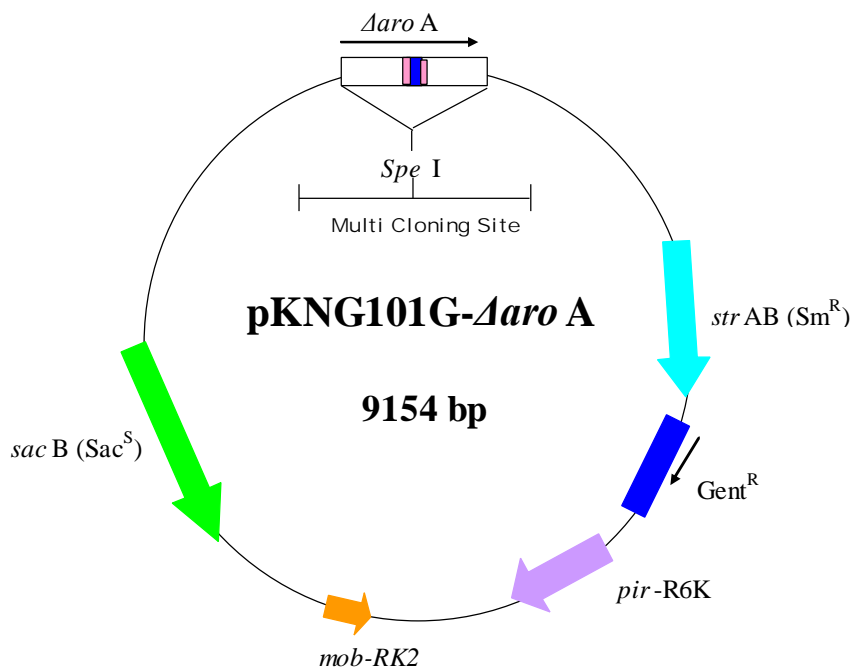


図2 . pKNG101G- *aroA* の模式図

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

pKNG101G- *aroA* の大腸菌 K12 S17 λ *pir* への移入方法

pKNG101G- *aroA* を大腸菌 K12 S17 λ *pir* にエレクトロポレーション法で導入し、最小培地では生育できない形質転換した供与菌株とした (別紙 1.図 5)。

aroA 欠損遺伝子の受容菌株 (宿主鶏大腸菌 EC34195 株) への移入方法

供与菌株との接合によって、pKNG101G- Δ *aroA* を宿主鶏大腸菌 EC34195 株に導入した (別紙 1. 図 6)。

接合後、一重及び二重交差の相同組換えによって、26bp の挿入配列を含む *aroA* 欠損遺伝子のみ宿主鶏大腸菌 EC34195 株の染色体に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

aroA 欠損遺伝子の組換え作出過程で使用した以下の大腸菌 K12 S17 λ *pir*、供与 (ドナ

ー) 菌株、受容 (レシピエント) 菌株、並びに *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のマスターシード及びワーキングシードについて、それらの概要と育成過程を以下に述べる。

1. 大腸菌 K12 S17 λ *pir* (参考資料 5 及び文献 13)

大腸菌の染色体に組み込まれた広域宿主 IncP 型プラスミド RP4 の伝達遺伝子を有する。 λ ファージにより *pir* 遺伝子を大腸菌染色体に形質転換しており、自殺ベクター pKNG101G-*aroA* のための π タンパク質を提供する。エレクトロポレーションの前に、ルリア・ベルターニ (LB) 培地で培養増殖させ調製し、細胞融合まで氷上に保存する。

2. 供与 (ドナー) 菌株

供与菌株は pKNG101G-*aroA* を含む大腸菌 K12 S17 λ *pir* 形質転換体であり、最小培地では生育できない。接合前に、ゲンタマイシン添加 LB 培地で培養増殖させ調製する。

3. 受容 (レシピエント) 菌株

受容菌株は宿主鶏大腸菌 EC34195 株 (親株) を使用した。受容菌株はゲンタマイシン添加培地では生育できない。接合前に、ゲンタマイシン不含 LB 培地で培養増殖させ調製する。

供試した大腸菌は、供与菌株 (*aroA*) と受容菌株 (*aroA*) との相同組換えにより、受容菌株側の *aroA* 遺伝子を組換え、*aroA* 遺伝子の一部を削除 (*aroA*) させただけであるので (別紙 1)、供与菌株側の遺伝子が導入されることはない (別紙 3)。

4. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のマスターシード及びワーキングシード (参考資料 14)

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のマスターシード原株 (参考資料 14) は、英国獣医学研究所から分与を受け、それをういてフォートダッジ・アニマルヘルス (FDAH) が作出した。

なお、製造には、マスターシード (原株) から最終製品までの最大継代数を規定している (参考資料 14)。

(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

移入された GCCCGGGCTAAAGATCTTAAGAATTC の 26bp オリゴヌクレオチドを含む *aroA* 欠損遺伝子は、宿主大腸菌の染色体上の *aroA* 遺伝子座に存在する (別紙 4)。

また、ワクチン製造用のマスターシードである *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株 (参考資料 14) をういて、*In vitro* で 1 ~ 5 代継代培養後に PCR 解析をおこなった結果、いずれの継代後においても増幅遺伝子の大きさ (1187 bp) に相違は認められず、*In vitro* におけ

る遺伝学的安定性が確認された（別紙 5）。

さらに、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株（親株）から大腸菌の増殖に關与する芳香族アミノ酸の生成を司る *aroA* 遺伝子の一部を欠損させて弱毒化されていることから、強制的な鶏の継代によっても継代 2 代目でわずかに回収されるだけで、継代 3 代目で回収が不能となり継代できなくなり、病原性の復帰は認められなかった。また、2 代目に回収された *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を用いて *aroA* 遺伝子を対象とした PCR 解析をおこなった結果、継代前のマスターシードと増幅遺伝子産物の大きさに違いが認められず、*aroA* 欠損遺伝子の遺伝的安定性が確認された。このことから、*In vivo* における遺伝的安定性が確認され、病原性復帰がないことも確認された（別紙 6）。

なお、自殺ベクターを用いて *aroA* 遺伝子を欠損させた大腸菌（EC99 株）の復帰突然変の頻度は、 10^{-12} 未満であると報告されている（文献 29）。

(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

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、栄養要求性に基づく分離培養と API20E（シスメックス・ピオメリュー社）を用いた生化学検査を組み合わせた手法（参考資料 19）によって、鶏体内の各器官及び環境から採取したスワブサンプルから菌分離し、夾雑菌と識別すること可能であり、本評価書に添付の各試験報告書において本手法を使用した実績がある（参考資料 6, 7, 20, 21）。また、分離した菌株に対して、*aroA* 遺伝子部位の PCR 産物（別紙 5, 参考資料 1・図 8, 参考資料 6・図 1）、またはその制限酵素切断像（参考資料 1・図 8）を得ることで識別できる。

移入されたオリゴヌクレオチドには制限酵素の認識部位 *SrfI* 及び *BglII* が含まれる（別紙 1）が、宿主鶏大腸菌 EC34195 株には、これらの制限酵素認識部位が存在しないため（別紙 7）、その特異性は非常に高い。

また、PCR 法により増幅用プライマー *aroA-1* 及び *aroA-4* を用いて、増幅遺伝子の大きさを検出することによって識別できる。組換え大腸菌では 1187 bp の増幅遺伝子が認められるが、宿主鶏大腸菌 EC34195 株では、1262 bp が増幅され、その大きさによって識別が可能である（別紙 5）。

PCR の感度については、分離培養と同程度の感度があると推察され、数コピーから十数コピー以上あれば検出は可能と思われる。その信頼性は、RFLP 法と組み合わせた場合、特に高いものと推察される。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 遺伝子組換え微生物とその調製に利用した宿主又はこれに属する生物種との特性の違い
・増殖様式：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、*aroA* 遺伝子の一部を欠損させている（別紙 1, 参考資料 1）。*aroA* 遺伝子を欠損させた大腸菌やサルモネラ菌等の菌株は芳香族アミノ酸（トリプトファン、フェニルアラニン及びチロシン）及び *p*-アミノベンゾエート（PABA：パラアミノ安息香酸）といった細菌が増殖するうえで必須の物質を自ら生成することができず、外界からこれらの栄養素の供給がない限り増殖できない（文

献 29)。このことは、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株においては、マッコンキー寒天培地及びトリプチケース・ソイ寒天培地（TSA 培地）では 37、24 時間の培養でコロニーを形成するが、最小寒天培地ではコロニーを形成しないことから確認されている（参考資料 19）。なお、液体培地（LB 培地）中での *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の増殖性状については、宿主鶏大腸菌 EC34195 株との違いは認められない（参考資料 1. 図 10）。

aroA 遺伝子を欠損させた細菌株は、シキミ酸経路を持たない鳥類や哺乳動物の体内では増殖できないとされる（文献 29）。このことは、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を鶏に接種したとき、または鶏を用いて継代したとき、接種後の時間経過または継代数と共に体内から菌分離される鶏の羽数または生菌数が減少し、最終的に菌分離されなくなったことから確認されている（別紙 6, 8, 参考資料 6, 7, 20, 21）。

- ・ 遺伝的特性：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株では、*aroA* 遺伝子の 593 bp 目から 693bp 目までの 101 bp 部位を欠損させ、さらに、組換え操作の過程で 26 bp の合成オリゴヌクレオチドが欠損部位に移入されている。*aroA* 遺伝子の欠損配列は自然界の大腸菌及び宿主鶏大腸菌 EC34195 株では報告されていない。移入された 26 bp の合成オリゴヌクレオチドは、自然界の大腸菌及び宿主鶏大腸菌 EC34195 株では認められない（別紙 7）。

なお、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の遺伝子型は MLST 法により鑑別されている（参考資料 17）。

- ・ 病原性：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、鶏に散霧または点眼接種した場合、鶏大腸菌症を発症する可能性が生じる心臓及び肝臓に感染するが、宿主鶏大腸菌 EC34195 株とは異なり、これらの器官から遅くとも接種後 7 日で消失し、当該菌株の感染に起因する臨床症状を示さず、感染組織に病変を形成しなかった（別紙 6, 8, 参考資料 6, 7, 20, 21）。モロッコで実施された多施設臨床試験（参考資料 24）において、ポールバック *E.coli* の接種に起因する有害事象は認められていないことから、室内実験と比べて鶏大腸菌症を発症し易い野外環境下においても鶏に対して病原性を示さない。また、非適用対象動物であるマウス及び豚に接種した場合も、病原性を示さず（別紙 9, 10）ポールバック *E.coli* が供給されている各国（別紙 13）において、接種鶏、ヒト及びその他の動物について有害事象は報告されていない。以上のことから、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の病原性は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株より低い。

なお、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の栄養要求性から、ヒトの体内において増殖して長期保菌される可能性が低いこと、ポールバック *E.coli* が承認された各国において、当製剤に起因したヒトに対する有害事象は認められていないことから、ヒトへの暴露により安全上の懸念が生じる可能性は低い。さらに、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を接種した鶏、マウス及び豚において、大腸菌によるヒトの腸管感染症及び腸管外感染症を引き起こすことを示唆するような臨床症状を示さなかったことから支持される。

・薬剤感受性：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の薬剤感受性は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株のそれと同一であり、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、アモキシシリン及びクロラムフェニコール等に感受性である(参考資料18)。

・有害物質の産生性：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、欠損させた遺伝子が *aroA* 遺伝子のみであるため、宿主鶏大腸菌 EC34195 株と同様に内毒素及びコリシン産生性であるが、*aroA* 遺伝子を欠損させたことにより増殖せず、一定期間しか生存できないため、これらの有害物質が生産される量及び期間は宿主鶏大腸菌 EC34195 株よりも限定されている。

aroA 欠損遺伝子に挿入した 26bp の合成オリゴヌクレオチドの部分から産生されるのは、セリン-プロリン-グリシンである(別紙4)。Medline での文献検索上、当該アミノ酸配列がアレルギーや変異原性物質となることを示す、あるいは示唆する報告は見つからなかった。また、PV-Works(社内グローバルファーマコビジランス調査ソフト)においても、当該アミノ酸配列がアレルギーや変異原性物質となることを示す、あるいは示唆するような有害事象を含め、ポールバック *E.coli* に起因する有害事象は認められなかった(別紙13)。

・感染性：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、鶏に接種した場合の感染が成立することが確認されている(別紙6及び8、参考資料6、7、20、21)。また、大腸菌の宿主域が極めて広いことを考慮すると、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が他の動物及びヒトに対して感染性を有する可能性は否定できない。

しかし、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、細菌にとって必須である芳香族アミノ酸や PABA といった芳香族代謝物質を自ら生合成できないため、これらの芳香族代謝物質が生合成されていない動物体内では、増殖及び生存に関する能力が親株である宿主鶏大腸菌 EC34195 株よりも低下し、常在菌として定着する可能性は低い。このことは、宿主鶏大腸菌 EC34195 株は接種鶏の盲腸、肝臓及び脾臓においてコロニーを形成して接種後5週間以上菌分離された(参考資料1)のに対して、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、接種鶏の気嚢、心臓及び肝臓から最長で接種後7日、総排泄口からは最長で接種後28日目(別紙8、参考資料7、20、21)までと、菌分離された期間がいずれの器官においても5週間未満であったことから確認されている。

・内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、鶏に病原性を示す宿主鶏大腸菌 EC34195 株から *aroA* 遺伝子のみ欠損させただけであるので、鶏大腸菌の病原遺伝子を保有すると考えられる。大腸菌の病原遺伝子は主に接合及び形質導入によって水平伝達するため、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、鶏大腸菌の病原性を他の大腸菌株及び細菌に付与する可能性がある。しかし、*aroA* 遺伝子を欠損させたことにより *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は増殖せず、一定期間しか生存できないことから、宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて病原遺伝子を水平伝

達する機会は低下している。

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、鶏、マウス及び豚に接種したとき、当該菌株に起因するいかなる臨床症状も示さなかったことから、腸管感染症及び腸管外感染症を含めて大腸菌症と関連した病原性を有する可能性は低く、従って病原性を付与する可能性は低い。

- ・接種動物からの排菌及び同居感染性：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の排菌経路については、散霧または点眼投与で SPF 鶏ヒナに接種したとき、全ての接種鶏において総排泄口から *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が検出され、他の排泄ルートと考えられる鼻汁からは検出がなされなかったことから、排菌経路は糞便を介したものと結論付けられた（参考資料 21）。総排泄口から検出された期間は、最長で接種後 28 日であった。

同居感染については、SPF 鶏ヒナに点眼投与したとき、接種後 11 日目まで同居鶏の総排泄口から菌分離されたため、同居感染が確認されたが、接種後 14 日以降は菌分離されず、接種鶏よりも消失時期が早いことが確認された（参考資料 20）。

また、当該試験において、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、最長で試験終了日である接種後 21 日目まで飼育環境（敷料、水道水及び餌）から分離された。しかし、接種後 14 日目以降は、同居鶏に感染は認められなかったことから、環境中に *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が残存していたとしても、同居感染のリスクは経時的に低下することが確認されている。

さらに、当該試験及び同居感染性を調べた他の試験のいずれにおいても、鶏大腸菌症を発症するリスクが生じる気嚢、心臓、肝臓への感染は同居鶏では全く認められなかった（別紙 6, 8, 参考資料 6, 7, 20）。

- ・自然界での生存能力：通常の鶏の飼育環境を想定し、鶏舎内の敷料に曝露した *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株と鶏大腸菌血清型 O78 の野生株の安定性について、室温(18)において経時的に菌量の推移を検討した結果、1 用量分（想定用量 / 羽）の *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を接種された敷料では、24 時間後には菌が検出されなかった。また、鶏大腸菌血清型 O78 の野生株においては 48 時間後には菌が検出されなかった（参考資料 12）。

水道水及び環境水（池由来の水）に曝露した場合の *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株及び鶏大腸菌血清型 O78 の野生株の生存能力について、外界温度（20 ）における経時的な菌量の推移から検討を行った。*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株及び宿主鶏大腸菌 EC34195 株は、7 日間で各々 1/100 ~ 1/10 及び 1/10 ほどに減少し、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の生存能力は鶏大腸菌血清型 O78 の野生株と比較して同等以下であることが確認された（参考資料 16）。

鶏に接種した場合、飼育場を模した環境中から *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が消失する時期は、接種時の菌量及び方法ならびに複雑な環境要因の影響を受け、11 日

～42日までと幅が認められた。2.217×10⁸ CFU/ドースを散霧接種後に接種鶏を十分に乾燥させてから飼育場に移動させたとき、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の環境中からの消失時期は接種後 11 日であった（参考資料 7）。これは検討をおこなった試験の中で最も短かった。点眼接種後に飼育場を模した環境に移動した場合、または飼育場を模した環境で散霧接種したときの環境中からの消失時期はそれぞれ接種後 35 日及び 42 日であった（参考資料 21）。また、飲水、餌、敷料を比較したとき、飲水は菌分離される期間が短く、敷料は菌分離される期間が長い傾向にあった。

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の自然界での生存能力を確認した成績は上記のとおりだが、宿主鶏大腸菌 EC34195 株とは増殖代謝が異なり、芳香族アミノ酸の供給がない限り増殖複製できないことが明らかにされていることから、自然界（環境あるいは感染野生動植物）での生存能力は宿主大腸菌と比較して同等以下である。

- ・核酸の水平伝達：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は宿主鶏大腸菌 EC34195 株と異なり芳香族アミノ酸及び PABA 要求性であり、鳥類及び哺乳類の体内ならびに環境中において生存菌数は経時的に減少し、生ワクチンとして主に使用される鶏の飼育場を模した環境中では鶏に接種後 42 日で消失することから、接合、形質導入及び形質転換による核酸の水平伝達の機会は、鶏大腸菌の野生株と比べて低下している。

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

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、マッコンキー寒天培地及び TSA 培地において 37℃、24 時間の培養でコロニーを形成し、最小寒天培地においてコロニーを形成しない（参考資料 19）。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

鶏大腸菌症は、大腸菌を原因菌とする鶏の感染性疾病で、世界的な流行が認められている。日本においても鶏、特に肉用鶏に甚大な被害をもたらしている。

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、鶏大腸菌症の予防を目的とする生ワクチン（ポールバック *E. coli*）の主剤として使用される。本ワクチンの用法及び用量として「乾燥ワクチンに適量の精製水を加えて溶解し、それを 1 羽当たり 0.1～0.5 mL となるように精製水で希釈し、散霧器を用いて 1 日齢以上の鶏に 1 回投与する。」を予定している。本ワクチンに含まれる *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の生菌数は、1 用量当たり 6.5×10⁶ CFU 以上を予定している。また、散霧接種によるヒトへの暴露を防ぐために、使用者に対する注意として「作業時には、防護メガネ、マスク、手袋等の防護具を着用し、眼、鼻、口等に入らないように注意すること。」及び「作業後は、石けん等で手をよく洗うこと。」等を定め、鶏に対する注意として「産卵開始 35 日前からは本剤を投与しないこと。」等を定める予定である。

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、*aroA* 遺伝子を欠損させたことによって、通常の大腸菌とは栄養要求性が異なり、芳香族アミノ酸や PABA といった細菌にとって必須の栄養素を自ら合成できないため、これらの栄養素が不足する動物体内や環境中では病原性、増殖能、

生存能等の能力が著しく低下する。このことで、接種鶏に対する安全性を確保し、排菌及び同居感染、並びに環境中に拡散するリスクを低減し、野外使用の際の安全性を高めている。

日本における鶏大腸菌症ワクチンとしては、組換え型 F11 線毛抗原及びペロ細胞毒素抗原を主成分とする油性アジュバント加不活化ワクチン（筋肉内投与）、大腸菌の全菌体破碎処理抗原を主成分とする脂質アジュバント加不活化ワクチン（点眼投与）及び cAMP 受容体をコードする *crp* 遺伝子欠損型大腸菌血清型 O78 を主成分とする鶏大腸菌症生ワクチン（初回は噴霧器投与、2 回目は噴霧器または散霧器投与）の 3 製品が承認されている。これらの既承認製剤のうち、本申請製剤は、*crp* 遺伝子欠損型大腸菌血清型 O78 を主剤とする鶏大腸菌症生ワクチンと類似した製品であるが、鶏に散霧器で単回投与することで効果が得られる点で差別化されており、ワクチン接種に伴う作業のさらなる省力化を可能とする。

(1) 使用等の内容

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

薬事法（昭和 35 年法律第 145 号）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に関する資料の収集を目的とする試験（以下「治験」という。）に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年農林水産省令 75 号）第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用

薬事法第 14 条第 1 項に基づく承認申請書に従った使用（ に該当する行為は除く。）

接種（鶏への接種）

廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残さの廃棄

以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄を伴う場合を含む。）

～ 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

治験期間中のワクチンの使用に際し、モニタリング計画書（別添）に従って、モニタリングを実施することとする。

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

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

果

実験室等で鶏に接種した結果に関しては参考資料 6 (または別紙 6)、7 (または別紙 8)、20 及び 21、モロッコで実施された多施設臨床試験の結果に関しては参考資料 24 を参照。

(6) 国外における使用等に関する情報

海外における承認状況及び有害事象報告

Poulvac *E.coli* (海外におけるポールバック *E.coli* の販売名) は、米国で承認 (2006 年 4 月) 以降、タイ (2008 年 2 月)、カナダ (2008 年 9 月)、マレーシア (2009 年 8 月)、フィリピン (2010 年 3 月) 及び EU (2012 年 6 月) で承認され、それぞれの国において確認できる供給総数量は、219,170,000、38,000,000、33,000,000 及び 9,884,900 ドースであった (2012 年 4 月現在 (カナダ及び EU を除く)) (別紙 12)。その総供給量に対して、PV-Works (社内グローバルファーマコビジランス調査ソフト) により検索したところ、現在まで供給されている各国での Poulvac *E.coli* の接種鶏、ヒト及びその他の動物に対する有害事象は認められず (別紙 13)、PV-Works 及び文献検索上、本ワクチンの使用に伴って生物多様性に影響を及ぼしたと考えられるような報告はなかった。

海外における野外使用に関する影響評価

米国において、Poulvac *E.coli* の野外安全試験での使用に際して、感受性動物や組換えを起こす可能性あるいは環境への影響について、米国農務省動物植物検疫所 (USDA APHIS) の動物用生物学的製剤センターの危害分析プロセス (Center for Veterinary Biologics Risk Analysis Process) により評価され、本ワクチンの野外使用が認められた (別紙 11)。

カナダにおいては、本ワクチンの輸入及び国内使用に関するライセンス許可に関する申請に際して、Canadian Food Inspection Agency の Veterinary Biologics Section (VBS) によって本ワクチンの環境に対する影響が評価された (参考資料 22)。VBS が公表している環境評価書においては、本ワクチンは環境に対していかなる重大な有害事象を与えないと予期されると結論づけられている。

EU においては、本ワクチンの EC 域内医薬品販売許可 (European Community marketing authorization) に関する申請の際に、第 相環境リスク評価がおこなわれた。本ワクチンは EU において遺伝子組み換え生物 (GMO) を含む生ワクチンに該当するが、環境に放出した際のリスクは極めて低い、または無視できるものと結論づけられている。このことは、European Medicines Agency の Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) が公表している本ワクチンの評価書に掲載されている (参考資料 23)。

(7) 接種動物の体内における挙動に関する情報

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

接種鶏における *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の排菌経路については、散霧または点眼投与で SPF 鶏ヒナに接種した場合、総排泄口から糞中に排菌される。総排泄口からは、接種後 21 ~ 35 日で菌分離されなくなることが確認されている (参考資料 20, 21)。

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

から、当該遺伝子組み換え生ワクチンを鶏に接種後 35 日までは鶏肉、卵及び糞便を介して *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が環境中に放出される可能性がある。しかし、下記を考慮すると、放出された *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の環境中への拡散は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株とは異なり、一過性で空間的な広がりも限定的なものとなり、放出された *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は一定期間後に消失すると考えられる。

- ・ 敷料中（参考資料 12）及び水中（参考資料 16）に直接接種したときの *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の生存能力は、鶏大腸菌の野生株と同等以下であったこと
- ・ *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を鶏に散霧または点眼接種して飼育場を模した環境中で飼育した場合、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、敷料、水及び餌からワクチン接種後 11～42 日で消失したこと（参考資料 7，11）
- ・ 同居感染性を調べた試験において、感染した同居鶏は経時的に減少し、ワクチン接種後 14 日以降は、環境中に *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が残存していたとしても同居感染が認められなかったこと
- ・ *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株はアミノ酸及び PABA 要求性であり、動物体内では経時的に生存菌数が減少し、感染動物の体内で長期保菌され新たな感染源となる可能性が低いこと

卵については、当該遺伝子組み換え生ワクチンの鶏への接種は産卵開始から 35 日前までに限られるため、使用方法を厳守する限り介卵感染の可能性は極めて低い。

なお、一般的に、排出された鶏糞については、家畜排泄物法に基づき保管及び処理がなされる。鶏糞の処理法としては、肥料として再利用するために発酵等の処理がおこなわれるか、あるいは焼却処分されるのが一般的である。

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

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が総排泄口から菌分離されなくなるのは最長で接種後 35 日であるため（参考資料 21）、この間は介卵感染する可能性がある。しかし、当該遺伝子組み換え生ワクチンの鶏への接種は産卵開始から 35 日前までに限られるため、使用方法を厳守する限りにおいて、介卵感染が実際に起こる可能性は極めて低い。

野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

大腸菌の宿主域は極めて広く、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は鶏大腸菌であることから、野生動物、とりわけ鳥類に感染する可能性がある。*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が環境中から消失するまでの期間は接種後 42 日間であることから、その期間に養鶏場に野生の鳥類及び哺乳類が侵入した場合、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が野生動物に

感染する可能性が考えられる。しかし、*amA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の栄養要求性から、感染した野生動物が長期間保菌及び排菌する可能性は低く、伝播は一過性で空間的な広がりも限定的なものとなる。

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

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株と異なり、細菌では生合成可能な芳香族アミノ酸や PABA といった必須の栄養素を自ら生合成できず、動物体内及び環境中で増殖できず、また、一定の期間しか生存できない。従って、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の競合能力は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて低い。

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の親株である宿主鶏大腸菌 EC34195 株は、微生物に対して殺傷能力を持つコリシンを産生する。操作した *aroA* 遺伝子はコリシン産生とは直接的な関連がないため、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株も宿主同様のコリシン産生性を有すると考えられる。しかし、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は動物体内及び環境中において増殖せず、生存期間が限定されているため、コリシンの産生量及び期間は宿主鶏大腸菌 EC34195 株よりも限定され、微生物群への影響は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて低い。

このことから、他の微生物を減少させる性質に起因して影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

鶏大腸菌の宿主域は極めて広く、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株において欠損させた *aroA* 遺伝子は、大腸菌が動物の体内で付着及び侵入するための機能とは関連がないことを考慮すると、野生動物、とりわけ鳥類に感染する可能性は否定できない。しかし、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は宿主鶏大腸菌 EC34195 株とは異なり芳香族アミノ酸及び PABA 要求性であることから、これらの栄養素が生合成されていない動物体内では増殖せず、生存期間は限定され、長期保菌され新たな感染源となる可能性は低い。このことは、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を接種した鶏と接種していない鶏を同居させた場合に、経時的に同居感染がおこりにくくなることから確認できる。以上のことから、野生動物に感染したとし

ても、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の伝播は、一過性で空間的な広がりも限定的なものになると考えられ、宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて伝播力は低いと考えられる。

病原性については、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、鶏に散霧または点眼接種した場合、鶏大腸菌症を発症する可能性が生じる心臓及び肝臓に感染するが、宿主鶏大腸菌 EC34195 株とは異なり、これらの器官から遅くとも接種後 7 日で消失し、当該菌株の感染に起因する臨床症状を示さず、感染組織に病変を形成しなかった。モロッコで実施された多施設臨床試験において、ポールバック *E.coli* の接種に起因する有害事象は認められていないことから、室内実験と比べて鶏大腸菌症を発症し易い野外環境下においても鶏に対して病原性を示さないことが確認されている。また、非適用対象動物であるマウス及び豚に接種した場合も病原性を示さず、ポールバック *E.coli* が供給されている各国において、鶏及びその他の動物に関して本剤の使用に起因した有害事象は報告されていない。以上を考慮すると、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の病原性は、宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて低いと考えられる。

また、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の栄養要求性から、ヒトの体内において長期保菌される可能性は低いこと、ポールバック *E.coli* が供給されている各国においてヒトに対する有害事象が報告されていないこと等より、ヒトへの暴露により安全上の懸念が生じる可能性も低い。

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

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は、操作した *aroA* 遺伝子が内毒素及び外毒素の産生に関連していないことから、宿主鶏大腸菌 EC34195 株と同様に内毒素及び外毒素であるコリシン産生する。しかし、*aroA* 遺伝子を欠損させたことにより増殖せず、生体内及び環境中で一定期間しか生存できないため、これらの有害物質が産生される量及び期間は宿主鶏大腸菌 EC34195 株よりも限定されている。また、供与核酸は機能を有するタンパク質を発現しない。

従って、有害物質の産生性は宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて低下している。

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

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

大腸菌は鳥類及び哺乳類に属する野生動物に感染する。しかし、大腸菌の核酸が鳥類及び哺乳類の核酸に組み込まれたという報告はない。また、主にヒトの遺伝子を対象とした系統解析からも細菌の核酸が脊椎動物の核酸に組み込まれる可能性は支持されていない。

また、微生物同士の核酸の水平伝播について大腸菌は、接合、形質転換及び形質導入によって核酸を水平伝達する性質を持つ。*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は *aroA* 遺伝子を欠損させたことにより増殖せず、一定期間しか生存できないため、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が核酸を水平伝達する機会は宿主大腸菌と比べて低下している。また、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が消失するまでの期間、供与核酸が安定的に *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株に配置されていることも確認している。従って、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株から供与核酸が水平伝達する可能性は低い。これに加えて、供与核酸はプラスミドではなく染色体上に位置し、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の作出過程でトランスポゾンを使用していないことから、接合によって供与核酸が水平伝達する可能性はさらに低い。さらに、仮に供与核酸が水平伝達することがあったとしても、供与核酸から機能を有するタンパク質は発現しない。以上のことから、核酸を水平伝達する性質によって影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

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

上記のほかに、当該組換え大腸菌に関して生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる性質はないと判断された。

III 生物多様性影響の総合的評価

他の微生物を減少させる性質については、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株は宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて他の微生物との競合能力が低く、コリシンの産生量及び期間が限られていることから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

病原性については、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の伝播力及び病原性は宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて低いことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

有害物質の産生性については、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の有害物質の産生性は宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて低下していること、*aroA* 欠損遺伝子から機能のあるタンパク質が発現しないことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

核酸を水平伝達する性質については、供与核酸が感染動物の染色体に組み込まれる可能性が低いこと、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が他の微生物に核酸を水平伝達する機会は宿主鶏大腸菌 EC34195 株と比べて低下していること、供与核酸から機能のあるタンパク質が発現しないこと等から、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

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

本申請書で使用する略号・用語表

略号・用語	正式名称・英名	簡単な解説
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌
APEC	Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i>	鶏大腸菌
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	腸管病原性大腸菌 小児の腸炎起因菌。発熱、嘔吐、水様下痢を引き起こす。束形成線毛で初期接着し、インティミン (intimin) を使って菌が密着して上皮細胞に影響を及ぼし、微絨毛の形態を変形 (A/E 付着と呼ばれる) させ、病気を起すと考えられている。
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	腸管組織侵入性大腸菌 赤痢属によく似た腸炎を引き起こす。本菌は腸管粘膜に侵入し、粘膜上皮細胞内で増殖し、それを破壊する。発熱、腹痛、水様下痢や細菌性赤痢症の特徴である白血球等を含む血性、粘液性下痢症を起す。検査ではSereny試験、OH血清型、ELISA法、HEp-2またはHeLa細胞への侵入性等によって鑑別しうる。
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	毒素原性大腸菌 易熱性、耐熱性腸管毒 (エンテロトキシン) を産生する。
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	腸管出血性大腸菌 または志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> , STEC) : 志賀毒素、エンテロヘモリシンを産生する。
EAggEC	Enteroadhagative <i>Escherichia coli</i>	腸管凝集付着性大腸菌 細菌が凝集塊となって、上皮細胞に付着する性質をもつ一連の菌群をいう。自発凝集しやすく、特殊な線毛 (AAF/I)

		をもつ。ETECの毒素とは別の耐熱性腸管毒（EAST）を産生する。本菌は小児の慢性下痢の原因とされており、水様下痢、嘔吐、脱水症状、時として発熱、血便等の症状を呈する。
ExPEC	Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>	腸管外病原性大腸菌 胆道、尿路、呼吸器等に異所性（迷入）感染して腸管外感染症を引き起こす大腸菌。感染した組織の炎症や敗血症等を引き起こす。尿路病原性大腸菌及び新生児髄膜炎大腸菌は腸管外病原性大腸菌に含まれる。
UPEC	Uropathogenic <i>Escherichia coli</i>	尿路病原性大腸菌 腸管外病原性大腸菌の1つ。尿路感染症を引き起こす。
NMEC	Neonatal-causing Meningitis <i>Escherichia coli</i>	新生児髄膜炎起因大腸菌 腸管外病原性大腸菌の1つ。新生児髄膜炎を引き起こす。
SPF	Specific Pathogen Free	特定病原体を保有しない
bp	base pair	塩基対
PCR	Polymerase Chain Reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
オリゴヌクレオチド	Oligonucleotide	オリゴヌクレオチドは約20塩基対（bp）かそれ以下の長さの短いヌクレオチド（DNAまたはRNA）の配列である。ヌクレオチドは相補的なヌクレオチドと結合する性質があるので、オリゴヌクレオチドは相補的DNAまたはRNAを検出するプローブとして使われる。また、DNAと相補的なオリゴヌクレオチドはポリメラーゼ連鎖反応のプライマーとして盛んに使われる。
プライマー	Primer	プライマーはDNAポリメラーゼがDNAを合成する際に3'OHを供給する役割をもつ短い核酸の断片である。
<i>aroA</i>	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase	大腸菌の増殖に関与する生合成経路であるシキミ酸経路を司る酵素の1つをコードする遺伝子(<i>aroA</i> :5-エノールピ

		ルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素)
<i>aroA</i>	Delta- <i>aroA</i>	<i>aroA</i> 遺伝子の 593bp 目から 693 bp 目までの 101 bp 部位を欠損
芳香族アミノ酸	Aromatic Amino Acid	ベンゼンを代表する環状の不飽和アミノ酸を芳香族化合物という。芳香環を有するフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンのアミノ酸を芳香族アミノ酸と呼ぶ。
プラスミド	Plasmid	プラスミド (plasmid) は細胞内で複製され、娘細胞に分配される染色体以外の DNA 分子の総称。細菌や酵母の細胞質内に存在し、染色体の DNA とは独立して自律的に複製を行う。一般に環状二本鎖構造をとる。細菌の接合を起こすもの(F プラスミドなど)、抗生物質に対する耐性を宿主にもたらすものなどがある。
コンピテント大腸菌	Competent Cell (<i>E.coli</i>)	外来 DNA(プラスミド、ファージなど) を細胞内に取り込める状態の細胞である。通常はカルシウムイオンの存在下で冷却することにより DNA に対する膜透過性が増大する大腸菌をさす。
相同組換え	Homologous recombination	相同組換え (相同的組換え) は、DNA の塩基配列がよく似た部位 (相同部位) で起こる組換えである。様々な化学物質や放射線により切断された DNA は主に相同組換えによって修復される。
一重交差及び二重交差による相同組換え		目的の欠損株を選択する際、目的の遺伝子と薬剤耐性 (あるいは栄養要求性) から感受性に变化した株を直接選択することは難しく、一つ一つの選択ステップを経て選択するため、最初のステップとして Single strand の組換えを目的とした一重交差及び次のステップとして Double strand の組換えを目的とし

		た二重交差による相同組換えが必要。
接合	Bacterial conjugation	さまざまな細菌で、細胞間に接触を生じて互いの遺伝子の一部をやり取りする現象が知られており、これを細菌の接合という。
形質導入	Transduction	特定の増殖様式を有するファージが、感染した細菌の遺伝子を粒子内に取り込み、次に感染する細菌内に導入する現象。
形質転換	Transformation	外部から DNA を導入し、その遺伝的性質を変えること。大腸菌に対する形質転換としては、電気パルスにより瞬間的に細胞に穴を開けるエレクトロポレーション法や、カルシウム法によってコンピテントセルとした菌を用いる方法がある。
MLST 法	Multilocus Sequence Typing 法	Wirth 等の MLST 法による大腸菌の遺伝子型の鑑別（参考資料 30）では、 <i>adk</i> 、 <i>fumC</i> 、 <i>gyrB</i> 、 <i>icd</i> 、 <i>mdh</i> 、 <i>purA</i> 、 <i>recA</i> の 7 つの house keeping 遺伝子を対象に、それぞれ 400 塩基程度の配列を PCR 法で増幅してその塩基配列を決定する。決定された塩基配列情報を元に統合ソフトウェアを用いて解析する。各遺伝子の塩基配列情報は、これまでに解析した菌株の塩基配列情報の違いを元に対立遺伝子（allele）として番号を付与してデータベース化されている。各菌株が保有する対立遺伝子の組み合わせによって sequence type（ST）が割当てられ、番号が付与されている。近縁の ST は、ST complex として分類される。

引用文献（文献として添付）

1. 江崎孝行：細菌の分類と同定、標準微生物学、山西弘一・平山啓一編、第8版、p133-138、医学書院、東京、（2002）
2. 佐藤成大：消毒と滅菌、標準微生物学、山西弘一・平山啓一編、第8版、p46-55、医学書院、東京、（2002）
3. 横地高志：内毒素、標準微生物学、山西弘一・平山啓一編、第8版、p121-125、医学書院、東京、（2002）
4. 野田公俊：外毒素、標準微生物学、山西弘一・平山啓一編、第8版、p125-132、医学書院、東京、（2002）
5. 仲田崇志：門レベルの分類、真正細菌ドメイン、生物分類表
<http://www2.tba.t-com.ne.jp/nakada/takashi/taxonomy/taxonomy.html>（2011）
6. 本田武司：グラム陰性通性嫌気性桿菌、標準微生物学、山西弘一・平山啓一編、第8版、p172-179、医学書院、東京、（2002）
7. Gross, W.B: Colibacillosis. pp.138-144. In: Disease of Poultry. 9th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa,USA, (1991)
8. 村瀬敏之：最近の大腸菌症，鶏病研報 46 卷 増刊号，1-4,(2010)
9. 中村菊保：大腸菌症、鶏の病気、鶏病研究会編、p70-73、鶏病研究会、（1995）
10. 橋本和典：大腸菌症、新鶏病全書、高松泰人監修、p78-84、鶏友社、東京、（1982）
11. Duncan, K., et al.:The complete amino acid sequence of Escherichia coli 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. FEBS Lett. 170:59-63 (1984).
12. Kaniga, K., et al.: A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram- negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica. Gene 109, 137-141. (1991)
13. Simon, et al.: A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Biotechnology 1, 784-791. (1983)
14. シキミ酸及びシキミ酸経路：生化学辞典第2版、今堀和友ら編集、p587-588、東京化学同人、東京、(1990)
15. Dziva, F. and Stevens M.P.: Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts. Avian Pathology, 37, 355-366. (2008)
16. 5. 細胞外突起物、第3章 細菌学総論、標準微生物学、山西弘一・平山啓一編、第8版、p76、医学書院、東京、（2002）
17. Ozawa, M. et al.: Molecular Typing of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 Strains in Japan by Using Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J. Vet. Med. Sci. 72, 1517–1520. (2010)
18. Elsas, J.D. et al.: Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. The ISME Journal, 5, 173–183. (2011)
19. 7. 細菌の増殖、第3章 細菌学総論、標準微生物学、山西弘一・平山啓一編、第8版、p80、医学書院、東京、（2002）

20. Juhas, M.: Horizontal gene transfer in human pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.*, Early Online, 1–8. (2013)
21. 大腸菌〔感染〕症：明解 獣医学辞典、田中享一ら編集、p776、チクサン出版社、東京、(1989)
22. 福山正文、他：Vero 毒素産生性大腸菌(VTEC)感染症に関する研究— 鹿からの本菌分離について— . *感染症学雑誌*、73、1140-1144、(1999)
23. 塚本定三、他：ヒトおよび動物由来の志賀毒素産生性大腸菌の血清型と毒素型、*感染症誌*、76、167-173、(2002)
24. 福山正文、他：ヒトおよびカラスからの Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分離および血清型、*感染症誌*、77、5-9、(2003)
25. Kobayashi, H. et al.: Prevalence and Characteristics of *eae*- and *stx*-Positive Strains of *Escherichia coli* from Wild Birds in the Immediate Environment of Tokyo Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 292–295. (2009)
26. Moulin-Schouleur, M., et al.: Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3366–3376. (2007)
27. Dziva, F., et al.: Sequencing and Functional Annotation of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Serogroup O78 Strains Reveal the Evolution of *E. coli* Lineages Pathogenic for Poultry via Distinct Mechanisms. *Infection and Immunity*, 81, 838-849. (2013)
28. 内毒素[endotoxin]：免疫学辞典、大沢利昭ら編集、p372、東京化学同人、東京、(1993)
29. Kariyawasam, S.: Construction, characterization, and evaluation of the vaccine potential of three genetically defined mutants of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Disease*, 48, 287-99. (2004)
30. Wirth, et al.: Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60, 1136–1151. (2006)
31. Palchevskiy, V. and Finkel S.E.: *Escherichia coli* Competence Gene Homologs Are Essential for Competitive Fitness and the Use of DNA as a Nutrient. *J. Bacteriol*, 188, 3902–3910. (2006)
32. Lorenz, M.G. and Wackernagel, W.: Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.*, 58, 563–602. (1994)
33. Chauret, C.: Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. *Virulence*, 2, 593-601. (2011)
34. Keeling, P.J. and Palmer, J.D.: Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Review Genetics*, 9, 505-618. (2008)
35. Stanhope, M.J., et al.: Phylogenetic analyses do not support horizontal gene transfers from bacteria to vertebrates. *Nature*, 411, 940-944. (2001)
36. Priestman, M.A., et al.: Molecular basis for the glyphosate-insensitivity of the reaction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase with shikimate. *FEBS Letters*, 579, 5773-5780. (2005)

緊急措置計画書

平成 26 年 3 月 3 日

氏名 ゾエティス・ジャパン株式会社
代表取締役社長 ホルヘ・ペレスマルチネス
住所 東京都渋谷区代々木三丁目 22 番 7 号

第一種使用規程の承認を申請している *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株(ポールバック *E.coli*) (*Escherichia coli*) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置を執ることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を執るための実施体制及び責任者

実施体制(別添 1 として添付)

実施責任者【個人情報につき非開示】(ゾエティス・ジャパン株式会社 製品開発・薬事統括部長)

実施責任者は、米国で製造されて日本に輸入される *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株(ポールバック *E.coli*) (*Escherichia coli*) (以下「本組換え微生物」という。)が生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められたとき、本組換え微生物を開発した米国の法人(以下「米国開発法人」という。)及び日本国内に設置した業務安全委員会に連絡する。業務安全委員会は、緊急措置を執るための社内体制及び連絡窓口を通じて、実施責任者とともに緊急措置を執る。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

(1) 日本向けに輸出される本組換え微生物の製造状況、輸入業者等の情報提供を米国開発法人に依頼するとともに、本組換え微生物を使用するモニタリングの受託機関¹、治験の受託機関²及び実施機関³、本組換え微生物の販売先及び国内販売代理店等に関する情報を把握し、その情報を整理して記録する。

(2) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、(1)により把握しているモニタリングの受託機関、治験の受託機関及び実施機関、販売先及び国内販売代理店等に情報提供を依頼し、本組換え微生物を保有している者及び使用状況の把握に努め、得られた情報を整理して記録する。

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

米国開発法人に、本組換え微生物が日本において生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められたことを連絡する。また、米国開発法人のホームページにおいても、本件についてのお知らせを掲載するとともに、問い合わせ窓口を設置することを協議する。

日本国内においては、プレスリリースを行う等メディアを通じて広く使用者に周知するとともに、2

¹ モニタリング計画書上の受託機関を指す。

² 動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成九年十月二十三日農林水産省令第七十五号)の第十条において定める治験の依頼をしようとする者から治験の依頼及び管理に係る業務の一部を委託された者を指す。

³ 動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(平成九年十月二十三日農林水産省令第七十五号)の第2条2項において定める治験の依頼を受けて治験又は製造販売後臨床試験を行う機関を指す。

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

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

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

(1) 米国の開発法人に対して、本組換え微生物の日本への輸出の自粛及び日本向けの輸入業者等への販売を自粛してもらうよう要請する。

(2) 日本国内において本組換え微生物がモニタリング及び治験に使用されている場合は、本組換え微生物が自然環境に拡散しないように必要な拡散防止措置（本組換え微生物によって汚染されたおそれのある施設、糞や敷料等の資材や死体等の消毒を含む）を直ちに執るようモニタリングの受託機関及び治験の実施機関に要請するとともに、本組換え微生物を含む使用残の治験薬を実施機関から速やかに回収し、高圧滅菌等により不活化措置を執るよう治験の受託機関に要請する。

(3) 日本国内において本組換え微生物が市販されている場合は、本組換え微生物の販売中止及び回収を行い、回収した本組換え微生物は密閉容器に保管の上、高圧滅菌等の不活化措置を執る。

(4) 日本国内において本組換え微生物が市販され、一般使用されている場合は、密閉容器に本組換え微生物を保管の上、高圧滅菌等の不活化措置を執るよう使用者に要請する。

(5) 日本国内において本組換え微生物が動物に接種されている場合は、自然環境に本組換え微生物が拡散しないよう、接種された動物及び感染している可能性の高い動物（例えば同居動物）の隔離飼育又は安楽死等の適切な措置を執るよう関係者に要請する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への速やかな連絡体制

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

6 その他必要な事項

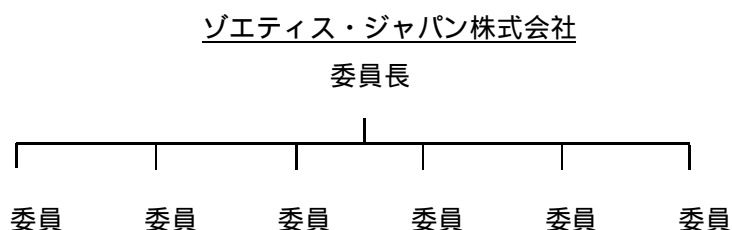
—

実施体制

・業務安全委員会

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

・実施体制図



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

モニタリング計画書

平成 26 年 3 月 3 日

氏名 ソエティス・ジャパン株式会社

申請者 代表取締役社長 ホルヘ・ペレスマルチネス

住所 東京都渋谷区代々木 3 丁目 22 番 7 号

第一種使用規程の承認を申請している *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株(ポールバック *E. coli*) (*Escherichia coli*)(以下「本組換え微生物」という。)の第一種使用規程の第一種使用等の内容の治験実施計画書に従った使用において、以下のモニタリング措置をとることとする。

背景及び目的

生物多様性影響について総合的に評価した結果、本組換え微生物を第一種使用規程に従って使用するかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。しかしながら治験においては、日本国内の野外条件下で本組換え微生物を使用した場合に本組換え微生物が一定期間しか生存せず、増殖をしないことを確認することが必要と考えるため、モニタリングを実施する。

イ 第一種使用等におけるモニタリングを講ずるための実施体制及び責任者

実施体制：別添 1 のとおり

実施責任者：【個人情報につき非開示】(ソエティス・ジャパン株式会社)

ロ モニタリングの対象となる野生動植物等の種類と名称

モニタリングの対象は、孵化場及びコマーシャル農場の鶏舎内への侵入が予測されうるネズミとする。孵化場及びコマーシャル農場では、一般衛生対策及び野生動物侵入に対するバイオセキュリティ対策を実施している。このため、孵化場及びコマーシャル農場周辺に生息しているが、本組換え微生物に暴露される機会が少ない、イタチ、テン、タヌキ、イノシシ、シカ及び野鳥(スズメ・カラス・カケス・ヒヨドリ等)等の野生動物は対象外とする。

また、ネズミに追加して、孵化場では接種場所の床面のスワブ(拭き取り)を、コマーシャル農場では接種されたヒナと同じ鶏舎内で飼育されている非接種鶏(以下「同居モニター鶏」という。)接種されたヒナが導入された鶏舎あるいは接種場所である鶏舎内の給水器、給餌器及び床面のスワブもモニタリングの対象とする。

八 モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる野生動植物等の生息又は生育状況

(1) 孵化場

モニタリングは、以下の孵化場のうち、本組換え微生物の散霧接種が行われたいずれか1施設において実施する。ただし、孵化場ではなくコマーシャル農場で本組換え微生物を接種するケースもあることから、全てのケースにおいて接種がコマーシャル農場で行われた場合は、孵化場におけるモニタリングは行わない。また、コマーシャル農場の変更に伴って今後の変更もありうる。その場合は決定次第、農林水産省農産安全管理課に報告する。

【社外秘のため非公開】

【社外秘のため非公開】

【社外秘のため非公開】

孵化場では通常、ワクチン接種後に消毒(ホルマリン燻蒸、アルコール消毒等)が実施されるため、床面スワブを対象としたモニタリングの採材は消毒後に行うこととなる。

(2) コマーシャル農場

モニタリングは、以下のコマーシャル農場のうち、少なくとも1つの、本組換え微生物の接種が行われた農場あるいは本組換え微生物を接種されたヒナが導入された農場において実施する。ただし、本試験実施により適当な農場があった場合は、そちらへの変更もありうる。その場合は決定次第、農林水産省農産安全管理課に報告する。

【社外秘のため非公開】

【社外秘のため非公開】

【社外秘のため非公開】

【社外秘のため非公開】

各々のコマーシャル農場における鶏に関する詳細は以下のとおりである。

農場	【社外秘のため非公開】	【社外秘のため非公開】
鶏種	チャンキーまたはコップ	チャンキー
年齢	0日齢～出荷時(49～63日齢)	0日齢～出荷時(49～63日齢)
導入元	【社外秘のため非公開】	【社外秘のため非公開】
識別方法	翼帯	翼帯
健康状態	良好	良好
飼育羽数	約1500羽×9鶏舎	約6000羽×3鶏舎
飼養形態	ウインドレス、平床	ウインドレス、平床
給餌方法	不断手給餌	不断自動給餌
給水方法	不断自動給水	不断自動給水
鶏舎の面積	約90m ² /1鶏舎	約100m ² /1鶏舎
1回の導入羽数	約1500羽×2鶏舎	約6000羽×2鶏舎

農場	【社外秘のため非公開】	【社外秘のため非公開】
鶏種	チャンキー	チャンキー
年齢	0日齢～出荷時(49~63日齢)	0日齢～出荷時(49~63日齢)
導入元	【社外秘のため非公開】	【社外秘のため非公開】
識別方法	翼帯	翼帯
健康状態	良好	良好
飼育羽数	約2000羽×28鶏舎	約2000羽×17鶏舎
飼養形態	開放鶏舎	開放鶏舎
給餌方法	不断自動給餌	不断自動給餌
給水方法	不断自動給水	不断自動給水
鶏舎の面積	約130m ² /1鶏舎	約130m ² /1鶏舎
1回の導入羽数	約2000羽×7鶏舎	約2000羽×6鶏舎

ニ モニタリングの期間

(1) 孵化場

床面のスワブについては、本組換え微生物を接種し、消毒を済ませた30分～1時間後を1回目のサンプリングとし、その後1週間隔で42日目までサンプリングを行う。その時点で陽性が出ている場合は、本組換え微生物が検出されなくなるまでモニタリングを実施する。

またネズミについては、接種後7日を1回目のサンプリングとし、その後1週間隔で42日目までサンプリングを行う。その時点で陽性が出ている場合は、本組換え微生物が検出されなくなるまでモニタリングを実施する。

(2) コマーシャル農場

給水器、給餌器及び床面のスワブ、ネズミ並びに同居モニター鶏について、本組換え微生物の接種後7日をサンプリング1回目とし、その後1週間隔で同居モニター鶏は35日目まで、その他の対象については42日目までサンプリングを行う。その時点で陽性が出ている場合は、本組換え微生物が検出されなくなるまでモニタリングを実施する。

ホ 実施期間、頻度その他のモニタリングの方法

(1) 実施期間

同居モニター鶏は本組換え微生物接種後35日まで、その他のサンプリング対象については本組換え微生物接種後42日までモニタリングを実施する。ただし、それぞれ35日及び42日の段階で陽性となった検体が存在する場合は、陽性が出なくなるまでモニタリングを継続する。

(2) 頻度

治験期間中、複数の鶏群が異なる時期に、本組換え微生物を接種される、あるいは接種された状態でコマーシャル農場に導入される予定である。モニタリングの対象とするのは治験開始から初めて接種あるいは導入された鶏群に関連するもののみである。すなわち、孵化場については、治験開始から最初に鶏群に接種を行った施設の床のみを、また、コマーシャル農場については、選出したコマーシャル農場において、治験開始から最初に接種あるいは導入された鶏群（1つの鶏舎に入れられた鶏の群）及びその鶏群が収容された鶏舎のみを対象としてモニタリングを実施する。サンプリングの頻度はモニタリングの期間を参照。

(3) モニタリング方法

接種

孵化場あるいはコマーシャル農場において、1日齢以上の鶏を対象に、本組換え微生物に適量の精製水を加えて溶解し、それを1羽あたり0.1~0.5 mLとなるように調整したものを、散霧器を用いて1回投与する。接種された鶏はコマーシャル農場にて本組換え微生物が接種されていない同居モニター鶏と一緒に飼育する。

サンプリング方法

i. 孵化場

接種場所の床面のスワブは、接種場所の中央及び四方に当たる5箇所から採取し、1箇所あたり1検体とする。また、ネズミについては、接種場所周囲に5個の粘着トラップを設置して捕獲する。トラップは接種後少なくとも1週間隔で確認のうえ、捕獲されている場合には随時回収して心臓、肝臓、肺及び腸内容物のスワブを採取し、各々を1検体とする。また、接種後1週間隔でネズミの糞が落ちていないかを確認し、落ちていた場合は採取して時点ごとに1検体とする。

ii. コマーシャル農場

選出したコマーシャル農場において、最初に接種あるいは導入された鶏群が収容された鶏舎のうち1鶏舎を対象とし、接種鶏の中に同居モニター鶏を33羽置き、接種後1週間隔で30羽ずつのクロアカスワブを採取する。また、同居モニター鶏からの採材と同時期に、接種されたヒナが導入された鶏舎あるいは接種場所である鶏舎内の給水器3箇所、給餌器2箇所及び床面5箇所のスワブを採取し、各々を1検体とする。ネズミについては、一つの鶏舎につき5個の粘着トラップを設置して捕獲する。トラップは、鶏舎の四隅と、天井の梁で特に餌への動線に当たる場所に設置し、接種後少なくとも1週間隔で確認のうえ、捕獲されている場合には随時回収して心臓、肝臓、肺及び腸内容物のスワブを採取し、各々を1検体とする。また、接種後1週間隔でネズミの糞が落ちていないかを確認し、落ちていた場合は採取して時点ごとに1検体とする。

同定

採取した検体はマッコンキー寒天培地に塗抹し、35～40℃で約24時間培養する。発育したコロニーが多すぎる場合は、元の検体を希釈して再度培養を行う。

発育した*E. coli*のコロニー（鮮やかな桃色で周囲に沈殿物が認められるもの）のうち、同居モニター鶏のクロアカスワブ（総排泄腔のぬぐい液）で5個、その他の検体で50個（ただし、それ以下の数のコロニーしか得られなかった場合はその数だけ）についてTSA培地及び最小寒天培地（芳香族アミノ酸及び*p*-アミノベンゾエート（パラアミノ安息香酸（PABA））を含まない基礎培地）を用いた発育試験（35～40℃で約24時間培養）を行う。

そして、本組換え微生物の表現型を示すコロニー（最小寒天培地では発育せず、TSA培地でしか発育しないコロニー）のうち、1検体あたり2個（ただし、それ以下の数のコロニーしか得られなかった場合はその数だけ）を対象に、API同定kitによる菌種の同定、ならびにPCRによる遺伝子の同定を行う。PCRではプライマー*aroA*-1および*aroA*-4を用いて1187 bpの増幅遺伝子を確認する。

ヘ モニタリングの結果の解析方法

孵化場及びコマーシャル農場において採取されたネズミ、同居モニター鶏及び各種環境スワブを用いて、本組換え微生物が検出される期間を調査する。これにより一定期間経てば本組換え微生物が死滅することを確認する。

また、コマーシャル農場において、同居モニター鶏の陽性数の変化を調査することにより、本組換え微生物が経時的に減少することを確認する。

ト 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告方法と速やかな連絡体制

モニタリングの結果、採取したサンプルのいずれかについて、一定期間を経過しても本組換え微生物が検出され続ける、あるいは陽性となる同居モニター鶏の数が増加し続けるといった、生物多様性に悪影響を与える可能性が無視できない事態が生じた場合には、農林水産省農産安全管理課にその旨を報告し、協議の上対処を検討する。また、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口に連絡する。

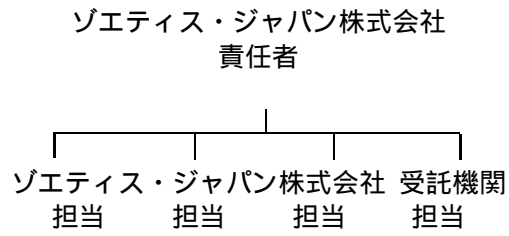
また、モニタリングの終了後、その結果概要を農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に報告する。

チ その他必要な事項

なし

モニタリング実施体制

・実施体制図



担当	氏名	職名
責任者	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社
担当	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社
担当	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社
担当	【個人情報につき非開示】	ゾエティス・ジャパン株式会社
担当	【個人情報につき非開示】	受託機関 (社外秘のため非公開)

別添資料

別 紙

- 別紙 1. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の作出過程
- 別紙 2. *aroA* 遺伝子と *aroA* 欠損遺伝子の相違
- 別紙 3. 自殺ベクター (pKNG101G プラスミド) 由来遺伝子の確認
- 別紙 4. *aroA* 欠損遺伝子の遺伝子解析
- 別紙 5. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の遺伝的安定性 (*In vitro*)
- 別紙 6. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の遺伝的安定性 (*In vivo*)
- 別紙 7. 移入された 26 bp オリゴヌクレオチドのホモロジー検索
- 別紙 8. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の鶏における安全性・クリアランス・排菌及び拡散 (散霧投与)
- 別紙 9. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のマウスにおける安全性
- 別紙 10. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の豚における安全性
- 別紙 11. ポールバック *E. coli* の動物用生物学的製剤の危害分析
- 別紙 12. ポールバック *E. coli* の承認状況及び販売高
- 別紙 13. ポールバック *E. coli* の海外における副作用報告 (PV-Works より)
- 別紙 14. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の SPF 鶏における安全性・クリアランス・排菌及び拡散 (点眼投与)
- 別紙 15. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の排菌及び環境中における生存期間
- 別紙 16. ポールバック *E. coli* のモロッコにおける多施設臨床試験

参考資料

参考資料 1 ~ 24 : 社外秘のため非公開

別紙 1 aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の作出過程

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の作出に用いた材料及び作出過程を説明した。

材料：

1. 供与核酸

大腸菌の aroA 遺伝子¹ (図 1) [1]の 593bp 目から 693 bp 目までの 101 bp を欠損させることによって aroA 欠損遺伝子 (図 2) を作出して供与核酸とした。aroA 欠損遺伝子中の欠損領域には、本菌株の作出過程で用いた合成オリゴヌクレオチドプライマー由来の外来の 26bp の挿入配列が存在している。

図 1. 大腸菌の aroA 遺伝子及び欠損領域の全塩基配列 (社外秘のため非公開)

図 2. aroA 欠損遺伝子の全塩基配列 (社外秘のため非公開)

2. 合成オリゴヌクレオチドプライマー

aroA 遺伝子欠損株の作出に使用された合成オリゴヌクレオチドプライマーは aroA-1 ~ aroA-4 の 4 種類である (表 1)。

aroA-2 と aroA-3 の塩基配列は、それぞれ 3'側の約半分が aroA 遺伝子内の塩基配列と同じであるが、残りの 5'側には aroA-2 では、SrfI 制限酵素認識部位、BglII 制限酵素認識部位及び終止コドンを含む 20bp、aroA-3 では、EcoRI 制限酵素認識部位、BglII 制限酵素認識部位及び終止コドンを含む 18bp の外来の塩基配列が組み込まれている。

表 1. aroA 遺伝子欠損株を作製するために供試した合成オリゴヌクレオチドプライマー

Primer ID	Primer sequence 5'-3'	Position base pair	Accession No
aroA -1	atccctgacgttacaacc	6-23	X00557
aroA -2	aaaagatctttaagccgggctagaaaccagatcgcctt	575-592	X00557
aroA -3	tttagatcttaagaattccagtctccgggtacttat	694-711	X00557
aroA -4	tccgcgccagctgctcga	1250-1267	X00557

□ BglII restriction sites □ SrfI restriction site □ Stop codons □ EcoRI restriction site

3. ベクター (供試プラスミド)

pKNG101G (自殺ベクター) (参考資料 4)

¹ 菌の増殖代謝に関与する芳香族アミノ酸 (トリプトファン、フェニルアラニン及びチロシン) の生合成経路であるシキミ酸経路を司る酵素の 1 つである 5-エノーピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素をコードする遺伝子。1284 塩基対 (bp)。

プラスミド pBSL141 由来のゲンタマイシン耐性遺伝子をコードする領域を含む *Not*I 制限酵素断片を pKNG101 の *Not*I 制限酵素部位にクローニングして作製する。本ベクターの蔗糖感受性、ストレプトマイシン耐性能及びゲンタマイシン耐性能を組換え大腸菌の選択マーカーとして利用する。

pCR2.1 TOPO (大腸菌 JM109 を由来とするプラスミド : pUC19, pBR322 と類似) (参考資料 2)

市販の TOPO TA クローニングベクター (Invitrogen 社) であり、大腸菌 O78 *aroA* 遺伝子を 101 bp 欠損させ、Taq ポリメラーゼで増幅した PCR 産物のクローニングに使用する。なお、本ベクターは、供与核酸の調製過程で使用した。

pKNG101 (大腸菌 R6K を由来とするプラスミド) (参考資料 3)

グラム陰性菌の染色体挿入または染色体欠損変異の誘発によく使用される自殺ベクターで、以下の遺伝的要素を有する。

複製に π タンパク質を必要とする *pir*-R6K 複製起点を有する。*strAB* 遺伝子を有し、ストレプトマイシン耐性 (Sm^R) である。また、レバンスクララーゼをコードする *sacB* 遺伝子を有し、蔗糖の加水分解及びレバンの合成を触媒する。プラスミド pKNG101 では *sacB* 遺伝子産物が蔗糖感受性をもたらし、蔗糖感受性を指標に識別される)。ストレプトマイシンフォスフォトランスフェラーゼを菌中の本プラスミドの存在の選択マーカーとして利用する。なお、本ベクター「pKNG101」は、ベクター「pKNG101G」作製のための材料として位置づける。

4. *aroA* 遺伝子欠損株の作出に供試した大腸菌

大腸菌 K12 S17 λ *pir* (参考資料 5)

大腸菌の染色体に組み込まれた広域宿主 IncP 型プラスミド RP4 の伝達遺伝子を有する。 λ ファージにより *pir* 遺伝子を大腸菌染色体に形質転換しており、自殺ベクター pKNG101G-*aroA* のための π タンパク質を提供する。

供与 (ドナー) 菌株と受容 (レシピエント) 菌株

供与菌株は pKNG101G-*aroA* を含む大腸菌 K12 S17 λ *pir* 形質転換体である。受容菌株は、英国の鶏大腸菌症の臨床例からの鶏大腸菌野外分離株 (親株 : 宿主鶏大腸菌 EC34195 株) を使用した。本菌株はゲンタマイシン添加培地では発育できない。

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の作出過程 :

1. 供与核酸の作製 (図 3)

- aroA*-1/*aroA*-2 及び *aroA*-3/*aroA*-4 のプライマーペアを用いてそれぞれ PCR² を行い、親株の *aroA* 遺伝子から約 600 bp の 2 種類の DNA 断片を増幅した。
- 各 DNA 断片の末端を *Bgl* II で切断し、電気泳動を行った。バンドを切り出し、各 DNA 断片を精製した。
- 制限酵素で切断した各 DNA 断片を等量ずつ混合し、ライゲーションによって結合させた (連結後の DNA 断片は *aroA* 遺伝子の 593 ~ 693 番目の塩基対を失っており、合成オリゴヌクレオチドプライマー由来の 26bp の挿入配列を含んでいる)。

² ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction) の略

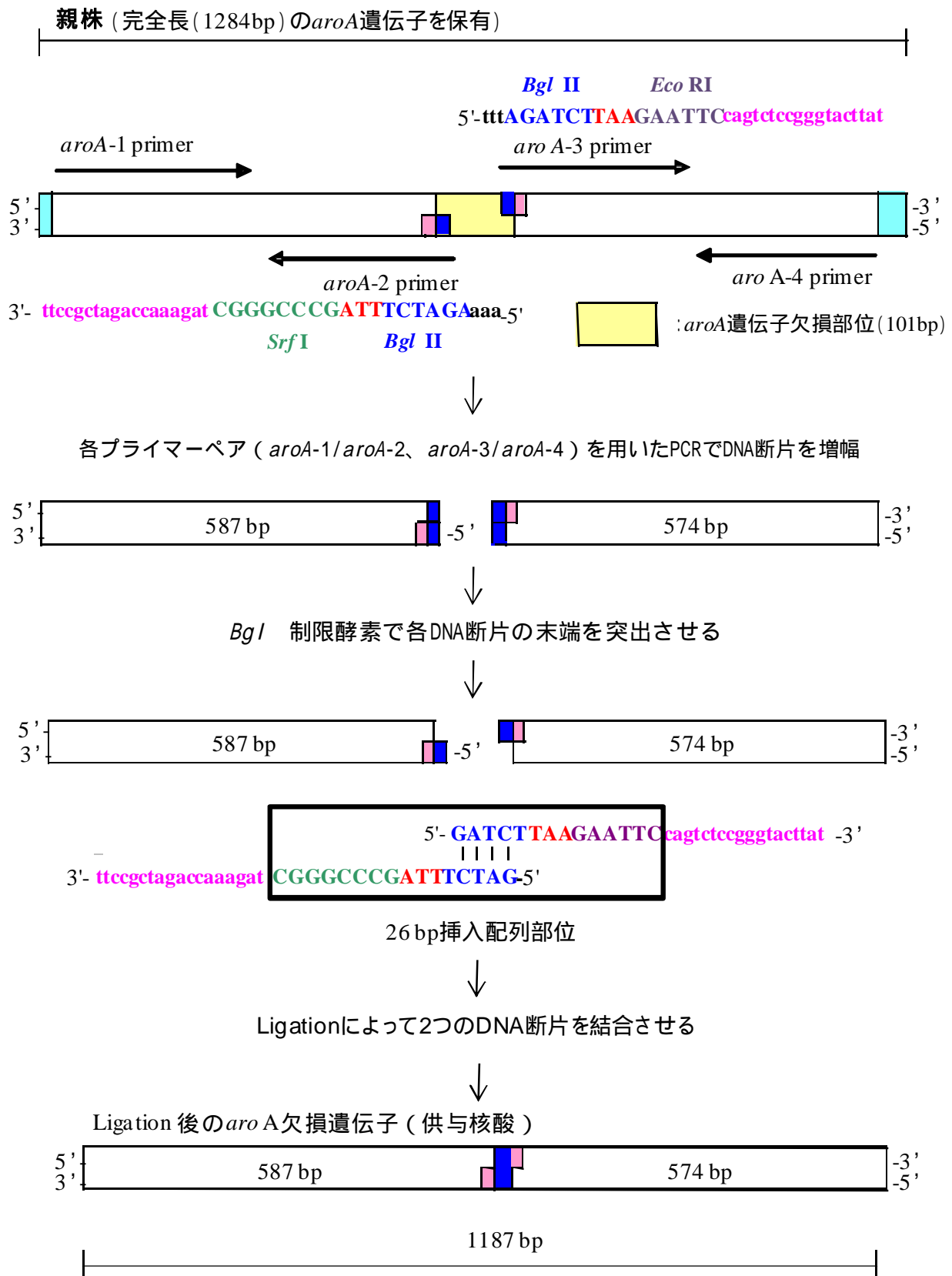


図3. 供与核酸の作製

2. 供与核酸のクローニング及び自殺ベクター (pKNG101G) への組み込み (図4、図5)

a) 供与核酸をプラスミド (pCR2.1) ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。*aroA* 欠損遺伝子を含

むプラスミドベクター (pCR2.1- *aroA*) をコンピテント大腸菌³DH5α[2]に導入し、制限酵素切断像と PCR によりクローニングできたことを確認した。

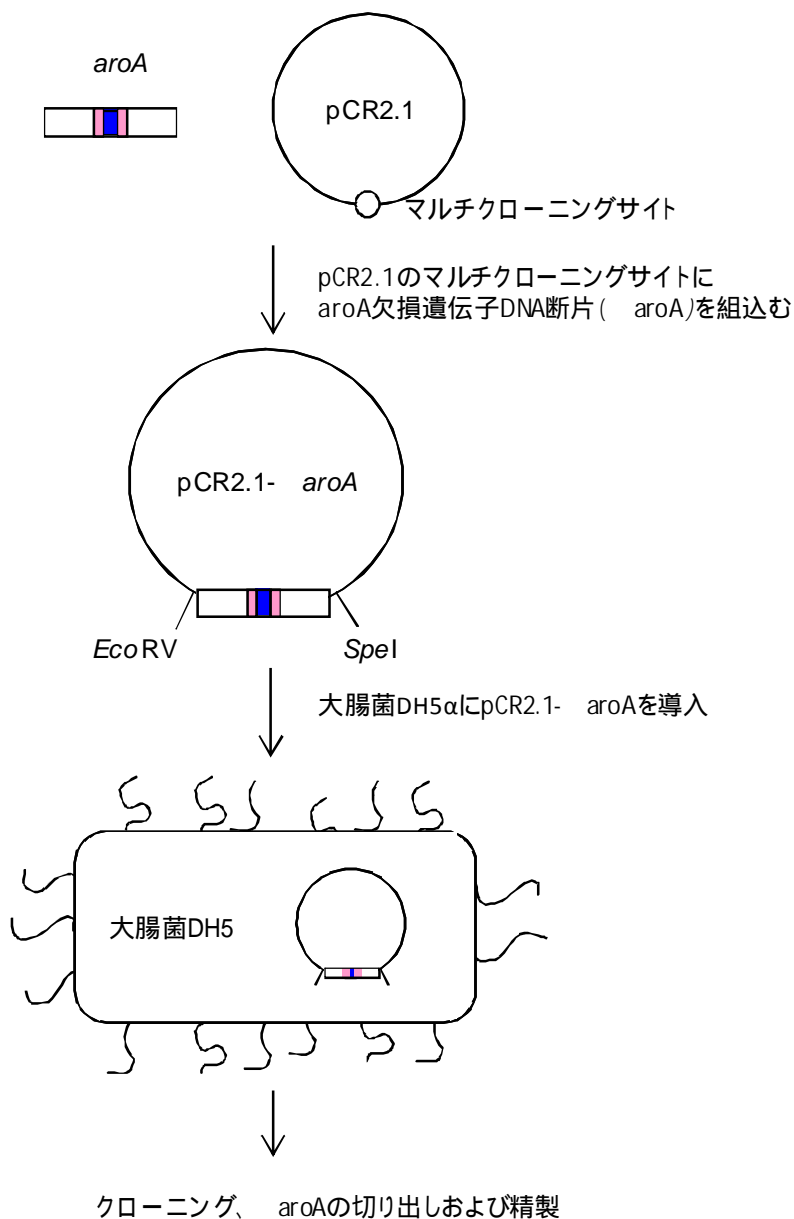
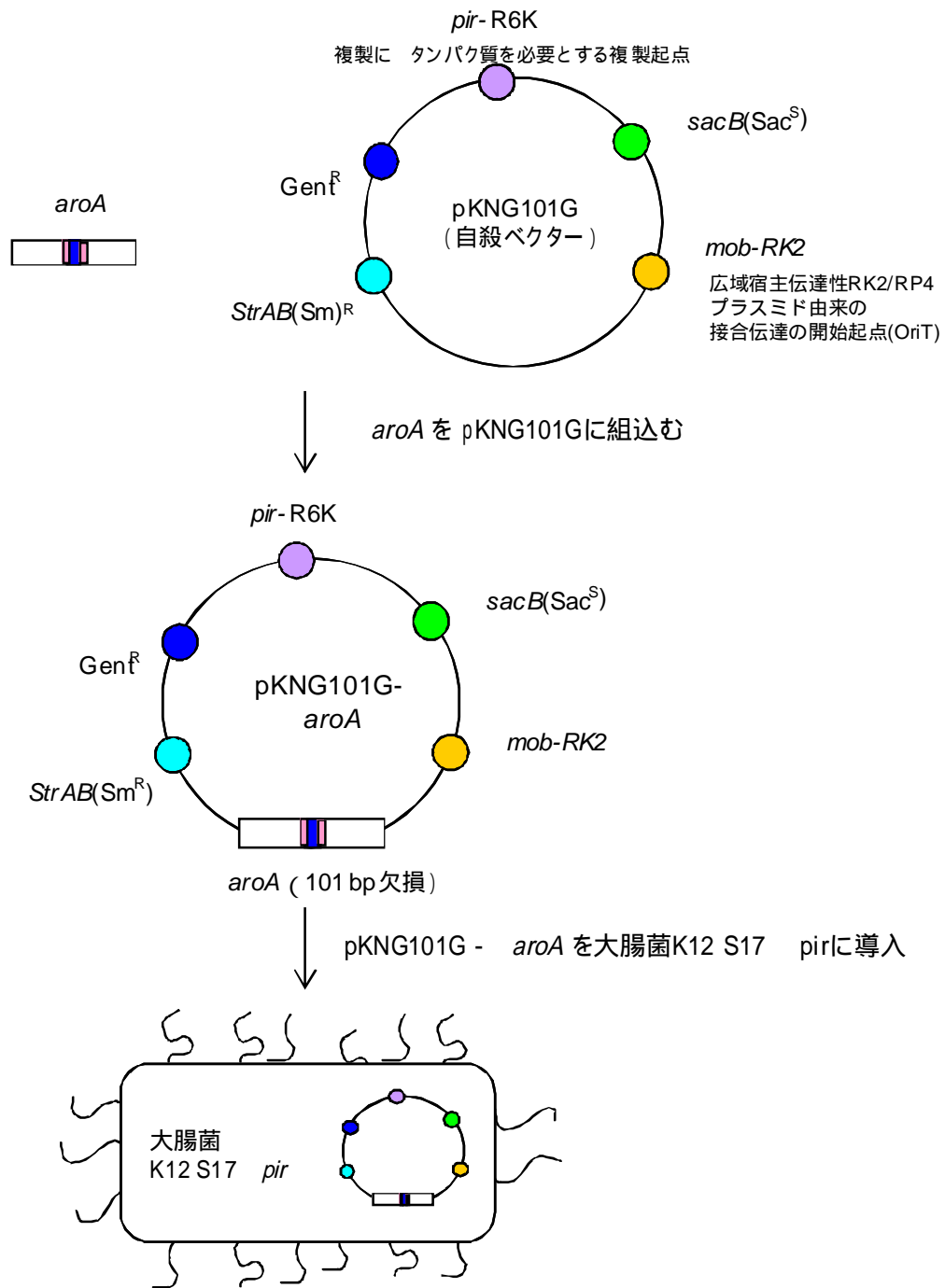


図4. 供与核酸のクローニング

- b) *EcoRV* と *SpeI* を用いてプラスミド (pCR2.1) ベクターから *aroA* 欠損遺伝子全長を制限酵素 *SrfI* 及び *EcoRV* を用いて切り出して精製し、前もって制限酵素 (*SpeI*) で前消化した自殺ベクター (pKNG101G) に組み込みを行った。
- c) これをエレクトロコンピテント⁴にした大腸菌 K12 S17 *λpir* にエレクトロポレーションで導入し、制限酵素切断像と PCR によりクローニングできたことを確認した。

³ 外来 DNA (プラスミド、ファージ DNA など) を菌体内に取り込める状態の大腸菌。通常はカルシウムイオンの存在下で冷却することにより DNA に対する膜透過性が増大した大腸菌を指す。

⁴ エレクトロポレーション用に外来 DNA を菌体内に取り込めるようにした状態



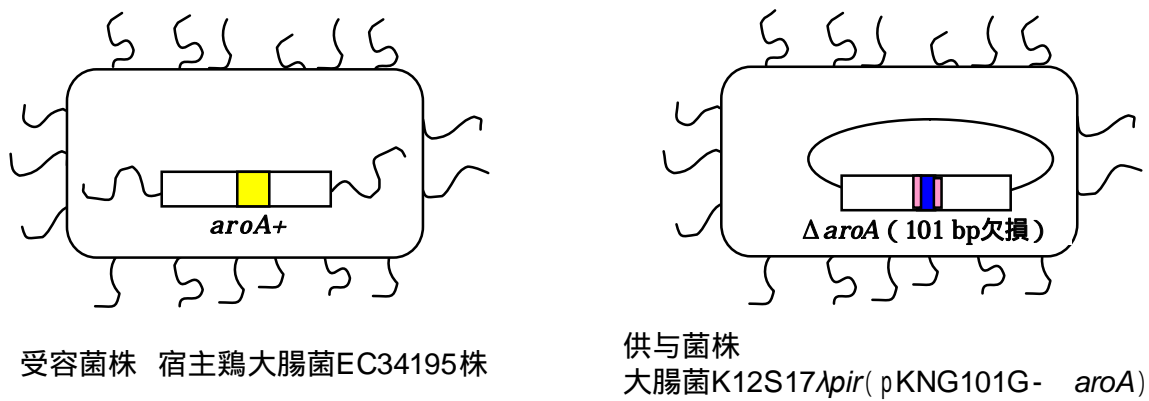
大腸菌K12 S17 *pir*は、*pir*遺伝子を保有し、タンパク質を生合成するため、pKNG101G *aroA*を複製可能

図5. 供与核酸(*aroA*)の自殺ベクター(pKN101G)への組み込み
及び pKNG101G- *aroA*の大腸菌 K12S17 *pir*への導入

3. 供与(ドナー)菌株と受容(レシピエント)菌株の接合及び一重交差体⁵の選択(図6~図8)

a) 供与菌株と大腸菌 EC34195株を乾燥した栄養寒天上に重ねたニトロセルロースメンブレン上で接合させた。

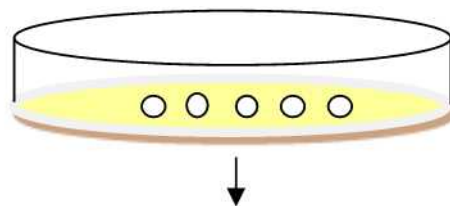
⁵ 遺伝子が交差する場所をランダムで1つ選び、その場所より後ろを入れ替える方式で相同組換えした遺伝子組換え体



供与菌株と受菌株をニトロセルロースメンブレン上で接合

図6. 供与(ドナー)菌株と受容(レシピエント)菌株の接合

- b) 4時間の培養後、メンブレンを無菌的に取り出し、メンブレンに付着した菌体をM9培地中に浮遊させた。
- c) 浮遊させた菌液をグルコース添加M9培地(ゲンタマイシン、ストレプトマイシン含有)に播き、37、48時間培養した。
- d) 発育したコロニーを最少寒天培地(ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、芳香族アミノ酸含有)に継代培養した。
- e) 発育したコロニーをPCRで確認した。野生型及び101 bp欠損した *aroA* 遺伝子を持つ突然変異体(一重交差体)のコロニーを選択した。一重交差体の遺伝子型を図8に示した。一重交差体は、ゲンタマイシン及びストレプトマイシン耐性遺伝子、蔗糖感受性遺伝子、*aroA* 欠損遺伝子 (*aroA*) 及び野生型 *aroA* 遺伝子 (*aroA+*) を保有する。



最少寒天培地(ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、芳香族アミノ酸含有)で培養

PCRで野生型及び欠損型の両方の *aroA* 遺伝子を持つ変異体(一重交差体)を選択

図7. 一重交差体の選択

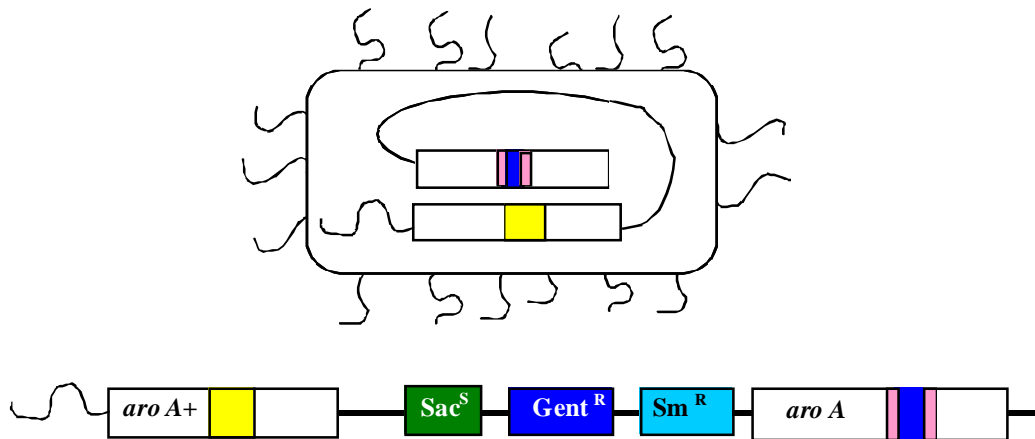


図 8. 一重交差体とその遺伝子型

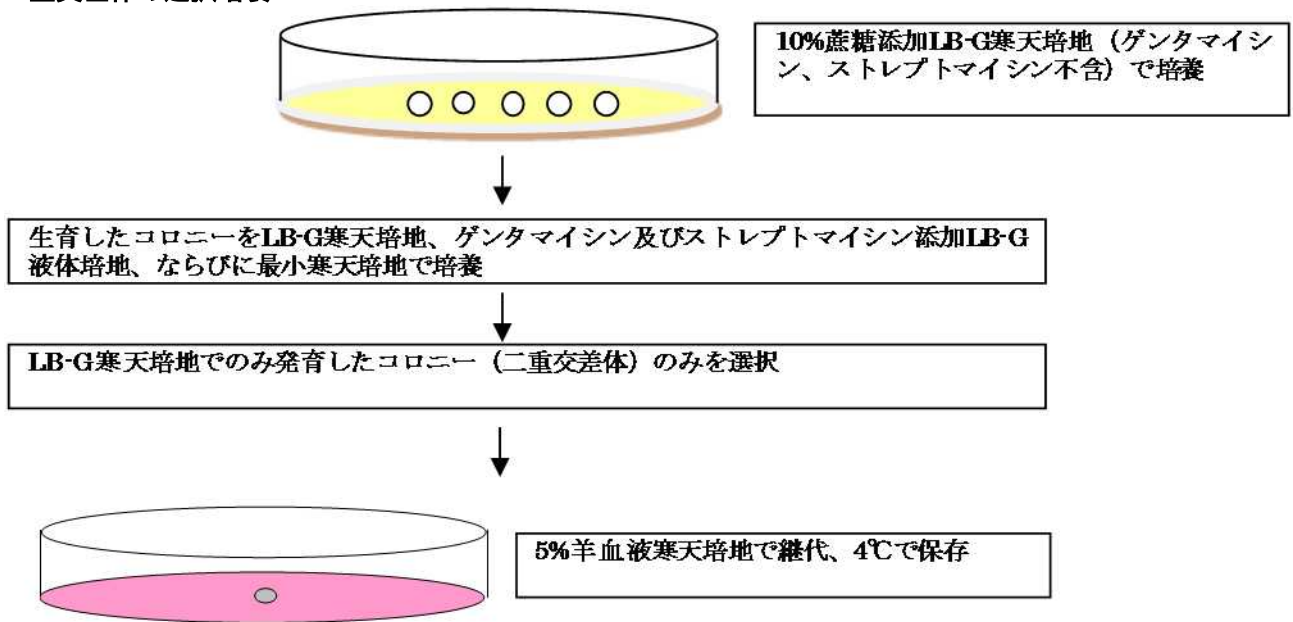
4. 二重交差体⁶の選択培養 (図 9)

- 一重交差体を 10% 蔗糖添加の LB-G⁷ 液体培地 (ゲンタマイシン及びストレプトマイシン不含) でゆっくり振盪しながら 37 °C で 16 時間培養した。培養したものを段階希釈し、10% 蔗糖添加 LB-G 寒天培地 (ゲンタマイシン及びストレプトマイシン不含) に播き、37 °C で 16 時間培養した。
- 10% 蔗糖添加 LB-G 寒天培地に生育したコロニーを、LB-G 液体培地、ゲンタマイシン及びストレプトマイシン添加の LB-G 寒天培地、ならびに最小寒天培地で 16 時間 37 °C 培養した。LB-G 寒天培地上でのみ発育したコロニー (二重交差体) だけを 5% 羊血液寒天培地で継代し、4 °C で維持した。

⁶ 交差点をランダムに 2 つ選び二つの交差点に挟まれている部分を入れ替える方式で相同組換えした遺伝子組換え体。なお、目的の遺伝子欠損株を選択する際、欠損遺伝子、薬剤耐性及び栄養要求性から直接的に選択することは難しく、最初の過程で一重交差体を選択し、次の過程で二重交差体を段階的に選択した。

⁷ ルリア・ベルターニ培地でグルコース含有のもの。大腸菌を用いた遺伝子組換え操作において頻繁に用いられる。

二重交差体の選択培養



二重交差体の表現型 : ゲンタマイシン (S)・ストレプトマイシン (S)・蔗糖 (R)・ *aroA* (101bp -)

二重交差の模式図

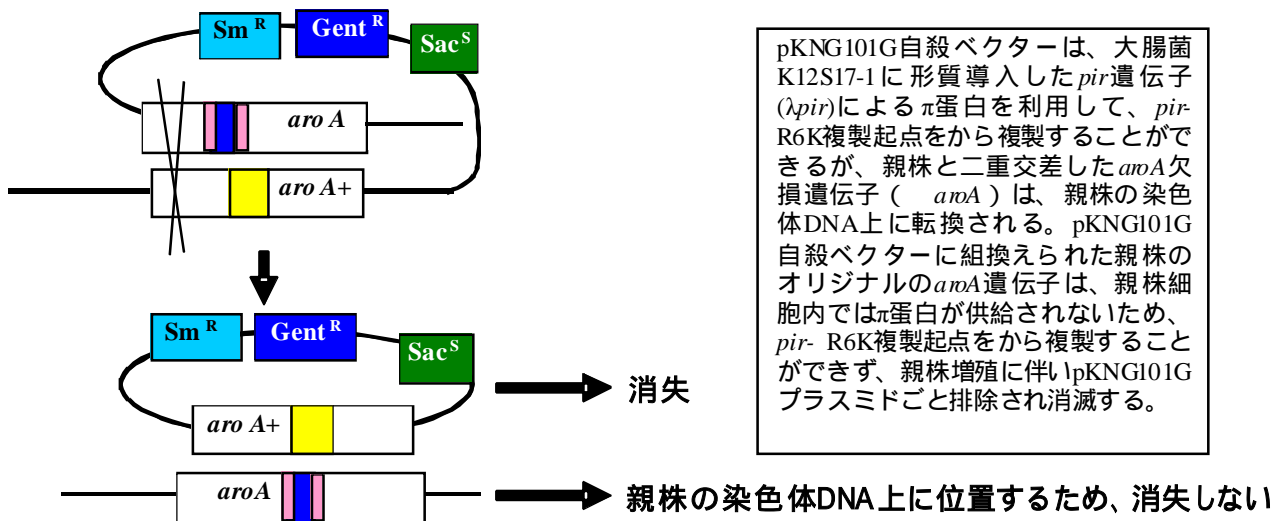


図 9. 二重交差体の選択培養及び二重交差体の模式図

図 10 に二重交差後の *aroA* 欠損遺伝子の模式図を示した。最終的に組み込まれたこの遺伝子の全長は 1209 bp である。

二重交差後の $aroA$ 欠損遺伝子

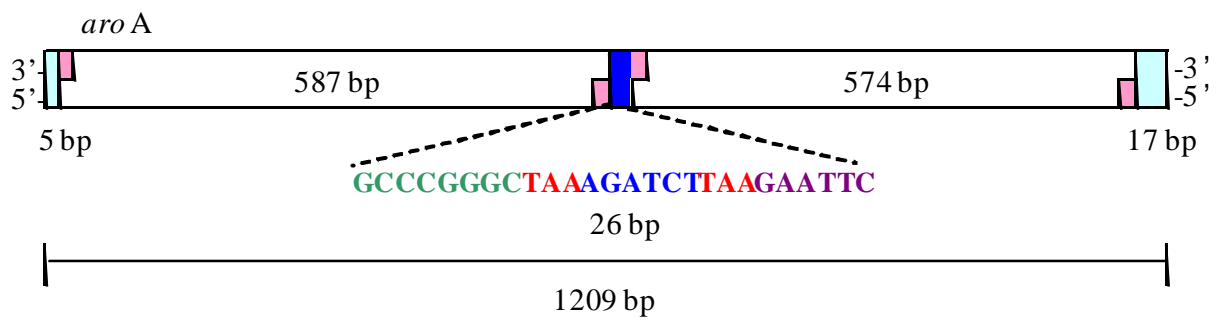


図 10. 二重交差後の $aroA$ 欠損遺伝子の模式図

図 11. $aroA$ 遺伝子欠損株 (組換え体) の全塩基配列 (社外秘のため非公開)

引用文献:

- [1] Duncan, K.A., et al. : The complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. FEBS Letters, 170, 59-63. (1984)
- [2] Woodcock, D.M., et al.: Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Res., 17, 3469-3478. (1989)

別紙 2. *aroA* 遺伝子と *aroA* 欠損遺伝子の相違

目的：

親株の *aroA* 遺伝子、ならびに供与核酸及び *aroA* 欠損鶏大腸菌 EC34195 株の *aroA* 欠損遺伝子の相違について示した。

図 A. 宿主鶏大腸菌 EC34195 株（親株）の *aroA* 遺伝子の全塩基配列（社外秘のため非公開）

図 A には、親株である宿主鶏大腸菌 EC34195 株の *aroA* 遺伝子の全塩基配列 1284 塩基対（bp）を示した。

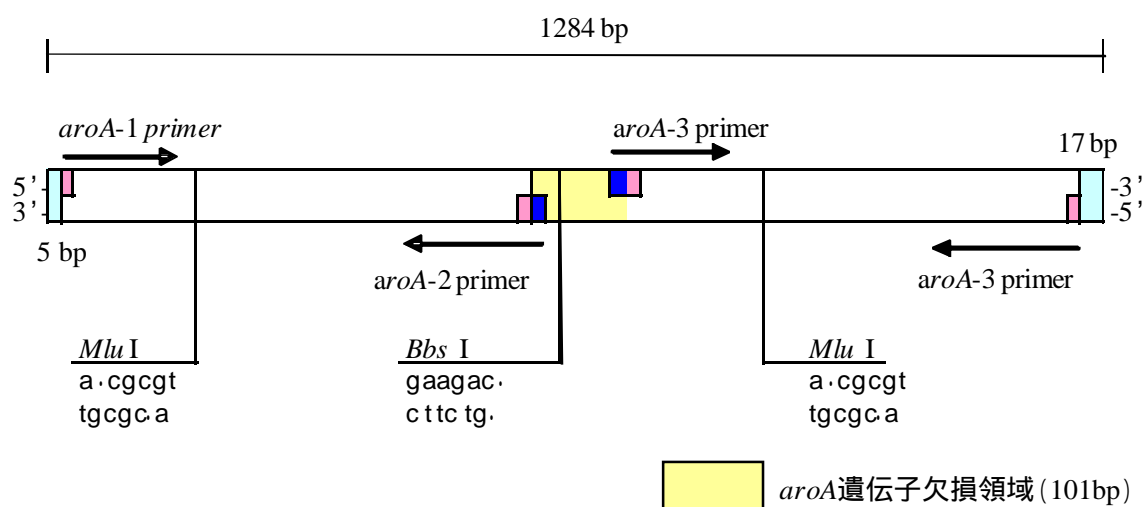


図 B. 宿主鶏大腸菌 EC34195 株（親株）の *aroA* 遺伝子の模式図

図 B には、図 A の模式図を示した。

図中の黄色で示した領域は、供与核酸である *aroA* 欠損遺伝子を作成する過程で取り除いた 593-693 番目の 101 bp の塩基配列を示す。

ピンク色及び青色の領域は、*aroA* 欠損遺伝子の作成過程で使用した合成オリゴヌクレオチドプライマー（別紙 1 の表 1）領域を示し、各矢印は、4 つの合成オリゴヌクレオチドプライマーの位置関係と PCR の際の DNA 鎖の伸張反応の方向を示す。ピンク色は親株の *aroA* 遺伝子と塩基配列が同じ領域を示し、青色の領域は、合成オリゴヌクレオチドプライマー由来の外来の塩基配列を示す。

水色の領域は供与核酸（1187bp）には含まれない 5bp、17bp の 2 つの領域を示す。

図 C. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の *aroA* 欠損遺伝子の全塩基配列（社外秘のため非公開）

図 C には、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の *aroA* 欠損遺伝子の全塩基配列（1209 bp）を示した。

*aroA*遺伝子欠損鶏大腸菌EC34195株の*aroA*欠損遺伝子

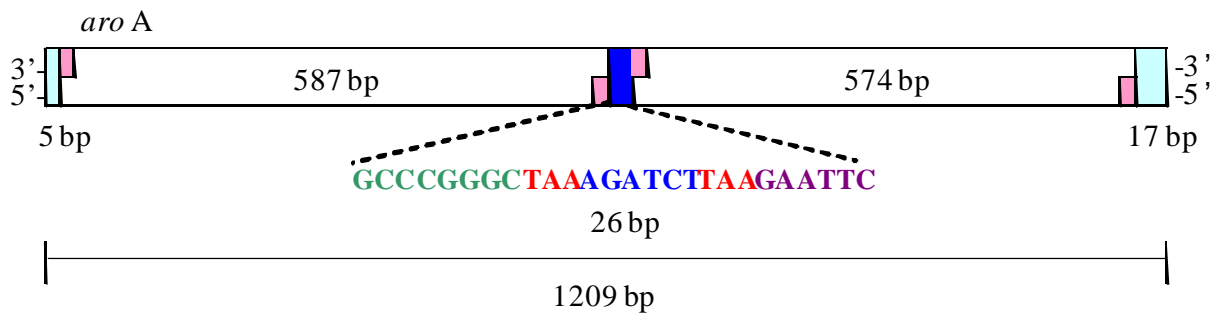


図 D. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の *aroA* 欠損遺伝子の模式図

図 D には、図 C の模式図を示した。

ピンク色及び青色の領域は、*aroA* 欠損遺伝子の作出過程で使用した合成オリゴヌクレオチドプライマー（別紙 1 の表 1）領域を示す。ピンク色は親株の *aroA* 遺伝子と塩基配列が同じ領域を示し、青色の領域は、合成オリゴヌクレオチドプライマー由来の外来の塩基配列 GCCCGGGCTAAAGATCTTAAGAATTC (26 bp) を示す。

水色の領域は供与核酸 (1187bp) には含まれない 5bp、17bp の 2 つの領域を示す。

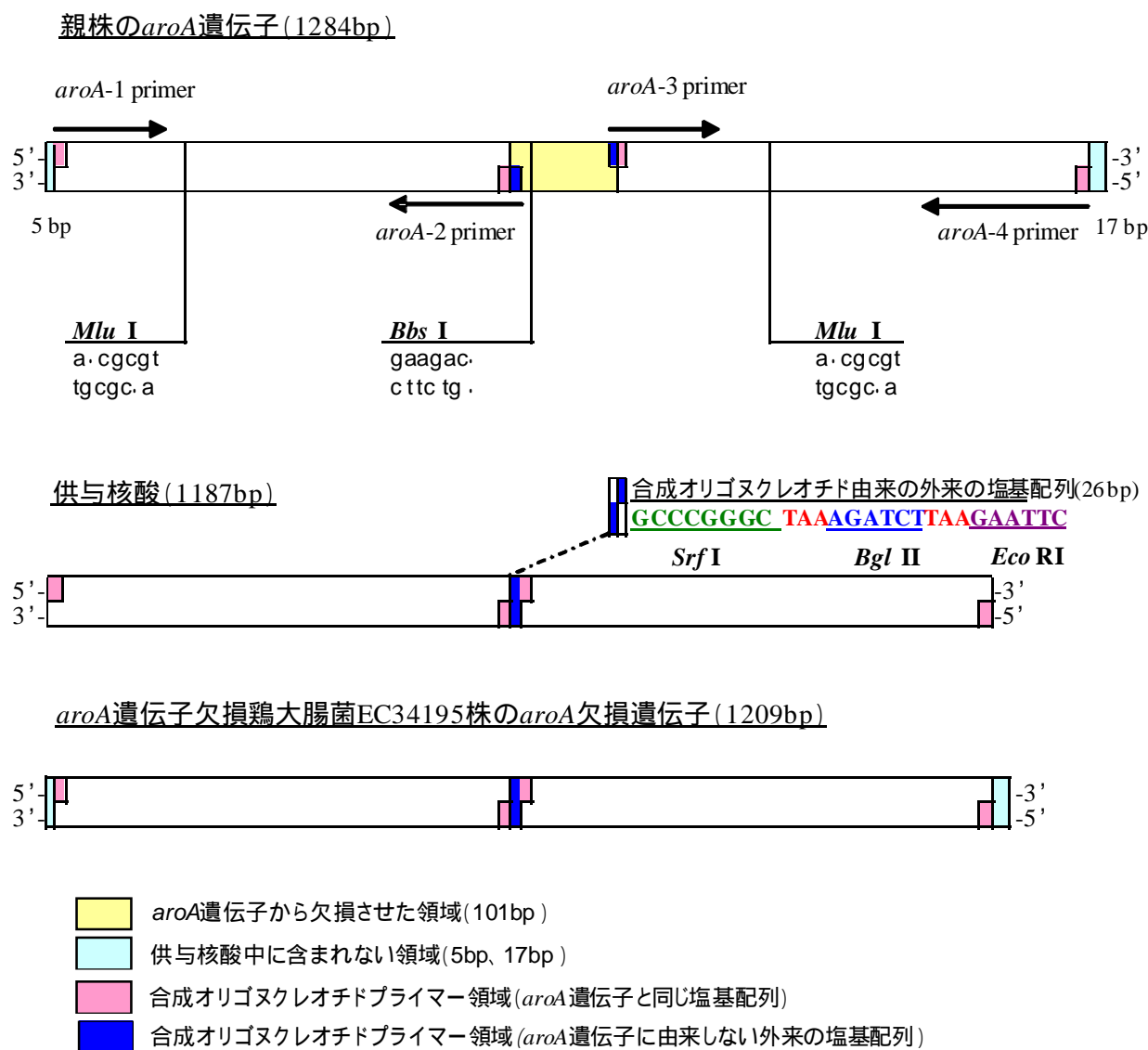


図 E. 親株、供与核酸、欠損株の遺伝子比較 (模式図)

図 E は、上段に親株の *aroA* 遺伝子(1284bp)、中段に供与核酸(1187bp)、下段に *aroA* 欠損鶏大腸菌 EC34195 株の *aroA* 欠損遺伝子(1209bp) の模式図をそれぞれ示した。

図中の黄色で示した領域は、供与核酸である *aroA* 欠損遺伝子を作成する過程で取り除いた 593-693 番目の 101 bp の塩基配列を示す。

水色の領域は供与核酸のみに含まれない 5bp、17bp の 2 つの領域を示す。

ピンク色及び青色の領域は、*aroA* 欠損遺伝子の作成過程で使用した合成オリゴヌクレオチドプライマー(別紙 1 の表 1)領域を示し、各矢印は、4 つの合成オリゴヌクレオチドプライマーの位置関係と PCR の際の DNA 鎖の伸張反応の方向を示す。ピンク色は親株の *aroA* 遺伝子と塩基配列が同じ領域を示し、青色の領域は、合成オリゴヌクレオチドプライマー由来の外來の塩基配列 **GCCCGGGCTAAAGATCTTAAGAATTC** (26 bp) を示す。

別紙 3 自殺ベクター (pKNG101G プラスミド) 由来遺伝子の消失の確認

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の作出過程で使用した自殺ベクター (pKNG101G プラスミド) が *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のゲノム中に存在しないことを確認した。

試験方法：

供試菌株は、野生型大腸菌親株及び *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株 (遺伝子組換え大腸菌 O78 17 株) を含む *aroA* 遺伝子欠損大腸菌株であった。

大腸菌株及び pKNG101G プラスミドを *Bgl II* 制限酵素で切断した後、電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、ナイロンメンブランフィルターに転写して pKNG101G プラスミドにコードされた *SacB* 遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを実施した。

結果及び考察：

野生型大腸菌 O78 親株を含め、*SacB* 遺伝子が存在しない野生型大腸菌親株において、*SacB* 遺伝子は検出されず (図 1 レーン 4、レーン 6、レーン 8)、遺伝子組換え大腸菌 O78 17 株 (*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株) を含む遺伝子組換え大腸菌株においても、*SacB* 遺伝子は検出されなかった (図 1 レーン 5、レーン 7、レーン 9)。上述の大腸菌株とは対照的に、*SacB* 遺伝子は *Bgl II* 制限酵素処理の有無によらず自殺ベクター (pKNG101G プラスミド) 中に検出された (図 1 レーン 2 及びレーン 3)。以上のことから、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を含む遺伝子組換え大腸菌株を作出する過程で、自殺ベクターは消失したことが確認された。

自殺ベクター消失の理由として、 π タンパク質による pKNG101G プラスミドの複製制御メカニズムの関与が考えられた。pKNG101G プラスミドは、 π タンパク質が供給されている条件下で *pir-R6K* 複製起点から複製が可能となる。通常、大腸菌は π タンパク質をコードしている *pir* 遺伝子を保有していないため、二重交差により *aroA* 欠損遺伝子がゲノム中に転換された後、転換後の自殺ベクターは、菌の増殖に伴い、複製されることなく菌体内から排除され、消失したものと考えられた。



- 1: マーカー
- 2: 自殺ベクター pKNG101G (制限酵素未切断)
- 3: 自殺ベクター pKNG101G (*Bgl* II 制限酵素切断)
- 4: 野生型大腸菌 O1 親株 (*Bgl* II 制限酵素切断)
- 5: 遺伝子組換え大腸 O1 14 株 (*Bgl* II 制限酵素切断)
- 6: 野生型大腸菌 O2 親株 (*Bgl* II 制限酵素切断)
- 7: 遺伝子組換え大腸 O2 15 株 (*Bgl* II 制限酵素切断)
- 8: 野生型大腸菌 O78 親株 (*Bgl* II 制限酵素切断)
- 9: 遺伝子組換え大腸 O1 17 株 (*Bgl* II 制限酵素切断)
(*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株)

**図 1 サザンハイブリダイゼーションによる自殺ベクター由来 *SacB* 遺伝子の確認
(親株と *aroA* 欠損変異株の比較)**

別紙 4 *aroA* 欠損遺伝子の遺伝子解析

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が保有する *aroA* 欠損遺伝子について遺伝子解析した。

方法：

aroA 欠損遺伝子を対象に、Vector NTI ソフトウェア(Invitrogen 社)を用いて遺伝子解析を実施した。

また、遺伝子解析で同定されたオープンリーディングフレーム (open reading frame ; ORF) について、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の BLAST (ver. 2.2.25) によって、原核生物ゲノムの塩基配列及びアミノ酸配列との相同性を検索した。

結果：

Vector NTI ソフトウェアを用いた遺伝子解析

- 1) - 鎖で 555 番目から、T7 promoter Primer (特異的 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列) と 70% 類似の塩基配列が 1 箇所認められた。
- 2) + 鎖で 2 つの ORF が確認された。1 つは、*aroA* 欠損遺伝子の 1 番目から 600 番目、もう 1 つは、*aroA* 欠損遺伝子の 709 番目から 1206 番目に位置していた。読み枠をシフトした場合、ORF は認められなかった。
- 3) - 鎖で 2 つの ORF が確認された。1 つは、*aroA* 欠損遺伝子の 532 番目から 855 番目、もう 1 つは *aroA* 欠損遺伝子の 895 番目から 1080 番目に位置していた。読み枠をシフトした場合、ORF は認められなかった。
(図 1、図 2 の遺伝子解析データについては社外秘のため非公開)

BLAST を用いた ORF の相同性検索

aroA 欠損遺伝子の ORF から生合成される推定上の遺伝子産物は、*aroA* 遺伝子産物の前半及び後半部分であることが確認された。*aroA* 遺伝子を保有する大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌、エンテロバクター及びシトロバクター等の原核生物のなかでは、特に大腸菌及び赤痢菌の *aroA* 遺伝子産物と高い相同性を示した。上記を除き、原核生物のゲノム上で、類似した塩基配列及びアミノ酸配列は、BLAST による相同性検索から確認されなかった。

まとめ及び考察：

aroA 欠損遺伝子に存在する 2 つの ORF から生合成される推定上の遺伝子産物は、大腸菌あるいは赤痢菌等の *aroA* 遺伝子産物の前半及び後半部分と高い相同性を有していた。これを除き、類似した塩基配列及びアミノ酸配列の存在は、原核生物のゲノム上には確認されなかった。

aroA 遺伝子の産物は 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素であるが、当該酵素の結晶構造解析から、当該酵素中で基質と結合する 15 個のアミノ酸は、アミノ酸配列中に広く分布していることが明らかにされている [1]。従って、*aroA* 欠損遺伝子の推定上の ORF から 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素の前半部分と後半部分がそれぞれ合成されたとしても、基質結合部位を形成することはできず、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素としての機能を失う。

以上のことから、*aroA* 欠損遺伝子が原核生物の遺伝子として機能する可能性は認められなかった。

引用文献

[1] Priestman, M.A., et al.: Molecular basis for the glyphosate-insensitivity of the reaction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase with shikimate. *FEBS Letters*, 579, 5773-5780. (2005)

別紙5 *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の遺伝的安定性 (*In vitro*)

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のワクチン製造用原株（マスターシード）を対象に、*in vitro* における遺伝的安定性を確認した。

試験方法（抜粋）：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のマスターシード及びマスターシードから 1~5 代継代培養したものについて、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって *aroA* 遺伝子領域を検出した。

結果：

マスターシードは 1~5 代継代後においても増幅遺伝子（1187 bp）の大きさに相違は認められず、*in vitro* における継代後の遺伝的安定性が確認された。

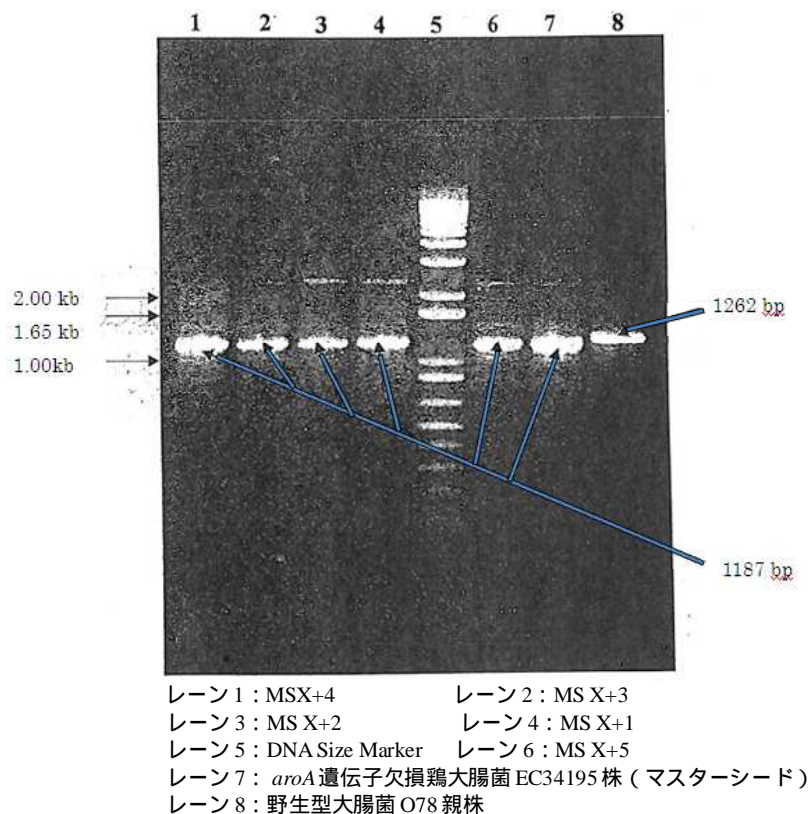


図 1. *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の遺伝的安定性

別紙 6 *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の遺伝的安定性 (*In vivo*)

目的：

本試験では、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のワクチン製造用原株（マスターシード）について、鶏を用いて連続的に継代接種を行い、病原性復帰について検討した。

試験方法：

試験設計を表 1 に示した。試験動物として 1 日齢 SPF 白色レグホン鶏（Hy-Vac）を用いた。飼育はアイソレーター内で行った。*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のマスターシード、 5.0×10^7 CFU/0.2mL/羽を目標値として調製して 10 羽の供試鶏に気管内接種し、5 羽の未接種鶏と同居させた。接種後 7 日目（8 日齢）に各鶏の気嚢、心臓及び肝臓からスワブを採取し、滅菌 MacConkey プイヨン 5 mL を添加した 50 mL 遠心チューブに回収して懸濁した。回収した懸濁液中の大腸菌数（単位：CFU/mL）を分離培養により測定した。2 回目以降の継代接種では、0.2 mL/羽の懸濁液を接種し、1 回目接種時と同様に飼育した。

回収された懸濁液中に含まれる細菌株の同定・確認は、3 種類のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）によって行った。

表 1 試験設計

継代接種回数	接種材料*	接種経路*	試験に使用した鶏羽数**	
			接種鶏	同居鶏
1回目	<i>aroA</i> 遺伝子欠損鶏大腸菌EC34195株 (マスターシード)	気管内	10	5
2回目	気嚢、心臓及び肝臓スワブ懸濁液	気管内	10	5
3回目	気嚢、心臓及び肝臓スワブ懸濁液	気管内	10	5

*：接種量は 0.2mL/羽。1 回目のマスターシードの目標接種量は 5.0×10^7 CFU/0.2mL/羽

**：試験に使用した 15 羽の鶏のうち 10 羽にマスターシードまたは気嚢、心臓及び肝臓スワブ懸濁液を接種し、5 羽は接種せずに同居させた。

成績：

一連の継代接種において、接種鶏及び同居鶏に臨床症状及び剖検時の肉眼病変は認められなかった。

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌株は、接種鶏から 1 回目及び 2 回目の継代接種後まで回収され、3 回目接種後は回収されなかった（表 2）。

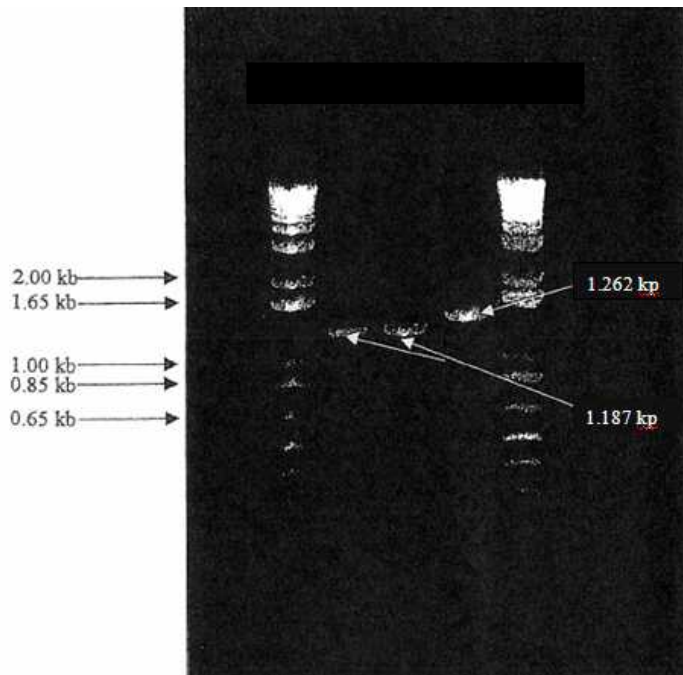
表2 投与した接種材料の菌数

継代接種回数	接種材料の菌数 (CFU*/0.2mL/羽)	回収材料の菌数 (CFU/mL)
1回目	1.23×10^7	3.82×10^5
2回目	7.64×10^4	1コロニー
3回目	1コロニー (菌数を測定できず)	**

*：Colony forming Unit; コロニー形成単位

**：測定できず

2 回目継代接種から回収された大腸菌の PCR 確認試験において、2 代目分離株の *aroA* 遺伝子部位の塩基配列の長さは、野生型大腸菌 O78 株より短く、かつマスターシードと差がないことから、回収された菌株は *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌であることが確認された（図 1）。



レーン1：DNA マーカー
 レーン2：2代目分離株 #466
 レーン3：*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株（マスターシード）
 レーン4：野生型大腸菌 078 株
 レーン5：DNA マーカー

図1：野生型大腸菌及び*aroA*遺伝子欠損鶏大腸菌EC34195株における*aroA*遺伝子のPCR分析

*aroA*遺伝子欠損鶏大腸菌株の回収率は、1回目の継代接種から40% (4/10)、2回目の継代接種から10% (1/10)、3回目の継代接種から0% (0/10)であった (表3)。さらに、各回の継代接種において同居鶏から*aroA*遺伝子欠損鶏大腸菌株は回収されなかった。

表3 病原性復帰試験：菌分離データ

継代接種回数	接種経路	<i>E. coli aroA</i> -*陽性数 / 培養数	
		接種	非接種 (同居)
1回目	気管内	4/10	0/5
2回目	気管内	1/10	0/5
3回目	気管内	0/10	0/5

*：*aroA*遺伝子欠損鶏大腸菌株

まとめ及び考察：

接種鶏において臨床徴候及び剖検時の肉眼病変は認められず、また、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を鶏を用いて連続的に継代したとき、継代3代目で回収が不能となって継代できなくなったことから、病原性の復帰は認められないことが確認された。

また、2回目継代接種から回収された *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌の PCR 確認試験において、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌が *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株マスターシードと差がないことが示され、*in vivo* における遺伝的安定性が確認された。

別紙7 移入された 26 bp オリゴヌクレオチドのホモロジー検索

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株に移入された 26 bp のオリゴヌクレオチドの塩基配列が、大腸菌及びその他の菌のゲノム中の塩基配列と一致するか検討した。

試験方法：

移入された 26 bp のオリゴヌクレオチドとの相同性について、大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所の DDBJ (DNA data bank of Japan) の BLASTN 2.2.24 によって検索した。

さらに、検索で特定された生物を対象に、移入された 26 bp のオリゴヌクレオチドと類似性の高い塩基配列が存在する遺伝子に関して National Center of Biotechnology Information (NCBI) の BLAST2.2.26 によって検索し、明らかにした。

結果：

ホモロジー検索の結果

ホモロジー検索の結果、*Lactobacillus amylovorus*、*Staphylococcus aureus*、*Thermodesulfovibium narugense*、*Shewanella sp.*、*Clostridiales sp.*、*Vibrio sp.*、*Vibrio parahaemolyticus* 及び *Streptococcus uberis* において、移入した 26 bp の塩基配列と 17 ~ 19bp の一致が認められたが、移入された 26bp の塩基配列と完全長が一致した生物は認められなかった (表 1)。

表 1 ホモロジー検索の結果

GenBank accession No.	GenBank 登録名	一致した塩基数 (26bp 中)
CP002609	<i>Lactobacillus amylovorus</i> GRL 1118, complete genome.	19 bp
GQ900418	<i>Staphylococcus aureus</i> plasmid SAP063A, complete sequence.	18 bp
CP002690	<i>Thermodesulfovibium narugense</i> DSM 14796, complete genome.	17 bp
CP000446	<i>Shewanella sp.</i> MR-4, complete genome	17 bp
FP929061	<i>Clostridiales sp.</i> SSC/2 draft genome.	17 bp
CP001806	<i>Vibrio sp.</i> Ex25 chromosome 2, complete sequence.	17 bp
BA000032	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633 DNA, chromosome 2, complete sequence.	17 bp
AM946015	<i>Streptococcus uberis</i> 0140J complete genome.	17 bp

2010年8月8日検索 (BLASTN 2.2.24)

移入された 26 bp のオリゴヌクレオチドと類似性の高い塩基配列が存在する遺伝子 (表 2)

移入された 26 bp のオリゴヌクレオチドと相同性の高い塩基配列が存在する遺伝子は、*Lactobacillus amylovorus* で SlpX (19bp/1536bp で一致：S-Layer protein)、*Thermodesulfovibium narugense* で peptidase S16 lon domain protein (17bp/2382bp で一致：ペプチダーゼ)、*Shewanella sp.* で Excinuclease ABC subunit C (17bp/1830bp で一致：ヌクレアーゼ)、*Clostridiales sp.* で imisazole glycerol phosphate synthase (17bp/606bp で一致：トランスフェラーゼ)、*Vibrio sp.* 及び *Vibrio parahaemolyticus* で hypothetical protein (17bp/153bp で一致：機能が不明な蛋白質) であった。*Staphylococcus aureus* (18bp/26,016bp で一致) 及び *Streptococcus uberis* (17bp/1,852,352bp で一致) では、特に遺伝子として機能していないことが確認された。

表2 移入された 26 bp のオリゴヌクレオチドと類似性の高い塩基配列が存在する遺伝子

GenBank 登録名	遺伝子産物名	遺伝子機能	一致塩基数/総塩基数
Lactobacillus amylovorus GRL 1118, complete genome.	SlpX	S-Layer protein	19bp/1536bp
Staphylococcus aureus plasmid SAP063A, complete sequence.	非コーディング領域	無し	18bp/26,016bp
Thermodesulfobium narugense DSM 14796, complete genome.	Peptidase S16 lon domain protein	ペプチダーゼ	17bp/2382bp
Shewanella sp. MR-4, complete genome	Excinuclease ABC subunit C	ヌクレアーゼ	17bp/1830bp
Clostridiales sp. SSC/2 draft genome.	imisazole glycerol phosphate synthase	トランスフェラーゼ	17bp/606bp
Vibrio sp. Ex25 chromosome 2, complete sequence.	hypothetical protein	機能不明な蛋白質	17bp/153bp
Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633 DNA, chromosome 2, complete sequence.	hypothetical protein	機能不明な蛋白質	17bp/153bp
Streptococcus uberis 0140J complete genome.	非コーディング領域	無し	17bp/1,852,352bp

2012年4月11日検索 (BLAST2.2.26)

まとめ及び考察：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株に移入された 26 bp オリゴヌクレオチドは、現在、GenBank に登録されているいかなる大腸菌、あるいはその他の菌のゲノムに含まれないことが確認された。

さらに、移入された 26 bp オリゴヌクレオチドと相同性の高い塩基配列を有する菌は認められたものの、相同性の高い 17bp から 19bp の塩基配列は、特定の遺伝子の塩基配列、あるいは非コーディング領域の一部にすぎず、移入された 26bp の塩基配列が病原因子等の遺伝子として機能するとは考え難い。

別紙 8 aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の鶏における安全性・クリアランス・排菌及び拡散（散霧投与時）

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の安全性・クリアランス及び排菌・拡散について、当該菌株を主剤とする aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチンを用いて、 2.217×10^8 CFU/ドースを初生 SPF 鶏に散霧投与することによって検討した。

試験方法：

1 日齢の SPF 鶏 50 羽に、 2.217×10^8 CFU/羽の aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする生ワクチンを散霧により投与した。同居対照群の SPF 鶏 25 羽にはワクチンを投与しなかった（表 1）。臨床徴候について全ての鶏を毎日観察した。

ワクチン投与後 4、8、11、15 及び 22 日目にワクチン投与群 10 羽及び同居対照群 5 羽を剖検した。剖検時、各鶏から菌回収のため、心臓、肝臓及び気嚢からスワブ標本を採し、MacConkey 寒天培地で培養した。

各鶏から回収された細菌を API 20E ストリップ（同定キット）によって同定し、大腸菌同定を実施すると共に、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン）及びパラアミノ安息香酸（PABA）非含有の基本培地上で発育しないこと検証し、aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株が存在することを検討した。

飼育に使用したアイソレーターからの環境サンプルのスワブ標本も採取し、ワクチン株の存在について、各時点でモニタリングした。

表 1. 試験設計

試験群	ワクチン	投与量 (1 羽あたりの用量)	ワクチン 投与経路*	鶏羽数**
1	aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチン	2.217×10^8 CFU	散霧	50
2	なし	なし	なし	25

*：散霧投与には散霧用の箱を用意し、鶏 50 羽を集めてワクチン投与し、投与後、アイソレーターに収容。

**：2 個（#32 及び#17）のアイソレーターを使用し、ワクチン投与群 50 羽及び同居対照群 25 羽を収容した。各アイソレーターにはワクチン投与群 25 羽及び同居対照群 12 羽または 13 羽を収容した。

成績：

ワクチンを投与した鶏にも同居対照群の鶏にも、疾患の臨床徴候は認められなかった。さらに、試験期間中、ワクチンの投与に起因する死亡例は認められなかった。

ワクチン投与後 4 日目及び 8 日目に採取した環境サンプルからワクチン株が回収されたが、ワクチン投与後 11、15 及び 22 日目に採取したサンプルからは回収されなかった（表 2）。

ワクチン投与後 4 日目の剖検時に、ワクチン投与群の 1 羽からのみワクチン株が回収された。第 8、11、15 及び 22 日の剖検時にはワクチン投与群のいずれの鶏からもワクチン株は回収されなかった。同居対照群の鶏でも全ての時点でワクチン株は回収されなかった（表 3）。

野生型大腸菌ならびに *Enterobacter cloacae*、*Citrobacter freundii*、*Serratia liquefaciens* 及び *Fluorescent Pseudomonas* 群などの細菌は、ワクチン投与群または対照群の鶏及び環境サンプルからさまざまな時点で回収された。

表2 アイソレーター内部の細菌分離結果

分離 日齢	アイソレータ #	分離 場所	マッコキ-培地	寒天培地	API同定kit	トプチケ-スライ 寒天培地	同定
4	32	上 / 前面	-	nt*	nt	nt	NA**
		給水器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		給餌器	+	-	<i>E.coli</i>	+	Vaccine
	17	床面	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		上 / 前面	-	nt*	nt	nt	NA**
		給水器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
給餌器		+	-	<i>E.coli</i>	+	Vaccine	
8	32	給餌器	+	-	<i>E.coli</i>	+	Vaccine
		床	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		上 / 前面	-	nt	nt	nt	NA
	17	給水器	+	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>
		給水器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		給餌器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
床面		+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type	
11	32	床面	+	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>
		上 / 前面	-	nt	nt	nt	NA
		給水器	+	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>
	17	給水器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		給餌器	-	nt	nt	nt	NA
		床面	+	-	<i>E.coli</i>	+	Vaccine
15	32	床面	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		上 / 前面	-	nt	nt	nt	NA
		給水器	+	+	No ID***	+	No ID
	17	給水器	+	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>
		給餌器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		床面	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
22	32	給餌器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		上 / 前面	-	nt	nt	nt	NA
		給水器	+	+	No ID	+	No ID
	17	給水器	+	-	No ID	+	No ID
		給水器	+	-	No ID	+	No ID
		給水器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
15	32	給水器	+	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>
		給餌器	-	nt	nt	nt	NA
		床面	+	+	No ID	+	No ID
	17	給水器	+	+	<i>Ser. liquifaciens</i>	+	<i>Ser. liquifaciens</i>
		給餌器	-	nt	nt	nt	NA
		床面	+	+	No ID	+	No ID
4	32	上 / 前面	-	nt	nt	nt	NA
		給水器	+	+	No ID	+	No ID
		給水器	+	-	No ID	+	No ID
	17	給水器	+	-	No ID	+	No ID
		給水器	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		給水器	+	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>	+	<i>Ent. cloacae,</i> <i>Cit.freundi</i>
17	給餌器	-	nt	nt	nt	NA	
	床面	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type	
	上 / 前面	-	nt	nt	nt	NA	
	給水器	-	nt	nt	nt	NA	
17	給餌器	-	nt	nt	nt	NA	
	床面	-	nt	nt	nt	NA	

* : 試験せず
 ** : 同定実施せず
 *** : 同定できず

表 3. 剖検による鶏からの細菌分離結果

分離日齢	アイソラータ #	分離羽数/検査羽数	マッコッキー培地	寒天培地	API同定kit	トリブチケースロイ寒天培地	同定
4	32	1/9	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
	17	(1/11)*	+	+	<i>E.coli</i>	+	Vaccine
		(2/11)*	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
8	32	(2/11)*	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
		(1/11)	+	+	<i>Ent. ζ loacae, Cit.freundi</i>	+	<i>Ent. ζ loacae, Cit.freundi</i>
	17	0/7	-	nt**	nt	nt	NA***
11	32	0/7	-	nt	nt	nt	NA
	17	0/8	-	nt	nt	nt	NA
15	32	1/9	+	+	<i>Flu.pseudomonas</i>	+	<i>Flu.pseudomonas</i>
	17	1/7	+	+	<i>E.coli</i>	+	Wild-type
22	32	0/7	-	nt	nt	nt	NA
	17	0/8	-	nt	nt	nt	NA

* : ワクチン接種鶏から分離された (その他の分離例は同居対象鶏から)

** : 試験せず

*** : 同定実施せず

まとめ及び考察 :

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする生ワクチンを散霧投与した場合、鶏及び環境から迅速に消失したことが明らかにされた。

散霧投与後、ワクチン株は第 4 日目にワクチン投与群の鶏 1 羽のみから回収された。環境サンプルからは第 4 日及び 8 日に回収されたが、それ以降の菌回収はされなかった。

ワクチン投与後 3 週間の間、いずれの時点においても同居対照群の鶏からワクチン株は採取されなかった。

このことから、散霧投与により 1 日齢の SPF 鶏にワクチン投与した場合、本ワクチンはワクチン投与した鶏、同居鶏及び環境に対して安全であることが確認された。

別紙9 *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株のマウスにおける安全性

目的：

非適用対象動物であるマウスを対象に、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチンの安全性について検討した。

試験方法：

2群 16匹のマウスを実験に供した。試験群1の8匹のマウスに *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチンを 5.0×10^6 CFU/頭 (0.5 mL) ずつ腹腔内接種し、もう試験群2の8匹のマウスに当該ワクチンを 5.0×10^6 CFU/頭 (0.03 mL) ずつ脳内接種し、7日間毎日観察した(表1)。

表1. 試験設計

試験群	ワクチン	投与量 (1頭当たりの用量)	ワクチン 投与経路	マウス 匹数
1	<i>aroA</i> 遺伝子欠損鶏大腸菌 弱毒生ワクチン	5.0×10^6 CFU (0.5 mL)	腹腔内	8
2	<i>aroA</i> 遺伝子欠損鶏大腸菌 弱毒生ワクチン	5.0×10^6 CFU (0.03 mL)	脳内	8

成績：

腹腔内接種群では、観察期間中、ワクチン投与に起因する有害事象（死亡またはその他の臨床徴候）は認められなかった。脳内接種群では、接種1日目に1匹のマウスが死亡したが接種時の外傷によるものであったと考察された。それ以外の7匹は観察期間中、ワクチン投与に起因する望ましくない反応（死亡またはその他の臨床徴候）は認められなかった。（表2）。

表2. マウスにおける *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒ワクチンの安全性評価

試験群	投与経路	動物頭数	死亡	副反応	ワクチン接種後観察(経過日数)						
					1	2	3	4	5	6	7
1	腹腔内	8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
2	脳内	8	1/8*	0/7	1/8	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7

* : 接種1日目の死亡（接種時の外傷によるもの）

まとめ及び考察：

これらのことから、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を非対象動物であるマウスに腹腔内または脳内接種したときの安全性が確認された。

別紙 10 *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の豚における安全性

目的：

非適用対象動物である豚を対象に、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチンの安全性について検討した。

試験方法：

3 週齢の子豚 10 頭に 3.55×10^8 CFU/頭 (1.0 mL) の *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチンを経口投与し、無投与対象豚 5 頭を別房で飼育し、全ての子豚の臨床徴候及び死亡について毎日観察した (表 1)。

ワクチン投与後 3 週 (6 週齢) に剖検し、子豚の臓器 (肺、心臓、肝臓及び脾臓) に大腸菌に起因する病変があるかどうかを評価し、菌分離を実施した。

大腸菌分離用 MacConkey 寒天培地で各組織のスワブを培養し、API ストリップ (同定キット) を用いて陽性結果の出た全てのプレートを検査し、大腸菌の存在を確認した。

表 1. 試験設計

試験群	ワクチン	投与量 (1 頭当たりの用量)	ワクチン 投与経路	豚頭数
1	<i>aroA</i> 遺伝子欠損鶏大腸菌 弱毒生ワクチン	3.55×10^8 CFU (1.0 mL)	経口	10
2	なし	なし	なし	5

成績：

表 2. 3 週齢の子豚における鶏大腸菌弱毒生ワクチンの安全性評価

試験群	投与 経路	動物 頭数	死亡 (%)	病変				<i>aroA</i> -大腸菌分離 (陽性個体 / 検査個体)			
				肺	心臓	肝臓	脾臓	肺	心臓	肝臓	脾臓
1	経口	10	10 (1/10*)	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
2	-	5	20 (1/5**)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

* : 腎病変によるワクチン接種豚の死亡

** : 重篤な急性肺炎によるワクチン未接種豚の死亡

試験終了時、子豚の組織 (肺、心臓、肝臓及び脾臓) を細菌分離用に採取した。ワクチン投与群の子豚からワクチン株は回収されなかった。無投与対照群の子豚から同定不能な細菌数種が回収された。

死亡例について

ワクチン接種後 15 日目にワクチン投与群の子豚 (#W567) 1 頭及び接種後 20 日目に無投与群の子豚 (#W551) 1 頭が死亡しているのが発見された。この死亡した 2 頭を剖検し、肉眼的病変について検査した。

ワクチン投与群の子豚（#W567）の死亡は、ワクチンに起因するものではなく、先天性腎疾患により腎不全に至ったことが原因であった。

ワクチン無投与対照群の子豚（#W551）の死亡は重度な急性肺炎が原因であった。

死亡例からの細菌分離

死亡した子豚2頭（#W567及び#W551）の組織（肺、心臓、肝臓及び脾臓）を細菌分離用に採取した。

ワクチン無投与の対照群の子豚（#W551）から同定不能な細菌数種が回収された。

ワクチン投与群の子豚（#W567）からは *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌ワクチン株を含め細菌は回収されなかった。

まとめ及び考察：

非適用対象動物（豚）に対するワクチン投与において、ワクチンに起因する有害事象（死亡またはその他の臨床徴候）は認められなかった。また、剖検において、ワクチンを投与した全ての子豚の臓器には大腸菌に起因する肉眼的病変は認められず、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌も回収されなかった（表2）。試験期間中にワクチン投与子豚で死亡が認められたが、ワクチンに起因するものではなく、先天性腎疾患により腎不全が原因であった。

これらのことから、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を非対象動物である豚に経口投与したときの安全性が確認された。

別紙 11 ポールバック *E. coli* の米国における動物用生物学的製剤の危害分析

本資料は、米国農務省 動植物衛生検査局 (USDA APHIS) によって評価された「Veterinary Biologics Risk Assessment for the Field Testing and Licensure of *Escherichia Coli* Vaccine, Live Culture」の最終稿 (参考資料 11) から危害分析に関する事項を抜粋し、邦訳したものである。

I. 要旨 (略)

II. 緒言

A. 動物用生物学的製剤の危害分析プロセス

米国農務省 動植物衛生検査局 (USDA APHIS) が実験用動物用生物学的製剤の輸送及び封じ込め解除申請を、9CFR 103.3 の規定の定めるところにより評価する際には、動物用生物学的製剤センターの危害分析プロセス (Center for Veterinary Biologics Risk Analysis Process) が使用されている。同プロセスに使用される危害分析は、動物用生物学的製剤向けにデザインされたもので、動物、公衆衛生及び環境に対する危害を評価するための多要因アプローチ (multi-factorial approach) である。危害分析は、危害に対する評価を含む。危害の定義には標準的な定義、すなわち「危害とは、有害事象の発生確率、ならびに有害事象が発生した場合の影響度をいう」を使用する。広範囲の科学的解析、相互評価、審査過程の公示及び文書化が必要とされる。このアプローチは、一般的な危害分析の実施基準と一致する。

動物用生物学的製剤の危害分析では、ワクチン株の特性及び研究実施環境に重点が置かれる。ワクチン株の安全性は、特定の経験的データ及び根拠のある科学的情報に基づいている。

B. 目的

この危害分析の目的は、実験用カテゴリ II の大腸菌生ワクチン (Category II, *Escherichia Coli* Vaccine, Live Culture) の環境放出に伴う安全性リスクを明らかにすることである。

本解析の目標は、以下の点を保証することである。

- 1) この実験用ワクチンを制御された試験で野外条件下で投与した場合に安全であること。
- 2) 本ワクチンのライセンス承認、一般流通及び販売を行っても安全であること。

Virus-Serum-Toxin Act (ウイルス・血清・毒素法、1913 年制定、1985 年改定) の規定により、USDA は動物用生物学的製剤が純粋、安全及び有効であり、かつ無価値、汚染、危険、または有害ではないことを保証しなければならない。

C. 提言 (略)

III. 遺伝子欠損微生物の特徴 (略)

IV. 危害分析

A. 有害事象の特性

有害事象の特定では、今回申請する *aroA*-大腸菌ワクチンの野外試験の実施に関連して動物、公衆衛生及び環境の安全に対して発生しうる全ての有害事象の特定を行う。

1. 動物の安全

今回申請する *Escherichia Coli* Vaccine, Live Culture, VS Code 1551.R0 の野外安全性試験の実施に伴い、動物の安全に対する懸念は生じない。本ワクチンは製造用原株から製造した。aroA-大腸菌 EC34195 株は、鶏及び豚に接種した場合に安全であることが明らかになっている。また、本ワクチンを対象に、FDAH によって 9CFR113.33 で述べるマウス安全試験が行なわれ、適合した。したがって、今回申請する本ワクチン株の放出により、動物の安全に影響を及ぼすような有害事象は発生しないと予想される。

2. 公衆衛生の安全

a. 要約

製造用原株の安全性は、ヒトでは未評価である。しかし、この栄養要求株を用いて、今回申請する *Escherichia Coli* Vaccine, Live Culture, VS Code 1551.R0 の野外安全性試験を実施した場合、公衆衛生に対する有害事象は発生しないと予想される。

ヒトへの曝露が発生した場合、弱毒化の原理はヒトでも有効に機能すると予想される。

b. ヒトへの曝露確率

本ワクチンに曝露されるヒトは家禽へのワクチン投与の担当者に限定される。また、散霧は密閉型のキャビネット内で実施する予定であるため、ワクチンへの曝露は最小限と予想される。さらに、投与鶏の体内及び環境中でのワクチン株の複製は限定的であったこと、投与鶏と接触可能な同居鶏群でワクチン株が検出されなかったことは、ワクチンが環境中に拡散する潜在能力には限度があることを示している。したがって、ワクチンのヒトへの曝露は最小限といえる。

c. 親株のヒトにおける病原性

親株である野生型大腸菌は鶏の敗血症例から分離された。ヒトにおける親株の病原性は不明である。

d. ワクチン株のヒトにおける病原性

「aroA 遺伝子欠損変異体 (aroA deletion mutants)」をテーマとして MEDLINE 検索を実施したところ、aroA 遺伝子欠損変異体のヒトへの曝露に関する情報を含む研究が 2 件発表されていることが明らかになった。MEDLINE に登録されているこの 2 報告の要旨を以下に示す。

- i) (Stocker BA. Auxotrophic *Salmonella typhi* as live vaccine. Vaccine 1988;6:141-145.)
「*Salmonella typhi* 541Ty は、aroA 及び purA 遺伝子を欠損している芳香族代謝物質 (p-アミノベンゾエートなど) 及びアデニン要求株である。志願者 36 例に 541Ty またはその Vi 陰性変異体 543Ty (10⁸ ~ 10¹⁰個) を経口投与したところ、副反応を示した志願者はなかった。また、全志願者で細胞性免疫応答の証拠が得られたが、血清抗体価が上昇した志願者は数例にすぎなかった。S. typhimurium を用いた実験 (Wellcome Research Laboratories 及びスタンフォード大学で実施) からは、アデニン要求性が、マウス組織中における菌体生存率及び生ワクチンの有効性の両方を低下させる可能性があることが明

らかになっている。芳香環生合成経路の阻害のみにより弱毒化した *S. typhi* は、経口生ワクチンとしての効果が、アデニン要求株より高いと考えられる。」

- ii) (Levine MM, Herrington D, Murphy JR, Morris JG, Losonsky G, Tall B, Lindberg AA, Svenson S, Baqar S, Edwards MF, et al. Safety, infectivity, immunogenicity, and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in humans. J Clin Invest 1987;79:888-902.)
- 「2種類の *Salmonella typhi* 変異体 [*p*-アミノベンゾエート及びアデニン要求株である 541Ty (Vi+) 及び 543Ty (Vi-)] を、経口生ワクチンとして評価した。志願者 33 例にワクチン株 10^8 、 10^9 及び 10^{10} 個を単回経口投与し、その他 4 例にワクチン株 2×10^9 個を 4 日間隔で 2 回投与した。副反応は観察されなかった。糞便培養及び十二指腸カプセル法で採取した検体の培養からワクチン株が回収された志願者は、それぞれ 37 例中 29 例 (78%) 及び 2 例であった。血液培養を繰り返したが、ワクチン株は回収されなかった。*S. typhi* O、H、Vi 及び溶解抗原に対する血清中及び腸液中の液性抗体反応はわずかであった。これに対し、全被投与者とも細胞性免疫反応を示した。ワクチン投与後、全被投与者の 69% 及びワクチン株 10^9 個以上を投与された被投与者の 89% が、リンパ球増殖試験において *S. typhi* 粒子または精製 O 多糖抗原に反応したが、他の *Salmonella* または *Escherichia coli* の抗原には反応しなかった。ワクチン投与後、全志願者で、単核球による血漿依存的な野生型 *S. typhi* の有意な阻害が認められた。」

しかし、製造用原株は、ヒトでは未評価である。したがって、同株のヒトにおける病原性は不明である。*aroA* の変異により芳香族代謝物質の要求性が生じるが、芳香族代謝物質はヒトを含む脊椎動物の組織中に存在しないため、哺乳類体内における複製能は確実に低い。

e. ヒトへの曝露により生じうる影響

製造用原株がヒトに接種されたことはない。ヒトへの偶発的曝露により実際にどのような影響が生じるのかは不明である。しかし、*aroA* に変異を来たした *aroA*- 大腸菌 EC34195 株の生物学的特性から考えて、ヒトへの曝露により安全上の懸念が生じるとは予想されない。*aroA* の変異により、哺乳類組織中の複製能は確実に低下している。

3. 環境の安全

Escherichia Coli Vaccine, Live Culture, VS Code 1551.R0 の野外安全性試験に使用するワクチンは、製造用原株から調製する予定である。製造用原株は、鶏を飼育している施設ではどこにでも存在する大腸菌と類似した野生型大腸菌を用いて作製した。ワクチン株は、野生型親株に新たな遺伝物質が導入されたものではない。したがって、このワクチンが環境中に導入された場合、新たな遺伝コードが環境中に導入されることはない。実際、ワクチン株は機能的に重要な代謝経路を欠損しているため、ワクチン株を直接投与する鶏以外の生物への導入は無視できる程度である。ワクチン株は、(*aroA*- *Salmonella* 株と同様) 栄養を人為的に供給しなければ、複製が持続しないことが実証されているため、表現型または遺伝子に変異が生じる可能性はほとんどない。各種実験動物を用いて実験室で実施した実験からは、ワクチン株の自然界における複製能がきわめて低いこと、また、理想的な条件下で、継代時に栄養を供給し、通常のワクチン製造で承認されている最高継代数を超えて継代を行った場合でも、表現型が安定

であることが裏づけられている。

今回申請する本ワクチンの野外試験を実施することにより、環境の安全に対する懸念は生じない。ワクチン株の偶発的放出が万一生じた場合にも、環境に対する有害事象は発生しないと予想される。

B. 放出のアセスメント

1. 試験実施孵化場の所在地

試験を実施予定の孵化場の識別情報及び所在地はすでに決定している。野外安全性試験は、1 試験協力者につき 1 孵化場のみで実施する。孵化場の識別情報は、野外安全性試験のスケジュール設定時点で、各試験協力者のみが確認することができる。

2. 試験実施養鶏場の所在地

試験を実施予定の養鶏場の識別情報及び所在地はすでに決定している。野外安全性試験は、1 試験協力者につき 1 養鶏場のみで実施する。養鶏場の識別情報は、野外安全性試験のスケジュール設定時点で、各試験協力者のみが確認することができる。

3. 試験実施施設の特性

試験実施施設は、典型的な飼育方法により管理されている大規模な商業孵化場及び養鶏場とする。

4. 試験担当者

試験依頼者

Fort Dodge Animal Health
800 5th Street N.W.
Fort Dodge, Iowa 50501

試験モニター

【個人情報につき非開示】

5. 試験デザイン

a. 供試動物数

1 孵化場（または鶏舎）につき 2,000 羽以上

b. 供試動物の廃棄

養鶏場において現行で行われている方法

c. 投与経路

初生時に散霧投与

d. 用量

散霧投与に関する指示に従い、適当量にワクチンを溶解

- e. 被験ワクチンの総投与量
1 孵化場（または鶏舎）あたり 2,000 ドース以上
- f. 曝露頻度及び期間
初生時に 1 羽分を投与
- g. 廃棄物の処理方法
試験実施施設における廃棄物の処理方法は、各養鶏場の慣例に従う。
- h. 試験実施施設の除染
試験実施施設の除染方法は、各養鶏場の慣例に従う。

6. 環境への放出・拡散可能性

ワクチン株の分子的及び生物学的特性から、芳香族代謝物質が存在しない条件における生存能は限定されているため、ワクチン株が環境中に放出・拡散し定着する可能性は低い。鶏の運搬中に媒介物を介してワクチン株が拡散したとしても、環境中に放出されて定着する見込みは全くなさそうである。

7. 環境中に定着する可能性

ワクチン株の分子的及び生物学的特性から考えて、ワクチン株の環境中への定着が生じる見込みはない。さらに、*aroA* 変異によっても環境中での複製能が確実に低下していると考えられる。

8. モニタリング

USDA により承認された野外試験実施計画書に従い、観察を行う予定である。

9. 有害事象が発生した場合の危機管理計画

試験期間中に発生した有害事象のいずれも、試験責任者のほか USDA にも直ちに通知する予定である。他の動物、人員または環境に重大な危険があると判断した場合には、その区域を「立ち入り禁止」とする。*aroA*-大腸菌 EC34195 株の抗生物質感受性は確認されている。そのため、抗生物質療法を迅速かつ有効に使用することにより、ヒトへの望ましくない曝露による有害な影響を低減することができる。

C. リスクの検討

1. 病原性復帰の可能性に関するリスクの検討

a. 発生確率の評価

動物の安全、公衆衛生の安全及び環境の安全に対するリスクの発生確率は、次の基準に基づき評価する。

低 = 有害事象が起こりそうにない

中 = 有害事象が起こる可能性がある

高 = 有害事象が起こる可能性が高い

aroA-大腸菌 EC34195 株の病原性が復帰する確率は、「低 = 有害事象が起こりそうにない」と評

価される。

このような評価となった理由は、本アセスメント中で幾度となく主張している。遺伝子欠損の特性について論じた III.A.2.において、a.では *aroA* 遺伝子の欠損について説明している。*aroA*-大腸菌 EC34195 株は、5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthetase をコードする *aroA* 遺伝子が部位特異的に欠損している。このことは、*aroA*-大腸菌 EC34195 株が、組換えにより他所から遺伝子を取得しなければならないらしいことを意味する。*aroA*-大腸菌 EC34195 株が強毒株に転換する機会は実質的に 0 である。

b. 影響度の評価

動物の安全、公衆衛生の安全及び環境の安全に対する影響度も、次の基準に基づき評価する。

低 = 有害事象が発生した場合の影響が小さい

(有害事象が自然に消失し、その影響がごくわずかである場合)

中 = 有害事象が発生した場合の影響が中程度である

(有害事象は影響を及ぼすが、永続的でなく対処可能である場合)

高 = 有害事象が発生した場合の影響が大きい

(有害事象が影響を及ぼし、永続的かつ対処不可能である場合)

aroA-大腸菌 EC34195 株の病原性復帰が発生した場合の影響度は、「低 = 有害事象が発生した場合の影響が小さい (有害事象が自然に消失し、その影響がごくわずかである場合)」と評価される。

現在、大腸菌症の最も有効な抑制方法は、抗生物質の予防的使用である。しかし、この結果、野生型大腸菌集団が高レベルの抗生物質抵抗性を獲得し、環境中における抵抗性株の占有率が上昇している。*aroA*-大腸菌 EC34195 株が病原性復帰したとしても、その地域に生息している内在性大腸菌より病原性が高いとは考えられない。病原性復帰したワクチン株が動物に感染した場合、野生型菌株に感染した場合よりも悪化することはないと考えられる。ワクチン株の抗生物質感受性プロファイルはすでに実際に確認されており、感染動物に迅速な獣医学的治療を施すことができる。

c. 確度の評価

確率及び影響度の各評価は、次の基準に基づく確度評価により調整する。

確実 = 評価が科学的根拠により直接裏づけられている。

やや確実 = 評価が科学的根拠により間接的に裏づけられている。

不確実 = 評価が科学的根拠により裏づけられていない。

aroA-大腸菌 EC34195 株の病原性が復帰する可能性の確度は、「確実 = 評価が科学的根拠により直接裏づけられている」と評価される。

aroA-大腸菌 EC34195 株は、病原性復帰、排出及び伝播の能力について評価されている。同居対照群からは、いずれの継代からも *aroA*-大腸菌 EC34195 株が回収されなかったことから、*aroA*-大腸菌 EC34195 株は隣接鶏に伝播しなかったと考えられる。プールした懸濁液中の *aroA*-大腸菌 EC34195 株の生菌数も、初代継代から第 3 代継代にかけて上昇を示さなかった。

上記に加え、試験期間中、*aroA*-大腸菌 EC34195 株投与に起因する死亡は発生しなかったことから、*aroA*-大腸菌 EC34195 株を鶏生体で 3 代継代しても、病原性復帰しなかったという結論

に達した。(2002年10月28日にCVBに提出した「鶏用大腸菌弱毒化生ワクチンの病原性復帰否定試験(Reversion to Virulence Study of Modified Live *Escherichia coli* Vaccine for Use in Chickens)」と題する報告書)

d. 病原性復帰の可能性に関して予想されるリスクの算出

病原性復帰の可能性に関して予想されるリスクは、以上の情報から算出することができる。動物用生物学的製剤の危害分析において予想されるリスク(Gay, C.G. & Orr, R.L., 1994)を算出する際には、次の情報を用いて算出する。

発生確率「低」 LL = 1.00

影響度「低」 CL = 1.00

確度評価II(確度評価Iは発生確率が中程度または高度と判定され、かつ影響度が中程度または高度と判定された場合にのみ使用する)

確度 C = 1.00

予想されるリスク = [(発生確率) x (確度)] x [(影響度) x (確度)]

(1.00 x 1.00) x (1.00 x 1.00) = 1.00

したがって、予想されるリスクは1.00と算出される。

e. リスクの評価

リスク評価は、動物用生物学的製剤の危害分析において予想されるリスク(Gay, C.G. & Orr, R.L., 1994)を参考にして決定する。予想されるリスクが1.00であることから、リスク評価は次のようになる。

低 = 許容できるリスク(訳者注:影響度はごくわずかで発生確率も非常に低い)

申請により生じる懸念がきわめて低い(申請を却下する根拠がない)

2. 環境への排泄・拡散可能性に関するリスクの検討

a. 発生確率の評価

動物の安全、公衆衛生の安全及び環境の安全に対するリスクの発生確率は、次の基準に基づき評価する。

低 = 有害事象が起こりそうにない

中 = 有害事象が起こる可能性がある

高 = 有害事象が起こる可能性が高い

aroA-大腸菌 EC34195株が環境中に放出・拡散する確率は、「低 = 有害事象が起こりそうにない」と評価される。

製造用原株について説明した第2項には、FDAHが実施した排出/伝播に関する試験において、ワクチン株がワクチン投与鶏からワクチン未投与の隣接鶏に伝播しなかったことを示した。FDAHは現在、*aroA*-大腸菌 EC34195株を用いた大腸菌生ワクチンの開発を行っている。ワクチン株が投与鶏から排出されたとしても、*aroA*の変異により芳香族化合物要求性となっており、芳香族化合物[チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、*p*-アミノベンゾエート(PABA:パラアミノ安息香酸)及び2,3-ジヒドロキシベンゾエート(DHBA)]が供給されない限り増殖できないため、環境中に残存する見込みはないと考えられる。

ワクチン株は染色体 DNA に変異を有するため、環境中では自由に利用できない必須芳香族化合物が供給されない限り増殖できないことから、ワクチン株が想定外に放出されたとしても、環境中で生存・拡散はしないと考えられる。

b. 影響度の評価

動物の安全、公衆衛生の安全及び環境の安全に対する影響度も、次の基準に基づき評価する。

低 = 有害事象が発生した場合の影響が小さい

(有害事象が自然に消失し、その影響がごくわずかである場合)

中 = 有害事象が発生した場合の影響が中程度である

(有害事象は影響を及ぼすが、永続的でなく対処可能である場合)

高 = 有害事象が発生した場合の影響が大きい

(有害事象が影響を及ぼし、永続的かつ対処不可能である場合)

aroA-大腸菌 EC34195 株の環境への排泄・拡散が発生した場合の影響度は、「低 = 有害事象が発生した場合の影響が小さい(有害事象が自然に消失し、その影響がごくわずかである場合)」と評価される。

影響度を「低」とした理由は、上記の発生確率に関する項に示している。*aroA*-大腸菌 EC34195 株が環境中に放出・拡散したとしても、この事象は自然に消失し、その影響はわずかであると考えられる。

c. 確度の評価

確度も、動物の安全、公衆衛生の安全及び環境の安全に関して、次の基準に基づき判定する。

確実 = 評価が科学的根拠により直接裏づけられている。

やや確実 = 評価が科学的根拠により間接的に裏づけられている。

不確実 = 評価が科学的根拠により裏づけられていない。

aroA-大腸菌 EC34195 株の環境への放出・拡散する可能性がないことについての確度は、「確実 = 評価が科学的根拠により直接裏づけられている」と評価される。

aroA-大腸菌 EC34195 株は、過失による過量投与、ワクチンバイアルの破損、またはこれらと類似した事故により環境中に放出される可能性がある。しかし、酵素経路が変異しているため、環境中に拡散することはない。環境中に拡散するためには、病原性が復帰する必要があると考えられる。この事象が発生する見込みがないという科学的根拠については、III.B.2.d で論じている。*aroA* 遺伝子の欠損は部位特異的であるため、*aroA*-大腸菌 EC34195 株が親株に復帰する可能性は実質的に 0 である。

d. 環境への放出・拡散可能性に関して予想されるリスクの算出

環境への放出・拡散する可能性に関して予想されるリスクは、上記の情報から算出することができる。動物用生物学的製剤の危害分析において予想されるリスク (Gay, C.G. & Orr, R.L., 1994) を算出する際には、次の情報を用いて算出する。

発生確率「低」 LL = 1.00

影響度「低」 CL = 1.00

確度評価 II (確度評価 I は発生確率が中程度または高度と判定され、かつ影響度が中程度または高度と判定された場合にのみ使用する)。

確度 C = 1.00

予想されるリスク = [(発生確率) x (確度)] x [(影響度) x (確度)]

(1.00 x 1.00) x (1.00 x 1.00) = 1.00

したがって、予想されるリスクは 1.00 と算出される。

e. リスクの評価

リスク評価は、動物用生物学的製剤の危害分析において予想されるリスク(Gay, C.G. & Orr, R.L., 1994) を参考にして決定する。予想されるリスクが 1.00 であることから、リスク評価は次のようになる。

低 = 許容できるリスク

申請により生じる懸念がきわめて低い (申請を却下する根拠がない)

3. 環境への定着可能性に関するリスクの検討

a. 発生確率の評価

動物の安全、公衆衛生の安全及び環境の安全に対するリスクの発生確率は、次の基準に基づき評価する。

低 = 有害事象が起こりそうにない

中 = 有害事象が起こる可能性がある

高 = 有害事象が起こる可能性が高い

aroA-大腸菌 EC34195 株が環境中に定着する確率は、「低 = 有害事象が起こりそうにない」と評価される。

ワクチン株が投与鶏から排出されたとしても、*aroA* 変異により芳香族化合物要求株となっており、芳香族化合物 (チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、PABA 及び DHBA) が供給されない限り増殖できないため、環境中に定着する可能性は低いと考えられる。

aroA-大腸菌 EC34195 株が環境中に定着する唯一の方法は病原性復帰であるが、この事象の発生確率はきわめて低い。*aroA*-大腸菌 EC34195 株が親株に復帰する確率は実質的に 0 である。

b. 影響度の評価

動物の安全、公衆衛生の安全及び環境の安全に対する影響度も、次の基準に基づき評価する。

低 = 有害事象が発生した場合の影響が小さい

(有害事象が自然に消失し、その影響がごくわずかである場合)

中 = 有害事象が発生した場合の影響が中程度である

(有害事象は影響を及ぼすが、永続的でなく対処可能である場合)

高 = 有害事象が発生した場合の影響が大きい

(有害事象が影響を及ぼし、永続的かつ対処不可能である場合)

aroA-大腸菌 EC34195 株の環境への定着が発生した場合の影響度は、「低 = 有害事象が発生した場合の影響が小さい (有害事象が自然に消失し、その影響がごくわずかである場合) 」と評価される。

大腸菌が環境中にすでに定着していることは、科学的根拠から示されている。環境中に定着している大腸菌と *aroA*-大腸菌 EC34195 株の違いは、*aroA*-大腸菌 EC34195 株の抗生物質感受性プロファイルがすでに確認されていること、*aroA*-大腸菌 EC34195 株が環境中に定着する見込みがなく、その影響はわずかであると考えられることである。

c. 確度の評価

確度も、動物の安全、公衆衛生の安全及び環境の安全に関して、次の基準に基づき評価する。

確実 = 評価が科学的根拠により直接裏づけられている。

やや確実 = 評価が科学的根拠により間接的に裏づけられている。

不確実 = 評価が科学的根拠により裏づけられていない。

aroA-大腸菌 EC34195 株の環境中に定着する可能性がないことの確度は、「確実 = 評価が科学的根拠により直接裏づけられている」と評価される。

aroA-大腸菌 EC34195 株が環境中に定着する唯一の方法は、病原性復帰である。この事象が発生する見込みがないという科学的根拠は、第 III.B.2.g 項で論じた。*aroA* 遺伝子の欠損は部位特異的であるため、*aroA*-大腸菌 EC34195 株が親株に復帰する可能性は実質的に 0 である。

d. 環境への定着可能性に関して予想されるリスクの算出

環境への定着可能性に関して予想されるリスクは、上記の情報から算出することができる。動物用生物学的製剤の危害分析において予想されるリスク (Gay, C.G. & Orr, R.L., 1994) を算出する際には、次の情報を用いて算出する。

発生確率「低」 LL = 1.00

影響度「低」 CL = 1.00

確度評価 II (確度評価 I は発生確率が中程度または高度と判定され、かつ影響度が中程度または高度と判定された場合にのみ使用する)。

確度 C = 1.00

予想されるリスク = [(発生確率) x (確度)] x [(影響度) x (確度)]

(1.00 x 1.00) x (1.00 x 1.00) = 1.00

したがって、予想されるリスクは 1.00 と算出される。

e. リスクの評価

リスク評価は、動物用生物学的製剤の危害分析において予想されるリスク (Gay, C.G. & Orr, R.L., 1994) を参考にして決定する。予想されるリスクが 1.00 であることから、リスク評価は次のようになる。

低 = 許容できるリスク

申請により生じる懸念がきわめて低い。

V. 危害管理に関する提言

A. 手順

危害管理には上記の項に示した情報を使用し、動物、公衆衛生または環境の安全に対する危害

を低減または排除する手段を決定する。

B. 提言

動物、公衆衛生または環境の安全に対する危害は低い。危害評価「低」とは、危害が受け入れ可能で、FDAHの大腸菌生ワクチンに関して今回申請する野外試験の実施と、その後のライセンス承認により生じる懸念がごくわずかであることを意味する。FDAHは、9 CFR 103.3の要件及び承認された試験実施計画書に従った野外試験実施の承認を要請する。

別紙 12 ポールバック *E. coli* の海外における承認状況及び販売高

承認状況：

本ワクチンは、米国、タイ、マレーシア及びフィリピンの 4 カ国において動物用医薬品として承認が取得されている。承認年月日及び販売量は表に示すとおり。

申請国	承認年月日	販売量 (ドース)*
米国	2006年4月	219,170,000
タイ	2008年2月	38,000,000
マレーシア	2009年8月	33,000,000
フィリピン	2010年3月	9,884,900

*: 承認後の販売量 (2012年4月現在)

カルタヘナ議定書の未締約国(米国)及び締約国(タイ、マレーシア、フィリピン)における承認審査過程：

Poulvac *E. coli* (ポールバック *E. coli* の海外における販売名) の開発は、フォートダッチアニマルヘルス社(現米国ゾエティス社) が米国農務省 動植物検疫局 (USDA APHIS) に申請することにより始まった。承認審査過程は、米国における新規動物用生物学的製剤の申請の一般的な流れに加えて、Veterinary Service Memorandum (VSM) No. 800.205 (獣医便宜覚書：<http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb>) において定められているガイドライン上のバイオテクノロジー由来動物用生物学的製剤のカテゴリーII (遺伝子欠損生ワクチン) に沿って進行し、2006年4月に承認された。

米国はカルタヘナ議定書の締約国ではないが、GMO (genetically modified organisms) に該当する全ての製剤は USDA の公式の危害分析 (Veterinary Risk Assessment) を行うことが義務付けられている。危害分析は、申請者と USDA APHIS による相互評価の方式で行われる。バイオテクノロジー由来動物用生物学的製剤では、野外試験の実施の許可に先立ち、その分子のあるいは生物学的特徴が明らかにされ、動物、公衆衛生、環境に対する危険性が低い (安全上の懸念がごくわずか) ことが危害分析を含んだ Summary Information Format (SIF) において示される。Poulvac *E. coli* についても、危害分析によって、野外試験 (field trial) の実施と、承認後の野外使用により生じる動物、公衆衛生、環境に対する動物、公衆衛生、環境に対する危険性が低い (安全上の懸念がごくわずか) と評価された。

カルタヘナ議定書の締約国であるタイ、マレーシア及びフィリピンでは、承認申請の際に上記の危害分析を含む SIF を資料として提出した。遺伝子組換え生物 (living modified organism (LMO)) に関する要求やコメントは何らなかったと報告されている。

ただし、フィリピンでは、国内での野外試験の実施が承認要件とされるため、当局監視指導下で 5 箇所のコマーシャルブローラー農場において野外試験を実施した。タイ及びマレーシアでは、国内での野外試験の実施は承認要件とされていないこともあり、要求されなかった。

別紙 13 ポールバック *E. coli*の海外における副作用報告 (PV-Works より)

ファイザー株式会社が採用している PV-Works¹ (グローバルファーマコビジランス調査ソフト) により調査したところ、各国で供給されている Poulvac *E. coli* (注: ポールバック *E. coli*の海外における販売名) に対して、接種鶏、ヒト及びその他の動物に関する有害事象は 2007 年 1 月から 2012 年 4 月 25 日現在まで認められなかった。

¹ 世界各国から収集されたファイザー社アニマルヘルス製品に関する有害事象情報は、このデータベースに蓄積される。このデータベースから製品名や国名等で有害事象情報の検索が可能である。

別紙 14 *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の鶏における安全性・クリアランス・排菌及び拡散 (点眼投与)(海外試験)

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の安全性・クリアランス及び排菌・拡散について鶏に点眼投与することによって検討した。

試験方法：

1 日齢の鶏 50 羽に、*aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチン (ポールバック *E. coli*) を 1.0×10^9 CFU/羽以上ずつ 1 日齢の鶏に点眼投与し、ワクチンを投与していない鶏 25 羽と同居させた。

臨床徴候を観察し、剖検を定期的実施して肉眼的病変を観察した。ワクチン投与後 21 日まで総排泄腔、鼻腔及び鶏体内の器官のスワブ検体、ならびに環境サンプル (敷料、餌、飲用水) を経時的に採取し、ワクチン株の分離培養を行った。

成績：

臨床徴候及び剖検所見

観察期間中、ワクチン投与に起因した臨床徴候及び肉眼的病変は認められなかった。

鶏体内器官からのワクチン株の分離成績

ワクチン投与後 4 日に 1 羽のワクチン投与鶏の体内器官からワクチン株が分離された。同居鶏からはワクチン株は分離されなかった。

総排泄腔スワブからのワクチン株の分離

ワクチン投与鶏ではワクチン投与後 14 日まで総排泄腔スワブからワクチン株が分離された、同居鶏ではワクチン投与後 11 日まで総排泄腔スワブからワクチン株が分離された。

鼻腔からのワクチン株の分離

鼻腔からはワクチン投与鶏及び同居鶏で各 1 回ずつしかワクチン株が分離されなかった。

環境サンプルからのワクチン株の分離

敷料及び餌からワクチン投与後 21 日までワクチン株が分離され、飲用水からワクチン投与後 7 日まで分離された。

試験データについては社外秘のため非公開

別紙 15 *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の排菌及び環境中における生存期間（海外試験）

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株の排菌及び環境中における生存期間について、鶏に点眼投与または散霧投与することによって検討した。

試験方法：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチン（ポールバック *E. coli*）を 1 日齢の鶏 20 羽ずつに点眼投与または散霧投与した。

臨床徴候を毎日観察し、ワクチン投与後 42 日に供試した鶏を剖検し、肉眼的病変を観察した。総排泄腔スワブ及び環境サンプル（敷料、餌、飲用水）をワクチン投与後 42 日まで採取し、ワクチン株の分離培養を行った。

成績：

臨床徴候及び剖検所見

観察期間中、臨床徴候及び肉眼的病変は認められなかった。

総排泄腔スワブからのワクチン株の分離

ワクチンを点眼投与または散霧投与した鶏のいずれとも、ワクチン投与後 28 日までワクチン株が総排泄腔スワブから分離された。

環境サンプルからのワクチン株の分離

点眼投与した場合、ワクチン投与後 28 日までワクチン株が餌及び飲用水から分離された。散霧投与した場合、ワクチン投与後 35 日までワクチン株が敷料から分離された。

試験データについては社外秘のため非公開

別紙 16 ポールバック *E. coli* のモロッコにおける多施設臨床試験

出典：Mombarg, M. et al.: Safety and efficacy of an *aroA*-deleted live vaccine against avian colibacillosis in a multicentre field trial in broilers in Morocco. *Avian Pathology*, 43, 276–281. (2014)

目的：

aroA 遺伝子欠損鶏大腸菌 EC34195 株を主剤とする *aroA* 遺伝子欠損鶏大腸菌弱毒生ワクチン（ポールバック *E. coli*）を野外でブロイラー鶏に投与したときの安全性及び有効性を多施設臨床試験を実施することによって検討した。

試験方法：

モロッコ国内の 18 施設（15 農場）において治験を実施した。供試動物としてブロイラー鶏を用い、治験薬の投与は農場または孵化場において 1 日齢時に行った。ワクチン群の 112490 羽にポールバック *E. coli*（ 1.3×10^8 CFU/羽）を 1000 羽当たり 200～220 mL ずつ散霧投与し、対照群の 112476 羽については、農場で治験薬投与を実施した場合は、盲検化を目的としてミネラルウォーターをワクチン群と同様に投与し、孵化場で治験薬投与を実施した場合は、農場入荷時にワクチン群の鶏は十分乾燥し、対照群の鶏と区別できなくなることから、盲検化を目的としたミネラルウォーターの投与は実施しなかった。治験薬投与日からと畜場出荷日（37 日齢から 53 日齢）まで観察して安全性及び有効性を評価した。

表 1 試験設計

試験群	治験薬	投与経路	投与量	鶏羽数
ワクチン群	ポールバック <i>E. coli</i>	散霧投与	200～220 mL/1000 羽 (1.3×10^8 CFU/羽) ²⁾	112490
対照群	ミネラルウォーター または無投与 ¹⁾	散霧投与	200～220 mL/1000 羽	112476

1) 治験薬投与を農場で実施した場合、盲検化を目的として対照群にミネラルウォーターをワクチン群と同様に投与し、孵化場で実施した場合、農場入荷時にワクチン群の鶏は十分乾燥し、対照群の鶏と区別できなくなることから、対照群への投与は実施しなかった。

2) ポールバック *E. coli* を 1 羽分（約 0.2 mL）が 1.3×10^8 CFU となるようにミネラルウォーターで希釈して使用した。

安全性に関する項目のうち、1 日平均増体重、死亡率、飼料効率及び抗菌剤による治療日数は、ワクチン群と対照群の差の 95%信頼区間上限または下限について非劣性限界値（ α ；5%または-5%に設定）との比較で評価した。臨床観察及び死亡例の観察については、統計解析を行わなかった。

有効性に関する項目のうち、死亡率、1 日平均増体重、飼料効率、抗菌剤による治療日数、と畜場出荷率及びと畜場出荷時の鶏大腸菌症様病変陽性率は、一般化線形混合モデルによる群間比較によって評価した（水準=0.05）。臨床観察及び死亡例の観察については、統計解析を行わなかった。

成績：

安全性に関する項目

臨床観察及び死亡例の観察

ポールバック *E. coli* 投与に起因している可能性がある有害事象は認められなかった。

死亡率

治験薬投与日から14日間の死亡率の最小二乗平均値は、ワクチン群及び対照群とも1.48%であった。95%信頼区間は、ワクチン群で1.14 - 1.88、対照群で1.13 - 1.88であった。ワクチン群と対照群の差の95%信頼区間上限は非劣性限界値（ Δ ；5%に設定）を超えなかったことから、死亡率におけるポールバック *E. coli* 投与の非劣性が確認された。

1日平均増体重

治験薬投与日から14日間の1日平均増体重の最小二乗平均値は、ワクチン群で19.1g、対照群で18.9gであった。95%信頼区間は、ワクチン群で17.4 - 20.9、対照群で17.2 - 20.7であった。ワクチン群と対照群の差の95%信頼区間下限は非劣性限界値（ Δ ；-5%に設定）を超えなかったことから、1日平均増体重におけるポールバック *E. coli* 投与の非劣性が確認された。

飼料効率

治験薬投与日から14日間の飼料効率の最小二乗平均値は、ワクチン群で2.14、対照群で2.20であった。95%信頼区間は、ワクチン群で1.78 - 2.50、対照群で1.83 - 2.56であった。ワクチン群と対照群の差の95%信頼区間上限は非劣性限界値（ Δ ；5%に設定）を超え、飼料効率におけるポールバック *E. coli* 投与の非劣性が確認されなかった。

有効性に関する項目

死亡率

治験薬投与日からと畜場出荷日の死亡率の最小二乗平均値は、ワクチン群で9.3%、対照群で10.3%であり、両試験群間に有意差が認められた（ $p=0.0203$ ）（表2）。

1日平均増体重

治験薬投与日からと畜場出荷日の1日平均増体重の最小二乗平均値は、ワクチン群で47.8g、対照群で46.2gであり、両試験群間に有意差が認められた（ $p=0.0006$ ）（表2）。

表2 有効性評価結果（死亡率及び1日平均増体重）

施設番号 ¹⁾	鶏羽数 (治験開始時)		死亡率(%)		1日平均増体重(g/日)	
	V	C	V	C	V	C
1	5999	6002	9.6	11.0	48.9	48.1
3	8000	8000	4.6	6.6	52.5	51.7
5	6000	6000	2.3	2.1	58.4	54.0
6	6000	6000	16.4	18.2	38.5	37.1
7	6504	6502	5.1	7.2	48.5	46.7
8	6502	6494	9.9	11.4	48.1	47.0
9	5000	5000	5.9	6.9	51.5	47.8
10	5000	5000	20.7	20.6	40.8	39.8
11	5000	5000	22.4	22.2	42.1	39.6
12	4998	5003	5.9	5.9	43.5	42.6
13	8000	8000	28.4	28.9	45.8	45.1
14-1	5001	4991	6.0	10.1	46.8	45.1
14-2	7006	7004	9.0	10.8	45.5	43.8
15-1	6240	6240	5.6	4.2	n.a.	n.a.
15-2	6240	6240	3.2	4.3	n.a.	n.a.
16-1	8000	8000	9.3	8.1	51.1	51.0
16-2	8000	8000	5.8	5.9	50.6	52.0
17	5000	5000	5.2	7.6	53.9	51.6
最小二乗平均値 (95%信頼区間)			9.3* (5.9 - 13.5)	10.3 (6.7 - 14.6)	47.8* (44.8 - 50.9)	46.2 (43.2 - 49.3)

V: ワクチン群, C: 対照群, n.a.: 記録の不備のため有効性評価から除外

1) 各施設には対を成す鶏舎が有り、ワクチン群及び対照群を各鶏舎に割当てた。

* 対照群との比較で有意差が認められた (p = 0.05)。

飼料効率

治験薬投与日からと畜場出荷日の飼料効率の最小二乗平均値は、ワクチン群で 2.18、対照群で 2.22 であり、両試験群間に有意差は認められなかった (p=0.1856) (表 3)。

抗菌剤による治療日数

抗菌剤による治療はワクチン投与後 15 日以降に行われたことから、ワクチン後 15 日からと畜場出荷時までの治療日数のみ評価した。当該期間の治療日数の最小二乗平均値は、ワクチン群で 0.5 日、対照群で 2.0 日であり、両試験群間に有意差が認められた (p=0.0008) (表 3)。

と畜場出荷率

と畜場出荷率の最小二乗平均値は、ワクチン群で 90.0%、対照群で 89.0% であり、両試験群間に有意差が認められた (p=0.0309)。

鶏大腸菌症様病変陽性率

と畜場出荷時の鶏大腸菌症様病変スコアの最小二乗平均値は、ワクチン群で 1.7%、対照群で 3.5% であり、両試験群間に有意差が認められた (p=0.0054) (表 3)。

表 3 有効性評価結果（飼料効率、抗菌剤による治療日数及び鶏大腸菌症様病変陽性率）

施設番号 ¹⁾	飼料効率 (kg/kg)		抗菌剤による治療日数		鶏大腸菌症様病変陽性率(%)	
	V	C	V	C	V	C
1	2.03	2.07	2	3	9.5	6.2
3	1.95	1.96	0	3	1.2	3.8
5	1.45	1.46	0	0	0.7	5.1
6	3.04	3.08	1	3	2.9	3.0
7	1.74	1.75	0	2	0.9	2.0
8	1.91	1.86	1	1	0.8	2.9
9	2.25	2.42	1	1	5.2	2.2
10	3.16	3.36	0	2	0.4	2.0
11	3.18	3.13	0	4	0.7	2.3
12	2.05	2.15	0	0	0.6	3.8
13	2.50	2.33	0	0	1.8	3.6
14-1	1.70	1.91	0	1	1.4	4.8
14-2	1.74	2.03	1	1	0.6	4.2
15-1	n.a.	n.a.	0	4	n.a.	n.a.
15-2	n.a.	n.a.	0	4	n.a.	n.a.
16-1	1.96	1.97	0	0	1.8	3.3
16-2	1.80	1.71	4	4	1.6	3.7
17	1.70	1.74	0	3	2.1	5.9
最小二乗平均値 (95%信頼区間)	2.18 (1.85 - 2.51)	2.22 (1.89 - 2.55)	0.5* (-0.2 - 1.3)	2.0 (1.3 - 2.7)	1.7* (1.0 - 2.6)	3.5 (2.5 - 4.7)

V: ワクチン群, C: 対照群, n.a.: 記録の不備のため有効性評価から除外

1) 各施設には対を成す鶏舎が有り、ワクチン群及び対照群を各鶏舎に割当てた。

* 対照群との比較で有意差が認められた (p < 0.05)。

臨床観察及び死亡例の観察

臨床観察及び死亡例の観察から、施設 5、10、11、13、17 を除いた施設において、少なくとも 1 時点で大腸菌症の発生が疑われた。大腸菌は 9 施設において分離され、大腸菌同定後に血清型を判定した 8 施設由来の 13 例の血清型を表 4 に示した。

その他の臨床上の異常として、コクシジウム症（施設 10 及び 11）、ガンボ口病（施設 6 及び 17）、死亡を伴う重度の高温によるストレス（施設 10、11、13；室温が 40℃を超えた）及び原因不明の消化器症状（施設 9 及び 10）が報告された。

表 4 分離された大腸菌の血清型

施設	採材した鶏の日齢	試験群	血清型
1	29	対照群	O78 型別不能
3	26	ワクチン群	O78 O135 型別不能
3	26	対照群	型別不能
6	13	ワクチン群	O1 O135
7	34	ワクチン群	型別不能
7	34	対照群	O78 型別不能
8	35	対照群	O78 O118 型別不能
9	20	ワクチン群	O78
9	20	対照群	O78
14-2	35	対照群	O1 O118
16-1	43	ワクチン群	O78
16-1	43	対照群	O78 型別不能
16-2	37	ワクチン群	O78

まとめ及び考察：

安全性に関して、ポールバック *E. coli* 投与に起因した有害事象は認められず、また、1日平均増体重及び死亡率に関してポールバック *E. coli* 投与の非劣性が確認されたことから、初生ブロイラー鶏へのポールバック *E. coli* 投与の安全性が確認された。

飼料効率については非劣性が確認できなかった。これは若齢期の鶏では数日おきにしか飼料が給餌されていないため、ワクチン投与から2週間の飼料効率の推定値には農場間で大きな変動があったことによる。

有効性に関して、ポールバック *E. coli* 投与により、と畜場出荷時の鶏大腸菌症様病変陽性率、1日平均増体重、抗菌剤による治療日数、と畜場出荷率及び死亡率において有意差が認められ、ポールバック *E. coli* 投与により鶏大腸菌症が軽減されることが確認された。

以上のことから、ポールバック *E. coli* の野外使用に対する安全性及び有効性が確認された。