第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 11 月 27 日

農林水産大臣　　森山　裕　殿
環境大臣　　大塚　珠代　殿

メリアル・ジャパン株式会社
代表取締役　永田　正
東京都新宿区西新宿三丁目 20 番 2 号

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHVT013-69 株 （IBDV *VP2, Meleagrid herpesvirus 1*）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	① 運搬及び保管（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の運搬及び保管を含む） ② 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号。以下「医薬品医療機器等法」という。）の第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験（以下「治験」という。）に該当する場合は、同法第 80 条の 2 第 2 項に基づき届け出る治験計画届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年農林水産省令第 75 号）第 7 条に基づき作成する治験実施計画書に従った使用 ③ 医薬品医療機器等法第 14 条第 1 項に基づく承認申請書に従った使用（④に該当する行為は除く） ④ 接種（鶏への接種） ⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残渣の廃棄 ⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄に伴う場合を含む） ⑦ ①～⑥に付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	－

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2 蛋白発現遺伝子導入
七面鳥ヘルペスウイルス vHVT013-69 株

生物多様性影響評価書

メリアル・ジャパン株式会社

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来VP2蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHVT013-69株 の 生物多様性影響評価書

目次

I　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 1
1　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 1
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布情報 1
(2) 使用等の歴史及び現状 1
(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性 1
イ　基本的特性 1
ロ　生息又は生育（増殖）可能な環境の条件 2
ハ　捕食性又は寄生性 3
ニ　繁殖又は増殖の様式 3
ホ　病原性 4
ヘ　有害物質の産生性 5
ト　その他の情報 5
2　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 6
(1) 供与核酸に関する情報 6
イ　構成及び構成要素の由来 6
ロ　構成要素の機能 17
(2) ベクターに関する情報 18
イ　名称及び由来 18
ロ　特性 20
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 23
イ　宿主内に移入された核酸全体の構成 23
ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法 24
ハ　遺伝子組換え生物等の育成の経過 25
(4) 細胞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 27
(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 28
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 28
3　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 31
(1) 使用等の内容 31
(2) 使用等の方法 32
(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 32

(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..... 32
(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環境での使用等の結果..... 32
(6) 国外における使用等に関する情報..... 33
(7) 接種動物体内における挙動に関する情報 33
II 項目ごとの生物多様性影響評価 39
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）..... 39
2 病原性（野生動植物等に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質）..... 39
3 有害物質の産生性（野生動植物の生息または生育に支障を及ぼす物質を産生する性質..... 40
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）..... 40
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）..... 41
III 生物多様性影響の総合的評価..... 42
参考文献 43

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情報

① 分類学上の位置・学名（属及び種）

学名：七面鳥ヘルペスウイルス１型（Meleagrid herpesvirus 1: MeHV-1）又は七面鳥ヘルペスウイルス（Herpesvirus of Turkey: HVT）

ヘルペスウイルス科（*Herpesviridae*）

アルファヘルペスウイルス亜科（*Alphaherpesvirinae*）

マルディウイルス属（*Mardivirus*）

② 宿主の同定の根拠となる事項

アメリカで七面鳥群から採取した血液検体から七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株が分離された（Witter R.L.ら、1970）（別紙 1）。FC126 株をさらに鶏胚細胞での継代を経て vHVT 株を作出した（別紙 2）。ゲノムは線状 2 本鎖 DNA で塩基数は約 165 kbp である（別紙 3）。

③ 宿主を誘導するために用いた遺伝的改変の内容

vHVT 株はアメリカで分離された七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株を培養細胞での継代のみ行った。

(2) 使用等の歴史及び現状

マレック病ウイルス（Marek's disease virus: MDV）には鶏ヘルペスウイルス 2 型（*Gallid herpesvirus 2*）及び鶏ヘルペスウイルス 3 型（*Gallid herpesvirus 3*）の 2 種類あり、それぞれ血清型 1（MDV1）及び血清型 2（MDV2）に分類される。MDV1 に属するウイルス株のみが腫瘍原性をもち、MDV2 は腫瘍原性をもたない（文献 17）。七面鳥ヘルペスウイルス 1 型（Herpesvirus of Turkey: HVT）は MDV と血清学的交差性を示し、血清型 3（MDV3）に分類される非病原性ウイルスである（文献 17）。HVT は MDV 感染に対して防御効果を示し、1970 年代に初めて実用化されたマレック病に対するワクチンで、現在も世界中で使用されている。vHVT 株は HVT FC126 株を起源とするが、HVT FC126 株はマレック病に対する生ワクチンとして一般的に使用され、日本においても市販されている（別紙 28）。米国では年間 50 億羽以上のブロイラーに接種されている。

(3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性

イ　基本的特性

HVT は七面鳥に普遍的に存在する非病原性ウイルスである（文献 2、17、18）。MDV と血清学的に交差性を示すことから、血清型 3（MDV3）に分類される。HVT は二本鎖 DNA ウイルスで約 99 の推定タンパク質をコードする。HVT（MDV3）のゲノム遺伝子構成は、MDV1 及び MDV2 と Unique Long（U_L）及び Unique Short（U_S）ゲノム領域において高い相同性を示し、またヒト単純ヘルペスウイルス 1 型

（human simple herpes virus type I; HSV-1）とも 57 の相同遺伝子を持つ（別紙 5）。野生の七面鳥以外では、HVT ワクチンの使用に伴い、鶏においても HVT がユビキタスに存在することは知られているが、それ以外の野生の鳥類における伝播についてはよく知られていない（文献 17）。一方、MDV は鶏を自然宿主とし、キジ目の七面鳥、ウズラ、コウライキジは MDV 感染に対して感受性が高いとされ（文献 17）、キジ目以外の野鳥であるマガンからも分離の報告がある（文献 3）。一方、アヒル、スズメ、ヤマウズラ、ハト及びクジャクは MDV 感染に対して抵抗性があると考えられている（文献 17）。また、HVT は鳥類のリンパ球にのみ指向性を示し（文献 17）、感受性のある動物はコウライキジ、ウズラなどの鳥類に限定されるが、七面鳥以外に対する自然感染率は低いと考えられ、霊長類を含む哺乳類では MDV の実験的な接種によっても感染しないことから、人を含め感染性はないと考えられている（文献 17）。また、HVT に他の微生物を減少させるような性質は報告されていない（文献 17）。

HVT は細胞随伴性ウイルスであるが、感染性をもつ細胞遊離型ウイルスは感染七面鳥の羽包上皮で産生されフケに内包される形で体外に排出される（文献 4）。伝播様式は感染性ウイルスを含有するフケを介する経気道感染であると考えられ、介卵（垂直）感染はない（文献 5）。フケが気道より侵入すると貪食細胞により取り込まれる。ウイルスはリンパ球指向性を示し、細胞に吸着後、エンベロープを細胞膜に融合させることによって細胞に侵入する（文献 6、7）。HVT の鶏への自然感染率は低いが、HVT を接種した鶏では体内に長期にわたり持続する（文献 7）。

マレック病はMDV1に起因する鶏の脚麻痺といった神経疾患や種々の組織及び臓器の悪性リンパ腫を主徴とする伝染性の高い疾病であり、養鶏場における著しい経済的被害の原因になっている。MDV1 ゲノムは腫瘍原性遺伝子が挿入されているが、HVT ゲノムにはなく（文献 8、21）、感染しても自然宿主である七面鳥にさえも臨床症状を呈さない。HVT を鶏に接種すると体内でウイルス血症を誘導し、MDV1 感染に対する抵抗性を付与していると考えられている（文献 17）。

ロ　生息又は生育（増殖）可能な環境の条件

鳥類の細胞は HVT に対して感受性があり、鶏胚細胞（CEF）、アヒル胚細胞（DEF）、七面鳥胚細胞（TEF）、コウライキジ胚細胞（PhEF）、ウズラ胚細胞（JQEF）、鶏腎細胞（CK）等で増殖することが知られている（文献 9）。HVT を CEF で増幅培養するには通常の細胞培養条件（38℃±2℃、5%CO_2）、及び MEM や F10 等の一般的な細胞増殖用培地を用い、培養後 3 日前後で採材可能である。HVT は哺乳類の培養細胞では増殖しない（文献 10、11）。宿主ウイルスである vHVT 株は DEF 及び CEF で培養して得られた（別紙 2）。vHVT 株は HVT FC126 株生ワクチンと同一の起源であり（別紙 1）、培養細胞での継代についても同等であるため、その増殖能力は同等と考えられる。

ヘルペスウイルスは、ウイルスの増殖が細胞核内で行われ、細胞の生存できる環境が必須であるため、浸透圧の低い水中では殆ど生存できないと考えられる。ヘルペスウイルスはエンベロープを有するウイルスで、逆性石鹸、2%グルタラール、次亜塩素酸ナトリウム、消毒用エタノール、70%イソプロパノール、ポビドンヨード等で不活化される（文献 19)。

ハ　捕食性又は寄生性

－

ニ　繁殖又は増殖の様式

①　宿主を誘導するために用いた遺伝的改変の内容

1（1）④に示す通り、継代培養のみ行った。

②　生存能力又は増殖能力

一般的に DEF、CEF 及び CK が HVT の分離及び継代に用いられる。その他、コウライキジやウズラ等、鳥類の胚細胞でも培養可能であったことが報告されている（文献 9)。数%の牛血清を含む MEM や F10 等の一般的な培地で、5%CO_2、38℃前後の通常の培養条件でよく増殖するが、哺乳類の培養細胞では増殖しない（文献 10、11)。

HVT は細胞随伴性ウイルスである。ウイルスが細胞に吸着後、エンベロープを細胞膜に融合させることによって細胞へ侵入する。リンパ球指向性を示し、全身の組織に運ばれ持続感染することから免疫が長期間持続する（文献 12、13、14)。感染性をもつ細胞遊離型ウイルスは感染七面鳥の羽包上皮で産生されフケに内包される形で体外に排出される（文献 4)。七面鳥を自然宿主として遍在するウイルスであり、七面鳥間で水平伝播し、垂直感染は認められない（文献 5)。HVT を接種した鶏の体内ではウイルスは長期にわたり持続するもののウイルスの排泄は稀である（文献 7)。MDV1 の伝播性は高く、鶏間の伝播は容易であるが（文献 15)、HVT の鶏への自然感染性は非常に低い（文献 7、18)。

③　生殖の様式及び交雑性

HVT は非病原性であるが、ウイルスの基本的動態は MDV と相同である。MDV の自然感染は感染性ウイルスを吸入することにより始まる。リンパ組織に侵入したウイルスは、感染初期には B 細胞、後に T 細胞で細胞溶解性に複製する。溶解性感染の後、主に活性化 $CD4^+$ T 細胞において潜伏感染し、増殖性 T 細胞性リンパ腫に形質転換する。ただし、HVT は MDV と異なり、meq に代表される腫瘍原性・形質転換に係る遺伝子配列を有さない（文献 8、21）ため、感染性ウイルス粒子は、感染リンパ球が羽包上皮細胞に移行し産

生され、フケに内包される形で環境中に排泄されることにより、感染源となり、環境中に維持される（文献 22)。

養鶏場ではマレック病予防のため、1970 年代から HVT 単味ワクチンが使用されていたが、1980 年代以降マレック病の病原性の増強に伴い、HVT と MDV2 を組み合わせた 2 価ワクチンが導入され、その後、弱毒 MDV1 生ワクチンも導入された（文献 22、23、24)。

アルファヘルペスウイルス間で組換えが生じるには遺伝子配列の相同性が必要で、同一の亜科ではその相同性が高いため *in vitro* だけでなく *in vivo* でも起こることがあるが、*in vivo* における発生率は *in vitro* より低い（文献 25)。また、最初に感染したウイルスによって次のウイルスの感染が抑制される、重感染の抑制についても多くの報告がある（文献 26、27、28)。近年、実験的に異なるウイルスを同時感染させた場合、重感染の抑制とともに、混合感染が起こりうることが報告された（文献 29、30)。ただし、種内での自然組換えが起こるには、ウイルス間に遺伝子レベルで有意な相同性があり、同一の宿主に感染した上で、同一の細胞に感染する必要があり、宿主側並びにウイルス側で様々な要因が関連するため、その頻度は限定的である。MD に対して多価ワクチンが一般的に使用されているが、HVT と他の MDV 血清型との間の *in vivo* における自然組換えは報告されていない（文献 1、15)。

また、MDV 以外のアルファヘルペスウイルス亜科に属する鳥類のウイルスとしてイルトウイルス属（*Iltovirus*）のトリヘルペスウイルス 1 型（Gallid herpesvirus 1; GaHV-1）がある。これは伝染性喉頭気管炎（ILT）の原因として知られている。遺伝子学的系統樹解析において GaHV-1 は HVT と近縁ではなく（文献 31)、また、HVT はリンパ球指向性を示すのに対し、GaHV-1 は主に呼吸器粘膜及び眼粘膜で増殖するため、重感染の機会はほとんどないと考えられる。野外では一般的に MD 及び ILT に対するワクチンが併用して使用されているが、これまで組換えによると考えられる問題は起こっていない。

ホ　病原性

vHVT 株は、アメリカで分離された七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株（別紙 2）由来のマレック病生ワクチン株と同じ起源である。親株 HVT FC126 株は、自然宿主であり分離された動物である七面鳥に対しても、同じ鳥類である鶏に対しても、感染性はあるが病原性を示さない（別紙 6)。哺乳動物に対しては体内で複製できないことから病原性はない（別紙 7 及び 8)。HVT FC126 株は鶏ヘルペスウイルスのマレック病ウイルスと交差性を示すことから、鶏に対する生ワクチン株として広く世界中で用いられている。

HVT は人、犬、牛、バブーン、ウサギ又は豚の腎臓細胞で増殖しない。文献的に検索した結果においても、主要な農林水産動物（牛、馬又は豚）に対する病原性については報告がない*。哺乳動物であるマウス（別紙 7）、モルモット（別紙 8）に対して HVT を接種しても病原性及び局所の所見も認められなかった。

*製造元における申請書記載内容並びに 2014 年 7 月以前の Medline（PubMed）による文献検索を実施。キーワード：Herpesvirus of turkey, pathogenicity, mammal

へ　有害物質の産生性

HVT は非病原性ウイルスとして知られており、有害な影響を及ぼす生理活性物質の産生性が認められるとの報告はない*。 vHVT は七面鳥分離株 FC126 株から継代培養のみ行っていることから、HVT の性状と同一であり、有害物質の産生性はない。

* 製造元における申請書記載内容並びに2014年7月以前の Medline（PubMed）による文献検索を実施。キーワード：VP2, Herpesvirus of turkey, avian, allergy

ト　その他の情報

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

①-1　供与核酸「*VP2*遺伝子発現カセット」の構成要素及びその由来は以下の通りである。

表1　伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 VP2蛋白発現遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHVT013-69株の作出に用いた供与核酸の各構成要素

供与核酸の名称：*VP2*遺伝子発現カセット（別紙3. 3.3～3.5）		
構成要素	サイズ	構成要素の由来
IBDV *VP2*遺伝子	1,405 bp	IBDV Faragher 52/70株に感染させたSPF鶏ファブリキウス嚢から抽出された IBDV ウイルス粒子を由来とする。
マウスサイトメガロウイルス(MCMV)-Immediate-early (IE)プロモーター	1,414 bp	マウスサイトメガロウイルス由来のIEプロモーター（プラスミドpAMB33に存在）。
SV40 poly A	218 bp	シミアンウイルス由来のポリアデニル化（poly A）配列（プラスミドpCMV β に存在）。

IBDV VP2遺伝子について

学名：ビルナウイルス科（Birnaviridae）、アビビルナウイルス属（Avibirnavirus）、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（Infectious bursal disease virus: IBDV）

株名：52/70 Faragher

配列：VP2 蛋白質コード遺伝子（1,405bp）

IBDV は鶏において伝染性ファブリキウス嚢病（ガンボロ病）を引き起こす原因となる。本ウイルスは感染鶏において、B リンパ球の分化に関与する器官であるファブリキウス嚢のリンパ組織を破壊することによって致死や免疫抑制を起こす。ウイルスゲノムは2本鎖 RNA の2つの断片から構成される（図1）。A 断片（3.1 kbp）はポリ蛋白質（N 末端 VP2-VP4-VP3 C 末端）をコードし、3つのウイルス蛋白質（VP2、VP3及び VP4）に開裂する。VP2及び VP3はカプシド蛋白質になる。B 断片（2.9 kbp）は、VP1（ポリメラーゼ）をコードする（Kibenge ら、1988、別紙9）。

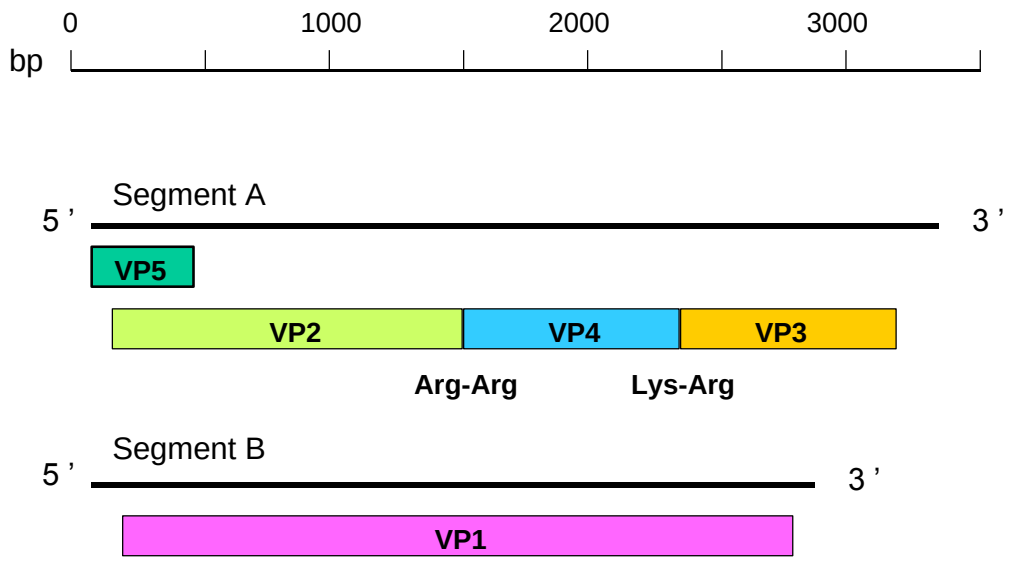


図1　IBDV ゲノム

①-2 プラスミド pEL070における供与核酸「*VP2*遺伝子発現カセット」とその制限酵素地図は以下の通りである。

「*VP2*遺伝子発現カセット」は MCMV IE プロモーター、IBDV *VP2*遺伝子及び SV40ポリアデニレーションシグナルから成る。プラスミド pEL070における「*VP2*発現カセット」の位置は図2の赤矢印で示した *Eco*RI-*Sal*I フラグメントであり、その制限酵素地図は図中に示した通りである。

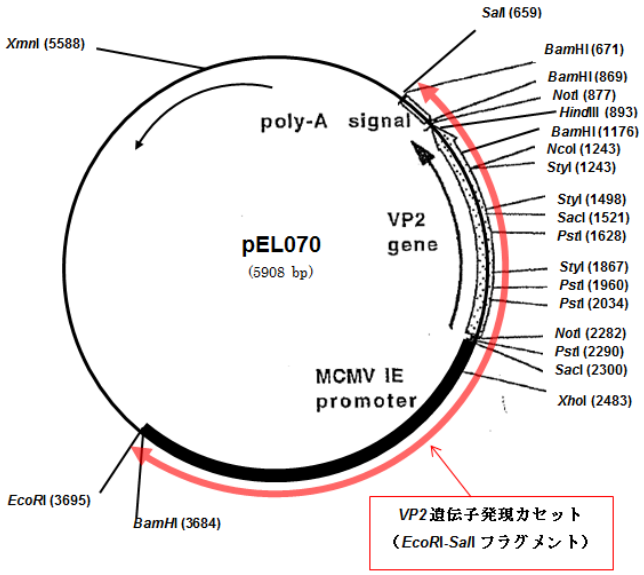


図 2　プラスミド pEL070 における供与核酸：*VP2* 遺伝子発現カセット

② -1　供与核酸の構造

供与核酸の塩基配列（3,037 bp）は、別紙 3 の Annex 5「遺伝子組換え体 vHVT013 の HVT *Bam*HI-I 領域の塩基配列」を参照。

② -2　供与核酸の調製

IBDV *VP2* 遺伝子のクローニング

a) cDNA の作製

IBDV Faragher 52/70 株を接種した SPF 鶏のファブリキウス嚢からウイルスを分離して、そのゲノム RNA を抽出した材料から cDNA を得た。

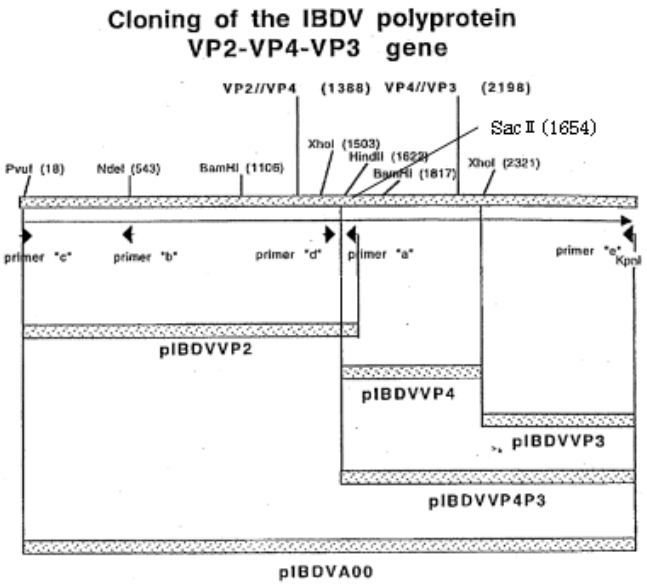


図 3　IBDV VP2-VP4-VP3 蛋白質をコードする配列のクローニング

b) 供与核酸「*VP2* 遺伝子発現カセット」の作製

b)-1　pEL024 の作製（供与核酸「*VP2* 遺伝子発現カセット」の VP2 の供給プラスミドを作製する過程）

cDNA を PCR により増幅し、カプシド蛋白質を含む IBDV の *VP2-VP4-VP3* 遺伝子配列を保持するクローン（図 8 の「pIBDVA00」に相当する部分）を作製した。このクローンをもとに、*VP2* 遺伝子の完全長 orf を含む断片（図 3 の「pIBDVVP2」に相当する部分）を、pBlueScriptII SK+にクローニングし、プラスミド「pEL024」とした（図 4）。

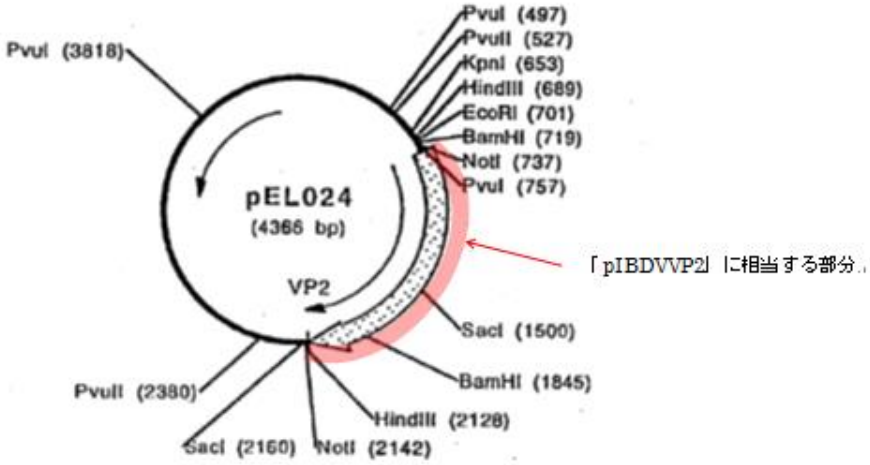
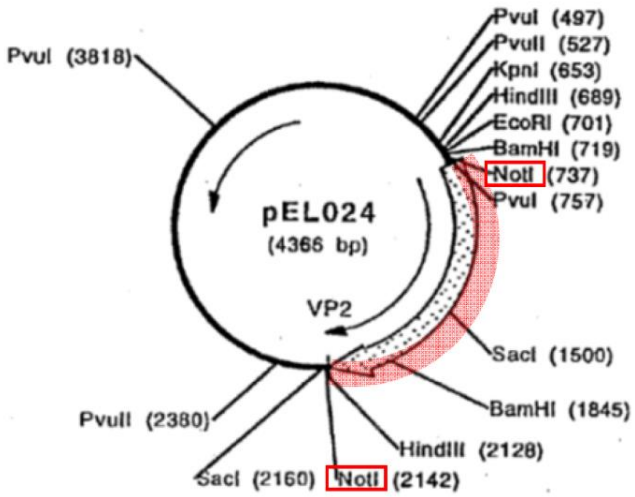


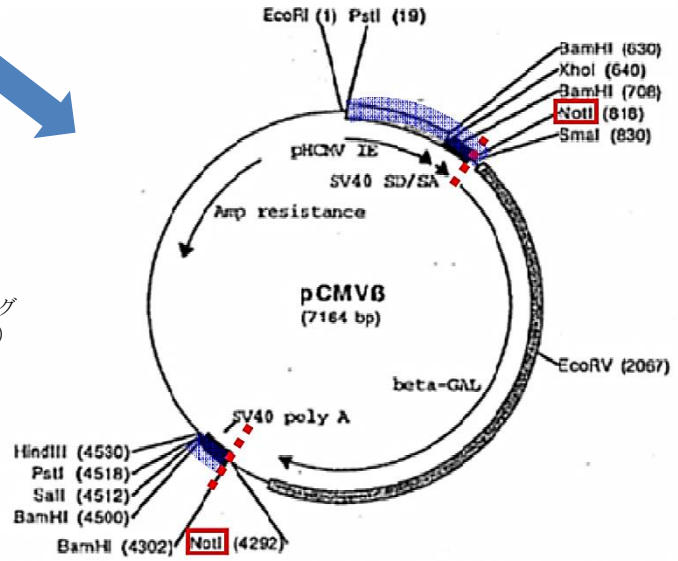
図 4　プラスミド pEL024

本配列については GenBank Accession Number D00869 として登録されている IBDV 52/70 株と不安定な 1 塩基を除いて同一であり、アミノ酸レベルでは変化していないことが確認されている。

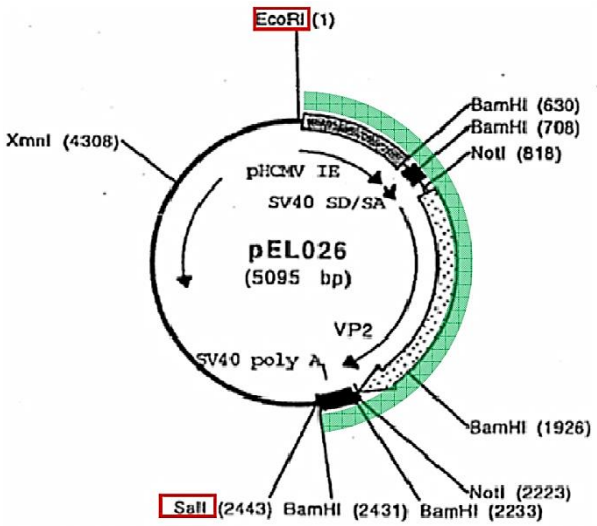
b)-2　pEL027 の作製（供与核酸「*VP2* 遺伝子発現カセット」の poly A の供給プラスミドを作製する過程）（図 5）

- pEL024 の *Not*I- *Not*I フラグメントを pCMVβ（*Not* I サイトで結合）に組み込み pEL026 を作製。
- pEL026 の *EcoR* I-*Sal* I フラグメントを pBlueScript II SK+に組み込み pEL027 を作製。

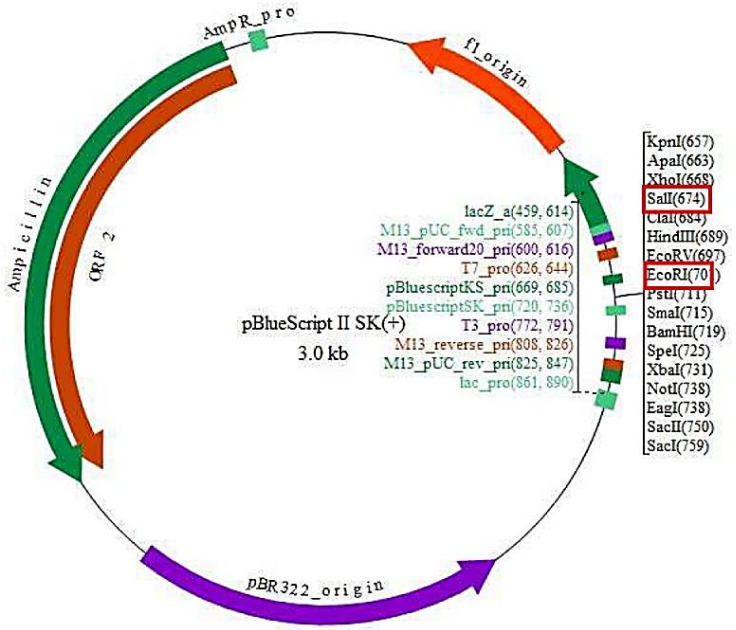




pCMVbを*Not*Iでで切断し（点線部）、pEL024の*Not*I- *Not*Iフラグメントとlacz遺伝子（beta-GAL）と置換し、pEL026 を作製。



（次ページへ）



pBlueScript II SK+を*Eco*RI-*Sal* Iで切断し、pEL026由来*Eco*RI-*Sal* Iフラグメントを組み込みpEL027 を作製。

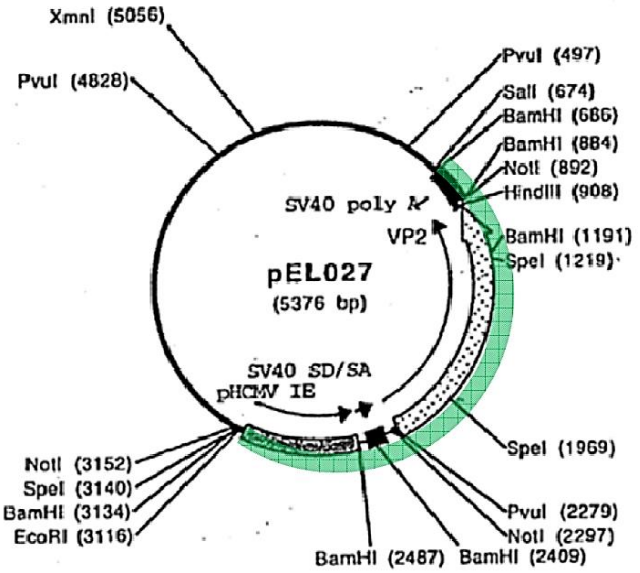
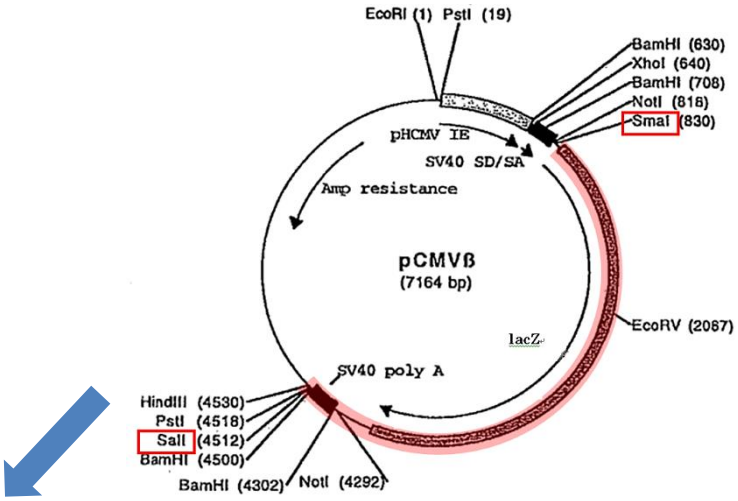
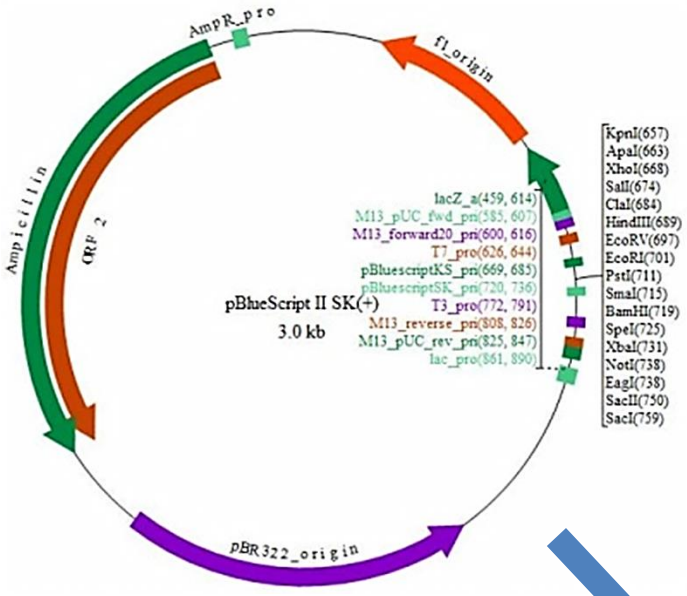


図 5　プラスミド pEL027 の作製

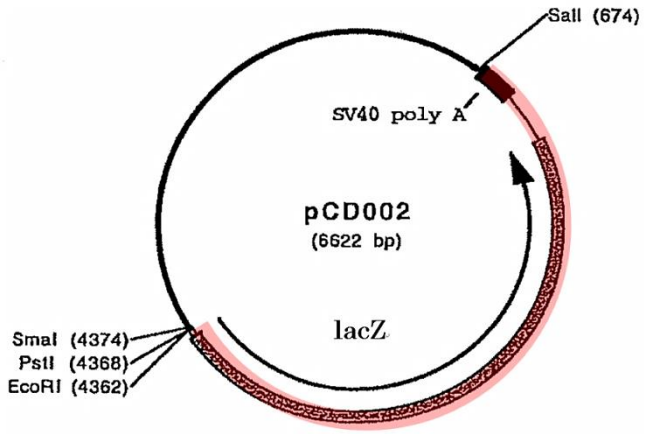
b)-3　pEL068 の作製（供与核酸「*VP2* 遺伝子発現カセット」の土台であり、MCMV-IE プロモーターを含むプラスミドを作製する過程）（図 6）

- pCMVβ 由来 *Sal*I-*Sma*I フラグメント（LacZ（β-ガラクトシダーゼをコード）および PolyA 領域含む）を pBlueScript II SK+に組み込み、pCD002 を作製。
- pCD004 由来 *Hpa*I-*Pst*I フラグメント（MCMV-IE プロモーター領域を含む）を pCD002 に組み込み、pCD009 を作製。
- オリゴヌクレオチド MB070 と MB071 は、[*Sac*I]-*EcoR*I-*Spe*I-*Pst*I-*Not*I-*Sal*I-[*Kpn*I]という特有の制限酵素配列を含み、この二つの配列をハイブリダイズして *Sac*I-*Kpn*I 二本鎖 DNA リンカーを作製した。この *Sac*I-*Kpn*I リンカー配列を、あらかじめ *Sac*I と *Kpn*I で切断した pBlueScript II SK+に組み込み pEL067 を作製。これにより、pEL067 は pCD009 由来 MCMV-IE プロモーター領域の挿入部位である *Spe*I-*Pst*I を含む。
- pCD009 の *Spe* I-*Pst* I フラグメントを pEL067 に組み込み pEL068 を作製。





pCMVß由来*Sal*I-*Sma*Iフラグメント（LacZ、ß-ガラクトシダーゼをコードおよびPolyA領域含む）をpBlueScript II SK+に組み込み、pCD002を作製



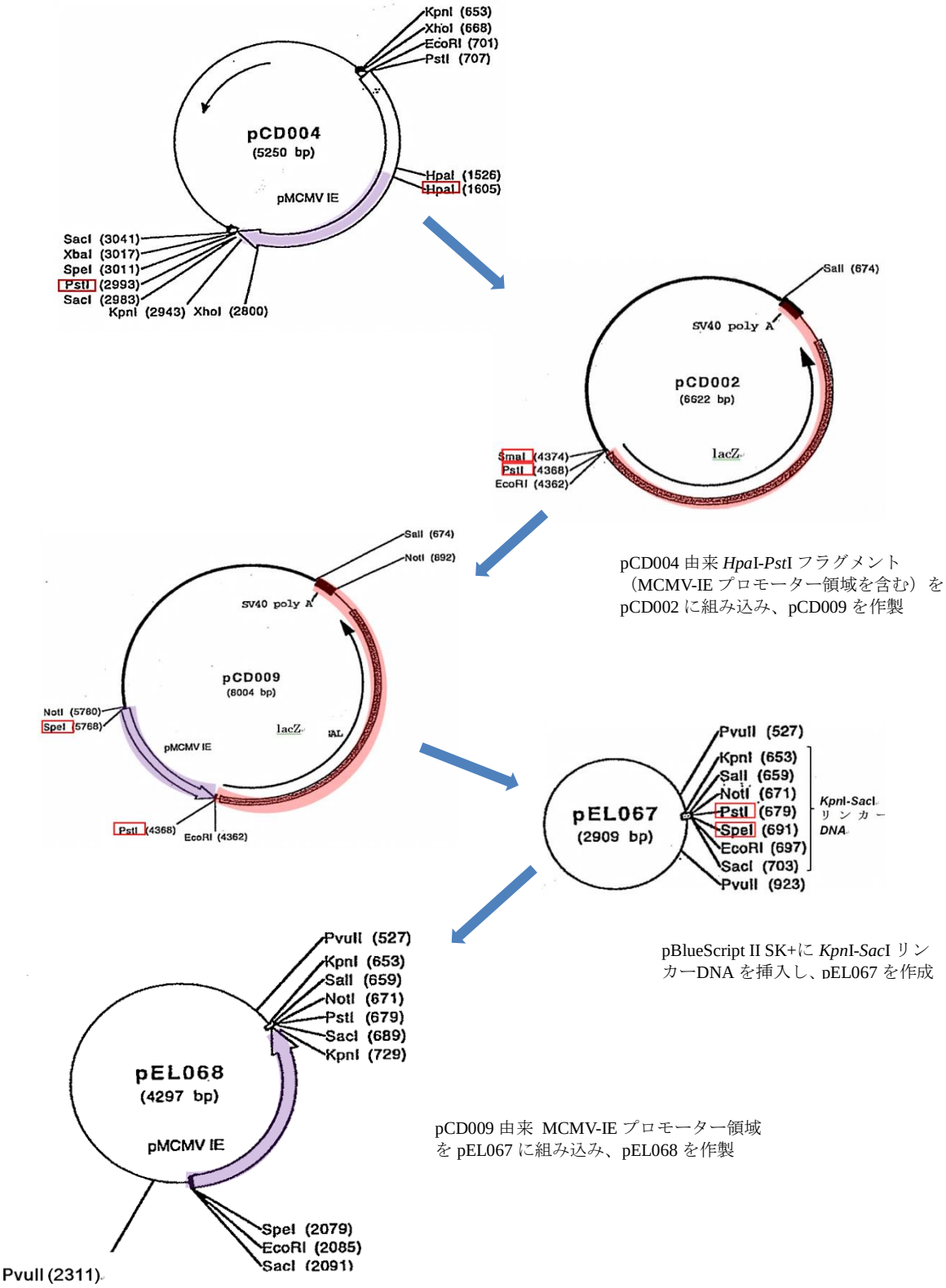
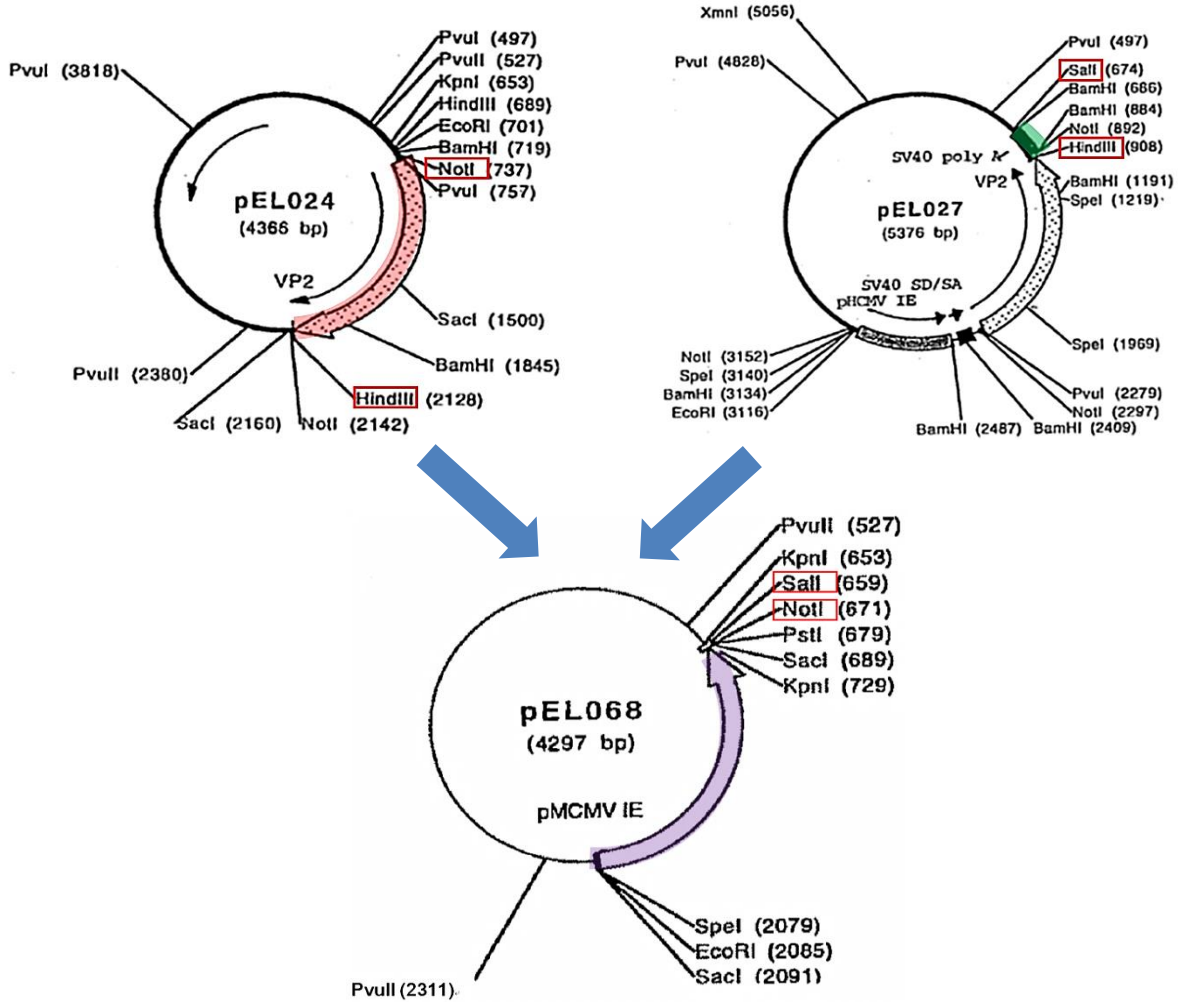


図 6　プラスミド pEL068 の作製

b)-4　pEL070 の作製（pEL068 を土台に、pEL024 の *Not* I-*Hind* III フラグメント（VP2）と pEL027 の *Sal* I-*Hind* III フラグメント（poly A）を組み込んで作製する過程）

・ pEL024 の *Not* I-*Hind* III フラグメント（VP2 領域を含む）と pEL027 の *Sal* I-*Hind* III フラグメント（poly A 領域を含む）をライゲートし、*Not* I と *Sal* I で予め切断した pEL068 に組み込み、pEL070 を作製した（図 7）。



pEL024 の *Not* I-*Hind* III フラグメント（VP2）と pEL027 の *Sal* I-*Hind* III フラグメント（poly A）をライゲートし、*Not* I と *Sal* I で予め切断した pEL068 に組み込んで pEL070 を作製。

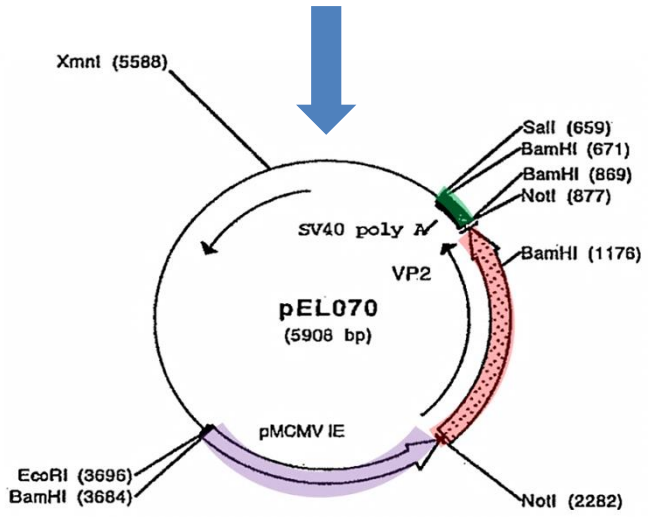


図 7　プラスミド pEL070 の構築

ロ　構成要素の機能

① 供与核酸「*VP2*遺伝子発現カセット」の各構成要素の機能は以下の通りである。

表2　伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス由来 *VP2*遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス vHV013-69株の作出に用いた供与核酸の各構成要素の機能

供与核酸の名称：*VP2*遺伝子発現カセット（別紙3）	
構成要素	構成要素の機能
IBDV *VP2*遺伝子	*VP2*遺伝子は IBDV のカプシド蛋白質をコードする遺伝子であり、IBDV に対する防御誘導遺伝子領域（主要防御抗原）である（中和抗体の主要な部分はこの蛋白に対するものである）。
MCMV-IE プロモーター	マウスサイトメガロウイルスの主要最初期（immediate-early, IE）遺伝子で、非常に高い転写活性を示す。本プロモーターは医学分野で広く安全に用いられていることより選択した。
SV40 poly A	poly A は、真核細胞の mRNA 3'末端についているアデニン・ヌクレオチド鎖を指し、転写終結およびポリアデニル化に必要なシグナルをもたらす機能がある。

② 目的遺伝子をコードする遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

IBDV は血清型1型と2型に分かれ、病原性株は1型に属す。供与核酸は欧州古典型の標準株である IBDV Faragher 52/70株（血清型1型）由来の *VP2*遺伝子を含む。目的遺伝子である *VP2*遺伝子の発現により産生されるのは、IBDV カプシド蛋白質 VP2である。カプシド蛋白質（VP2及び VP3）は IBDV の抗原性に関与するエピトープを含んでいるが、VP2蛋白質は中和防御抗体の誘導を担う血清型特異的抗原をもたらすことが示されている。VP2には少なくとも2つのウイルス中和エピトープがあり、その内の一つは血清型特異的である（Kibenge ら、1988、別紙9）。IBDV VP2蛋白質がアレルギー性を有するとの報告はなく* VP2蛋白質シークエンスと既知のアレルゲンシークエンスとのホモロジー検索の結果、相同性のあるシークエンスは存在しなかった（別紙35）。

* 製造元における申請書記載内容並びに2014年7月以前の Medline（PubMed）による文献検索を実施。キーワード：VP2, Herpesvirus of turkey, avian, allergy

③ 宿主の持つ代謝系を変化させるか否か

供与核酸は宿主（vHVT 株）の *Bam*HI-I 領域の挿入遺伝子座に挿入されている。*Bam*HI-I 領域は HVT の増殖に不可欠な機能を担っていない（別紙 10）。この領域に発現カセットを挿入された組換え体である vHVT013-69 株は *in vitro* において HVT FC126 株と同様に鶏胚細胞でよく増殖するが、体内での増殖能は HVT FC126 株より若干低いことが示唆された（別紙 22）。一方、vHVT013-69 株はマレック病に対する感染防御能が十分に誘導されることは確認されている（別紙 17）。これらのことから、宿主の代謝系を大きく変化させるとは考えられない。

(2) ベクターに関する情報

イ　名称及び由来

名称：　pEL079

由来：　ベクターpEL079は、プラスミド pBluescript II KS+（図8）に、HVT FC126株ゲノム DNA 由来の *Bam*HI-I 領域の *Xho*I-*Sac*I フラグメント（以下、「HVT オープンリーディングフレーム（orf）2-3/4」とする。）（図10）を組み込み改変したものである。

ベクターの主要部分pBSII-KS+についての情報は別紙 11 の通りである。

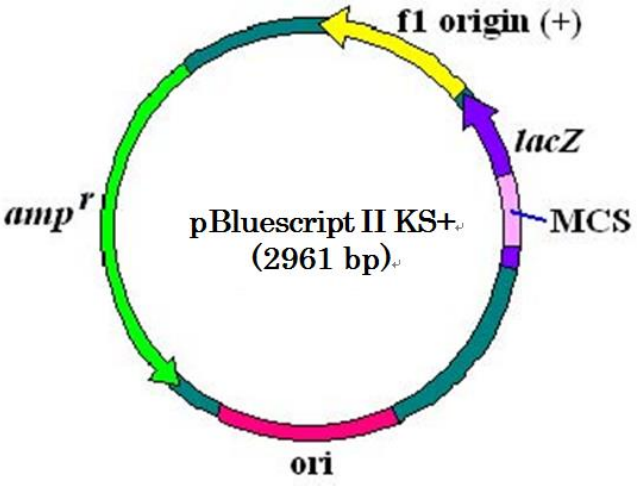


図 8　pBSII-KS+の遺伝子地図

ベクターpEL079の各構成要素の詳細は以下の通りである（表3及び図9）。

表3　ベクターpEL079の構成要素の由来

ベクターpEL079（4,959 bp、別紙3）		
構成要素	サイズ	構成要素の由来
HVT orf 2-3/4	2,084 bp	ベクターpEL079は HVT FC126株ゲノム DNA 由来の HVT orf 2及び3/4を含み（図10）、供与核酸「*VP2*遺伝子発現カセット」が挿入される部位（12 bp、1500-1512）を含んでいる。供与核酸挿入部位は orf 2と3/4を分断する形で存在しており、*Sal*I、*Sma*I、*Eco*RI の3つの制限酵素切断部位を含む。
pBluescriptII KS+	2,961 bp	ストラタジーン社が開発したクローニングベクター（図8）。大腸菌 K12株における実験用クローニングベクターとして汎用されているもので、全遺伝子配列が決定されている。ファージとプラスミドの両方の性質を持つのでファージミッドと呼ばれている。

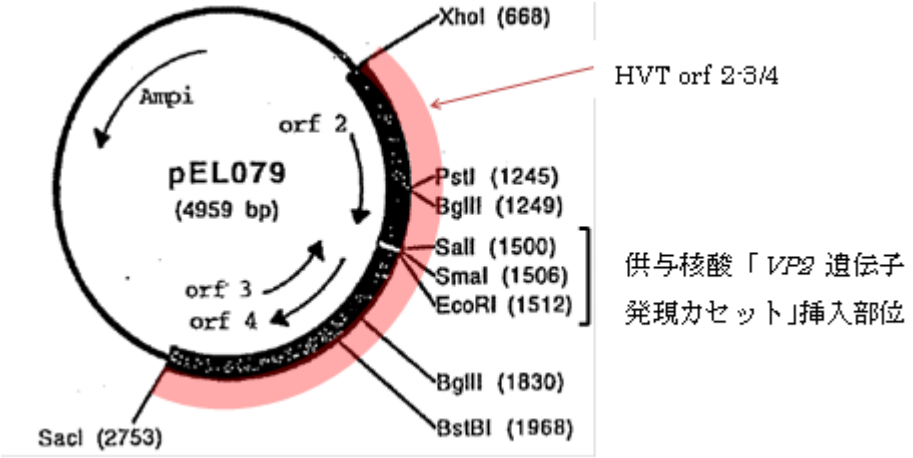


図 9　ベクターpEL079 の遺伝子地図

HVT ゲノムは 82%の L 領域と 12%の S 領域との二つの部分からなる。各々の領域は、ユニークな配列（U_L 及び U_S）とその両端の倒置反復配列（TR_L 及び IR_L、IR_S 及び TR_S）からなる。R は反復配列、T は末端部（Terminal）、I は内部（Internal）、下付きの L は L 領域、下付きの S は S 領域を示す（Igarashi et al., 1987）。

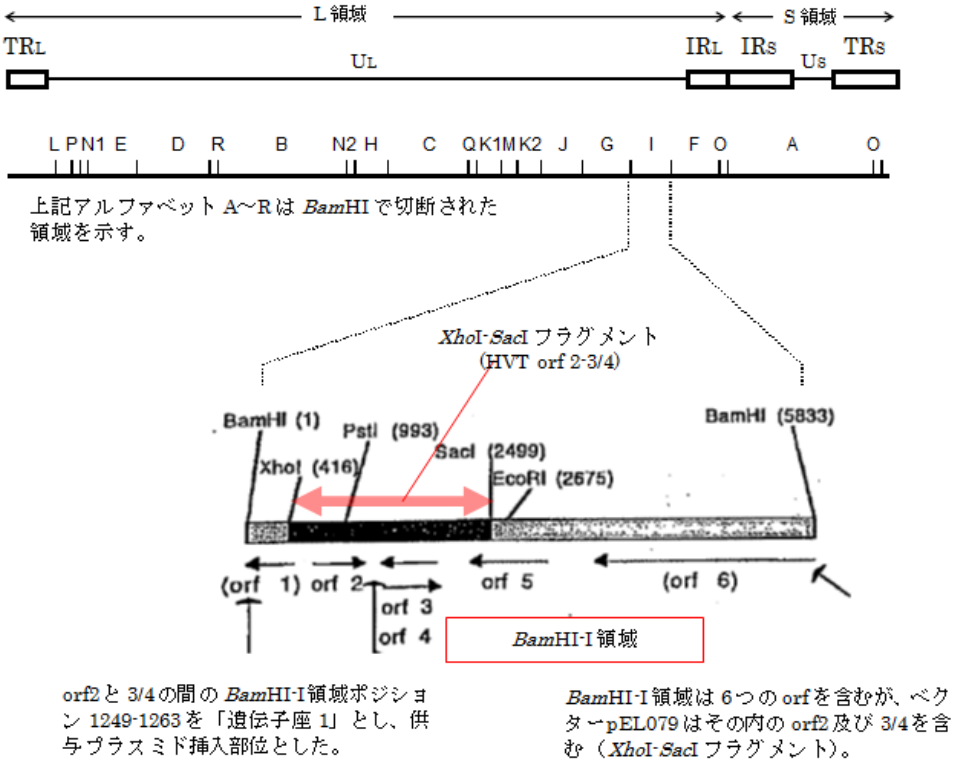


図 10　HVT ゲノムの構造、及び *Bam*HI 領域と *Xho*I-*Sac*I フラグメント

ロ　特性

①　ベクターの塩基数及び塩基配列

ベクターpEL079は、HVT FC126株ゲノムDNA由来の「HVT orf 2-3/4」を、プラスミドpBluescriptII KS+（pBSII-KS+）に組み込み改変したものである。供与核酸の挿入部位をHVT orf2と3/4の間に持つ（図9）。HVT orf 2、3/4が供与核酸を挟む形になるため、vHVTゲノムDNAとの*in vitro*相同組換えが可能となる。

表4　ベクターpEL079の各構成要素の特性

構成要素	構成要素の特性
ベクターpEL079（4,959 bp、別紙3）	
HVT orf 2-3/4	HVT FC126株ゲノムDNA由来の*Bam*HI-I領域は、4つの完全長orf2、3、4及び5、及び2つの部分的orf1及び6の6つのorfを含む（図10）。ベクターpEL079はそのうちorf2及び3/4を含む（*Xho*I-*Sac*Iフラグメント（HVT orf 2-3/4））。各orfの特性は表5に示した。*Bam*HI-I領域は伝染性、病原性及び伝達性に関与する遺伝子は保持しない。
pBluescriptII KS+	ベクターの主要部分であるpBSII-KS+は実験用クローニングベクターであり、病原性、伝染性及び伝達性に関する遺伝子は保持しない。

②　特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

表5にBam HI-I領域に存在する推定orfと、それと相同性を有する配列について記載した。

表5　HVT *Bam*HI-I領域に存在する推定orf

名称[a]	転写方向	開始コドン	終止コドン	orfの長さ（アミノ酸数）	Poly-A[b]	相同性
(Orf1)	左	479	-	(>159)	NA	該当なし
Orf2	右	676	1185	169	1236	HSV-1 U_L55[c]
Orf3	左	4968	4411	185	1281	EHV-1遺伝子3[d]
Orf4	右	4430	4987	185	2176	該当なし
Orf5	左	6108	5311	265	2210/2036	該当なし
(Orf6)	左	-	6597	(>755)	3553	MDV orf21[e]

a　（ ）は一部の配列のorf

b　ポリアデニレーションサイト配列AATAAA（あるいはATTAAA）。Poly-Aは、RNA合成酵

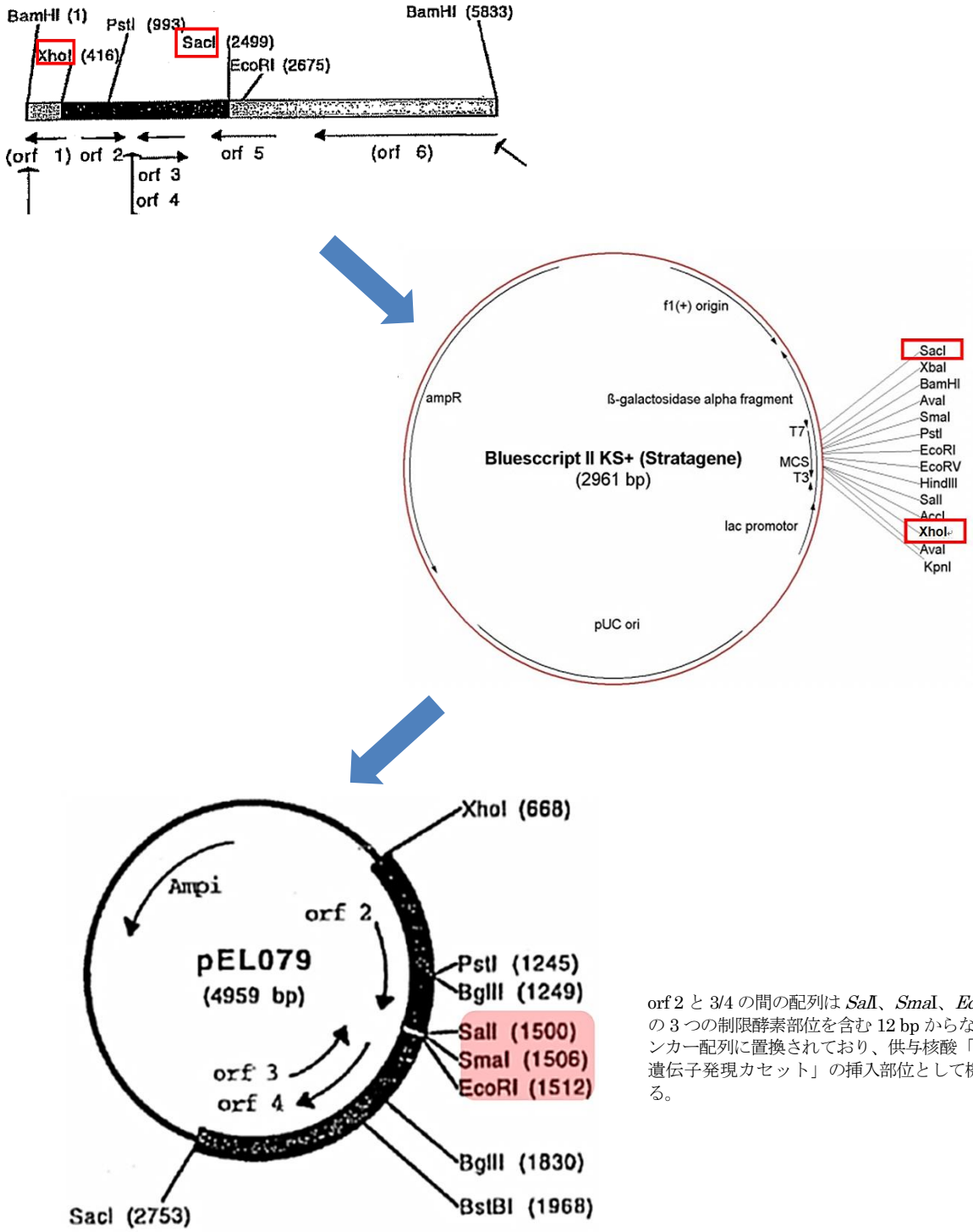
素による転写終結および転写後の Poly-A 付加の起点となるシグナル配列であり、その位置は上流にある翻訳領域（Orf)を転写した mRNA の機能的終結部位を示す。Poly-A、開始コドン、終始コドンを確認する事により、その上流にある Orf が機能する事を示している。
c　McGeoch et al. (1988): HSV-1 U_L55 は、単純ヘルペスウイルス（HSV）1 型の U_L 配列の一つであり、非本質的な遺伝子として考えられている。その明確な機能はわかっていないが、マウスにおける実験においてウイルスの複製、腹腔内における病原性、潜伏期間に関与しないとの報告がある。
d　Telford et al. (1992): 馬ヘルペスウイルス 1 型（EHV-1）遺伝子 3 は Orf3 の遺伝子領域であり、糖蛋白質をコードし、防御免疫に関連する遺伝子であると考えられている。
e　Ross et al. (1993): マレック病ウイルス（MDV）の orf21 は U_L 内に位置し、少なくとも 322 のアミノ酸塩基からコードされると推定され、水痘帯状ヘルペスウイルス（VZV）のアルファ変換誘導蛋白とある種の相同性を示すが、明確な機能は報告されていない。

③ ベクターの伝染性の有無及び伝染性・病原性を有する場合はその宿主域に関する情報

ベクターである pEL079 は大腸菌系のプラスミドベクターである pBSII-KS+が主要な部分を構成し、HVT FC126 株由来 *Xho*I-*Sac*I フラグメントを有するが、伝染性、病原性、伝達性は pBSII-KS+と同等であると考えられる。pBSII-KS+は大腸菌 K12 株における実験用プラスミドベクターとして汎用されているもので、全遺伝子配列が決定されており、病原性、伝染性は知られておらず、接合伝達性は低い種類として一般的に認識されている。

④ 既知のベクターについて改造又は修飾を行い、新しいベクターを開発した場合、改造又は修飾前のベクターに関する文献、改造又は修飾を行った部分についての方法

HVT *Bam*HI-I 領域をクローニング後、*Bam*HI-I の *Xho*I-*Sac*I フラグメントが含まれるように pBSII-KS+にクローニングし、*VP2* 遺伝子発現カセットを組み込むためのベクターである pEL079 を作製した（図 11、別紙 3 参照）。orf 2 と 3/4 の間の配列は *Sal*I、*Sma*I、*Eco*RI の 3 つの制限酵素部位を含む 12 bp からなるリンカー配列に置換されており、供与核酸の挿入部位として機能する。よって、供与核酸は orf 2 と orf 3/4 の間の 12bp の部位に挿入され、各 orf の機能には影響を与えないと考えられる。



orf 2 と 3/4 の間の配列は *Sal*I、*Sma*I、*Eco*RI の 3 つの制限酵素部位を含む 12 bp からなるリンカー配列に置換されており、供与核酸「VP2 遺伝子発現カセット」の挿入部位として機能する。

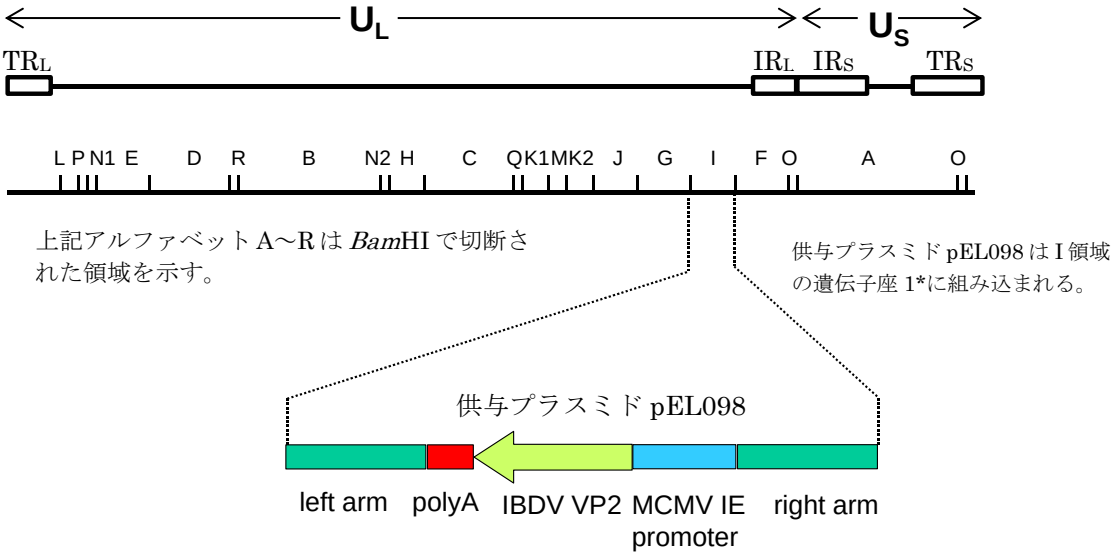
図 11　供与核酸を挿入するベクターpEL079 の構築

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ　宿主内に移入された核酸全体の構成

①　ベクター内での供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位

供与核酸「*VP2* 遺伝子発現カセット」をベクターpEL079 に組み込んだ供与プラスミド pEL098 は、宿主である vHVT の orf 3/4 を含む遺伝子座 1 right arm 領域、MCMV-IE プロモーター領域、*VP2* 遺伝子領域、SV40 poly A 領域、そして vHVT の orf 2 を含む遺伝子座 1 left arm 領域から構成されている（図 12）。



U_L 及び U_S: HVT ゲノムのユニーク配列（L 領域及び S 領域）
TR_L、IR_L、IR_S 及び TR_S: U_L 及び U_S 両端の倒置反復配列

* ofr2 と 3/4 の間の *Bam*HI-I 領域ポジション 1249-1264 を「遺伝子座 1」とし、供与プラスミド挿入部位とした。

図 12　vHVT ゲノムに移入する核酸の構造及び位置

挿入した *VP2* 遺伝子の塩基配列については別紙 3 に示した。

②　ベクター（pEL079）への供与核酸（VP2 遺伝子発現カセット）の挿入方法

供与プラスミド pEL098の構築（(別紙3及び図13参照）

pEL070 を *Sal*I/*Eco*RI で切断し、*Sal*I/*Eco*RI で切断したベクターpEL079 に pEL070 由来の *VP2* 遺伝子発現カセットを挿入して、供与プラスミド pEL098 を作製した。

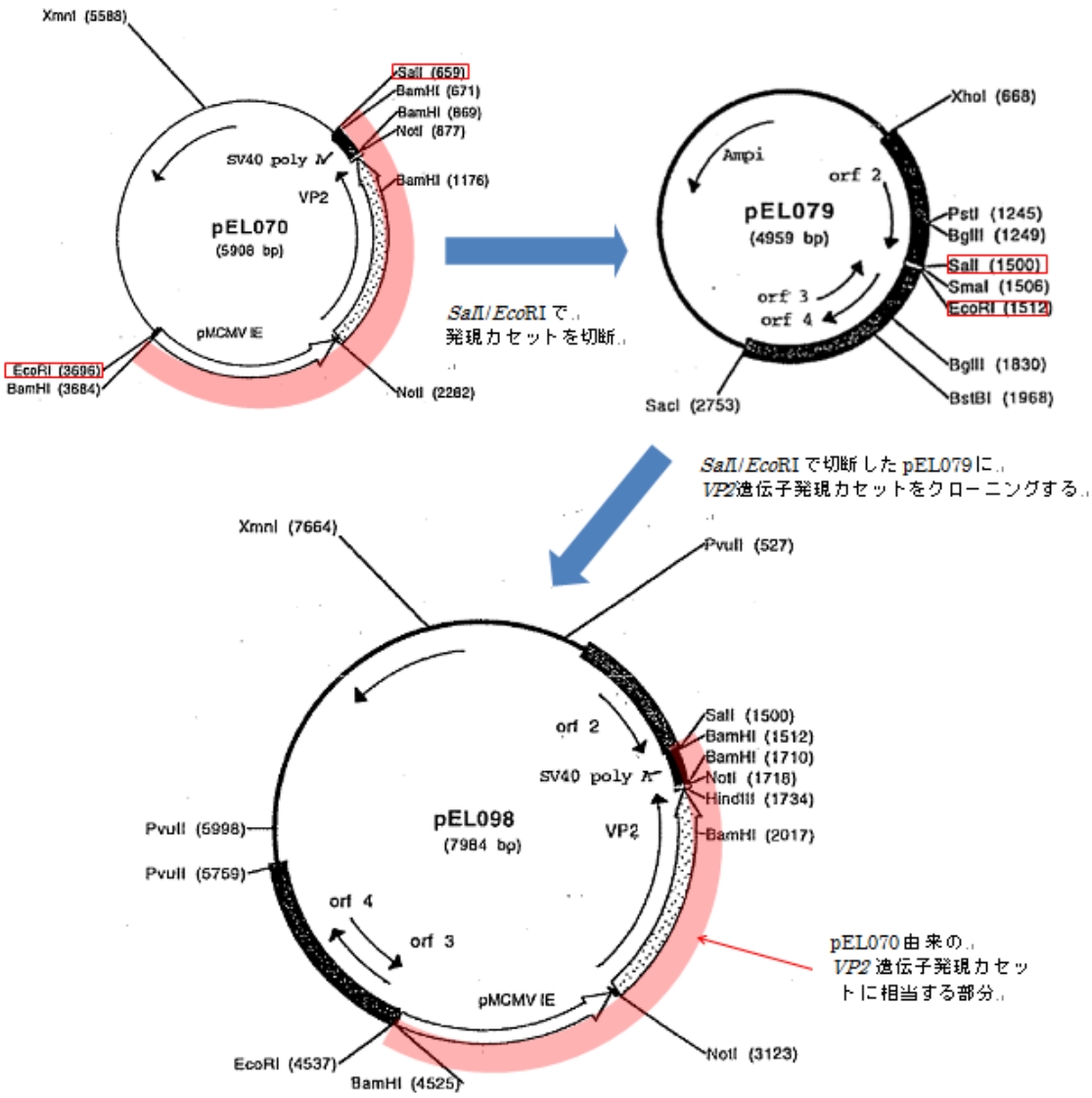


図 13　供与プラスミド（pEL098）の構築

ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法

目的遺伝子、プロモーターを挿入した発現カセットを含む供与プラスミド pEL098を *Pvu*II 制限酵素で直線状にした後、vHVT ゲノム DNA とともにリポフェクタミンと混合し、鶏胚線維芽細胞でトランスフェクトさせ、相同組換えをおこさせることで vHVT に目的遺伝子である *VP2*遺伝子発現カセットを挿入して遺伝子組換え微生物 vHVT013を作製した（別紙3及び図14参照）。

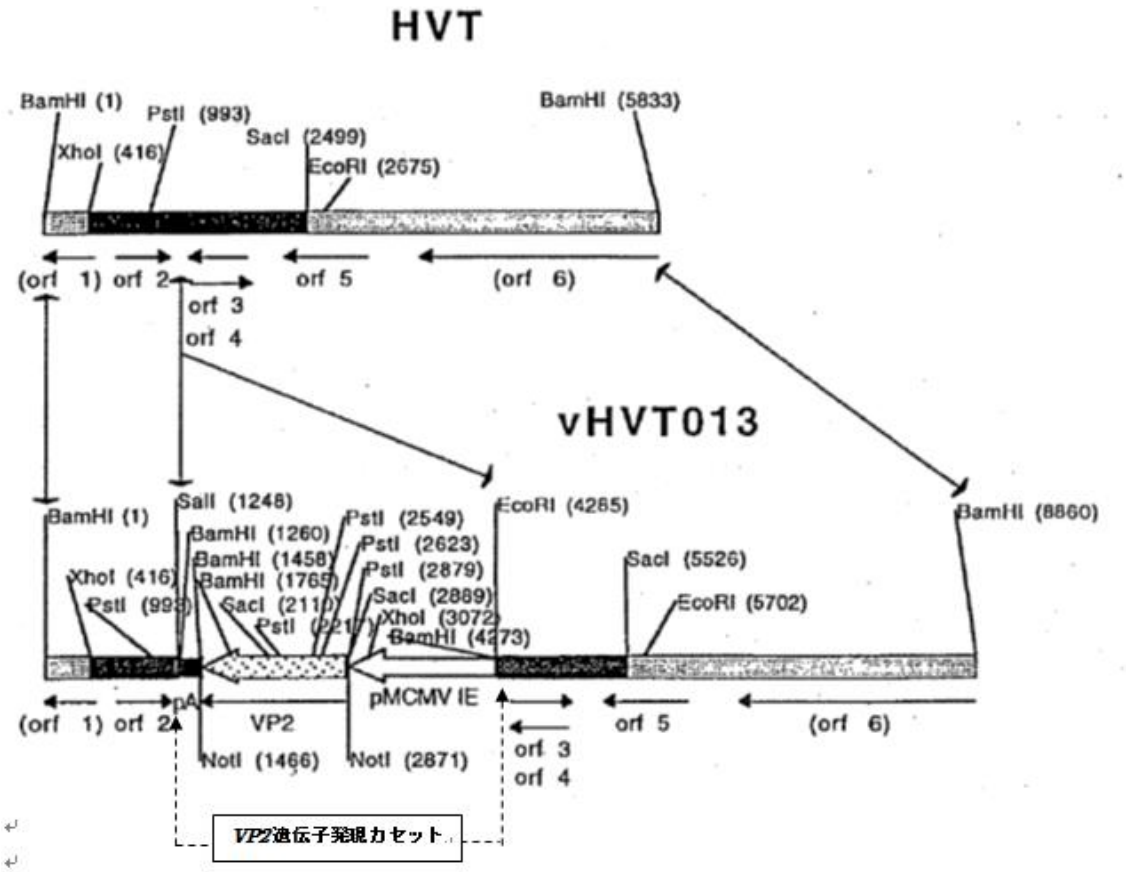


図 15　親株（HVT）及び組換え後（vHVT013）の *VP2* 遺伝子発現カセット領域

ハ　遺伝子組換え生物等の育成の経過

相同組換えにより作製した vHVT013を増幅するため、トランスフェクトした細胞を継代培養した。トランスフェクション後4代目で期待する PCR プロファイルを示す組換え体（クローン"C1"）が得られた。このウイルスを3代継代して増幅し、Stock "CRYO vHVT013/26/CEP1" を得た。このクローンを PCR 分析したところ、一部に TR_L に欠損が確認されたものが認められたため、欠損のないウイルスを得るため再クローニングを行った。Stock "CRYO vHVT013/26/CEP1"の限界希釈法によるクローニングにより、PCR で非欠損であった2クローン（#8及び#69）が得られた。結果的にクローン#8はサザンブロットで IR_L 及び/又は TR_L にいくつかの欠損が認められ、クローン#69には欠損が認められなかったため、#69を選択した（vHVT013-69）。IR_L 及び TR_L の欠損は HVT FC126株由来の *Bam*HI-I と *Bam*HI-F において一部確認されているが、これらの欠損が *in vitro* や *in vivo* における HVT の増殖や、マレック病防御に本質的な役割を果たさないとの報告がある（別紙10）。

継代の詳細は以下の表6に示した。

表6　遺伝子組換え微生物の育成過程の概要

トランスフェクションからの継代数	vHVT の継代数	実施した作業
0	19	[redacted]
1	20	[redacted]
2	21	[redacted]
3	22	[redacted]
4	23	[redacted]
5	24	[redacted]
6	25	[redacted]
7	26	[redacted]
8	27	[redacted]
9	28	[redacted]
10	29	[redacted]
11	30	[redacted]
12	31	[redacted]
13	32	[redacted]
14	33	[redacted] マスターシードウイルス（MSV）: vHVT 013-69/33/CEP1/6418/961205

相同組換えから11代目で得られた遺伝子組換え微生物 vHVT013-69/31/CEP1/96.10.17 dated 17.10.96を、さらに SPF 鶏胚線維芽細胞を用いローラーボトルで2代継代して得たものを、製造に用いるマスターシードウイルス（MSV）vHVT 013-69/33/CEP1/6418/961205 とした。MSV は液体窒素（≤-196℃）で凍結保存する。

なお、vHVT013-69/31/CEP1/96.10.17 dated 17.10.96以降、MSV を2代継代培養したものを「本遺伝子組換え微生物」と規定して名称を統一して以降の記載を行った。

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

① 移入した核酸が遺伝子組換え微生物の染色体に組み込まれているかプラスミドとして存在するか等

目的遺伝子は宿主である七面鳥ヘルペスウイルス vHVT のゲノム DNA 内に組み込まれていることを本遺伝子組換え微生物について確認した（別紙3 p204）。挿入場所は vHVT の *Bam*HI-I 領域の 遺伝子座1で（別紙12）、目的遺伝子 IBDV *VP2*遺伝子は上流に MCMV-IE プロモーター、下流に SV40 poly A を付加されている。

② 移入された核酸の複製物の世代交代時における伝達の安定性

本遺伝子組換え微生物について *in vitro*（鶏胚線維芽細胞）で初代、5代及び10代継代したものを、PCR 法を用いて解析したところ、予想されるサイズのバンドが認められ、親株である HVT のコンタミネーションは確認されなかった（別紙13, p399, 3.3.3）。また、サザンブロット分析においても組換え遺伝子の挿入が確認された（別紙13, p394, 3.1.3）。

③ 目的遺伝子の動物内での発現の安定性

MSV から *in vitro*（鶏胚線維芽細胞）で3代及び8代継代したのち、IBDV *VP2*遺伝子の発現を間接免疫蛍光抗体法によって確認したところ、それぞれについて全てのプラークで発現が確認された（別紙14）。また、本遺伝子組換え微生物と、本遺伝子組換え微生物を鶏で9代継代したウイルスをサザンブロット分析及び PCR 法によって比較したところ、*VP2*遺伝子領域の配列間が同一であり、*in vivo* 継代における安定性が確認された（別紙15）。

以上の結果より、挿入した供与核酸の継代による脱落は観察されず、世代交代時における伝達の安定性が示され、目的遺伝子は挿入部位に安定的に存在していることが確認された。また、挿入遺伝子により目的とする VP2蛋白質が100%のプラークで発現していたことから、遺伝子挿入部位における変異に伴う目的以外の蛋白質の発現は無く、目的遺伝子の形質発現が安定的であることが確認された。

遺伝子組換え微生物 vHVT013-69株は哺乳動物由来細胞では複製しないので、その安定性については確認できない。

vHVT013-69株を接種した鶏で IBDV 及び MDV の攻撃に対し、防御効果を示すことが確認されている（別紙16及び17）。

(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

VP2 蛋白は IBDV カプシド蛋白の主要な構成要素の一つである。VP2 蛋白の発現は、IBDV VP2 蛋白特異的モノクローナル抗体や IBDV 感染鶏から得られた血清を用いた免疫蛍光法や放射性免疫沈降法等によって確認できると考えられる。通常は、品質管理試験の方法である Fluorescein-isothiocyanate（FITC）標識抗マレック病ウイルス特異抗体と Indocarbocyaine（Cy3）標識抗 VP2 蛋白モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により行う（別紙 18、34）。蛍光抗体法の特異性を検証した際の試験方法及び条件の概要を以下に述べる（別紙 18）。鶏胚細胞を調整し、本遺伝子組換え微生物、HVT、IBDV 又は MDV Rispens 株を感染させた後にアセトン固定し、蛍光免疫染色に供する。IBDV 由来抗 VP2 蛋白モノクローナル抗体及び抗 HVT 特異抗体を一次抗体として固定感染鶏胚細胞へ添加し、38℃で 30 分間反応する。PBS により洗浄後、標識（FITC 又は Cy3）二次抗体により染色し、蛍光顕微鏡において観察する。HVT 感染は FITC 標識により緑色の蛍光として観察され、VP2 蛋白の発現は赤色の蛍光として観察される。特異性の検証結果として、抗 VP2 蛋白モノクローナル抗体は IBDV 及び本遺伝子組換え微生物には反応したが、HVT 及び MDV Rispens 株には反応しなかった。また、抗 HVT 特異抗体は HVT 及び本遺伝子組換え微生物には反応したが、IBDV には反応せず、MDV Rispens 株への反応性は低かった事が示された。本結果により、蛍光抗体法の特異性は立証された。その他に挿入配列とベクターを同定する方法として、理論的にはウイルス DNA の制限酵素切断パターン、PCR、ELISA 又はウェスタンブロット等の方法が考えられる。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 遺伝子組換え微生物と、その調製に利用した宿主又はこれらの属する生物種との特性の違い

七面鳥ヘルペスウイルスは鳥類由来細胞において一般的な細胞培養条件で増殖する。本遺伝子組換え微生物は、親株 FC126 株を培養細胞で継代して得られた宿主である vHVT 株の *Bam*HI-I 領域の挿入遺伝子座に IBDV *VP2* 遺伝子を挿入している。遺伝子学的特性として HVT ゲノムに IBDV *VP2* 遺伝子を 1 コピー持つとともに、マウスサイトメガロウイルスプロモーターMCMV-IE を 1 コピー持っている。上記の遺伝子は vHVT 株の *Bam*HI-I 領域に挿入されているが、その領域にもともとあった orf の発現は妨げないように挿入している（別紙 12）。よって、本遺伝子組換え微生物は IBDV VP2 蛋白質を発現する以外は宿主である七面鳥ヘルペスウイルスと同等の性質を示し、ウイルスの増殖が細胞核で行われ、細胞の生存できる環境が必須であるため、浸透圧の低い水中では殆ど生存できないと考えられる。宿主及び本遺伝子組換え

微生物はその親株である HVT FC126 株と同一の細胞指向性及び増殖様式を示し、自然宿主である鳥類において感染性はあるが非病原性である。本遺伝子組換え微生物を鶏に接種した場合の体内分布、体外への排泄及び同居感染性については、その宿主の性質と同等であることが、試験により確認された（別紙 19 及び 20）。また、本組換え体はその宿主と同様に羽包のみに分布し（別紙 19）、鶏から鶏への伝播性は認められなかった（別紙 20）。なお、本遺伝子組換え微生物接種鶏との同居による七面鳥への伝播は認められたが（表 7、別紙 21）、飼育環境（敷き藁）からの伝播は HVT FC126 では確認されたものの、本遺伝子組換え微生物では認められなかった（別紙 30）。また、SPF 鶏体内におけるウイルス量を確認したところ、分離された量は HVT FC126 株の約 1/4 であり（表 8、別紙 22）、本遺伝子組換え微生物の増殖能は宿主と比較して高くないと考えられた。

哺乳動物に対しては体内で複製できないことから病原性はない（別紙 7、8）。

表 7　遺伝子組換え微生物の鶏から七面鳥への伝播（別紙 21：試験番号 98.183 試験結果抜粋）

群	材料	供試動物	HVT ウイルス分離[1]	抗 IBDV 抗体（log10）[2]	抗 HVT 抗体[3]	
			D28	D28	D28	D42
G1A	vHVT013-69	鶏12羽	＋	3.6	11/12	
G1B	－（G1A と同居）	七面鳥8羽	＋	4.2	0/6	5/6
G2A	HVT FC126	鶏6羽	＋	≤0.4	6/6	
G2B	－（G2A と同居）	七面鳥4羽	＋	≤0.4	0/3	2/3
G3A	マレック溶解用液	鶏6羽	－	≤0.4	0/6	
G3B	－（G3A と同居）	七面鳥4羽	－	≤0.4	0/3	0/3

1) 初代培養結果

2) 各群の幾何平均値

3) 陽性検体数／供試数

表8　遺伝子組換え微生物の SPF 鶏における残存性（別紙22：試験番号98.255試験結果抜粋）

群	処置	D0	[redacted]		[redacted]		D61	
		IBD[1)]	HVT[2)]	IBD	HVT	IBD	HVT	IBD
G0	血清対照（D0に安楽殺）	<0.5						
G1 (n=10)	vHV013-69	ND	4/5	[redacted]	5/5	[redacted]	5/5 [redacted]	[redacted]
G2 (n=10)	HVT FC126	ND	5/5	ND	5/5	ND	5/5 [redacted]	ND
G3 (n=10)	対照	ND	0/5	<0.5	0/5	<0.5	0/5	<0.5

1) 抗 IBD 抗体価幾何平均値（log10）

2) HVT ウイルス分離結果：陽性検体数／供試数[redacted]
D61において分離ウイルス量を定量した[redacted]

② 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

本組換え体とその宿主との識別は、Fluorescein-isothiocyanate（FITC）標識抗マレック病ウイルス特異抗体と Indocarbocyaine（Cy3）標識抗 VP2 蛋白質モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法により行う。本試験法は品質管理試験　同定試験法と同様である（別紙 18、34）。

3　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

家畜伝染病予防法において、マレック病（MD）及び伝染性ファブリキウス嚢病（IBD）は双方とも届出伝染病に指定され、両ウイルス性疾病をコントロールすることは養鶏産業において非常に重要である。MD 及び IBD は最も一般的な免疫抑制ウイルス性疾病である。MD はリンパ球増殖性疾病で、末梢神経の腫大や臓器組織におけるリンパ腫形成を特徴とする。IBD ウイルスはリンパ組織に向性を示し、ファブリキウス嚢を標的臓器として増殖する。B リンパ球で増殖する際にリンパ球を破壊し、罹患鶏では免疫抑制を起こす。

本遺伝子組換え微生物 vHVT013-69 株は、MD 及び IBD の予防を目的とする遺伝子組換え生ワクチン VAXXITEK® HVT+IBD 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、皮下接種及び発育鶏卵内接種を想定している。皮下接種は「凍結ワクチンを融解後、溶解用液で 1 羽当たり 0.2mL となるように溶解し、初生鶏の皮下に 0.2mL を接種する」、発育鶏卵内接種は「凍結ワクチンを融解後、溶解用液で 1 羽当たり 0.05mL となるように溶解し、18～19 日齢の発育鶏卵内に 0.05mL を接種する」を予定している。

免疫抑制疾病である MD 及び IBD に対する防御を早期に誘導するためには、それぞれの生ワクチンをできるだけ早期（初生又は卵内）に接種することが推奨されるが、このアプローチは安全性及び有効性の面から困難であった。IBD 生ワクチンは免疫能賦与に関して移行抗体の影響を著しく受け、特にひな用のワクチンウイルスは弱毒化が進んでいるので、それだけ移行抗体の影響は大きい。また、全ての個体がテイクするよう一般的に頻回接種が行われている。一方、本ワクチンの宿主である HVT ワクチン株はヘルペスウイルスであり、細胞随伴性ウイルスであることから液性抗体である移行抗体の影響を受けにくく、また、HVT は IBDV 移行抗体価のレベルに影響されない。潜伏感染して体内で長期間持続感染する特性があることから（文献 13）、長期間有効な省力型ワクチンベクターである。また、HVT FC126 株生ワクチンは発育鶏卵内接種が承認されているように、同等の生物学的性状をもつ本遺伝子組換え生ワクチンについても発育鶏卵内接種における安全性が確認されている。本遺伝子組み換え生ワクチンに挿入された IBDV VP2 遺伝子は主要構造蛋白の一つである VP2 蛋白を発現し、中和抗体誘導を担うエピトープを含む防御抗原である。ファブリキウス嚢の傷害に関与する遺伝子は含まないため安全であり、初生雛又は 18~19 日齢の発育鶏卵に接種できる。また、IBD 移行抗体レベルの影響を受けず有効性が発揮されることが確認されている（別紙 33）。

(1) 使用等の内容

①　運搬及び保管（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の

運搬及び保管を含む）

② 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号。以下「医薬品医療機器等法」という。）第 14 条第 3 項の規程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実施届出書及び動物用医薬品の臨床試験の実施基準に関す省令（平成 9 年農林水産省令 75 号）第 7 号に基づき作成する治験実施計画書に従った使用

③ 医薬品医療機器等法第 14 条第 1 項に基づく承認申請に従った使用（④に該当する行為は除く。）

④ 接種（鶏への接種）

⑤ 廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）第 12 条の 2 に基づき定める感染性産業廃棄物の処理基準に従った接種後の器具及び使用残渣の廃棄

⑥ ⑤以外の廃棄（生活力を有する遺伝子組換え生ワクチンを保有する接種動物の廃棄等に伴う場合を含む）

⑦ ①～⑥に付随する行為

(2) 使用等の方法

―

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

－

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

緊急措置計画書を参照

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

本遺伝子組換え生ワクチン使用対象である鶏を用いた実験室内試験の結果、*in vivo* 継代による組換え領域の安定性が確認された（別紙 15、26）。ワクチンの安全性について問題となるような所見は認められず、病原性復帰を示唆する傾向は認められなかった（別紙 24、25）。また、HVT 及び IBD に対する攻撃試験による有効性評価試験において、本遺伝子組換え生ワクチンが両疾病に対する防御能を鶏に付与

できることが確認された（別紙 16、17）。ワクチン接種鶏におけるウイルスの体内分布について総排泄腔、気管、ファブリキウス嚢及び羽包を調べたところ、羽包にのみウイルスが認められたが（別紙 19）、飼育環境から感染性ウイルスは検出されなかった（別紙 29）。また、ウイルス接種鶏の白血球中に接種後 61 日目においてもウイルスが確認され、少なくとも 8 週間は鶏体内で持続感染することが確認された（別紙 22）。鶏から七面鳥への同居感染が認められたが（別紙 21）、鶏間での同居感染は認められなかった（別紙 20）。これらの性状はいずれも HVT FC126 株と同等であった。

海外で実施された臨床試験結果においても安全性及び有効性が確認された（別紙 33）。

(6) 国外における使用等に関する情報

当該遺伝子組換え微生物 vHVT013-69 株を有効成分とするワクチン（製品名：VAXXITEK® HVT+IBD）の外国における承認取得は 2002 年以降 85 か所（84 か国）である（2015 年 2 月現在）（別紙 4）。

主要 10 か国の直近 3 年の販売実績を「表 7　主要 10 か国における販売状況」に示した。これら主要 10 か国の合計として 2011 年で 4,784,952,000 ドース、2012 年で 6,206,425,000 ドース、2013 年で 7,802,741,000 ドースである。2014 年 8 月時点の全世界における本ワクチン接種累計数は 480 億ドース以上に上る。

表 9　主要 10 か国における販売状況

販売国	販売量（千ドース）*		
	2011 年	2012 年	2013 年
ブラジル	1,251,090	1,667,146	1,505,348
アメリカ合衆国	1,061,086	1,245,436	2,258,766
フランス	97,048	130,539	154,701
中国	889,596	1,300,518	1,731,040
ロシア	292,580	429,590	490,040
メキシコ	248,084	491,816	603,384
ベネズエラ	366,110	318,500	351,500
アルゼンチン	335,516	353,728	379,230
コロンビア	174,670	199,980	210,790
フィリピン	69,172	69,172	117,942
合計	4,784,952	6,206,425	7,802,741

*販売量は 1 月から 12 月の数値として記載。

(7) 接種動物体内における挙動に関する情報

①　接種動物の体内における遺伝子組換え生ワクチンの消長に関する情報

HVT は七面鳥群に普遍的に存在する非病原性ウイルスで、非常に広範囲に分

布している。鶏には自然発生しないが、ウイルスは七面鳥と同様に鶏でも複製する。HVT は羽包及び白血球に組織指向性があり、実験的には HVT 生ワクチン株である親株 FC126 株と本遺伝子組換え生ワクチンを接種した鶏において、両者ともウイルスは羽包にのみ確認された（別紙 19）。また、両者とも鶏体内で 8 週間は持続することが確認されたが、ウイルス量としては本遺伝子組換え生ワクチンは親株の 1/4 であった（別紙 22）。鶏体内での 9 継代後と未継代の比較において、病原性復帰を示唆するような傾向は認められなかった（別紙 24、25）。本遺伝子組換え生ワクチンの *in vivo* 遺伝子学的安定性に関する試験結果から、組換え領域の安定性及び鶏での *in vivo* 複製においてゲノム改変しないことが証明された（別紙 15、26）。

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

HVT は鶏間で直接伝播する可能性は低いと考えられている。HVT FC126 株及び本遺伝子組換え生ワクチン各 10^5 PFU を 1 日齢 SPF 鶏 6 羽ずつに皮下接種し、無処置の SPF 鶏各 4 羽と 56 日間同居させた。接種 29 日目及び 56 日目に各鶏の白血球からウイルス分離を行い、更に 42 日目及び 56 日目の血清サンプルについて抗 IBD 中和抗体及び抗 HVT 蛍光抗体を調査した。その結果、HVT FC126 株及び本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏の白血球からウイルスが検出され、全羽に特異抗体が認められたが、同居群の鶏からはウイルスが分離されず、抗体も検出されなかった（別紙 20）。これらのことから、本遺伝子組換えワクチンは HVT FC126 株と同様に鶏間での同居感染の可能性は非常に低いと考えられた。

一方、HVT は鶏から七面鳥及び七面鳥間で伝播することが知られている。HVT FC126 株接種又は本遺伝子組換え生ワクチン接種 SPF 初生雛に、SPF 七面鳥初生雛を同居させ、鶏を安楽殺後、更に七面鳥を 14 日間飼育し、白血球からのウイルス分離及び抗体検査を実施したところ、同居七面鳥のウイルス分離及び抗体検査結果は陽性であったことから（別紙 21）、鶏から七面鳥への伝播は可能であった。しかしながら、HVT FC126 株及び本遺伝子組換え生ワクチン接種 SPF 鶏を 21 日間飼育した敷き藁で、SPF 七面鳥を 20 日間飼育し、更に SPF 七面鳥を同居させて 22 日間飼育したところ、HVT FC126 株については敷き藁飼育及び同居七面鳥ともにウイルスが伝播することが確認されたが、本遺伝子組換え生ワクチンの鶏から七面鳥への敷き藁を通じた伝播は認められなかった（別紙 30）。

HVT は主に感染性ウイルスを含有する羽包上皮の落屑（フケ）や敷藁屑によって経気道感染すると考えられている。HVT は鶏間での伝播の可能性は低いと考えられており、本遺伝子組換え生ワクチンについても同居感染は認められなかった（別紙 20）。鶏から七面鳥への伝播については本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏と

SPF 七面鳥が同居することによって七面鳥への感染が成立したが（別紙 21)、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏の敷き藁で七面鳥を飼育しても感染が成立しなかったことから、本遺伝子組換え生ワクチンが鶏から七面鳥へ伝播するには同居するといった密接な接触が必要であると考えられる。

本遺伝子組換え生ワクチンの接種対象動物ではないが、HVT に最も感染リスクの高い七面鳥を用いて本遺伝子組換え生ワクチンの拡散に関する試験を実施した（別紙 27)。コンベンショナル七面鳥に本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥を接触させたところ、本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥と単独同居群（非接種）では 9 羽中 5 羽に HVT 抗体が、9 羽中 2 羽に IBD 抗体が検出されたが、本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥と共に HVT Genesis2 株*接種七面鳥とも同居させた非接種群においては、IBD 特異抗体は検出されなかった。本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥と同居した HVT 接種群は、10 羽中 3 羽に特異的レベルに満たない IBDV 抗体のわずかな陽転が認められた（1.0 log10）が、それらの七面鳥を同居させた七面鳥には遺伝子組換え生ワクチンは継代（伝播）されなかった。これらのことから、HVT 感染七面鳥が存在している環境では、本遺伝子組換え生ワクチン接種七面鳥から同居の七面鳥には遺伝子組換え生ワクチンが拡散する可能性が低いことが確認された。

以上より、本遺伝子組換え生ワクチンは接種対象動物である鶏間では伝播の可能性が非常に低く、宿主ウイルス HVT に最も感受性の高い七面鳥においても、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏とのみ同居させるといった密接な接触でない限り伝播しない。よって、本遺伝子組換え生ワクチンが環境へ拡散するリスクは極めて低いと考えられる。

主として人に感染すると考えられるヘルペスウイルスは現在 8 種類同定されているが（文献 32)、人を含む非鳥類への MDV の伝播は、全ての血清型についてこれまで報告されていない。

* 1997 年に米国ノースカロライナ州の七面鳥農場から分離された株。分離後の継代数が少ないことから、野外における七面鳥の HVT 感染に代わるもの。

③ 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

宿主である vHVT 株に行った遺伝子学的改変は供与プラスミド挿入部位である遺伝子座 1 における 15 bp の欠失のみである。遺伝子組換えの工程で、既知の有害な配列や遺伝子伝達能を改変するような配列は挿入されていない。組換えによって宿主域、組織指向性、拡散性、体内分布及び持続性は親株に比してほとんど変化していない（別紙 19、20、21、22、27）ことから、本組換え生ワクチンは一般的な HVT と相同と考えることができる。よって、HVT に関する

知見が本組換え体にも適用できると考えられる。HVT は垂直感染（介卵感染）が認められず、本組換え生ワクチンの体内での増殖能は HVT FC126 株と比較して高くない（別紙 22）ことから、垂直（介卵）感染する可能性は一般的な HVT と同等以下であると考えられ、本遺伝子組換え生ワクチンも HVT と同様に介卵感染しないと考えられる。

④　野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

本遺伝子組み換え生ワクチンの宿主である FC126 株をはじめ HVT はマレック病に対するワクチン株として世界中で広く使用されている。その安全性は対象動物及び非対象動物において数十年にわたって野外で証明されている。現在までの知見では HVT は全ての動物種において非病原性である。

本遺伝子組換え生ワクチンは HVT に IBDV の遺伝子を挿入したもので、MD 及び IBD に対する鶏用のワクチンとして使用する。HVT の伝播様式は感染性ウイルスを含有するフケを介する経気道感染である。感染性ウイルス吸入により侵入したウイルスはリンパ系組織に移行し、T 細胞において潜伏感染する。感染性ウイルス粒子は感染リンパ球が羽包上皮細胞に移行し産生される。それがフケに内包される形で環境中に排泄されることによって感染源となり、環境中に維持される。

HVT は一般的に鶏から鶏への伝播の可能性は非常に低く（文献 4）、HVT FC126 株及び本遺伝子組換え生ワクチンについても鶏から鶏への同居感染は認められなかった（別紙 20）。本遺伝子組換え生ワクチンのウイルス排泄について確認したところ、接種鶏の羽包にウイルスが確認されたものの（別紙 19）、粉塵及び敷き藁から感染性ウイルスは検出されず（別紙 29）、飼育環境中へのウイルス排泄量は非常に少ないと考えられた。

アルファヘルペスウイルス弱毒生ワクチンは HSV-1 等の人用を含め、動物用に関しても MDV をはじめ広く使用されている。一方、近年、自然組換えによる病原性の獲得に関するリスクについて問題提起されている（文献 25、29、30）。しかしながら、組換えが起こるには、ウイルス間に遺伝子レベルで有意な相同性があり、同一の宿主に感染した上で、同一の細胞に感染する必要があり、自然界では宿主側、ウイルス側で様々な制約があるため、その頻度は限定的である。

本遺伝子組換え生ワクチンの用法は発育鶏卵内接種又は初生鶏へ皮下接種である。MDV は介卵感染しないため、ワクチン接種時には対象鶏は MDV に感染していないと想定されることから、本遺伝子組換え生ワクチンと MDV が重感染する機会はない。また、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏から他の MDV 感染鶏への伝播による組換えリスクに関しては、本遺伝子組換え生ワクチンは鶏間での伝播の可能性は低いため（別紙 20）、重感染の機会は非常に低いと考えられる。

HVT の本来の保有動物は七面鳥であるが、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏と SPF 七面鳥の同居によってウイルスは伝播したものの（別紙 21）、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏を飼育した敷き藁で飼育した SPF 七面鳥への伝播は認められなかったことから（別紙 30）、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏飼育環境からの七面鳥への感染は認められず、最も HVT 感受性が高い七面鳥に対してでも、自然感染が成立するためには、本遺伝子組換え生ワクチン接種鶏とのみ七面鳥単独で同居する等の密接な接触が必要である。一方、養鶏場で鶏と七面鳥が同居するような状況は通常考えられないため、重感染のリスクはほとんどない。

養鶏場ではマレック病予防のため、1970 年代から HVT 単味ワクチンが使用されていたが、1980 年代以降マレック病の病原性増強に伴い HVT と MDV2 を組み合わせた 2 価ワクチンが導入され、その後、弱毒 MDV1 生ワクチンも導入された（文献 23、24）。環境中に複数の血清型が同時に存在する場合があることから同時感染の機会が想定されるが、HVT と他の MDV 血清型との間の *in vivo* における自然組換えは報告されていない（文献 1、15、25）。本遺伝子組換え生ワクチンと野外株を鶏に共感染させた場合においても MD の病原性が変化することはなかった（別紙 32）。

HVT は七面鳥を本来の宿主とし、野生の七面鳥において HVT がユビキタスに存在することは知られている。また、鶏に対して MD 予防のため HVT ワクチンが広く使用されていることから鶏においても遍在しているが、それ以外の野生の鳥類における HVT の伝播はよく知られていない（文献 17）。一方、MDV は鶏を自然宿主とし、同じキジ目の七面鳥、ウズラ、コウライキジに感受性があることが報告されており（文献 17）、カモ目のマガンから分離が報告された（文献 3）。実験的に本遺伝子組換え生ワクチン高用量をコウライキジに接種したところ、感染が成立することが確認されたが、抗体陽転の程度は鶏よりも低かった。また、臨床症状や病変等は観察されず安全性が確認された（別紙 23）。実験感染によりアヒルが MDV 抗体を産生したとの報告はあるが、アヒル、スズメ、ヤマウズラ、ハト及びクジャクは MDV 感染に対して抵抗性があると考えられている（文献 17）。これらのことから、七面鳥以外のキジ目野鳥に対する HVT の感受性は鶏より低いと考えられ、それ以外の野鳥の感受性はほとんどないと考えられることから、本遺伝子組換え生ワクチンの野鳥を介した伝播のリスクは極めて低いと考えられる。

HVT は鳥類のリンパ球にのみ指向性を示すことより、感受性のある動物は鳥類に限定される（文献 17）。MDV はヒトを含む霊長類（アカゲザル、カニクイザル、ボンネットモンキー、マーモセット）、ラット、ハムスター等の哺乳類には感染しないとされ（文献 17）、また MDV CVI988 株を誤ってヒトに接種した際に抗体が陽転しなかった事も報告されている（文献 33）ことから、本遺伝子

組換え生ワクチンの哺乳類への伝播リスクはない。

本遺伝子組換え生ワクチンは既に世界中の何十億という鶏に対して接種が行われているが、人や他の種への伝播は報告されていない。

⑤　その他必要な情報

-

II　項目ごとの生物多様性影響評価

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

(1)　影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主の属する分類学上の種であるHVTに微生物を減少させる性質は報告されていない。本遺伝子組換え微生物は、IBD VP2蛋白質を発現すること以外はワクチン株の宿主と同様な細胞指向性であり、細胞の生存できる環境が必須の増殖様式である。また、IBD VP2蛋白質に毒性があるという報告はない。鶏から鶏へ、鶏から七面鳥への同居感染性もなく、本遺伝子組換え微生物を接種した鶏体内からのウイルス分離量は宿主の1/4であり、増殖能は宿主と比較して高くない。また、接種鶏の敷き藁等から感染性ウイルスは検出されなかった。これらのことから、飼育環境中への排泄量については非常に少なく、他の微生物を減少させる性質に関しては宿主ウイルスから変化していないと考えられる。

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

(2)　影響の具体的内容の評価

－

(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

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

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

(1)　影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え微生物は宿主vHVT株の親株であるHVT FC126株と同一の細胞指向性及び増殖様式を示し、鶏から鶏への同居感染は起こらない。また、接種鶏の羽包には感染性ウイルスは確認されたものの飼育環境中の粉塵及び敷き藁からは検出されず、ウイルスの環境中への排泄量は非常に少ない。更に、本遺伝子組換え微生物の鶏体内での増殖能は宿主と比較して高くなく、垂直（介卵）感染は起こらない。HVTは七面鳥が本来の保有動物であるが、それ以外の野生の鳥類における伝播はよく知られていない。本遺伝子組換え微生物のコウライキジへの実験感染の結果等から、七面鳥以外のキジ目野鳥に対するHVTの感受性は鶏より低いと考えられ、キジ目以外の野鳥への自然感染性はほとんどないと推察される。また、HVT FC126株は、1970年代か

らマレック病に対する生ワクチンとして鶏に対して世界中で用いられており、日本においても市販されているが、これまでに野生動植物に対する病原性は報告されていない。また、哺乳動物に対しては体内で複製できないことから病原性はない。

以上から、病原性に起因する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

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

3 有害物質の産生性（野生動植物の生息または生育に支障を及ぼす物質を産生する性質）

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本遺伝子組換え微生物は、宿主である七面鳥ヘルペスウイルス vHVT 株の *Bam*HI-I 領域の挿入遺伝子座にその領域に元々あった orf の発現は妨げないように IBDV *VP2* 遺伝子を挿入している。HVT は非病原性で有害物質の産生性は知られておらず、供与核酸は IBDV のカプシド蛋白質 VP2 をコードするが、当該蛋白質がアレルギー性等有害な性質を有するとの報告はない。供与核酸及びベクターを構成する遺伝子配列が明らかにされており、有害な塩基配列を含まない。

以上から、本組換え微生物について有害物質の産生性に起因する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

よって、第一種使用規程に従った使用を行う限り、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

HVT はヘルペスウイルスで、通常、ゲノムを感染動物の染色体に組み込み、水平伝播する性質は持たない。近縁ウイルスとの相同組換えの可能性については、

MD に対して一般的に多価ワクチンが使用されているが、HVT と他の血清型の MDV との間の *in vivo* における自然組換えは報告されていない。また、野外では MDV 以外のアルファヘルペスウイルス亜科に属する鳥類のウイルスである ILTV のワクチンと併用して使用されているが、これまで組換えによると考えられる問題は起こっていない。同種ウイルスとの相同組換えの可能性については、本遺伝子組換え微生物を接種した鶏から同居鶏への伝播性の可能性が非常に低く、野外において重感染の機会がほとんどないため組換えリスクは極めて低いと考えられる。

以上から、本遺伝子組換え微生物について核酸を水平伝播する性質に起因する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

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

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）

上記の他に、本組換え体に関して生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる性質はないと判断した。

III 生物多様性影響の総合的評価

他の微生物を減少させる性質については、IBD VP2 蛋白質を発現すること以外は宿主の属する分類学上の種である HVT と当該遺伝子組換え微生物間に基本的性状に違いはなく、増殖能は宿主と比較して低いことから、環境中への排泄量は非常に少なく、第一種使用規定に従った使用を行う限り、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

病原性については、宿主ウイルスと当該遺伝子組換え微生物は同等で非病原性であり、鶏から鶏へ同居感染の可能性は非常に低く、垂直（介卵）感染も起こらない。また、一部の鳥類以外には感染せずいずれの動物種に対しても病原性が確認されていないことから、第一種使用規程に従った使用を行う限り、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

有害物質の産生性については、当該遺伝子組換え微生物は宿主ウイルスと同様、有害物質の産生性は認められず、供与核酸についても既存の orf の発現は妨げず有害な塩基配列を含まないことから、第一種使用規程に従った使用を行う限り、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

核酸を水平伝達する性質については、当該遺伝子組換え微生物は宿主ウイルスと比較して低下していると考えられ、他国での使用実績からも第一種使用規程に従った使用を行う限り、水平伝達に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

以上を総合的に評価し、当該遺伝子組換え微生物を第一種使用規定に従った使用を行う限り、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

参考文献

1 Calnek B.W. and Witter R.L. (ed.) 1997
Marek's disease, in *Disease of poultry*, 10th ed. 375-377, Iowa State University Press, Ames, Iowa

2 Schat K.A.
Marek's disease: a model for protection against herpesvirus-induced tumors.
Cancer Surveys vol.6, 1987, 1-37

3 淺川光彦
渡り鳥の感染症―マレック病感染マガン発見を機に考える
日本獣医師会雑誌 2002：55 巻：264－265

4 Witter R.L. et al.
Studies on the *in vivo* replication of turkey herpesvirus
Journal of the National Cancer Institute, 49, 1121-1129, 1972

5 Witter R.L. and Solomon J.J.
Epidemiology of a Herpesvirus of Turkeys: Possible sources and spread of infection in turkey flocks.
Infection and Immunity, 356-361, 1971

6 ウイルス／日本ウイルス学会編
獣疫ウイルス研究の歩み
日本ウイルス学会 25 周年記念、ウイルス 28（記念号）、93-117、1978

7 加藤四郎
マレック病ウイルス及び七面鳥ヘルペスウイルスについて
鶏病研究会報 1972：8 巻 2 号：44-60

8 Shamblin C.E., Greene N., Arumugaswami V., Dienglewicz R.L., Parcells M.S.
Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence.
Vet. Microbiol. 102, 147-167, 2004

9 Purchase H.G., Burmester B.R. and Cunningham C.H.
Responses of cell cultres from various avian species to Marek's disease virus and herpes of turkeys.
American Journal of Vet. Research, 32-11, 1811-1823, 1971

10 Hlozanek I. and Sovona V.
Lack of pathogenicity of Marek's disease herpesvirus and herpesvirus of turkey for mammalian hosts and mammalian cell cultures.

Folia Biol., 20, 51-58, 1974
11 Meumelans G, Halen P. and Schyns P.
Susceptibility of mammalian and avian cell cultures to infection with cell-free turkey herpesvirus.
J.Comp.Path., 83, 605-508, 1973
12 Witter R.L. and Solomon J.J.
Experimental infection of turkeys and chickens with a herpesvirus of turkeys (HVT)
Avian Diseases, 16, 34-44, 1972
13 Purchase H.G., Okazaki W, and Burmester B.R.
Lon-term field trials with the herpesvirus of turkeys vaccine against Marek's disease.
Avian Dis. 16, 57-71, 1972
14 Calnek B.W. and Witter R.L.
Marek's disease, in *Disease of poultry*, 1997, 10th ed., 390-392
15 Biggs P.M.
The history and biology of Marek's disease virus.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 255, 1-24, 2001
16 Kawamura H., King D.J.Jr,, and Anderson D.P.
A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys.
Avian Dis. 13, 853-863, 1969
17 Schat KA, Venugopal Nair
Marek's disease.
Editor-In-Chief, Saif. Y.M. Diseases of Poultry. 12th ed., Blackwell Publishing, 2008: 452-514.
18 Prasad L.B.M.
Turkey herpesvirus and Marek's disease virus. A comparative appraisal.
Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis., 2, 335-358, 1979
19 野田雅博、松田俊二、小林正夫
消毒剤の殺ウイルス効果に関する検討 ー殺ウイルス効果に及ぼす血清蛋白の影響ー
感染症学雑誌 74, 664-669, 2000
20 Cho B.R. and Kenzy S.G.
Horizontal transmission of turkey herpesvirus to chickens.
Poultry Sci., 54, 109-115, 1975
21 Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Rock D.L., and Kutish G.F.

The genome of turkey herpesvirus
J. Virol. 75, 971-978, 2001

22 Gennart I., Coupeau D., Pejakovic S., Laurent S., Rasschaert D., and Muylkens B.
Marek's disease: Genetic regulation of gallid herpesvirus 2 infection and latency
Vet J. 205, 339-348, 2015

23 Baigent S.J., Smith L.P., Nair V.K., and Currie R.J.W
Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection
Vet Immunol Immunopathol. 112, 78-86, 2006

24 Gimeno I.M.
Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow?
Vaccine, 26S, C31-41, 2008

25 Thiry E., Meurens F., Muylkens B., McVoy M., Gogev S., Thiry J., Vanderplasschen A., Epstein A., Keil G., and Schynts F.
Recombination in alphaherpesviruses
Rev Med Virol. 15, 89-102, 2005

26 Meurens F., Schynts F., Keil G.M., Muylkens B., Vanderplasschen A, Gallego P., and Thiry E.
Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1
J. Virol, 78, 3872-3879, 2004

27 Lee L.F., Cui F.X., Gimeno I., Lupiani B., and Reddy S.M.
Characterization of a very virulent Marek's disease virus mutant expressing the pp38 protein from the serotype1 vaccine strain CVI988/Rispens
Virus Genes, 31, 73-80, 2005

28 Muylkens B., Farnir F., Meurens F., Schynts F., Vanderplasschen A., Georges M., and Thiry E.
Coinfection with two closely related alphaherpesviruses results in a highly diversified recombination mosaic displaying negative genetic interference.
J. Virol, 83, 3127-3137, 2009

29 Jarosinski K.W.
Dual infection and superinfection inhibition of epithelial skin cells by two alphaherpesviruses co-occure in the natural host
PLoS One, 7, 1-15, 2012

30 Sloutskin A., Yee M.B., Kinchington P.R., and Goldstein R.S.
Caricella-zoster virus and herpes simplex virus 1 can infect and replicate in the same neurons whether co- or superinfected
J Virol. 88, 5079-5086, 2014

31 Hughes A.L. and Rivailler P.
Phylogeny and recombination history of gallid herpesvirus 2 (Marek's disease virus) genomes
Virus Res. 130, 28-33, 2007

32 近藤一博
18. HHV-6・HHV-7　－β-ヘルペスウイルスの共通点と相違点―
ウイルス 52, 117-122, 2002

33 Rispens BH, van Vloten H, Mastenbroek N, Maas JL, Schat KA
Control of Marek's disease in the Netherlands. II. Field trials on vaccination with an avirulent strain (CVI 988) of Marek's disease virus.
Avian Dis. Apr;16(1):126-38. 1972

.