

第一種使用規程承認申請書

平成 30 年 7 月 10 日

農林水産大臣 齋藤 健 殿

環 境 大 臣 中川 雅治 殿

ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社

代表取締役社長 永田 正

東京都品川区大崎二丁目 1 番 1 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><i>Npro</i> 及び <i>Ems</i> 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 ddBVD Tub 1 株      ならびに <i>Npro</i> 及び <i>Ems</i> 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型 ddBVD Tub 2 株      ( <i>Npro</i> , <i>Ems</i> , Bovine viral diarrhea virus type 1, Bovine viral diarrhea virus type 2 )( BOVELA )</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>医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律 ( 昭和 35 年法律第 145 号。以下、「医薬品医療機器等法」という。 ) 第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験 ( 以下、「治験」という。 ) に該当する場合は同法第 80 条の 2 第 2 項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</p> <p>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 ( に該当する行為は除く。 )</p> <p>接種 ( 牛への接種 )</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に伴う場合を含む。 )</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>



*Npro* 及び *Ems* 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 ddBVD Tub 1 株  
ならびに  
*Npro* 及び *Ems* 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型 ddBVD Tub 2 株  
( *Npro* , *Ems* , Bovine viral diarrhea virus type 1,  
Bovine viral diarrhea virus type 2 )( BOVELA )  
の生物多様性影響評価書

ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社

2018 年 7 月



*Npro* 及び *E<sup>ms</sup>* 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 ddBVD Tub 1 株ならびに *Npro* 及び *E<sup>ms</sup>* 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型 ddBVD Tub 2 株( *Npro* , *E<sup>ms</sup>* ,Bovine viral diarrhea virus type 1, Bovine viral diarrhea virus type 2 )( BOVELA ) 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あたり収集した情報.....	1
1	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	1
(1)	分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	1
イ	分類学上の位置・学名(属及び種)及び和名.....	1
ロ	宿主の株名.....	1
ハ	自然環境における分布状況(宿主として野生株を用いる場合).....	2
(2)	使用等の歴史及び現状.....	2
(3)	生理学的及び生態学(生物学)的特性.....	3
イ	基本的特性.....	3
ロ	生息又は生育(増殖)可能な環境条件.....	6
ハ	捕食性又は寄生性.....	6
ホ	病原性.....	7
ヘ	有害物質の産生性.....	8
ト	その他の情報.....	9
2	遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	10
(1)	供与核酸に関する情報.....	10
イ	構成及び構造要素の由来.....	10
ロ	構成要素の機能.....	11
(2)	ベクターに関する情報.....	12
イ	名称及び由来.....	12
ロ	特性.....	15
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法.....	16
イ	宿主内に移入された核酸全体の構成.....	16
ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法.....	16
ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	18
(4)	細胞内(宿主体内)に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	

イ	移入した核酸の遺伝子組換え生物における存在状態.....	18
ロ	目的遺伝子の宿主内での発現の安定性.....	18
ハ	特定のファージの感染等によって目的遺伝子の宿主以外の生物への伝達性が生じるおそれの有無.....	20
(5)	<b>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.....</b>	<b>20</b>
(6)	<b>宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....</b>	<b>21</b>
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.....	21
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.....	27
<b>3</b>	<b>遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....</b>	<b>28</b>
(1)	使用等の内容.....	28
(2)	使用等の方法.....	29
(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.....	29
(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	29
(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	29
(6)	国外における使用等に関する情報.....	29
イ	海外における市販状況.....	29
ロ	欧州医薬品局提出資料.....	30
(7)	接種動物の体内における挙動に関する情報.....	33
イ	接種動物の体内における遺伝子組換え微生物の消長に関する情報.....	33
ロ	接種動物体及び接種動物の排泄物、血液・体液、卵等からの遺伝子組換え微生物の環境への拡散の有無に関する情報.....	33
ハ	接種動物において遺伝子組換え微生物の垂直感染の可能性の有無に関する情報.....	34
ニ	野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報.....	34
ホ	その他必要な情報.....	35
<b>II</b>	<b>項目ごとの生物多様性影響評価.....</b>	<b>36</b>
<b>1</b>	<b>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)</b>	<b>36</b>
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	36
(2)	影響の具体的内容の評価.....	37
(3)	影響の生じやすさの評価.....	37



(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断 .....	37
<b>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） .....</b>	<b>37</b>
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	37
(2) 影響の具体的内容の評価 .....	38
(3) 影響の生じやすさの評価 .....	38
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断 .....	38
<b>3 有害物質の産生性（野生動植物の生息又は育成に支障を及ぼす物質を産生する性質） .....</b>	<b>38</b>
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	38
(2) 影響の具体的内容の評価 .....	39
(3) 影響の生じやすさの評価 .....	39
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断 .....	39
<b>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） .....</b>	<b>39</b>
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 .....	39
(2) 影響の具体的内容の評価 .....	39
(3) 影響の生じやすさの評価 .....	39
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断 .....	39
<b>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） .....</b>	<b>40</b>
<b>III 生物多様性影響の総合評価 .....</b>	<b>40</b>
<b>引用文献 .....</b>	<b>41</b>
<b>本申請書で使用する略号・用語表 .....</b>	<b>45</b>



本申請は、表題に示した 2 株の遺伝子組換え微生物の双方を含むワクチンに関する使用について行うものである。

本申請対象の遺伝子組換え微生物（以下、「本遺伝子組換え微生物」という。）は、遺伝子欠損を遺伝子組換え技術で生じさせたウイルスである。本遺伝子組換え微生物にはウイルス以外の外来性の遺伝子は含まれない。本申請書においては、宿主は組換え前の親株、遺伝子組換え微生物は欠損を生じさせた株と定義して記載する。

## I 生物多様性影響の評価にあたり収集した情報

### 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

##### イ 分類学上の位置・学名（属及び種）及び和名

フラビウイルス科ペスチウイルス属牛ウイルス性下痢ウイルス

科 (Family) : フラビウイルス科 (Flaviviridae)

属 (Genus) : ペスチウイルス属 (Pestivirus)

種 (Species) : 牛ウイルス性下痢ウイルス (Bovine viral diarrhea virus (BVDV))

フラビウイルス科ペスチウイルス属は牛ウイルス性下痢ウイルス、豚コレラウイルス、ボーター病ウイルスを代表とする動物ウイルスの総称であり、40~60 nm のエンベロープを有するウイルスである(文献 1)。類似した遺伝子構造を持ち、その中の *N<sup>pro</sup>* 及び *E<sup>ms</sup>* の遺伝子産物については、病原性に關与しているとの報告がある(詳細については 1 の(3)のイの に記載、文献 2)。人への感染は知られていない(文献 3)。

牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、「BVDV」という。）は、エンベロープを有し、核酸としてプラスの一本鎖リボ核酸 (ribonucleic acid、RNA) を持つ。さらに、RNA の 5' 非翻訳領域 (5' UTR)、N 末端の自家プロテアーゼ (*N<sup>pro</sup>*) あるいはエンベロープ糖タンパク質 (E2) 遺伝子領域の解析又はモノクローナル抗体による反応性から、1 型及び 2 型に分けられる。

主に牛に感染するが、家畜動物としての豚、ヒツジ、ヤギ、あるいは野生反すう動物に感染しているとの報告がある。多くの場合不顕性感染であるが、牛では牛ウイルス性下痢-粘膜病 (Bovine viral diarrhea-mucosal disease, BVD-MD) の原因ウイルスとして知られ、発熱、下痢、呼吸器症状、致死的な MD の発症、流産等で多大な経済的損失の原因となっている (文献 1)。

##### ロ 宿主の株名

フラビウイルス科ペスチウイルス属牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型(以下、「BVDV-1」という。)KE9 株

フラビウイルス科ペスチウイルス属牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型(以下、「BVDV-2」という。)NY93 株

宿主 KE9 株及び NY93 株は、ワクチン開発に有利な性質を有することから選択された病原性の BVDV 野外分離株である。主な感受性動物は反すう動物の牛であり、BVD-MD を引き起こす。

ワクチン開発開始当時、BVDV においては明確な弱毒化の定義がなく、BVDV の感染においては再現性の高い発症モデルを攻撃実験等で得ることは難しかったため、発症した動物から分離された野外株が

遺伝子組換えという明確な手段によって BVDV の病原性と結びついた性質である潜伏感染性、同居感染性、垂直感染性を欠損させることで、弱毒化したことが明確になるようにするため、BVDV-1 については KE9 株、BVDV-2 については NY93 株を選択した。

## 八 自然環境における分布状況（宿主として野生株を用いる場合）

国内及び国外のいずれにおいても BVDV の主な感受性動物は偶蹄類反すう動物である牛であるため、世界中の牛を飼育している地域を中心に主に分布していると考えられる。海外ではラクダ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、アルパカ、ビクーニャといった家畜反すう動物の他に野生種ヤギやシカといった野生反すう動物にも感染が認められ、偶蹄類の豚、イノシシ、その他の哺乳類として野生種ウサギでも感染の報告がある。主に BVDV-1 の検出が家畜飼育地域の周辺部の野生反すう動物に報告されており、BVDV-2 については報告がみられない（感受性動物の詳細については I の 1 の(3)のイの に記載）。

KE9 株は、ドイツで定期的に行われる“Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt des Landes Schleswig-Holstein<sup>\*</sup>”によるスクリーニングで、ニーダーザクセン州の下痢の認められた牛から分離された CPE(-) NCP 型<sup>\*\*</sup>の野外分離株で、Federal Research Institute for Viral Disease (Friedrich Löffler Institute), Tübingen, ドイツの G. Meyers 博士から入手されたものである。BVDV-1b 株は世界的に確認されているが、BVDV-1b 株の KE9 株（文献 46）は、日本及び米国での分離株とは異なる独自のクラスターを形成するドイツ固有の株であることが確認されている（文献 47）。

一方、NY93 株は NCP 型の北米分離株である。米国、カナダ及びイングランドで BVDV 感染が流行した時期があり、北米では 1993 年から 1995 年にかけて確認された（文献 48）が、その後流行は確認されていない。1993 年に、NY93 株は米国ニューヨークでコーネル大学の E. Dubovi 博士によって分離された（文献 49）。その後、G. Meyers 博士のラボにいた K. Elbers 博士（ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルス所属）を経て入手されたものである。

## (2) 使用等の歴史及び現状

我が国では BVDV に起因する感染症の予防として不活化ワクチン及び生ワクチンが使用されている。BVDV-1 及び BVDV-2 とも弱毒化された株が牛用の生ワクチンの有効成分として使用されており、2018 年 3 月現在で、BVDV-1 及び BVDV-2 の両方の有効成分を含有する生ワクチンは 1 製品で、他の有効成分 4 種類（牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、牛 RS ウイルス及び牛アデノウイルス 7 型）も含まれる多価ワクチンである（別紙 1-1）。なお、不活化ワクチンは複数回の接種が必要となり、生ワクチンの妊娠牛の使用には、持続感染（persistent infection, PI）牛を産出しないよう細心の注意を払っている。

BVDV-1 の KE9 株及び BVDV-2 の NY93 株はともに、過去の産業利用はない。

\* シュレスヴィヒホルスタイン食品・獣医学研究室。ドイツ国内における日本の家畜保健所に相当する機関。

\*\* BVDV には、培養時の細胞に CPE（細胞変性効果、cytopath(ogen)ic effect）を示さない NCP 型（非細胞変性型）と、CPE を示す CP 型（細胞変性型）が存在する。

### (3) 生理学的及び生態学（生物学）的特性

#### イ 基本的特性

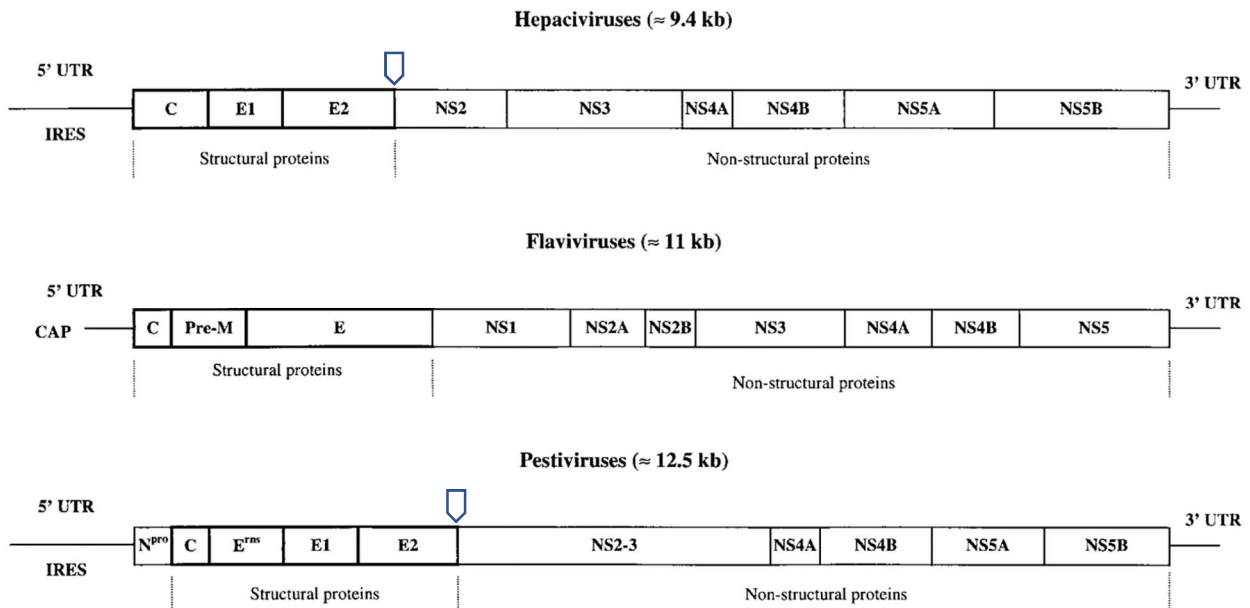
ペスチウイルスの基本的性状

1の(1)のイにも記載のとおり、フラビウイルス科ペスチウイルス属は牛ウイルス性下痢ウイルス、豚コレラウイルス、ボーター病ウイルスを代表とする動物ウイルスの総称であり、40～60 nmのエンベロープを有する一本鎖プラス RNA を核酸として有するウイルスである（文献1）。

遺伝子学的性状

BVDVを含むフラビウイルス科ペスチウイルス属の遺伝子は、コードされているタンパク質の順番が N<sup>pro</sup>-C-E<sup>ms</sup>-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B であり（図 1-1、別紙 1-2 の 1-2-1、文献 2）非構造タンパク質の N<sup>pro</sup> 及び構造タンパク質の E<sup>ms</sup> をもつことが他のフラビウイルス科の属とは異なる特徴である。5' 及び 3' 末端側の非翻訳領域（UTR）はそれぞれ 375 b 以下及び 220 b 以下で、分子量は約  $6 \times 10^7$  ダルトン、シヨ糖密度勾配による密度は 1.10～1.15 g/cm<sup>3</sup>、ウイルス粒子が安定な pH 域は 5.7～9.3 である。

図 1-1 フラビウイルス科に属するウイルス属の基本遺伝子構造



(別紙 1-2 の 1-2-1、文献 2 Leyssen *et al.*, 2000 より抜粋)

上から、ヘパシウイルス属、フラビウイルス属及びペスチウイルス属の遺伝子構造を示した。ヘパシウイルス属及びペスチウイルス属にはウイルス粒子を形成する構造タンパクである p7 が矢印 ( ) の位置に存在する。ヘパシウイルス属では C、E1 及び E2 の 3 遺伝子にウイルス構成タンパク質がコードされ、フラビウイルス属では C、Pre-M 及び E である。

ペスチウイルス属では、C、E<sup>ms</sup>、E1 及び E2 の 4 遺伝子にウイルス構成タンパク質がコードされており（別紙 1-2 の 1-2-2 及び 1-2-3、文献 4 及び 5）E<sup>ms</sup> 及び E2 に対する抗体がウイルス中和活性をもつことが知られている（別紙 1-2 の 1-2-4 及び 1-2-5、文献 6 及び 7）。N<sup>pro</sup> は感染動物の 1 型インターフェロンを抑制することにより、ウイルスが増殖しやすい環境を作ることが知られている（文献 8）。遺伝子産物である約 4,000 アミノ酸のポリペプチドは 12 種類の成熟タンパク質となる。

UTR：非翻訳領域

## 生化学的・生物学的性状

BVDV の遺伝子である 1 本鎖 RNA は、前段の で示したとおりにペスチウイルス属に特有な構造で *Npro*、*C*、*E<sup>ms</sup>*、*E1*、*E2*、*p7*、*NS2/3*、*NS4A*、*NS4B*、*NS5A* 及び *NS5B* で構成されている。

*Npro* の遺伝子産物は、ペスチウイルス属に特有の 168 個のアミノ酸からなる非構造タンパク質で、自然に開裂して N 末端ドメインと C 末端ドメインの 2 つのタンパク質となる。N 末端側のタンパク質はプロテアーゼで、システインプロテアーゼ活性があり、*Npro* の遺伝子産物を開裂させる機能を有する。C 末端側のタンパク質は亜鉛結合 TRASH モチーフ (Cys-Cys-Asp-Cys) が含まれており、インターフェロン制御因子-3 (interferon regulatory factor-3: IRF-3) に結合して 1 型インターフェロンの産生を阻止する機能を有する (文献 8 及び 9)。

*E<sup>ms</sup>* 遺伝子産物は *C*、*E1* 及び *E2* とともにウイルス外殻を構成するタンパク質で、*E<sup>ms</sup>* は中和抗体の結合部位、感染動物に抗原として認識されて免疫反応を誘導する部位であることが報告されている。また、*E<sup>ms</sup>* 遺伝子産物はリボヌクレアーゼ活性を持っており、ウイルス外膜のウイルス RNA によって誘導されるインターフェロンの発現を阻止し、BVDV の持続感染性に大きな役割を果たしていると考えられている (文献 10)。

BVDV は、1 の(1)のイにも記載のとおり、5' 非翻訳領域 (5' UTR)、N 末端の自家プロテアーゼ (*Npro*) あるいはエンベロープ糖タンパク質 (*E2*) 遺伝子領域の解析 (文献 11) 又はモノクローナル抗体による反応性から、1 型及び 2 型に分けられる (文献 40)。

また、細胞へ感染させた場合の BVDV の性状として、CPE を示めす CP 株と CPE を示さない NCP 株が存在する。

## 感受性動物、感染経路、感染様式等

BVDV の主な感受性動物は偶蹄類反すう動物である牛である。牛以外の BVDV 感受性動物としては、抗体の検出あるいは逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) での抗原検出により、ラクダ (文献 12 及び 13)、ヒツジ (文献 12、13、14、15 及び 20)、ヤギ (文献 12 及び 15)、ラマ (文献 13、16、17 及び 18)、アルパカ (文献 13、14、16、17 及び 20)、豚 (文献 12、13、14、19 及び 20)、ビクーニャ (文献 21) といった家畜化されている動物の他、野生種ヤギ (mountain goats (*Oreamnos americanus*), eland 等、文献 14、20、22、23、24 及び 25)、シカ (red deer, white-tailed deer, mule deer, mouse deer 等、文献 12、13、14、23、24、26、27 及び 28)、野生ウサギ (文献 29)、イノシシ (文献 30) が報告されている。また、近年マウスでの BVDV 実験感染が成立したとの報告がされた (文献 31) が、マウスの自然感染例は報告されていない。野生偶蹄類では主に BVDV-1 の感染が報告されているため、BVDV-1 は牛が家畜として飼育されている地域とその周辺部の野生反すう動物が分布する地域、BVDV-2 は牛飼育地域に存在するものと考えられる。

文献的調査で、野生の感受性動物における抗体保有率は 0~6.01% の範囲であり、野生動物において BVDV が流行したような報告はされていない。牛以外の動物における自然感染での病原性は報告されていない\*。

日本国内では、農研機構 動物衛生研究所の 2012 年の報告 (文献 32) があり、日本全国から収集さ

---

\* 製造元における申請書記載内容並びに 2017 年以前の PubMed による文献検索を実施。キーワード: BVDV, infection, pathogenic

れた牛由来 47 検体から主に BVDV-1 が分離され( 1a 型 36.2%、1b 型 40.4%、1c 型 8.5%、1j 型 2.1% ) BVDV-2 ( 2a 型 ) は 12.8%程度の検出率であった。

牛における感染については、分泌物に排出されたウイルスへの接触あるいは妊娠牛から胎子への垂直感染が考えられる。

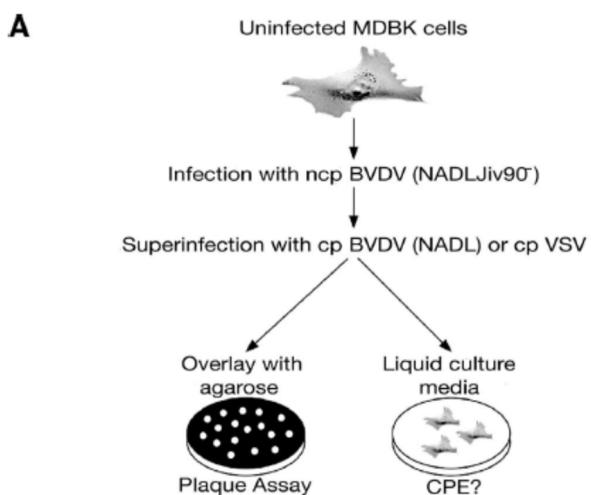
BVDV は感染動物の分泌物にウイルスが排せられるため、鼻汁、糞尿などへの接触による感染が主である。動物体内に侵入した後は、免疫細胞表面受容体の CD46 分子にウイルスが付着して免疫細胞内に取り込まれ、血液を介して動物体内に広く分布する。

CD46 分子は広く哺乳類の免疫細胞に分布することが知られているが、本項目の最初に述べたとおりペスチウイルス属の BVDV は反すう動物を含む偶蹄類に感染することが報告されており、例えば CD46 分子を保有するヒトには感染しないとされている ( 文献 3 )

### その他の性状

BVDV は、一本鎖プラス RNA をもつフラビウイルス科ペスチウイルス属のウイルスである。細胞が一度ウイルスに感染すると、最初のウイルスと同種のウイルスの重感染は阻害されるという性質をもつものが多い。ペスチウイルス属のウイルスもその性質を有するウイルスであり、BVDV が感染している細胞には別の BVDV は感染できないという性質をもつ ( Superinfection Exclusion ( 重感染排除 ) 図 1-2、別紙 1-3、文献 33 )。この特性は感染後 30 ~ 60 分で成立し、後から感染しようとするウイルスの侵入を阻止することも含め、感染細胞にウイルスが侵入したときゲノムの翻訳がされなくなる。このメカニズムは、E2 糖タンパク質が関与するウイルス侵入段階と、RNA の複製段階の 2 つの段階でブロックされていると考えられる。この性質を利用して、国家検定のウイルス含有量試験も実施される製品がある。

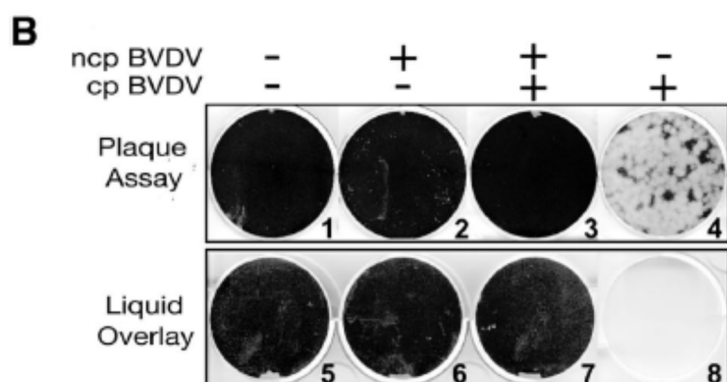
図 1-2 BVDV の Superinfection Exclusion の現象



A : 実験内容の概要をフロー図に示した。MDBK 細胞に CPE を示さない性質の ncpBVDV を先に MOI = 10 で感染させてから、CPE を示す cpBVDV あるいは水疱性口炎ウイルス ( VSV ) をさらに感染させて\*、重層寒天培地を用いたブラックアッセイと通常の培養液による観察を行った。後から感染させた cpBVDV が細胞に感染すると、CPE が認められるはずである。ブラックアッセイでは CPE を示すウイルスが存在する場合、寒天培地である程度ウイルスの存在する場所が限定されるため、円状に細胞が変性する。通常の培養液ではウイルスが自由に動き回れるため、感染すると細胞全体がシャーレの壁面からはがれる。細胞はクリスタルバイオレットで染色し、CPE が示されている場合は白く抜ける。

( 次ページに続く )

図 1-2 BVDV の Superinfection Exclusion の現象 ( 続き )



B : 実験したところ、対照 ( 非感染細胞、1 及び 5 )、ncpBVDV のみの感染細胞 ( 2 及び 6 )、ncpBVDV を感染させてから cpBVDV を感染させた細胞 ( 3 及び 7 ) は CPE を示さないが、cpBVDV のみの感染細胞 ( 4 及び 8 ) は CPE を示す。一方、異種である VSV を感染させた場合には、重感染が成立する。

\*文献には重感染させた cpBVDV 及び VSV のウイルス量は記載されていないが、ncpBVDV とほぼ同等の  $5 \times 10^6$  FFU であると考えられる。FFU はウイルス量の単位で、フォーカス形成単位 ( focus forming unit )。

#### ロ 生息又は生育 ( 増殖 ) 可能な環境条件

自然界における主な BVDV 感受性動物は牛である ( (3) のイの )。

KE9 株及び NY93 株双方とも、培養細胞 ( MDBK 細胞 : 牛腎株化細胞 ) において、CPE を伴わずに増殖する。

BVDV は C 型肝炎ウイルス ( HCV ) のモデルウイルスとして実験に使用されており、その性質が HCV に似ていると推察される。医療現場において、HCV は室温の環境表面で 7 日間は生存可能であるとされている。紫外線 ( UV、波長 254 nm ) では  $300 \text{ mJ/cm}^2$  の照射で  $10^7 \text{ TCID}_{50}^*/\text{mL}$  程度のウイルスが検出限界以下まで減衰するとの報告がある ( 文献 34 )。よって、BVDV ( KE9 株及び NY93 株を含む ) についても同等の性質であると考えられる。

BVDV は豚コレラウイルスと同じ属であり、畜舎等の消毒には豚コレラウイルスと同様の消毒あるいは不活化処理が有効であると考えられる。生石灰 ( 酸化カルシウム )、消石灰 ( 水酸化カルシウム )、苛性ソーダ ( 水酸化ナトリウム ) 等のアルカリ消毒剤や次亜塩素酸ナトリウム、逆性石鹼 ( 四級アンモニウム塩 )、加熱処理によって不活化される。

製造元で実施した消毒剤等の効果試験では、70% イソプロパノール、3% 又は 5% 次亜塩素酸ナトリウム、フェノール系消毒薬、アルコール系消毒薬において室温 10 分間での不活化が確認されている ( 別紙 1-4 )。

#### ハ 捕食性又は寄生性

\*  $\text{TCID}_{50}$  ( Tissue Culture Infectious Dose 50 ) は、細胞にウイルスの CPE が認められる性質を利用してウイルス量を測定する場合の単位である。

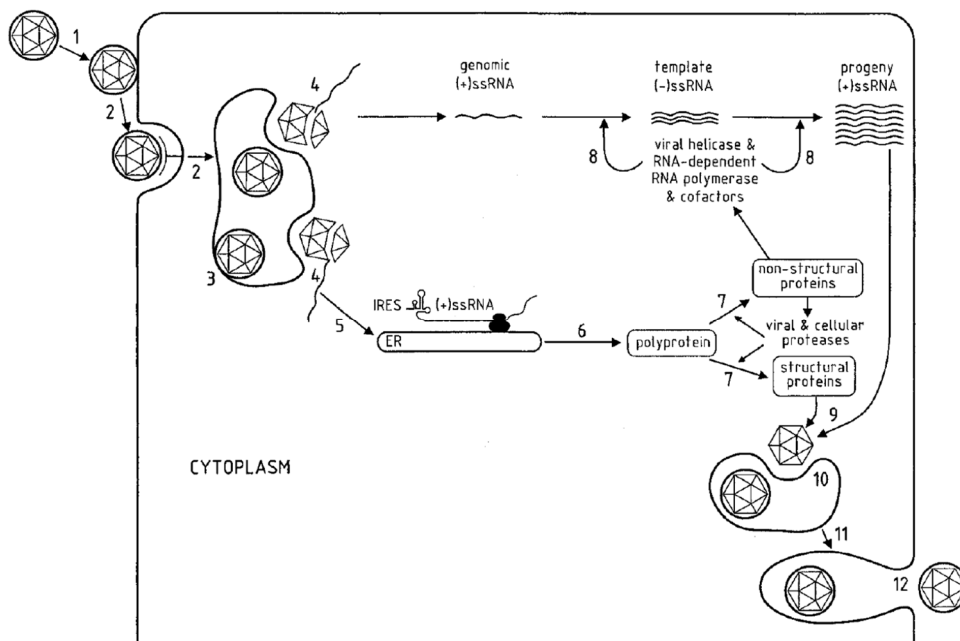


## 二 繁殖又は増殖の様式

BVDV はフラビウイルス科ペスチウイルス属の一本鎖プラス RNA ウイルスであるため、ウイルスは細胞質内で増殖する（図 1-3、別紙 1-2 の 1-2-1、文献 2）。

宿主は、哺乳類細胞の一般的な培養条件（37℃、5%CO<sub>2</sub>）下、牛腎臓由来細胞で増殖することが確認されている。

図 1-3 ペスチウイルスの増殖様式



1：ウイルスが体内に侵入して 2：細胞膜に吸着し、受容体を介するエンドサイトーシスにより細胞質内に取り込まれたのち、3：リソソームに低 pH で融合し、4：脱殻して 5：ウイルス由来プラス鎖 RNA そのものがメッセンジャー RNA ( mRNA ) の働きをして 6：ウイルスタンパク質前駆体が翻訳される。7：同時又は翻訳後に細胞由来あるいはウイルス由来のプロテアーゼによってウイルスポリタンパク質が消化される。一方、核酸の複製は、8：膜に結合して一旦マイナス鎖 RNA に転写され、それを鋳型として子孫ウイルスのプラス鎖 RNA が複製される。9：細胞質内で合成されたウイルスタンパク質からヌクレオカプシドが形成され、複製されたプラス鎖 RNA を取り込んで子孫ウイルスとなり、10：細胞質内の空胞にウイルスが出芽し、11：細胞質内空胞やゴルジ体の中をウイルス粒子が移動し、12：空胞が細胞膜と融合することで成熟ウイルス粒子が放出される。ss：一本鎖

## ホ 病原性

感染動物の分泌物にウイルスが排泄された BVDV 粒子は免疫細胞表面に存在する CD46 分子を介して牛の組織全般に分布し、広範囲にわたる病気の徴候、すなわち潜在的または軽度の感染、急性の下痢、二次感染の原因となる免疫抑制、繁殖障害、新生子虚弱、症状を呈するまたは呈しない持続感染、ならびに急性または慢性の MD などを引き起こす。

BVDV では培養細胞に対する性状として CPE を示す細胞病原性株 ( CP 株 ) と、CPE を示さない非細胞病原性株 ( NCP 株 ) があり、野外株はほとんど NCP 株である。NCP 株が妊娠牛に感染すると、感染時期に

よっては胎子が母体のウイルスに対して免疫寛容となり、垂直感染が成立してPI牛として娩出され、牛群の他の牛に対する感染源となるため、問題視されている。PI牛に感染しているCPEを示さないNCP型ウイルスが変異してCPEを示すCP型になると、PI牛はMDに移行し、死に至る（文献1）。

BVDVの病原性は株によって大きく異なる。BVDVはBVDV-1及びBVDV-2に分けられる。BVDV3型も報告されているが、HoBi-like virusあるいはatypical pestivirusとも呼ばれ、Giraffe virus, Pronghorn virus, Bungowannah virusとともにまだ未分類のウイルスとして取り扱われているもので、日本における報告はない。病原性については、BVDV-2の方が臨床症状としてより重篤で胎盤感染する傾向が強いとの報告がある（文献35及び36）。その一方で、BVDV-1による大規模で重篤な野外感染例も報告されている（文献37）ことから、BVDV-1とBVDV-2の違いで一概に病原性の高低は判別できない。

宿主であるKE9株及びNY93株は感染牛から分離されたBVDVであることから、これらのBVDVの病原性を保持していると考えられる（文献38）。KE9株が分離された牛には発熱及び下痢といった臨床症状が認められ、妊娠牛に対する接種試験では供試6頭中全頭の胎子感染が認められた（別紙1-5、文献39）。NY93株を妊娠牛に接種した試験では、臨床症状として発熱、下痢、食欲不振、鼻汁漏出、結膜炎、発咳、呼吸異常が認められ、顕著な白血球数の減少やウイルス血症が認められており、全供試牛の胎子からウイルスが検出されている（別紙2-1、文献40）。

予防はワクチン接種によるものである。BVDV感染牛においては、臨床症状を呈する個体の治療は対症療法のみで、臨床症状が認められないBVDV陽性牛もあり、感染拡大を防ぐためにはBVDV陽性牛の摘発淘汰を行う必要があると考えられている。そのため、本病による経済的被害は大きい。

先にも述べたとおり（1の(3)のイの ）、文献的調査で以下の野生動物からの抗体検出ならびにRT-PCRでのBVDV-1検出の報告がある。

家畜：ラクダ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、アルパカ、ビクーニャ、豚

野生動物：野生種ヤギ、シカ、ウサギ、イノシシ

野生動物では主にBVDV-1の感染が報告されていることから、牛が家畜として飼育されている地域の周辺部の野生動物の感染リスクが特にBVDV-1について比較的高いと想定されるが、野生動物においてBVDVが流行したような報告はなく、死亡動物からの検出ではないことから、自然環境下で牛以外の動物において病原性を示すことはないと考えられる。牛以外の動物における自然感染での病原性は報告されていない<sup>#</sup>。また、ヒトには病原性がないとされている（文献3）。

#### へ、有害物質の産生性

BVDVにおいて、有害な影響を及ぼす生理活性物質の生産性が認められるとの報告はない\*。

- アレルギー物質産生性について：インターネットで確認できるアレルギー物質のアミノ酸あるいは遺伝子の配列に関するサイト\*\*で、本ウイルスの遺伝子配列（継代により変化した配列も含む）と比較したところ、アレルギー物質に相同性の高い配列は確認されなかった。

<sup>#</sup> 製造元における申請書記載内容並びに2017年以前のPubMedによる文献検索を実施。キーワード：BVDV, infection, pathogenic

\* 製造元における申請書記載内容並びに2017年以前のPubMedによる検索を実施。キーワード：BVDV

\*\* 内閣府食品安全委員会平成15年度食品安全確保総合調査「タンパク質のアレルギー評価手法に関する調査報告」に示されたサイトで、現在閲覧が可能だったIUIS, SWISS-PROT allergen index, CSL, FARRP, ALLALLERGY及びSDAPのデータベースに基づいて検索。

- 毒性物質産生性について：本ウイルスを含有する試験品で対象動物への接種試験を行っており、その際に対象動物に対する毒性を示すような結果は得られていない。よって本遺伝子組換え微生物による毒物の産生性は否定されたと考えられる。海外での非臨床試験ならびに臨床試験で実施した対象動物を用いた試験での実績については、別紙 1-6 に示すとおりである。

対象動物を用いた試験としては、妊娠牛に対する高用量接種による安全性試験、子牛に対する常用量及び高用量接種による安全性試験、病原性復帰否定試験、同居感染性及び体内分布の確認試験、最少免疫用量及び免疫持続性の確認試験及び免疫成立時期確認試験が実施された。

#### ト その他の情報

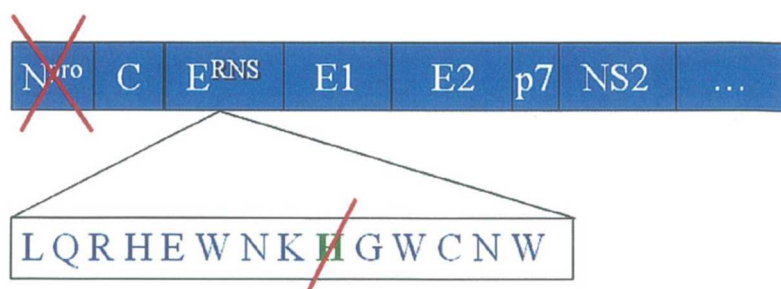
## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ 構成及び構造要素の由来

本遺伝子組換え微生物には、遺伝子の欠損のみが生じており、外来性の供与核酸はない。遺伝子の欠損を生じさせる遺伝子組換えのプロセスでは、宿主 KE9 株及び NY93 株の遺伝子が一本鎖プラス RNA であり、遺伝子組み換え技術を用いるのには難しい構造なので、取り扱いには安定であるデオキシリボ核酸 (deoxypentose nucleic acid, DNA) としてプラスミドにクローニングし、様々な遺伝子操作及び解析に供試した。本遺伝子組換え微生物の作製にあたっては、宿主の *N<sup>pro</sup>* 遺伝子の最初のアミノ酸 4 個分 (メチオニン (M)、グルタミン酸 (E)、ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、以下、MELF と記載する。) の配列を除くすべての欠損及び *E<sup>ms</sup>* 遺伝子領域の 349 番目コドン (ヒスチジン) の 3 塩基 (CAT) の欠失があるフラグメントをプラスミドの状態で置換している (別紙 1-5 及び 2-1、文献 39 及び 40)。本遺伝子組換え微生物の全長遺伝子を含むプラスミドを細胞にトランスフェクションすることにより、最終的に図 2-1 に示す一本鎖プラス RNA を含むそれぞれの本遺伝子組換え微生物を得た。

図 2-1 本遺伝子組換えウイルスの概略



遺伝子の塩基配列、制限酵素地図、サイズ等は別紙 2-2 及び 2-4 に示した。配列の詳細については、「I.2.(3)遺伝子組換え生物等の調製方法」参照。

宿主である BVDV-1 の KE9 株と、それから得られた遺伝子欠損ウイルスである遺伝子組換え微生物 (以下、ddBVD Tub 1 株という。) の一次配列 (別紙 2-2) を比較すると、以下のとおりである。

宿主 KE9 株の 1 本鎖 RNA は全長 12246 b で、アミノ酸の翻訳は遺伝子配列の 381 ~ 383 番目のメチオニン (ATG) から開始され、12275 ~ 12277 番目の終止コドン (TGA) で終わる。コードされているアミノ酸は 3964 個で、*N<sup>pro</sup>* の欠損及び *E<sup>ms</sup>* の欠損はそれぞれ塩基配列の (492 b、164 個のアミノ酸) (3 b、1 個のアミノ酸 (ヒスチジン)) に相当する。

よって、ddBVD Tub 1 株の一本鎖 RNA の全長は、宿主 KE9 株の全長 12246 b よりも 495 b 短い 11751 b である。

宿主である BVDV-2 の NY93 株と、それから得られた遺伝子欠損ウイルスである遺伝子組換え微生物 (以下、ddBVD Tub 2 株という。) の一次配列 (別紙 2-2) を比較すると、以下のとおりである。

宿主 NY93 株は全長 12331 b で、アミノ酸の翻訳は遺伝子配列の 386 ~ 388 番目のメチオニン (ATG) から開始され、12125 ~ 12127 番目の終止コドン (TGA) で終わる。コードされているアミノ酸は 3914 個で、

*Npro* の欠損及び *E<sup>rms</sup>* の欠損はそれぞれ塩基配列の ( 492 b、164 個のアミノ酸 ) ( 3 b、1 個のアミノ酸 ( ヒスチジン ) ) に相当する。

よって、ddBVD Tub 2 株の一本鎖 RNA の全長は、宿主 KE9 株の全長 12331 b よりも 495 b 短い 11836 b である。

#### ロ 構成要素の機能

1 の(3)のイの においても記載しているとおり、BVDV の遺伝子である 1 本鎖 RNA は、ペスチウイルス属に特有な構造で *Npro*、*C*、*E<sup>rms</sup>*、*E1*、*E2*、*p7*、*NS2/3*、*NS4A*、*NS4B*、*NS5A* 及び *NS5B* で構成されており、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の遺伝子では *Npro* の欠損及び *E<sup>rms</sup>* の 3 塩基の欠損以外は同様の構造である。

*Npro* 遺伝子産物は、ペスチウイルス属に特有の 168 個のアミノ酸からなる非構造タンパク質で、自然に開裂して N 末端ドメインと C 末端ドメインの 2 つのタンパク質となる。N 末端側のタンパク質はプロテアーゼで、システインプロテアーゼ活性があり、*Npro* の遺伝子産物を開裂させる機能を有する。C 末端側のタンパク質は亜鉛結合 TRASH モチーフ ( Cys-Cys-Asp-Cys ) が含まれており、インターフェロン制御因子-3 ( interferon regulatory factor-3: IRF-3 ) に結合して 1 型インターフェロンの産生を阻止する機能を有する。

*E<sup>rms</sup>* 遺伝子産物は *C*、*E1* 及び *E2* とともにウイルス外殻を構成するタンパク質で、*E<sup>rms</sup>* は中和抗体の結合部位、感染動物に抗原として認識されて免疫反応を誘導する部位であることが報告されている。また、*E<sup>rms</sup>* 遺伝子産物はリボヌクレアーゼ活性を持っており、ウイルス外膜のウイルス RNA によって誘導されるインターフェロンの発現を阻止し、BVDV の持続感染性に大きな役割を果たしていると考えられている。

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株では非構造タンパク質である *Npro* 遺伝子産物のアミノ酸 4 個分を除く全体と、構造タンパク質である *E<sup>rms</sup>* の 1 アミノ酸のみに欠損が生じている。この欠損により、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は非病原性となることが確認されており ( 別紙 2-1、文献 40 )、その原因はそれぞれの遺伝子産物による本来の機能が損なわれることによるものと考えられる。*Npro* 遺伝子にコードされている 2 つのタンパク質のうち、C 末端側のタンパク質は 1 型インターフェロンの産生阻止機能があるため、その欠損によって感染動物に対するインターフェロン阻害活性がなくなると考えられる。また、ウイルス外殻タンパク質である *E<sup>rms</sup>* の 1 アミノ酸の欠損は、ウイルスの構成には支障がない程度ではあるが若干立体構造に影響を与え、ウイルスの感染動物細胞に対する結合性や抗原性に若干の影響を与えたと考えられる。また、リボヌクレアーゼである *E<sup>rms</sup>* の活性にも影響を与え、インターフェロン産生阻止活性にも影響を与えていると考えられる。

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

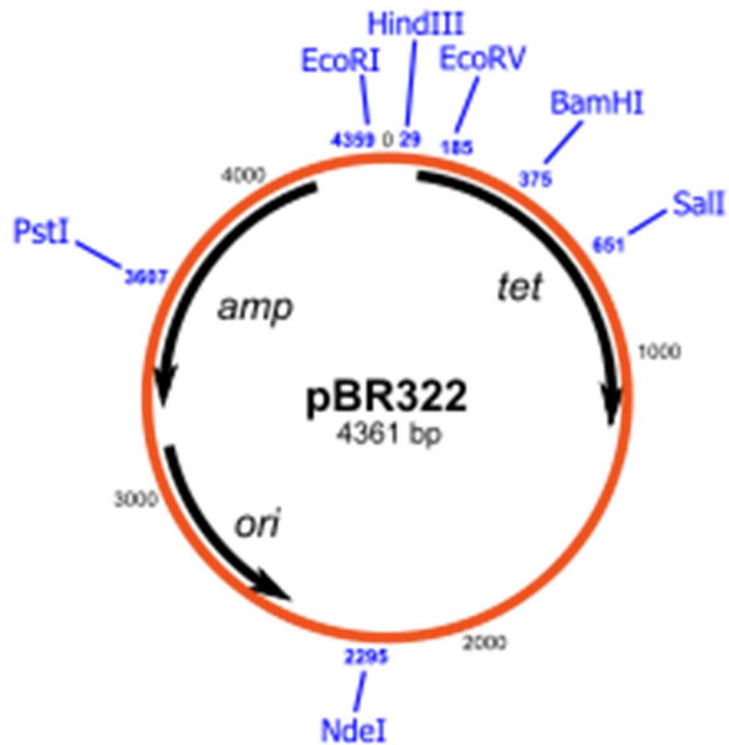
本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の作製には、以下のベクターを用いた（別紙 2-3）。なお、pBR322 及び pBluescript SK(-)は、宿主ウイルス RNA の全長相補的 DNA (cDNA) クローンを作製するために用いられたベクターである。

pBR322（図 2-2、別紙 2-3 の 2-3-1）

ベクター-pBR322 は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミドで、ColE1 compatibility グループのプラスミドである。

大腸菌は生物の分類学上、腸内細菌目 (Enterobacteriaceae) *Escherichia* 属に属する。

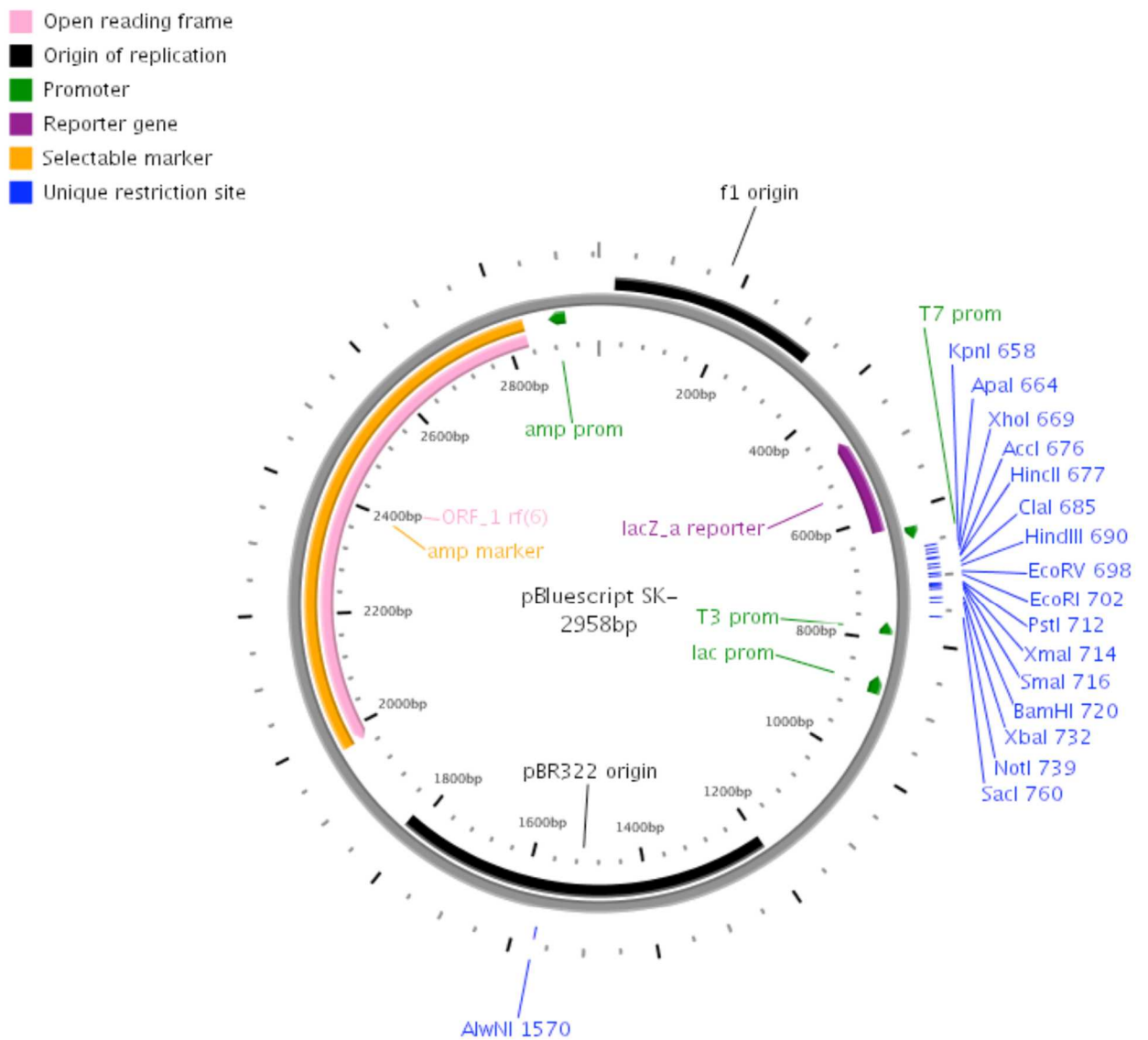
図 2-2 pBR322 プラスミドの概略



pBluescript SK(-) (図 2-3、別紙 2-3 の 2-3-2)

ベクターpBluescript SK(-)は、大腸菌由来のプラスミド pBR322 から改変して構築した pUC 系のプラスミドに、ラムダファージ由来の遺伝子配列を入れ込んだもので、いわゆるファージミドである。大腸菌の生物分類学上の位置づけは前述のとおりで、ラムダファージは大腸菌に感染するテンプレートファージである。

図 2-3 pBluescript SK(-)の概略



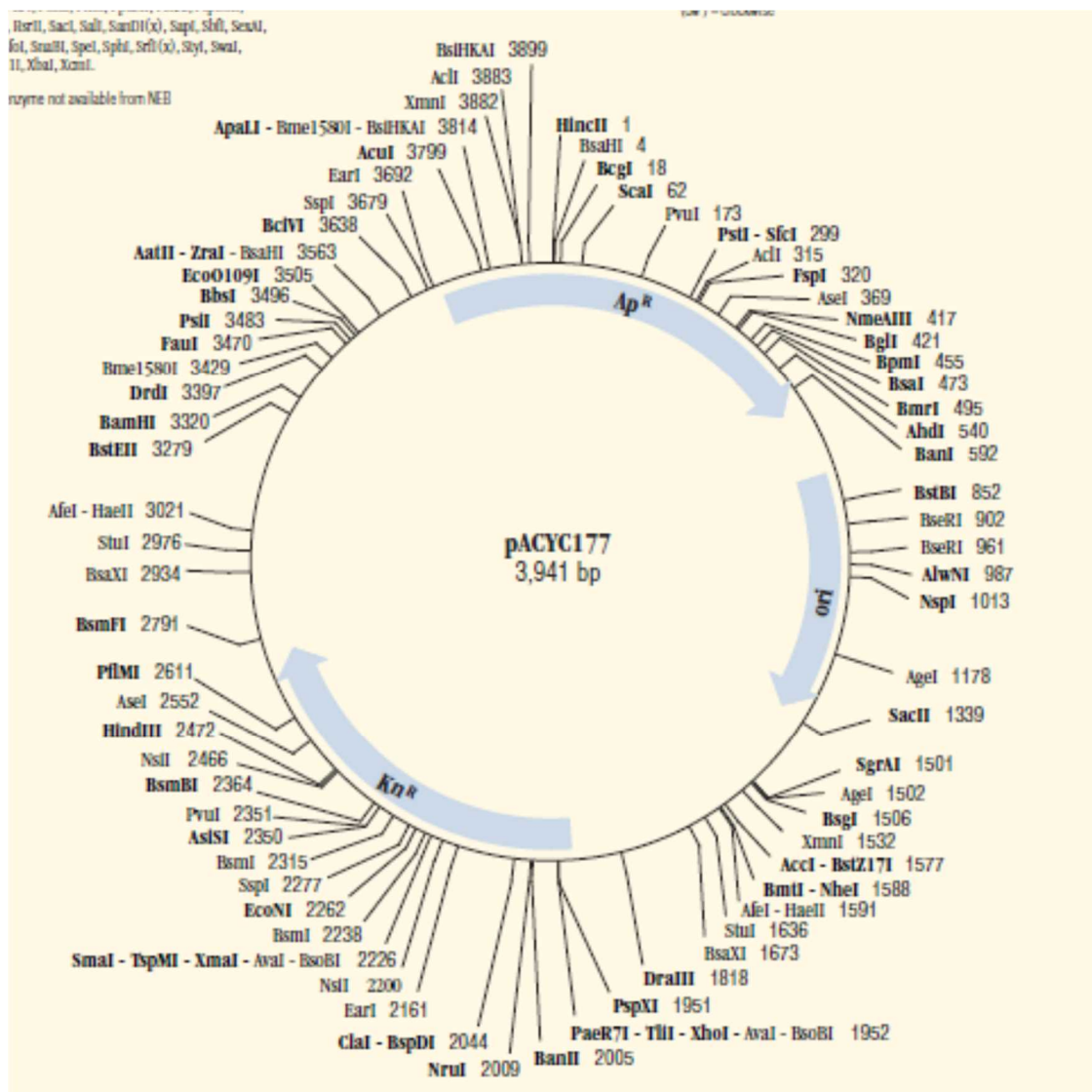
26 of the 26 labels are shown.

Created using PlasMapper

pACYC177 ( 図 2-4、別紙 2-3 の 2-3-3 )

ベクターpACYC177 は、大腸菌由来のプラスミドで、ColE1 compatibility グループのプラスミド(すなわち pBR322、pUC19) と同系列である。

図 2-4 pACYC177 の概略





## □ 特性

ベクター-pBR322、pBluescript SK(-)及び pACYC177 は遺伝子組換え実験に汎用される一般的な既知のベクターである。

pBR322 ( 4361 bp ): 現在用いられている組換え用プラスミドの多くの原型となるプラスミドであり、病原性及び伝染性はない。図 2-2 に示すとおり、薬剤耐性遺伝子 *tet* (テトラサイクリン耐性) 及び *amp* (アンピシリン耐性) をマーカーとして持っており、クローニングサイトが薬剤耐性遺伝子の位置にも存在するため、スクリーニングに薬剤添加培地を使うことが可能である。プラスミドとしての伝達性は、大腸菌内でのプラスミド伝達性で想定される程度である。

pBluescript SK(-) ( 2958 bp ): pBR322 由来の遺伝子配列と、ラムダファージ由来の遺伝子が混在するファージミドで、病原性及び伝染性はなく、アンピシリン薬剤耐性遺伝子をマーカーとして持っている ( 図 2-3 )。発色マーカーも  $\lambda$ -ZapII ファージと同様に持っているため、発色によるコロニーのスクリーニングが可能である。プラスミドとしての伝達性は、大腸菌内で想定される程度で、ファージに格納できるように一本鎖 DNA になる性質をもつ配列がある。ファージに格納された場合の病原性・感染性は、宿主大腸菌に対するもので、ファージとしての伝達性はラムダファージで想定される程度であると考えられる。

pACYC177 ( 3941bp ): ColE1 compatibility グループのプラスミド ( すなわち pBR322、pUC19 ) と同系列で、病原性及び伝染性はない。薬剤耐性遺伝子及びクローニングサイトは図 2-4 に示されたとおりで、カナマイシン耐性遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子の二つを持っていることが特徴である。プラスミドとしての伝達性は、大腸菌内でのプラスミド伝達で想定される程度である。

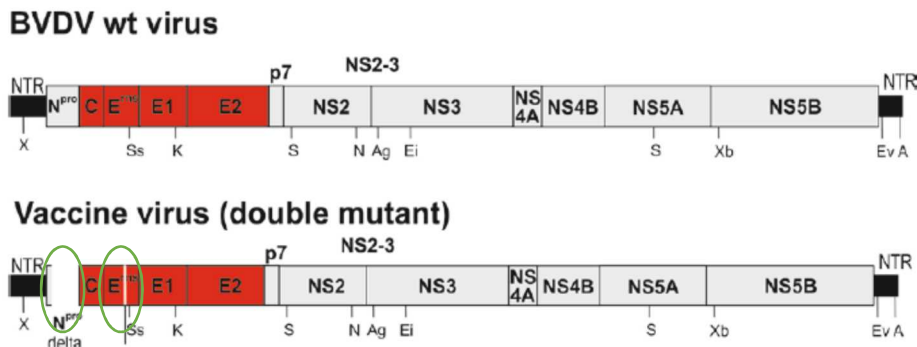
### (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

#### イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

本項目では宿主遺伝子のどの位置に欠損を生じさせたかについて記載する。

図 2-5 に、宿主及び本遺伝子組換え微生物の基本構造に関する模式図を示した。BVDV-1 及び BVDV-2 とともに、基本的には同じように欠損が生じるように遺伝子組換えを行っており、*Npro* の最初のアミノ酸 4 個分を除いた配列と *E<sup>ms</sup>* のヒスチジンをコードする 3 塩基 (3 b) が欠損した状態で、遺伝子複製ならびにアミノ酸への翻訳が行われるようにつながられている。

図 2-5 宿主及び本遺伝子組換え微生物の模式図



上段：宿主            下段：本遺伝子組換え微生物

 : 欠損部位

#### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

本項目では宿主内にどのように欠損を生じさせたかについて、その方法を記載する。記載に当たっては、BVDV-2 で遺伝子欠損を生じさせたときの性質を確認した後、BVDV-1 の遺伝子で同様の遺伝子領域の改変を行った経緯から、本文では BVDV-2 の遺伝子欠損生成過程を記載した後、BVDV-1 遺伝子欠損生成過程を記載する。

##### a) ddBVD Tub 2 株における *Npro* 及び *E<sup>ms</sup>* の欠損の導入方法

ddBVD Tub 2 株の作製過程は以下のとおりである (別紙 2-1、文献 40) :

NY93 株の RNA 配列に基づく全長 cDNA クローン pKANE40A の作製

構造タンパク質をコードする *E<sup>ms</sup>* 遺伝子領域への欠損をもつ pKANE40B の作製

PCR を用いた非構造タンパク質をコードする *Npro* 遺伝子領域の改変 (*Npro* タンパク質コード領域の 492 b 欠失生成) を含む pK86C の作製

pKANE40B に pK86C 由来フラグメントを挿入することによる二重欠損プラスミド pKANE88C の作製

以上の工程の詳細については、別紙 2-4 の 2-4-2 に示したとおりである。

工程 において、1 本鎖 RNA をゲノムとして持つ BVDV を一旦プラスミド化し、それをテンプレ

ートとして *in vitro* で RNA に翻訳してから細胞にトランスフェクトすることによってウイルス粒子が得られることを確認した。これにより、プラスミドで遺伝子操作してから細胞にトランスフェクトすることで複製可能な欠損を持つウイルスを確認可能となった。工程 及び においては、*E<sup>rns</sup>* のヒスチジンの欠損の位置、*N<sup>pro</sup>* の欠損の大きさを検討して最もワクチンウイルスとして効果的な欠損の組み合わせを選択した。

宿主 NY93 株のウイルスゲノム全長を cDNA ライブラリからのクローニングと PCR によってプラスミドに挿入し、pKANE40A を得た。それとともに、ゲノムの 5'末端側の遺伝子領域（非翻訳領域から E1 遺伝子領域までの領域）を含む pKANE22A も得た。

*E<sup>rns</sup>* にコードされるウイルスタンパク質転写開始から 349 番目のヒスチジンを欠損させるため、部位特異的変異導入法 (site-directed mutagenesis、QuickChange™、Stratagene) を用い、pKANE22A (5375 bp) から 3 bp のみを削った pKANE22B (5372 bp) を得た。これを pKANE22B の PmlII/PshAI フラグメントを切り出し、pKANE40A の同じサイトで置換して、pKANE40B を得た。

プラスミド pKANE22A を切断後、PCR で *N<sup>pro</sup>* 遺伝子の 5'末端の 4 コドン（アミノ酸 MELF をコードする）のみを残して欠損した cDNA 断片を作製し、pKANE22A に挿入し、*N<sup>pro</sup>* を欠損させたプラスミド pK86C を得た。

pK86C の配列確認後、切り出したフラグメントを pKANE40B に挿入し、プロテアーゼの殆どすべてをコードする *N<sup>pro</sup>* の欠失及び RNase の不活化変異 H349 欠損を含む、pKANE88C を得た。

#### b) ddBVD Tub 1 株における *N<sup>pro</sup>* 及び *E<sup>rns</sup>* の欠損の導入方法

ddBVD Tub 1 株の作製過程は以下のとおりである（別紙 1-5、文献 39）：

KE9 株の RNA 配列に基づく全長 cDNA クローン pKE9 の作製

KE9 遺伝子の前半部分を含む二重欠損遺伝子を含むプラスミドの作成

切り出したフラグメントを挿入することによる二重欠損プラスミド pKE9/N-/E-の作製

*E<sup>rns</sup>* におけるヒスチジンの欠損は、ヒスチジンをコードする遺伝子配列 CAT を欠損させたプライマーを用いることによって生じさせ、*N<sup>pro</sup>* における 168 個中 164 個のアミノ酸をコードする配列の欠損も制限酵素サイトを含むプライマーを作製することによって得たフラグメントを、目的の位置に結合することによって作製された。これらの欠損が生じる配列のフラグメント（欠損フラグメント）をつなぎ合わせ、KE9 株の前半部分がクローニングされたプラスミド *N<sup>pro</sup>* から *E<sup>rns</sup>* をコードする部分のフラグメントを制限酵素で切り出し、そこに作製した欠損フラグメントを挿入し、プラスミドを得た。さらに、PCR で作製したプラスミドの T7 プロモーターとウイルスの配列の 5'末端を含む部分をベクター部分のフラグメントと置き換えた。

フラグメントを、完全長ウイルスゲノムのプラスミドであるフラグメントと入れ替えた。

## 八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本項目では、*N<sup>pro</sup>* 及び *E<sup>ms</sup>* に欠損を導入したプラスミドのトランスフェクトと、その後のウイルスの回収について述べる。

### a) 製造用マスターシードウイルス ddBVD Tub 1 株の作製

*N<sup>pro</sup>* 遺伝子及び *E<sup>ms</sup>* 遺伝子欠損 BVDV の全長フラグメントを含むプラスミド pKE9/N-/R-をテンプレートとして、*in vitro* による RNA への翻訳を行った。エレクトロポレーション(パルス:950  $\mu$ F、210 V、9.7 msec)により、牛腎株化細胞の MDBK 細胞に RNA をトランスフェクトし、KE9-B-NdN 株を得た。その後、37℃、4%CO<sub>2</sub> の条件下 10 vol%牛胎子血清 (FBS) 含有イーグル最小必須培地 (E-MEM) で継代し、製造用マスターシードウイルス ddBVD Tub 1 株を得た。

### b) 製造用マスターシードウイルス ddBVD Tub 2 株の作製

*N<sup>pro</sup>* 遺伝子及び *E<sup>ms</sup>* 遺伝子欠損 BVDV の全長フラグメントを含むプラスミド pKANE88C をテンプレートとして、*in vitro* による RNA への翻訳を行った。リボソーム試薬 DMRIE-C により、MDBK 細胞に RNA をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞から得たウイルス(XIKE-B-NdN 株)を 10 vol%FBS 含有 E-MEM で、37℃、4%CO<sub>2</sub> の条件下で継代し、製造用マスターシードウイルス ddBVD Tub 2 株を得た。

## (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

### イ 移入した核酸の遺伝子組換え生物における存在状態

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の遺伝子の欠損部分は、*N<sup>pro</sup>* 遺伝子の 5' 末端の 4 コドンのみを残したすべてと、*E<sup>ms</sup>* 遺伝子に位置するコドン 349 の 3 塩基である (図 2-5)。宿主と比較して本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株のウイルス粒子の複製は遺伝子の欠損による影響は認められず、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は宿主の BVDV の性質を保持していると考えられる。

BVDV は一本鎖プラス RNA ウイルスであり、細胞に感染した後、細胞質において RNA の複製も含めてすべてのウイルス粒子構成タンパク質及び核酸が生じる。

### ロ 目的遺伝子の宿主内での発現の安定性

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の遺伝子は欠損のみが生じており、それぞれの遺伝子組換え微生物の作成方法からいって新たなオープンリーディングフレームは生じない (別紙 2-2 の 2-2-1 及び 2-2-2)。よって、ウイルス粒子が構成されるためのタンパク質以外のタンパク質も発現しないと考えられる。

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株のマスターシードウイルスを *in vitro* で 5 代継代したものと継代前のもの、また動物接種により継代したものと継代前のものでそれぞれの株について、*N<sup>pro</sup>* 及び *E<sup>ms</sup>* 欠損部についてはそのまま保存されていた。これらの欠損は自然な変異により復帰する可能性は、野生株との組換えによる欠損部位の復帰による以外に起こりえないと考えられる (表 2-11)

及び 2-12)。

宿主 KE9 株と本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株の遺伝子配列を比較したところ、欠損部以外のアミノ酸の置換に反映されない塩基の置換が 2 か所、アミノ酸の置換を伴う塩基の置換が 1 か所あった(表 2-11、別紙 2-5 の表 2-5-3)。宿主 NY93 株と本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 2 株の遺伝子配列を比較したところ、欠損部以外のアミノ酸の置換に反映されない塩基の置換が 7 か所、アミノ酸の置換を伴う塩基の置換が 7 か所あった(表 2-12、別紙 2-5 の表 2-5-4)。いずれの遺伝子組換え微生物においても、それぞれのウイルスの性状に影響を与えるような変化は、遺伝子配列の解析上認められなかった(別紙 2-5)。

また、細胞あるいは動物で 5 代継代した後のウイルスについて、その遺伝子配列を比較した(表 2-13、表 2-14、別紙 2-5 の表 2-5-6 及び表 2-5-7)。細胞継代では ddBVD Tub 1 株で 1 塩基、ddBVD Tub 2 株で 2 塩基の置換が認められたが、アミノ酸配列への影響は認められない置換であった。動物継代では ddBVD Tub 1 株で 3 塩基、ddBVD Tub 2 株で 7 塩基の置換があり、ddBVD Tub 1 株ではそのうちの 1 塩基の置換についてはアミノ酸配列の置換にもいたっていたが、配列の解析上ウイルスの性状に影響を与えるような変化ではなかった。

RNA ウイルスは、DNA ウイルスよりも核酸レベルで変異しやすいウイルスであることが一般的に知られており、その変異率の幅は  $10^{-6}$  から  $10^{-4}$  である(別紙 2-7 の 2-7-1、文献 41)。そのため、継代による塩基置換変異は、遺伝子組換え微生物である以前に RNA ウイルスでは起こりうる。細胞あるいは動物での 5 代の継代でそれぞれ 1 塩基あるいは 7 塩基の変異は、RNA ウイルスに見られる範囲としては高い変異率ではない。RNA ウイルスのペスチウイルスである C 型肝炎ウイルスの *in vivo* の変異率は  $1.15 \pm 0.29 \times 10^{-4}$  で(別紙 2-7 の 2-7-2、文献 42)、変異率の高い豚繁殖呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) では 1 年あたりで  $10^{-3} \sim 10^{-2}$  レベルであるとの報告がある(別紙 2-7 の 2-7-3、文献 43)。本遺伝子組換え微生物の場合、1 継代で 1 塩基変異するときの変異率は  $1/12300 = 8.1 \times 10^{-5}$  (これより小さい変異率は計算上ありえない) となり、5 継代で 1~3 塩基の変異の場合、1 継代あたりの変異率は  $8.1 \sim 56.9 \times 10^{-5}$  となるため、報告されている RNA ウイルス変異率の範囲内である。

表 2-11 BVDV-1 の KE9 株と ddBVD Tub 1 株の一次配列の比較結果

位置	KE9 株の塩基	ddBVD Tub 1 株の塩基	アミノ酸配列への影響
		欠損	N <sup>pro</sup> 欠損
		欠損	ヒスチジン欠損
	C	A	Q グルタミン→K リシン
	C	T	なし
	T	C	なし

\* 位置については社外秘のため非公表

表 2-12 BVDV-2 の NY93 株と ddBVD Tub 2 株の一次配列の比較結果

位置	NY93 株の塩基	ddBVD Tub 2 株の塩基	アミノ酸配列への影響
		欠損	N <sup>pro</sup> 欠損
	G	T	K リシン→N アスパラギン
	G	A	A アラニン→T トレオニン
		欠損	ヒスチジン欠損
	A	G	E グルタミン酸→A アラニン

	C	A	なし
	A	G	なし
	G	A	なし
	T	C	I イソロイシン→T トレオニン
	T	C	V バリン→A アラニン
	C	T	A アラニン→V バリン
	A	G	なし
	G	A	R アルギニン→K リシン
	A	G	なし
	G	A	なし
	A	G	なし

\* 位置については社外秘のため非公表

表 2-13 ddBVD Tub 1 株を細胞で継代した株 (MSV+5) 及び動物で継代した株 (MSV-RVS) との MSV 株 ddBVD Tub 1 株の比較

位置	MSV ddBVD Tub 1 株	MSV+5	MSV-RVS*	アミノ酸配列への影響
	G	A	G	なし
	C	C	T	T トレオニン→I イソロイシン
	G	G	A	なし
	C	C	T	なし

\* 位置については社外秘のため非公表

表 2-14 ddBVD Tub 2 株を細胞で継代した株 (MSV+5) 及び動物で継代した株 (MSV-RVS) との MSV 株 ddBVD Tub 2 株の比較

位置	MSV ddBVD Tub 2 株	MSV+5	MSV-RVS*	アミノ酸配列への影響
	T	C	C	なし (非翻訳領域)
	C	C	T	なし
	T	T	C	なし
	T	T	C	なし
	A	A	G	なし
	G	G/A	A	なし
	G	G	A	なし

\* 位置については社外秘のため非公表

#### 八 特定のファージの感染等によって目的遺伝子の宿主以外の生物への伝達性が生じるおそれの有無

特定のファージあるいは他の微生物の感染等による目的遺伝子の宿主以外の生物への遺伝子伝達が生じるおそれについては、知られていない。BVDV は一本鎖プラス RNA を核酸として持ち、細胞質以外では増殖しないウイルスであり、同様の増殖様式の他の微生物と重感染する可能性自体が極めて低いと考えられる。また、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株については欠損のみが生じており、その欠損が他の微生物に伝達されるようなおそれは、BVDV の増殖性を低下させる変異であることから極めて低いと考えられる。

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

宿主と本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の識別方法としては、一次配列の

確認（欠損部分の確認）が信頼性の高い方法であると考えられる。別紙 2-5 で 5 代継代した場合について分析した結果（表 2-13 及び 2-14）で、欠損部分は動物体内の継代においても安定して保存されていることが確認されている。5 代の継代は動物用生物学的製剤基準の一般試験法の組換え遺伝子等安定性確認試験法で規定されている継代数である。

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株と宿主との一次配列の比較にはまずウイルス分離を行う必要がある。海外の野外臨床試験において用いたウイルス分離方法では、牛精巢（BT）細胞あるいは MDBK 細胞を用いて蛍光抗体染色法によるウイルス検出を行った。鼻汁、白血球（パフィーコート）及び胎子組織（脾臓）検体を用いて特異性、精密度、正確性、直線性、頑健性について確認したところ、検出下限は BVDV-1 で 16 FAID<sub>50</sub>\*/mL、BVDV-2 で 4 FAID<sub>50</sub>/mL であった。なお、胎子組織検体については肝臓による検出も試みたが、細胞毒性が強いため検出下限が BVDV-1 で 125 FAID<sub>50</sub>/mL、BVDV-2 で 40 FAID<sub>50</sub>/mL となった（別紙 2-9）。そのため、胎子組織検体としては肝臓よりは脾臓のサンプリングが望ましい。

ウイルス分離後は本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株それぞれの欠損部分に特異的なプライマーを用いて PCR による増幅を行い、一次配列の確認を行うことが可能である（別紙 2-5）。

## (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

培養細胞における増殖性について宿主と比較した結果、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の MDBK 細胞における増殖速度はそれぞれの宿主とほぼ同等かそれより若干低い程度であった（2(6)口参照、別紙 1-5 及び 2-1、文献 39 及び 40）。培養細胞の増殖性から、本遺伝子組換え微生物のウイルス粒子の複製様式は、宿主の様式を保存していると考えられる。

一方、動物体内における増殖性については宿主と本遺伝子組換え微生物で明らかな相違が認められ、本遺伝子組換え微生物は動物体内での増殖性は低いと考えられた（2の(4)の口参照、別紙 2-6）。遺伝子組換え微生物の欠損によって宿主には認められるインターフェロン阻害活性が欠如するため、動物体内ではウイルスの増殖が 1 型インターフェロンの作用によって阻害されるものと考えられる。別紙 2-8 の体内分布試験では、本遺伝子組換え微生物を接種した動物の主にリンパ系臓器に分布した後、接種後 21 日目にはウイルスが体内から検出されない状態となったことから、増殖性は宿主以下であることが確認されている。

### 遺伝的特性

本遺伝子組換え微生物は、供与核酸の残存やベクター由来の塩基配列は含まず、宿主の *N<sup>pro</sup>* 領域の 492 b と *E<sup>ms</sup>* 領域の 3 b が欠損したのみで、その他はすべて遺伝子が保存されており、5 代継代してもその構造が維持されていることが確認されている。そのため、遺伝的特性については、*N<sup>pro</sup>* 領域と *E<sup>ms</sup>* 領域の違いについてのみ相違があると考えられる。

\* 遺伝子組換え微生物は CPE を示さないため、培養細胞を蛍光標識抗体で染色して感染細胞を検出する。よって、単位としては TCID<sub>50</sub> と相同である。

ウイルス粒子の複製は、先の増殖様式においても記載したとおり、培養細胞においてほぼ同等である。その一方で、動物体内にとりこまれてからの本遺伝子組換え微生物ウイルス粒子の挙動は宿主とは異なり、宿主に感染した動物からは体外への排出が鼻汁あるいは糞便に認められ同居感染性が認められるが、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を接種した動物からは体外への排出は認められず、同居感染性はなかった（別紙 2-8）。これらの宿主とは異なる動物体内での挙動の変化は、本遺伝子組換え微生物のもつ欠損によるものであると考えられる。

#### 病原性

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は 2 か所の欠損によって非病原性となっており、宿主が感受性動物である牛に感染した場合に認められるような病原性は認められなくなることが確認されている（別紙 2-1、文献 40）。

別紙 2-8 の同居感染試験に示されているように、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株  $10^{4.98}$  TCID<sub>50</sub>/用量及び ddBVD Tub 2 株  $10^{6.74}$  TCID<sub>50</sub>/用量を混合したワクチンを接種した感受性動物である牛での同居感染性は認められないので、ヒトや野生動物を含めた感受性動物以外の動物に対する感染性はないと結論付けられる。同居感染試験は、1~2 ヶ月齢の雄牛（ホルスタインフリージアン種）15 頭を、ワクチン株接種群とプラセボ接種群にそれぞれ 10 頭（予備 2 頭を含む）及び 5 頭（予備 1 頭を含む）割り付け、ワクチン（ddBVD Tub 1 株  $10^{4.98}$  TCID<sub>50</sub>/用量及び ddBVD Tub 2 株  $10^{6.74}$  TCID<sub>50</sub>/用量含有）とプラセボを同日に筋肉内注射して実施したもので、同居感染性は同居群の鼻汁あるいはパフィーコートからのウイルス分離を実施して確認されず、抗体も検出されなかった。また、感受性動物である牛には同居感染のような自然感染が成立しないことから、病原性を示す可能性は注射等の特定の 방법으로強制的に接種するような場合に限られる。

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を動物体内に筋肉注射により接種した場合には感染が成立し、BVDV 野外病原性株で攻撃しても発症しない免疫が成立することが確認されている。別紙 1-6 の有効性の試験で示されているように、接種対象動物の牛に本遺伝子組換え微生物を含有するワクチン（ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株をそれぞれ  $10^3$  TCID<sub>50</sub> 以上/用量含有するもの）を筋肉内接種したとき感染が成立し、野外病原性株で攻撃しても発症しない免疫が成立する。遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株を用いた試験では、接種後交配し、妊娠中に攻撃試験を実施してから 60 日後に剖検し、胎子臓器からウイルス分離を試みたが、ウイルスは一切分離されなかった。攻撃群とは別に抗体価測定群を設定して推移を確認したところ、BVDV-1 中和抗体価はワクチン接種群で確認され、交配時には検出限界である 905 倍以上となっており、BVDV-2 中和抗体価も BVDV-1 中和抗体価よりは低いながら検出された（600~700 倍）。遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 2 株を用いた試験では、ワクチン接種後 12 か月後に強毒 BVDV-2 株による攻撃試験を実施し、ddBVD Tub 1 株と同様に胎子臓器からウイルス分離を試みて、ウイルスは一切分離されず、BVDV-2 中和抗体価とともに BVDV-1 中和抗体価がワクチン接種後 61 日目から全頭で陽転して攻撃時まで維持された。

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は、ともに BVDV 特有の性質である Superinfection Exclusion によって BVDV 野外病原株と重感染する可能性がウイルス侵入の段階と RNA の複製段階の 2 つの段階でブロックされるために科学的に低いと考えられ（1 の(3)のイの 参照、文献 33）、本遺伝子組換え微生物の欠損が BVDV 野外病原株から補完されることによる病原性復帰は発生しないと考えられる。



病原性復帰試験のような臓器接種材料で調整した試験でも、ddBVD Tub 1 株 3 代目以降、ddBVD Tub 2 株 2 代目以降の継代は不可能となっている（別紙 2-6）ことから、変異が起きる可能性はさらに非常に低くなると考えられる。病原性復帰試験は、5～10 週齢の BVDV 抗体及び抗原陰性子牛を用いて、それぞれの遺伝子組換え微生物単独（接種量はそれぞれ ddBVD Tub 1 株  $10^{6.74}$  TCID<sub>50</sub>/用量、ddBVD Tub 2 株  $10^{6.22}$  TCID<sub>50</sub>/用量）ならびに遺伝子組換え微生物 2 株を混合したもの（接種量 ddBVD Tub 1 株  $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub>/用量、ddBVD Tub 2 株  $10^{5.7}$  TCID<sub>50</sub>/用量）を 5～6 頭に経鼻接種し、パフィーコート及び鼻汁スワブから得られたウイルスをプールして次の継代を行うという形で動物継代を実施したものである。ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の双方を混合して牛に接種しても、2 代目以降の継代は不可能となっている（別紙 2-6、試験の概要については 2(6)イ にも記載）。

妊娠牛あるいは子牛に対する高用量反復接種試験においても、異常が認められず、安全性が確認されている（別紙 1-6）。高用量の本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を含むワクチン（それぞれの製品に含まれる予定の規格値  $10^{4.0} \sim 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量（別紙 3-1 における成分及び分量参照）と比較した場合、ddBVD Tub 1 株は下限値の 355～1,622 倍、上限値の 3.5～16 倍、ddBVD Tub 2 株は下限値の 200～398 倍、上限値の 2～4 倍）を妊娠 61～90 日目の BVDV 抗体陰性牛 22 頭に接種し、生理的食塩水を接種した対照群 11 頭とともに安全性を確認した試験で、常用量下限値の 200 倍、上限値の 2 倍以上の本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を含むワクチンを接種した動物のパフィーコートからは接種後 12 日以降ウイルスは分離されなかった。ワクチン接種後 48 日目に 1 頭が流産した。流産胎子の臓器から BVDV は分離されず、流産した妊娠牛の血液からも BVDV は分離されなかったことから、この流産は BVDV 感染あるいはワクチン接種によるものではないと考えられた。ワクチン接種後 62 日目の剖検で得られた 21 頭中 1 頭の胎子胸腺検体について 2 回検査したうちの 1 回 BVDV 陽性となったため、この胎子の臓器（脾臓、胸腺、パイエル板、骨髄、腹水・胸水、血液、腸間リンパ節及び胎盤）について再検査したが、BVDV は分離されなかった。当該妊娠牛の臨床所見、直腸温、白血球数、血小板数及び抗体価の結果は他の妊娠牛と特に大きな差は認められなかった。よって、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の常用量（それぞれ  $10^{4.0} \sim 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量、両株を合わせた場合には  $10^{4.3} \sim 10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/用量）の接種では垂直感染は認められないと推察される。

それぞれの試験で用いた本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の接種量で、同居感染試験における ddBVD Tub 1 株は  $10^{4.98}$  TCID<sub>50</sub>/用量、両株同時接種による病原性復帰試験における ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株はそれぞれ  $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub>/用量及び  $10^{5.7}$  TCID<sub>50</sub>/用量については予定規格値の上限である  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量を下回っているが、単独で行っている病原性復帰試験では上限値を上回る接種量で実施されており、強制的な動物継代で 2～3 代目には継代できなくなる程度のウイルス量しか回収されていないことから、予定規格値  $10^{4.0} \sim 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量で接種された動物においては同居感染性はないと推察される。妊娠牛での安全性試験では、規格上限値を 1 型では 3.5～16 倍、2 型では 2～4 倍上回るウイルス量が接種されており、通常の使用ではありえないウイルス量を接種している。1 頭の胎子から本遺伝子組換え体 1 型が検出されたことについては、胸腺からのみで非常に微量でコンタミネーションを疑うレベルであり、他の臓器の再検査では一切ウイルスは検出されていないことから、垂直感染と断定することは不可能であった。これらの試験結果を踏まえると、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株をそれぞれ  $10^{4.0} \sim 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量ずつ含まれる接種量では安全性が確保されると推察される。

### 有害物質の産生性

宿主において有害物質の産生性は認められない。本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は宿主に欠損のみを生じさせたものであるため、有害物質の産生性は認められないと考えられる。

遺伝子配列の検索を宿主と同様のデータベース\*で確認したところ、アレルギー物質に相同性の高い配列は確認されなかった。

毒性物質産生性については、動物への接種試験において、特に毒性物質産生性を示すような所見は認められていない。

野外における使用後の有害事象についても、特にアレルギー物質あるいは毒性物質が産生されるような所見は認められていない（別紙 2-10）。

### 感染性（組織親和性及び持続感染性）

宿主の組織親和性と比較すると、「病原性」で記載したとおり、以下の理由から非常に感染性が低くなっていると考えられる：

- 動物に対する接種試験において、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は体外に排出されないことが確認されている（別紙 2-8）。同居感染性の有効な指標と考えられる抗体価は本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を含むワクチン株接種群でのみ検出されており、ウイルスの排泄経路と考えられる鼻汁スワブで陰性であり、同居群のバフィーコートからも検出されなかったことから、同居感染性はないと考えられた。体内分布においても陽性と判定された臓器は接種後 6 日のパイエル板のみであったことから、感染は一過性で、ワクチン株は主にリンパ系臓器に分布した後、接種後 21 日には体内から検出されなくなると考えられた。
- 動物接種による継代では 2～3 代で継代不能となる（別紙 2-9）。病原性復帰試験の結果から、動物体内でのウイルス増殖性は低く、感染能力もないと考えられた。これは、欠損の生じた本遺伝子組換え微生物では、ウイルスの増殖が 1 型インターフェロンの作用を受けて阻害されるためと考えられる。
- 胎子に対する感染は認められないと考えられる（別紙 1-6）。妊娠動物に対する病原性については、妊娠牛に対する高用量反復接種試験が実施されている。高用量の反復接種でも明らかに遺伝子組換え微生物が陽性となった牛胎子は認められなかったことから、常用量（それぞれ  $10^{4.0} \sim 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量、両株を合わせた場合には  $10^{4.3} \sim 10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/用量）接種による垂直感染は認められないと考えられる。

### 内在性ウイルスの活性化及び病原性付与の可能性の有無

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は牛を接種対象としているため、牛白血病ウイルスが感染している場合、活性化したり、病原性を付与したりする可能性について考察する。

- ・ 内在性ウイルスのような持続感染性のウイルスが本遺伝子組換え微生物の感染によって活性化されて免疫抑制が生じる可能性の有無：

\* 内閣府食品安全委員会平成 15 年度食品安全確保総合調査「タンパク質のアレルギー評価手法に関する調査報告」に示されたサイトで、現在閲覧が可能だった IUIS, SWISS-PROT allergen index, CSL, FARRP, ALLALLERGY 及び SDAP のデータベースに基づいて検索。

野外 BVDV 株と比較してワクチンウイルスを接種しても免疫抑制は起きないことが報告されている（文献 45）。

- ・ 副作用報告：2015 年の市販以降の副作用報告を確認したところ、内在性ウイルスの活性化あるいはその他の病原性が付与されたことを疑わせるようなものを含め、重大な報告は認められなかった。

#### 接種動物からの排泄及び同居感染性

「病原性」及び「感染性（組織親和性及び持続感染性）」で記載したとおり、接種動物における本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の体内分布確認試験及び同居感染性確認試験の結果からは、体外への排泄はされておらず、同居感染性もないという結果となった（別紙 2-8）。

#### 自然界での生存能力

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株はそれぞれの宿主の遺伝子配列の 2 か所に欠損があるだけで外来性遺伝子は一切含まないウイルスであるため、宿主の病原性及び動物体内における増殖性以外の特性をほぼそのまま受け継いでいると考えられる。ウイルスであるため、本遺伝子組換え微生物の増殖には動物体内に取り込まれることが必須であるが、接種動物からは排泄されず、同居感染性もみられないため、基本的に自然界では増えることはないと考えられる。

エンベロープを有する 1 本鎖(+)RNA ウイルスであり、エンベロープを有しないウイルスと比較すると水中等での生存性は数週間程度と推察されて（文献 44）より短く、標準的な水道水を用いた試験では 24 時間後には検出限界以下となった（表 2-15、別紙 2-11）。

表 2-15 遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の水中におけるウイルス価の推移

		Potency Log <sub>10</sub> FAID <sub>50</sub> /ml		
		0hr	6hr	24hr
Positive Control	Type 1	5.22	5.22	5.44
	Type 2	5.00	4.75	4.63
Water Test Sample <sup>1</sup>	Type 1	5.50	4.45	≤ 3.50 <sup>2</sup>
	Type 2	4.90	≤ 4.09 <sup>2</sup>	≤ 3.63 <sup>2</sup>

Type 1 : ddBVD Tub1 株                      Type 2 : ddBVD Tub 2 株

FAID<sub>50</sub> : 遺伝子組換え微生物は CPE を示さないため、培養細胞を蛍光標識抗体で染色して感染細胞を検出する。よって、単位としては TCID<sub>50</sub> と相同である。

陽性対照（Positive Control）は通常の培養液で培養したウイルス価で、水中試験検体（Water Test Sample）は水道水中でのウイルス価。

なお、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は宿主 BVDV と同様に紫外線及び消毒薬に対する感受性は比較的高く、BVDV は紫外線（UV、波長 254 nm）では 300 mJ/cm<sup>2</sup> の照射で 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 程度の減衰がみられ（別紙 2-12、文献 34）、畜舎等の消毒には同じウイルス属の豚コレラウイルスと同様に生石灰（酸化カルシウム）、消石灰（水酸化カルシウム）、苛性ソーダ（水酸化ナトリウム）等のアルカリ消毒剤や次亜塩素酸ナトリウム、逆性石鹼（四級アンモニウム塩）、加熱処理に

よって不活化されると考えられる。製造元で実施した消毒剤等の効果試験では、70%イソプロパノール、3%又は5%次亜塩素酸ナトリウム、フェノール系消毒薬、アルコール系消毒薬において室温 10 分間の不活化が確認されている（別紙 1-4）。

#### 交雑性

本遺伝子組換え微生物は、BVDV の性質をもつ一本鎖プラス RNA ウイルスであるため、同種または他種ウイルスとの組換えが生じるとすれば、細胞への感染後である。同種ウイルスとの組換えの可能性は、同じ細胞に同種ウイルスが同時に感染しなければ成立しないと考えられるが、BVDV 感染状態にある細胞には、後から別の種類の BVDV が感染しない（Superinfection Exclusion）ため、BVDV 同士の異なる株間での組換えは生じないと考えられる。これは本遺伝子組換え微生物と野外株を混合して培養した実験においても裏付けられている（別紙 2-13）。MDBK 細胞に、ddBVD Tub 1 株では BVDV-1 野外分離株（0001 株）、ddBVD Tub 2 株では BVDV-2 野外分離株（XJ-04 株）をそれぞれ MOI=0.1 で共感染させ、培養上清を 24、48 及び 72 時間後に回収した。エンドポイント希釈アッセイで無作為に免疫染色陽性となったフォーカスを選んで RNA を抽出し、cDNA を合成して nested PCR 法で遺伝子産物を得た。宿主ではない野外株を用いたのは、遺伝子組換え微生物とは異なるマーカー配列から、組換えが生じたときに確認可能となるためである。マーカー配列を含む部分について一次配列を確認したところ、マーカー遺伝子配列は野外株及び遺伝子組換え微生物で保存されていることが確認され、野外株と遺伝子組換え微生物の間で組換えは生じていないと結論付けられた。この実験条件は、牛体内にある CD46 陽性細胞に対する接種ウイルス量の規格（ddBVD Tub1 株及び ddBVD Tub 2 株それぞれについて 1 用量あたり  $10^{4.0} \sim 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>）よりは厳しい条件である。CD46 はほとんどの成熟白血球細胞表面に存在するため、仮に CD46 陽性細胞が血中白血球全般と考えると、一般的な白血球数  $4.9 \sim 13.3 \times 10^6$  個/mL（文献 50）として、牛の体重 1 kg 当たりの推定白血球数は牛の平均血液量 57 mL/kg（文献 51）から  $2.8 \sim 7.6 \times 10^8$  個となり、牛の生時を 40 kg とすれば  $1.1 \sim 3.0 \times 10^{10}$  個が血中の推定白血球数となる。よって、単純に計算すれば接種される本遺伝子組換え微生物の量は、接種牛における血中白血球数に対して MOI=10<sup>-4</sup> 以下と推定される。

BVDV は同種のウイルスとの重感染は生じないと考えられる一方で、BVDV で重感染が生じる事例が BVD-MD 発症牛には認められるとの報告がある（文献 52、53 及び 54）。BVD-MD 発症牛は、発症以前から NCP 型 BVDV がすでに感染しており、BVDV に対しては免疫寛容状態で正常な免疫反応が機能せず、Superinfection Exclusion メカニズムが機能しない。BVD-MD 発症は CP 型の BVDV との重感染で発症すると考えられ、BVD-MD 発症牛から、NCP 型のウイルスゲノムとともに CP 型のサブゲノムが十数種類確認されたと報告されている。

本遺伝子組換え微生物の使用に際しては、持続感染牛の摘発淘汰と同時並行して、健康牛へ接種する予定であり、重感染は生じないことが前提であるが、上記の事象を踏まえ、Superinfection Exclusion メカニズムが機能しない可能性については、以下の 3 つのシナリオが考えられた\*：

- A) 本遺伝子組換え微生物接種と同時に急性 BVDV 感染が起きる場合
- B) 本遺伝子組換え微生物を接種した直後に野外 BVDV が感染した場合

\* 2014 年 EMEA/CVMP における環境放出の妥当性に関する審議において説明。

C) 誤って、PI 牛に本遺伝子組換え微生物を接種した場合

A) については、野外 BVDV 株感染後にウイルス血症となる時期があるが、その際に本遺伝子組換え微生物が接種された場合、野外 BVDV 株と本遺伝子組換え微生物が一時的に血液中に共存する期間が想定される。Super infection Exclusion メカニズムは細胞への感染後、30～60 分で成立することから、成立前の数十分間で本遺伝子組換え微生物と野外 BVDV 株が同時に感染する可能性は否定できない。

また、B) については、野外 BVDV 感染後に本遺伝子組換え微生物接種牛が免疫機能不全となって PI 牛に近い状態になっているような可能性が全くないとは言えない。

さらに、C) については、PI 牛においては BVDV に対して免疫寛容となっているため、本遺伝子組換え微生物と野外 BVDV の重感染が起きる可能性は完全に否定できないと考えられる。

しかし、A)、B) あるいは C) のシナリオで実際に重感染が生じる危険性は、本遺伝子組換え微生物の動物体内における感染能力の低さから、すでに感染して圧倒的多数となっている野外 BVDV よりも優勢に増殖する能力を獲得する可能性が非常に低いと考えられるため、無視できる程度であると考えられる。なお、PI 牛に感染しているのは NCP 型 BVDV であり、同じ NCP 型の本遺伝子組換え微生物のみが感染しても BVD-MD 発症には至らないと考えられ、文献 53 に示された CP 型ワクチンによる BVD-MD 発症のような事態は生じないと考えられる。

前述のとおり、日本で本遺伝子組換え微生物を含有するワクチンを使用する場合は、現在国の事業として推進している PI 牛の摘発淘汰と同時並行して行われることになり、Superinfection Exclusion メカニズムが機能している健康な牛への接種が前提となる。また、その使用に際しては接種適否の判断を厳密に行ったうえで健康牛に接種することが使用条件となるように、使用上の注意事項として規定する予定である。

他種ウイルスとの交雑性は知られていない。

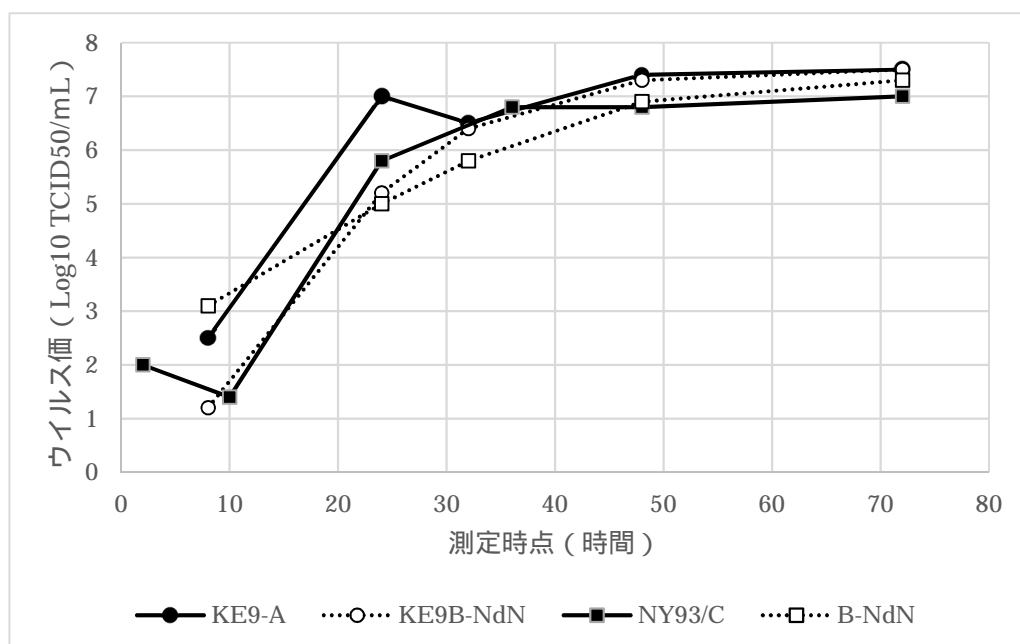
#### □ 遺伝子組換え微生物の宿主との識別を可能とするコロニー形成性、発色性等の特徴

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、発色性等の特徴はない。

宿主との識別方法としては、一次配列の確認（欠損部分の確認）が信頼性の高い方法であると考えられる。別紙 2-5 で 5 代継代した場合について分析した結果で、欠損部分は安定して保存されていることが確認されている。別紙 2-5 に記載のプライマーを使って遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の欠損部分を識別するための PCR 法が可能である。

培養細胞における増殖性は、宿主と比較すると本遺伝子組換え微生物は同等であった。図 2-16 に宿主と本遺伝子組換え微生物の増殖曲線を示した。MDBK-B2 細胞に MOI=0.1 で接種後 8、24、32、48 及び 72 時間のウイルス価は、KE9 株においてそれぞれ 2.5、7.0、6.5、7.4 及び 7.5  $\text{Log}_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL であり、BVDV-1 の遺伝子組換え微生物においてそれぞれ 1.2、5.2、6.4、7.3 及び 7.5  $\text{Log}_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL で、8 及び 24 時間目で遺伝子組換え微生物が若干低かったが、32 時間以降のウイルス価はほぼ同じであった。同じ接種条件で実施した NY93 株では、接種後 2、10、24、36、48 及び 72 時間でそれぞれ 2.0、1.4、5.8、6.8、6.8 及び 7.0  $\text{Log}_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL、BVDV-2 の遺伝子組換え微生物では、接種後 8、24、32、48 及び 72 時間でそれぞれ 3.1、5.0、5.8、6.9 及び 7.3  $\text{Log}_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL で、24～36 時間では遺伝子組換え微生物が低かったが、48 時間以降のウイルス価はほぼ同じであった。

図 2-16 宿主及び遺伝子組換え微生物の増殖性



MDBK-B2 細胞に MOI=0.1 でウイルスを感染させ、各時点で検体をサンプリングして凍結融解させたものを MDBK-B2 細胞に接種し、72 時間後に蛍光抗体法によりウイルス価を確認した（別紙 1-5 及び 2-1、文献 39 及び 40）。本グラフは文献に使用したデータから、再構成したものである。KE9B-NdN 及び B-NdN はそれぞれ 1 型及び 2 型の遺伝子組換え微生物である。

測定時点 (時間)	ウイルス価 (Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /mL)			
	KE9B-NdN	KE9-A	NY93/C	B-NdN
2			2.0	
8	1.2	2.5		3.1
10			1.4	
24	5.2	7.0	5.8	5.0
32	6.4	6.5		5.8
36			6.8	
48	7.3	7.4	6.8	6.9
72	7.5	7.5	7.0	7.3

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### (1) 使用等の内容

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。）  
 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号。以下、「医薬品医療機器等法」という。）第 14 条第 3 項の規定により提出すべき資料のうち臨床試験の試験成績に関する資料の収集を目的とする試験（以下、「治験」という。）に該当する場合は同法第 80 条の 2 第 2 項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  
 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（ に該当する行為は除く。）  
 接種（牛への接種）

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に伴う場合を含む。)

～ 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

## (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

緊急措置計画書参照

## (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

次項目(6)参照。

## (6)国外における使用等に関する情報

### イ 海外における市販状況

本遺伝子組換え微生物を含むワクチンは、2014年12月22日に欧州医薬品局(European Medicines Agency, EMA)によって承認され(別紙3-1)、その後、2015年3月に9カ国(ドイツ、フランス、スペイン、イタリア、オランダ、ベルギー、ポーランド、英国及びハンガリー)で上市され始め、2017年4月時点では13カ国で累計500万ドース以上販売されている(表3-1、別紙3-2)。

米国においては2017年10月現在承認申請中である。

表3-1 主要5か国における販売量の推移

国名	2015年	2016年	2017年 <sup>1)</sup>
ベルギー	109,340	125,145	77,535
フランス	369,850	909,545	522,185
ドイツ	243,060	266,805	127,525
イタリア	245,680	283,805	149,030
英国	255,355	457,030	204,740

単位：ドース

1) 2017年1月から4月実績

□ 欧州医薬品局提出資料

a) 市販後の有害事象（別紙 2-9）

欧州医薬品局の規則に従って市販後から 6 ヶ月ごとに作成される Periodic Safety Update Report においては、野外における使用後の有害事象がまとめられている（別紙 2-9）。有害事象の内訳は、ワクチン接種対象動物及び非接種対象動物の安全性に関する有害事象事例、ヒトに対する安全性に関する事例、有効性が疑われる事例、休業期間に関する有害事象事例、環境要因に起因する有害事象事例、感染因子の伝播が疑われる有害事象事例、製品における物質（異物）事例に分類されている。市販後から 2017 年 7 月までに報告された事例（表 3-2）には、対象動物の安全性に関する有害事象が接種動物の 0.0364% で報告されており、牛では特に高い報告頻度ではない。有効性が疑われる有害事象事例には主に PI 牛も含まれるが、野外感染がワクチン接種よりも先に起きている可能性は否定できなかった。非接種対象動物の安全性に関する有害事象事例は報告されていない。



表 3-2 2014 年 12 月から 2017 年 6 月までの有害事象に関する情報

期間	BOVELA 接種動物数 (頭)	対象動物の安全性に関する 有害事象		有効性に 関する 報告数	環境要因に起 因する有害事 象報告数
		頭数(頭)	割合(%)		
2014 年 12 月 ~ 2015 年 6 月	847,995	147	0.0173	0	0
2015 年 7 月 ~ 2015 年 12 月	673,195	165	0.0245	4	0
2016 年 1 月 ~ 2016 年 6 月	1,319,720	645	0.0489	3	2
2016 年 7 月 ~ 2016 年 12 月	1,232,910	136	0.0110	10	5
2017 年 1 月 ~ 2017 年 6 月	1,535,040	950	0.0619	16	1
全期間の合計	5,608,860	2,043	0.0364	33	8

b) 海外における野外臨床試験

海外では承認取得時のハンガリーでの野外臨床試験が、3,576 頭（試験終了時の頭数として酪農牛 2,062 頭、肉用牛 1,514 頭）規模で行われた。本試験の概要について記載する（別紙 3-3）。

酪農牛の野外臨床試験（別紙 3-3 の 3-3-1）

BVDV 抗体価に関して状態及び妊娠ステージの異なる 4,129 頭（8 施設）を供試した。2,067 頭に本遺伝子組換え微生物を含有するワクチン（市販標準品と同様の ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株それぞれ  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/用量含有）を接種し（ワクチン群）、対照群 2,062 頭にはリン酸緩衝食塩液（PBS）を 2 mL 接種した。

試験期間中、2,399 頭（ワクチン群 1,216 頭、対照群 1,183 頭）の新生牛が生まれた。

主要評価項目として、ワクチン株あるいは野外株による胎子感染（安全性）を設定した。新生牛について 4 週間追跡調査した。副次的評価項目として、臨床観察（BVDV 感染に関連した項目）及び抗体検査を実施した。BVDV 感染を確認するために採血を 3 か月ごとに試験終了時まで実施したところ、ワクチン群では 4 頭を除くすべての牛で抗体陽転が認められ、対照群ではほとんどの動物が試験開始時から終了時まで抗体陰性のままであった。

ワクチン群 1,216 頭中 5 頭、対照群 1,183 頭中 10 頭の胎子感染が確認された。ワクチン群 5 頭中の 4 頭ではイヤーノッチ試験で PCR 陽性となり、いずれも野外 BVDV-1 であることが判明した。そのうち 3 頭については、日数から推察するとワクチン接種前の経子宮感染であると考えられた。5 頭中 1 頭のワクチン群の流産胎子では、BVDV が血液検体からわずかに検出されたのみで、その他の臓器（胸腺、脾臓、小脳等）からは検出されなかったが、結果的にはワクチン株（ddBVD Tub 1 株）であることが判明した。正常な子牛、死産、流産を含み、本試験のワクチン群で 1,331 頭の子牛中ワクチンウイルスが検出されたのは、この 1 症例のみであった。非常に微量なウイルス検出量から、ワクチン株が流産の原因でないことは明らかであり、流産に至るような異常な因子があっ

たために本来健康な胎子では移行する可能性のないワクチン株が胎子から検出されたものと推察された。

イヤーノッチ試験では陰性であったワクチン群 2 頭で、バフィーコート検体における BVDV 陽性が確認されたが、これは一過性の野外 BVDV 感染であると考えられた。これらの子牛の母牛は試験開始時には妊娠後期であったため、試験開始前から子牛の感染があったと考えられた。

67 件の流産（ワクチン群 34 頭、対照群 33 頭）が試験期間中報告された。2 頭の胎子以外はすべてウイルス分離試験において BVDV 陰性であった。ワクチン群の胎子 1 頭は血液検体から BVDV が分離された（前述）。対照群の 1 頭は臓器から野外 BVDV-1 陽性となった。それぞれの母牛は接種処置時に感染しやすい時期だったため、野外 BVDV 感染が胎子にあったものと考えられた。

ワクチン群 1 頭、対照群 2 頭には先天性欠陥が確認された。対照群の 1 頭ではバフィーコートでの BVDV 陽性が確認され、生存可能で先天性乏毛症と骨格の欠陥が認められ、接種処置の前後に野外 BVDV の経子宮感染があったと考えられた。

試験期間中、産出された子牛はすべてワクチン株陰性であると確認された。よって、非妊娠牛及び全ての妊娠期における妊娠牛において本遺伝子組換え微生物を含有するワクチンは安全であると結論付けられた。

その他、未経産牛における受胎率、経産牛及び未経産牛における死亡動物の死亡原因、ならびに死産、死亡子牛及び死亡胎子に関する死亡原因について、ワクチン群では BVDV 感染によるものと考えられる異常は認められなかった。

以上の結果から、本遺伝子組換え微生物を含有するワクチンは非妊娠乳牛及びすべての妊娠ステージの妊娠乳牛において安全であることが確認された。受胎率にも影響は認められなかった。有効性に関しても、野外 BVDV 株の感染阻止が示唆される事例があった。

#### 肉用牛の野外臨床試験（別紙 3-3 の 3-3-2）

妊娠ステージの異なる 757 頭（10 施設）の動物に本遺伝子組換え微生物を含有するワクチン（市販標準品と同様の ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株それぞれ  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/用量含有）を接種した（ワクチン群）。対照群 757 頭には PBS を 2 mL 接種した。最終的に 226 頭（ワクチン群 115 頭、対照群 111 頭）が試験から除外となった。

主要評価項目として、ワクチン株あるいは野外株による胎子感染（安全性）を設定した。副次的評価項目として、臨床観察（BVDV 感染に関連した項目）及び抗体検査を実施した。680 頭（ワクチン群 336 頭、対照群 344 頭）の新生牛について 4 週間追跡調査した。

2 件（ワクチン群及び対照群それぞれ 1 件）の胎子感染がイヤーノッチ試験で試験中に報告された。感染ウイルスの遺伝子配列を確認したところ、いずれも野外 BVDV-1 株であることが判明した。本感染はおそらく試験開始直前に起きた可能性が高いと推察された。

試験開始時、ワクチン群中、試験開始時の BVDV-1 抗体陰性は 26.8%（203 頭、BVDV-2 抗体陰性は 28.8%（218 頭）であった。ワクチン接種後は BVDV-1 及び BVDV-2 に対する抗体価が認められなかった牛の 97%以上（BVDV-1 抗体陽転 199 頭、BVDV-2 抗体陽転 212 頭）の抗体が陽転した。一方、対照群の試験開始時において、BVDV-1 抗体陰性は 31.4%（238 頭）、BVDV-2 抗体陰性は 33.03%（250 頭）であった。92%以上（BVDV-1 抗体陰性 230 頭、BVDV-2 抗体陰性 226 頭）の牛が試験終了時まで抗体陰性であった。10 施設中 7 施設でワクチン接種後の抗体価がワクチン群

で有意に高かった。

新生牛における異常は、臨床症状として数日間の一過性の行動活性低下がワクチン群 2 頭、対照群 1 頭で報告された以外は、認められなかった。

BVDV 感染が疑われるような臨床症状は認められなかった。

1,514 頭中 18 頭の牛が、BVDV 感染とは無関係な原因で死亡した。

試験期間中に 4 件の流産が報告され、うち 3 件はワクチン群であった。3 件とも流産胎子の発育に異常は認められなかった。検査の結果、4 頭とも BVDV 陰性であると確認された。

以上の結果から、ワクチンの安全性及び有効性が確認された。

## (7) 接種動物の体内における挙動に関する情報

### イ 接種動物の体内における遺伝子組換え微生物の消長に関する情報

BVDV は免疫細胞表面に存在する CD46 を介して感染することから、本遺伝子組換え微生物も同様の経路で感染すると考えられる。CD46 陽性細胞は免疫細胞を含めて牛体内の細胞表面に広く分布するため、感染時は一時的に体内全体に分布する可能性があると考えられるが、接種後糞便や体液からの排泄は認められないことから、体内での増殖性は低いと考えられる。病原性復帰試験において、ddBVD Tub1 株（接種量： $10^{6.74}$  TCID<sub>50</sub>/用量）では継代 3 代目、ddBVD Tub 2 株（接種量： $10^{6.22}$  TCID<sub>50</sub>/用量）では継代 2 代目において継代が不可能になっていること（別紙 2-6 の 2-6-1(1)及び(2)）、ddBVD Tub1 株及び ddBVD Tub 2 株（接種量：それぞれ  $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub> 及び  $10^{5.7}$  TCID<sub>50</sub>/用量\*）を混合して接種した試験では継代 2 代目において継代が不可能になったこと（別紙 2-6 の 2-6-2）、ddBVD Tub1 株及び ddBVD Tub 2 株（目標接種量：それぞれ  $10^{5.7}$  TCID<sub>50</sub> 及び  $10^{5.8}$ TCID<sub>50</sub>/用量）を混合して接種した試験で、接種動物ではウイルス陽性臓器が 6 日目に最も多く、9 日目には急激に減少し、21 日目には認められなくなり、接種しなかった動物への同居感染性が認められないこと（別紙 2-8）が確認されている。引用した試験の概要については 2 の（6）のイに示したとおりである。

日本においては他の生ワクチンが接種されている牛に本遺伝子組換え微生物を含む製品が接種される可能性があるが、BVBD-1 及び BVDV-2 のそれぞれの野外株との本遺伝子組換え微生物の共培養によっても本遺伝子組換え微生物との組換えが起きていないことから（別紙 2-13）、野外株よりも感染性は低いと考えられる生ワクチン株との組換えの可能性はほぼないと考えられる。

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

同居感染性はないことが、実験で証明されている（2 の(6)の 、別紙 2-7）。強制的に動物継代を行う病原性復帰試験（動物への最初の接種量は ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株とも  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/用量以上）において接種材料として用いたのは、血液（バフィーコート）及び体液（鼻汁スワブ）であり、本材料による継代は ddBVD Tub1 株では継代 3 代目、ddBVD Tub 2 株では継代 2 代目において継代が

\* ここでは接種量の単位を TCID<sub>50</sub> で記載したが、別紙 2-6 の 2-6-2 の報告書においては FAID<sub>50</sub> で記載されている。本遺伝子組換えウイルスは CPE を示さないため、感染細胞を特定するため蛍光標識した抗体で染色する必要がある。よって FAID<sub>50</sub> は TCID<sub>50</sub> と同一である。

不可能になった(2の(6)の、別紙 2-6)。

よって、本遺伝子組換え微生物を含有するワクチンの予定規格の 100 倍量を人工的に動物継代した結果でも 2~3 代目には消失してしまう程度のウイルス量しか得られないこと、そもそも同居感染性が認められないことから、糞便あるいは尿経由への遺伝子組換え微生物の排泄はないと考えられる。

## 八 接種動物において遺伝子組換え微生物の垂直感染の可能性の有無に関する情報

妊娠動物に対する病原性については、別紙 1-6 中に記載されているとおり、妊娠牛に対する高用量接種試験が実施されている。

高用量の本遺伝子組換え微生物含有ワクチン(4.0 Log<sub>10</sub>/用量とした場合、200 ~1,621 倍)を妊娠 61~90 日目の BVDV 抗体陰性牛 22 頭に接種し、生理的食塩水を接種した対照群 11 頭とともに安全性を確認した。接種後 62 日間にわたって臨床観察(全身及び局所)及び直腸温測定の実施と、血液検体採取によるパフィーコートからのウイルス分離、血小板数、白血球数、抗体陽転の確認を行った結果、高用量の本遺伝子組換え微生物含有ワクチンを妊娠牛に接種してもいずれの項目についても病原性は認められず、胎子からも ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株もしくは BVDV は分離されず、垂直感染の可能性はないと考えられ、安全であることが確認された。

## 二 野生動植物への伝播の可能性の有無に関する情報

BVDV に最も感受性の高い動物は牛である。

文献検索から、日本において BVDV 感染の可能性のある動物種を絞り込むと、以下のようになると考えられる：

- 野生種ヤギ(日本における生息数は非常に少ない。)
- 野生種ウサギ(日本における生息数は減少傾向で、準絶滅危惧種に指定されている。)
- シカ\*(ある程度の生息数が確認されている。)
- イノシシ\*(ある程度の生息数が確認されている。)

日本における放牧の状況については、第 4 回畜産企画部会委員要求資料(平成 16 年 7 月農林水産省生産局畜産部)によると、酪農を中心に公共牧場において放牧されている牛は、北海道では約半数、都府県では 3 割とされる<sup>#</sup>。感受性の高い牛でも同居感染性は観察されておらず、放牧中に日本である程度の生息数が確認される野生シカ、イノシシに遭遇する可能性が考えられるが、同居のような濃密な接触を野生シカあるいはイノシシとする可能性はないため、拡散しないと考えられる。放牧以外の場合では野生動物への接触の可能性が低い飼育形態であると考えられるため、牛よりも感受性の低い野生動物への伝播の可能性はないと考えられる。さらに生息数の少ない野生種ヤギあるいは野生種ウサギについても、同様の理由で拡散しないと考えられる。

\* 環境省において、「野生鳥獣による生態系への影響が懸念される地域(ニホンジカ及びイノシシ)」が公開されている(<http://www.biodic.go.jp/biodiversity/activity/policy/map/map14/index.html>)。

<sup>#</sup> 第 4 回畜産企画部会委員要求資料(平成 16 年 7 月農林水産省生産局畜産部)  
<http://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/tikusan/kikaku/h1605/pdf/data6.pdf>

実際にシカあるいはイノシシで本遺伝子組換え微生物を用いた試験を実施するのは困難であるが、本遺伝子組換え微生物を用いたヒツジ及び豚での同居感染性を確認した試験資料では、遺伝子組換え微生物接種動物と非接種動物を同居させてそれぞれ 56 日間観察し、ヒツジ及び豚の双方で同居感染が認められないことが確認された（別紙 3-4）。シカ及びイノシシにおける感染性はヒツジ及び豚と同等と考えられ、直接接種された場合でも同居感染性はないと考えられる。また、一番感受性の高い牛においても継代が途中で成立しなくなることを考え合わせると、シカ及びイノシシ双方への拡散の可能性はないと考えられる。

なお、別紙 2-9 として添付した有害事象に関する報告では、非接種対象動物も報告の対象となっているが、市販後から 2017 年 7 月までに報告されている事例はない。

#### ホ その他必要な情報

欧州ではすでに承認を得ており、欧州医薬品局における審議結果においては、環境リスクアセスメントをその評価書で述べている（別紙 3-1）。

本遺伝子組換え微生物を含有するワクチン（ddBVD<sub>Tub1</sub> 株及び ddBVD<sub>Tub2</sub> 株混合生ワクチン）の危険性及び環境への暴露の危険性としては以下の観点から科学的に検証された：

本遺伝子組換え微生物を含有するワクチンの危険性

対象動物以外の種への伝播

生抗原含有製品の排泄

生存性、定着性及び拡散性

遺伝子の安定性、病原性復帰、遺伝子拡散の可能性

その他（一本鎖 RNA ウイルスのゲノムは、DNA に組み替えられないこと）

遺伝子組換え微生物を含むあるいはそれで構成される製品に対する環境リスクアセスメント

結論として、本遺伝子組換え微生物を含有するワクチンの生物多様性影響については、動物あるいは環境菌のゲノムに対してウイルス RNA ゲノム由来の遺伝子の拡散が起きる危険性は無視できる程度であると考えられる。環境リスクアセスメントでは、弱毒ワクチン株である BVDV-1 及び BVDV-2 の使用による危険性は、ヒトに対して無視できるものであり、用法及び用量どおりに用いるときの環境に対しても非常に低いと考えられ、通常の使用の注意程度で十分であると考えられるとされた。実施された試験内容で、ワクチン株は対象動物だけでなく、最も重要な非接種対象動物を代表するヒツジ及び豚にも安全であることが確認されていること、両ワクチン株とも病原性復帰が否定されていること、並びにワクチン株が接触による拡散はしないと結論付けられていることから、野生動物のモニタリングは必要ないと結論付けられた。

## 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

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は BVDV-1 の宿主 KE9 株及び BVDV-2 の宿主 NY93 株から *Npro* 遺伝子の 4 アミノ酸を除くすべての配列と *E<sub>1ms</sub>* 遺伝子のヒスチジンをコードする 3 塩基の欠損を生じさせたものであり、欠損以外の遺伝子は宿主と同一で外来性遺伝子は一切含まれず、5 代継代しても遺伝子は安定しており、宿主と比較しても培養細胞における増殖性は同等である。ほぼ全体を欠損させた *Npro* 遺伝子の産物は、ペスチウイルス属に特有の 168 個のアミノ酸からなる非構造タンパク質で、自然に開裂して N 末端ドメインと C 末端ドメインの 2 つのタンパク質となる。N 末端側のタンパク質はプロテアーゼで、システインプロテアーゼ活性があり、*Npro* の遺伝子産物を開裂させる機能を有する。C 末端側のタンパク質は亜鉛結合 TRASH モチーフ (Cys-Cys-Asp-Cys) が含まれており、インターフェロン制御因子-3 (interferon regulatory factor-3: IRF-3) に結合して 1 型インターフェロンの産生を阻止する機能を有する。一方、3 塩基のみの欠損を生じさせた *E<sub>1ms</sub>* 遺伝子の産物は C、E1 及び E2 とともにウイルス外殻を構成するタンパク質で、*E<sub>1ms</sub>* は中和抗体の結合部位、感染動物に抗原として認識されて免疫反応を誘導する部位であることが報告されている。また、*E<sub>1ms</sub>* 遺伝子産物はリボヌクレアーゼ活性を持っており、ウイルス外膜のウイルス RNA によって誘導されるインターフェロンの発現を阻止し、BVDV の持続感染性に大きな役割を果たしていると考えられている。そのため、欠損の生じた本遺伝子組換え微生物では、ウイルスの増殖が 1 型インターフェロンの作用を受けて阻害されると考えられる。

本遺伝子組換え微生物は宿主の病原性及び動物体内における増殖性以外の特性を受け継いでいるため、BVDV 感受性動物である牛及びその他の反すう動物ならびに豚及びウサギに感染して初めて複製が可能となるが、感受性動物体内では 1 型インターフェロンによる阻害によるものと思われる増殖抑制が起きると考えられる。最も BVDV に対して感受性の高い牛での比較的高いウイルス量 (ddBVD Tub 1 株  $10^{4.98}$  TCID<sub>50</sub>/用量及び ddBVD Tub 2 株  $10^{6.74}$  TCID<sub>50</sub>/用量) 接種による同居感染試験において、水平伝播は認められなかった。同居感染試験における ddBVD Tub 1 株接種量  $10^{4.98}$  TCID<sub>50</sub>/用量は予定規格値の上限である  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量を下回っているが、単独接種で行っている病原性復帰試験では上限値を上回る接種量で実施されており、強制的な動物継代で 2～3 代目には継代できなくなる程度のウイルス量しか回収されていないことから、予定規格値  $10^{4.0}$ ～ $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量で接種された動物において同居感染性はないと推察される。なお、病原性復帰することで同種のウイルスが増えるような可能性は、BVDV 野外病原株との組換えによる欠損部分の復帰によるものが考えられるが、そのためには動物体内における重感染が必要条件となる。健康牛の場合、BVDV の特徴として同種のウイルス同士が同じ感染細胞には感染できない Superinfection Exclusion メカニズムにより重感染は不可能であるため、病原性復帰は起きないと考えられ、自然界においては生存能力の低いウイルスであると考えられる。PI 牛において BVDV の重感染が起きることが確認されているが、すでに病原性 BVDV が感染しているような細胞で本遺伝子組換え微生物がそれを上回る複製能力を獲得する可能性は非常に低いと考えられる。他の微生物と重感染する可能性は否定できないが、他の微生物が欠損部分を全く同一の配列として補完する可能性は殆どありえないと考えられる。

本遺伝子組換え微生物の形質発現の安定性は確認されており、病原性及び動物体内における増殖

性以外は宿主の特性をほぼ受け継いでいることを踏まえると、有害物質を産生して他の微生物に影響を与える可能性は宿主と同等であると考えられる。本遺伝子組換え微生物の宿主 KE9 株はヨーロッパ、NY93 株は米国に分布していたそれぞれ遺伝子解析上別系統の株で、それぞれの地域において現状で BVDV 発生による他の微生物への影響は報告されていないこと、自然界での生存能力は宿主と同程度で紫外線や消毒薬に対する感受性が比較的高く自然界での生存能力は低いと考えられること、BVDV が他の微生物との交雑性は報告されていないことから、本遺伝子組換え微生物についても影響はないと考えられる。なお、本遺伝子組換え微生物は遺伝子上の欠損を確認することによって特定することが可能である。

これらのことから、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育成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、BVDV-1 及び BVDV-2 を宿主としており、病原性及び動物体内における増殖性以外は宿主の特性をほぼ受け継いでいることから、影響を受ける可能性のある野生動物としては、BVDV への感受性が報告されている野生種ヤギ、野生種ウサギ、シカ及びイノシシが想定される。日本国内において、野生種ヤギはほとんど生息しておらず、野生種ウサギはその生息数が減少傾向にあり、準絶滅危惧種に指定されている。シカ及びイノシシについては、日本全国にある程度の数が分布している。

野生動物への BVDV 感染リスクは、最も BVDV に対して感受性の高い動物である家畜の牛が飼育されている地域の周辺部で高いと考えられるが、文献調査では野生の感受性動物における抗体保有率は 0～6.01%程度である。野生動物からは BVDV-1 が RT-PCR で確認されているが、BVDV 感染が野生動物において流行したという報告はない。

本遺伝子組換え微生物は、病原性を有する宿主 KE9 株及び NY93 株から作製されているが、*N<sup>pro</sup>* 遺伝子の 4 アミノ酸を除くすべての配列と *E<sup>rms</sup>* 遺伝子のヒスチジンをコードする 3 塩基の欠損により、宿主の有する病原性は認められなくなったことが、様々な動物接種試験によって確認されている。この病原性の消失は、*N<sup>pro</sup>* の欠損による 1 型インターフェロン阻害活性の消失と *E<sup>rms</sup>* の一部欠損によるインターフェロン発現阻害活性の低下によるものと考えられる。さらに、排泄されるウイ

ルス量は、最も感受性の高い牛に強制感染させた病原性復帰試験でも継代 2～3 代目には動物継代が不可能となる程度であり、筋肉注射した牛と非接種牛の同居感染試験でも同居感染性が認められないことが推察され、牛以外で感受性のあるヒツジ及び豚でも試験を実施し認められないことが実験的に確認されている。よって、接種対象動物である牛と野生動物が接触することによる感染は成立しないと考えられ、万が一感染が成立したとしても、他の野生個体への伝播は成立しないと考えられる。

接種妊娠牛からの胎子への垂直感染は、妊娠牛を用いた高用量の反復接種試験によっても明らかには認められなかったことから、胎子の持続感染の可能性は否定される。本遺伝子組換え微生物の病原性の復帰には、他微生物との重感染による欠損の補完が必要と考えられるが、BVDV の特徴として同種のウイルス同士が同じ感染細胞には感染できない Superinfection Exclusion メカニズムにより重感染は不可能であるため、病原性復帰は起きないと考えられ、他の微生物と重感染したとしても、他の微生物が欠損部分を全く同一の配列として補完する可能性はないと考えられる。

BVDV はヒトへの感染性が知られていないことから、本遺伝子組換え微生物のヒトへの暴露による安全上の懸念が生じる可能性はない。

これらのことから、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の判断

以上のことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性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（野生動植物の生息又は育成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

宿主において有害物質の産生性は認められておらず、本遺伝子組換え微生物は病原性及び動物体内における増殖性以外は宿主の特性をほぼ受け継いでいると考えられることから、有害物質の産生性は認められないと考えられる。海外では市販後においても有害物質産生を疑うような報告はない。また、遺伝子配列の検索によるアレルギー性物質その他の有害性物質を産生するような配列も認められていない。また、遺伝子上の欠損は安定していて新たなオープンリーディングフレーム発生による有害物質産生の可能性もないことから、有害物質産生による野生動植物に対する影響はないと考えられる。

これらのことから、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

BVDV は一本鎖プラス RNA ウイルスであり、その増殖様式から細胞質内で核酸の複製が行われて増殖すること、核酸の複製過程に DNA の形態を介さないことから、核酸の一部または全部が感染動物の細胞の染色体に含まれる可能性はないと考えられる。

最も BVDV に対して感受性の高い牛での比較的高いウイルス量( ddBVD Tub 1 株  $10^{4.98}$  TCID<sub>50</sub>/用量及び ddBVD Tub 2 株  $10^{6.74}$  TCID<sub>50</sub>/用量 ) 接種による同居感染試験において、水平伝播は認められなかった。同居感染試験における ddBVD Tub 1 株接種量  $10^{4.98}$  TCID<sub>50</sub>/用量は予定規格値の上限である  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量を下回っているが、単独接種で行っている病原性復帰試験では上限値を上回る接種量で実施されており、強制的な動物継代で 2～3 代目には継代できなくなる程度のウイルス量しか回収されていないことから、予定規格値  $10^{4.0}$ ～ $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/用量で接種された動物において同居感染性はないと推察される。このことから、近隣感受性動物または近隣野生動物に対しても事故が起きる可能性はないと考えられ、本遺伝子組換え微生物が他の野生動植物等の核酸に水平伝播する機会はないものと考えられる。

これらのことから、核酸を水平伝播する性質によって影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

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、核酸を水平伝播する性質に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないものと判断した。

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

上記のほかに、本遺伝子組換え微生物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評価

他の微生物を減少させる性質については、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub1 株及び ddBVD Tub 2 株が宿主の病原性及び動物体内での増殖性以外の特性を受け継いでいるウイルスであるため動物体内に取り込まれて増殖可能となるが、動物体内に取り込まれた後には 1 型インターフェロンによる阻害と思われる増殖抑制が起きると考えられる。最も感受性の高い牛での同居感染試験で、ddBVD Tub 1 株接種量は予定規格値の上限を下回っているが、単独接種で行っている病原性復帰試験では上限値を上回る接種量で実施されており、強制的な動物継代で 2～3 代目には継代できなくなる程度のウイルス量しか回収されていないことから、予定規格値で接種された動物において同居感染性はないと推察される。さらに、健康牛においては BVDV 野外病原株の重感染による欠損部分の復帰は Superinfection Exclusion メカニズムにより不可能であり、PI 牛における重感染が仮に起きたとしてもすでに持続感染している病原性 BVDV を上回る増殖能を獲得する可能性はほとんどありえないこと、他の微生物との重感染による欠損部分の補完は可能性がほとんど否定されること、有害物質産生性による他の微生物への影響は報告されていないこと、自然界では宿主と同程度の生存能力で紫外線や消毒薬に対する感受性が高いこと、他の微生物との交雑性は報告されていないことから、本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、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、日本国内における感染リスクの高い動物種と考えられるシカ、イノシシ及び野生種ウサギについて BVDV の流行が認められたとの報告はなく、宿主に認められた病原性が本遺伝子組換え微生物については最も感受性の高い牛の他、ヒツジ及び豚における同居感染性が否定されることから接種動物からの排出が認められず、前項に述べたとおり病原性復帰試験の結果から動物体内では 2～3 代目には継代不可能となる程度の増殖力であった。また、胎子への垂直感染も高用量の反復接種試験によって認められないと考えられ、BVDV のヒトへの感染性は知られていないことから、本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、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、BVDV そのものに有害物質産生性がないため、宿主の病原性及び動物体内における増殖性以外の特性を受け継ぐ本遺伝子組換え微生物にも有害物質産生性はないと考えられること、海外における市販後調査においても有害物質産生性が認められておらず、遺伝子配列に基づく検索でアレルギー性物質その他の有害物質を産生するような配列が認められず、遺伝子上の欠損は安定していて新たなオープンリーディングフレーム発生による有害物質の産生性もないと考えられることから、本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、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないものと判断した。

核酸を水平伝播する性質については、BVDV が細胞質内で核酸の複製及びウイルスの複製が行われるペストウイルスであり、核酸の複製過程に DNA は介在せず、本遺伝子組換え微生物の核酸が感染動物の染色体に取り込まれる可能性がないこと、同居感染性が認められないと推察されるために近隣感受性動物または近隣野生動物に対する事故が起きる可能性はないと考えられることから、本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、核酸を水平伝播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、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株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。

## 引用文献

1. 迫田, 2011 : 6. ペスチウイルス, ウイルス, 第 61 巻第 2 号 : 239-248.
2. Leyssen *et al.*, 2000: Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. Clin. Microbiol. Rev., 13: 67-82.
3. OIE, 2015; BOVINE VIRAL DIARRHOEA, Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.
4. Thiel *et al.*, 1991: Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. J. Virol. 65: 612.
5. Weiland *et al.*, 1999: Localization of pestiviral envelope proteins E<sup>rns</sup> and E2 at the cell surface and on isolated particles. J. Gen. Virol., 80: 1157-1165.
6. Weiland *et al.*, 1990: Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. J. Virol., 64: 3563-3569.
7. Weiland *et al.*, 1992: A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. J. Virol., 66: 3677-3682.
8. Gil *et al.*, 2006: The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus N<sup>pro</sup> protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. J. Virol., 80: 900-911.
9. Hilton *et al.*, 2006: The N<sup>pro</sup> product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. J. Virol. 80: 11723-11732.
10. Zürcher *et al.*, 2014: Prolonged activity of the pestiviral RNase E<sup>rns</sup> as an interferon antagonist after uptake by clathrin-mediated endocytosis. J. Virol., 88: 7235-7243.
11. Giangaspero *et al.*, 2007: Numerical taxonomy of the genus Pestivirus based on palindromic nucleotide substitutions in the 5' untranslated region. J. Virol. Methods., 146: 375-88.
12. Deng *et al.*, 2014; Genomic characterization of a bovine viral diarrhea virus 1 isolate from swine. Arch Virol., 159: 2513-2517.
13. Goa *et al.*, 2013; Serological and molecular evidence for natural infection of Bactrian camels with multiple subgenotypes of bovine viral diarrhea virus in Western China. Vet Microbiol., 163: 172-176.
14. Bachofen *et al.*, 2013; Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. Vet Res., 44: 32.
15. Mishra *et al.*, 2012; Genetic variety of bovine viral diarrhea virus 1 strains isolated from sheep and goats in India. Acta Virol., 56: 209-215.

16. Aguirre *et al.*, 2014; Genotypic characterization of Chilean llama (*Lama glama*) and alpaca (*Vicugna pacos*) pestivirus isolates. *Vet Microbiol.*, 168: 312-317.
17. Aguirre *et al.*, 2014; Antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from alpaca (*Vicugna pacos*), llama (*Lama glama*) and bovines in Chile. *Vet Microbiol.*, 168: 324-330.
18. Marcoppido *et al.*, 2011; Study of the kinetics of antibodies titres against viral pathogens and detection of rotavirus and parainfluenza 3 infections in captive crias of guanacos (*Lama guanicoe*). *Transbound Emerg Dis.*, 58: 37-43.
19. 梁川直宏, 千代隆之, 西部家畜保健衛生所(鳥取), 豚の牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)感染による豚コレラ ELISA 陽性事例, 平成 19 年度畜産技業績発表会.
20. Nelson *et al.*, 2008; Evidence for persistent Bovine viral diarrhoea virus infection in a captive mountain goat (*Oreamnos americanus*). *J Vet Diagn Invest.*, 20: 752-759.
21. Marcoppido *et al.*, 2010 Apr; Antibodies to pathogenic livestock viruses in a wild vicuña (*Vicugna vicugna*) population in the Argentinean Andean altiplano. *J Wildl Dis.*, 46: 608-614.
22. Nelson *et al.*, 2016; Persistent Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Domestic and Wild Small Ruminants and Camelids Including the Mountain Goat (*Oreamnos americanus*). *Front Microbiol.*, 6: 1415.
23. Paniagua *et al.*, 2016; Absence of circulation of Pestivirus between wild and domestic ruminants in southern Spain. *Vet. Rec.*, 178: 215.
24. Casaubon *et al.*, 2012; Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Vet Res.*, 8:204.
25. Martin *et al.*, 2011; Epidemiology of Pestivirus infection in wild ungulates of the French South Alps. *Vet Microbiol.*, 147: 320-328.
26. Kirchgessner *et al.*, 2012; Prevalence and spatial distribution of antibodies to bovine viral diarrhoea virus and *Coxiella burnetii* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in New York and Pennsylvania. *J. Zoo Wildl Med.*, 43: 466-472.
27. Ilha *et al.*, 2012; The occurrence of Bovine viral diarrhoea virus in hunter-harvested white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the state of Georgia, southeastern United States. *J. Vet Diagn Invest.* 24: 1052-1056.
28. Glawischnig *et al.*, 2010; Monitoring for bovine viral diarrhoea virus in Austrian red deer (*Cervus elaphus elaphus*) by using ear-notch samples. *J. Wildl Dis.*, 46: 1269-1273.
29. Grant *et al.*, 2015; Assessment of the rabbit as a wildlife reservoir of bovine viral diarrhoea virus: serological analysis and generation of trans-placentally infected offspring. *Front Microbiol.*, 6: 1000.
30. Sedlak *et al.*, 2008; Antibodies to selected viral disease agents in wild boars from the Czech Republic. *J. Wildlife Dis.*, 44: 777-780.
31. Seong *et al.*, 2015; Experimental infection of mice with bovine viral diarrhoea virus. *Arch Virol.*, 160: 1565–1571.
32. 亀山ら, 平成 24 年 3 月; 牛ウイルス性下痢ウイルスの国内分布および牛ウイルス性下痢・粘膜病の

迅速診断に関する研究，動衛研研究報告第 118 号，19-22

33. Lee *et al.*, 2005; Dual Mechanisms of Pestiviral Superinfection Exclusion at Entry and RNA Replication. *J. Virol.*, 70: 3231-3242.
34. Cutler *et al.*, 2011; Kinetics of UV<sub>254</sub> inactivation of selected viral pathogens in a static system. *J. Appl Microbiol.*, 111: 389-395.
35. Carman *et al.*, 1998; Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest.* 27-35.
36. Jenckel *et al.*, 2014; Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhea virus detected by deep sequencing. *J. Virol.* 88: 6983-92.
37. Vilcek *et al.*, 2005; Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Vet Med.* 72: 31-35.
38. 田島誉士，2012年；日本獣医師会誌 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症 65: 111-117.
39. Meyers *et al.*, 2007; Bovine viral diarrhea virus: Prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting E<sup>rns</sup> RNase and N<sup>pro</sup> Protease. *J. Virol.* 81, 3327-3338.
40. Meyers *et al.*, 2002; Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J. Virol.* 76, 8494-8503.
41. Combe, M. and Sanjuan, R., 2014; Variation in RNA virus mutation rate across host cells. *PLOS Pathogens*, 10: e1003855.
42. Cuevas, J. M. *et al.*, 2009; Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus *in vivo*. *J. Virol.*, 83:5760-5764.
43. Hanada, K. *et al.*, 2005; The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (4).
44. Ciesek *et al.*, 2010; How Stable Is the Hepatitis C Virus (HCV)? Environmental Stability of HCV and Its Susceptibility to Chemical Biocides. *J. Infect. Dis.*, 201: 1859-1866.
45. Platt *et al.*, 2017; Comparison of humoral and T-cell-mediated immune responses to a single dose of Bovela live double deleted BVDV vaccine or to a field BVDV strain. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 187: 20-27.
46. Wernike *et al.*, 2017; Eradication of bovine viral diarrhea virus in Germany—Diversity of subtypes and detection of live-vaccine viruses. *Vet. Microbiol.* 208: 25-29.
47. Tajima, 2006; The prevalent genotypes of bovine viral diarrhea virus in Japan, Germany and the United States of America. *Jpn. J. Vet. Res.* 54: 129-134.
48. Ridpath *et al.*, 2006; Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Vet. Microbiol.* 114: 196-204.
49. Odeón *et al.*, 1999; Experimental infection of calves with bovine viral diarrhea virus genotype II (NY-93). *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 221-228.
50. Altman and Dittmer, 1974; *Biology data book*. AMRL TR, Oct:1-631.
51. Roland, *et al.*, 2014; Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *J. Vet. Diag. Investig.*, 26: 592-598.
52. Becher *et al.*, 1999; Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus:

Molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J. Virol.* 73: 5646-5653.

53. Becher *et al.*, 2001; RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.* 75: 6256-6f264.
54. Kameyama *et al.*, 2006; Genetic recombination at different points in the Npro-coding region of bovine viral diarrhea virus and the potentials to change their antigenicities and pathogenicities. *Virus Res.* 116: 78-84.

## 本申請書で使用する略号・用語表

BVDV :	牛ウイルス性下痢ウイルス、Bovine Viral Diarrhea Virus
BVDV-1 :	牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型、Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1
BVDV-2 :	牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型、Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2
RT-PCR :	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RNA :	リボ核酸、ribonucleic acid
CPE :	細胞変性効果、cytopathogenic effect, cytopathic effect
CP 型 :	細胞変性型
NCP 型 :	非細胞変性型
DNA :	デオキシリボ核酸、deoxypentose nucleic acid
TCID <sub>50</sub> :	Tissue Culture Infectious Dose 50
FAID <sub>50</sub> :	Fluorescent Assay Infectious Dose 50
PI :	持続感染、persistent infection
BVD-MD :	牛ウイルス性下痢-粘膜病、Bovine viral diarrhea-mucosal disease
MD :	粘膜病、mucosal disease
cDNA :	相補的 DNA、complementary DNA
FBS :	牛胎子血清、Fetal Bovine Serum
E-MEM :	イーグル最小必須培地、Eagle's Minimal Essential Medium
MDBK 細胞 :	Madin-Darby bovine kidney cell
BT 細胞 :	牛精巣細胞
PBS :	リン酸緩衝食塩液、Phosphate buffered saline
ERA :	環境リスクアセスメント、Environmental Risk Assessment
CVMP :	獣科薬製品委員会、Committee for Medicinal Products for Veterinary Use

## 別添資料リスト

- 別紙 1-1 日本における既承認牛ウイルス性下痢ウイルス抗原含有ワクチン
- 別紙 1-2 ペスチウイルスの特性
- 別紙 1-3 遺伝子組換え微生物の宿主の特性について(1) BVDV の Superinfection Exclusion
- 別紙 1-4 遺伝子組換え微生物の消毒薬に対する感受性
- 別紙 1-5 遺伝子組換え微生物の宿主の特性について(2) KE9 株の特性
- 別紙 1-6 対象動物を用いた ddBVD Tub 1 株あるいは ddBVD Tub 2 株の試験
- 別紙 2-1 本遺伝子組換え微生物の特性
- 別紙 2-2 宿主及び遺伝子組換え微生物の遺伝子配列
- 別紙 2-3 ベクターの情報
- 別紙 2-4 遺伝子組換え微生物作製方法
- 別紙 2-5 遺伝子組換え微生物の *in vitro* あるいは *in vivo* による継代での遺伝子配列の比較に関する資料
- 別紙 2-6 病原性復帰試験
- 別紙 2-7 RNA ウイルスの変異率について
- 別紙 2-8 同居感染性および体内分布について
- 別紙 2-9 海外の野外臨床試験で実施したウイルス分離法
- 別紙 2-10 海外の市販後における安全性について
- 別紙 2-11 宿主及び遺伝子組換え微生物の水中での生存性に関する資料
- 別紙 2-12 紫外線による BVDV の不活化に関する資料
- 別紙 2-13 遺伝子組換え微生物と野外株との混合培養に関する資料
- 別紙 3-1 ヨーロッパ医薬品局 ( European Medicines Agency: EMA ) での承認内容にかかわる資料
- 別紙 3-2 海外における BOVELA 販売量の推移
- 別紙 3-3 海外における承認取得時に添付した臨床試験の成績
- 別紙 3-4 非接種対象で感受性の報告のある動物種での同居感染性の確認



別紙 1-1 日本における既承認牛ウイルス性下痢ウイルス抗原含有ワクチン（2018年3月現在）

製品名	製造販売業者	BVDV-1	BVDV-2	抗原価	生・不活化
IBR・BVD・PI 生ワクチン	日生研株式会社	No. 12-43 株		3	生
“京都微研”牛 4 種混合生ワクチン・R	京都微研	No. 12-43 株		4	生
“京都微研”牛 5 種混合生ワクチン	京都微研	No. 12-43 株		5	生
“京都微研”カーフウイン 6	京都微研	No. 1255 株	KZ1254 株	6	生
“京都微研”キャトルウイン-5Hs	京都微研	No. 12-43 株		6	生
BVD 生ワクチン“日生研”	日生研株式会社	No. 12-43 株		1	生
ポビエヌテクト 5	日生研株式会社	No. 12-43 株		5	生
IBR・BVD・PI 混合生ワクチン ミューコ・3	共立製薬株式会社	No. 12-43 株		3	生
IBR・BVD・PI 三種混合生ワクチン“化血研”	化血研	No. 12-43 株		3	生
“京都微研”キャトルウイン - 5K	京都微研	Nose-KB 株	KZ-91-KB 株	5	不活化
“京都微研”キャトルウイン-6	京都微研	Nose/T 株	KZ-cp/T 株	6	不活化
ストックガード 5	ゾエティス	シンガー株	5912 株	5	不活化
ポビバック 5	共立製薬株式会社	HK003KS 株	HK060KS 株	5	不活化
ポビバック B5	共立製薬株式会社	HK286KS 株	HK060KS 株	5	不活化

京都微研：株式会社 微生物科学研究所

化血研：一般財団法人 化学及血清療法研究所

ゾエティス：ゾエティス・ジャパン株式会社

富士経済（2017年）に基づき、IBR・BVD・PI 生ワクチン、“京都微研”牛 4 種混合生ワクチン・R、BVD 生ワクチン“日生研”、IBR・BVD・PI 混合生ワクチン ミューコ・3 及び IBR・BVD・PI 三種混合生ワクチン“化血研”は、市販されていない。

## 別紙 1-2 ペスチウイルスの特性

### 要旨

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 及び豚コレラウイルス (HCV) を含むフラビウイルス科ペスチウイルス属の遺伝子は、コードされているタンパク質の順番が N<sup>pro</sup>-C-E<sup>rns</sup>-E1-E2-p7-NS2/3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B であり (文献 1-2-1)、非構造タンパク質の N<sup>pro</sup> 及び構造タンパク質の E<sup>rns</sup> をもつことが他のフラビウイルス科の属とは異なる特徴である。5' 及び 3' 末端側の非翻訳領域 (UTR) はそれぞれ 375 b 以下及び 220 b 以下で、分子量は約  $6 \times 10^7$  ダルトン、ショ糖密度勾配による密度は 1.10 ~ 1.15 g/cm<sup>3</sup>、ウイルス粒子が安定な pH 域は 5.7 ~ 9.3 である。

ペスチウイルス属では、C、E<sup>rns</sup>、E1 及び E2 の 4 遺伝子にウイルス構成タンパク質がコードされており (1-2-2 及び 1-2-3)、E<sup>rns</sup> 及び E2 に対する抗体がウイルス中和活性をもつことが知られている (1-2-4 及び 1-2-5)。N<sup>pro</sup> は感染動物の 1 型インターフェロンを抑制することにより、ウイルスが増殖しやすい環境を作ることが知られている。遺伝子産物である約 4,000 アミノ酸のポリペプチドは 12 種類の成熟タンパク質となる。

### 【文献】

- 1-2-1 Leysen *et al.*, 2000: Perspectives for the Treatment of Infections with *Flaviviridae*. Clin. Microbiol. Reviews, 13, 67-82.

## フラビウイルス科によるウイルス感染症の治療に関する展望

### 文献要旨

フラビウイルス科は、ヘパシウイルス属、フラビウイルス属及びペスチウイルス属の、3 つの属のウイルスから構成されている。全世界で 1 億 7,000 万人を超える人々が、C 型肝炎ウイルスに慢性的に感染しており、肝硬変や肝がんを発症するリスクの高い状態にある。さらに、節足動物媒介性のフラビウイルス感染症 (デング熱、日本脳炎、ダニ媒介性脳炎、セントルイス脳炎、マレー溪谷脳炎、ウエストナイル熱、及び黄熱) も世界各地で発生し、ペスチウイルスも家畜に深刻な影響を与えている。しかし、残念ながらフラビウイルス科のウイルス感染に対する特異的な治療法や予防法はない。これらに関する研究は進行中であるが、ウイルスの細胞への結合、ウイルスの細胞への取り込み、ヘパシウイルス属やペスチウイルス属の内部リボソーム侵入部位 (internal ribosome entry site)、フラビウイルス属のキャッピング機構、ウイルスプロテアーゼ、ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ及びウイルスヘリカーゼといったものが、感染抑制のための標的メカニズムとなる可能性があることが示されている。本稿では、近年における研究の進展、上記のようなウイルス感染症の発生状況、各感染症の種類と特徴及びそれぞれの感染症の重要性に焦点を当て、それぞれのウイルスを標的とした場合の特異的な感染抑制戦略と、病態形成や抗ウイルス戦略の研究に利用できる動物モデルについて概観する。

- 1-2-2 Thiel *et al.*, 1991: Hog Cholera Virus: Molecular Composition of Virions from a Pestivirus. *J. Virol.* 65 4705-4712.

#### 豚コレラウイルス：ペスチウイルス属のウイルス粒子の分子構成

##### 文献要旨

ペスチウイルス属に分類されている豚コレラウイルス (HCV) の粒子について、特異的抗体を用いて解析を行った。このウイルスのヌクレオカプシドタンパク質は、14 kDa の分子 (HCV p14) であった。また同等のタンパク質が、別のペスチウイルスである牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の粒子からも確認された。HCV のエンベロープは HCV gp44/48、gp33、gp55 という 3 つの糖タンパク質から構成されているが、これら 3 つはすべて、ウイルス感染細胞及びウイルス粒子内では、ジスルフィド結合による二量体 (ダイマー) の形で存在していた。またこのうち、HCV gp44/48 及び gp55 はそれぞれホモダイマーを形成していた一方で、gp55 は gp33 とモダイマーを形成することが確認された。このような共有結合による構造糖タンパク質間の複雑な相互作用は、これまで RNA ウイルスでは報告されていなかったものである。

- 1-2-3 Weiland *et al.*, 1999: Localization of pestiviral envelope proteins E<sup>rms</sup> and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J. General Virol.* 80, 1157-1165.

#### ペスチウイルスエンベロープタンパク質 E<sup>rms</sup> 及び E2 の 細胞表面及び分離ウイルス粒子における局在

##### 文献要旨

豚コレラウイルス (CSFV) の E<sup>rms</sup> 糖タンパク質や、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の E<sup>rms</sup> 及び E2 糖タンパク質が、感染細胞の表面に局在していることが、間接免疫蛍光法や細胞蛍光測定法を用いた解析から示された。そこで、免疫染色陽性であることが示された細胞表面について、さらに金標識免疫電子顕微鏡法による解析を実施したところ、細胞外のウイルス粒子からのみ標識シグナルが検出され、細胞膜においては金標識された粒子が観察されなかった。よって、BVDV の E2 とは異なり、細胞膜に付着している CSFV 粒子の E2 糖タンパク質には、特異的なモノクローナル抗体が到達することができなかったことが示唆された。しかし、培養上清から分離した CSFV 粒子は、抗 E<sup>rms</sup> 及び抗 E2 モノクローナル抗体のいずれとも結合した。さらに、CSFV 及び BVDV のいずれにおいても、ウイルス粒子の抗 E<sup>rms</sup> 抗体への結合は、抗 E2 抗体への結合よりも強かった。これまで E2 が免疫優性な糖タンパク質であると考えられていたため、この結果は予想していなかったものであった。

- 1-2-4 Weiland *et al.*, 1990: Pestivirus Glycoprotein Which Induces Neutralizing Antibodies Forms Part of a Disulfide-Linked Heterodimer. *J. Virol.* 64, 3563-3569.

中和抗体を誘導するペスチウイルス糖タンパク質  
すなわちジスルフィド結合によるヘテロダイマー形成部位

文献要旨

豚コレラウイルス(HCV)に対する中和抗体を用いて、HCV がコードする 2 種類の糖タンパク質、HCV gp55 及び HCV gp33 を沈降分離した。バクテリア発現系由来の融合タンパク質を用いた免疫測定法及び、感染細胞の抽出物を用いたウエスタンブロットティング法を実施したところ、抗体は HCV gp55 のみを認識していることが明らかになり、HCV gp33 が共沈降していたのは、分子間のジスルフィド架橋の存在によることが示された。また、使用した抗体のうちの 1 つは、別のペスチウイルスである牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の主要な糖タンパク質とも結合した。BVDV が持つこの類似の糖タンパク質におけるシステイン残基の分布を見ると、HCV gp55 や gp33 とほぼ同様に、さらにこの 2 種類の BVDV の糖タンパク質も、ジスルフィド架橋によって結合していた。

- 1-2-5 Weiland *et al.*, 1992: A Second Envelope Glycoprotein Mediates Neutralization of a Pestivirus, Hog Cholera Virus. *J. Virol.* 66, 3677-3682.

ペスチウイルス属豚コレラウイルスの中和に関与する 2 つ目のエンベロープ糖タンパク質

文献要旨

豚コレラウイルス(HCV)に対するモノクローナル抗体(MAb)数種類を作製したところ、これらは構造糖タンパク質 gp44/48 と反応し、さらにウイルス中和活性を持っていた。そして、HCV gp44/48 がウイルス表面に存在していることが、金標識免疫電子顕微鏡法によって直接的に示された。さらに、免疫ペルオキシダーゼ法を用いて、種々の系統のペスチウイルスに対する 8 種類の抗 HCV gp44/48 MAb の反応性を評価したところ、それぞれの MAb は、各 HCV 株に対して異なる反応性を示した。よってこれら MAb は、HCV のアウトブレイク時の疫学研究に有用であることが示唆された。

Lee *et al.*, 2005: Dual Mechanisms of Pestiviral Superinfection Exclusion at Entry and RNA Replication. *J. Virol.*,79, 3231-3242.

細胞侵入および RNA 複製段階における  
二重のペスチウイルス Superinfection Exclusion (重感染排除)メカニズム

文献要旨

多くのウイルスにおいて、一次感染がそれに引き続く相同ウイルスの重感染を抑制することが知られている。本研究では、プラス鎖 RNA をゲノムとするペスチウイルスの 1 つである、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の Superinfection Exclusion (重感染排除) について解析を行った。細胞への BVDV 急性感染は、相同な BVDV の重感染を阻止したが、別種である水胞性口炎ウイルスに対してこの効果は見られなかった。この重感染排除は 30 ~ 60 分以内に完成したが、持続感染細胞として継代するうちに失われた。重感染に用いた BVDV は、急性感染細胞内に翻訳可能なゲノムを侵入させることができなかったことから、ウイルスの細胞侵入が阻止されたことが示唆された。そしてこの Superinfection Exclusion は、一次感染させた BVDV において構造タンパク質である E2 を欠損させたところ、生じなかった。細胞侵入段階における排除をバイパスするために RNA 導入を行ったところ、翻訳段階に影響はなかったものの、複製段階において 2 つ目の排除メカニズムが働いていることが明らかになった。この排除メカニズムには、構造タンパク質の発現は必要ではなく、また一次感染した BVDV の RNA 複製レベルと負の相関が認められた。これらのことから、ペスチウイルスの重感染排除においては二重のメカニズムが存在し、1 つはウイルスの E2 糖タンパク質を必要とする細胞侵入段階、2 つ目はウイルス RNA の複製段階であることが示された。

## 別紙 1-4 遺伝子組換え微生物の消毒薬に対する感受性

Virucidal efficacy testing against BVD Tubingen type 1 and 2 (6127-0955-05B-057)

Boeinger Ingelheit betmedica, Inc. November 21, 2006.

### 要旨

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の消毒薬に対する感受性について確認した。本試験には本遺伝子組換え微生物が増殖する MDBK 細胞を用いた *in vitro* アッセイ法を用いた。MDBK 細胞に対する消毒薬の毒性を確認したうえで、宿主及びドライフィルムからすぐに分離したウイルス量 (ddBVD Tub 1 株、ddBVD Tub 2 株) と 10 分間消毒液に暴露した後のウイルス量を比較したところ、供試した消毒剤 70%イソプロパノール、3%及び 5%次亜塩素酸ナトリウム、Vesphene、Hillyard Q.T.、Spor-Klenz 及び LpHse は遺伝子組換え微生物の双方に有効であった。しかし、3%あるいは 6%過酸化水素水では不活化が不十分であった。本試験資料に用いられている製品の成分及び分量は、以下の通りである。

#### Vesphene

o-phenylphenol	9.09%
p-tertiary amylphenol	7.66%
Inert ingredients	83.25%

#### LpHse

o-phenylphenol	7.7%
p-tertiary amylphenol	7.6%
Inert ingredients	84.7%

#### Spor-Klenz

Hydrogen Peroxide	1.00%
Peroxyacetic acid	0.08%
Inert Ingredients	98.92%

#### Hillyard Q.T.

Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (C12-16)	3-<5%
Alcohols (C12-15, 飽和) Ethoxylate	1-<3%
Didecyl dimethyl ammonium chloride	1-<3%
Ethanol	1-<3%
Tetrasodium ethylenediamine tetraacetate	1-<3%
Inert Ingredients	80-<90%

Meyers *et al.*, 2007: Bovine viral diarrhea virus: Prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro Protease. *J. Virol.* 81, 3327-3338.

牛ウイルス性下痢ウイルス：Erns RNase及びNproプロテアーゼの  
二重変異による胎子の持続感染抑制

文献要旨

さまざまな遺伝子改変を施した牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）を用いて、妊娠牛の胎子への感染能について解析を行った。変異ウイルスは、N末端プロテアーゼNproの大部分の欠失のみのウイルス、または構造糖タンパク質ErnsのRNase活性低下を引き起こす349番目のコドン欠失のみのウイルス、あるいはこれらの両変異をあわせ持つ二重変異ウイルスであった。野生型ウイルスまたはいずれかの変異を単独でもつ変異型ウイルスを妊娠牛に感染させた2か月後には、ほとんどの胎子からウイルスが検出され、流産が発生するかまたは子宮内で死亡した。一方、二重変異ウイルスについては、同様の感染実験を行っても胎子組織からウイルスが回収されることはなく、胎子が死亡することもなかった。この結果は、同様の変異を持つ他系統のBVDVにおいても確かめられた。野生型、変異型及び細胞病原性（CP型）BVDVを子宮内感染させると、5、7及び14日後のいずれの時点においても、胎子組織中にウイルスが検出された。そして野生型の非細胞病原性（NCP型）BVDV以外のウイルスでは、感染処置後、胎子血清から1型インターフェロン（IFN）が検出された。なかでもNpro及びErnsの二重変異ウイルスは、処置7及び14日後に、最も多量のIFNを胎子血清中に誘導した。ただし、二重変異ウイルスであっても、胎子感染がより長期にわたった場合には、流産が発生した。以上の結果から、感受性動物体内におけるペスチウイルスでは、Npro及びErns RNaseの両方が、インターフェロン誘導の抑制及び持続感染の確立において重要な役割を果たしていることが、初めて実証された。

## 1 安全性に関する試験資料

### 1-1 高用量接種及び反復接種による安全性試験

#### 1-1-1 妊娠牛に対する高用量（10用量）接種における安全性

Safety of 10x Overdose on Pregnant Heifers: Safety of a ten-time overdose of a combined Type 1 and Type 2 Vaccine in pregnant heifers: Study no. 2009100, 09 Apr 2010.

#### 1-1-2 子牛に対する高用量（10用量）接種における安全性

Safety of a Single Dose and Overdose of Vaccine in Young Calves: Evaluation of the safety of a repeated ten times overdose of a Type 1 and Type 2 BVDV vaccine in young calves: Study no. 2009101, 25 June 2011.

### 1-2 病原性復帰否定試験（別紙 2-6 参照）

#### 1-2-1 BVDV-1 の病原性復帰否定試験

Reversion to virulence back passage safety study for Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1 double deletion master seed virus, Study Number 6131-0955-06B-090, 05 August 2008.

#### 1-2-2 BVDV-2 の病原性復帰否定試験

Reversion to virulence back passage safety study for Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2 double deletion master seed virus, Study Number 6131-0955-06B-034, 16 June 2008.

### 1-3 同居感染性及び体内分布について（別紙 2-8 参照）

Pivotal dissemination and transmission study with the master seed virus of an attenuated, combined BVDV Type I and Type II vaccine in bull study animals, Study Number 2007098, 15 September 2007.

## 2 有効性に関する試験資料

### 2-1 最少免疫用量と免疫持続性に関する試験

#### 2-1-1 BVDV-1 感染に対する最少免疫用量と免疫持続性

Minimum Immunizing Dose and Duration of Immunity Study, BVD-1: Evaluation of the duration of foetal protection and minimum immunizing dose of a Type-1 and Type-2 BVDV vaccine candidate against virulent Type-1 BVDV challenge 12 month after vaccination, Study no. 2009054, 02 November 2010.

#### 2-1-2 BVDV-2 感染に対する最少免疫用量と免疫持続性

Minimum Immunizing Dose and Duration of Immunity Study, BVD-2: Evaluation of the duration of foetal protection and minimum immunizing dose of a Type-1 and Type-2 BVDV vaccine candidate against virulent Type-2 BVDV challenge 12 month after vaccination, Study no. 2009055, 04 July 2011.

### 2-2 免疫成立時期

#### 2-2-1 BVDV-1 感染に対する免疫成立時期

Onset of Immunity Study, BVDV-1: Evaluation of the Onset of Immunity of a Type 1 and Type 2 BVDV vaccine candidate (BVD Type 1 and Type 2 Vaccine) against virulent Type 1



BVDV Challenge, Study no. 2009056, 01 September 2011.

## 2-2-2 BVDV-2 感染に対する免疫成立時期

Onset of Immunity Study, BVDV-2: Evaluation of the Onset of Immunity of a Type 1 and Type 2 BVDV vaccine candidate (BVD Type 1 and Type 2 Vaccine) against virulent Type 2 BVDV Challenge, Study no. 2009057, 01 December 2011.

## 1 安全性に関する試験資料

### 1-1 高用量接種及び反復接種による安全性試験

#### 1-1-1 妊娠牛に対する高用量（10用量）接種における安全性

##### 要旨

血清検体について BVDV 抗体陰性，BVDV 抗原陰性であることを確認した妊娠牛 33 頭を 3 群に均等に分け、第 1 群及び第 2 群には本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を高用量（最小規格抗原量の 200 倍以上）含む被験物質、第 3 群（以下、対照群）には生理的食塩水を妊娠 61～90 日目に接種し、主要評価項目を胎子感染率、副次的評価項目をウイルス血症の確認、血小板数、白血球数、抗体陽転、直腸温、注射部位の観察及び臨床観察として接種後 60 日間観察した。その結果、対照群では胎子感染は認められず、清浄な環境が維持されたことが確認された。第 1 群の 1 頭で流産が発生したが、いずれの胎子臓器からも BVDV は検出されなかった。第 1 群の 1 頭の胎子胸腺からウイルスが分離されたが、再検査では分離されず、それ以外の臓器からはウイルスは分離されなかった。そのほかの胎子からはウイルスは分離されなかった。妊娠牛でのウイルス分離陽性となったのはワクチン接種後 4～10 日までであった。妊娠牛の直腸温及び白血球数については、3 群ともほぼ同様の推移を示し、異常は認められなかった。血小板数は対照群と比較して被験物質接種後で一時的に著しい低下が認められたが回復した。BVDV 中和抗体価は BVDV-1 及び BVDV-2 の双方に対して被験物質接種後 14 日に陽転してから試験終了時の 60 日まで上昇した。被験物質注射部位に認められた所見は、腫脹及び結節であり、被験物質接種の 22 頭中 6 頭で認められたが、被験物質接種後 4 日にはいずれの妊娠牛でも消失した。臨床観察では、行動、食欲、流涙、口腔あるいは眼の出血、下痢、異常呼吸及び蹄葉炎については記録されず、結膜炎、鼻汁、咳が認められたものの一過性であり、著しい異常は認められなかった。剖検所見では胎子に全身性の点状出血及び頭部奇形が 1 頭ずつ認められたが、BVDV は分離されなかった。

以上の結果から、被験物質である本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を妊娠牛に使用することは安全であると考えられた。

#### 1-1-2 子牛に対する高用量（10用量）接種における安全性

##### 要旨

血清検体について BVDV 抗体陰性，BVDV 抗原陰性であることを確認した子牛 22 頭を 2 群に均等に分け、第 1 群（以下、対照群）に生理的食塩水、第 2 群（以下、接種群）に本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を高用量（最小規格抗原量の 400 倍以上）含む被験物質を 14 日間隔でそれぞれ 2 回ずつ接種し、ウイルス血症の確認、血小板数、白血球数、抗体陽転、直腸温、注射部位の観察及び臨床観察を 1 回目接種時から 28 日間観察した。接種群の 22 頭中 3 頭でウイルス血症が一過性にワクチン接種後 6～10 日に認められ、それ以外からは対照群、接種群ともウイルス血

症は認められなかった。血小板数及び白血球数は両群とも生理的範囲に収まっていた。中和抗体価は1回目接種後14日後すなわち2回目接種時には陽転しており、試験終了時まで維持された。直腸温は40を超えることはなかった。注射部位の観察では、対照群及び接種群の両群で腫脹が接種後一過性に認められたが、2回行った接種の両方とも接種後2日目には消失した。接種局所における病理組織学的所見においても、対照群及び接種群の両群でリンパ球及び組織球の浸潤ならびに線維芽細胞の増殖が軽度認められた程度であった。臨床観察では対照群及び接種群の両群で、行動、食欲、流涙、鼻汁、下痢及び咳が認められ、接種群のみで2回目接種後に結膜炎が認められたが、被験物質接種との因果関係はないと判断された。

以上の結果から、被験物質である本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を妊娠牛に使用することは安全であると考えられた。

## 1-2 病原性復帰否定試験（別紙 2-6 参照）

## 1-3 同居感染性及び体内分布について（別紙 2-8 参照）

# 2 有効性に関する試験資料

## 2-1 最少免疫用量と免疫持続性に関する試験

### 2-1-1 BVDV-1 感染に対する最少免疫用量と免疫持続性

### 2-1-2 BVDV-2 感染に対する最少免疫用量と免疫持続性

#### 要旨

BVDV 感染に対する最少有効抗原量を確認するため、それぞれ BVDV-1 または BVDV-2 の野外株（BVDV-1 Pe 515 ncp 株  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/頭、BVDV-2 KE13 ncp 株  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/頭）を本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株または ddBVD Tub 2 株（それぞれ  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/2mL/用量または  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/2mL/用量の1回うち）を接種後に、種付け後80日前後の妊娠牛に対して接種し、攻撃試験を実施し、攻撃後60～65日に剖検した。主要評価項目として設定した胎子感染については、BVDV-1 及び BVDV-2 の両攻撃対照群で全頭の胎子から攻撃ウイルスが確認された一方、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株または ddBVD Tub 2 株をあらかじめ接種した群（以下、接種群）では全頭の胎子でウイルスは分離されなかった。副次的評価項目として設定した攻撃後の臨床観察、直腸温、白血球数及び血小板数の推移については、両接種群において試験期間中特筆すべき異常が認められず、パフィーコートからのウイルス分離はすべて陰性であった。

免疫持続性については、攻撃試験に用いなかった牛にそれぞれ同量の本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株または ddBVD Tub 2 株を2回（1回目種付前、2回目種付後80日前後）接種して中和抗体価の推移を確認した。その結果、接種後12か月以上は中和抗体価が良好に維持されることが確認された。

以上の結果から、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は、ともに  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/用量において野外攻撃株に対する有効な免疫が付与され、12か月以上維持されることが確認された。

## 2-2 免疫成立時期

### 2-2-1 BVDV-1 感染に対する免疫成立時期

### 2-2-2 BVDV-2 感染に対する免疫成立時期

#### 要旨

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株または ddBVD Tub 2 株を免疫した 3 か月齢の牛に、BVDV-1 あるいは BVDV-2 野外株を感染させ、白血球数の推移を主要評価項目として免疫成立時期について確認した。BVDV-1 または BVDV-2 野外株の攻撃量は、2-1 に記載の条件と同一で、本遺伝子組換え微生物をそれぞれ  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/頭（以下、3 乗接種群）あるいは  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/頭（以下、4 乗接種群）で接種後 21 日にそれぞれ BVDV-1 または BVDV-2 野外株で攻撃し、プラセボとして PBS を接種した群（以下、攻撃対照群）とともに接種後 42 日に剖検した。観察項目として、白血球数の確認（主要評価項目）、臨床観察、直腸温、パフィーコートからのウイルス分離、中和抗体価の測定、鼻汁スワブ検体での PCR によるウイルス検査及び剖検による臓器観察を設定した。主要評価項目である白血球数の推移については、攻撃前の白血球数をベースラインとした場合、攻撃時の本遺伝子組換え微生物接種後 21 日には統計学的に有意な差は認められなかった。ベースラインを基準にして統計学的に比較すると、BVDV-1 で行った試験では、4 乗接種群は攻撃対照群より有意に白血球数が高かった。3 乗接種群と攻撃対照群を比較した場合には有意差は認められなかったものの、攻撃対照群は 3 乗接種群に対して減少傾向を示していた。この白血球数の変化は 3 乗接種群及び 4 乗接種群では増加したが、攻撃対象群では減少した。このことから、BVDV-1 野外株で攻撃して認められた白血球減少が、本遺伝子組換え微生物の接種によって抑えられていると考えられた。BVDV-2 で行った試験でも、攻撃対照群では白血球数の減少傾向が認められ、3 乗接種群（実際のウイルス量は  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/頭程度）では減少傾向の低減、4 乗接種群ではほぼ減少傾向が抑えられていた。副次的評価項目については、BVDV-1 及び BVDV-2 の試験のいずれでも、接種群及び攻撃対照群の臨床症状において顕著な変化は認められなかった。直腸温は、攻撃後の接種群よりも攻撃対照群で高くなる傾向が認められた。中和抗体価は、BVDV-1 及び BVDV-2 の両抗原に対して、3 乗接種群、4 乗接種群及び攻撃対照群のいずれも攻撃まで陰性で、攻撃対照群では 42 日に陽転し、両接種群では 14 日で陽転してから 42 日まで上昇傾向を示した。パフィーコートからのウイルス分離では、攻撃対照群のみからウイルスが検出された。鼻汁スワブ検体からウイルスはいずれの群からも検出されなかった。剖検所見については、接種群のみに特異的な所見は得られなかった。

以上の結果から、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株または ddBVD Tub 2 株接種後 21 日には BVDV-1 及び BVDV-2 野外株に対する有効な免疫が成立していると考えられた。

## 別紙 2-1 本遺伝子組換え微生物の特性

Meyers *et al.*, 2002: Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J. Virol.* 76, 8494-8503.

### 感染性cDNAクローンからの病原性RNase陰性弱毒2型牛ウイルス性下痢ウイルスの回収

#### 文献要旨

病原性2型牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV-2) NY'93/C株のゲノムに由来するcDNAクローンの配列を決定し、感染性cDNAクローンpKANE40Aを構築した。pKANE40Aから回収したウイルスは、野生型BVDV NY'93/C株によく似た増殖特性を示し、動物実験で見られる臨床症状からは野生型ウイルスと区別できないことが確認された。また、変異ウイルスの解析から、ウイルス糖タンパク質E<sup>rns</sup>内に存在するRNase活性がなくなると、弱毒化することが明らかになった。プラスミドpKANE40Aは、BVDV-2として初めて構築された感染性ウイルスが得られるcDNAクローンであり、BVDVによる牛の疾患メカニズムを解析するための様々な新しい手法を提供できるものである。

## 別紙 2-2 宿主及び遺伝子組換え微生物の遺伝子配列

### 要旨

宿主 KE9 株の 1 本鎖 RNA は全長 12246 b で、アミノ酸の翻訳は遺伝子配列の 381 ~ 383 番目のメチオニン (ATG) から開始され、12275 ~ 12277 番目の終止コドン (TGA) で終わる。コードされているアミノ酸は 3964 個で、*Npro* の欠損及び *E<sup>ms</sup>* の 3 塩基の欠損はそれぞれ 492 b (164 個のアミノ酸)、3 b (1 個のアミノ酸 (ヒスチジン)) に相当する。

宿主 NY93 株は全長 12331 b で、アミノ酸の翻訳は遺伝子配列の 386 ~ 388 番目のメチオニン (ATG) から開始され、12125 ~ 12127 番目の終止コドン (TGA) で終わる。コードされているアミノ酸は 3914 個で、*Npro* の欠損及び *E<sup>ms</sup>* の 3 塩基の欠損はそれぞれ 492 b (164 個のアミノ酸)、3 b (1 個のアミノ酸 (ヒスチジン)) に相当する。

ベクターの情報

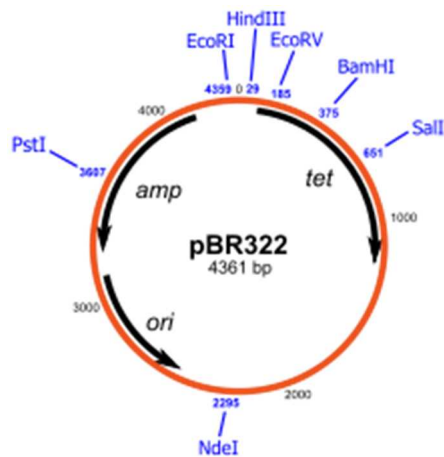
遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株作製に用いたベクター

2-3-1 pBR322

2-3-2 pBluescript SK(-)

2-3-3 pACYC177

2-3-1 pBR322



```

1  ttctcatggt  tgacagctta  tcatcgataa  gctttaatgc  ggtagtttat  cacagttaa
61  ttgctaacgc  agtcaggcac  cgtgtatgaa  atctaacaat  gcgctcatcg  tcatcctcgg
121 caccgtcacc  ctggatgctg  taggcatagg  cttggttatg  ccggtactgc  cgggcctctt
181 gcgggatata  gtccattccg  acagcatcgc  cagtcactat  ggctgtctgc  tagcgctata
241 tgcgttgatg  caatttctat  gcgcaccctg  tctcggagca  ctgtccgacc  gctttggccg
301 ccgccagtc  ctgctcgctt  cgctacttgg  agccactatc  gactacgcga  tcatggcgac
361 cacaccgtc  ctgtggatcc  tctacgccgg  acgcatcgtg  gccggcatca  ccggcgccac
421 aggtgcggtt  gctggcgctt  atategccga  catcaccgat  ggggaagatc  gggctcgcca
481 cttcgggctc  atgagcgctt  gtttcggcgt  gggtatgggt  gcaggccccg  tggccggggg
541 actgttgggc  gccatctcct  tgcatgcacc  attccttgcg  gcggcggtgc  tcaacggcct
601 caacctacta  ctgggctgct  tctaatagca  ggagtcgcat  aaggagagac  gtcgaccgat
661 gcccttgaga  gccctcaacc  cagtcagctc  cttccggtgg  gcgcggggca  tgactatcgt
721 cgccgcactt  atgactgtct  tctttatcat  gcaactcgta  ggacaggtgc  cggcagcgct
    
```

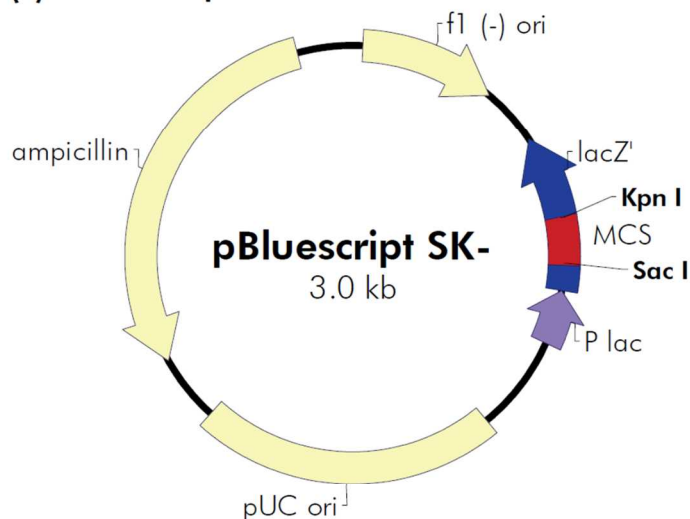
781	ctgggtcatt	ttcggcgagg	accgctttcg	ctggagcgcg	acgatgatcg	gcctgtcgct
841	tgcggtattc	ggaatcttgc	acgccctcgc	tcaagccttc	gtcactggtc	ccgccaccaa
901	acgtttcggc	gagaagcagg	ccattatcgc	cggcattggcg	gccgacgcgc	tgggctacgt
961	cttgctggcg	ttcgcgacgc	gaggctggat	ggccttcccc	attatgattc	ttctcgcttc
1021	cggcggcatc	gggatgcccg	cgttgcaggc	catgctgtcc	aggcaggtag	atgacgacca
1081	tcagggacag	cttcaaggat	cgctcgcggc	tcttaccagc	ctaacttcga	tactggacc
1141	gctgatcgtc	acggcgattt	atgccgcctc	ggcgagcaca	tggaacgggt	tggcatggat
1201	tgtaggcgcc	gccctatacc	ttgtctgcct	ccccgcgttg	cgtcgcggtg	catggagccg
1261	ggccacctcg	acctgaatgg	aagccggcgg	cacctcgcta	acggattcac	cactccaaga
1321	attggagcca	atcaattctt	gcggagaact	gtgaatgcgc	aaaccaacc	ttggcagaac
1381	atatccatcg	cgtcgcccat	ctccagcagc	cgcacgcggc	gcatctcggg	cagcgttggg
1441	tcttgccac	gggtgcgcat	gatcgtgctc	ctgtcgttga	ggacccggct	aggctggcgg
1501	ggttgcctta	ctggttagca	gaatgaatca	ccgatacgcg	agcgaacgtg	aagcgactgc
1561	tgctgcaaaa	cgtctgcgac	ctgagcaaca	acatgaatgg	tcttcggttt	ccgtgtttcg
1621	taaagtctgg	aaacgcggaa	gtcagcgccc	tgcaccatta	tgttccggat	ctgcatcgca
1681	ggatgctgct	ggctaccctg	tggaacacct	acatctgtat	taacgaagcg	ctggcattga
1741	ccctgagtga	tttttctctg	gtcccgcgc	atccataccg	ccagttgttt	accctcaaaa
1801	cgttccagta	accgggcatg	ttcatcatca	gtaaccgta	tcgtgagcat	cctctctcgt
1861	ttcatcggtg	tcattacccc	catgaacaga	aatccccctt	acacggaggc	atcagtgacc
1921	aaacaggaaa	aaaccgcctt	taacatggcc	cgctttatca	gaagccagac	attaacgctt
1981	ctggagaaac	tcaacgagct	ggacgcggat	gaacaggcag	acatctgtga	atcgcttcac
2041	gaccacgctg	atgagcttta	ccgcagctgc	ctcgcgcggt	tcggtgatga	cggtgaaaac
2101	ctctgacaca	tgcagctccc	ggagacggtc	acagcttgtc	tgtaagcgga	tgccgggagc
2161	agacaagccc	gtcagggcgc	gtcagcgggt	gttggcgggt	gtcggggcgc	agccatgacc
2221	cagtcacgta	gcgatagcgg	agtgatatact	ggcttaacta	tgcggcatca	gagcagattg
2281	tactgagagt	gcaccatgat	cggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc
2341	gcatcaggcg	ctcttccgct	tctcgcctca	ctgactcgtc	gcgctcggtc	gttcggctgc
2401	ggcgagcggg	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata
2461	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaaggc	agcaaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg
2521	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct
2581	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa
2641	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgacct	tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc
2701	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg
2761	aggctcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg
2821	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	accgggtaag	acacgactta	tcgccactgg
2881	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggatgtg	aggcgggtgct	acagagttct
2941	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	at ttggatc	tgcgctctgc
3001	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg

3061 ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac ggcagaaaa aaaggatctc  
3121 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt  
3181 aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa  
3241 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat  
3301 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagttgcct  
3361 gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc cccagtgctg  
3421 caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag  
3481 ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgctccatc cagtctatta  
3541 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtg  
3601 ccattgctgc aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg  
3661 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa gcggttagct  
3721 ctttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcattggtta  
3781 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg  
3841 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc  
3901 cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcattcattg  
3961 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga  
4021 tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg  
4081 ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat  
4141 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc  
4201 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca  
4261 catttccccg aaaagtcca cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct  
4321 ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtcttcaaga a

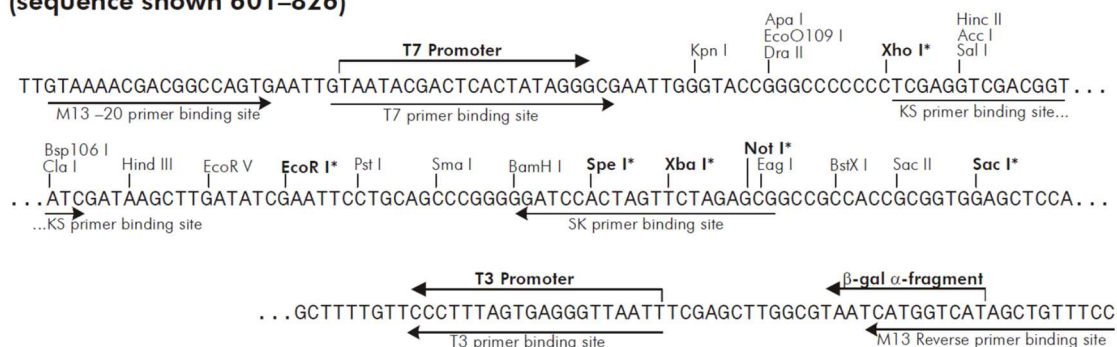


## 2-3-2 pBluescript SK(-)

### pBluescript SK(-) Vector Map



### pBluescript SK (-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 601–826)



\* These six restriction sites (Sac I, Not I, Xba I, Spe I, EcoR I, and Xho I) are unique within the Lambda ZAP II cloning vector.

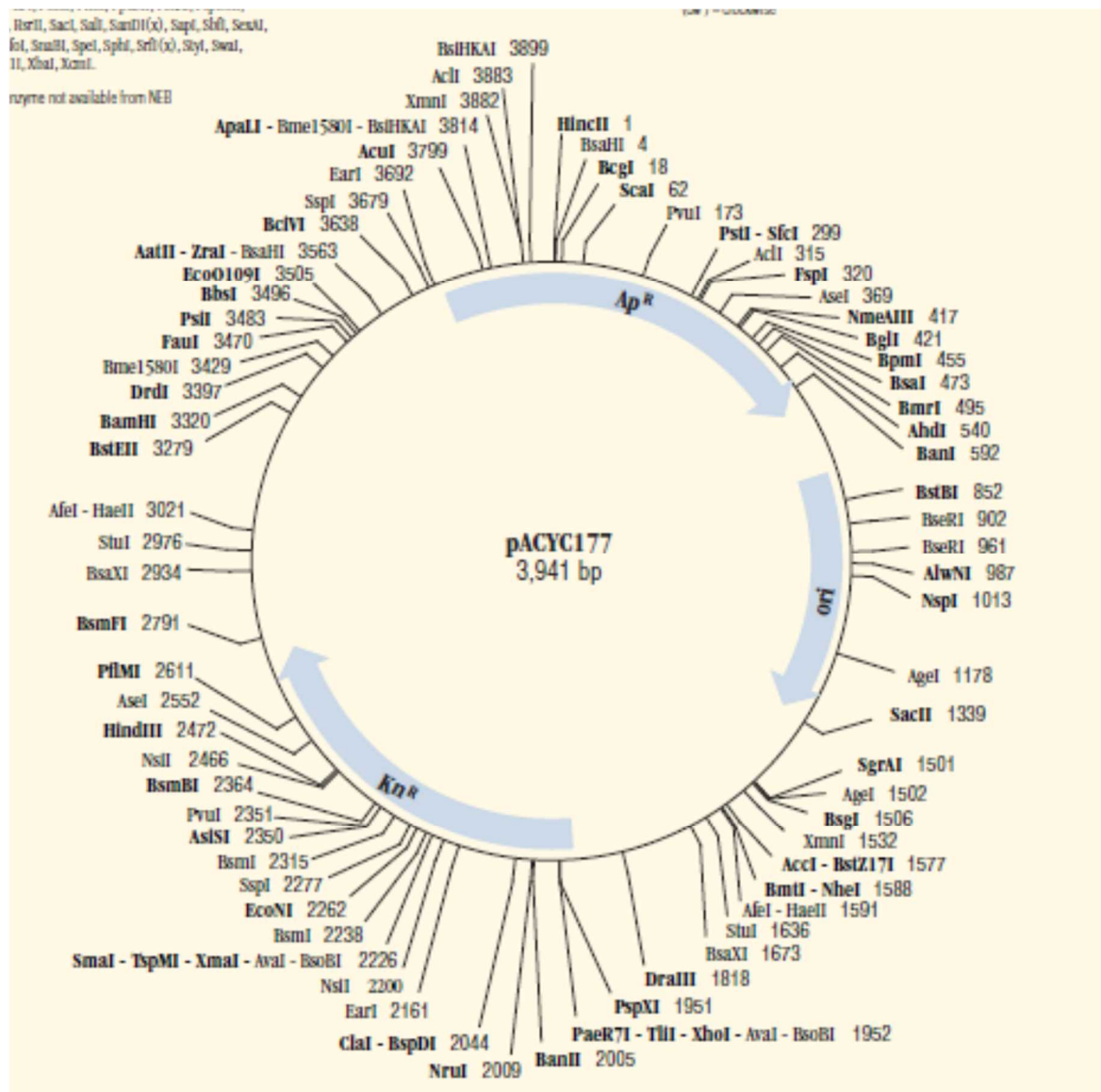
Feature	Nucleotide Position
f1 (-) origin of ss-DNA replication	24–330
$\beta$ -galactosidase $\alpha$ -fragment coding sequence ( <i>lacZ'</i> )	463–816
T7 promoter transcription initiation site	643
multiple cloning site	653–760
T3 promoter transcription initiation site	774
<i>lac</i> promoter	817–938
pUC origin of replication	1158–1825
ampicillin resistance ( <i>bla</i> ) ORF	1976–2833

**FIGURE 2** Circular map and polylinker sequence of the pBluescript SK(-) phagemid. The complete sequence and list of restriction sites are available from [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com) or from the GenBank® database (#X52324).

1 cacctgacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg  
61 tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc  
121 tcgccacgtt cgccggcctt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctcctt ttagggttcc  
181 gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta  
241 gtgggcatc gccctgatag acggtttttc gcccttgac gttggagtcc acgttcttta  
301 atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg  
361 atttataagg gatthttgccg atttcggcct attggttaaa aatgagctg atttaacaaa  
421 aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttccattcgc cattcaggct  
481 gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgc ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa  
541 agggggatgt gctgcaaggc gattaagtgt ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg  
601 ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg  
661 gccccctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgatata gaattcctgc agccgggggg  
721 atccactagt tctagagcgg ccgccaccgc ggtggagctc cagcttttgt tccctttagt  
781 gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattggt  
841 atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg  
901 cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg  
961 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc  
1021 gtattgggcg ctcttccgct tctcgcctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc  
1081 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata  
1141 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggc agcaaaaaggc caggaaacct aaaaaggccg  
1201 cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct  
1261 caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa  
1321 gtcctctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatactg tccgcctttc  
1381 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg  
1441 aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg  
1501 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtgag acacgactta tcgccactgg  
1561 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgt acagagttct  
1621 tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc  
1681 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg  
1741 ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc  
1801 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt  
1861 aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa  
1921 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat  
1981 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgctcctcc atagttgctt  
2041 gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtct accatctggc cccagtgctg  
2101 caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag  
2161 ccggaagggc cgagcgcaga agtgggtcctg caactttatc cgctccatc cagtctatta

2221 attggtgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg  
2281 ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg  
2341 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa gcggtagct  
2401 ctttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcattggtta  
2461 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg  
2521 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc  
2581 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcattcattg  
2641 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga  
2701 tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg  
2761 ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataaggcg acacggaaat  
2821 gttgaatact catactcttc cttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc  
2881 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca  
2941 catttccccg aaaagtgc

2-3-3 pACYC177



```

1  gttgacgccg  ggcaagagca  actcggtcgc  cgcatacact  attctcagaa  tgacttggtt
61  gagtactcac  cagtcacaga  aaagcatctt  acggatggca  tgacagtaag  agaattatgc
121 agtgtcgcca  taaccatgag  tgataacact  gcggccaact  tacttctgac  aacgatcgga
181 ggaccgaagg  agctaaccgc  ttttttgac  aacatggggg  atcatgtaac  tcgccttgat
241 cgttgggaac  cggagctgaa  tgaagccata  ccaaacgacg  agcgtgacac  cacgatgcct
301 gcagcaatgg  caacaacgtt  gcgcaacta  ttaactggcg  aactacttac  tctagcttcc
361 cggaacaat  taatagactg  gatggaggcg  gataaagttg  caggaccact  tctgcgctcg
421 gcccttcgg  ctggctggtt  tattgctgat  aaatctggag  ccggtgagcg  tgggtctcgc
481 ggtatcattg  cagcactggg  gccagatggt  aagccctccc  gtatcgtagt  tatctacag
541 acggggagtc  aggcaactat  ggatgaacga  aatagacaga  tcgctgagat  aggtgcctca

```

601 ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta  
661 aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc  
721 aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccttaat aagatgatct  
781 tcttgagatc gttttggctt gcgctgaatc tcttgctctg aaaacgaaaa aaccgccttg  
841 cagggcgggtt tttcgaaggt tctctgagct accaactctt tgaaccgagg taactggcctt  
901 ggaggagcgc agtcaccaaa acttgtcctt tcagtttagc cttaacccggc gcatgacttc  
961 aagactaact cctctaaatc aattaccagt ggctgctgcc agtggtgctt ttgcatgtct  
1021 ttccggggtg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg actgaaccggg  
1081 gggttcgtgc atacagtcca gcttgagcgc aactgcctac ccggaactga gtgtcaggcg  
1141 tggaatgaga caaacgcggc cataacagcg gaatgacacc ggtaaaccga aaggcaggaa  
1201 caggagagcg cacgagggag ccgccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg  
1261 ggtttcgcca ccaactgatt gagcgtcaga tttcgtgatg cttgtcaggg gggcggagcc  
1321 tatggaaaaa cggctttgcc gcggccctct cacttcctg ttaagtatct tcctggcatc  
1381 ttccaggaaa tctccgcccc gttcgtgaagc catttcgct cgccgcagtc gaacgaccga  
1441 gcgtagcgag tcagtgagcg aggaagcggg atatatcctg tatcacatat tctgctgacg  
1501 caccggtgca gccttttttc tctgcccaca tgaagcactt cactgacacc ctcactagtg  
1561 ccaacatagt aagccagtat acactccgct agcgtgagg tctgcctcgt gaagaagggtg  
1621 ttgctgactc ataccaggcc tgaatcgccc catcatccag ccagaaaagtg agggagccac  
1681 ggttgatgag agctttgttg taggtggacc agttggatg tttgaacttt tgctttgcca  
1741 cggaacggtc tgcgttctcg ggaagatgag tgatctgatc cttcaactca gcaaaaagttc  
1801 gatttattca acaaagccac gttgtgtctc aaaatctctg atgttacatt gcacaagata  
1861 aaaatataatc atcatgaaca ataaaactgt ctgcttacat aaacagtaat acaaggggtg  
1921 ttatgagcca tattcaacgg gaaacgtctt gctcgaggcc gcgattaaat tccaacatgg  
1981 atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt cgggcaatca ggtgagcaaa  
2041 tctatcgatt gtatgggaag cccgatgagc cagagttggt tctgaaacat ggcaaaggta  
2101 gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa ctggctgacg gaatttatgc  
2161 ctcttccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga tgcattggtta ctcaccactg  
2221 cgatccccgg gaaaacagca ttccaggtat tagaagaata tctgattca ggtgaaaata  
2281 ttgttgatgc gctggcagtg ttctgagcc ggttgcatc gattcctggt tgtaattgtc  
2341 cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg ctcaggcgca atcacgaatg aataacggtt  
2401 tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga  
2461 aagaaatgca taagcttttg ccattctcac cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct  
2521 cacttgataa cttatTTTT gacgagggga aattaatagg ttgtattgat gttggacgag  
2581 tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccactctatg gaactgcctc ggtgagtttt  
2641 ctccctcatt acagaaacgg cttttcaaa aatatggtat tgataatcct gatatgaata  
2701 aattgcagtt tcatTTgatg ctgatgagt ttttctaac agaattggtt aattggttgt  
2761 aacctggca gagcattacg ctgacttgac gggacggcgg ctttgttgaa taaatcgaac  
2821 ttttgctgag ttgaaggatc agatcacgca tcttcccgac aacgcagacc gttccgtggc

2881 aaagcaaaaag ttcaaaatca ccaactggtc cacctacaac aaagctctca tcaaccgtgg  
2941 ctccctcact ttctggctgg atgatggggc gattcaggcc tggatgagt cagcaacacc  
3001 ttcttcacga ggcagacctc agcgctcaaa gatgcagggg taaaagctaa ccgcatcttt  
3061 accgacaagg catccggcag ttcaacagat cgggaagggc tggatttgc gaggatgaag  
3121 gtggaggaag gtgatgtcat tctggtgaag aagctcgacc gtcttggccg cgacaccgcc  
3181 gacatgatcc aactgataaa agagtttgat gtcagggtg tagcggttcg gtttattgac  
3241 gacgggatca gtaccgacgg tgatatgggg caaatggtgg tcaccatcct gtcggctgtg  
3301 gcacaggctg aacgccggag gatcctagag cgcacgaat agggccgaca ggaagcaaag  
3361 ctgaaaggaa tcaaatttgg ccgcaggcgt accgtggaca ggaacgtcgt gctgacgctt  
3421 catcagaagg gcaactggtgc aacggaaatt gtcatcagc tcagtattgc ccgctccacg  
3481 gtttataaaa ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg  
3541 tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgvcggaa  
3601 cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac  
3661 cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttcctg  
3721 tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc  
3781 tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg  
3841 atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga  
3901 gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg t

## 別紙 2-4 遺伝子組換え微生物作製方法

### 要旨

以下に、BVDV-1 及び BVDV-2 の宿主から、それぞれの遺伝子組換え微生物である ddBVD Tub1 株及び ddBVD Tub 2 株が作製されるまでのフローを解説した。

#### 2-4-1 KE9 株から KE9-B-NdN 株を経て ddBVD Tub 1 株作製に至るまでのフロー

遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株作製過程は以下のとおりである：

KE9 株の RNA 配列に基づく全長 cDNA クローン pKE9 (p1678) の作製と感染性ウイルス粒子 (KE9-A 株) の作製

構造タンパク質をコードする *E<sup>ms</sup>* 遺伝子領域への欠損生成

*N<sup>pro</sup>* 遺伝子領域の改変

二重欠損ウイルス KE9-B-NdN 株の作製

製造用株 ddBVD Tub 1 株の確立

#### 2-4-2 NY93 株から XIKE-B-NdN 株を経て ddBVD Tub 2 株作製に至るまでのフロー

遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 2 株作製過程は以下のとおりである：

NY93 株の RNA 配列に基づく全長 cDNA クローン pKANE40A の作製

pKANE40A による感染性ウイルス粒子 (XIKE-A 株) の作製

構造タンパク質をコードする *E<sup>ms</sup>* 遺伝子領域への欠損生成 → XIKE-B 株 (349 番目アミノ酸であるヒスチジン (H349) 欠損)

PCR を用いた非構造タンパク質をコードする *N<sup>pro</sup>* 遺伝子領域の改変 (*N<sup>pro</sup>* タンパク質コード領域の 400b 以上の欠失生成) → XIKE-A-NdN 株

二重欠損ウイルス XIKE-B-NdN 株の作製

製造用株 ddBVD Tub 2 株の確立

なお、本文でも述べているとおり、実際には BVDV-2 の遺伝子組換え微生物作製を行ってから、BVDV-1 の遺伝子組換え微生物作製が行われた。

Genomic Sequence Analysis of Bovela/BVDV, 2014007.

要旨

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は、野外分離株宿主である BVDV-1 の KE-9 株及び BVDV-2 の NY93 株の遺伝子を 2 か所欠損させたのみで、ウイルス由来遺伝子以外の外来性遺伝子は一切挿入されていない。本試験は、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株それぞれの 5 代の *in vitro* 継代後の配列及び病原性復帰試験で動物体内での *in vivo* の継代を行い、分離可能だった最大継代後の配列を、継代前の配列と比較した。

復元や欠失生成等の操作を経て、ddBVD Tub 1 株には親株 KE9 株と比較すると 3 か所の塩基の置換が認められ、そのうち 1 か所はアミノ酸配列の置換を引き起こしていた。ddBVD Tub 2 株においては 14 か所の塩基の置換が親株 NY93 株の配列と比較した場合に認められ、そのうち 7 か所はアミノ酸配列の置換を引き起こしていた。これらの置換によって株の性状である感染性および増殖性は影響を受けず、ほぼ同等であった。

さらに、ワクチンの製造用マスターシードウイルス (MSV) の性状として、細胞による 5 代継代での安定性と動物に接種して 5 代継代した場合の安定性を確認した。それぞれ細胞継代後と動物継代後の遺伝子配列を比較したところ、ddBVD Tub 1 株では 4 か所の塩基の置換が認められ、そのうち 1 か所はアミノ酸の置換を引き起こしていた。一方、ddBVD Tub 2 株では 7 か所の塩基の置換が認められ、アミノ酸の置換は起きていなかった。

以上のことから、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は、*in vitro* あるいは *in vivo* で継代されても、野外分離株に認められるほどの高頻度の変異は生じないことが確認された。



## 別紙 2-6 病原性復帰試験

2-6-1(1) : Reversion to virulence back passage safety study for Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1 double deletion master seed virus, Study Number 6131-0955-06B-090, 05 August 2008.

2-6-1(2) : Reversion to virulence back passage safety study for Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2 double deletion master seed virus, Study Number 6131-0955-06B-034, 16 June 2008.

2-6-2 : Reversion to Virulence Back Passage Safety Study for Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1 Double-Deletion Master Seed Virus and Bovine Viral Diarrhea Virus Type 2 Double-Deletion Master Seed Virus, Study Number: 2015165.

### 要旨

本試験では、感受性動物である BVDV-1 及び BVDV-2 に対する抗体陰性牛に本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を、それぞれ 1 株ずつあるいは 2 株を混合した状態で経鼻接種し、バフィーコート及び鼻汁スワブを継代材料として別の牛に接種して継代した。プラセボ (MDBK 細胞) 接種動物を対照とした。

最初の接種材料のウイルス量は、ddBVD Tub 1 株のみの接種時 1 頭当たり  $10^{6.74}$  TCID<sub>50</sub>、ddBVD Tub 2 株のみの接種時 1 頭当たり  $10^{6.22}$  TCID<sub>50</sub>、両株混合接種時 1 頭当たり ddBVD Tub 1 株  $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub> 及び ddBVD Tub 2 株  $10^{5.7}$  TCID<sub>50</sub> で、ウイルス陽性となった接種材料を経時的に接種後 10 日まで採材してプールし、別の BVDV-1 及び BVDV-2 に対する抗体陰性牛に経鼻接種して継代した。

ウイルス接種後は臨床観察、直腸温測定 (39.4 以上を発熱と定義) 白血球数及び血小板数の確認 (それぞれ、接種前の白血球数及び血小板数をベースラインとして 40% 以上の変動が認められた場合を異常と定義) バフィーコート及び鼻汁スワブからのウイルス分離を行った。臨床観察では、対照群でも認められるような軽度の鼻汁漏出、咳、食欲不振、元気消失、軽度あるいは水様性下痢といった症状以外には、異常は観察されなかった。直腸温測定では、ddBVD Tub 1 株接種群で一過性に 39.4 あるいは 39.5 を示す動物が対照群も含めてあった程度であり、その他に異常は認められなかった。白血球数及び血小板数においても、異常は認められなかった。バフィーコート及び鼻汁スワブからのウイルス分離は、ddBVD Tub 1 株のみ接種した場合、継代 3 代目で分離されなくなり、ddBVD Tub 2 株のみ接種した場合、継代 2 代目で分離されなくなった。また、ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を混同して同時接種した場合、継代 2 代目で分離されなくなった。

## 別紙 2-7 RNA ウイルスの変異率について

### 要旨

RNA ウイルスは、DNA ウイルスよりも核酸レベルで変異しやすいウイルスであることが一般的に知られており、その変異率の幅は  $10^{-6}$  から  $10^{-4}$  である (2-7-1)。そのため、継代による塩基置換変異は、遺伝子組換え微生物である以前に RNA ウイルスでは起こりうる。細胞あるいは動物での 5 代の継代でそれぞれ 1 塩基あるいは 7 塩基の変異は、RNA ウイルスに見られる範囲としては高い変異率ではない。RNA ウイルスのペスチウイルスである C 型肝炎ウイルスの *in vivo* の変異率は  $1.15 \pm 0.29 \times 10^{-4}$  で (2-7-2)、変異率の高い豚繁殖呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) では 1 年あたりで  $10^{-3} \sim 10^{-2}$  レベルであるとの報告がある (2-7-3)。本遺伝子組換え微生物の場合、1 継代で 1 塩基変異するときの変異率は  $1/12300 = 8.1 \times 10^{-5}$  (これより小さい変異率は計算上ありえない) となり、5 継代で 1~3 塩基の変異の場合、1 継代あたりの変異率は  $8.1 \sim 56.9 \times 10^{-5}$  となるため、報告されている RNA ウイルス変異率の範囲内である。

2-7-1 Combe, M. and Sanjuan, R., 2014; Variation in RNA virus mutation rate across host cells. PLOS Pathogens, 10: e1003855.

### 宿主細胞によってさまざまに変化する RNA ウイルスの変異率

#### 文献要旨

RNA ウイルスの自然突然変異率は、DNA ウイルスや他の微生物に比べて高いことがよく知られている。しかしながら、RNA ウイルスの変異率は、 $10^{-6}$  から  $10^{-4}$  s/n/r (複製 1 回あたりある塩基に起きる置換の頻度) とそれぞれのウイルスによってかなりのばらつきがあり、なぜこのようにばらつくのかは、よくわかっていない。ウイルスの変異率は、複製の忠実度やエラー修復能の違いに加えて、感染動物側の因子に依存している可能性もある。そこで本研究では、感受性動物域や細胞指向性の広い水胞性口炎ウイルス (VSV) を用いて、細胞環境が自然突然変異率に与える影響を評価した。ルリア-デルブリュックのゆらぎ試験及びシーケンス解析を実施したところ、VSV の突然変異率は、ベビーハムスター腎細胞、マウス胚線維芽細胞、大腸がん細胞及び神経芽腫細胞のいずれを用いた場合においても、同等であることが示された (およそ  $10^{-5}$  s/n/r)。また、p53 機能欠損による細胞の不死化や、酸素濃度 ( $1 \sim 21\%$ ) は、ウイルス複製の忠実度に有意な影響を与えなかった。よって、過去に発表されている変異率は、特定の人工的な実験室内環境で測定されたものであっても、妥当であると考えてよいことが示された。さらに面白いことに、種々の昆虫由来細胞内における VSV の変異率は、哺乳類細胞内と比べて、約 4 倍低いことも発見した。VSV や他の節足動物媒介性ウイルスの野外における進化が比較的遅いことを、この現象によって説明できるかもしれない。

2-7-2 Cuevas, J. M. *et al.*, 2009; Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus *in vivo*. *J. Virol.*, 83:5760-5764.

#### 生体内における C 型肝炎ウイルスの変異率及び変異スペクトルに対するリバビリンの効果

##### 文献要旨

RNA ウイルスは複製時のエラーが極めて多いため、致死変異生成 (lethal mutagenesis) による治療の標的となる。C 型肝炎ウイルス (HCV) の場合、*in vitro* で変異原性を持つ塩基類似体のリバビリンが標準治療で使用されるが、*in vivo* におけるリバビリンの作用機序はよくわかっていない。本研究では、ナンセンス変異の解析に基づいて変異率を推定する新しい方法を用い、生体内におけるリバビリン及びインターフェロン併用療法の変異原性について評価した。この方法を適用したのは、74 例の HCV 感染患者に由来する逆転写 PCR による分子クローン配列を 15,000 以上擁する、大規模な HCV 配列データベースである。得られた自然突然変異率の推定値は、1 塩基あたり約  $10^{-4}$  置換以下で、これは RNA ウイルスで一般的に認められる範囲の値であった。6 か月にわたってインターフェロン及びリバビリン併用療法を実施した患者に由来するサンプルでは、変異率がおよそ 3 倍になり、変異スペクトルにも有意なシフトが認められた。この結果は、すでに *in vitro* で知られていたリバビリンの変異原性効果を支持するものであり、リバビリン及びインターフェロン併用療法における抗ウイルス効果は、少なくとも部分的には、致死変異生成によるものであることが示唆された。

2-7-3 Hanada, K. *et al.*, 2005; The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (4).

#### 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの起源と進化

##### 文献要旨

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) は、北米型と欧州型に分けられ、これらの間には 40%ほどのアミノ酸配列の違いがある。これら 2 つの型が分岐したのは、疫学データにもとづいた推定から 1980 年ごろとされているが、このことは、PRRSV の進化速度が他の RNA ウイルスの  $10^{-3}$  から  $10^{-5}$ /塩基/年と比較して、高いことを示唆している ( $10^{-2}$ /塩基/年のオーダー)。本研究では、疫学データにもとづく先行研究で推測された PRRSV の進化過程を検証するため、分子進化解析により PRRSV の分岐時間および進化速度を推定した。推定された分岐時間 (1972 -1988 年) は、疫学データから推定されるものとよく一致した。また PRRSV の進化速度は、 $(4.71 -9.8) \times 10^{-2}$ /塩基/年と推定され、これまでに報告されている RNA ウイルスの中で最も高いことが実証された。さらに、PRRSV が出現してからどのように豚への感染に適応していったのかを知るため、この適応に重要な部位を推定した。その結果、免疫に関連するエピトープだけでなく、シグナルペプチドを含む膜貫通領域にも、適応に関連する部位が存在していた。特に、膜貫通領域に認められた適応関連部位は、宿主細胞膜への適合性に影響を与えていると考えられた。以上より、PRRSV は、1980 年ごろに他の宿主動物から豚へと伝播し、膜貫通領域を変化させることで、豚への感染に適応したと結論づけられる。

## 別紙 2-8 同居感染性および体内分布について

Pivotal dissemination and transmission study with the master seed virus of an attenuated, combined BVDV Type I and Type II vaccine in bull study animals, Study Number 2007098, 15 September 2007

### 要旨

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を含むワクチンの同居感染性ならびに体内分布について、1~2 か月齢の牛を用い、接種群（8 頭）および同居非接種群（4 頭）の設定で検討した。

接種群には 1 頭当たりのウイルス量として ddBVD Tub 1 株  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL × 5 mL、ddBVD Tub 2 株  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL × 3.6 mL を混合して接種し、同居非接種群とともに最長 45 日間飼育し、臨床観察（行動、食欲、体調、流涙、結膜炎、鼻汁漏出、口腔炎、口腔あるいは眼の出血、下痢、咳、異常呼吸、呼吸回数および蹄葉炎）、直腸温測定、抗体検査、ウイルス分離（パフィーコート及び鼻汁スワブ）、白血球数及び血小板数の測定を行った。体内分布を確認するため、接種後 6 日、9 日、13 日及び 21 日に 2 頭ずつ剖検し、咽頭扁桃、下顎リンパ節、咽頭後リンパ節、腸管リンパ節、パイエル板（空腸、回腸および横行結腸）、骨髓、胃（第一胃又は第二胃、および第四胃）、鼻甲介、期間、肺（肺炎病変部がある場合にはそれも追加）、口腔内のびらんが認められた個体についてはその病変部を検体として採取した。牛鼻甲介（BT）細胞に臓器乳剤を接種して、ウイルス分離を行った。接種後 6 日は、咽頭後リンパ節、腸管リンパ節、パイエル板（空腸）及び胸腺を含む 17 検体で本組換え遺伝子微生物が分離されたが、接種後 9 日には 4 検体のみ、接種後 13 日には 2 検体のみでウイルスが分離され、接種後 21 日及び 30 日の検体では供試したすべての臓器検体からウイルスは分離されなかった。パフィーコート検体では接種後 4 日の 1 検体のみでウイルス陽性となり、そのほかはすべて陰性であった。鼻汁スワブからはウイルスは一切検出されなかった。中和抗体価は、BVDV-1 株に対して接種後 13 日から検出され始め、接種後 19 日に全頭で陽性となり、BVDV-2 株に対しては接種後 13 日目に全頭で陽性となった。臨床症状は、項目ごとに 4 段階（0：正常、1：軽度、2：中等度、3：重度）にスコア化してワクチン接種群と同居非接種群を（累積臨床スコア/観察日数）の平均で比較したところ、ワクチン接種群では 0.4~2.9、同居非接種群では 1.2~2.9 とほぼ同じ範囲であり、特筆すべき差は認められなかった。直腸温の推移は、一部に接種前の平均直腸温と比較して有意に低かったり高かったりする時点は合ったものの一過性であり、発熱は認められなかった。白血球数及び血小板数においては、血小板数においてワクチン接種群及び非接種同居群で 1 頭の 1 時点ずつ低い値が認められたが、一過性であった。病理組織学的検査において、蛍光抗体染色により BVDV が検出されたのは接種後 6 日の空腸パイエル板のみで、その後はいずれの臓器においても両群とも検出されなかった。以上のことから、ワクチン接種群にはウイルスが検出され、非接種同居群でウイルスは検出されなかったことから、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を含むワクチンには同居感染性がないと考えられた。ワクチンを接種した動物の臓器サンプルからは一過性に接種後 6 日、9 日及び 13 日にリンパ系臓器検体（咽頭扁桃、咽頭後リンパ節、腸管リンパ節、パイエル板、骨髓および胸腺）、胃あるいは呼吸器系（鼻甲介、気管リングおよび肺）の臓器で認められた。病理組織学的検査においては D6 のパイエル板でのみ陽性が検出され、その後は陰性であった。パフィーコート検体からは 1 個体 1 時点（D4）のみで陽性となり、その他の個体からはすべての時点で検出されなかった。鼻汁スワブにおいて陽性検体は全く認められなかった。よって、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を含むワクチン接種後 21 日には、体内から検出されない状態になると考えられた。



## 別紙 2-9 海外の野外臨床試験で実施したウイルス分離法

2-9-1 Validation of the virus isolation method for the detection of type 1 bovine viral diarrhoea virus in nasal swabs, buffy coats and fetal tissues.

2-9-2 Validation of the virus isolation method for the detection of type 2 bovine viral diarrhoea virus in nasal swabs, buffy coats and fetal tissues.

### 要旨

宿主との一次配列の比較にはまずウイルス分離を行う必要がある。海外の野外臨床試験において用いたウイルス分離方法では、BT 細胞あるいは MDBK 細胞を用いて蛍光抗体染色法によるウイルス検出を行った。鼻汁、白血球（バフィーコート）及び胎子組織（脾臓）検体を用いて特異性、精密度、正確性、直線性、頑健性について確認した。検出下限は BVDV-1 で 16 FAID<sub>50</sub>/mL、BVDV-2 で 4 FAID<sub>50</sub>/mL であった。なお、胎子組織検体については肝臓による検出も試みたが、細胞毒性が強いため検出下限が BVDV-1 で 125 FAID<sub>50</sub>/mL、BVDV-2 で 40 FAID<sub>50</sub>/mL となった。

Periodic Safety Update Report (Document Number: vr00108337)

要旨

本資料は、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を含むワクチンが承認されている欧州市場において、欧州医薬品局 (EMA) の規則に従って市販後 6 か月ごとに作成される有害事象に関する報告書である。

有害事象の内訳は、ワクチン接種対象動物及び非接種対象動物の安全性に関する有害事象事例、ヒトに対する安全性に関する事例、有効性が疑われる事例、休薬期間に関する有害事象事例、環境要因に起因する有害事象事例、感染因子の伝播が疑われる有害事象事例、製品における物質 (異物) 事例に分類されている。市販後から 2017 年 7 月までに報告された事例には、対象動物の安全性に関する有害事象が接種動物の 0.0364% で報告されており、牛では特に高い報告頻度ではない。有効性が疑われる有害事象事例には主に持続感染 (PI) 牛も含まれるが、野外感染がワクチン接種よりも先に起きている可能性は否定できなかった。非接種対象動物の安全性に関する有害事象事例は報告されていない。

Bovela® - Double Gene Deleted Modified Live BVDV Vaccine  
Survivability of Bovela® in Water, Internal Number: 2017022

要旨

本遺伝子組換え微生物の水中での生存性を確認するため、試験を実施した。凍結乾燥した本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株含有ワクチンを、1 用量 (2 mL) となるように溶解用液で溶解し、その 10 mL ずつを 90 mL の水道水及び注射水に加えて室温 (25 ) でよく混合した。その 7.5 mL を 15 mL 試験管に移し、2.5 mL の安定剤を加えて -65 に保存した。この操作を経時的に行い、0、6、12、18 及び 24 時間の検体をそれぞれ採取し、溶解時のワクチンを陽性対照としてウイルス量を比較した。その結果、注射水に加えたワクチンのウイルス量は、ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の両株とも陽性対照と同等であったのに対し、水道水に加えたワクチンのウイルス量は ddBVD Tub 2 株では 6 時間後に検出限界以下となり、ddBVD Tub 1 株では 24 時間後に検出限界以下となった。

以上の結果から、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は、宿主 BVDV の形質と同様に注射水中では 24 時間生存する一方、水道水中では 24 時間以内に検出限界以下になり、減衰曲線から 48 時間以内にほぼ不活化されると結論付けられた。



Cutler *et al.*, 2011: Kinetics of UV<sub>254</sub> inactivation of selected viral pathogens in a static system. *J. Applied Microbiol.*, 111, 389-395.

#### 静的システムにおけるUV<sub>254</sub>による特定のウイルス病原体不活化の推移

##### 文献要旨

本研究の目的は、A型インフルエンザウイルス、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV)、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、及びレオウイルス、という4つのウイルス病原体に対するUV<sub>254</sub>照射後の不活化定数を推定することである。培地中のウイルスに対して9種類の線量でUV<sub>254</sub>を照射した後、ウイルスの感染力価を測定した。解析の結果、UV<sub>254</sub>によるウイルス不活化は、一般的な1段階の不活化モデルよりも、2段階モデルによってより正確に記述できることが示された。本結果から、今回調べたウイルスには、UV<sub>254</sub>によって不活化されやすい集団と、より抵抗性の高い集団という、2つの不均一なウイルス集団が存在することが示された。また重要な点として、1段階モデルに基づいて算出した不活化定数を使用すると、実験条件によっては、ウイルスの不活化に必要なUV<sub>254</sub>の線量を過小に見積もってしまうことがある。微生物の不活化に関する研究において正確な推定を行うには、不活化の推移の評価に、1段階及び2段階モデルの両方を用いるべきである。本研究結果は、実験室や野外における抗微生物因子に関連する分野の人にとって興味深いものであると考えられる。

別紙 2-13 遺伝子組換え微生物と野外株との混合培養に関する資料

2-13-1 Recombination evaluation between gene-deleted BVDV-1 vaccine strain and BVDV-1 field strain.

Project number: 1677, 28 Aug 2016.

2-13-2 Recombination evaluation between gene-deleted BVDV-2 vaccine strain and BVDV-2 field strain.

Project number: 1677, 31 Aug 2016.

要旨

本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株のそれぞれについて、同種のウイルス間で遺伝子組換えが起きるかについて確認するため、本遺伝子組換え微生物と野外株を MDBK 細胞に同時に加えて培養し、その後蛍光抗体で確認されたウイルスのフォーカスを無作為に 30 個程度抽出し、N<sup>pro</sup> と E<sup>rns</sup> 遺伝子領域を RT-PCR で増幅して遺伝子配列から本遺伝子組換え微生物と野外株との遺伝子組換えが起きていないかどうかを確認した。遺伝子組換えが起きた場合に判別が可能となるように、本試験に用いた BVDV-1 及び BVDV-2 のそれぞれの野外株は、本遺伝子組換え微生物及びその宿主とは異なる配列であることが確認された BVDV であった。配列の確認で、BVDV-1 及び BVDV-2 の両方の実験で、本遺伝子組換え微生物と野外株の配列が混在するウイルスは、いずれの場合も確認されなかった。

別紙 3-1 ヨーロッパ医薬品局 (European Medicines Agency: EMA) での承認内容に関する資料  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/003703/vet\\_med\\_000308.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1c](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/003703/vet_med_000308.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1c)

## 動物用医薬品製品委員会 Bovela に関する CVMP 評価報告書

### 環境リスクアセスメント (ERA)

申請者は獣科薬製品委員会 (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, CVMP) ガイドラインの免疫学的動物用医薬品の環境リスク評価 (EMA/CVMP/074/95<sup>1</sup>) に準拠して、リスク評価を行った。

#### 1. 危険性の特定

接種対象動物以外の種への伝播：遺伝子組換えワクチン株の接種対象動物種は牛である。BVDV は偶蹄目に属する動物に自然感染が限られている。ワクチンウイルス株の伝播は接種対象あるいは非接種対象動物間で認められなかった。ワクチン接種後の牛、豚および羊において、それらの種での伝播は認められなかった。生抗原含有製品の排泄：接種対象動物種内での伝播および非接種対象動物への伝播の可能性は体内分布試験で特に検討された。鼻汁、血液、尿および糞便を介しての BVDV の排泄は、特に環境において BVDV が伝播するのに重要な感染源である考えられている鼻汁において BVDV が確認されなかったことから、危険性が低いと評価された。ワクチンに含有された BVDV 株はワクチン非接種動物である新生牛において確認されず、本ワクチンの排泄の危険性が低いことおよびワクチンウイルスが垂直伝播しないという事実を示した。ワクチン BVDV 株はワクチン接種後 6 ~ 23 日でワクチン接種母牛の乳汁中に散発的かつ微量に確認された。環境中への遺伝子組換え生ワクチン BVDV 株の拡散は、乳汁への排泄および哺乳に関する臨床試験の観察に基づいて可能性のある危険性として同定された。二つの試験において陽性となった検体のウイルス量は非常に低いと考えられる。重要なこととして、BVDV 陽性と判定された乳汁を哺乳された子牛 (接種対象動物の中で最も感受性がある動物) で BVDV 抗原陽性になったものはおらず、ワクチンに関連した臨床症状や抗体陽転は認められなかった。これらに基づき、すべての前述のデータから本製品のワクチン BVDV 株の拡散能力が非常に低いとみなされる。生存性、定着性および拡散性：BVDV は感受性動物の体内でのみ複製でき、動物体外の環境中では複製できない。エンベロープのあるウイルスの特性によって、BVDV は紫外線や低湿度のような環境条件に弱い。遺伝子組換えワクチン株の分泌や排出を介する拡散は低いと評価される。遺伝子の安定性、病原性復帰、遺伝子拡散の可能性：遺伝子の安定性および弱毒の表現型の安定性を鑑みると、ワクチン株は *N<sup>pro</sup>* コドンのポジション 5 ~ 168 および *E<sup>trns</sup>* コドンのポジション 349 の二つの遺伝子欠損によって弱毒化されている。よって、突然変異による病原性復帰は起きる可能性が非常に低い。組換えによる病原性復帰が理論的には起きる可能性がある。しかし、野外ウイルスが細胞に重感染しているときに起きるこのような事象は、superinfection exclusion メカニズムおよびワクチン株の複製率の低さ (弱毒化の表現型) から、非常に起きる可能性が低いと考えられる。組換え体ウイルスは、他の BVDV 野外株とほとんど変わらない性質の野外親株の生物学的特性を最悪の場合示す。ウイルスの RNA ゲノムが唯一の遺伝子情報で、RNA は DNA に組換えられない。よって、動物あるいは

<sup>1</sup> [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500004620.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004620.pdf)

環境菌のゲノムに対してウイルス RNA ゲノム由来の遺伝子の拡散が起きる危険性は無視できる程度であると考えられる。

## 2. 暴露の危険性

環境への直接的な暴露の危険性は、ワクチンが筋肉内接種であるため非常に低減される。さらにワクチンは訓練された獣医師に対してのみ供給される要指示薬となる。これによって技術的に確かな接種と、免疫学的動物用医薬品あるいはそれに関連した使用品の正しい廃棄も確実に行われる。データに基づき、環境リスクアセスメントは第 I 相で終了できる。製品は用法及び用量に従って使用されるとき、製品は環境に対する危険性が引き起こされるようなことは考えられない。

### 遺伝子組換え微生物を含むあるいはそれで構成される製品に対する環境リスクアセスメント

当該ワクチン Bovela は、Directive 2001/18/EC<sup>2</sup>に基づいて遺伝子組換え微生物の環境放出の妥当性に関する審議が必要である。

申請者は人および環境に対する可能性のある危険性についての詳細な情報を提供している。

ペストウイルスゲノムは一本鎖(+)RNA である。ワクチンに含まれる BVDV-1 株および BVDV-2 株は遺伝子分析によって判別できる。BVDV-1 マスターシードウイルスおよび BVDV-2 マスターシードウイルスの遺伝子分析では、野外分離株と比較していくつかの変異が認められるが、遺伝子の安定性は組換えワクチン BVDV 株の製造で示された。申請者は、*in vitro* とともに *in vivo* でも十分な継代数で継代したマスターシードウイルスの遺伝子安定性を示した。変異率はふつうであった。よって、BVDV-1 および BVDV-2 のマスターシードウイルスは遺伝子学的に十分安定であると考えられる。

ワクチンウイルス株は BVDV-1 および BVDV-2 において相同な 2 か所の特異的な欠損によって作製され、外来性遺伝子を一切含まない。複数の欠損は病原性復帰の危険性を極小化する。

環境への放出条件および放出環境に関する情報が示された。

BVDV-1 および BVDV-2 は感染動物に対する毒性は知られておらず、感染動物にアレルギー反応を引き起こすことは知られていない。接種対象動物および非接種対象動物による臨床試験で得られた成績では、接種対象動物における高用量接種後に若干の局所反応が認められたのみであることが示されている。

ワクチン株間および野外株との組換えの可能性は、野外株のような同じ遺伝子構成のもの、あるいは野外株の構成遺伝子をもつワクチンウイルスにより、組換え BVDV ができるかで起きると考えられるが、このようなことが起きる可能性は低い。

臨床試験の結果に基づき、ワクチン BVDV の非常にわずかな量だけが環境に放出されるかもしれないが、BVDV は感染した感受性動物の組織細胞でのみ増殖するので、残存することはない。ワクチンウイルスはある特定の期間だけ乳汁中に極少量放出される以外、分泌及び排出経路を介してワクチン接種動物から排泄されない。この乳汁を哺乳した子牛は BVDV 感染を示す臨床徴候や抗体陽転は認められなかった。同様にワクチン接種動物とおとり動物との混合飼育で、おとり動物の抗体陽転は認められなかった。よって、環境中へのワクチン株の明らかな拡散は検出されなかった。

ワクチンウイルスでの感染は偶蹄目に属する動物のみに限定され、ワクチン非接種のおとり動物への拡散

<sup>2</sup>

[http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0004.02/DOC\\_1&format=PDF](http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0004.02/DOC_1&format=PDF)

は起こらない。

非接種対象動物である豚および羊でのワクチンの安全性が評価された。ワクチンを直接接種されても有害事象は確認されなかった。

*N<sup>pro</sup>* 遺伝子産物の発現が起きないことで、*N<sup>pro</sup>* 遺伝子産物は感染動物の免疫反応を免疫優位的に標的としていないため、ウイルス感染に抵抗するための感染動物における免疫機能の能力に影響がある可能性はないと考えられる。

BVDV はヒトに感染せず、偶蹄目に属する動物にのみ感染する。

このように、製品が承認された場合、ワクチンウイルスのモニタリングは必要ないと考えられる。また、製品が承認されたのちの製造所に入り込む他の微生物を防ぐさらなる方法や手順は必要ないと考えられる。

総合すると、弱毒ワクチン株である BVDV-1 および BVDV-2 の使用による危険性は、ヒトに対して無視できるものであり、用法および用量どおりに用いるときの環境に対しても非常に低いと考えられる。通常の使用の注意程度で十分であると考えられる。

別紙 3-2 海外における BOVELA 販売量の推移

国名	2015 年 <sup>1)</sup>	2016 年	2017 年 <sup>2)</sup>
ベルギー	109,340	125,145	77,535
キプロス	-	7,500	-
フランス	369,850	909,545	522,185
ドイツ	243,060	266,805	127,525
ハンガリー	22,595	52,735	12,505
アイルランド	-	49,160	29,190
イタリア	245,680	283,805	149,030
オランダ	157,485	182,125	91,710
ポーランド	28,285	52,760	23,435
ルーマニア	5,880	23,400	8,760
スペイン	70,390	125,945	54,560
英国	255,355	457,030	204,740
ポルトガル	7,875	16,675	2,700
合計	1,515,795	2,552,630	1,303,875

単位：ドース - : 販売なし

1) 2015 年月市販開始後から 12 月まで

## 別紙 3-3 海外における承認取得時に添付した臨床試験の成績

### 3-3-1 Evaluation of Field Safety and Efficacy in Dairy Cattle after Vaccination with a BVDV Vaccine Comprising a Type-1 and a Type-2 BVDV Vaccine Strain. Study number: 2009098.

#### 要旨

BVDV 抗体価に関して状態及び妊娠ステージの異なる 4,129 頭 (8 施設) の酪農牛を供試した。2,067 頭に本遺伝子組換え微生物を含有するワクチン (市販標準品と同様の ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株それぞれ  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/用量含有) を接種し (ワクチン群) 対照群 2,062 頭にはリン酸緩衝食塩液 (PBS) を 2 mL 接種した。

試験期間中、2,399 頭 (ワクチン群 1,216 頭、対照群 1,183 頭) の新生牛が生まれた。

主要評価項目として、ワクチン株あるいは野外株による胎子感染 (安全性) を設定した。新生牛について 4 週間追跡調査した。副次的評価項目として、臨床観察 (BVDV 感染に関連した項目) 及び抗体検査を実施した。BVDV 感染を確認するために採血を 3 か月ごとに試験終了時まで実施したところ、ワクチン群では 4 頭を除くすべての牛で抗体陽転が認められ、対照群ではほとんどの動物が試験開始時から終了時まで抗体陰性のままであった。

ワクチン群 1,216 頭中 5 頭、対照群 1,183 頭中 10 頭の胎子感染が確認された。ワクチン群 5 頭中の 4 頭ではイヤーノッチ試験で PCR 陽性となり、いずれも野外 BVDV-1 であることが判明した。そのうち 3 頭については、日数から推察するとワクチン接種前の経子宮感染であると考えられた。5 頭中 1 頭のワクチン群の流産胎子では、BVDV が血液検体からわずかに検出されたのみで、その他の臓器 (胸腺、脾臓、小脳等) からは検出されなかったが、結果的にはワクチン株 (ddBVD Tub 1 株) であることが判明した。正常な子牛、死産、流産を含み、本試験のワクチン群で 1,331 頭の子牛中ワクチンウイルスが検出されたのは、この 1 症例のみであった。非常に微量なウイルス検出量から、ワクチン株が流産の原因でないことは明らかであり、流産に至るような異常な因子があったために本来健康な胎子では移行する可能性のないワクチン株が胎子から検出されたものと推察された。

イヤーノッチ試験では陰性であったワクチン群 2 頭で、バフィーコート検体における BVDV 陽性が確認されたが、これは一過性の野外 BVDV 感染であると考えられた。これらの子牛の母牛は試験開始時には妊娠後期であったため、試験開始前から子牛の感染があったと考えられた。

67 件の流産 (ワクチン群 34 頭、対照群 33 頭) が試験期間中報告された。2 頭の胎子以外はすべてウイルス分離試験において BVDV 陰性であった。ワクチン群の胎子 1 頭は血液検体から BVDV が分離された (前述)。対照群の 1 頭は臓器から野外 BVDV-1 陽性となった。それぞれの母牛は接種処置時に感染しやすい時期だったため、野外 BVDV 感染が胎子にあったものと考えられた。

ワクチン群 1 頭、対照群 2 頭には先天的欠陥が確認された。対照群の 1 頭ではバフィーコートでの BVDV 陽性が確認され、生存可能で先天性乏毛症と骨格の欠陥が認められ、接種処置の前後に野外 BVDV の経子宮感染があったと考えられた。

試験期間中、産出された子牛はすべてワクチン株陰性であると確認された。よって、非妊娠牛及び全ての妊娠期における妊娠牛において本遺伝子組換え微生物を含有するワクチンは安全であると結論付けられた。

その他、未經産牛における受胎率、経産牛及び未經産牛における死亡動物の死亡原因、ならびに死産、死亡子牛及び死亡胎子に関する死亡原因について、ワクチン群では BVDV 感染によるものと考えられる異常は

認められなかった。

以上の結果から、本遺伝子組換え微生物を含有するワクチンは非妊娠乳牛及びすべての妊娠ステージの妊娠乳牛において安全であることが確認された。受胎率にも影響は認められなかった。有効性に関しても、野外 BVDV 株の感染阻止が示唆される事例があった。

### 3-3-2 Evaluation of Field Safety and Efficacy in Beef Cattle after Vaccination with a BVDV Vaccine Comprising a Type-1 and a Type-2 BVDV Vaccine Strain. Study number: 2009099.

#### 要旨

妊娠ステージの異なる 757 頭 (10 施設) の肉牛に本遺伝子組換え微生物を含有するワクチン (市販標準品と同様の ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株それぞれ  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/用量含有) を接種した (ワクチン群)、対照群 757 頭には PBS を 2 mL 接種した。最終的に 226 頭 (ワクチン群 115 頭、対照群 111 頭) が試験から除外となった。

主要評価項目として、ワクチン株あるいは野外株による胎子感染 (安全性) を設定した。副次的評価項目として、臨床観察 (BVDV 感染に関連した項目) 及び抗体検査を実施した。680 頭 (ワクチン群 336 頭、対照群 344 頭) の新生牛について 4 週間追跡調査した。

2 件 (ワクチン群及び対照群それぞれ 1 件) の胎子感染がイヤーノッチ試験で試験中に報告された。感染ウイルスの遺伝子配列を確認したところ、いずれも野外 BVDV-1 株であることが判明した。本感染はおそらく試験開始直前に起きた可能性が高いと推察された。

試験開始時、ワクチン群中、試験開始時の BVDV-1 抗体陰性は 26.8% (203 頭、BVDV-2 抗体陰性は 28.8% (218 頭) であった。ワクチン接種後は BVDV-1 及び BVDV-2 に対する抗体価が認められなかった牛の 97% 以上 (BVDV-1 抗体陽転 199 頭、BVDV-2 抗体陽転 212 頭) の抗体が陽転した。一方、対照群の試験開始時において、BVDV-1 抗体陰性は 31.4% (238 頭)、BVDV-2 抗体陰性は 33.03% (250 頭) であった。92% 以上 (BVDV-1 抗体陰性 230 頭、BVDV-2 抗体陰性 226 頭) の牛が試験終了時まで抗体陰性であった。10 施設中 7 施設でワクチン接種後の抗体価がワクチン群で有意に高かった。

新生牛における異常は、臨床症状として数日間の一過性の行動活性低がワクチン群 2 頭、対照群 1 頭で報告された以外は、認められなかった。

BVDV 感染が疑われるような臨床症状は認められなかった。

1,514 頭中 18 頭の牛が、BVDV 感染とは無関係な原因で死亡した。

試験期間中に 4 件の流産が報告され、うち 3 件はワクチン群であった。3 件とも流産胎子の発育に異常は認められなかった。検査の結果、4 頭とも BVDV 陰性であると確認された。

以上の結果から、ワクチンの安全性及び有効性が確認された。



## 別紙 3-4 非接種対象で感受性の報告のある動物種での同居感染性の確認

3-4-1 Safety of a Type 1 and Type 2 BVDV Vaccine Candidate in the Non-Target Animal, Sheep, with Particular Reference to the Spread of the Vaccine Candidate. Study number: 2009093.

3-4-2 Safety of a Type 1 and Type 2 BVDV Vaccine Candidate in the Non-Target Animal, Pig, with Particular Reference to the Spread of the Vaccine Candidate. Study number: 2009094.

### 要旨

本試験の目的は、遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を含有するワクチンの非接種対象動物であり感受性動物である羊及び豚に対する安全性の確認である。

約 2 か月齢の羊 15 頭を、10 頭と 5 頭の 2 群に分け、10 頭には本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株をそれぞれ  $10^6$  TCID<sub>50</sub> ずつ含有する接種材料を経鼻接種し（以下、接種群）、5 頭には PBS を経鼻接種し（以下、対照群）同一の飼育室で 4 時間同居させたのちそれぞれの飼育室に戻し、56 日間観察した。血液を接種前 7 日、接種時、接種後 14 日、28 日、42 日及び 56 日に採取し、BVDV-1 及び BVDV-2 に対する中和抗体価を測定したところ、対照群では接種前 7 日から接種後 56 日まで陰性のままで、接種群では接種後 14 日から BVDV-1 及び BVDV-2 に対する抗体陽転が確認され始め、28 日には供試した 10 頭全部で陽性になり、56 日まで維持された。パフィーコートからのウイルス分離を接種前 7 日、接種時、接種後 3 日、6 日、9 日及び 12 日に行ったところ、接種群及び対照群の全頭からウイルスは一切分離されなかった。臨床観察での特筆すべき異常は認められず、直腸温の推移も 40 に達するような発熱は認められなかった。

さらに、約 5 週齢の豚 15 頭を用いて、羊の試験と同一の条件で試験を実施した。BVDV-1 及び BVDV-2 に対する中和抗体価の測定では、接種群の 1 頭で接種後 28 日以降陽性となった以外は、接種群及び対照群の全頭で抗体陰性であった。パフィーコートからのウイルス分離も、供試した 15 頭全頭で陰性であった。臨床観察での特筆すべき異常は認められず、直腸温の推移にも異常は認められなかった。

以上の結果から、非接種対象動物で感受性動物である羊及び豚において、本遺伝子組換え微生物 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の同居感染性は認められず、羊及び豚で拡散することはないと考えられた。

## 緊急措置計画書

平成 30 年 7 月 10 日

ベーリンガーインゲルハイムベトアニマルヘルスジャパン株式会社  
代表取締役社長 永田 正  
東京都品川区大崎二丁目 1 番 1 号

第一種使用規程の承認を申請している  $N^{pro}$  及び  $E^{ms}$  遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 ddBVD Tub 1 株ならびに  $N^{pro}$  及び  $E^{ms}$  遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型 ddBVD Tub 2 株(  $N^{pro}$  ,  $E^{ms}$  , Bovine viral diarrhea virus type 1, Bovine viral diarrhea virus type 2) (BOVELA) の第一種使用等において、生物多様性影響が生じ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、以下の措置をとることとする。

### 1 第一種使用等における緊急措置をとるための実施体制及び責任者

実施体制(実施体制図を別添として添付)

実施責任者【個人情報につき非公開】(ベーリンガーインゲルハイムベトアニマルヘルスジャパン株式会社 執行役員 薬事部長)

実施責任者は、ドイツ等海外の製造所で製造されて日本に輸入される  $N^{pro}$  及び  $E^{ms}$  遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 ddBVD Tub 1 株ならびに  $N^{pro}$  及び  $E^{ms}$  遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型 ddBVD Tub 2 株(  $N^{pro}$  ,  $E^{ms}$  , Bovine viral diarrhea virus type 1, Bovine viral diarrhea virus type 2) (BOVELA) (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場合には、本組換え微生物を開発した法人(以下、「製造法人」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講じる。

### 2 第一種使用等の状況の把握方法

- (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製造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、治験の受託機関及び実施機関、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) さらに、生物多様性影響が生じるおそれがあると認められた場合には、(1)により把握している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

製造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、広く一般に知られるような方法で、本件についてのお知らせをするとともに、問い合わせ窓

口を設置することを協議する。

日本国内においては、プレスリリースを行う等、メディアを通じて広く使用者に周知するとともに、2 で把握した関係者に対しては、電話や文書等により個別に連絡を取る。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、問い合わせ専用窓口を設置する。ただし、日本国内で実施する開発段階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、治験の手順に従うこととする。

#### 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) 製造法人に対して、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実施する。
- (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、使用環境の消毒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

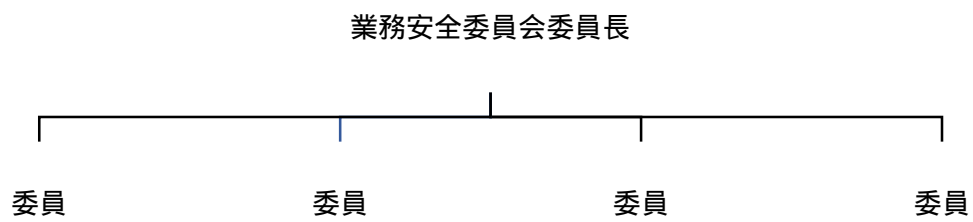
別添

実施体制

・ 業務安全委員会

委員長	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社
委員	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社
委員	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社
委員	株式会社食環境衛生研究所
委員(連絡窓口)	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社

・ 実施体制図



## 業務安全委員会

### 委員名簿

	氏名	職名
委員長	〔個人情報につき 非公開〕	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社 代表取締役社長
委員	〔個人情報につき 非公開〕	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社 薬事部
委員	〔個人情報につき 非公開〕	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社 品質保証部
委員	〔個人情報につき 非公開〕	株式会社食環境衛生研究所 信頼性保証部
委員 (連絡窓口)	〔個人情報につき 非公開〕	ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社 薬事部