

動物用医薬品専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

農林水産大臣から食品安全委員会に意見を求められた牛ウイルス性下痢ウイルス（ N^{pro} 及び E^{ns} 遺伝子欠損 1 型・2 型）生ワクチン（ボベラ）に係る食品健康影響評価（令和 4 年 5 月 25 日付け 4 消安第 1060 号）については、令和 4 年 6 月 27 日に開催された第 253 回動物用医薬品専門調査会において審議され、審議結果（案）がとりまとめられた。

2. 牛ウイルス性下痢ウイルス（ N^{pro} 及び E^{ns} 遺伝子欠損 1 型・2 型）生ワクチン（ボベラ）に係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

令和 4 年 7 月 26 日（火）開催の食品安全委員会（第 868 回会合）の翌日の令和 4 年 7 月 27 日（水）から令和 4 年 8 月 25 日（木）までの 30 日間。

2) 受付体制

電子メールフォーム（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、動物用医薬品専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

動物用医薬品評価書

牛ウイルス性下痢ウイルス (N^{pro} 及び
 E^{rns} 遺伝子欠損 1 型・2 型) 生ワクチ
ン (ボベラ)

令和 4 年 (2022 年) 7 月

食品安全委員会
動物用医薬品専門調査会

目 次

	頁
<審議の経緯>	2
<食品安全委員会委員名簿>	2
<食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿>	2
<第 253 回食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門参考人名簿>	2
要 約	3
I. 評価対象動物用医薬品の概要	4
1. 主剤	4
2. 効能・効果	4
3. 用法・用量	4
4. 添加剤等	4
5. 開発の経緯	4
II. 安全性に係る知見の概要	6
1. 人に対する安全性	6
(1) 主剤	6
(2) 添加剤等	7
2. 牛に対する安全性	7
(1) 安全性に関する試験	7
(2) 臨床試験	9
3. 本遺伝子組換えウイルスの <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 遺伝学的安定性	10
4. その他の知見	10
III. 食品健康影響評価	12
<別紙：検査値等略称>	13
<参照>	14

＜審議の経緯＞

2022 年 5 月 25 日 農林水産大臣から製造販売の承認に係る食品健康影響評価について要請（4 消安第 1060 号）、関係資料の接受
2022 年 5 月 31 日 第 860 回食品安全委員会（要請事項説明）
2022 年 6 月 27 日 第 253 回動物用医薬品専門調査会
2022 年 7 月 26 日 第 868 回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

（2021 年 7 月 1 日から）

山本 茂貴（委員長）
浅野 哲（委員長代理 第一順位）
川西 徹（委員長代理 第二順位）
脇 昌子（委員長代理 第三順位）
香西 みどり
松永 和紀
吉田 充

＜食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿＞

（2021 年 10 月 1 日から）

青山 博昭（座長）	島田 章則	宮田 昌明
石塚 真由美（座長代理）	島田 美樹	山本 昌美
青木 博史	須永 藤子	
稲見 圭子	寺岡 宏樹	
伊吹 裕子	内木 綾	
桑村 充	中西 剛	

＜第 253 回食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門参考人名簿＞

中島 春紫

要 約

牛ウイルス性下痢ウイルス (N^{pro} 及び E^{ns} 遺伝子欠損 1 型・2 型) 生ワクチン (ボベラ) について、動物用医薬品製造販売承認申請書等を用いて食品健康影響評価を実施した。

本製剤の主剤の製造用株である ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は、それぞれ病原性株である BVDV-1 KE-9 株及び BVDV-2 NY-93 株を親株として、 N^{pro} 遺伝子の最初の 4 アミノ酸 (メチオニン、グルタミン酸、ロイシン及びフェニルアラニン) の配列を除く全ての塩基と E^{ns} 遺伝子の 349 番目コドン (ヒスチジン) の 3 塩基 (CAT) を欠損させた遺伝子組換えウイルスである。

これらの製造用株は外来性遺伝子を一切含まず、目的の遺伝子領域の欠損による影響 (弱毒化され病原性を示さない。) 以外は牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の特性を受け継いでいると考えられ、BVDV の宿主域は偶蹄類であり人に対する病原性はなく、牛ウイルス性下痢 (BVD) は人獣共通感染症とみなされていない。

また、BVDV には有害な生理活性物質の生産性についての報告はなく、BVDV の特性を受け継いでいる製造用株においても同様に有害物質の産生はないと考えられ、さらに遺伝子配列のデータベース検索でもアレルギー物質に相同性の高い配列は確認されないことが示されている。

以上のことから、本製剤の主剤の製造用株は、人に対する病原性はないと考えられた。

本製剤に使用されている添加剤等は、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合の人への健康影響は無視できる程度と考えられた。

牛を対象とした安全性試験等において、本製剤の接種に起因する牛への影響として、特に問題となる所見はみられなかった。

以上のことから、本製剤が適切に使用される限りにおいては、食品を通じて人の健康に影響を与える可能性は無視できる程度と考えた。

I. 評価対象動物用医薬品の概要

1. 主剤

主剤は、*Npro* 及び *E^{ns}* 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 ddBVD Tub 1 株（シード）（ $10^4 \sim 10^6$ TCID₅₀¹）と *Npro* 及び *E^{ns}* 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型 ddBVD Tub 2 株（シード）（ $10^4 \sim 10^6$ TCID₅₀/ドース）である。（参照 1）

2. 効能・効果

効能・効果は、牛ウイルス性下痢ウイルス感染による臨床症状の軽減及び白血球減少の抑制並びに胎児への垂直感染の防止である。（参照 1）

3. 用法・用量

用法・用量は、本製剤（乾燥ワクチン：5 頭分/バイアル又は 25 頭分/バイアル）を、添付の溶解用液²で溶解し、その 2 mL を 3 か月齢以上の牛の筋肉内に注射する。1 年後に再注射することが推奨される。（参照 1）

4. 添加剤等

本製剤には、安定剤としてスクロース及びゼラチン並びに溶剤として生理食塩水が含まれている³。（参照 1）

5. 開発の経緯

牛ウイルス性下痢（BVD: bovine viral diarrhea）は、フラビウイルス科ペスチウイルス属に分類される牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV: Bovine viral diarrhea virus）を原因とする家畜の監視伝染病（届出伝染病）である。牛、水牛、山羊、羊、豚、鹿等の偶蹄類に感染するが、牛の感受性が最も高い。BVDV はエンベロープを有するプラス 1 本鎖の RNA ウイルスで、細胞病原性 (CP) 株と非細胞病原性 (NCP) 株の 2 つの生物型があるほか、遺伝子型で 1 型 (BVDV-1)、2 型 (BVDV-2) に区別され、さらにいくつかの遺伝子亜型が存在する。非妊娠牛が BVDV に感染すると一過性の症状（発熱、下痢、鼻汁及び発咳）を呈することがあるが、免疫応答により回復し抗体を保有する。一方、妊娠牛に NCP 株が感染すると胎児への垂直感染が容易に成立し死流産や先天性異常（奇形）を生じ、胎齢 100 日前後の胎児への感染では免疫寛容によって持続感染 (PI: Persistent infection) 牛となって娩出されることがあり、PI 牛はウイルスを終生排泄し続けるため牛群における感染源となる。したがって、BVDV 感染予防及び PI 牛の産出リスク低減のためのワクチン

¹ 50% Tissue Culture Infectious Dose（50%組織培養細胞感染価）

² リン酸緩衝生理食塩水

³ 本製剤の添加剤については、「食品安全委員会の公開について」（平成 15 年 7 月 1 日内閣府食品安全委員会決定）に基づき、「企業の知的財産等が開示され、特定の者に不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがある」ことから、本評価書には具体的な物質名及びその分量を記載していない。

投与は、BVD の発生予防・まん延防止対策として重要であるとされている。(参照 2、3、4)

本製剤は、BVDV-1 及び BVDV-2 の病原性株を親株として、それぞれの非構造タンパク質をコードする *N^{pro}* 遺伝子の C 末端 164 アミノ酸及び構造タンパク質をコードする *E^{ns}* 遺伝子の 349 番目のヒスチジンを欠損させることによって弱毒化した遺伝子組換えウイルスからなる両遺伝子型 (BVDV-1 及び BVDV-2) を含有した BVD2 価生ワクチンである。現在、国内で市販されている BVDV 抗原を含む生ワクチンは、ワクチン株の胎児感染による流産や PI 牛産出に対する懸念により妊娠牛への投与は禁忌とされているが、本製剤は、妊娠牛に対しても投与が可能であり、BVD 対策において垂直感染及び PI 牛産出の防止に対する有効性が期待されている。また、本製剤は、海外において 2014 年に欧州で承認を取得し、2019 年に再審査期間が終了している。2015 年の上市以降、2020 年 7 月末時点の世界各国における累計販売量は 15,961,120 ドースとなっている。(参照 2)

今般、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から本製剤の製造販売承認申請がなされたことに伴い、農林水産大臣から本製剤の承認に係る食品健康影響評価が要請された。

II. 安全性に係る知見の概要

1. 人に対する安全性

(1) 主剤

主剤の製造用株 ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は、それぞれ病原性株である BVDV-1 KE-9 株⁴及び BVDV-2 NY-93 株⁵を親株として、それぞれの *Npro* 遺伝子の C 末端 164 アミノ酸及び *E_{gns}* 遺伝子の 349 番目のヒスチジンを欠損させた遺伝子組換えウイルス株である。*Npro* の遺伝子産物は非構造タンパク質で、C 末端側のタンパク質は I 型インターフェロン (IFN) の産生誘導を抑制する。*E_{gns}* の遺伝子産物はエンベロープを構成するタンパク質で、リボヌクレアーゼ活性を有し細胞外二本鎖 RNA の分解によって I 型 IFN 産生誘導を抑制し、ウイルス粒子の形成及び感染性に必須とされている。当該部位の欠損によりそれぞれのウイルス株は弱毒化され病原性を示さないことが確認されている。(参照 2)

各親株は取扱いに安定的な DNA としてプラスミドにクローニングして遺伝子操作⁶が行われた。製造用株の作製に当たっては、各親株の *Npro* 遺伝子の最初の 4 アミノ酸 (メチオニン、グルタミン酸、ロイシン及びフェニルアラニン) の配列を除く全ての欠損と *E_{gns}* 遺伝子の 349 番目コドン (ヒスチジン) の 3 塩基 (CAT) の欠損があるフラグメントをプラスミドの状態で置換し、その後、欠損部分を含むフラグメントに入れ替えた遺伝子組換えウイルスの全長を含むプラスミドを RNA に翻訳して MDBK 細胞 (牛腎株化細胞) にトランスフェクトし、得られたそれぞれの遺伝子組換えウイルスを継代して製造用マスターシードウイルス ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を得た。(参照 2、5)

前述のように ddBVD Tub1 株及び ddBVD Tub2 株の遺伝子改変は *Npro* 遺伝子の 5'末端の 4 コドンのみを残した全てと *E_{gns}* 遺伝子に位置するコドン 349 の 3 塩基の欠損のみであり弱毒化されて病原性を示さない一方、外来性遺伝子を一切含まず親株に新たな性質は付加されていないと考えられる。BVDV の宿主域は偶蹄類であり人に対して病原性はなく、BVD は食品安全委員会における過去の評価においても人獣共通感染症とみなされていない。(参照 5、6、7)

また、遺伝子組換えウイルスである ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株についてはカルタヘナ法に基づいた第一種使用規程の承認申請に係る審査において、一本鎖プラス RNA の増殖様式から核酸の一部又は全部が感染動物の細胞の染色体に組み込まれる可能性はないと考えられること、BVDV には有害な生理活性物質の生産性について報告はなく⁷、これら製造用株は目的の遺伝子領域の欠損による影響以外は BVDV の特性を受け継いでいることから、同じく有害物質の産生もないと考えられ、さらに遺伝子配列のデータベース⁸検索ではアレルギー物質に相同性の

⁴ ドイツ国内の BVDV スクリーニング検査で分離された 1b 亜型の野外株

⁵ 米国ニューヨーク州でアウトブレイクの際に分離された 2a 亜型の野外株

⁶ 使用されたベクター 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病原性や伝染性はない (参照 5)

⁷ 申請書記載内容並びに 2017 年以前の PubMed による文献検索結果

⁸ 申請書記載内容並びに内閣府食品安全委員会平成 15 年食品安全確保総合調査「タンパク質の

高い配列は確認されないことが示されている。(参照 5)

以上を踏まえると、主剤の製造用株である ddBVD Tub1 株及び ddBVD Tub2 株は、人に対する病原性はないと考えられた。

(2) 添加剤等

本製剤に使用されている添加剤のうち、安定剤及び溶剤の組成成分は、いずれも動物用ワクチンの添加剤として過去に食品安全委員会で評価されており、食品、食品から通常摂取される成分、食品添加物又は ADI の設定が不要とされている成分である。(参照 8)

したがって、本製剤に含まれている添加剤等については、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合の人への健康影響は無視できる程度と考えた。

2. 牛に対する安全性

(1) 安全性に関する試験

① 高用量反復注射安全性試験

牛（ホルスタイン種、68～84 日齢、11 頭/群）に、出荷時最大ワクチンウイルス量（ 10^6 TCID₅₀/ドース）の 10 倍量の被験薬を 14 日間間隔で 2 回、右側頸部に筋肉内投与する安全性試験が実施された。対照群には同用量のリン酸緩衝生理食塩水を投与した。群構成を表 1 に示した。

観察期間中、直腸温、臨床症状、注射局所反応（視診・触診）、ウイルス血症⁹、白血球数、血小板数、中和抗体価¹⁰について観察又は測定を行い、観察期間終了後（2 回目投与から 15 日後）に肉眼解剖検査を実施した。注射部位、咽喉頭リンパ節及び浅頸リンパ節については病理組織学的検査及びウイルス分離¹¹を実施した。

試験期間中、3 頭（陰性対照群 2 頭、被験薬群 1 頭）が死亡したが、被験薬投与との関連はないと判断された。直腸温、白血球数及び病理組織学的検査（注射部位、咽喉頭リンパ節及び浅頸リンパ節）において被験薬投与の影響はみられず、軽度の臨床症状（流涙及び鼻汁）及び注射部位局所反応（腫脹及び限局性の表面結節）の症状スコア又は発生頻度について対照群との有意差はみられなかった。血小板数は、被験薬群の 1 頭で血小板減少（ベースラインから 54%の減少）がみられたが、対照群及び被験薬群における血小板数の幾何平均は全ての測定時点で生理的な範囲であり群間の有意差はみられなかった。ウイルス血症は被験薬群の死亡個体を含む 3 頭が陽性を示したが、注射部位及び関連リンパ節のウイルス分離では死亡個体¹²を

アレルギー評価手法に関する調査報告」に示されたデータベース（IUIS, SWISS-PROT allergen index, CSL, FARPP, ALLALLERGY 及び SDAP）

⁹ 末梢血バフィーコートから BT（牛鼻甲介）細胞及び MDBK（牛腎由来）細胞で継代後、間接蛍光抗体法によりウイルス特異的蛍光を検出

¹⁰ 100 TCID₅₀ を中和した希釈倍率（5 倍以下は陰性とした。）

¹¹ 方法は注釈 9 と同様

¹² 脾臓、小脳、胸腺、パイエル板、骨髄及び腸間膜リンパ節についてもウイルス分離を実施

含む全ての試料で陰性であった。中和抗体は被験薬群の全ての個体で初回投与後 14 日及び 28 日に BVDV-1 及び BVDV-2 に対して抗体陽転が認められた。(参照 2、9)

以上のことから、被験薬投与に関連した有害事象は認められず、本製剤の投与による牛に対する安全性に問題はないと考えた。

表 1 高用量反復注射安全性試験（牛）の群構成及び処置

群	頭数	初回投与（0 日）		2 回目投与（14 日後）	
		注射力価（TCID ₅₀ ）	注射量	注射力価（TCID ₅₀ ）	注射量
被験薬群	11	ddBVD Tub 1 株：10 ^{7.24} ddBVD Tub 2 株 ^a ：10 ^{6.67}	4 mL	ddBVD Tub 1 株：10 ^{7.18} ddBVD Tub 2 株：10 ^{7.33}	4 mL
対照群	11	リン酸緩衝生理食塩水	4 mL	リン酸緩衝生理食塩水	4 mL

a：出荷時最大量の約 4.7 倍

② 高用量繁殖安全性試験

牛（ホルスタイン種、妊娠 42～72 日、11 頭/群）に、出荷時最大量（10⁶TCID₅₀/ドース）の 1.5～18 倍量の被験薬を妊娠 61～90 日の間に 1 回、頸部へ筋肉内投与する安全性試験が実施された。対照群にはリン酸緩衝生理食塩水を投与した。群構成を表 2 に示した。

観察期間中、直腸温、臨床症状、注射局所反応（視診・触診）、妊娠状態（流産の有無）、ウイルス血症¹³、白血球数、血小板数、中和抗体価¹⁴について観察又は測定を行い、投与後 62 日に供試動物を安楽死させ、胎児の脾臓、パイエル版、胸腺及び小脳を採取しウイルス分離¹⁵を実施した。

被験薬群 1 の 1 頭で投与後 48 日に流産がみられたが、当該母動物に発熱、ウイルス血症はみられず、流産胎児組織¹⁶及び胎盤からのウイルス分離は陰性であったことから、流産の原因は BVD ウイルス感染ではないと判断された。また、投与後 62 日に被験薬群 1 の 1 頭から回収された胎児の胸腺からウイルス¹⁷が検出されたが、本事象は人為的過誤によるコンタミネーション又は通常起こりえない胎児の一過性感染によるものであり、いずれの場合も当該胎児は持続感染牛ではなく、仮に出生した場合もワクチン株の排出はないと判断された。

観察期間中、直腸温は全ての供試動物で生理的範囲内であり、被験薬投与の影響はみられなかった。注射局所反応では、対照群及び被験薬群とも軽度の反応（腫脹又は表面結節）が、4～5 頭にみられたが、いずれも投与後 4 日以降は消失した。臨床症状では、結膜炎、鼻汁、口腔内潰瘍及び発咳がみられ、これらの発症頭数に関

¹³ 末梢血バフィーコートから BT（牛鼻甲介）細胞及び MDBK（牛腎由来）細胞で継代後、間接蛍光抗体法によりウイルス特異的蛍光を検出

¹⁴ 100 TCID₅₀ を中和した希釈倍率（3.5 倍以下は陰性とした。）

¹⁵ 方法は注釈 13 と同様

¹⁶ 脾臓、胸腺、パイエル板、小脳、骨髄、腹水、腸間膜リンパ節及び肺

¹⁷ RT-PCR により BVDV-1 ワクチン株であることが確認されている。

して対照群と各被験薬群との有意な差はみられなかった。被験薬群 2 の 1 頭は結膜充血、鼻汁（カタル性粘液）や単発性の発咳等の他の個体と異なる症状を呈し、ウイルス血症及び血小板数減少もみられたことから被験薬投与との関連を否定できなかった。血小板数減少は被験薬群 1 及び 2 でそれぞれ 2 頭及び 5 頭に、白血球数減少は被験薬群 1 及び 2 でいずれも 2 頭にみられ、被験薬投与と関連があると判断された。ウイルス血症は被験薬群 1 及び 2 でそれぞれ 3 頭 (27.3%) 及び 6 頭 (54.5%) が陽性を示した。BVDV-1 及び BVDV-2 に対する中和抗体は投与後 14 日から被験薬群の全ての個体で確認され、抗体価は投与後 60 日（最終採血日）まで増加した。肉眼解剖検査では、被験薬群 2 の胎児において皮下の点状出血が 1 頭に、頭蓋裂、頭蓋腔狭窄及び脳ヘルニアが別の 1 頭にみられたが、いずれの胎児組織からも BVD ウイルスは検出されなかったことから被験薬投与との関連は否定された。（参照 2、10）

以上から、被験薬投与による重度の臨床症状、流産及び持続感染牛の発生兆候はみられず、被験薬は妊娠牛に対して安全であると考えた。

表 2 高用量繁殖安全性試験（牛）の群構成及び処置

群	頭数	被験薬の注射力価（TCID ₅₀ ）		注 射 量
		ddBVD Tub1 株	ddBVD Tub2 株	
被験群 1	11	10 ^{6.61a}	10 ^{6.18b}	2 mL
被験群 2	11	10 ^{7.26}	10 ^{6.38c}	8 mL
対照群（リン酸緩衝生理食塩水投与）	11			8 mL

a：出荷時最大量の約 4.1 倍

b：出荷時最大量の約 1.5 倍

c：出荷時最大量の約 2.4 倍

（２）臨床試験

国内施設（10 か所）において、肉牛（黒毛和種）及び乳牛（ホルスタイン種）を用いて本製剤の野外臨床試験が実施された。3 か月齢以上の子牛、妊娠牛又は人工授精前の雌牛を治験対象として、被験薬群には本製剤 1 用量（ddBVD Tub 1 株 [10^{4.0}～10^{6.0} TCID₅₀] 及び ddBVD Tub 2 株 [10^{4.0}～10^{6.0} TCID₅₀]/2 mL）を、対照群には生理食塩水 2 mL を筋肉内投与した。群構成を表 3 に示した。

子牛は投与後 6 か月まで、人工授精前の雌牛は投与後 3 週以降に人工授精を行い妊娠鑑定まで、妊娠牛は分娩時まで観察した。妊娠牛の娩出子牛へのワクチン株の移行¹⁸及び先天異常の有無を調査し、胎児に対する安全性も評価対象とした。観察期間中の死亡個体は可能な限り死因を調査し、異常産胎児、先天異常個体及び持続感染牛については、安楽死後採取した脾臓、胸腺、パイエル板及び小脳の試料について遺伝子学的検査及びウイルス分離を行った。

¹⁸ イヤーノッチテスト（新生児への耳標取り付けの際、採取した耳介軟骨組織を試料として BVDV 特異的塩基配列を PCR で検出する。）を実施し、陽性の場合、3 週間後に採血し持続感染牛か否かを診断する（参照 2）

野外臨床試験における供試動物の安全性評価では、①被験群の臨床観察スコア・投与部位観察スコアにワクチンによる悪化がみられない、②被験群でワクチン株による持続感染牛が出生しない、及び③被験群の異常産胎児あるいは先天異常を有した新生児からワクチン株が分離されないとの基準を全て満たす場合、被験薬は安全であると判断された。

全ての供試牛で活力・食欲、体温、呼吸様式、発咳、鼻汁及び糞便性状に異常はみられず、投与部位の発赤、熱感、腫脹及び疼痛もみられなかった。妊娠牛の全ての新生児のイヤーノッチテストは陰性でワクチン株の持続感染牛の出生はなかった。被験群で5頭の妊娠牛に繁殖障害（死産）がみられたが、母牛の血液中及び異常産胎児からPCR検査によりBVDV特異的塩基配列は検出されずワクチン株は分離されなかった。また、先天性異常を有した新生児の娩出はなかった。（参照2、11）

以上から、本製剤の投与による3か月齢以上の子牛及び妊娠牛に対する臨床上の安全性に問題はないと考えた。

表3 野外臨床試験（牛）の群構成

	肉牛		乳牛		
治験対象	子牛（雌雄） ^a	妊娠牛	子牛（雌雄） ^a	妊娠牛	雌牛 ^b
被験群	5	9	5	56	13
対照群	5	9	5	57	12

a：3か月齢以上

b：人工授精前

3. 本遺伝子組換えウイルスの *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝学的安定性

マスターシードである ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株を *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の *N^{pro}* 及び *E^{ns}* 欠損部分はそのまま保存されていた。野外株との組換えによる欠損部位の補完は、BVDV を含むフラビウイルス科ペスチウイルス属のウイルスに特徴的な性質である重感染排除¹⁹により起こりえないと考えられる。製造用株と野外分離株間での遺伝子組換えは生じないことが確認されている。（参照2、5、）

4. その他の知見

本製剤の ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株のマスターシードウイルスの規格として、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、外来性ウイルス否定試験が実施されいづれも適合したことが確認されている。（参照2）

病原性復帰確認試験において、ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株のそれぞれ並びに ddBVD Tub 1 と ddBVD Tub 2 株の双方を混合したものについて、感受性動物の牛で継代を試みた結果、臨床所見に異常はみられず、ddBVD Tub 1 株は

¹⁹ Superinfection Exclusion：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止されるという性質（参照5）

3 代目以降、ddBVD Tub 2 株並びに ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株の双方を混合したものはいずれも 2 代目以降、継代材料（鼻汁スワブ及び末梢血バフィーコート）中のウイルス量が減少して継代不可となり、病原性復帰は否定された。（参照 2）

泌乳中の乳牛 19 頭に本製剤の出荷時最大ワクチンウイルス量（ $10^{6.0}$ TCID₅₀/2 mL）を投与し、乳汁中へのワクチン株の排泄を評価した結果、投与後 6～23 日に採取された乳汁中に低力価（2.2 TCID₅₀/mL～12.8 TCID₅₀/mL）のワクチン株の排泄が確認されたが、ワクチン株を含んだ乳汁を摂取した子牛において抗体陽転は認められず、本製剤の介乳汁感染は否定された。（参照 2）

雄牛（1～2 か月齢、10 頭）に 8.6 mL の混合ワクチン株（ddBVD Tub 1 株： 2.75×10^6 TCID₅₀/5 mL/頭及び ddBVD Tub 2 株： 2.75×10^6 TCID₅₀/3.6 mL/頭）を投与後、経時的にバフィーコート及び鼻汁スワブからウイルス分離²⁰を行うとともに、投与後 6、9、13、21 及び 30 日にそれぞれ 2 頭を剖検し採取した臓器・組織²¹からウイルス分離²²を行った結果、バフィーコートでは投与後 4 日に 1 頭のみが陽性を示し、鼻汁スワブは全ての検体で陰性であった。臓器・組織では主にリンパ系組織から検出され、投与後 6 日に 15 臓器（19 検体）で陽性を示したが、投与後 9 日では 3 臓器（4 検体）、投与後 13 日では 1 臓器 1 検体のみ陽性を示し、投与後 21 日以降は全ての臓器で陰性となったことから、本製造用株の体内での増殖は一過性で投与後 21 日には未検出となることが示された。（参照 2、12）

²⁰ 検体試料から BT（牛鼻甲介）細胞及び MDBK（牛腎由来）細胞で継代後、間接蛍光抗体法によりウイルス特異的蛍光を検出

²¹ 咽頭扁桃、顎下リンパ節、咽頭後リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板（空腸及び回腸）、腸管リンパ節（近位結腸）、大腿骨骨髓、胸腺、第一胃、第二胃（投与後 6 日のみ）、第四胃、鼻甲介、気管、肺（肺炎病変部）、及び口腔内びらん部（投与後 9 日のみ）

²² 注釈 20 と同様

III. 食品健康影響評価

本製剤の主剤の製造用株である ddBVD Tub 1 株及び ddBVD Tub 2 株は、それぞれ病原性株である BVDV-1 KE-9 株及び BVDV-2 NY-93 株を親株として、*N^{pro}* 遺伝子の最初の 4 アミノ酸（メチオニン、グルタミン酸、ロイシン及びフェニルアラニン）の配列を除く全てと *E^{ns}* 遺伝子の 349 番目コドン（ヒスチジン）の 3 塩基（CAT）を欠損させた遺伝子組換えウイルスである。

これらの製造用株は外来性遺伝子を一切含まず、目的の遺伝子領域の欠損による影響（弱毒化され病原性を示さない。）以外は BVDV の特性を受け継いでいると考えられるが、BVDV の宿主域は偶蹄類であり人に対する病原性はなく、BVD は人獣共通感染症とみなされていない。また、BVDV には有害な生理活性物質の生産性についての報告はなく、BVDV の特性を受け継いでいる製造用株においても同様に有害物質の産生はないと考えられる。さらに、遺伝子配列のデータベース検索でも、アレルギー物質に相同性の高い配列は確認されないことが示されている。

本遺伝子組換えウイルスは *in vitro* 及び *in vivo* での継代後において欠損部は安定であり、フラビウイルス科ペスチウイルス属である BVDV の特性である重感染排除の性質から、野外株との組換えによる欠損部位の補完は起こりえないと考えられる。事実、製造用株と野外分離株間での遺伝子の組み換えは生じないことが確認されている。また、製造用株の牛を用いた継代試験においても、病原性復帰の可能性は否定されている。したがって、本遺伝子組換えウイルスは遺伝学的に安定であると考えられる。

以上を踏まえると、本製剤の主剤の製造用株である ddBVD Tub1 株及び ddBVD Tub2 株には人に対する病原性はないと考えられた。

本製剤に使用されている添加剤等は、その使用状況、既存の毒性評価及び本製剤の用法・用量を考慮すると、本製剤の含有成分として摂取した場合の人への健康影響は無視できる程度と考えられた。

本製剤の牛における安全性試験及び臨床試験では、本製剤に起因すると考えられる有害事象はみられず、妊娠牛を含む 3 か月齢以上の牛において安全性に問題がないことが示されている。

以上のことから、本製剤が適切に使用される限りにおいては、食品を通じて人の健康に影響を与える可能性は無視できる程度と考えた。

<別紙：検査値等略称>

略称等	名称
ADI	Acceptable Daily Intake：許容一日摂取量
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid：相補的デオキシリボ核酸
PCR	Polymerase Chain Reaction：ポリメラーゼ連鎖反応
RNA	Ribonucleic acid：リボ核酸
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction：逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

<参照>

1. 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. 動物用医薬品製造販売承認申請書：ボベラ（非公表）
2. 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. 動物用医薬品製造販売承認申請書：ボベラ 概要書：（非公表）
3. 動衛研：家畜の監視伝染病 届出伝染病：牛ウイルス性下痢
https://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_fact/t06.html
4. 牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策ガイドライン 農林水産省消費・安全局動物衛生課長通知 平成28年4月28日28消安第734号
5. 遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の承認申請に係る審査報告書 *N^{pro}* 及び *E^{rns}* 遺伝子欠損牛ウイルス1型 ddBVD Tub 1 株ならびに *N^{pro}* 及び *E^{rns}* 遺伝子欠損牛ウイルス性下痢ウイルス2型 ddBVD Tub 2 株 (BOVELA). 農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課 平成30年11月15日
6. Chapter 3.4.7. Bovine viral diarrhoea, OIE Terrestrial Manual 2018
7. 食品安全委員会 食品健康影響評価の結果の通知について 府食第371号 平成25年5月13日 別添 動物医薬品評価書 牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢・粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン（“京都微研,,カーフウィン6）
8. 食品安全委員会 動物用ワクチンの添加剤の食品健康影響評価結果 平成30年10月30日現在
9. 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. 動物用医薬品製造販売承認申請書：ボベラ 添付資料9-1（非公表）
10. 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. 動物用医薬品製造販売承認申請書：ボベラ 添付資料9-2（非公表）
11. 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. 動物用医薬品製造販売承認申請書：ボベラ 添付資料14-1（非公表）
12. 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. 動物用医薬品製造販売承認申請書：ボベラ 添付資料2-1-3（非公表）