

(案)

動物用医薬品評価書

馬鼻肺炎生ワクチン
(エクエヌテクト ERP)

2013年2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及び専門参考人名簿	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	5
1. ヒトに対する安全性	5
(1) 主剤について	5
(2) 添加剤について	6
2. 馬に対する安全性	6
(1) 馬における安全性試験	6
(2) 馬における臨床試験	7
3. その他	8
III. 食品健康影響評価	8
・別紙：検査値等略称	9
・参照	9

〈審議の経緯〉

- 2012年 10月 11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（24消安第3309号）、厚生労働大臣から残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安1009第3号）、関係資料の接受
- 2012年 10月 15日 第449回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2012年 11月 8日 第145回動物用医薬品専門調査会
- 2012年 12月 13日 第146回動物用医薬品専門調査会
- 2013年 2月 18日 第463回食品安全委員会（報告）

〈食品安全委員会委員名簿〉

（2012年7月1日から）

熊谷 進 （委員長）
佐藤 洋 （委員長代理）
山添 康 （委員長代理）
三森 国敏（委員長代理）
石井 克枝
上安平 冽子
村田 容常

〈食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員及び専門参考人名簿〉

（2012年7月1日から） （専門参考人）

山手 丈至 （座長*） 澤田 純一
小川 久美子（座長代理*）
石川 さと子 舞田 正志
石川 整 松尾 三郎
寺本 昭二 山口 成夫
天間 恭介 山崎 浩史
頭金 正博 吉田 敏則**
能美 健彦 渡邊 敏明
福所 秋雄

*: 2012年8月22日から

**： 2012年10月1日から

要 約

馬鼻肺炎生ワクチン（エクエヌテクト ERP）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は、馬ヘルペスウイルス 1 の野外分離株の *gE* 糖タンパク質遺伝子（以下「*gE* 遺伝子」という。）を欠損型 *gE* 遺伝子に置き換えられて作出された馬ヘルペスウイルス 1 の *gE* 遺伝子欠損株（以下「 ΔgE 株」という。）であるが、馬ヘルペスウイルス 1 の実験室継代による自然発生的な *gE* 遺伝子欠損が報告されていることから、 ΔgE 株は、自然界に存在する欠損型ウイルス株と同等に病原性が減弱しており、製造用株において病原性に関する *gE* 遺伝子を欠損型に置き換えることに起因する安全上の新たな懸念は生じないものと考えられた。また、馬ヘルペスウイルス 1 は馬属のみに感染するウイルスとして知られており、ヒトへの感染は報告されていないことから、馬鼻肺炎は人獣共通感染症ではないと考えられる。以上のことから、馬ヘルペスウイルス 1 はヒトに対する病原性はないと考えられる。さらに、製造用株の再活性化及び病原性復帰は起こらないこと並びに性状は安定であることが確認されている。

本製剤に使用されている添加剤については、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ヒトへの健康影響は無視できると考えられる。

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、食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できると考えられる。

I. 評価対象動物用医薬品の概要

1. 主剤 (参照 1)

主剤は馬胎子皮膚由来細胞 (EFD-C₁ 細胞)¹培養馬ヘルペスウイルス 1²ΔgE-NIBS 株³である。本製剤 1 バイアル (1 頭分) 中に当該ウイルス株が 10^{4.5} TCID₅₀以上含まれている。

2. 効能・効果 (参照 1)

効能・効果は、馬ヘルペスウイルス 1²感染による呼吸器疾病の症状の軽減である。

3. 用法・用量 (参照 1)

本製剤の小分製品に添付の溶解用液⁴を加えて溶解し、その 2 mL ずつを 3 週間隔で 2 回、6 か月齢以上の馬の筋肉内に注射する。

4. 添加剤等 (参照 1)

本製剤 (乾燥ワクチン) 1 バイアル (1 頭分) 中に、安定剤として乳糖 (20 mg)、ポリペプトン (10 mg) 及びポリビニルピロリドン (以下「PVP」という。0.6 mg) が含まれている。

5. 開発の経緯 (参照 2~10)

馬鼻肺炎 (equine rhinopneumonitis) は、馬ヘルペスウイルス 1 (以下「EHV-1」という。) 及び馬ヘルペスウイルス 4 の感染によって引き起こされる馬の疾病である。子馬の初感染では鼻肺炎、妊娠馬では流産を起し、EHV-1 の感染では神経症状を示すことがある。(参照 2~4)

現在日本では流産及び呼吸器疾病予防を目的として、EHV-1 の組織培養馴化ウイルス HH-1 BKS 株を用いて製造された馬鼻肺炎 (アジュバント加) 不活化ワクチンが使用されている。不活化ワクチンによる抗体は比較的早く低下するため、ワクチン投与馬の一部にも馬鼻肺炎が発症しているのが実情である。一般的に、生ワクチンは不活化ワクチンと比較して、接種された動物に細胞性免疫を効率よく誘導し、免疫効果の持続性も期待できると考えられている。アジュバントを含まない生ワクチンでは、生産コストの削減や安全性の確保も期待される。(参照 2、3)

ヘルペスウイルスの gE 糖タンパク質遺伝子 (以下「gE 遺伝子」という。) は病原性に関与しているといわれており、gE 遺伝子欠損株は病原性が減弱している一方で免疫原性を保持していることが報告されている。そこで、野外分離株 (89c25p 株。以下「親

¹ 健康な馬胎子の皮膚由来細胞 (EFD 細胞) で、継代 90 代以降の増殖性の安定した細胞集団

² 承認申請書 (参照 1) では、「馬ヘルペスウイルス 1 型」と記載されているが、本評価書案では現在用いられている分類で表記した。

³ 野外分離株 (89c25p 株) を親株とし、その gE 遺伝子を欠損させた変異株である。

⁴ 溶解用液 (2 mL、1 頭分) 中に塩化ナトリウム (16 mg)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (0.86 mg)、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 (5.2 mg)、フェノールレッド (0.02 mg) 及び精製水 (残量) が含まれている。

株」という。) のゲノム上にある *gE* 遺伝子を相同組換え法により欠損型 *gE* 遺伝子に置き換えることによって EHV-1 *gE* 遺伝子欠損株 (以下「 ΔgE 株」という。) がワクチン株として作出された (ナチュラルオカレンス⁵に該当)。(参照 2、4~6)

本株は、EHV-1 に対する中和抗体陰性の初乳非摂取子馬や EHV-1 に対する補体結合抗体陰性の 1 歳馬の鼻腔内に接種しても、発熱、呼吸器症状等の臨床異常を示さず、ウイルス血症やウイルス排泄がほとんど認められないことから、親株と比較しても馬体内での増殖性は非常に低下しており、馬に対する病原性が減弱していることが確認された。また、筋肉内接種でも、臨床症状、鼻腔内へのウイルス排出及びウイルス血症は認められず、馬における安全性が確認された。一方、本株の筋肉内接種により血中中和抗体の有意な上昇が認められ、さらに、親株で攻撃すると発熱、呼吸器症状等の臨床症状、ウイルス排泄、ウイルス血症等が緩和されたことから本株の馬における免疫原性が確認された。これらのことから、呼吸器疾病に良好な発症抑制又は軽減効果を有するとともに、若齢馬に対しても安全な馬鼻肺炎生ワクチンとして、本製剤が開発された。(参照 2、3、7)

海外では、EHV-1 の弱毒生ワクチンが製造販売されている。(参照 2、3、8、9)

II. 安全性に係る知見の概要

1. ヒトに対する安全性

(1) 主剤について (参照 2、3、10~13)

主剤の製造用株は、1989 年に馬鼻肺炎ウイルスによる呼吸器疾患の症状を呈した競走馬から分離、クローニングされた親株のゲノム上にある *gE* 遺伝子を相同組換え法により欠損型 *gE* 遺伝子に置き換えて作出した ΔgE 株を EFD 細胞で継代馴化して ΔgE -NIBS 株とした後、EFD-C₁ 細胞で 1 代継代されたものを原株としたものである。

まず、親株のゲノム断片 (*Sma* I/*Bam* H I) をプラスミドベクター pUC19 にクローニングし、プラスミド (p*Sma*-*Bam*) の *gE* 遺伝子の一部を欠損させ、さらに、*lacZ* 発現カセットを挿入してプラスミド (p ΔgE -*lacZ*) を作製した。これをトランスファーベクターとして親株を感染させた初代馬胎子腎細胞 (FHK 細胞) にエレクトロポレーション⁶法により導入すると、相同組換えが起こり、ウイルスゲノムの *gE* 遺伝子領域が p ΔgE -*lacZ* の DNA 断片と置き換わり、ゲノム上に *lacZ* 発現カセットを持つウイルスが作製される。これを X-gal 存在下で青色に発色するブラックとして単離し ΔgE -*lacZ* 株とした。次に p*Sma*-*Bam* から、*gE* 遺伝子の一部を欠損させたプラスミド (p ΔgE) を作製し、 ΔgE -*lacZ* 株を感染させた細胞内にエレクトロポレーション法により導入すると、再び相同組換えが起こり、 ΔgE -*lacZ* 株の *gE* 遺伝子領域が p ΔgE の *gE* 遺伝子欠損 DNA 断片と置き換わり、EHV-1 (ΔgE 株) が生成される。これを X-gal 存在下で青

⁵ 自然条件で核酸を交換することが知られているウイルスの核酸のみを用いて加工する技術。用いる遺伝子組換え技術がナチュラルオカレンスに相当する場合、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 (平成 15 年法律第 97 号) の規制対象外となる。(参照 5)

⁶ 細胞を DNA 溶液中に懸濁して直流高電圧のパルスをかけると、細胞内に DNA が導入されることを利用した遺伝子導入法の一つ。加電によって細胞膜に穴があき、同時に DNA 分子が電気泳動の作用で細胞内に導入されると考えられている。(参照 10)

色に発色しないブラックとして単離し EFD-C₁ 細胞で継代馴化したものを製造用株とした。

作出の際に挿入された *lacZ* 発現カセットは脱落しており、 ΔgE 株の *gE* 遺伝子欠損部位には、ベクタープラスミドとして用いられたプラスミドの DNA に由来する塩基配列は認められず、製造用株の塩基配列は全て親株由来である。また、EHV-1 株の実験室継代による自然発生的な *gE* 遺伝子欠損が報告（参照 11）されていることから、 ΔgE 株は、自然界に存在する欠損型ウイルス株と同等に病原性が減弱しており、製造用株において病原性に関する *gE* 遺伝子を欠損型に置き換えることに起因する安全性上の新たな懸念は生じないものと考えられた。（参照 2、7、10～12）

また、EHV-1 は、馬属のみに感染するウイルスとして知られており、ヒトへの感染は報告されていないことから、馬鼻肺炎は人獣共通感染症ではないと考えられる。（参照 2、3、13）以上のことから、EHV-1 はヒトに対する病原性はないと考えられる。

（2）添加剤について（参照 14～20）

本製剤の乾燥ワクチンに安定剤として使用されている乳糖及びポリペプトンは、それぞれ牛乳由来の糖及びアミノ酸である。（参照 14～17）PVP⁷については、医薬品添加物として使用されているほか、海外では食品添加物として使用されている。（参照 1、18～20）本製剤の溶解用液の成分である塩化ナトリウムは食品・調味料として通常摂取され、リン酸二水素ナトリウム二水和物及びリン酸水素二ナトリウム・十二水和物は食品添加物として、フェノールレッドは医薬品（腎機能検査薬）等として使用されている。（参照 14、15、17、23～25）これらの乾燥ワクチンの安定剤及び溶解用液の成分は、いずれも動物用医薬品の添加剤として過去に食品安全委員会で評価されている。（参照 15～17、23）

以上のことから、本製剤に含まれている添加剤は、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ヒトへの健康影響は無視できると考えられる。

2. 馬に対する安全性

（1）馬における安全性試験（参照 2、26）

馬（ポニー種、6 か月齢、3 頭/群）を用いて、本製剤の試作ワクチンを 3 週間隔で 2 回、8 週間後に 1 回の計 3 回筋肉内接種（常用量⁸及び 100 倍量⁹、対照群には生理食塩水を投与）し、本製剤の安全性試験が実施された。

⁷ PVP の不純物として含有されるヒドラジンは、成分及び分量に基づく本製剤の PVP の含有量及び PVP におけるヒドラジンの規格値（1 ppm 以下）から算出すると、本製剤での含有量は馬 1 頭当たり 0.6 ng 以下と非常に微量であることが確認されている。また、ヒドラジンは、投与された動物の体内で速やかに代謝され消失することが知られている。（参照 1、21、22）これらのことから、本製剤におけるヒトへのヒドラジンの暴露は無視できると考えられる。

⁸ 常用量: 5 頭分入り 1 バイアルの生ワクチンを 1 バイアルの溶解用液 10 mL に溶解し 1 頭当たり 2 mL を 1 か所に接種した。

⁹ 100 倍量: 20 バイアルの生ワクチンを 5 バイアルの溶解用液 50 mL に溶解して内容を均一にし、1 頭当たり 50 mL を 4 分割して 4 か所に接種した。

その結果、臨床症状及び接種部位では、常用量群において接種に起因する変化はみられなかった。100 倍量群では、第 1 回及び第 2 回接種後に元気消失及び第 2 回の接種部位の腫脹がみられたが、いずれも接種 2 日後には消失した。

体温は、常用量群において、第 1 回接種翌日に上昇したが接種 2 日後には回復した。100 倍量群においては、各回の接種翌日に発熱がみられた。しかし、常用量群と同様に接種 2 日後には回復し、いずれも一過性の反応であった。

そのほか、各時点の体重、体重増加量、摂餌量、血液学的検査所見及び血液生化学的検査所見に変化はみられず、観察期間（第 1 回接種から第 3 回接種 3 週間後までの 14 週間）終了後の剖検、臓器重量及び接種部位の病理組織学的検査において接種に関連すると思われる変化はみられなかった。

(2) 馬における臨床試験（参照 2、27）

3 施設において、計 129 頭（65 頭/被験薬群、64 頭/対照群）の馬を用いて本製剤の試作ワクチン（*ΔgE* 株を主成分とする被験薬）の臨床試験が実施された。対照群には既承認の馬鼻肺炎（アジュバント加）不活化ワクチン（以下「既承認不活化ワクチン」という。）又は生理食塩液が用いられた。被験動物として、本製剤の安全性の評価に重大な影響を及ぼす可能性のある合併症のあるもの、発熱（3 歳未満では 39.0 °C 以上、3 歳以上では 38.5 °C 以上）又は鼻汁等の呼吸器症状が認められるもの及び病歴等の情報が不十分であるものは除外した。

試験群の設定を表 1 に示した。3 歳未満の馬では、被験薬群には本製剤の試作ワクチンの 1 用量（2 mL）を 3 週間隔で 2 回頸部筋肉内に接種し、対照群には生理食塩液 2 mL を 3 週間隔で 2 回頸部筋肉内に投与した。3 歳以上の馬では、被験薬群には本製剤の試作ワクチンの 1 用量（2 mL）を 3 週間隔で 2 回、対照群には既承認不活化ワクチンの 1 用量（5 mL）を 4 週間隔で 2 回、それぞれ頸部筋肉内に接種した。

表 1 馬の臨床試験における試験群の設定（頭）

施設	被験薬群	対照群	
	試作ワクチン *	既承認不活化ワクチン **	生理食塩液 #
施設 1（3 歳未満）	11	0	11
施設 2（3 歳以上）	27	27 ^{##}	0
施設 3（3 歳以上）	27	26	0
合計	65	53	11
		64	

*: 1 用量（2 mL）を 3 週間隔で 2 回、頸部筋肉内に接種した。

**：1 用量（5 mL）を 4 週間隔で 2 回、頸部筋肉内に接種した。

#：2 mL を 3 週間隔で 2 回、頸部筋肉内に投与した。

##：このうち 1 頭は初回投与時に暴れたため、投与できず解析から除外された。

その結果、施設 2 の被験薬群の 1 例及び対照群（既承認不活化ワクチン）の 2 例で一過性の発熱（発熱期間は 1 日）が初回接種後のみにみられた以外、全ての群で接種によ

ると考えられる臨床異常は認められなかった。被験薬群では、試作ワクチン接種部位の異常も認められなかったことから、本製剤の接種における馬の安全性に問題はないものと考えられた。

3. その他（参照 1、2、7）

本製剤では、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、迷入ウイルス否定試験等が規格として設定され、それぞれの試験が実施され問題のないことが確認されている。さらに、これらの試験は製造方法にも規定されている。（参照 1）

本製剤の主剤（製造用株）について、病原性復帰及び性状の安定性が調べられている。病原性については、再活性化否定試験及び病原性復帰否定試験が実施され、主剤（製造用株）は馬体内で潜伏感染し、再活性化する可能性は低く、病原性復帰の可能性はほとんどないと判断された。（参照 2、7）

Ⅲ. 食品健康影響評価

上記のように、主剤の製造用株は、親株の *gE* 遺伝子を欠損型 *gE* 遺伝子に置き換えられて作出されたものであるが、EHV-1 株の実験室継代による自然発生的な *gE* 遺伝子欠損が報告されていることから、 ΔgE 株は、自然界に存在する欠損型ウイルス株と同等に病原性が減弱しており、製造用株において病原性に関する *gE* 遺伝子を欠損型に置き換えることに起因する安全上の新たな懸念は生じないものと考えられた。また、EHV-1 は馬属のみに感染するウイルスとして知られており、ヒトへの感染は報告されていないことから、馬鼻肺炎は人獣共通感染症ではないと考えられる。以上のことから、EHV-1 はヒトに対する病原性はないと考えられる。さらに、製造用株の再活性化及び病原性復帰は起こらないこと並びに性状は安定であることが確認されている。

本製剤の安定剤として使用されている添加剤については、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ヒトへの健康影響は無視できると考えられる。

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、食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できると考えられる。

〈別紙：検査値等略称〉

略称等	名称
EFD-C ₁ 細胞	馬胎子皮膚由来株化細胞
EFD 細胞	馬胎子皮膚由来細胞
FHK 細胞	初代馬胎子腎細胞
TCID ₅₀	50%組織培養感染量

〈参照〉

1. 日生研株式会社. 動物用医薬品製造販売承認申請書 エクエヌテクト ERP (未公表)
2. 日生研株式会社. 動物用医薬品製造販売承認申請書 エクエヌテクト ERP 添付資料概要 (未公表)
3. 日生研株式会社. 動物用医薬品製造販売承認申請書 エクエヌテクト ERP 添付資料 1 起源又は発見の経緯 (未公表)
4. 桐澤力雄. “馬鼻肺炎”, 動物の感染症. 明石博臣, 大橋和彦, 小沼操, 菊池直哉, 後藤義孝, 高井伸二, 宝達勉編. 第三版, 近代出版, 2011 年, p.160
5. 環境省 HP: 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の解説. 平成 19 年 4 月 1 日修正
http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/070401law_manual_ver5.pdf
6. 農林水産省消費・安全局. 「セルフクローニング及びナチュラルオカレンスに該当すると判断された大腸菌株、ウイルス株について」(平成 19 年 2 月 1 日)
7. 日生研株式会社. 動物用医薬品製造販売承認申請書 エクエヌテクト ERP 添付資料 2 物理的、化学的試験に関する資料 (未公表)
8. USDA: Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy: Mitigation Experiences, Lessons Learned, and Future Needs. 2008
9. Rosas CT, Goodman LB, von Einem J, Osterrieder N: Equine herpesvirus type 1 modified live virus vaccines: quo vaditis? Expert review of vaccines, 2006 Feb; 5(1): 119-31
10. 岩波生物学辞典. 第 4 版, 株式会社岩波書店. 1996 年 (電気穿孔法)
11. Flowers CC, O'Callaghan DJ: The Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Homolog of Herpes Simplex Virus Type 1 US9 and the Nature of a Major Deletion within the Unique Short Segment of the EHV-1 KyA Strain Genome. Virology, 1992; 190: 307-315
12. ML Perdue, MC Kemp, CC Randall, DJ O'callaghan: Studies of the Molecular Anatomy of the L-M Cell Strain of Equine Herpes Virus Type 1: Proteins of the Nucleocapsid and Intact Virion. Virology, 1974; 59: 201-216
13. 今川浩. “馬鼻肺炎”, 獣医感染症カラーアトラス, 見上彪監修. 第 2 版, 文永堂出版株式会社. 2006 年, p.315
14. 丸善食品総合辞典. 五十嵐脩, 小林彰夫, 田村真八郎編. 丸善株式会社. 1998 年

15. 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」(平成 17 年 2 月 10 日付府食第 146 号): (別添 1) 牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢-粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン(日生研牛呼吸器病 4 種混合生ワクチン)の再審査に係る食品健康影響評価について, 2005 年
16. 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」(平成 20 年 6 月 5 日付府食第 622 号): 動物用医薬品評価書 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症(G210 株)生ワクチン(“京都微研”ポールセーバーMG)の再審査に係る食品健康影響評価について, 2008 年
17. 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」(平成 20 年 6 月 5 日付府食第 621 号): 動物用医薬品評価書 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症(6/85 株)生ワクチン(ノビリス MG 6/85)の再審査に係る食品健康影響評価について, 2008 年
18. 厚生労働省. 第 16 改正日本薬局方. 2011 年
19. 医薬品添付文書. “L-グルタミン顆粒「ヒシヤマ」”, 2007 年 7 月改訂(第 4 版)
20. JECFA: “POLYVINYLPIRROLIDONE”. Toxicological evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series, No. 15, 1980
21. JECFA: “Carbadox”. Residues of some veterinary drugs in foods and animals. FAO Food Nutrition Paper 41/15, 2003
22. JECFA: “Carbadox”. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series, No. 27, 1991
23. 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」(平成 22 年 7 月 15 日付府食第 541 号): 動物用医薬品評価書 牛クロストリジウム感染症 5 種混合(アジュバント加)トキシイド(“京都微研”キャトルウィン-CI 5)の再審査に係る食品健康影響評価について, 2010 年
24. 医薬品添付文書: フェノールスルホンフタレイン注 0.6%「第一三共」. 2009 年 9 月改訂
25. 医薬品添付文書: 乾燥弱毒生風疹ワクチン「タケダ」. 2012 年 4 月改訂
26. 日生研株式会社. 動物用医薬品製造販売承認申請書 エクエヌテクト ERP 添付資料 9 安全性に関する資料(未公表)
27. 日生研株式会社. 動物用医薬品製造販売承認申請書 エクエヌテクト ERP 添付資料 14 臨床試験に関する資料(未公表)