

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ワクチン(“京都微研”キャトルウイン 6)の食品健康影響評価について(案)

## 1. 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ワクチンについて

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ワクチン(以下キャトルウイン 6)は、それぞれ弱毒化された牛ヘルペスウイルス(BHV-1)、牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス(BPIV-3)、牛RSウイルス(BRSV)、牛アデノウイルス7(BAdV-7)の4種の乾燥生ワクチンと、紫外線で不活化した牛ウイルス性下痢ウイルス1及び2(BVDV-1, BVDV-2)を混合した、6種混合ワクチンである<sup>(1)</sup>。

BHV-1は豚精巣培養細胞、BPIV-3は鶏胚培養細胞、BRSVはハムスター肺由来培養細胞をそれぞれ用いた継代培養により弱毒化され、限界希釈法によるクローニングにより純化されている。BAdV-7は牛腎培養細胞を用いて継代培養し限界希釈法によりクローニングしたものをさらに山羊精巣培養細胞を用いて継代培養し弱毒化されている。また、BVDVは紫外線照射により不活化されている。キャトルウイン 6は弱毒化された生ウイルス株を乾燥させたものを、不活化されたBVDV培養液を限外濾過で濃縮したもので溶解後、筋肉中に注射して使用される。これらのウイルス株は全て過去に国内で分離されたものに由来している<sup>(1)</sup>。

なお、本ワクチンと同じウイルス株のBHV-1、BPIV-3、BRSV、BAdV-7とウイルス株が異なる弱毒BVDVを混合した5種混合生ワクチンがすでに我が国で承認され市販されている<sup>(2)</sup>。

なお、本生物学的製剤にはアジュバントは添加されていない。

## 2. ワクチンの対象疾病について

### 牛伝染性鼻気管炎(infectious bovine rhinotracheitis)について<sup>(3,4,5)</sup>

原因ウイルスは牛伝染性鼻気管炎ウイルス(infectious bovine rhinotracheitis virus ;IBRV)と通称される牛ヘルペスウイルス 1(bovine herpesvirus 1 ;BHV-1)の感染によって起こる伝染病である。ヘルペスウイルスは全ての脊椎動物や、昆虫からも分離され、糖蛋白質と脂質のエンベロープ<sup>a</sup>、テグメント<sup>b</sup>、 capsid<sup>c</sup>を持ち、直鎖2本鎖DNAをゲノムに有する。BHV-1はアルファヘルペスウイルス亜科に属し、感染によって高熱、元気消失、食欲不振、流涙、流涎等を示し、妊娠牛では流産が見られることがある。病態は呼吸器型その他、生殖器型等多様にわたり、上部気道に感染した場合本病となるが、外陰腔部に感染すれば牛伝染性膿疱性外陰腔炎となる。ヘルペスウイルスの特徴として潜伏感染を起こすので清浄化は非常に困難であるとされる。日本でも全国的に発生が見られ、届出伝染病に指定されている。

### 牛ウイルス性下痢 - 粘膜病(bovine viral diarrhea-mucosal disease)について<sup>(3,4,5)</sup>

原因ウイルスは牛ウイルス性下痢ウイルス(bovine viral diarrhea virus ; BVDV)である。ペストウイルス属に属し、同属に豚コレラウイルスがある。糖蛋白質から成るエンベロープと capsid<sup>c</sup>を持ち、プラス1本鎖RNAをゲノムに有する。細胞変性効果(CPE)を示すウイルスと示さない(NCPE)ウイルスの存在が知られている。感染によって軽度の発熱や下痢等の症状を示すこ

<sup>a</sup> ウイルス粒子の最も外側に存在する構造。脂質二重膜でウイルスに特異的な蛋白質がその上に存在している。エンベロープのないウイルスもある。

<sup>b</sup> エンベロープと capsid<sup>c</sup>の間に存在する構造をいう。

<sup>c</sup> ウイルスゲノムを包み保護している蛋白質の殻。

ともあるが不顕感染で終わることが多い。感染牛からは NCPE ウイルスが検出される。一方、妊娠牛に感染すると妊娠の時期によって胎児奇形や流産を起こすことがあり、中には免疫寛容<sup>d</sup>となった牛が出産される場合がある。免疫寛容となった牛はウイルスを保持し、継続的に排泄することからウイルスの伝播に重要視されており、粘膜病の発生リスク群としても知られている。粘膜病は6ヶ月~2歳の牛でよく発生し、致死性である。粘膜病感染牛からは CPE ウィルスも分離される。1990年頃、北米で流行した出血性で、致死性の高い疾病の原因ウイルスとして同定された BVDV は従前のウイルスと血清学、遺伝学的に異なっていたことから BVDV-2 と呼ばれている。日本では全国的に分布しており、届出伝染病に指定されている。

#### 牛パラインフルエンザ(bovine parainfluenza)について<sup>(6.4.5)</sup>

原因ウイルスは牛パラインフルエンザウイルス3(bovine parainfluenza virus 3 ;BPIV-3)である。パラミクソウイルス科のレスピロウイルス属に属し、ヒトパラインフルエンザウイルス1及び3は同属である。赤血球凝集活性及びノイラミニダーゼ活性を有する(HN)蛋白質と膜融合(F)蛋白質を有するエンベロープを持ち、マイナス1本鎖RNAをゲノムに有する。感染によって発熱、発咳、鼻汁等の呼吸器症状を示すが、多くは軽症である。通常、BRSV、BAV、BHV-1、BVDV 等との混合感染が多く、さらに細菌等の二次感染により重症化する場合もある。長距離輸送等が誘引となることから輸送熱とも呼ばれる。日本では全国的に年間を通して発生が見られる。

#### 牛RSウイルス感染症(bovine respiratory syncytial virus infection)について<sup>(6.4.5)</sup>

原因ウイルスは牛RSウイルス(bovine respiratory syncytial virus ;BRSV)である。パラミクソウイルス科のニューモウイルス属に属し、ヒトRSウイルスと抗原的に関連がある。レスピロウイルス属と異なり、エンベロープを構成する糖蛋白質にパラインフルエンザウイルスと同様にF蛋白質を持つが、HN 蛋白質に相当するものとしては、赤血球凝集やノイラミニダーゼ活性のないG蛋白質を持ち、ゲノムはマイナス1本鎖RNAである。感染によって発熱、発咳、鼻汁等の呼吸器症状を示す。通常、BPIV や BAV 等との混合感染が多く、細菌等の二次感染を受けることもある。日本では年間を通して散発的に発生が見られる。

#### 牛アデノウイルス7 感染症(bovine adenovirus infection)について<sup>(6.4.5)</sup>

原因ウイルスは牛アデノウイルス(bovine adenovirus 7 ;BAV-7)である。11の型に分類されており、アデノウイルス科のマストアデノウイルス属に属するが、一部(4-8型)をアトアデノウイルス属に分類することも提唱されている。正20面体粒子でエンベロープはなく、キャプシドは252個のキャプソメア<sup>e</sup>から成る。ゲノムは直鎖状2本鎖DNAである。感染によって、症状や程度は型によって多少異なるが、発熱、発咳、鼻漏、下痢等の呼吸器症状、消化器症状のいずれかまたは合併症を呈する。日本で分離された7型(袋井株)は最も強い症状を示す。アデノウイルスの特徴として、症状が消失しても長期間にわたって糞便中にウイルスが排泄され感染源となる。我が国では全国的に年間を通して発生している。

### 3. キャトルウィン 6 の安全性に関する知見等について

#### (1) ヒトに対する安全性について

本生物学的製剤について、ヒトに対する直接的な病原性等の検討は行われていない。

本生物学的製剤は弱毒生ワクチンと不活化ワクチンの混合ワクチンであり、生ワクチンは牛に対して感染力を有している。しかしながら、いずれのウイルスについても人獣共通感染症と

<sup>d</sup> 免疫系が、ある生体を攻撃しない状態。この場合BVDVを攻撃しなくなった状態となった牛。

<sup>e</sup> キャプシドのサブユニットが複数個重合した単位構造を称する。

する報告はない。なお、各ウイルスのヒトへの影響に関しては、次のような知見が得られている。

### BHV-1

牛が自然宿主であるが、生殖器炎を呈したブタ、ブタの死産胎児、呼吸器症状を呈したヤギ、消化器症状を呈したミンクなどからもウイルスの分離例がある。また、ブタ、ヒツジ、ヤギ、シカ等から抗体が検出されたとする報告がある。一方、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ、サル、モルモット、ラット、マウス、鶏胚での感染試験は不成功であったとする報告がある<sup>(6)</sup>。なお、OIE ではヒトに対する病原性はないとしている<sup>(7)</sup>。

ヒトヘルペスウイルス1(HSV-1)と BHV-1 にはいくつかの違いが認められている。ヘルペスウイルスの細胞への侵入にはウイルス側の Glycoprotein D(gD)と細胞側の受容体が必要とされており、ヒト細胞の受容体としては HveA、HveB、HveC が同定されている。BHV-1 は HveC に結合することが確認されたが、これは HSV と比較して弱いものであったとする報告がある<sup>(8)</sup>。ただし、別の報告では結合力に差はなく検出可能な相互作用と細胞への侵入は別の事象であるとするものもある<sup>(9)</sup>。また、微小管認識、核内移行、細胞間輸送等に関与する HSV-1 のテグメント蛋白質である VP22 とその BHV-1 における homolog<sup>f</sup>である BVP22 の各種細胞内における挙動及び局在性には差が認められている<sup>(10)</sup>。また、潜伏時に発現する転写物 LAT(HSV-1)と LR(BHV-1)を比較すると、LAT にはインターフェロンの抗ウイルス作用を阻害する RNA が含まれているのに対し、LR はそれを欠いている。HSV-1 はマウスに対し病原性であるのに対し BHV-1 は病原性を示さないが、これにインターフェロンが関与しているとする報告がある<sup>(11,12)</sup>。これらの各事象が BHV-1 のヒトに対する種特異性に関与している可能性はあるが、ヒトに対して病原性を示さない理由は明確にされていない。

### BPIV-3

BPIV-3 については、ヒトパラインフルエンザ 3 ウイルス(HPIV-3)の生ワクチン開発の一環で、成人ボランティア 18 名に対する感染試験が実施されたが、いずれも明確な症状を示さなかったと報告されている<sup>(13)</sup>。また、幼児、子供についても同様の報告がある<sup>(14)</sup>。種特異性の決定要因については HPIV-3 と BPIV-3 の核蛋白質やエンベロープ蛋白質の遺伝子を組み換えた組み換えウイルスをアカゲザルに感染させ、病原性を比較した報告がある。HPIV-3 の核蛋白質(N)もしくはリン酸化蛋白質(P)の ORF<sup>g</sup>を BPIV-3 のもので組み換えたウイルスでは上部および下部気道におけるウイルスの増殖が BPIV-3 と同様に抑制されたのに対し、ポリメラーゼ蛋白質、マトリクス蛋白質、F 蛋白質、HN の ORF を組み換えたウイルスの増殖の抑制具合は低かった。このことから、霊長類における BPIV-3 の増殖抑制には複数の要素が関与するものの、N、P が主要な因子であることが示唆されている<sup>(15,16)</sup>。

### BRSV

BRSV はヒト RS ウイルス(HRSV)に対して感受性であるチンパンジーにおいてウイルスの増殖が抑制されるとする報告がある。また、BRSV のゲノムを HRSV のエンベロープ蛋白質(G 及び F 蛋白質)をコードする RNA で組み換えた組み換えウイルスは、ヒト培養細胞において中程度の増殖を示し、ウシ培養細胞において BRSV と同様の増殖を示し、チンパンジーの気道においても BRSV と比較してやや増殖がよいが、HRSV と比べると著しく劣るという報告がある<sup>(17)</sup>。したがって F と G 蛋白質は、BRSV の宿主域の決定に係わるが、それだけでは十分ではないと考えられる。一方、BRSV を HRSV の Nonstructural Protein(NS 蛋白質)をコードする RNA で組み換えた組み換えウイルス(rBRSV)はウシ IFN 産生能を持つ MDBK 細胞や Klu 細胞で増

<sup>f</sup> 相同物。

<sup>g</sup> オープンリーディングフレーム。塩基配列の並びにおいて、遺伝暗号の開始コドンと終止コドンに挟まれている部分を言う。長い ORF は通常蛋白質をコードしていると考えられる。

殖が抑制されたのに対し、IFN 産生能を持たない Vero 細胞やヒトIFN 産生能を有する HEp-2 細胞では BRSV と rBRSV は同様に増殖し、さらにこれらの細胞に IFN- を細胞外から与えると Vero 細胞では BRSV と rBRSV は同様に増殖したのに対し、MDBK 細胞では rBRSV の増殖は BRSV に比べて抑制され、HEp-2 細胞では BRSV の増殖が rBRSV と比べて抑制されたとする報告がある。これらのことから、NS 蛋白質が宿主域の決定に関与していることが示唆されている<sup>(18)</sup>。

#### BAdV-7

アデノウイルスはほ乳類や鳥類において広範に存在が確認されているが、一般に 1 あるいは 2~3 のごく近縁の種に特異的に感染するとされる<sup>(19)</sup>。動物のアデノウイルスはヒト細胞に侵入はするが増殖はせず、そのため病原性を示さない。この性質を利用して、一過的に目的遺伝子を細胞内で発現させることができる遺伝子治療のベクターとして動物のアデノウイルスを利用しようとする研究が行われている。ウシでは BAdV-3 等で研究が進んでいる<sup>(20)</sup>。

#### BVDV

BVDV はウシの他、ヒツジやシカ等の野生の反すう動物に感染するが、ヒトには病原性を示さないとされている<sup>(21,22)</sup>。また、本ワクチンに含有される BVDV は紫外線照射により不活化されており、感染力を有していない<sup>(1)</sup>。

### (2)ウシにおける安全性試験<sup>(23)</sup>

キャトルウイン 6 は既存の 5 種混合生ワクチンをベースとしている。異なる点は、5 種混合が BVDV についても弱毒ウイルス株を用いているのに対し、キャトルウイン 6 は 2 種の BVDV 株 (いずれも 5 種混合とは異なる株)を用い、かつこれが不活化されている点である。他の 4 種の弱毒ウイルスについては同一のものが使用されている。

キャトルウイン 6 のウシにおける安全性試験としては、妊娠牛及び子牛への投与試験が実施されており、臨床症状や血液検査などの各種パラメータの他、注射部位の局所反応についても観察されている。

#### 妊娠牛における安全性試験

妊娠 6 ヶ月のウシに 2 ヶ月間隔で 2 回 (対照群、常用量、10 倍用量 ;各 3 頭)接種を行った。2 回目注射後に自然分娩させ、母ウシ及び胎児に対する安全性を検討した。母ウシに対しては臨床症状 (注射部位を含む)、体重、飼料摂取量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、抗体測定、妊娠期間及び分娩状況、泌乳量の観察を実施した。新生子牛については臨床症状 (注射部位を含む)、体重、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、抗体価の観察を実施した。

臨床症状では 10 倍用量群の注射後 2 日に体温の上昇が認められた。10 倍用量群の 1 頭で 2 回目注射 24 日以後に食欲低下、発熱、呼吸速迫等が認められ、この個体では同時に貧血、白血球減少、リンパ球増加、血小板数の増加も認められた。これは発症時期から分娩の負荷に起因するもので、ワクチン接種に関与するものではないと考えられた。他に特に異常は認められなかった。また、注射部位にも熱感、腫脹、硬結等の変化は認められなかった。

分娩状況について、10 倍用量群の 1 頭で胎児の異常胎勢による難産に伴う胎児の死亡が認められたが、これは難産となりやすい胎勢として一般的に認められる変化であり、偶発的なものと考えられた。

体重、飼料摂取量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、抗体測定、妊娠期間、泌乳量、体重については、特にワクチン接種に起因する異常は認められなかった。

新生子牛については各検査項目に投与に起因した異常は認められなかった。

### 子牛における安全性試験

3ヶ月齢の子牛に2ヶ月間隔で2回(対照群、常用量、10倍用量;各3頭)接種を行った。臨床症状(注射部位を含む)、体重、飼料摂取量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、剖検、病理組織学検査を観察した。観察は2回注射後14日まで実施した。

臨床症状では10倍用量群で1頭に1回目注射後3~6日に軟便が認められ、10倍用量群の2回目注射15分後から1頭に起立不安定、元気消失、流涎、呼吸速迫が認められたが、これは4時間後までには回復した。また、10倍用量群で2回とも注射後2~4日に軽度の体温上昇が認められた。

体重、飼料摂取量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、諸器官の剖検では投与に起因した異常は認められなかった。

注射部位における変化については、2回目の注射において常用量群の1頭で注射後2日に、10倍用量群の3頭で注射後2~5日の間で1ないし3頭で軽度な腫脹が認められた。剖検では、10倍用量群の1頭で2回目の注射部位に淡黄色部が認められ、この部位の病理組織学的検査では中程度の肉芽腫が認められた。その他、常用量群の1頭で2回目注射部位に、10倍用量群の1頭で1回目注射部位に軽度な細胞浸潤が認められた。

なお、試験期間中に常用量群の1頭が膀胱炎で死亡したが、これはワクチン接種に起因するものではないとされている。

### (3)臨床試験<sup>(24)</sup>

国内2カ所の農場でウシに対する臨床試験が行われている。いずれも臨床試験実施中に対象疾病の流行は認められず、対照群の抗体の陽転あるいは上昇も認められなかった。また、特にワクチンの接種に起因する臨床異常や肉眼的に確認できる局所反応は認められなかった。なお、この試験はGCP対応で実施されている。

### (4)その他<sup>(1,25)</sup>

なお、各弱毒ウイルスの性状、細菌、マイコプラズマ、他のウイルス等の混入否定試験、安全試験等が、規格として設定されており、試作ワクチンにつき、それぞれ試験が行われ問題のないことが確認された。さらに、これらについては製造方法の中に規定されている。

## 4. 食品健康影響評価について

上記のように、当ワクチンの主剤は日本国内で分離されたウイルス株を弱毒化あるいは不活化したものである。弱毒化ウイルスはウシへの感染性を有する生ウイルスであるが、これらはすべて人獣共通感染症の病原体とはみなされていない。これまでヒトで発病した事例も報告されておらず、ヒトへの病原性はないと判断される。また、製剤はアジュバントを含有していない。

これらのことから、当生物学的製剤が適切に使用される限りにおいて、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ものと考えられる。

< 出 典 >

- (1) キャトルウィン 6 製造承認申請書 本文 (未公表)
- (2) キャトルウィン 6 製造承認申請書添付資料：起源又は開発の経緯 (未公表)
- (3) 獣医感染症カラーアトラス 文永堂出版(1999)
- (4) 獣医微生物学 文永堂出版(1995)
- (5) 獣医学大事典 チクサン出版社(1989)
- (6) 新編 獣医微生物学 (株)養賢堂 (1989)
- (7) INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS/INFECIOUS PUSTULAR VULVOVAGINITIS  
Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5<sup>th</sup> edition, 2004 (OIE)
- (8) Connolly S.A., et. al.  
Glycoprotein D Homologs in herpes simplex virus type 1, pseudorabies virus, and bovine herpes virus type 1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities  
Virology, Vol.280, Issue 1, 7-18(2001)
- (9) Campadelli-Fiume G, et. al  
The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alpha herpesviruses into cells  
Rev. Med. Virol., Vol.10, Issue 5, 305-319(2000)
- (10) Jerome S. H., et. al.  
Distinction between Bovine Herpesvirus 1 and Herpes Simplex Virus Type 1 VP22 Tegument Protein Subcellular Associations  
J. Virol., Vol.74, No. 7, 3301-3312(2000)
- (11) Clinton J.  
Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency  
Clin. Microbiol. Rev., Vol.16, No.1, 79-95(2003)
- (12) Carlos A., et. al.  
Both Viral and Host Factors Contribute to Neurovirulence of Bovine Herpesviruses 1 and 5 in Interferon Receptor-Deficient Mice  
J. Virol., Vol.78, No.7, 3644-3653(2004)
- (13) Maly L. C., et. al  
Evaluation of Bovine, Cold-Adapted Human, and Wild-Type Human Parainfluenza Type 3 Virus in Adult Volunteers and in Chimpanzees,  
J. Clin. Microbiol., Vol.29, No.6, 1175-1182(1991)
- (14) Min-Shi L., et. al.  
Antibody Responses to Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (PIV3) Vaccination and Human PIV3 Infection in Young Infants  
J. Infect. Dis., 184, 909-913(2001)
- (15) Jane E. B. et. al.  
A Recombinant Human Parainfluenza Virus Type 3 (PIV3) in Which the Nucleocapsid N Protein Has Been Replaced by That of Bovine PIV3 Is Attenuated in Primates  
J. Virol., Vol.74, No.7, 3188-3195(2000)
- (16) Mario H. S., et. al  
Determinants of the Host Range Restriction of Replication of Bovine Parainfluenza Virus Type 3 in Rhesus Monkeys Are Polygenic  
J. Virol., Vol.77, No.2, 1141-1148(2003)

- (17) Ursula J. B., et. al  
Chimeric Bovine Respiratory Syncytial Virus with Glycoprotein Gene Substitutions from Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) : Effects on Host Range and Evaluation as a Live-Attenuated HRSV Vaccine  
J. Virol., Vol.74, No.3, 1187-1199(2000)
- (18) Birgit B. and Karl-Klaus C.  
Respiratory Syncytial Virus (RSV) Nonstructural (NS) Proteins as Host Range Determinants: a Chimeric Bovine RSV with NS Genes from Human RSV Is Attenuate in Interferon-Competent Bovine Cells.  
J. Virol., Vol.76, No.9, 4287-4293(2002)
- (19) 微生物学・分子生物学辞典 朝倉書店 (1997)
- (20) Reddy P. S. et. al.  
Replication-Defective Bovine Adenovirus Type 3 as an Expression Vector  
J. Virol., Vol.73, No.11, 9137-9144(1999)
- (21) Bovine Viral Diarrhea (Ministry Agriculture and Food ; CANADA)
- (22) BOVINE VIRAL DIARRHOEA  
Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5<sup>th</sup> edition, 2004 (OIE)
- (23) キャトルウィン 6 製造承認申請書添付資料：安全性に関する試験 (未公表)
- (24) キャトルウィン 6 製造承認申請書添付資料：臨床試験 (未公表)
- (25) キャトルウィン 6 製造承認申請書添付資料：物理的、化学的試験 (未公表)