

(案)

動物用医薬品評価書

ニューカッスル病・マレック病（ニューカッスル病
ウイルス由来F蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス
1型）凍結生ワクチン（セルミューンN）

2009年10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	3
○食品安全委員会委員名簿	3
○食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿	3
○要約	4
I. 評価対象動物用医薬品の概要	5
1. 主剤	5
2. 効能・効果	5
3. 用法・用量	5
4. 添加剤等	5
5. 開発の経緯及び使用状況等	5
II. 安全性に係る知見の概要	6
1. 主剤のウイルスについて	6
(1) 宿主ウイルスの病原性	6
(2) 挿入遺伝子の供与体の病原性	6
(3) 分布	7
(4) 排泄	7
(5) 鶏における感染試験	8
(6) 非接種対象動物への影響	9
(7) 抗体調査	11
2. ヒトに対する安全性	11
(1) 主剤について	11
(2) rMDV1 の鶏肉中での生存性確認試験	12
(3) 人工胃液中生存試験	12
(4) 添加剤等について	13
3. 鶏に対する安全性	13
(1) 鶏に対する安全性試験	13
(2) 鶏に対する臨床試験	14
4. その他	15
(1) 挿入 DNA の安定性	15
(2) 遺伝子産物の安全性	16
(3) その他	16
III. 食品健康影響評価	16

▪ 別紙：検査値等略称.....	18
▪ 参照.....	19

〈審議の経緯〉

- 2009年 7月 3日 農林水産大臣より製造販売の承認に係る食品健康影響評価について要請（21消安第2910号）、
厚生労働大臣より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0703第1号）
関係書類の接受
- 2009年 7月 9日 第293回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2009年 8月 18日 第114回動物用医薬品専門調査会
- 2009年 10月 22日 第306回食品安全委員会（報告）

〈食品安全委員会委員名簿〉

(2009年7月1日から)

- 小泉 直子 (委員長)
見上 彪 (委員長代理*)
長尾 拓
野村 一正
畑江敬子
廣瀬 雅雄
村田 容常

* 2009年7月9日から

〈食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員名簿〉

(2009年9月30日まで)

- 三森 国敏 (座長)
井上 松久 (座長代理)
青木 宙 寺本 昭二
今井 俊夫 頭金 正博
今田 由美子 戸塚 恭一
江馬 眞 中村 政幸
小川 久美子 能美 健彦
下位 香代子 山崎 浩史
津田 修治 吉田 緑
寺岡 宏樹

(2009年10月1日から)

- 石川 さと子 能美 健彦
石川 整 舞田 正志
小川 久美子 松尾 三郎
寺岡 宏樹 三森 国敏
寺本 昭二 山口 成夫
天間 恭介 山崎 浩史
頭金 正博 山手 丈至
中村 政幸 渡邊 敏明

(専門参考人)

- 神田 忠仁
澤田 純一
下地 善弘

要 約

ニューカッスル病・マレック病（ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型）凍結生ワクチン（セルミュン N）について食品健康影響評価を実施した。

本製剤は弱毒マレック病ウイルスにニューカッスル病ウイルスの感染防御抗原である F 蛋白遺伝子を導入した鶏胚細胞培養ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病 1 型 207 株（以下、rMDV1 という。）を主剤とする生ワクチンである。rMDV1 の宿主ウイルスを病原とするマレック病は、鶏を宿主とし、人獣共通感染症とはみなされていない。また、ニューカッスル病は、鶏を主要な宿主とする感染症で、ヒトが感染鶏に濃厚接触した場合まれに急性結膜炎を起こすことがある人獣共通感染症ではあるが、本製剤の主剤の組換えに用いられた F 蛋白遺伝子の供与体であるニューカッスル病ウイルス D26 株は、これまでにワクチンに使用されてきている弱毒株の B1 株よりも病原性は弱いとされている。

rMDV1 は接種鶏の糞やフケから分離されず、また、各種感染試験から、通常のマレック病ウイルスと同様、ヒトを含む他の哺乳動物に対する感染性は認められなかった。

添加剤については、本製剤の含有成分の摂取による健康影響は無視できると考えられる。

また、F 蛋白遺伝子の塩基配列は既知の有害物質（アレルゲンを含む。）の塩基配列との相同性は認められていない。F 蛋白遺伝子発現カセットの挿入にともない、挿入領域内外の接合部に意図しない 4 個のオープンリーディングフレーム（ORF）が検出されたが、これらの ORF からタンパク質が発現する可能性は低いと考えられた。なお、挿入遺伝子は継代培養後においても安定していることが確認されている。

rMDV1 接種鶏に由来する肉及び内臓等からは 4 °C で保存した場合、最長接種 7 日後までウイルスが回収されるものの、rMDV1 は各種感染試験から、通常のマレック病ウイルス同様、ヒトを含む他の動物に対する感染性は認められないこと、人工胃液中生存試験の結果からヒトの消化管内でウイルスは不活性化されると考えられることから、食品の摂取により当該ウイルスに感染する可能性はないものと考えられる。

鶏の安全性試験及び臨床試験も実施され、安全性試験でみられた脳及び坐骨神経の所見は、既承認のマレック病生ワクチン接種において観察される所見であり、程度も同程度であった。

以上のことから、本生物学的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ものと考えられる。

I. 評価対象動物医薬品の概要

1. 主剤 (参照 1)

主剤は鶏胚細胞培養ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株である。本製剤 (凍結ワクチン) 1 アンプル (1,000 羽分、2 mL) 中に鶏胚細胞培養ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株が 10^6 PFU 以上含まれている。

2. 効能・効果 (参照 1)

効能・効果は鶏のマレック病及びニューカッスル病の予防である。

3. 用法・用量 (参照 1)

凍結ワクチンを流水で速やかに融解して、凍結ワクチン溶解用液“化血研”¹200 mL 当たりに 1 本を懸濁し、鶏初生ひなの頸部皮下に 1 羽分 (0.2 mL) を 1 回接種する。

4. 添加剤等 (参照 1)

本製剤 (凍結ワクチン) 1 アンプル (1,000 羽分、2 mL) 中に、安定剤としてジメチルスルホキシドが 0.12 mL、牛血清が 0.30 mL、溶剤としてトリプトース・ホスフェイト・ブロスが 4.66 mg、イーグル MEM が残量、保存剤として硫酸ゲンタマイシンが 47.4 μg (力価)、ベンジルペニシリンカリウムが 158 単位及び硫酸ストレプトマイシンが 158 μg (力価)含まれている。²

5. 開発の経緯及び使用状況等 (参照 2～5)

マレック病は、マレック病ウイルス (MDV) を病原とし、鶏に対して伝染性が強く、末梢神経の腫大や種々の臓器組織におけるリンパ腫の形成を特徴とする。MDV は細胞随伴性が強く、感染性の cell-free ウイルスは感染個体の羽包上皮で増殖、産生されフケ及び羽毛とともに拡散し鶏舎を汚染する。MDV の血清型には、腫瘍原性を持つ血清型 1 (MDV1) 及び腫瘍原性を持たない血清型 2 (MDV2) の 2 種類があり、さらに抗原的に類似した非病原性の七面鳥ヘルペスウイルスが血清型 3 に分類され、血清型 2 及び 3 や弱毒化 MDV1 は強毒株のリンパ腫形成に防御効果を有する。致死率は、慢性経過をとる古典型 (10%前後) と急性で諸臓器にリンパ腫形成が認められる急性型 (ワクチン未接種で 50%以上の場合有り) で異なり、日本では 1964 年ごろから局地的に若齢鶏で発生し全国に拡大した。(参照 2)

ニューカッスル病は、ニューカッスル病ウイルス (NDV) を病原とする急性伝染病で世界中に広く分布する。感染鶏の病態は様々で、症状は強毒内臓型、強毒神経型、中等

¹ 凍結ワクチン溶解用液“化血研” (200 mL) の組成: トリプトース・ホスフェイト・ブロス-468 mg、塩化ナトリウム-1,492 mg、リン酸二水素ナトリウム二水和物-90 mg、リン酸水素ナトリウム-252 mg、フェノールレッド-2.9 mg、精製水-残量 (pH6.8~7.4)

² 本製剤の一部の添加剤等については、「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等を記載していない。

毒型、弱毒型及び無症状腸型に分類される。強毒神経型の致死率は、1 ヶ月齢未満の鶏で 50～90 %、成鶏で 5 %程度である。鶏への病原性には、ウイルスの表面糖タンパク質である Fusion 蛋白（以下、F 蛋白という。）が関連していることが明らかとなっている。国内では 1965～1967 年に大流行し、1967 年に生ワクチンが初めて導入された。現在は生ワクチンの普及によりニューカッスル病の発生数は激減したが、ワクチン未接種の愛玩鶏や不適直接種群を中心に散発が認められていることから、本病は常在していると考えられる。（参照 3）

両疾病の予防は、養鶏場における疾病管理の基本で、ほとんどの鶏が両疾病に対するワクチン接種を受けている。特にニューカッスル病については、移行抗体の影響を受けることから不活化ワクチンを追加接種する 80 日齢までに生ワクチンを 2～5 回繰り返し接種している現状があり、養鶏業者にとっては大きな負担となっている。一方、マレック病については、生ワクチンを初生ひなに 1 回接種すれば終生免疫が得られる。

本製剤は、弱毒 MDV1 型の A4 断片に、NDV の感染防御抗原である F 蛋白をコードする遺伝子（以下、F 蛋白遺伝子という。）を導入した鶏胚細胞培養 NDV 由来 F 蛋白遺伝子導入 MDV1 型 207 株（以下、原株という。）を継代したウイルス（以下、rMDV1 という。）を主剤とする生ワクチンで、移行抗体存在下においても孵化直後のひなに 1 回接種するのみでマレック病及びニューカッスル病に対して終生免疫を付与することが可能となり、ニューカッスル病生ワクチンの投与回数を減らすことによる省力化、二次感染として起こりうる細菌感染症の発生抑制及び抗生物質の使用低減が期待できることから開発された。（参照 4、5）

II. 安全性に係る知見の概要

1. 主剤のウイルスについて

(1) 宿主ウイルスの病原性（参照 1、5～7）

MDV1 CVI 988 株は Central Veterinary Institute（オランダ）において健康な鶏から分離、確立された野外株であり、分離当初より鶏に対して明らかな病原性を示さず、アカゲザルを用いた接種試験においても全く病原性を示さなかった。この株をオランダより輸入し、アヒル胚初代細胞で継代後、次に鶏胚初代細胞で継代して作出された株を rMDV1 の宿主として用いる MDV1 CVI 988 C17 株（以下、宿主ウイルスという。）としている。（参照 5、6、7）

また、CVI 988 株をアヒル胚初代細胞又は鶏胚初代細胞で馴化した生ワクチンは、既に世界各国で使用されており、日本においても CVI 988 株由来の生ワクチンは 1985 年に承認されて以来広く使用されている。（参照 5、6）

(2) 挿入遺伝子の供与体の病原性（参照 5、6、8、9）

rMDV1 に導入した F 蛋白遺伝子の供与体である NDV D26 株は、発育鶏卵に接種した場合に胎児を死亡させないことから、NDV の中でも最も病原性が低いグループに分類される。これまでワクチンに広く使用されている B1 株では、受精卵平均致死時間が 120 時間と報告されており、D26 株は B1 株よりもさらに病原性は低いと考えられた。

（参照 6、8）

また、F 蛋白遺伝子の導入には、A4 断片を用いた相同性組換えが行われている。A4 断片の供与体である MDV1 K554 株は、野外より分離された株であるが、分離当初より腫瘍原性はなく、ワクチンの効果を有することから弱毒株と考えられている。(参照 5、6、9)

(3) 分布 (参照 5、6、10)

初生ひな (SPF 鶏) に rMDV1 及び宿主ウイルスを頸部皮下に接種 (実験 1 : 10,000 PFU/羽、実験 2 : 3,500 PFU/羽) し、接種鶏における両ウイルスの体内分布について比較した。1、4 及び 10 週齢時に接種鶏各 3 羽の各組織からウイルス分離を実施した (実験 1³)。また、雑菌混入等により判定不能であった組織、及び宿主ウイルスと rMDV1 でウイルス分離率に差が認められた組織については、各 5 羽を用いて 4 及び 10 週齢時の追試を実施した (実験 2)。

実験 1 及び 2 の結果から、各組織からのウイルス分離率において、気管を除き rMDV1 は宿主ウイルスとほぼ同じであった。気管については、宿主ウイルスでは 1 及び 4 週齢時にウイルスが回収されているが、rMDV1 では全く回収されなかった。

(4) 排泄 (参照 5、6、11)

① 糞便への排泄 (参照 5、6)

初生ひな (SPF 鶏、15 羽) に rMDV1 を頸部皮下に接種 (3,000 PFU/羽) し、接種 2、6 及び 10 週後に回収した糞便各 5~6 個中におけるウイルス排泄を CPE の有無の観察により検討した。

その結果、いずれの時点で回収された糞便を接種した細胞にも CPE は観察されず、ウイルスは分離されなかった。

② フケへの排泄 (参照 5、6、11)

初生ひな (シェーバー、10 羽/群) に rMDV1 (5,000 PFU/羽) 又は市販ワクチン⁴ (常用量) を頸部皮下にそれぞれ接種し、接種 1、2、4、6 及び 10 週後に体表よりフケを 10 羽分回収し、ウイルス分離を行った。また、MDV は 2 本鎖 DNA ウイルスであることからフケから DNA を抽出し、MDV の DNA 上の *gA* 遺伝子⁵ 配列にプライマーを設計して PCR 分析を行った。ウイルス分離及び PCR 分析の結果を表 1 に示した。

³ 実験 1 はウイルス回収を確実にを行う目的で、より多いウイルス量で実施した。

⁴ 弱毒マレック病ウイルス CVI 988 株を主成分とするマレック病 (マレック病 1 型) 凍結生ワクチン。

⁵ MDV1 感染細胞において発現される糖タンパク質 glycoprotein A をコードする遺伝子。近年 gC ともいい、MDV1 の検出に使用される。

表 1 フケからのウイルス分離及びウイルス DNA 検出結果

群	接種後週数 (週)	ウイルス 分離 ^{※1}	初代分離時の 回収ウイルス (PFU)	フケ重量 (mg)	フケ 10 mg 当 たりのウイル ス量 (PFU)	PCR ^{※2}
rMDV1	1	—	0	20	—	—
	2	—	0	92	—	+
	4	—	0	600	—	+
	6	—	0	470	—	+
	10	—	0	910	—	—
市販 ワクチン	1	—	0	20	—	—
	2	+	1,212	107	113.2	+
	4	+	790	790	10.0	+
	6	+	141	680	2.0	+
	10	+	46	700	0.7	+

※1 + : ウイルス分離あり — : ウイルス分離なし

※2 + : DNA 検出あり — : DNA 検出なし

市販ワクチン接種群では、接種 2 週後をピークに接種 10 週後までウイルスが分離されたが、rMDV1 接種群からはウイルスは分離されなかった。フケからのウイルス DNA 検出については、rMDV1 接種鶏においても接種 2 週後から 6 週後までウイルス DNA が検出された。

(5) 鶏における感染試験 (参照 5、6、12、13)

① 同居感染試験 (SPF 鶏) (参照 5、6、12)

初生ひな (SPF 鶏) に rMDV1 を頸部皮下に接種 (2,000 PFU/羽) し、同日に接種鶏 20 羽に非接種の初生ひな 10 羽を同居させ、接種 (同居) 5 週後に接種鶏、同居 10 週後に非接種鶏それぞれ 10 羽から採血して SPF 鶏における同居感染について検討した。採血血清は蛍光抗体法で抗 MDV1 抗体を、ELISA 法で抗 F 蛋白抗体を測定 (接種鶏については後者のみ実施) した。また、非接種鶏については、同居 10 週後に末梢血単核球 (PBMC) を回収し、ウイルス分離を行った。

その結果、接種鶏は、接種 (同居) 5 週後に全羽が抗 F 蛋白抗体陽性であったが、非接種鶏では同居 10 週後の抗 MDV1 抗体及び抗 F 蛋白抗体はいずれも陰性で、PBMC からウイルスは分離されなかった。

以上より、rMDV1 接種鶏から非接種鶏への同居感染性は認められなかった。

② 同居感染試験 (市販鶏) (参照 5、6、12)

初生ひな (デカルブ) に rMDV1 を頸部皮下に接種 (5,000 PFU/羽) し、同日に接種鶏 70 羽に非接種の初生ひな 15 羽を同居させ、接種 (同居) 10 週後に接種鶏及び非接種鶏のそれぞれ 15 羽から採血して市販鶏における同居感染について検討した。採血血

清は蛍光抗体法で抗 MDV1 抗体を、ELISA 法で抗 F 蛋白抗体を測定（接種鶏については後者のみ実施）した。

その結果、接種鶏は、接種（同居）10 週後には全羽が高い抗 F 蛋白抗体価を保持していたが、非接種鶏では抗 MDV1 抗体及び抗 F 蛋白抗体のいずれも陰性で、同居感染は認められなかった。

③ 同居感染試験（卵内接種）（参照 5、6、12）

鶏（試験 1：イサブラウン、試験 2：イサホワイト）の 18 日齢発育鶏卵に rMDV1 を卵内接種（2,000 PFU/羽）し、接種後孵化したひなに非接種の初生ひなを同居させ（試験 1：19 及び 6 羽、試験 2：96 及び 5 羽）、同居 10 週後に接種鶏及び非接種鶏からそれぞれ採血して卵内接種における同居感染について検討した。採血血清は蛍光抗体法で抗 MDV1 抗体を、ELISA 法で抗 F 蛋白抗体を測定（接種鶏については後者のみ実施）した。

その結果、接種鶏は、ほとんどの個体において同居 10 週後に高い抗 F 蛋白抗体（試験 1：16/19 羽、試験 2：91/96 羽）が誘導されていたが、非接種鶏では抗 MDV1 抗体及び抗 F 蛋白抗体のいずれも陰性で、同居感染は認められなかった。

④ 垂直感染試験（参照 5、6、13）

初生ひな（SPF 鶏、雌雄、10 羽）に rMDV1 を頸部皮下に接種（5,000 PFU/羽）し、自然交配させ、約 170 日齢時に受精卵を採取し、採卵直後の卵（試験 1：5 個）、孵卵 11 日の鶏胚（試験 2：5 例）及び孵化 10 日後のひな（試験 3：5 羽）への垂直感染について検討した。なお、試験 1 では、rMDV1 の DNA 上の *gA* 遺伝子配列にプライマーを設計して PCR 分析を行い、試験 2 及び 3 では、CPE の有無を観察した。

その結果、全試験群において *gA* 遺伝子に該当するバンドは検出されず、また CPE は観察されず、介卵性の垂直感染は認められなかった。

（6）非接種対象動物への影響（参照 5、6、14、15）

F 蛋白遺伝子挿入の結果、rMDV1 が新たな宿主域を獲得しているか否かを推定することを目的としてマウス及びネコに対する感染試験、及び哺乳動物由来細胞への感染試験を実施した。

① 感染試験（マウス）（参照 5、6、14）

マウス（BALB/c、3 週齢、8 匹/群）に rMDV1 又は宿主ウイルスを経口及び皮下に同時に接種（各投与経路 40,000 PFU/匹）し、接種 4、7 及び 10 週後に採血し、ELISA 法で抗 F 蛋白抗体を、蛍光抗体法で抗 MDV1 抗体を測定した。

rMDV1 及び宿主ウイルス投与群ともにいずれの時点においても抗 F 蛋白抗体及び抗 MDV1 抗体は陰性であり、感染は認められなかった。

② 感染試験（ネコ）（参照 5、6、14）

ネコ（12 ヶ月齢、雄、3 匹/rMDV1 接種群、2 匹/宿主ウイルス接種群、1 匹/非接種対照群）に rMDV1 及び宿主ウイルスを皮下接種（20 万 PFU/匹）し、接種 1、4 及び 10

週後に採血し、PBMC からウイルス分離及び *gA* 遺伝子配列にプライマーを設計して PCR 分析を実施した。また、ELISA 法で抗 F 蛋白抗体を、蛍光抗体法で抗 MDV1 抗体を測定した。

その結果、いずれの時点においても全個体からウイルスは分離されず、PCR 法においても *gA* 遺伝子に該当するバンドは検出されず、また、MDV1 抗体も陰性であった。ELISA では、接種後に抗 F 蛋白抗体の抗体価が上昇した個体は認められず、本試験においてネコは rMDV1 に感染しなかったものと判断された。

③ 感染試験 (*in vitro*: 哺乳動物由来細胞) (参照 5、6、15)

rMDV1 及び宿主ウイルスを超音波処理により cell-free⁶にした後、表 2 に示すヒトを含む 14 種の哺乳動物由来細胞に接種した。培養細胞は 5 代目まで継代し、継代毎に CPE の出現の有無の観察及び *gA* 遺伝子配列にプライマーを設計して PCR 分析を行った。5 代目継代時にいずれかが陽性であった細胞については、8 代目まで継代し、同様に試験した。さらに、1 及び 5 代目の細胞については MDV1-pp38⁷ 及び F 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法を実施した。

表 2 感染試験に供試した哺乳動物由来細胞

細胞名	動物種	臓器等
HEL (MCR-5)	ヒト	肺
NHDF-neo	ヒト	皮膚
Hela	ヒト	子宮頸がん
CCRF-CEM	ヒト	白血病
U937	ヒト	リンパ腫
RPMI1788	ヒト	末梢血
Vero	サル	腎臓
MDBK	牛	腎臓
MDCK	イヌ	腎臓
CRFK	ネコ	腎臓
BHK-21	ハムスター	腎臓
HmLu	ハムスター	肺
3T3	マウス	胚
PK	豚	腎臓

CPE は、いずれの細胞においても rMDV1 及び宿主ウイルスともに 5 代目までの継代期間中観察されなかった。PCR 分析では、最大 5 代目まで *gA* 遺伝子に該当するバンドが検出される細胞 (BHK-21 及び HmLu) があったが、いずれも rMDV1 と宿主ウイル

⁶ 鶏胚初代細胞は数代の継代が可能である。感染細胞の形状で接種した場合、同細胞により感染試験陽性となる可能性があるため、cell-free ウイルスとして接種した。

⁷ pp38 は発現量が最も多いタンパク質の一つであることから、MDV1 の検出によく用いられる。

スでほぼ同様の結果であり、6代目以降は陰性化した。また、蛍光抗体法において、MDV1-pp38 及び F 蛋白の発現はいずれもみられなかったことから、PCR 分析で検出されたバンドは、継代の期間中には除去されなかった接種ウイルス又は残存したウイルスの DNA によるものであり、感染の結果ではないと考えられた。

以上より、rMDV1 は本試験に使用した哺乳動物由来細胞には感染しないと考えられた。

(7) 抗体調査 (ヒト) (参照 5、6、16、17)

rMDV1 のヒトに対する感染性を推測する目的で、実験従事者及び飼育担当者血清中の rMDV1 に対する抗体について rMDV1 感染細胞を用いた蛍光抗体法により調べた結果、いずれも陰性であり (表 3)、ヒトへの感染性は認められなかった。(参照 5、6)

表 3 ヒト血清中の rMDV1 に対する抗体確認の結果

被験者	期間及び頻度	抗 MDV1 抗体
実験従事者 1	3 年間、週 1~2 回	—
実験従事者 2	3 年間、月 1~2 回	—
実験従事者 3	3 年間、週 1~2 回	—
実験従事者 4	3 年間、週 1~2 回	—
実験従事者 5	3 年間、週 1~2 回	—
実験従事者 6	3 年間、ほぼ毎日	—
実験従事者 7	3 年間、ほぼ毎日	—
実験従事者 8	3 年間、月 1~2 回	—
飼育担当者 1	3 年間、ほぼ毎日	—
飼育担当者 2	3 年間、ほぼ毎日	—

— : 陰性

また、国際獣疫事務局 (OIE) によれば、MDV1、MDV2 又は七面鳥ヘルペスウイルスに接触している従事者の健康に対する影響は認められていないとしている。(参照 16) さらに、文献によれば MDV1 CVI 988 株の鶏接種試験に従事し、明らかに多量のウイルスに暴露された従事者において血清中の抗 MDV1 抗体は陽性転化せず、ワクチン接種時に針刺し事故を起こした従事者においても、抗体は陽性転化しなかったと報告されている。(参照 17)

2. ヒトに対する安全性

(1) 主剤について (参照 1、5~9、16、17)

マレック病は、鶏を主要な宿主とする感染症であるが、OIE の報告及び文献からもヒトの健康に対する影響は認められておらず、人獣共通感染症とはみなされていない。ニューカッスル病は鶏を主要な宿主とする感染症で、ヒトが感染鶏に濃厚接触した場合まれに急性結膜炎を起こすことがある人獣共通感染症ではあるが、rMDV1 の挿入遺伝子

の供与体である NDV D26 株は、これまでにワクチンに広く使用されてきている弱毒株の B1 株よりもさらに病原性は低いとされている。また、NDV の F 蛋白遺伝子を挿入した rMDV1 の鶏以外の動物種への感染試験結果から、rMDV1 と宿主ウイルスとの間で宿主域の変化は認められず、実験従事者の抗体調査の結果からヒトに感染しないものと考えられた。

(2) rMDV1 の鶏肉中での生存性確認試験 (参照 18)

初生ひな (ブロイラー、5羽) に rMDV1 を頸部皮下接種 (4,280 PFU/羽) し、18.5 週齢時に鶏を放血と殺し、肝臓、筋胃、筋肉及び PBMC からウイルスを分離した。なお、肝臓、筋胃及び筋肉については 4 °C に保存し、と殺後経時的 (と殺 0、2、4、7 及び 10 日後) にウイルス分離を実施した。

結果を表 4 に示した。rMDV1 は 4 °C で保存した場合、筋肉はと殺当日のみ、肝臓は保存 2 日後まで、PBMC 及び筋胃は保存 7 日後までウイルスは回収された。rMDV1 は 4 °C に保存された鶏肉等において、7 日間程度は生存するものと考えられた。

表 4 と殺後 4 °C 保存における各組織からのウイルス分離結果

分離臓器	保存日数 (日)				
	0	2	4	7	10
PBMC	5/5*	5/5	4/5	1/5	0/5
肝臓	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5
筋胃	5/5	4/5	5/5	4/5	0/5
筋肉	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* : ウイルス分離陽性検体数 / 供試検体数

また、初生ひな (市販鶏ブロイラー、3羽) に本製剤試作ワクチンを頸部皮下接種 (4,280 PFU/羽) し、7.5 週齢時に鶏を放血と殺し、肝臓、筋胃及び筋肉を -20 °C で 24 時間保存した場合、解凍したいずれの組織からも rMDV1 は回収されなかった。

(3) 人工胃液中生存試験 (参照 19)

① rMDV1 感染細胞

rMDV1 を 40 万 PFU に調整し感染させた細胞を人工胃液⁸ (原液 (pH 1.4) 及び 10 倍希釈液 (pH 2.4)、対照 : リン酸緩衝食塩液、3 mL) で処理後に培養して rMDV1 の胃液中での生存性について検討した。なお、処理時間⁹は 30 及び 240 分間で、処理後の感染細胞は鶏胚 2 代継代細胞に接種後 10 日間培養し CPE の有無を観察した。

表 5 に示すとおり、rMDV1 は 10 倍に希釈した人工胃液においても 30 分以内で不活性化された。

⁸ 人工胃液 : 滅菌水 50 mL、0.1N 塩酸 100 mL、3% 酢酸 2.5 mL にペプシン 0.3 g を溶解したもの

⁹ 胃内滞留時間は通常固形物で 5 時間、液体で 3 時間といわれている。(参照 20)

表 5 鶏胚初代細胞に感染した rMDV1 の人工胃液中での生存試験結果

処理液の種類	リン酸緩衝食塩液		人工胃液原液		10 倍希釈人工胃液	
	30 分	240 分	30 分	240 分	30 分	240 分
非感染細胞	—	—	—	—	—	—
感染細胞	+	+	—	—	—	—

+ : CPE あり - : CPE なし

② rMDV1 感染 PBMC

初生ひな（9羽）に rMDV1 を 10 倍量（40,000 PFU）頸部皮下接種し、6 週齢時に採血し、PBMC を分離後人工胃液（10 倍（pH 2.4）及び 50 倍（pH 3.0）希釈液、対照：リン酸緩衝食塩液、3 mL）で処理した。その後、培養して rMDV1 の胃液中での生存性について検討した。なお、処理時間は 30 分間で、処理後の感染細胞は鶏胚 2 代継代細胞に接種後 10 日間培養し CPE の有無を観察した。

その結果、PBMC に感染した rMDV1 は、50 倍に希釈した人工胃液においても 30 分以内に不活性化された。

（4）添加剤等について（参照 1、21～32）

本製剤に使用されている添加剤等のうち、安定剤として使用されているジメチルスルホキシド、保存剤として使用されている硫酸ゲンタマイシン、ベンジルペニシリンカリウム及び硫酸ストレプトマイシンは、過去に動物用医薬品の添加剤として食品安全委員会で評価されている（参照 21～23）。安定剤として使用されている牛血清¹⁰は牛胎児の血液由来でヒト用医薬品の製造工程にも使用されている（参照 24）。溶剤として使用されているトリプトース・ホスフェイト・ブロスは牛の乳成分及び豚臓器（脾臓等）、豚の胃を加水分解後の調製物に、塩化ナトリウム、デキストロース（ブドウ糖）、リン酸水素二ナトリウム等を加えたものである。（参照 1、25）。また、イーグルMEMについては主に無機塩類、ビタミン及びアミノ酸で構成されている（参照 26）。トリプトース・ホスフェイト・ブロス及びイーグルMEMの成分のうち、塩化ナトリウム、ブドウ糖、重酒石酸コリン、カナマイシン及びフェノールレッド等以外は食品添加物としての使用が認められた物質である（参照 27、28）。塩化ナトリウム及びブドウ糖はともに通常食品として摂取され、重酒石酸コリンはヒト用医薬品として使用されている（参照 29）。カナマイシンは、過去に食品安全委員会において評価されている（参照 23、30）。また、フェノールレッドは微量で pH 指示薬として使用され、食品安全委員会で過去に評価された動物用医薬品の添加剤として使用されている（参照 31）。

以上より、既存の毒性評価及び本製剤の接種量を考慮すると、本製剤に使用されている添加剤等はヒトの健康に影響を与えるものとは考えられない。

3. 鶏に対する安全性

（1）鶏に対する安全性試験（参照 5、32）

¹⁰ BSE 非発生国であるオーストラリア、ニュージーランドを原産国とするもの。

鶏（初生ひな、雌雄各 5 羽/群）を用いて、試作ワクチンの単回皮下接種（常用量、100 倍量、対照：生理食塩水）試験を表 6 の要領で実施し、本製剤の安全性について検討した。供試鶏は接種後 10 週間臨床観察を行い、接種 10 週後に採血、剖検及び病理組織学的検査を実施した。

表 6 試作ワクチンの皮下接種による安全性試験設定

群	動物数	投与物質	投与量
対照	雌雄各 5 羽	生理食塩液	0.2 mL/羽
常用量		試作ワクチン	
100 倍量		試作ワクチン	

10 週間の観察期間中、いずれの個体にも異常は観察されず、接種 10 週後の体重、血液検査、剖検及び臓器重量において各群間の有意差は認められなかった。

病理組織学的検査では、試作ワクチン接種群において脳にごく軽度から軽度の単核細胞の囲管性細胞浸潤が認められた。また、常用量群では、ごく軽度から軽度のグリア細胞の集簇、及び 100 倍量群の 1 例においては坐骨神経にごく軽度の単核細胞の浸潤が観察された。これらの所見は対照群にはみられないことから、試作ワクチンの接種により生じた変化と考えられた。また、全群において肺、腎臓及び脾臓にリンパ球浸潤/集簇、肺にリンパ濾胞増生があり、試作ワクチン接種群で程度が強いもしくは出現頻度が高かったが、これらの変化は、ウイルス性炎及び免疫反応の結果と考えられた。

以上より、脳及び坐骨神経の所見は、既承認のマレック病生ワクチン接種において観察される所見であり、程度も同程度であった。

(2) 鶏に対する臨床試験（参照 5、33）

野外の飼育環境を模し外部と画した国内 2 施設において、計 1,820 頭の鶏（雌、投与群：初生ひな 220 又は 230 羽、対照群：初生ひな～10 週齢鶏 220 又は 230 羽）に試作ワクチンを接種し、安全性について検討した。安全性は、臨床症状、投与局所反応、体重、育成率、産卵率及び正常卵産出率により判定した。試験系の設定は表 7 のとおりであった。

表 7 臨床試験における試験設定

	試験番号	農場	鶏種	動物数 (羽)	投与時期及び供試薬
投与群	1	A	肉用鶏 (コブ)	230	初生：試作ワクチン
	2		採卵用鶏 (ジュリア)	230	
	3	B	肉用鶏 (チャンキー)	220	
	4		採卵用鶏 (ジュリア)	230	
対照群	1	A	肉用鶏 (コブ)	230	初生：市販薬 A* ¹
	2		採卵用鶏 (ジュリア)	230	2 週齢：市販薬 B* ²
	3	B	肉用鶏 (チャンキー)	220	4 週齢：市販薬 B

	4	採卵用鶏（ジュリア）	230	10 週齢：市販薬 C*3
--	---	------------	-----	---------------

*1：七面鳥ヘルペスウイルス

*2：ニューカッスル病、鶏伝染性気管支炎混合不活化ワクチン

*3：ニューカッスル病、鶏伝染性気管支炎 2 価、産卵低下症候群-1976、鶏伝染性コリーザ（A・C 型）、マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合不活化ワクチン（試験 2 及び 4 のみ）

臨床症状として下痢、元気消失及び脚弱が認められたものの、いずれも通常認められる程度であり、投与群と対照群に有意差は認められず、全期間を通じ、試作ワクチンに起因する臨床症状及び投与局所の異常は認められなかった。

体重では一過性の有意差が認められたが、被験薬に起因する増加抑制はみられず、育成率についても各群間に有意差はなかった。

産卵率については、試験 4 で産卵開始 2 及び 3 ヶ月において対照群の方が有意に高かった（投与群：95.7 及び 95.3 %、対照群：98.0 及び 96.7 %）が、投与群の産卵率でも、本試験に使用した鶏種（ジュリア）の標準的なピーク時産卵率（92～95 %）を上回っており、試験 2 において、ピーク時産卵率は投与群（94.7 %）の方が対照群（91.0 %）よりも高い値であった。また、投与群及び対照群の 50 %産卵率到達日齢は、試験 2 においてそれぞれ 136 及び 135 日齢、試験 4 においてそれぞれ 138 及び 142 日齢であった。

正常卵産出率については、試験 4 の産卵開始 4 ヶ月後において対照群が有意に高かった（投与群：99.6 %、対照群：100 %）ものの、全般的に高い水準で推移した。

4. その他

(1) 挿入 DNA の安定性（参照 5、6、34）

rMDV1 のゲノムに挿入された遺伝子（図参照）の完全性及び安定性を確認するため、rMDV1 及び rMDV1 の原株から 20 代継代したウイルス（rMDV1-20）の挿入遺伝子領域について塩基配列を決定し、発現ベクターの配列と比較した。

その結果、rMDV1 及び rMDV1-20 の F 蛋白遺伝子発現カセット（*gB* 遺伝子プロモーター、F 蛋白遺伝子及び Simian virus 40 ターミネーター）の塩基配列に変異が生じていないことが確認された。（参照 5、6）

また、F 蛋白遺伝子発現カセットは、宿主の A4 断片内にある *US10* 遺伝子に挿入されていることから、*US10* 遺伝子の 5'側及び 3'側配列にプライマーを設計し、rMDV1 の原株からの継代数 2、8、15 及び 21 代の各ウイルス感染細胞について PCR 分析を行った。その結果、いずれの継代細胞においても同じサイズのバンドが検出された。（参照 5、6、34）

さらに、同継代細胞について、モノクローナル抗体を用いて F 蛋白の発現を確認した結果、いずれの継代細胞においても、全てのプラークで F 蛋白の発現が確認された。（参照 5、6）

以上のことから、F 蛋白遺伝子発現カセット及び F 蛋白遺伝子発現カセットから発現するタンパク質は安定していることが確認された。

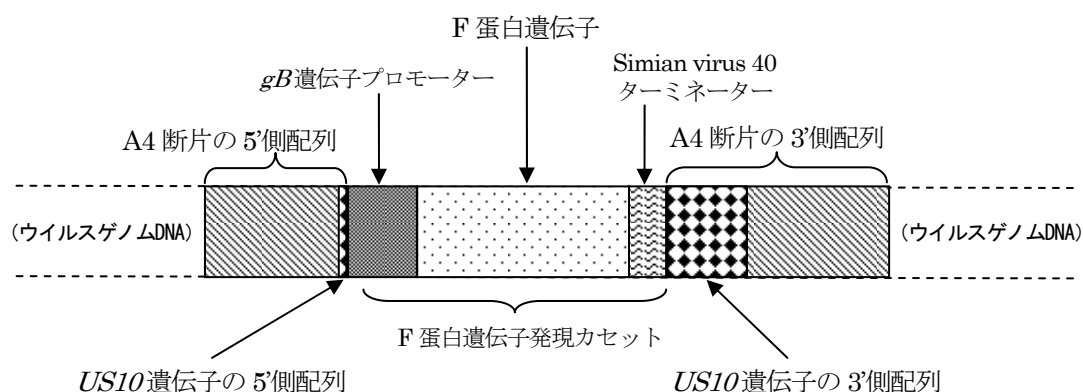


図 rMDV1 に挿入された DNA (模式図)

(2) 遺伝子産物の安全性 (参照 35、36)

F 蛋白遺伝子と既知の有害物質の遺伝子との相同性について確認するために、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)のデータベースを用いてblastn 検索 (version 2.2.18) を行った結果、既知の有害物質 (アレルゲンを含む。) と相同性を示す配列は見出されなかった。(参照 35)

また、遺伝子挿入領域内外の接合部に意図しないオープンリーディングフレーム (ORF) が生じていないことを確認するために、遺伝子解析ソフト GENETYX (version 6.0.1) を用いて、ORF の検索を行った結果、4 個の ORF が検出された。

4 個の ORF がコードするアミノ酸配列について、DDBJ のデータベースを用いてblastp 検索 (version 2.2.18) を行った。その結果、1 個の ORF において、Simian virus 40 ターミネーターの相補鎖にある large T 抗原 C 末端ペプチドとの相同性が認められたが、これらの塩基配列等から、この ORF からタンパク質を発現する可能性はきわめて低いと考えられた。仮に発現したとしても、核移行シグナル及び形質転換活性が存在しないことから、発現したタンパク質が核に移行して DNA の複製等に影響する可能性はないと考えられる。(参照 35、36)

(3) その他 (参照 1)

本製剤は、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及び 1~4 日齢の鶏を用いた安全性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。(参照 1)

III. 食品健康影響評価

上記のように、マレック病は鶏を主要な宿主とし、人獣共通感染症とはみなされていない。ニューカッスル病は、鶏を主要な宿主とする感染症で、ヒトが感染鶏に濃厚接触した場合まれに急性結膜炎を起こすことがある人獣共通感染症ではあるが、本製剤の主剤の組換えに用いられた F 蛋白遺伝子の供与体である NDV D26 株は、これまでにワク

チンに使用されてきている弱毒株の B1 株よりも病原性は弱いとされている。

rMDV1 は接種鶏の糞やフケから分離されず、また、各種感染試験から、通常の MDV 同様、ヒトを含む他の哺乳動物に対する感染性は認められなかった。

添加剤については、本製剤の含有成分の摂取による健康影響は無視できると考えられる。

また、F 蛋白遺伝子の塩基配列は既知の有害物質（アレルゲンを含む。）の塩基配列との相同性は認められていない。F 蛋白遺伝子発現カセットの挿入にともない、挿入領域内外の接合部に意図しない 4 個の ORF が検出されたが、これらの ORF からタンパク質が発現する可能性は低いと考えられた。なお、挿入遺伝子は継代培養後においても安定していることが確認されている。

rMDV1 接種鶏に由来する肉及び内臓等からは 4 °C で保存した場合、最長接種 7 日後までウイルスが回収されるものの、rMDV1 は各種感染試験から、通常の MDV 同様、ヒトを含む他の動物に対する感染性は認められないこと、人工胃液中生存試験の結果からヒトの消化管内でウイルスは不活性化されると考えられることから、食品の摂取により当該ウイルスに感染する可能性はないものと考えられる。

鶏の安全性試験及び臨床試験も実施され、安全性試験でみられた脳及び坐骨神経の所見は、既承認のマレック病生ワクチン接種において観察される所見であり、程度も同程度であった。

以上のことから、本生物学的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ものと考えられる。

<別紙 検査値等略称>

略称	名称
CPE	細胞変性効果
ELISA	酵素免疫測定法
OIE	国際獣疫事務局
ORF	オープンリーディングフレーム
PBMC	末梢血単核球
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
PFU	プラーク形成単位

<参照>

- 1 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書: セルミューン N (未公表)
- 2 大橋和彦. “マレック病”、動物の感染症. 小沼操、明石博臣、菊池直哉、澤田拓士、杉本千尋、宝達勉編. 第二版、近代出版、2006, p205
- 3 真瀬昌司. “ニューカッスル病”、動物の感染症. 小沼操、明石博臣、菊池直哉、澤田拓士、杉本千尋、宝達勉編. 第二版、近代出版、2006, p202
- 4 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 添付資料: 起源又は開発の経緯 (未公表)
- 5 (財) 化学及び血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 添付資料: 概要 (未公表)
- 6 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 添付資料: 物理的、化学的試験 (未公表)
- 7 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 参考文献 4 (未公表)
- 8 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 参考文献 12 (未公表)
- 9 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 参考文献 17 (未公表)
- 10 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規程承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、別紙 15 (未公表)
- 11 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規程承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、別紙 20 (未公表)
- 12 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規程承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、別紙 19 (未公表)
- 13 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規程承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、別紙 23 (未公表)
- 14 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規程承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、別紙 18 (未公表)
- 15 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規程承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、別紙 2 (未公表)
- 16 OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 Volume 1 CHAPTER 2. 3. 13. MAREK'S DISEASE
http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/A_summry.htm
- 17 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 参考文献 4 (未公表)
- 18 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規程承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、別紙 29 (未公表)
- 19 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規程承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、別紙 28 (未公表)

- 20 最新 医学大辞典 第2版 医歯薬出版株式会社
- 21 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19年1月18日付け 府食第00050号): 動物用医薬品評価書 鶏マレック病 (マレック病ウイルス1型・七面鳥ヘルペスウイルス)凍結生ワクチン(クリオマレック(RISPENS+HVT))の再審査に係る食品健康影響評価について、2007年
- 22 食品安全委員会. 15 消安第6562号に係る食品健康影響評価の結果の通知について (平成16年3月25日付け 府食第358号の1(別添)): 鳥インフルエンザ不活化ワクチンを接種した鳥類に由来する食品健康影響評価について、2004年
- 23 食品安全委員会. 16 消安第31号に係る食品健康影響評価の結果の通知について (平成16年6月17日付け 府食第669号の1(別添)): 鶏伝染性気管支炎生ワクチン(“京都微研” ポールセーバーIB)の食品健康影響評価について、2004年
- 24 遺伝子組換え分泌型ヒト成長ホルモン製剤セロスティム注 5 mg 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 医療用医薬品の添付文書情報
http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/2412402D7027_1_09/
- 25 Glucose. THE MERCK INDEX Fourteenth Edition. 2006: 4459~4460
- 26 イーグルMEM 培地「ニッスイ」①
- 27 L-アルギニン、L-イソロイシン、myo-イノシトール、塩化カリウム、塩化カルシウム、コハク酸、コハク酸二ナトリウム、L-システイン塩酸塩、チアミン塩酸塩、L-チロシン、L-トリプトファン、L-トレオニン、ニコチン酸アミド、L-バリン、パントテン酸カルシウム、ビオチン、L-ヒスチジン塩酸塩、ピリドキシン塩酸塩、L-フェニルアラニン、L-メチオニン、葉酸、リボフラビン、硫酸マグネシウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、L-ロイシン. 第8版 食品添加物公定書解説書 廣川書店, 2007, D-112~114, 197~200, 201~203, 262~265, 266~268, 604~606, 608~610, 725~730, 1109~1114, 1128~1130, 1207~1210, 1216~1219, 1241~1243, 1310~1313, 1313~1317, 1319~1322, 1332~1335, 1385~1390, 1416~1419, 1618~1621, 1655~1660, 1687~1692, 1715~1721, 1757~1759, 1799~1802, 1802~1805, 1814~1815
- 28 Inositol. THE MERCK INDEX Fourteenth Edition. 2006: 4976
- 29 肝臓加水分解物製剤プロヘパール錠 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 医療用医薬品の添付文書情報
http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/3919101F1023_1_06/
- 30 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19年5月31日付け 府食第536号): 動物用医薬品評価書 カナマイシンの食品健康影響評価について、2007年
- 31 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日付け 府食第146号(別添1)): 牛伝染性気管支炎・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
- 32 (財)化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 添付資料: 安全性に関する試験 (未公表)

- 33 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 添付資料：臨床試験（未公表）
- 34 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 参考文献 10（未公表）
- 35 (財) 化学及血清療法研究所. 第一種使用規定承認申請書 ニューカッスル病ウイルス由来F蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型 207 株、生物由来技術部会指摘事項回答書 資料 5：参考資料 2（未公表）
- 36 (財) 化学及血清療法研究所. 動物用医薬品製造承認申請書 セルミューン N 参考文献 16（未公表）