

猫用3種混合生ワクチン中からのRD114ウイルスの 検出とその試行的安全性評価

成嶋理恵^{1)†} 笛吹達史²⁾ 小川 孝³⁾ 嶋崎智章³⁾

1) 農林水産省動物医薬品検査所 (〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1)

2) 鳥取大学農学部 (〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101)

3) 農林水産省消費・安全局 (〒100-8950 千代田区霞が関1-2-1)

(2010年2月15日受付・2010年3月24日受理)

要 約

猫内在性レトロウイルス (RD114ウイルス) はすべての猫の体細胞と生殖細胞内に内在化していることから、猫由来培養細胞を用いて製造される猫用混合生ワクチンに混入することが懸念される。最近、Miyazawa らはいくつかの猫用弱毒生ワクチンにRD114ウイルスが混入していることを報告した [*Journal of Virology*]。そこで、国内既承認ワクチンにおけるその混入状況をLacZマーカーレスキュー法によって調査した結果、供試ワクチン (4製剤, 計30製品) の30%から感染性RD114ウイルスが検出された。今回の報告はわれわれがワクチン中に感染性RD114ウイルスが存在することを実証したものである。これまでRD114ウイルスの猫に対する病原性およびRD114ウイルスの混入する当該ワクチンの接種による副作用については、いまだ明確ではない。また、同一のワクチンが製造販売されている欧米においても特段の規制措置は講じられていないことから、われわれは、現段階ではこれらのワクチンに対して緊急的な措置を講じる必要はないと結論付け、今後とも有用情報収集に努めることとした。

—キーワード：猫内在性レトロウイルス, 猫用生ワクチン, RD114ウイルス。

----- 日獣会誌 63, 630~633 (2010)

レトロウイルスは、その存在様式から外来性レトロウイルスと内在性レトロウイルスに大別される。猫に感染して病原性を有する外来性レトロウイルスとしては猫白血病ウイルス (FeLV) や猫免疫不全ウイルス (FIV) が知られている。いっぽう、ある種の外来性レトロウイルスが宿主の生殖細胞に感染し、その生殖細胞から発生する個体の遺伝子に組み込まれて宿主ゲノムの一部となったウイルスを内在性レトロウイルスと呼び、親から子へ遺伝していくことになる。内在性レトロウイルスのほとんどは変異などによって感染性を失って種間伝播も含めて水平感染することはないが、すべての猫の遺伝子に組み込まれているRD114ウイルス [1-3] は細胞感染性を有している。

一般にレトロウイルスは、生殖細胞内に内在化する過程で弱毒化または不活化される。しかし、最近、コアラの内在性レトロウイルス (KoRV) がコアラにリンパ腫や免疫抑制を起こすこと [4]、マウス由来のレトロウイルスであるXMRVが人の前立腺ガン発症と関係がある

こと [5] が報告され、内在性レトロウイルスが感染因子として注目されるようになってきた。また、非感染性の内在性レトロウイルスが感染性の外来性レトロウイルスと宿主体内で組換えを起こすことにより、病原性をもった感染性ウイルスが新たに出現することも猫やマウスで明らかになっている [6]。たとえば、猫は外来性のレトロウイルスである猫白血病ウイルス (外来性FeLV) に類似した内在性レトロウイルスのエレメント (内在性FeLV) をもっており、内在性FeLVには感染性はないが、外来性FeLVと組換えを起こして、病原性が高くなることが報告されている [6]。これらの既報等を勘案すると、内在性レトロウイルスであるRD114ウイルスを猫に接種することに対する安全性評価が必要である。

現在、わが国で製造販売が承認されている猫用ワクチンについて、猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、猫カリシウイルス、および猫汎白血球減少症ウイルスの各生ワクチン成分は、動物用生物学的製剤基準 (平成14年10月3日農林水産省告示第1567号) によると、すべて猫由

† 連絡責任者：成嶋理恵 (農林水産省動物医薬品検査所検査第一部)

〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1 ☎042-321-1841 FAX 042-321-1769 E-mail : narusima@nval.maff.go.jp

来培養細胞を用いて製造されている。したがって、これらの3種類の生ウイルス成分を含有する混合ワクチン（猫用3種混合生ワクチン）中に感染性RD114ウイルスが混入する可能性が考えられ、実際に宮沢ら [6] のグループはある種の猫用3種混合生ワクチンにRD114ウイルスが混入していることを2007年に総説ならびに2007年第144回日本獣医学会学術集会で報告している。また最近、Miyazawaら [7] は英国の研究グループと共同で、日欧で販売されている犬用ならびに猫用の生ワクチン中に感染性RD114ウイルスが混入していることを発表した。

そこでわれわれは、現在、国内で認可され、販売されている猫用3種混合生ワクチンの複数製品についてRD114ウイルスの混入状況を感染性RD114ウイルスを検出する手法であるLacZマーカーレスキュー法 [8] によって調査し、また、その販売および副作用の発生状況に基づいた猫への安全性に関する評価を試みた。

材料および方法

供試ワクチン：2006年度から2008年度までの3年間にわが国で販売された猫用3種混合生ワクチン4製剤、計30製品を供試した。

感染性RD114ウイルスの検出：猫用3種混合生ワクチン中の感染性RD114ウイルスの検出は、Sakaguchiら [8] が開発したLacZマーカーレスキュー法に準拠して行った。すなわち、凍結乾燥されたワクチン5用量を用法および用量に従い、それぞれ1mlの注射用精製水で溶解し、プールした。これを1mlずつ5穴のLacZ遺伝子導入TE671細胞（TE671（LacZ）細胞）に接種後、37℃にて培養し、3回継代培養を行った後、培養上清を回収した。得られた培養上清を、TE671細胞およびRD114ウイルス持続感染TE671細胞（TE671/RD114細胞）に接種して、さらに2日間培養後、それぞれの培養細胞をX-gal染色した。感染性RD114ウイルスの産生の有無については、青色に染色された陽性細胞の存在を確認し、TE671細胞のみX-gal染色陽性の場合を感染性RD114ウイルス産生ありと判定した。

また、ワクチン中のRD114ウイルスの混入の有無を別の手法によって確認するため、3代継代後の培養細胞からゲノムDNAを抽出して、RD114ウイルスの*env*遺伝子、*pol*遺伝子のPCR検査もあわせて行った。

猫用3種混合生ワクチンの副作用報告に関する過去5年間の集計：薬事法の規定に基づく副作用等の報告（製造販売業者、獣医師等の農林水産大臣への義務的な報告）により、猫用3種混合生ワクチン4製剤について、2003年9月からの獣医師による副作用報告制度開始以降、2008年11月までの間の報告について、副作用の発生状況とその後の転帰（回復、死亡）を調べ、かつRD114

表1 LacZマーカーレスキュー法による猫用3種混合生ワクチンからのRD114ウイルス検出成績

ワクチンの製造年度 (全ロット数)	陽性ロット数/調査ロット数 (陽性率)
2006年度 (10ロット)	2/10 (20%)
2007年度 (15ロット)	5/14 (35.7%)
2008年度 (9ロット)	2/6 (33.3%)
計	9/30 (30%)

ウイルスに起因している可能性の有無について調査した。

成 績

表1に示したとおり、2006年度に販売された10製品中2製品から、2007年度に販売された14製品中5製品から、2008年度に販売された6製品中2製品から、それぞれ感染性RD114ウイルスが検出された。また、陽性検体のすべてについて、PCR法で培養細胞中から、RD114ウイルスの*env*遺伝子、*pol*遺伝子をいずれも検出したが、陰性検体についてPCR法で遺伝子は検出されなかった。X-gal染色陽性細胞が認められたワクチンについて、1用量を1mlの注射用精製水で溶解後、これをさらに2倍に希釈して調べると、感染性RD114ウイルスが検出されるが、4倍に希釈すると検出されなくなることから、本ウイルスの混入量は4FFU/dose未満と推定され、きわめて微量と考えられた。年度別の陽性率はそれぞれ20%、35.7%、33.3%であり、製造年月日の新しい製品は検出率が高い傾向があった。

猫用3種混合生ワクチンによる副作用報告は、2003年9月から2008年11月までの間に計26件あり、そのうち回復例は7件、死亡例が19件であった。同時期における猫用不活化ワクチン（3種混合に限らない）による副作用報告は59件あり、そのうち回復例は25件、死亡例は34例であった。猫用不活化ワクチンによる副作用の発生状況やその内容を比較するとともに、猫用3種混合生ワクチンによる副作用報告のいずれの事例も背景情報等を勘案すると、ワクチン接種時における一般的な副反応と見られ（アナフィラキシーショック、嘔吐、発熱、顔面の腫脹等）、RD114ウイルス感染に起因するものとは考えられなかった。接種部位が腫脹したという報告が3例あったが、うち2例は接種後170時間未満での発生であり、RD114ウイルスに起因するものではないと考えられた。残りの1例についてはワクチン接種部位に発生した線維肉腫である可能性が高いと思われた。なお、表2に示したように2004年から2007年までの4年間に猫用3種混合生ワクチン（4製剤）の製造販売数量は、薬事法上の医薬品等の取扱数量の届出（製造販売業者および製造（輸入販売）業者の農林水産大臣への毎年

猫用生ワクチンからのRD114 ウイルスの検出

表2 2004～2007年における猫用3種混合生ワクチン接種に伴う副作用の種類とその出現頻度

副作用の種類	調 査 年				合 計
	2004年	2005年	2006年	2007年	
アナフィラキシー	1 (0) ^{※2}	0	4 (3)	1 (1)	6 (4)
元気消失・食欲不振・嘔吐・発熱	1 (0)	0	8 (6)	4 (4)	13 (10)
接種部位の病変	0	0	2 (2)	0	2 (2)
不明	0	0	0	1 (1)	1 (1)
副作用報告合計 (件)	2 (0)	0	14 (11)	6 (6)	22 (17)
販売数量 (ドーズ) ^{※1}	626,390	407,340	626,220	578,970	2,238,920
副作用出現率 (%)	0.00032	0	0.00224	0.00104	0.00098
推定副作用の出現確率 (頭数)	1/313,195	0	1/44,730	1/96,495	1/101,769

※1 規制当局の指示 (動物用医薬品等取締規則第81条の規定) に基づく製造販売業者等からの報告数量 (「動物用医薬品, 医薬部外品及び医療用具生産 (輸入) 販売高年報: (株)日本動物用医薬品協会出版」)

※2 () 内は, うち死亡頭数を表す。

の報告) によると, 合計で2,238,920 ドーズであり, この間の副作用報告数は合計22件であったので, 副作用出現頻度はおおむね0.00098% (およそ101,769頭に1頭の割合) と推定された。

考 察

今般, 2006年度から2008年度にかけて国内で販売された猫用3種混合生ワクチン4製剤, 計30製品について, RD114 ウイルスの混入状況の調査をLacZ マーカーレスキュー法によって実施したところ, 全体の30%の被検ワクチンから感染性RD114 ウイルスが検出された。しかし, その推定混入量は, 4FFU/dose 未満と微量であった。なお, 製造用に猫由来培養細胞を用いているにもかかわらず, RD114 ウイルスが検出されなかったワクチンは, RD114 ウイルスが混入していなかったのではなく, 混入量が本法の検出限界以下であったものと考えられた。また, 今回調査を行った最近3年間に販売された製品においては, 毎年陽性製品が確認されたことから, 猫用3種混合生ワクチンが販売され始めた1985年から, おそらく感染性RD114 ウイルスがワクチン中に混入していたことが推察された。したがって, 当該ワクチンが使用されるようになった以降, 感染性 RD114 ウイルスが, ワクチンを介して長年に亘って猫に接種されていることが示唆された。

これまでにRD114 ウイルスを実験的に猫に接種した報告はなく, RD114 ウイルスを外部から接種したときに猫の体内でどのような動態を示すかのよくわかっていない [6]。そこで, われわれは, ①RD114 ウイルスは, すべての猫の生殖細胞および体細胞に内在化しているウイルスである, ②RD114 ウイルスの猫に対する病原性に関する報告は, これまでにまったくない, ③猫用生ワクチン中にRD114 ウイルスが混入することによるリスクは不明である, ④当該ワクチンが製造・販売されている欧米においては, 本件に対する規制措置は講じら

れておらず, さらなる情報収集に努めることとされている, ⑤猫用3種混合生ワクチンの副作用報告において, RD114 ウイルスに起因すると考えられる事例は認められなかった, ⑥現在の技術では, 製造工程中におけるRD114 ウイルスのクリアランス技術は確立されておらず, 除去が困難である, ⑦RD114 ウイルスが絶対に産生・分泌されない猫由来培養細胞は理論的にないと考えられる。また, RD114 ウイルスの出芽が人為的に阻害された猫由来培養細胞も確立されていない, という①～⑦の事実関係に基づき, 猫3種混合生ワクチンに混入するRD114 ウイルスの猫への安全性を評価することを試みた。そして, 現時点における基本的な対処方針をとりまとめた。

これらのことから, 現段階では猫3種混合生ワクチンの使用に関して特段のリスク管理措置を講じる必要はなく, 今後とも関連情報の収集に努める必要があり, また, RD114 ウイルスの病原性等に関する新たな情報が得られた際には, 再度検討する必要があるとの見解をとりまとめた。なお, この取扱い方針は薬事・食品衛生審議会薬事分科会動物用医薬品等部会に報告され, 了承された。

LacZ マーカーレスキュー法 [8] による今回のわれわれの実験において, その製造に猫由来培養細胞を用いて製造されるワクチンには感染性RD114 ウイルスが混入することが明らかとなった。この報告は, われわれがワクチン中に感染性RD114 ウイルスが存在することを実証したものである。なお, 犬用生ワクチンの一部にも猫由来培養細胞を用いて製造されている製剤があり, それらにRD114 ウイルスが混入していることが予想され, 実際にMiyazawaら [7] は犬用生ワクチンにもRD114 ウイルスが存在することを報告している。犬に対して, RD114 ウイルスは外来性レトロウイルスとなるが, 犬に対する感染性や感染した場合の病原性については不明である。したがって, 早急に国内で販売されている犬用

生ワクチンにおけるRD114ウイルスの混入状況について同様に調査する必要がある。そして、犬に対するRD114ウイルスの感染性および病原性も調べた上で、RD114ウイルスの犬に対する安全性評価を行う必要があると考えられた。

稿を終えるにあたり、ワクチン中のRD114ウイルスの混入状況調査に際して、関連細胞の分与および技術伝達をいただいた京都大学ウイルス研究所細胞生物学研究部門信号伝達学研究分野宮沢孝幸准教授に深謝する。

引用文献

- [1] Fischinger PJ, Peebles PT, Nomura S, Haapala DK : Isolation of RD-114-like oncornavirus from a cat cell line, *J Virol*, 11, 978-985 (1973)
- [2] Gifford R, Tristem M : The evolution, distribution and diversity of endogenous retrovirus, *Virus Genes*, 26, 291-315 (2003)
- [3] McAllister RM, Nicolson M, Gardner MB, Rongey RW, Rasheed S, Sarma PS, Huebner RJ, Hatanaka M, Oroszlan S, Gilden RV, Kabigting A, Vernon L : C-type virus released from cultured human rhabdomyosarcoma cells, *Nat New Biol*, 235, 3-6 (1972)
- [4] Tarlinton RE, Meers J, Young PR : Retroviral invasion of the koala genome, *Nature*, 442, 79-81 (2006)
- [5] Dong B, Kim S, Hong S, Das Gupta J, Malathi K, Klein EA, Ganem D, Derisi JL, Chow SA, Silverman RH : An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 104, 1655-1660 (2007)
- [6] 宮沢孝幸, 岡田雅也, 馬場健司 : 内在性レトロウイルスとワクチン, *獣畜新報*, 60, 722-730 (2007)
- [7] Miyazawa T, Yoshikawa R, Golder M, Okada M, Stewart H, Palmarini M : Isolation of an infectious endogenous retrovirus in a proportion of live attenuated vaccines for pets, *J Virol*, 84, 3690-3694 (2010)
- [8] Sakaguchi S, Okada M, Shojima T, Baba K, Miyazawa T : Establishment of a LacZ marker rescue assay to detect infectious RD114 virus, *J Vet. Med Sci*, 70, 785-790 (2008)

Detection of Infectious RD114 Virus in Feline Live Multivalent Vaccines and Provisional Safety Evaluation in Cats

Rie NARUSHIMA^{*†}, Tatsufumi USUI, Takashi OGAWA and Tomoaki SHIMAZAKI

** Assay Division I, National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1 Tokura, Kokubunji, 185-8511, Japan*

SUMMARY

An infectious endogenous retrovirus termed the RD114 virus is present in the genome of domestic cats, and as such has the potential to contaminate feline live attenuated vaccines manufactured using feline cells for cultivation. Recently, Miyazawa et al. reported that infectious RD114 viruses were present in certain live attenuated vaccines [*Journal of Virology*]. In this study, we attempted to confirm the presence of the virus in feline live multivalent vaccines (four products, 30 batches) approved in Japan by the LacZ marker rescue assay. Thirty percent of the vaccines tested were found to be positive for the infectious RD114 virus. This report confirms the presence of infectious RD114 virus in feline vaccines under the present experimental design. The pathogenicity of the RD114 virus and the adverse effects on cats of inoculation with feline live attenuated vaccines are unknown at present. Nevertheless, the same vaccines have been sold in European countries and in the United States. As the regulatory authority of Japan, we have decided not to take urgent action, such as banning the sale of vaccines containing the RD114 virus, and will continue to collect information about the virus and monitor any issues that may arise.

—Key words : Feline endogenous retrovirus, live vaccines for cats, RD114 virus.

† Correspondence to : Rie NARUSHIMA (Assay Division I, National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

1-15-1 Tokura, Kokubunji, 185-8511, Japan

TEL 042-321-1841 FAX 042-321-1769 E-mail : narusima@nval.maff.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 630-633 (2010)