

でも減少しても粒子径の増大が認められた。最も強度が高いPLL（分子量22,400）2回処理のAPAマイクロカプセルは、PLL1回処理のどのAPAマイクロカプセルよりも粒子径が小さく400-450 μmであった。このAPAマイクロカプセル作製に伴う粒子径の増大は、クエン酸処理時に観察される現象であることから、カプセル内部のアルギン酸ゲルの溶解により生じた浸透圧のため、カプセル内部へ水が流入することに起因すると考えられる。

次に直径2 mmのアルギン酸ビーズから作製した各APAマイクロカプセルを用いて、PLLの分子量とAPA膜の物質透過性の関係について検討を行った。3種類のタンパクいずれにおいても、PLLの分子量が増大するにつれてカプセル内への透過タンパク量は減少することが観察され、透過性は用いるPLLの分子量により制御できることが示唆された。またPLL（分子量22,400）2回処理のAPAマイクロカプセルは、同分子量のPLL1回処理のAPAマイクロカプセルよりも物質透過が制限されたが、抗体分子等の高分子物質の透過を完全に阻止することはできなかった。しかし本検討の結果は、今後PLLの分子量や処理回数を詳細に検討することで、細胞が分泌する生理活性物質や、酸素、二酸化炭素あるい

は栄養物、老廃物などは自由に透過し、免疫反応に関与する高分子量の抗体、補体などの透過を阻止できる免疫隔離性に優れたAPAマイクロカプセルを作製できる可能性を示している。

APAマイクロカプセルを生体に投与するにあたり、物理的安定性が高くても生体適合性が欠けていれば生体に適用することは困難である。そこで物理的安定性の高いPLL（分子量22,400）2回処理のAPAマイクロカプセルを用い、生体適合性を検討したところ、投与後1、2、3ヶ月後のいずれにおいても投与量の70%以上のカプセルがマウス腹腔内から回収された。この結果は、投与直後での回収率が約80%であることを考慮すると、ほぼすべてのAPAマイクロカプセルが腹腔内で安定に存在していたと思われる。またマウス腹腔内には破壊されたカプセルは見あたらず、回収されたカプセルはすべてintactな状態であった。さらにカプセル表面への炎症性細胞の付着も観察されず、このAPAマイクロカプセルは少なくとも3ヶ月間は生体内で安定に存在している事が確認された。このようにホストの炎症反応を惹起しないAPAマイクロカプセルは極めて生体適合性に優れていることが判明した。

表1. APAマイクロカプセルの生体適合性

移植後日数	回収率 (%)	細胞接着の有無
0	83.3±10.4	-
30	75.0±10.0	-
60	85.0±13.2	-
90	73.3± 2.9	-

- : no change ± : mild + : severe

(2) APA-SK2細胞の増殖

以上の検討によりAPAマイクロカプセルの特性が明らかとなったので、次にAPAマイクロカプセル内でのSK2細胞のviabilityをin vitroで検討した。カプセル内の全SK2細胞数は培養期間を通して増加したが、生細胞数は20日目以降一定で、カプセル300μlあたり約 5×10^6 個であった。これは、静置培養であったために細胞密度の上昇に伴ってカプセル内での物質交換が良好に行われなくなり、カプセル中心部付近の細胞が死滅したためであろう。この結果より、APAマイクロカプセル内でSK2細胞は生存・増殖することが可能であり、APA-SK2細胞がSK2抗体の薬物キャリアーとして機能し得ることが示唆された。

(3) 細胞性製剤としてのAPA-SK2細胞の有効性

APAマイクロカプセル内でのSK2細胞の生存性が確認できたためhIL-6 Tgmを用いてAPA-SK2細胞の細胞性製剤としての有効性を検討した。hIL-6 Tgm

の14週齢における病理組織像を観察したところ（表2）、

無処置群では腎糸球体においてメサンギウム基質の過形成およびメサンギウム細胞の増殖が観察されたのに対し、APA-SK2細胞投与群ではほとんど変化を認めなかった。また無処置群の脾臓とリンパ節ではプラズマ細胞の過増殖が、肝臓、腎臓ではプラズマ細胞の浸潤が認められたが、これらはAPA-SK2細胞投与により抑制された。このようにhIL-6 Tgm特有の糸球体腎炎、IgG1プラズマサイトーシスをAPA-SK2細胞投与により顕著に抑制することができた。この効果はカプセルに封入していないSK2細胞（MHC haplotype：H-2d）投与群では観察されず、カプセルに封入することによりホスト（hIL-6 Tgm, MHC haplotype：H-2b）の免疫系からSK2細胞が隔離されていることを示唆している。また、APA-SK2細胞投与群では無処置のhIL-6 Tgm

表2. ヒトIL-6トランスジェニックマウスの14週齢における病理組織学的所見

病変部位と組織傷害	hIL-6 Tgm				SK2細胞投与					APA-SK2細胞投与				
肝臓														
プラズマ細胞の浸潤あるいは増殖	++	+	++	+	+	+	++	+	+	+	±	-	-	-
好中球の浸潤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
腎臓														
糸球体														
腫大	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±	±	±	-	-
メサンギウム基質の過形成	+	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
メサンギウム細胞の増殖	++	++	+	+	+	+	+	±	+	+	±	±	±	±
尿管														
硝子円柱の形成	+	±	++	±	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-
硝子滴の形成	++	-	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
間質組織														
プラズマ細胞の浸潤	±	±	+	+	±	+	+	-	-	+	-	-	-	-
好中球の浸潤	+	±	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	-	-
脾臓														
プラズマ細胞の増殖	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+	+	+	+
好中球の増殖	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	±	±	-
鼠径部リンパ節														
プラズマ細胞の増殖	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
好中球の浸潤	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

--: no change ±: very slight +: mild ++: moderate +++: severe

と比較して、12週間以上の延命効果も観察された。本研究では、物理的安定性、生体適合性に優れたAPAマイクロカプセルを用いた細胞性製剤が、生理活性物質のin vivo長期デリバリーの薬物担体として非常に有効であることが判明した。しかし、今回行った本システムは、細胞が生体内で生存している限り生理活性物質をデリバリーし続ける事ができるという点において、細胞を応用した単なる徐放性製剤にすぎず、これは細胞性製剤の特徴の一部分でしかない。我々の指向する細胞性製剤はin vivoにおいてマイクロカプセル外の生体情報に対応してカプセル内の細胞が生理活性物質の合成・分泌の制御を自動的に行う、いわゆるセンサー機能等の制御機能を駆使できる点にある。このような種々の機能を有する細胞を封入したマイクロカプセルは、まさしくDDSにかなう細胞性製剤であり、必要なときに必要な量の生理活性物質（医薬品）を徐放してくれる。この目的を達成するためには、細胞にセンサー機能等を付与するための技術が必要である。近年我々の研究室ではセンダイウイルスが細胞に感染する機構に学び、その天然様式を応用した膜融合リポソームを開発した。膜融合リポソームはウイルスベクターの持つ高い遺伝子導入効率と、非ウイルスベクターの持つ安全性を合わせ持ったハイブリッドベクターであり、リポソーム内に封入できるものであれば、遺伝子、生理活性タンパク質等、どのような物質でも細胞内へ効率よく直接導入することが可能である。現在、本膜融合リポソームをはじめとする様々な手法により、カプセル内へ封入する細胞にセンサー機能等のDDS製剤の機能を付与するための検討を行っている。冒頭でも述べたように、DDSを生体内で理想

的に遂行している「細胞」に学び、その機能を利用した「細胞性製剤」は生きたDDS製剤そのものであり、生きていたが故に生体の有機的連関のもとに機能し、ホメオスタシスを乱すことなく薬物の長期デリバリーを行うことが可能となる。究極の薬物療法、「細胞性製剤」が実現可能となれば、今後21世紀に向けて治療薬の概念は飛躍的に発展していくものと思われる。

D. 結論

1. アルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルはポリ(L)リジンの分子量をそれぞれ変化させることで、物質透過性・強度等の特性が異なる高分子担体の調製が可能であることを明らかとした。また、カプセル強度に主眼をおいたAPAマイクロカプセルの改良として、その調製段階でポリ(L)リジンおよびアルギン酸による処理を2回ずつ行う方法を提示し、従来よりも強度に優れたAPAマイクロカプセルの調製に成功した。今後、より詳細な調製条件の検討あるいは他の物質による修飾方法の探索を行うことで、固定化細胞の産生・分泌する生理活性物質の分子サイズ、あるいは固定化細胞の生体への投与部位等に合わせた最適な高分子担体の選択が可能であることが示唆された。2. 抗ヒトインターロイキン-6モノクローナル抗体産生細胞 (SK2細胞) をAPAマイクロカプセルに封入することで、宿主免疫系から隔離でき得ること、また高分子担体に封入したSK2細胞を腹腔内に投与することで、ヒトインターロイキン-6トランスジェニックマウスのIgG1プラズマサイト

ーシスなどの発症抑制と、それに伴う生存日数の延長が達成されることを明らかとした。これは、生理活性物質を産生・分泌する細胞自身を疾病治療に応用可能であることを示しており、細胞性製剤ともいべき新規投与剤形を提示することができた。

E. 研究発表

1. Mizuguchi H., Nakagawa T., Toyosawa S., Nakanishi M., Imazu S., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Ijuhin N., and Mayumi T. : Tumor necrosis factor alpha-mediated tumor regression by the in vivo transfer of genes in to the artery that leads to tumors., *Cancer Res.*, in press.
2. Yoshioka T., Okada N., Miyamoto H., Sakamoto K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Miyazaki J., Mayumi T., : Possibility of cytomedical therapy for diabetes melitus using microcapsulated pancreatic β cell line with glucose sensor., *Drug Delivery System.*, 13 : 95 - 100, 1998.
3. Suzuki R., Nakagawa T., Mizuguchi H., Imazu S., Nakanishi T., Nakagawa S., Nakanishi M., and Mayumi T. : The optimization of cytoplasmic gene expression system with T7 RNA polymerase., *Drug Delivery System*, 13 : 87 - 93, 1998.

F. 参考文献

1. Lim, F., Sun, A. M. : Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210 : 908-910, 1980.
2. Sun, A. M. : Microencapsulation of pancreatic islet cells: a bioartificial endocrine pancreas. *Methods Enzymol.* 137 : 575-580, 1988.
3. Ohe, Y., Podack, E., R., Olsen, K., J., Miyahara, Y., Miura, K. et al. : Interleukin-6 cDNA transfected Lewis lung carcinoma cells show unaltered net tumour growth rate but cause weight loss and shorten survival in syngenic mice. *Br. J. Cancer* 67 : 939-944, 1993.
4. Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N. et al. : IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 7547-7551, 1989.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

トランスジェニック動物／クローン動物を利用して製造した医薬品の安全性評価に
関する研究

トランスジェニック動物／クローン動物作成維持管理評価技術

（分担） 研究者 黒澤 努 大阪大学医学部附属動物実験施設 助教授

研究要旨

トランスジェニック動物／クローン動物を利用して医薬品を製造しようとする動きが急となってきた。しかしこれらの動物は従来存在せず、また具体的に動物を用いたヒトの医薬品の開発は従来希であった。したがってこれら動物を利用して製造する際の安全性評価をどのように行うかが課題となっていた。研究分担者はその中でもとくにこうした動物を安定的に作成維持管理評価する技術をどのように確立すべきかにつき考察した。医薬品における安全性はすでに化合物については確立されているので、動物を用いた医薬品も化合物としては同様に安全性を確保するのが適当である。本研究では完成した医薬品の安全性ではなく、それを作成するための動物の安定的な作成維持管理、その中でもとくに品質管理の困難なそれら動物の微生物学的管理を中心に考察した。

分担研究者氏名：黒澤努

所属施設：大阪大学医学部附属動物実験
施設

職名：助教授

早川班の報告書などが公開されている。さらに多数の関連ドキュメントがWeb上で公開されている。こうした公開情報および学術文献を渉猟し、適切な製造用動物の品質安定性をとりまとめる。

A. 研究目的

医薬品を製造する目的で用いられるトランスジェニック動物／クローン動物の作成維持管理をとくに微生物学的な品質管理面から考察する。また関連ガイドライン作成時に考慮すべき項目を考察する。

B. 研究方法

医療用品を製造する目的の動物の品質管理に関しては米国FDAのガイドライン、通達、厚生科学研究費、中村班の議事録、

C. 研究結果

作成：医薬品を製造する目的で用いられるトランスジェニック動物／クローン動物の作成は特別な方法で行うことは現在想定できないとされる。またその作成方法の違いにより、その後の医薬品の品質に影響を与える様な要素は想定が困難であり、これは実際に生産された医薬品そのものの品質評価により行うべきものと考えられている。

維持：遺伝学的品質についてはすでに実験動物において行われている遺伝モニタリングの方法を用いて品質の維持が可能であるとされる。ただし従来の畜産目的で行われていた遺伝学的な統御方法は医薬品製造の目的では十分とは思われない。実験動物学的に確立された遺伝学的モニタリングより、さらにきめの細かいモニタリングが必要である。すなわち特定の遺伝子が発現しているかいないかの確認をサザンブロット法、PCR法などを用いて行う。現在のところ生殖細胞にうまく組み込まれた遺伝子は適切な交配計画を用いることにより、従来の実験動物学で確立された方法を用いると失うことは希とされる。

微生物：動物の品質維持でもっとも困難なのが微生物学的統御である。すでに動物を用いた医療用具等（異種移植用組織片）に適用された指針を医薬品製造にも適用する必要がある。実際に製造の用に供される動物の一代前の親動物から微生物学的品質は現行の実験動物に適用されるSPF以上とする。また微生物統御は動物飼育方法と密接に関連することから、動物飼育施設自体が基準に適合したものが要求される。

FDAでは米国動物施設認定協会（AAALAC International）により認定された施設に動物を飼育するものとしている。さらにこれらを管理するためには実験動物医学認定医、および相当数の資格をもつ実験動物技術者の配置が欠かせない。その上で実際の動物飼育管理SOPを製造機関で作成し、それに基づいた管理が行われる必要がある。またこうした厳格な微生物統御は医薬品の品質だけでなく作成された動物の個体維持のために

も必要である。またこうして作成された動物は極めて貴重な資源となるため、遺伝子保存の意味から、胚、精子、卵子あるいは細胞などを凍結保存して維持することが望ましい。

D. 考察

医薬品を製造する目的で用いられるトランスジェニック動物／クローン動物の作成維持管理は種々の項目を十分に考慮して行うことによってのみ安全性の高い医薬品の製造が行い得る。その中でもとりわけ微生物学的安定性は重要な要素となる。

現実の問題としてモニターしなければならない病原体は多岐に渡り、200以上の微生物がすでに人獣共通感染症の病原体として知られている。これら全てをモニターするのは非現実的であるから、動物の清浄化を行って、厳格な微生物統御を行うことが望まれるのである。

微生物統御にあたって重要なものとしては1、従来から家畜で知られている人獣共通感染症原因微生物、2、清浄化によっても統御が困難な微生物、および3、新たに発見された、あるいは今後発見される新興感染症の原因となるもの等に分類できる。1としては炭素、ブルセロ、サルモネラ、ブタ丹毒、結核、コクシエラブルネチー（Q熱原因菌）、トキソプラズマ、各種寄生虫などがある。これらのほとんどは食品衛生上の問題から多くの家畜では駆除されている。2としてはレトロウイルス、トキソプラズマ、等が問題となろう。3としてはスクレーピー、プリオンがとくに注目される。これは2にも分類すべきものであるが、その発症が地域限定であることから、正常域

由来の動物を使用することで防止は可能とされる。しかし新興の感染症はその発生、病原性を特定するには時日を要する事から、関連情報の収集が最大の予防法とならざるを得ない。

Consider: FDA)

いずれにせよ、新種の医薬品の製造に当たっては、Risk&Benefit のバランスを考慮することが重要であるとされ、また実際の臨床的な適用後は追跡調査などにより、データを蓄積してゆくことが求められている。こうして遺伝子操作をした動物により製造される医薬品の安全性の確保の基盤がより強化されることとなる。今後は実験動物医学認定医など人獣共通感染症の専門家の協力を得て詳細な人獣共通感染症のモニタープログラムを作成する事が期待されている。

E. 結論

医薬品を製造する目的で用いられるトランスジェニック動物／クローン動物の作成維持管理は基準に適合した動物施設において十分な数の有資格者により行われる必要がある。

F. 研究発表

1, 論文発表

池田卓也、黒澤努 実験動物施設の査察—AAALAC の認定申請書式—、実験動物と環境 6(2):1-30. 1998

G. 参考資料:

<http://hayato.med.osaka-u.ac.jp/index/vet-j/zoonosis-j/20.html>

トランスジェニック動物由来の医薬品の製造と試験のための留意点 (Points to

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

トランスジェニック動物・クローン動物を利用した医薬品の
安全性評価に関する研究

分担研究者 豊島 聡 星薬科大学教授

研究要旨 ヒト型抗体を産生するトランスジェニックマウスは、マウス免疫グロブリン遺伝子を破壊したノックアウトマウスとヒト免疫グロブリン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを交配することにより作製する。従って、目的遺伝子を導入したトランスジェニック動物が産生する物質をそのまま医薬品に応用する場合とは異なり、トランスジェニックマウス由来ヒト型抗体の医薬品としての試験や評価にあたっては交配前のノックアウトマウスとトランスジェニックマウスについても考慮する必要がある。本研究ではこの点を中心に検討・考察した。

A. 研究目的

ヒト型のタンパク質をトランスジェニック動物に生産させて医薬品として応用しようとする時、ヒトの遺伝子を導入した動物も同様の活性を有するタンパク質を生産している場合がほとんどであるが、これをヒト型タンパク質と分離することは困難であることが多い。しかし、医薬品としての異種タンパク質の静注などによる投与は免疫応答を惹起するため、複数回の投与は危険である。そこで、このような場合には目的遺伝子を導入する動物に存在する類似活性物質の遺伝子を破壊する必要がある（ノックアウトマウスの作製）。

最近、作製されたヒト型抗体を産生するトランスジェニックマウスはその典型的な例であり、マウス免疫グロブリン遺伝子が破壊されヒト免疫グロブリン遺伝子が導入されている。ヒト免疫グロブリン産生マウ

スの作製法は添付資料（「ヒトの抗体を作るトランスジェニックマウス」西義介、日経サイエンス 1995年6月号）にある通りであるが、概略は以下の通りである。まず、マウス免疫グロブリンのH鎖及びL鎖（ κ 鎖と λ 鎖の2種類）の遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製し、これらを交配することにより免疫グロブリンを産生しないノックアウトマウスを調製する。一方、ヒト免疫グロブリンのH鎖及びL鎖（ κ 鎖）の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、これらを交配することによりマウス型に加えヒト型の免疫グロブリンを産生するトランスジェニックマウスを調製する。最後に免疫グロブリンを産生しないマウスとヒト免疫グロブリンを産生するマウスを交配することによりヒトの抗体を作る（マウスの抗体は作らない）トランスジェニックマウスが完成する。

ヒトの抗体を作るトランスジェニックマウスの作製には3種類のノックアウトマウス（H鎖、 κ 鎖、 λ 鎖の遺伝子が破壊されたもの）と少なくとも2種類のトランスジェニックマウス（H鎖、 κ 鎖の遺伝子を導入したもの、実際にはH鎖の遺伝子は大変大きいので全体を導入したトランスジェニックマウスを作製することは難しいのでトランスジェニックマウスは断片化したH鎖遺伝子の異なる断片を導入した複数と成る可能性がある）が必要であり、目的遺伝子の導入のみによって目的とする医薬品を生産するトランスジェニック動物を作製できる場合とは異なっている。そこで、トランスジェニック動物に製造させた製品について、医薬品製造の観点から品質、有効性、安全性を確保するために必要な試験方法や評価方法を検討するにあたり、ヒトの抗体を作るトランスジェニックマウスについてはこの動物に特有な事項を考慮する必要がある。

このような状況に鑑み、本分担研究では、目的医薬品を産生するトランスジェニック動物の作製過程においてノックアウト動物を調製する必要のある場合に特有な事象、状況を中心に把握し、医薬品製造の観点から、製造に利用される動物を作製、育成、維持するうえでの留意事項及び製品の品質や安全確保に必要な評価技術に関する検討を行うとともに、ガイドライン等を作製するための基礎的研究を行った。

B. 研究方法

遺伝子のターゲッティング（破壊）を伴って作製されたトランスジェニック動物に関連する公表論文及び医薬品製造の観点か

らの安全性に関する情報、米国FDAやEU CPMPの基準、我が国における関連ガイドラインなどを参考に、標的遺伝子の破壊を伴い作製されたトランスジェニック動物を応用して製造する医薬品の品質及び安全性確保に必要な諸要素を明らかにし、その評価方法について検討した。

C. 研究結果及び考察

c.1 標的遺伝子破壊を伴い作製されたトランスジェニック動物を用いた医薬品開発の現状

現在、医薬品の製造を目的に開発された遺伝子破壊を伴ったトランスジェニック動物として知られているのはヒトの抗体を作るトランスジェニックマウスがある。

既に米国のベンチャー企業2社からヒトの抗体を作るトランスジェニックマウスについては報告があるが、このマウスの作製には標的遺伝子の破壊という通常のトランスジェニック動物の作製には含まれなかった過程が含まれており、製造された医薬品の品質、安全性、有効性を確保するためにどのような試験とデータが必要であり、どのような評価方法が適正であるかについて慎重に検討する必要がある。

c.2 ヒト抗体産生トランスジェニックマウスを利用して生産される医薬品（抗体）の品質、安全性等確保に必要な諸要素及び評価にあたって考慮すべき要件

製造面で留意すべき主な事項としては以下のような項目が挙げられる。

- 1) 遺伝子導入構成体の構築と特性解析（トランスジェニックマウス作製のために導入するヒト免疫グロブリン遺伝

子構成体及びマウス免疫グロブリン遺伝子破壊のために導入する遺伝子構成体)、2) 初代ヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスの作出と特性解析(ヒト免疫グロブリン遺伝子導入トランスジェニックマウス及びマウス免疫グロブリン遺伝子を破壊したノックアウトマウスの作出と特性解析、これらのマウスからの初代ヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスの作出と特性解析)、3) トランスジェニックマウスの保存、継続的維持・供給体制の確立、4) 生産用トランスジェニックマウスの作製と選別、5) トランスジェニックマウスの維持管理、6) トランスジェニックマウスからの抗体の採取、精製、製品化、など。製品の試験、評価などで留意すべき主な事項は、1) 製品の特性・品質解析、2) プロセス評価、工程内管理試験、3) 規格の設定、4) 製品の安定性評価、5) 非臨床安全性等試験及び臨床試験、など。

c. 2. 1 遺伝子導入構成体の構築と特性解析

ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作出に用いる遺伝子導入構成体には発現を目的としたヒト免疫グロブリン遺伝子構成体とマウス免疫グロブリン遺伝子破壊のための遺伝子構成体がある。これら遺伝子導入構成体の構築と特性解析に関してその詳細を明確にすべき主な項目は他のトランスジェニック動物作出時に明確にすべき項目とほぼ同様であるが、ヒト免疫グロブリン遺伝子は大変大きいため、その導入に

はYACベクターを用いる。YACベクターの塩基配列をすべて明らかにすることは大変な作業であり、ヒト型抗体産生トランスジェニックマウスの抗体医薬品開発への応用を妨げることになりかねないので、YACベクターの塩基配列を含む特性解析の必要性については検討の余地が有る。また、マウス免疫グロブリン遺伝子破壊に用いる遺伝子構成体に関連してつけ加えた方がよいと思われる項目があり、それを以下に挙げる。

- 1) トランスジェニックマウス及びノックアウトマウスに導入された遺伝物質の構成成分(目的遺伝子、人工染色体等遺伝物質の構成成分)すべてについて、その由来をあきらかにする。目的遺伝子(標的遺伝子破壊のための遺伝子)については、構築手順、増幅法及び精製法を詳細に記載する。その他の構成成分についても特記することがあれば明らかにする。塩基配列、構築や精製を含む調製法の妥当性、適格性についても明らかにする(標的遺伝子破壊のための遺伝子構成体については遺伝子破壊との関係を含めて詳細に記載する)。
- 2) ノックアウトマウスに導入された標的遺伝子破壊のための遺伝子の塩基配列を明らかにするとともに、標的遺伝子破壊との関係を明確にする。
- 3) 標的遺伝子破壊のための遺伝子の導入に用いるベクター(たとえばYACベクター、人工染色体)について、このベクターを選択した理由とその特徴を詳細に記載する。
- 4) 標的遺伝子破壊のための遺伝子導入法

の理論的根拠及び実験的根拠について記載する。

- 5) 標的遺伝子破壊のための理論的根拠について記載する。
- 6) ベクターの製造手順、精製法及び管理法について記載する。
- 7) ベクターの構造又は組成分析について記載する。
- 8) ベクターの生物学的特徴（種特異性・組織特異性の有無、静止期の細胞への遺伝子導入の可否など）を記載する。遺伝子の導入効率、標的遺伝子の破壊効率を記載する。導入遺伝子の細胞内での存在様式、安定性について記載する。
- 9) 直接遺伝子導入操作における実際の導入手順、使用する試薬、機器等について記載する。
- 10) 直接遺伝子導入法の生物学的特徴を記載する。遺伝子の導入効率、標的遺伝子の破壊効率を記載する。

c. 2. 2 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析

(1) ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製に用いられる動物

ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製に用いられるトランスジェニックマウス及びノックアウトマウスの作製に用いられる配偶子あるいは胚性幹細胞（ES細胞）を取り出すマウス、及び仮親となるマウスの履歴について詳細に記載する。

(2) 遺伝子の導入法

組換えDNAあるいは genomic DNA（人工的操作を加えたものを含む）を動物に導入する方法について詳細に記載する。

また、体細胞変異を生じさせたマウスについては、その方法の詳細な記述を必要とする。

(3) トランスジェニックマウスの確認

ヒト免疫グロブリンのH鎖（あるいはL鎖）の遺伝子を導入したマウスを交配して作製したヒトH鎖（あるいはL鎖）導入トランスジェニックマウスにおける、導入遺伝子の存在を明確にする。次にH鎖遺伝子導入マウスとL鎖遺伝子導入マウスを交配して作製したヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウス（マウス免疫グロブリン酸性能も有している）における導入遺伝子の存在を明確にする。

(4) ノックアウトマウスにおける標的遺伝子破壊の確認

ヒト免疫グロブリンのH鎖（あるいはL鎖の κ 鎖か λ 鎖）遺伝子を破壊したマウスを交配して作製したヒトH鎖（あるいはL鎖の κ 鎖か λ 鎖）遺伝子破壊ノックアウトマウスにおける標的遺伝子破壊を明確にする。次にH鎖遺伝子破壊マウスとL鎖遺伝子破壊マウスを交配して作製したマウス免疫グロブリン遺伝子ノックアウトマウスにおける標的遺伝子破壊を明確にする。

(5) 初代ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの確認

ヒト免疫グロブリン遺伝子を導入したマウス（マウス免疫グロブリン遺伝子は存在）とマウス免疫グロブリン遺伝子を破壊したマウスを交配して、初代ヒト抗体産生トランスジェニックマウスは作製される。このマウスについてヒト免疫グロブリン遺伝子が存在することと、マウス免疫グロブリン遺伝子が破壊されていることを確認する。しかし、このマウスがヒト抗体を産生

していることを確認することは当然のことであるが、マウス抗体を一部産生していたとしても、ハイブリドーマ作成時のクローニング操作により排除することができるのでマウス免疫グロブリン遺伝子の一部発現はこのマウスを抗体医薬品開発へ応用することの妨げにはならないと考えられる。

(6) ヒト抗体の生産の安定性

ヒト抗体の継続的な生産は、導入遺伝子の安定性、及び導入遺伝子の発現の安定性に依存している。従って、1) ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの交配の間の遺伝子の安定性をモニターし、確認することと、2) ヒト抗体遺伝子の発現の安定性を生産に用いられる期間以上にわたって確認することが必要である。

(7) マウス抗体の不生産の安定性

マウス抗体が継続的に生産されないことを確認することが必要である(目的抗体を産生するハイブリドーマで確認することが重要であろう)。医薬品として開発されたヒト抗体にマウス抗体が混入してしまうようであれば、このトランスジェニックマウスを作製した意味がなくなってしまうため確認は慎重に行う。

c. 2. 3 ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの保存、継続的維持・供給体制の確立等

1) ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの保存、継続的維持・供給体制の確立、2) 生産用トランスジェニックマウスの作製、3) トランスジェニックマウスの維持・管理については、他の医薬品生産トランスジェニック動物と同様に考えればよい。

c. 2. 4 トランスジェニックマウスからのヒト抗体の採取、精製、製品化等

トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法としては、目的の抗体に対する抗原によって免疫されたトランスジェニックマウスの脾リンパ球とミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製し、目的の抗体を生産しているハイブリドーマをクローニングして大量培養等を行うことが考えられる。いずれにしても、ハイブリドーマの作製は必須であり、ヒト抗体の安全性評価に関する物質レベルで考慮すべき要件(精製、製品化、特性・品質解析、プロセス評価、工程内管理試験、医薬品規格及び試験方法の設定、製品の安定性試験、非臨床安全性等試験及び臨床試験など)については細胞株由来のバイオテクノロジー製品のガイドラインを適用すればよいと考えられる。

D. 結論

本研究の結果、トランスジェニックマウスを応用して製造するヒト型抗体の安全性評価のために考慮すべき事柄は、他の医薬品生産のためのトランスジェニック動物の場合と基本的に同じであると考えられた。しかし、いくつかの点で異なる。1) ヒト型抗体産生トランスジェニックマウスはマウス免疫グロブリン遺伝子を破壊したノックアウトマウスとヒト免疫グロブリン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの交配により作製されるため、交配前のトランスジェニックマウスとノックアウトマウスについて検討する必要がある。トランスジェニックマウスに関しては、導入するヒト免疫グロブリン遺伝子が大変大きく、その導入には YAC ベクターを用いる点に配

慮が必要と考えられた。すなわち、YACベクターの特性解析のためその塩基配列をすべて明らかにすることは大変な作業であり、ヒト型抗体産生トランスジェニックマウスを抗体医薬品開発へ応用することの妨げになる可能性があるため検討の余地がある。ノックアウトマウスに関しては、トランスジェニックマウスの場合に準じて遺伝子構成体の特性解析等を行う。2) ヒト型抗体産生トランスジェニックマウスを用いて抗体医薬品を開発する場合には、このマウスをまず免疫し、脾リンパ球を取り出して目的の抗体を産生するハイブリドーマを調製する。従って、医薬品となる抗体はトランスジェニックマウスが直接産生するものではない。この点についての配慮も必要と考えられる。例えば、ヒト型抗体産生トランスジェニックマウスが、一部マウス免疫グロブリンを産生していたとしても、目的抗体を産生するハイブリドーマを選択する段階でマウス抗体の混入を防ぐことができるので、トランスジェニックマウスがマウス免疫グロブリンを産生していないことを厳密に確認する必要はないと考えられる。

トランスジェニック動物／クローン動物を利用して製造した 医薬品の安全性評価に関する研究

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第2室長

研究要旨

トランスジェニック動物を応用して製造した医薬品のウイルス汚染に関する安全性確保に必要な諸要素を明らかにし、その評価をどの様に行うかについて調査研究を行った。トランスジェニック動物由来医薬品のウイルスに対する安全性確保のために、（1）宿主となる動物に存在が知られており、かつヒトに対して感染性や病原性が知られているウイルスに着目した試験を行うこと、（2）トランスジェニック動物を取り扱う地域で発生が知られているウイルスに着目した試験を行うこと、（3）特に、ヒトに対する病原性の重篤なウイルスに関して試験を行うことなどが挙げられたので、これらの点について考察した。

1.1. ウイルスの汚染源

トランスジェニック動物を応用して医薬品を生産する場合、通常、乳汁、血液、尿へ分泌される目的産物を採取して用いる。従って、トランスジェニック動物由来の乳汁、血液、尿に出現するウイルスについて十分な安全対策を実施しなければならない。このウイルス検査には、トランスジェニック動物を作製する際に、宿主となる動物の選択にあたって行うべき検査と、トランスジェニック動物を作製し、それを用いて医薬品の生産を行う際に行うべき検査がある。トランスジェニック動物の選択に際しては、目的とする動物に存在することが予想されるウイルスに着目した検討を行い、合理的理由がある場合を除きその存在を否定することが必要である。また、感染性のあるウイルスばかりでなく潜在するレトロウイルスに着目した試験も行うことが望ましい。例えば、ブタレトロウイルスは宿主であるブタの染色体に組み込まれているとされているが、このようなレトロウイルスの出現がないかモニターをすることの必要性について考えておくべ

きである。ヒト、およびヒト以外の霊長類に感染あるいは病原性を有することが証明されているウイルスの検査は慎重に行うべきである。さらに、トランスジェニック動物を作製した後は、飼育環境から迷入する可能性あるウイルスに特に注意を払うべきである。この場合試験のタイミングとしては、生産の直前に行うことが望ましい。ヒトに病原性を示す可能性のあるウイルスが存在する動物由来組織から得た製品は原則として使用すべきではない。スクリーニングにあたっては、目的とする医薬品を採取する組織ばかりでなく、血系や尿等を用いてウイルスそのものばかりでなく抗ウイルス抗体の検査や核酸増幅法検査を適切に活用するべきである。

1.2 安全性確保の基本

トランスジェニック動物由来の血液、乳汁、尿等を原料とする医薬品のウイルスに対する安全対策は、次に示す複数の方法を適切かつ相補的に行うことにより達成される。

（1）動物由来の血液、乳汁、尿等より得た出発

原料中にヒトに対して重大な感染性や病原性を示す可能性のあるウイルスの存在を否定するためのウイルス検査を実施する。

(2) 製造工程に適切なウイルス除去および不活化処理を組み込み、その能力を評価すること。

(3) 製造工程の適切な段階において感染性ウイルス否定試験を行うこと。

また製造業者は、それぞれの製品や製造工程について、ウイルスに対する安全性を保証するための総合戦略の中で採用したアプローチを説明し、その妥当性を示す必要がある。

1.3 検査の限界

ウイルスの検査方法は技術の進歩とともに向上するため、検査の実施に当たっては科学的に最高水準の技術を取り入れ、適切に行われなければならない。通常、いかなる検査にも検出限界が存在するため、ウイルス検査の結果が陰性であってもウイルスの存在を完全に否定できないこともある。また、トランスジェニック動物由来の血液、乳汁、尿等には未知のウイルスの存在も考えられる。したがって、現在採用している検査技術には検出限界のあることを認識し、ウイルスの潜在を前提とした上で安全対策を講ずる必要がある。

2. 原料

2.1 分類

現在まで、トランスジェニック動物由来医薬品は、としてヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ等より得られている。当然、用いる原材料の種に応じてどのようなウイルスに対して注意を払わなければならないかが決定されるが、また、用いる原材料の部位に応じて対策を講じる必要がある。すなわち、特殊な原材料を用いる場合はCJDやスクレイピーなどに対する考慮も必要となるであろう。こ

のような原材料を用いる場合にはあらかじめ規制当局と協議することが推奨される。

トランスジェニック動物作製に用いられる動物に感染する可能性が知られているウイルスは以下の様なものが知られている。これらのウイルスの検査にあたっては、トランスジェニック動物作製に用いた動物がどのような地域から得たのか、トランスジェニック動物を飼育している地域に流行しているウイルスはどのようなもの、さらにはヒトで発病した場合の病状の重さなどを総合的に勘案して行うべきである。

—Cowpox virus (牛痘ウイルス) 主として、西ヨーロッパ。東ヨーロッパにも。ウシでは、乳房、乳頭に発痘。ヒトでは、指、手などに発痘。発育鶏卵の漿尿膜接種、培養細胞、血清反応として赤血球凝集阻止反応が用いられる。

—Paravaccinia virus (偽牛痘ウイルス) 世界中に分布。日本でも希ではない。動物では、口唇、鼻鏡、乳房、乳頭に発痘。ヒトでは、手、指などに発痘。電子顕微鏡検査、発育鶏卵で増殖せず。ウイルスの分離には初代培養細胞を用いる。血清反応は実用化されておらず。

—Murray Valley encephalitis virus (マレーバレー脳炎ウイルス) 主としてオーストラリア南部のMurray-Darling川流域に多発する。感染動物は無症状。ヒトでは、日本脳炎に似た症状。致死率も日本脳炎と同様といわれている。血清を用いた抗体検査。

—Louping-ill virus (羊跳躍病ウイルス) スコットランド、アイルランド、ウエールズ、イングランド北部。ウシでは脳脊髄炎。ヒトでは、インフルエンザ様症状。重症例では髄膜脳炎。麻痺がおきるとポリオと同じ症状。ウイルスの分離には、マウス、発育鶏卵、ヒツジ培養細胞が用いられる。血清反応では、中和試験、赤血球凝集阻止反応が用いられる。

—Foot-and-mouth disease virus (口蹄疫ウイ

ルス) オセアニア、北米、スカンジナビア。ウシでは突然の発熱、流涎、舌、口、乳頭、乳房の水疱。ヒトでは、発熱頭痛、感染部位の水疱、口、手足の水疱。1? 2週間で回復。乳のみマウスへの接種。血清診断にはゲル内沈降反応。中和試験。

—Japanese encephalitis virus (日本脳炎ウイルス) アジア、東南アジア。妊娠ブタに感染すると死産が多い。ヒトでは、不顕性感染が多いが、発症すると、発熱、脳炎が起こり、致死率は35%と高い。ウイルスの分離は乳のみマウス、培養細胞などが用いられる。血清反応としては、間接蛍光抗体法、ELISA法、中和試験、赤血球凝集阻止反応などがある。

—Vesicular stomatitis virus (水疱性口炎ウイルス) 主としてアメリカ大陸に分布する。動物では、発熱、口腔粘膜、蹄等の水泡、びらんが起こる。ヒトでは、インフルエンザ様の症状を呈し、口腔、喉に水泡ができることもある。

—Orf virus (オルフウイルス) 動物では、口唇、鼻鏡、乳頭、乳房などに発症。死亡することは希である。ヒトでは、手、指などに発症。電子顕微鏡検査、発育鶏卵で増殖せず。ウイルスの分離には初代培養細胞を用いる。血清反応は実用化されておらず。

—Borna disease virus (ボルナウイルス) 主として中央ヨーロッパ。動物の典型的な症状は、脳炎であり、興奮、無動、けいれん、麻痺など。ヒトで脳内に持続感染することが知られているが、発症については不明。長い潜伏期間や病気の進行状態からスローウイルス感染の一つと見なされている。最近、精神病との関連が指摘されている。ヒトや種々の動物の細胞で増殖するが細胞変性効果は無い。血清学的には抗体の検出で行う。PCR反応。

— Rabies virus (狂犬病ウイルス) 中枢神経の興奮による痙攣に続いて麻痺期に入り、嚥下筋、呼吸筋などの麻痺を起こして急速に死亡する。p

H6.2、低温でのガチヨウ赤血球の凝集反応。また、ニワトリ、ミドリザル、アカゲザルの赤血球の凝集も起こす。ニワトリ胚 (HEP-Flury株)、子イヌ、ハムスター、ブタ腎の初代細胞で培養可能。

2.2 原材料を得るためのトランスジェニック動物の適性と検査

トランスジェニック動物医薬品の製造に用いられる動物は、適切な健康管理を行われており、様々な検査によりその動物が健康であることが明らかにされている必要がある。さらには、飼育されている群が適切に管理された飼育条件にあって全く異常な個体が発生していないことも必要である。また、ヒトに感染性や病原性をもたらすことが知られている下記の各々の動物特有のウイルスの存在を血清学的あるいは核酸増幅法等を用いて否定しておくべきである。

3. その他

トランスジェニック動物由来医薬品のウイルス安全性の確保にあたっては、局方生物薬品のウイルスに対する安全性確保のための留意事項(案)(別添)が適切に適用できる場合にはこれを参考にすること。

4. まとめ

トランスジェニック動物を応用して製造した医薬品の安全性確保の一環としてウイルス汚染に関して対処すべき諸要素を明らかにし、その評価をどの様に行うかについて調査研究を行った。トランスジェニック動物由来医薬品のウイルスに対する安全性確保のためには、(1)トランスジェニック動物を作製する際に、宿主とする動物の適性検査として行うウイルス試験とトランスジェニック動物を用いて製造する時に行うべきウイルス試験、さらには製造原料を得た際に行うべき試験が考えられることを明らかにし

た、さらに対象とするウイルスとしては、(2) 宿主となる動物に存在が知られており、かつヒトに対して感染性や病原性が知られているウイルスに着目した試験を行うこと。(3) トランス

ジェニック動物を取り扱う地域で発生が知られているウイルスに注目した試験を行うこと。

(4) 特に、ヒトに対する病原性の重篤なウイルスに関して試験を行うことなどを明らかにした。

表1. 各々の動物に感染することが知られている人畜共通感染ウイルス。

	ウシ	ブタ	ヒツジ	ヤギ
Cowpox virus	◎			
Paravaccinia virus	◎	◎	◎	◎
Murray valley encephalitis virus	◎	◎		
Louping-ill virus	◎	◎	◎	◎
Foot-and-mouth disease virus	◎	◎		
Japanese encephalitis virus		◎		
Vesicular stomatitis virus		◎		
Orf virus			◎	
Borna disease virus			◎	
Rabies virus	◎	◎	◎	◎

トランスジェニック動物／クローン動物を応用して製造した医薬品の安全性評価に関する研究

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所室長

研究要旨 トランスジェニック動物を応用して製造した医薬品の品質、安全性等確保に必要な諸要素を明らかにし、その評価技術の開発を目的とする基礎的研究を行った。トランスジェニック動物を利用して製造した医薬品の非臨床安全性試験、薬理試験、および薬物動態試験等において考慮すべきポイントを整理し、検討・考察した。

A. 研究目的

近年のバイオテクノロジーの飛躍的な進歩により、1985年のヒトインスリンの承認を始めとする数多くのバイオテクノロジー応用医薬品が医療現場に供されている。我が国では、今まで、組換え体を用いた組換え医薬品及び細胞大量培養技術を用いた細胞培養医薬品が供されているだけであるが、欧米ではトランスジェニック技術を応用したウシ等の動物に製造させた医薬品の臨床試験が始まるなど、動物を医薬品工場として利用する技術が実用化段階に入ってきている。

米国FDAにおいては、1995年に "Points to consider in the manufacture and testing of therapeutic products for human use derived from transgenic animals." を示し、トランスジェニック動物を利用して製造した医薬品の製造及び試験における留意事項を明らかにしている。

このトランスジェニック技術を応用した動物による医薬品の製造は、従来のバイオ技術による医薬品の製造より、はるかに効率的であり、我が国においても、近い将来、当該技術を利用した医薬品が臨床に供されることが予想される。

そこで、我が国でもトランスジェニック動物に製造させた医薬品について、医薬品製造の観点から品質、有効性、安全性を確保することが必要であり、その評価方法の検討が急務となっている。

このような状況に鑑み、本研究では、トランスジェニック動物から得られた医薬品の、非臨床安全性試験、薬理試験、および薬物動態試験、において留意すべきポイントを中心に検討を行った。

B. 研究方法

トランスジェニック動物に関連する公表論文および医薬品製造の観点からの安全性に関する情報、米国FDAのPoint to consider (PTC)、EU CPMPのガイドライン、また遺伝子組換え医薬品、細胞培養医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品の品質、有効性、安全性確保を図る過程あるいは関連する評価技術の開発研究を行う過程で蓄積されてきた経験や知見、さらにICH文書の関連部分等を参考に、トランスジェニック動物を応用して製造した医薬品の安全性確保に必要な諸要素を、非臨床安全性試験、

薬理試験、薬物動態試験に関してまとめた。

C. 研究結果及び考察

1. 被験物質の特性からみた考察

不純物や混入物質の混在により、安全性に関わる問題が発生する可能性がある。これらに適合性を与えるための非臨床試験計画を設定するより、不純物や混入物を除去する精製過程に期待することが望ましい。いずれの場合においても、適切な非臨床試験計画をたてるに充分なだけ、当該トランスジェニック動物由来医薬品の特性が明らかにされている必要がある。

トランスジェニック動物由来医薬品は、細菌および哺乳類細胞などに由来する宿主細胞成分の混入に起因するリスクを伴う可能性がある。このような宿主細胞成分の混在によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起されることがある。核酸汚染に関連する有害作用は理論上、考えられることであるが、宿主ゲノムに組み込まれる可能性は除外できない。昆虫、植物または哺乳類細胞、あるいはトランスジェニック植物ならびに動物由来の医薬品の場合には更にウイルス感染の危険性もある。

一般に、最終的な薬効薬理試験および毒性試験には初期の臨床試験で使用する予定の製品と同等のものを使用する必要がある。しかし、開発の過程においては製品の品質と収量を向上させるため製造工程に変更を加えることがあり、これは認められる。実験動物で得られた知見をヒトに外挿する際には、そのような変更による影響についても考慮しなければならない。

開発計画の進行中に新規または改良された製造工程を採用した場合や、製品あるいは製剤に有意な変更を加えた場合には、開発期間中の被験物質との比較類似性を示さなければならない。その比較類似性は、生化学的ないし生物学的特性(同一性、純度、安定性および力価)に基づい

て検討することができる。場合によっては追加試験(薬物動態試験、薬動力学試験ないしは安全性試験)が必要となることもある。その際、用いる研究方法の科学的根拠について明らかにする必要がある。

2. 非臨床安全性試験

2.1 一般原則

安全性に関する非臨床試験の目的は、医薬品の薬理作用および毒性作用について、ヒト試験を開始する前だけでなく、臨床開発段階を通じて明らかにすることである。*In vitro* および *in vivo* の両方の試験を実施することで、これらの特性が明らかとなる。既に臨床使用され、広い使用経験のある医薬品と構造的あるいは薬理学的に類似するトランスジェニック動物由来医薬品の場合、毒性試験を簡略化してもよい場合がある。

非臨床安全性試験の設定については、1)適切な動物種の選択、2)年齢、3)生理学的状態、4)投与量、投与経路、処置方法を含む投与様式、5)使用条件下での被験物質の安定性について考慮しなければならない。

毒性試験は、「医薬品の安全性試験の実施に関する基準 (GLP)」に準拠して実施されることが求められている。しかし、トランスジェニック動物由来医薬品において必要とされることの多い特殊な試験系の中には、完全に GLP 対応で実施することができない場合がある。このような場合には、GLP に対応していない部分を明確にし、安全性評価全体に対するその相対的重要性について検討しなければならない。GLP に完全に対応していない試験であっても、そこから得られたデータを臨床試験の実施や製造承認を得るための支持データとして使用することができる。

トランスジェニック動物由来医薬品ではその特徴的かつ多様な構造や、種特異性、免疫原性、予期しない多形質発現活性といった生物学的性

質のため、医薬品の従来の毒性試験方法が適切でない場合がある。

2.2 生物学的活性/薬力学

その製品のどの作用が臨床活性と関連しているか調べるため、*in vitro* 定量法により生物学的活性を測定することができる。細胞の表現型や増殖に及ぼす直接効果について検討するためには、樹立細胞系あるいは初代培養細胞を使用することが有用である。多くのトランスジェニック動物由来医薬品の作用には種特異性があるため、毒性試験では適切な動物種を選択して用いることが重要である。*In vivo* 活性について特定の作用について予測したり、複数の動物種(ヒトを含む)の感受性を量的に比較するために *in vitro* の哺乳類細胞の細胞系を利用することもできよう。例えば、受容体占有率、受容体親和性、あるいは薬理効果などについて評価したり、更に *in vivo* の薬理試験や毒性試験を行う上で適切な動物種を選択することを目的に、*in vitro* 試験系を用いることができる。これらの *in vitro* および *in vivo* の試験結果を組み合わせることは、そこで得られた知見を、ヒトに外挿する上で有用である。作用機序を明らかにすることを含めた薬理活性を評価するための *in vivo* 試験は、しばしば臨床試験における被検物質の適用法の理論的根拠を示す目的で用いられる。

2.3 動物種/モデルの選択

多くのトランスジェニック動物由来医薬品では、その薬理活性と種・組織特異性があいまって、汎用される動物種(例えば、ラット、イヌ)を使用した標準的毒性試験は意味をなさないことがしばしばある。安全性評価試験では適切な動物種が用いられるべきである。適切な動物種とはその動物種に受容体または抗原決定基(モノクローナル抗体の場合)が発現し、被験物質の

薬理的活性が示されるものである。種々の技法(例えば、免疫化学的または機能的試験)を用いて適切な動物種を確定することができる。受容体や抗原決定基の分布を知ることにより、*in vivo* での潜在的な毒性を更に明確にできる。

安全性評価計画では、通常二種類の動物種を使用する必要がある。しかし、正当な理由が示されていれば、適切な一種類の動物のみで十分である(例えば、適切な動物種が一種類のみ確認されている場合や当該トランスジェニック動物由来医薬品の生物学的活性が十分に理解されている場合)。さらに、短期試験で毒性を特定するのに二種類の動物種が必要である場合でも、引き続き行われる長期試験は一種類の動物種でもよい場合がある(例えば、短期試験で使用した二種類の動物種の毒性像が同等であった場合)。

適切でない動物種を用いた毒性試験からは誤った結論が導かれることがあるため、推奨できない。適切な動物種がない場合、ヒト型受容体を発現させたトランスジェニック動物や、その動物にとっての相同タンパク質などを使った方法も検討すべきである。当該医薬品とそれに対応するヒト型受容体の相互作用が、ヒトで予期される生理学的な一連の反応と同様である場合、ヒト型受容体を発現したトランスジェニック動物モデルを使用して得られた情報は効果的である。相同タンパク質を利用しても有益な情報が得られるかもしれないが、この時注意しなければならないのは、相同タンパク質と実際に臨床で使用される製品とでは、製造工程、不純物や混入物質の程度、薬物動態および厳密な意味での薬理作用機序などが異なっている可能性があることである。トランスジェニック動物モデルや相同タンパク質を使用できない場合でも、重要な機能に関する項目(例えば、心血管系、呼吸器系)の評価を含めた、一種類の動物種を用いたしるべき毒性試験(例えば、14日間以内の反復投与毒性試験)が、依然として意義があるか

も知れない。

近年、ヒト疾患と類似していると考えられる実験動物モデルの開発がめざましい。これらの動物モデルには、自然発症性疾患モデル、遺伝子ノックアウトモデル、およびトランスジェニック動物などが含まれる。これらのモデルは、製品の薬理作用、薬物動態、吸収量などを測定する際に、更なる情報を提供する可能性を持つばかりでなく、安全性（例えば、疾患進行を促進させる有害作用）を評価する上でも有益である可能性がある。場合によっては、正常な動物での毒性試験の代わりに病態動物モデルを使った試験を実施することも認容されてもよい（注1）。このような病態動物モデルを使用して安全性を評価する場合には、その科学的妥当性が明確に示される必要がある。

2.4 動物数/性別

各用量毎に使用される動物数は毒性検出力に直接関係してくる。例数が少ないと毒性の重症度が無視され、その発現頻度のみが観察されることがとなり、その結果毒性事象の観察を誤ることがある。サンプル数に起因するこうした限界は、しばしば霊長類を使った試験で発生するが、モニタリングの頻度を増やしたり、観察期間を延長することで部分的に補うことができる。一般的には雌雄両方を用いるべきであるが、一方を省略する場合には、その妥当性について理由付けがなければならない。

2.5 用法/用量の設定

投与経路および投与回数は予想される臨床適用に近い形にすべきである。また使用する動物種における当該医薬品の薬物動態および生物学的利用率、実験動物に安全かつ苦痛なく投与しうる容量であるように考慮すべきである。例えば、有効成分の消失速度が速い場合や、溶解度が小さい場合、これを補うために実験動物では

臨床試験での予定投与計画と比較して投与頻度を増やさなければならないかもしれない。このような場合には、臨床での投与量に対する実験動物での相対的な投与量について明示しなければならない。また、投与量、濃度、剤形および投与部位などの影響も考慮しなければならない。投与方法や動物の大きさ、あるいは生理学的理由により生物学的利用率に限界があり、投与経路を変更しなければならないような場合、臨床で予定されている投与経路以外の経路で投与することも受け入れられるべきである。

投与用量の段階は用量-反応関係、毒性用量、無毒性用量（NOAEL）などに関する情報が得られるように設定しなければならない。毒性がほとんどないか、全くない医薬品では、明確な最大用量を求めることができない。このような場合は、その用量設定について、およびヒト適用時に予定される用量の何倍量を投与量とするかについての明確な科学的根拠が求められる。高用量の設定には、予想される薬理的・生理学的効果、被検物質の入手の可能性、および意図される臨床用途などに基ついて判断する必要がある。選択された動物の細胞に対する医薬品の親和性や薬理効果がヒト細胞と比較して低い場合には、高用量で試験することも重要である。十分な安全幅を確保するためにヒトと比較して何倍の用量を試験すべきかについては、各トランスジェニック動物由来医薬品の分類とその臨床適応により異なるべきである。

2.6 免疫原性

ヒトへの適用が期待されるトランスジェニック動物由来医薬品の多くは、動物で免疫原性を示す。そのため、この種の医薬品の反復投与毒性試験を行う際に、投与に応答して産生された抗体を測定することは、これらの試験結果を解釈する上で役に立つ。抗体反応については、その特性（例えば、力価、応答した動物数、中和