

## 2. 口頭発表

- 1) HAYAKAWA, T., "Overview of the international endeavor toward harmonization of technical requirements for the control of new medicines from biotechnology", The Joint International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology and European Society for Animal Cell Technology (JAACT/ESACT' 98), Animal Cell Technology, Challenges for the 21<sup>st</sup> Century, Kyoto (1998.7).
- 2) 早川堯夫：バイオテクノロジー応用医薬品に関するICHガイドライン, PDA Symposium on Virus and Prion Clearance from Biopharmaceutical Products, 東京 (1998.10)
- 3) Takao HAYAKAWA: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin: ICH Viral Safety Guideline, Recovery of Biologicals IX, Whistler, Canada (1999. 5)
- 4) Takao HAYAKAWA: Japanese Perspective with Respect to Quality Control of Biotechnological/Biological Products, International Conference Biologicals Beyond 2000; Challenge for Quality Standards in an Evolving Field, Strasbourg, France (1999. 9)
- 5) Takao HAYAKAWA: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin: ICH Viral Safety Guideline, ICH and the Canadian Drug Regulatory System, Montreal, Canada (1999.11)

## 補遺1 クローン動物を利用した医薬品製造の現状

### 1. クローン動物

#### 1. 1 クローン動物とは

クローン動物とは遺伝的に同一の動物を意味し、卵細胞へ脱核や核移植などの操作をすることにより個体を複製することによって作成される。一卵性双生児もクローン個体であるが、現在話題となっているクローン動物は体細胞クローン動物である。生物学的な意味ではすでに分化した細胞核を取り出し、他のレシピエント卵子内に移植し再度発生させ、個体を得ることをさす。

#### 1. 2 体細胞の核移植によるクローン細胞の誕生

クローン動物の作製法としては、従来受精卵を用いた核移植による方法については成功例が報告されていた。この方法では、受精後卵割を開始し分裂期に入った胚細胞を分離して、その細胞を核を除いた未受精卵に移植するものである。したがって、作出過程に精子と卵子の受精が入るため、作出されてくるクローン動物の遺伝情報をあらかじめ知ることはできない。一方、導入する細胞の特性をあらかじめ解析し、生まれるクローン動物について予測が可能な胎性幹細胞 (ES 細胞) あるいは体細胞の核移植によってクローン動物を得る試みも多くなされてきたが、数年前までことごとく失敗し、一般にはこれら細胞の核移植によるクローン動物作製技術の開発は20世紀中には困難と考えられていたところが、1997年ロスリン研究所とPPL Therapeutics社の共同研究グループによって、乳腺細胞の核移植によるクローンヒツジ「ドリー」の誕生が発表された。

ドリーは6歳のメスのヒツジから採取され、凍結保存されていた乳腺細胞を解凍し、未受精

卵に核移植して作製されたクローン動物である。研究グループのとった方法が他の失敗例と異なる点は、乳腺細胞をあらかじめ血清濃度を低下させた培養液中で培養する（血清飢餓処理）ことにあった。この血清飢餓処理によって乳腺細胞の遺伝子発現やタンパク質の合成能などを抑えると同時に、細胞周期を未受精卵に合わせたことが、クローン動物の誕生を成功に導いた要因と考えられている。

このクローンヒツジ「ドリー」の誕生は、生物学的にみれば、細胞の分化が可逆的であることを示す点で画期的な発表であったが、また、医薬品生産のための動物工場としてのクローン動物の利用を可能にする成果としても画期的なものであった。事実 PPL Therapeutics 社はドリーについて、乳汁中にヒト血液凝固第 4 因子を分泌する遺伝子を導入したクローンヒツジ「ポリー」を誕生させており、その医薬品化をめざしている。

### 1. 3 クローン動物の作製技術の医薬品生産への応用

以上述べたクローン動物作製の成功は、医薬品生産用動物工場の作製において 2 つの意味をもつ。第一は遺伝子導入細胞を核移植することによるトランスジェニック動物の作製効率の改善という点であり、第二は初代トランスジェニック動物から均一な医薬品生産用動物を得るための手段となりうる、という点である。

#### (1) トランスジェニック動物作製効率の改善の手段としてのクローン動物の作製

従来、動物工場としての利用をめざしてトランスジェニック動物を作製する場合は、通常マイクロインジェクションによって遺伝子構成体を受精卵に導入する方法がとられていた。しかしこの方法の問題点として、1) 遺伝子導入効率が低く、通常ヒツジ、ヤギ、ウシなどの大動物ではトランスジェニック動物が得られる確立

は 1% 以下である、2) 遺伝子の導入については調節可能な部分は非常に限られており、目的にかなった動物が得られる確率はさらに低い。一方、体細胞の核移植によるクローン動物の作製効率は数%程度までは望めると考えられている。さらに核移植の場合は、ジーンターゲティング法を利用して移植する細胞の目的とする染色体部位へあらかじめ遺伝子を導入しておくことが可能であり、また移植する遺伝子導入細胞についてあらかじめ導入遺伝子を解析し、選別したのちに移植することが可能である点から、効率のよいトランスジェニック動物作成法となりうる。

#### (2) 初代トランスジェニック動物から均一な生産用動物を得るための手段としてのクローン動物の作製

トランスジェニック動物を利用した医薬品生産システムを開発する過程では、目的物質を高収量かつ安定的に生産することが可能な遺伝的性質をもった初代トランスジェニック動物を確立するとともに、その後この動物を他の動物と交配させ、同様な遺伝的形質を有する生産用動物を作製することが必要となる。この過程では、通常の交配では初代トランスジェニック動物と同じ遺伝的形質を受け継ぐ動物は一定の確率以上は生まれず、また当然のことながら個体差は大きい。一方、医薬品生産用動物の作製において、初代トランスジェニック動物由来の細胞を用いて、クローン動物を作製するならば、遺伝的形質が同じ生産用動物を効率的に得ることが可能となり、医薬品の恒常的生産を可能にする点からも望ましいことと考えられる。

### 1. 4 クローン動物の作製の問題点

クローン動物については、上に述べたように体細胞の核移植により作製が可能となったことにより、ロスリン研究所のヒツジを筆頭に、その後ウシ、ヤギ、マウス、ブタなどで、その成

功例が次々と報告されている。しかしながらこの技術は成功からまだ日が浅く、作製技術において改良すべき点も少なからずあり、さらにはクローン動物の性質に関してもまだ未知の部分が少なくない。

### 1) 作製効率の問題

体細胞の核移植によるクローン動物の作出効率は低く（ドリーの場合 0.3%）、その改善が望まれている。そのための方法としてはまず胎仔由来の細胞を用いる方法があげられる。また胚性幹細胞（ES 細胞）の核移植によっても効率の改善が期待でき、実際マウスにおいて、ごく最近 ES 細胞を核移植することによるクローン動物作製の成功が報告されている。しかし一方、動物工場として主に用いられることが予想されるヒツジ、ヤギ、ウシにおいては、ES 細胞株の樹立は困難を極めており、成功までにはもうしばらくの時間が必要と思われる。

### 2) 作出されるクローン動物の個体差

細胞を核移植することによって作出されたクローン動物の場合、獲得される遺伝情報は同一と考えられがちであるが、実際には個体差が生じる。

核移植では、核を取り除いた未受精卵に細胞を移植するため、ミトコンドリアはレシピエント細胞である卵子由来のものと導入されたドナー細胞由来のものが混在する。通常ドナー細胞由来のミトコンドリアは順次消失してレシピエント細胞由来のミトコンドリアに置き代わることが観察されている (*Nature Genetics* **23**, 90-93 (1999))。ミトコンドリアはリボソーム RNA やトランスファー RNA およびタンパク質（呼吸酵素と ATP 合成酵素の一部）をコードする遺伝子を有することが知られており、この遺伝子は個体ごとに微妙に異なる。このことは、核移植によって得られたクローン動物の遺伝子すべてがドナー細胞に由来するものでないことを示

しており、異なった動物から得られた卵子を用いた場合、同じドナー細胞を移植してもミトコンドリア遺伝子は異なる。これら動物によって生産される生理活性タンパク質の性質にミトコンドリア遺伝子が直接関わるとは考えにくいものの、作出されたクローン動物において生理活性タンパク質の生産量に動物個体差を生じさせる可能性は大きい。

また、核移植によるクローン動物の作製においては、核移植された卵子はインキュベータ中で一定時間培養された後（ヒツジは体外での培養を行わない場合もある）、仮親に移植される。したがって仮親が異なれば、その後の卵子がおかれる環境が異なり、クローン動物とはいえ個体差を生じさせる要因となる。さらに、以上の過程の多くは顕微鏡化で一つ一つの卵子ごとに行われる特殊な操作であることから、このことも個体差をうむ要因となる。

### 3) クローン動物の老化

1999 年ロスリン研究所からの報告 (*Nature* **399**, 316-317 (1999)) によって、ドリーのテロメアの長さは由来する乳腺細胞と同様で、通常の動物に比べると短いことが報告された。さらにドリーに由来する細胞から得られたクローン動物についても、同様にテロメアの短縮が観察されているという。正常細胞では細胞分裂のたびにテロメアが短小化することが知られており、加齢に伴う細胞の老化や腫瘍化とテロメアの短小化の関連が指摘されており、上記の実験事実は、クローン動物は生後直後でも生物学的にドナー細胞の年齢を引き継ぐ可能性を示唆する。

この点については現在世界各地で追試が行われているところであり、同様の実験事実も確認されているようである（報文としては発表されていない）。しかし一方ではテロメアの短縮は移植する細胞の由来によっても異なるという実験データも得られているといわれており、必ず

しも一般化できる事実ではないようである。また、もともとテロメアの長いマウスにおいては現在までにクローンマウスにおいてテロメアが短いという報告はない。

さらに、実際にテロメアが短小化したクローン動物の場合の老化のあらわれかた、あるいは腫瘍の発生頻度については公表データはなく、特に医薬品生産の動物工場として汎用されるであろうヒツジ、ヤギ、ウシ等の場合においては、これらのデータを得るには長時間を要する。したがって、クローン動物のテロメアの短縮の生物学的意義が明らかにされるには、今後の科学的知見の集積が必要である。

## 2. クローン動物を利用して生産される医薬品の品質、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

上記のように、クローン動物作製技術は医薬品生産上、二つの利用が考えられる。一つは初代トランスジェニック動物を作出するための利用、もう一つは初代トランスジェニック動物から均一な生産用動物を作出する手段としての利用である。

前者においては核移植されるドナー細胞に目的遺伝子を導入しクローン化するまでの過程は、組換え医薬品製造のための細胞基材に関するガイドラインを適用することができる。体細胞やES細胞を含んだドナー細胞の核移植、および移植後の細胞の融合法については詳細に記述される必要がある。それに続く仮親への卵子の移植、および妊娠、さらには初代トランスジェニッククローン動物の作出とその特性解析については、基本的には平成10年度総括報告書の「2.2 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析」と同様の評価法が適用できる。ただし、クローン動物の生物学的特性については未だ解明されていない問題も多く、テロメアの短縮の問題を含めて、今後の科学的知見の集積に応じた対

応が必要とされる。

後者の生産用動物としての初代トランスジェニック動物からのクローン動物の作出においては、初代トランスジェニック動物からの細胞の分離、さらには核移植から生産用クローン動物の作出に至る操作については、詳細に報告すべきである。さらには生産用クローン動物の選別の方法、およびその基準を示す必要がある。その他平成10年度総括報告書「2.4 生産用トランスジェニック動物の作製」および「2.5 トランスジェニック動物の維持・管理」を適用して考えるべきである。

クローン動物からの目的産物の採取以降の工程については、トランスジェニック動物を利用した医薬品の製造と同様の原則をあてはめることができる。

## 補遺2 人獣共通感染症原因微生物

ヒトに感染するとともに、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシなどのトランスジェニック動物作出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としては表1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か、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いない。

—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 (水胞性口炎ウイルス) 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、蹄等の水疱、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、乳房などに発痘。死亡することは希である。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いない。

—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。pH6.2、低温でのガチョ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。

動物医薬品の製造に用いられる動物は、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表1にあげた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。

### 補遺3 トランスジェニック動物由来 医薬品の原料のウイルス検査 —特に NAT 法に関して—

トランスジェニック動物由来の医薬品原材料のウイルス検出法としては血清学的手法、細胞学的手法、及び核酸増幅法（NAT 法）が挙げられる。特に、PCR 等の NAT 法では数コピー程度のウイルス遺伝子を検出可能なことから医薬品のウイルス安全性試験において急速に普及してきている。そこで、NAT 法による原材料のウイルス検査を行う際に留意すべきポイントを以下に述べる。

NAT 法としては、耐熱性の Taq ポリメラーゼを利用して目的遺伝子を増幅させる polymerase-chain-reaction (PCR) 法や、reverse transcriptase と RNA 依存性 RNA polymerase 及び RNaseH を組み合わせた Transcription Mediated Amplification 法（TMA 法）、あるいは T4 リガーゼを用いた核酸増幅法などがある。さらに、目的遺伝子の増幅の特異性を高めるために nested PCR 法なども用いられている。また、増幅した核酸の検出法としてはエチジウムブロマイド等の蛍光色素を用いる方法やプローブの蛍光消光をリアルタイムに検出する方法など多様な検出法が開発されている。いずれの手法を用いるにせよ、目的とするウイルスゲノムを確実に精度よく検出するためにあらかじめ十分な評価を行っておく必要がある。

#### 1. NAT 法導入にあたって考慮すべき事項

スクリーニング試験は可能な限りトランスジェニック動物の個体ごとに行う。プールした原材料に対して NAT 検査を行う際は希釈による感度の低下を十分に考慮する必要がある。

NAT 法は高感度であるが故に、施設の不備や不十分な手技により擬陽性や十分な感度が得られなかったりする危険性が高い。従って、NAT 法を

行う施設は検査の流れ等（増幅した試料は増幅前の操作を行う部屋に持ち込まない等）に十分配慮した設計を行うべきである。また、NAT 法は十分な経験と専門的知識を有する従事者によって実施されるべきである。

#### 2. 特異性

用いるプライマーが非特異性を示さないことを明らかにしておくべきである。また、目的とするウイルスにサブタイプ等が存在する場合には可能な限り共通する保存された配列を検出できるようなプライマーの設計を行うとともに、トランスジェニック動物を飼育している地域やトランスジェニック動物の原産国に多く認められるウイルスに着目したプライマーの設計を行うべきである。さらに、目的とするウイルスの検出が十分可能か、複数のサブタイプのウイルスを用いて評価しておく必要がある。

特異性の評価に際しては、可能な限り 100 以上の陰性パネルを用いた検討を行うことが望ましい。

#### 3. 感度

検出しようとするウイルスあるいはその目的ウイルスの遺伝子配列を持つプラスミド等からなる標準品や標準物質を対照として、用いる NAT 法の感度を評価することが必要である。感度の評価に際しては、標準品・標準物質あるいは自家標準物質等を対照としてエンドポイントアッセイを行い、検出限界を求め、採用しようとしている NAT 法の妥当性を明らかにしておくべきである。

#### 4. 標準物質

国際標準品や国内標準品がなく、in house において標準物質を作製する場合には以下の点を考慮する必要がある。

1) 定量的 NAT 法ないしは定量性のある他の手

法を用いて設定される必要がある。可能な限り、設定に当たってはコピー数を算出しておくことが望まれる。

- 2) 保存温度でのウイルスゲノムの安定性を確認しておく必要がある。

## 5. 試験法

試験にあたっては、陰性及び陽性コントロールを毎回使用すること。陽性コントロールとしては、感度を保証する WHO 標準品、国内標準品、またはそれに基づいて設定された標準物質、あるいは適切な手法により設定された自家標準物質を用いること。陰性コントロールは、対象とする原材料と同じ性質の乳汁、血液、尿等でウイルスを含まないことが明らかにされたものを用いるべきである。

測定は、各試料について複数回行う。さらに、陰性コントロールが陽性にでたり、陽性コントロールが陰性にでた場合には測定を無効とする。

## 6. 判定

判定は以下のように行うべきである。

- (1) 複数測定の結果が一致した場合

++ 陽性と判定する  
-- 陰性と判定する

- (2) 複数測定の結果が一致しない場合

+/- 再検査を行う

- 2-1) その結果が一致した場合

++ 陽性と判定

-- 陰性と判定

- 2-2) その結果が不一致の場合

+/- 陽性と判定（検出限界に近いウイルス量と考えられる）

## 7. ウイルス否定試験における NAT 法と血清学的試験や生物学的試験との補完性

トランスジェニック動物由来医薬品のウイルス安全性は、総合的なアプローチによって評価される。NAT 法は従来の血清学的試験や生物学的試験に比較して非常に高感度であるが対象とする全てのウイルスを検出できるわけではなく、それぞれ補完的な役割を担っている。

さらに、NAT 法によるウイルス試験は非常に高感度であるため、検査施設に高濃度のウイルスを持ち込むことは施設の汚染を引き起こすことになりかねない。可能な限り、血清学的試験や生物学的試験によりウイルスが検出されないような試料を NAT 法でさらに試験を行うような体制が望ましい。

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 真弓 忠範 大阪大学大学院薬学研究科教授

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するにあたり、トランスジェニック動物の作製ならびに維持方法についての調査研究を行った。中でも特にトランスジェニック動物から製造される医薬品の安全性、有効性ならびに品質を確保するために、1. トランスジェニック動物作製に使用する動物、2. トランスジェニック動物の作製方法、3. トランスジェニック動物の保存および継続的維持方法について考慮すべき点を整理・検討し、考察した。

1) トランスジェニック動物の作製に使  
われる動物

トランスジェニック動物（初代トランスジェニック動物および初代から由来したトランスジェニック動物を含む）作製に用いられる動物は、発育ならびに健康状態がよく、血清学的によく解明された動物で、その動物種およびヒトに感染する物質を可能な限り排除した閉鎖集団またはコロニーを使用すべきである。トランスジェニック動物の作製に使われる配偶子あるいは胚性幹細胞(ES細胞)を取り出す動物、および仮親ならびに仮親の作製（擬妊娠動物の作成）に使用した動物の履歴および特徴については詳細に記述される必要があり、例えば、当該動物を選択した理由、種、系統、繁殖・交配・飼育方法、起源となる国、健康状態、その他血統などに関する情報を記述する。

2) トランスジェニック動物の作製方法

トランスジェニック動物の作製方法には、1. 受精卵へ直接組換え遺伝子をマイクロインジェクションする方法、2. 組換え遺伝子を導入したES細胞を用い、キメラ動物として個体発生させる方法、3. レトロウイルスベクターを用いて初期発生胚に感染させる方法などがあり、詳細な記述が必要である。例えば、受精卵の単離・培養、インビトロ受精、マイクロインジェクション、仮親の作製、受精卵の移植、仮親の飼育など、既存の方法及び新たに開発した方法について詳細に明記すべきである。マイクロインジェクションによるトランスジェニック動物作製においては、導入する遺伝子の形状、濃度、純度および2種以上の遺伝子を導入する場合にはその比率などを詳細に明記すべきである。受精卵



前核に直接組換え遺伝子をマイクロインジェクションすると、多くの場合、遺伝子の染色体への組込は一細胞期に起こるが、一部のトランスジェニック動物では、組換え遺伝子の組込がそれ以降の時期に起こり、外来遺伝子の存在状態がモザイクのトランスジェニック動物になる。染色体に導入された外来遺伝子のコピー数は、1個から数百個にわたる。また導入遺伝子が多数コピー存在する場合は、2本以上の異なる染色体に挿入されていることもあるが、通常は同一染色体上の1カ所に挿入されている場合が多い。ES細胞は、8細胞期胚や胚盤胞内に注入あるいは透明体を除去した8細胞期胚と凝集させた場合、宿主胚由来の細胞と混ざりあい、キメラ個体として正常に発生する。また、ES細胞は生殖系列にも分化するため、交配によりES細胞由来の配偶子から動物個体を得ることが出来る。このES細胞に組換え遺伝子を導入しておくことにより、トランスジェニック動物が得られる。この方法を用いる場合は、1. ES細胞の樹立方法、培養方法、維持方法、2. ES細胞へ組換え遺伝子を導入する方法、導入された遺伝子の確認方法、遺伝子導入ES細胞の選別方法、3. 遺伝子導入ES細胞の培養方法、維持方法などについて、詳細に記載する必要がある。ES細胞を用いる方法は、マイクロインジェクションやレトロウイルスを用いた方法と異なり、遺伝子導入したES細胞の段階で遺伝子の導入量や導入位置、発見量などの検討が可能であり、それらの情報から良好な細胞株を選択して使用できる。レトロウイルスを用いて4-8細胞期の胚に遺伝子導入した場合、1個から複数個の細胞に遺伝子が導入され、それ

ぞれの細胞において遺伝子が導入される染色体の位置が異なる。従って、それに応じたモザイク動物が生まれることになる。

### 3) トランスジェニック動物の保存、継続的維持

受精卵へのマイクロインジェクションにより作製されたトランスジェニック動物の外来導入遺伝子は、ヘミ接合体である。初代トランスジェニック動物は、非トランスジェニック動物、あるいはトランスジェニック動物との交配により子孫を得る。初代トランスジェニック動物の導入遺伝子がモザイクでなく、染色体の1箇所に導入されている場合は、通常メンデルの遺伝の法則に従い、ヘミ接合型トランスジェニック動物と非トランスジェニック動物が1:1で出現する。系統維持に関しては、ヘミ接合型トランスジェニック動物と非トランスジェニック動物との交配により、ヘミ接合型トランスジェニック動物として系統を維持するか、ヘミ接合型同士の交配により、ホモ接合型を選別し、ホモ接合型トランスジェニック動物同士を交配させて維持する。マイクロインジェクションにより作製されたトランスジェニック動物は、ES細胞を用いた方法と異なり、最初に作り出された初代トランスジェニック動物がそれぞれ個々の系統のトランスジェニック動物であり、同一のトランスジェニック動物を再度作り出すことは出来ない。従って、トランスジェニック動物の維持に関しては病原微生物による感染や不慮の事故などにより、系統が途絶えないように受精卵や精子などを保存しておくことが重要となる。また、レトロウイルス感染によって作製し

たトランスジェニック動物は、モザイクの程度が著しいため、均質なトランスジェニック動物を得るためには数世代の交配を要する。

トランスジェニック動物/クローン動物を医薬品の製造を目的として用いる場合その品質を維持する上において重要な要素の一つが、それら動物の品質維持である。中でも微生物による感染、特に人畜共通感染微生物による感染は、ヒトに対して重篤な症状を示す例も多く、適切な基準を設ける必要がある。人畜共通伝染病には、細菌病、真菌病、ウイルス病、寄生虫病とがあり、以下にその例を示す。

#### 1. アメーバ赤痢

アメーバー類に属する *Entamoeba histolytica* に起因する。動物では一般に無症状であるが、ヒトでは下痢を主とした消化器症状を示す。

#### 2. ニューモシスティス症

*Pneumocystis carinii* による疾患。宿主域は広く、ヒトでは呼吸困難、チアノーゼ、発熱などが認められ、動物での症状もヒトに類似している。

#### 3. 皮膚糸状菌症

皮膚糸状菌を含む多くの真菌が病原体である。動物では、頭部および全身の円型、不整形の脱毛、紅斑、脱色斑などが見られる。ヒトでは寄生部位、寄生菌により異なるが、黄癬、頭部白癬、小水泡性斑状白癬などが起こる

#### 4. 鼠咬む症

*Streptobacillus moniliformis* と *Spirillum minus* が原因菌として知られている。ラットおよびマウスでは通常不顕性感染である。ヒトでの症状は、咬傷部位で

の炎症、発熱、発疹が起こる。

#### 5. 結核

*Mycobacterium tuberculosis* または *M. bovis* による感染。ヒトでは感染により肺結核、頸部リンパ節炎、関節病変、髄膜炎などが起きる。

#### 6. 細菌性赤痢

赤痢菌による疾患で、自然宿主はヒトである。発熱、腹痛、下痢が認められ、幼児の感染は、中枢神経、循環器障害を伴い、致命率が高い。

#### 7. イヌブルセラ病

*Brucella canis* に起因する。ヒトでは、発熱、頭痛、不快感、リンパ節の腫大、関節炎が報告されている。

#### 8. モンキーポックス

ポックスウイルス科のオルソポックス亜科に属するウイルスに起因する。ヒトでの症状は、天然痘と区別がつかない。

#### 9. Bウイルス感染症

ヒトの単純ヘルペスに類似したBウイルスに起因する。自然宿主はサルで、ヒトではきわめて重篤な脳脊髄炎をこし、死亡率が高い。

#### 10. マールブルク病

原因ウイルスは、マールブルクウイルスで、ヒトでの症状は、発熱、頭痛、筋肉痛、下痢、内臓や皮膚、粘膜からの出血が認められる。

これら伝染病については、微生物のモニタリングが重要であり、その実施については適切な基準を設定しなければならない

#### 4) まとめ

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する場合に、その安全性、有効性、品質管理の面から、使用する動物の品質や基準などの諸要素を明らかにした。また、トランスジェニック動物の作製方法ならびにその動物の保存、継続的維持方法について整理するとともに、注意すべき点を明らかにした。

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

分担研究者 黒澤 努 大阪大学医学部、助教授

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由来医薬品の試験や評価にあたって考慮すべき要件を、

- (1) 動物の作出と特性解析、
- (2) 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析、
  - (イ) トランスジェニック動物の作製に使われる動物
  - (ロ) 遺伝子の導入方法
  - (ハ) 特性解析
- (3) トランスジェニック動物系の保存、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動物の作製と選別、
- (5) トランスジェニック動物の維持管理、
  - (イ) 動物の維持管理
  - (ロ) 既知感染物質のスクリーニング
  - (ハ) 非臨床安全性等試験

に分類し、各要件について評価方法および評価基準に関して検討・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して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。これらは、微生物や動物細胞の組換え体由来の組換え医薬品あるいは動物細胞を大量培養する技術を用いた細胞培養医薬品である。

最近、欧米を中心にトランスジェニック技術を応用したヤギ、ウシ等の動物に製造させた製品が開発され、最も進んだものについては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。さらにはクローン動物の医薬品生産への利用の可能性も検討され始めている。こうした動向をうけて米国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."、EU CPMPでも同年にガイドライン "Use of transgenic animals in the manufacture of biological medicinal products for human use."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あるいはクローン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るとされ、我が国においてもいくつかの会社が設立されている。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／クローン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、本研究の初年度では、今後、開発が進展すると思われるトランスジェニック動物を応用した製品の製造技術の状況を把握し、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、維持する上での留意事項及び製品の品質や安全性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成するための基礎的研究を行った。

本年度になりヒトのクローン技術などについての議論が増加した。とくに新聞報道等によれば諸外国ではヒトのクローン技術に関しての研究が進み、その技術の特許が認められたとのことである。それに対して社会的にはヒトクローン技術の広がりには何らかの倫理的な規制が加わるべきとの意見も多く、政府もその方向で施策を行っているようである。

一方動物に関連しては研究の規制はしないものの、届け出制などにする方向と思われる。本研究における対象はすべてこの動物のクローン技術に関連することもあり、今後の推移を注視すべきである。またごく最近医薬審議会は”バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価について”医薬審326号、および”ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について”医薬審第329号を発出し、安全性評価方法についての方針を示した。

## B. 研究方法

本年度は以下の項目につきこれまで収集した文献、文書、その他情報を総合的に検討し、考察した。

### (1) 動物の作出と特性解析

### (2) 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析

(イ) トランスジェニック動物の作製に使われる動物

(ロ) 遺伝子の導入方法

(3) トランスジェニック動物系の保存、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動物の作製と選別、

(5) トランスジェニック動物の維持管理、

(イ) 動物の維持管理

(ロ) 既知感染物質のスクリーニング

(ハ) 非臨床安全性等試験

## C. 研究結果及び考察

### (1) 動物の作出

トランスジェニック動物とは、人為的に組換え DNA を導入され形質が変化した動物と仮に定義される。タイプとしては、胚に DNA が導入され遺伝性が獲得された動物と生殖細胞以外の体細胞に遺伝子が導入され遺伝性は獲得されていない動物の 2 種類が考えられる。

クローン動物とは遺伝子クローンが同一の動物を意味するが、現在話題となっているクローン動物は体細胞クローン動物である。生物学的な意味ではすでに分化した細胞核を取り出し、他の細胞（多くは受精卵）内に移植し、再度発生させ、個体を得ることをさす。この技術は一度分化した細胞核を再度発生させることができるということで生物学的な意義は極めて高いものである。この技術を医薬品の製造に利用できることは自明の理である。すなわちヒトの体細胞を用いて同一のクローンからなる胚、それから発生した小器官、臓器を作れることを意味するからである。理論的には生物学的製剤のすべては同一のクローンで作成できることを証明した

こととなる。さらにはそのまま培養が進めば同一クローンを持ったヒト個体が発生し得ることとなる。したがって倫理的な側面からの議論は重要である。本研究では倫理的な側面はさておき、こうして作成された医薬品の安全性について考察するわけであるが、こうした操作によって作成される蛋白等の生物学的製剤の安全性は本質的には極めて高いものと考えられ、通常の生物学的製剤の生産過程と同様なプロセスにより、とくに特殊な製剤として論ずる必要はない。逆に動物等の遺伝子由来の生物学的製剤の本質的な安全性を考えるとむしろ極めて安全な医薬品が生産されると考えてさしつかえないだろう。

一方、細胞、小器官、臓器などをこの技術により製造される医薬品と考えるといくつかの潜在的な安全性確認が必要となろう。その代表的なものとして染色体の末端のテロメア短縮の問題がある。これは細胞の寿命は1回の細胞分裂により短縮してゆくテロメアの長さに依存するという考えに基づいている。すなわちクローン動物を作出したときに用いた核内のテロメアがすでに細胞分化しているので生殖細胞のそれより短くなっている、得られた細胞、小器官および臓器はすでにその寿命が短縮しているという考えである。実際、世界ではじめて体細胞クローン動物として誕生したヒツジ”ドリー”の細胞のテロメアは使用した核と同じであり、生まれつき年齢がすでに経ているのと同等であるとされた知見に基づいている。実際テロメアが短縮した際には癌化も容易に起こるとされていることから、医薬品製造の安全性に関しては極めて関心を高めておくべき事項である。その一方すでにそれらに対する反論も出始めている。またウシの体細胞クローン動物はその乳汁の生産さらに畜産学的に優良な品種の開発などに関連して多数

作られたが、発生途上での死亡および奇形が極めて多いとされている一方、マウスの体細胞クローン動物ではそれらが経験されないだけでなく寿命もとくに短いという観察結果は報告されていない。したがってヒツジの例だけを引用してこの問題についての結論を出すには時期尚早との感が拭えない。

この問題は他のそもそも寿命が短い実験動物、たとえばマウス等での研究を積み重ね結論を出すべき問題と思われる。さらにクローン動物の遺伝子に関わる問題については、医薬品製造に関する安全性を論ずる立場からは、あまりにも情報の蓄積が少なく現在はまだ論ずる時期にはきていないものと考えられる。

遺伝子に関わらない医薬品製造に用いられる体細胞クローン動物に関しては、とくに他の動物を利用して医薬品を製造する場合ととくに区別して論ずる必要はなく、通常の医薬品製造に用いられるトランスジェニック動物と同様の配慮がなされる必要がある。したがって以降はとくに体細胞クローン動物を区別することなくトランスジェニック動物と同様に考察を進める。今後多数の研究の蓄積により全く新たな知見が得られた場合には別に議論をする必要があるかもしれない。したがって新しい情報の獲得はクローン動物を用いた医薬品製造における安全性の確保という点からは極めて重要と考えられる。

医薬品生産のためのトランスジェニック動物の作出とその利用法に関してはさまざまな戦略や技術があり得る。その中で、現在最も検討が進んでいる方法は、乳腺特異的に発現する乳タンパク質のプロモーター配列に目的遺伝子をコードする領域を連結させ、受精卵にマイクロインジェクションし、個体

として誕生・成熟させた後、乳線に目的物質を発現させ、乳中に分泌させるというものである。目的タンパク質側から考えても、乳汁は目的とする生物活性を保持しつつタンパク発現を可能にする格好のメEDIUMであり、また、目的タンパク質がきわめて高濃度に発現し、しかも共存するタンパク質類等が明らかであるところから精製法に関する戦略も立てやすい。さらに、乳腺という天然のフィルターを通過して生産物が得られるという過程を経ることは、生産動物由来のウイルス等微生物汚染の可能性が比較的低いことを意味しており、安全性に関する対策を立てやすいという利点も考えられる。ちなみに、乳汁は一般に食用に供されているものである。乳汁は、いわゆるプリオンに関しても比較的安全性の高い医薬品出発物質であると考えられている。すなわち、プリオンは乳腺中では生産されないし、入ってきたとしても持続して存続し得ないと報告されている。

WHOも乳汁と精液はプリオンに関して非感染であろうとみなしている。

なお、ここで生産しようとするタンパク質の多くは糖タンパク質であるが、生産動物として利用されようとしているのはヤギ、ヒツジやウシであり、従来の細胞培養系による糖タンパク質生産に一般的に利用されている齧歯類細胞に比べ、系統発生的にヒトにより近い動物系であるところから、付加される糖鎖もヒト型に近くなるのではないかとの期待もある。

一方、マウスの自己抗体の発現をブロックしてヒトの抗体遺伝子を導入し、ヒト型抗体をつくらせるトランスジェニックマウスの開発も報告されている。

このようにトランスジェニック動物を利用したタンパク質生産系は、細胞培養系と比

べて優れた特長を有するタンパク性医薬品の新しい生産方法として、研究が盛んに行われているばかりでなく、欧米ではすでに医薬品としての承認申請もなされている。我が国においてもトランスジェニック動物を利用して生産される製品が医薬品候補として出現してくるのは時間の問題といえる。上記に述べたように、トランスジェニック動物を利用したタンパク性医薬品の生産には、多くの利点が期待されるものの、製造方法は従来にない全く新しいものであり、生産物の品質、安全性、有効性評価に関しても未知、未経験の要素があることは否めない。したがって、この新たな創薬技術による医薬品創製を推進する立場を基本としながらも、製品の医薬品としての品質、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。

(2) 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析、

(イ) トランスジェニック動物の作出に使われる動物

トランスジェニック動物はcDNAの初期胚核へのマイクロインジェクションあるいは胚性幹細胞(ES細胞)にcDNAを導入して、導入されたES細胞を選別し、初期胚と融合させる、あるいは胚盤胞内に注入するなどの方法で作出される。ES細胞株が樹立した動物では後者を行い得るが、現在マウス、ヒトでは確立したが他の動物種では困難である。しかし、各研究者が他の動物種とりわけ乳汁を大量に生産する動物種のES細胞株の樹立にしのぎを削っているため極めて早い時期に確立するものと思われる。したがって他の動物種におけるES細胞株樹立に関する情報入手には敏感であるべきである。

通常の初期胚に cDNA をマイクロインジェクションする方法はマウス、ラットでは通常の実験手段として広く行われている。さらにヒツジ、ヤギ、ブタ及びウシでも手法は確立している。サルにおいても方法は確立されたといわれる。哺乳動物以外のより下等な動物種においても広く手法は確立されつつある。鳥類のニワトリ、両生類のカエル、魚類のゼブラフィッシュなどである。

また ES 細胞を用いた方法では ES 細胞の培養のためにフィーダー細胞が必要となり、多くはマウスの繊維芽細胞が使われている。ES 細胞の培養においてはフィーダー細胞との相性が重要とされていて、種々の試みがなされるが、本研究で話題とする安全性、とりわけ感染性物質の移行に関してはフィーダー細胞をはじめとする共培養される細胞の品質についても十分に確認する必要がある、トランスジェニック動物の作出に使われる動物の項に、これを記述しておく。

#### (ロ) 遺伝子の導入方法

トランスジェニック、ノックアウト動物の作出においては cDNA あるいは遺伝子をどこかの段階で導入する必要がある。最初のトランスジェニック哺乳動物はマウスで作出され、それは cDNA を初期胚の核内にマイクロインジェクションする方法で行われた。すなわち受精直後の前核期胚の核内、とりわけ雄性前核は大きいのでこちらが用いられるが、顕微鏡下に、cDNA 溶液を微量吸い込んだ極めて細いガラス管を刺入し、注入する。cDNA が注入された受精卵を偽妊娠させた、あるいは交配直後の動物の卵管あるいは子宮内に移植し、トランスジェニック動物が生まれてくる。

ES 細胞などの全能性のある細胞にあらかじめ遺伝子を導入し、この細胞を用いてキメラ動物を作出する方法も多く用いられる。ES

細胞をフィーダー細胞と共培養し、遺伝子を導入する。導入する遺伝子は通常、後に遺伝子導入された細胞を選別するためネオマイシン耐性遺伝子、遺伝子が発現すると細胞が死亡するようにジフテリアトキシン遺伝子、あるいは遺伝子発現特性、例えば cre/lox のように発現時期を調整するための遺伝子、などと組み合わせて作成される。

遺伝子を ES 細胞内に導入するにはいくつかの方法が使われるが、燐酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAE デキストラン法、エレクトロポレーション法などがある。ただ各種ベクターとりわけウイルスベクターを用いての導入も行われるが、これは本研究のテーマである安全性を考えた場合には、当該ベクターによる生体への影響を十分吟味しておく必要が生ずる。

遺伝子を導入され選別された細胞は初期胚と融合され、キメラを形成する。これにも大きく分けて 2 つの方法がある。4-8 細胞期胚の細胞塊の近傍に ES 細胞を接近させ融合させる方法と胚盤胞期の胚盤腔内に ES 細胞を注入する方法である。キメラ胚は偽妊娠あるいは交配直後の動物の卵管内あるいは子宮内に移植し、キメラ個体を得る。得られたキメラ個体を交配させホモ型に遺伝子発現する個体を通常動物の繁殖方法にて得る。

#### (ハ) 特性解析

導入された遺伝子は体細胞の一部を採取してサザンブロット法などで導入を確認する。遺伝子が導入された個体の中から、計画通りに遺伝子発現がなされ、所定の産物を生産する個体を選別する。とくに遺伝子の導入状況によりまたその動物の遺伝的バックグラウンドにより期待する産物の生産率は変化する。通常の家畜の育種と同様の手法で効率良く産物を生産する個体を選抜する。また



産物によっては大量の産物を生産するためにその個体に影響を及ぼし、かえって生産効率を下げる場合もある。

### (3) トランスジェニック動物系統の保存、継続的維持・供給体制の確立

動物系統の保存は従来の実験動物育種の方法で行い得る。ただしここで期待される特性は遺伝子発現なので通常のフェノタイプすなわち外見からだけで個体を選抜することはできない場合もある。究極的には産物の生産を指標として個体選抜を行うこととなるが、近年はそれを容易にするため、緑色の蛍光を発する遺伝子を組み込んで、遺伝子の発現を確認する方法もとられるようになった。

動物個体による系統の維持は思わぬ伝染病の発生などで妨げられることも多く、厳格な微生物統御が行われた環境で維持する必要がある。品質保証の観点から、動物系統の安全性の確保を論ずる場合、その個体の微生物学的ステータスを示すにとどまらず、その動物系統の飼育環境、方法をも確認する必要がある。こうして動物飼育施設の品質保証が必要となる。現在これを国際的に行っている団体としては AAALAC International があげられる。医薬品製造の用に供するこうした動物はその飼育施設を包括的に品質保証の認証を受けることが必要である。

それでも動物は突然の疾病に侵されることもあり遺伝子資源として系統を保存する必要もある。これには受精卵の凍結保存が勧められる。多くの動物種で受精卵を保存する技術が確立している。また精液を凍結し保存する事も行われる。多くの動物で体外受精法が確立しておりその手法を用いて必要に応じて個体を発生させることができるようになった。

動物の品質の維持においては微生物学的

な統御がもっとも重要であるが、動物個体を微生物統御したまま移動させることは極めて難しく、また品質維持の確認には煩雑さがともなう。そこで現在では凍結胚などを輸送するのが一般的となっている。多くの動物において、凍結胚を微生物汚染を排除しつつ輸送する手段は確立されている。

現在の焦点はやがて使わぬかもしれない凍結胚などをどのようにして、どのような組織で保存するかとなろう。これまでの細胞バンクなどに目的を明らかにして預けるのは最も現実的な話である。現在までのところ、個別には各機関がそれぞれの手法を用いて凍結胚保存を行っているが、これもやがては統一した手法を用いて保存を行うことが望ましい。そのためには凍結胚作成の標準法の確立だけでなく、保存胚のデータベース作成などの作業も重要となろう。

こうした保存には従来から活動している細胞バンクに期待することは大きい。その保存した胚から胚移植などにより個体を発生させ維持するための品質保証された施設が重要である。現在わが国には国際的に認証された動物飼育施設は存在していない。この認証が急がれる。

### (4) 生産用トランスジェニック動物の作製と選別

系統維持している動物から生産用動物群を作成し、選別することは従来の家畜育種の方法と同一手法で行い得る。従来の方法と違う点は生産される産物の品質保証のため、厳密な微生物統御を要する点である。とくに動物輸送時の微生物統御は極めて困難であり、授精卵などで輸送することが勧められる。

個体が得られれば遺伝子の発現をサザンブロット法などで確認し、さらに計画的な繁殖育種計画により生産効率の良い個体を選

抜することとなる。

#### (5) トランスジェニック動物の維持管理

##### (イ) 動物の維持管理

動物の維持管理はその産物の品質保証のため動物個体のみでなく飼育管理方式を含め吟味する必要がある。とくに動物の維持管理は従来の家畜の維持管理と同様なレベルの微生物管理しか行われなことが多く、ここで問題にする動物医薬品の製造工場としての品質を要求されるので極めて厳格な維持管理が要求される。この管理のためには動物に直接関わる環境の統御、投与される飼料、飲水、飼育装置の品質管理も要求される。また品質保持のためには動物管理施設への新たな動物の搬入時にも十分な検疫を行う必要がある。原則的には、当該の生産コロニーへの動物の搬入は禁止すべきである。

またヒトおよび搬入物品からの微生物混入にも注意を払う必要がある。関係者は動物に微生物を移すことのないような服装をすることなど現行の実験動物施設での飼育管理方法を遵守するだけでなく、管理者は関係者の健康管理を適切に行う必要がある。とくに健康であればとくに問題とはならないような微生物も健康を害することによりそのヒトの体内で増殖し、動物に伝播させることも考えられるので関係者の良好な労働環境を構築することも重要である。さらに関係者の飼育する動物からの微生物の移行なども考慮し、最低同一動物種の飼育は禁止すべきである。

##### (ロ) 既知感染物質のスクリーニング

すでに”ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について”が医薬審から発出されているので、トランスジェニック動物に関してもほぼこれに準じた扱いが必要

となる。この文書ではウイルスについてのみ記載されているが、細菌、カビさらにはプリオン等についても同様な考え方が必要である。

細胞と動物の違いは前者が *in vitro* で培養されるのに対し、後者は通常環境で飼育されるので、微生物学的統御は極端に困難である点である。また統御しなければならない環境は細胞とは比較にならぬほど膨大な空間となり、一層統御を困難にしている。さらに細胞では感染がおこると培養そのものになりたたなくなることが多く容易に感染が知覚されるが、動物では容易には感染は検知されない。また細胞では一度汚染した場合でも微生物の除去を行うことも可能であるが、動物ではその個体ではほぼ不可能である。したがって一度汚染した場合には、その個体を清浄化するのではなく次世代を清浄化することとなる。

以上を考えると感染物質のスクリーニングはトランスジェニック動物作出過程における生物材料すべてで行うことが強く勧められる。また動物個体においても定期的なモニタリングが必要となる。

トランスジェニック動物種が感染されている可能性のある微生物の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、ブルセラ、サルモネラ、ブタ丹毒、結核、コクシエラブルネティー（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としてはスクレーパー、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（補遺参照）。

以上の観点から、トランスジェニック動物種に感染している可能性のあるウイルスに関して可能な限り明らかにしておく必要がある。特に、宿主に感染後、発症まで長期間かかるレトロウイルスやウイルスの組換えの可能性については注意が必要である。

トランスジェニック動物及び細胞、組織、臓器に対する既知感染物質のスクリーニングは目的産物の回収および精製方法に応じた規定とする。トランスジェニック動物に存在する異種親和性の内因性ウイルス、持続性ウイルスのヒトへの感染性や疾病との関連性について明らかにしておくことは特に重要と考えられる。なお、スクリーニングに用いる検査法は特異性、感受性、有効性が示されているものでなければならない。

トランスジェニック動物の細胞、組織、臓器試料は、例えばヒト末梢血単核細胞などの適切な指標細胞との共培養などにより試験する。すなわち、無作為継代培養を行い、細胞障害性の影響や病巣形成の観察、逆転写酵素分析、電子顕微鏡検査などの適切な方法を用いて感染物質の有無を明らかにすることが必要と考えられる。培養によりウイルスまたはウイルス様物質の存在が示唆された場合は免疫学的手法、分子生物学的手法によりさらに検討する。潜伏性ウイルスは化学的方法や照射法により誘発・活性化させることで検出が容易となる。予想される細菌の検出

にはPCR法を適用できる。

スクリーニングすべき感染物質の数は多いが、嚴重に微生物統御した環境において飼育されるトランスジェニック動物がその作出過程においても厳格な微生物統御がなされていると多くの感染物質はとくに考慮する必要はなくなる。その一方厳格な微生物統御が行われない場合はあらゆる危険性を排除する立場から、できるだけ多くの感染物質をスクリーニングする必要がある。初年度に示した既存の人獣共通感染症の起因感染物質に加え、“ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について”の別表に示された動物に接種することにより抗体産生により検出されるとされるウイルスの一覧表と、細胞株のウイルスクリアランス試験に用いられたことのあるウイルスの例を参照することを勧める。

#### (ハ) 非臨床安全性等試験

トランスジェニック動物由来医薬品では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。これらに適格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十分なだけ、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については、理論上考えら

れていることであるが、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。

また、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。

#### 補遺 人獣共通感染症原因微生物

ヒトに感染するとともに、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシなどのトランスジェニック動物作出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としては表1の様なのが知られている。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か、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、乳頭、乳房に発痘。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。