

－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流産が多い。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。

－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。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。

いずれにせよ、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を証明することも必要である。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上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。

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	◎	◎	◎	◎
Murry valley encephalitis virus	◎	◎		
Louping-ill virus	◎	◎	◎	◎
Foot-and-mouth disease virus	◎	◎		
Japanese encephalitis virus		◎		

Vesicular stomatitis virus		◎		
Orf virus			◎	◎
Borna disease virus			◎	◎
Rabies virus	◎	◎	◎	◎

* インフルエンザウイルス 全世界的に存在し、ブタ、ウマ、水鳥でも多く見られるが、インフルエンザのヒトでの流行はこうした動物を介した変異体のウイルスによることが最近明らかにされた。インフルエンザはニワトリ胚で容易に培養可能であり、ワクチンも製造されているが、ひとたび流行すると多数の死者が出ることが明らかとなっているので、今後注目すべき人獣共通感染症である。

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 豊島 聡 星薬科大学学生化学教室教授

研究要旨 ヒト型モノクローナル抗体を産生するトランスジェニックマウスの作製は、マウスの抗体遺伝子をターゲッティングしてその発現をブロックしたマウスとヒトの抗体遺伝子を導入したマウスを交配して行う。さらに、目的産物であるヒト型モノクローナル抗体を得るためには免疫したトランスジェニックマウスのリンパ球とミエローマ細胞とのハイブリドーマの作製が必要となる。すなわち、通常のトランスジェニックマウスを応用した医薬品の製造と異なり、トランスジェニック動物が直接目的産物を産生するわけではない。本研究では、ヒト型モノクローナル抗体産生トランスジェニック動物において特に考慮すべき点を中心に考察を加えた。

A. 研究目的

バイオテクノロジーの飛躍的進歩により、トランスジェニック動物の作製は容易になり、これを応用した医薬品の製造も開始されてきている。ヒト免疫グロブリン（抗体）遺伝子は大変大きなものであり、これを導入したトランスジェニックマウスの作製は困難であると考えられたが、すでに作製されている（全ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むものではない）。作成法は多少複雑であり、はじめにマウス免疫グロブリンのH鎖及びL鎖の遺伝子を

それぞれターゲッティングしたマウスを調製し、これらを交配することにより、マウス免疫グロブリンを産生しないノックアウトマウスを作製する。一方、ヒト免疫グロブリンのH鎖及びL鎖の遺伝子をそれぞれ導入したトランスジェニックマウスを調製し、これらを交配することにより、マウス免疫グロブリンに加えヒト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作製する。ヒト免疫グロブリンのみ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

子のノックアウトマウスとヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスを交配することにより得られる。この過程はトランスジェニック動物に直接目的医薬品を生産させる場合と異なる点を含んでおり、医薬品の安全性評価にあたっては特定の考慮が必要である。本研究は、トランスジェニックマウスを応用して作製するヒト型モノクローナル抗体の安全性評価にあたり特に考慮すべき要件について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト型モノクローナル抗体産生トランスジェニックマウスに関連する公表論文を参考に検討を加えた。

C. 研究結果及び考察

1 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析

(1) トランスジェニック動物の作製に使われる動物

ヒト型モノクローナル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マウスについて考慮すべき要件は、他の医薬品製造用トランスジェニック動物と同様である。

(2) 遺伝子の導入方法

他のトランスジェニック動物作製と同様に遺伝子のマウスへの導入については詳細な記述が必要である。特

に YAC ベクターを用いた大きな genomic 遺伝子の導入については注意深く記述される必要がある。

(3) トランスジェニック動物の確認

マウス免疫グロブリンを産生せずヒト免疫グロブリンを産生する初代のトランスジェニックマウスの作製には、まずマウス免疫グロブリンの H 鎖及び L 鎖遺伝子それぞれのノックアウトマウスに加え、ヒト免疫グロブリンの H 鎖及び L 鎖遺伝子それぞれのトランスジェニックマウスの調製が必要である。従って、トランスジェニック動物の確認はこれらのマウスについても必要である。すなわち、ノックアウトマウスについてはターゲッティングした遺伝子が発現していないことを、トランスジーンしたマウスについては目的遺伝子が発現していることを確認する必要がある。なお最近の知見によれば前述のようにして作製されたヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスは、定常部がマウス型で可変部がヒト型の抗体(キメラ抗体)を産生することがあるのでターゲッティング遺伝子の非発現とトランジーン遺伝子の発現は注意深く調べる必要がある。しかし、目的産物である純粋なヒト型抗体の選択は目的抗体産生ハイブリドーマのクローニング時に可能であり、トランスジェニックマウスがキメラ抗体を産生

していたとしても医薬品としてのヒト型モノクローナル抗体作製に応用することは可能である。

2 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

ヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスの保存、維持については他のトランスジェニック動物と異なり、マウス免疫グロブリン遺伝子ノックアウトマウス及びヒト免疫グロブリン遺伝子導入マウスの保存維持も考慮する必要がある。

3 生産用トランスジェニックマウスの作製

他のトランスジェニック動物と同様に行う。

4 トランスジェニックマウスの維持・管理

他のトランスジェニック動物と同様に行う。

5 トランスジェニック動物からの目的産物の採取、精製、製品化

5.1 トランスジェニックマウスからの目的抗体の採取

トランスジェニックマウスを応用してヒト型抗体を採取するためにはまず抗原による免疫、免疫リンパ球とミエローマ細胞とのハイブリドーマの調製、目的抗体産生ハイブリドーマの選択を行う。このようにして選択されたハイブリドーマが確かにヒト型抗体を産生していることを、遺伝子及びタンパク質レベルで厳密に確認する必要がある。このようにして選択されたハイブリドーマが目的抗体を得るためのホスト細胞となる。このハイブリドーマからの目的抗体の大量採取、精製、製品化は”動物細胞を応用した医薬品の生産”に準じる。

19990742

このページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice

Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Lee DV, Erickson KL, Luna J, Roy CM, Abderrahim H, Kirschenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Klapholz S, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jakobovits A
Nat Genet 1997 Feb;15(2):146-156

Dual enigma of somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes: targeting and mechanism.

Winter DB, Gearhart PJ
Immunol Rev 1998 Apr;162:89-96

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 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注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。（4）さらに、近年急速に進歩している核酸増幅法検査をトランスジェニック動物由来製品に適応する際にいくつかの考慮すべき点が存在することが明らかになったので、これらの点について考察した。

1. トランスジェニック動物におけるウイルス汚染

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、尿等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的

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、血液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（NAT法検査）を適切に活用すべきである。

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進歩に即した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. 分類

現在までトランスジェニック動物由来医薬品は主にヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ等より得られている。当然、用いる動物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。

ー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。

ー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、乳房、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。

ー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。

ー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。

ーOrf virus (オルフウイルス) 動物では、口唇、鼻鏡、乳房などに発瘡。死亡す

ることは希である。ヒトでは、手、指などに発瘡。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。

ー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。

ー 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

医薬品の製造に用いられるトランスジェニック動物は、適切な健康管理が行われ、様々な検査によりその動物が健康であること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つ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 原料

3.1 原料でのウイルス検査—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発展してきている。そこで、NAT法による原材料のウイルス検査を行う際に検討すべき課題について以下に述べる。

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。

3.1.1 NAT法導入に当たって考慮すべき事項

試験は可能な限りスクリーニング試験として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、N

AT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。

3.1.2 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。

3.1.3 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参照品を対照として、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・参照品あるいは自家参照品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。また国際標準品や国内標準品がなく、in houseにおいて標準品・参照品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。

3.1.4 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参照品、あるいは適切な手法により設定された自家参照品を用いること。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。

3.1.5 測定

測定は、各試料について複数回測定を行い、陰性コントロール及び陽性コントロールを必ず一回ごとのNAT試験に入れておくべきである。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。

3.1.6 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)

3.2 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。可能であれば、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。

3.3 製造工程及び最終製品でのウイルス否定試験

必要に応じてNAT法によるウイルス否定試験を製造工程におけるin-process試験や最終製品での試験として設定することを考慮すべきである。

4 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、局方生物医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。

5 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。(5) さらに、近年急速に進歩している核酸増幅法検査をトランスジェニック動物由来製品に適応する際に考慮すべき点を明らかにした。

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
牛痘ウイルス (Cowpox virus)	◎			
偽牛痘ウイルス (Paravaccinia virus)	◎	◎	◎	◎
マレーバレー脳炎ウイルス (Murray valley encephalitis virus)	◎	◎		
羊跳躍病ウイルス (Louping-ill virus)	◎	◎	◎	◎
口蹄疫病ウイルス (Foot-and-mouth disease virus)	◎	◎		
日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus)		◎		
水疱性口炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus)		◎		
オルフウイルス (Orf virus)			◎	
ボルナ病ウイルス (Borna disease virus)			◎	
狂犬病ウイルス (Rabies virus)	◎	◎	◎	◎
インフルエンザウイルス (Influenza virus)		◎		
ブタE型肝炎ウイルス (Porcine hepatitis E virus)		◎		
脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis virus)	◎			
ロタウイルス (Rota virus)	◎			

クローン動物を利用した医薬品開発の現状

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第3室長

研究要旨 クローン動物について医薬品の動物工場としての利用という視点から、現状を調査した。1997年のヒツジの体細胞クローン動物の作製の報告以来、ウシ、ヤギ、マウス、ブタなどにおいて次々と体細胞クローン動物の作出が報告されている。医薬品の動物工場の作製においても、動物への優れた遺伝子導入法として体細胞クローン動物作製技術が直接応用されはじめており、トランスジェニッククローン動物の動物工場への利用が具体化している。動物工場としての評価は基本的には通常のトランスジェニック動物の場合の原則をあてはめることができる。しかしクローン動物については生物学的に未知な部分が少なくなく、今後の生物学上の知見の集積に応じた対応が必要と思われる。

A. 研究目的

トランスジェニック動物をバイオリアクターとして用いた医薬品生産法は目的物質を高収率に得られることから、21世紀における生物薬品の優れた生産法として注目されている。一方、最近数年の間に体細胞の核移植によるクローン動物作製の成功を契機に、クローン動物の作成例が続々と報告されるようになり、さらに目的遺伝子を導入し、乳汁中に目的物質を分泌するクローン動物を医薬品生産の現場に利用しようとする動きも急になっている。そこで本研究ではクローン動物の作製技術の現状を調査するとともに、その問題点を整理した。

B. 研究方法

クローン動物に関連する研究機関等の発表および公表論文等を参考にしながら、医薬品製造の観点からクローン動物に関する情

報を整理する。これらの情報を参考に、クローン動物応用医薬品の品質・安全性確保に必要な諸要素を整理し、評価方法および評価基準について検討した。

C. 研究結果および考察

1. クローン動物

1.1 細胞の核移植によるクローン動物の誕生

クローン動物の作製法としては、従来から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、精子と卵子の受精がその過程にあるため、作出されてくるクローン動物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

ーン動物が有する遺伝情報の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いたが、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 (Nature 385, 810-813 (1997))。

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。研究グループのとし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) ことにある。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が抑えるとともに、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 (Scientific American, 279, 30-35 (1998) (翻訳: 日経サイエンス 29, 36-43 (1999)))。

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、乳汁中にヒト型液凝固第 4 因子を分泌するような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 (Science 278, 2130-2133 (1997))。

1. 2 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技術は、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、多くの場合トランスジェニック動物の作製のためには、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注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率は 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立はさらに低い。一方、体細胞の核移植によるクローン動物の作製効率は 2% 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、あらかじめ移植する細胞ヘジエンターゲティング法を利用して目的とする染色体部位に遺伝子を導入することが容易であり、また移植する細胞についてあらかじめ導入遺伝子の解析を行うことによって細胞を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. 3 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 (*Science* **282**, 2095-2098 (1998))、ヤギ (*Nature Biotech.* **17**, 456-461 (1999))、マウス (*Nature* **394**, 369-373 (1998))、ブタ (PPL Therapeutics 社報道発表 2000年3月14日)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ついてもまだ未知の部分が少ない。

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、ロスリン研究所と PPL Therapeutics 社によって作製されたポリーはこの方法によっている。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とが混在する。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生む要因となる。

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 (personal communication)。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のテロメアが短いという結果の報告はないようである。

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のデータはなく、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り、長期にわたる研究が必要とされよう。

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」と同様の原則が適用できる。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、詳細に報告しなければならない。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。

その後の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じ原則で考えればよい。

19990742

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells
Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH
Nature 1997 Feb 27;385(6619):810-3

医療を変えるクローン技術

I.ウィルムート
日経サイエンス. pp.36-43. 1999.3

Eight calves cloned from somatic cells of a single adult.

Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H,
Tsunoda Y
Science 1998 Dec 11;282(5396):2095-8

クローン家畜の可能性

角田幸雄, 加藤容子
日経サイエンス. pp.44-47. 1999.3

Production of goats by somatic cell nuclear transfer.

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM,
Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ,
Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA,
Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y
Nat Biotechnol 1999 May;17(5):456-61

Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei.

Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R
Nature 1998 Jul 23;394(6691):369-74

Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep.

Evans MJ, Gurer C, Loike JD, Wilmut I, Schnieke AE, Schon EA
Nat Genet 1999 Sep;23(1):90-3

http://www.ppl-therapeutics.com/html/cfml/index_fullstory.cfm?StoryID=14