

- 薬品の特性解析, 品質及び安全性確保の評価
科学 - 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, トラ
ンスジェニック動物由来たんぱく質性医薬品,
トランスジェニック動物由来細胞治療用医薬
品— 衛研報告 117, 1-38 (1999)
- 8) 早川 堯夫 日局生物薬品の品質・安全性確
保に関する研究 - ウィルス安全性確保の基
本要件 (中間報告) 医薬品研究 30,
602-617 (1999)
- 9) Takao HAYAKAWA: Japanese Perspective with
Respect to Quality Control of
Biotechnological/Biological Products,
Pharmaeuropa, Special Issue (Biologicals
beyond 2000: Challenge for Quality
Standard in an Evolving Field), pp.261-262
(2000)
- 10) Takao HAYAKAWA, Miyako OHTA and Nana
KAWASAKI: Current Analytical Procedures
for Glycosylated Proteins, *Pharmaeuropa*,
Special Issue (Biologicals beyond 2000:
Challenge for Quality Standard in an
Evolving Field), pp.87-102 (2000)
- 11) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Sumiko HYUGA
Masashi HYUGA and Takao HAYAKAWA:
Application of liquid
chromatography/mass spectrometry and
liquid chromatography with tandem mass
spectrometry to the analysis of the
site-specific carbohydrate heterogeneity
in erythropoietin, *Anal. Biochem.*, 285,
82-91 (2000)
- 12) Durcova-Hills, G., Tokunaga, T., Kurosaka,
S., Yamaguchi, M., Takahashi, S. and Imai,
H.: Immunomagnetic isolation of
primordial germ cells and the
establishment of embryonic germ cells in
the mouse. *Cloning* 1 (2), 217-223. (2000).
- 13) Horri, T., Nagao, Y., Tokunaga, T., Minami,
N., Yamada, M. and Imai, H.: Serum-free
culture of murine primordial germ cells
and embryonic germ cells. *Theriogenology*,
53 (1), 219. (2000).
- 14) Muramatsu, H., Nagao, Y., Minami, N.,
Yamada, M. and Imai, H.: Intra-specific
transfer of liver mitochondria and their
fate during embryogenesis after
microinjection into mouse zygotes.
Theriogenology, 53 (1), 398. (2000).
- 15) Shimatsu, Y., Uchida, M., Niki, R. and
Imai, H.: Induction of superovulation and
recovery of fertilized oocytes in
prepubertal miniature pigs after
treatment with PG600. *Theriogenology*, 53
(4), 1013-1022. (2000).
- 16) Takeda, K., Takahashi, S., Onishi, A.,
Hanada, H. and Imai, H.: Replicative
advantage and tissue-specific
segregation of RR mitochondrial DNA
between C57BL/6 and RR heteroplasmic mice.
Genetics, 155 (2), 777-783. (2000).
- 17) Hashimoto, S., Takakura, R., Yoshinari,
M., Minami, N., Yamada, M., Imai, H. and
Kashima, N.: Relationship between the
responsiveness to multiple-ovulation
treatment and the number of bovine oocytes
collected by transvaginal follicle
aspiration. *J. Vet. Med. Sci.*, 62 (6),
647-650. (2000).
- 18) Hashimoto, S., Minami, N., Yamada, M. and
Imai, H.: Excessive concentration of
glucose during in vitro maturation impairs
the developmental competence of bovine
oocytes after in vitro fertilization:
relevance to intracellular reactive
oxygen species and glutathione contents.

- Mol. Reprod. Dev.*, **56** (4), 520-526. (2000).
- 19) Sakaguchi, M., Yotsushima, K., Kakei, T., Nakahara, H., Takahashi, S., Imai, H. and Izaike, Y.: Cloned calves produced by transfer of reconstituted embryos derived from fibroblast cells of a female fetus. *J. Reprod. Dev.*, **46** (4), 265-269. (2000).
- 20) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **910**, 1-11 (2001)
- 21) Kurosaka, S., Nagao, Y., Minami, N., Yamada, M. and Imai, H.: Relationship between activation and fusion on developmental ability of bovine nuclear transfer embryos. *Theriogenology* **55** (1), 239. (2001).
- 22) Oura, T., Nagao, Y., Muramatsu, H., Minami, N., Yamada, M. and Imai, H.: Fate of bovine sperm mitochondria and mitochondrial DNA in fertilized hamster egg. *Theriogenology* **55** (1), 240. (2001).
- 23) Takao HAYAKAWA: Specifications For Biotechnological Substances, ICH 5 Proceedings, The Regulatory Affairs Journal, (in press)
- 24) Takao HAYAKAWA: Biotech Process Evaluation, ICH 5 Proceedings, The Regulatory Affairs Journal, (in press)
- 25) Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products- a view from Japan- Dev Biol Stand., Basel, Karger, (in press)
- 26) 早川堯夫, 内田恵理子, 黒澤 努, 白倉良太: トランスジェニック動物由来細胞の品質・安全性確保に関する基礎的研究, 医薬品研究, **31**, 791-817 (2000)
- 27) 早川堯夫: 細胞基材の品質・安全性評価, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.33-49 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 28) 早川堯夫: 感染性物質概論: バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.101-122 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 29) 早川堯夫: 製品の特性解析・品質規格、安定性及び Comparability: バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.205-230 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 30) 川崎ナナ, 早川堯夫: 糖鎖構造解析, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.255-284 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 31) 早川堯夫: 遺伝子治療用医薬品の品質, 安全性等の確保, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.341-350 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 32) 早川堯夫: 細胞・組織利用医薬品等の品質・安全性の確保, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.397-419 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 33) 早川堯夫: バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験, 日本薬局方技術情報 (JPTI) 2001, JPTI 編集委員会編 (印刷中), じほう, 東京
- 34) 早川堯夫, 真弓忠範, 黒澤 努, 豊島 聡, 山口照英, 川西 徹: トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基

礎的検討 医薬品研究 (印刷中)

- 35) 早川 義夫, 水口 裕之: 遺伝子治療用医薬品の
実用化と一層の進展に向けて 次世代アデ
ノウイルスベクターの開発, 医薬ジャー
ナル, (印刷中)

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 21st Century, Kyoto (1998.7).
- 2) 早川 義夫: 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)
- 6) Takao HAYAKAWA: Critical Issues in the Approval of Biotechnology Products: Quality and safety issues., Millennial World Congress of Pharmaceutical Sciences, San Francisco (2000.4)
- 7) Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products A view from Japan., Biologics 2000 Conference Washington DC (2000.6)
- 8) Eriko Uchida and Takao Hayakawa: Quality and Safety Evaluation of Gene Therapy Products in Japan., Gene Therapeutic Agents Past, Present, and Future, The 4th annual KFDA international symposium, Seoul (2000.9)
- 9) Takao HAYAKAWA: The Japanese Perspective on Comparability of Biotechnology Products., The 3rd International Conference, Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biologicals, Washington DC (2000.9)
- 10) Takao HAYAKAWA: Specifications For Biotechnological Substances., The Fifth International Conference on Harmonisation, Brussels (2000.11)
- 11) Takao HAYAKAWA: Biotech Process Evaluation, The Fifth International Conference on Harmonisation, Brussels (2000.11)

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

クローン動物の作出法としては、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出技術の開発は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出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社はドリーに次いで、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。

このように、1997年の体細胞クローン羊“ドリー”の誕生以降、様々の動物種で体細胞からの個体生産が可能になっている。これまでに生産された体細胞クローン動物は、ヒツジ、マウス、ウシ、ヤギ、ブタであり、他の動物種においても可能になるのは時間の問題と思われる。特に、医薬品生産や異種臓器移植においてトランスジェニック技術の主要な対象となってきたブタにおいて体細胞クローン技術が開発されたことは、トランスジェニック個体の医学領域への応用が加速する可能性がある。

1. 3 クローン動物の作出技術の医薬品生産への応用

以上述べたクローン動物作出の成功は、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出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

め的手段となりうる、という点である。

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

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出する場合は、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出効率は数%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、ジーンターゲット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、将来的には効率のよいトランスジェニック動物作成法となる可能性がある。

(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出

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出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出において、初代トランスジェニック動物由来の細胞を

用いて、クローン動物を作出するならば、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 クローン動物の作出の問題点

クローン動物については、上に述べたように体細胞核移植法により作出が可能となったことを契機として、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、作出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) 作出効率の問題

現状では体細胞からのクローン個体の作出効率は依然として改善する方向にはない(ドリーの場合0.3%)。さらに、クローン胚を仮親に移植した後に、そのほぼ半数は着床前後で死滅し、その後分娩にいたる様々な過程で流産死する。さらに出生直後には、胎児の過大化、胎盤の肥大化、呼吸不全(肺機能の未成熟)、線維芽細胞の異常増殖、胸腺の欠失などにより、ほぼ半数が1週間以内に死亡している。その原因はインプリンティング遺伝子のリプログラミング異常と推定されているが、直接的な証拠は得られていない。

今後の作出効率向上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出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

得られたクローン動物が元になった動物あるいはクローン動物間で表現型がどの程度類似しているのかについても、系統だったデータはいまだに得られていない。しかし、1個の受精卵を分割して得られるウシの双子について成長、肉質、乳量などを検討した結果を見ても、必ずしも同一ではなく、胎児期あるいは出生後の外的環境に影響を受けることがうかがえる。このことから、体細胞クローンでは同一卵子に由来する双子以上に相同性があるとは考えにくく、クローン技術をトランスジェニックの個体生産に応用したとしても、これらの個体の経済動物としての評価は改めて行う必要がある。

このようなクローン動物の個体差を生む要因としては以下のようなものが考えられる。

a. 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。

b. 核移植によるクローン動物の作出においては、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) クローン動物の作出の安定性

体細胞クローン技術のトランスジェニック動物の作出への応用としては、胎児あるいは成体から採取して遺伝子導入した体細胞を経由して、あるいはトランスジェニック動物の体細胞からの直接的なトランスジェニッククローン動物の作出がありうる。前者の場合は、理論的にはほぼ無限数のクローン動物の作出が可能である。しかし、現在の体細胞への遺伝子導入技術では導入遺伝子の発現制御は困難であり、従来のマイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物と同様の問題を抱えている。最近、体細胞への相同遺伝子組換えによる遺伝子導入によりクローン動物の作出例が報告されているが、相同組換え体の選抜に時間がかかり単一アレルの組換えにとどまっている。一方、生産ベースにあるトランスジェニック動物からのクローンの作出も可能と思われる。この場合、何世代にも渡って安定的にクローン動物の作出が可能かについては将来的には問題が生じてくるかもしれない。例えば“ドリー”の場合には、染色体末端のテロメア一長はその元になった体細胞のそれと比べると短縮しており (*Nature* 399, 316-317 (1999))、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が示唆された。しかし、老化したウシ体細胞を

用いてクローンを作成した場合には、テロメア一長は逆に伸張していることが報告されている。この矛盾については、現在のところ説明できていない。テロメア一長の短縮が個体の生存性に直接的に影響を及ぼす可能性については不明であるが、マウスでは6世代のクローン、ウシでも少なくとも2世代のクローンを繰り返し作出することは可能である。この点についてはさらにデータの蓄積が必要であろう。

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、クローン動物作出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、基本的には本報告書の「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、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年度本総括報告書「2.4 生産用トランスジェニック動物の作出」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 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出に関する留意点

1 ヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスの治療応用抗体作製に関連した特性

(1) ヒト免疫グロブリン産生能

作出したトランスジェニックマウスは、通常のマウスのマウス免疫グロブリン産生能と同等のヒト免疫グロブリン産生能を有することが、実用的に望ましいと考えられる。従って、トランスジェニックマウスの血清中のヒト免疫グロブリン量を測定する必要がある。しかし、ヒト免疫グロブリン産生能が通常のマウスより低い時でも、治療に応用できるヒト型抗体の作製には支障ない場合も考えられるので、同等のヒト免疫グロブリン産生能を有することが、本トランスジェニックマウスに必須の特性とはいえない。

一方、ある抗原で免疫したときに、種々の特異性（ポリクローナル）の抗体が産生されるかどうか調べておく必要がある。ヒト抗体産生B細胞クローンの数が少ないと目的とする抗体を得られる確率が低くなり、この場合実用性が低いと考えられる。

(2) 産生ヒト免疫グロブリンのクラス、サブクラス

ヒト型抗体の治療への応用には、

a. サイトカインのような生理活性を有する標的分子に結合させて、その活性を中和させる場合と、

b. がん細胞のような標的細胞に結合させて、これを破壊させる場合

が考えられる。これらの目的に有効な抗体のクラス・サブクラスは異なっている。a の場合には、標的分子のみを中和し、患者の正常細胞を傷つけない抗体が望ましいので、補体活性化能を有さないかあるいは非常に弱い抗体が必要となる。すなわち、この場合には IgG4 や IgG2 サブクラスの抗体が有用である。一方、b の場合には、標的細胞の破壊の多くが補体依存的であるので、補体活性化能の強い抗体が必要となる（抗体依存性細胞障害（ADCC）の場合にも Fc 部分が重要であり IgG サブクラスについて考慮することが必要である）。

以上のことより、トランスジェニックマウスが目的とするクラス・サブクラスの抗体を産生するかどうか調べておく必要がある。必要とするクラス・サブクラスの抗体を産生できないトランスジェニックマウスであっても標的抗原に対する結合性を有していれば、ヒト化の技術を応用することにより必要とするクラス・サブクラスの抗体を調製することは可能である。しかし、このようなトランスジェニックマウスの実用性はより低いと考えられる。

(3) ヒト免疫グロブリン産生マウスにおけるクラススイッチの有無

前述のように必要な活性を有するクラス・サブクラスの抗体を得ることが、抗体を治療に応用するためには必要である。そのためには特定のクラス・サブクラスのヒト型抗体を産生するトランスジェニックマウスを作出するか、すべてのヒト抗体定常部遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出する必要がある。後者の方がクラス・サブクラスごとにトランスジェ

ニックマウスを作出する必要がないので有用と考えられるが、免疫に伴いクラススイッチが起こるかどうか確認することが必要となる。

なお、通常の動物では、免疫を繰り返すことにより、より親和性の高い抗体が得られるようになる。これは遺伝子に変異が起こることにより生じると考えられるが、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスにおいても同様なことが起こるかどうか確認しておくといよい。

(4) トランスジェニックマウスが産生するヒト免疫グロブリンの糖鎖構造

トランスジェニックマウスの産生するヒト免疫グロブリンのタンパク質部分の構造は当然ヒト型であるが、糖鎖はマウス型である。糖鎖がマウス型であることにより、抗体をヒトに投与した時に特に問題があったという報告は今のところないと思われるが、異種糖鎖を含むヒト型抗体の投与がどのような影響を生体に与えるかの解析は充分になされているとはいえない。従って、作製したヒト型抗体の糖鎖構造を明らかにしておくことが必要である。

2 トランスジェニックマウスによるヒト型抗体の作製

トランスジェニックマウスを利用してヒト型抗体を得るためには、

a. 標的抗原による免疫、

b. 免疫トランスジェニックマウスからの脾リンパ球の採取、

c. 脾リンパ球とミエローマ細胞を融合してハイブリドーマ細胞を作製、

d. 目的とする抗体を産生しているハイブリドーマ細胞をクローニング、

e. 目的抗体を産生するハイブリドーマ細胞の大量培養

という過程が必要となる。目的とするヒト型抗体産生ハイブリドーマ細胞のクローニング後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。従って、トランスジェニックマウスを用いてヒト型抗体を作製する時に留意する点は、主に目的とする抗体を産生するハイブリドーマ細胞を、クローニング・確立する過程に存在する。

(1) ヒト免疫グロブリン可変部遺伝子の発現効率

ヒト免疫グロブリン可変部重鎖遺伝子を少量導入したマウスでは B 細胞の分化効率が低く、ある程度以上の可変部遺伝子を導入したマウスでないと十分な分化が起こらないことが最近報告されている。すなわち、医薬品としての開発に十分な有効性を有する抗体を得るためには、十分量の可変部遺伝子を導入することが望ましい。

ヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスには、マウス軽鎖 (κ 鎖及び λ 鎖) の一方のみ不活性化したものがあるが、このようなマウスでは導入したヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子の発現効率の低いことが判明している。従って、軽鎖遺伝子は両方とも不活性化することが望ましい。一方のみ不活性化してある場合には、クローニングしたハイブリドーマ細胞の産生する抗体がヒト型であることを十分に確認する必要がある。

さらに、マウス免疫グロブリン遺伝子が発現できる状態にあると、非免疫状態ではヒト免疫グロブリンが十分量存在するが、免疫するとマウス遺伝子の方が優位に発現することも最近報告されている。この観点からもクローニングされたハイブリドーマ細胞の産生する抗体がヒト型であることを確認することは必須と考えられる。

補遺 3 マウス等の小動物のトランスジェニック動物実験施設に関する留意

点

トランスジェニック動物／を用いた医薬品生産では、個体あたりの生産量が多いという点から主としてヤギ、ヒツジ、ウシ等の家畜が使用されている。しかし、ヒト型抗体産生マウスのように、医薬品生産においてもマウス、ラット等の小動物の利用も考えられる。小動物の場合、その動物施設に関する留意点は家畜とは大きく異なる。そこで、学術審議会学術情報資料分科会学術資料部会（平成 9 年 7 月 10 日）や、国立大学動物実験施設協議会編動物実験施設における遺伝子操作動物の取扱に関する手引き（案）（第 2 版）等を参考にして、トランスジェニック小動物の実験施設について、留意点をまとめた。

1 トランスジェニック動物の逃亡防止対策

組換え DNA の作製実験 (in vitro 実験) は組換え体を肉眼で確認できないのに対し、トランスジェニック動物はそれ自体が組換え体と考えられ、動物個体ごとに肉眼で観察可能であり、管理区域内での存否を直ちに確認できる。また、トランスジェニック動物はこれまで自然界に存在しない動物であり、これが外部へ逃亡した場合は自然環境に影響を与える可能性がある。即ち、同種の動物と交配・繁殖する事により、自然生態系を変化させる事も考えられる。従ってトランスジェニック動物の取扱いの基本は、実験室外へ逃亡させない措置が絶対必要条件である。

2 トランスジェニック動物作出の実験室・飼育室

トランスジェニック動物作出に必要なスペースは、もともになる動物の系統、生殖能力、組換え DNA の種類、実験者の習熟度等で、必要な動物数の幅が大きく、統一した数値を提示する事は困難である。しかし、一応の目安を考えてみ

る。一般的には、組換え DNA 作製は施設外で行われるであろうから、それに要するスペースはここでは考えない。実験室は原則的に 3 室必要である。

(1) 受精卵、胚操作の実験室：実験室は「大学等における組換え DNA 実験指針」に定められた安全度を有するものとする。

(2) 非遺伝子操作動物飼育室：受精卵や胚を供給する動物、偽妊娠動物作製用等。

(3) トランスジェニック動物作出用飼育室：飼育室は「大学等における組換え DNA 実験指針」に定められた安全度を有するものとする。

一般に、トランスジェニック動物は導入する 1 遺伝子 (1 コンストラクト) あたり数ラインが出来るので、必要な動物数は幅が大きい。そのため、動物数及びケージ数を十分に考慮しなければならない。さらに発牛工学技術を駆使して使用動物数やケージ数を減らす事が可能である。例えば体外受精法を用いて予め多数の受精卵を作製し、それらを凍結保存し、必要時に必要数を融解し、遺伝子操作動物の作出に供すること等である。また、当然であるが、誕生個体の導入遺伝子の有無を迅速に検定し、導入されていないものはすぐに処分する事なども飼育動物数の削減に必要である。

3 安全性の高いトランスジェニック動物の飼育管理

この場合には必要な物理的封じ込めと逃亡防止の措置を取るという条件の下に、一般の実験動物と同様の飼育管理が出来る。この点が大幅に緩和された点である。

(1) 逃亡防止策

飼育室・実験室においてはトランスジェニック動物が逃亡又は隠れるような床、壁、天井の隙間や、給排気口・排水管等の開口部には逃亡防止策を講ずる事。例えば、給排気口には金属性の多孔板や網、排水口等の開口部にはスノコを設置し、その径は 8mm 以下が望ましい。

(2) ネズミ返し

廊下と飼育室の間の扉 (入口) には「ネズミ返し」を付け、その高さは 45cm 以上が望ましい。できれば飼育室に前室を設けるか、飼育棚・実験台を設置するスペースと入口との間も「ネズミ返し」で区切り、ここを前室の代用とする事が望ましい。また適宜ネズミ取りを数個置いて、逃亡防止策を講ずる。

(3) 専用の飼育室・実験室

飼育室・実験室はトランスジェニック動物専用とし、非遺伝子操作動物との同室飼育は原則として避ける。やむを得ない事情により同室飼育する場合は、それらの動物はトランスジェニック動物扱いとする。また、飼育室・実験室にはそれを示す標識を付け、関係者以外の立入制限区域とする。

(4) 飼育棚等の設備とケージ

飼育室に多くの系統のトランスジェニック動物を飼育する場合は、1 系統の場合と異なり、より厳重な管理が必要となる。飼育棚及びケージは逃亡防止に配慮した適切なものにする。

4 危険性の高いトランスジェニック動物の飼育管理

この場合には、「安全性の高いトランスジェニック動物の飼育管理」の飼育管理法に加えて以下の項目を遵守する必要がある。

(1) 個体識別

ケージはもとより、ケージ内のトランスジェニック動物は個体識別を明瞭にし、個体数のチェックをケージ毎に定期的に行い、必ず記録し、実験終了時まで保管する。

(2) 感染性因子

感染性ウイルスを排出する可能性があるトランスジェニック動物は、飼育・実験・維持等は全て感染動物実験区域内で行う必要がある。この際の物理的封じ込めレベルは、異種の DNA 分子、組換え DNA 分子又は組換え体を得るための作製実験又は増殖実験におけるレベルと同等のレベルを採用する。その際、昭和 62 年に国動協において定められた「感染動物実験における安全対策（案）」が参考になる。また感染実験そのものはこの安全対策（案）に則して飼育管理を行うのは勿論である。

(3) トランスジェニック動物子孫の飼育管理

実験に用いたトランスジェニック動物の子孫を得てそれを飼育する場合は、第 1 代と同様の管理を行う。

(4) 排泄物・実験終了後の動物個体等の処理

トランスジェニック動物の排泄物、残存飼料・飲用水等は消毒、滅菌、また焼却等の処理を行うこと。動物個体等は、安楽死後消毒又は滅菌を行い、その後焼却処理を行うこと。また飼育ケージ等も洗浄前に消毒・滅菌等の処理を行う。

補遺 4 トランスジェニック動物におけるウイルス汚染とその検査法

1. トランス動物応用医薬品に関連するウイル

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出する際に、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出し、それを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出した後は、飼育環境から迷入する可能性が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を行う。また核酸増幅法検査 (NAT

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. ウイルスの分類

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。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は以下の様なものが知られている。また人獣共通感染ウイルスについては表1にまとめた。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出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にはどのようなものがあるか、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、東ヨーロッパにもみられる。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。

—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。長い潜伏期間や病氣
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。

3. 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。

4 原料

4.1 原料でのウイルス検査—特に NAT 法に関し て

PCRをはじめとする核酸増幅法(NAT法)は、目

的遺伝子の一部や cDNA を試験管内で増幅し高感度に検出する手法として開発され、バイオテクノロジー技術の大きな柱となっている。NAT 法は今日まで様々な改良や新たな手法が開発されてきた。医薬品の品質確保のための各種試験としても、幅広く用いられてきているが、特にその高感度に DNA や RNA を増幅し検出できることからウイルスなどの感染性微生物ゲノムの高感度検出として有用性を認識され、広く利用されるようになってきている。PCR 法を用いることにより、抗体等を用いた血清学的手法では検出できないような濃度のウイルスを検出できるようになり、ウイルス安全性は飛躍的に向上すると期待されていた。しかし、PCR 法を用いても信頼限界、精度等を考慮すると、血漿 50-100 コピー/ml のウイルスゲノムが検出限界とされ、ウイルス感染のウィンドウ期に関しても、HIV や HCV ウイルスの短縮は認められるもの HBV ウイルスではあまりウィンドウ期の短縮が認められない等問題点が指摘されている。このような背景から、NAT 法の検出感度や精度等の更なる向上が望まれており、特にウイルス感染のウィンドウ期をさらに短縮できるような NAT 法の高感度化や多数の検体を処理するための自動化技術の開発が望まれるようになってきている。このような時代の要請を受けて、多様な増幅法や検出法が開発されあるいは開発中である。トランスジェニック動物由来医薬品のウイルス安全性についても、このような NAT 法の開発をめぐる動向を調査研究することは非常に重要である。将来の動向も含めた NAT 法を取り巻くこのような現況について解析した。

4.1.1 新たに開発されつつある NAT 法について

NAT の原点は、耐熱性の Taq ポリメラーゼを用いた polymerase chain reaction (PCR) である。PCR 法は、3 段階からなる DNA 合成反応を繰り返

して行うことにより鑄型となる DNA の指数関数的な増幅を行うことにある。まず、鑄型となる 2 本鎖 DNA (1 本鎖 DNA の場合にはこのステップは無い) を加熱・変性し (熱変性)、1 本鎖にする。増幅したい特定部位の DNA 鎖の両端に相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを反応系に過剰に加えた状態で温度を下げることにより、プライマーと 1 本鎖 DNA が相補部位で 2 本鎖を形成する (アニーリング)。この状態で、デオキシヌクレオチド 3 リン酸存在下に耐熱性 DNA ポリメラーゼを作用させると、ポリメラーゼは結合したプライマー部位から、DNA 相補鎖を合成していく (DNA 鎖の伸長反応)。この、熱変性-アニーリング-伸長反応のサイクルを、反応温度を変化させることにより繰り返し増幅を行う。最初の 2 サイクルは、長さが不安定な部分 2 本鎖 DNA が合成されるが、3 サイクル目からはプライマーに挟まれた部位の長さのそろった 2 本鎖 DNA が合成され、 2^n (n はサイクル数) に増幅される (図 3)。この PCR 反応には熱変性や 72°C 前後での DNA 合成反応が可能な耐熱性の DNA ポリメラーゼの利用が不可欠であり、これにより正確な目的部位の DNA 増幅が可能になった。PCR 法では、2 段階での PCR 反応を行う nested PCR 法を用いることによりその検出感度は数コピーの遺伝子を検出することも可能と言われている。また、RNA ウイルス遺伝子等の検出には逆転写酵素による cDNA 合成と PCR 反応を組み合わせた RT-PCR 反応が用いられている。

一方 PCR 法では、反応増幅産物の検出には電気泳動による目的バンドの検出が古くから行われてきているが、スクリーニング系として自動化を行うために蛍光プローブの開発が進み、反応産物の自動化リアルタイム検出系が開発されるようになった。このような自動化検出系では、検出したシグナルの特異性の評価が重要である。

このような自動化 NAT 法の開発においては、PCR 法のように何段階もの温度変化を行わなければならない反応系は機器の高額化が避けられず、非常に不利である。このような理由もあって、恒温での NAT 法の開発が急速に進んでいる。

このような恒温 NAT 法としては、T7RNA ポリメラーゼと RNaseH を組み合わせた Nucleic Acid Sequence Based Amplification 法 (NASBA 法)、環状構造を作るようなプライマーを用いて中程度の耐熱性を持つ鎖置換型 DNA ポリメラーゼ (BcaDNA ポリメラーゼ) による遺伝子増幅反応を行う Loop-mediated isothermal amplification of DNA 法 (LAMP 法)、プライマーとして DNA-RNA キメラプライマーを用いて鎖置換型 DNA ポリメラーゼによる鎖置換反応を利用して遺伝子増幅を行う Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic Acids 法 (ICAN 法) があげられる。これらの手法は、いずれも恒温で反応を行うために自動化が容易であり、また PCR と異なり反応容量の制限を受けないといった特徴をもつ。さらに、検出感度についても RNA あるいは DNA のいずれに適しているかの違いはあるが、PCR 法に匹敵することも報告されている。

4.1.2 NASBA 法

図 4 に示すように、NASBA 法では主として RNA ウイルス等をターゲットしており、まず T7 プライマーのタグをつけた標的 RNA の結合するプライマー存在下に逆転写酵素反応を行い cDNA を作製する。ついで、RNaseH により一本鎖 cDNA とし、これを鋳型として非 T7 プライマー存在下に DNA ポリメラーゼ反応を行い 2 本鎖とする。この反応により T7RNA ポリメラーゼが結合する 2 本鎖部位ができる。続いて、T7RNA ポリメラーゼにより標的とした RNA に対してアンチセンスの RNA

が 100~1000 コピーほど作られる。合成されたアンチセンス RNA に対しても逆転写酵素が働き、先ほどとは逆にセンス側の RNA が同じように合成され、このサイクルの繰り返しにより目的 RNA に対するセンス及びアンチセンス RNA が増幅される。これを、蛍光プローブ等を用いて検出する。

本法は、RNA を標的として増幅する方法であるが、プライマーの設計を工夫するなどして DNA の検出にも用いられているが、DNA の検出感度は PCR に比べて低いとされている。一方、RNA に対しては非常に感度がよく、また、PCR による RNA ゲノムの増幅と異なり 1 段階の反応で増幅が行われ、反応時間も 30 分ぐらいと短い。また、検出系として蛍光プローブを用いた自動検出機が作製されており、HCV や HIV ウイルスなどの RNA ウイルスのスクリーニングに既に用いられている。

4.1.3 LAMP 法

図 5 に示すように、LAMP 法では目的とする DNA の増幅しようとする領域の 3' 側にアンチセンスプライマー配列 (F2) とそのすぐ上流の配列に対してセンスな配列 (F1c) を結合したプライマー (F2-F1c) と F2 配列のすぐ下流の配列 (F3c) のアンチセンス配列 (F3) を持つ 2 種類のプライマーセットの存在下に鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用いて cDNA 合成を行う。この反応で合成された cDNA の末端は、用いたプライマーの F1 と F1c 部位がハイブリダイズすることによりループ状構造をとる。さらに、目的 DNA の 5' 側についても同様の設計プライマーを用いてループ構造を作製する。こうして作製した両端がループ構造を持つ複製 DNA を鋳型として、ループになった配列にまたがるようなプライマーセットを用いて DNA の伸長反応を行うことにより、ループを

介して数珠つなぎに合成される DNA と鎖置換反応により合成される DNA が増幅される。増幅された DNA は、電気泳動によりラダーとして検出される。さらに、逆転写酵素を利用して RNA より cDNA を合成し、これを鋳型に LAMP 法を行うことも可能と報告されている。

4.1.4 ICAN 法

ICAN 法の特徴は、図 6 に示すようにプライマーとして DNA-RNA のキメラプライマーを用いることと、LAMP 法同様に鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用いることである。目的 2 本鎖 DNA に対して、DNA-RNA キメラプライマー存在下に、鎖置換型 DNA ポリメラーゼにより DNA 伸長反応を行わせると、通常の伸長反応に加えて鎖置換反応により使用しているもう一方のプライマーから伸長して来た DNA 同士を鋳型とした DNA 伸長反応が起こる。このようにして鎖置換反応により合成された両端の 5' 側に RNA 配列をもつ 2 本鎖 DNA が合成される (反応中間物 A)。さらに、RNaseH を存在させることによりこの RNA 部分にニックが入り、ニックからの新たな DNA 合成が開始される。さらにこの伸長過程でも鎖置換反応が起こり、ニックの入った反応中間物 C と入っていない反応中間物 B ができ、ニックの入った反応中間物 C からは同様の鎖置換反応により最初の反応中間物 A ができることにより一連のサイクル合成が行われる。増幅された DNA は副反応で合成される鎖長のわずかに異なる DNA が見られるが、ほとんどが反応中間物 A とそれと同じ鎖長の反応中間物である。この検出には、電気泳動を用いることも、蛍光プローブを用いることも可能と報告されている。ICAN 法も最初のプライマーのアニーリング以外はすべて恒温で反応を行うことが可能であり、LAMP 法と同様に反応時間が非常に短いとされている。RNA の増幅に関

しても LAMP 法と同様に逆転写反応と組み合わせることにより可能である。

4.1.5 ウイルス等感染因子検出法としての NAT 法の比較と今後の課題

以上の 4 種類の遺伝子増幅法に関する、特徴、長所と欠点等をまとめると表 2 のように要約できる。PCR 法は、最初に核酸増幅という概念を確立した画期的な技術であり、RT-PCR 法をはじめとして DNA シークエンスに至るまで様々な周辺技術を含め膨大なデータの蓄積があり測定法としての完成度は高い。従って、核酸の抽出から、増幅した核酸の検出に至るまで周辺技術を生み出してきており、数多くの経験に基づくデータが蓄積している。また、周辺機器の整備も著しいものがある。他の NAT 法においても、PCR 法において蓄積された技術に基づく手法を利用している場合が多い。一方、PCR 法ではサーマルサイクラーを利用しているため、厳密な温度変化を行うことができる機械装置を装備する必要があるために検出を自動的に行う装置の開発が非常に困難であった。そのために現在開発されている自動検出機をもつ PCR 反応装置は、非常に高価のものになっている。さらに、最初に述べたように厳密な反応温度の変化を行うために反応容量にも制限がある。一方、他の 3 法では最初のプライマーのアニーリング以外は恒温で行うことが可能であり、自動検出や反応容量の変更が容易である。反応容量を大幅に増加できれば、検出感度を大幅に増加させることが可能になる。現在の PCR 法の検出限界としては信頼限界をどの程度取るかによるが、50-100 コピー/ml と報告されている。しかし恒温反応を行える PCR 法以外の NAT 法では以下に述べる理由から、理論的には 1 オーダーから 2 オーダー下げることとも可能である。すなわち、PCR 法では反応容量

の限界があるために、検出限界近くの希薄溶液をサンプリングにおいてはその中に分注された溶液にウイルスが含まれるか否かは確率論的な考慮が必要となる。一方、ICAN 法等の恒温反応による核酸増幅では反応容量を数十 ml にすることも容易であり、一旦目的遺伝子を増幅できれば増幅産物を濃縮して検出することも可能である。このような検出法は、スクリーニングとしては適切ではないかも知れないが、医薬品製造の適切な過程でこのような試験として導入できれば非常に有用と考えられ、このように、PCR 法以外の恒温反応を行うことの可能な NAT 法を用いることにより、ウイルス等感染因子の検出の高感度化に新たな可能性が出てきたが、克服すべき課題もいくつか認められる。

一つの問題点は検出したシグナルの確認についてである。NAT 法で検出した陽性シグナルの確認については、PCR 法ではほぼ確立された手法として利用できるが、ICAN 法等、他の NAT 法では十分な検討が行われていない。すなわち、PCR 法では nested PCR 反応等を用いることによりより特異性の高い核酸増幅産物の検出を行うことも可能であり、さらには直接増幅産物のシーケンスを行うことにより目的遺伝子を増幅できたことを直接確認することもできる。一方、NASBA 法では、増幅産物が RNA でありそのシーケンスの確認には煩雑な操作と相当の時間を要することになる。LAMP 法や ICAN 法の増幅産物は DNA であるので比較的容易にシーケンスを確認することが可能と思われるが、十分な検討はなされていない。また、nested NAT 法のような手法を取り入れることも考慮すべきかもしれないが、この点についても報告はない。

2 点目は、反応温度の問題である。通常の PCR 反応は 72℃程度の比較的高い温度で行われる。これは、目的遺伝子以外にプライマーが結合し、

擬陽性反応を起こすことを防いでいる。しかし、PCR 法以外の NAT 法では、PCR 法よりは低い温度条件下で反応を行っている。これは、用いる酵素がそれほど熱耐性ではないためと考えられ、従って目的以外の増幅反応が起こる可能性が高いと想定される。特に、LAMP 法や ICAN 法などの開発間もない手法においてはこれらの基礎的検討が重要と思われる。

一方、ウイルス等感染因子の NAT 法による検出の高感度化に関しては、反応そのものを高感度化するばかりでなく目的とするウイルス等の感染因子の濃縮法やそれに付随する核酸抽出法の改良によっても可能である。ウイルスの濃縮法としては遠心法やポリエチレングリコール法あるいはアルコール沈殿法などが知られているが、操作が非常に煩雑であることやそのあとの NAT 法を阻害する危険性があることなどの欠点が知られている。従って、NAT 法によるウイルス等感染因子試験法の高感度化を目指すには、このような目的とする医薬品原材料や製造中間体あるいは製品からのウイルス等の濃縮法や抽出法の開発も重要な要素である。

4.2 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、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。

4.2.1 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。

4.2.2 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。

4.2.3 試験

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。

4.2.4 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出たり、陽性コントロールが陰性に出た場合には測定を無効とする。

4.2.5 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）

4.3 NAT 法によるウイルス検出の限界

ウイルスの NAT 定量では、検体を限界希釈し、希釈検体中のウイルスを all-or-none に検出し、その希釈度と陽性確率からコピー数

を算出する、いわゆる限界希釈定量法 (Limiting dilution method) がしばしば用いられる (*J. Virol.*, 64, 864-872 (1990), *Transfusion*, 32, 824-828 (1992))。これは、ウイルス感染価測定 of TCID50 法に相当するものである。また、ウイルス感染価測定 of プラーク測定法 (Plaque assay) が定量的方法 (Quantitative assay) であるのに対して、これらは量的方法 (Quantal assay) と呼ばれる。

NAT における「検出限界」の概念は、ELISA 等一般の定量的検出法のそれと全く異なるが、しばしば混同される。また、NAT を繰り返し試行した場合の検出限界の概念も明確化されていないと思われる。本稿では、限界希釈法の理論を背景として、NAT の検出限界や本法による定量値の信頼限界について考察した。NAT は非常に高感度で種々の影響を受けやすいため、しばしば偽陽性や偽陰性が問題とされる場合があるが、ここでは技術上の問題は解決され、また、シングルコピーのウイルスが検出できるほど十分に最適化されていることを前提として議論を進める。

4.3.1 NAT 陽性確率からのウイルス存在量の算出およびその 95% 信頼限界 (理論)

一般的に、1 回の試行である事象が起こる確率を p とすると、 n 回の試行でこの事象が i 回起こる確率 $P(i)$ は、 $P(i) = {}_n C_i \cdot p^i (1-p)^{n-i}$ である (二項分布)。

同様に、総量 V 中にウイルスが k 個あるとき、任意量 v をサンプリングしたとき、この中にウイルスが j 個入る確率 $P(j)$ は、個々のウイルス粒子が独立に挙動するとした場合、二項確立で表現でき、

$$P(j) = {}_k C_j \cdot (v/V)^j \{1-(v/V)\}^{k-j} \quad (0 \leq j \leq k) \quad (1)$$

である。サンプル量 v 中に少なくとも 1 個のウ

イルスが入る確率 $Q (= P(1)+P(2)+\dots+P(k))$ は、全確率 1 からサンプル量 v 中に 1 個のウイルスも入らない確立 $P(0)$ を差し引けば求められる。すなわち、

$$Q = 1 - P(0) \\ = 1 - \{1 - (v/V)\}^k$$

である。サンプル量 v 中にあるウイルスの平均個数 m は、 $m = k \cdot v/V$ であるから、

$$Q = 1 - \{1 - (v/V)\}^{m \cdot V/v}$$

となる。数学的に、 $\lim_{x \rightarrow 0} (1-x)^{1/x} = e^{-1}$ である

から $V \gg v$ ならば $(v/V) \ll 0.01$ ならば実質的に、

$$Q = 1 - e^{-m} \quad (2)$$

が成立する。また、(1) 式は、 $V \gg v$ ならば、数学的に $P(j) = e^{-m} \cdot m^j / j!$ で近似できる (これは、ポアソン分布 (Poisson distribution) の一般式である)。すなわち、 $V \gg v$ ならば、ウイルスの存在確立はポアソン分布に従うと考えてもよい。 $Q = 1 - P(0)$ として (2) 式が同様に導かれる。

NAT で十分な感度を得られ、NAT 反応系に投入した検体中に少なくとも 1 個のウイルスが存在すれば陽性となる場合、この Q 値は NAT を試行したときの陽性確立に他ならない。NAT 陽性確率は検体中のウイルス量によって決まり、逆に、NAT 陽性確率からウイルス量を推定できることになる。

次に、ある検体について NAT を n 回試行し i 回陽性となったときを考える。真の NAT 陽性確率を Q とすると、 i 回陽性となる確率 $R(i)$ は、当然、二項確率で表され、

$$R(i) = {}_n C_i \cdot Q^i (1-Q)^{n-i}$$

である。このとき、実験的に得られた見掛けの Q 値 (Q_{app}) は i/n であり、

$$\sum_{i=0}^i R(i) \geq 0.05 \quad (3)$$

$$\sum_{i=0}^n R(i) \geq 0.05 \quad (4)$$

$i=j$

を満足する Q 値を適当な手法 (パソコン等) で求めれば、実験的に得られた Q_{app} 値の 95%信頼区間の上限値と下限値が得られる。したがって、(2)式から検体中のウィルス量とその 95%信頼限界に換算できる。

4.3.2 NAT における検出限界

前項(2)式から明らかなように、 $m \geq 3$ のとき、NAT 陽性確率 Q は 0.95 以上となる。すなわち、ある検体中に NAT 増幅対象とした検体量 (以降、NAT 検体量という) あたり平均 3 コピー以上のウィルスが存在すれば陰性となることはまずない (信頼度 ≥ 0.95 、危険率 ≤ 0.05)。換言すれば、NAT を試行し陰性ならば、信頼度 95%で 3 コピー以下/NAT 検体量であると言える ($n=1$ 、 $i=0$ で $Q_{app}=0$ のとき、式は $1-Q \leq 0.05$ となり、 Q_{app} の 95%信頼限界は 0.950 以下となる。(2)式でコピー数に換算すると、 $m \leq 3.00$)。一方、NAT 陽性であれば、信頼度 95%で 0.05 コピー/NAT 検体以上のウィルスがあることになる ($n=1$ 、 $i=1$ で $Q_{app}=1$ のとき、(4)式は $Q \geq 0.05$ となり、 Q_{app} の 95%信頼限界は 0.05 以上となる。(2)式でコピー数に換算すると、 $m \geq 0.0513$)。

NAT の検出限界を「確率 95%で検出できるコピー数」や「陰性結果をもたらすコピー数の 95%信頼限界」と定義すると、3 コピー/NAT 検体量となる。検出限界を「確率 50%で検出できるコピー数」(0.7 コピー/NAT 検体量)と定義することは、以下に述べるように合理的で至便性があるが、血漿分画製剤のウィルスバリデーション研究では、前者を検出限界として製造工程の除去不活化率を算出することが推奨されている (Federal Register, 61, 21882-21891 (1996).)。

次に、NAT を全く独立に n 回試行した場合を考える。 n 回とも NAT 陰性ならば、95%の信頼限界で、 $(1-Q)^n \geq 0.05$ 、したがって、 $m \leq 3.00/n$ であ

る。例えば、NAT を 3 回試行して全て陰性であったとき、危険率 5%で 1.0 コピー/NAT 検体量以下と言える。このように、統計学的には NAT の検出限界 (95%信頼限界) は試行回数に反比例して変化することになる。定性的には、NAT を n 回繰り返して試行し全て陰性であることは、 n 倍量の試料を用いて NAT を 1 回行い陰性であった場合と同じ結果と考えられる。

NAT を n 回試行して全て陰性であったとき、それは起こるべくして起こった (まれに起こったのではない: 危険率 5%以下) と考えると、その確率 Q は $(1-Q)^n \geq 0.95$ で表される。したがって、 $m \leq 0.0513/n$ となり、 n 回とも陰性となるために許容される最大のコピー数が求められる。このコピー数以下ならば、必ず (95%の確率、信頼度 95%、危険率 5%で) n 回とも陰性となる。これに対して、検出限界のコピー数は「このコピー数以下ならば n 回とも陰性となることがある。(確率 5%以上で)」と表現されるコピー数である点に留意されたい。

NAT を n 回試行して全て陽性であったとき、95%の信頼度で、 $Q^n \geq 0.05$ 、 $m \geq -\ln(1-0.05^{1/n})$ である。例えば、NAT を 3 回試行して全て陽性であったとき、危険率 5%で 0.5 コピー/NAT 検体量以上といえる。NAT を n 回試行して全て陽性であったとき、それは起こるべくして起こったと考えると、その確率は $Q^n \geq 0.95$ で、 $m \leq -\ln(1-0.95^{1/n})$ となり、 n 回とも陽性となる最小のコピー数が求められる。

以上のような NAT 結果とウィルス数との関係をもう少し一般化して図示すると、図 7 のようになる。大別して 3 領域、すなわち、 n 回とも全て陽性になるウィルス数 (繰り返し回数に依存するが、3~5 コピー/NAT 検体量以上)、全て陰性になるウィルス数 (0.050~0.005 コピー/NAT 検体量以下)、そして陽性か陰性か定まらない