

種々のガイドラインにおいて、動物を医薬品のソースとする場合はこうした動物飼育施設の認証に AAALAC International の認証が有効であるとしている。

#### 異種移植のソース動物

異種移植のソース動物に関しては米国の FDA が詳細なガイドライン <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> と今後の方針を発表した <http://www.fda.gov/cber/xap/xap.htm>。当然医薬品を製造するための動物とはその品質において同等であることはないが、微生物統御の考え方は極めて参考にすべき点が多い。今後の米国、欧州の関連ガイドライン等も注目すべきである。

#### D. 考察

以上現在までに収集した情報からトランスジェニック動物／クローン動物を利用して製造する医薬品の安全性評価に関連してソース動物の微生物学的統御に関して記述した。基本的にはこれまでも医薬品として使われてきたワクチンなどの生物学的製剤のうち動物ないし動物の組織に接触して作成された医薬品が極めて良いモデルとなる。しかし、これまで遺伝子改変動物はこうした目的には利用されていなかったため、微生物統御ならびに遺伝的操作がすすんでいる実験動物に注目して、ソース動物の微生物統御を行うことについて議論する必要がある。その際に異種移植のソース動物は遺伝子改変動物であることも多いので関連ガイドラインが参考となる。

#### E. 結論

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の安全性確保はソース動物の微生物学的統御が重要である。そのためには飼育施設の認証制度が必須となる。

## 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 今井 裕 京都大学大学院農学研究科教授

### 研究要旨

体細胞クローン技術の開発によって、トランスジェニック動物の作出に新たな経路が生まれた。そこで、最近のクローン技術について考察するとともに、医薬品生産の上で中心的な役割を果たすと予想される家畜について、トランスジェニック動物の維持管理、防疫上必要とされる注意事項について考察した。

#### A. 研究目的

乳汁中に医薬品を生産するトランスジェニック動物として、家畜は主たる対象動物となる。しかし、現在のトランスジェニック動物の作出やその維持管理についてのガイドラインは、主として実験動物を想定して作られており、家畜の特性を考慮したものにはなっていない。また、家畜は食品衛生上の基準は示されていても、トランスジェニック家畜が生産する医薬品の安全性についての基準はこれまでに示されていない。そこで、本研究では、家畜を中心として、トランスジェニック動物の生産から系統維持にいたる一連の過程において注意すべき点についての考察を試みた。

#### B. 研究方法

これまでにわが国で一般的に行われている家畜の飼育方法、わが国で唯一のトランスジェニック家畜専用の飼育施設（農林水産省畜産試験場、形質転換実験棟）、遺伝子組換え動物のガイドラインなどをもとに調

査し、医薬品を生産するトランスジェニック家畜について留意すべき事項について検討した。さらに、トランスジェニック動物の生産は近年開発された体細胞クローン技術の進展に大きく影響を受けることが考えられるので、学術論文から最近の体細胞クローン技術についても調査を行った。

#### C. 研究結果および考察

##### 1. トランスジェニック家畜の生産と維持管理

##### 1. 1 トランスジェニック家畜の維持管理

医薬品生産の対象となるトランスジェニック動物種としては、マウス、ラット、ウサギなどの実験小動物とウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ミニブタなどの家畜が考えられる。両者は、動物としての特性からトランスジェニック個体の維持管理について区別して考えることができる。すなわち、前者は逃亡の可能性が高く、個体識別も煩雑になりやすいことから、飼育管理はより厳密に行うことができる。一方、家畜は個体識

別が容易であり、逃亡の可能性も極めて低いことから、飼育エリアをフェンスなどで外的環境と隔離することによって、トランスジェニック個体の維持は可能であろう。

実験動物ではSPFに対応した飼育施設でトランスジェニックの生産から維持までを一貫して行うことは容易である。しかし、家畜の場合には上記の理由から実験動物と同一に考えることは現実的ではない。トランスジェニック家畜の場合の飼育管理は以下の2種類に大別することができよう。一つは、ファウンダーのトランスジェニック個体から医薬品生産の対象となる個体として選抜する過程であり、もう一つは実際に医薬品生産を行うトランスジェニック個体である。前者の場合には、野外あるいは畜舎において、通常の家畜の飼育管理によって対応可能と考えられる。後者の場合には、生産される医薬品の品質を管理する上で、かなり厳密な飼育施設を必要とする。具体的には、温度管理が可能で、微生物感染に対して制御が可能な施設によって対応する必要がある。いずれにしても、家畜の場合にはトランスジェニック施設への導入にあたっては、人獣共通感染症の検疫については特に注意する必要がある。家畜の導入にあたっては、各都道府県の家畜保険所に連絡し、防疫体制などについて指導を受ける必要がある。施設内への管理者の出入りに際しては、薬液槽の設置など、防疫に対する配慮が必要である。また、飼料や飲料についてもモニタリングが必要である。複数の動物種のトランスジェニック個体を同一のエリアで飼育することは、相互の微生物感染を考慮すると避けるべきである。

## 1. 2 トランスジェニック動物の生産ラインへの供給と処分方法

現時点では、特に家畜のトランスジェニック動物の作出効率は低いために、その作出過程で遺伝子導入の有無や医薬品生産能力の異なる様々な個体ができる。実験動物とは異なり、これらの動物を維持管理することは経費的にも限られた施設の規模では困難をとまなう。必要に応じて体細胞、生殖細胞（精子・卵子）の凍結保存によってラインを維持すると同時に、不要な個体は屠殺処分する必要がある。家畜の場合は、食肉に供する可能性があるために、その方法は特に注意する必要がある。トランスジェニック家畜の食肉としての安全性が確認されていない現時点では、導入遺伝子の存在の有無に関わらず、トランスジェニック個体を作成する過程あるいは医薬品生産に供した後に廃棄処分する個体はすべて焼却処分とする必要がある。ウシの場合は、成体で1000kgを超える場合も想定され、その屠殺や解体のための施設を必要とする。ブタ、ヤギ、ヒツジなどについては、焼却処分は可能である。いずれにしても、適当な規模の屠体焼却処理施設が必要である。

## 2. クローン研究の進展状況

1997年の体細胞クローン羊“ドリー”の誕生以降、様々な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。

一方で、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。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。

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りとは考えにくく、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。

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、何世代に渡って安定的にクローン動物の作出が可能かについて将来的には問題となってくるのかもしれない。“ドリリー”の場合には、染色体末端のテロメアー長はその元になった体細胞のそれと比べると短縮していた。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、テロメアー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が、テロメアー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。さらにデータの蓄積が必要であろう。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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 I* (2), 217-223. (2000).
2. 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).
  3. 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).
  4. 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).
  5. 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).
  6. 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).
  7. 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).
  8. 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).
  9. 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).
  10. 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).
2. 口頭発表
1. Takeda, K., Akagi, S., Takahashi, S., Izaike, Y., Goto, Y., Kaneyama, K., Kojima, T., Imai, H., Onishi, A. and Hanada, H.: Mitochondrial DNA genotypes of nuclear-transferred calves derived from somatic cells. 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Proceedings Vol. 2, 240. (2000).
  2. Kurosaka, S., Ohashi, A., Nagao, Y., Minami, N., Yamada, M. and Imai, H.: Effect of recipient cytoplasm following oocyte activation on the development of nuclear transferred embryos from somatic cells in the bovine. *Biol. Reprod.*, 62, Suppl. 1, 127 (2000).
  3. Ohashi, A., Minami, N., Miyamoto, M., Nagao, Y., Yamada, M. and Imai, H.: Nuclear

accumulation of cyclin B is inhibited in mouse embryos arrested at the 2-cell stage in vitro. *Biol. Reprod.*, 62, Suppl. 1, 148 (2000).

4. Minami, N., Miyamoto, M., Sasaki, K., Aizawa, A., Ohashi, A. and Imai, H.: A novel gene of mouse early preimplantation embryos expressed in an environment dependent manner. *Biol. Reprod.*, 62, Suppl. 1, 252 (2000).

5. 今井 裕：近畿大学生物理工学研究所公開シンポジウム、体細胞クローン家畜の生産技術と問題点 (2000)

6. 今井 裕：繁殖生物学会公開シンポジウム「21世紀の動物繁殖技術」クローン動物のこと (2000)

7. 今井 裕：石川県公開講演会「クローン技術の展望について」(2000) .

8. 今井 裕：日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業「食資源の科学」公開シンポジウム、「安全性の高い食資源動物の生産を目指して：先端技術の応用」(2000).

9. 4<sup>th</sup> International Symposium of Organized Research Combination System "Genomic Functions and Molecular Mechanism in Embryogenesis and Development" and 2<sup>nd</sup> International Symposium of 21<sup>st</sup> Century Green Frontier Research "Transgenic Agro-Biofarm", Recent progress and problems on animal biotechnology in Japan, Tsukuba, Japan (2000).

10. 今井 裕：山形県バイオテクノロジーセミナー、20世紀が積み残した家畜バイオテクノロジーの課題 (2001) .

11. 今井 裕：農林水産技術情報協会公開シンポジウム、細胞からのクローン動物の誕生 (2001) .

12. 今井 裕：大分県公開シンポジウム「畜産におけるクローン技術の現況」(2001).

#### 書籍

1. Takahashi, S., Kubota, C., Shimuzu, M., Tabara, N., Izaike, Y. and Imai, H.: Production of cloned calves by somatic cell nuclear transfer transplantation. In "Cloned Animal and Placentation" (Roberts, R.M., Yanagimachi, R., Kariya, T. And Hashizume, K. Eds.), pp. 30-35, Yokendo Ltd., Tokyo (2000).

2. Tokunaga, T., Takahashi S. and Imai, H.: Isolation of rabbit embryonic germ cells by immunomagnetic cell sorting system. In "Cloned Animal and Placentation" (Roberts, R.M., Yanagimachi, R., Kariya, T. And Hashizume, K. Eds.), pp. 44-46, Yokendo Ltd., Tokyo (2000).

3. Totsuka, Y., Nagao, Y. and Imai, H.: Physical performance of congenic mice with mitochondrial genomes derived from different mouse strains. In "Cloned Animal and Placentation" (Roberts, R.M., Yanagimachi, R., Kariya, T. And Hashizume, K. Eds.), pp. 63-72, Yokendo Ltd., Tokyo (2000).

4. 今井 裕：クローン動物の食肉としての安全性、「遺伝子組み換え食品がわかる本」(村田幸作・清水誠編)、pp. 133-148, 法研、東京(2000).

#### 雑誌

1. 今井 裕：クローン技術の現段階と展望、畜産の研究、54巻、1号、126-131. (2000).

2. 上川奈都子・今井 裕：動物工場の現状と問題点、研究ジャーナル、23巻、5号、37-42、(2000).
3. Kurosaka, S. and Imai, H. (2000) Cloned animal from somatic cells and nuclear transfer reprogramming in nuclear transferred embryos. Jpn. J. Fertil. Steril., 45 (3), 191-195. (2000).
4. 今井 裕：ウシのクローンは若返るのか？、遺伝、54巻、9号、8-9 (2000).
5. 星野洋一郎・今井 裕：ブタにおける体細胞クローン個体の作出とその応用に向けての課題、日本胚移植学雑誌、22巻 (3)、102-106. (2000).

厚生科学研究費補助金（医薬総合研究事業）

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 聰 医薬品医療機器審査センター長

研究要旨 昨年までの本研究では、主に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について検討を加えた。本年度は、トランスジェニックマウスによるヒト型抗体作製に関する問題点と全体を見渡して残された問題点について考察した。特に、ヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスにおけるヒト型抗体産生での特性（ヒト免疫グロブリン産生能、抗体のクラス・サブクラス産生の比率、より高い特異性の抗体を生み出す遺伝子変異がおこるか等）について検討を加えた。

A. 研究目的

ヒトの疾病治療には、ヒト型抗体を応用することが望ましい。しかし、通常、標的となる抗原でヒトを免疫するわけにはいかないため、治療用の抗体はマウス等の動物を免疫して得た、異種動物の型の抗体であった。この点の克服のため、定常部がヒト型の抗体（キメラ抗体）や、CDR 部分のみが異種動物由来の抗体（ヒト化抗体）が開発されてきた。しかしながら、これらの抗体も、異種タンパク部分を含んでおり、投与された患者で免疫反応を生じる危険性は否定できない。そこで、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（マウス免疫グロブリン遺伝子は不活性化してある）を作製し、免疫することによりヒト型抗体を得る方法が考案された。ヒト免疫グロブリン遺伝子は大変

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、酵母人工染色体（YAC）ベクターの利用によりその作製が可能となった。また、最近ヒトの染色体フラグメントをヒト免疫グロブリン遺伝子導入のベクターとして用いる方法によってもヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスが作製されている。ヒト免疫グロブリン重鎖の定常部の遺伝子はクローニングが困難な配列を含むことが知られていたが、後者ではこのクローニングステップを回避することができる利点を有している。これらのヒト免疫グロブリン産生トランスジェニックマウスのヒト型抗体産生における特性について、昨年度までに主要な点を明らかにしてきた。本年度は、最近の知見に基づき、ヒト抗体の作製



に関係するトランスジェニックマウスの特性をさらに明確にするとともに、全体的な問題点を明らかにすることを目的として研究を進めた。

## B. 研究方法

治療用モノクローナル抗体の作製や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・応用に関連する公表論文を参考にして検討を加えた。

## C. 研究結果及び考察

### 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

作製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性であるので、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製するか、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製する必要がある。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製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（ $\kappa$ 鎖及び $\lambda$ 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。

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（NAT）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、検査の実施にあ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。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。

—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、喉に水疱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、

嚙下筋、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。

## 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 原料

### 3.1 原料でのウイルス検査—特にNAT法に関して

#### 3.1 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、ウイルス感染のウイ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イ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イ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。

#### 3.1.1 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鋳型となるDNAの指数関数的な増幅を行うことにある。まず、鋳

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 差の両端に相補的な 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 (総括研究報告書図 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 法での検出感度は、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 ウィ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 法に匹敵するとも報告されている。

### 3.1.2 NASBA 法

総括研究報告書図 4 に示すように、NASBA 法では主として RNA ウィ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 ウィルスなどの RNA ウィルスのスクリーニングに既に用いられている。

### 3.1.3 LAMP 法

総括研究報告書図 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。

### 3.1.4 ICAN 法

ICAN 法の特徴は、総括研究報告書図 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 法同様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。

### 3.1.5 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 法においてもその、PCR 法において蓄積されて技術に

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の、厳密な温度変化を行うための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ための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が可能である。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が数十 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

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危険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。

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。

### 3.2 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。

#### 3.2.1 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。

### 3.2.2 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。

### 3.2.3 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。

### 3.2.4 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。

### 3.2.5 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)