

### 3.3 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[1,2]。これは、ウイルス感染価測定のTCID<sub>50</sub>法に相当するものである。また、ウイルス感染価測定のプラーク測定法 (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。

#### 3.3.1 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立を $p$ とすると、 $n$ 回の試行でこの事象が $i$ 回起こる確立 $P(i)$ 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<sub>app</sub>)はi/nであり、

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

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

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<sub>app</sub>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。

### 3.3.2 NATにおける検出限界

前項(2)式から明らかのように、 $m \geq 3$ 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 $\geq 0.95$ 、危険率 $\leq 0.05$ )。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 $1-Q \geq 0.05$ 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[3]。

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 $(1-Q)^n \geq 0.05$ 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、総括研究報告書図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ウィルス数(0.05~3あるいは0.005~5コピー/NAT検体量)の領域が存在することがわかる。陽性か陰性か定まらない中間的なウィルス数の領域は、全て陽性や陰性になることがあるか否かによって、さらに4つの領域に細分化される。とくに、0.7コピー/NAT検体量前後(陽性確率50%付近)のウィルス数を含む検体では、NATを5回以上繰り返した場合全て陽性や全て陰性の結果は絶対に得られない(危険率 $\leq 5\%$ )。検査の対象となる検体には「陽性」か「陰性」のいずれかしかあり得ないのは当然であるが、PCRによって陽性か陰性か(検出限界以下か)を判定する場合には、いずれとも定まらないコピー数領域が存在することを再認識したい。また、「確

率50%で検出できるコピー数」はNAT繰り返し数に無関係に一定であるが、検出限界(95%信頼限界)は図中のLine IIIのようにNAT繰り返し回数の増加とともに低下することに注目したい。

最後に、表3に、検体を限界希釈し、NATをn回試行し、i回陽性となったときのウィルス数の計算値とその95%信頼限界をまとめたので参考にされたい( $1 \leq n \leq 6$ )。例えば、NATを3回試行して、全て陰性(0/3)ならば、信頼度95%でNAT検体量あたり1コピー以下、1/3で陽性ならば、0.02~2コピー、2/3ならば、0.2~4コピー、全て陽性(3/3)ならば、0.5コピー以上と言える。原検体のコピー数はこれに希釈度をかけて求めればよい。

### 3.4 ウィ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ィルス安全性は、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ィ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法によるウィ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ィ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ィ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。

### 3.5 製造工程及び最終製品でのウィルス否定

## 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、ヒトに対する重い病原性を有する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。

## 6. 参考文献

- 1) Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, Ludlam CA, Bishop JO, and Brown AJL; Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers, *J. Virol.*, 64, 864-872 (1990).
- 2) Yei S, Yu MW, and Tankersley DL; Partitioning of hepatitis C virus during Cohn-Oncle Fractionation of plasma, *Transfusion*, 32, 824-828 (1992).
- 3) FDA; International conference on harmonization; Draft guideline on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin; Availability, *Federal Register*, 61, 21882-21891 (1996).

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	ウマ
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 (Murry valley encephalitis virus)	◎	◎			
羊跳躍病ウイルス (Louping-ill virus)	◎	◎	◎	◎	
口蹄疫ウイルス (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)	◎				
東部ウマ脳炎ウイルス (Eastern equine encephalitis virus)					◎
西部ウマ脳炎ウイルス (Western equine encephalitis virus)					◎
ベネズエラウマ脳炎ウイルス (Venezuelan equine encephalitis virus)					◎
伝染性胃腸炎ウイルス (Transmissible gastroenteritis virus)		◎			
ブタ呼吸器コロナウイルス (porcine respiratory coronavirus)		◎			
ブタ流行性下痢症ウイルス (porcine epidemic diarrhea)		◎			
血球凝集性脳髄膜炎ウイルス (Hemagglutinating encephalomyelitis virus)		◎			
ブタ繁殖呼吸器病症候群ウイルス (porcine respiratory and reproductive complex virus)		◎			
ブタコレラウイルス (Hog cholera virus)		◎			
パラインフルエンザ3型ウイルス (parainfluenza 3 virus)		◎			
エンテロウイルス1型 (Talfan/Teschen disease virus)		◎			

irus)					
レオウイルス (Reoviruses)		◎			
内在性レトロウイルス (Endogenous virus)		◎			
ブタアデノウイルス 1-4型 (porcine adenovirus)		◎			
ブタサーコウイルス (porcine circovirus)		◎			
ブタパルボウイルス (porcine parvovirus)		◎			
スイポックスウイルス (swinepox virus)		◎			
ブタサイトメガロウイルス (porcine cytomegalovirus)		◎			
アルファヘルペスウイルス (Pseudorabies virus)		◎			
ロシア春夏脳炎ウイルス (Russian spring summer encephalitis virus)			◎	◎	
リフトバレー熱ウイルス (Rift Valley fever viruses)			◎	◎	
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus) (ナイロウイルス (Nairovirus))			◎	◎	
トロウイルス (Torovirus)	◎				

表2

	増幅原理の特徴	用いる酵素	プライマー	長所	短所
PCR 法	サーマルサイクル反応	耐熱 DNA ポリメラーゼ	5' と 3' 側に 2 種類	最も多くの論文等があり、様々なデータの蓄積がある。	サーマルサイクラーを用いるため、自動化に非常にコストがかかる。反応容量に制限がある。
NASBA 法	恒温での RNA ポリメラーゼ反応	逆転写酵素、RNaseH、RNA ポリメラーゼ	T7RNA ポリメラーゼ結合配列を持つプライマーと通常のプライマー	RNA の検出に向く。恒温反応のため反応量を容易に増加でき、自動化も容易。特殊な機器が不要。	DNA に対して増幅効率が悪い。増幅産物の確認が複雑。Nested NAT 法等の検討が十分されていない。
LAMP 法	恒温での鎖置換 DNA 伸長反応	鎖置換型 DNA ポリメラーゼ	ループ構造を作る 2 種類のプライマー	恒温反応のため反応量を容易に増加でき、自動化も容易。特殊な機器が不要。	増幅産物がラダーとなるため、確認が複雑。Nested NAT 法等の検討が十分されていない。
ICAN 法	恒温での鎖置換 DNA 伸長反応	鎖置換型 DNA ポリメラーゼ	RNA・DNA キメラプライマー	恒温反応のため反応量を容易に増加でき、自動化も容易。特殊な機器が不要。	増幅産物が 3 種類できてしまう。Nested NAT 法等の検討が十分されていない。

表 3

PCR	見掛けのPCR陽性確率			PCR検体量あ たりの		
繰り返し	i/n(Q <sub>app</sub> )			平均ウイルス数		
回数		95%信頼限界		m	95%信頼限界	
n		上限	下限		上限	下限
1	0/1 (0.000)	0.95	-	-	3.00	-
	1/1 (1.000)	-	0.0500	-	-	0.0513
2	0/2 (0.000)	0.776	-	-	1.50	-
	1/2 (0.500)	0.975	0.0253	0.693	3.68	0.0256
	2/2 (1.000)	-	0.224	-	-	0.254
3	0/3 (0.000)	0.632	-	-	1.00	-
	1/3 (0.333)	0.865	0.0170	0.405	2.00	0.0171
	2/3 (0.667)	0.983	0.135	1.10	4.08	0.145
	3/3 (1.000)	-	0.368	-	-	0.459
4	0/4 (0.000)	0.527	-	-	0.749	-
	1/4 (0.250)	0.751	0.0128	0.288	1.39	0.0129
	2/4 (0.500)	0.902	0.0976	0.693	2.33	0.103
	3/4 (0.750)	0.987	0.249	1.39	4.37	0.286
	4/4 (1.000)	-	0.473	-	-	0.640
5	0/5 (0.000)	0.451	-	-	0.599	-
	1/5 (0.200)	0.657	0.0102	0.223	1.07	0.0103
	2/5 (0.400)	0.811	0.0764	0.511	1.66	0.0795
	3/5 (0.600)	0.927	0.189	0.916	2.57	0.209
	4/5 (0.800)	0.990	0.343	1.61	4.58	0.420
	5/5 (1.000)	-	0.549	-	-	0.796
6	0/6 (0.000)	0.393	-	-	0.499	-
	1/6 (0.167)	0.582	0.00815	0.182	0.872	0.00819
	2/6 (0.333)	0.729	0.0628	0.405	1.30	0.0649
	3/6 (0.500)	0.847	0.153	0.693	1.88	0.166
	4/6 (0.667)	0.973	0.271	1.10	2.77	0.316
	5/6 (0.833)	0.991	0.418	1.79	4.77	0.541
	6/6 (1.000)	-	0.607	-	-	0.934



科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

トランスジェニック動物／クローン動物を利用した医薬品の製造施設  
に関する調査報告

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** トランスジェニック動物／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。米国の規制当局であるFDA-CBERの専門家との意見交換では、米国における現状は1995年のPoint-to-Consider以降大きな状況の変化はないという認識が示された。次に米国の代表的企業であるGenzyme Transgenics社におけるトランスジェニック動物の作製および飼育施設の視察および専門家との意見交換、英国の代表的企業であるPPL Therapeutics社の専門家との意見交換を行なった。その結果、家畜のミルクに目的物質を分泌させ、搾乳したミルクから目的物質を精製し医薬品とする方法は、安全性の高い方法と考えられるが、人獣共通感染性病原体を考慮し、安全な動物群の確立に注意を払うとともに、病原体汚染のスクリーニングを日常的に行なう必要があると考えられた。

#### A. 研究目的

トランスジェニック動物をバイオリクターとして用いた医薬品生産法は目的物質を高収率で得られることから、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。最終年度は、米国における規制当局であるFDAとの意見交換を行なった結果、および実際にトランスジェニック動物／クローン動物を利用した医薬品生産を行なっているGenzyme Transgenics社および、PPLtherapeutics社へ訪問し、動物飼育および作製施設の現状、および研究開発者との意見交換を行なった結果を報告する。

#### B. 研究方法

トランスジェニック動物／クローン動物を利用した医薬品製造の現場を訪問するとともに、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トランスジェニック動物／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. 米国FDAの規制当局との意見交換

米国FDAにおいて1995年の“Points to consider in the manufacture and testing of therapeutic products for human use derived from transgenic animals.”の作製作業にあたったFDA-CBERのDr Steven R. BAUERに、現在のFDAのトランスジェニック動物応用医薬品に対す

る姿勢について意見を伺い、意見交換を行なった。  
Dr. BAUER の意見をまとめると以下のようになる。

- 1) 米国におけるトランスジェニック動物由来医薬品の開発の現状としては、Genzyme Transgenics 社によるヒトアンチトロンビン III が臨床第 3 相試験がほぼ終了した状態にあるが、その他の生物薬品について細胞培養による医薬品生産からトランスジェニック動物を利用した生産へのシフトが起こるとい状況にはない。
- 2) FDA としては 1995 年の Point to Consider は現状においてもトランスジェニック応用医薬品の品質、有効性、安全性評価のためのガイドラインとして十分に機能していると考えており、特に改訂、あるいは追補の予定はない。
- 3) 強いていえば、その後の状況への対応という点でトランスジェニック動物の環境への影響について言及することが必要になるかもしれない。
- 4) クローン動物による医薬品生産については、医薬品の品質・有効性・安全性評価という点からは、特に新しいポイントは思い当たらない。トランスジェニック動物応用医薬品に関する Point-to-Consider を応用することで対応可能と思われる。

## 2. Genzyme Transgenics 社

Genzyme Transgenics 社のフラミングハム（マサチューセッツ）の本社および、郊外にあるトランスジェニックヤギ製造、飼育施設を見学した。Genzyme Transgenics 社はトランスジェニック動物応用医薬品開発においては現在最も先行している企業であり、ヒトアンチトロンビン III は臨床第 3 相試験がほぼ終了して、データの最終的な取りまとめに入っているということであり、近い将来市販されるものと思われる。同社の特徴は、トランスジェニック動物としては主にヤギを用いており、また体細胞クローン動物作製も行なっ

ている。同社のもう一つの特徴は、トランスジェニック動物応用医薬品生産に研究を集中させていることであり、再生医療等へのトランスジェニック動物の応用は考えていないとのことであった。

トランスジェニックヤギの作製・飼育施設はフラミングハム郊外にある。施設を囲む二重のフェンスを設けているという点を除いて、トランスジェニック動物の作製のための建物以外の動物舎の外見は、通常の家畜用の動物飼育施設と大きな違いはない。動物は戸外の牧草にもアクセスできる構造になっており、小動物のトランスジェニック動物施設が、動物の逃亡を防ぐ意味で厳重な閉鎖系をとっているのと好対照であった。空気の流れも戸外と自由に行き来するような構造がとられており、小動物の実験動物施設との大きな違いであった。ただし、トランスジェニック動物を作製するために動物を手術するための建物は小動物の実験動物施設と同様のバリアーシステムがとられており、手術時およびその後の回復期での感染症等を防ぐ手段となっている。動物の搾乳施設にしても、動物一頭一頭のモニタリングが行なえるような構造になっている点を除けば、新しい乳牛の搾乳施設と大きな違いはなかった。

以下に、トランスジェニック動物由来医薬品の安全性評価にとってキーの一つである、病原微生物管理試験について、Genzyme Transgenics 社の体制をまとめる。

### 2-1 Genzyme Transgenics 社のトランスジェニックヤギの病原微生物管理体制

当初、ニュージーランドから 500 頭のヤギを導入して、スクレーピーフリーの動物群を確立、さらに 1997 年と 1998 年に同様にニュージーランドから動物を導入した。また少数ではあるが、米国起源の動物も導入したが、これらの動物は 5 年間にわたる米国農務省のスクレーピーフリー認定プログラムによって、スクレーピーフリーであることが確認されている。

### (1) 動物の健康管理プログラム

Genzyme Transgenics 社の動物の健康プログラムの主要な目標は、原料物質、原料ミルクがヒトの治療を目的としたタンパク質として品質を十分に高く維持することにある。動物健康プログラムはヤギの健康を維持するのに必要な獣医学的実践を、治療用医薬品の生産に必須な品質確保機能と結びつけることにある。

動物の多くの疾患、例えば、結核、ブルセラ病、Q 熱、サルモネラ症、ブドウ球菌感染症はミルクを通してヒトに感染する可能性があるので、動物の健康は重要である。これら疾患の病因菌のほとんどは乳腺から直接ミルクに入ったり、あるいは感染した体からの分泌物がミルクの中にまざることによって、間接的にミルクに入る。

健康管理プログラムの主要な目的は、外部からの疾患の導入を防ぐこと、および感染性の疾患の動きを抑えることによって、ヤギの健康を維持することにある。プログラムはモニタリングと予防処置、治療レジメ、適当な管理法からなる。

検査している感染症は表 1 のとおりである。

### (2) ミルクのウィルススクリーニング

無加工のミルクへの様々な哺乳類感染性ウィルスの混入をテストするために、3つの異なるインビトロ細胞系スクリーニングプロトコールが採用されている。用いられる細胞系は MRC-5、Vero、Goat Turbinate である。用いられる細胞系は、ヤギ細胞を除いて ATCC (Rockville, MD) から購入したものである。

検査を始めるにあたって、1000rpm、10分、4°C でミルクを低速遠心し、50ml のミルクを澄明にする。上清を指標細胞の培養液に加える。指標細胞を試験液あるいは標準液 0.5ml で約 1 時間処理する。次に培養細胞を緩衝液で洗浄し、培養皿に新しい培養液を加える。指標細胞は 14 日間、週 3 回、形態的に評価される。検査項目としては細胞病理学的効果、血球凝集作用、さらには  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  お

よび  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  において、鶏、ヒトから得た赤血球の血球吸着作用を含む。

ブラインド継代培養は、最初の継代によって得た上清 0.5ml で新たな指標細胞を処理することによってなされる。ブラインド継代細胞についても 14 日間、週 3 回、形態的に評価される。このブラインド継代によって、いかなる小さなウィルスの増幅も可能となるが、このような方法をとらなければ、陰性と間違えられる場合もある。

検査結果は以下の場合、acceptable とみなされる

- ・陽性コントロールウィルスは指標細胞に細胞病理学的変化をおこす
- ・陽性コントロールウィルスは少なくとも 2 種の赤血球、一つ以上の温度、各々の指標細胞について、血球凝集、および血球吸着をひきおこす
- ・陰性コントロールを処理された指標細胞は正常の形態を示す
- ・陰性コントロールを処理された指標細胞では、血球凝集も血球吸着も生じない。

### (3) プロセスバリデーション

最も重要な評価は、ウィルスあるいはプリオンの除去を調べるための精製過程のプロセスバリデーションである。この過程はバイオテクノロジー応用医薬品における内在性あるいは有害物質の精製過程における除去を確認するための行なうバリデーションと同じであり、トランスジェニック動物応用医薬品においても、非常に重要な評価法といえる

### 3. PPL Therapeutics 社

PPL Therapeutics 社のロスリン (エジンバラ) の本社を訪問した。PPL Therapeutics 社はトランスジェニック動物応用医薬品開発、とりわけ体細胞クローン動物作製技術において、世界的に  $\alpha 1$ -アンチトリプシンが臨床第 2 相試験の終了を目前としている。同社の特徴は、トランスジェニック動物としては主にヒツジを用いている点にある

が、もう一つの特徴は、再生医療等へのトランスジェニック動物（特にトランスジェニックブタ）の応用についても非常に積極的に展開を考えている点であり、トランスジェニック動物作製技術を非常に広汎に利用することを計画している。

PPL Therapeutics 社は、ヒツジを中心としたトランスジェニック動物作製および飼育施設をロスリン郊外に建設しているが、直接の関係者以外への公開は安全性の維持という観点から行なわれておらず、直接見学することはできなかった。しかし、動物飼育、管理、および微生物管理については、以下にまとめられるような情報を得ることができた。

### 3-1. SPF 動物

PPL 社ではトランスジェニック動物由来医薬品生産動物は特別な SPF 動物施設の中で飼育、維持されている。この特別な SPF 動物は、すべてニュージーランドの血統が明瞭な群を起源として得たヒツジである。ニュージーランドは国際的にも以下の疾病がない国として認められている。

#### (1) 英国内にみられる疾病

スクレイピー Scrapie  
跳躍病 louping ill (ダニ媒介脳症)  
マエディ・ビスナ maedi-visna  
肺腺腫 pulmonary adenomatosis (Jaagsiekte)

#### (2) 英国内ではみられない疾病

ブルータング blue tongue  
口蹄疫 foot and mouth disease  
狂犬病 rabies  
牛疫 rinder pest  
羊痘 sheep and goat pox  
水疱性口内炎 vesicular stomatitis

ニュージーランドではヒツジはブルセラ菌フリーであることを認定されている群のみを起源としており、スコットランドに輸入される以前はボーダー病 border disease フリーであることが

血清学的試験で確かめられている。

さらにスコットランドにおける SPF 動物は以下の病原菌がないことを保証されている。

スクレイピー  
跳躍病 louping ill  
マエディ・ビスナ maedi visna  
ボーダー病 border disease

英国国内で保証されている病原体フリーの認定管理方式が機能しているところでは、PPL はその動物群を認めてきている。その認定管理方法とは以下の二つがある。

#### 1) ヒツジおよびヤギの健康認定方式 (SGHS) -

これはスクレイピーに汚染されていないことを保証するものである。この方式では、最低 100 頭あたり 1 頭以上、2 年以上にわたって、独立した研究所によってスクレイピーに関する脳の組織病理学的診断を行なう必要がある。

2 年のモニタリング期間後、1994 年以来この動物群はスクレイピーフリーの状態にある。

#### 2) マエディ・ビスナ認定方式 Maedi-Visna Accreditation Schema スコットランド農業大学によっておこなわれている。

プロトコールは以下のとおりである：

— 血清学的試験 — 6~12 ヶ月の間隔をおいて二度行なう

12 ヶ月後に血清学的検査

その後 12 ヶ月を越えない間隔で血清学的検査

—すべての血清学的試験は 18 月齢以上の動物からの血液サンプルについて行なわれる  
—動物数が 1000 頭を越える場合は、150 頭の動物を試験しなければならない (PPL の場合)

1994 年以來、すべての試験で陰性であり、PPL のヒツジはマエディ・ビスナ maedi-visna フリー認定の動物とされている。

#### 内科的疾患モニタリングプログラム

国内的な認定方式のない場合、独立した研究所 内科的疾患認定モニタリングプログラムについてはスコットランド農業大学獣医サービス科— のサービスを利用している。

#### 跳躍病 Louping-ill

この病気はダニを媒介として生じるので、ダニ媒介脳症としても知られている。この病気は人獣共通感染性でもある。PPL の両農場は東ミドロシアン地方の南部東岸に位置している。ダニはスコットランドの湿気のある西海岸で流行っているが、東海岸はずっと乾燥している。

1995 年以來、毎年 150 頭の血清学的試験が行なわれ、すべてのサンプルで感染は否定されてきた。すべての流産についてもまた、跳躍病について血清学的試験がおこなわれている。

#### ボーダー病 Border Disease

流産のすべてのケース (即ち、妊娠 139 日以前の死亡) および死産の大多数についてはボーダー病の可能性について血清学的試験によって調べられる。ニュージーランドからヒツジを輸入して以來、すべてのサンプルについて感染例はない。

すべての流産について、独立した研究所で病因を検査するが、これにはバクテリア、真

菌、地方病性流産 enzootic abortion、Q-熱、トキソプラズマ、跳躍病、ボーダー病に関する試験を含む。トキソプラズマについては陽性のサンプルがあるが、他の感染症原因物質については単離されたことはない。

疾患に関する適切な検討を行なうために日常的に獣医師による決定がおこなわれている。突然死については、原因が明らかでない場合、例えば絞殺の場合を除いて、死亡原因を探るために調べられる。

#### 3-2. 動物の隔離 (Quarantine)

動物群は決められた隔離条件下に維持されている。その隔離条件には、二重の隔離フェンス (鹿の侵入を防ぐことができる程度の高さ) および餌さ、人、車、装置、その他の物質の侵入を妨げるような制限が含まれる。すべてのスタッフ、コンサルタント、契約者、訪問者は、鹿が維持されている PPL の施設のいずれかに入るためには、48 時間以内には反芻動物と接触していないという条件を受け入れなければならない。ヒツジを扱うすべての契約者、即ち調査する人あるいは毛を刈る人はヒツジの飼育施設に入る前にシャワーを浴びなければならない。

#### 3-3. 動物からの搾乳

すべてのヒツジは個別に耳につけるタグ番号で識別できるようにし、すべての生産用メスヒツジは皮下送信装置および耳にタグ番号をつける。またすべてのヒツジは適切に訓練を受けた経験者によって飼育される。ミルク生産用メスヒツジは搾乳に先立って 1 日 2 回、健康状態について目視によって検診を受ける。健康状態が悪いメスヒツジについては、生産用動物群から外し、獣医学的診察、および必要に応じて治療を受ける。すべての獣医学的処置は、獣医学的記録簿に記録され、個々のヒツジごとの記録簿が残される。獣医師は、投与した薬および搾乳を中止していた期間等を

考慮にいれつつ、メスヒツジについてミルクの生産にもどしてもよいかどうか、および生産に戻す時期について決定する。家畜用医薬品、例えば塗布薬は循環系に吸収されることはなく、ミルクに排泄されることもない。したがって、そのような薬を投与されているヒツジは生産動物群に入れたままでかまわない。ミルクの生産を中止した動物は、獣医師からの証明を得てから生産動物群に戻す。また子ヒツジを出産した後に生産動物群に戻す際にも、獣医師による証明を必要とする。駆虫薬、抗寄生虫薬処置およびワクチン摂取のような日常的な治療は、標準操作手順書に記されているような厳格に決められたスケジュールに従って、生産用動物群でも行なわれる。

健康状態を調べるための視覚的な診察をパスしたメスヒツジは、次に正しい搾乳動物グループに属していることを保証するために、搾乳の工程を始める前に、送信装置番号が読みこまれる。乳房は不健康な徴候がないか調べられ、ミルクはさらに不健康な徴候がないか調べるため検査にまわされる。もし不健康な徴候がある場合には、この動物からのミルクは生産用バッチに加えられずに、獣医師による診察をうける。

不健康な徴候を調べる検査のすべてをパスしたヒツジは、ウシの日常的搾乳工程に使われるものと同じ標準的装置を用いて、機械で搾乳される。すべての搾乳装置は、毎回の搾乳後に洗浄され、殺菌処理される。搾乳記録は一頭ごとに記され、その記録には搾乳ごとのミルクの量、合計ミルク量、泌乳期間、さらにはその個体が該当するならば生産から外された理由が含まれる。各々のヒツジからのミルクの収集は、初乳生産が止まるように、泌乳 10 日までは生産バッチから除外される。

### 3-4. 動物の栄養管理

生産動物群を含む PPL のすべてのヒツジには栄養要求性、即ち成長、妊娠、泌乳、維持の各段階に応じて、バランスのよい飼料を与える。利用さ

れるすべての食品成分は、反芻動物起源のものは含まれない植物起源のものであり、一つの例外 - 生産用ヒツジ群から生まれたヒツジを人工的に育てるためのウシ乳清タンパク質を含むミルク代用物を除いて、哺乳類起源のタンパク質を含まない。栄養的には高品質搾乳群で用いられるものと変わりはなく、自然の牧草も使用している。食物と床敷のソース/製造会社、品質、消費期限、貯蔵の記録は保管する。

### 3-4. 病原体等のスクリーニング

PPL 社では、ヒツジ+/-ヒトにおいて疾病を引き起こすかもしれない病原体に関して注意深い考察を行うが、これら病原体について次のクライテリアを用いて区別する。

- ・病原体の性質および伝染性
- ・ミルク中への病原体の排泄
- ・検査方法の信頼性、感度、利用性
- ・病原体に対するワクチンの有効性および利用性
- ・ミルクに関する工程前の病原体検査
- ・病原体の除去のプロセスバリデーション
- ・病原体の有無に関する製品バッチ検査

さらに病原体を以下の階層に分類している。この分類では、上に記されたものほど重要である

- ・スクレイピー
- ・人獣共通感染性ウイルス
- ・非人獣共通感染性ウイルス
- ・非ウイルス性人獣共通感染症
- ・すべての非人獣共通非ウイルス性病原体

#### (1) 動物の病原体感染のスクリーニング

動物については表 3 に挙げた微生物について調べている。表 4 は調べていない微生物、および除外した理由をあげている。

#### (2) ミルクのウイルス汚染スクリーニング

トランスジェニック動物を作製する場合、組換

え DNA 技術を使用しているの、安全性を保障するためのアプローチとして、関連領域の現在利用できるガイドラインに従うべきである。別の方法としては、動物はミルクを寄贈しているのだから、このプロセスは血液の分画により似ているという考えからなりたつ。PPL はこれらのアプローチのいづれもが意味があると考えているが、どちらもトランスジェニック動物応用医薬品に完全にはフィットしないと考える。

血液の分画の場合、個々の献血者は病原体に関して調べられうるし、感染者の血液はその後の工程から除外される。このアプローチは、献血者は個人であり、お互いに直接はつながりはないという考えに基づいている。このことは献血者の履歴が非常に異なっている献血においては、妥当な考えである。しかし、動物が同じように隔離され、近接した遺伝的關係にあり、お互いに同じ食物を与えられている等の状況にある、トランスジェニック動物由来医薬品生産にそのまま当てはめることは危険である。それゆえ、ウィルスに関して陽性となった一頭のヒツジのみを除外し同じ群の他の動物は安全だと考えるのは、楽観的すぎると思われる。ヒツジの場合、生産の単位は個々の動物の集合と考えるより、群であると考えることがより合理的であろう。それゆえ、群からプールされたミルク（即ち、細胞培養上清をテストするのと同じように）をテストすることが、科学的なことのように思える。不幸なことに、細胞培養と同じに、一つの製造群からのミルクにウィルスが検出されることは、群のいくつかのフラクションの廃棄ではなく、プール全体の廃棄を意味することになるだろう。

ミルクの受け入れ基準は、以下の会社の方針によって強化される。即ち、もし病原体が製造群のミルクの中で発見されたなら、製造は中止されなければならない、という方針である。この製造の一時中止は、病原体が同定され、量的にも調べら

れ、ヒツジ／ヒツジ群の健康状態がミルクを収集するだけの PPL の受け入れ基準に会ってはじめて、取り下げられるものである。関係するすべての団体が、すべての問題が解決されたことを満足するときまで、関連製品の出荷は中止する。一度病原体が群の中で観察されたら、いくつかの生産ロットにも同様に存在すると考えることが重要である。

PPL では、各製造バッチのミルクは日常的にウィルス汚染について調べている。さらに、ベロ細胞を用いた血球吸収試験によると同様に、ヒト二倍体細胞 (MRC-5)、サル腎臓細胞 (vero) およびヒツジ (SCP) 細胞を用いたウィルス検査を行なっている。さらに微生物の混入についても調べられる。得られた数字については、ウィルスクリアランステストで示された除去レベルと比較される。上に述べたように、ウィルススクリーニング（1 ウィルス/ml の感度）において陽性結果がであった場合は、その重要性が評価されるまで、製造は中止される。今まで PPL は 4 年以上にわたり recAAT の 250 以上の中間生産物を製造してきたが、ミルクへの細菌の混入に関する受け入れ基準について、ウィルススクリーニングで陽性の結果となったことはない。

それぞれの製造バッチに関する原料（ミルク）は日常的にウィルス汚染について調べている。さらに、ベロ細胞を用いた血球吸収試験によると同様に、ヒト二倍体細胞 (MRC-5)、サル腎臓細胞 (vero) およびヒツジ (SCP) 細胞を用いたウィルス検査を行なっている。

#### D. 研究発表

##### 1. 誌上発表

1) 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)

表1 ヤギおよび家畜で調べられている人獣共通感染症菌

疾病	原因物質	試験頻度あるいは 防御法	伝染の様式
ブルセラ病	ブルセラ菌	年1回	直接の接触、特に精子、流産した胎仔、胎仔の膜、羊水
カンピロバクテリア病	カンピロバクテリア菌	子供が飲むミルクの殺菌	生肉、生ミルクの摂取
クラミディア病	クラミディア類	年4回	吸引
大腸菌乳腺炎	大腸菌	年4回	接触
羊痘	パラポックスウィルス	年1回	直接の接触
ヨーネ病(パラ結核症)	マイコバクテリア パラ結核菌	年4回	糞便・経口
リステリア症	リステリア単球増 加菌	年4回	粘膜との接触、皮膚からの透過、 摂取
オウム病	クラミディアオウ ム病菌	年4回	鳥および糞便との接触
Q熱	Q熱病原体	年4回	吸引、汚染させた生ミルクの摂 取、羊水や胎盤との接触、血液 吸引性の節足動物
狂犬病	狂犬病ウィルス	ワクチン	噛み傷、傷口での唾液
サルモネラ菌病	サルモネラ菌	年4回	摂取、吸引および接触
プシュードモナス 乳腺炎	プシュードモナス 菌	年4回	接触
破傷風	破傷風菌	ワクチン	噛み傷、刺し傷からの汚染
結核	結核菌	年一度	エアロゾルあるいはミルク摂取

人獣共通感染症ではない疾病も、家畜としてのヤギの健康、生活の質に重要な影響を与える。それらの疾病は人に感染しないが、ヤギが医薬品生産能力を維持するうえで、影響が大きい。それらの疾病は表2に記すとおりである。



表2 ヤギにおいて関係するその他の疾病

疾病	原因物質	試験頻度あるいは 防御法	伝染の様式
ヤギ関節炎脳症	ヤギ関節炎脳症ウ イルス	年1回	垂直感染および生ミルク
ヤギヘルペスI	ヤギヘルペスIウ イルス	年1回	垂直感染および水平感染(交配)

表3. 生産用動物群で検査が行なわれている病原体

病原体	スクリーニングの頻度	方法
スクレイピー	購入前 ・日常的に毎年選択して ・すべての死亡生産用動物 ・神経症状を伴ったすべての死亡/安楽死動物	購入 国際的にスクレイピーフリーとして認定された国から 脳組織病理学的診断

人獣共通感染性ウイルス

病原体	スクリーニングの頻度	方法
跳躍病 Louping-ill (フラビウイルス)	購入前  年間 150 頭 すべての流産例	購入 国際的に跳躍病フリーとして認定された国から  血清学的検査 血清学的検査

非人獣共通感染性ウイルス

病原体	スクリーニングの頻度	方法
マエディ・ビスナ Maedi-visna (レンチウイルス)	購入前  認定施設制度とは関係なく	購入 国際的にマエディ・ビスナフリーとして認定された国から  血清学的検査
ボーダー病 Border disease (ペストウイルス)	購入前 すべての流産例	血清学的検査 血清学的検査
肺腺腫 Jaagsiekte (レトロウイルス)	死亡原因が明らかでないすべての動物  呼吸器疾患による死亡あるいは安楽死させた動物	肺の病理学および組織学的検査

非ウイルス性人獣共通感染性病原体

病原体	スクリーニングの頻度	方法
リステリア <i>listeria</i> (バクテリア)	すべての流産例	胎子の胃および胎盤の培養
サルモネラ (バクテリア)	すべての流産例	胎子の胃および胎盤の培養
クラミディア (バクテリア)		
Q 熱病原 <i>Coxiella burnetii</i> (リケッチャ)	すべての流産例	胎盤/胎子のスメアおよび母体の血清学的検査
トキソプラズマ (バクテリア)	すべての流産例	胎子および母体の血清学的検査  すべてのメス動物はトキソプラズマに対しワクチン接種
炭疽菌 (バクテリア)	突然死	死亡後の検査および血液塗抹標本検査
コリネバクテリウム偽結核菌 (CLA) (バクテリア)	膿瘍と診断された場合	培養
O157 を含む大腸菌 (バクテリア)	子ヒツジにおいて下痢症と診断された場合	糞便の単離および抗原型の決定
ウシマイコバクテリア (TB) (バクテリア)	臨床例がでたとき	死亡後の検査および病理組織学的検査
パラ結核性腸炎菌 (Johnes 症) (バクテリアによる特異的人獣共通伝染病)	疾病発生時	糞便検査。死亡後の検査および病理組織学的検査

非人獣共通感染性および非ウイルス性病原体

病原体	検査の頻度	検査方法
カンピロバクター（バクテリア） ブドウ球菌（バクテリア） 連鎖球菌（バクテリア） エルシニア（バクテリア）	すべての流産	胎仔の胃および胎盤の培養
クロストリディウム属（バクテリア）	突然死の場合 感染を示唆するような死亡 例がでた時	死亡後のバクテリア毒素試験
クリプトスポリディア	下痢症の子ヒツジ	糞便検査