

厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

非ヒト霊長類の動物実験代替法に関する国内外の動向調査および開発に向けた 基礎情報の取得に資する研究

令和4年度 分担研究年度終了報告書

マーモセットを用いた安全性評価検討

研究分担者 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所病理部 部長

研究協力者 豊田武士 国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長

研究協力者 松下幸平 国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究官

研究協力者 井上 亮 実験動物中央研究所 主任

研究要旨

カニクイザル、アカゲザル等の非ヒト霊長類（NHP：non-human primates）は、医薬品開発における有効性、安全性等の評価において重要な役割を果たしている。特にNHPを用いた安全性試験は、抗体医薬品など近年開発が目覚ましい個別化医療の開発に必須とされている。国内に必要なNHPの多くは海外からの輸入に依存しているが、COVID-19のパンデミック以降、ワクチン等の開発におけるNHPの需要が急増するとともに、これまで主要な輸出国であった中国が輸出を停止したこと等により、現在、世界的にNHPの供給不足と価格高騰が生じている。このまま現状の供給不足が続いた場合、我が国での医薬品の開発・承認にも支障が生じるため、喫緊の対応が必要である。コモンマーモセットは、国内でも繁殖されており、自国での対応が可能であることから、本研究では、コモンマーモセットの毒性試験への応用の適性について検討することを目的とした。特に、抗体医薬品などでは、免疫応答の観察が必要と考えられるため、ヒトへの外挿性のある免疫応答の評価が可能か否か検討することとした。

文献情報に基づいてシクロスポリン群（3頭）には50 mg/kg体重の用量で28日間反復皮下投与し、KLH（Keyhole limpet hemocyanin）群（3頭）には2 mg/kg体重の用量で単回皮下投与することとした。本検討では、免疫抑制剤であるシクロスポリン群では、ディフィシル腸炎が発症し、安楽殺処置が必要となった。これは、シクロスポリン投与による免疫抑制機構が高度に発現する環境になっていたことが原因と考えられた。

現在、実験動物中央研究所における環境整備を行うと共に、コモンマーモセットの供給施設である日本クレア株式会社（岐阜県）においてシクロスポリンの投与量を25 mg/kg体重とし、KLHとの複合投与群も設定して再試験を実施している。両試験を比較することにより、より適切な判断が可能になると考えられる。

A. 研究目的

カニクイザル、アカゲザル等の非ヒト霊長類（NHP：non-human primates）は、医薬品開発における有効性、安全性等の評価において重要な役割を果たしている。特にNHPを用いた安全性試験は、抗体医薬品など近年開発が目覚ましい個別化医療の開発に必須とされている。国内に必要なNHPの多くは海外からの輸入に依存しているが、

COVID-19のパンデミック以降、ワクチン等の開発におけるNHPの需要が急増するとともに、これまで主要な輸出国であった中国が輸出を停止したこと等により、現在、世界的にNHPの供給不足と価格高騰が生じている。本件は一過性の事象ではなく、パンデミック後も、バイオ医薬品の世界的な開発ペースの加速化に伴い、NHPの需要は引き続き高止まりすると予測される。この

まま現状の供給不足が続いた場合、我が国での医薬品の開発・承認にも支障が生じるため、喫緊の対応が必要である。

近年、一部の医薬品開発において、NHPの中でも小型(体重は250-500 gとラットとほぼ同等)で繁殖が容易(1.5歳で性成熟に達し、1回の産子数は1-3匹)なコモンマーモセットを用いた非臨床試験が行われつつある(図1)が、実験動物としての適格性に関する基礎情報は限られている。

コモンマーモセットは、国内でも繁殖されており、自国での対応が可能であることから、本研究では、コモンマーモセットの毒性試験への応用の適性について検討することを目的とした。特に、抗体医薬品などでは、免疫応答の観察が必要と考えられるため、ヒトへの外挿性のある免疫応答の評価が可能か否か検討することとした。

B. 研究方法

コモンマーモセットの実験動物としての適性判断に資する基礎的データとして、T細胞依存性抗体産生試験(TDAR)の適応性について検討している。実験動物中央研究所において使用可能な2歳から6歳の雄動物を均等に割り付け、文献情報に基づいてシクロスポリン群(3頭)には50 mg/kg体重の用量で28日間反復皮下投与し、KLH(Keyhole limpet hemocyanin)群(3頭)には2 mg/kg体重の用量で単回皮下投与することとした。調整は生理食塩水を用いて25 mg/mlに希釈し、2 ml/kg体重の容量で23G注射針を用いて投与した。対照動物(1頭)には生理食塩水をKLH群と同様に単回皮下投与とした。

試験期間中は、毎日一般状態を観察し、体重測定は被験物質投与開始日及び採材日を含め週に1回以上とした。

被験物質投与開始前(対照群は採材前)、シクロスポリン投与群は投与開始14日後のシクロスポリン投与前及びKLH群は投与後7日後に、大腿静脈より約1.0 mLを採血し、血液学的検査及びELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)を用いたサル抗KLH(Keyhole limpet hemocyanin)-IgG抗体価の測定に供することとした。観察期間は、シクロスポリン群は28日間投与の翌日まで、KLH群及び対照群は単回投与の20日目までとした。ただし、一般状態観察にお

いて、安楽死が妥当と判断された場合は、試験を中止し、麻酔下で安楽死を実施することとした。採材に当たっては、0.04 mg/kgメデトミジン(ドミツール、日本全薬工業)、0.4 mg/kgミダゾラム(ドルミカム注射液10mg、アステラス製薬)、0.4 mg/kgブトルファノール混合液(ベトルファール5 mg、Meiji Seikaファルマ)を筋肉内投与して鎮静後に1-3%イソフルラン(ファイザー、キャリアガスO₂)のマスク吸入によって麻酔を維持した。

麻酔下で腹大動脈より採血し、安楽死処置とした。採取後の血液は血液学的検査、血液生化学的検査(アルブミン(A1b)、総蛋白(TP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(GOT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(GPT)、総ビリルビン(T-bil)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE))及びELISAを実施する。全臓器(脾臓、胸腺、脊椎、腸管、リンパ節等)を摘出し、脾臓、胸腺、リンパ節を重量測定後、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬し室温で保管・固定後、定法に従って切出し・標本作製を行い、病理組織学的検査を実施した。

動物飼育は実験動物中央研究所にて実施し、標本作製及び鏡検は国立医薬品食品衛生研究所 病理部にて実施した。

(倫理面への配慮)

本試験は「公益財団法人実験動物中央研究所 動物実験委員会」による試験計画書の審査、及び「国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して動物実験計画書を作成し、同動物実験委員会による承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置は倫理規定に十分配慮して熟練者が実施し、安楽死及び実験終了時、動物はすべて鎮静・麻酔下で大動脈からの脱血により安楽死させ、動物に与える苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

免疫抑制剤であるシクロスポリン群では投与開始後体重低下及び軟便を示し、3頭のそれぞれについて7, 8, 及び11日目に元気消失及び体温低下などの一般状態悪化所見が見られ、糞便中からディフィシル抗原及び毒素が確認されたことからデ

ィフィシル腸炎と診断され、安楽死処置がとられた。KLH 群では、3 頭中 1 頭に投与後嘔吐がみられ、明らかな体重減少はみられず、ディフィシル毒素は陰性であったが、3 日目に十二指腸拡張の悪化が確認され、安楽死殺が適切と判断された。KLH 群 2 頭及び対照群の 1 頭は予定通り投与 20 日後に屠殺剖検した。(表 1, 2)

病理組織学的検索では、肝臓及び腎臓においてシクロスポリン及び KLH 投与の影響は認められなかった。シクロスポリン投与群では、リンパ節および脾臓において濾胞の Ki67 陽性細胞が減少しており、胸腺においては皮質の非薄化と Ki67 陽性細胞の減少が認められ、免疫抑制作用を反映した所見と考えられた。(図 2)

D. 考察

免疫毒性試験は、多くの場合はげっ歯類を用いて検討されているが、個別化医療における分子標的薬などは、免疫原性を持つことも想定され、ヒトへの外挿性が重要な意味を持つと考えられる。本検討では、コモンマーモセットの NHP 試験への適応性に関するデータ収集を目的としており、免疫抑制剤に対する感受性に関する有用なデータが得られると考えられる。

本検討では、試験実施中ディフィシル腸炎を疑う所見が見られ、安楽死処置が必要となった。これは、シクロスポリン投与による免疫抑制機構が高度に発現する環境になっていたことが原因と考えられた。

現在、実験動物中央研究所における環境

整備を行うと共に、コモンマーモセットの供給施設である日本クレア株式会社(岐阜県)においてシクロスポリンの投与量を 25 mg/kg 体重とし、KLH との複合投与群も設定して再試験を実施している。2 つの試験を比較することにより、より適切な判断が可能になると考えられる。

E. 結論

2～6 歳の雄性コモンマーモセットを用いたシクロスポリンおよび KLH 投与試験を実施した。高濃度のシクロスポリンに起因した免疫抑制作用により死亡例がみられたが、環境整備下における再試験は、大きな問題なく投与を終了している。詳細なデータを解析することにより、コモンマーモセットの有用性に関する有用な知見が得られると考えられる。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

F.2 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

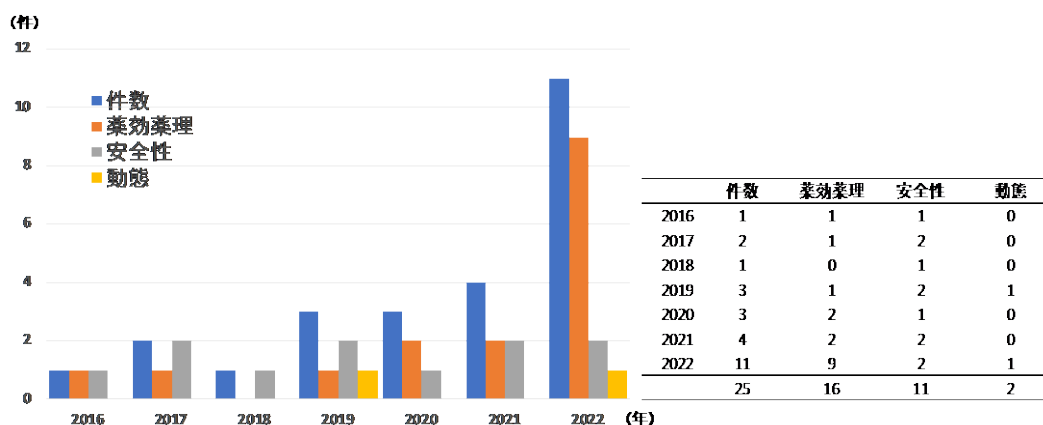


図 1. PMDA のインタビューフォーム検索におけるコモンマーモセット試験数(2016 年以降)

表 1. コモンマーモセットを用いたシクロスポリン及び KLH 投与試験における一般状態

Group	Animal No.	Days before administration (Day)																												
		-16 ~ 0	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
Saline single, s.c.	I7450M	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclosporin 50 mg/kg, 4wks, s.c.	I7477M	-	-	-	-	-	-	-	-	L	W	T, No-feces, H	Humane endpoint	Clostridium difficile colitis (c.diff Ag(+), Tox(+))																
	I7431M	M (only one day)	-	-	-	-	-	M	-	H, Humane endpoint	Clostridium difficile colitis (c.diff Ag(+), Tox(+))																			
	I6561M	-	-	-	-	-	-	-	H, Humane endpoint	Clostridium difficile colitis (c.diff Ag(+), Tox(+))																				
KLH 2 mg/kg Single, s.c.	I7449M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I7475M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I6893M	L, M, W, P, B	V, W, P	V, W, P	V, W, P	Exacerbation of duodenal dilatation (c.diff Ag(+), Tox(-))																								

Vancomycin administration discontinued from Day -16

* : First administration day

- : No abnormality

M: Muddy stool, L: Loose stool, W: Watery stool, V: Vomiting, H: Hypothermia, T: Tremor, P: piloerection, B: Bloody stool

表 2. コモンマーモセットを用いたシクロスポリン及び KLH 投与試験における体重変化

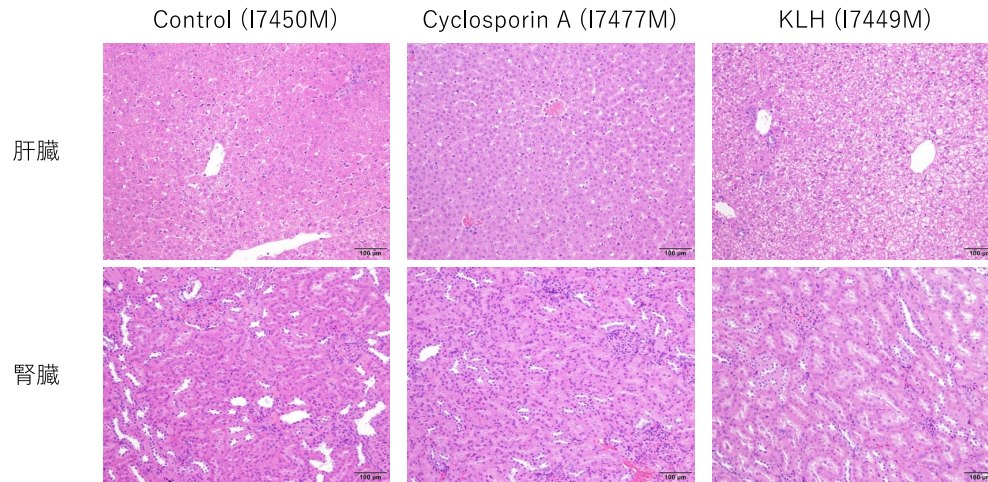
Group	Animal No.	Days before administration (Day)												unit : g
		1*	2	3	7	8	10	11	13	14	17	20	29	
Saline, single, s.c.	I7450M	315	-	318	-	-	-	-	-	318	-	317		
Ciclosporin 50 mg/kg, 4wks, s.c.	I7477M	297				262	240	230	/	/	/	/	/	
	I7431M	360	-	-	-	296	/	/	/	/	/	/	/	
	I6561M	279	-	-	235	/	/	/	/	/	/	/	/	
KLH 2 mg/kg, single, s.c.	I7449M	343	-	-	326	-	-	-	305	-	347	339		
	I7475M	271			272				270		271	260		
	I6893M	304	303	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	

* : First administration day

- : Not Applicable

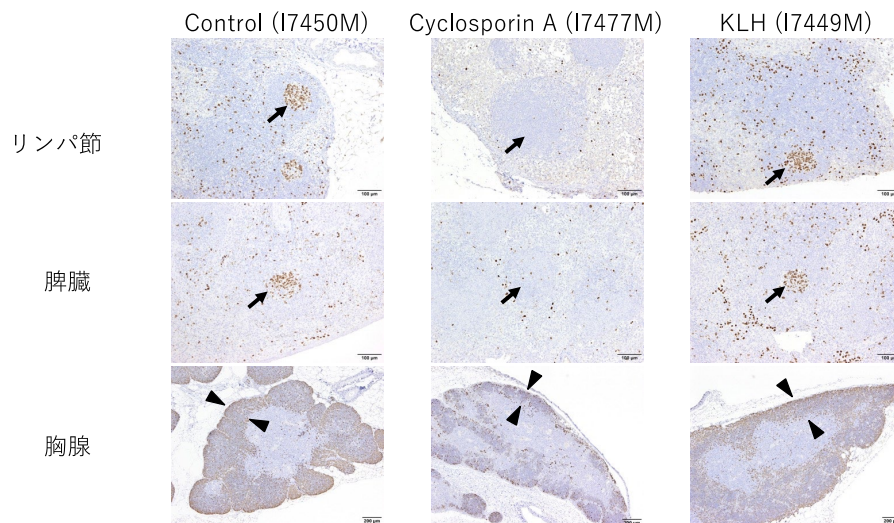
/ : not survived

肝臓および腎臓



- Cyclosporin A投与群、KLH投与群において、肝臓及び腎臓に被験物質投与の影響は認められなかった。
(KLH群ではControl群でもみられる肝細胞の空胞（恐らくグリコーゲン）が多い傾向があったが、検査例数も少ないため現時点では明らかな変化とはいえないと判断した）

リンパ節、脾臓および胸腺（Ki67免疫染色）



- Cyclosporin A投与群では、リンパ節および脾臓において濾胞（↑）のKi67陽性細胞が減少しており、胸腺においては皮質（▲）の非薄化とKi67陽性細胞の減少が認められた。
- KLH投与群では被験物質投与の影響はみられなかった。

図 2. コモンマーモセットを用いたシクロスポリン及び KLH 投与試験における病理組織学的検討