

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 総括研究年度終了報告書

研究代表者 足利太可雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長

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おり、国内で必要な NHP の多くは海外からの輸入に依存しているが、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。また、近年一部の医薬品開発において、NHP の中でも小型で繁殖が容易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。

本件課題に対応するためには、NHP の安定供給を図るとともに、NHP に代わる試験法の開発や、必要な頭数の節減、NHP の中でも繁殖が比較的容易な種への置き換え等が考えられるが、現時点で具体的な対応方針は定まっていない。そこで本研究では、NHP に関する調査・研究を通じて本件課題の実態や国際的な動向を明らかにするとともに、我が国で必要な対応の方向性について提案することを目的とした。

NHP に関する調査については、アメリカ第 62 回 SOT (Society of Toxicology) 年次総会における関連演題の調査を行った。その結果、NHP 関連演題の多くが使用数の削減や他の代替動物への置換あるいは倫理面からの実験条件の改良であることが明らかとなった。さらに COVID-19 動物モデルについて文献調査を行った。その結果、日本では検討されていない／検討することができない動物種を用いた感染動物モデルに関する報告が確認され、NHP の動物実験代替法を検討する上で、実験動物種としての動物種を増やすことが有用と考えられた。関連団体における供給状況及び対応の実態調査については、日本製薬工業協会、一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会、独立行政法人医薬品医療機器総合機構および日本実験動物学会との対面調査により、上記団体が連携して、承認申請におけるサル試験の有用性の調査、日本国内のサル供給体制に関する調査が進んでいることが明らかになった。代替動物としてのコモンマーモセットを用いた安全性評価検討については、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、今後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。

今後 NHP に関する調査とモンマーモセットを用いた安全性評価を継続して知見を蓄積することで、本件課題の実態や国際的な動向を明らかにするとともに、我が国で必要な対応の方向性について提案する予定である。

研究分担者

小川久美子

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 病理部

部長

小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 特別研究員

花本賢一

国立感染症研究所 安全実験管理部

部長

A. 研究目的

これまで、我が国の代替法開発の中核的組織である日本動物実験代替法評価センターにおいて、齧歯類、ウサギ等を用いた毒性試験に関する代替法の研究開発に数多く携わるとともに、国内外の動向調査を行ってきた。本研究では、これらの知見を基盤とした上で、NHP に関する以下の調査・研究を通じて本件課題の実態や国際的な動向を明らかにするとともに、我が国で必要な対応の方向性について提案することを目的とする。

- ・国内における NHP の使用実態や需給状況、また、その供給不足によって医薬品開発に生じている影響について、実態を調査する。
- ・NHP の代替法等の取り組みについて、国際的な動向を調査する。
- ・代替動物として注目されているコモンマーモセットの免疫毒性試験に関する基礎的実験を行う。

B. 研究方法

B.1. 代替法に関する国際動向調査

1. 調査委託先の選定

NHP を用いた動物実験に関する代替法開発に関する調査を委託するにあたり、調査内容、調査対象、調査項目などを定めた。

2. アメリカ毒科学会(SOT)における関連演題調査

2023 年 3 月 19 日－23 日に開催された第 62 回 SOT (Society of Toxicology) 年次総会に参加し、要旨集から関連する発表を収集し、整理した。具体的には、SOT のアプリより、発表の abstract において NHP (Non-human primates) を検索し、ヒットした演題について、演題番号、筆頭発表者の国籍、所属機関、および発表内容をまとめた。

3. NHP の需要を他の動物へ置き換えることの可能性に関する論文調査

今年度の研究期間が 2 ヶ月足らずのため、調査対象は現在も感染の流行が続く COVID-19 (SARS-CoV-2 感染症) に限定した。そして、PubMed で COVID-19 に関する動物モデルの総説を検索し、その詳細は必要に応じて原著論文を確認した。

B.2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査

実験動物としての NHP の供給不足で困っている製薬企業や医薬品開発業務受託機関 (CRO : Contract Research Organization) の現状を把握するため、日本製薬工業協会および一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会に加え、独立行政法人医薬品医療機器総合機構および日本実験動物学会の代表者と対面による面接調査を行い、NHP 不足の現状に関する最新情報を収集した。

B.3. 代替動物としてのコモンマーモセットを用いた安全性評価検討

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(Alb)、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

C.1. 代替法に関する国際動向調査

C.1.1. 調査委託先の選定

調査実施内容は、NHP を用いる動物実験について、使用数の削減、他の代替動物への置換および in vitro/in silico 試験による代替法が検討されており、こうした検討に係る文献を収集し、動向を整理することとした。調査対象として以下の機関を定めた。

•ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)

•EURL ECVAM (EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing)

•FDA (U.S. Food and Drug Ministration)

- NIH (National Institute of Health)
- EMA (European Medicines Agency)
- 日本実験動物学会
- 日本毒性学会
- SOT (American Society of Toxicology)
- AAPS (The American Association of Pharmaceutical Scientists)
- EUROTOX (European Society of Toxicology)

調査項目は以下のように定めた。

- ・医薬品開発における非ヒト霊長類 (NHP) を用いる動物実験の現状
 - ・欧米の医薬品開発の規制に関する非ヒト霊長類を用いる動物実験代替法の動向
 - ・上記のうち特に使用動物数の削減や繁殖が比較的容易な種への置き換えの検討状況
- 以上の委託使用に基づき、委託機関を選定した。

C.1.2. アメリカ毒科学会(SOT)における関連演題調査

全演題の要旨に関して“NHP”で検索したところ、19 題がヒットした。登録された要旨の数は約 2460 題であることから、NHP に関連する発表は多くはないと考えられた。筆頭発表者の所属国はアメリカがほとんどであった (19 題中 14 題) が、中国、カナダ、イギリスも散見された。また筆頭発表者の所属は企業がほとんどだった (19 題中 16 題) が、FDA、大学も散見された。ヒットした 19 題中、11 題が動物実験代替法関連と考えられ、残り 8 題は NHP を用いた毒性研究と考えられた。

C.1.3. NHP の需要を他の動物へ置き換えることの可能性に関する論文調査

COVID-19 動物モデルに関する総説として、Animal models in SARS-CoV-2 research (Chu et al., Nat Methods 19:392–394, 2022); Cell and Animal Models for SARS-CoV-2

Research (Bestion et al., Viruses 14:1507, 2022); Animal models for SARS-CoV-2 infection and pathology (Bi et al., MedComm (2020) 2:548-568, 2021) ; Animal Models for COVID-19: Hamsters, Mouse, Ferret, Mink, Tree Shrew, and Non-human Primates (Shou et al., Front Microbiol. 12:626553, 2021) を参考にした。

COVID-19 は 2019 年 12 月初旬に中国・武漢市で最初の患者が報告され、その後、急速に世界へ感染拡大した感染症である。SARS-CoV-2 の由来は明らかになっていないが、2002 年 11 月 16 日に中国広東省で原因不明の重症肺炎の患者が報告され、やがて世界に伝播した重症急性呼吸器症候群 (SARS) の原因微生物である SARS-CoV とゲノム全体で約 80% と高い相同性があることから SARS-CoV-2 と命名された。SARS-CoV-2 は様々な哺乳動物が自然感染することが報告されており、最も有名な事例はオランダのミンク農場で発生したヒト・ミンク感染である [Science 371:172–177, 2021]。その他に家庭動物であるイヌやネコ、展示動物であるライオン、トラ、ピューマといったネコ科動物の感染死亡例も報告されており、SARS-CoV-2 は広い宿主域をもっている [mBio 11:e02220-20, 2020; Arch Virol 167:2503–2517, 2022]。そのため、多様な動物モデルが検討されている。

NHP :

アカゲザル、アフリカミドリザル、カニクイザルなどが用いられている。これらの内、アフリカミドリザルは SARS-CoV-2 の培養に用いられる Vero 細胞の由来動物であるが、ワシントン条約により輸入が禁止されており、繁殖を行っていない日本では事実上利用できない。SARS-CoV-2 感染における第一の受容体は ACE2 であるが、特にアカゲザルの ACE2 はヒトの ACE2 (hACE2) と比較して 91% の相同性を示す [Virology 381:89–97, 2008]。そして、SARS-CoV-2 の

感染により食欲減退、脱水、一過性の発熱（1～2 日目）、軽度の体重減少、時折咳き込むなどの極軽微から軽度の臨床症状しか示さず、7 日目にピークを迎えて 9～17 日目で回復する [Nature 585:268–272, 2020]。従って、アカゲザル感染モデルは COVID-19 患者の中程度の症状の再現に留まり、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) はみられない。アフリカミドリザルはアカゲザルやカニクイザルよりも SARS-CoV 感染に対して感受性が高いことが示されており [Virology 330:8–15, 2004]、軽症から重症までの反応が見られ、高齢のアフリカミドリザルは、SARS-CoV-2 で引き起こされる死亡の主因として注目されている ARDS に進行することが報告されている [Am. J. Pathol. 191:274–282, 2021; Nat. Immunol. 22:86–98, 2021]。カニクイザルでは、より軽度な身体活動低下あるいは無症状に留まる [Viruses 13:1673, 2021]。若齢個体に比べて高齢個体の鼻腔スワブでより高レベルのウイルス RNA が検出されたが、アカゲザルとは異なり顕著な肺感染や明らかな臨床症状を示さなかった [Science 368:1012–1015, 2020]。コモンマーモセットでは明らかな臨床症状を示さなかったが、2～8 日目の末梢血とウイルス接種後 2 週間の鼻、喉、肛門スワブよりウイルス RNA を検出することができた。しかし、実験中のマーモセットの血清中には、ウイルス特異的な抗体は検出されなかった [Signal Transduct Target Ther. 5:157, 2020]。

マウス：

マウス ACE2 (mACE2) は hACE2 と比較して ACE と SARS-CoV-2 の S 蛋白と結合する部位のアミノ酸が置換されているため、SARS-CoV-2 の感染が成立しにくい。そのため、マウスで SARS-CoV-2 の研究を可能にするための戦略が採られている。それらの中で、ヒトサイトケラチン 18 遺伝子 (KRT18) をプロモーターとして上皮細

胞に hACE2 が高発現させた K18-hACE2 マウスは SARS 研究用に開発されたマウスであり、SARS-CoV-2 の研究で最も汎用されているマウスモデルの一つである。COVID-19 の重症肺炎に類似した重症呼吸器疾患を再現している [Nature 589:603–607, 2021]。そして、ウイルスの経鼻接種後、6 週齢の K18-hACE2 マウスは震えや失調性歩行などの神経症状を示し、6 日目までにすべての動物が死亡した [Viruses 13:132, 2021]。このマウスモデルは神経系における SARS-CoV-2 感染の病因を研究するために有用である。hACE2 をコードする複製欠損アデノウイルスを野生型マウスに鼻腔内投与することにより肺組織で hACE2 を発現させて SARS-CoV-2 へ感受性を付与した AdV-hACE2 マウスは、K18-hACE2 マウスとは対照的により低力価のウイルス増殖がみられ、明確な症状はみられない [Cell 182:744.e–753.e., 2020; Emerg. Microbes Infect. 9:2433–2445, 2020]。

マウス馴化ウイルスを用いたモデルは、SARS-CoV-2 を野生型マウスで連続継代することにより作出される [Cell 183:1070.e–1085.e., 2020]。これは RNA ウイルスの集団に関連するウイルスの準種が群を成しており、その中で mACE2 への結合親和性を高める重要な蛋白質に変異をもつマイナーなウイルスが継代により選抜されると考えられる。そして、致死的な肺疾患を引き起こすマウスモデルの作出に成功している。また、マウス馴化ウイルスはリバーズジェネティクスを用いても作出されており [Nature 586:560–566, 2020]、マウス馴化ウイルスを用いたマウスモデルによる臨床試験が行われている [Cell 182:1271–1283, 2020; J Virol. 94:e01218-20, 2020; Immunity 54:1869–1882, 2021]。なお、マウス馴化ウイルスを用いる本モデルは、ヒトの疾患を再現しない独自の病態で障害を引き起こす可能性があること、中和抗

体反応の主たる標的である receptor-binding domain (RBD) など免疫原に重要な変異が発生すると、マウス馴化ウイルスでは中和効果がない等の限界がある。また、マウス馴化ウイルスの作出は懸念されるデュアルユース (DURC) に該当することにも留意する必要がある。

ハムスター：

SARS-CoV-2 の S 蛋白 RBD と相互作用する hACE2 ドメインとシリアンハムスターの ACE2 ドメインは酷似していることから、シリアンハムスターは SARS-CoV-2 の感染モデルとして適していることが示唆されている [Mol Inform. 40:2100031, 2021]。実際、 5×10^4 TCID₅₀ の SARS-CoV-2 を鼻腔内接種すると約 15% の体重減少が起こり、ハムスターの上下気道、肺、心臓、脳、脾臓、肝臓などの器官でウイルスが増殖した [Nat Med. 26:1694–1700, 2020; Nature 583:834–838, 2020]。ハムスターは軽度の臨床症状を示し、14 日目に回復した [Nature 583:834–838, 2020; Viruses 12:779, 2020]。しかし、 5×10^5 TCID₅₀ の SARS-CoV-2 をハムスターに鼻腔内接種すると、CT で中程度から致死的な気管支間質性肺炎と両側および多葉の磨りガラス混濁といった COVID-19 患者と多くの特徴を共有し、重度の体重減少、死亡率の上昇が見られる [Nat Med. 26:1694–1700, 2020; PNAS. 117:16587–16595, 2020; Front Microbiol. 11:618891, 2020]。重度の SARS-CoV-2 感染ハムスターモデルにおいても、肺、心臓、脳、脾臓、肝臓、リンパ節、腎臓、副腎、消化管、卵巣、前立腺、小胞腺の組織で高レベルのウイルス複製を伴う多臓器損傷が観察され、最終的には全身的な傷害につながる。なお、シリアンハムスターより小型のチャイニーズハムスターでは、肺病理はシリアンハムスターと同様の肺炎と肺胞損傷が認められた。ただし、気管支炎と肺炎の経過はシリアンハムスターと比較して軽症で、肺炎は長期化した [Transbound Emerg.

Dis. 68:1075–1079, 2020]。チャイニーズハムスターは糖尿病を自然発症するため、糖尿病患者の COVID-19 モデルの作出に有用である可能性がある [Lab Anim Res. 37:23, 2021]。

フェレット：

フェレットはインフルエンザウイルス、SARS-CoV などのヒト呼吸器系ウイルスの感染・伝播の研究モデルとしてよく用いられている哺乳類である。そして、フェレットの呼吸器は、気管支壁の腺密度、末端気管支、上・下気道の割合など、解剖学的にヒトと類似する [Virology 479-480:259–270, 2015]。ACE2 は主にフェレットの腺房上皮細胞および II 型肺胞上皮細胞に発現し、SARS-CoV 感染に親和性を示す [Nature 425:915, 2003]。ただし、ウイルスの複製は上気道にほぼ限定され、感染したフェレットは感染後 2 日以内に体温上昇を示し、感染後 4 日目にピークに達する。軽度の疾病結果にもかかわらず、SARS-CoV-2 は直接および間接的な接触によって個体間で効率的に伝播するため、フェレットは SARS-CoV-2 の感染伝播や軽症感染の研究のための重要なモデルとなっている [Cell Host Microbe 27:704.e–709.e., 2020; Nat. Commun. 11:3496, 2020]。なお、SARS-CoV-2 感染フェレットにモルスピラビルを 1 日 2 回経口投与した結果、上気道での SARS-CoV-2 の複製が著しく減少し、未治療接触動物へのウイルス伝播が完全に阻害されることが報告されている [Nat. Microbiol. 6:11–18, 2021]。

ツパイ：

ツパイは遺伝的にマウスよりもヒトに近い哺乳類で C 型肝炎ウイルス [J Virol. 84:303–311, 2010]、ジカウイルス [J Virol. 93:e01982-18, 2019]、インフルエンザウイルス [Virol J. 10:111, 2013] 等の感染動物モデルとして用いられている。SARS-CoV-2 感染の受容体である ACE2 は、ヒトと比較

して 85.47%の全体的な相同性を示し、SARS-CoV-2 に親和性を示し、腎臓、肺、肝臓、脾臓、脊髄骨などの器官に多く発現している [Bioengineered 12:2836–2850, 2021]。SARS-CoV-2 の経口、鼻腔内、眼への複合接種により、肺組織、特に若齢ツパイ（1 歳）の肺細胞でウイルス複製が誘導され、3 日目でピークに達し、14 日目には検出限界以下に低下した。5～6 歳の高齢のツパイは若齢個体に比べて SARS-CoV-2 感染に弱く、肺組織でのウイルス排出期間が長く、7 日目でピークを示した [Zool Res. 41:517–526, 2020]。なお、オスと高齢のツパイは、メスよりもウイルス排出の効率が高い [Sci Rep. 10:16007, 2020]。COVID-19 患者で観察される典型的な特徴を再現できないため、SARS-CoV-2 感染の病因、治療法、ワクチン評価モデルとしてのツパイの研究はほとんどない。

コットンラット：

ハムスターに近縁のマウスとラットの間大の動物で、鼻腔内感染後に肺組織で麻疹ウイルスを再現する唯一のげっ歯類とされている [Immunol Lett. 65:47-50, 1999]。SARS-CoV の実験感染では、 1×10^6 TCID₅₀ の SARS-CoV を鼻腔内接種しても病気の徴候がなく、血液や組織中から感染性粒子や抗原の存在が証明できないこと、明かな組織病理が認められないことから動物モデルに適さないとされた [Vector Borne Zoonotic Dis. 8:339–344, 2008]。しかし、SARS-CoV-2 に対しては感受性を示し、上気道でウイルスはよく複製し、肺での複製は限定的で体重減少や呼吸困難という臨床症状は認められなかった。そのため、重度の間質性肺炎を発症するシリアンハムスターとは対照的で、NHP 感染モデルに類似点があった。なお、コットンラットではヒト集団でみられる病状発現と同じ不均一性がみられた [Sci Rep. 13:757, 2023]。

C.2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査

C.2.1. 日本製薬工業協会

日本製薬工業協会は、厚生労働省、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) および実験動物学会と連携して、承認申請におけるサル試験の有用性の調査、日本国内のサル共有体制に関する調査をしている。

2022 年 2 月、日本製薬工業協会は傘下会員企業に対し、製薬企業における動物試験に関するアンケートを実施した。

この度、アンケートの質問項目および結果を入手したことから、アンケート結果は安研協のものと合わせ、解析し、まとめる予定である。

C.2.2. 一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会（安研協）

日本製薬工業協会より入手したアンケート用紙をもとに一部を改変した。このアンケート用紙を用いて安研協を通して、傘下 CRO にアンケートを実施した。

C.2.3. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）

2016 年度から 2022 年度の 7 年間ににおいて、NHP を用いた申請は 131 件 (53.3%)、カニクイザルが 123 件 (85.4%) であった。増え続けている標的特異性の高さから、NHP は新規モダリティの毒性評価に利用されることが多く、特に生殖毒性試験のうち、受胎能に懸念がある場合に利用される可能性がある。

HESI (Health and Environmental Sciences Institute) で進んでいる発達生殖毒性試験のワーキンググループ会議にも寄与し、代替法の実態調査やサルの低減化に関する議論に関与していくとの見解が示された。

C.2.4 日本実験動物学会

学会内に NHP 課題対応ワーキンググループを設置し、医薬品開発における NHP 使用状況からのリスク、医薬品開発における NHP 供給数、価格からのリスク、現在、トリ得ている対応リスクなどについて取りまとめている。さらに、日本国内のサル共有体制に関する生産体制を調べていると説明を受けた。

より詳細な情報は、別途新研究班で報告される。

C.3. 代替動物としてのコモンマーモセットを用いた安全性評価検討

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。

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。

D. 考察

D.1. 代替法に関する国際動向調査

代替法関連演題と考えられる11題の内容は以下のものであった。9題が

Refinement (ウサギやミニブタへの置換、拘束条件の改良など)であった。3題がReduction (対象群の削減や転用などによる使用動物数の削減)であった。1題は上記2点両方の要素を含んでいた。またReplacement (動物を使用しないin vitro またはin silico 試験への置換)の発表はなかった。以上より、FDAや製薬企業のグループ、個別企業などが、NHPの供給不足に対応していることが伺え、それらはウサギやミニブタへの置換や、苦痛の軽減、試験デザインの工夫による動物数の削減であった。一方、NHPで検索した限りにおいて、in vitro およびin silico 研究は見当たらなかった。今回のSOTにおいても、in vitro およびin silico アプローチによる動物実験代替法の関連演題は数多く見られており、直接NHPを用いる動物実験に言及していないだけと考えられた。

SARS-CoV-2はヒトだけでなく、様々な動物種に感染して様々な病態を示す。その中で、NHPは軽症モデルに留まり、重症モデルとしてはシリアンハムスター、K18-hACE2マウスが利用される。また、フェレットは重症化こそしないが、感染伝播モデルとして有用であることが示されている。従って、研究目的に応じて動物モデルを選択できることがCOVID-19の研究の著しい進展に寄与したと考えられる。

感染症の動物モデルを作出するに当たっては、①病原体に感受性のある動物を検索する。②病原体に感受性のある動物を作出する(例:遺伝子組換え動物、人為的免疫不全動物)。③動物に感受性のある病原体を作出する(例:動物での連続継代、リバースジェネティク法)。④近縁の病原体を用いる(例:ヒトB型肝炎ウイルスの代替としてのアヒルB型肝炎ウイルス)。といったアプローチが挙げられる。この内、①は第一選択肢となるものであるが、COVID-19動物モデルとして日本では馴染

みの薄いツパイとコットンラットも用いられていた。ただし、日本でもツパイはC型肝炎の研究、コットンラットは多包条虫の研究で使用された実績がある。

遺伝子組換え技術の普及により、今日、遺伝子組換えマウスを中心に様々なモデル動物が作出されている。その結果、マウスの動物モデルは劇的に増えた反面、実験動物として利用可能な動物種が減っている。例を挙げると、感染症法により輸入禁止となっているマストミスは、国立感染症研究所（旧予防衛生研究所）で近交系を確立して胚凍結されたが、復元的手段がなく実質的に途絶えている。また、食虫目の実験動物であるスunksは生産業者が販売を中止し、辛うじて少数の大学研究室で維持されている。これら日本で利用困難な実験動物の中から NHP に代わる至適感染動物モデルが作出される可能性があり、実験動物としての動物種を増やす取り組みが必要と考える。

D.2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査

日本製薬工業協会、一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会、独立行政法人医薬品医療機器総合機構および日本実験動物学会からの実態調査より、我が国におけるサル供給の課題、主要要因およびリスクが明らかになりつつある。早急に CRO へのアンケート結果をまとめ、製薬企業の見解および現状をまとめる予定である。

D.3. 代替動物としてのコモンマーモセットを用いた安全性評価検討

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。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

E.1. 代替法に関する国際動向調査

NHP を用いた動物実験に関する動物実験代替法開発に関する調査委託先を決定した。アメリカ第 62 回 SOT (Society of Toxicology) 年次総会に参加し、関連演題の調査を行った。その結果、NHP 関連演題の多くが使用数の削減や他の代替動物への置換あるいは倫理面からの実験条件の改良であることが明らかとなった。

COVID-19 動物モデルについて文献調査を行った。その結果、日本では検討されていない／検討することができない動物種を用いた感染動物モデルに関する報告が確認された。NHP の動物実験代替法を検討する上で、実験動物種としての動物種を増やすことが有用と考えられる。

E.2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査

日本製薬工業協会、一般社団法人日本安全性試験受託研究機関協議会、独立行政法人医薬品医療機器総合機構および日本実験動物学会との対面調査により、上記団体が

連携して、承認申請におけるサル試験の有用性の調査、日本国内のサル供給体制に関する調査が進んでいることが明らかになった。

E.3. 代替動物としてのコモンマーモセットを用いた安全性評価検討

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

(予定を含む。)

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