

厚生労働行政推進調査事業費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)
総括研究報告書(令和5年度)

非ヒト霊長類の動物実験代替法等の薬事上の取り扱いに関する研究

研究代表者： 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

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。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。本課題では、国内におけるNHPの使用実態や代替法等に関する調査・研究をもとに、対応の提案を目的としている。

コモンマーモセットは国内で実験動物として繁殖されているNHPであり、医薬品開発における非臨床試験に適用できれば、これらの問題を解決する一助となることが期待される。本研究では免疫毒性試験であるT細胞依存性抗体産生試験へのコモンマーモセットの反応性/適用性について検討した。コモンマーモセット(雄、21-46ヵ月齢)に免疫原であるkeyhole limpet hemocyanin(KLH, 2 mg/kg 体重/日、皮下、2回)あるいは免疫抑制剤であるシクロスポリン(25 mg/kg 体重/日、皮下、28日間)をそれぞれ単独あるいは併用投与した。抗KLH抗体産生に対するシクロスポリンの影響を検証する目的で、対照群およびKLH群の血清中抗KLH抗体価をELISAにて測定した結果、対照群との間に差は認められなかった。一方、剖検時に採取した全身諸臓器の病理組織学的検査では種々の自然発生性病変が認められ、これらの情報は今後コモンマーモセットを安全性試験に適用するうえで重要な知見となることが期待された。引き続き、抗KLH抗体産生を誘導するKLHの至適投与条件を検討するため、アジュバントであるAlumを併用投与する実験を立案してコモンマーモセットを導入した。入荷後にClostridium difficileによる下痢及び体重低下が認められたため、当初の予定通り実験を行うことが困難となった。抗生物質の投与及び糞便移植等を行うことにより症状は改善されたため、今後動物実験及び解析を行い、コモンマーモセットの免疫毒性試験への適用性について検証する予定である。

また、国内外の医薬品開発におけるコモンマーモセットの利用状況について、情報収集をおこなったところ、医薬品開発において、コモンマーモセットを用いた安全性評価は限定的ではあるものの、医薬品医療機器総合機構において評価資料として用いられていることを確認した。不足する基礎的データを補うことにより、他のNHPよりも適切な場合の代替となる潜在性があると考えられた。

さらに、世界的にNHPの需要が逼迫し、入手困難かつ価格高騰から、開発研究の進捗に支障をきた

している事態への対応の一環として、先行研究で収集した国内関連施設に対する NHP の動物実験代替法に関する動向調査および開発に向けた基礎情報を元に、NHP の代替となる *in vitro* 試験や *in silico* の研究を実施しているとの回答を得た対象者への NHP を用いない動物実験代替法に関する追加のアンケートを実施したところ、非臨床安全性評価においても利用可能な動物個体を用いない様々な代替法が考案されつつある一端が垣間見られた。一方、現状としては *in vitro* や *in silico* への代替には限界があり、個体評価は不可欠である。必要な動物試験が実施可能な体制の維持強化についても有効な対策が望まれる。

一方、フェレットの国内外の使用状況とヒト感染症動物モデルとしての実績調査を行ったところ、フェレットは日米欧において非ヒト霊長類 (NHP) よりも使用数が少なく、日本では実験動物希少種であった。ヒト感染症動物モデルとしては、エボラウイルス属ウイルスに対して、マカク属サルと同様に馴化させることなくヒトの病態に近い反応を示すことが文献より確認された。また、ヘニパウイルス属ウイルス、重症熱性血小板減少症候群ウイルス、結核菌に対しても良好な動物モデルとなることも確認された。従って、フェレットのヒト感染症動物モデルとしての知見が蓄積され、利用可能な試薬と解析技術等が整備されることで NHP に代わる新たなヒト感染症動物モデルになることが期待された。

キーワード：非ヒト霊長類、マーモセット、代替法、実態調査

研究協分担者：平林 容子
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長
研究分担者：花木 賢一
国立感染症研究所 安全実験管理部長
研究協力者：松下 幸平
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 室長
研究協力者：小島 肇
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安全性予測評価部

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。国内で必要な 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。

A1. コモンマーモセットを用いた安全性評価に関する調査

コモンマーモセットは小型 (体重 250-500 g) 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) という特徴を持つ NHP であり、国内でも実験動物として繁殖されている。よってコモンマーモセットを医薬品開発における非臨床試験に適用することができれば、NHP の海外からの供給不足および価格高騰の問題を解決する一助となることが期待される。既に一部の医薬品開発においてコモンマーモセットを用いた非臨床試験が行われているが、その多くは薬

理試験であり、安全性試験に用いる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。

免疫毒性試験にはげっ歯類が用いられることが多いが、ヒトにおける免疫反応がげっ歯類よりも NHP に近いと考えられる場合には、NHP が適用されることも考えられる。さらに、NHP の主な対象となるバイオ医薬品では、免疫原性が副作用として問題になることもあり、適切な感受性を示すことも必要と考えられる。本研究では、代表的な免疫毒性試験である T 細胞依存性抗体産生試験 (TDAR) へのコモンマーモセットの反応性/適用性について検討した。

また、国内外の医薬品開発におけるコモンマーモセットの利用状況についても、情報収集をおこなった。

A2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査に関する研究

本課題への対応として、まず国内における不足の実態調査や海外の需給に関する調査については、別途研究班でまとめられている。また、先行研究「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 (22CA2036)」(代表：足利太可雄 令和4年4月～令和5年11月)で、国内関連施設に対して、NHP の動物実験代替法に関する動向調査および開発に向けた基礎情報の収集を行った。本研究では、その成果を

基に、製薬企業や医薬品開発業務受託機関 (CRO : Contract Research Organization) における NHP の需給ギャップへの今後の対処方針に資する調査研究を行うことを目的としている。

A3. 感染動物モデルとしてのフェレットに関する調査研究

実験動物学の黎明期には様々な動物の実験動物化、多様化が試みられた。日本で開発されたトガリネズミ科ジャコウネズミ属のスクスは、マウスやラットではみられない嘔吐反応を示すことから抗がん剤をはじめとする種々の薬物の

動揺刺激研究に用いられた。しかし、需要が限定的であり、大手実験動物繁殖事業者が取扱を中止したことから、限られた研究者間の授受により維持されている。また、遺伝子改変技術の普及により様々なマウスモデルが作出されるようになって、実験動物希少種であったマストミスの系統が途絶える等、実験動物の種の多様性が失われた。

デンマークでは毛皮を採取するための家畜としてミンクが飼育されているが、2020年11月に SARS-CoV-2 の変異種がミンク農場で確認されてヒトへ感染していたことを受け、国内の全ミンク約1,700万頭の殺処分が実施された。そして、ミンクの近縁種の実験動物であるフェレットも SARS-CoV-2 への感受性を示し、COVID-19 の研究に利用されている [Zhao et al. *Zool Res.* 44:323-330, 2023]。フェレットはイタチ属イタチ科の動物で、実験動物としての歴史は長く、1926年にイヌの感染症であるモルビリウイルス属ジステンパーウイルスの研究に初めて用いられた [Dunkin & Laidlaw. *J Comp Pathol Ther.* 39:213-221, 1926]。1933年にはフェレットはインフルエンザウイルスに感染し、感染個体から未感染個体へウイルスが伝播することが実証され [Smith et al. *Lancet.* 222:66-68, 1933]、その後、インフルエンザの研究に汎用されるようになった。フェレットを用いた最も著名な研究としてトリインフルエンザウイルス (A(H5N1)) の機能獲得変異研究がある [Imai et al. *Nature.* 486:420-8, 2012; Herfst et al. *Science.* 336:1534-41, 2012]。しかし、大学等の動物実験に関する情報公開によると、代表的な国立大学法人である北海道大学、東北大学、東京大学、名古屋大学、京都大学、大阪大学、九州大学ではフェレットは飼養されていなかった (令和3年度または令和4年度実績)。ただし、理化学研究所と金沢大学では令和3年度の飼養実績としてフェレットをそれぞれ31頭、36頭を報告しており、脳科学の分野で利用されている。このように、日本においては実験動物としてのフェレットの

飼養実績は乏しいものの、新たなヒト感染症動物モデルとして NHP に代わる可能性が期待される。そこで、本研究では国内外での実験動物としてのフェレットの飼養・使用実績を調査し、フェレットの実験動物としての利用状況を把握する。そして、フェレットがヒト感染症動物モデルとしてインフルエンザ以外でも実績があるかについて、英文総説と原著論文を検索して整理した。

B. 研究方法

B1. コモンマーモセットを用いた安全性評価に関する調査

B1-1 コモンマーモセットを用いた試験

本動物実験は日本クレア株式会社で実施し、標本作製および鏡検を国立医薬品食品衛生研究所病理部にて実施した。合計 8 頭の雄コモンマーモセット (21~46 ヶ月齢) を 4 群 (各群 2 匹) に配し、免疫原である KLH (keyhole limpet hemocyanin) あるいは免疫抑制剤であるシクロスポリンをそれぞれ単独あるいは併用投与した。KLH は媒体を PBS として 2 mg/kg 体重/日の用量で 2 回 (Day 7 及び 21) 皮下投与し、シクロスポリンは生理食塩水を媒体として 25 mg/kg 体重/日の用量で 28 日間皮下投与 (Day 1-28) した。KLH 及びシクロスポリンの投与用量及び回数はカニクイザル等の文献情報からそれぞれ免疫を誘導あるいは抑制することが十分に可能であることが予測される条件を設定した。また対照群にはそれぞれの媒体を同様に投与した。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。

Day 29 に 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、腹大動

脈より採血して安楽死処置とした。採取後の血液から血清を分離し、対照群及び KLH 投与群について ELISA 法により抗 KLH 抗体の抗体価を測定した。また剖検時に全身諸臓器を採材し、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺、脳、胸腺、副腎及び精巣については重量を測定後、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。

(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。

B1-2 コモンマーモセットの使用状況

医薬品開発におけるコモンマーモセットの使用状況について、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の医療用医薬品添付文書等情報検索

(<https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch/>)

のインタビューフォーム検索を用いて検討した。インタビューフォームにおいて、薬効薬理、薬物動態、毒性試験のいずれの項目でコモンマーモセットが使用されたか確認した。また、ホームページや文献情報等から、海外でのコモンマーモセットの使用に関する記載を検索した。

(倫理面への配慮)

文献等調査に基づく研究であるため、該当しない。

B2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査に関する研究

本年度は、先行研究で行った日本製薬工業協会及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へのアンケート調査結果を基に、NHP を用いない動物実験代替法に関する追加のアンケートを実施した。

(倫理面への配慮)
該当しない。

B3. 感染動物モデルとしてのフェレットに関する調査研究

国内のフェレットの飼養・使用実績は、日本実験動物協会が公表する国内販売実績を参照した。海外については、米国は農務省 (USDA) が公表する Research Facility Annual Reports とフェレットの福祉活動を行う Ferret Association of Connecticut (FACT) の提供情報、欧州連合 (EU) は欧州委員会 (EC) が公表する Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2020、英国は政府が公表する Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals Great Britain 2022 を参照した。

フェレットによるヒト感染症に関する研究論文は Ferret models of viral pathogenesis (総説) [Enkirch & von Messling. Virol. 479-480:259-70, 2015] を参考にして引用元の論文を確認した。また、本総説の出版後に発表された重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス [Park SJ, et al. Nat Microbiol. 4:438-446, 2019]、インフルエンザウイルス [Belser JA, et al. Am J Pathol. 190:11-24, 2020]、フィロウイルス [Schiffman Z, et al. ILAR J. 61:62-71, 2022]、エンテロウイルス D68 [Vermillion MS, et al. J Virol. 96:e0083322, 2022]、結核菌 [Gupta et al. Front Cell Infect Microbiol. 12:873416, 2022]、

SARS-CoV-2 [Zhao et al. Zool Res. 44:323-330, 2023] 等の原著論文を確認し、ヒト感染症動物モデルとしての利用可能性を評価した。

(倫理面への配慮)
文献等調査に基づく研究であるため、該当しない。

C. 研究結果

C1. コモンマーモセットを用いた安全性評価に関する調査

C1-1 コモンマーモセットを用いた試験

シクロスポリン+KLH 群の 1 例に Clostridium difficile による腸炎が認められ体重の減少が認められたものの、その他の個体において一般状態観察及び体重測定において異常は観察されなかった。血中 KLH 抗体価の測定では、対照群及び KLH 群ともに十分な吸光値は得られなかった。

臓器重量測定において被験物質投与の影響と考えられる明らかな変化は認められなかった。病理組織学的検査においては、腎臓における進行性腎症など自然発生性病変が全群において認められたものの、被験物質投与の影響は観察されなかった。

C1-2 コモンマーモセットの使用状況

インタビューフォーム検索上、2016 年から PMDA への医薬品申請資料への記載が認められ、2022 年には 9 件の申請においてコモンマーモセットが用いられていた。2023 年は 2 件であったが、2024 年は 5 月現在で 3 件に使用されている。2022 年は薬効薬理試験での使用が 7 件認められ突出していたが、毒性試験には毎年 1~2 件に用いられていた。米国の医薬品開発におけるコモンマーモセットの使用実態については、内容の確認が不十分であるが 50 品目において申請資料に "common marmoset" の用語が用いられていた。日本で承認されている品目は、同様の申請書が提出されていると考えられる。NHP を用いた非臨床試験について、2022 年に FDA から発出され

ていた COVID-19 パンデミックに起因する NHP の供給不足を緩和するために、NHP を用いる試験の限定を要望する業界向けガイダンス <https://digirepo.nlm.nih.gov/master/borndig/9918451285806676/9918451285806676.pdf>

は、2023 年 5 月に取り下げられており、
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230023001174>

今後も一定数の NHP を用いた試験が実施されると考えられる。また、医薬品開発に限らない、科学研究については、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health ; NIH) が支援する研究における NHP の使用に関する調査の結果、

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37184189/>

神経科学及び神経変性疾患、予期せぬ感染症、免疫療法、生殖、老化、慢性炎症性疾患などの領域では、NHP の使用を増やす必要があると考えられ、特にアカゲザルとカニクイザルのマカク属及びマーモセットの使用増加が考えられるとされている。文献検索では、パーキンソン病のモデルとしての使用例も複数認められた。

C2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査に関する研究

先行研究で NHP を用いない動物実験代替法に関するアンケート調査に回答のあった 76 件のうち、NHP の代替となる *in vitro* 試験や *in silico* の研究を実施しているとの回答のあった 15 件 (産 7、学 6、官 2) に対し、その実施内容についてより具体的な情報を収集することが有用と考えた。そこで、設問内容を検討し、追加のアンケート調査を実施したところ、5 件 (産 3、学 1、官 1) の回答が得られた。回答数が少ないため、特段の解析はしなかった。

設問とその回答は以下の通りであった。

設問 1 研究内容をご教示ください

安全性研究全般、代替試験法開発 (生体模倣システム (MPS)、ゼブラフィッシュの利用や QSAR、など)、安全性薬理評価 (特に心毒性・中枢毒性)、消化管吸収率予測

設問 2 ご発表歴 (学会発表または論文) がございましたら、お教えください。

学会発表

日本安全性薬理学会、日本毒性学会、実験動物代替法学会、国際安全性薬理学会、World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences、MPS World Summit

誌上発表

Regenerative Medicine 誌、雑誌名の特定なし

設問 3 代替対象となる薬効評価または毒性試験名がございましたら、お教えください。なお、基礎研究の場合には、無記載で結構です。

- サルでも確認出来ない場合のあるミトコンドリア毒性や、日本人の SNPs の差による副作用を事前に検出し、治験でダウンする率を下げたり、患者さんへのテーラーメイド対応を可能にすること。
- hiPS 細胞由来心筋細胞を用いた FDA アッセイ、hiPS 細胞由来心筋細胞を用いた収縮評価、ラット培養神経細胞及び MEA を用いた痙攣リスク評価系など
- 安全性薬理試験および生殖発生毒性試験

設問 4 研究に取り組むに至った動機をお教えください。

- EU が規制をテコに戦略的に産業振興を進めているので、アメリカの動きが決定的ではあるものの、日本もそうした戦略に臨機応変に対応する必要があるとの判断。
- 製薬企業としてリスクの最小化が重要な心毒性及び中枢神経毒性であること、過去のプロジェクトで臨床において QT 延長や痙攣発生などの経験がある。
- 消化管吸収の動物間の種差を明らかにしたいというモチベーションから、げっ歯類から大動物+ヒト消化管検体から幹細胞を調製し、分化細胞をとることで吸収性の種差の原因探索をできると考えたため。

- 候補化合物選択、臨床予測性向上、社会的貢献
- 大学院と入社した製薬企業が研究していたため。

設問 5 厚生労働省担当部署または AMED 等の行政機関に伝えたいことがございましたら、お教えください。

- MPS などの経済産業省主導の研究プロジェクトの成果を活用し、政策実現が進めば、国民にとっても産業界にとっても大きな貢献が可能と考える。
- サルを実験に使用しにくい環境は今後も変わらないと考えます。そのために、代替法の研究の促進は必須です。一方、サルの使用はゼロ（0）にはならないと考えていますので、安定供給・安定入手できるようなサポートをいただけますと心強いです。
- 研究目的で使用する際のヒト由来臓器検体へのアクセスについて国として整備してほしい。
- 動物実験代替法にかかる研究に対して、国としてもっとバックアップ体制があってもいいのではないかと？

経団連は 2023 年度規制改革要望として、内閣府へ「医薬品開発における先端技術利用の促進」を提出している。背景としては動物実験代替への取組推進を医薬業界含む産業界から要望したものとなる。欧米はすでに推進を後押しする規制を定め、新規技術を医薬品開発に導入しやすくする仕組み作りを行っており、是非厚労省にも本要望について前向きにご検討頂きたい。

C3. 感染動物モデルとしてのフェレットに関する調査研究

実験用フェレットを国内の動物実験施設で自家繁殖しているという情報がないため、実験動物取扱事業者の販売数は国内の飼養・使用実績を反映すると考えた。実験動物の販売実績は日本実験動物協会が 3 年に 1 度、国内の事業者へ

アンケート調査を行って取りまとめて報告している。直近 3 回の調査結果（抜粋）を表 1 に示す。

表 1 集計年度毎の実験動物の国内販売数

	2016 年 度	2019 年 度	2022 年 度
マウス	3.2 百 万匹	3.0 百 万匹	2.6 百 万匹
ハムスター	8,465 匹	5,887 匹	20,022 匹
NHP	3,261 頭	2,320 頭	1,843 頭
フェレット*	607 頭	175 頭	149 頭

*フェレットはスunksとの合算

フェレットは販売数が NHP に比べて一桁少なく、NHP 同様に調査する度に減少している。一方、ハムスターは 2022 年度に激増しているが、これは COVID-19 研究の動物モデルとしての需要増が主因と考えられた。感染研では実験動物の使用頭数を当該年度の殺処分数と年度末飼養保管数との合算で算出しているが、フェレットは 2016 年度：143 頭、2019 年度：87 頭、2022 年度：150 頭、2015～2022 年度の 8 年間の平均は 99 頭/年であった。従って、国内で販売された実験用フェレットの多くが感染研で使用されていると推定された。米国では USDA に登録されている各研究施設と連邦研究施設に対して、動物福祉法 (AWA) に基づいて試験、研究、教育、手術等のための動物の使用を記録した年次報告書を提出することを義務付けており、それを集計して公表している。登録様式には「イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ウサギ、NHP、ヒツジ、ブタ、その他農場動物、その他動物」の 10 区分で登録することになっており、フェレットは「その他動物」として登録される。なお、AWA は実験用マウスとラットを対象外としているため、使用数集計の対象となっていない。最新データは 2019 年分で、動物実験に使用された NHP は

68,257頭であったが、フェレットの使用数は確認することができなかった。そこで、他に情報を求めた結果、FACTのウェブサイトで「研究室に毎年約6,500頭が飼育されている」とあった。ECはEU27カ国とノルウェーの動物使用状況を集計しており、最新データは英国離脱後の2020年分である。その集計では‘Number of procedures’を使用しており、同一個体に複数回の処置を行った場合にはその処置回数で集計されている。対象国の初回処置のみの集計でフェレット：1,250回、NHP：4,784回（カニクイザル：4,220回、アカゲザル：227回、バブーン：53回、ベルベット：34回、マーモセット・タマリン：196回、原猿類：54回）であった。英国ではEC同様の集計を行っており、最新データは2022年分である。初回処置のみの集計でフェレット：285回、NHP：1,820回（カニクイザル：1,701回、アカゲザル：56回、マーモセット・タマリン：63回）であった。実験動物としてのフェレットの飼養・使用は日本が極端に少ないというわけではなく、調査した米国、EU加盟国とノルウェー、英国でも同様の傾向であった。

実験動物を用いたヒト感染症モデルを考える場合、以下の4つに分類することができる。

1. ヒトの症状に近い反応を示す
2. ヒトの症状の一部を再現する
3. 感染するが発症しない
4. 感染しない

そこで、ヒト感染症の起因微生物23種に対するフェレットの反応について、文献情報を基にこの分類に当てはめると以下の通りであった。

1. には、エボラウイルス属ウイルス（ザイール、レストン、スーダン）、ヘニパウイルス属ウイルス（ニパウイルス、ヘンドラウイルス）、狂犬病ウイルス、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、SFTSウイルス、結核菌が含まれた。
2. には、ヒトパラインフルエンザウイルス2、レスピロウイルス属ウイルス（ヒトパラインフルエンザウイルス1及び3）、ベータコロナウイル

ス属ウイルス（SARS-CoV, SARS-CoV-2）が含まれた。

3. には、ムンプスウイルス、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルスが含まれた。

4. には、マールブルグウイルス属ウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ベータコロナウイルス属MERS-CoVが含まれた。

D. 考察

D1. コモンマーモセットを用いた安全性評価に関する調査

D1-1 コモンマーモセットを用いた試験

TDARはKLH等の投与により抗体産生を誘導し、それに対する被験物質の影響を評価する試験法である。本研究における一般状態観察及び体重測定では、全ての被験物質群投与において投与の影響は認められなかったことから、シクロスポリンは本投与条件にてTDARへ適用可能と考えられた。一方、KLH群における血清中の抗KLH抗体価に対照群との差は認められなかったため、抗KLH抗体の産生を誘導するKLHの投与条件を検討する必要があると考えられた。

全身諸臓器の病理組織学的検査では、腎臓における進行性腎症など種々の自然発生性病変が観察された。これらの基礎的な知見はコモンマーモセットを免疫毒性試験等の安全性試験に適用するうえで重要な情報となることが期待される。

引き続き、抗KLH抗体の産生を誘導するKLHの至適投与条件を検討することを目的とし、KLHとともにアジュバントとしてAlumを併用投与する実験を計画した。当初の計画では本年度中に実験を終了する予定であったが、日本クレア株式会社から動物実験中央研究所に動物を導入したところ、Clostridium difficileによる下痢及び体重低下を示す個体が認められたため、計画通りに実験を実施することが困難となった。Clostridium difficileの毒素産生例が見られたため、全例にバンコマイシン投与及び糞便移植を行うことによって症状は改善されたため、来年度に

は実験を遂行できると考えられる。

D1-2 コモンマーモセットの使用状況

現在のところ、医薬品開発におけるコモンマーモセットの使用は限定的であるが、薬物代謝などの面で、使用が合理的と考えられる場合は、入手のしやすさ、低体重であるため被験物質が少量で検討可能となることなどのアドバンテージがある。成長発達や免疫反応など基礎的なデータの不足を補う研究が必要と考えられた。

D2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査に関する研究

回答者は、本人ないしは共同研究者が安全性評価における代替法試験に関連する研究業務に携わっており、国内外の安全性薬理学会・動物実験代替法学会・毒性学会などで研究成果の発表をおこなっている。研究対象はヒトでの安全性予測向上を企図した、ミトコンドリア毒性、心毒性、中枢毒性、生殖発生毒性などであった。また、研究推進の原動力としては、国際的な動物試験廃止の動きに呼応するところは大きいものの、動物実験結果のヒトへの外挿性に起因するリスクに根本的に対処するためにヒトでの予測性能の向上を目指すところも大きいことがわかった。行政機関に対しては、代替試験法開発に対する更なる多面的な支援や代替評価の行政利用の推進といった要望が寄せられた一方、必要な動物試験が実施可能な体制の強化に対しても積極的な関与が期待されている。

D3. 感染動物モデルとしてのフェレットに関する調査研究

フェレットは90年を超えるインフルエンザ動物モデルとしての実績がある。しかし、日米欧の主要国の実験動物としてのフェレットの使用状況は、使用数が少ないNHPよりもさらに少なく、近年の日本ではNHPの10分の1未満であった。そのため、フェレットの感染症研究における利用では、インフルエンザに限定されていると考

えられた。しかし、報告数は限られるもののインフルエンザ以外の感染症研究におけるフェレットの有用性が検討されており、ヒトの症状に近い反応を示す病原体としてエボラウイルス属ウイルスが確認された。このことについて、Schiffman Z, et al. (ILAR J. 61:62-71, 2022) Fig.1を改変してその特長を整理したものが表2である。フィロウイルス科(エボラウイルス、マールブルグウイルス)の研究において、マカク属サルはヒトに近縁で、感染して類似の病態を示すことから第一選択肢とされている。しかし、基礎研究ではウイルスをモルモット、ハムスターまたはマウスに馴化させることによりヒトの病態に近い動物モデルとして利用されている。ただし、馴化が必要という点で新たな野生株の性状解析へ直ちに利用できない欠点がある。フェレットはエボラウイルス属ウイルスを馴化させることなく感染し、ヒトに近い病態を示す。また、ヒトへの病原性が確認されていないレストンエボラウイルスに対してマカク属サル同様の感受性を示す。一方、マールブルグウイルス属ウイルスには感受性を示さないことが報告されている [Cross et al. J Infect Dis. 218(suppl_5):S448-S452, 2018]。従って、エボラウイルス属ウイルス研究では、フェレットはマカク属サルに代わる有望な動物モデルと考えられる。

表2 フィロウイルス感染症動物モデルの比較



対象	ヒト	マカク属サル	フェレット	モルモット	ゴールデンハムスター	マウス
ウイルス馴化の必要性	不要	不要	不要	必要	必要	必要
感染発症経路(馴化株)	EBOV SUDV BDV TAFV	EBOV SUDV BDV TAFV RESTV MARV RAVV	EBOV SUDV BDV RESTV MARV	GPA-EBOV GPA-SUDV GPA-MARV GPA-RAVV	MA-EBOV MA-MARV	MA-EBOV MA-MARV MA-RAVV
致死性	~45%	~100%	100%	100%	100%	~100%
ウイルス血症	高	高	高	高	高	高
血液凝固障害	あり	あり	あり	あり	あり	なし/限定的
入手性・費用	—	難・極めて高価	普通・高価	容易・安価	容易・安価	容易・安価
取り扱いやすさ	—	難	普通	容易	容易	容易
解析手段も試験	—	多い	少ない	少ない	少ない	多い
動物実験倫理	—	高い	普通	低い	低い	低い

EBOV: ゼーラエボラウイルス, SUDV: スーダンエボラウイルス, BDV: フォンジアネエボラウイルス, TAFV: タイフスエボラウイルス, RESTV: レストンエボラウイルス, MARV: マールブルグウイルス, RAVV: ランゴウイルス, GPA: マールブルグ属, MA: ハムスター属, RA: マウス属

フェレットをエボラウイルス属ウイルス研究に用いる利点は、NHP(カニクイザル: 500万円前後)に比べて非常に安価(4万円前後)で入手が容易であること、小柄でヒトに馴れることである。一方、欠点としては利用可能な試薬と解析技術等がNHPに比べて限られることが挙げられる。

なお、「ヒトの症状の一部を再現する」、「感染するが発症しない」に分類された病原体についてもフェレットへ馴化させることでヒトの病態に近い動物モデルを作出できることが考えられる。また、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集がフェレットについても報告されており [Kou et al. Cell Res. 25:1372-5, 2015]、本来フェレットには感染しない MERS-CoV をはじめとする病原体による感染動物モデルを作出できることが期待される。

令和 4 年にワクチンや治療薬の研究開発を加速させるために「重点感染症（暫定）」が新たに指定された。これにより重点感染症に対するワクチンや治療薬の開発が積極的に行われと思われる。本研究で評価した病原体の内、重点感染症のグループ B（定期的または突発的に国内外で一定レベル以上の流行を起こす既知の感染症、グループ A と近縁な病原体による感染症）に分類され、且つフェレットに感染する病原体として、エボラウイルス属ウイルス、ヘニパウイルス属ウイルス、SFTS ウイルス、SARS-CoV、RS ウイルス、エンテロウイルス D68 がある。これらについてフェレットモデルの知見を増やし、ヒトの症状の再現が乏しいものはウイルスの馴化株を作出し、ゲノム編集技術によりフェレットに感受性を賦与し、利用可能な試薬と解析方法を整えることで、NHP に代わる動物モデルとして需要を満たすことが期待される。

E. 結論

E1. コモンマーモセットを用いた安全性評価に関する調査

E1-1 コモンマーモセットを用いた試験

TDAR へのコモンマーモセットの反応性/適用性を検討する目的で実験を実施した。その結果、当初の条件では KLH 投与群で抗 KLH 抗体価の上昇が認められなかったため、今後はアジュバントの併用投与を含む KLH の至適投与条件を検討する必要があると考えられた。一方、本実験により得られた背景データは、今後コモン

マーモセットを安全性試験に適用するうえで重要な基礎的知見となることが期待される。

E1-2 コモンマーモセットの使用状況

医薬品開発において、コモンマーモセットを用いた安全性評価は限定的ではあるものの、PMDA において評価資料として用いられている。不足する基礎的データを補うことにより、他の NHP よりも適切な場合の代替となる潜在性があると考えられた。

E2. 関連団体における供給状況及び対応の実態調査に関する研究

アンケート調査により、回答数は限られたものではあったが、非臨床安全性評価においても利用可能な動物個体を用いない様々な代替法が考案されつつある一端が垣間見られた。欧米では、化学物質等の安全性やリスク評価において、試験動物を使用しない評価法へのパラダイムシフトを加速しようとしており、グローバルな市場を考慮すれば、対応は必須である。一方、現状としては *in vitro* や *in silico* への代替には限界があり、個体評価は不可欠である。必要な動物試験が実施可能な体制の維持強化についても有効な対策が望まれる。

E3. 感染動物モデルとしてのフェレットに関する調査研究

フェレットは日米欧において主要な実験動物ではない。しかし、フェレットはインフルエンザ以外にエボラウイルス属ウイルス感染症、ヘニパウイルス属ウイルス感染症、SFTS ウイルス感染症、結核の動物モデルとして有望であることが確認された。そのため、フェレットの動物モデルとしての特性に関する知見の蓄積、利用可能な試薬と解析技術等を整えることで NHP の代替動物として普及することが期待された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. J. Strickland, E. Haugabrooks, D.G. Allen, L.B. Balottin, Y. Hirabayashi, N.C. Kleinstreuer, H. Kojima, C. Nishizawa, P. Prieto, D.E. Ratzlaff, J. Jeong, J. Lee, Y. Yang, P. Lin, K. Sullivan, W. Casey, International regulatory uses of acute systemic toxicity data and integration of new approach methodologies. Crit Rev Toxicol. 2023, 53(7), 1-27
2. 小島肇夫, 平林容子. 創薬開発に期待される New Approach Methodの行政的な受け入れについて 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 158, 269-272, 2023.
3. Hirabayashi, Y., Kojima, H., Ashikaga, T.: Update on recent activities at JaCVAM. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC12), Niagara Falls, Canada, 31 Aug., 2023
4. Hirabayashi, Y.: Initiatives for New Approach Methods at Japanese Center for the Validation Methods (JaCVAM). MPS World summit 2023, Berlin, 27 Jun., 2023

F.2 学会発表

1. Hirabayashi, Y.: New Approach Methods (NAMs) in Japan., Satellite Meeting SOT of the 63rd Annual Meeting organized by the Center for Alternative to Animal Testing and the Human

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし