

## 別添 4.

### 厚生労働科学研究費補助金

(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)

#### 令和 6 年度 分担研究報告書

#### 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 コモンマーモセットを用いた安全性評価に関する研究

研究分担者 松下 幸平

国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長

研究代表者 小川 久美子

国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究官

#### 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が、現在世界的に供給不足と価格高騰が生じている。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することができれば、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 (TDAR) へのコモンマーモセットの適用性について検討した。

コモンマーモセット（雄、22-24 カ月齢）に免疫原である keyhole limpet hemocyanin (KLH) を 2 及び 10 mg/kg の用量でアジュバントである Alum と共に試験開始時から 2 週間毎に計 4 回皮下投与し、投与前及び試験期間中に経時的に採取した血液から血漿を分離して ELISA 法により抗 KLH 抗体価を測定した。その結果、2 及び 10 mg/kg 投与群とともに 2 回の投与後から明らかな抗 KLH 抗体価の上昇が認められた。また本年度の解析に用いた ELISA 法により、昨年度に実施した動物実験より得られた血漿サンプルにおける抗 KLH 抗体価を測定した。その結果、KLH 単独投与群 (2 mg/kg、2 回投与、アジュバントなし) において抗 KLH-IgG 抗体価の明らかな上昇が認められ、KLH 及び免疫抑制剤であるシクロスボリン (25 mg/kg、28 日間皮下投与) の併用投与群では抗 KLH-IgG 抗体価の上昇は確認されなかった。

以上より、コモンマーモセットに KLH を投与した結果、アジュバントの有無に関わらず抗 KLH 抗体の産生が認められ、その産生は免疫抑制剤の投与により抑制された。本結果はコモンマーモセットの TDAR への適用の可能性を示すものと考えられた。

#### 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。

コモンマーモセットは小型（体重250-500g）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及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。また、抗体医薬等の開発においては、免疫原性の評価も必要であることから、妥当な免疫応答を示す動物で評価する必要がある。本年度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への適用性につ

いて検討するため、免疫原であるKLH（keyhole limpet hemocyanin）及びアジュバントであるAlumを用いた動物実験を実施し、血漿中の抗KLH抗体値を測定した。

## B. 研究方法

本動物実験は公益財団法人実中研で実施し、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。

実験1: 合計6頭の雄コモンマーモセット（22~24ヶ月齢）を2群（各群3匹）に配し、KLHを2あるいは10mg/kgの用量でアジュバントのAlumと共に試験開始時から2週間毎に計4回皮下投与した。KLH投与前及び実験開始2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週後に大腿静脈より約0.3mLを採血し、血漿を分離した。

実験2: 実験1のKLH最終投与日から約3ヵ月間の休薬後、同動物を再び2群（各群3匹）に配し、1群についてはKLH以外の免疫原であるヒツジ赤血球（SRBC）に対する抗体産生能を確認するため、SRBCを単回尾静脈内投与（ $10^9$  cells/animal）した。他の1群については免疫抑制剤であるシクロスボリンを25mg/kgの用量で1日1回、28日間反復皮下投与し、Clostridium difficile感染による腸炎が発症するかどうかを検討した。いずれの群も試験開始より29日後に剖検した。

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。

剖検時には、0.04mg/kg メデトミジン（ドミトール、日本全薬工業）、0.4mg/kg ミダゾラム（ドルミカム注射液10mg、アステラス製薬）、0.4mg/kg ブトルファノール混合液（ベトルファール5mg、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

O<sub>2</sub>) 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樂死処置とした。

実験期間中及び剖検時に採取した血液から抗 SRBC 抗体価を測定するために血漿を分離した。また全身諸臓器の病理解析を行うため、剖検時に各臓器を採材し、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た。

#### (倫理面への配慮)

本実験は「公益財団法人実中研 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、安樂死及び実験終了時、動物はすべて鎮静・麻酔下で大動脈からの脱血により安樂死させ、動物に与える苦痛を最小限に留めた。

### C. 研究結果

実験1:KLH 10 mg/kg 群の1例(I8199M)において3回目の投与以降に体重減少傾向が認められたため、同個体では KLH の投与回数を3回に変更した(図1)。その他の個体の体重に KLH 投与による明らかな影響は認められなかった。

コモンマーモセットの血漿中から抗 KLH-IgG 抗体価を適切に測定することのできる ELISA 法を確立して解析を行った。その結果、2 及び 10 mg/kg 群とともに 2 回の投与後から明らかな抗 KLH-IgG 抗体の力価の上昇が認められた(図2)。また本 ELISA 法を用いて昨年度に実施した動物実験より得られた血漿サンプルについて

解析を行った。その結果、KLH 単独投与群(2 mg/kg、2 回投与、アジュバントなし)において抗 KLH-IgG 抗体価の明らかな上昇が認められ、KLH 及びシクロスボリン(25 mg/kg、28 日間皮下投与)併用投与群では抗 KLH-IgG 抗体価の上昇は確認されなかった(図3)。

実験2: 体重測定では SRBC 及びシクロスボリン投与による明らかな影響は認められず、Clostridium difficile 感染による腸炎の発症も観察されなかった。現在、血漿中の抗 SRBC 抗体の測定方法を検討しており、さらに剖検時に採材した全身諸臓器についても病理解析を進めている。

### D. 考察

コモンマーモセットに KLH を投与した結果、アジュバントの有無に関わらず 2 mg/kg の KLH の投与により明らかな抗 KLH 抗体の產生が認められ、さらにその產生は免疫抑制剤であるシクロスボリンの併用投与により抑制されたことが示された。これらの結果はコモンマーモセットの TDAR への適用の可能性を示すものと考えられた。

これまでコモンマーモセットを用いた実験では、Clostridium difficile 感染による腸炎が発症し、それによる下痢や体重減少のため実験の継続が困難になることがあった。一方、今回の実験においては免疫抑制剤であるシクロスボリンを 28 日間投与した群においても Clostridium difficile 感染による腸炎は観察されず、実験を完遂することができた。Clostridium difficile 感染症が発症しなかった理由として、動物の導入時に実施した糞便移植の効果によるものと推察された。

今後は引き続き SRBC の測定を行いコモンマーモセットの TDAR への適用性をさ

らに検証するとともに、本実験から得られた全身諸臓器の病理解析を実施して背景データを収集する予定である。

#### E. 結論

本研究結果から、コモンマーモセットのTDARへの適用の可能性及び適切な免疫応答能が示された。

#### F. 研究発表

##### F.1. 論文発表

該当なし

##### F.2 学会発表

小川 久美子: マカク属以外の非ヒト霊長類の実験動物としての応用可能性、日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.29, 宇都宮)

#### 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

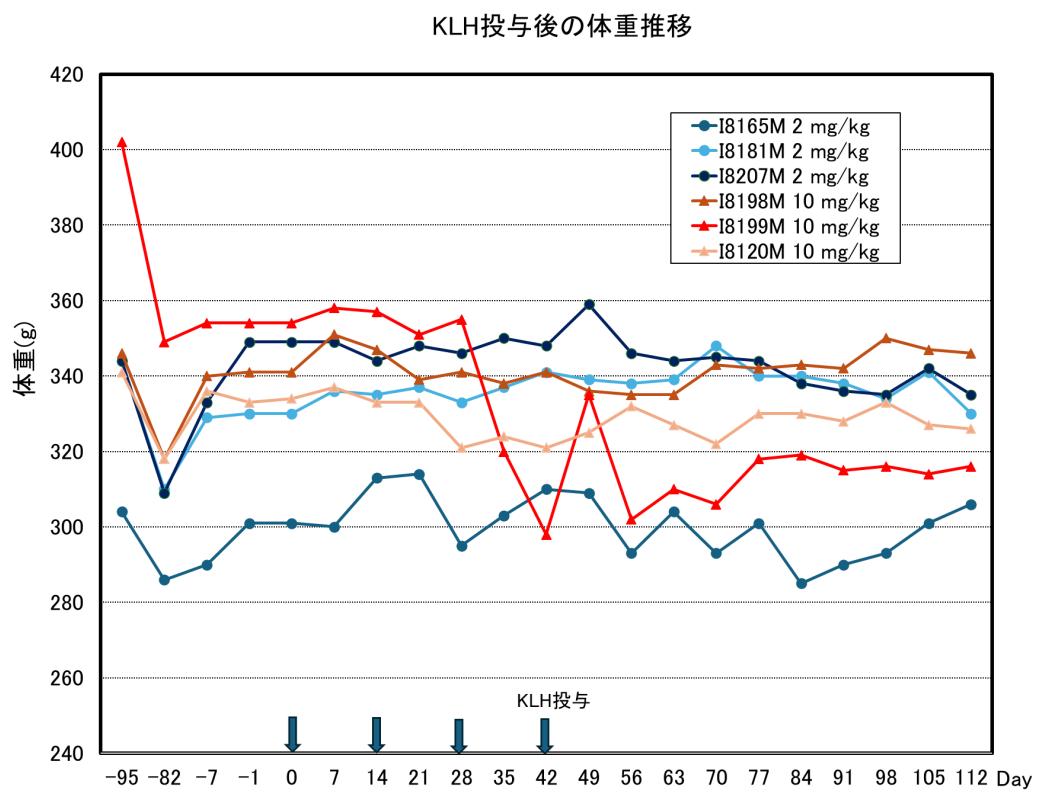


図 1. 体重の推移

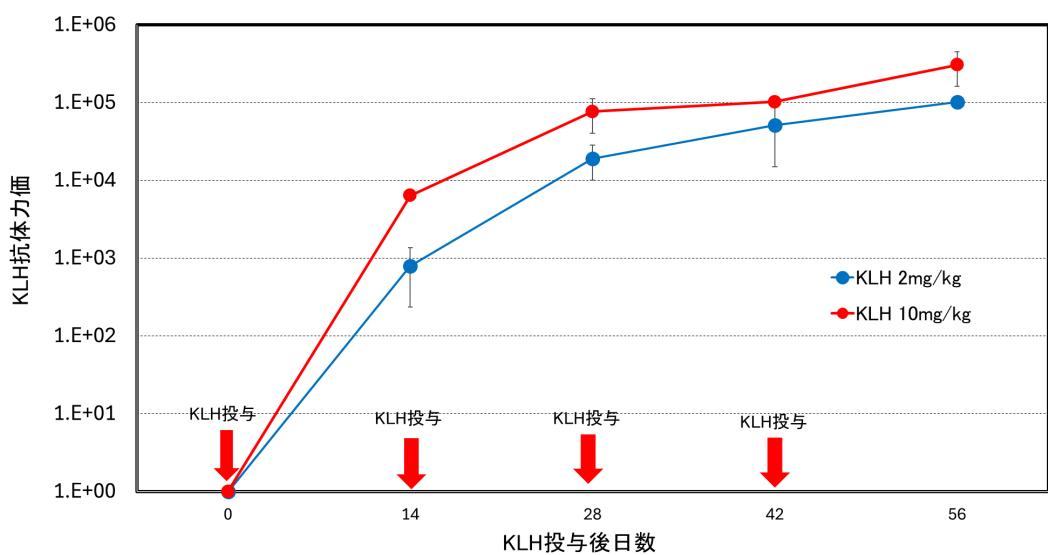


図2. 抗keyhole limpet hemocyanin (KLH) -IgG抗体値

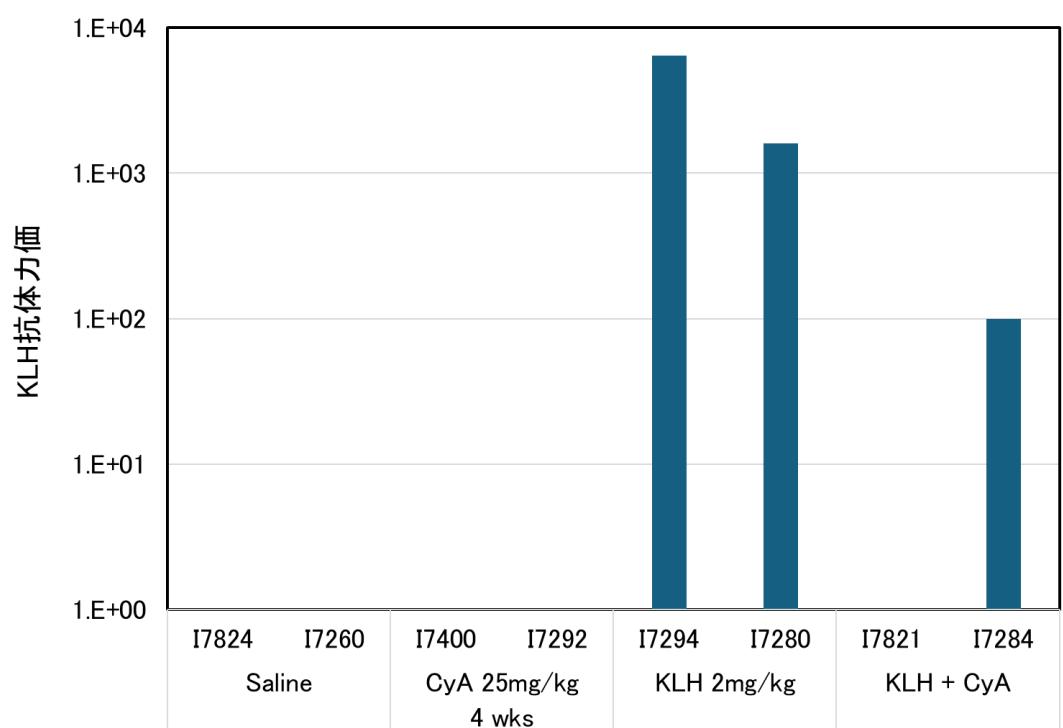


図3. keyhole limpet hemocyanin (KLH) 及びシクロスボリン (CyA) の単独及び併用投与群における抗KLH-IgG抗体価