第 6 章　評価に有用な文献情報

本調査に必要な文献を以下のキーワードを組み合わせて PubMed で検索した（表 6-1）。また、馬における再生医療研究論文が多く掲載されている「Equine Veterinary Journal」誌については、同誌のウェブサイト（http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1001/(ISSN)2042-3306）での検索も併せて行った。要旨を確認して 44 編の調査文献を選択した。

表 6-1 PubMed で検索したキーワード

1. infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)
2. DNA vaccine
3. regenerative medicine
4. stem cell
5. pluripotent
6. food producing animal
7. horse
8. equine
9. cattle
10. bovine
11. pig
12. porcine
13. mastitis
14. sperm

計画では、海外での実用化事例に関与しているものを優先しつつ、有用な文献を 40 報以上収集するとしていたが、食用動物に対する再生医療等製品で実用化されているものはなかった。一方で、生産性向上を目的とした豚成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）遺伝子エンコーディングプラスミド製剤がオーストラリアで承認されていた。また、遺伝子治療に類似する DNA ワクチンの食用動物における実用化事例（サケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチン）及び遺伝子を改変した生物（ヒトアンチトロンビン遺伝子導入山羊）の事例があったので、参考情報としてこれらに関連する論文を収集した。さらに、食用となる可能性のある動物のうち、再生医療研究の進んでいる馬、及び食用動物のうちで再生医療応用の可能性が高い牛、豚等において、再生医療に関連する研究の現状や今後の動向を把握するため、関連の総説及び原著論文を収集した。

以下に、収集した論文のリスト及びその要約を示す。

豚の生産性向上を目的とした製剤関連文献

1. Draghia-Akli R, Ellis KM, Hill L-A, Malone PB, Fiorotto, ML., High-efficiency growth hormone releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs., FASEB J., 17(3):526-528. (2003)

DNA ワクチン関連文献

2. Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, Leong JA., Genetic immunization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) against infectious hematopoietic necrosis virus., Mol Mar Biol Biotechnol., 5(2):114-122. (1996)

3. Anderson ED, Mourich DV, Leong JA., Gene expression in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) following intramuscular injection of DNA., Mol Mar Biol Biotechnol., 5(2):105-113. (1996)

4. Biering E, Villoing S, Sommerset I, Christie KE., Update on viral vaccines for fish., Dev Biol (Basel). 121:97-113. Review. (2005)

5. Kurath G., Overview of recent DNA vaccine development for fish., Dev Biol (Basel)., 121:201-213. Review. (2005)

6. Lorenzen N, LaPatra SE., DNA vaccines for aquacultured fish., Rev Sci Tech., 24(1):201-13. Review. (2005)

7. Adomako M, St-Hilaire S, Zheng Y, Eley J, Marcum RD, Sealey W, Donahower BC, Lapatra S, Sheridan PP. J, Oral DNA vaccination of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), against in fectious haematopoietic necrosis virus using PLGA [Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid)] nanoparticles., Fish Dis., 35(3):203-214. doi: 10.1111/j.1365-2761.2011.01338.x. (2012)

8. Licensed DNA Vaccines against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV). Alonso M1, Leong JA. Recent Pat DNA Gene Seq. 2013; 7(1):62-65.

9. Brudeseth BE, Wiulsrød R, Fredriksen BN, Lindmo K, Løkling KE, Bordevik M, Steine N, Klevan A, Gravningen K., Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming., Fish Shellfish Immunol., 35(6):1759-68. doi: 10.1016/j.fsi.2013.05.029. (2013)

10. Martinez-Lopez A, García-Valtanen P, Ortega-Villaizan Mdel M, Chico V, Medina-Gali RM, Perez L, Coll J, Estepa A., Increasing versatility of the DNA vaccines through modification of the subcellular location of plasmid-encoded antigen expression in the *in vivo* transfected cells., PLoS One., 8(10):e77426. doi: 10.1371/journal.pone.0077426. eCollection (2013)

11. Dhar AK, Manna SK, Thomas Allnutt FC. Virusdisease., Viral vaccines for farmed finfish., 25(1):1-17. doi: 10.1007/s13337-013-0186-4. (2014)

12. Ballesteros NA, Alonso M, Saint-Jean SR, Perez-Prieto SI., An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (Oncorrhynchus mykiss)., Fish Shellfish Immunol., 45(2):877-888. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.045. (2015)

遺伝子改変生物関連文献

13. Edminds T, Van Patten, S M, Pollock J, Hanson E, Bemasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson J M, Cole E S. Blood., Transgenically produced human antithronbin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithronbin., 91(12):4561-4571. (1998)

馬の再生医療関連文献

14. Guest DJ, Smith MR, Allen WR., Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon., Equine Vet J. 42(7):636-642. (2010)

15. Taylor SE, Clegg PD., Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells., Vet Clin North Am Equine Pract., 27(2):263-274. doi: 10.1016/j.cveq.2011.05.003. Review. (2011)

16. Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RK., Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon., Equine Vet J. 44(1):25-32. (2012)

17. Kol A, Walker NL, Galuppo LD, Clark KC, Buerchler A, Borjesson DL., Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression., Equine Vet J. 45(2);193–198. (2013)

18. Raabe O, Shell K, Fietz D, Freitag C, Ohrndorf A, Christ HJ, Wenisch S, Arnhold S., Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions., Cell Tissue Res., 352(3):509-21. doi: 10.1007/s00441-013-1574-1. (2013)

19. Schnabel LV, Fortier LA, McIlwraith CW, Nobert KM., Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when?, Vet J., 197(3):570-577. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.04.018. Review. (2013)

20. Aguiar C, Theoret C, Smith O, Segura M, Lemire P, Smith LC., Immune potential of allogeneic equine induced pluripotent stem cells., Equine Vet J., doi: 10.1111/evj.12345. (2014)

21. Broeckx S, Borena BM, Zimmerman M, Mariën T, Seys B, Suls M, Duchateau L, Spaas JH., Intravenous application of allogenic peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: a safety assessment in 291 equine recipients., Curr Stem Cell Res Ther. 9(6):452-457. (2014)

22. Burk J, Gittel C, Heller S, Pfeiffer B, Paebst F, Ahrberg AB, Brehm W., Gene expression of tendon markers in mesenchymal stromal cells derived from different sources., BMC Res Notes., 7:826. doi: 10.1186/1756-0500-7-826. (2014)

23. Donadeu FX., Equine induced pluripotent stem cells or how to turn skin cells into neurons: Horse tissues a la carte?, Equine Vet J., 46(5);534–537. (2014)

24. Hessel LN, Bosch G, van Weeren PR, Ionita JC., Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems., Equine Vet J., 47(3):319-325. (2014)

25. Sharma R, Livesey MR, Wyllie DJ, Proudfoot C, Whitelaw CB, Hay DC, Donadeu FX., Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine

induced pluripotent stem cells., Stem Cells Dev., 23(13):1524-1534. doi: 10.1089/scd.2013.0565. (2014)

26. Smith RK, Garvican ER, Fortier LA., The current 'state of play' of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human. Regen Med., 9(5):673-685. doi: 10.2217/rme.14.42. Review. (2014)

27. Aguiar C, Therrien J, Lemire P, Segura M, Smith LC, Theoret CL., Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. Equine Vet J., doi: 10.1111/evj.12438. (2015)

28. Linardi RL, Megee SO, Mainardi SR, Senoo M, Galantino-Homer HL., Expression and localization of epithelial stem cell and differentiation markers in equine skin, eye and hoof., Vet Dermatol., 26(4):213-e47. doi: 10.1111/vde.12214. (2015)

29. Lopez MJ, Jarazo J., State of the art: Stem cells in equine regenerative medicine., Equine Vet J., 47(2);145–154. (2015)

30. Ranera B, Antczak D, Miller D, Doroshenkova T, Ryan A, C. W. McIlwraith CW, Barry F., Donor-derived equine mesenchymal stem cells suppress proliferation of mismatched lymphocytes., Equine Vet J., doi: 10.1111/evj.12414. (2015)

31. William LB, Koening JB, Black B, Gibson TW, Sharif S, Koch TG., Equine allogeneic umbilical-cord-blood mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in a LPS induced synovitis model., Equine Vet J., doi: 10.1111/evj.12477. (2015)

馬以外の食用動物における再生医療関連文献

32. Ribitsch I, Burk J, Delling U, Geißler C, Gittel C, Jülke H, Brehm W., Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine., Adv Biochem Eng Biotechnol., 123:219-263. Review. (2010)

33. Dittmar T, Entschladen F. Adv Biochem Eng Biotechnol., Migratory properties of mesenchymal stem cells., 129:117-136. doi: 10.1007/10_2012_144. Review (2013)

34. Pavlin D, Cemazar M, Sersa G, Tozon N., IL-12 based gene therapy in veterinary

medicine., J Transl Med., 10:234. doi: 10.1186/1479-5876-10-234. (2012)

35. Borena BM, Bussche L, Burvenich C, Duchateau L, Van de Walle GR., Mammary stem cell research in veterinary science: an update., Stem Cells Dev., 22(12):1743-51. doi: 10.1089/scd.2012.0677. Epub 2013 Mar 5. Review. (2013)

36. Maguire G. Commun Integr Biol., Stem cell therapy without the cells., 6(6):e26631. doi: 10.4161/cib.26631. (2013)

37. Sharma N, Jeong DK., Stem cell research: a novel boulevard towards improved bovine mastitis management., Int J Biol Sci., 9(8):818-29. doi: 10.7150/ijbs.6901. eCollection (2013)

38. Whitelaw, C B A., Toward ovine iPSC., Cellular Reprogramming., 15(5): 385-388. (2013)

39. Choudhary R K., Mammary stem cells: expansion and animal productivity., J Anim Sci Biotechnol., 5(1):36. doi: 10.1186/2049-1891-5-36. eCollection (2014)

40. Gonçalves NN, Ambrósio CE, Piedrahita JA., Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: a multispecies perspective., Reprod Domest Anim., 49 Suppl 4:2-10. doi: 10.1111/rda.12392. (2014)

41. Koh S, Piedrahita JA., From "ES-like" cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals, Theriogenology., 81(1):103-111. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.009 (2014;)

42. Arnhold S, Wenisch S., Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine., Am J Stem Cells., 4(1): 1–12. (2015)

43. Gadella BM, Ferraz MA. Reprod Domest Anim., A Review of New Technologies that may Become Useful for *in vitro* Production of Boar Sperm., 50 Suppl 2:61-70. doi: 10.1111/rda.12571. (2015)

44. Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M, Imai H., Generation of Naïve Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac

Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors., PLOS One., DOI: 10.1371/journal.pone.0135403. (2015)

【文献 1】**[104]**

High-efficiency growth hormone releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs.

Draghia-Akli R, Ellis KM, Hill L-A, Malone PB, Fiorotto, ML

FASEB Journal. (2003) 17(3):526-528.

豚骨格筋肉への成長ホルモン放出ホルモンプラスミドベクターのエレクトロポレーションによる高効率注入法

（原著論文）

生体へのウイルスを使わない遺伝子導入法の中で、プラスミドの筋肉内への直接注入法が安全性の観点からは最も望ましいが、導入した遺伝子の発現効率が低いという問題があった。しかし、エレクトロポレーション法による遺伝子導入法が開発され、生体へのプラスミドの導入や導入遺伝子の発現効率を上げることが可能になってきた。GH によって誘導される一連の生体反応を適切に調節することは、動物の成長だけでなく、炭水化物、タンパク質及び脂肪代謝の恒常性を保つためにも重要である。GH は直接あるいはインスリン様成長因子 1（IGF-1）を介して、末梢組織に作用を及ぼす。GH の分泌は、視床下部から分泌される GHRH による誘導とソマトスタチンによる抑制のバランスで制御されている。GH 分泌不足の治療において、副作用は GH の投与よりも GHRH 投与の方が少ないことが知られているが、GHRH ペプチドは血中の半減期が短いという欠点がある。そのため、GHRH に対する遺伝子治療が試みられてきた。我々は、筋原性発現ベクター（myogenic expression vector）に組み込んだ成長ホルモン（GH）放出ホルモン（GHRH）遺伝子 cDNA をエレクトロポレーション法で骨格筋に注入し、GH の分泌を 2 ヶ月にわたって促進させることに、マウス及び豚で成功している。今回、針状電極を応用してエレクトロポレーションの効率を高め、遺伝子導入を最適化した方法を確立した。分泌型アルカリホスファターゼ遺伝子をレポーターとして用いたエレクトロポレーション法の検討では、針状電極（needle electrode）の方がノギス型電極（caliper electrode）より 25 倍の効率で遺伝子が発現していた。GHRH プラスミド 0.1 mg を生後 7、14 及び 21 日齢の子豚の半腱様筋あるいは背最長筋へ注入し、53 日齢まで観察したところ、14 日齢で投与した群の体重増加が最も顕著であった。また、脂肪の貯蔵は 22%減少し、骨ミネラルは 10%増加していた。また、試験豚の血液生化学検査及び病理学的検査で特に異常はみられなかった。

【文献 2】**[105]**

Genetic Immunization of Rainbow Trout (Oncorynchus mykiss) against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus.

Anderson E.D., Mourich, D.V.

Molecular Marine Biology and Biotechnology (1996) 5(2): 114-132

伝染性造血器壊死症ウイルス遺伝子によるニジマスへの免疫付与

（原著論文）

伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)は、北大西洋沿岸のサケ科魚類における重要な病原体であり、甚大な経済的被害をもたらすことから、効果的かつ安全なワクチン開発が希求されてきた。既に弱毒化、不活化又はサブユニットワクチンが試され、抗 IHNV 防御免疫誘導が可能であることが示されているが、効果、費用、安全性の面から実用化には至っていない。近年、各種動物において DNA ワクチンが防御免疫を誘導し、作製が容易かつ安全性が高いと報告されている。本研究では、IHNV に対する DNA ワクチンの作製を試みた。サイトメガロウイルスプロモーター(CMV-IEP)下流に IHNV の糖タンパク質(G)又は核タンパク質(N)の遺伝子を組み込んだプラスミドベクター(それぞれ pCMV4-G 及び pCMV4-N)を作製し、コイ上皮腫株化細胞に導入したところ、細胞質全体に中程度～強度のウイルスタンパク質の発現が確認された。ニジマス稚魚(平均体重 1 g)の骨格筋にプラスミド DNA 各 10 μg を接種後、経時的に採血し、5 匹のプール血清中の抗 IHNV 抗体を ELISA 法で計測した結果、pCMV4-G 及び pCMV4-N の同時接種群で接種後 4 週から高い抗体価が認められ、試験期間の 14 週間持続した。同時接種群の抗 IHNV 抗体価は pCMV4-G 単独接種群より早く上昇し、また接種後 8 週の抗体価は pCMV4-G 単独接種群に比べ 26 倍高値であったことから、核タンパク質の発現が抗 IHNV 抗体誘導を促進する可能性が示唆された。同時接種群及び pCMV4-G 単独接種群の血清は、ウェスタンブロッティング法で IHNV-G タンパク質に特異的に反応した。N タンパク質に対する反応は、同時接種及び pCMV4-N 単独接種群においても認められなかった。350 g のニジマスに同様にプラスミドを接種した個体ごとの血清では、各群 15 尾中 1 又は 2 尾のみに抗体上昇が認められ、ブースター接種による上昇促進も認められなかった。免疫応答の個体相違は遺伝的多様性のためと考えられたが、反応した個体では迅速に高い中和抗体価が得られた。プラスミド DNA を筋肉内接種したニジマス稚魚に、致死量の IHNV を感染させた。対照群及び pCMV4-N 接種群ではニジマスの致死率は 65～75%に達したが、pCMV4-G 単独又は pCMV4-G/pCMV4-N 同時接種群では致死率は 15～17%に留まり、充分な防御免疫が誘導されたことが示された。ワクチン接種方法及び接種ルートにさらに検討を加え、より効果的なワクチン作製が可能と考える。

【文献 3】**[106]**

Gene Expression in Rainbow Trout (Oncorhychus mykiss) following Intramuscular Injection of DNA.

Anderson, E.D., Mourich, D.V., Leong, J.C.

Molecular Marine Biology and Biotechnology (1996) 5(2): 105-113

ニジマスにおける筋肉内 DNA 接種による遺伝子発現

（原著論文）

動物体組織への DNA の直接注入は、免疫誘導及び遺伝子治療の重要な手法である。また、導入遺伝子の発現調節プロモーター及び発現レポーターの研究も進んでいる。本研究では、魚類の抗ウイルス免疫を誘導する実用的な技術を開発するため、発現レポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子を用い、ニジマス筋肉内に DNA を直接接種し、遺伝子が発現する部位や期間等について検討した。プロモーターとしてマウス乳がんウイルス(MMTV)プロモーター、サイトメガロウイルス即時初期プロモーター(CMV-IEP)、CMV-IEP に加え転写プロモーター、コイ β アクチンプロモーターを導入したプラスミド(それぞれ pMMTV-Luc、pCMVL、pCMV4EAL、pFV4EAL)を作製した。各プラスミドをニジマスの筋肉内に接種し、最大ルシフェラーゼ活性が得られる条件を検討した結果、pCMVL 及び pFV4EAL 接種魚にて DNA 接種後 5 日、pCMV4EAL では接種後 7 日に最大活性が得られ、DNA 接種後 7 日の pCMVL 及び pCMV4EAL の発現量は、pFV4EAL の約 500 倍に達した。体重 50 g の魚に 25μg (50 g 群)、1 g の魚に 10μg (1 g 群)の pCMV4EAL をそれぞれ接種し、63 日及び 115 日間飼育しルシフェラーゼ活性を計測した結果、両群とも接種 7 日後に最大活性が見られ、活性は実験期間中継続して検出された。50 g 群の魚における接種 DNA の組織内安定性について、サザンブロッティング法で検証した結果、プラスミドは接種後 2、14、28 日には接種部位筋肉内で直鎖又は弛緩環状 DNA として存在し、接種 63 日まで複製又は遺伝子組換えされずに残存した。レポーターの発現は、主に筋肉内に注入経路に沿って認められ、腎臓、心臓、肝臓、脾臓及び鰓にも認められた。以上の結果より、DNA の筋肉内接種は遺伝子による免疫誘導及び遺伝子治療に適した手法であり、さらにトランスジェニック魚作出にも利用可能な手法であることが示唆された。

【文献 4】**[107]**

Update on Viral Vaccines for Fish.

Biering, E., Villoing, S., Sommerset, I., Christie, K.E.

Progress in Fish Vaccinology (2005) 121: 97-113

最新の魚類ウイルスワクチン

（総説）

サケの養殖産業では現在多くのワクチンが使用されているが、認可済みのものは細菌ワクチンも含め全てオイルアジュバント添加不活化抗原ワクチンである。不活化ワクチンは主に液性免疫を誘導し、細菌などの細胞外病原体には有効であるが、ウイルスなどの細胞内病原体には不十分であることが多い。弱毒生ウイルスワクチンや、防御ウイルス抗原を組み込んだ組換え生ワクチンは、病原性の復帰や遺伝子組換え生物(GMO)規制の観点から使用が困難である。近年注目を集めている DNA (又は RNA)ワクチンは、自然感染の場合と同様、宿主細胞上に抗原を発現し、主に細胞性免疫を誘導することが可能である一方、オイルアジュバントでの投与は難しい。現在カナダでは、唯一承認されている伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)の DNA ワクチンの管理された野外試験が実施されている。以下、魚類のウイルスワクチンについて概説する。ビルナウイルス科伝染性膵臓壊死症ウイルス(IPNV)に対するワクチン: 大腸菌発現 VP2 を抗原とする不活化ワクチンがノルウェー及びチリで市販されているが、IPNV は既に養殖現場に広く浸潤しており、効果は不明。DNA ワクチンの有効性が報告されており、今後の研究の進展が期待される。ラブドウイルス科 IHNV 及びウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV)、コイ春ウイルス血症ウイルスに対するワクチン: 従来法による各種糖タンパク質抗原ワクチンの開発が進んでいるが、有効かつ安全なワクチンは開発されていない。IHNV では中和抗体価は感染防御能と必ずしも相関しない。近年、IHNV 及び VHSV に対する DNA ワクチンの有効性が示され、有望視されている。アルファウイルス科サケ膵臓病ウイルス(SPDV)及び睡眠病ウイルス(SDV)に対するワクチン: 感染生残魚は耐性を有することから、ワクチン開発は有望である。SPDV に対し不活化ウイルスワクチンが、SDV に対しホルマリン不活化ウイルスワクチンが製造され、アイルランド及びノルウェーで段階的に使用されている。伝染性サケ貧血(ISA)に対するワクチン: ISA は致死率が高く、欧州では摘発淘汰が原則でワクチンは承認されていない。カナダ及び米国では現在 2 種類のワクチンが市販されており、高汚染地域で使用されているが、効果は明らかでない。主に不活化ウイルスワクチン及び組換え抗原の研究も行われている。ISA 感染耐過魚は長期間ウイルスを排出し続けるため、ワクチン接種キャリアの検討が必要である。

【文献 5】**[108]**

Overview of Recent DNA Vaccine Development for Fish.

Kurath, G.

Progress in Fish Vaccinology (2005) 121: 201-213

魚類のための最新の DNA ワクチン開発の概要

（総説）

DNA ワクチンは、病原体タンパク質をコードする遺伝子、プロモーター及び転写終結/ポリアデニル化因子を細菌プラスミドベクターに組み込み、真核細胞内で発現させるもので、宿主に自然感染と同様の体液性及び細胞性免疫を長期間誘導しうることが示されている。技術的には、遺伝的、熱的安定性、低コスト及び生産安定性、作製及び遺伝子改変の容易さなど、様々な利点を有する。生物学的安全性の点では、DNA ワクチンは病原性の復帰や、オイルアジュバントに対する副反応、組換え生ウイルスワクチンのベクターの免疫原性といったリスクがない他、発現タンパク質が単一であることから、自然感染との判別が可能である。これらの利点から、従来法では防除が困難な病原体に対し、DNA ワクチンの開発が試みられている。DNA ワクチンの研究は、1990 年にマウスにおけるプラスミド導入レポーター遺伝子の持続的発現確認に始まる。魚類では、1991 年にコイ、1992 年にティラピア、1996 年にニジマスにおいてレポーター遺伝子の発現が確認され、さらに伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)糖タンパク質(G)遺伝子の発現及び IHNV 感染防御成立が Anderson らにより初めて報告された。1998 年には、ウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV) G 遺伝子の DNA ワクチンによる感染防御の成立が Lorenzen らにより報告され、以降、魚類の DNA ワクチンの報告は 40 報を超える。レポータータンパク質やプロモーターの検討に加え、DNA ワクチンの接種ルートに関する研究も重点的に行われている。現在のところ、DNA ワクチンの接種は筋肉内(IM)への注射が最も有効である。腹腔内接種では、微弱な発現しか認められず、また、IM に比べ部分的な防御免疫しか誘導されない。IHNV G 遺伝子 DNA ワクチンの経皮乱切接種（皮膚につけた傷を介して接種する方法）、口腔内接種、浸漬接種において有効性は報告されていない。養殖業においては集団接種が求められることから、DNA 被覆微小球体や DNA 内包リポソームを用いた浸漬法や超音波法も試みられている。対象病原体に関しては、IHNV 及び VHSV と同じラブドウイルス科のヒラメラブドウイルス及びコイ春ウイルス血症ウイルス、他に、伝染性膵臓壊死症ウイルス、マダイイリドウイルスについて防御免疫誘導の報告がある。IHNV の DNA ワクチンでは高い中和抗体が誘導され、受動免疫による防御も報告されている。一方、中和抗体が誘導されなくても防御が得られる場合があり、液性免疫に加え、細胞性免疫の関与も示唆される。さらに DNA ワクチンの接種では、反応初期に一過性の交差防御が誘導されることが報告されており、まず迅速で強力な非特異

的免疫反応が誘導され、続いて特異的かつ持続的な液性免疫が誘導されると考えられる。DNA ワクチンに関しては短期間に多様な観点から研究が進んだが、実用化を含め今後のさらなる展開が期待される。

【文献 6】**[109]**

DNA Vaccines for Aquacultured Fish.

Lorenzen, N., LaPatra, S.E.

Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., (2005) 24(1): 201-213

水産養殖魚の DNA ワクチン

（総説）

DNA ワクチンは、病原体の抗原遺伝子を接種し、宿主細胞に抗原を発現させることにより宿主の免疫応答を誘導する。今日、ヒトを含む動物の DNA ワクチンのうち最も効果的なものは、魚類のラブドウイルス、サケ科養殖魚の重要なウイルスである伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)及びウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV)に対する DNA ワクチンである。ウイルス表面糖タンパク質 G の遺伝子を組み込んだプラスミドを取り込んだ宿主細胞は、細胞表面に G タンパク質を発現し、液性及び細胞性防御メカニズムを発動させる。また、特異的免疫反応の前にインターフェロン誘導性非特異的抗ウイルス作用が誘導されるという特性も報告されている。現在のところ、接種ルートは筋肉内注射(IM)が最も効果的であり、ナノグラムレベルのプラスミド DNA の単回接種で迅速かつ持続的な防御効果が得られる。しかし、養殖の現場では集団接種の方が効率的で望ましく、DNA 内包リポソームや DNA 被覆微粒子を用いた浸漬法や超音波法が試みられているもののワクチン効果は IM 接種に及ばない。大西洋サケの養殖では、オイルアジュバント添加細菌ワクチンの腹腔内接種が実施されており、DNA ワクチンの追加も検討されているが、IM 接種に比べ高用量が必要である。IHNV 及び VHSV 以外には、伝染性膵臓壊死症ウイルスに対する DNA ワクチンで防御効果が得られたとの報告があるが、その他、コイ春ウイルス血症ウイルスやヒラメラブドウイルス、伝染性サケ貧血ウイルス、細菌性腎臓病等では、充分な防御反応を誘導し得る DNA ワクチンは開発されていない。今日までに、DNA ワクチン接種魚における有害事象は観察されておらず、また、宿主ゲノムへの組み込みも起こらないとされている。しかし、ヒトを含むワクチン接種魚の捕食者に対する影響や、環境への拡散について監視を怠ってはならない。法規制に関し、現行の分類では遺伝子組換え生物(GMO)と DNA ワクチン接種動物との区別に明確な基準はなく、対応は各国で異なっている。一般大衆の GMO に対する反応を考慮し、情報の開示と DNA ワクチンの利点の周知に努めるべきである。筆者は、ワクチン DNA が生殖細胞の遺伝子に組み込まれる科学的証拠がない限り、DNA ワクチン接種動物と GMO とは区別すべきと考える。養殖業における DNA ワクチンは、アニマルウェルフェアの向上、養殖業が環境にもたらす負荷の低減、食品の質及び量の向上、持続的な生産等、様々な利点を持つ。商業的規模の生産現場における実用化試験はカナダの大西洋サケの IHNV について試験が開始されたところであり、また、デンマークにおいて VHSV の試験が予

定されている。

【文献 7】**[110]**

Oral DNA vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against infectious haematopoietic necrosis virus using PLGA [Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid)] nanoparticles.
Adomako, M., St-Hilaire, S., Zheng, Y., Eley, J., Marcum, R.D., Sealey, W., Donahower, B.C., LaPatra, S., Sheridan, P.P.
Journal of Fish Diseases (2012) 35: 203-214
ニジマスの伝染性造血器壊死症ウイルスに対する PLGA ナノ粒子を用いた経口 DNA ワクチン

（原著論文）

ニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)の伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)に対する DNA ワクチンは有効であるが、筋肉内に注射する必要があり、淡水養殖魚への使用は実用的でない。本研究では、乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)を用いた経口 DNA ワクチンの作製を試みた。PLGA ナノ粒子に蛍光色素クマリン 6 を封入し、35%大豆タンパク質濃縮物(SPC)又は 35%大豆粕(SBM)に添加し、ニジマスに摂食させた。摂食 96 時間後、SPC 投与群の 38%、SBM 投与群の 29%の主に後腸腸管上皮細胞内に PLGA ナノ粒子の蛍光が検出された。次に、IHNV の G タンパク質遺伝子を挿入したプラスミド pCDNA-G を封入した PLGA ナノ粒子を同様にニジマスに摂食させた。DNA ワクチン量は、低用量群で 22 μg/匹、高用量群で 43 μg/匹に相当した。DNA ワクチンを背鰭基部筋肉内に注射した群を陽性対照、DNA ワクチンを含まない PLGA ナノ粒子のみの群を陰性対照とした。摂食 7 日後に後腸、前腸、筋注部位又は背鰭基部の筋肉、頭腎、脾臓を採取し、IHNV G 遺伝子の発現を検出したところ、ワクチン経口投与ニジマスの少数(15%)に発現が認められた。発現匹数に投与量の差による有意差は認められず、また陽性対照との有意差も認められなかった。筋注群では、IHNV G 遺伝子は前腸及び腎/脾組織に発現し、注射部位である筋肉には発現していなかった。摂食 6 週後に IHNV を腹腔内に攻撃接種し、21 日間の相対生存率(RPS)を評価した。陽性対照群、高用量投与群、低用量投与群、陰性対照群の RPS はそれぞれ 82%、22%、11%、6%となり、陽性対照及び高用量投与群と陰性対照群間に有意差が認められた。同様に、摂食 10 週後の攻撃接種試験では、RPS はそれぞれ 55%、19%、0%、19%となり、有意差は認められなかった。血清中抗 IHNV 中和抗体は、陽性対照群で 4/15 尾、高用量群で 2/15 尾に若干の上昇が認められた。以上の結果から、PLGA ナノ粒子を用いた経口 DNA ワクチンは免疫応答を誘導することが示されたが、筋注と同等の効果を得るためには低温域で DNA を放出可能なポリマーの探索など、改良が必要であることが示唆された。

【文献 8】**[111]**

Licensed DNA Vaccines against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV).

Alonso, M. Leong, J.C.

Recent Patents on DNA & Gene Sequences (2012) 6:

伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)に対する既承認 DNA ワクチン

（総説）

世界の食用魚類生産量に占める水産養殖魚の割合は現在 30%を超え、2030 年までに 50%を超えようとしている。この成長率の維持には、エビ、サケ、マス、ナマズ養殖業における疾病の低減が不可欠である。魚類の病原体の中でも RNA ウイルス、特にノビラブドウイルス科伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)は致死率が 80～100%と高く、米国及びカナダのサケ科魚類産業に重大な損害を与えている。DNA ワクチンは、ウイルスの抗原タンパク質遺伝子を宿主細胞に導入するワクチンであり、ウイルス抗原は宿主細胞内で感染の場合と同様に発現し、病原性復帰の懸念もなく、細胞性及び液性免疫を誘導する。1996 年、著者らはサイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーターを用いた IHNV 表面糖タンパク質(G)遺伝子をコードする DNA ワクチン(pCMVIEP-G)が、IHNV の攻撃接種に対し極めて高い感染防御能を誘導したことを報告した。1997 年には、別の CMV プロモーターを用いた IHNV DNA ワクチンの特許(EP0773295)が成立し、2005 年にカナダでは、CMV プロモーターを用いた IHNV-G DNA ワクチンがカナダ食品検査庁により認可されている。一方、CMV はヒトの病原性ウイルス由来であり、米国食品医薬局は魚類のワクチンには魚類のプロモーターが望ましいと指摘している。著者らは、ニジマスのインターフェロン制御因子 1A (IFR1A)プロモーター遺伝子を単離し、これを用いた IHNV-G ワクチン(pIRF1A-G)を作製し、ニジマスにおける感染試験で pCMVIEP-G ワクチンより優れた感染防御能を誘導した。DNA ワクチンプラスミドは、接種魚体の生殖細胞を含む組織中に長期間残存することが示されている。各国の規制当局の対応は様々で、英国及びデンマークでは、外来 DNA が宿主ゲノムに組込まれない限り DNA ワクチン接種動物は遺伝子組換え生物(GMO)とは見なさない、としているが、ノルウェーでは、外来 DNA の残存期間は GMO と見なされる。また、抗 DNA 抗体や自己免疫の誘導、免疫寛容や宿主ゲノムへの組込みといった安全性の問題が提起されている。生殖細胞への組込みが繁殖や野生資源に及ぼす影響や、残存 DNA の消費者又は捕食者に対する影響も懸念されている。これらの問題を解消するため、筆者らは宿主への免疫誘導後に外来 DNA を含む細胞にアポトーシスを誘導する自殺プラスミドベクターを考案し、この自殺 DNA ワクチン(特許公開番号 WO2002069840)を用いて接種試験を行い、有効性を確認した。このベクターを用いれば、DNA ワクチンの痕跡は消失する。また、DNA ワクチンの養殖業における接種方法には今後の検討が必要である。これらの新規技術を用

いた DNA ワクチンが漁業関係者及び消費者に受け入れられることを希望する。

【文献 9】**[112]**

Status and Future Perspectives of Vaccines for Industrialised Fin-Fish Farming.

Brudeseth, B.E., Wiulsfød, R., Fredrikisen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., Gravningen, K.

Fish & Shellfish Immunology (2013) 35: 1759-1768

魚の養殖水産業におけるワクチンの現状と将来展望

（総説）

現代の魚の養殖水産業は、最適環境と集中給餌による高度に集約的な産業であり、ワクチンによる疾病管理は重要である。特にサケの養殖業においてワクチンの役割は大きく、ノルウェーにおいて油中水型乳剤(w/o)ワクチンの導入は、1987 年に 50 t であった抗生剤使用量を 1997 年には 1～2 t に低減したばかりでなく、同期間の養殖サケ生産量を 5 万 t から 35 万 t へ増産した。現在、40 ヶ国を超える国々で 17 魚種を対象に、少なくとも 22 種類の細菌病及び 6 種類のウイルス病に対するワクチンが使用されている。大西洋サケ及びギンザケの疾病として重要なものは、せっそう病、ビブリオ病、冷水性ビブリオ病、冬期潰瘍（winter-ulcer）、レッドマウス病、ピシリケッチア症、細菌性腎臓病、伝染性サケ貧血、伝染性造血器壊死症(IHN)などである。ニジマスでは、連鎖球菌症、カラムナリス病も重要である。これらの疾病に対するワクチンはほとんどが w/o の腹腔内接種ワクチンであり、ノルウェー、フェロー諸島、英国及びアイルランド、カナダ、米国、チリ、オーストラリア、日本にて使用されている。カナダでは、DNA ワクチンで唯一承認されている IHN ウイルスワクチンの筋肉内接種も行われている。海産養殖魚では、ノルウェーにおいて大西洋タラのせっそう病及びビブリオ病の水性ワクチン、地中海諸国において主にヨーロッパシーバス及びゴウシュウマダイのビブリオ病及びパスツレラ症の水性ワクチン及び w/o ワクチン、日本においてブリ及びカンパチのイリドウイルス病、ビブリオ病、連鎖球菌症の浸漬ワクチンや w/o ワクチンが使用されている。マレーシア及びインドネシアではバラマンディの β 溶血性連鎖球菌症、日本、中国、韓国ではヒラメの β 溶血性連鎖球菌症、韓国ではエドワジエラ症のワクチンが使用されている。日本では、マダイの不活化マダイイリドウイルスワクチンが初めて承認され、近年、マハタの神経壊死症ウイルスワクチンも承認された。その他、ソウギョ、ナマズ類、ティラピアの淡水養殖において、各国でワクチンが使用されている。魚の養殖産業における産業の持続性、魚の福祉、企業利益、環境負荷の観点から、新たなワクチンの開発が期待されている。DNA ワクチンは、カナダで承認済みの IHN ウイルスを含むラブドウイルス科のウイルス糖タンパク質遺伝子を用いて、効果が示されているが、DNA ワクチン接種動物が遺伝子組換え生物(GMO)と認定される国もあり、一般大衆に認知される必要がある。また、弱毒生ウイルスワクチンも効果が期待されるが、病原性復帰の懸念や規制の問題が存在

する。新たなワクチンの実用化には、これらの安全性や規制問題の克服が課題である。

【文献 10】**[113]**

Increasing Versatility of the DNA Vaccine through Modification of the Subcellular Location of Plasmid-Encoded Antigen Expression in the In Vivo Transfected Cells.

Martinez-Lopez, A., Garcia-Valtanen, P., Ortega-Villaizan, M.M., Chico, V., Medina-Gali, R.M., Perez, L., Coll, J., Estepa, A.

PLOS ONE (2013) 8 (10): e77426

In Vivo で遺伝子導入したプラスミドコード抗原の細胞内発現部位をコントロールすることにより DNA ワクチンの汎用性が高まる

（原著論文）

DNA ワクチンにより免疫応答を惹起するためには、接種ルートが重要である。魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)及びウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV)の膜結合性糖タンパク質(gpG)遺伝子を含む DNA ワクチンは、筋肉内投与(i.m.)で最大の効果をもたらし、腹腔内投与(i.p.)では低い効果しか示さない。本研究では、モデルとして VHSV を用い、接種ルートに依らず防御免疫を誘導しうる DNA ワクチンの作製を試みた。VHSV $gpG_{1\text{-}507}$ から、膜貫通部位及び細胞質側末端を削除した可溶性の $gpG_{1\text{-}462}$ 及び $gpG_{1\text{-}462}$ 同様の可溶性とシグナルペプチドを有する分泌型可溶性 $gpG_{LmPle20\text{-}462}$ を発現するプラスミド [それぞれ pAE6 -$gpG_{1\text{-}507}$(既報)、pAE6- $gpG_{1\text{-}462}$ 及び pAE6- $gpG_{LmPle20\text{-}462}$]を作製した。それらをコイ上皮性細胞株(EPC 細胞)に安定的に導入したところ、$gpG_{1\text{-}507}$ は細胞膜上に、$gpG_{LmPle20\text{-}462}$ は細胞質顆粒内に、$gpG_{1\text{-}462}$ は細胞質内に発現が確認された。また、$gpG_{LmPle20\text{-}462}$ 導入 EPC 細胞の培養上清中には分泌型可溶性 VHSV-gpG が確認された。さらに、3 種のプラスミドワクチンをニジマスに i.m.又は i.p.にて免疫接種し、40 日後に致死量の VHSV で攻撃接種したところ、現行ワクチンの i.m.接種群の生存率 100%に対し、分泌型可溶性 pAE6-$gpG_{LmPle20\text{-}462}$ 免疫 i.m.群にて 100%、i.p.群にて 80%の相対生存率(RPS)が得られた。一方、可溶性 pAE6-$gpG_{1\text{-}462}$ 免疫 i.m.及び i.p.群の RPS は 64%と低かった。ワクチン接種 30 日後のニジマス血清中には高力価の抗 gpG 抗体が存在したが、ウイルス中和試験では有効な中和活性は認められなかった。免疫接種 3 日後に腹腔内に B 及び T 細胞の浸潤が認められ、特に pAE6-$gpG_{LmPle20\text{-}462}$ 免疫 i.p.群に細胞膜 IgT 発現 B 細胞の誘導が認められたことから、DNA ワクチンによる防御反応の主役は B 細胞であることが示唆された。pAE6- $gpG_{LmPle20\text{-}462}$ は i.m.にて防御免疫を誘導する初めての DNA ワクチンであり、オイルアジュバント存在下でも同様の有効性を示したことから、i.m.接種可能なオイルアジュバント添加多価ワクチンの可能性が示唆された。また、DNA ワクチンにより免疫応答を誘導するためには、プラスミド導入した発現抗原の細胞内局在が重要であることが示唆された。

【文献 11】**[114]**
Viral Vaccines for Farmed Finfish.
Dhar, A.K., Manna, S.K., Allnutt, F.C.T.
Virus Diseases (2014) 25: 1-17
養殖魚類におけるウイルスワクチン

（総説）
水産養殖業は全世界で大規模化が進み、2011 年の生産量は 6,300 万トン、生産額にして 1,300 億ドルに上った。伝染性疾病は水産養殖業における大きな問題であり、その原因は、細菌(54.9%)、ウイルス(22.6%)、寄生虫(19.4%)、真菌(3.1%)である。生体や卵の国際的な流通も発生の一因となっている。中でもウイルス性疾病は有効な薬剤がなく、生育初期に発生するため被害が大きい。サケ科魚類の伝染性サケ貧血(ISA)、伝染性造血器壊死症(IHN)、ウイルス性出血性壊死症(VHS)、コイ科魚類のコイ春ウイルス血症(SVC)やコイヘルペスウイルス病(KHVD)は、各国で壊滅的な被害の発生があったことから、疾病コントロール及び持続的産業のため、ワクチン開発が進められている。歴史的に初めて開発されたワクチンは不活化ワクチンであり、現在、ISA、IPN、SD、KHVD に対する不活化ワクチンが市販されている。原因ウイルスの培養が難しく、作製が困難な場合もある。弱毒化生ウイルスワクチンはヒトでは広く用いられているが、病原性復帰の懸念もあり、魚類を対象に市販されているものは現在のところ KHVD ワクチンのみである。サブユニットワクチンは単一又は複数のウイルス抗原を用いるワクチンであり、発現抗原にウイルス様粒子を形成させ、より効果を高めたワクチンも開発されている。組換え DNA ワクチンは、ウイルス抗原 DNA を筋肉内注射し、宿主内で抗原タンパク質を発現させて免疫を賦与するワクチンであり、強力かつ持続的な液性/細胞性免疫の誘導が可能である。現在カナダで IHN の DNA ワクチンが認可されているが、欧州及び米国では安全性の観点から認可されていない。養殖業においては、ワクチンの接種ルートも重要な課題である。現在主流の腹腔内接種及び筋注は、個別接種のため比較的大きな魚を対象とし、魚に与えるストレス、手技の煩雑さ、コストが問題である。浸漬法は幼魚への接種が可能でストレスも少なく低コストで実施できるが、抗原の安定性や免疫効果に改良が必要である。これらの課題を克服するため、経口投与の DNA ワクチンや組換え酵母発現ワクチンが検討されている。酵母は既に分子生物学的研究に広く用いられており、安全性の観点からも受け入れられやすい。培養コストも低く、免疫活性剤として既に魚のエサに用いられている。バキュロウイルスなど他の発現系も試みられており、今後、経口ワクチンの開発が重点的に進むと考えられる。また、今後はアジア圏で広く養殖されているコイ科魚類など、サケ科魚類以外を対象にしたワクチンの開発、市販も期待される。

【文献 12】**[115]**

An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (Oncorrhynchus mykiss).

Ballesteros, N. A., Alonso, M., Saint-Jean, S. R., Perez-Prieto, S. I.

Fish & Shellfish Immunology (2015) 45: 877-888

伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)に対するアルギン酸マイクロカプセル内包経口 DNA ワクチンはニジマスの免疫反応及び有意な防御反応を誘導する

（原著論文）

インターフェロン制御因子 1A (IRF1A)の上流にプロモーター領域を有し、伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)の糖タンパク質(G)を発現する DNA ワクチン pIRF1A-G は、筋肉内接種(筋注)にてニジマスに防御免疫を付与する。養殖魚の DNA ワクチン接種にはより省力的かつ安価な接種法が望ましいため、本研究では、アルギン酸マイクロカプセルに pIRF1A-G を内包した経口ワクチンのニジマスへの経口接種を試みた。経口ワクチン接種 1, 3, 5, 7 日後に、鰓、脾、腎及び腸管組織から IHNV G タンパク質が検出された。アルギン酸マイクロカプセルに内包された pIRF1A-G ワクチンは、胃での消化を免れ、後腸に送達された後、腸粘膜を経て全身の臓器に達すると考えられた。IHNV G タンパク質が腎及び脾臓で充分量発現するためには、経口接種では筋注の約 20 倍量のプラスミドが必要であった。10 μg の pIRF1A-G の経口接種にて、腎臓における *IFN-1*、*TLR-7* 及び *IgM* 遺伝子発現の増強が認められた。一方、*Mx-1*、*Vig-1*、*Vig-2*、*TLR-3* 及び *TLR-8* 遺伝子の発現は、より高用量(50 μg 及び 100 μg)の pIRF1A-G 経口接種時にのみ認められた。pIRF1A-G ワクチンは、腎及び脾臓において他の免疫応答マーカー(CD4、CD8、IgM 及び IgT)の発現も用量依存的に誘導した。ワクチン接種魚に IHNV を浸漬接種した場合、ワクチン用量に応じた防御反応が認められ、経口ワクチン接種魚、ワクチン非接種魚、対照プラスミド接種魚における累積死亡率には有意差が認められた。5 μg のワクチン筋注及び高用量(100 μg)の経口接種では、それぞれ 70%及び 56%と同程度の相対生存率が得られた。高用量(50 μg 及び 100 μg)経口ワクチン接種魚では、接種 45 日後においても血清中に抗 IHNV 抗体の有意な存在が認められた。ワクチン接種魚における IHNV の腎及び脾臓における N 遺伝子発現は攻撃接種後 10 日で検出感度以下となることから、経口ワクチンが組織中ウイルスを効果的に減ずることが示唆された。以上の結果から、アルギン酸マイクロカプセルに高濃度のプラスミドを内包した DNA ワクチンの経口接種により、ニジマスの免疫応答及び IHNV 感染防御が誘導されることが示された。

【文献 13】**[116]**

Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin.

Edmunds, T., Van Patten, S.M., Pollock, J., Hanson, E., Bernascon, R., Higgins, E., Manavalan, P., Ziomek, C., Meade, H., McPherson, J.M., Cole, E.S.

Blood (1998) 12: 4561-4571

遺伝子導入によるヒトアンチトロンビンの生成 : ヒト血漿由来アンチトロンビンとの構造及び機能の比較

（原著論文）

アンチトロンビン(AT)はセリンプロテアーゼ阻害作用を有し、トロンビンや Xa 因子と結合し、血液凝固を制御する。ヒト AT は分子量約 58,000 の糖タンパク質で、その機能及び血中半減期の維持には糖付加が必要であり、遺伝子組換えヒト AT (rhAT)は哺乳類細胞株を用いて製造されるが、タンパク質の生産効率や精製工程における回収率が低く、大量の培養液が必要である。我々は、トランスジェニック山羊を作製してその乳汁中にヒトのタンパク質を分泌させる方法を既に報告している。本報告では、トランスジェニック山羊で作製した rhTA をヒト血漿由来 AT (phAT)と比較した。 山羊 β 羊カゼイン遺伝子にヒト AT を組込んだ cDNA を山羊胚に導入し、作製した形質転換山羊を交配してトランスジェニック(F_1)山羊を作製した。雌 F_1 山羊 2 頭は 300 日以上一定したレベルで泌乳した。採取した乳汁は冷凍保存し、タンジェンシャルフローろ過膜を用いて精製た。精製における回収率は 55%であった。精製したタンパク質の分子量はヒト血漿由来 TA（phTA）と同等で、逆相液体クロマトグラフィーにて測定したタンパク質の精製度は 99%、クロマトグラムは phTA と同様で、N 末端アミノ酸配列及びペプチドマッピングにより、rhAT 及び phAT は構造的に同一であることが確認された。ヘパリン過剰量下におけるトロンビン及び Xa 因子の抑制効果は同等であったが、ヘパリンカラムへ及びヘパリン結合性アッセイにより、ヘパリン親和性は rhAT が phTA に比べ 4 倍強いことが示された。N 末端アミノ酸配列は一致したが、還元化及びアルキル化ペプチドマッピング、液体クロマトグラフ質量分析及び FACE 解析により、rhAT 及び phAT の 4 ヶ所のアスパラギン残基(Asn96、Asn135、Asn155 及び Asn192)における N 結合型糖鎖の相異が明らかになった。特に rhAT では、Asn 155 がオリゴマンノース型構造をとり複数の N 結合型オリゴ糖の単糖(GalNAc)への置換とフコシル化が見られた。さらに、rhAT は phAT に比べシアル酸結合数が少なく、これらの特徴がヘパリン親和性を高めていることが示唆された。高用量の AT 投与は播種性血管内凝固症候群や、他のトロンビン介在性疾患の治療に有用である。今後、ヘパリン親和性の高い rhAT の生体内分布や有効性について研究を進める予定である。

【文献 14】**[117]**

Equine Embryonic Stem-Like Cells and Mesenchymal Stromal Cells Have Different Survival Rates and Migration Patterns Following Their Injection into Damaged Superficial Digital Flexor Tendon.

Guest, D.J., Smith, M.R.W., Allen, W.R.

Equine Veterinary Journal (2010) 42(7): 636-642

損傷浅肢屈筋腱に注入した馬胚性幹細胞様細胞及び間葉系間質細胞の生存率と遊走性における差

（原著論文）

競走馬における浅肢屈筋腱(SDFT)の損傷は発生率が高く、腱の再生が不十分なことから再発率も高い。腱の再生促進を目的に臨床現場で用いられている骨髄由来の自己間葉系幹細胞(MSC)は、採取時の侵襲性や採取後の培養に時間がかかること、個体ごとに細胞集団が異なり標準治療の確立が困難なことなど、実際の使用には制約がある。馬の胚性幹細胞(ES 細胞)はこれらの難点を克服する可能性があることから、損傷腱に ES 細胞を注入し、その挙動を MSC と比較した。試験には 3、4 歳の去勢馬 8 頭を用いた。骨髄を吸引採取し、MSC を接着培養分離法にて分離し、緑色蛍光タンパク質(GFP)発現プラスミド pCAG-EGFP を導入した。100%の MSC に培養期間の 14 週間にわたり GFP 発現が確認され、注入試験前に骨、脂肪、軟骨細胞への分化も確認された。一方、既報の ES 細胞株にレトロウイルス遺伝子発現システムを用いて βgal 遺伝子を導入した。70～80%の細胞に培養 3 ヶ月間にわたり βgal 発現が確認され、三胚葉への分化も確認された。8 頭の馬の前肢 SDFT の中手掌側に約 1 cm の刺切創を等間隔に 3 ヶ所作製し、7 日後に第 1 創に自己血清、第 2 創に自己又は同種 MSC、第 3 創に 2 頭は MSC、6 頭は ES 細胞を各 1×10^6 個注入し、対側肢を無処置対照とした。注入後は、安静から徐々に運動量を増やし、超音波診断及び組織染色にて 10、30、60、90 日後の注入細胞の生存率及び局在を調べた。MSC 及び ES 細胞の注入による免疫応答や腫瘍の発生は認められなかった。GFP 発現 MSC は紡錘形を呈し、試験期間にわたり注入部周辺の健康組織及び損傷部位に検出され、10 日後の生存率は 5%未満で、90 日後には 0.2%に減少した。βgal 発現 ES 細胞も同様に注入部周辺に認められ、10 日後には血清注入創及び MSC 注入創にも検出された。生存率は注入部で少なくとも 60%と MSC に比べ極めて高かった。ES 細胞の健康組織への浸潤は、血管内以外には認められなかった。本試験では、注入細胞の腱細胞への分化は確認されていないが、ES 細胞及び MSC は機能的に異なる効果を有し、また ES 細胞の遊走能及び生存率の高さから腱損傷治療における有用性が示唆された。

【文献 15】**[118]**

Collection and Propagation Methods for Mesenchymal Stromal Cells.

Taylor, S.E., Clegg, P.D.

The Veterinary Clinics of North America. Equine practice (2011) 27(2): 263-274

間葉系幹細胞の採取及び生成方法

（総説）

間葉系幹細胞(MSC)は、成体の間葉系組織に由来し、骨、軟骨、脂肪細胞への分化能を有する。臨床現場では MSC の分離組織として主に、骨髄(BM)、脂肪組織(AT)及び臍帯(UC)が用いられている。本総説は、馬の骨髄及び脂肪由来 MSC の採取及び生成方法について概説する。馬の骨髄液は、主に第 5 胸骨から 12G 骨髄生検針を用いて超音波画像で確認しつつ 10～15 ml を採取する。他に寛結節、脛骨、上腕骨からも採取可能である。採取した骨髄液そのまま、あるいは密度勾配遠心法にて分離した単核球分画を、10%牛胎子血清添加培養液中で培養し、接着培養分離法にて BM-MSC を分離する。脂肪組織は尾根部又は背部の臀筋から採取し、細切後コラゲナーゼで消化し、間葉系細胞と脂肪細胞を分離する。遠心分離後、AT-MSC を含む有核細胞層を回収し、培養する。臍帯血は臍帯から採取し、密度勾配遠心法にて UC-MSC を含む有核細胞層を回収し、培養する。得られた MSC の自己複製能及びクローン形成能は、コロニー形成単位アッセイにて計測する。BM-MSC は分裂 30 回、AT-MSC 及び UC-MSC は 60～80 回で細胞老化に達するとの報告がある。分化能は、遺伝子発現や、細胞の形態や膜電位の変化をもたらす代謝の変化によって確認できる。多分化能は MSC の重要な要素の一つであり、骨、軟骨、脂肪の筋骨格系細胞へ誘導培養にて分化する。各細胞系への分化の指標として、骨細胞ではカルシウム及びリン酸塩、軟骨細胞ではグリコサミノグリカン、プロテオグリカン、脂肪細胞ではリポタンパク質リパーゼ活性等を染色法にて検出する他に、特定の遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法等で検出する。BM-MSC は AT-MSC に比べ骨及び軟骨細胞への分化能に優れることが報告されている。MSC の凍結保存が細胞活性や分化能に与える影響は少ない。MSC を規定する細胞表面抗原の馬 MSC に関する知見は少ないが、CD29、CD44、CD90 の発現と CD14、CD79、MHC-II の非発現が必須とされている。培養 MSC は、細菌等の汚染がないよう滅菌環境下で維持・管理されなければならない。また、培養 MSC を均質な細胞集団のまま維持することは難しく、継代時のトリプシン処理や、細胞密度の維持に留意する必要がある。今後、クオリティコントロールや研究成果の比較のため、馬 MSC の作製や細胞特性に関する標準的手法や細胞マーカーの研究の進展が必要と考える。

【文献 16】**[119]**

Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon

Godwin, E. E., Young, N. J., Dudhia, J., Beamish, I. C., and Smith, R. K. W.

Equine Veterinary Journal (2012) 44: 25-32

骨髄由来間葉系幹細胞移植が馬の浅指屈筋腱過伸展損傷の予後を改善する

（原著論文）

競走馬に多くみられる浅肢屈筋腱の損傷(浅屈腱炎)において、損傷後の屈筋腱は線維化のプロセスを経て修復され、全体としては強度が増すものの柔軟性は低下するために、走行成績の低下や再発リスクの上昇につながることが多い。一方、損傷腱に注入された間葉系幹細胞(MSC)は、最大引張応力の上昇やⅠ型/Ⅲ型コラーゲン比の上昇をもたらすことから、組織に生着し、細胞外マトリクスの生成を促進すると考えられている。本研究では、競走馬に自然発生的に生じた浅屈腱炎に対する骨髄由来 MSC の病変内注入の安全性及び再発率を評価し、他の治療法による成績と比較した。移植に用いた骨髄由来 MSC は、胸椎から吸引した自家骨髄液中の接着細胞を分離培養し、骨髄液上清に懸濁した。注射針の位置を超音波診断画像にて確認しつつ、損傷部位に約 1×10^7 個の骨髄由来 MSC を注入した。移植後は、定期的に超音波検査を行いながら、標準プログラムに従い 48 週以上かけて徐々に運動レベルを上げ、最終的にレース復帰を目指した。臨床例として、2003～2007 年にイギリスにてナショナルハントレース(障害競走)又は平地レースに出走したサラブレッド系競走馬の浅屈腱炎に骨髄由来 MSC 移植治療を施し、2 年以上フォローアップを行った記録と、保存的治療報告との比較を行った。移植の安全性を、浅屈腱炎を発症した 6 頭を対象に超音波診断及びシンチグラフィにより評価した結果、移植後に損傷の悪化及び骨組織の生成は認められなかった。また、移植後 150～365 日経過した 8 頭について組織学的検査を行った結果、異所性組織は認められなかった。MSC 治療後 2 年以上のフォローアップ記録が存在するレース馬 113 頭のうち 111 頭がレースに復帰し、31 頭(27.4%)が治療肢に、6 頭(5.3%)が治療肢の対側に屈腱炎を発症した。再発率は、Dyson ら及び O'Meara らの保存的運動療法及び薬物(ヒアルロン酸又は多硫酸グリコサミノグリカン、インスリン様成長因子の注入)治療と比較し、有意に低かった。治療時の年齢、移植 MSC 細胞数、損傷から治療までの日数と治療結果とに有意な相関は認められなかった。以上の結果より、MSC 移植は安全性が高く、特にナショナルハントレース馬において浅屈腱炎の再発を低減することが示された。この結果は競走馬の腱障害に対する MSC 移植の長期的効果を実証するものであり、ヒトの腱損傷治療への応用が期待される。

【文献 17】**[120]**

Autologous Point-of-Care Cellular Therapies Variably Induce Equine Mesenchymal Stem Cell Migration, Proliferation and Cytokine Expression.

Kol, A., Walker, N.J., Galuppo, L.D., Clark, K.C., Buerchler, S., Bernanke, A., Borjesson, D.L.

Equine Veterinary Journal (2013) 45: 193-198

自己細胞の臨床即時投与療法による馬間葉系幹細胞の遊走、分化及びサイトカイン発現誘導の多様性

（原著論文）

馬の間葉系幹細胞(MSC)は、骨、腱、靭帯や軟骨組織の修復に用いられるが、MSC の分離増殖には時間がかかる。一方、自己再生細胞混合濃縮物(mixed regenerative cell concentrate: MRC)は、患者から採材後すぐに作製し、初期治療に用いることが可能である。MRC は、脂肪組織由来間質血管細胞群(SVF)、骨髄単核球(BMMN)、臍帯血単核球(CBMN)及び多血小板血漿(PRP)からなり、MSC、血管内皮前駆細胞、単球/マクロファージ、造血幹細胞及び前駆細胞といった細胞そのものだけでなく、細胞外マトリクスや成長因子、サイトカインを供給する。また、MRC は自己組織であるため免疫反応を惹起するリスクもなく、FDA の厳格な規制を受けることもない。初期治療に投与した自己 MRC は局所性 MSC を動員し、活性化させる。MSC 活性化因子として TNF-α や IFN-γ が知られており、活性化 MSC からは IL-6 や PGE_2、TGF-β1 が分泌される。本研究では、MRC が MSC 機能に及ぼす影響を *in vitro* モデルにて解析した。1～2 歳の馬 7 頭を供試し、皮下脂肪、骨髄、血液を採取し、それぞれ SVF、BMMN、血小板溶解物(PL)を作製した。臍帯血は出生時に採材し、MSC は本試験より 1 年以上前に骨髄から作製し、保存した。各 MRC 成分が MSC の増殖、遊走性、サイトカイン遺伝子発現及び分泌に及ぼす影響を解析するため、トランズウェルインサートにて自己 MRC と MSC を共培養した。MRC の各成分と共培養した MSC の細胞数は、対照の約 1.3 倍と有意に増加し、特に SVF との共培養にて有意な増数が見られた。MSC の遊走性では有意差は認められなかったが、SVF 及び BMMN は PL 及び CBMN に比べ有意に MSC の走化性浸潤を誘導した。CBMN は MSC の IL-6 遺伝子発現を有意に刺激した。PL 及び CBMN における TGFβ1 を産生が認められたが、共培養で MSC の産生は促進しなかった。SVF は他の MRC に比べ有意に多量の PGE_2 産生を誘導していた。以上の結果より、自己 MRC が MSC の増殖及び遊走性、サイトカイン分泌及び遺伝子発現を増強することが明らかとなり、中でも SVF は MSC の増殖及び遊走を有意に促進した。MSC の損傷部位への注入は、局所 MSC の活性化とサイトカイン分泌、また慢性損傷部位における MSC の活性化を促進すると考えられた。

【文献 18】**[121]**

Tenogenic Differentiation of Equine Adipose-Tissue-Derived Stem Cells under the Influence of Tensil Strain, Growth Differentiation Factors and Various Oxygen Tensions.

Raabe, O., Shell, K., Fietz, D., Freitag, C., Ohrndorf, A., Christ, H.J., Wenisch, S., Arnhold, S.

Cell and Tissue Research (2013) 352: 509-521

馬の脂肪組織由来幹細胞の腱分化における引張刺激、増殖分化因子及び酸素分圧の影響

（原著論文）

間葉系幹細胞(MSC)は筋骨格系組織の細胞に分化する能力を有し、馬の腱損傷の再生治療において有効性が期待されている。骨髄由来 MSC と同様、脂肪由来 MSC (ASC)も骨、軟骨分化能を有し、腱の再生研究が進められている。腱は強大な張力に耐えうる組織であり、線維芽細胞と細胞外基質(ECM)から成る。ECM は基質と線維から成り、線維の 95%が腱の強度を担う I 型コラーゲン(col I)、5%が弾力性を生み出す III 型コラーゲン(col III)である。ASC を線維芽細胞に分化させ、完全に機能的な ECM を作り出す至適条件の検討が必要である。生体内は低酸素環境であり、脂肪及び軟骨細胞への分化における最適酸素（O_2）分圧は組織の平均 O_2 分圧である 3%であることが示されている。また、増殖分化因子(GDF)5 の投与による腱細胞への分化促進、ECM の産生及び腱マーカーとして、スクレラキシス(scx)、軟骨オリゴマーマトリクスタンパク質(COMP)遺伝子の発現が認められている。さらに、幹細胞及び線維芽細胞に対する機械的刺激も ECM 線維の配列及び基質強度上昇に重要である。本研究では、これら複数の条件について総合的に検討を行った。馬の皮下脂肪組織から ASC を分離し、3 次元支持担体である I 型コラーゲンに懸濁しゲル化した。この 3 次元 ASC ゲルを 21%又は 3% O_2 分圧下で、4%/2h 強度の単軸引張に静止 6h の周期的引張を加えながら腱誘導培養液にて培養し、細胞における形態学的変化及び遺伝子発現を解析した。培養 21 日後に、3% O_2 分圧ではほぼ全ての細胞がダメージを受けていたのに対し、21% O_2 分圧下では約 65%の細胞が生残し、GDF5 添加培養にて培養開始時の丸みを帯びた形態から腱細胞に特徴的な紡錘形に変化し、細胞同士の接着が見られ、ミトコンドリア、小胞体の存在から細胞内合成も示唆された。引張方向に配列する明瞭な細胞骨格や、細胞外にはコラーゲン前駆体を示唆する粘張成分が認められた。定量的 PCR の結果、col I 及び col III の発現は 21% O_2 分圧下が 3% O_2 分圧下に比べ、また腱組織と比較しても有意に高かった。GDF5 及び GDF7 の添加は col I、col III、scx、COMP の発現を有意に増強した。以上の結果から、3 次元培養における ASC の線維芽細胞への分化は、21% O_2 分圧、引張刺激及び GDF5、GDF7 添加の条件が最適であることが示され、前分化幹細胞の治療への応用が期待される。

【文献 19】**[122]**

Therapeutic Use of Stem Cells in Horses: Which Type, How, and When?

Schnabel, L.V., Fortier, L.A., McIlwraith, C.W., Nobert, K.M.

The Veterinary Journal (2013) 197: 570-577

馬の治療における幹細胞の使用法：種類、方法及び投与時期

（総説）

馬の腱疾患、骨関節炎及び蹄葉炎といった筋骨格系障害の臨床現場において、幹細胞療法は広く行われている。本総説は、現在(2013 年)、幹細胞療法に使用されている細胞の種類や手法、治療の限界や規制に関する情報を臨床獣医師に対し提供する。馬の臨床医療では、骨髄由来(BM-)及び脂肪組織由来(AT-)の間葉系幹細胞(MSC)が用いられている。骨髄は胸骨又は腸骨から吸引し、2～3 週間の培養により BM-MSC を分離するか、又は吸引後ただちに遠心分離して幹細胞及び血小板を含む骨髄濃縮液(bone marrow concentrate, BMC)を調製する。BM-MSC の分離・培養サービスや BMC 調製用遠心分離装置はすでに上市され、臨床応用されている。脂肪組織は主に尾根部から採取し、AT-MSC 又は脂肪由来間質血管細胞群(adipose-derived stromal vascular fraction, AD-SVF)を調製する。AD-SVF は幹細胞含有率が低いが、調製に要する時間が短く、調製サービスが存在することから臨床使用例は多い。成体幹細胞に加え、胚性幹細胞が胎子線維芽細胞、臍帯血、臍帯組織、胎盤及び羊水から作製されている。馬の腱損傷治療における BM-MSC の有効性について実験的及び臨床的研究がなされており、競走馬のレースへの復帰や、再発率の低下が報告されている。治療では、損傷部位への超音波ガイド下接種や、静脈内投与が行われる。一方、血小板濃縮血漿も既に広く使用されているが、BM-MSC との有効性の比較や同時投与による効果の検証が必要である。骨関節炎(OA)に関しては、BM-MSC が AT-MSC に比べ良好な治療成績が得られている。BM-MSC の関節腔内接種(IA)では、AD-SVF や対照に比べ滑液の滲出や炎症性因子濃度の低下が認められており、大腿関節丘の軟骨欠損においても同様の有効性が報告されている。IA 時には幹細胞を定着させるためにヒアルロン酸、非ステロイド抗炎症剤、自己あるいは市販のフィブリン等を同時に注入する。同種軟骨細胞の移植も有効とされる。蹄葉炎に対する幹細胞療法は、安全性や有効性を評価した研究報告はないものの、臨床現場では既に実施されている。炎症反応の鎮静を目的に患肢の種子骨位静脈（lateral digital vein at the level of sesamoid bone）から自己又は同種幹細胞を投与する。現在は獣医幹細胞療法に関する法規制はなく、米国食品医薬品局(FDA)の動物薬センター(CVM)は、獣医細胞療法を Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FDCA) に基づく規制の準備をしていると推察される。米国農務省の見解は異なっており、今後、定義や規制状況について精査が行われるが、CVM は FDA のヒト細胞・組織製品規制に準ずると予想され、獣医細胞医療においても”Minimal Manipulation”を

含む基準の導入や FDA の市販前承認、少なくとも病原体の伝播を防止する品質管理や最終製品テストは必要になると考えられ、今後の注視が必要である。

【文献 20】**[123]**

Immune Potential of Allogeneic Equine Induced Pluripotent Stem Cells.

Aguiar, C., Theoret, C., Smith, O. Segura, M., Lemire, P., Smith, C.

Equine Veterinary Journal (2014)

馬の同種人工多能性幹細胞の免疫原性

（原著論文）

馬は、幹細胞療法における有効性及び安全性を評価する動物モデルとして有用である。間葉系幹細胞(MSC)を用いた馬の筋骨格系障害治療の臨床試験では、移植細胞の低生残性や低定着率、線維肉腫（fibrosarcoma）やがん腫（carcinoma）の発生等の問題が報告されている。幹細胞移植では拒絶反応が最大の障壁であるが、馬の同種 MSC 移植では、MSC は MHC-I を発現しながらも免疫調整機能により排除を免れることが報告されている。多能性幹細胞は自己複製能及び 3 胚葉性の分化能を有することから、成体細胞を用いた人工多能性幹細胞(iPSC)は細胞治療や再生医療分野に大きな期待をもたらしている。一方、自己 iPSC の作製には時間がかかることから、将来の再生医療には同種 iPSC が利用されると考えられる。マウスでは、iPSC の作製にウイルスベクターを用いた場合に、自己 iPSC に発現する MHC-I が細胞障害性 T 細胞を誘導し、移植後の拒絶につながるとの報告がある。馬では、2011 年にトランスポゾンシステムにより iPSC (eiPSC)が作製されており、本研究では、同種 eiPSC を馬の皮下移植し、eiPSC の免疫原性について検証を行った。eiPSC は、PiggyBac トランスポゾンシステムにより馬線維芽細胞に山中因子及び GFP マーカーを導入して作製した。得られた 2 株の eiPSC の MHC 発現をフローサイトメトリーで解析し、各種多能性マーカーの発現を確認した。MHC-I の発現率は親株の線維芽細胞では 96%であったのに対し eiPSC の 2 株はともに 4%であり、MHC-II は 17%に対し 1%及び 12%と低く、拒絶反応を惹起しにくいと考えられた。8 歳及び 18 歳の 2 頭の雌馬の頸部側面を剃毛し 4×4 の格子を作製し、各列に 0.9%滅菌食塩水(陰性対照)、phytohemagglutinin (PHA)及び eiPSC 1 株 1×10^6 個を 4 列皮下移植し、移植後 2、3、7 及び 30 日に皮膚全層を生検した。GFP 蛍光は移植後 3 及び 7 日の検体組織に認められたが、30 日には認められなかった。eiPSC 移植部周囲に移植後 3 日に好中球優勢の炎症性細胞浸潤、7 日にリンパ球優勢性浸潤が認められた。PHA 接種部には接種後 3 日にマクロファージ、好中球及び好塩基球性の急性/亜急性炎症像が認められ、30 日に炎症は収束した。CD4 陽性細胞及び CD8 陽性細胞は、PHA 接種部位には接種後 2 日に強い浸潤が認められ、30 日には減少したが、eiPSC 移植部位には移植後 30 日に増加が認められた。以上の結果から、移植した同種 eiPSC は中程度の細胞性反応を惹起したが、急性の拒絶反応は認められず、再生医療に用いる同種 iPSC バンクの可能性が示唆された。

【文献 21】**[124]**

Intravenous Application of Allogenic Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Safety Assessment in 291 Equine Recipients.

Broeckx, S., Borena, B.M., Zimmerman, M., Mriën, T., Seys, B., Suls, M., Duchateau, L., Spaas, J.H.

Current Stem Cell Research & Therapy (2014) 9

同種末梢血由来間葉系幹細胞の静脈内投与: 馬 291 頭における安全性の評価

（原著論文）

静脈内投与した自己間葉系幹細胞(MSC)は、脈管系を介して損傷部位に達し、治癒促進に関与することが報告されているが、患者自身の MSC は採取や調製及び質の安定的な確保が困難な場合があることから、近年、他家 MSC 移植の研究が進められている。一方、マウスにおいては異種(ヒト)又は同種 MSC の静脈内投与試験にて重篤な肺疾患や死亡例が報告されている。本研究では、ヒトの大動物モデル及び獣医療の進歩に供するため、馬における静脈内投与による同種末梢血由来 MSC 移植の大規模な安全性評価を行った。4 歳及び 6 歳のドナー馬の頸静脈から末梢血各 50 mL を採取し、PBMC から接着培養分離法にて MSC を分離した。得られた細胞は、CD29、CD44、CD90、CD105 及び Ki67 陽性、MHC-I 弱陽性及び MHC-II 及び p63 陰性であった。また、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞の 3 種種類の間質系細胞への分化能及び正常な自己再生能を示す細胞数倍化時間など、MSC の特性が確認された。継代数 3〜5 回の MSC を 0.2×10^6 個/ml で 10%DMSO 添加 DMEM に懸濁し、凍結保存した。血清中の血液伝播可能な病原体は陰性であった。レシピエントとして 3 ヶ月〜33 歳の馬計 291 頭を供試し、第 1 群 176 頭に 4 歳馬の末梢血由来 MSC 0.2×10^6 個を、第 2 群 115 頭に 6 歳馬の同 MSC を静脈内投与した。第 2 群の 115 頭のうち 5 頭には 6 週間後にさらに 0.2×10^6 個を、別の 5 頭には 1×10^6 個を追加投与した。投与後 10 日間は、臨床症状、特に膨疹形成、発汗、呼吸数及び体温上昇といった過敏反応等の有害事象について詳細に観察した。さらに投与 6 ヶ月後及び 1 年後に獣医師による再評価を行った。その結果、単回投与及び追加投与したいずれの馬にもこれらの有害事象や死亡例は認められなかった。投与 7 ヶ月後に、1 頭が疝痛にて死亡した。残る 290 頭は 1 年間の観察期間中に有害事象の発現は認められなかった。疝痛は馬に最も一般的な疾患であり、その発現率 0.22 例/頭年から予想される発現数は 64 頭となり、本試験の 291 頭における発現数 1 頭は十分に低いと考えられた。以上の結果から、末梢血由来 MSC の静脈内投与は 291 頭の馬に対し臨床的有害事象を惹起しなかったと結論づけられ、今後は病理学的検証も必要と考えられた。

【文献 22】**[125]**

Gene expression of tendon markers in mesenchymal stromal cells derived from different sources.

Burk, J., Gittel, C., Heller, S., Pfeiffer, B., Paebst, F., Ahrberg, A.B., and Brehm, W.

BMC Research Notes (2014) 7: 826-831

異なる組織由来の間葉系間質細胞における腱マーカー遺伝子発現

（原著論文）

多分化能を有する間葉系間質細胞(MSC)は様々な体組織から採取可能であるが、その機能は元の組織によって異なることが示されている。MSC は腱再生治療に広く用いられているが、腱組織は厳密に構造化されたコラーゲン線維などの細胞外マトリックスに富んでおり、細胞外マトリックスを高発現する MSC を得られる組織の選択が重要である。本研究は、馬の骨髄(BM)、脂肪組織(AT)、臍帯組織(UCT)、臍帯血(UCB)及び腱組織(TT)由来 MSC における腱細胞外マトリックスタンパク質及び分化マーカーの発現を評価した。新生子馬から UCB 及び UCT を、3～18 歳の成馬から BM、AT 及び TT を採取し、コラーゲン分解酵素処理して組織中の MSC 接着培養分離した。3 代継代後、脂肪細胞、骨芽細胞及び軟骨細胞への分化能をそれぞれオイルレッド O 染色、コッサ染色、アルシアンブルー染色にて確認した。また、フローサイトメトリーにて CD29、CD44 の発現及び CD34、CD45、MHC-II の非発現を確認した。各組織由来 MSC における細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲン 1A2、コラーゲン 3A1、デコリン及びテネイシン-C 並びに転写因子であるスクレラキシスの発現をリアルタイム RT-PCR にて比較した。AT-MSC は、コラーゲン 1A2 を他の組織由来 MSC 及び腱組織自体(NaT)と比較して有意に高いレベルで発現した。また、コラーゲン 3A1 の発現も、UCB-MSC を除く全ての MSC と比べ有意に高かった。コラーゲン 1A2 のコラーゲン 3A1 に対する発現比は、TT-MSC で最も高く、NaT を含む他の全組織由来 MSC と比較して有意に高かった。デコリンの発現は全ての組織由来 MSC で NaT より高く、AT 及び TT-MSC で最も高かった。テネイシン-C 及びスクレラキシスの発現は、全ての MSC が NaT より有意に低かった。以上の結果より、MSC の細胞特性は由来組織により異なることが示された。腱再生治療においては、細胞外マトリックスの再構成が重要であり、腱細胞外マトリックス成分の高発現率及び組織の採取しやすさから、腱再生治療における脂肪組織由来 MSC の有用性が示された。

【文献 23】**[126]**

Equine induced pluripotent stem cells or how to turn skin cells into neurons: Horse tissues a la carte?

Donadeu FX.

Equine Veterinary Journal (2014) 46: 534-537

馬人工多能性幹細胞、又は皮膚細胞からの神経細胞の作り方: 馬の組織をお好みで

（総説）

間葉系幹細胞(MSC)は、馬の整形外科における細胞療法として現在広く使用されている。しかし、MSC の臨床応用には、成体組織中の細胞数の少なさや培養による増殖・維持の困難さ、分化組織が間葉系組織に限定されるなどの様々な制約がある。一方、多能性幹細胞(PSC)は本質的に無限の増殖性と体内の全ての細胞への分化能を有し、再生医療への応用において MSC よりも有用である。胚性幹細胞(ESC)は胚盤胞から作出するため非自己であり自己移植はほぼ不可能であり、また倫理的制約から利用が難しい。人工多能性幹細胞(iPSC)は、*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myk* の 4 転写因子を導入することにより成体細胞を再プログラムする技術である。2006 年にマウス、次いで 2007 年にヒトにて初めて樹立されて以降、豚、羊、牛、イヌなどの動物種で作製が報告されている。馬の iPSC は 2011 年に初めて胎子線維芽細胞からの作製が報告され、*in vitro* での多能性マーカーの発現に加え、*in vivo* でも馬の ESC では不可能であったテラトーマの形成が確認された。著者らは、成体角質細胞（keratinocyte）から馬の iPSC の樹立に成功した。間葉系以外の細胞における再プログラミングは、マウス及びヒト以外では初めてである。角質細胞からの作製は線維芽細胞よりも早く、効率的であり、また樹立された iPSC は線維芽細胞由来 iPSC に比べ多様な細胞への分化能を有し、神経、軟骨、筋、肺上皮、腸管上皮の各細胞へ分化が可能であり、特に、神経などの外胚葉性細胞への分化傾向が強かった。また、著者らが用いた方法では、培養に白血病阻止因子を添加し、線維芽細胞増殖因子や血清、フィーダー細胞は使用していないことから、臨床上の安全性が向上している。今後さらに、導入遺伝子によるがん化の懸念を解消するため、DNA フリーでの導入など作製法の検討が必要である。著者らが樹立した馬角質細胞由来 iPSC は神経前駆細胞に分化し、さらに形態学的にコリン作動性運動ニューロンと相同の細胞に分化し、電気的刺激に応じて活動電位を生じた。この細胞は現在、馬の正常な神経発達及び神経疾患や毒性に関する神経発生学的研究に用いられており、将来的には、現在治療法のない馬の運動ニューロン性疾患や変性性脊髄脳炎、自律神経異常症（grass sickness）の治療に応用できる可能性がある。また、すぐに使用可能な off-the-shelf の iPSC として、筋骨格系障害のみならず蹄葉炎などの炎症性疾患、胃腸病、自己免疫疾患の治療にも応用可能と考える。さらに、疾患特異的な iPSC の作製と馬の全ゲノム情報の解析により、遺伝的疾患治療やゲノム編

集への応用など、研究の進展が期待される。

【文献 24】**[127]**

Equine Autologous Platelet Concentrates: A Comparative Study between Different Available Systems.

Hessel, L.N., Bosch, G., van Weeren, P.R., Ionita, J.C.

Equine Veterinary Journal (2015) 47: 319-325

馬の自己血小板濃縮物：現存システムの比較研究

（原著論文）

自己血小板濃縮物(APC)は多血小板血漿とも呼ばれ、馬の整形外科治療において一般的に使用される。APC は、損傷治癒プロセスに重要な血小板由来成長因子(PDGF)-BB や変異増殖因子(TGF)-β など多様な成長因子を放出するため、組織再生の促進を目的に、筋、滑膜、靭帯、腱及び皮下損傷に外用あるいは注入して用いられる。馬 APC の作製は一般に、ヒト血液からの分離を目的に開発された現存システムを用いるが、馬の血液は性質が異なることから、得られた APC の質の評価が必要である。本研究では、馬血液から 4 種類の市販システム(Angel^{TM}、ACP^{TM}、E-PET^{TM}、GPS^{TM}III)及び 2 回の遠心分離による手動分離(マニュアル法)にて APC を作製し、その血液学的性状や各種サイトカイン濃度を評価した。血液は馬 6 頭から抗凝固的に採取し、それぞれの方法で APC を分離した。E-PET^{TM} 以外の 3 システムは 1 回遠心分離法、E-PET^{TM} は濾過法であり、それぞれ手技書に従い操作した。マニュアル法では、1 回目の遠心でバフィーコートを除去し、2 回目の遠心で APC を分離した。各手技に要する時間は、市販システムで 10～30 分、マニュアル法では 50 分であった。血小板濃縮率は、E-PET^{TM} にて 369%、GPS^{TM}III にて 527%と有意に高く、ACP^{TM} は 130%と最も低かった。総白血球濃縮率は GPS^{TM}III が 663%と有意に高く、ACP^{TM} は 9%とベースライン(血液)と比べても有意に低かった。白血球分画は全方法で好中球比が減少し、リンパ球比が増加した。PDGF-GG の濃縮率は、Angel^{TM} (514%)、E-PET^{TM} (1255%)、GPS^{TM}III (1251%)及びマニュアル法(394%)にて有意に高く、ACP^{TM} (116%)はベースラインと同等であった。TGF-β の濃縮率は、ACP^{TM} (93%)以外の全方法で有意に高く、特に E-PET^{TM} (560%)及びマニュアル法(507%)が他の方法に比べ有意に高かった。以上、馬血液から作製した APC の血液学的及び生化学的性状は、5 種類の APC 作製法により異なり、また、ヒト血液を材料とした結果とも異なっていた。これらが APC の生理活性に影響し、結果的に損傷治療の結果に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

【文献 25】**[128]**

Generation of Functional Neurons from Feeder-Free, Kratinocyte-Derived Equine Induced Pluripotent Stem Cells.

Sharma, R., Livesey, M.R., Wyllie, D.J.A., Proudfoot, C., Whitelaw, C.B., Hay, D.C., Donadeu, F.X.

Stem Cells and Development (2014) 23: 1524-1534

ケラチノサイト由来馬人工多能性幹細胞からのフィーダー細胞を用いない機能的ニューロンの生成

（原著論文）

人工多能性幹細胞(iPSC)技術はヒトの神経疾患治療の可能性を拓き、近年では複数の種類の神経細胞の作製が報告されている。近年、多様な動物種における iPSC の作製が試みられており、馬においても部分的な成果が報告されている。馬は、グラスシックネスなどの神経症や運動ニューロン疾患を発症することが多く、馬 iPSC の作製は馬の再生医療のみならず、ヒトの ALS や進行性筋萎縮症の疾患モデルとして重要である。本研究では、ケラチノサイトにレトロウイルスベクターを用いて転写因子を導入し、馬 iPSC を作製した。5 ヶ月齢の子馬からケラチノサイト初代培養細胞を作製し、マウス転写因子遺伝子 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*Myc* を導入した。導入細胞をマウスフィーダー細胞上に播種し、ヒト bFGF 及び LIF 添加培養液にて培養した。フィーダー細胞を用いずに ALP 陽性コロニーを馬線維芽細胞培養上清にて継代し、6 株の iPSC を得、うち 3 株(K1、K2、K3)について性状解析を行った。3 株ともに内在性多能性マーカーである *OCT4*、*SOX2*、*NANOG*、*LIN28*、*DNMT3B* 及び *REX1* を発現し、導入転写因子によるリプログラミングが確認された。iPSC は低付着培養にて胚様体を形成し、染色により三胚葉性細胞が確認された。これらの分化多能性を確認するため、NOD-SCID マウスに移植し、形成されたテラトーマを組織学的に解析した結果、K2 株移植マウスにて内胚葉(肺及び腸管上皮)、中胚葉(軟骨、骨、筋)、外胚葉(ケラチン化上皮及び成熟ニューロン)への分化が確認された。K2 株をさらに神経系細胞へ分化誘導するため、ニューロスフェアを形成させ、神経細胞培養サプリメント添加無血清培養にて成熟ニューロンを形成させた。培養 3 日後から TUBB3、MAP2 及び前シナプスマーカーSYN1 の発現、またアセチルコリンエステラーゼの発現及びアセチルコリンの産生が認められた。さらに、パッチクランプ法にて活動電位の発生が検出されたことから、運動ニューロン様細胞への分化が確認された。本報告は馬 iPSC から機能的な細胞を誘導した初めての報告であり、馬の再生医療及び神経変性疾患の治療、獣医療における再生医療の発展に資すると考える。

【文献 26】**[129]**

The Current ‘State-of-Play’ of Regenerative Medicine in Horses: What the Horse Can Tell the Human.

Smith, R.K.W., Garvican, E.R., Fortier, L.A.

Regenerative Medicine (2014) 9: 673-685

馬における再生医療の最前線：ヒトが馬に学べること

（総説）

馬には疲労骨折や骨関節炎、腱の過進展損傷（over-strain injury）といった加齢性及び運動性の疾患が多発することから、馬はヒトの筋骨格系変性疾患の新たな治療法を検討するための優れたモデルとされている。これらの疾患に対する再生医療の応用は、規制の厳格なヒト医療よりも獣医療において研究が進んでいる。幹細胞の中でも間葉系幹細胞（MSC）は、骨、軟骨及び脂肪細胞への分化能を有し、馬の腱損傷をはじめ筋骨格系の損傷治療に広く使用されている。MSC は、骨髄や脂肪組織、臍帯血から分離・作製され、他に羊膜、滑液、腱からも MSC 始原細胞が分離されている。今後、馬においてもヒトの MSC と同様な特有の幹細胞マーカーの確立が必要である。MSC は多様な細胞集団から成り、その分化能は由来組織により極性があることが報告されており、治療に有利な細胞を選択することも可能と考えられる。損傷部位に移植された MSC は、傍分泌（パラクリン）作用による生理活性物質の分泌や宿主細胞への液性因子の供給をとおして治療効果を発揮する。MSC は細胞上の MHC クラス I 及び II の発現を抑制しているだけでなく、免疫抑制物質を分泌し、同種反応性 T 細胞の攻撃を免れることが示唆されている。また近年、ヒトにおいてマクロファージフェノタイプのスイッチングへの MSC の関与や、Toll 様受容体を介した抗炎症作用についての報告があり、MSC のこれらの免疫抑制作用も損傷治癒に寄与していると考えられる。一方、馬の腱損傷の治療では、幹細胞の定着、増殖の足場(scaffold)となるカーボン、ポリエチレン、ポリ乳酸等の生体工学材料の使用や、IGF-1、EGH、TGF-β、GDF-5 等の組換え成長因子や多血小板血漿の投与など、幹細胞そのものを用いない治療も試みられている。腱損傷の治療で移植された馬 MSC の追跡では、移植後 170 日まで損傷部位において分化能を維持した MSC の生存がごく少数ながら確認されている。胚性幹細胞は、骨髄由来 MSC に比べ損傷部における生存率が有意に高く、隣接組織への遊走も観察されている。競走馬における腱損傷の臨床試験成績の検証から、幹細胞療法が損傷の再発低減に有効であることが示された一方で、全ての関節疾患の治療に MSC が有効とは限らない。MSC 治療の有効性は、移植細胞による自然治癒メカニズムの活性化にあると考えられ、今後はその免疫修飾作用の研究や慢性炎症性疾患治療への応用も期待される。

【文献 27】**[130]**

Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage.

Aguiar, C., Therrien, J., Lemire, P., Segura, M., Smith, L.C., Theoret, C.L.

Equine Veterinary Journal (2015) 0: 1-8

馬に導入した人工多能性幹細胞のケラチノサイト系細胞への分化

（原著論文）

馬における四肢の皮膚損傷は慢性に転帰しやすく、また、移植用皮膚も入手困難である。近年、人工多能性幹細胞(iPSC)から分化したケラチノサイト(KC)のマウスへの移植試験において、多層上皮の形成を認め、また、Nagy らはウイルスを用いない PiggyBac システムによる馬 iPSC (eiPSC)の作製を報告している。本研究では、これらの知見を元に、eiPSC からケラチノサイト系細胞への分化を試みた。40 日齢の馬胎子から得た線維芽細胞に、PiggyBac トランスポゾンシステムにより山中因子及び緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した。コロニー形成した細胞のうち、多分化能マーカーである OCT-4、SOX-2、KLF-4、NONG の発現が確認された細胞を分離培養し、胚様体を形成させ、外胚葉形成因子（レチノイン酸(RA)及び骨形態形成タンパク質-4 (BMP4)）を順次添加した培養液にて接着分離培養した。接着細胞を KC 分化誘導培養液にて培養したところ、馬初代培養ケラチノサイト(PEK)に相似した多角形の敷石状形態を示す eiPSC-KC に分化した。eiPSC において汎サイトケラチンタンパク質(PANCK)は RA 及び BMP4 添加培養 7 日から発現し、30 日で 4.8 倍と PEK と同レベルのピークに達した。一方、未分化 eiPSC に発現していた多能性マーカーは、eiPSC-KC への分化誘導に従い消失した。ケラチン遺伝子(KRT)18 の発現は培養 7、14、30 日に、KRT14 は培養 7、14 日に有意に上昇した。層状表皮特異的マーカーである KRT10 及びインボルクリン遺伝子(IVL)は、分化誘導に従い発現し、有意に上昇した。フローサイトメトリーにより、30 日間の分化誘導培養後、eiPSC の 82.5%がケラチノサイト幹細胞マーカーであるケラチン 14 を発現し、PEK の 90.9%と同等であったことから、本試験により高純度の表皮基底幹細胞集団が得られたことが示された。eiPSC-KC 及び PEK のスクラッチアッセイ（scratch assay）では、96 時間で創傷部位は完全に細胞に覆われ、iPSC-KC の遊走能は PEK と同等であった。また、低カルシウム濃度において、PEK は 8〜9 回の継代後に静止期に入るのに対し、分化 eiPSC-KC は 35 回以上の継代を繰り返し、PEK より高い増殖能を示した。高カルシウム濃度では、eiPSC-KC は PEK に相似する扁平立方形態を示し、角質細胞の形成が示唆された。これらの結果から、eiPSC-KC は PEK と機能的に同等であることが示された。以上、eiPSC のケラチノサイトへの分化誘導が成立したことから、幹細胞に基づく皮膚構造の構築による損傷又は消失皮膚の再生の可能性が示唆された。

【文献 28】**[131]**

Expression and Localization of Epithelial Stem Cell and Differentiation Markers in Equine Skin, Eye and Hoof.

Linardi, R.L., Megee, S.O., Mainardi, S.R., Senoo, M., Galantino-Homer, H.L.

Veterinary Dermatology (2015) 26: 213-e47

馬の皮膚、眼及び蹄における上皮幹細胞あるいは分化マーカーの発現と局在

（原著論文）

上皮幹細胞(ESC)は重層上皮基底細胞層に存在し、組織の恒常性の維持、損傷後の再生及び移植組織の生着に重要な役割を果たす。幹細胞からは上皮前駆(transit amplifying, TA)細胞が分化し、さらに上皮細胞へと最終分化する。馬では、蹄葉炎を含む蹄疾患、角膜の損傷や疾患、皮膚の創傷や障害など上皮性疾患は臨床上重要であるにもかかわらず、上皮基底層細胞、とくに ESC 及び TA 細胞に関する情報は少ない。本研究では、馬の上皮組織における幹細胞及び TA 細胞、層状上皮における分化マーカーの発現と局在について詳細に検討した。馬の蹄(有毛部皮膚、蹄冠、葉状層)及び眼球(角膜、角膜縁)上皮組織を採取し、間接蛍光抗体法及び免疫ブロッティング法を用いて、ケラチンアイソフォーム(K3、K10、K14 及び K124)、転写因子 p63、リン酸化 p63 (pp63)を検出した。ケラチノサイトマーカーである K14 は、表皮では基底細胞層に限局して発現し、蹄有毛部皮膚、蹄冠及び角膜縁上皮の基底細胞層上層に漸減して検出され、角膜中心部には認められなかった。牛では角膜と角膜縁の双方に発現することから、角膜上皮の分化に種差が存在することが示唆された。K14 は馬の基底層マーカーであるが、単独では ESC マーカーとするには不十分であることが示唆された。K10 は多層上皮の顆粒層及び角質層マーカーであり、毛包間表皮の顆粒層及び角質層あるいは蹄壁外層に発現していた。K3 及び K76 を特異的に検出する AE5 単クローン抗体は、角膜縁上皮基底層以外の全ての組織で反応した。これらの結果から、K10 及び K3/K76 は、馬の有毛部皮膚、蹄冠及び蹄葉状層における基底層上層の顆粒層及び角質層の分化マーカーとなり得ることが示唆された。蹄葉状層の細胞骨格タンパク質 K124 と交差反応を示す H-87 抗インテグリン α6 抗体は、ケラチンの複数の分子量のバンドに反応し、複数の上皮組織細胞質に反応したことから、馬の汎上皮細胞マーカーと考えられた。ESC の増殖能を示す転写因子 p63 は、有毛部皮膚、蹄冠及び葉状層、角膜及び角膜縁の基底層及び基底層上層の細胞に局在した。pp63 は p63 陽性細胞に様々なレベルで発現し、pp63/p63 比は全ての馬上皮組織において基底層から上層に向かって上昇したことから、pp63 及び p63 の発現強度の比較により ESC 及び TA 細胞が区別可能と考えられた。本報告は、馬における組織特異的ケラチンマーカー及び ESC 細胞、TA 細胞の発現と局在についての初めての報告であり、これらの知見が馬における表皮及び角膜上皮細胞学及び再生医療研究を促進すると考える。

【文献 29】[132]

State of the Art: Stem Cells in Equine Regenerative Medicine.

Lopez, M.J. and Jarazo, J.

Equine Veterinary Journal (2015) 47: 145-154

最先端技術: 馬の再生医療における幹細胞

（総説）

幹細胞、バイオマテリアル、生理活性物質の 3 要素の組み合わせからなる再生医療は新たなパラダイムを提示し、医療に新たな選択肢を提供すると期待される。馬の臨床現場では、既に従来の治療法に加え再生医療が多く実施されており、その対象は主に筋骨格系組織の軟骨、腱/靭帯、骨、蹄葉、半月板であり、また皮膚や角膜も対象となる。治療に用いられる幹細胞は、成体の完全に分化した組織である脂肪、骨髄、末梢血、羊膜、羊水、臍帯組織、臍帯血、腱、筋、骨膜、角膜から得られ、より未分化な胚性及び胎子組織からも得られる。臍帯組織からは成体組織に比べより可塑性（plasticity）に富む増殖性の高い細胞が得られることが示されており、また、細胞の可塑性は個々のドナーによっても異なる。得られる幹細胞の形質は、由来となる組織や分離方法によっても異なる。多能性間質細胞(multipotent stromal cells, MSC)は組織から比重遠心法や酵素分解法、さらに接着性を利用して分離されるが、未だ確立された分離法はない。最適酸素分圧や細胞外基質といった組織特異的な最適培養条件の検討も今後必要と考えられる。ヒト MSC の定義の最低条件として、プラスチックへの接着性、特定の細胞表面抗原の発現、脂肪・骨・軟骨の 3 組織系細胞への分化能が提唱されており、近年ではそれに加え、特定の遺伝子やタンパク質の発現が必要とされている。馬においては、細胞の特性や、CD90 及び CD44 の発現、CD34 及び CD45 の非発現をもって MSC を特定しているが、種特異的抗体の不足もあり、最低基準は確立されていない。再現性のある結果を得るため、未分化細胞の厳密かつ一貫性のある同定基準の確立が必要である。米国では動物用生物学的製剤は、動物用医薬品として食品医薬品局(FDA)動物薬センター（Center for Veterinary Medicine, CVM）及び米国農務省（USDA）動物用生物学的製剤センター（Center for Veterinary Biologics, CVB）双方の監督下にある。今日、獣医療における幹細胞由来製品及びこれを用いた治療に対する規制はないが、将来的にはヒト再生医療製品に対する FDA の規制と同様な規制が課される可能性がある。英国においては、非食用馬における自己由来馬幹細胞の採取、保存、加工、製造及び投与は獣医学研究局（Veterinary Medicines Directorate, VMD）で規制されている。いずれにせよ、基礎実験から臨床への応用に際しては、安全性や有効性の確認が不可欠である。移植細胞の遊走性や生存期間、生理活性物質の分泌など機能を有する期間、個体や培養条件による免疫原性の多様性についても安全性の点から明らかにする必要がある。馬の再生医療を実現するために、今後も組織や器官の機

能的な再建への期待を原動力に集中的かつエビデンスーベースの研究の進展が望まれる。

【文献 30】**[133]**

Donor-Derived Equine Mesenchymal Stem Cells Suppress Proliferation of Mismatched Lymphocytes.

Ranera, B., Antczak, D., Millaer, D., Doroshenkova, T., Ryan, A, McIlwraith, C.W., Barry, F.

Equine Veterinary Journal (2015)

ドナー由来馬間葉系幹細胞は MHC 不適合リンパ球の増殖を抑制する

（原著論文）

近年、馬の筋骨格系障害に対する間葉系幹細胞(MSC)治療の有効性が多数報告されている。自己 MSC は主に関節軟骨の修復や腱損傷の治療に用いられており、実験的関節腔内投与では、自己 MSC の分離・培養に要する 4 週間後の治療開始でも、関節軟骨の修復に有効であることが示されている。損傷治癒には早期治療が有効であることから、診断後に速やかに使用可能な同種他家 MSC (allo-MSC)の利用が期待されており、その有効性及び安全性の評価が必要である。MSC の生体内での効果は細胞から分泌される栄養因子（trophic factor）よるものとされている。また、MSC の免疫修飾作用と自身の免疫原性の喪失(MHC-II 分子と CD86 抗原の非発現)が、移植の効果に影響する宿主免疫系に有用な作用を及ぼす。馬の白血球型抗原(ELA)は 8 種の主要型から成り、ヒトの HLA タイプやマウスの H2 システムよりも複雑である。本研究では、allo-MSC の臨床応用を目的に、骨髄由来(BM-)MSC が MHC 不適合リンパ球及び T 細胞サブセットに及ぼす影響を *in vitro* にて検証した。コネマラ種 3 頭、サラブレッド 3 頭の血液 DNA からそれぞれの MHC ハプロタイプを決定した。MHC 遺伝子内の 5 ヶ所のマイクロサテライト領域に計 11 のハプロタイプが同定され、コマネラ種とサラブレッド、さらに同血統内においても不適合であった。コマネラ種(ドナー) 3 頭の骨髄から BM-MSC を分離培養し、3 回継代した後、骨、脂肪、軟骨の 3 系統への分化能を確認した。サラブレッド(レシピエント) 3 頭の末梢血単核球(PBMC)を phytohemagglutinin（PHA）で刺激して T 細胞を増殖させ、コマネラ種 3 頭の BM-MSC と 500:1～10:1 の比で共培養し、BM-MSC の T 細胞増殖抑制効果を測定した。リンパ球は 5-(and -6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester（CFSE）で蛍光ラベルし、増殖をモニターした。リンパ球の増殖は MHC 不適合 BM-MSC との共培養で細胞比依存的に抑制され、10:1 の場合に最も強く抑制された。自己 BM-MSC 及び MHC 不適合 BM-MSC との共培養でリンパ球増殖抑制に差は認められず、抑制作用は MHC 非依存性であることが示唆された。$CD4^+$及び $CD8^+$細胞群は減少し、特に $CD8^+$細胞は有意に減少した。$CD4^+/CD8^+$細胞は対照(PHA 刺激細胞群)と同程度であった。以上の結果より、馬の骨格系障害治療のための allo-MSC の臨床応用の可能性が示唆された。

【文献 31】**[134]**

Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an LPS induced synovitis model.

Williams, L.B., Koenig, J.B., Black, B., Gibson, T.W.G., Sharif, S., Koch, T.G.

Equine Veterinary Journal (2015)

馬同種臍帯血由来間葉系間質細胞は LPS 誘導性滑膜炎モデルにおいて滑膜液有核細胞数を減少させ、軽度の自己限定的な炎症を惹起する

（原著論文）

滑膜関節（synovial joints）の炎症性障害では、跛行、関節滲出液、滑膜液細胞数の増加、炎症性細胞群の変化や滑膜液総タンパク質の増加が見られる。軟骨損傷では、炎症性反応の連鎖が軟骨細胞の消失や軟骨基質の枯渇及びタイプ II コラーゲンの分解を引き起こす。間葉系間質細胞(MSC)は、骨、軟骨、脂肪の 3 組織系細胞への分化能を有し、炎症性細胞に対する増殖抑制効果及び抗炎症作用といった免疫修飾作用を有することが示されている。馬、イヌ及びヒトの関節損傷治療において MSC の関節腔内(i.a.)投与の臨床的有用性が報告されているが、その効果が発現する機序は明らかでない。また、馬の臍帯血由来(CB)-MSC の生体内における免疫修飾作用についても明らかにされていない。本研究では、馬のリポ多糖(LPS)誘導性滑膜炎モデルを用い、同種 CB-MSC i.a.投与の炎症性反応抑制効果について検証した。実行可能性調査として、馬 6 頭を供試し、LPS 又は CB-MSC を各 3 頭、それぞれ手根中央関節（middle carpal joint）に i.a.投与し、滑膜液を経時的に採取、炎症性反応について測定した。LPS 投与では中程度(中央値: グレード 3、範囲 2-3)の跛行が一過性に観察され、投与後 8 時間で滑膜液中の総有核細胞数(TNCC)、総タンパク質濃度、好中球数は有意に増加した。CB-MSC は事前に作製し、凍結保存したものを使用した。CB-MSC 3×10^7 個の i.a.投与では 2 頭の跛行は軽度(グレード 1 及び 2)、1 頭は重篤(グレード 4)で、24 時間継続し、投与後 48 時間で消失した。滑膜液中の TNCC 数及び好中球数は投与後 8 時間、総タンパク質は 48 及び 72 時間で増加し、滑膜炎と跛行との相関は認められなかった。LPS 及び CB-MSC の手根中央関節への同時投与では、投与 8 時間で全頭に跛行が見られ、滑膜液中の TNCC、好中球及び単球数数は、対側の LPS 投与肢に比べ有意に減少した。以上の結果から、同種 CB-MSC の i.a.投与により滑膜液細胞数は減少し、軽度の自己限定的な炎症反応が誘導された。今後、i.a.投与 CB-MSC 治療の抗炎症作用及び炎症誘発作用について、用量、治療のタイミング、及び治療頻度等の評価が必要と考える。

【文献 32】**[135]**

Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine.

Ribitsch, I. Burk, J., Delling, U., Geißler, C., Gittel, C., Jülke, H., Brehm, W.

Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (2010)123: 219-263

獣医療における幹細胞の基礎研究及び臨床応用

（総説）

幹細胞療法は、獣医療において重要な役割を担い、ヒト医療における将来的な幹細胞応用のモデルとしても注目されている。しかし、マウス以外の動物の胚性幹細胞作製は、未だ十分に基準を満たす成果は得られていない。一方、成体幹細胞では、馬の腱障害に対する間葉系幹細胞(MSC)療法のように既に実用化されたものもある。本稿では、獣医療における MSC の基礎科学と臨床応用について概括する。MSC は成体組織から分離され、骨、軟骨、脂肪及び筋などの間葉系組織に分化可能な、自己複製能力を有する未分化の細胞集団である。MSC は増殖分化により特定の組織を再生修復するのみならず、成長因子や抗アポトーシス因子、走化性因子などの生理活性タンパク質を分泌し、新たな MSC を動員する。MSC の分離には、現在、骨髄が最も多く用いられ、マウス、ラット、ウサギ、馬、イヌ、ネコ、豚、牛など多様な動物種からの MSC 分離が報告されている。末梢血は採取が容易であるが、MSC は他組織由来のものと比べ分化能が低い。臍帯血由来 MSC は最も分化能が高いが、採取機会が限られる。現在、動物では馬の臍帯血バンクが存在し、将来の再生医療利用に有用と考えられる。固形組織では脂肪組織が最も多く研究されており、脂肪由来 MSC のイヌ及び馬の骨関節炎、腱及び靭帯損傷における臨床応用が実用化されている。臍帯組織、滑膜、歯根膜、皮膚、筋、脳、関節液、腱、骨膜からの分離も試みられているが、それぞれ分化能や自己複製能力に限界があるなど、臨床利用には課題が残されている。成体 MSC 移植では、低免疫原性や宿主 T 細胞及び樹状細胞、リンパ活性抑制と移植片の生残が認められており、MSC の抗炎症作用及び損傷治癒効果が示唆される。これらの作用に自己及び同種 MSC の差異はなく、MSC が分泌する液性因子が免疫抑制的環境を造ると考えられる。また、MSC はケモカイン受容体を発現し、損傷部位に自ら遊走し、再生治癒能力を発揮することが示されている。獣医領域における幹細胞療法は、MSC を用いて、特に馬及び伴侶動物における腱損傷、骨関節炎、骨再生、脊髄損傷などの整形外科領域にて実用化が進んでいる。さらに、人工多能性幹細胞の作製も試みられており、動物で得られた知見が今後、ヒトの再生医療において重要な役割を果たすことが期待される。

【文献 33】**[136]**

Migratory Properties of Mesenchymal Stem Cells.

Dittmar, T., Entschlade, F.

Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (2013) 129: 117-136

間葉系幹細胞の遊走能

（総説）

成人の細胞のうち、自律的遊走能を有する細胞は、白血球、線維芽細胞、幹細胞及びがん細胞のみである。間葉系幹細胞(MSC)の遊走は、がん細胞と共通して、ケモカインに強く誘導される。骨髄由来 MSC の多くは細胞表面に CXCR4、CXCR6、CXC3CR1、c-met を発現し、SDF-1α や HGF に強く反応して損傷組織に遊走する。同様に心筋の虚血/再灌流障害では、MCP-1/CCL2 と CCR2 の相互作用を介して MSC が動員される。この相互作用はまた、初代培養乳がん細胞に対する MSC の遊走でも認められる。放射線照射マウス乳がん細胞 4T1 では、TGF-β1、VEGF、PDGF-BB といった増殖因子の発現増強が認められ、また神経膠腫細胞は VEGF、TGF-β1 に加え、IL-8、NT-3 を分泌する。これらの細胞に暴露した MSC は CCR2 の発現が増強され、MCP-1/CCL2 と CCR2 のシグナル経路を介して動員される。腫瘍に集積した MSC は腫瘍の増殖を抑制する。MSC と共培養した肝細胞がん細胞では Bcl-2、c-Myc、PCNA の発現が抑制され、細胞増殖の抑制及びアポトーシスの亢進が認められた。同様に、乳がん細胞における NFκB 及び p-IκBα 発現抑制や、Wnt 経路阻害、細胞周期停止因子の亢進等、MSC 誘導性の腫瘍増殖抑制が報告されている。一方で、MSC が腫瘍の増殖、転移を促進するという報告もある。乳がん細胞の刺激により MSC が CCL5/RANTES を分泌し、その傍分泌作用で乳がん細胞の浸潤、転移が促進される。さらに MSC のエストロゲン受容体を介した腫瘍増殖効果や、がん始原細胞の維持への関与も報告されている。また、MSC そのものの腫瘍化や、免疫抑制効果による腫瘍増殖促進の報告もある。このように相反する腫瘍増殖抑制/促進効果の報告があるものの、MSC の腫瘍向性を利用した『トロイの木馬』としての新たな抗がん治療への応用が検討されている。すなわち MSC を、IFN-β、IL-2、IL-12 といったサイトカイン、TNF 関連アポトーシス誘導リガンド TRAIL、腫瘍溶解性ウイルス等の抗腫瘍因子を腫瘍内部に送達する乗り物として用いる。腫瘍内部に集積した MSC はこれらの抗腫瘍因子を発現し、腫瘍の増殖や転移を抑制する。一方、これらの抗腫瘍因子産生 MSC は、アデノウイルスやレトロウイルスなどを用いて遺伝子導入したものであり、免疫原性やランダムな遺伝子挿入による発がん性のリスクがある。アデノ随伴ウイルスやヒト人工染色体(HAC)ベクターは、この欠点を克服する新たな手法である。MSC の遊走能を利用した新たな抗腫瘍治療の進展が期待される。

【文献 34】**[137]**

IL-12 based gene therapy in veterinary medicine.

Pavlin, D., Cemazar, M., Sersa, G., Tozon, N.

Journal of Translational Medicine (2012) 10: 234

獣医領域における *IL-12* による遺伝子治療

（総説）

遺伝子治療とは、ターゲットとなる細胞に特定の遺伝子を導入して、遺伝疾患を治療したり、疾病の治癒に有効な物質の産生や機能の付与を目的とした治療法である。ヒトの遺伝子治療のための基礎的研究には実験小動物も用いられるが、イヌ、ネコ、馬等の動物は伴侶動物としてヒトと同じような環境で飼育されていること、また、解剖学的・生理学的にも実験小動物よりはヒトに近いこと、実験小動物より寿命が長く発がんリスクの高い年齢の動物を得やすいことなどから、腫瘍学の研究に有用な実験動物である。インターロイキン-12（IL-12）は NK 細胞刺激因子、細胞障害性リンパ球成熟因子として発見されたサイトカインで、T 細胞や NK 細胞の増殖を促進し、細胞障害活性やインターフェロン γ（IFN-γ）産生を誘導する作用を持っている。IL-12 によって産生が誘導された IFN-γ は、MHC クラス I 分子の発現を増加させることにより腫瘍細胞の認識能を増強し、腫瘍組織での血管形成や転移を抑制する。そこで、組換え IL-12 を用いた腫瘍治療の前臨床試験が行われたが、低用量でも強い毒性がみられた。このため、組換えタンパク質の投与ではなく *IL-12* 遺伝子の導入によって IL-12 を腫瘍組織に作用させる手法が試みられている。イヌ、ネコ、馬等を用いた腫瘍治療の実験では、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入及びウイルスを使わない導入の両方が試みられている。ネコでは、軟組織肉腫にアデノウイルスベクターを用いたマウスあるいはネコ *IL-12* の直接注入が 1 例報告されている。馬では、転移メラノーマ組織へのヒトあるいは馬 *IL-12* 挿入プラスミドの直接注入が 3 例試みられており、イヌでは伝染性性病腫瘍症例等でのヒトあるいはネコ *IL-12* の電気穿孔法（エレクトロポレーション）による腫瘍組織あるいは筋肉内への遺伝子導入が試みられている。これらのイヌ、ネコ、馬等の自然発生腫瘍の *IL-12* 遺伝子治療の試みはおおむね好結果を示している。すなわちウイルスベクター使う導入でもそれ以外の方法でも、また注入部位が腫瘍内でも筋肉内投与による全身性の遺伝子供給でも、その有効性が確認されている。被検動物に対する安全性も確認されている。以上のことから、*IL-12* を基本とした腫瘍の遺伝子治療は、イヌ、ネコ、馬等における治療法として有望であるのみならず、ヒトにおける遺伝子治療法開発への重要な情報となる。

【文献 35】**[138]**

Mammary Stem Cell Research in Veterinary Science: An Update.

Borena, M.M., Bussche, L., Burvenich, C., Duchateau, L., Van de Wall, G.R.

Stem Cells and Development, 2013, 22(12): 1743-1751

獣医科学における乳腺幹細胞研究の最新情報

（総説）

乳腺は、増殖、泌乳、退縮のサイクルを繰り返す極めて再生能に富む器官である。マウス乳腺組織の限界希釈移植実験により、自己複製能と多能性を持つ細胞、乳腺幹細胞(MaSC)の存在が示唆され、乳腺再生サイクルにこの MaSC が関与すると考えられる。最近の研究では、乳腺組織に 2 種類の単分化性始原細胞が存在すること、また、ヒト乳汁中にも多能性間葉系幹細胞が存在することが示唆されている。一方、ヒトや肉食動物には乳がんが発生するのに対し、牛、馬、羊、豚、旧世界猿のマカクでは極めて稀であるなど、乳腺には動物種による多様性が認められる。これらの動物種の乳腺に関する情報は少なく、また適切な幹細胞マーカーがないため、MaSC の検出には組織免疫染色法や DNA の染色やラベリング、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)-1 発現を目印にしたフローサイトメトリーや組織染色を行う。さらに、乳腺組織からマンモスフェア(乳腺前駆細胞塊)を分離・培養し、自己複製能や、管腔上皮細胞(CK8、CK18、CK19、ESA、MUC-1 陽性)及び基底筋上皮細胞(CK5、CK14、平滑筋アクチン、ビメンチン陽性)への分化能を検証する必要がある。牛の MaSC は、泌乳量の増加と乳房の健康向上、乳がんの発がん予防因子の発見を目的に研究が進められた。近年、牛の乳腺には CD24 及び CD49f の発現の有無から、推定幹細胞、推定始原細胞、基底細胞及び管腔細胞の 4 種類の細胞集団が存在すること及びそれらの細胞分化における階層性が示唆されている。イヌ・ネコの雌に乳がんの発生は多く、乳腺研究は主にヒトの乳がん組織に高い確率で存在するがん幹細胞(CSC)の探求を目的としている。イヌの正常乳腺組織からは、マンモスフェア形成、自己複製能及び多分化能を有する MaSC が分離されている。また、CD49f、CD33、p21、CK14、CD29 及びヒトの CSC マーカーである CD44 を発現する CSC が分離されている。ネコでは、CSC と見なされる乳がん株化細胞に CD44、ER-α、EGFR の発現が確認されている。馬の正常乳腺組織から分離した MaSC はマンモスフェアを形成し、その細胞は CD29、CD44、CD49f 及びカゼインキナーゼ 2β 陽性で、管腔上皮細胞及び筋上皮細胞に分化した。以上のように、マウス及びヒト以外の動物種では、MaSC 及び CSC の適切な細胞マーカーが存在せず、また幹細胞の呼称も統一されていないなど様々な問題が存在するが、獣医領域の乳腺研究はがん治療薬や基礎研究のモデルとしてもその発展が期待される。

【文献 36】**[139]**

Stem Cell Therapy without the Cells.

Maguire, G.

Communicative & Integrative Biology (2013) 6: 6, e26631

細胞を含まない幹細胞療法

（総説）

幹細胞療法の進展は著しく、近年は自己及び同種成体幹細胞が心筋症、痴呆症、組織損傷、免疫関連疾病等、様々な疾病の治療に応用されている。成体幹細胞はほとんどの体組織に存在し、細胞分裂と分化により組織の再生・修復を担う。一方、近年の研究から、移植された成体幹細胞の組織修復機能は、単に増殖・分化だけでなく、パラクリン（paracrine、傍分泌）及びオートクリン（autocrine、自己分泌）因子の分泌が重要であることが明らかになってきた。成体幹細胞の治療効果の 80%はパラクリン因子の作用であるとの報告もある。幹細胞から放出されるこれらの因子は、セクレトーム（celectome）又は幹細胞由来因子(SRM)と呼ばれ、タンパク質、マイクロ RNA、成長因子、抗酸化分子、プロテアソーム（proteasome）、エクソソーム（exosome）等、100 種類にも及び、種々の生物学的経路を標的とする。SRM の組成は細胞の種類や、年齢、環境等の状態に依存する。成体幹細胞のパラクリン作用として次のものが挙げられる: 1) 抗菌作用、2) 分化細胞から始原細胞へのスイッチング、3) Wnt シグナルによる幹細胞ニッチ形成のコントロール、4) 細胞外マトリクス(ECM)の構築、5) 免疫システムの制御、6) 損傷治癒、7) 骨再生、8) 腹圧性尿失禁の回復、9) 機能的腸管組織の再生、10) 外傷性脳損傷からの回復促進、11) エクソソームの放出など多様な治療効果、12) 異常構造タンパク質分解のためのプロテアソーム放出。このように、幹細胞自体ではなく SRM を治療に応用することには多数の利点がある。移植された幹細胞が損傷部位に到達するかは不明であるが、SRM は損傷部位への直接投与や、投与量の調整も可能である。また、SRM は制御された実験室環境下で、多様な細胞から、必要な組成のものを得ることが可能である。無秩序な ECM の構築は損傷治癒とがんに共通して認められるが、これも SRM によって制御可能である。胎児の外科的手術では瘢痕が残らず、完全に修復された ECM が観察されるが、これには胎児組織固有の始原状態が関与していると考えられる。胎児の始原組織に見られるような分子構成による SRM 療法を開発することにより、ECM が関与するがんなどの疾病の治療につながると考える。

【文献 37】**[140]**

Stem cell research: A novel boulevard towards improved bovine mastitis management.

Sharma, N., Jeong, D.K.

International Journal of Biologocal Sciences (2013) 9(8): 818-829

幹細胞研究: 新しい牛乳房炎治療への道

（総説）

牛乳房炎は多様な要因によって発生する乳腺の炎症で、乳房腺組織の傷害によって牛乳の品質及び生産量の低下をもたらす。乳房炎の発生率非常に高く、特にアジア地域で多く発生しているといわれている。牛乳房炎の治療は難しく、乳房炎症例のおよそ半数は黄色ブドウ球菌によるものであるが、抗生物質投与による黄色ブドウ球菌性乳房炎の治癒率はおよそ 15%にすぎない。乳房炎の高い発生率と低い治癒率から、これによる経済的損失は非常に大きい。このため、より効率的な牛乳房炎の予防・治療法の開発が望まれている。特に、乳腺組織の線維化のような炎症後の構造的なダメージを回復させる有効な治療法はないため、成体由来幹細胞や前駆細胞を利用した乳腺組織の再生法確立への期待が高まっている。損傷を受けた組織の修復に応用するため、多くの研究者が成体幹細胞の効率的な増殖法や希望する細胞への分化誘導法に開発に取り組んでいる。このため、ヒトやマウスの乳腺幹細胞や前駆細胞に関する情報はかなり蓄積してきたが、その他の動物種においては乳腺幹細胞や前駆細胞に関する研究成果は少ないのが現状である。成動物の乳腺上皮は、乳を分泌する管腔上皮細胞と基底膜に接した筋上皮細胞から構成されている。興味深いことに、乳腺を構成するこれらの細胞種は外胚葉由来の 1 種類の始原細胞に由来しており、さらに乳腺組織局所の微環境が幹細胞や前駆細胞の管腔上皮細胞や筋上皮細胞への分化誘導に関与している。管腔／分泌上皮細胞はサイトケラチン（CK）18、CK19、CK7 及び CK8 を発現しており、筋上皮細胞は CK14、CK5、CK17 及びα平滑筋アクチンを発現している。乳腺では生涯を通して幹細胞／前駆細胞の機能的階層が維持されており、未分化の幹細胞から分化の最終段階である管腔上皮細胞や筋上皮細胞までの多様な細胞が存在している。すなわち、乳腺幹細胞（MaSC）が単能性の管腔上皮前駆細胞に分化し、これが腺胞の筋上皮細胞と乳分泌細胞へと分化する。最近の研究で、牛の MaSC や前駆細胞の分離、特性解析等が進んできた。ヒトやマウスで蓄積された情報の活用と、牛での研究の進展が、幹細胞や前駆細胞を使った乳房炎により障害を受けた乳腺組織の修復法の開発につながるであろう。

【文献 38】**[141]**
Toward ovine iPSC.
Bruce, C., Whitelaw, A.
Cellular Reprogramming (2013) 15: 385-388
羊 iPSC の樹立へ向けて

（総説）
幹細胞は、自己複製能と多能性という 2 つの特徴を持つ。人工多能性幹細胞(iPSC)は、山中因子すなわち *OCT4*、*SOX2*、*KLF4* 及び *c-MYC* の 4 因子を体細胞に導入することで作製される。多能性は主に、胚様体及びヌードマウスに形成したテラトーマにおける内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉のマーカー遺伝子又は分子の検出により証明される。iPSC の作製は初めにマウス、次いでヒト及びラットにおいて成功したが、家畜の iPSC 作製の試みは大きく遅れを取っている。家畜の中では豚が最も成功しており、iPSC を胚盤胞に導入してキメラ豚を作製し、生殖細胞への分化にまで至っている。その他、牛、馬、羊でいくらかの進展が見られている。羊の iPSC 作製は複数のグループから報告されている。Li らは、羊胎児線維芽細胞にレンチウイルスを用いて山中因子を導入し、コロニーを生成し、ノックアウト血清代替物(KSR)添加培養液にて培養した結果、4 因子に加え自己 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 及び *SSEA-4* の発現を確認し、加えて、胚様体及びテラトーマに三胚葉の形成を確認した。Bao らは同様に、山中 4 因子に加えて *Nanog*、*Lin28*、SV40 ラージ T 及びヒトテロメアーゼ逆転写酵素遺伝子を導入し、KSR 添加 DMEM 培養液にて培養後、染色法にて AP、Oct4、Sox2、Nanog、SSEA-1、Tra1-60、Tra1-81 の抗原発現を確認し、組織学的に三胚葉の形成を確認した。オーストラリアのグループはレトロウイルスベクターを用いて山中因子を導入し、FGF 添加培養液にて培養した。得られた胚様体及びテラトーマ細胞は *Oct4* 及び *Sox2* を発現したが、導入遺伝子の発現は抑制されていた。著者らのグループも同様の系で導入遺伝子の部分的発現抑制を経験した。これらの報告では導入因子や培養条件に若干の相異がありつつも、マーカー遺伝子や抗原の発現及びテラトーマに三胚葉への分化が確認されたことを多能性の証明とし、iPSC 成功としている。さらに、著者らは iPSC からキメラ個体を作製し、今後、体細胞核移植のドナー細胞として用いることを計画している。以上のように、羊の iPSC の作製法や多能性マーカーは、マウスやヒトのように確立していない。動物の幹細胞は、新たな細胞医療の促進や安全性の検証におけるモデルとして期待されており、今後、多能性因子の確立に向けてさらなる研究が必要と考える。

【文献 39】**[142]**

Mammary stem cells: expansion and animal productivity.

Choudhary, R.K.

Journal of Animal Science and Biotechnology (2014) 5: 36-43

乳腺幹細胞: 増殖と動物の生産性

（総説）

乳生産動物の乳腺幹細胞(MaSC)と前駆細胞の研究は、乳腺形成、組織のターンオーバー、泌乳持続性等の解明や再生医療に重要であり、乳生産性の向上につながることが期待される。MaSC は多能性を有し、増殖分裂して管腔細胞及び基底/筋上皮細胞に分化するとされてきたが、近年、二分化能又は単分化能を有する細胞の存在も示唆されている。MaSC は研究初期には染色法や形態により組織学的に検出され、現在、ヒトやマウスでは細胞マーカーの同定も進んでいる。牛では Ki-67、CD24、CD49f といった抗原の発現の強弱により、MaSC、二分化性基底前駆細胞、単分化性管腔前駆細胞及び単分化性管腔細胞に区別される。OCT4、SOX2、NANAG は新たな多能性因子とされているが、MaSC/前駆細胞の多能性マーカーとしては未検証である。山羊では、サイトケラチン(CK)を発現する管腔細胞及び基底/筋上皮細胞が報告されていたが、泌乳期の腺房内に CK を発現しない未分化細胞の存在が示唆され、山羊の MaSC/前駆細胞と考えられた。これらの細胞は NOD/SCID マウスへの移植や *in vitro* のコロニー形成アッセイから、MaSC/前駆細胞とされている。MaSC の増殖により、細胞ターンオーバーの促進及び組織再生と泌乳活性が促進されると考えられる。内因性のエストロゲン、プロゲステロン及び牛成長ホルモン(bST)、外因性の成長ホルモン、キサントシン及びイノシンは、MaSC 及び前駆細胞と乳腺上皮細胞を増数することが報告されている。また、マウスでは妊娠に関連して腺房の終末細管に経産誘発性(PI-) MaSC が見られ、経産動物では未経産動物に比べ多数の PI-MaSC が管腔上皮内に存在することが報告されている。キサントシンやイノシンは泌乳持続期間の延長に関与するとの報告もある。乾乳期は乳腺上皮細胞の再生のために必須であるが、bST 存在下で 60 日間の乾乳期間を 30 日間に短縮しても乳腺上皮の再生や次乳期の乳量や成分には影響がないとされる。経産牛への bST の投与で細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現が 3 倍に増加したとの報告もある。以上の様に、MaSC/前駆細胞の増殖を促進し、細胞のターンオーバーの促進や泌乳持続期間の延長、乾乳期の短縮が乳生産性を向上する可能性があり、今後の MaSC/前駆細胞の乳腺組織での役割の検証が望まれる。また、乳汁中の MaSC は非侵襲的に回収可能な MaSC として有望であり、今後の研究の進展が期待される。

【文献 40】**[143]**

Stem Cells and Regenerative Medicine in Domestic and Companion Animals: A Multispecies Perspective.

Gonçalves, N.N., Ambrósio, C.E., Piedrahita, J.A.

Reproduction in Domestic Animals (2014) 49: 2-10

家畜及び伴侶動物における幹細胞及び再生医療: 多様な動物種における展望

（総説）

多能性幹細胞は、多分化能を維持しながら自己複製能を有する細胞と規定される。中でも胚性幹細胞(ES 細胞)は、1981 年にマウスにて初めて作製され、1998 年にはヒトでの作製が成功し、精力的に研究が進められてきた。家畜や伴侶動物では、豚、牛、馬、イヌ、ネコで作製が試みられた。1990 年には豚の胚盤胞から分離した細胞を三胚葉にまで分化させた。牛では、多能性マーカーを発現する ES 細胞様細胞を作製しヌードマウスに奇形腫を形成させたとの報告があるが、いずれもキメラの生成にまでは至っていない。ネコでは多能性マーカーを持った ES 細胞様細胞が胚様体を形成し心筋細胞に分化したが、未分化状態での継代維持はできなかった。馬では、胚盤胞から分離した ES 細胞様細胞を牛臍帯由来細胞上で培養し、56 代までの継代と、多能性マーカーの発現及び神経前駆細胞、上皮細胞、造血系細胞への分化を確認した。イヌでは、胚盤胞から LIF 及び FGF 添加培養にて作製した ES 細胞は、多分化能マーカーの発現、長期継代、ヌードマウスに奇形腫を形成等、キメラ生成以外の全ての ESC 基準を満たした。以上のように、マウス及びヒト以外の動物種における ES 細胞の作製は困難であることから、再生医療に用いる幹細胞研究の対象は成体体細胞由来幹細胞にシフトした。中でも、骨髄及び脂肪組織由来の間葉系幹細胞(MSC)は採取が容易であることから最も多く用いられている。2013 年の国際細胞治療学会の基準では、MSC 細胞マーカーは CD70、CD90 及び CD105 陽性、CD34 陰性とされたが、現在では MSC は CD34 陽性細胞を含む多様な細胞集団であるとの認識から、新たな基準の策定が議論されている。獣医領域においても、それぞれの動物種における MSC マーカーの報告がなされており、臨床応用の観点から MSC の基準の確立が必要である。一方、ES 細胞や MSC のような多分化能を持たない単分化能幹細胞も再生医療の臨床材料として期待されている。イヌの尿失禁に対する自家筋衛星細胞の注入で、括約筋機能の再生が報告されている。軟骨細胞の 3 次元培養では軟骨及び骨の再生が認められ、整形外科材料として有望である。最後に、人工多能性幹細胞(iPSC)は、成体細胞に転写因子 *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*C-myc* を導入し、ESC 様の幹細胞を作製する技術である。これまでに、アカゲザル、牛、ウサギ、羊、豚、馬、イヌといった動物種で iPSC の作製が報告されており、レトロウイルスベクターやがん遺伝子を用いない方法も模索されている。多様な動物種での研究の進展は、ヒトのモデルや材料としてだけでなく、獣

医領域における再生医療の発展にもつながると期待される。

【文献 41】**[144]**

From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals.

Koh, S., Piedrahita, J.A.

Theriogenology (2014) 81

ES 様細胞から人工多能性幹細胞へ：家畜における歴史的視点

（総説）

多能性幹細胞は自己複製能と多能性を特徴とする。胚性幹細胞(ESC)は、再生医療だけでなく遺伝子改変動物を作製する材料としても期待され、マウスで樹立されて以来、家畜においても様々な幹細胞の作製が報告されたものの、安定的かつ長期的に培養可能で、生殖細胞を含む多様な細胞系列に分化可能な真の ESC はげっ歯類以外では未だ樹立されていない。一方、近年樹立された人工多能性幹細胞(iPSC)は、形態学的にも、自己複製能及び分化多能性も ESC と相同であり、現在、マウスのみならずヒト、アカゲザル、ラット、豚、イヌ、牛、馬の iPSC が樹立されている。豚は、生体サイズや生理機能がヒトに近いことから前臨床研究のモデルとして広く使用され、異種臓器移植のドナーとしても期待される。そのため、豚 ESC の作製には多くの努力が注入されたが真の ESC の樹立には至らなかった。一方、豚 iPSC は既に複数の細胞株が樹立されている。これらはアルカリホスファターゼの発現や OCT4、SOX2、NANOG といった多能性コアマーカーの発現に関しては共通しているが、その他の表面抗原の発現パターンには多様性があり、作製に用いた手法や導入因子、抑制因子の多様性が影響すると考えられる。ほとんどの豚 iPSC において胚様体の形成及びテラトーマの形成は確認されているが、キメラ胚の作製率は極めて低く、移植しても死産又は生後すぐの死亡となり、何らかのエピジェネティックな障害が生じていると考えられる。また、外来転写因子のサイレンシングが不完全なため、体細胞核移植のドナー細胞として不適性であった。イヌは、ヒトと同様にアルツハイマー病や角膜変性、筋ジストロフィー、糖尿病などの遺伝子疾患が存在することから、イヌの iPSC は細胞移植等の治療法の検討やヒトの疾病モデルとして期待される。イヌの iPSC も豚と同様に、細胞表面マーカーに多様性があり、外来転写因子のサイレンシングが不完全である。胚様体の形成は報告されているが、テラトーマに関しては少なく、SCID マウスへの移植で胚細胞腫瘍の形成が報告されている。牛の iPSC も同様に、外来遺伝子のサイレンシング、キメラ形成、生殖細胞伝達、染色体の安定性など、未だ解決すべき点が残されている。外来遺伝子導入による DNA の損傷や細胞増殖時の複製により、iPSC には遺伝的不安定性が存在することが報告されており、今後の課題である。マウスにおける ESC 初樹立以降、30 年以上が経過したが、家畜の生殖細胞に匹敵する ESC は未だ樹立されていない。iPSC 研究の進展により ESC 技術も向上しており、今後の研究発展

が期待される。

【文献 42】**[145]**

Adipose Tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine.

Arnhold, S., Wenisch, S.

American Journal of Stem Cell, 2015, 4(1): 1-2

獣医療における筋骨格系修復のための脂肪組織由来間葉系幹細胞

（総説）

脂肪組織由来幹細胞(ASC)は、多様な脂肪組織から得られる間葉系幹細胞である。採取が容易で細胞数が多く、細胞工学的に主に骨格系組織の修復に用いられる。獣医領域では、マウス、ラット、ウサギ、豚の ASC がヒトのモデルとして研究対象となってきたが、近年、馬及びイヌの再生医療において ASC の実用化が進んでいる。ASC には多能性に関連する幹細胞マーカーが発現し、馬では Oct4 及び Nanog、イヌでは Oct-4、Nanog 及び SOX2 と異なる。ASC は特定の環境下で培養することにより、様々な細胞に分化する。馬、イヌともに脂肪、骨、軟骨組織の生成能を有することが、組織染色及び遺伝子発現により確認されている。馬ではさらに、腱組織への分化能が引張応力及び組織学的検査、COMP 及び Scleraxis 等の腱マーカー遺伝子発現により示されている。間葉系幹細胞(MSC)の筋骨格系組織への分化能から、特に馬における組織工学的及び再生医療への応用が期待される。競走馬は軟骨の障害や変成、骨折、腱障害を来すことが多く、完治には長期間を要する。MSC の組織工学的応用により、早期治療や完全な組織再生への期待が高まっている。馬の屈腱炎の治療に、ASC に加え、脂肪組織由来単核細胞と呼ばれる細胞分画や、コラーゲン分解酵素含有ゲル、血小板濃縮血漿などを同時注入した試験で、安全性及び臨床、組織学的成績の向上が認められている。小動物では、イヌをモデルとしてヒトの中枢あるいは末梢神経損傷及び心筋症、あるいは整形外科の研究が進み、獣医療としては骨関節炎治療に ASC が利用されている。股関節や腕橈関節の骨関節炎に ASC を含む間質血管細胞分画(SVF)を注入した結果、跛行、疼痛及び可動域の有意な改善が認められている。さらに、事故あるいは腫瘍や嚢胞除去後の骨欠損への応用も進んでいる。ASC に加え SVF 等の細胞分画は、各種サイトカインや成長因子の分泌による免疫修飾能も注目されており、他家由来細胞の治療的利用も研究されている。規制に関し、ヒトの医療における幹細胞利用は市販承認を含め、欧州域内では欧州医薬品庁(EMA)、米国においては米国食品医薬品局(FDA)の規制下にあり、獣医領域で使用される医薬品も同様に EMA、FDA の管理下にあるものの、獣医療における ASC を含む幹細胞利用に関しては何の規制も適用されてないのが現状である。今後、獣医療においても、安全性に留意した自己及び同種他家由来幹細胞の組織工学的利用が期待される。

【文献 43】**[146]**

A review of new technology that may become useful for *in vitro* production of boar sperm.

Gadella, B.M., Ferraz, M.A.

Reproduction in Domestic Animals (2014) 5: 36-43

豚精子の *in vitro* 作製を可能にする新しい技術の展望

（総説）

最近の生殖幹細胞に関する研究成果は目覚ましく、マウス及びヒト精原幹細胞（SSC）の ES 様細胞への形質転換、人工多能性幹細胞（iPSC）の精子形成過程への誘導、新生マウス精巣由来始原生殖細胞や SSC の 3D プリンタを使った（3-D printing）立体培養による 1 倍体精子様細胞の作製、マウスやヒトの精祖細胞（精原細胞、spermatogonia）の人工培養等に成功している。このようなことから、機能的な精子を培養ディッシュ上で作製することへの科学的期待だけでなく、男性不妊への応用への期待が高まっている。精巣精細管の基底層はセルトリ細胞で覆われており、セルトリ細胞同士はタイトジャンクションで結合している。また、基底膜の内側のセルトリ細胞の間には精粗細胞の始原細胞である SSC も分布している。基底層の外側の間質には、テストステロンを分泌するライディッヒ細胞が分布している。テストステロンはセルトリ細胞を活性化し、セルトリ細胞とライディッヒ細胞の傍分泌による相互作用や、下垂体からのホルモン分泌によって、SSC の有糸分裂が誘導される。このようなホルモンネットワークに制御されて SSC は有糸分裂して精粗細胞となり、精粗細胞が有糸分裂を繰り返して精母細胞（primary spermatocyte）となる。さらに精母細胞は 2 回減数分裂して 1 倍体の精娘細胞（secondary spermatocyte）から精細胞（精子細胞、spermatid）となる。精細胞は細長く形態を変え、さらには精子（sperm）へと変態する。しかし、精巣で形成された精子は受精能力がなく、精巣上体でさらに成熟する必要がある。このように複雑な精子形成過程で、セルトリ細胞は栄養供給により精子形成を支えている。残念ながら、*in vitro* での精子形成技術は未熟で、体外受精や人工授精における受精能力はない。最近、3-D printing 技術、微小流体（microfluidic）技術、精巣細胞培養への培養液の灌流技術等が急速に発達しているが、豚の繁殖に利用可能な 1 倍体精子様細胞の *in vitro* 培養は成功していない。今後の様々な技術開発で、豚の人工授精に使える精子の in vitro での調製や、さらには X 染色体を持つ精子のみを選択的に調製する技術などの実用化が望まれるが、その道のりはまだまだ長いと思われる。

【文献 44】**[147]**

Generation of Naïve Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors

Kawaguchi, T., Tshukiyama, T., Kimura, K., Matsuyama, S., Minami, N., Yamada, M., Imai, H.

PLOS ONE (2015) August 19

PiggyBac トランスポゾンを用いたドキシサイクリン誘導性転写因子の導入によるナイーブ型牛人工多能性幹細胞の作製

（原著論文）

家畜における多能性幹細胞(PSC)作製の報告は限られており、いずれも着床後のエピブラスト（epiblast）に相当するキメラ形成能の低いプライム型（primed）PSC であった。一方、マウスの PSC はナイーブ型 PSC であり、ナイーブ型 PSC は胚盤胞内の内部細胞塊(ICM)に相当し、胚性幹(ES)細胞と同様に生殖細胞を含む全ての細胞系譜に分化することが可能である。家畜の PSC は、遺伝的形質の改良やヒトの再生医療や疾病研究のモデルとして期待されており、家畜におけるナイーブ型 PSC の樹立が必要である。本研究では、牛人工多能性幹細胞(biPSC)の作製を試みるため、piggyBac ベクターを用いてドキシサイクリン(Dox)誘導性転写因子（*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*）を牛羊膜由来細胞に導入した。Dox 添加によりヒト ES 細胞様の扁平なコロニー、プライム型 pbiPSC と、マウス ES 細胞様のドーム型コロニー、ナイーブ型 nbiPSC が得られた。pbiPSC はノックアウト血清代替物（knockout serum replacement）、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子、牛白血病阻止因子(bLIF)添加 piPSC 培養液で継代し、nbiPSc はそれに加え MEK/ERK 抑制因子、GSK3β 抑制因子及びホルスコリン添加 niPSC 培養液で継代した。biPSC は、培養液の交換により容易に相互の型に転換した。両型 biPSC はともに強いアルカリホスファターゼ活性を示し、免疫染色法にて外因性及び/又は内因性の *OCT3/4*、*NANOG* の発現が確認され、RT-PCR 法にて多能性マーカーである *OCT3/4*、*SOX2*、*NANOG*、*REX1*、*ESRRβ*、*STELLA*、*SOCS3* の発現が確認された。両型 biPSC は胚様体を形成し、三胚葉の形成が確認された。ナイーブ型マウス iPSC に特徴的な LIF 依存性増殖、FGF5 非発現、*XIST* 活性化及び両 X 染色体の活性化は、nbiPSC でのみ認められた。さらに、集合胚の形成では、pbiPSC は細胞塊を形成しなかったが、プライムーナイーブ転換 pnbiPSC 及び nbiPSC は胚盤胞内で正常に ICM に組み込まれ、キメラ胚を形成した。キメラ胚 3 個を代理母子宮内に移植し、移植後 90 日で回収したところ、胎子は正常に発育し、生殖腺を含む 14 組織中 11 組織にて pnbiPSC の寄与が確認された。本報告は、生殖腺を含むキメラ胚形成が可能なナイーブ型 iPSC の牛における初めての作製であり、また、ナイーブ型を維持する培養条件についての初めての報告である。

第 7 章　まとめ

本調査では、海外における動物用再生医療等製品の実用化状況、実用化されたものについては関連する法令や安全性評価に関する情報、及び動物用再生医療等製品の安全性評価に関するガイドラインの策定状況等について、情報の収集・整理をおこなった。また、安全性評価ガイドライン案を作成するために有用と思われる文献を収集しその要約を作成した。

海外において実用化されている動物細胞加工製品はなかった。一方、遺伝子治療用製品においては、米国でイヌメラノーマ DNA ワクチン（2012 年)、イヌリンフォーマ DNA ワクチン（2015 年）が、カナダでイヌメラノーマ DNA ワクチン（2011 年）がそれぞれ承認されていた。また、細胞へ遺伝子を導入する点では遺伝子治療用製品と類似した製剤として、生産性向上を目的とした豚成長ホルモン放出ホルモン DNA エンコーディングプラスミド製剤（2007 年）がオーストラリアで承認されていた。また､感染症予防のためのDNAワクチンとして､馬ウエストナイルウイルス感染症DNAワクチン（2005 年）が米国で、サケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチンが米国（2014 年）及びカナダ（2005 年）で承認されていた。さらに、ヒトアンチトロンビンを乳汁中へ分泌するする遺伝子組換え山羊（2009 年）が米国で医薬品として承認されていた。

承認された製品のヒト及び対象動物に対する安全性評価に関する情報は、サケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチン（米国農務省、カナダ食糧検査機関）及びイヌメラノーマ DNA ワクチン（カナダ食糧検査機関）に関するものを収集できた。

動物用再生医療等製品に関するガイドラインは、米国食品医薬品局で作成されていた。また、欧州医薬品庁では再生医療等製品を含む新しいタイプの医薬品に関する専門家班を発足させて作業を開始していた。

海外の規制当局に関する情報と併せて、安全性評価ガイドライン案を作成するために有用と考えられる科学文献 44 報を収集し、その要約をまとめた。

今回の調査では、我が国及び海外とも、動物細胞加工製品で実用化（承認）されたものはなかった。また、具体的な製品化情報についても我が国でのイヌ幹細胞由来製品に関する業務提携情報のみで、海外における具体的な製品化の情報は入手できなかった。しかし、今後動物細胞加工製品の承認申請が予想されることから、わが国では農林水産省が 2014 年度からの補助事業「動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業」で、動物用細胞加工製品の製造販売承認申請時における品質及び安全性の確保のための資料を整備する際に参考となるガイドライン（指針）を作成するための作業を開始している。また米国食品医薬品局では動物用細胞加工製品についての業界向けガイダンスを公表しており、欧州医薬品庁でも専門家の作業班を発足させるなど、海

外においても動物細胞加工製品の承認申請を想定した対応が進んでいる。

このように、我が国及び海外において、動物用再生医療等製品の実用化の動きがあるが、その対象となる動物はイヌを中心とした伴侶動物であり、食用動物においては、実用化にむけた具体的な情報は収集できなかった。細胞加工製品については、経済的な理由から、食用動物に適用されるとしても経済的価値の高い動物を対象としたもの限られるものと思われる。具体的には高泌乳牛の乳腺組織修復や多能性幹細胞からの種畜の生殖細胞の作出などが考えられる。しかしながら、第 6 章で収集した文献情報からも明らかなように、これらの技術についてはまだ基礎研究の段階であり、実用化されるとしてもかなりの時日を要するものと思われる。

一方、我が国の医薬品医療機器等法では再生医療等製品に該当するか明確ではないが、オーストラリアで承認されている豚成長ホルモン放出ホルモン DNA エンコーディングプラスミド製剤のように、食用動物の生産性向上を目的とした遺伝子導入用製品は、今後増加するものと思われる。

本調査を終えるにあたり、動物用再生医療等製品の食品健康影響評価ガイドラインを作成する際の参考として、再生医療等製品が食用動物に適用された場合に想定されるリスク及び留意点について、表 7-1 に取りまとめた。なお、評価ガイドラインの作成にあたっては、さらなる検討が必要である。

表 7-1 再生医療等製品が食用動物に適用された場合に想定されるリスク及び留意点

再生医療等製品	使用する技術	食用動物で想定されるリスク及び留意点
再生医療等製品全般		・原材料の品質および安全性については、対象動物に対してだけではなくヒトに対する安全性も併せて評価する必要がある。
細胞加工製品	細胞加工製品全般	・米国食品医薬品局（Food and Drug Administration, FDA）から、#218 Guidance for Industry: Cell-Based Products for Animal Use[86]および#187: Guidance for Industry: Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs[87]が公表されている（第 5 章参照）。
	活性化リンパ球による免疫増強	・機能修飾された細胞の残存、体内動態が不明のため影響が評価できない。しかし、リンパ球の寿命は 2〜3 週間である。
	幹細胞利用による組織修復	・移植された細胞の動態（局在）を確認する必要があるが、方法については未確立である。 ・異種細胞の移植では、摂取したヒトでのアレルギー反応を惹起する可能性がある。 ・未分化な iPS 細胞や ES 細胞が腫瘍化する可能性があり、未分化な細胞の確認法を確立する必要がある。しかし、と畜検査により、腫瘍化した可食部がフードチェーンに入る可能性は低い。 ・移植する細胞に異種動物の遺伝子を導入した場合、この細胞の移植を受けた動物は遺伝子組換え動物となるため、遺伝子組換え動物としてのリスク評価も必要となる。遺伝子組換え動物の食品利用におけるリスク評価についてはコーデックスのガイド

再生医療等製品	使用する技術	食用動物で想定されるリスク及び留意点
細胞加工製品	幹細胞利用による組織修復	ライン（Codex Alimentarius Commission: Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals）[148]がある。
遺伝子治療用製品（生産性向上のための遺伝子導入用製品も含む）	遺伝子治療用製品全般	・欧州医薬品庁（European Medicines Agency, EMA)[76-78]およびカナダ食糧検査機関(Canadian Food Inspection Agency, CFIA)[93]では、遺伝子治療用製品に類似する DNA ワクチンに関するガイドラインが策定されている（第 5 参照)。 ・米国食品医薬品局（Food and Drug Administration, FDA）からは、#187: Guidance for Industry: Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs[87]が公表されている（第 5 参照)。 ・カナダ食糧検査機関（CFIA）が実施したサケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチン[35]及びイヌメラノーマ DNA ワクチン[36]の対象動物及びヒトに対する安全性評価並びにオーストラリア農薬・動物用医薬品局（Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority，APVMA）が実施した豚成長ホルモン放出ホルモン DNA エンドコーディングプラスミド注射液[22]の対象動物及びヒトに対する安全性評価が参考になる（第 4 章参照)。
	ウイルスベクター	・ウイルスの感染性、残存性について確認する必要がある。 ・遺伝子挿入位置が不適切なことによりがん遺伝子が活性化する可能性がある。しかし、と畜検査により、腫瘍化した可食部がフードチェーンに入る可能性は低い。

再生医療等製品	使用する技術	食用動物で想定されるリスク及び留意点
遺伝子治療用製品（生産性向上のための遺伝子導入用製品も含む）	プラスミドベクター	・投与後のプラスミドの動態を明らかにする必要がある。 ・ヒトゲノムへの挿入の可能性についても確認する必要がある。
	異種遺伝子の導入	・ゲノムに異種遺伝子が導入される場合は遺伝子組換え動物となるため、遺伝子組換え動物としてのリスク評価も必要となる。遺伝子組換え動物の食品利用におけるリスク評価についてはコーデックスのガイドライン（Codex Alimentarius Commission: Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals）**[148]**がある。

参考文献

1. 日本国. *医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保に関する法律（平成 25 年法律第 84 号）*. 2013; Available from: http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/iyakuhin/dl/140825_0-1.pdf.
2. 日本国. *医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律施行令（平成 27 年 1 月 9 日政令第 2 号）*. 2015; Available from: http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S36/S36SE011.html.
3. 農林水産省. *動物用医薬品等取締規則（平成 26 年 11 月 18 日農林水産省令第 58 号）*. 2014; Available from: http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H16/H16F17001000107.html.
4. Yano, K., et al., *Regulatory approval for autologous human cells and tissue products in the United States, the European Union, and Japan.* Regenerative Therapy, 2015. **1**: p. 45-56.
5. 厚生労働省医薬食品局審査管理課長厚生労働省大臣官房参事官. *生物由来製品及び特定生物由来製品並びに指定再生医療等製品の指定に関する考え方について(薬食審査発 1105 第 1 号／薬食機参発 1105 第 2 号 平成 26 年 11 月 5 日)*. 2014; Available from: http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/141105nama.pdf.
6. 独立行政法人国立印刷局, *厚生労働省告示第 378 号.* 官報 6621 号、平成 27 年 9 月 18 日金曜日、P5, 2015.
7. 笠嶋快周. *競走馬臨床における再生医療技術の導入に関する研究.* 競走馬総合研究所年報 2012 年 2012; 14-15]. Available from: www.equinst.go.jp/JP/kenkyuu/comp/k2012-1.pdf.
8. 都築直. *ウマの骨および関節軟骨に対する生体組織工学を用いた再生医療の応用に関する研究（岐阜大学博士論文）*. 2013; Available from: https://repository.lib.gifu-u.ac.jp/bitstream/123456789/47366/2/vk0402.pdf.
9. 田中あかね、松田浩珍. *間葉系幹細胞シートを用いた角膜損傷治療への応用(移植用細胞シートの製造方法、移植用細胞シート、及び移植用細胞シートを用いる治療方法：特願 2010-192682)*. 2015; Available from: shingi.jst.go.jp/abst/p/11/1110/tuat08.pdf.
10. 株式会社アニマルステムセル. *犬の脊髄損傷に関する治験*. 2015; Available from: http://www.medibic.com/animalstemcell/service/index.html#anc01.
11. 山口智宏, *時集炎症と免疫コントロール　新しい免疫活性療法～産業動物のための疾患予防～*. 臨床獣医, 2014. **32**(12): p. 27-32.
12. DS ファーマアニマルヘルス株式会社, *J-ARM とＤＳファーマアニマルヘルスの細胞医療事業に関する提携のお知らせ～動物用細胞医薬品の早期製造販売承認取得に向けた共同臨床開発～* 2015.
13. 岡田邦彦, *新しいがん治療・活性化自己リンパ球療法　獣医療におけるがん免疫療法の可能性－がん治療の選択肢のひとつとして－*. CAT, 2007(10): p. 6-13.
14. Kawaguchi T, T.T., Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M, Ima H, *Generation of*

Naïve Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors. PLOS ONE, 2015. **10**(8): p. e0135403. doi: 10.1371/journal.pone.0135403.

15. Panasophonkul, S., T. Tharasanit, and M. Techakumphu, *Effect of skin fibroblast-derived allogeneic feeder cells on porcine ES-like cell establishment.* J Vet Med Sci, 2012. **74**(10): p. 1243-51.
16. Petersen-Jones, S., *Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases.* J Small Anim Pract, 2005. **46**(8): p. 371-80.
17. Petersen-Jones, S.M., *Viral vectors for targeting the canine retina: a review.* Vet Ophthalmol, 2012. **15 Suppl 2**: p. 29-34.
18. United States Department of Agricuture Animal and Plant Health Inspection Service. *Currently Licensed Veterinary Biological Products (includes imported under permit): Current Veterinary Biologics Product Catalogue, 2015*. 2015; Available from: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/CurrentProdCodeBook.pdf.
19. Cabadian Food Inspection Agency. *Veterinary Biologics Licensed in Canada: List of licensed (approved) veterinary biologics*. 2015; Available from: http://www.inspection.gc.ca/active/scripts/database/vetbio_submit.asp?lang=e&species=all&manufacturer=all.
20. United States Department of Agricuture Animal and Plant Health Inspection Service. *Newly Published Information: Veterinary Biologics Information Published in the Last 90 Days; CVB Notices: Issuance of a Conditional License for Canine Lymphoma Vaccine, DNA*. 2015; Available from: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/notice_15_11.pdf.
21. United States Department of Agricuture Animal and Plant Health Inspection Service. *Currently Licensed Veterinary Biological Products (includes imported under permit): Currently Licensed biologics for Aquatic Animals, 2015*. 2015; Available from: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/aqua_products.pdf.
22. Australian Pesticidesb and Veterinary Medicinec Authority. *APVMA Gazette: Gazette No. 12, 4 December 2007: Synthetic Procine GHRH-encoding Plasmid Page [LIFETIDE SW 5 INJECTABLE PLASMID ENCODING PORCINE GHRH*. 2007; Available from: http://apvma.gov.au/sites/default/files/gazette_2007-12-04.pdf.
23. Health Canada. *Genetically Modified (GM) Foods and Other Novel Foods: Approved Products*. 2015; Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/index-eng.php.
24. The US Food and Drug Administration, t.C.f.V.M. *NADA 141-294 Bc6 rDNA construct in*

GTC 155-92 Goats - original approval. 2009; Available from: http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/UCM118087.pdf.

25. Merial. *Merial News Release: MERIAL Receives Full License Approval for ONCEPT™ Canine Melanoma Vaccine* 2010; Available from: http://us.merial.com/merial_corporate/news/press_releases/02-16-2010_ONCEPT_consumer_release.asp.
26. Newswire, P. *MERIAL Receives Full License Approval for ONCEPT(TM) Canine Melanoma Vaccine*. 2010; Available from: http://www.prnewswire.com/news-releases/merial-receives-full-license-approval-for-oncepttm-canine-melanoma-vaccine-84464667.html.
27. European Medicines Agency. *Oncept Melanoma: Withdrawal Statement*. 2014; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/003684/wapp/Initial_authorisation/vet_wapp_000020.jsp&mid=WC0b01ac058008d7ab&source=homeMedSearch&category=veterinary.
28. European Medicines Agency. *Withdrawal of Oncept Melanoma solution for injection for dogs Centralized procedure (EMEA/V/C/003684/0000)*. 2014; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Withdrawal_letter/veterinary/003684/WC500183120.pdf.
29. European Medicines Agency - Commettee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). *Withdrawal assessment report for Oncept Melanoma (EMEA/V/C/003684/0000)*. 2014; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Application_withdrawal_assessment_report/veterinary/003684/WC500183119.pdf.
30. De Filette, M., et al., *Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination.* Veterinary Research, 2012. **43**(1): p. 16-16.
31. Brandler, S. and F. Tangy, *Vaccines in development against West Nile virus.* Viruses, 2013. **5**(10): p. 2384-409.
32. US Department of Aguricauture. *Environmental Assessment: For Issuance of a Permit for Distribution and Sale of an Imported Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Vaccine, DNA*. 2013; Available from: https://www.aphis.usda.gov/regulations/compliance/downloads/SupplementalReference7%20.pdf.
33. European Medicines Agency. *ATryn: antithrombin alfa*. 2006; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000587/

human_med_000658.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

34. United States Department of Agricuture Animal and Plant Health Inspection Service. *Environmental Assessment: For Issuance of a Permit for Distribution and Sale of an Imported Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Vaccine, DNA*. 2013; Available from: https://www.aphis.usda.gov/regulations/compliance/downloads/SupplementalReference7%20.pdf.

35. Simard NC. *The Road to Licensure of a DNA Vaccine for Atlantic Salom*. 2008; Available from: http://www.bion.no/filarkiv/2010/07/vaccine_simard.pdf.

36. Canadian Centre for Veterinary Biologics. *Canine Melanoma Vaccine,DNA: Environmental Assessment (Oncept)*. 2011; Available from: http://www.inspection.gc.ca/animals/veterinary-biologics/licensed-products/environmental-assessments/canine-melanoma-vaccine/eng/1333125439916/1333125603215.

37. GTC Biotherapeutics Inc. *Freedom of Information Summary: Original New Animal Drug Application, NADA 141-294, Bc6 rDNA Construct in GTC 155-92 Goats* 2009; Available from: http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/UCM118087.pdf.

38. Center for Veterinary Medicine-United State Food and Drug Administration. *Environmental Assessment for the Bc6 rDNA Construct in GTC 155-92 Goats Expressing Recombinant Human Antithrombin III (rhAT or ATRYN)* 2009; Available from: http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/GeneticEngineering/GeneticallyEngineeredAnimals/UCM163814.pdf.

39. Meyer, R.G., et al., *A phase I vaccination study with tyrosinase in patients with stage II melanoma using recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA-hTyr).* Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(5): p. 453-67.

40. Lindsey, K.R., et al., *Evaluation of prime/boost regimens using recombinant poxvirus/tyrosinase vaccines for the treatment of patients with metastatic melanoma.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(8): p. 2526-37.

41. Ledwith, B.J., et al., *Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice.* Intervirology, 2000. **43**(4-6): p. 258-72.

42. Manam, S., et al., *Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA.* Intervirology, 2000. **43**(4-6): p. 273-81.

43. Wolff, J.A., et al., *Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle.* J Cell Sci, 1992. **103 (Pt 4)**: p. 1249-59.

44. Parker, S.E., et al., *Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits.* Hum Gene Ther, 1999. **10**(5): p. 741-58.
45. Kues, U. and U. Stahl, *Replication of plasmids in gram-negative bacteria.* Microbiol Rev, 1989. **53**(4): p. 491-516.
46. MacGregor, R.R., et al., *T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev.* Aids, 2002. **16**(16): p. 2137-43.
47. McConkey, S.J., et al., *Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 729-35.
48. Maturin, L., Sr. and R. Curtiss, 3rd, *Degradation of DNA by nucleases in intestinal tract of rats.* Science, 1977. **196**(4286): p. 216-8.
49. Leira, H.L. and K.J. Baalsrud, *Operator safety during injection vaccination of fish.* Dev Biol Stand, 1997. **90**: p. 383-7.
50. Dyrkorn, R., B.H. Saegrov, and S. Saegrov, *[Frequency and clinical consequences of self-injection among salmon vaccinators].* Tidsskr Nor Laegeforen, 1993. **113**(13): p. 1566-8.
51. The European Medicines Agency. *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)*. 2015; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000262.jsp&mid=WC0b01ac0580028dd8.
52. The European Parliament and the Council of the European Union. *Directive 2004/28/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products (Official Journal L 136, 30/4/2004 p. 58 - 84).* 2004; Available from: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2004_28/dir_2004_28_en.pdf.
53. European Commission. *Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on on veterinary medicinal products*. 2014; Available from: http://ec.europa.eu/health/files/veterinary/vet_2014-09/regulation/reg_part1_en.pdf.
54. European Food Safety Authority (EFSA). *The Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)* 2015; Available from: http://www.efsa.europa.eu/en/panels/biohaz.
55. European Food Safety Authority (EFSA). *The Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)* 2015; Available from: http://www.efsa.europa.eu/en/panels/gmo.
56. The United States of Food and Drug Administtation. *The Center for Veterinary Medicine (CVM)*. 2015; Available from: http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofFoods/CVM/default.htm#What_CVM_Regulates.
57. The United States Code. *21 USC 360b: New animal drugs, Title 21-Food and Drugs,*

Chapter 9-Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, Subchapter V-Drugs and Devices, Part A-Drugs and Device. 1938; Available from: http://uscode.house.gov/view.xhtml?req=granuleid:USC-prelim-title21-section360b&num=0&edition=prelim.

58. United States Department of Agricuture Animal and Plant Health Inspection Service. *Veterinary Biologics*. 2015; Available from: https://www.aphis.usda.gov/wps/portal/aphis/ourfocus/animalhealth/!ut/p/a1/04_Sj9CPyksy0xPLMnMz0vMAfGjzOK9_D2MDJ0MjDzdgy1dDTz9wtx8LXzMjf09TIAKIoEKnN0dPUzMfQwMDEwsjAw8XZw8XMwtfQ0MPM2I02-AAzgaENIfrh-FpsTd1QmoxM0nwNzby8jA2xSqAJ8TwQrwuKEgNzTCINNTEQDfLcka/?1dmy&urile=wcm%3apath%3a%2FAPHIS_Content_Library%2FSA_Our_Focus%2FSA_Animal_Health%2FSA_Vet_Biologics%2F.

59. The United States Department of Agriculture (USDA). *Virus-Serum-Toxin Act, 21 USC 151-159 et. seq.* . 1913 (1985 amended); Available from: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/vsta.pdf.

60. Health Canada. *Drugs and Health Products*. 2015; Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/index-eng.php.

61. Canada. *Food and Drug Act*. 1985; Available from: http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/F-27.pdf.

62. The Minister of Justice. *Food and Drug Regulations*. 2015; Available from: http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C.R.C.,_c._870.pdf.

63. Canadian Food Inspection Agency (CFIA). *Veterinary Biologics*. 2015; Available from: http://www.inspection.gc.ca/animals/veterinary-biologics/eng/1299159403979/1320545281259.

64. Canada. *Health of Animal Act*. 2015; Available from: http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/H-3.3.pdf.

65. Canada. *Health of Animal Regulations*. 2015; Available from: http://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/C.R.C.,_c._296.pdf.

66. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). *Registrations and Permits*. 2015; Available from: http://apvma.gov.au/node/1060.

67. Agriculture and Water Resources. *Agricultural and Veterinary Chemicals Code Act 1994*. 1994; Available from: F2014L00845.pdf.

68. Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). *Food Standards Code (until 1 March 2016)*. 2015; Available from: http://www.foodstandards.gov.au/code/Pages/default.aspx.

69. The European Parliament and the Council of the European Union. *Directive 2009/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 amending Directive*

2001/82/EC and Directive 2001/83/EC, as regards variations to the terms of marketing authorisations for medicinal products. (Official Journal L 168, 30/6/2009, p. 33 - 34). 2009; Available from: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2009_53/dir_2009_53_en.pdf.

70. The Commision of the European Communities. *Commission Directive 2009/9/EC of 10 February 2009 amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for veterinary use (Official Journal L 44, 14/2/2009 p. 10 - 61)*. 2009; Available from: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2009_9/dir_2009_9_en.pdf.

71. The Commision of the European Communities. *Commission Directive 2006/130/EC of 11 December 2006 implementing Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of criteria for exempting certain veterinary medicinal products for food-producing animals from the requirement of a veterinary prescription was published in the Official Journal on 12 December 2006*. 2006; Available from: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2006_130/dir_2006_130_en.pdf.

72. The European Parliament and the Council of the European Union. *Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products (Official Journal L 311, 28/11/2001 p. 1 - 66). (consolidated version : 18/7/2009)*. 2001; Available from: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2001_82_cons2009/dir_2001_82_cons2009_en.pdf.

73. The European Parliament and the Council of the European Union. *Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC*. 2001; Available from: http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0004.02/DOC_1&format=PDF.

74. The Council of the European Union. *Council Directive 2006/88/EC of 24 October 2006 on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals*. 2006; Available from: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0088&from=EN.

75. The Commision of the European Communities. *Council Directive of 28 January 1991 concerning the animal health conditions governing the placing on the market of aquaculture animals and products (91/67/EEC) (OJ L 46, 19.2.1991, p. 1)*. 1991; Available from: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991L0067:20030605:EN:PDF.

76. The Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). *Guideline on the design of studies to evaluate the safety and efficacy of fish vaccines (EMA/CVMP/IWP/314550/2010 Consultation)*. 2011; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/03/WC500104493.pdf.

77. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). *Guideline on Live Recombinant Vector Vaccines for Veterinary Use (EMEA/CVMP/004/04-FINAL)* 2004; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004590.pdf.

78. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). *DNA vaccines non-amplifiable in eukaryotic cells for veterinary use (CVMP/IWP/07/98-FINAL)*. 2000; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004614.pdf.

79. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). *Environmental risk assessment for immunological veterinary medicinal products (EMA/CVMP/074/95-FINAL)*. 1996; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004620.pdf.

80. Committe for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). *Data requirements for immunological veterinary medicinal products intended for minor use or minor species (Rev. 1)(Doc. Ref. EMEA/CVMP/IWP/123243/2006-Rev.1-CONSULTATION)*. 2006; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004530.pdf.

81. Committe for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). *Data requirements for immunological veterinary medicinal products intended for minor use or minor species (Rev. 2)(EMEA/CVMP/IWP/123243/2006 Rev. 2)*. 2010; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004531.pdf.

82. European Food Safety Authority Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *Scientific Opinion: Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified animals*. 2013; Available from: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3200.pdf.

83. European Food Safety Authority Panels on Genetically Modified Organisms (GMO) and Animal Health and Welfare (AHAW). *Scientific Opinion: Guidance on the risk assessment of food and feed from genetically modified animals and on animal health and welfare aspects*. 2012; Available from: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2501.pdf.

84. European Food Safety Authority Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *Scientific Opinion: Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use*. 2011; Available from: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2193.pdf.

85. European Food Safety Authority Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). *Guidance document for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and feed use*. 2006; Available from: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/comm_Guidance_gmo_en%2C0.pdf.

86. The United States Food and Drug Administration. *#218 Guidance for Industry: Cell-Based Products for Animal Use*. 2015; Available from: http://www.fda.gov/downloads/animalveterinary/guidancecomplianceenforcement/guidanceforindustry/ucm405679.pdf.

87. The United States Food and Drug Administration. *#187 Guidance for Industry: Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs*. 2015; Available from: http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM113903.pdf.

88. U.S. Code of Federal Regulations (CFR). *Title 9 - Animals and Animal Products, Chapter I - Animal and Plant Health inspection Service, Department of Agriculture, Parts 101 to 123*. 2015; Available from: http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2015-title9-vol1/pdf/CFR-2015-title9-vol1-part102.pdf.

89. The Animal and Plant Health Inspection Service and the Food and Drug Administration. *Memorandum of Understanding Between the Animal and Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture and the Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (APHIS Agreement # 04-9100-0859-MU FDA Serial # 225-05-7000)*. 1992; Available from: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/APHIS_FDA_biologics_MOU.pdf.

90. The Canadian Food Inspection Agency's Canadian Centre for Veterinary Biologics. *Veterinary Biologics Guideline 4.10E: The Regulation of Veterinary Biologics in Canada*. 2012; Available from: http://www.inspection.gc.ca/animals/veterinary-biologics/guidelines-forms/4-10e/eng/1328215080021/1328215153251.

91. The Canadian Food Inspection Agency's Canadian Centre for Veterinary Biologics. *Veterinary Biologics Guideline 4.5E: Licensing Requirements for Veterinary Biologics in Canada*. 2015; Available from: http://www.inspection.gc.ca/animals/veterinary-biologics/guidelines-forms/4-5e/eng/1318508906578/1318509047147.

92. The Canadian Food Inspection Agency's Canadian Centre for Veterinary Biologics. *Veterinary Biologics Guideline 3.2: Regulation of Biotechnology-Derived Veterinary Biologics*. 2012; Available from: http://www.inspection.gc.ca/animals/veterinary-biologics/guidelines-forms/3-2/eng/1328244737525/1328244875804.

93. The Canadian Food Inspection Agency's Canadian Centre for Veterinary Biologics. *Veterinary Biologics Guideline 3.23E: Guidelines for Licensing Veterinary Nucleic Acid Vaccines*. 2012; Available from: www.inspection.gc.ca/english/anima/vetbio/info/vb323e.shtml.

94. The Canadian Food Inspection Agency's Canadian Centre for Veterinary Biologics. *Canine Melanoma Vaccine, DNA: Enviromental Assessment*. 2011; Available from: http://www.inspection.gc.ca/animals/veterinary-biologics/licensed-products/environmental-assessments/canine-melanoma-vaccine/eng/1333125439916/1333125603215.

95. The Canadian Food Inspection Agency's Veterinary Biologics Section. *Environmental assessment for licensing infectious haematopoietic necrosis virus vaccine, DNA vaccine in Canada*. 2005; Available from: http://epe.lac-bac.gc.ca/100/206/301/cfia-acia/2011-09-21/www.inspection.gc.ca/english/anima/vetbio/eaee/vbeaihnve.shtml.

96. Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). *Australia New Zealand Food Standards Code - Standard 1.5.2 - Food Produced Using Gene Technology*. 2015; Available from: https://www.comlaw.gov.au/Details/F2015C00970.

97. European Medicines Agency. *Guideline on the design of studies to evaluate the safety and efficacy of fish vaccines*. 2011; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/11/WC500118226.pdf.

98. European Medicines Agency. *Note for Guidance: DNA Vaccines Non-Amplifiable in Eukaryotic Cells for Veterinary Use*. 2000; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004614.pdf.

99. The European Medicines Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *Note for*

Guidance: Environmental risk assessment for immunological veterinary medicinal products. 1996; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004620.pdf.

100. European Medicines Agency. *Data requirements for immunological veterinary medicinal products intended for minor use or minor species*. 2008; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004530.pdf.
101. European Medicines Agency. *Data requirements for immunological veterinary medicinal products intended for minor use or minor species (Rev. 2)*. 2010; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004531.pdf.
102. Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). *Review of genetically modified food safety assessments (2009)*. 2008; Available from: http://www.foodstandards.gov.au/consumer/gmfood/pages/reviewofgeneticallym4394.aspx.
103. 動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会. *平成 26 年度動物用再生医療等製品の安全性試験等開発事業事業報告書－動物用再生医療等製品（同種由来）の品質及び安全性確保に関する指針（素案）－*. 2015; Available from: http://www.jsavbr.jp/data/1432867667.pdf.
104. Draghia-Akli, R., et al., *High-efficiency growth hormone-releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs.* Faseb j, 2003. **17**(3): p. 526-8.
105. Anderson, E.D., et al., *Genetic immunization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) against infectious hematopoietic necrosis virus.* Mol Mar Biol Biotechnol, 1996. **5**(2): p. 114-22.
106. Anderson, E.D., D.V. Mourich, and J.A. Leong, *Gene expression in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) following intramuscular injection of DNA.* Mol Mar Biol Biotechnol, 1996. **5**(2): p. 105-13.
107. Biering, E., et al., *Update on viral vaccines for fish.* Dev Biol (Basel), 2005. **121**: p. 97-113.
108. Kurath, G., *Overview of recent DNA vaccine development for fish.* Dev Biol (Basel), 2005. **121**: p. 201-13.
109. Lorenzen, N. and S.E. LaPatra, *DNA vaccines for aquacultured fish.* Rev Sci Tech, 2005. **24**(1): p. 201-13.
110. Adomako, M., et al., *Oral DNA vaccination of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), against infectious haematopoietic necrosis virus using PLGA [Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid)] nanoparticles.* J Fish Dis, 2012. **35**(3): p. 203-14.
111. Alonso, M. and J.A. Leong, *Licensed DNA Vaccines against Infectious Hematopoietic*

Necrosis Virus (IHNV). Recent Pat DNA Gene Seq, 2013. **7**(1): p. 62-5.

112. Brudeseth, B.E., et al., *Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming.* Fish Shellfish Immunol, 2013. **35**(6): p. 1759-68.
113. Martinez-Lopez, A., et al., *Increasing versatility of the DNA vaccines through modification of the subcellular location of plasmid-encoded antigen expression in the in vivo transfected cells.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77426.
114. Dhar, A.K., S.K. Manna, and F.C. Thomas Allnutt, *Viral vaccines for farmed finfish.* Virusdisease, 2014. **25**(1): p. 1-17.
115. Ballesteros, N.A., et al., *An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (Oncorrhynchus mykiss).* Fish Shellfish Immunol, 2015. **45**(2): p. 877-88.
116. Edmunds, T., et al., *Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin.* Blood, 1998. **91**(12): p. 4561-71.
117. Guest, D.J., M.R. Smith, and W.R. Allen, *Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon.* Equine Vet J, 2010. **42**(7): p. 636-42.
118. Taylor, S.E. and P.D. Clegg, *Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells.* Vet Clin North Am Equine Pract, 2011. **27**(2): p. 263-74.
119. Godwin, E.E., et al., *Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon.* Equine Vet J, 2012. **44**(1): p. 25-32.
120. Kol, A., et al., *Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression.* Equine Vet J, 2013. **45**(2): p. 193-8.
121. Raabe, O., et al., *Tenogenic differentiation of equine adipose-tissue-derived stem cells under the influence of tensile strain, growth differentiation factors and various oxygen tensions.* Cell Tissue Res, 2013. **352**(3): p. 509-21.
122. Schnabel, L.V., et al., *Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when?* Vet J, 2013. **197**(3): p. 570-7.
123. Aguiar, C., et al., *Immune potential of allogeneic equine induced pluripotent stem cells.* Equine Vet J, 2015. **47**(6): p. 708-14.
124. Broeckx, S., et al., *Intravenous application of allogenic peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: a safety assessment in 291 equine recipients.* Curr Stem Cell

Res Ther, 2014. **9**(6): p. 452-7.

125. Burk, J., et al., *Gene expression of tendon markers in mesenchymal stromal cells derived from different sources.* BMC Res Notes, 2014. **7**: p. 826.
126. Donadeu, F.X., *Equine induced pluripotent stem cells or how to turn skin cells into neurons: horse tissues a la carte?* Equine Vet J, 2014. **46**(5): p. 534-7.
127. Hessel, L.N., et al., *Equine autologous platelet concentrates: A comparative study between different available systems.* Equine Vet J, 2015. **47**(3): p. 319-25.
128. Sharma, R., et al., *Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine induced pluripotent stem cells.* Stem Cells Dev, 2014. **23**(13): p. 1524-34.
129. Smith, R.K., E.R. Garvican, and L.A. Fortier, *The current 'state of play' of regenerative medicine in horses: what the horse can tell the human.* Regen Med, 2014. **9**(5): p. 673-85.
130. Aguiar, C., et al., *Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage.* Equine Vet J, 2015.
131. Linardi, R.L., et al., *Expression and localization of epithelial stem cell and differentiation markers in equine skin, eye and hoof.* Vet Dermatol, 2015. **26**(4): p. 213-e47.
132. Lopez, M.J. and J. Jarazo, *State of the art: stem cells in equine regenerative medicine.* Equine Vet J, 2015. **47**(2): p. 145-54.
133. Ranera, B., et al., *Donor-derived equine mesenchymal stem cells suppress proliferation of mismatched lymphocytes.* Equine Vet J, 2015.
134. Williams, L.B., et al., *Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an LPS induced synovitis model.* Equine Vet J, 2015.
135. Ribitsch, I., et al., *Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 2010. **123**: p. 219-63.
136. Dittmar, T. and F. Entschladen, *Migratory properties of mesenchymal stem cells.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013. **129**: p. 117-36.
137. Pavlin, D., et al., *IL-12 based gene therapy in veterinary medicine.* J Transl Med, 2012. **10**: p. 234.
138. Borena, B.M., et al., *Mammary stem cell research in veterinary science: an update.* Stem Cells Dev, 2013. **22**(12): p. 1743-51.
139. Maguire, G., *Stem cell therapy without the cells.* Commun Integr Biol, 2013. **6**(6): p. e26631.
140. Sharma, N. and D.K. Jeong, *Stem cell research: a novel boulevard towards improved bovine mastitis management.* Int J Biol Sci, 2013. **9**(8): p. 818-29.
141. Whitelaw, C.B., *Toward ovine iPSCs.* Cell Reprogram, 2013. **15**(5): p. 385-8.
142. Choudhary, R.K., *Mammary stem cells: expansion and animal productivity.* J Anim Sci

Biotechnol, 2014. **5**(1): p. 36.

143. Goncalves, N.N., C.E. Ambrosio, and J.A. Piedrahita, *Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: a multispecies perspective.* Reprod Domest Anim, 2014. **49 Suppl 4**: p. 2-10.

144. Koh, S. and J.A. Piedrahita, *From "ES-like" cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals.* Theriogenology, 2014. **81**(1): p. 103-11.

145. Arnhold, S. and S. Wenisch, *Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine.* Am J Stem Cells, 2015. **4**(1): p. 1-12.

146. Gadella, B.M. and M.A. Ferraz, *A Review of New Technologies that may Become Useful for in vitro Production of Boar Sperm.* Reprod Domest Anim, 2015. **50 Suppl 2**: p. 61-70.

147. Kawaguchi, T., et al., *Generation of Naive Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors.* PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135403.

148. Codex Alimentarius Commission. *Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived From Recombinant-DNA Animals*. 2008; Available from: http://www.codexalimentarius.org/download/standards/11023/CXG_068e.pdf.

参考資料

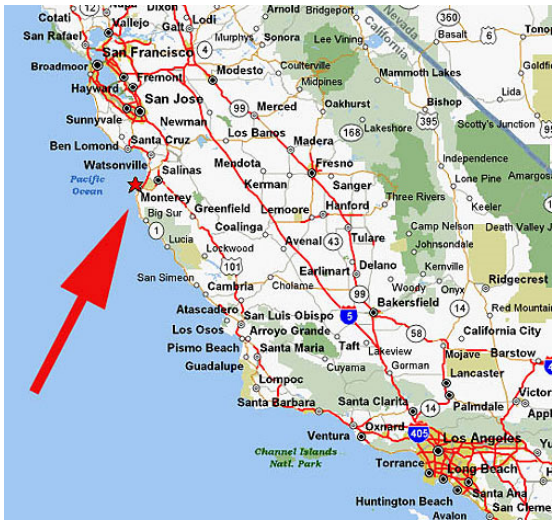
1. 北米獣医再生医療協会（NAVRMA）出張報告
2. VICH5 公開会議における情報収集について（報告）

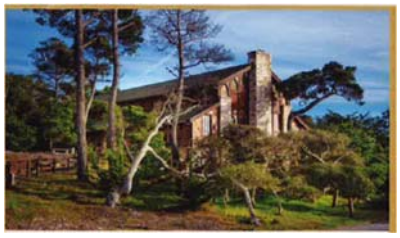
2015 年北米獣医再生医療協会年次総会報告書

（2015 North American Veterinary Regenerative Medicine Conference：NAVRMA）

報告者：矢野一男（東京女子医科大学）

1. 場所：Asilomar Conference Center, Monterey, California





2. 日時：6 月 28 日（日）～7 月 1 日（水）

3. 概要

今回の北米獣医再生医療協会の年次総会は、第五回目である。初回は 2010 年に UC Davis のウマ健康センター、アラモピンタド・ウマ医療センター、ロッドライデルウマ病院のメンバーにより設立された。5 年が経ち、メンバーも増え、設立の地で開催するのは喜びであるとの会長の挨拶で開会された。今回は 115 名が参加し、教育講演・一般講演（42 演題）、基調講演（2 演題）、ポスター（7 演題）が発表された。企業は 6 業者（Anthrex, Arthrogen, Biovison, Dechra, Owl Manor Veterinary, Biotechne）、獣医大学（UCDAVIS）が展示ブースを出していた。規制に関しては、FDA/CVM の Lynne Boxer 女史と ReCellerate の Karl Nobert 氏から発表があった。

4. 演者・発表演題

6 月 29 日（月）：口頭発表：別添 1（プログラム）、別添 2（抄録）を参照

演者（所属）：招聘又は一般演題	演題
Thomas Koch (Ontario Veterinary College)：招聘	幹細胞と組織工学のプライマー
Dori Borjesson (UC Davis)：招聘	治験の報告：幹細胞の機能と追跡
Tracy Webb (Colorado State University)：招聘	ネコの間葉系幹細胞治療：今何処に？
Ralph Marcucio (University of California, San Francisco)：招聘	骨折治癒：軟骨内骨化における新パラダイム
Kurt Hankenson (Michigan State University)：招聘	骨修復の生物製剤治療法：基礎研究からの教訓とヒト整形外科の臨床
Takeaki Kubo (J-ARM)：一般	日本の獣医療における細胞治療

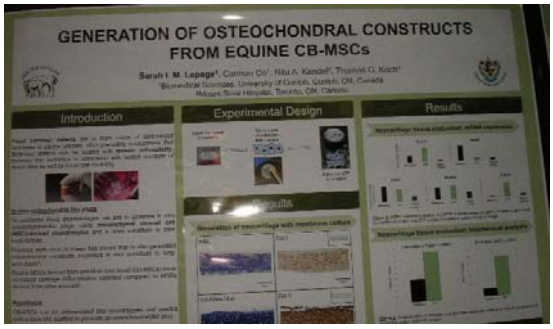
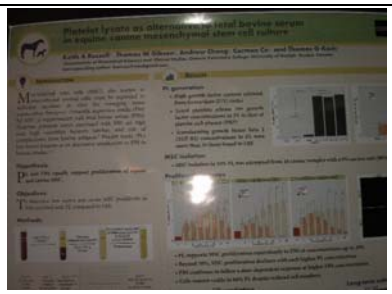
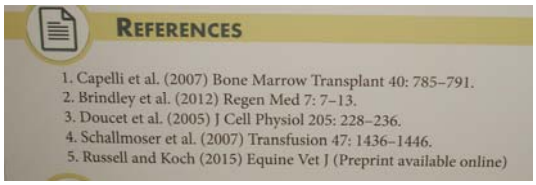
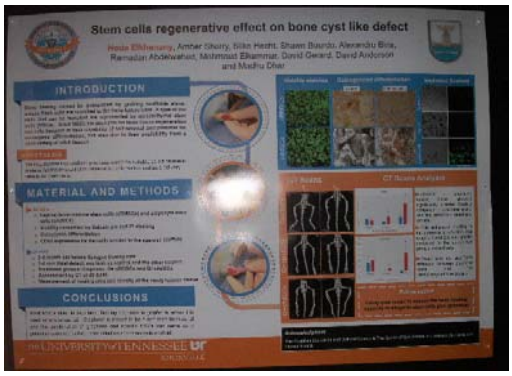
演者（所属）：招聘又は一般演題	演題
Boaz Arzi (UC Davis)：一般	イヌの下顎再建における再生医療の取り組み
Susan Volk (University of Pennsylvania)：招聘	微細環境の再生におけるⅢ型コラーゲンの役割
Kaitlin Clark (UC Davis)：一般	皮下創傷治癒におけるウマ間葉系幹細胞の評価
Valerie Johnson (Colorado State University)：一般	活性化間葉系幹細胞は慢性黄色ブドウ球菌感染症に対する抗生物質活性を増幅する
Alice Bertone (Ohio State University)：一般	ウマ跛行の歯髄治療法を評価するための前向き無作為盲検化臨床試験
Ashlee Watts (Texas A &M University)：一般	異なる細胞調整技術による臨床効果
Lynn William (University of Guelph)：一般	ウマ CB-MSC は LPS 誘発性滑膜炎モデルにおける滑液中有核細胞を減少させる
Boaz Arzi (UC Davis)：一般	ネコの不応性歯肉口内炎に対する新鮮、培養自己間葉系幹細胞治療
Ashlee Watts (Texas A &M University)：一般	自己及び同種間葉系幹細胞の関節への反復投与
Dennis Lox (Private Clinic)：未発表・一般	ヒト膝変形性関節症における膀胱基質の使用：獣医学における相互関連性
Madhu Dhar (University of Tennessee)：一般	筋骨格障害を有するウマに自己間葉性幹細胞を治療した臨床の転帰
Nathaniel White (Virginia Tech)：一般	ウマ蹄葉の深部指状屈筋腱及び遠位指節間側副靭帯損傷における MRI ガイド再生医療治療法
Rokey S. Tuan (University of Pittsburgh)：招聘 	基調講演：組織工学とモデリングにおける成人幹細胞と生体模造マトリックス：修復、回復、再形成

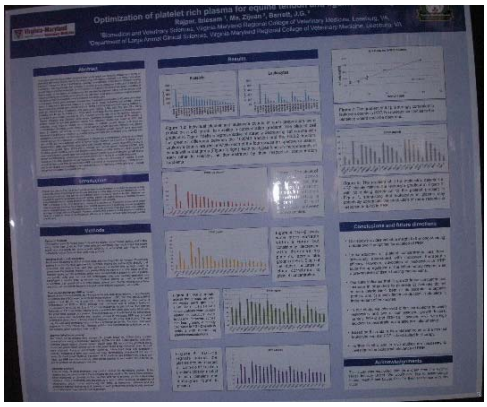
6 月 30 日 （火）：口頭発表

演者（所属）：招聘又は一般演題	演題
Dean Betts (University of Western Ontario)：招聘	イヌ多能性幹細胞：ゴールデンタイムへの準備
Ardy Bayat (University of Manchester)：一般	電気刺激は皮膚修復を加速する

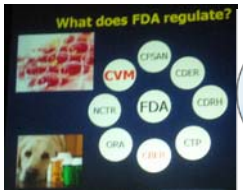
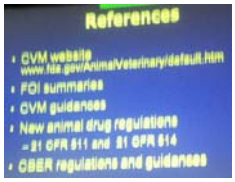
演者（所属）：招聘又は一般演題	演題
Fernando Fierro (UC Davis)：招聘	臨床症状を呈する遺伝改変多能性間質細胞による臨床効果の増強
Ian Tobis (University of Western Ontario)：一般	ナィーブな多能性状態を目指したイヌ胚性幹細胞への低分子導入
Amir Kol (UC Davis)：一般	イヌの間葉系幹細胞治療における標的物質としての Th17 細胞（ヘルパーT 細胞のサブセットで IL-17 産生）
Aijun Wang (UC Davis)：招聘	先天性欠損症動物モデルにおける子宮内修復のためのエンジニアリング材料及び幹細胞
Anne Wooldridge (Auburn University)：一般	ウマ上皮前駆細胞：分離方法の改善とハイドロゲルマイクロスフェア内生育
Mohammad Zayed (University of Tennessee)：一般	軟骨形成：骨髄と滑液由来間葉系幹細胞間の一対比較
Alan Nixon (Cornell University)：招聘	軟骨修復と変形性関節症における多面的エフェクターとしての自己幹細胞
Yoshinori Kasashima (JRA)	ゼラチンマイクロスフェアを取り込んだ幹細胞はウマ腱損傷の細胞治療を改善できるか？
James Dawkins (Cedars-Sinai Heart Institute)：一般	磁気性虚血性心筋症によるブタ全冠状動脈投与と単一冠状動脈投与におけるリモデリングを指標にした血管電磁性非閉塞性冠動脈内注入による心臓由来幹細胞の心筋配達
Jennifer Barrett (Virginia Tech)：招聘	腱への間葉系幹細胞の分化は環状負荷反応器内の振幅に依存する
Mandi Lopez (Louisiana State University)：一般	ウマ成獣多能性実質細胞を脱分化させる合成 mRNA
Yoshihiro Kishigami (Animal Clinic)：一般	イヌ椎間板疾患における間葉系幹細胞の非侵襲性治療の遡及的研究
Jenny Mumaw (University of Georgia)：一般	一般的な動物種から採取した間葉系幹細胞の AAV カプシド 1,2,5,6,8,9 の形質導入の効率と免疫修飾の影響
Andras Nagy (Mount Simai Hospital)：招聘	基調講演：組織修復の幹細胞の代替供給源

ポスター発表

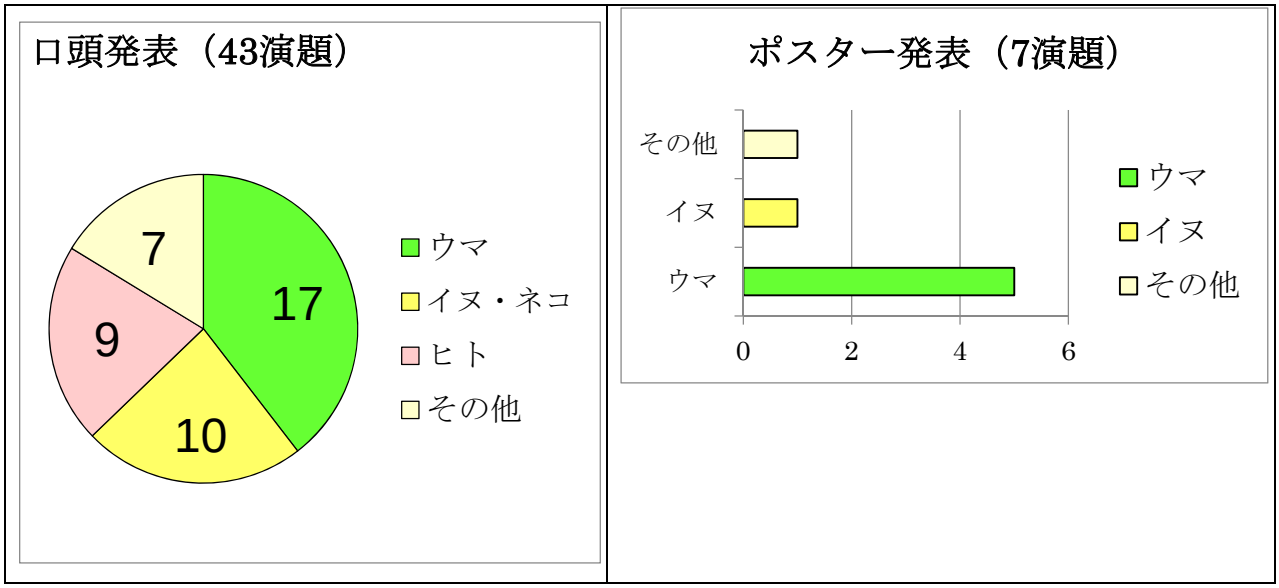
演者（所属）：演題	ポスター
Sarah I. M. Lepage (University of Guelph) ウマ CB-MSCs からの骨軟骨構造物の発生	
Keith A. Russell (University of Guelph) ウマ・イヌ間葉系幹細胞培養における胎児ウシ血清の代用品としての血小板溶解液 	 
Hoda Elkhenany (University of Tennessee) 欠陥としての骨嚢胞における幹細胞再生の影響	
イヌの頚脊椎損傷治療の同種 MSC 複数回投与 D. J. Barberinit (Clinic, Brazil) ReabiVet Instituto Bioethicus	

演者（所属）：演題	ポスター
ウマ原虫性脳脊髄症への同種 MSC 投与 D. J. Barberinit (Clinic, Brazil)	
間葉系幹細胞の挙動における局所環境の影響 Popelarczyk (Virginia Tech)	ポスター撮影忘れ：並列状に比較して、格子状の人工ファイバーを用いて培養した間葉系幹細胞の方が、張力が優れていた
ウマ腱及び靱帯治癒のための多血小板血漿の最適化 Rajpar Ibteam (Virginia Tech)	

7 月 1 日（水）：口頭発表

演者（所属）：招聘又は一般演題	演題
Lynne Boxer (FDA)：招聘 	**FDA ガイドライン 218：動物用使用の細胞由来製品** 
Karl Nobert (ReCellerate)：招聘 	**獣医再生医療の規制**
Denni Day (Texas A & M University)：招聘	幹細胞開始のためのガイドライン：成功のための 12 のステップ
Jade E. LaDow (Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine)：一般	腱形成の生物反応モデルにおいて、腱幹細胞は骨髄及び脂肪細胞由来の幹細胞よりパフォーマンスが優れている

演者(所属):招聘又は一般演題	演題
Daryl Boyd (Arthrogen):一般	移植を伴わない Goldic 製幹細胞を用いた損傷治癒
Merrilee Thoresen (University of Georgia):一般	ウマ骨髄と骨髄由来間葉系幹細胞の異なった輸送条件の比較
Eduardo Silva (UC Davis):招聘	エンジニアリング血管網のための多糖類由来システム
Alxis Mitchell (Texas A &M University):一般・未発表	ウマ MSCs の冷凍保存
Rahaul Pathak ():一般・未発表	知的財産権の保護



5. 細胞由来製品の規制

5.1 #218 Guidance for Industry Cell-Based Products for Animal Use: Lynne Boxer (FDA)：別添 3 参照

1)組織図:動物用医薬品センター(Center of Veterinary Medicine)

2)FDA とは:健康福祉省の食品医薬品局(The Food and Drug Administration)

3)ガイドラインの目的と範囲:

①新規動物用医薬品の定義に合った細胞由来製品を管轄する FDA の見解を明らかにする

②いかに既存の規制を細胞由来製品に適用するか FDA の現在の考えを明らかにする

③細胞由来製品に関する共通の用語を規定する

④細胞由来製品のリスクに基づく分類を規定する

⑤製品開発の早い段階から CVM とのコミュニケーションや接触を奨める

4)細胞由来製品の定義(動物幹細胞由来製品:Animal Stem Cell-Based Products: ASCPs)

動物幹細胞由来製品とは、動物に使用する幹細胞を含有するか、構成するか、由来するものである。さらに、細胞由来製品のサブセットであり、例えば幹細胞、前駆細胞(Progenitor)、前芽細胞(Precursor)、
幹細胞様細胞、リプログラミング細胞、同様な特性を有する他の細胞タイプのような細胞を含有するか、構成するか、由来するものである。本ガイドラインでは、動物幹細胞由来製品の用語は、新規動物

用医薬品の定義に該当する製品を引用している。
動物幹細胞由来製品は、動物用疾患の診断、治療、疾患の軽減、処置、予防を目的とするか、あるいは動物の構造や機能に影響を及ぼすことを目的としている。

5)法律

(1) 食品医薬品化粧品法(Food, Drug, and Cosmetic Act; FD&D Act)が新規動物用医薬品の FDA の権限を規定している。

・201(g)項:医薬品を「ヒトあるいは動物の疾患の診断、治療、軽減、処置、あるいは予防に使用することを目的とするもの」、「ヒトあるいは動物の構造やいかなる機能に影響することを目的とするもの」と規定している。
・2012(v)項:「新規動物用医薬品」を動物に使用する目的のいかなる医薬品であって、表示類に記載され、推奨され、示唆された条件下における使用の安全性や有効性が一般的に認められていない。
・512(a)項:医薬品が安全でない状態を言及している。本項においては、動物用医薬品が「安全でないと判断する」のは、その医薬品が承認された、条件付で承認された、あるいは、索引に掲載された以外の状態である。
・512(j)項:512(a)の要求事項から免除を規定し、臨床試験に使用する場合が免除される。21CFR511には、法を遵守した臨床試験での使用に適した治験依頼者の責務と義務が記載されている。

(2)合法的な上市方法:FDA 承認システム

(3)新医薬品承認申請:New Drug Application (NDA)

- **New animal drug application** (NADA)
- **Abbreviated NADA** (ANADA)
- **Conditional approval** (CNADA) 21 U.S.C. § 360ccc
- **Index listing in effect 21 USC § 360ccc-1** (21 U.S.C. §§ 331(a) and 360b(a)).

http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/NewAnimalDrugApplications/default.htm

<その他 CVM が規制する製品>
・ 飼料(FD&D Act の 402 項と 403 項)、飼料添加物(FD&D Act の 409 項;21CFR 570&571;承認された製品リスト:21CFR582&584)http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/AnimalFoodFeeds/ucm050223.htm
・ 医療機器(市販前承認・認可を必要としない)但し、放射線発生装置は登録が必要
表示類と販売促進資料の適正化を推奨(動物種別の適切な使用の表示)
http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/ResourcesforYou/ucm047117.htm

(4)新規動物用医薬品として承認された製品(Approved Animal Drug Products (Green Book)
http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/default.htm

6) 動物幹細胞由来製品のカテゴリー

A. 異種動物幹細胞由来製品(Xenogeneic):ドナーとレシピエントが異種間で使用される
B. 同種動物幹細胞由来製品(Allogeneic):ドナーとレシピエントが同種間で使用される
C. 自己細胞幹細胞由来製品(Autologous):ドナーとレシピエントが同個体である

1. タイプⅠ
a. 最少加工以上(more than minimally manipulated)
b. 非相同使用(non-homologous use)
c. 食用動物への使用(use in a food-producing animal)
d. 生細胞の代謝活性に依存する影響(to be dependent on the metabolic activity of its living cells)
e. 他の物質との組み合わせによる製造(combination of the calls with another article in the manufacture)
f. 最終製品は医薬品や医療機器との組み合わせ(combination with another drug and device for finished ASCP)

2. タイプⅡ
a. 最少加工(minimally manipulated)
b. 相同使用(homologous use)
c. 食用動物以外への使用(use in non-food-producing animal):同伴動物(pet)
d. 他の物質との組み合わせによらない製造(no combination of the calls with another article in the manufacture)
f. 最終製品は医薬品や医療機器との組み合わせでない(no combination with another drug and device for finished ASCP)

7) FDA の期待

①cGMP での製造、②製造施設の登録、③表示類の不正記載をしない、④有害事象報告

8) FDA への問い合わせ

①開発初期から可能、②製造の基準(21CFR210&211)

9) 治験開始前の臨床研究(PreINAD;動物用治験品:Investigational New Animal Drug)

①治験における表示類への免除事項記載(21CFR511.1(a))

10) 治験届の審査(INAD review)

①顧客所有の動物に対する臨床試験のための書類審査、②INAD 規制遵守(21CFR511.1(b))、③INAD 提出資料(製品情報、前臨床試験データ、安全性データ、有効性データ)、④対面(製品情報、開発計画の検討)⑤INAD 下での免除規定(治験品の該当州外への出荷禁止の免除)⑥INAD 下での治験依頼者の責務(表示類、データ収集、記録、治験薬の管理、動物の処分、治験責任医師の適格性)

11) 登録 (Registration)

12) 承認

①安全性データ、②有効性データ、③品質(Chemistry, manufacture, control; CMC)確認の査察

13) 組み合わせ製品

①CMC データ提供、②製造工程の提示(細胞取扱いの信頼性確認、細胞機能の維持、コンタミネーション防止)、③cGMP、④GTPs の遵守

14) 安全性・有効性の確認資料

①ドナー選択基準、②造腫瘍性、③免疫原性、④長期間の安全性、⑤細胞の生存、⑥生体内分布、⑦異所性組織の形成、⑧外来物質の伝播、⑨製品規格の指標

重要な技術的事項（Major Technical Sections）	付随的技術的事項（Minor Technical Sections）
・安全性（対象動物、特別調査） ・有効性（実質的同等性の根拠、実地調査、使用条件） ・製造（同定、濃度、品質、純度） ・ヒトの食品安全性 ・環境への影響度	・表示類 ・その他の情報 ・FOI（情報公開：Freedom of information）

15） 申請者への参考情報

①CVM website：http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/default.htm

②FOI サマリー：http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/default.htm

③CVM ガイドライン：http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm

④新規動物用医薬品規制（21CFR511、21CFR514）

21CFR511：http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=511&showFR=1

21CFR514：http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=514&showFR=1

⑤CBER 規制とガイドライン

CBER' Rules: http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ActsRulesRegulations/default.htm

CBER's Guidance:http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm

16) Q&A

・質問：FDA/CVM の作成したガイドラインは CBER の HCT/Ps を参考にして作成したとのことであったが、遺伝子治療製品に関して記載されていないが、今後作成するのか？（矢野）

・回答：FDA/CVM でも、細胞由来製品の範疇には、遺伝子治療製品が含まれる。今回は記載していない。今後、遺伝子治療製品のガイドラインが発出されるか不明である（Lynne）。

5.2 Regulation of veterinary regenerative medicine: Karl Nobert (ReCellerate) 別添 4 参照

1) ReCellerate とは

・グローバル動物用医薬品関発会社で、イヌ、ネコ、ウマ、外来鳥の治療用幹細胞製品を開発している。

・専門家：

Prof. Jeniffer Barrett (Virginia Tech's Marion DuPont Scott Equine Medical Center)
Dr. Debra Canapp (Veterinary Orthopedic & Sports Medicine Group)
Dr. Sherman Canapp (Veterinary Orthopedic & Sports Medicine Group)
Prof. Jayesh Dudhia (Royal Veterinary College, London)
Dr. Victor Ibrahim (Regenerative Orthopedics and Sports Medicine)
Dr. Dwight Lin (Sports Medicine and PMR Clinician)
Prof. Alan Nixon (Cornell University and Cornell Ruffian Equine Specialists)
Prof. Biju Parekkadan (Harvard University School of Medicine)
Dr. Ashok Singh (Cook Country Hospital System)
Prof. Roger Smith (Royal Veterinary College, England)
Prof. Rockey Tuan (McGowan Institute for Regenerative Medicine, University of Pittsburgh)
Dr. Tracy Webb (Colorado State University)
Prof. Christine Zink (Johns Hopkins University School of Medicine)

2)新規動物用医薬品承認

・何人も新規動物用医薬品の承認を取得する以外、動物新医薬品を、州を越えて持ち込んではいけない。

・動物用医薬品の定義：食品医薬品化粧品法の 201(g)項に記載

201(g)項：医薬品を「ヒトあるいは動物の疾患の診断、治療、軽減、処置、あるいは予防に使用することを目的とするもの」、「ヒトあるいは動物の構造やいかなる機能に影響することを目的とするもの」

・動物用生物製剤

動物の治療に使用するのが目的で、免疫系あるいは免疫反応の直接な刺激、補充、増強、調節により一次的に作用する

The term "veterinary biologics" includes all viruses, serums, toxins, or analogous products of natural or synthetic origin which are intended for use in the treatment of animals and which act primarily through the direct stimulation, supplementation, enhancement, or modulation of the immune system or immune response. http://www.fda.gov/aboutfda/transparency/basics/ucm193868.htm

農務省における動物用生物製剤の規定（Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS：動物植物検疫所)'s Center for Veterinary Biologics (CVB)が管轄）

http://www.aphis.usda.gov/wps/portal/aphis/ourfocus/animalhealth?urile=wcm%3apath%3a%2FAPHIS_Content_Library%2FSA_Our_Focus%2FSA_Animal_Health%2FSA_Vet_Biologics

・ウイルス・血清・トキシン法（http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/vsta.pdf）

・農務省で承認した動物用生物製剤（Current Veterinary Biologics Product Catalogue：April 09, 2015；http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/CurrentProdCodeBook.pdf）

＜ APHIS の CVB がリンクを張っている関連組織＞

- Australia - Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (www.daff.gov.au/)
- Canadian Food Inspection Agency (http://www.inspection.gc.ca/)
- Committee of the Americas for Veterinary Medicines (CAMEVET) (http://www.rr-americas.oie.int/in/proyectos/Camevet/in_acta.htm)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)(www.cdc.gov)
- U.S. Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine (CVM) (wwww.fda.gov/cvm/default.html)
- European Commission (EUROPA) (http://ec.europa.eu/food/animal/index_en.htm)
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA) (www.fda.gov)
- Institute for International Cooperation in Animal Biologics (IICAB) (www.cfsph.iastate.edu/IICAB/)
- New Zealand - Ministry of Agriculture and Forestry (http://www.mpi.govt.nz/)
- Office of Foreign Assets Control (www.treas.gov/offices/enforcement/ofac/programs/index.shtml)
- The World Organisation for Animal Health (OIE) (www.oie.int)
- United Kingdom - Department of Environment, Food and Rural Affairs(https://www.gov.uk/government/organisations/department-for-environment-food-rural-affairs)
- International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products (VICH) (www.vichsec.org)

3)医療機器

・食品医薬品化粧品法の 201(h)項で医療機器を規定

"an instrument, apparatus, implement, machine, contrivance, implant, in-vitro reagent, or other similar or related article, including any component, part, or accessory, which is ... intended for use in the diagnosis of disease or other conditions, or in the cure, mitigation,

treatment, or prevention of disease in man or other animals, or [which is] intended to affect the structure or any function of the body of man or other animals ... ." Further, a device "does not achieve its primary intended purposes through chemical action within or on the body of man or other animals, and ... is not dependent upon being metabolized for the achievement of its primary intended purposes."

・医療機器の実例：注射針、注射器、手術用器具、人工装具、X 線装置、診断検査キット、歯科用器具

4)覚書（Memorandum of Understanding）

・FDA と USDA（Department of Agriculture；農務省）の動物植物検疫所（APHIS）が規制する製品に関する情報を交換する覚書を締結（2013 年）した。

http://www.fda.gov/AboutFDA/PartnershipsCollaborations/MemorandaofUnderstandingMOUs/DomesticMOUs/ucm359217.htm

Food and Drug Administration (FDA)	Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)
Drugs under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA § 201(g)(1), 21 U.S.C. § 321(g)(1)) **Drugs** are defined as articles intended for use in the diagnosis, cure, mitigation, treatment, or prevention of disease in man or other animals and articles (other than food) intended to affect the structure or any function of the body of man or animals. Thus, articles that are intended to improve animal performance, such as increased production, weight gain and enhanced feed efficiency are considered to be drugs under the FFDCA. Although animal biological products are "drugs" within the meaning of the FFDCA, FDA regulates such products when they are not produced and distributed in full conformance with the VSTA and its implementing regulations (see 21 CFR § 510.4). The phrase "**biological product**" does not apply to antimicrobials, corticosteroids, steroidal and non-steroidal antiinflammatories, hormones, and products that are intended for use to treat disease but their primary mechanism of action is not immunological. See section IIIC of this MOU. These drug products are regulated under section 512 of the FFDCA (21 U.S.C. § 360b).	Certain animal products as biologicals under the Virus-Serum-Toxin Act (21 U.S.C. §§ 151) **Animal biological products** are all viruses, serums, toxins (excluding substances that are selectively toxic to microorganisms, *e.g.*, antibiotics), or analogous products at any stage of production, distribution, or sale which are intended for use in the treatment of animals and which act primarily through the direct stimulation, supplementation, enhancement, or modulation of the immune system or immune response. The term "**biological products**" includes but is not limited to vaccines, bacterins, allergens, antibodies, antitoxins, toxoids, immunostimulants, certain cytokines, antigenic or immunizing components of live microorganisms, and diagnostic components of natural or synthetic origin, or that are derived from synthesizing or altering various substances or components of substances such as microorganisms, genes or genetic sequences, carbohydrates, proteins, antigens, allergens, or antibodies.

5)ガイダンス文書に関する所見

・動物幹細胞由来製品（ASCPs）

・定義：最少加工(minimally manipulated)と相同使用(homologous use)が自己細胞幹細胞由来製品をタイプ 1 とタイプ 2 に区分する項目である。

・動物用医薬品として承認を取得するために、GXP に準拠する必要がある。

・さらに、該当する製品も固有の問題点がある。

6)Q&A

・質問：米国では、州を越えて動物用医薬品を移動させる場合には FDA の承認が必要であるが、州内での移動は FDA の承認が不要なのか？（矢野）

・回答：私の好きな良き質問である。1 つの州内での販売は FDA の承認が必要でない。1 つの州内で販売したとしても、その新規動物用医薬品の原料や機器も含めすべて、同一州内で調達した場合には、FDA の承認が不要である（Karl）。

VICH5 公開会議における情報収集について（報告）

日時　平成 27 年 10 月 27 日（火）～平成 27 年 10 月 29 日（木）
場所　京王プラザホテル

VICH5 公開会議に参加されていた Dr. Anja Holm、Dr. Byron E Rippke、Dr. Steven Vaughn、Dr. Jean-Pierre Orand、Dr. Phil Reeves の 5 名に対して動物用再生医療に関する質問を行い、以下のように回答を得た。

・Dr. Anja Holm - The Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, European Medicines Agency

【質問 1】CVMP ではアドホックグループによる新治療の検討が始まっており、細胞加工製品も含まれているが、進展はあったか。
【回答】多少は進展している。幹細胞の安定性、モノクローナル抗体と 2 つのトピックスについて検討している。

【質問 2】EU の企業は動物用再生医療製品を出すか。
【回答】出すならばコンパニオンアニマルか馬であろう。大学と企業が提携して研究を実施しているところである。

【質問 3】動物用再生医療等製品に特化した安全性試験法ガイドラインはあるか。幹細胞の試験を迅速に実施しなければならないが、それについて何らかの試験法を設定しているか。
【回答】動物用再生医療等製品に特化したガイドラインは作成していない。試験実施にあたっては、ヒトのガイドラインを参考にすることになるだろう。

【質問 4】カナダで承認されているサケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチンが EU において承認されていないのは、当方の調査によれば安全性に問題があるということが理由であるとのことであるが、実際にはどうか。
【回答】EU においてはそもそもサケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチンの需要がない。個人的には当該ワクチンのサケ及びヒトに関する安全性において特に問題はないと思われる。それよりも DNA ワクチンを投与した動物が遺伝子組換え生物に該当するのではないかという議論が EU 内にある。

※Dr. Anja Holm によれば、アドホックグループの進捗状況等に関して、いつになるかわからないがホームページに掲載する予定とのことである。また、今回取得した情報

以外にも Dr. Anja Holm から得られる可能性があるため、引き続きコンタクトを取っていく。

・Dr. Steven Vaughn－Director, Office of New Animal Drug Evaluation, U.S. Food and Drug Administration

【質問 1 】動物用細胞由来製品に関する業界向けガイダンスが発出されているが、実際に申請があったか。

【回答】まだない。開発している会社が 2・3 あると聞いている。

【質問 2】最初にどの動物種の製品が開発されるか。

【回答】コンパニオンアニマルだろう。

【質問 3】ガイダンスによれば、動物用細胞由来製品の有効性についてもフルデータを求めているが、申請までに長期間かかるのでは。

【回答】動物用新薬であるのでフルデータが必要である。

・Dr. Byron E Rippke - Center for Veterinary Biologics, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Service, United States Department of Agriculture

【質問】動物用再生医療等製品を投与した食用動物に関する規制はあるか。またカナダで承認されているサケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチンが米国で承認されていない理由について聞かせてほしい。

【回答】詳しい担当者を紹介するので、確認してほしい。

→担当者（Dr. Melisse Schilling）に照会したところ、サケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチンは米国において 2014 年 3 月に承認されているということであった。

・Dr. Brandi Robinson – Office of New Animal Drug Evaluation, U. S. Food and Drug Administration

【質問】カナダで承認されているサケ伝染性造血器壊死症ウイルスの DNA ワクチンが米国で承認されていない理由について聞かせてほしい。

【回答】DNA ワクチンについては FDA の所掌であるため、USDA に質問してほしい。

・Dr. Jean-Pierre Orand - Environmental and Occupational Health & Safety, French Agency for Food, ANSES

【質問】フランスにおける動物用再生医療に関する情報を教えてほしい。

【回答】特に情報はないが、担当者を紹介することは可能である。

・Dr. Phil Reeves – Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Australian Government

【質問】動物用再生医療等製品に関する基準等はあるか。

【回答】遺伝子改変製品に関するガイドラインが作成されており、それを遺伝子改変動物に応用することになっている。当方でも情報収集を行っているところである。

おわりに

今回の報告書作成にあたっては、医薬品医療機器等法により新設された再生医療等製品という製品カテゴリーに焦点を絞り、海外における動物用再生医療等製品の実例化事例、リスク評価やそのためのガイドライン等の策定状況を調査し、これらの情報について、科学的な根拠をもって総合的にとりまとめることに努力を傾注してきた。その成果が今後、食品健康影響評価のガイドラインの策定につながり、食用動物における再生医療等製品によるヒトの食品を介した健康被害を未然に防ぐための様々な検討や措置に活用されて貢献できることを願うものである。

今回、検討会委員の意見を徴しながら本報告書をとりまとめたが、このことはひとえにこれら関係者の多大なご協力とご助言の賜物であり、感謝の意を表します。