

新動薬情報

○●2017年度 第2号●○



一般財団法人生物科学安全研究所

RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE IN BIOCHEMISTRY & TOXICOLOGY

目 次

文献抄訳

【感染症】

致死量以下の殺虫剤への曝露が、アメリカ腐蛆病に感染した幼虫の生存率と細胞性免疫応答を低下させる	1
FACT 複合体が鶏白血病ウイルスの宿主細胞への感染を促進させる	2

【残留・分析法】

固体保持液抽出法 (SLE 法) を用いた鶏加工食品及び筋肉中の多種類動物薬の同時定量	3
液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析法を用いたハチミツ中残留抗生物質一斉分析法の開発及びバリデーション	5

【その他】

SPF 豚におけるサポニンアジュバント Matrix-M によって誘発される自然免疫応答	6
ブロイラー種鶏農場における環境エンリッチメント	7
幼虫食料中の植物由来マイクロ RNA がミツバチのカースト分化に関与している	8
ヒト及びマウスにおける隣島 G タンパク質共役受容体発現の比較解析	9
植物の防御機能を誘導すると害虫の共食いが増加して食害が減少する	10
III 型分泌装置 (T3SS) のエフェクターである VopL が宿主細胞の活性酸素種 (ROS) 反応を阻害することで <i>Vibrio parahaemolyticus</i> の細胞内での生存を助けている	11
台所スポンジのマイクロバイーム解析と共焦点顕微鏡観察で大量の <i>Acinetobacter</i> 属 <i>Moraxella</i> 属及び <i>Chryseobacterium</i> 属菌の定着を確認	12
M1 ムスカリン受容体のアロステリックモジュレーターはプリオン病における神経変性を遅らせ、記憶欠損を回復させる	13
ヒト腸管微生物による外因性化学物質の代謝 (総説)	14

トピックス

統計学の大家研究者たちが批判の多い P 値についての改革を望んでいる	16
PF0A (ペルフルオロオクタン酸) の水質基準の提案	17
我々は抗生物質を使い尽くしつつある、WHO の報告書が確認	17
動物実験を減らすための新しいツール	18
ペットも根拠に基づいた医療を受ける権利があると SkeptVet が主張している	19
獣医療用の同種他家幹細胞由来製品に関する Q&A: 無菌性に関する質問	20

編集後記

題字：野田 篤 (執行役員)

文献抄訳

感染症

致死量以下の殺虫剤への曝露が、アメリカ腐蛆病に感染した幼虫の生存率と細胞性免疫応答を低下させる

Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae.

J. H. López, et al.

Sci. Rep., DOI: 10.1038/srep40853 (2017)

近年報告されている花粉媒介者であるハナバチの種数及び個体数の減少については、寄生者や病原体の増加、作物に対する殺虫剤の使用、利用できる資源の減少などの要因が複合的に関与していると考えられている。著者らは、殺虫剤の摂取と花粉媒介者であるハナバチの感染症への感受性との関係を明確にすることは、殺虫剤によりハナバチの健康がどの程度損なわれているかを理解するために重要であると考え、殺虫剤とアメリカ腐蛆病菌 (*Paenibacillus larvae*) 芽胞をセイヨウミツバチ幼虫に同時に感作し、その影響を観察した。実験では、孵化後数時間のセイヨウミツバチ幼虫に対して ERIC II 型 *P. larvae* の芽胞を1個体あたり100個投与し、その翌々日からの4日間、ストレス剤として各種農薬を幼虫の生存に対して影響を与えない量で投与した。強毒性の化学物質として有機リン系殺虫剤のジメトエートとネオニコチノイド系殺虫剤のクロチアニジン、弱毒性の化学物質として一般的に蜂群のダニ防除に用いられているピレスロイド系殺ダニ剤のフルバリネートを選択した。芽胞を投与して感染させた幼虫に致死量以下のジメトエート或いはクロチアニジンを投与すると、芽胞の単独投与時よりも有意に死亡率が上昇した。また血液中の血球細胞数を調べたところ、芽胞単独或いは殺虫剤単独で投与した時には血球細胞数が上昇したが、両方を同時に投与した時には有意に血球細胞の減少が見られた。この結果から筆者らは、殺虫剤と病原体が共同的に働くことにより免疫応答能の低下が引き起こされ、これが死亡率の有意な上昇を引き起こしたのではないかと推察している。一方、毒性の低いフルバリネートと芽胞の同時投与では、このような共同的な効果は確認されなかった。

この論文において、致死量以下濃度の殺虫剤の摂取がアメリカ腐蛆病の原因菌である *P. larvae* 芽胞の摂取と共同的に働くことにより、単独で菌を摂取した時よりも死亡率を上昇させたことが初めて示されている。致死量以下の殺虫剤がハナバチの行動、採餌活性、学習能力、繁殖性や免疫に対して悪影響を及ぼしていることについては多数の報告がある。この論文の著者らは、ハナバチの種数及び個体数の減少にはネオニコチノイドのような殺虫剤の影響が特に大きいと考えており、殺虫剤と病原体がスト

レッサーとして相乗的に作用することが、今後もっと実証されていくだろうと述べている。

◎*P. larvae* はゲノム中の繰り返し配列標的としたPCRによってERIC I~IVに型別され、近年分離されるのは主にI型及びII型であり、II型が最も病原性が強い。この論文は低濃度の殺虫剤によるストレスが、病原性の高いERIC II型菌による幼虫死亡率を上昇させることを確認した論文であるが、このような強毒性の病原体による感染症において、幼虫の生存率が幼虫の免疫力の変動によりどこまで影響を受けるのかについては疑問が残る。なお、この論文ではERIC II型菌の芽胞100個でおよそ半数の幼虫が死亡しているが、他の論文ではERIC II型菌芽胞のLD₅₀値は1~6.2個/個体と報告されている。いずれにしても、日和見的に感染が成立するようなより弱毒性の病原体も実験に用いると、より有用な情報を得られるのではないかと思った。(中村 佳子)

FACT複合体が鶏白血病ウイルスの宿主細胞への感染を促進させる

The FACT complex promotes Avian Leukosis Virus DNA integration.

S. Winans, et al.

J. Virol., DOI: 10.1128/JVI.00082-17 (2017)

[緒言]

レトロウイルスは、標的細胞への感染時にインテグラーゼ (IN) という酵素の働きの下、標的細胞染色体に自らのゲノムを組み込む (インテグレーション反応)。この特徴を利用したレトロウイルスベクターは、遺伝子治療用ツールとして利用されているが、組み込み時に起こる遺伝子変異 (がん化等) のリスクを伴う。レトロウイルスベクターとして利用されているレンチウイルス属のヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) やガンマレトロウイルス属のマウス白血病ウイルス (MLV) のインテグレーションに関する研究は盛んになされているが、鶏白血病ウイルス (ALV) を含むアルファレトロウイルス属のその仕組みについてはあまり知られていないため、ALV IN と結合する宿主細胞側の因子としてヒストンシャペロン型転写伸長因子 (FACT (facilitates chromatin transcription) 複合体) に注目して検証した。

[方法と結果]

質量分析によるプロテオミクス並びに抗原抗体反応を利用したイムノロット及びプルダウンアッセイにより、FACT複合体の2つのサブユニット (SSRP1 (structure-specific recognition protein-1) と Spt16 (suppressor of Ty 16)) は他ウイルスのINとは反応せず、ALV IN と特異的に反応することが明らかになった。続いて、均一性時間分解蛍光法 (HTRF) により ALV IN 及び FACT複合体の活性中心について検証した

結果、ALV IN の C 末端ドメイン並びに FACT の SSRP1 及び Spt16 (特に SSRP1) が重要であることが示された。また、ALV IN の活性上昇には SSRP1 或いは Spt16 単独ではなく FACT 複合体が結合する必要があることも明らかになった。さらに、鶏 B 細胞由来 DT40 細胞の SSRP1 ノックアウトモデルを用いた実験では、SSRP1 の欠損は細胞増殖率及び ALV のインテグレーション頻度を低下させたが、HIV-1 及び MLV のインテグレーションには影響しなかった。

[考察とまとめ]

FACT 複合体の2つのサブユニットのそれぞれが ALV IN と結合することが明らかになった。FACT 複合体は感染細胞内における ALV の組み込みを調整しており、FACT 複合体の量と ALV プロウイルスの組み込みの頻度の間には相関があった。また、上記のような FACT 複合体の反応は、レンチウイルス属やガンマレトロウイルス属に対しては見られず、アルファレトロウイルス属の ALV に対してのみ特異的に認められた。

◎ALV は、その感染・増殖様式の特徴上、生きたウイルスの検出及び定量に手間がかかる。本報告は、ALV の感染機序に関する詳細な検証がなされており、新たな ALV 定量方法発案の参考になった。また、遺伝子治療におけるベクターとしての ALV 活用の今後の行方についても興味と期待を抱かせてくれた。(片岡 敦子)

残留・分析法

固体保持液抽出法 (SLE 法) を用いた鶏加工食品及び筋肉中の多種類動物薬の同時定量
Simultaneous determination of multi-class veterinary drugs in chicken processed foods and muscle using solid-supported liquid extraction clean-up.

S. Yoshikawa, et al.

J. Chromatograph. B, **1057**(1), 15-23 (2017)

[緒言]

動物薬は家畜の治療や成長促進のために広く使用されている。しかし過量投与や違法使用により家畜体内に残留し、薬品で汚染された畜産物は人間の健康に被害を及ぼす。しかし、最近増えている加工食品における動物薬の監視報告は少ない。加工食品は一般的に高脂質で、抽出精製過程でエマルジョンを形成しやすいため、分析にあたっては最適な抽出方法と精製方法を決定することが重要である。固相保持液抽出法 (SLE 法) は珪藻土表面の水を一方の液相とした液-液分配による試料の精製法である。珪藻土が充填されたミニカラムに水溶性試料が負荷されると分析対象物はその表面に広がり吸着される。分析対象物質は液々分配と同様な界面を形成するが、抽出溶媒が注入されると効

果的に担体から離脱し、溶媒とともに回収される。そこで著者らは SLE 法を応用した加工食品中動物薬の同時分析法を開発した。

[方法]

鶏唐揚、鶏カツレツ及び鶏筋肉を東京都内のスーパーマーケットで購入し、唐揚粉及びパン粉を除去してミンチして、分析用試料とした。妥当性試験には国内で最も消費量の多い加工食品である鶏唐揚を使用した。高脂質のため 1 回目の抽出には酢酸エチルを用い、2 回目の抽出はアセトニトリルに塩及び緩衝液を加えて行い、SLE 法による精製には InertSep K-solute を使用した。測定は LC-MS/MS で行った。

[結果及び考察]

鶏筋肉用に開発されたアセトニトリルに塩及び緩衝液を加えて抽出する一斉分析方法を加工食品に適用したところ、オキシリン酸だけ回収率が著しく悪かった。そこで 1 回目の抽出として酢酸エチル抽出を加えたところ、抽出効率が改善され、結果として 70%以上の回収率が得られた。

精製方法においては、逆相或いはイオン交換による固相抽出は好結果が得られなかった。分析の障害になる脂質除去法としては液々分配が有効であるが、多量の有機溶媒が必要であり、またエマルジョンを形成しやすいという問題がある。そこで、珪藻土が充填されている InertSep K-solute を使用する SLE 法を検討したところ、抽出液のアプライや洗浄に最適化の必要がなく、アセトニトリルと組み合わせることにより効果的に脂質を除去することができた。

今回開発した方法は日本の分析法妥当性評価ガイドラインに従って検証された。鶏カツレツ及び鶏筋肉では、37 種類の薬剤で真度が 70~105%、並行精度及び室内精度の相対標準偏差がそれぞれ 1~11%及び 2~12%となり日本の基準を満たした。鶏唐揚では真度が 23~98%、並行精度及び室内精度の相対標準偏差がそれぞれ 1~15%及び 1~49%となり、37 種類中 3 種類の薬剤（ミロサマイシン、ナリジクス酸、オキシリン酸）において低い結果となった。この結果はマトリックスや加工手順の違いから生じると推測される。

この研究によって開発した方法を東京のスーパーで購入した輸入食品を含む実試料 85 サンプルに適用した。鶏唐揚 3 サンプル、鶏カツレツ 5 サンプル及び鶏筋肉 17 サンプルから残留動物薬が検出され、最高濃度は、ブラジルから輸入された鶏筋肉でナイカルバジン 35.0 µg/kg であった。

この新しい方法は日常的な残留動物薬のモニタリングに役立つと思われる。

◎自分が携わっている分析の中にも脂質の高いサンプルがある。この論文に出てくる抽出方法や精製方法は非常に参考になると思った。 (宇野 明子)

液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析法を用いたハチミツ中残留抗生物質一斉分析法の開発及びバリデーション

Development and validation of a multiclass method for the determination of antibiotic residues in honey using liquid chromatography tandem mass spectrometry.

K. El Hawari, et al.

Food Addit. Contam. Part A, **34**(4), 582-597 (2017)

[緒言]

動物薬（VMP）は様々な動物の病気を治療及び予防することができるが、誤った使用方法による畜産物への動物薬残留は、それを摂取した人の健康に影響を及ぼし、また、アレルギー反応を引き起こす危険がある。たとえ低いレベルでの残留であっても、長期間にわたる曝露によって細菌が抗菌性物質への耐性を獲得する可能性があるため、欧州医薬品庁、米国食品医薬品局及びその他の国際規制当局は、家畜に用いられる動物薬の最大残留基準値（MRL）を設定し、規制している。

養蜂においては、アメリカ腐蛆病やヨーロッパ腐蛆病などの予防に抗生物質が使用されているが、現在、EUではハチミツ中の抗菌性物質のMRLは設定されておらず（EU Reg No37/2010 2009）、ハチミツ中の抗生物質は検出されてはならないこととなっている。そのため、一部の国や国際機関では独自の規制や対応を行っている。こういった情勢をふまえ、本研究では、ハチミツ中の21種類の抗菌性物質のLC-ESI-MS/MSによる一斉分析法を開発し、その妥当性を確認した。

[抽出方法の検討]

ハチミツは、複雑な生物学的マトリックスであり、また養蜂で使用される抗菌性物質の化学的性状は多様である。様々な化学的性質を持つ抗生物質の一斉分析を開発するために、サンプル前処理における抽出溶媒、pH、塩酸によるN-グリコシド結合の切断効率、超音波抽出と振とうとの比較、分散型固相抽出（SPE）による精製等、抽出効率に影響を及ぼす様々なパラメータを検討し、以下のような前処理法を確立するとともに、欧州委員会決議2002/657/ECに従って妥当性を確認した。

[確立したサンプル前処理方法及びこれを用いた一斉分析法の妥当性確認]

ハチミツサンプル 2 ± 0.05 g を 50 mL 遠心管に採取し、内部標準溶液 100 μ L を加え、暗所で一晚保存。超純水 2.5 mL を加え、1 分間振とうしてハチミツを溶解する。次に、酸性メタノール（2 mol/L 塩酸メタノール溶液）2.5 mL 添加し、1 分間振とうした後、10 分間超音波処理する。これに EDTA4Na 460 \pm 5 mg を添加して pH2.0 に調整し、4,000 rpm で 10 分間（室温）遠心分離する。上清 1 mL を第 1 級、第 2 級アミン（PSA）固相 50 \pm 5 mg を入れた遠心管にとり、1 分間振とうした後、4,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清を LC-MS/MS 供試液とする。

一斉分析法の回収率は 85~111%、再現性及び室内再現性は 20.6 及び 26.8%未満で

あった。判定限界 (CC α) 及び検出能力 (CC β) は、ストレプトマイシン及びネオマイシンの 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を除き、6~9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 7~13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、特異性及び直線性についても基準値を満たしていた。FAPAS のハチミツ試験試料 (テトラサイクリン) を用いて空間技能試験スキームを実施して試験結果を評価したところ、Z-スコアは ± 2 の範囲で得られていた。また、低コストかつ短時間で多くのサンプル処理を行うことができるため、ハチミツの品質を保証するための日常的な分析方法として適していることが確認された。

◎病気を防ぐために抗生物質に頼らざるを得ない状況で、耐性菌の出現や人健康への影響を防ぐためには、多検体を低コストかつ迅速に測定できるこの一斉分析法は大変有益である。
(永田 尚子)

その他

SPF 豚におけるサポニンアジュバント Matrix-M によって誘発される自然免疫応答

Innate immune responses induced by the saponin adjuvant Matrix-M in specific pathogen free pigs.

V. Ahlberg, et al.

Vet. Res., **48**(1), 30 (2017)

シャボンノキ (キラヤ) 由来のサポニンの免疫刺激効果は、ほぼ 100 年前から知られている。これらのサポニンは、動物用ワクチンに数多く使用されてきたが、その効果のメカニズムは完全に理解されていない。サポニンの精製画分は、リン脂質やコレステロールと配合して Matrix-M (Novavax AB, Uppsala, Sweden) のようなナノ粒子免疫刺激複合体マトリクス (ISCOM-Matrix) アジュバントとして利用されている。

この論文の著者たちは、Matrix-M 刺激に対するブタの炎症性サイトカイン等の遺伝子発現をリンパ球、単球或いは単球由来樹状細胞 (MoDC) を用いた *in vitro* の系及び *in vivo* の系で解析した。さらに、Matrix-M を SPF 豚に投与して免疫関連遺伝子発現を解析するとともに、コンベンショナルで飼育された豚と接触させる自然感染条件下での臨床症状発現等も解析した。その結果、前炎症性サイトカインである IL-1B 及び CXCL8 の遺伝子発現は、Matrix-M 投与後の単球及びリンパ球において増加した。また、Matrix-M は、リンパ球における IL-12B、IL-17A 及び IFN- γ 並びに MoDC における IFN- α 遺伝子の発現も誘導した。投与後 18 時間に IFN- α 及び TLR2 遺伝子の統計学的増加が確認された。コンベンショナル豚と接触した SPF 豚で呼吸器疾患が 1-3 日以内に発症した。接触暴露前に生理食塩液を注射した 4 頭の SPF 豚のうち 2 頭では全身

症状を伴っていたが、Matrix-M を投与した4頭の豚では全身症状は認められなかった。顆粒球数、血清中アミロイド A 濃度及び IL-18 と TLR2 の転写は、豚の疾患の進行と一致していた。これらの結果は、豚の管理における重要な時期において、Matrix-M は自然免疫応答をより強化する可能性があるとの評価を支持するものである。

◎多くの植物に含まれていることが知られているサポニンに免疫刺激効果があり、動物用ワクチンのアジュバントとして有用であることが、そのメカニズムで評価された。さらに有効性の報告が公表されることが期待される。(山本 譲)

ブロイラー種鶏農場における環境エンリッチメント

Environmental enrichment for broiler breeders: An undeveloped field.

A. B. River, et al.

Front. Vet. Sci., doi: 10.3389/fvets.2017.00086 (2017)

動物福祉において国際的に認められている概念として、飢えや渇き、苦痛や傷害、恐怖や苦悶等からの自由（「5つの自由」）がある。これは産業動物に限らず人間の飼育下にある、あらゆる動物に対しての動物福祉に関する原則として認知されている。さらに、産業動物の飢え、ストレス、攻撃性、異常な性行動といった動物福祉上の問題を避けるための手段として、環境エンリッチメントがある。環境エンリッチメントとは、飼育動物の正常な行動の多様性を引き出し、異常行動を減らして、動物の福祉と健康を改善するために、飼育環境に対して行われる工夫を指し、それにより動物の生物学的機能改善につなげることが可能である。

ブロイラー種鶏の飼育では制限給餌が一般的で、前述の動物福祉上の問題がある。そこで、環境エンリッチメントによる常同行動や交尾行動への効果について、産卵エリアのパネル、おが屑や砂浴び用材料、給餌方法による研究に関する文献調査を実施した。

床敷きエリアにシェルターのような役割のパネルを産卵期間にのみ設置したところ、雌鳥はパネルの中でより多く産卵した。さらに有精卵の割合が高くなり、産卵率の減少が徐々に減った。通常のエリアを雌鳥が使うことはなく、交尾行動や雌鳥へのダメージも観察されなかった。次に、すのこか、床におが屑を敷くかで行動の違いを調べたところ、おが屑を敷いて雌鳥（4週齢）を飼育した場合は、羽つつき、壁つつきや人つつきが少なくなった。すのこの場合は10週齢で常同性の壁つつきが最も高く、羽へのダメージが多く観察された。最後に給餌方法について、寝床に餌をばらまいて与えたところ、血漿コルチコステロン濃度や遊離脂肪酸の比率等の空腹の指標値には変化がないものの、対象への常同性のつつきは減少したということである。

◎常同行動とは繰り返し行動のことであり、異常行動の一つとされている。ケージで飼育する産卵鶏では、こういった常同行動は加齢とともに減少しており、また羽つつきから物つつき、羽つつきから頭振り、羽つつきからペーシング（或いはそれぞれの逆方向）といったように、羽つつきが常同行動における流れの中心にあることが認められている（Tanaka, T., 1992）。ブロイラーの種鶏に関する文献ではあるが、本文献のような形で鶏の特性を生かすことができれば、産卵鶏やブロイラーにおいても環境エンリッチメントの効果を得ることが可能ではないか。（小川 友香）

幼虫食料中の植物由来マイクロRNAがミツバチのカースト分化に関与している

Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development.

K. Zhu, et al.

PLOS Genetics, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006946> (2017)

ミツバチのカーストが形成されるメカニズムについては、幼虫が摂取する栄養成分が重要で、ローヤルゼリーが女王蜂への分化のトリガーになることは分かっていますが、詳細なメカニズムについてはまだよくわかっていません。働き蜂になるべき幼虫は4日目頃からハチミツに花粉を混ぜたハチパン（beebread）を給与されることから、花粉の成分が幼虫の働き蜂へと分化に関与しているのではないかと考えられています。一方マイクロRNA（miRNA）は、動植物のゲノムにコードされた短いノンコーディングRNAで、遺伝子転写後のmRNA発現を調節する機能を持っており、発生、分化、増殖、細胞死などの調節に関与しています。この論文の著者は、花粉に含まれる植物由来のmiRNAがミツバチのカースト形成に関わっているのではと考え、種々の解析を行いました。菜の花の開花期に採取したローヤルゼリー、ハチミツ、ハチパン及び花粉中の植物由来miRNA量は花粉中が最も多く、ついでハチパン、ハチミツの順で、ローヤルゼリーにはほとんど含まれていませんでした。また、幼虫飼料に植物由来の総RNA或いはmiRNAを混合して給与すると、幼虫の生育速度が低下し、体重、体長及び卵巣のサイズが小さくなり、働き蜂へ分化することが分かりました。また、植物由来miRNAのうち、miR162aというmiRNAの作用が最も強いことも分かりました。さらに、これまでの研究でシグナル伝達に関与するタンパク質キナーゼの一種であるTORがミツバチのカースト分化に関わっていることが明らかになっているので、miR162aとミツバチTORの遺伝子（*amTOR*）発現との関連を解析したところ、miR162aは*amTOR*の発現を抑制することが分かりました。以上のことから、植物のmiRNAが*amTOR*の発現抑制を介してミツバチ幼虫の分化に関与していることが明らかになりましたが、興味深いことに、通常は花粉を摂取することがなくカーストも存在しないショウジョウバエでも、植物のmiRNAがミツバチの場合と同様に幼虫の生育に影響を及ぼしていたそうです。

© "You are what you eat" という英語のことわざがあり、日本でもCMのコピーに使われていますが、この研究成果はまさにこの具体例でしょう。ただ、論文の著者も考察で述べていますが、miRNAの役割はミツバチ幼虫の複雑な分化メカニズムの一部に関与しているだけであり、単純に1つの要因だけを過大評価すべきではないでしょう。いずれにしても、植物と動物の密接な関係の一端を垣間見ることができる研究成果です。

(宮崎 茂)

ヒト及びマウスにおける膵島Gタンパク質共役受容体発現の比較解析

A comparative analysis of human and mouse islet G-protein coupled receptor expression.

S. Amisten et al.

Sci. Rep., doi: 10.1038/srep46600 (2017)

ラットやマウスなどの実験小動物がヒトのモデルとして様々な研究に用いられていますが、これらの動物とヒトの生理機能には異なる点が多く、たとえば医薬品の開発においても、マウスには効果を示す薬物がヒトには効果がないということがしばしばです。一方、Gタンパク質共役受容体(GPCR)は、7回膜貫通型の膜タンパク質で、多様な細胞機能の調節に関与しており、この受容体の機能解析に貢献のあった Brian Kobilka と Robert Lefkowitz が 2012 年のノーベル化学賞を受賞しています。ヒトの膵島(膵臓のランゲルハンス島。グルカゴン、インスリン、ソマトスタチン、グレリン等を分泌)では 300 種以上の GPCR が発現していますが、ヒト膵島の入手が困難なことからその機能が明らかになっているのはごくわずかで、マウスの膵島を用いた GPCR の解析が行われています。しかし、マウスでの解析結果がどの程度ヒトに外挿できるのか分かっていません。この論文の著者らは糖尿病の研究者で、膵島からの各種ホルモン分泌調節に関与している GPCR の発現状況をヒトとマウスで比較解析しました。その結果、多くの GPCR はヒトとマウスで同様に発現しており、マウスがヒトのモデルとなりうるということが明らかになりました。しかし、アデノシン A3 受容体(ADORA3)はマウスの膵島でのみ発現しており、ADORA3 アゴニストである MRS 5698 によるグルコース誘導性インシュリン分泌の抑制はマウスのみで観察され、ヒトには無効であることが分かりました。同様に、ガラニンの受容体である GALR1、GALR2、GALR3 はマウス膵島では大量に発現していますが、ヒト膵島ではほとんど発現しておらず、ガラニンによるインスリン分泌抑制も、マウスでしか観察できません。一方、sst1 受容体(SSTR1)はヒトの膵島で大量に発現しており、このアゴニストである CH 275 によるインスリン分泌抑制は、ヒト膵島でのみ観察されることが明らかになりました。以上のこ

とから、著者らは、糖尿病治療薬の開発にあたってマウスモデルを使う際には注意が必要だとしています。

◎ 藤島のようにヒトの材料の入手が困難な場合には、実験動物モデルでヒト医薬品候補物質の機能を解析せざるを得ませんが、マウスとヒトではその生理機能に違いがあることを十分考慮する必要があります。実験動物の使用量を減らすためにも、この論文のような基礎的情報の蓄積が重要です。 (宮崎 茂)

植物の防御機能を誘導すると害虫の共食いが増加して食害が減少する

Induced defences in plants reduce herbivory by increasing cannibalism.

J. Orrock, et al.

Nature Ecology & Evolution., **1**, 1205–1207 (2017)

害虫により食害を受けた植物は、食害に反応して誘導される自己防衛機能を持つ。例えば、ある植物は食害を受けるとジャスモン酸メチル (MeJA、最初にジャスミンの花から分離されたのでこの名が付いた) を生産し、対抗物質を産生する遺伝子の発現を誘導する。その結果植物は自分をまずくするなどして害虫の食欲を減退させて自分を守る。さらに、揮発性を利用して周囲の植物にも危険を伝達する。

そこで筆者らは、MeJAによる植物防御物質の誘導メカニズムを解析するため、トマトとトマトの葉を食べるイモムシ (シロイチモジヨトウの幼虫) の系で実験し、「植物が自分をまずく栄養価も下げる事で害虫による食害を避け、さらに害虫の共食いも誘う」という驚きの自己防衛法を発見した。

実験では、MeJAの噴霧の有無で対照群と処理群を設定した。MeJAの濃度は0.1、1.0及び10.0 mMとした。先ずイモムシの行動に対する影響を観察したところ、MeJA処理した葉の群では早いタイミングでイモムシが葉を食べるのをやめ共喰いを始めた。食害の比較として残った葉の重量を測ると処理群は対照群の5倍になり、食害が減った。次に、共喰い対象として死んだイモムシを用い、トマトの葉を入れた容器に死んだイモムシを入れるか否かで共喰い出来る環境と出来ない環境を作って比較した。その結果、共喰いが出来ない環境にした場合はイモムシの成長率は低く、葉が食べられない場合も共喰いによって栄養を得ていると思われる。その証拠に正常な葉を食べたイモムシとMeJA処理ではあるが共喰いできる環境のイモムシの成長率は同程度であった。

今回の検討により、MeJA処理によってイモムシがトマトの葉を食べる量が減り、葉の代わりとしてのイモムシの共喰いが多くなる事でさらに食害が減ることが明らかになった。

◎この論文ではジャスモン酸メチル (MeJA) が産生誘導する防御物質がイモムシを共喰いに至らしめたかは言及していないので、共喰いに至らせる脳のメカニズムの解明など追加の実験に期待します。 (高橋 京子)

III型分泌装置 (T3SS) のエフェクターである VopL が宿主細胞の活性酸素種 (ROS) 反応を阻害することで *Vibrio parahaemolyticus* の細胞内での生存を助けている

T3SS effector VopL inhibits the host ROS response, promoting the intracellular survival of *Vibrio parahaemolyticus*.

M. de Souza Santos, et al.

PLOS Pathogens, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006438>. (2017)

マスコミやサプリメントメーカーの広告などでは活性酸素種 (ROS) は諸悪の根源のように扱われていますが、私たちの体内で産生されるROSは、侵入した細菌の殺菌など多くの有用な生理機能を持っています。ROSの産生にはNADPH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸) オキシダーゼが重要な役割を持っています。一方、III型分泌装置は*Vibrio parahaemolyticus* (腸炎ビブリオ) やサルモネラなどの細菌が持つ、細胞外へタンパク質を分泌するための注射器のような装置で、エフェクターと呼ばれる分泌物を宿主細胞に注入することによって、腸炎ビブリオによる下痢の発現にも重要な役割を果たしていると考えられています。この論文の著者らは、腸炎ビブリオが分泌するエフェクターの一つであるVopLの機能を解析し、その役割を明らかにしました。まず、細胞内での腸炎ビブリオの生存にVopLが関与していることを確認するため、その遺伝子 (*vopL*) 欠損株を用いた解析を行いました。その結果、*vopL* 欠損株は非欠損株と同様に宿主細胞に侵入するのですが、その後の増殖が抑制され、形態もフィラメント状になることが明らかになりました。腸炎ビブリオは、紫外線やROSのストレスでフィラメント状に変化することがわかっています。この実験では紫外線を照射していませんので、*vopL*欠損株での形態の変化はROSによるものと考えられました。そこで、*vopL*欠損株感染細胞でのROS産生を確認したところ、非欠損株感染細胞より高濃度のROSが検出されました。そこで、*vopL*欠損株感染細胞にNADPHオキシダーゼホモログを阻害するGKDを作用させたところ、腸炎ビブリオのフィラメント化が抑制されました。以上のことから、VopLは宿主細胞のROS産生を抑制して腸炎ビブリオの細胞内での増殖を助けていることが明らかになりました。NADPHオキシダーゼは細胞膜に存在する酵素ですが、この働きを活性化するには、細胞質中に存在するサブユニットと会合して複合体を形成する必要があり、この複合体形成にはアクチン骨格の再構成が関与しています。そこで、VopLの宿主細胞アクチンの再構成やNADPHオキシダーゼ複合体の細胞質サブユニットの局在への関与について解析した

ところ、VopLは宿主細胞のアクチン再構成を阻害して、NADPHオキシダーゼ複合体細胞質サブユニットの細胞膜への移動を障害し、宿主細胞のROS産生を抑制していることが明らかになりました。

◎生体防御における活性酸素種の重要性や、これに対応する微生物の生き残り戦略の巧妙さを改めて認識させてくれる研究成果です。病原細菌の生き残り戦略の分子レベルでの解明が、革新的な医薬品の開発につながることを期待します。（宮崎 茂）

台所スポンジのマイクロバイーム解析と共焦点顕微鏡観察で大量の*Acinetobacter*属 *Moraxella*属及び*Chryseobacterium*属菌の定着を確認

Microbiome analysis and confocal microscopy of used kitchen sponges reveal massive colonization by *Acinetobacter*, *Moraxella* and *Chryseobacterium* species.

M. Cardinale, et al.

Sci. Rep., doi: 10.1038/s41598-017-06055-9 23, 957-964 (2017)

台所で使うスポンジには非常に多くの微生物が生息していることは分かっていますが、培養法では検出できる微生物に限られるため、その実態は明らかではありませんでした。この論文の著者らは、ドイツの家庭で使われていたスポンジ中の微生物について、次世代シーケンサーを使った16SリボゾームRNA遺伝子のパイロシーケンシングと、*in situ*ハイブリダイゼーションによる蛍光を共焦点レーザー走査型顕微鏡で検出する方法（FISH-CLSM）を使い、スポンジに生息する微生物の実態を解析しました。16SリボゾームRNA遺伝子については、16SリボゾームRNA遺伝子の塩基配列の類似度から得られる単位（operational taxonomic units, OTU）で解析し、362グループの微生物が存在することが分かりました。分類上は*Moraxella*や*Acinetobacter*が属する *Gammaproteobacteria*綱がおよそ半数を占め、また、主要な10のOTUのうちの5つが、German Technical Rule for Biological Agentsのリスクグループ2（RG2）の微生物だそうで、ヒトに対して一定のリスクが想定できますが、サルモネラやカンピロバクターは検出されなかったそうです。また、使用者が熱湯や電子レンジを使ってスポンジを消毒してもあまり効果的でなく、RG2の微生物である *Chryseobacterium hominis* と *Moraxella osloensis*の割合が増加したそうです。FISH-CLSMによる解析では、スポンジの表面や内部のバイオフィーム状の構造の中に多くの微生物が存在し、その濃度はスポンジ1 cm³あたり5.4 x 10¹⁰個と非常に多く、糞便中の微生物数と同レベルだったそうです。熱湯や消毒ではスポンジ中の微生物数は減少せず、むしろリスクの高いRG2細菌の割合が増えてしまうという現象について、競合する微生物が死滅することによる増加で、抗生物質投与後の消化管微生物叢の変化に類似したものではないかと、著者

らは考察しています。

◎ 台所のスポンジには非常に多くの微生物が生息していることが、あらためて明らかになりましたが、食中毒の原因となるリスクは低そうです。熱湯や電子レンジでの消毒はあまり効果がないことも分かりましたが、これについても、1 週間ごとにスポンジを交換することで解決できると著者らはコメントしています。台所用の除菌製品より、100 円均一の安価なスポンジを使い捨てる方が安心なようです。（宮崎 茂）

M1 ムスカリン受容体のアロステリックモジュレーターはプリオン病における神経変性を遅らせ、記憶欠損を回復させる

M1 muscarinic allosteric modulators slow prion neurodegeneration and restore memory loss.

S. J. Bradley, et al.

J. clin. invest., 127(2), 487-499 (2017)

アルツハイマー病（AD）では脳内の神経伝達物質が減少しており、その神経伝達物質の一つであるアセチルコリンの量を増やすことが AD に効果があるとされ、治療薬が開発されている。だが、アセチルコリンを分解する酵素の一つであるアセチルコリンエステラーゼを阻害する薬剤による治療は、用量依存的に重大な副作用へとつながってしまう。中枢のコリン作動性受容体は M1 サブタイプのムスカリン受容体（M1mAChR）である。M1mAChR は G タンパク質共役型受容体（GPCR、今号の 9 頁参照）の一種で、GPCR の内因性アゴニスト活性を促進するアロステリック部位に結合するモジュレータを、ポジティブアロステリックモジュレータ（PAMs）と呼ぶ。従って、M1mAChR の PAMs がアルツハイマー病特異的な治療薬候補と考えられている。一方、AD モデルマウスは PAMs による神経変性抑制作用を評価するには適さない。この論文の著者らは、プリオン病罹患マウスが海馬のコリン作動性神経の脱落など AD と類似した特徴を持つことを確認するとともに、プリオン病罹患マウスをモデルとして M1mAChR の PAMs による AD 治療効果を検証した。M1mAChR の非常に選択性の高い PAMs であるベンジルキノロンカルボン酸（BQCA）とベンゾキナゾリン 12（BQZ-12）は、プリオン病罹患マウスの恐怖条件付け反応の低下や記憶欠損を低減させた。また、BQCA を異常プリオンの脳内接種後 7 週から毎日腹腔内投与したところ、罹患マウスの延命効果が確認された。以上のことから、PAMs による M1mAChR の活性化が、プリオン病や AD のような神経変性性疾患における記憶欠損を回復させるだけでなく、重篤な臨床症状の発現も抑制することが明らかになった。

◎ 日本人は認知症の原因疾患としてアルツハイマー病が 4 割から 6 割を占めるといわ

れており、さらに増加傾向にある。その原因として、遺伝、環境等の因子が挙げられている。Emery らによれば、次世代シーケンサーを用いて死亡したアルツハイマー病患者から採取した脳細胞とコントロールとして採取した側頭葉の細胞を評価したところ、コントロール群と比較してアルツハイマー病の脳細胞には非常に多くの細菌がいる傾向にあったということである (D. C. Emery, et al. 2017)。今後はアルツハイマー病の原因因子がより明確になっていくことを強く期待している。(小川 友香)

ヒト腸管微生物による外因性化学物質の代謝 (総説)

Chemical transformation of xenobiotics by human gut microbiota.

N. Koppel, et al.

Science, doi: 10.1126/science.aag2770 (2017)

栄養成分も含めた食品由来化学物質、環境汚染物質、医薬品など、私たちが経口的に摂取しているxenobiotics (外因性化学物質、ゼノバイオティクス)の多くが、腸内に生息する微生物が産生する酵素によって代謝されていることは分かっていますが、腸管内に生息する微生物は非常に多様で、消化管微生物によるゼノバイオティクスの代謝の全体像解明にはほど遠い状況です。この総説では、消化管微生物によるゼノバイオティクスの代謝について、現在どこまで明らかになっているのか、またこれらの知見が私たちの健康維持にどの程度役立つのか、分かりやすく紹介されています。この総説で紹介されている情報のうち、医薬品の代謝との関連では興味深いのは、抗悪性腫瘍薬irinotecan (イリノテカン)の事例です。イリノテカン自体に抗腫瘍作用はなく、ヒトのカルボキシルエステラーゼで加水分解された代謝物のSN-38がトポイソメラーゼIを阻害して抗腫瘍作用を示します。SN-38はさらにヒトのUDP-グルクロニルトランスフェラーゼでグルクロン酸抱合され、胆汁へ排泄されます。ところが、胆汁中に排泄された抱合体は腸管微生物の β -グルクロニダーゼで加水分解されて、再び遊離型のSN-38に戻ってしまい、腸管上皮細胞に障害を起こして重篤な下痢などの副作用を起こしてしまいます。この副作用を防ぐためには、 β -グルクロニダーゼの作用を阻害すればいいのですが、ヒトもこの酵素を持っているので、ヒトの β -グルクロニダーゼも阻害する物質ではその悪影響が出てしまいます。そこで、腸内細菌の β -グルクロニダーゼだけを特異的に阻害する物質を探索し、この物質を同時投与することによって副作用を抑えることに成功しました。このように消化管微生物そのものではなく、微生物が産生する生理活性物質をコントロールして、医薬品の副作用を抑制することも可能になっているそうです。

◎この総説で紹介されているように、消化管微生物をコントロールして外因性化学物質の消化管内代謝を調節できることが明らかになりつつあります。しかし、消化管内微生物叢も外因性化学物質もきわめて多様であるため、どの菌が善玉でどの菌が悪玉というような判断には程遠い状況で、地道な情報の蓄積と総合的な解析が必要です。

(宮崎 茂)

トピックス

統計学の大家研究者たちが批判の多いP値についての改革を望んでいる

Big names in statistics want to shake up much-maligned P value.

2017年7月26日付、Nature, News 情報

<http://www.nature.com/news/big-names-in-statistics-want-to-shake-up-much-maligned-p-value-1.22375>

最近、論文として報告されている新しい知見の再現性の低さが大きな問題となっています。このような現状に対して、72名の世界的に高名な統計学者たちが連名で、「Redefine Statistical Significance」と題した論文を、心理学分野のオープンアクセスリポジトリPsyArXivに発表しています (<https://osf.io/preprints/psyarxiv/mky9j>)。多くの科学論文で、新しい知見が正しいかどうかの統計学的判断をP値で行っていて、P値が0.05より小さいと「統計学的に有意」としています。しかし、統計学者の多くが、0.05という閾値が「偽陽性」論文の原因であると考えているそうです。また、研究者の多くが、仮説を立ててデータを収集してその結果を統計的に解析するのではなく、集めたデータのパターンを解析して、有意差のあるものを報告するという手段をとる（P hackingと呼ばれているそうです）ようになったことも、再現性のない報告が増えてきた原因と考えられています。このような状況を踏まえ、この論文の著者たちは、P値の閾値を1オーダー小さくして、0.005とすべきだと提案しています。この論文の著者の一人である南カリフォルニア大ロサンゼルス校のDaniel Benjaminは、研究者はP値の閾値として0.05を用いることは、統計学には弱い根拠であることを理解すべきである。P値が0.05から0.005のデータは、確立した知見ではなく単に「示唆される (suggestive)」知見として扱うべきだと主張しています。一方、閾値を小さくすることで「偽陰性（有意な知見であるが見逃されてしまう）」が増えるという懸念があります。これに対応するには、サンプルサイズを大きくすればいいのですが、そのためには多くの研究費が必要です。また、統計的に有意差がないということで、データがお蔵入りしてしまう問題 (file-drawer problem) も起きてきます。Benjaminは、結果はP値に関わらず公表すべきだと主張しています。

◎再現できない研究が増加している背景には、今回紹介した統計処理の問題の他に、研究者の訓練不足、競争激化による論文数稼ぎなど、多様な背景があるのでしょうか。その後、P値の有意水準を厳しくすることは、file-drawer problemをかえって助長し、問題は解決しないとの反論もNature, Newsに掲載されました (<http://www.nature.com/news/one-size-fits-all-threshold-for-p-values-under-fire-1.22625>)。 (宮崎 茂)

PFOA（ペルフルオロオクタン酸）の水質基準の提案

Proposal for water quality standards for PFOA.

2017年9月19日付、オランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）情報

http://www.rivm.nl/en/Documents_and_publications/Common_and_Present/Newsmessages/2017/Proposal_for_water_quality_standards_for_PFOA

ペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）やペルフルオロオクタン酸（PFOA）などの有機フッ素化合物は、表面コーティング剤や撥水剤として用いられてきましたが、生体や環境中での蓄積性が高く、取扱者への健康影響が確認されています。PFOAについては、デュポン社によるオランダ国内での生産は2012年に終了しています。しかし、環境での蓄積性が高いことから、今回、オランダで水質基準の設定が提案されました。慢性曝露基準については、PFOAの魚への蓄積を指標とし、水質基準を48 ng/Lと計算しました。この濃度は、ヒトや動物が生涯魚を摂取し続けても安全な値として求められたものです。しかし、食物連鎖の中で水生生物への影響を見積もるための生物濃縮に関する情報は不足しています。PFOAの水生生物に対する毒性は低いとされていますが、食物連鎖を経た高位捕食者への影響はよくわかっていません。デュポン社は、2012年からPFOAの代替として、新たなフッ素化合物であるGenXの生産を開始しました。しかし、GenXの魚類での蓄積に関する情報が不足しているため、PFOAと同様な手法でのGenXの水質基準は設定できないとRIVMは結論しています。なお、RIVMによる詳細なレポートもウェブ上で公開されています（http://www.rivm.nl/en/Documents_and_publications/Scientific/Reports/2017/september/Water_quality_standards_for_PFOA_A_proposal_in_accordance_with_the_methodology_of_the_Water_Framework_Directive）。

◎ 環境へ大きな影響を及ぼす可能性のある物質についてはきちんとリスク管理する必要がありますが、一方、ある物質の影響が指摘されると、安易に影響の不明確な代替物質を導入する例が多くあります。冷静にリスクとベネフィットを評価して判断することが重要です。 （宮崎 茂）

我々は抗生物質を使い尽くしつつある、WHOの報告書が確認

The world is running out of antibiotics, WHO report confirms.

2017年9月20日付、世界保健機関（WHO）、Media Center 情報

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/en/>

薬剤耐性菌問題（AMR）について世界レベルでの取り組みが進んでいますが、既存の抗菌性物質に対して耐性を持った細菌に有効な抗菌剤の開発が遅れていて、大きな

問題となっています。これに関連して、WHOは9月20日に"Antibacterial agents in clinical development – an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis"という報告書を発表しました。(http://www.who.int/medicines/areas/rational_use/antibacterial_agents_clinical_development/en/)。現在臨床現場で用いられている新規抗生物質の多くは既存の抗生物質を改変したものであり、新しい作用機序を持つ製品ではないことから、短期的な解決にしかありません。WHOは多剤耐性結核菌を含む優先順位の高い細菌12種を公表しています。これら優先順位の高い病原菌に有効な新規の抗生物質や合成抗菌剤は51種リストアップされていますが、そのうち8種のみが革新的な薬品だそうです。このような状況は、多剤耐性或いは広範囲薬剤耐性の結核菌、*Acinetobacter*及び*Enterobacteriaceae* (クレブシエラや大腸菌) 感染症治療のオプションを狭めています。このような状況を解決するため、WHOは顧みられない病気の新薬開発イニシアチブ (Drugs for Neglected Diseases Initiative、DNDi) と共同で、Global Antibiotic Research and Development Partnership (GARDP) を立ち上げました。英国、ドイツなどの国々が合計5,600万ユーロを拠出しているそうです。

◎新動薬情報 2016 年第 2 号で、MRSA に有効な全く新しいタイプの抗生物質候補が見つかったことを紹介しましたが、このような研究への強力な支援が必要でしょう。

(宮崎 茂)

動物実験を減らすための新しいツール

New tools to potentially reduce need for animal testing.

2017年7月10日付、EFSA 情報

<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/170710>

動物実験は科学技術の発展や医薬品・食品等の安全性評価などに不可欠ですが、使用動物の削減について最大限の努力をすべきであることはいうまでもありません。化学物質の安全性評価や創薬の分野においては、定量的構造活性相関 (QSARs) などの *in silico* 解析技術や動物実験代替法の開発が進展し、実験動物は作用機序 (MoA) の同定のみに使われるべきとの考え方が主流になりつつあります。欧州食品安全機関

(EFSA) では、*in silico* 技術の進展を背景に、食品や飼料中の化学ハザードに関するデータベースである OpenFoodTox の運用を開始しました。EFSA は 2002 年の設立以来、4,000 種以上の化学物質のリスク評価を行い、1,600 件以上の報告書を公表してきました。これらの情報が OpenFoodTox データベースに集約されています。これらの情報は、化学物質のリスク評価や動物実験の削減に役立つ重要なデータベースです。ミラノ大学 Mario Negri Institute for Pharmacological Research の研究者たちは、OpenFoodTox データベース上のデータを *in silico* 技術で解析するツールを開発しました。このウェブページでは、ツールを含め

たOpenFoodToxの解説が、文章だけではなく分かりやすいビデオでも紹介されています。EFSAパネルメンバーであるKing's College, LondonのChrister Hogstrand教授の解説なのですが、演出が見事です。非常に聞き取りやすい英語なのでぜひご覧ください。

◎ 化学物質のリスク評価法については、これまでの標準的な毒性試験による評価から、作用機序に基づく評価に変更し、QSARsのような*in silico*技術も応用して、より適切な試験法を考えるべきだという考え方が主流になってきています。動物実験による病理組織学検査、臓器重量測定や血液生化学検査のエンドポイントはあまり重要ではなく、実験動物はMoAの解析にのみ使うべきとされています。それにしても、ウェブサイトのコンテンツに限らず、欧米の情報提供技術の高さには頭が下がります。(宮崎 茂)

ペットも根拠に基づいた医療を受ける権利があるとSkeptVetが主張している

Pets Deserve Evidence-Based Medicine, Too, Says The SkeptVet.

2017年9月3日付、米国パブリックラジオ (National Public Radio, NPR) 情報

<http://www.npr.org/sections/health-shots/2017/09/03/547420275/pets-deserve-evidence-based-medicine-too-says-the-skeptvet>

米国の非営利のラジオネットワークNPRのウェブサイトで、シリコンバレーで臨床獣医師をしているBrennen McKenzieのブログ、SkeptVet (懐疑主義の獣医師、<http://skeptvet.com/Blog/>) の記事が紹介されていました。彼は”Evidence-Based Veterinary Medicine Association” (根拠に基づく獣医療協会) の元会長という経歴の持ち主で、イヌやネコの治療方針について、科学的な根拠を求めて懐疑主義的発言をする場としてSkeptVetを開いたそうです。彼はこのブログの中で、人間の医療と同じように、明確な科学的根拠がない、怪しげな、疑似科学による治療がペットの医療でも蔓延していることに懸念を示しています。インターネット上では、ホメオパシーのように科学的根拠のない代替療法を信じる人たちが積極的に発言していますが、代替療法で効果を得られなかった人たちはほとんど発言していないことが問題だと指摘しています。また、反ワクチン主義者の発言も看過できません。懐疑主義は目新しいものをすべて否定するというのではなく、個人的な感想、逸話、伝説等に基づく主張について、その根拠が科学的に検証されるまで、判断を保留するということです。ペットオーナーは、獣医師と十分話し合い、治療法の良い点と悪い点を十分に理解して、何が最適な治療法かを判断する必要があります。

◎ 医療の問題に限らず、私たちは科学リテラシーを身につける必要があります。効果のない代替療法でも有害でなければ良いのかというと、そうではありません。本来実

施すべき標準治療を拒否することにより、救える命が救えないことになってしまいました。
(宮崎 茂)

獣医療用の同種他家幹細胞由来製品に関するQ&A：無菌性に関する質問

Questions and Answers on allogenic stem cell-based products for veterinary use: specific questions on sterility.

2017年6月15日付 欧州医薬品庁(EMA)動物用医薬品部会(CVMP)採択、公表
EMA/CVMP/ADVENT/751229/2016

欧州医薬品庁動物用医薬品部会（2017年6月13~15日）において、「獣医療用の同種他家幹細胞由来製品に関するQ&A：無菌性に関する質問」が採択され、ウェブサイトにて公開された。このQ&Aは獣医療領域での新規治療法に関するアドホックグループ（ADVENT）で協議、合意され、パブリックコメントを経て同部会に上程され、採択・公開されました。

近年、獣医領域において同種他家幹細胞由来製品の利用の増加を背景に、医薬品製造者、規制当局者、利用者の抱く質問が増加し、焦点の一つに最終製品の無菌性に関する問題があります。同種他家幹細胞由来製品は非経口投与型の動物用医薬品であり、直接体内に注入されることから、無菌性が担保されるべきものですが、製品の活性成分は不均質な生細胞であるため、物理的、化学的方法によって滅菌できない特性を持っています。また、幹細胞由来製品中のエンドトキシン存在は安全性への重大な懸念です。

ヒト細胞由来製品が無菌であることを要求する指針等は欧州、米国共に存在します。しかし、動物細胞由来製品に関しては、一般的要件として無菌性を要求するガイダンス文書が米国にはありますが、欧州には獣医療用幹細胞治療製品に関する特別な指針は現在ありません。しかし、EUのGMPでは、人体用医薬品、動物用医薬品の製造ともに適用すべき基本原則が示され、先進治療医薬品を含む人体用生物学的製剤の製造に適用される付属書2の原則規定が獣医療用の幹細胞由来製品にも適用可能と考えられています。

欧州薬局方には、動物用生物学的製剤を含む医薬品の微生物学的制御のための種々の試験法や推奨すなわち、無菌性、マイコプラズマ、細胞由来製品の微生物制御、微生物学的品質管理の代替法、無菌試験のためのガイドラインなどが記載され、遺伝子導入ヒト用医薬品についてもこれらの特性について試験することを勧告しています。最近、生物由来原材料に関する指針も収載されました。

米国薬局方には「細胞、組織由来製品」に特化した章があり、無菌性、マイコプラズマ、エンドトキシンに関する試験法が他の事項と共に含まれています。

幹細胞由来製品の微生物学的制御とその管理方法は、すべての細胞調製品の工程管理と品質評価にとって重要な視点であり、製造工程中の適切に選ばれた管理点で微生物否定試験が設定される必要があります。また、最終製品では細菌、真菌、マイコプラズマ、エンドトキシンの否定試験が求められます。しかし、幹細胞由来製品では最終製品は極めて短い期間内に使用されるので、微生物学的管理のための手法は限定されるか、投与前に検査結果を得る検査は通常実施できません。

以上のような背景のもと、本資料には幹細胞由来製品の無菌性について8つの質問に関する見解が示されています。

Q1：幹細胞由来製品の製造過程及び最終製品に対する無菌性管理のために利用可能な取り組み、手法、更なる課題として推奨できることはありますか？細胞由来製品の最終製品について、細菌、真菌、マイコプラズマの否定（無菌性）はどうやって保証されますか？

Q2：幹細胞の調達(sourcing)と採取(collecting)に際して無菌技術を完全に実行することは必ずしも可能でないことを考えれば、どのような手段が推奨されていますか？

Q3：原材料は潜在的な微生物の汚染源であり、その無菌性はどのように保証できますか？

Q4：製造工程全体における一般的な無菌性と安全性に関して推奨することはありますか？

Q5：製造工程中のいつの時点で無菌試験をするのが重要ですか？

Q6：幹細胞由来製品の最終製品の無菌試験には、適切な（迅速）微生物学的方法と有効な代替試験方法のどちらが適用できるか、また適切ですか？

Q7：PCR法は無菌試験の代替法になりますか？

Q8：幹細胞由来製品におけるエンドトキシンの存在は安全性の懸念であり、幹細胞由来製品の製造におけるエンドトキシンに関する品質管理はどのように行うことができますか？

最終的な無菌試験の結果が得られる前にその製品が投与されるという事実に照らせば、幹細胞製品の最終製品の無菌性を保証することは重要であり、幹細胞由来製品の無菌保証のプロセス全体に取り組むために、より詳細な点について質疑が繰り広げられています。

幹細胞由来製品は非経口投与の動物用医薬品であるため、それらは無菌でなければなりません。幹細胞由来製品が生きている細胞であるという特性からそれ自身を滅菌することは出来ません。そして、最終製品は最終的にろ過等による滅菌もできないため、製品の無菌性は極めて難しい要素です。よって、最終製品の検査に依存するだけでなく、全体的な微生物学的制御戦略を確立することが非常に重要です。製品の微生

物学的清浄性は、適切な規格に合致し検査された出発材料、原材料を使用し、適切な工程管理の下で有効な無菌製造工程を適用することによって保証されるべきです。材料の調達から完成品となるまでの製造工程全体における厳密な微生物モニタリングが必要です。

◎同種他家幹細胞由来製品の安全性確保にとって微生物学的管理が極めて重要なため、迅速かつ網羅的微生物検査法の開発が進んでいます。一方、獣医療での幹細胞治療においては安全性だけでなく、有効性の適切な評価系の確立も大きな課題です。

(濱岡 隆文)

編集後記

つい最近の"Science, News"に、放牧した牛でも気候変動は救えない (Grass-fed cows won't save the climate, report finds : <http://www.sciencemag.org/news/2017/10/grass-fed-cows-won-t-save-climate-report-finds>) という記事が掲載されました。英国のオックスフォード大学を中心とした Food Climate Research Network (FCRN) の研究者たちのレポートによると、反すう家畜に穀物ではなく牧草を給与すると温室効果ガスの排出を削減できるという主張には科学的な根拠はないそうです。研究者の一人は「牛のような反すう家畜をグラスフェッドで飼育しても気候変動は解決できず、肉の摂取量を減らすことが唯一の解決策である。」と述べています。一方、国連食糧農業機関 (FAO) などが昆虫をタンパク質源として利用する取り組みを進めており、世界中で消費されている畜肉の半分を昆虫の肉で置き換えれば、農地をおよそ 1/3 減らすことが可能であるとの見積もりもあるようです。近い将来、私たちの食卓に昆虫タンパク質が上るのが当たり前になるのかもしれませんが。ただ、上記のレポートには反論も多く、たとえば英国やアイルランドのように雨が少なく他の作物の栽培に適していないところでは、放牧による畜産物の生産が最も適していると主張している研究者もいます。また、昆虫食を進めることのマイナスな要素についての検討も必要でしょう。食料増産と地球温暖化対策をどのように両立させるかということは非常に大きな問題ですが、多くの要因が絡んでいて画一的な対応が難しいことを改めて再認識させてくれた記事です。

編集委員長 宮崎 茂

新動薬情報 2017年 第2号

編集：新動薬情報編集委員会

編集委員 委員長 宮崎 茂

委員 山本 譲、橋爪 昌美、丸山 賀子、永田 尚子、小濱 純、
中村 佳子、佐藤 彩乃、柳 充紘