

遺伝子組換えイチゴを原薬とする動物薬の開発

田林 紀子^{1*}・松村 健²

植物の遺伝子組換え技術を利用して、植物で抗体を発現させた最初の報告から今年でちょうど25年目となる。この間、治療用抗体やワクチンなどの医療用物質を遺伝子組換え植物で生産させる技術開発は、欧米の研究機関を中心に盛んに行われており、遺伝子組換え植物細胞の培養による動物薬、人体薬の承認例も報告されている。しかし、植物による医薬品生産の優位性の一つである抽出・精製を経ない、すなわち、植物体そのものを原薬とする医薬品開発成功はいまだ例がなかった。

一方、我々は、上記の優位性を考慮し、遺伝子組換え植物体を原薬として利用する経口投与可能な医薬品開発を行ってきた。以下にその概要を記載する。

開発の背景

植物の遺伝子組換え技術を利用した有用物質生産技術の開発には、他の生物生産系と比較して低コスト、拡大生産性、保存安定性、安全性（動物由来病原体の混入の回避）などの利点が提唱されている。この利点を生かして、欧米を中心に、さまざまな植物を用いたサイトカイン・ワクチン・治療用抗体などの高付加価値物質を生産する研究開発が進められており、これまで、遺伝子組換え植物細胞の培養・抽出による動物薬、人体薬の承認例・試薬生産は報告されている。欧米諸国の開発は、当初から上述のような医薬品生産遺伝子組換え植物を圃場で生産（栽培）することを前提としており、2002年に米国食品医薬品局（FDA）、欧州医薬品庁（EMA）からそれぞれ圃場での栽培ガイドラインが公布され、その後、米国農務省（USDA）およびEMAからの改訂などを経ている。しかし、欧州では食料や飼料用途の作物種を利用した医薬品などを生産する遺伝子組換え植物の圃場栽培に対する懸念が示される一方、非食料・飼料作物であるタバコを用いた遺伝子の一過性高発現系が開発されるなどの技術的背景から、近年では、タバコを用いた一過性発現系による開発が激増し、トウモロコシやコメなどの可食性作物を用いた研究報告は減少している。

国内の規制 医薬品原材料を生産する遺伝子組換え植物は、食品・飼料としての安全性を必ずしも担保するものではないため、その生産系の構築も検討しておかなければならない。そこで、我々は、遺伝子拡散防止措置の観点から「拡散防止措置を施した植物工場」での生産

（栽培）系を構築することとした。国内の場合、カルタヘナ国内担保法の下で、遺伝子組換え植物の第二種産業使用（環境への拡散を防止しつつ行う）に関して、「遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成16年財務省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第1号）」が制定されていたが、当初の省令においては遺伝子組換え植物に関する記載はなかった。しかし、2006（平成18）年6月6日の改訂により、遺伝子組換え植物の取扱が加えられたため、第二種使用等拡散防止措置確認申請書を作成し、主務大臣へ提出・確認を受けることで、二種利用による栽培・生産が可能となった。

宿主植物 我々は、生食・加工食とも可能で、かつ嗜好品であるイチゴ（*Fragaria × ananassa* Duchesne）を宿主として、経口用途を考慮した有用物質生産、医薬品には限らず、機能性食品を視野に入れた開発を行っている。イチゴは、ビタミンC、葉酸、エラグ酸、キシリトールといった成分を含有し、それ自体が機能性食品のような果実である。このような非加熱で利用可能な食品として身近で、食経験の歴史が長いイチゴの利用用途は、さまざまな応用が可能であり、後述する植物工場での栽培においても優位な点があげられる。また、栄養繁殖性という世代を更新しない特徴を生かした生産体系で増殖可能である特徴より、植物でのシードロットシステムを構築する際に容易であると推察し、これが医薬品開発において、バイオマスや生育速度の観点より重要な点と考えた。もちろん、種子増殖性の作物種においてもシードロットシステムの構築は可能であるが、ホモ化工程、および、その際生じる導入遺伝子のサイレンシング誘導のリスクは考慮しなければならない。

動物薬開発 開発目標の剤としては、ワクチンからさまざまなサイトカイン分子種に至るまで多くの候補を有していたが、

- ・人体薬に比較して開発期間が短い
- ・低コスト化が望まれる
- ・注射などを使用しないストレスフリーの投与方法、在宅投与が強く望まれる
- ・現存の競合医薬品が存在しない
- ・インターフェロン α の低用量経口投与が、さまざまな感染症や慢性疾患の予防・治療方法として効果的であ

* 著者紹介 ¹ホクサン株式会社 植物バイオセンター動物薬課
²独立行政法人産業技術総合研究所

ることが知られている
 などの点を考慮して、イヌインターフェロン α (CaIFN α)
 を発現するイチゴによるイヌ歯周病治療薬の開発を優先
 的に取り組んできた。歯周病は口腔内細菌の慢性的な感
 染が一因となって引き起こされる疾病であり、成犬の約
 8割が罹患していると言われている。現時点においても
 有効な動物医薬品がなく、非常に開発需要の高い剤だと
 考えられた。

開発の概要

CaIFN α 遺伝子組換えイチゴの作出 我々は、最初
 にバキュロウイルス系で発現・抽出・精製したCaIFN α
 の微量経口投与試験を実施し、細胞内寄生菌の減少・歯
 肉炎指数の低下などの結果を得た。その後、CaIFN α 遺
 伝子を植物発現ベクターへ挿入し、これをイチゴへ遺伝
 子導入した。得られた組換えイチゴ系統すべてにおいて
 CaIFN α の生物活性を解析した結果、植物体1g当たり
 10,000単位以上のCaIFN α の発現を示す系統が複数得ら
 れた。これらのイチゴ果実の凍結乾燥粉末を用いて、イ
 ヌへの投与試験（歯肉への塗込）を行い、歯肉炎指数に
 よる評価（表1）を行った結果、歯肉炎の軽減効果が認
 められた（図1）。

さらに、高用量投与においても副作用が引き起こされ
 ないことも確認された。これらの結果を踏まえ、投与プ
 ログラムの検討を行った。

密閉型遺伝子組換え植物工場システム 実験室レベ
 ルでの組換えイチゴの治癒効果確認には成功したが、こ
 れを医薬品としての実用化につなげるためには、栽培か
 ら製剤化工程までを、医薬品製造の基準に適合させる前
 例のない概念の確立と実現が必要不可欠であった。一部
 の例をあげると、事業化を目指した観点からの組換えイ
 チゴ系統の選抜、申請に必要なだと考えられうる種々・詳
 細な解析、大量増殖系の構築、および、栽培工程の計画
 性・再現性・安定性を確保した管理・原材料供給体制、
 加えて、医薬品生産に必要な、安定した生産量・品質管
 理・高い清浄度の維持・再現性などの厳しい工程管理を
 行う新たなシステムの構築である。

上記システムの構築のために、（独）産業技術総合研
 究所では、医薬品製造を想定した高性能植物工場の開発
 を世界に先駆けて開始した。この際重視したのは、遺伝
 子拡散防止措置だけではなく、医薬品原材料生産の観点
 からの工場開発である。結果として、完全人工光型植物
 工場をベースに、good manufacturing practice : GMP
 対応ハード・ソフトの構築を考慮した設計、多種多様な
 植物種の栽培環境を人工的に構築可能な高性能環境制御
 システムなど複合的性能を融合した新たな医薬品生産を
 目的とした植物工場を開発するに至った。

表1. 歯肉炎指数 評価

スコア	症状
0	歯肉縁に炎症が認められない
0.5	歯肉縁に軽度の炎症が認められる
1	歯肉縁にはっきりとした炎症が認められる
2>	歯肉縁にはっきりとした炎症及び出血が認められる

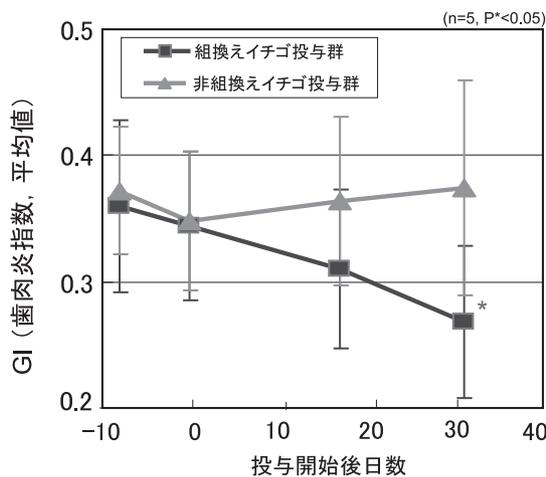


図1. 歯肉炎指数の推移

開発した当該工場において、CaIFN α 遺伝子組換えイ
 チゴ培養株の順化から果実採取、原材料生産に至るまで
 の技術開発、およびstandard operating procedure : SOP
 の構築を行ってきた。これらが構築できて初めて、製造
 工程・品質規格および品質管理試験の構築・確定が可能
 となり、これらの確定された工程において生産した原薬
 が、安全性試験・臨床試験へと初めて供給可能となった。

植物工場でのイチゴ栽培検討 イチゴの光要求量は
 約200~300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であり、草丈が低いので多段
 式の栽培システムが採用できた。この点も上述したイチ
 ゴの宿主植物としての優位性である。

蛍光灯を用いたnutrient film technique: NFT方式の栽
 培棚を設計し、これを30 m^2 の栽培室の中に設置した。
 遺伝子組換えに用いたイチゴ品種“エッチエス-138”の
 草型から株間を考慮し、栽培可能株数は約550株/室ま
 でのとした。栽培条件（温・湿度、光量、養液、栽培期間
 など）の検討および、栽培工程の改善を積み重ね、
 CaIFN α 遺伝子組換えイチゴの栽培工程を確定した。一
 方、栽培とは別に、イチゴの栄養繁殖性を利用したシー
 ドロットシステムの構築、栽培用苗の安定供給体制も構
 築する必要があった。また、本剤は、イチゴ果実を原薬
 とするため、品質管理はイチゴ原薬で実施することにな
 る。したがって、収穫したイチゴ果実そのものの清浄度
 管理は非常に厳しく実施されなければならない。すなわ
 ち、栽培工程全期間において、栽培室そのものの環境、



図2. 植物工場でのイチゴ栽培

栽培作業などの清浄度管理が重要である。現在、清浄度管理を実施しながらの培養株の順化から果実採取、原材料生産までの栽培・製造工程をほぼ確定し、栽培室での栽培を年2作行うことにより、実生産規模の平均250 kg/年の果実の安定的、計画的生産が可能となっている(図2)。

安全性試験・臨床試験 遺伝子組換えイチゴ果実の凍結乾燥粉末を原薬とし、試作製剤(治験薬)を作製した。安全性試験項目としては、対象動物の安全性、急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性などを行った。結果として、各試験において、何ら異常と判断される事象は認められなかった。

臨床試験は、二重盲検174症例について、治験薬または対照薬を歯肉に塗込投与(3乃至4日間隔で5週間連続、合計10回)し、その有効性および、安全性(臨床症状、体重及び血液生化学検査)を評価した。有効性は、歯肉炎指数(GI値:gingival index)で評価した。その結果、治験薬群の歯肉炎改善率は、投与開始後2か月目において対照群と比べて有意に高い値を示した($p < 0.01$)。また、治験薬を投与されたすべての犬において、安全性上問題となる事象は認められなかった。

以上の結果から、本剤の歯肉塗込投与によって歯肉炎が軽減されることが明らかとなり、その有効性と安全性が確認された。

保存安定性の確認 我々は、さらに保存安定性に関する確認を行った。原薬となる凍結乾燥果実粉末の力価試験を3か月ごとに行ったところ、24か月経過後も、力価の低下は認められなかった(表2)。主成分がインターフェロンであるにも関わらず、原薬の長期室温保存にお

表2. CaIFN α 4発現イチゴ果実凍結乾燥試料の力価推移

(LU/g, 平均値 n = 3)			
試験開始後月数			
保存温度	試験開始時	12か月目	24か月目
2-10°C	1.5×10^5	1.6×10^5	1.5×10^5
室温	1.5×10^5	1.5×10^5	1.4×10^5

いてもインターフェロン活性が失活しないことは、特筆すべきことである。現在、加速試験においてさらなる保存安定性を検討している。

おわりに

CaIFN α 遺伝子組換えイチゴの作出から遺伝子組換え植物体を原薬とする世界初の動物用医薬品「インターペリー α ®」が承認されるまでで、約10年近い時間を要した。この間、医薬品原材料生産のための植物工場の開発を始め、付随するさまざまな分野における技術開発が必要とされた。また、カルタヘナ第二種産業利用を始め、植物を用いたシードロットシステムの構築、動物薬製造承認、GMP適合性、製造薬販売承認申請に至るまで、多数の前例のない道を開く必要があった。

我々の今回の開発事例が、ごく一部ではあるが、遺伝子組換え植物を用いた医薬品開発の可能性を示せたことにより、「植物の遺伝子組換え」および「物質生産目的の植物工場」という技術の展開が、新たな産業形成へのブレークスルーとなればと考えている。

謝 辞

本研究開発は、NEDO補助事業(2004~2006年度)「バイオプロセス実用化開発」および、経済産業省プロジェクト(2006~2010年度)「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発/植物利用高付加価値植物物質製造基盤技術開発」の課題として実施したものである。

文 献

- 1) Julian, K.-C. Ma and Mich, B. Hein: *Plant Physiol.*, **109**, 341 (1995).
- 2) FDAガイドライン(2004): <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm124811.pdf#search='fda+transgenic+plant+drugs+human+bioengineered'>
- 3) USDAガイドライン(2008): bch.cbd.int/database/attachment/?id=3138
- 4) EMEAガイドライン(2008): http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/09/WC500003152.pdf
- 5) 後藤英司, 松村 健: 月刊BIO INDUSTRY, 1月号, p. 7 (2009).
- 6) 田林紀子: アグリフォトニクスII, p. 145, シーエムシー出版(2012).