カイコを利用した医薬品原料や医療機器等の開発のてびき

農林水産省委託プロジェクト研究
【医薬品作物、医療用素材の開発】

「絹糸タンパク質を用いた小口径人工血管の開発」
「絹糸タンパク質を用いた創傷被覆材、角膜再生材料等新素材の開発」
「カイコによるヒト・動物用医薬品の開発」 コンソーシアム　編

平成28年　3月

序

本てびきは、平成 22 年度から平成 26 年度に行われた農林水産省委託プロジェクト研究「医薬品作物、医療用素材の開発」*（22～24 年度は「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト」として、25 年度は「農林水産資源を活用した新需要創出プロジェクト医薬品作物等開発分科会」として実施）において、以下の 3 つのコンソーシアムにより得られた成果について紹介したものである。

このてびきが、これからカイコを利用した医薬品や医療機器等の開発に取り組むための指針となれば幸いである。

本資料は、「私的使用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断で転載、複製、放送、販売などの利用をすることはできません。転載、複製、放送、販売などの利用の場合には、事前に国立研究開発法人農業生物資源研究所の許可を得てください。

＜絹糸タンパク質を用いた小口径人工血管の開発コンソーシアム＞

国立大学法人東京農工大学
国立大学法人東京大学
独立行政法人　農業生物資源研究所
群馬県蚕糸技術センター

＜絹糸タンパク質を用いた創傷被覆材、角膜再生材料等新素材の開発コンソーシアム＞

独立行政法人　農業生物資源研究所
国立大学法人京都大学
独立行政法人　物質・材料研究機構
国立大学法人新潟大学（H25 年度まで）
国立大学法人信州大学（H25 年度から）
学校法人愛知医科大学（H26 年度）

＜カイコによるヒト・動物用医薬品の開発コンソーシアム＞

独立行政法人　農業生物資源研究所
増田化学工業株式会社
国立大学法人徳島大学
国立大学法人東京大学
国立大学法人群馬大学

株式会社ゲノム創薬研究所

独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構　動物衛生研究所

独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構　畜産草地研究所

株式会社免疫生物研究所（H23 まで）

＊参画機関の名称は、プロジェクト参画当時の名称で記載しております。

目次

1. カイコを利用した医薬品や医療機器のメリット ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

１－１．医薬品用組換えタンパク質の生産や医薬品のスクリーニングに遺伝子組換えカイコを用いるメリット

１－２．再生医療用等の医療機器の原料としてシルク（絹糸ならびにフィブロインタンパク質）を用いるメリット

2. 医薬品や医療機器として開発するための留意点 ・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

２－１．高品質の医薬品用組換えタンパク質を遺伝子組換えカイコで生産するための留意点

２－２．安定した品質の医療機器用シルク原料（絹糸ならびにフィブロインタンパク質）を生産するための留意点

3. 既製品、類似品との比較によるメリット・デメリット ・・・・・・・・・・・・・・・ 12

4. 事例集 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16

４－１．組換えカイコによるヒトリソソーム病治療薬の開発

４－２．組換えカイコによるウシ乳房炎治療薬の開発

４－３．ヒト病態モデルカイコを用いた医薬品の開発

４－４．小口径人工血管材料の開発

４－５．フィブロインタンパク質基材上での細胞の動的挙動に関する基礎的知見

４－６．軟骨再生材料の開発

４－７．角膜再生材料の開発

４－８．神経再生材料の開発

5. 利用・応用する上での留意点 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

５－１．遺伝子組換えカイコの使用についての留意点（カルタヘナ法）

５－２．審査機関（PMDA）からの指摘事項とその対応案

５－３．コスト試算

５－４．養蚕農家やシルク関連産業の現状

５－５．絹糸ならびにフィブロインタンパク質を原料とした医療機器を利用・応用する上での留意点

6. 他の昆虫素材等への応用の可能性 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43

６－１．他の昆虫由来シルク原料

７. 用語集　・・・

１．カイコを利用した医薬品や医療機器のメリット

１－１. 医薬品用組換えタンパク質の生産や医薬品のスクリーニングに遺伝子組換えカイコを用いるメリット

１）エンドトキシンや病原体等の混入がない

カイコ絹糸腺における組換えタンパク質発現系では、絹糸腺抽出液および抽出した組換えタンパク質においてエンドトキシン混入の問題がないことが本プロジェクトにより確認されている。また、カイコは基本的に植物（桑葉）だけを栄養源として生育できるため、血清等の動物由来材料の使用による感染症等のリスクがない。さらに、カイコは無菌に近い状態での飼育が可能であり、医薬品の製造工程で動物由来のウイルス遺伝子やがん遺伝子が混入するリスクも低いと考えられる。

２）糖鎖構造が比較的ヒト型に近い

カイコの絹糸腺で発現させた組換えタンパク質の N 結合型糖鎖においては、組換えバキュロウイルスによる体液でのタンパク質発現系と比べて α1,3-フコース（昆虫特異的で抗原性が懸念される）の付加がほとんど無く、比較的ヒト型に近い糖鎖構造（末端にガラクトースやシアル酸が付加されず完全なヒト型ではない）を持つ（Iizuka *et al.* 2009）。さらに α1,6-フコースもほとんど付加されず、抗体医薬品の抗体依存性細胞傷害活性が高いことが示されている（瀬筒, 立松 2014）。糖鎖修飾系を改変し、よりヒト型に近い糖鎖を作らせる試みも成功しつつある（瀬筒, 立松 2014）。

３）組換えウイルスの残存がない

組換えバキュロウイルスを用いた一過性タンパク質発現系（昆虫細胞・カイコ幼虫）とは異なり、組換えカイコを利用した発現系では、組換えウイルスが組換えタンパク質に混入する恐れが無い。

４）ヒト等の機能性タンパク質が活性を維持した形で発現

フィブロインに発現させた機能性タンパク質として、各種蛍光タンパク質（Iizuka *et al.* 2013）や成長因子（FGF 等）（Hino *et al.* 2006）がすでに知られている。セリシン層に発現させた機能性タンパク質の例では、蛍光タンパク質・抗体・その他がある（Iizuka *et al.* 2013）。他の機能性タンパク質についても、繭層中あるいは絹糸腺内では活性を保って分泌されると期待できる。

５）製造ロットごとの組換えタンパク質発現量のばらつきが小さい

系統化した組換えカイコでは、組換えバキュロウイルスによる一過性発現系や培養細胞を用いた発現系とは異なり、個体間での組換えタンパク質の発現量が比較的均一であることが、本プロジェクト等により示されている。

6）組換えタンパク質の抽出・精製が容易

絹糸腺で合成されるタンパク質（フィブロイン・セリシン・その他）は大部分が同定されており（Sehnal, Sutherland 2008）、他の生産系と比べて夾雑成分が極めて少ない。そのため、発現させた組換えタンパク質の分離精製が容易である。特に中部絹糸腺で発現させた場合、繭糸を緩衝液に浸漬するだけの簡便な操作で組換えタンパク質を抽出できる。

7）卵巣や精子の凍結保存技術によりセルバンクに類するシステムが構築可能

受精卵は約 1 年間保存でき、ワーキングバンクに相当するものとして一定の世代数は利用可能と考えられる。また、凍結保存した卵巣の移植技術や精子の人工授精技術の高度化により、セルバンクに相当するバンクとして、カイコ系統を長期保存することが可能となりつつある（Banno *et al.* 2013）。その一方で、受精卵の凍結保存技術は確立されておらず、今後の研究開発が必要である。

8）生産規模のスケールアップが容易

カイコは 1 世代約 2 ヶ月で 200 倍程度に増殖できるため、計算上 1 ペアのカイコから半年で 800 万個体へ増殖できる。大規模な養蚕農家であれば 100 万頭単位での飼育も難しくはなく、大量飼育の技術やノウハウは確立されている。ただし、現状では組換えカイコを飼育できる施設（第二種使用が可能な施設）に制限がある。

9）新規医薬品候補のスクリーニングに組換えカイコを使用可能

ヒト遺伝子等を導入した組換えカイコを病態モデルとして利用し、化合物ライブラリーや天然物ライブラリーから新規医薬品候補をスクリーニングすることも可能である（浜本, 関水 2014）。薬物の体内での安定性等（体内動態）を考慮した医薬品スクリーニングが可能となり、培養細胞等を使ったスクリーニングよりも有効であり、マウスやラットを用いるよりも低コストで動物愛護の問題がない（浜本, 関水 2014）。スクリーニングにより見つかった候補化合物は、通常の医薬品と同じプロセスでその後の開発が行われる。

１－２．再生医療用等の医療機器の原料としてシルク（絹糸ならびにフィブロインタンパク質）を用いるメリット

1）エンドトキシンや病原体等の混入リスクが低い

１－１．１）で記載した理由により、カイコが吐糸した直後の繭糸やカイコの絹糸腺から取り出したフィブロインタンパク質ではエンドトキシンや病原体等の混入がないと期待される。

２）強度・強靭性に優れ成形加工が容易

絹糸は天然で唯一の長繊維であり、強度・強靭性に優れている。絹糸の構成成分であるフィブロインタンパク質は高い自己組織化能を有し、いったん溶液化した後に架橋等の化学処理を行うことなく水に不溶かつ強度の高い様々な形態（フィルム・パウダー・ゲル・スポンジ等）に加工できる（Asakura and Kaplan 1994, Rockwood *et al.* 2011, Asakura *et al.* 2015）。水溶媒系で加工することができ、プロセスの工夫により目的に応じた物性にある程度調整できる。

３）生体安全性が高い

絹糸は縫合糸として長らく外科治療に用いられてきた実績から、発がん性などの未知の危険性が少ない。フィブロインタンパク質を加工原料として用いる場合は、溶解・透析・遠心等の処理が加わるため、絹糸よりも純度が高い状態で利用できると考えられる。実際に、「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方（薬食機発０３０１第２０号）」に準拠した試験をフィブロインタンパク質材料に対して実施し、本材料が安全性の高い材料であることを確認している（玉田ら 2015）。また、マクロファージ等の炎症系細胞による *in vitro* 評価や補体活性化評価による炎症評価あるいは動物埋植評価による生体反応性の評価により、フィブロインタンパク質材料が重篤な炎症反応を惹起しないことが報告されている（玉田 2007）、また、絹人工血管をラットやイヌに長期間（約 2 年）移植した実験において、毒性等に関して問題がないことを確認している（早乙女ら 2014）。

４）生分解性をもつ

繭から直接採取した絹繊維で作製された人工血管を動物体内に長期埋植すると、1 年後には生分解により絹糸の 70%程度がコラーゲンと置き換わることが報告されている（Enomoto *et al.* 2010）。また、絹糸およびフィブロインタンパク質（スポンジ材料）の生分解性を「制御されたコンポスト条件下の好気的究極生分解度及び崩壊度の求め方（ISO14855/JIS K6953）」に準拠した試験によりポリ乳酸フィルムと比較した結果、45 日間の評価では絹糸はほとんど分解されなかったのに対し、フィブロインスポンジはポリ乳酸の 1/3 程度の分解性を示すというデータが得られている（玉田, 平井 未発表）。同様に、フィブロインスポンジ小片をラットの皮下に埋植した実験において、200 日程度経つと約 7 割が皮下組織から炎症を起こすことなく排出されることを確認している（朝倉, 田中 2014）。したがって、加工プロセスを経ることによって絹糸よりも生分解

性が高い材料をフィブロインタンパク質から作製することも可能である。なお、加工条件によってフィブロインタンパク質材料の生分解性を制御する試みも報告されている（Lu *et al.* 2011）。

５）細胞分化誘導作用をもつ

フィブロインタンパク質フィルム上で培養した線維芽細胞は、コラーゲン・培養ディッシュ・ガラス上で培養した細胞よりも細胞外マトリックスタンパク質遺伝子の発現が高いことを明らかにした（Hashimoto *et al.* 2012）。このことは、フィブロインフィルム表面で培養した線維芽細胞が分化方向に誘導されていることを示唆している。

６）遺伝子組換えにより物性や機能性を改変・制御できる

遺伝子組換えにより絹糸やフィブロインタンパク質材料の力学物性（強度・伸度・弾性率等）を改変する手法が確立されつつある。これまでに、クモの縦糸タンパク質を発現させることで、生糸の強度、伸度、強靭性がそれぞれ 13%、42%、53%程度向上しており（Kuwana *et al.* 2014）、今後さらなる技術の進展が期待される。

また、遺伝子組換えにより成長因子等の生理活性タンパク質を融合させることで、様々な機能性を付加したフィブロインタンパク質を生産できる。すでに作出に成功している FGF 融合フィブロイン（Hino *et al.* 2006）は、膝半月板治療や中枢神経治療など多くの再生医療技術に応用できる可能性がある。フィブロインタンパク質に生理活性物質を融合させた場合の活性の大小は、融合させるタンパク質の種類に依存する。細胞接着活性をもつ RGD モチーフのような短いペプチドの場合は、融合させるタンパク質にはほとんど制限はないと思われるが、FGF 等の生理活性タンパク質の場合には、繭糸から精練・溶解・透析等のプロセスにおける様々な処理（アルカリ，変性剤，加熱等）を経ることで、活性を失う恐れがある。その場合、絹糸腺から溶液状のフィブロインタンパク質を取り出して原料とすることで、精練・溶解・透析といった一連のプロセスを省略することができ、活性の消失を防ぐことができる。

２．医薬品や医療機器として開発するための留意点

２－１.高品質の医薬品用組換えタンパク質を遺伝子組換えカイコで生産するための留意点

１）組換えカイコ系統の持つ特性（品質）および系統の安定保存

培養細胞を用いた医薬品開発においては、医薬品の品質の恒常性を確保するためにセルバンクが必要である。組換えカイコでの医薬品生産においてもセルバンクに相当するバンクの構築が必要と考えられ、１－１．７）に記述したように基盤技術が整いつつある。今後、カイコを用いて製造されるバイオ医薬品の品質確保のため、バンクや組換えカイコ個体の評価法や評価基準を確立する必要がある。

２）カイコで作らせる医薬品用タンパク質の活性や安定性等の向上

遺伝子組換えカイコによりタンパク質を生産させる場合、タンパク質の生産量にロット間差が少ないことが本プロジェクト等でも示されているが、組換えタンパク質ごとに確認が必要である。

３）発現量を増加させる技術の向上

現在、GAL4/UAS 系、IE1/hr3 系等のバイナリー発現系が利用されており（瀬筒, 立松 2014）、カイコ 1 頭あたりの組換えタンパク質の生産量は、100 μg ~ 10 mg 程度であるが、新たな発現系やゲノム編集技術を用いることにより、今後さらにカイコ一頭あたり数 10 ~ 数 100 mg 程度に生産量が向上すると見込まれる。

４）タンパク質抽出・精製技術の向上

組換えタンパク質の抽出・精製法はタンパク質ごとに異なるが、基本的には絹糸腺または繭からの粗抽出液をカラムクロマトグラフィー等によって精製する。組換えタンパク質は、絹糸腺内では液状のセリシン中に含まれ、繭中では固まったセリシン中に含まれる。繭はほぼ純粋なタンパク質（セリシンおよびフィブロイン）であり、夾雑タンパク質が少ないが、組換えタンパク質の種類によっては、繭からの回収効率が悪かったり、抽出・精製過程で活性が低下したりすることがある。このような場合には、絹糸腺からの抽出が有効な場合もある。また、繭の切開や絹糸腺の摘出については、いずれも自動装置の開発が望まれる。

５）製造工程由来不純物混入の防止

製造工程由来不純物として、セリシン等のカイコ由来タンパク質が免疫原性等をもつことが懸念される。カイコ由来 DNA の混入も考えられるが、DNA については、ヒト感染性のウイルス遺伝子等のリスクは低いと考えられる。これらの残存量について

は、培養細胞を用いて生産する場合と同等以下に減らすべきと考えられ、そのための精製法の確立が必要である。

６）医薬品原料生産用のカイコの飼育管理法

医薬品の製造工程管理に基づき、個体の生育状況・衛生環境等のモニタリングが必要と考えられる。また、医薬品原料の管理としては、飼料の管理も重要であるため、人工飼料の使用が適していると考えられる。人工飼料に含まれる桑およびに付着する微生物類も考慮する必要があるが、製造工程で滅菌されているため、ウイルスや病原体等の混入の懸念はないと考えられる。

２－２. 安定した品質の医療機器用シルク原料（絹糸ならびにフィブロインタンパク質）を生産するための留意点

１）ロット間差異

医療機器としてシルク原料（絹糸ならびにフィブロインタンパク質）を用いる上で最も重要な点は、ロット間差異を可能な限り低減させることである。一例として、フィブロインナノファイバーの製造においては、原料の性状にばらつきがあると紡糸工程が不安定化し、結果として安定したナノファイバーが得られない。その結果、生分解性や強度等の物性が変化し、生体内での挙動に大きな影響が出ることが懸念される。

ロット間差異を可能な限り低減するためには、下記の点に留意する必要がある。

- 飼料（桑葉・人工飼料）に含まれる重金属等がシルク原料に移行することが考えられるので、カイコ飼育時の飼料管理を徹底する必要がある。
- シルク原料の特性（高次構造・溶解性等）は、カイコ飼育・営繭・保管の各条件で変化する。特に、営繭環境の悪化（高湿度化）によって溶解性が大きく低下することが知られているので、フィブロインタンパク質を加工して利用する際には留意が必要である。
- 原料となるフィブロインタンパク質を、絹糸腺内から取り出すのか、絹糸から得るのかによって、材料の製造に必要な工程が異なる。また、由来が異なると、フィブロインタンパク質の特性が変わることから、作製した材料の性質も異なるため、留意が必要である。

２）シルク原料の保管方法

繭の乾燥方法・蛹の処理法・カビの防止法・害虫による繭や生糸等の食害防止法等について、応用目的ごとに明確にしておくことが必要である。

３）飼育施設の管理におけるマニュアル化

カイコの飼育には、各齢での飼育管理の他に蚕室や蚕具の洗浄・消毒等が必要である。特に蚕室の消毒については、ホルマリン等の薬剤散布管理ならびに処置後の除去作業等が必要で、有害化学物質の取扱方法などのマニュアル化が必要である。

4）滅菌手法ならびに滅菌状態を保つ方法

絹糸やフィブロインタンパク質材料は多くの場合オートクレーブ滅菌が可能である点は有利と言える。しかし、材料の形態や応用によってオートクレーブ滅菌が適用できない場合（例えば、熱による物性や形態の変化が材料としての許容範囲を超えてしまうような場合）は、他の滅菌法（γ線滅菌・濾過滅菌など）を検討する必要がある。

３．既製品、類似品との比較によるメリット・デメリット

【医薬品用組換えタンパク質生産ホストとして】

他の代表的な組換えタンパク質生産系（大腸菌・哺乳類培養細胞等）との比較を下表にまとめる。

表３－１　代表的な組換えタンパク質生産系の特徴

	大腸菌	酵母	カイコ（ﾊﾞｷｭﾛｳｲﾙｽ系）	カイコ（繭・絹糸腺）	哺乳動物培養細胞
生産コスト	低い	低い	比較的低い	低い	高い
生産できるタンパク質	単純タンパク質	単純タンパク質	複雑な構造のタンパク質も可能	複雑な構造のタンパク質も可能	複雑な構造のタンパク質も可能
精製	困難	比較的困難	困難	容易	比較的容易
大量生産	容易	容易	容易	容易	比較的困難

【小口径人工血管材料として】

１）小口径人工血管としての高い開存性

日本を含む世界の急速な高齢化社会や生活習慣病の増加をうけて、慢性閉塞性動脈疾患や心筋梗塞の冠動脈バイパス手術などの臨床に耐え得る口径 6 mm 未満の小口径人工血管の需要は急速に高まっている。しかしながら、既存の合成樹脂製の小口径人工血管では血栓ができやすく、長期間移植して使用する目的では使われていない。従来から外科手術用縫合糸として用いられ、十分な強度と高い操作性を有する絹糸はその素材として非常に有力であり、小口径人工血管開発の高い可能性を有する。

絹糸を素材として作製した小口径人工血管は、ラットへの移植試験の結果、既存の合成樹脂製よりも高い開存性を有することが分かった（図４－１１）（Enomoto *et al.* 2010）。絹糸製の人工血管は高い強度と強靭性を有すると同時に、適度な生分解性により生体中で徐々に分解して自身の血管に置き換わる特性（リモデリング機能）を有する。そのため、成長にともない血管が太くなっていく小児用の人工血管に使用し得る可能性も有し、従来の非分解性素材とは根本的に異なる特徴をもつと考えられる。

２）血液適合性

外部の GLP 試験機関に委託してシルクの血液適合性試験を行った結果、既存の人工血管素材であるポリエステル繊維と同等以上の血液適合性を有することがわかった（Aytemiz *et al*. 2014）。また、医療機器審査 No.36 に準拠して細胞のコロニー形成による毒性試験を行った結果、シルクに毒性がなく安全であることを確認した（朝倉ら 未発表）。

【軟骨再生材料として】

１）軟骨組織の早期形成作用

軟骨細胞を播種したフィブロインスポンジを骨・軟骨の欠損部に貼付することによって、機能的な層状構造を持った軟骨組織が早期に再生した。スポンジ表面に形成される膜様の細胞集団が組織欠損部に移行したためと考えられる。フィブロインスポンジ表面近傍におけるこの再生機序はいまだ不明であるが、本プロジェクトで明らかになった以下の特性が関係しているものと推察される。

- フィブロインタンパク質でコートした基材上に播種した軟骨細胞は、球状を保ったままフィブロイン表面上を高速に移動し、細胞塊を形成する（図４－１６）。
- フィブロインスポンジに播種した軟骨細胞は、増殖と軟骨基質産生の双方を示す（図４－１９）。

２）組織修復環境を保持

上記１）のように組織欠損部に細胞を供給するとともに、組織欠損部を力学的破壊から保護することにより、組織修復環境が保持される。

３）他の材料との比較

細胞シート

細胞シート法は、温度感応シャーレや細胞シート回収用フィルムを用いて細胞からなるシートを作製し、患部に貼付する方法である。（株）セルシードによって、細胞シート練習用キット・細胞シート回収用支持体「CellShifter™」等が販売されており、角膜・心筋をはじめ多くの再生分野における応用が期待されている。フィブロインスポンジを用いた「貼って治す」再生治療では、単層の細胞シートを重ねる方法に比べ、当初から重層した細胞塊を用いるため多くの細胞を患部に供給できるという利点がある。さらに、強度が高い、比較的安価である、培養を必要とせず操作が容易である、など細胞シート法と比較して多くの利点を有している。しかし、現時点では動物実験による実証が不十分である。

また、フィブロインスポンジによる「貼って治す」再生医療においても、臨床医や獣医師が簡便に治療実験を行うことができるフィブロインスポンジシャーレ（図４－２１）とその練習用キット等の販売が必要と考える。

自家培養軟骨ジャック

自家培養軟骨ジャック（患者から採取した細胞を培養によって増やして患部に移植する方法）は、平成 24 年 7 月 27 日に製造販売承認を取得し、培養器材は（株）セルシードによって治験が進行中である。これと比較すると、フィブロインスポンジを用いた「貼って治す」再生治療では、培養を用いないという大きな利点が期待される。また、従来の治療法である高位脛骨骨切り術（HTO）の応用拡大や有効な治療法のなか

った大腿膝蓋関節限局の病態（patellofemoral arthroplasty）の治療をターゲットとしており、開発の必要性は高いが、現時点においては動物実験による実証が不十分である。

人工関節等

人工関節治療はすでに確立した治療法であるが、関節置換術が必要となる上、骨吸収・ルーズニングなどにより再置換が必要となる。また、現時点では若年者への適応は困難である。ペルナックやテルダーミスなどの再生医療品は、フィブロイン材料に比べると強度に劣るコラーゲン材料を基材としており、強い剪断応力下に置かれる軟骨再生に用いるには強度が不十分であると思われる。

【角膜再生材料として】

１）優れた生体適合性と生体内での緩やかな生分解性

家兎角膜実質内にフィブロインナノファイバー不織布を 3 週間埋入した際、不織布内に角膜実質細胞の浸潤が認められた一方で、移植材料周囲に好中球やリンパ球などの炎症反応や免疫反応を示す細胞浸潤は認められなかった（図４－２４）。また、埋入材料内に浸潤したホストの角膜実質細胞が筋線維芽細胞に変化していなかった（図４－２４）。以上のことから、フィブロインナノファイバー不織布は、角膜実質組織に対して炎症・免疫反応を惹起する危険性の極めて低い材料であることが示唆された。

２）材料の高い強度

角膜実質組織は再生能力の低い組織であり、長期（6 ヶ月程度）にわたり強度・構造を維持した形で存在できる足場が求められる。一般的に、フィブロインタンパク質材料は高強度かつ非生分解性とされている。フィブロインタンパク質を加工して作製したフィブロインナノファイバー不織布は、角膜実質内において強度・構造の維持が期待できる材料であるとともに、上記１）で記述したように生体内において角膜実質細胞の浸潤や細胞の形質発現などが可能な材料であることが示された。したがって、フィブロインナノファイバー不織布は角膜再生材料に求められる要件を満たす材料と言える。

３）合成高分子性人工角膜との比較

合成高分子をベースとした人工角膜（AlpheCor など）が開発されているが、3 年のフォローアップでの脱落率が 58%と大きく（Jiraskova *et al.* 2011）、長期安定的に機能するかは疑問である。

一方再生医療をベースとしたアプローチでは、自己組織形成が完結し材料が完全に分解・消失されれば、半永久的に安定である点がメリットとして考えられる。しかしながら、これまで再生医療に用いる足場材料には、コラーゲンやゼラチンをベースと

することが多く、免疫拒絶を起こして繰り返し角膜移植に失敗する患者は、コラーゲンに対するアレルギー反応を起こすリスクが高くなる点や、コラゲナーゼなどの生体酵素による早期分解のリスク、材料それ自体が持つ初期強度が不足している点、などがデメリットとして挙げられる。

【神経再生材料として】

1）損傷部位外部からの保護効果および播種幹細胞の留置効果

フィブロインスポンジは、損傷部位の外からペリサイトやマクロファージが侵入してくるのを防ぐ保護材料として働く結果、神経系組織での炎症系の抑制作用から損傷部瘢痕形成を抑制する作用が認められ（図４－２６）、脊髄損傷の回復促進効果があった。また、損傷領域への細胞移植実験からは、移植細胞を損傷部に保持する機能も高いことが明らかとなっている。2020 年以降開始される iPS 細胞移植治療において、外部からの炎症性細胞の流入を防ぎつつ、移植幹細胞の外部への播種を抑える重要な補助材料となりうる。上記の事由から、フィブロインスポンジは損傷を受けた脊髄の保護ならびに再生材料として適していると言える。

2）生体安全性が高く炎症性などを示さない

脊髄損傷における長期の生体内での安全性や保護作用の確認を目的とした生体内埋植と生体安全性の試験において、炎症性サイトカインの発現等から、フィブロインスポンジは生体炎症作用を増強しないことが明らかになっている。血管系の浸潤が盛んな領域、あるいは、血管系の進入の少ない領域（上記、角膜再生材料の項目を参照）双方において安全性が高い点は、フィブロインスポンジを用いる利点として挙げられる。

3）他の材料との比較

コラーゲン等の他の生体材料との比較を、特に生体安全性の観点から行った。その結果、フィブロインスポンジは他の材料よりも炎症性の誘導が低く、安全性に優れていることが分かった。

４．事例集

４－１．組換えカイコによるヒトリソソーム病治療薬の開発

１）ヒトリソソーム病の１種ガラクトシアリドーシスの治療薬の原料となるヒトカテプシン A の組換えカイコによる生産

組換えカイコを用いて、医薬品等の原料となる組換えタンパク質を生産する方法の概要を以下の図に示す（図４－１）。この方法を用いて、ヒトカテプシン A の生産を行った。

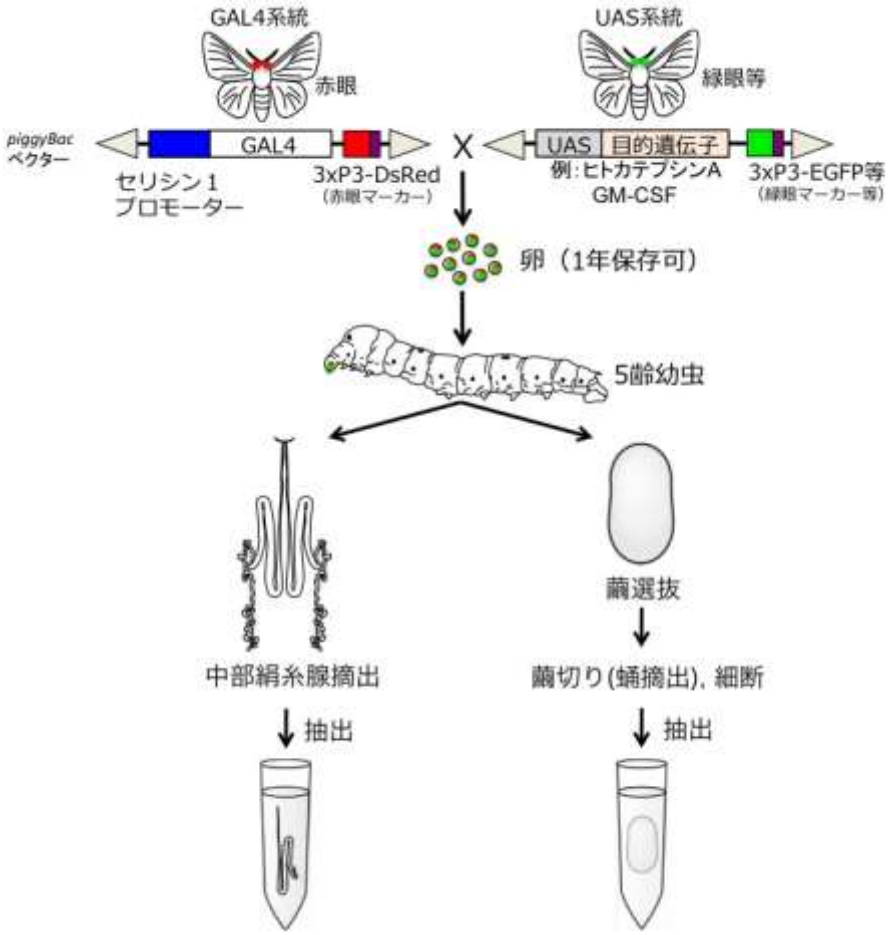


図４－１　カイコで組換えタンパク質を生産する方法

ヒトカテプシン A 等の目的遺伝子を GAL4/UAS 系によって中部絹糸腺で発現させ、中部絹糸腺もしくは繭から目的タンパク質を抽出する方法を開発した。

２）ヒトカテプシン A の大量生産のための組換えカイコの飼育

図４－２　群馬県での組換えカイコの大量飼育と絹糸腺摘出作業の様子

ヒトカテプシン A タンパク質を発現する組換えカイコについて､1 万頭以上の大量飼育を行った。群馬県蚕糸技術センター内の飼育施設において、養蚕農家からなる前橋遺伝子組換えカイコ飼育組合によって飼育が行われた（①～③)。さらに、組換えカイコの中部絹糸腺からヒトカテプシン A を抽出するために、絹糸腺の摘出が行われた（④、⑤)。

３）ヒトカテプシン A の発現および活性等の確認

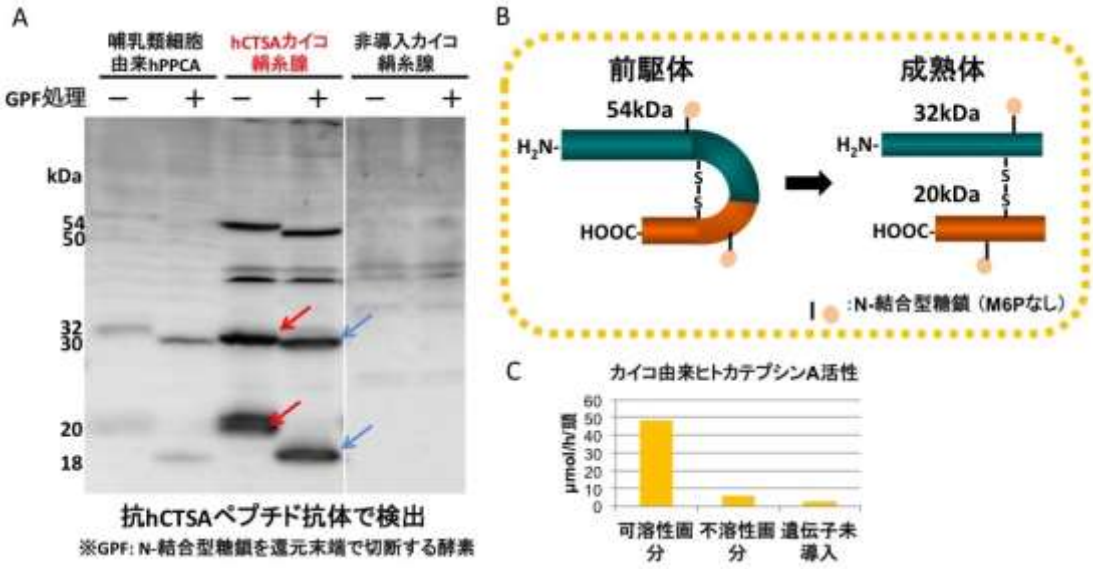


図４－３　組換えカイコによるヒトカテプシンＡ（hCTSA）の発現と活性

絹糸腺からヒトカテプシン A を抽出し発現確認を行ったところ、発現が確認され（A)、細胞内プロセシングにより成熟体型（B）のカテプシン A がつくられていることがわかった（A：赤矢印)。それらは N-結合型糖鎖修飾されていることも確認された（A：青矢印)。さらに、酵素活性を有していることが確認された（C)。

４－２．組換えカイコによるウシ乳房炎治療薬の開発

１）ウシ乳房炎治療薬の原料となるウシ顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の生産

図４−１の方法により、国内で年間約 800 億円の被害があり、従来の抗生物質投与による方法以外の治療法が望まれているウシ乳房炎に関して、新たな治療薬候補として期待される、ウシ顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）の生産を行った。

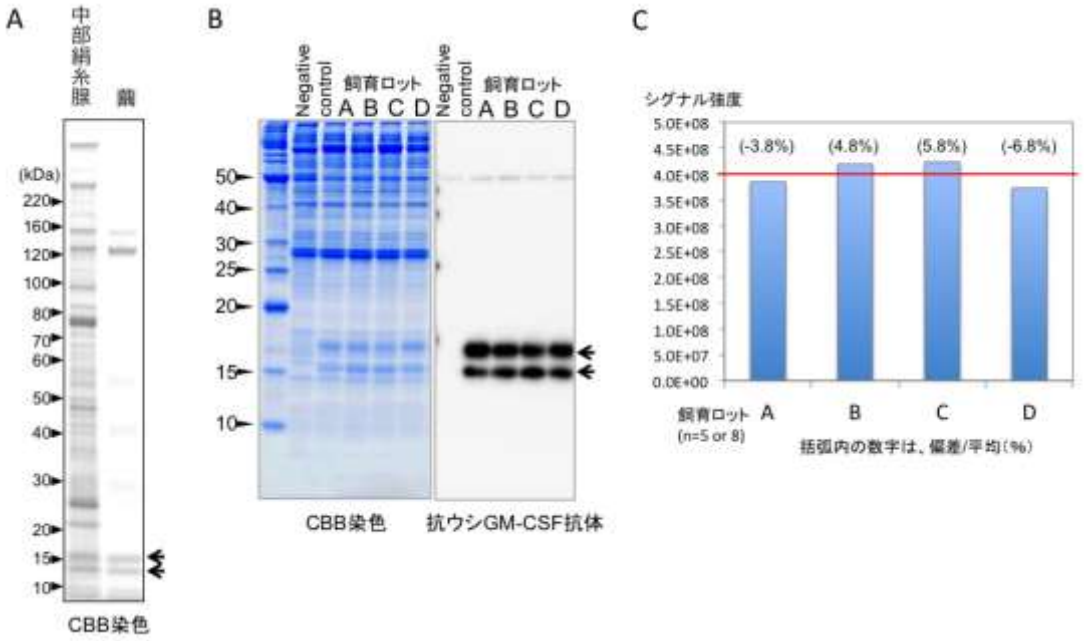


図４－４　組換えカイコの中部絹糸腺および繭で生産されたウシ GM-CSF とタンパク質発現量の飼育ロット間差

中部絹糸腺および繭でウシ GM-CSF を発現させたところ（A)、中部絹糸腺および繭ともに発現が確認された（A：矢印)。繭では夾雑タンパク質が少ないが、抽出効率が低いケースがあることも示唆された。飼育ロットによるタンパク質発現量の違いを比較した結果、ロット間差が少ないことが示された（B、C)。

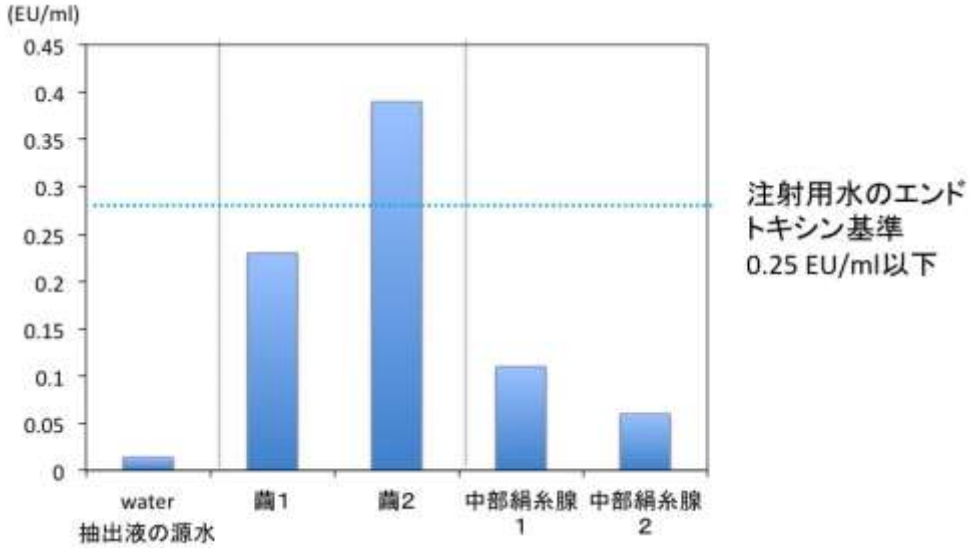


図４－５　中部絹糸腺および繭の粗抽出液のエンドトキシン濃度

製造工程由来不純物の一つとして考えられるエンドトキシンについて調べ

たところ、いずれも精製過程や接種用溶液の希釈調製によって問題の無いレベルと考えられた。中部絹糸腺抽出溶液の方が、繭抽出溶液よりエンドトキシン濃度は低い傾向が示された。

２）組換えカイコ由来ウシ GM-CSF の乳房炎発症牛への投与による治療効果の検証

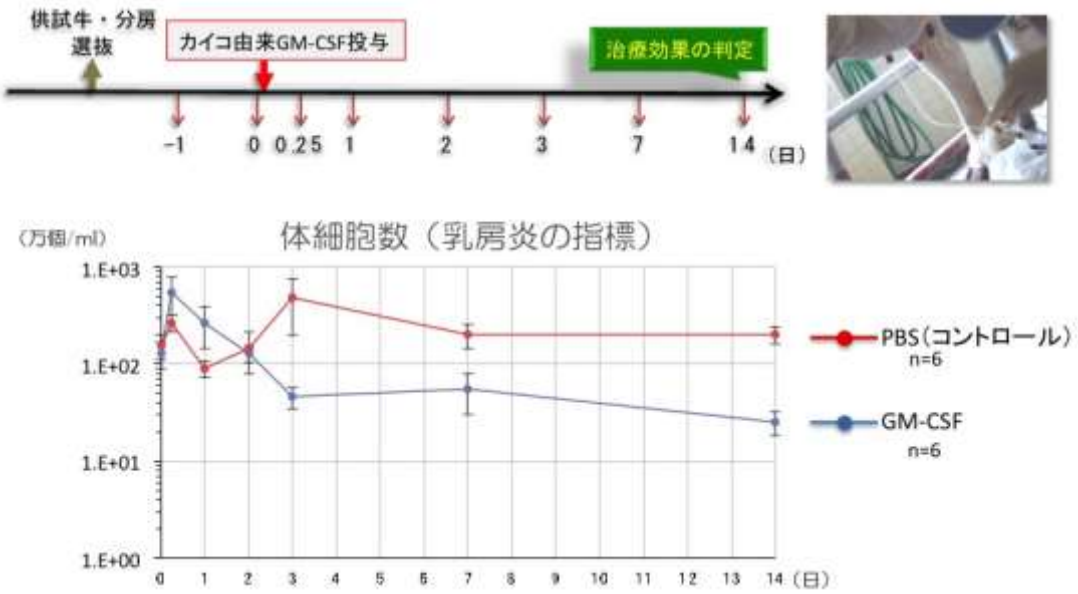


図４－６　乳房炎発症牛への投与による効果

組換えカイコ由来ウシ GM-CSF および対照群として PBS（リン酸緩衝生理食塩水）を、乳房炎発症牛への投与したところ、GM-CSF を投与した場合、乳房炎の指標となる体細胞数（白血球、上皮細胞、プラズマ細胞、赤血球が含まれ、高値の場合は生乳出荷時に生産者にペナルティがかかる）が減少すること、すなわち治療効果があることが示された。

４－３．ヒト病態モデルカイコを用いた医薬品の開発

１）ヒトの糖尿病治療薬・ガン治療薬・鎮痛薬等の新規探索系の開発

カイコを用いた創薬の新たな手法として、ヒト遺伝子等を導入した組換えカイコを、病態モデルとして利用し、化合物ライブラリーや天然物ライブラリーから新規医薬品候補をスクリーニングする方法を開発した。病態モデルカイコの開発およびそれを用いた医薬品候補探索の概念図を以下に示す（図４－７）。

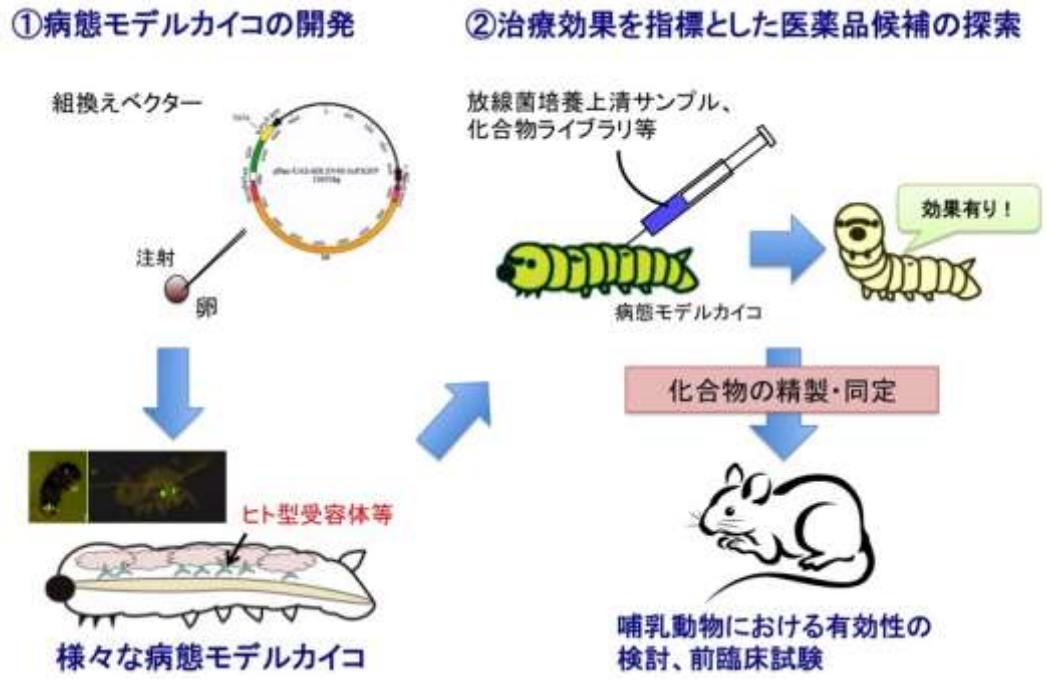


図４－７　病態モデルカイコの開発

様々なヒト型受容体遺伝子を *piggyBac* ベクターに組み込んだベクターDNAをカイコの受精卵に注射することにより、様々な病態モデルカイコとなる組換えカイコを作出した。それらのカイコ個体や脂肪体等を用いて、天然物ライブラリーや化合物ライブラリーのうち、ヒト型受容体に結合する物質や細胞内シグナル伝達等に影響を及ぼす物質を探索する系を開発した。

２）ヒトのガン治療薬探索のためのガンモデルカイコの開発

A

変異型*ras*　　野生型

熱誘導後48時間の幼虫
（その後全頭死亡）

B

Sorafenib (mg/kg)	変異型*ras* (n=3-4)	野生型
0	死亡 (0/4)	蛹まで生存 (4/4)
10	蛹まで生存 (2/4)	蛹まで生存 (4/4)
25	蛹まで生存 (3/4)	蛹まで生存 (4/4)
50	蛹まで生存 (4/4)	蛹まで生存 (4/4)

図４－８　ガンモデルカイコの開発と抗ガン剤（ソラフェニブ）による治療効果

ヒトのガン原遺伝子として知られる *ras* 遺伝子の変異型を導入したガンモデルカイコを開発し、熱誘導等により変異型 *ras* 遺伝子を発現させたところ、おそらく脂肪体組織、腸管、血球細胞等の機能不全によって、カイコが死亡する等の異常が確認された（A)。ヒトの抗ガン剤として利用されている、RAS シグナル伝達経路の阻害剤であるソラフェニブ（Sorafenib）を投与すると、生存可能になることがわかり（B)、ガンモデルカイコが抗ガン剤の探索系として利用可能であることが示された。

３）ヒトの糖尿病治療薬探索のための糖尿病モデルカイコの開発

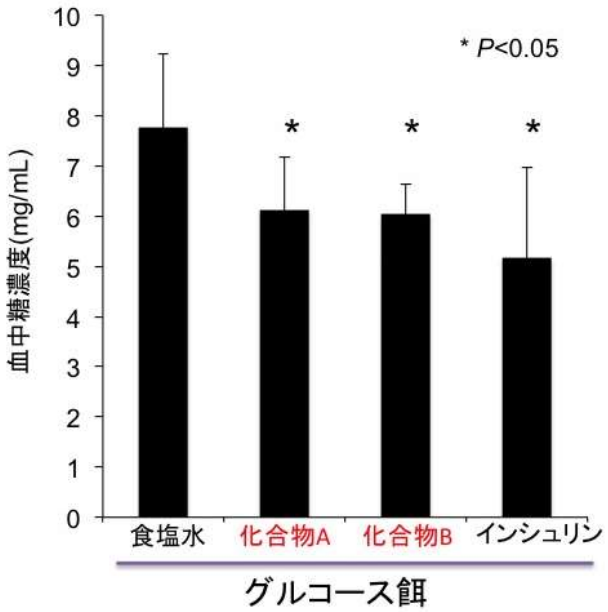


図４－９　ヒト糖尿病モデルカイコにおける新規探索化合物およびインシュリン投与による血糖降下作用

ヒトインシュリン受容体発現するヒト糖尿病モデルカイコを開発し（Matsumoto *et al.* 2014)、血糖降下作用のある化合物を探索した結果、カイコの血糖を有意に降下させる化合物 A、B が探索された。化合物 B の類縁体化合物を糖尿病モデルマウスに投与した結果、血糖値を低下させる傾向があることがわかった。

４）ヒト G タンパク質共役受容体（GPCR）発現カイコを利用した治療薬の開発

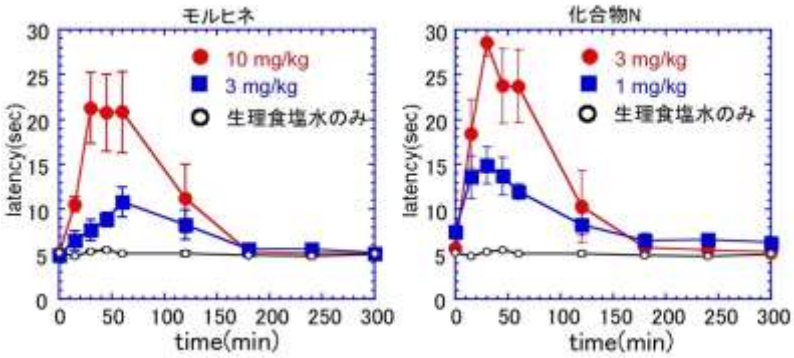


図４－１０　カイコを用いた鎮痛薬探索系で見つかった化合物の、ラットにおける鎮痛作用（ホットプレート試験結果）

各種のヒトＧタンパク質共役受容体（GPCR）を導入した組換えカイコを開発し、GPCR の新規リガンド探索系として利用可能であることを示した。一例として、G タンパク質融合型のオピオイド受容体（モルヒネ等のオピオイド系薬物と特異的に結合するレセプター）をカイコに導入し、リガンド化合物を探索した結果、化合物 N が得られた。化合物 N と既存の鎮痛薬モルヒネをそれぞれラットに投与し、ホットプレートに置いて耐えられる時間（latency）を計測することで、鎮痛作用効果を調べた結果、モルヒネ（左）よりも少ない量で鎮痛作用があることがわかった（右）。

４－４．小口径人工血管材料の開発

１）多様な絹人工血管基盤を用いて絹人工血管を作製

1.5 mm 径、3.5 mm 径ならびに 6 mm 径の絹人工血管基盤について、“ダブルラッセル編み”ならびに“組み”等、各繊維系各社のノウハウを生かしながら作製した。その後、農工大にて、フィブロインコーティングを施して小口径絹人工血管を作製、動物実験評価を行い、その結果に基づいて基盤やコーティングを改良した。これらの試作と動物実験評価を繰り返して、優れた絹人工血管を開発した（Yagi *et al*. 2011, Aytemiz *et al*. 2013, Asakura *et al*. 2014, 朝倉ら 2015）。比較用にポリエステル人工血管基盤についても、適宜、作製した。

２）小口径絹人工血管のラットでの移植評価結果

<u>小口径絹人工血管（1.5 mm 径）の特徴</u>

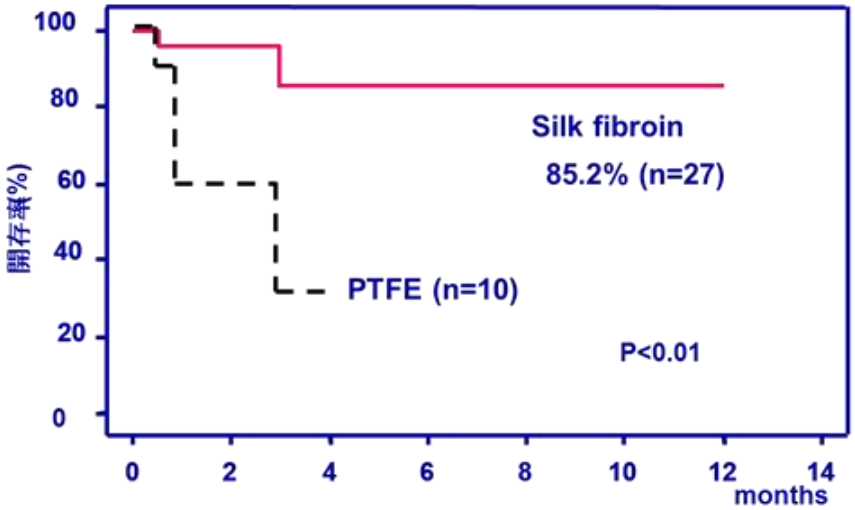


図４－１１　絹人工血管移植後の開存率の経時変化と市販人工血管素材の PTFE との比較図

絹糸で作製した小口径人工血管は、人工血管素材として一般的に用いられている PTFE を用いて試作した小口径人工血管と比較して、高い開存率を示した。

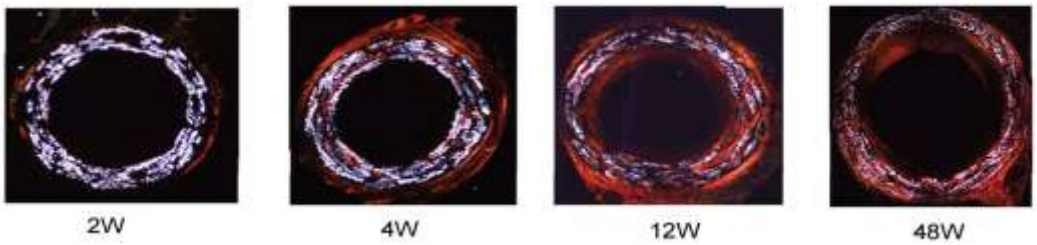


図４－１２　移植後の絹人工血管断面の経時変化

時間経過（2 週～48 週）につれ、絹成分（白色）が減少し、逆に、血管成分のコラーゲン（赤色）が増加した。すなわち、絹人工血管のリモデリングを確認した。

図４－１３　絹人工血管の移植一年後の断面写真

外観はラット自身の血管と殆ど変らなかった。

小口径絹人工血管と市販ポリエステル人工血管との比較

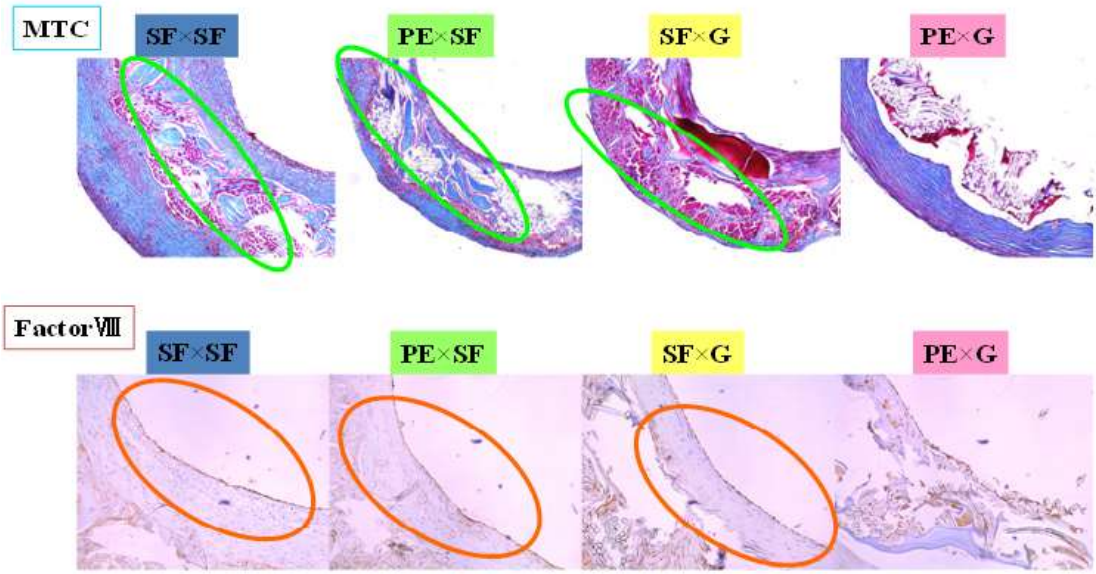


図４－１４　人工血管基盤に絹（シルクフィブロイン：SF）およびポリエステル（PE）を、コーティングに絹（SF）およびゼラチン（G）を用いた４種類の人工血管を移植し３ヶ月後の様子

マッソントリクローム染色（MTC）により膠原線維を青色で染色した結果、SF を基盤またはコーティングに使用した人工血管では、PE×G に比べて有意に組織が侵入していた（上）。また FactorⅧによる免疫染色により血管内皮細胞を染色した結果では、PE×G 以外では中央部分での内皮化が完了していた（下）。以上より、SF が組織侵入および内皮化を促進することが分かった（朝倉，田中 2014）。

３）小口径絹人工血管のイヌでの移植評価結果

6.0 mm 径の絹人工血管の場合

市販の人工血管との性能比較を行うために、6.0 mm 径の絹人工血管を作製し、絹人工血管と市販のポリエステル製人工血管との比較実験を行った。その結果、絹人工血管では、中央部まで血管内皮細胞が生着すること、および、最長 2 年程度開存することを確認し、市販品と遜色ない結果を得ることができた（早乙女ら 2014）。また、ポリエステル基盤上に、市販のゼラチンとフィブロインのコーティングを行って比較した結果、フィブロインのコーティングの方が、移植後の血管内側の内膜肥厚がより少ない（閉塞を防ぐ）ことを確認した（岡本，朝倉ら 未発表）

3.5 mm 径の絹人工血管の場合

実質的に市販品のない 3.5 mm 径人工血管について、筒状の絹糸の編み基盤上にスポンジ状のフィブロインタンパク質をコーティングしたものを含水状態で保管したのち、イヌへの移植実験を行った。その結果、移植 1 年後の絹人工血管において、良好な血流と血管内でのコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの存在を確認した。その後、最長 2 年程度開存することも確認した。この絹人工血管作製法については、特許出願した（特願 2012-110443）（Aytemiz *et al*. 2013）。

４）絹の機能化による新たな人工血管材料の創出

人工血管に適した遺伝子組換え（TG）絹の生産

人工血管に用いる素材としては、血管内部ができるだけ早期に血管内皮細胞で覆われると同時に、血小板が付着しにくい性質が求められる。そこで、内皮細胞接着因子（VEGF）を融合した TG 絹を作出し、血小板ならびに内皮細胞の接着性を通常の絹と比較した。その結果、VEGF を融合した TG 絹は通常の絹よりも血小板が付着しにくく、かつ、内皮細胞が接着しやすいことが分かった（朝倉ら 未発表）。

ラットを用いた新たな人工血管評価法の開発および通常の絹と TG 絹の評価の比較

ラットにおける径 1.5 mm、長さ 1 cm の人工血管では、吻合部からの伸張によって内皮細胞の形成が容易に達成されてしまい人工血管中央部における早期の内皮化の評価を行うことが困難であった。そこで、長さ 3 cm の人工血管をラット腹部大動脈に埋植することに成功し、長さ 1 cm で評価が難しかった血管中央部における内皮化の評価が可能な実験系を確立した（田中ら 未発表）。

この評価法を用いて、VEGF を含む TG 絹を作製し、通常の絹と比較した。すなわち、通常絹と TG 絹の長さ 3 cm の人工血管をラットに埋め込んだ。3 ヶ月後の免疫染色の結果より、血管中央部で TG 絹において有意に内皮化されていることが明らかとなった。このことより TG 絹を用いることにより、SF の特徴である血管内皮細胞の遊走がより促進することが明らかとなった（田中ら 未発表）。

４－５．フィブロインタンパク質基材上での細胞の動的挙動に関する基礎的知見

１）細胞の動的挙動の特異性

線維芽細胞を、フィブロイン表面、および比較として、ガラス、コラーゲン、フィブロネクチン各表面に播種し、初期 24 時間の観察により細胞の平均移動速度を算出した。その結果、下図に示すように、フィブロイン表面では細胞の移動性が顕著に高いことが分かった。この移動性の高低に連動して細胞外マトリックス関連遺伝子発現の増減も観察されたことから、基材の違いが細胞の機能性発現に影響を与えたと考えられた。

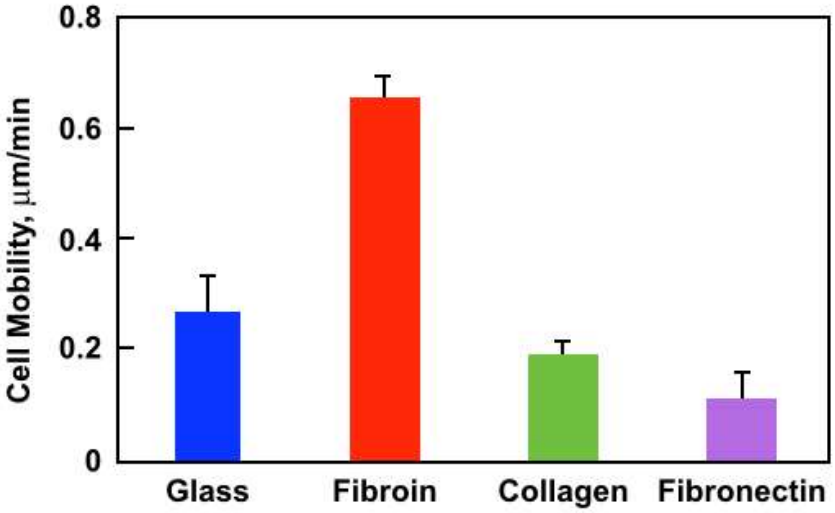


図４－１５　種々の表面（左から、ガラス、フィブロイン、コラーゲン、フィブロネクチン）上で培養した線維芽細胞（NIH3T3）の 24 時間の平均移動速度（Hashimoto, T. *et al.*, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 34, 158　(2013)）

４－６．軟骨再生材料の開発

１）フィブロイン上での軟骨細胞の細胞塊形成

フィブロインでコートした基材上に播種した軟骨細胞の移動速度を、フィブロネクチンでコートした基材上での移動速度を比較したところ、フィブロイン上では軟骨細胞が球状を保ったまま高速に移動して細胞塊を形成することが分かった（下図）。

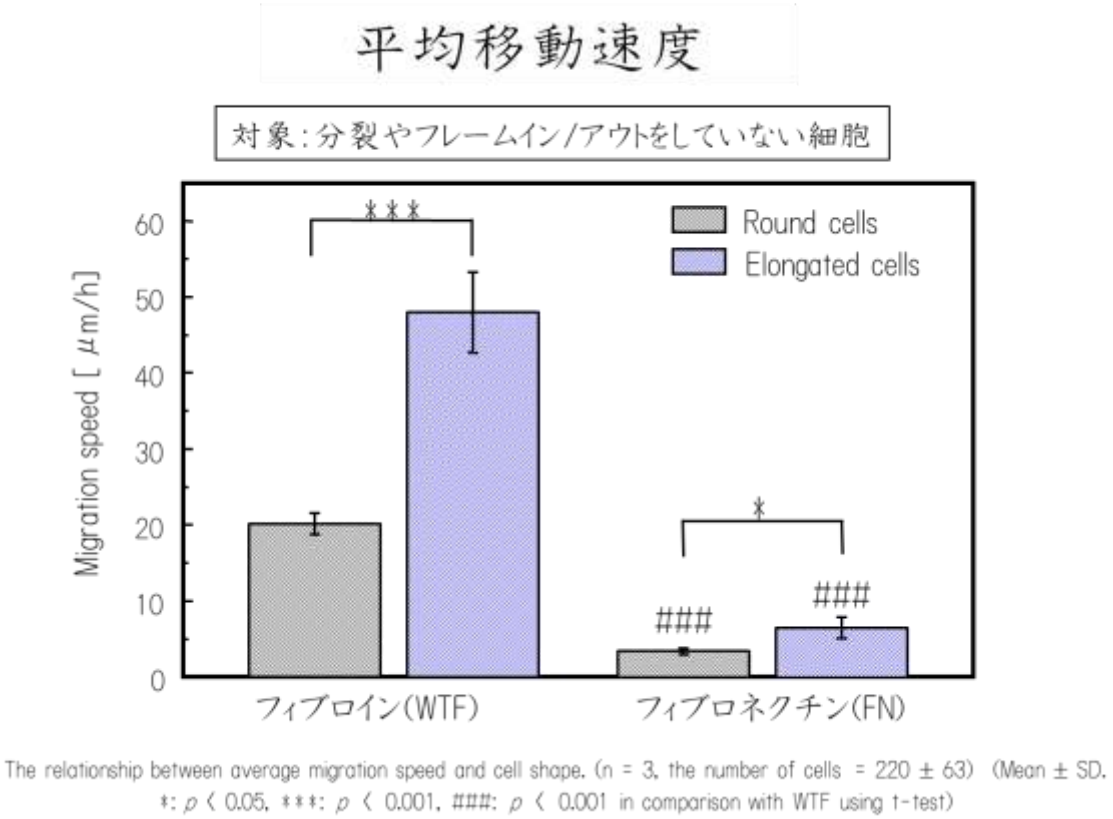


図４－１６　フィブロインおよびフィブロネクチンコート基材上に播種した軟骨細胞の平均移動速度

フィブロインコート基材上で見られた軟骨細胞の細胞塊形成は、フィブロインスポンジ中でも同様に観察された。その際、フィブロインスポンジの孔径に依存して細胞の凝集状態とその深さ分布が変化することが分かった（下図）。

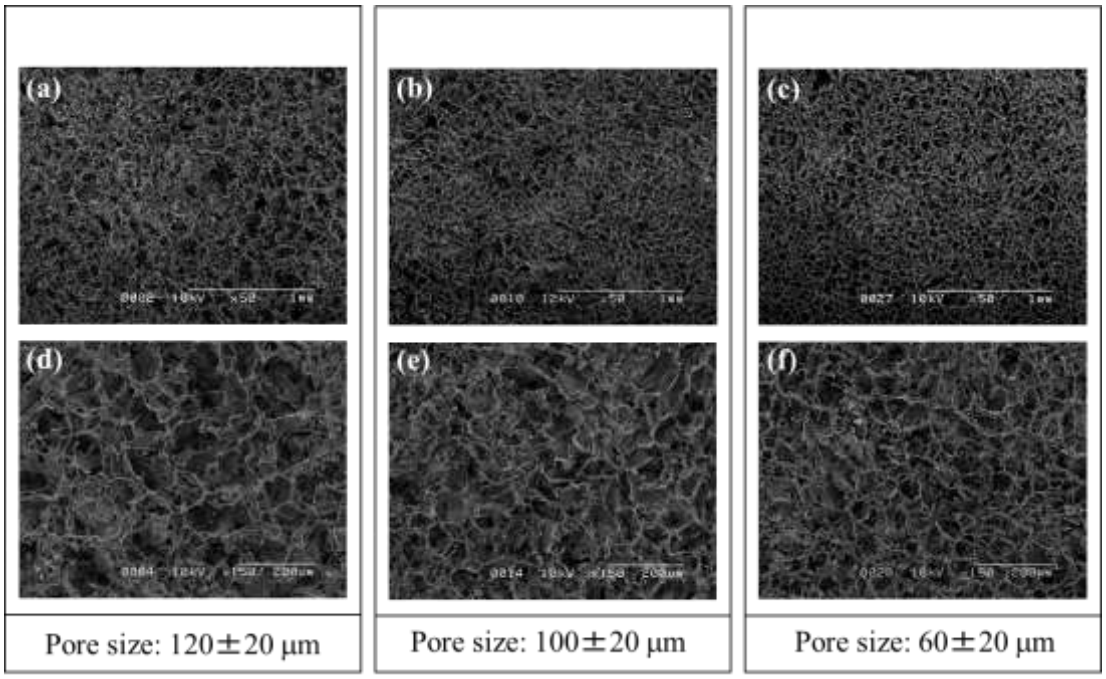


図４－１７　孔径（Pore size）の異なるフィブロインスポンジ中における軟骨細胞の細胞塊形成挙動

日本白色家兎から取り出した軟骨細胞をフィブロインスポンジに播種し、21 日間培養した後、スポンジ内の細胞の状態を電子顕微鏡で観察した（a-c:50 倍, d-f:150 倍）（Kawakami *et al.* 2011）。

上記で軟骨細胞を播種・培養したフィブロインスポンジ切片を、プロテオグリカン（軟骨細胞が産生する糖タンパク質）を染色する Safranin-O で染色した結果を下図に示す。

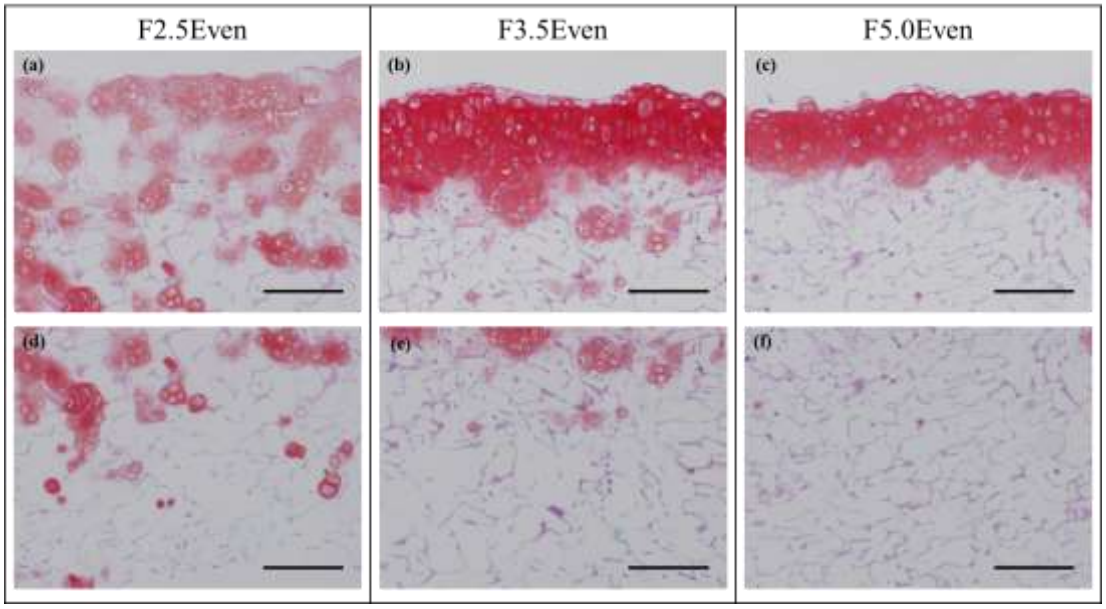
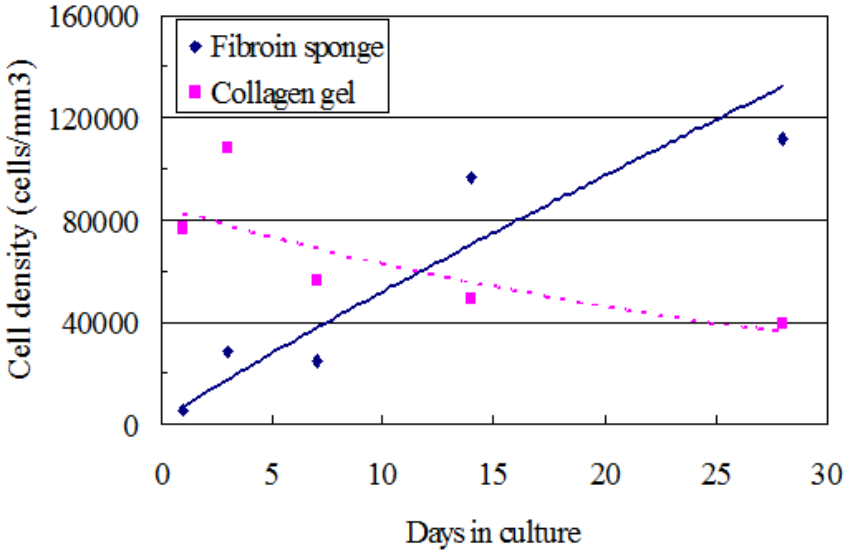


図４－１８　軟骨細胞を播種・培養後のフィブロインスポンジ切片の Safranin-O 染色像（スケールバー = 200 μm）

日本白色家兎から取り出した軟骨細胞をフィブロインスポンジに播種し、21 日間培養した後、スポンジ中で軟骨細胞が産生したプロテオグリカンを Safranin-O により染色した（Kawakami *et al.* 2011）。パネル（a）および（d）は、2.5%のフィブロイン水溶液を原料として作製した大きな孔径のスポンジ（120 ± 20 μm）を使用したデータを、パネル（b）および（e）は、3.5%のフィブロイン水溶液を原料として作製した中程度の孔径のスポンジ（100 ± 20 μm）を使用したデータを、パネル（c）および（f）は、5.0%のフィブロイン水溶液を原料として作製した小さな孔径のスポンジ（60 ± 20 μm）を使用したデータを示す。また、パネル（a-c）はフィブロイン表面での、パネル（d-f）はフィブロイン内部での軟骨基質形成を示している。治療においては、フィブロイン表面近傍に形成される膜様の細胞塊が組織欠損部に移行し、早期修復を可能にしていると考えられる。

２）フィブロインスポンジに播種した軟骨細胞の増殖と軟骨基質産生

フィブロインスポンジ内での軟骨細胞の増殖および軟骨基質（コンドロイチン硫酸）の産生量をコラーゲンゲルと比較した結果を下図に示す。



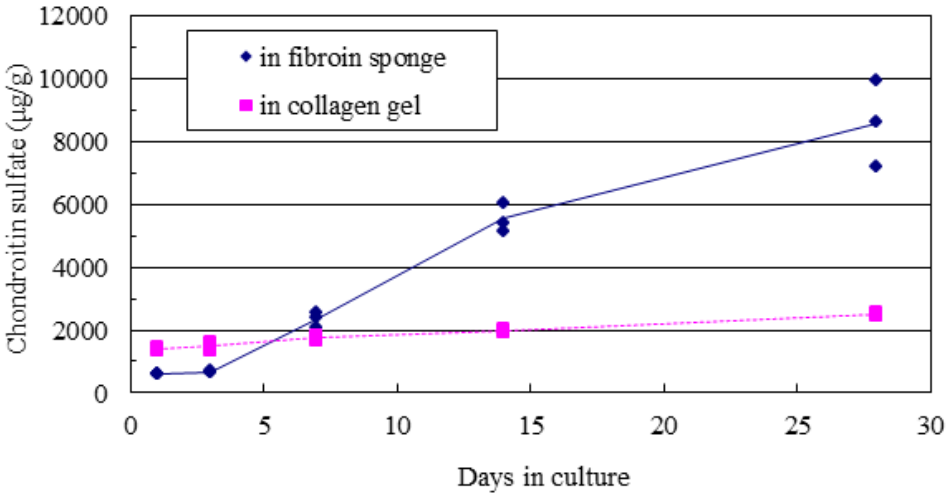


図４－１９　フィブロインスポンジおよびコラーゲンゲル内での軟骨細胞の増曲線（上）および軟骨基質（コンドロイチン硫酸）の産生量（下）

フィブロインスポンジ内では、軟骨細胞は増殖と軟骨基質産生の双方を示した。

３）フィブロインスポンジの Cell Delivery 機能

細胞を含ませることによって組織を形成させる細胞担体としての多孔質再生医療材料は、コラーゲンスポンジ・コラーゲンゲルなど多数が存在する。それらの中でのシルクフィブロインスポンジの特徴は、下図に示すように、軟骨細胞を播種すると膜状の細胞塊をスポンジ表面近傍に早期に形成し、その細胞塊がスポンジ内ではなく組織欠損部に移行して、組織を形成させることにある。

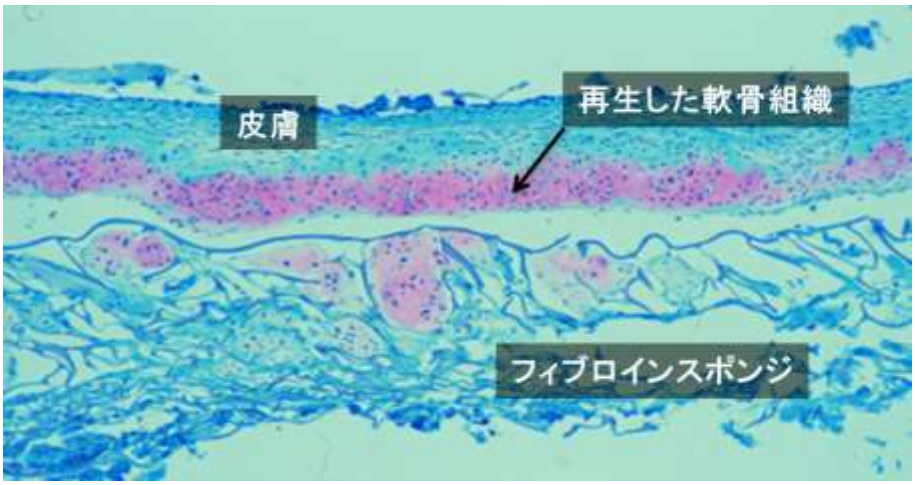


図４－２０　軟骨細胞を播種したシルクフィブロインスポンジをラット皮下に埋入後 14 日目の HE 染色組織

下部のスポンジ内よりも、その上部のスポンジ近傍に良好な軟骨組織が形成されている。

4）フィブロインスポンジを用いた「貼って治す」軟骨再生治療

フィブロインスポンジを用いた「貼って治す」軟骨再生治療のイメージ図を下図に示す。

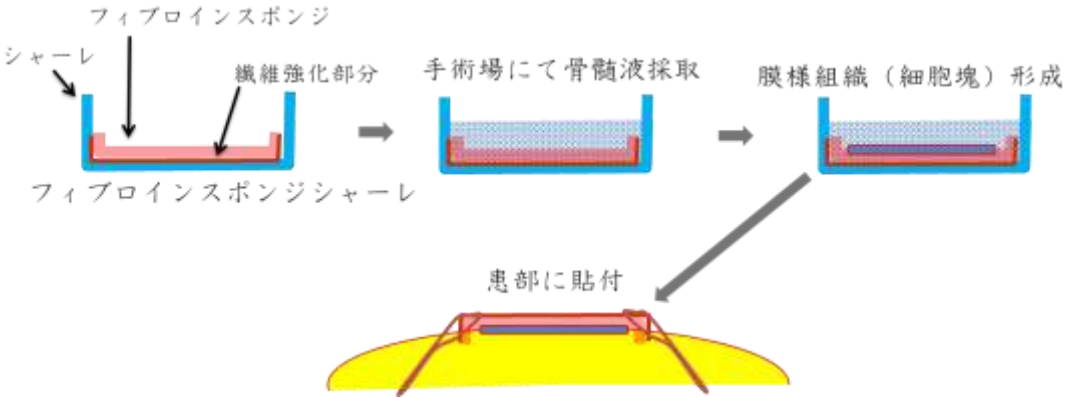


図４－２１　フィブロインスポンジを用いた「貼って治す」軟骨再生治療のイメージ

フィブロインスポンジを敷いたシャーレ（フィブロインスポンジシャーレ）上に骨髄液を満たし、フィブロインスポンジ上に形成される細胞塊とともに組織欠損部に貼付する。この方法は軟骨治療のみならず、創傷治療・肝臓再生・骨折遷延治癒など様々な再生治療に用い得る。

４－７．角膜再生材料の開発

1）フィブロインナノファイバーにおける不溶化処理条件

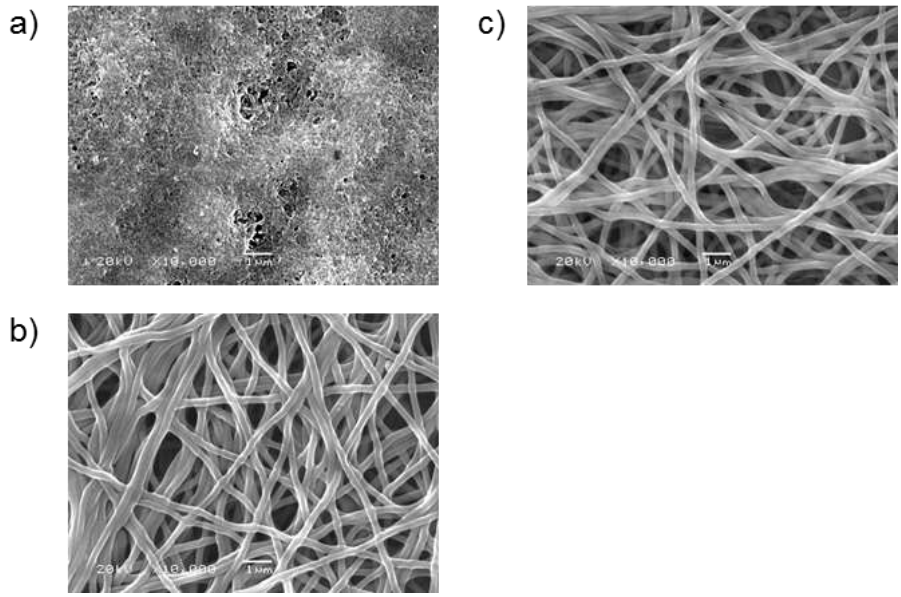


図４－２２　不溶化及び水溶性高分子除去のためのエタノール処理が及ぼす繊維構造の変化

フィブロインナノファイバーに対してエタノールによる不溶化処理及び水溶性ポリマーの除去処理を施した際の SEM 像を示した。a）：フィルムやスポンジに通常用いられる 77%エタノールによる 24 時間の不溶化処理では、シルクフィブロインナノファイバーは溶解して繊維形状を維持できない。b）：100%エタノールで 24 時間の不溶化処理を施した繊維は繊維形状を維持した。c）：さらにその後、95%エタノールによって水溶性高分子の除去を 72 時間行った後の試料も繊維形状を保つ。

2）フィブロインナノファイバーの透明化処理

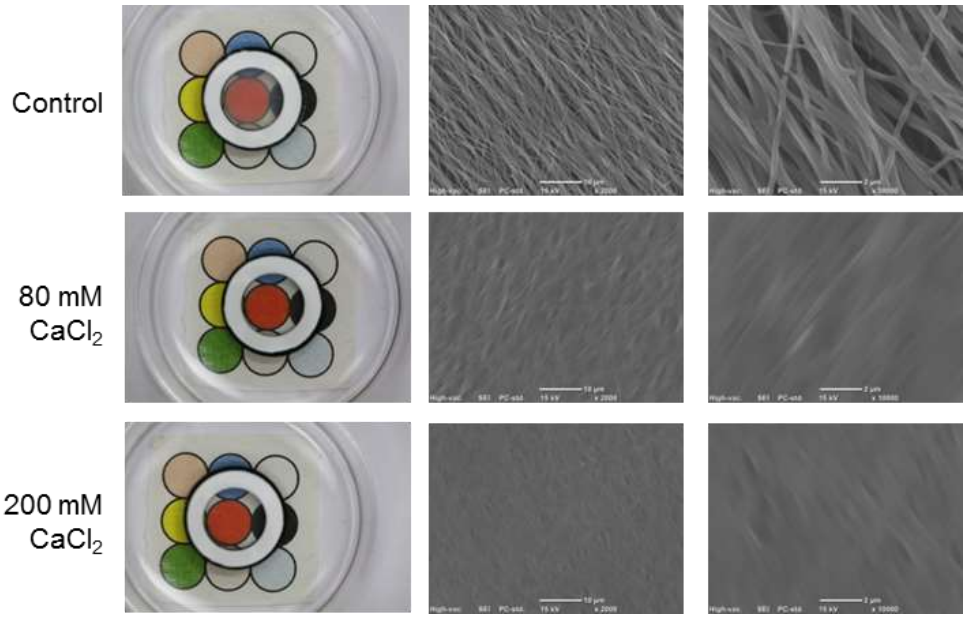


図４－２３　フィブロインナノファイバー不織布の透明化

100%エタノールと 70%エタノールを用いて不溶化処理を行った後、80 mM 塩化カルシウム水溶液に浸漬・乾燥したフィブロインナノファイバー不織布では透明化を達成することができたが、200 mM 塩化カルシウムで処理したサンプルでは透明度が 80 mM で処理したものより劣っていた。また、透明化処理後の試料中には配向繊維構造が残存していることが SEM 像から明らかとなった。塩化カルシウムによる溶解処理後も繊維形状が維持された。（詳細は特願 2014-177280 参照）

３）家兎角膜を用いたフィブロインナノファイバーの角膜組織適合性評価

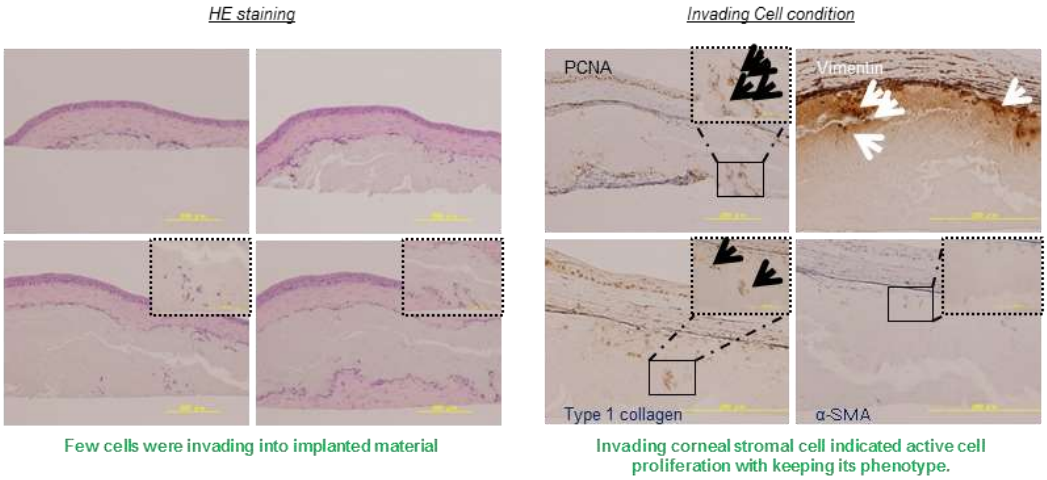


図４－２４　フィブロインナノファイバー不織布と生体との相互作用

術後 3 週目の組織を摘出し、組織学的検討を実施した。図左には HE 染色像を、図右には 4 種類の抗体（抗 PCNA, 抗 Vimentin, 抗コラーゲン 1 型, 抗 α-SMA）を用いた免疫染色像を示した。HE 像より、フィブロインナノファイバー不織布内への細胞浸潤が起こり始めていることが確認され、PCNA 抗体染色の結果より、侵入した細胞はフィブロインナノファイバー不織布内で増殖を続けていることが示された。また、不織布内に侵入した細胞が Vimentin 陽性、α-SMA 陰性細胞であることから、ホストの実質細胞が形質転換を起こさない状態で不織布内に侵入していることが判明し、更に、不織布内に浸潤した細胞周囲で Type 1 コラーゲン陽性を示すことから、侵入したホスト角膜実質細胞が Type 1 コラーゲンの産生を開始していることが示された。この結果から、フィブロインナノファイバー不織布の角膜適合性が示唆された。

４－８．神経再生材料の開発

1）フィブロインスポンジ被覆による脊髄損傷領域における効果

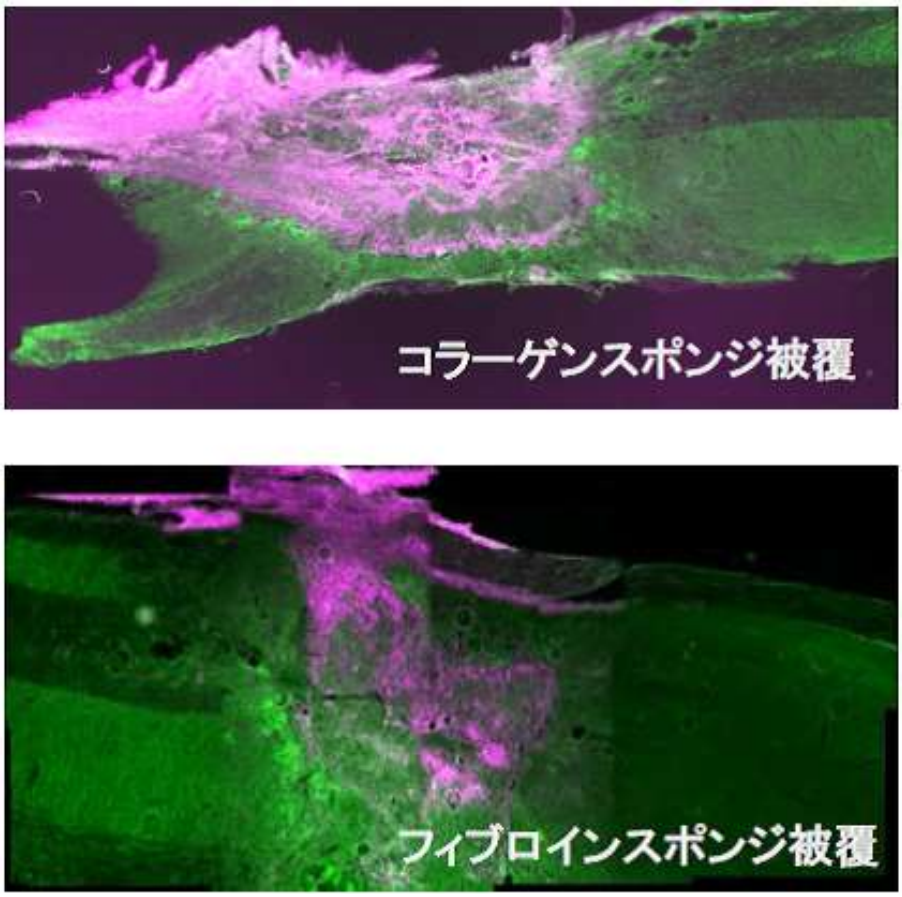


図４－２５　フィブロインスポンジによる被覆効果

脊髄損傷領域をコラーゲンスポンジおよびフィブロインスポンジで被覆し

2 週間経過後、外部からの進入細胞を蛍光標識（紫色）により確認した。　マウス脊髄（緑色）のうち損傷領域（濃い緑）の領域全体にわたって、コラーゲンスポンジでは多くの炎症系細胞およびペリサイトなどの侵入が認められるが、フィブロインスポンジの場合には少なかった。コラーゲンは細胞親和性が高いため、神経外の組織から多くの細胞を誘引し定着させる要因にもなるが、フィブロインの場合にはその傾向は認められなかった。

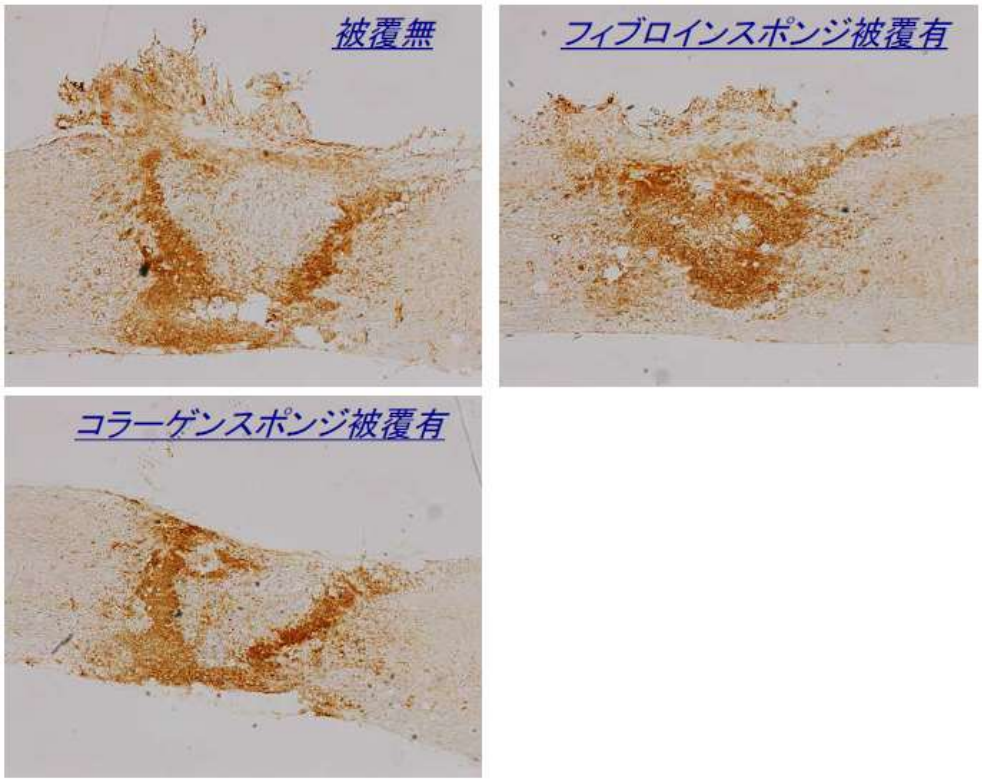


図４－２６　フィブロインスポンジによる脊髄損傷領域の瘢痕減少作用

脊髄損傷領域をコラーゲンスポンジおよびフィブロインスポンジで被覆し４週間経過後、炎症細胞のマーカーである CD45 にて染色した。被覆無し（左上）では損傷領域周囲に CD45 陽性の炎症細胞が集積しており（濃い染色領域）、この領域全体にわたって瘢痕となってしまい、物理的障壁を形成して脊髄損傷の予後はさらに悪くなると考えられた。コラーゲンスポンジで被覆した場合（左下）では、多くの CD45 陽性炎症系細胞が損傷部周囲にさらに集積し、被覆がない場合よりも瘢痕を広げてしまう傾向が認められた。フィブロインスポンジ被覆の場合（右上）には、CD45 陽性細胞の侵入が認められるが損傷部内に留まり、周囲への拡散は少ない。そのため最終的に瘢痕領域は減少して脊髄損傷後の予後は良いと考えられた。

２）フィブロインスポンジ移植後の安定性・安全性の比較

様々な材料を、血管進入の激しい領域や血管の増殖の激しくない領域に移植し、それらの生体安全性を評価した。一般的に、血管進入の多い領域は炎症性が高いが、炎症の誘導活性を炎症性・抗炎症性サイトカインなどの発現から確認した。

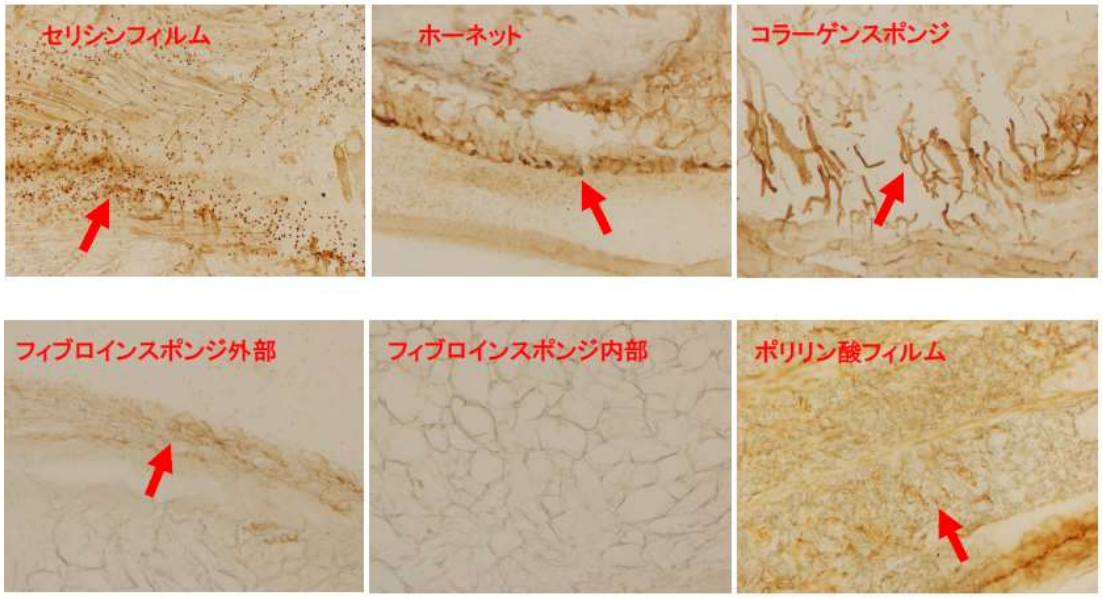


図４－２７　血管誘導活性におけるフィブロインスポンジの作用

生体内に様々な材料（セリシンフィルム、ホーネットシルクフィルム、コラーゲンスポンジ、フィブロインスポンジ、ポリリン酸フィルム）を移植後、4 週間後での血管誘導活性を血管マーカーであるⅣ型コラーゲン染色によって検討した。セリシンフィルム、ホーネットシルクフィルムを移植した組織では、血管誘導が認められた。また、コラーゲンスポンジ移植では多くの毛細血管網がスポンジ近傍に顕著に認められた。フィブロインスポンジでは内部への血管進入は皆無であり、また周囲にもほとんど染色は認められなかった。これは、ポリリン酸フィルム（血管誘導活性の低い材料）を移植した場合と同様に、フィブロインスポンジに血管誘導活性はほとんど無いことを示している。このことから、フィブロインスポンジを移植しても血管誘導は認められず、炎症も惹起しにくいことが分かった。

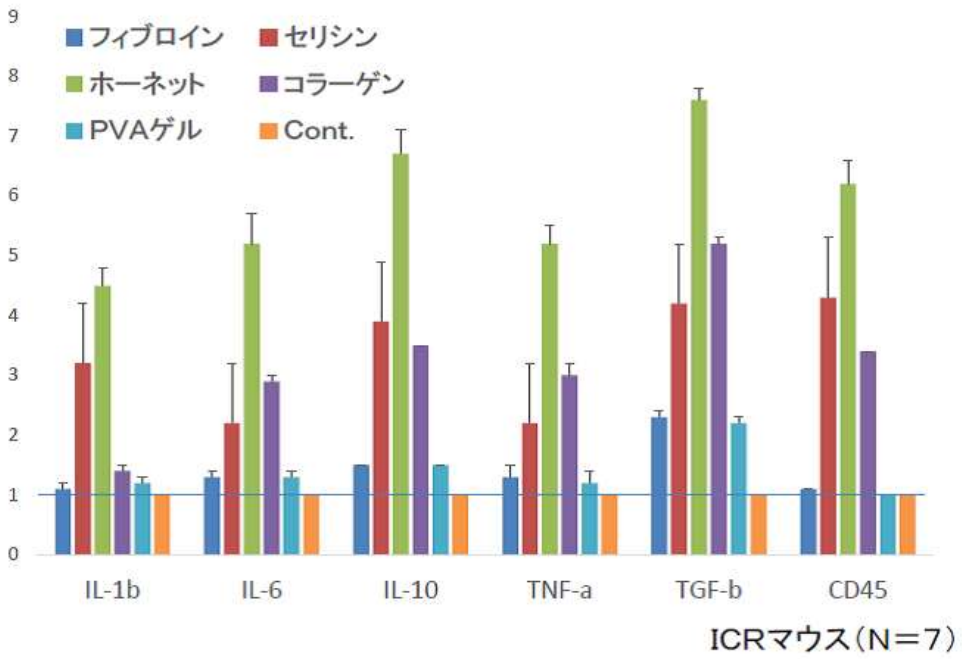


図４－２８　炎症誘導活性におけるフィブロインスポンジと PVA ゲル等他材料との比較

生体内に様々な材料（フィブロインスポンジ、セリシンフィルム、ホーネットシルクフィルム、コラーゲンスポンジ、PVA ゲル）を移植後、2 週間後での急性期の炎症惹起の比較を、種々のサイトカインの発現によって評価した。材料を移植した領域から組織を単離し、mRNA を抽出後、定量 PCR による遺伝子発現解析を行った。図４―２７で血管誘導活性を示したセリシン、ホーネットシルクを移植した組織では、いずれの炎症性マーカーも高い発現が認められた。また、コラーゲンスポンジを移植した組織では、TGFβ をはじめとする炎症性サイトカインの発現が顕著に認められた。一方、フィブロインスポンジを移植した組織では、いずれの炎症性・抗炎症性サイトカインの誘導も低く、PVA ゲルを移植した組織と比べてもほとんど炎症性を示さないことが分かった。このことは、フィブロインスポンジが PVA ゲルと同等ないしはより優れた安定性を持つことを示している。

５．利用・応用する上での留意点

５－１．遺伝子組換えカイコの使用についての留意点（カルタヘナ法）

遺伝子組換えカイコの使用（飼育・運搬等）の際には、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称：カルタヘナ法）の規制に従う必要があり、遺伝子組換え生物が逃げないように拡散防止措置をとった上で飼育する「第二種使用」と、拡散防止措置をとらずに飼育する「第一種使用」がある。

産業利用のための第二種使用に関しては、ニットボーメディカル（株）や（株）免疫生物研究所における自社での飼育に加え、群馬県において養蚕農家らによる受託飼育や、大関（株）による受託飼育および組換えタンパク質受託生産も開始されている。医薬品原料生産においては、全齢人工飼料育による第二種使用で対応可能と考えられる。より低コストで遺伝子組換えカイコを飼育してシルクを生産するには、手間と廃棄物処理等のコストがかかる拡散防止措置を必要としない第一種使用で飼育できることが望ましい。第一種使用については、申請に際して生物多様性影響評価書を提出して、主務大臣の認可が得られれば、飼育可能となる。2014 年に、動物では国内で初となる遺伝子組換えカイコの第一種使用規定が承認され、（独）農業生物資源研究所内の隔離飼育施設において組換えシルク系統の試験飼育が開始されており、今後組換えシルクの大量生産が可能になると期待される。

５－２．審査機関（PMDA）からの指摘事項とその対応案（抜粋）

【組換えカイコによる医薬品用組換えタンパク質生産について】

平成 22 年 11 月 29 日、PMDA にて事前面談を行った。具体的なデータ・開発計画の資料も無い状況下での事前面談なので、正式な PMDA の見解を表明するものではないが、基本的には、最終製品が医薬品としての製造販売承認審査基準（有効性、安全性等）を満たせばよい、との結論であった。その対応としては、遺伝子組換えカイコによるバイオ医薬品に係わる製造販売承認の可能性が確認されたため、製薬企業等による具体的な研究開発計画が策定された後、適切な時期に再度 PMDA と事前相談を行う必要がある。

【小口径人工血管材料について】

平成 23 年 2 月 22 日、PMDA にて対面助言を行った。以下に、その際の PMDA からの助言内容の一部を示す。

１）他の人工血管と比較した際の優れた特徴を明確にしてアピールすべき

２）逆に、工夫を講じても達成困難な点を踏まえ、開発可能な範囲を見極める

３）現在の小口径血行再建術に標準的に使用されているグラフトと標準的な治療方法において、ほぼ同等の開存性であることを動物実験で示すこと

４）安全性の評価は最終的には、生物学的安全性試験をもって最終製品の安全性を担保する必要があるが、現時点では、原材料について安全性を確認のこと

【軟骨再生材料について】

１）医薬品か医療機器かをまず判断する必要がある。

２）細胞を培養する場合は生物製品となる。フィブロイン単独ならば生物製品とはならない。

３）どのように使用するか（治療システム，そのための製品形態，臨床上の使用）を決める必要がある。使用方法により製品の形態・品質・性能が決定され、それに応じた試験が必要となる。

４）医療機器と考えた場合、原料から製品を製造するプロセス（カイコ飼育 → 繭収穫 → フィブロイン抽出 → スポンジへの加工 → 最終製品製造）のどこからが GMP の範囲と考えるのか判断しておく必要がある。

【神経再生材料について】

フィブロインスポンジに薬剤を担持した複合材料の有効性は高いが、実用化へのハードルは高いというのが PMDA からの見解である。したがって、フィブロインスポンジ単独材料としての開発を優先し、2015 年から大型動物での応用実験を開始する予定である。一方で、Made in Japan としての有効性や優位性を示すためにも、前述した複合材料としての発展可能性も積み上げる必要がある。

５－３ コスト試算

医薬品製造に係るコストについては医薬品毎に異なるが、共通コストとしての「カイコ 1 頭あたりの生産（飼育）コスト」に関しては、現在では餌のコストは 15～20 円程度（人工飼料「くわのはな」: 約 5,000 円/10kg 使用時）であり、それに加えて同程度の光熱費・人件費・飼育資材費等がかかっている（飼育施設や管理法によって変わる）。原料タンパク質を含む粗抽出液製造および精製に関するコストについては、生産コストと同程度かそれ以上かかると試算される（精製法等によって変わる）。現在は、カイコ 1 頭あたり 1mg の組換えタンパク質の生産が見込めるが、数年内には 1 頭あたり 5～10mg 以上の生産が可能になり、生産コストは 1/5～1/10 以下になると期待される。医薬品の承認に向けては、前臨床試験・非臨床試験・臨床試験等のために、通常の医薬品開発と同等のコストが必要となる。

絹糸タンパク質を原材料とした人工血管製造に係るコストについては、「編み」で作製する人工血管では、W ラッセル装置の減価償却や動物実験等費用を勘案し、市販品であるゴアテックス製人工血管（3.5mm 径、長さ 3cm で 3 万円）と同程度と試算される。その他の医療用素材製造に係るコストについては、現時点での生産体制ではシルクスポンジシート

が A4 シート 1 枚で約 3､000 円程度と想定され、医療機器としての製品化となると、これに開発費が上乗せされ、結果的にコラーゲンの真皮組織用シートであるデルターミスの A4 サイズ価格 28 万円（452 円/cm^2 から算出)と同程度と試算される。

５－４．養蚕農家やシルク関連産業の現状

養蚕業は日本の近代化に貢献し、繭生産量はピーク時には約 40 万トン（1930 年)、養蚕農家戸数は 221 万戸（1929 年）あったが、2013 年には繭生産量 168 トン、養蚕農家 486 戸と縮小し、深刻な存亡の危機に立たされている。2014 年に富岡製糸場と絹産業遺産群が世界文化遺産として登録され、蚕糸・絹業に関する伝統文化の一部は遺産として残る見込みだが、一方では技術の継承や産業としての存続は危ぶまれている。また、人工飼料製造等の関連事業が中止されれば、蚕糸・絹業および大学・公的機関におけるカイコを用いた研究の存続も非常に難しくなる。

遺伝子組換えカイコを用いた医薬品生産や絹糸ならびにフィブロインタンパク質の医療応用という新たな利用展開を進めることにより、長い養蚕の歴史で我が国に蓄積された技術や知識を継承・活用しながら、従来の養蚕業を新しい農業・産業として地域に定着させる可能性が拓かれつつある。

５－５．絹糸ならびにフィブロインタンパク質を原料とした医療機器を利用・応用する上での留意点

【小口径人工血管材料について】

１）絹人工血管の場合、滅菌法として加熱滅菌を用いるとタンパク質の変性を来す場合があるため、ガス滅菌なども検討する必要がある。

２）多量の血漏れを防ぎ、人工血管の強度や弾力性等の物性を改善するため、絹人工血管を作製後（絹基盤上に絹スポンジをコーティングして作製)、さらにその表面をグリセリンで薄くコーティングした状態でシールして出荷・保管する。

【軟骨再生材料について】

１）すでに手術用縫合糸として全身の手術に用いられた実績があるが、関節内などの特殊環境下での生体反応性の確認、生体内外における劣化の評価などが必要である。

２）現時点では、治癒プロトコールとして、治癒後にフィブロインスポンジは体内からの取り出しを原則としている。

【角膜再生材料について】

シルクをナノファイバー形態で医療材料として利用する際は、バルク量が少なく表面積が非常に大きいために異物の吸着、滅菌によるダメージ、分解劣化の進行が速い可能性などを勘案する必要がある。

６．他の昆虫素材等への応用の可能性

６－１．他の昆虫由来シルク原料

１）セリシンホープ由来セリシンタンパク質

フィブロインを合成しない特殊なカイコ品種「セリシンホープ」がつくる繭を原料とすれば、従来得られなかった天然状態の分子量を維持したセリシン（バージンセリシン）が得られる。バージンセリシンからは、架橋等の化学処理を行うことなく強度に優れたフィルム等の材料を作製できる（寺本 2007）。フィブロイン材料と比較すると、含水性や弾力性に優れる点が特徴である。

２）ホーネット（スズメバチ）由来シルク

ホーネットシルクとはスズメバチの幼虫が繭を作るために出す糸、および糸に含まれるタンパク質成分のことを指す。シルクタンパク質の中ではめずらしいコイルドコイル構造という高次構造を有している。成形加工が比較的容易なので素材として扱い易く、素材は優れた力学物性を有する（Kameda *et al.* 2010）。

３）遺伝子組換えカイコによる異種シルク原料

エリサンシルク（多孔性）・トビケラシルク（耐水性）・クモシルク（高強度・高伸度）・貝殻や骨（高硬度・高弾性・粘着性・水中接着性など）等の繊維性タンパク質を遺伝子組換えカイコで発現させることができる。これにより、カイコの絹糸やフィブロインタンパク質にそれぞれの機能性や力学特性などを付与することが可能と考えらえる。実例として、オニグモの牽引糸タンパク質を組換えカイコで発現させることで、生糸の強度、伸度、強靭性をそれぞれ非組み換え生糸と比較して 13%、42%、53% 程度向上させることに成功している（Kuwana *et al.* 2014）。

４）非天然型アミノ酸を導入したシルク

遺伝子組換えにより、非天然型アミノ酸をタンパク質合成に取り込むことのできる変異体酵素をカイコで発現させることにより、非天然型アミノ酸が導入されたシルクを生産することに成功している（Teramoto, Kojima 2014）。例えば、アジド基をもつ非天然型アミノ酸を導入したシルクでは、アジド基のみを選択的に反応させることができ、従来の化学修飾よりも簡便かつ安全に様々な機能性分子をシルクに結合できる。

７．用語集

１）FGF

線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor）のこと。血管新生や創傷治癒等に関与する成長因子の一種で、細胞・組織の増殖や分化において重要な役目を果たしている。

２）GAL4/UAS 系

外来遺伝子発現のために良く用いられる発現系である。酵母の転写活性化因子 GAL4 が、その認識配列である上流活性化配列（UAS）に結合すると、UAS の下流に組み込んだ外来遺伝子の発現が増強されるしくみを利用した系である。カイコでも利用されている（Imamura *et al.* 2003）。

３）HE 染色

ヘマトキシリンとエオジンの 2 種類の色素を用い、細胞核（青）とそれ以外の組織（赤）を染め分ける染色法のこと。

４）IE1/hr3 系

外来遺伝子発現系のひとつ。昆虫に感染するバキュロウイルスが持つ IE1 トランスアクチベーターと hr3 エンハンサーが宿主の昆虫の遺伝子の発現をコントロールする性質を利用して目的遺伝子の発現量を上昇させる系で、カイコでも確立済である（Tomita *et al.* 2007）。

５）*piggyBac*

イラクサギンウワバの培養細胞から得られたトランスポゾン（ゲノムの中で転移できる遺伝子）の１種。カイコを含む昆虫や、近年では哺乳類細胞や植物細胞での遺伝子組換えに利用されている（神村 *et al.* 2010）。

６）RGD モチーフ

３つのアミノ酸、アルギニン（Arg）－グリシン（Gly）－アスパラギン酸（Asp）、を 1 文字表記したもので、フィブロネクチン等の細胞接着性タンパク質に含まれる共通の細胞接着活性を持つアミノ酸配列である。

７）遺伝子組換えカイコ

外来遺伝子を組み込んだ *piggyBac* ベクターをカイコの受精卵に注射する方法によって、生物研の田村らが世界に先駆けて作出に成功した（Tamura *et al.* 2000）。組換えカイコ、トランスジェニック（TG）カイコ、GM カイコとも呼ばれる。

８）営繭

カイコが繭をつくること。通常、まぶし（蔟）という道具を用いて、繭をつくらせている。

９）エンドトキシン

医薬品や医療機器の品質管理において規格試験が必要とされる製造工程由来不純物・混入汚染物質の一つ。グラム陰性菌の細胞壁の成分（リポ多糖）で、血液中に入ると、発熱やショック等の作用があるため、管理が必要となる。

１０）生糸

複数の繭からとった繭糸を撚り合せた１本の糸。繭を熱水等につけてセリシンを少し溶かす煮繭によって繭糸を取り出す繰糸が行われ、撚り合わされて生糸になる。

１１）絹糸

生糸からセリシンを本格的に除く精練という作業によって得られる、独特の光沢をもつ糸。

１２）組換えタンパク質

遺伝子組換えの手法によって、外来遺伝子を様々な宿主に導入して発現させたタンパク質。

１３）組換えバキュロウイルス

昆虫の培養細胞や個体に感染するウイルスの１種。昆虫の培養細胞やカイコ個体にバキュロウイルスを感染させて，一過的に組換えタンパク質を作らせることができ、イヌとネコのインターフェロン等は商品化されている。バキュロウイルス発現系は，体液等からの粗抽出液に夾雑物が多く，個体ごとにウイルスを接種する手間がかかり，さらに精製後の組換えウイルス残存の可能性に問題があるが、迅速・簡便で少量多品目の試験生産に向いている。

１４）ゲノム編集技術

人工のヌクレアーゼ（DNA を切断する酵素）等を用いて、ゲノム DNA 上の標的遺伝子を破壊したり、ゲノム中の特定の場所に外来遺伝子を挿入したりする技術。幅広い生物種で研究が進められており、次世代の遺伝子改変技術として注目されている。カイコでは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用いる方法（Takasu *et al.* 2010）、TALE ヌクレアーゼ（TALEN）を用いる方法（Nakade *et al.* 2014, Takasu *et al.* 2014）、および、CRISPR/Cas システムを用いる方法（Wang *et al.* 2013）等、がこれまでに報告されている（Daimon *et al.* 2014）。

１５）絹糸腺

繭糸の主成分であるフィブロインやセリシンと呼ばれるタンパク質を大量に合成・分泌・貯蔵する特殊な器官。フィブロインは後部絹糸腺で発現・分泌され、セリシンでは中部絹糸腺で合成・分泌され、両者は中部絹糸腺に貯蔵される。

１６）コイルドコイル構造

タンパク質がとる構造の一つで、複数本のα-ヘリックス鎖がロープのように巻いた形をしている。

１７）抗体依存性細胞傷害活性

腫瘍細胞等の標的細胞に抗体が結合すると、ナチュラルキラー細胞やマクロファージが認識して、標的細胞等に傷害を与える活性。ADCC（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity）活性とも呼ばれ、抗体の糖鎖が活性に影響する。

１８）抗体医薬品

生体がもつ免疫システムの抗体を利用した医薬品で、疾患関連分子に特異的に結合する抗体を遺伝子組換え技術等によって作製したもの。2013 年の医薬品世界売上高トップ 10 のうち 6 つは抗体医薬品であり、今後もこの傾向は続くと予想される。新規の構造・作用・製法を特徴とする次世代抗体医薬品にも期待が集まっている。

１９）細胞外マトリックス

生物において、細胞外に存在する構造体。細胞外の空間を充填すると同時に、細胞の足場としても働き、細胞周辺の微小環境を制御している。コラーゲンなどの繊維状タンパク質や、コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカン等が含まれる。

２０）シルク

カイコが作る繊維状構造物の総称。繭糸、生糸、絹糸等様々な状態のものを包含する。フィブロインおよびセリシンの 2 種類のタンパク質が主要な構成成分である。より広くは、カイコ以外の昆虫類やクモ等の節足動物が産生する繊維状構造物も含まれる。

２１）人工飼料

カイコの生育に必要な栄養分を人工的に調合した飼料。人工飼料を用いることで、桑葉を収穫できない季節でもカイコが飼育できるとともに、無菌状態に近い清潔な環境下での飼育が可能になる。桑葉粉末の配合量が異なるいくつかの種類が市販されている。

２２）精練

アルカリ処理や酵素処理等によって生糸や繭からセリシンを本格的に取り除く作業。

２３）セリシン

カイコのシルクを構成する構造体の一つで、シルクの 20~30%をしめる、糊状構造。フィブロイン繊維を取り囲んでいる。数種のセリシンタンパク質と、ペプチド（プロテアーゼインヒビター等）、種々の低分子化合物（フラボノイドなど）を含む。

２４）セルバンク

培養細胞を基材として医薬品を生産する場合は、品質の恒常性確保のために、各製造バッチで同じ基材を用いることが望ましいため、細胞株のセルバンクシステムによって管理されている。単一の細胞プールから分注したマスターセルバンクと、その細胞浮遊液を増殖させて製品製造するためのワーキングセルバンクの２段階で構成され、適格性が規定されている。カイコの場合は、凍結保存された卵巣・精巣・精子をマスターセルバンクとして、また、受精卵をワーキングセルバンクとして利用可能かについて検討が行われている。

２５）第一種使用

産業第一種使用と研究第一種使用がある。いずれも、拡散防止措置を執らずに遺伝子組換え生物を飼育・栽培等することを指す。カイコではすでに、蛍光タンパク質を融合したシルクを発現する組換えカイコについて、研究第一種使用が始まっている。

２６）第二種使用

産業第二種使用と研究第二種使用がある。いずれも、遺伝子組換え生物をあらかじめ定められた封じ込め方法に従って飼育・栽培等を行うことを指す。カイコの場合、すでに検査薬・化粧品の原料タンパク質生産や蛍光シルクの生産を目的とした産業第二種使用の多くの実績がある。

２７）糖鎖

タンパク質の糖鎖修飾は、活性・体内動態・免疫原性等に関わるため、医薬品の品質管理において重要である。糖鎖がヒト型と異なっていても、医薬品の有効性・安全性が示されれば問題はないが、非ヒト型糖鎖が抗原性を示す可能性があるため、配慮が必要となる。主要な糖鎖の N 結合型糖鎖は、昆虫の脂肪体等ではパウチマンノース型・トリマンノシルコア型が付加され、ヒト型（コンプレックス型、ハイマンノース型）と異なるが、カイコの絹糸腺においては、ヒト型にやや近いコンプレックス型糖鎖やハイマンノース型糖鎖が付加され、ガラクトース・シアル酸・フコースはほとんど付加されないことがわかってきた（瀬筒, 立松 2014）。その他に O 結合型糖鎖がある。

２８）一箱

カイコの農家における飼育単位。蚕種業者が箱単位で出荷し、農協等で飼育されてから出荷されるカイコの最小単位。箱単位で蚕の幼虫が農家に納入される。県によって多少差はあるが、通常一箱 2 万 5000 頭。群馬県では 3 万頭。

２９）フィブロイン

カイコのシルクを構成する構造体の一つで、シルクの 70-80%をしめる、繊維構造。フィブロイン H 鎖、フィブロイン L 鎖および P25/fhx の三種のタンパク質で構成される。

３０）フィブロインタンパク質材料

繭や生糸を精練して得られる固形のフィブロインタンパク質を原料として作製される各種の材料（Rockwood *et al.* 2011）。パウダー、ブロック、スポンジ、ゲル、フィルム、チューブ、ナノファイバーなど、多様な形状の材料が作製されている。多くの場合、フィブロインタンパク質をいったん高濃度塩水溶液等に溶解したのち透析で塩を除去して得られる水溶液を経由して作製される。

３１）フィブロネクチン

細胞外マトリックスを構成する糖タンパク質で、細胞接着活性をもつ RGD モチーフを含んでいる。

３２）ホーネットシルク

スズメバチの幼虫が吐糸するシルクタンパク質の一種。

３３）補体

補体とは血中タンパク質群を指し、抗体が細菌等の病原体に結合すると補体は活性化され、最終的に細胞膜障害性複合体を形成して病原体の膜を破壊することで生体を防御する自然免疫を構成する。補体の活性化には古典経路・副反応・レクチン経路の 3 つが知られているが、補体 C3 が材料に吸着して活性化されることで免疫反応が惹起される副反応が、生体材料への免疫反応として主となる反応である。

３４）繭糸

カイコが吐く糸。カイコは、10〜20 ミクロンという細い繭糸を、長さ約 1200 メートルも吐いて繭を作る。

８．参考資料（HP・論文・知財等）

【カルタヘナ法関連】

第二種使用

「第二種使用に係る大臣確認手順及びチェックリスト（（改正）平成 26 年 8 月 21 日経済産業省製造産業局生物化学産業課）」

http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/mono/bio/cartagena/application_procedure2.pdf

「二種申請手続きの流れ」　http://www.bio.nite.go.jp/anzen/img/shinsei_flow.pdf

「カルタヘナ法に基づく産業上の使用等に係る第二種使用等（経済産業省所管分野）拡散防止措置の確認申請手続きに係る資料の作成・提出等について（第５版）」

http://www.bio.nite.go.jp/anzen/data/manual140926.pdf

「カルタヘナ法–はじめての産業利用申請–」

http://www.nbrc.nite.go.jp/nbrcnews.html#cartagena

第一種使用

「遺伝子組換え農作物のカルタヘナ法に基づく審査･管理に係る標準手順書」

http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_data/sop/pdf/sop_text.pdf

平成 26 年度遺伝子組換えカイコの飼育（第 1 種使用等）に関する飼育実験計画書

http://www.nias.affrc.go.jp/press/2014/20140527/plan.pdf

【参考文献】

Asakura, T., Kaplan, D. (1994). “Silk production and processing” in Encyclopedia of Agricultural Science, Ed. by C.J.Arutzen, Academic Press, **4**, 1-11.

Asakura, T., Saotome, T., Aytemiz, D., Shimokawatoko, H., Yagi, T., Fukayama, T., Ozai, Y., Tanaka, R. (2014). “Characterization of silk sponge in wet state using ^{13}C solid state NMR for development of porous silk vascular graft with small diameter” RSC Advances **4**(9): 4427-4434.

Asakura, T., Ohata, T., Kametani S., Okushita, K., Yazawa, K., Nishiyama, Y., Nishimura, K., Aoki, A., Suzuki, F., Kaji, H., Ulrich, A. S., Williamson, M. P. (2015) “Intermolecular packing in *B. mori* silk fibroin: multinuclear NMR study of the model peptide $(Ala\text{-}Gly)_{15}$ defines a heterogeneous antiparallel antipolar mode of Assembly in the silk II form” Macromolecules **48**(1): 28-36.

Aytemiz, D., Sakiyama, W., Suzuki, Y. Nakaizumi, N.; Tanaka, R.; Ogawa, Y.; Takagi, Y.; Nakazawa, Y.; Asakura, T., (2013)”Small-diameter knitted silk vascular grafts (3mm diameter) with a double-raschel knitted silk tube coated with silk fibroin sponge” Advanced Healthcare Materials **2**: 361-368.

Aytemiz, D., Suzuki, Y., Shindo, T., Saotome, T., Tanaka, R., Asakura, T. (2014) “ *In vitro and in vivo* Evaluation of Hemocompatibility of Silk Fibroin Based Artificial Vascular Grafts" International Journal of Chemistry **6** (2): 1-14.

Banno, Y., Nagasaki, K., Tsukada, M., Minohara, Y., Banno, J., Nishikawa, K., Yamamoto, K., Tamura, K., Fujii, T. (2013). "Development of a method for long-term preservation of *Bombyx mori* silkworm strains using frozen ovaries" Cryobiology **66**(3): 283-287.

Daimon, T., Kiuchi, T., Takasu, Y. (2014). "Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*" Development, Growth & Differentiation **56**(1): 14-25.

Enomoto, S., Sumi, M., Kajimoto, K., Nakazawa, Y., Takahashi, R., Takabayashi, C., Asakura, T., Sata, M. (2010). "Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material" Journal of Vascular Surgery **51**(1): 155-164.

Hashimoto, T., Kojima, K., Otaka, A., Takeda, Y. S., Tomita, N., Tamada, Y. (2012). "Quantitative evaluation of fibroblast migration on a silk fibroin surface and TGFBI gene expression" Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition **24**(2): 158-169.

Hino, R., Tomita, M., Yoshizato, K. (2006). "The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor" Biomaterials **27**(33): 5715-5724.

Iizuka, M., Ogawa, S., Takeuchi, A., Nakakita, S., Kubo, Y., Miyawaki, Y., Hirabayashi, J., Tomita, M. (2009). "Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons" FEBS Journal **276**(20): 5806-5820.

Iizuka, T., Sezutsu, H., Tatematsu, K.-i., Kobayashi, I., Yonemura, N., Uchino, K., Nakajima, K., Kojima, K., Takabayashi, C., Machii, H., Yamada, K., Kurihara, H., Asakura, T., Nakazawa, Y., Miyawaki, A., Karasawa, S., Kobayashi, H., Yamaguchi, J., Kuwabara, N., Nakamura, T., Yoshii, K., Tamura, T. (2013). "Colored fluorescent silk made by transgenic silkworms" Advanced Functional Materials **23**(42): 5232-5239.

Imamura, M., Nakai, J., Inoue, S., Quan, G. X., Kanda, T., Tamura, T. (2003). "Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*" Genetics **165**(3): 1329-1340.

Jiraskova, N., Rozsival, P., Burova, M., Kalfertova, M. (2011). "AlphaCor artificial cornea: clinical outcome" Eye **25**(9): 1138-1146.

Kameda, T., Kojima, K., Togawa, E., Sezutsu, H., Zhang, Q., Teramoto, H., Tamada, Y. (2010). "Drawing-induced changes in morphology and mechanical properties of hornet silk gel films" Biomacromolecules **11**(4): 1009-1018.

Kawakami, M., Tomita, N., Shimada, Y., Yamamoto, K., Tamada, Y., Kachi, N., Suguro, T. (2011). "Chondrocyte distribution and cartilage regeneration in silk fibroin sponge" Bio-Medical Materials and Engineering **21**(1): 53-61.

Kuwana, Y., Sezutsu, H., Nakajima, K., Tamada, Y., Kojima, K. (2014). "High-toughness silk produced by a transgenic silkworm expressing spider (*Araneus ventricosus*) dragline silk protein" PLoS ONE **9**(8): e105325.

Lu, Q., Zhang, B., Li, M., Zuo, B., Kaplan, D. L., Huang, Y., Zhu, H. (2011). "Degradation mechanism and control of silk fibroin" Biomacromolecules **12**(4): 1080-1086.

Matsumoto, Y., Ishii, M., Ishii, K., Miyaguchi, W., Horie, R., Inagaki, Y., Hamamoto, H., Tatematsu, K.-i., Uchino, K., Tamura, T., Sezutsu, H., Sekimizu, K. (2014). "Transgenic silkworms expressing human insulin receptors for evaluation of therapeutically active insulin receptor agonists" Biochemical and Biophysical Research Communications **455**(3–4): 159-164.

Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T., Suzuki, K.-i. T. (2014). "Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9" Nature Communications **5**.

Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yucel, T., Wang, X., Lovett, M. L., Kaplan, D. L. (2011). "Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin" Nature Protocols **6**(10): 1612-1631.

Sehnal, F., Sutherland, T. (2008). "Silks produced by insect labial glands" Prion **2**(4): 145-153.

Takasu, Y., Kobayashi, I., Beumer, K., Uchino, K., Sezutsu, H., Sajwan, S., Carroll, D., Tamura, T., Zurovec, M. (2010). "Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection" Insect Biochemistry and Molecular Biology **40**(10): 759-765.

Takasu, Y., Tamura, T., Sajwan, S., Kobayashi, I., Zurovec, M. (2014). "The use of TALENs for nonhomologous end joining mutagenesis in silkworm and fruitfly" Methods **69**(1): 46-57.

Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J. L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J. C., Couble, P. (2000). "Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector" Nature Biotechnology **18**(1): 81-84.

Teramoto, H., Kojima, K. (2014). "Production of *Bombyx mori* silk fibroin incorporated with unnatural amino acids" Biomacromolecules **15**(7): 2682-2690.

Tomita, M., Hino, R., Ogawa, S., Iizuka, M., Adachi, T., Shimizu, K., Sotoshiro, H., Yoshizato, K. (2007). "A germline transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon" Transgenic Research **16**(4): 449-465.

Wang, Y., Li, Z., Xu, J., Zeng, B., Ling, L., You, L., Chen, Y., Huang, Y., Tan, A. (2013). "The CRISPR/Cas System mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*" Cell Research **23**(12): 1414-1416.

Yagi,T., Sato, M., Nakazawa, Y., Tanaka, K, Sata,M., Itoh, K., Takagi, Y., Asakura, T. (2011) “Preparation of double-raschel knitted silk vascular grafts and evaluation of short-termfunction in a rat abdominal aorta” Journal of Artificial Organs **14**(2): 89-99.

朝倉, 田中 (2014) “家蚕絹を用いた小口径人工血管の開発” 高機能性繊維の最前線 ~医療、介護、ヘルスケアへの応用~ 第四編 第 7 章, シーエムシー出版, 148-155.

朝倉 (2015) “シルクによる再生医療材料の開発 ー衣料から医療へー” 工業材料 日刊工業出版プロダ

クション 2015 年 2 月号特集, 総論 シルクで創る再生医療材料の最新動向, 10-13, １. 構造と特性, 14-18, ３. 縫合糸, 25-28.
早乙女, 上杉, 衣笠, 山本, 岡本, 朝倉 (2014). “組紐製小口径絹人工血管の作製とイヌ腹部大動脈移植による評価” 繊維学会誌 **70**(12): 281-287.
玉田 (2007). "フィブロインの利用 (特集：絹タンパクフィブロイン研究の最前線)" 蚕糸・昆虫バイオテック **76**(1): 3-8.
玉田, 小林, 角 (2015) "フィブロインスポンジの安全性評価 －第1報－" 日本シルク学会誌 **23**: 71-73.
寺本 (2007). "材料化によるセリシンの新たな利用展開" BIO INDUSTRY **24**(11): 60-67.
神村, 日本, 葛西, 竹内, 畠山, 石橋（編）(2010). 分子昆虫学―ポストゲノムの昆虫研究―（共立出版）
瀬筒, 立松 (2014). "医療用有用タンパク質の生産を目指した組換えカイコの作製と展開(特集：昆虫の生物機能の解明と創薬・医療への応用)" 生化学 **86**(5): 553-560.
浜本, 関水 (2014). "カイコをモデル動物とした創薬(特集：昆虫の生物機能の解明と創薬・医療への応用)" 生化学 **86**(5): 578-582.

【関連特許】

生物研関連特許リスト

「カイコ卵へのポリヌクレオチドの効率的導入方法」（特許第 4132760 号、特許権者：生物研）

「効率的な遺伝子組換えカイコの作出方法」（特願 2006-090174 、出願人：生物研）

「カイコのキヌレニン酸化酵素遺伝子をコードする DNA の利用」（特許第 4431739 号、特許権者：生物研）

「アリールアルキルアミンーNーアセチルトランスフェラーゼ遺伝子とその利用」（特願 2011-139217 、出願人：生物研）

「カイコ中部絹糸腺特異的遺伝子発現系を利用したタンパク質の製造方法」（特許第 5131798 号、特許権者：生物研）

「後部絹糸腺遺伝子発現ユニット及びそれを有する遺伝子組換え絹糸虫」（特願 2012-281330 、出願人：生物研）

「セリシンを大量に生産する蚕品種」（特許第 3374177 号、特許権者：生物研）

「カイコにおける組換えタンパク質生産に用いる発現カセット」（特願 2006-048674 、出願人：生物研、東レ）

「外来酵素蛋白質の製造法、それに用いる遺伝子組換えカイコおよび製造法」（特許第 4798428 号、特許権者：生物研、日東紡）

「抗体を産生するトランスジェニックカイコとその製造方法」（W02007/046439、出願人：生物研、日東紡）

「T 細胞非依存性抗原に対する IgG 型抗体の製造方法、T 細胞非依存性抗原に対する IgG 型抗体を産出する遺伝子組換えカイコおよびその製造方法」（W02011/046097 、出願人：生物研、日東紡）
「β−N−アセチルヘキソサミニダーゼ」（特開 2009-254324 、出願人：生物研、シスメックス、阪大）
「α1,3-フコシルトランスフェラーゼ」（特願 2008-194338 、出願人：生物研、シスメックス、阪大、 （独）農研機構）
（上記ならびにその他の特許リストは下記ウェブページでもご覧になれます：http://www.nias.affrc.go.jp/patent/recomm.html）

【参考ウェブサイト】

（独）農業生物資源研究所	http://www.nias.affrc.go.jp/
（一社）日本蚕糸学会	http://www.jsss.or.jp/
（一社）繊維学会	http://www.fiber.or.jp/jpn/index.html
日本シルク学会	http://jssst.sakura.ne.jp/htdocs/
日本野蚕学会	http://jswsmo.appspot.com/
（一財）大日本蚕糸会	http://www.silk.or.jp/
蚕糸・絹業提携支援センター	http://www.silk-teikei.jp/
ナショナルバイオリソースプロジェクト（カイコ）	http://silkworm.nbrp.jp/
ナショナルバイオリソースプロジェクト（SilkwormBase）	http://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/index.jsp
Silk New Wave（カイコ・蚕糸・染織・シルク等に関心のある人のためのページ）	http://www.nias.affrc.go.jp/silkwave/hiroba/silk_wave.htm
養蚕技術発達史（農業技術ヴァーチャルミュージアム内）	http://mmsc.ruralnet.or.jp/v-museum/history06/index.html
Silkworm Genome Research Program	http://sgp.dna.affrc.go.jp/jp/index.html
Silkbase	http://silkbase.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi

９．問い合わせ先

国立研究開発法人農業生物資源研究所
広報室　TEL: 029-838-8469　FAX: 029-838-8465
遺伝子組換え研究センター　遺伝子組換え研究推進室
TEL: 029-838-7431
E-mail: agrihealth@nias.affrc.go.jp

＊平成 28 年 4 月以降、問い合わせ先の組織名称及び連絡先は以下のとおり変更となります。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構　生物機能利用研究部門
企画管理部　遺伝子組換え研究推進室
TEL: 029-838-7138
E-mail: agrihealth@naro.affrc.go.jp