

厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

非ヒト霊長類の動物実験代替法に関する国内外の動向調査および開発に向けた
基礎情報の取得に資する研究

令和4年度 分担研究年度終了報告書

代替法開発に関する国内外の動向調査

研究分担者 花木 賢一

国立感染症研究所 安全実験管理部 部長

研究要旨

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の基礎研究、治療薬、ワクチン開発のための非ヒト霊長類（NHP）の世界的需要が高まりと中国の輸出停止により、NHPは入手困難となっている。そこで、感染症研究におけるNHP動物実験代替法の動向調査としてCOVID-19動物モデルについて論文調査を行った。その結果、代表的な実験動物に加えて日本では普及していないツパイとコットンラットによる動物モデルが確認された。NHPの動物実験代替法を検討する上で、実験動物としての動物種を増大させることが有用と考えられた。

A. 研究目的

非ヒト霊長類（NHP：non-human primates）はエイズからアルツハイマー病まで、さまざまな種類のヒトの疾病を理解し、新薬の安全性と有効性を担保するために極めて重要な役割を担っている。新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に対するワクチンと治療薬開発においても、NHPは遺伝子レベルでヒトに酷似しており（90%以上）、ヒトの臨床検査同様に鼻腔スワブによる抗原・核酸検査、肺のX線CT画像解析により病態解析ができること等から重用されている。実際、Pfizer-BioNTechの開発したmRNAワクチンはアカゲザルを用いた前臨床試験で強い抗原特異的免疫応答を引き起こすことが証明され、臨床試験を開始する科学的裏付けとなった〔Nature 592:283–289, 2021〕。また、COVID-19に対する最初の治療薬としてアメリカだけでなく日本でも承認を受けたレムデシビルもSARS-CoV-2感染アカゲザルにおいて治

療効果が証明された〔Nature 585:273–276, 2020〕。しかし、SARS-CoV-2は病原性、感染性、抗体回避を修飾することができる変異を獲得しており、これまで有効であったワクチンや治療薬が新たに出現する変異株に有効であるか継続して評価する必要がある。COVID-19パンデミックによるカニクイザル、アカゲザル等のNHPの需要増に対して、主要供給国である中国が2020年3月に野生動物の販売を禁止した。アメリカでは2019年に輸入された33,818頭のNHP（主にカニクイザル）の60%以上を中国から輸入しており、その結果、需給バランスが一気に崩壊し、パンデミックが起こる2,3年前は3,000ドルであったカニクイザルの販売価格が40,000ドルに急騰する事態になった〔NBC News; Dec. 17, 2022〕。アメリカには7つの国立霊長類センターがあり、25,000匹もの実験用サル（主にはアカゲザル）が飼育されているが、増大するNHPの需要に応えることができずに輸入

に頼っていた。そのため、研究者らは NHP の安定供給を求めてアメリカ国内の NHP コロニーの増強を政府に訴えている。しかし、繁殖年齢に達した 100 頭のメスがいるコロニーであっても 1 年間に生まれる子の数は 60~70 頭に留まり、さらに子が研究に適する年齢に達するまでに 2~3 年要する [NBC News; Dec. 17, 2022] ということから、動物実験福祉の倫理原則 3R の内、Replacement と Reduction を強化することが最も現実的な取り組みである。そこで、本研究ではヒトの感染症研究において NHP の需要を他の動物へ置き換えることの可能性について論文調査を行った。

B. 研究方法

今年度の研究期間が 2 ヶ月足らずのため、調査対象は現在も感染の流行が続く COVID-19 (SARS-CoV-2 感染症) に限定した。そして、PubMed で COVID-19 に関する動物モデルの総説を検索し、その詳細は必要に応じて原著論文を確認した。

(倫理面への配慮)
文献調査に基づく研究であるため、該当しない。

C. 研究結果

COVID-19 動物モデルに関する総説として、Animal models in SARS-CoV-2 research (Chu et al., Nat Methods 19:392-394, 2022); Cell and Animal Models for SARS-CoV-2 Research (Bestion et al., Viruses 14:1507, 2022); Animal models for SARS-CoV-2 infection and pathology (Bi et al., MedComm (2020) 2:548-568, 2021) ; Animal Models for COVID-19: Hamsters, Mouse, Ferret, Mink, Tree Shrew, and Non-human Primates (Shou et al., Front Microbiol. 12:626553, 2021) を参考

にした。

COVID-19 は 2019 年 12 月初旬に中国・武漢市で最初の患者が報告され、その後、急速に世界へ感染拡大した感染症である。SARS-CoV-2 の由来は明らかになっていないが、2002 年 11 月 16 日に中国広東省で原因不明の重症肺炎の患者が報告され、やがて世界に伝播した重症急性呼吸器症候群 (SARS) の原因微生物である SARS-CoV とゲノム全体で約 80% と高い相同性があることから SARS-CoV-2 と命名された。SARS-CoV-2 は様々な哺乳動物が自然感染することが報告されており、最も有名な事例はオランダのミンク農場で発生したヒト⇄ミンク感染である [Science 371:172-177, 2021]。その他に家庭動物であるイヌやネコ、展示動物であるライオン、トラ、ピューマといったネコ科動物の感染死亡例も報告されており、SARS-CoV-2 は広い宿主域をもっている [mBio 11:e02220-20, 2020; Arch Virol 167:2503-2517, 2022]。そのため、多様な動物モデルが検討されている。

NHP :

アカゲザル、アフリカミドリザル、カニクイザルなどが用いられている。これらの内、アフリカミドリザルは SARS-CoV-2 の培養に用いられる Vero 細胞の由来動物であるが、ワシントン条約により輸入が禁止されており、繁殖を行っていない日本では事実上利用できない。SARS-CoV-2 感染における第一の受容体は ACE2 であるが、特にアカゲザルの ACE2 はヒトの ACE2 (hACE2) と比較して 91% の相同性を示す [Virology 381:89-97, 2008]。そして、SARS-CoV-2 の感染により食欲減退、脱水、一過性の発熱 (1~2 日目)、軽度の体重減少、時折咳き込むなどの極軽微から軽度の臨床症状しか示さず、7 日目にピークを迎えて 9~17 日目で回復する [Nature 585:268-272, 2020]。

従って、アカゲザル感染モデルは COVID-19 患者の中程度の症状の再現に留まり、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) はみられない。アフリカミドリザルはアカゲザルやカニクイザルよりも SARS-CoV 感染に対して感受性が高いことが示されており [Virology 330:8–15, 2004]、軽症から重症までの反応が見られ、高齢のアフリカミドリザルは、SARS-CoV-2 で引き起こされる死亡の主因として注目されている ARDS に進行することが報告されている [Am. J. Pathol. 191:274–282, 2021; Nat. Immunol. 22:86–98, 2021]。カニクイザルでは、より軽度な身体活動低下あるいは無症状に留まる [Viruses 13:1673, 2021]。若齢個体に比べて高齢個体の鼻腔スワブでより高レベルのウイルス RNA が検出されたが、アカゲザルとは異なり顕著な肺感染や明らかな臨床症状を示さなかった [Science 368:1012–1015, 2020]。コモンマーモセットでは明らかな臨床症状を示さなかったが、2～8 日目の末梢血とウイルス接種後 2 週間の鼻、喉、肛門スワブよりウイルス RNA を検出することができた。しかし、実験中のマーモセットの血清中には、ウイルス特異的な抗体は検出されなかった [Signal Transduct Target Ther. 5:157, 2020]。

マウス：

マウス ACE2 (mACE2) は hACE2 と比較して ACE と SARS-CoV-2 の S 蛋白と結合する部位のアミノ酸が置換されているため、SARS-CoV-2 の感染が成立しにくい。そのため、マウスで SARS-CoV-2 の研究を可能にするための戦略が採られている。それらの中で、ヒトサイトケラチン 18 遺伝子 (KRT18) をプロモーターとして上皮細胞に hACE2 が高発現させた K18-hACE2 マウスは SARS 研究用に開発されたマウスであり、SARS-CoV-2 の研究で最も汎用され

ているマウスモデルの一つである。COVID-19 の重症肺炎に類似した重症呼吸器疾患を再現している [Nature 589:603–607, 2021]。そして、ウイルスの経鼻接種後、6 週齢の K18-hACE2 マウスは震えや失調性歩行などの神経症状を示し、6 日目までにすべての動物が死亡した [Viruses 13:132, 2021]。このマウスモデルは神経系における SARS-CoV-2 感染の病因を研究するために有用である。hACE2 をコードする複製欠損アデノウイルスを野生型マウスに鼻腔内投与することにより肺組織で hACE2 を発現させて SARS-CoV-2 へ感受性を付与した AdV-hACE2 マウスは、K18-hACE2 マウスとは対照的により低力価のウイルス増殖がみられ、明確な症状はみられない [Cell 182:744.e–753.e., 2020; Emerg. Microbes Infect. 9:2433–2445, 2020]。

マウス馴化ウイルスを用いたモデルは、SARS-CoV-2 を野生型マウスで連続継代することにより作出される [Cell 183:1070.e–1085.e., 2020]。これは RNA ウイルスの集団に関連するウイルスの準種が群を成しており、その中で mACE2 への結合親和性を高める重要な蛋白質に変異をもつマイナーなウイルスが継代により選抜されると考えられる。そして、致死的な肺疾患を引き起こすマウスモデルの作出に成功している。また、マウス馴化ウイルスはリバーシジェネティクスを用いても作出されており [Nature 586:560–566, 2020]、マウス馴化ウイルスを用いたマウスモデルによる臨床試験が行われている [Cell 182:1271–1283, 2020; J Virol. 94:e01218-20, 2020; Immunity 54:1869–1882, 2021]。なお、マウス馴化ウイルスを用いる本モデルは、ヒトの疾患を再現しない独自の病態で障害を引き起こす可能性があること、中和抗体反応の主たる標的である receptor-binding

domain (RBD) など免疫原に重要な変異が発生すると、マウス馴化ウイルスでは中和効果がない等の限界がある。また、マウス馴化ウイルスの作出は懸念されるデュアルユース (DURC) に該当することにも留意する必要がある。

ハムスター：

SARS-CoV-2 の S 蛋白 RBD と相互作用する hACE2 ドメインとシリアンハムスターの ACE2 ドメインは酷似していることから、シリアンハムスターは SARS-CoV-2 の感染モデルとして適していることが示唆されている [Mol Inform. 40:2100031, 2021]。実際、 5×10^4 TCID₅₀ の SARS-CoV-2 を鼻腔内接種すると約 15% の体重減少が起こり、ハムスターの上下気道、肺、心臓、脳、脾臓、肝臓などの器官でウイルスが増殖した [Nat Med. 26:1694–1700, 2020; Nature 583:834–838, 2020]。ハムスターは軽度の臨床症状を示し、14 日目に回復した [Nature 583:834–838, 2020; Viruses 12:779, 2020]。しかし、 5×10^5 TCID₅₀ の SARS-CoV-2 をハムスターに鼻腔内接種すると、CT で中程度から致死的な気管支間質性肺炎と両側および多葉の磨りガラス混濁といった COVID-19 患者と多くの特徴を共有し、重度の体重減少、死亡率の上昇が見られる [Nat Med. 26:1694–1700, 2020; PNAS. 117:16587–16595, 2020; Front Microbiol. 11:618891, 2020]。重度の SARS-CoV-2 感染ハムスターモデルにおいても、肺、心臓、脳、脾臓、肝臓、リンパ節、腎臓、副腎、消化管、卵巣、前立腺、小胞腺の組織で高レベルのウイルス複製を伴う多臓器損傷が観察され、最終的には全身的な傷害につながる。なお、シリアンハムスターより小型のチャイニーズハムスターでは、肺病理はシリアンハムスターと同様の肺炎と肺胞

損傷が認められた。ただし、気管支炎と肺炎の経過はシリアンハムスターと比較して軽症で、肺炎は長期化した [Transbound Emerg. Dis. 68:1075–1079, 2020]。チャイニーズハムスターは糖尿病を自然発症するため、糖尿病患者の COVID-19 モデルの作出に有用である可能性がある [Lab Anim Res. 37:23, 2021]。

フェレット：

フェレットはインフルエンザウイルス、SARS-CoV などのヒト呼吸器系ウイルスの感染・伝播の研究モデルとしてよく用いられている哺乳類である。そして、フェレットの呼吸器は、気管支壁の腺密度、末端気管支、上・下気道の割合など、解剖学的にヒトと類似する [Virology 479-480:259–270, 2015]。ACE2 は主にフェレットの腺房上皮細胞および II 型肺胞上皮細胞に発現し、SARS-CoV 感染に親和性を示す [Nature 425:915, 2003]。ただし、ウイルスの複製は上気道にほぼ限定され、感染したフェレットは感染後 2 日以内に体温上昇を示し、感染後 4 日目にピークに達する。軽度の疾病結果にもかかわらず、SARS-CoV-2 は直接および間接的な接触によって個体間で効率的に伝播するため、フェレットは SARS-CoV-2 の感染伝播や軽症感染の研究のための重要なモデルとなっている [Cell Host Microbe 27:704.e–709.e., 2020; Nat. Commun. 11:3496, 2020]。なお、SARS-CoV-2 感染フェレットにモルヌピラビルを 1 日 2 回経口投与した結果、上気道での SARS-CoV-2 の複製が著しく減少し、未治療接触動物へのウイルス伝播が完全に阻害されることが報告されている [Nat. Microbiol. 6:11–18, 2021]。

ツパイ：

ツパイは遺伝的にマウスよりもヒトに近い哺乳類で C 型肝炎ウイルス [J Virol.

84:303–311, 2010]、ジカウイルス [J Virol. 93:e01982-18, 2019]、インフルエンザウイルス [Virol J. 10:111, 2013] 等の感染動物モデルとして用いられている。SARS-CoV-2 感染の受容体である ACE2 は、ヒトと比較して 85.47% の全体的な相同性を示し、SARS-CoV-2 に親和性を示し、腎臓、肺、肝臓、脾臓、脊椎骨などの器官に多く発現している [Bioengineered 12:2836–2850, 2021]。SARS-CoV-2 の経口、鼻腔内、眼への複合接種により、肺組織、特に若齢ツパイ (1 歳) の肺細胞でウイルス複製が誘導され、3 日目でピークに達し、14 日目には検出限界以下に低下した。5~6 歳の高齢のツパイは若齢個体に比べて SARS-CoV-2 感染に弱く、肺組織でのウイルス排出期間が長く、7 日目でピークを示した [Zool Res. 41:517–526, 2020]。なお、オスと高齢のツパイは、メスよりもウイルス排出の効率が高い [Sci Rep. 10:16007, 2020]。COVID-19 患者で観察される典型的な特徴を再現できないため、SARS-CoV-2 感染の病因、治療法、ワクチン評価モデルとしてのツパイの研究はほとんどない。

コットンラット：

ハムスターに近縁のマウスとラットの間中サイズの動物で、鼻腔内感染後に肺組織で麻疹ウイルスを再現する唯一のげっ歯類とされている [Immunol Lett. 65:47-50, 1999]。SARS-CoV の実験感染では、 1×10^6 TCID₅₀ の SARS-CoV を鼻腔内接種しても病気の徴候がなく、血液や組織中から感染性粒子や抗原の存在が証明できないこと、明かな組織病理が認められないことから動物モデルに適さないとされた [Vector Borne Zoonotic Dis. 8:339–344, 2008]。しかし、SARS-CoV-2 に対しては感受性を示し、上気道でウイルスはよく複製し、肺での複製は限定的で体重減少や呼吸困難という

臨床症状は認められなかった。そのため、重度の間質性肺炎を発症するシリアンハムスターとは対照的で、NHP 感染モデルに類似点があった。なお、コットンラットではヒト集団でみられる病状発現と同じ不均一性がみられた [Sci Rep. 13:757, 2023]。

D. 考察

SARS-CoV-2 はヒトだけでなく、様々な動物種に感染して様々な病態を示す。その中で、NHP は軽症モデルに留まり、重症モデルとしてはシリアンハムスター、K18-hACE2 マウスが利用される。また、フェレットは重症化こそしないが、感染伝播モデルとして有用であることが示されている。従って、研究目的に応じて動物モデルを選択できることが COVID-19 の研究の著しい進展に寄与したと考えられる。

感染症の動物モデルを作出するに当たっては、①病原体に感受性のある動物を検索する。②病原体に感受性のある動物を作出する (例：遺伝子組換え動物、人為的免疫不全動物)。③動物に感受性のある病原体を作出する (例：動物での連続継代、リバーズジェネティク法)。④近縁の病原体を用いる (例：ヒト B 型肝炎ウイルスの代替としてのアヒル B 型肝炎ウイルス)。といったアプローチが挙げられる。この内、①は第一選択肢となるものであるが、COVID-19 動物モデルとして日本では馴染みの薄いツパイとコットンラットも用いられていた。ただし、日本でもツパイは C 型肝炎の研究、コットンラットは多包条虫の研究で使用された実績がある。

遺伝子組換え技術の普及により、今日、遺伝子組換えマウスを中心に様々なモデル動物が作出されている。その結果、マウスの動物モデルは劇的に増えた反面、実験動物として利用可能な動物種が減ってい

る。例を挙げると、感染症法により輸入禁止となっているマストミスは、国立感染症研究所（旧予防衛生研究所）で近交系を確立して胚凍結されたが、復元の手段がなく実質的に途絶えている。また、食虫目の実験動物であるスunksは生産業者が販売を中止し、辛うじて少数の大学研究室で維持されている。これら日本で利用困難な実験動物の中から NHP に代わる至適感染動物モデルが作出される可能性があり、実験動物としての動物種を増やす取り組みが必要と考える。

E. 結論

COVID-19 動物モデルについて文献調査を行った。その結果、日本では検討されていない／検討することができない動物種を用いた感染動物モデルに関する報告が確認された。NHP の動物実験代替法を検討する上で、実験動物種としての動物種を増やすことが有用と考えられる。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

F.2 学会発表

該当なし

G.知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし