

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

令和6年度 分担研究報告書

非ヒト霊長類の動物実験代替法等の薬事上の取り扱いに関する研究 一類感染症動物モデルに関する調査研究

研究分担者 花木 賢一

国立感染症研究所 安全管理研究センター長

研究要旨

感染症法で規定された一類感染症の内、クリミア・コンゴ出血熱、エボラウイルス病、マールブルグウイルス病、ラッサ熱は治療薬やワクチンの開発が渴望されている。それら動物モデルのゴールドスタンダードは非ヒト霊長類であるが、それに代わる動物モデルについて文献調査を行った。その結果、何れも「ウイルス野生株+免疫不全マウス」と「マウス馴化ウイルス株+野生型マウス」の組み合わせが確認された。しかし、BSL4 実験室で取り扱うにはマウス個体は小さい、ウイルスの馴化が必要等の難点がある。マカク属サルとマウスの間の大きさに位置するフェレットは、エボラウイルス病の優れた動物モデルであるが、他の一類感染症の原因ウイルスでは発症しない。そのため、ゲノム編集技術によりそれらウイルスに感受性を賦与する遺伝子変換フェレットの作出は、新たな動物モデルの樹立に寄与すると考える。

A. 研究目的

非ヒト霊長類（NHP）は系統発生学的に最もヒトに近い動物種であり、身体構造や機能がヒトと非常に近似しているため高次脳機能の研究、神経疾患や精神疾患の研究に用いられている。また、ヒトに感染する病原体へ感受性を示し、生理代謝機能もヒトに近似することから、感染症研究、医薬品やワクチンの開発にも必須な動物である。しかし、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）パンデミックによる NHP の世界的な需要の高まりと世界最大の供給国である中国の輸出規制によりマカク属サルの価格が暴騰した。このことは動物実験代替法の探索の強い動機となり、*in vitro* や *in silico* の技術開発促進が期待される。

しかし、*in vitro* や *in silico* では生体反応を十分あるいは全く再現できないため、NHP に代わる動物種による生体モデルが求められる。

世界保健機関（WHO）は、COVID-19 パンデミックに先立つ 2018 年 2 月に公衆衛生上の緊急事態を引き起こす可能性があり、有効な治療薬やワクチンが存在しないことから研究開発を加速する必要がある 7 つの疾患を発表した〔研究開発（R&D）ブループリント〕。7 つとは、クリミア・コンゴ出血熱、エボラウイルス病とマールブルグウイルス病、ラッサ熱、中東呼吸器症候群（MERS）と重症急性呼吸器症候群（SARS）、ニパウイルス感染症とヘニパウイルス感染症、リフトバレー熱、ジカウイ

ルス感染症である。また、2024年3月27日に改訂された「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」では、感染防御能の評価は「ヒトでの感染・疾病を反映する動物モデルが存在する場合には、ワクチンが対象とする病原性微生物による感染又は発症の防御を評価項目とすることが望ましい。」とし、多くのヒト感染症モデルのゴールドスタンダードと位置付けられるNHP以外の動物モデルでも許容されることが示された。本研究では、WHOの公表したR&Dブループリントの内、BSL4施設のみで取り扱うことができる一類感染症の病原体の動物モデルについて文献調査を行った。

B. 研究方法

WHOが2018年2月に発表したR&Dブループリントに挙げられた7つの疾患のうち、感染症法により一類感染症に指定されているのは、以下の4疾患である。

クリミア・コンゴ出血熱

エボラウイルス病

マールブルグウイルス病

ラッサ熱

これらについて、動物モデルの開発または動物モデルを用いた研究論文をPubMedで検索し、原著論文等を調査した。

(倫理面への配慮)

文献等調査に基づく研究であるため、該当しない。

C. 研究結果

クリミア・コンゴ出血熱

ブニヤウイルス科ナイロウイルス属クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)を病原体とし、主にヒアロマ属のダニによって媒介される。クリミア・コンゴ出血熱

(CCHF)は、媒介ダニの地理的限界である北緯50度線以南のアフリカ、バルカン半島、中東、アジア諸国に蔓延している。ヒトはダニに刺咬されるか、感染した動物の屠殺中または屠殺直後に血液や組織に接触することで感染する。多くの野生または家畜哺乳類種がCCHFVに感染するが、一部の哺乳類種は高いウイルス血症と抗体レベルを示すにもかかわらず発病しない。免疫正常(野生型)マウスも発病しないが、STAT-1^{-/-}マウス[Bente DA, et al. J Virol. 84:11089–11100, 2010]とIFNAGR^{-/-}マウス[Aligholipour FT, et al. Viruses. 11:237, 2019]が発病モデルとして使用されている。これらのモデルでは致死的感染がみられ、多くの組織で高レベルのウイルス血症とウイルス播種を認める。また、ヒトの感染でみられることがある肝酵素の上昇、リンパ球減少、肝臓病変などの特徴もみられる[Garrison AR, et al. Viruses. 11:590, 2019]。2021年にはマウスに馴化したCCHFV変異株が作出され、野生型マウスでCCHFの重篤なヒト症例に近いモデルが樹立された[Hawman DW, et al. Elife. 10:e63906, 2021]。野生型ハムスターはCCHFを発症しないが、STAT-2^{-/-}ハムスターは致死的なCCHF疾患のモデルとして使用できること、肝腎機能障害を示唆する血液学的、生化学的パラメータの変化を伴うこと、リバビリンなどの抗ウイルス薬の有効性を評価するためにも使用できることが示された[Ranadheera C, et al. Sci Rep. 10:12378, 2020]。ただし、免疫不全マウス並びに免疫不全ハムスターモデルはCCHFV感染における免疫応答の研究に制約があることに留意する必要がある。CCHFVはモルモットへ実験的に感染させても発病しないが、CCHFV自然感染ダニを用いてモルモットにCCHFV

を感染させると重篤な症状と高い死亡率を示したという報告がある [Garrison AR, et al. *Viruses*. 11:590, 2019]。しかし、CCHFVを人工的に感染させたダニではモルモットを発症させなかった [Shepherd AJ, et al. *Am J Trop Med Hyg.* 40:326–331, 1989]。

CCHF 研究に最適なモデルは、感染経路によっては最大 75%の致死率を示す可能性があるカニクイザルモデルと考えられる [Haddock E, et al. *Nat Microbiol.* 3:556–562, 2018]。CCHFV 感染カニクイザルでは顕著な出血がみられ、高レベルのウイルス血症、肝臓と腎臓の機能障害もみられた。しかし、その後の研究では、感染後 28 日目まで精巢にウイルス抗原と RNA が残留するなど、軽度から中等度の症状が報告されている [Smith DR, et al. *PLoS Pathog.* 15:e1008050, 2019]。複数の CCHFV 株の感染でも軽度の疾患を引き起こすことが示されており、カニクイザルモデルの致死率は変動するが、ヒトの CCHF の広い臨床スペクトルを反映していると考えられる [Cross RW, et al. *PLoS Negl Trop Dis.* 14:e0008637, 2020]。CCHF に関するフェレットモデルの報告は確認できなかった。

エボラウイルス病とマールブルグウイルス病

フィロウイルス科には 3 つの属があり、そのうち最も重要なのはオルソエボラウイルス属とオルソマールブルグウイルス属である。オルソエボラウイルス属は 6 種のウイルスが確認されている。その内、エボラウイルス感染症 (EVD) を引き起こすエボラウイルス (EBOV)、スーダンウイルス病 (SVD) を引き起こすスーダンウイルス (SUDV)、ブンディブギョウウイルス病 (BVD) を引き起こすブンディブギョウウイ

ルス (BDBV) の 3 種がアウトブレイクを引き起こすことが知られており、それぞれの動物モデルが報告されている。オルソマールブルグウイルス属にはマールブルグウイルス (MARV) とラヴァンウイルスがあり、これらの動物モデルも報告されている [Siragam V, et al. *Zool Res.* 39:15–24, 2018]。フィロウイルスの多くの研究では、入手のしやすさ、低コスト、取り扱いの容易さ、解析試薬が豊富なことからマウスモデルが利用されている。しかし、マウスはフィロウイルス野生株に感染しないため、マウス馴化株の作出が必要である。マウスとマウス馴化 EBOV の組み合わせにより、肝臓と脾臓におけるウイルス複製、血液凝固障害、肝臓と腎臓の機能障害、感染時のマクロファージと単核食細胞への標的化など、エボラウイルス病患者に類似した特徴を再現できる [Bray M, et al. *J Infect Dis.* 178:651–661, 1998; Siragam V, et al. *Zool Res.* 39:15–24, 2018]。フィロウイルス感染マウスモデルの欠点は、ウイルスを腹腔内感染させる必要があり、フィロウイルスの自然感染経路ではないことである。マウス馴化ウイルス株を用いたマウスモデルは、EBOV と MARV のワクチンや治療法の非臨床研究開発に用いられており、VSV-EBOV ワクチンやエボラウイルス感染症治療用モノクローナル抗体など、重要な知見の獲得に貢献している [Jones SM, et al. *J. Infect. Dis.* 196(Suppl. 2):404, 2007; Qiu X, et al. *PLoS Negl Trop Dis.* 6:e1575, 2012; Banadyga L, et al. *ACS Infect. Dis.* 4:673–685, 2018; Rahim MN, et al. *PLoS Pathog.* 15:e1007564, 2019]。また、インターフェロン α/β 受容体 (IFNAR $^{-/-}$)、インターフェロン $\alpha/\beta/\gamma$ 受容体 (IFN- $\alpha/\beta/\gamma R^{-/-}$)、またはシグナル伝達および転写活性化因子 1 (STAT1)

を欠損した免疫不全マウスがフィロウイルス感染モデルとして用いられている [Bray M J. Gen Virol. 82:1365–1373, 2001; Falzarano D. and Bente DA. Clin MicroBiol Infect. 21S:e17–e27, 2019]。これらのマウスはフィロウイルス野生株に感受性があるため、新規分離株を用いた動物実験やその新規分離株による感染症の対策研究に有用である。マウス以外の小型動物モデルでは、シリアンハムスターの報告がある。マウス馴化 EBOV はシリアンハムスターにも感染し、感染後 5 日以内に発症して死亡した [Ebihara H, et al. J Infect Dis. 207:306–318, 2013]。また、ハムスター馴化 MARV はマールブルグウイルス病研究に適したモデルと考えられている [Marzi A, et al. Sci Rep. 6:39214, 2016]。モルモットはフィロウイルス感染モデルとしても広く用いられてきた。EBOV [Volchkov VE, et al. Virology. 277:147–155, 2000]、MARV [Cross RW, et al. J Infect Dis. 212(Suppl. 2):258, 2015]、SUDV [Wong G, et al. J Virol. 90:392–399, 2015] のモルモットモデルがある。ただし、致死的な感染症を引き起こさせるためにはモルモット馴化株が必要である。感染症の進行を研究するためにはマウスよりも個体が大きく入手しやすいことは利点であるが、詳細な免疫学的研究ではマウスに利点がある。そのため、モルモットモデルは、マウスモデルに加えて二次的な解析へ用いることに有用性がある。フェレットは EBOV、SUDV、BDBV の野生株を感染させると発症し、ヒトのエボラウイルス病の特徴を再現する。そのため、小動物モデルよりも優れた動物モデルである [Cross R.W., et al. J Infect Dis. 214:565–569, 2016; Siragam V., et al. Zool Res. 39:15–24, 2018]。ただし、免疫学的研究を行うために必要な試薬が

十分に入手できない欠点がある。加えて、MARV とラブンウイルスには感染しないことが報告されている [Cross R.W., et al. J Infect Dis. 18(suppl_5):S448–S452, 2018]。

NHP は、フィロウイルス感染症のゴールドスタンダードモデルであり、カニクイザル、アカゲザル、アフリカミドリザル、マーモセットなどが感染モデルとして使用されている [Siragam V, et al. Zool. Res. 39:15–24, 2018; Falzarano D and Bente DA. Clin MicroBiol Infect. 21S:e17–e27, 2019]。ヒトの病態を忠実に再現することからワクチンや治療薬の開発に用いられている。ウイルスの馴化を必要とせず、感染の全経過と免疫応答を研究するために必要な様々なマカク属用試薬が利用可能であることが大きな利点である。その内、カニクイザルはワクチン研究に最もよく使用され、アカゲザルは治療薬の評価に頻用されている。この使い分けは、カニクイザルの疾病的経過がアカゲザルのそれよりも若干短いことに起因する [Geisbert TW, et al. J Infect Dis. 212 Suppl 2(Suppl 2):S91–S97, 2015]。

ラッサ熱

アレナウイルス科には、げっ歯類媒介性ウイルスの 2 つのグループ：アフリカに生息するラッサウイルス (LASV) などの旧世界アレナウイルスとアメリカ大陸に分布する新世界アレナウイルスに分類され、南米で発見される出血熱を引き起こすウイルスを含む。LASV は世界中で最も一般的な出血熱の原因ウイルスであるが、マチュポウイルス、フニンウイルス、サビアウイルス、チャパレウイルス、グアナリトウイルスなど、出血熱を引き起こす南米アレナウイルスも発見されている [Shao J, et al.

Pathogens. 4:283–306, 2015]。ラッサ熱を研究するための多くのモデルが開発されて特徴づけられており、その多くはワクチンや治療薬の開発に利用されている。フィロウイルスの場合と同様、野生型マウスはLASVに感受性がない。しかし、IFNAR^{-/-}とSTAT1^{-/-}マウスの感染モデルが報告されている。LASVに曝露されると、IFNAR^{-/-}マウスは高いウイルス力価を示し、逆立った毛と活動性の低下、体重減少を認めた。しかし、発熱、致死はみられなかった [Yun NE, et al. *J Virol.* 86:3389–3392, 2012]。野生型骨髄細胞を移植した放射線照射した IFNAR^{-/-}マウス [Oestereich L, et al. *PLoS Pathog.* 12:e1005656, 2016] と STAT1^{-/-}マウス [Yun NE, et al. *J Virol.* 87:10908–10911, 2013] は、LASVの致死感染モデルとなるが、その使用は限られている。モルモットはLASV感染の最も汎用されている動物モデルであり、非近交系ハートレーモルモットと近交系モルモット strain 13 が病因研究と治療薬やワクチン開発のための重要なモデルとなっている [Warner BM, et al. *Drug Des Dev Ther.* 12:2519, 2018; Stein DR, et al. *Npj Vaccines.* 4:1–7, 2019; Warner BM, et al. *Curr Opin Virol.* 37:84–90, 2019]。LASVの複数の株が近交系モルモット strain 13 に感染するが、致死率は様々である。ハートレーモルモットでは均一な致死感染のために条件検討が行われている [Safronetz D, et al. *J Infect Dis.* 207:1316–1327, 2013; Safronetz D, et al. *Sci Rep.* 5:14775, 2015]。アレナウイルス科ウイルスに関するフェレットモデルの報告は確認できなかった。

NHP は LASV 研究においてもゴールドスタンダードモデルであり、アカゲザルとカニクイザルの致死感染モデルが病態研究や治療薬とワクチンの評価に用いられ

ている [Warner BM, et al. *Curr Opin Virol.* 37:84–90, 2019]。また、マーモセットやオマキザルなどの他の NHP も用いられている [Yun NE, et al. *Viruses.* 4:2031–2048, 2012; Warner BM, et al. *Curr Opin Virol.* 37:84–90, 2019]。NHP の LASV 感染はヒトの疾患をよく再現し、肝臓、副腎、脾臓の壊死や神経系への影響などの特徴的な症状を示す。

D. 考察

本研究では一類感染症の原因ウイルスに対象を絞って、NHP と他の動物の感染モデル調査を行った。この調査の背景には、長崎大学に BSL4 施設（高度感染症研究センター実験棟）が建設されて試運転を行っており、厚生労働大臣により特定一種病原体等所持施設として指定されることが念頭にあった。そして、2025 年 1 月 24 日に厚生労働大臣が長崎大学を特定一種病原体等所持者として、また、国立大学法人長崎大学内の高度感染症研究センター実験棟を特定一種病原体等所持施設として指定した。特定一種病原体の所持にはさらに時間を要すると思われるが、一類感染症に関する基礎から応用研究の展開が予想される。なお、長崎大学 BSL4 施設はスツ型 BSL4 動物実験室を整備し、マカク属サル（カニクイザル）とマウス等の小型げっ歯類を飼育可能としている。

CCHFV、オルソエボラウイルス属ウイルス、オルソマールブルグ属ウイルス、LASV の研究では NHP は動物モデルとしてゴールドスタンダードであるが、その代替として免疫不全マウスが用いられ、ウイルス野生株に感受性を示す。しかし、免疫不全動物モデルでは免疫学的研究に制約がある。それを補うものとして、マウス馴化株と野生型マウスを組み合わせたモデルが開発

されている。これら 2 つのマウスモデルにより、NHP の代替を担うことが期待される。しかし、BSL4 実験環境では対象動物が小さいということは作業上の制約になり、事故も起きている [Kortepeter MG, et al. Emerg Infect Dis. 14:881–887, 2008; Günther S, et al. J Infect Dis. 204 Suppl 3:S785–S790, 2011]。また、ウイルス野生株はマウスに感受性を示さないことも、新たなウイルス株の出現への対応で後れをとることになる。この点では、オルソエボラウイルス属ウイルスについてはフェレット、アレナウイルス属ウイルスについてはモルモットが NHP に代わる動物モデルとなると考えられる。しかし、CCHFV とオルソマールブルグウイルス属ウイルスではウイルス野生株が免疫正常動物に感染、発症するモデルが NHP に限られる。これらのモデル動物の選択肢を広げる手段として遺伝子改変動物の作出がある。フェレットでは CRISPR-Cas9 [Yu M, et al. Sci Rep. 9:1971, 2019] や TALEN [Johnson MB, et al. Nature. 556:370–375, 2018] によるゲノム編集により遺伝子組換えフェレットが作出された実績がある。そのため、CCHFV と MARV の野生株を感染させて発症する遺伝子組換えフェレットモデルの作出は、それらウイルス研究の進展に寄与すると思われる。その際には、免疫学的解析に必要なフェレット用試薬の充実も不可欠である。さらに、フェレット感染実験を可能にする BSL4 動物実験室の整備も必要になる。

E. 結論

BSL4 施設で取り扱う必要がある一類感染症の原因ウイルスの動物モデルは、NHP が最良である。それに代わる動物モデルとして「ウイルス野生株+免疫不全マウス」と「マウス馴化ウイルス+野生型マウス」がある。しかし、マウスモデルは個体が小さいことによる実験上の制約があり、目的によってより大きな動物モデルが求められる。フェレットは NHP に代わる EBOV 感染動物モデルとして優れていることから、他の一類感染症の原因ウイルスの感染発病モデルとしても期待が大きい。それを実現するためには、ゲノム編集技術による遺伝子組換えフェレットの作出が必要と考える。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2 学会発表

花木賢一：感染症研究における非ヒト靈長類に代わるモデル動物としてのフェレット、日本動物実験代替法学会 第 37 回大会
(2024.11.29, 宇都宮)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし