

インフルエンザウイルスの感染動物モデル ～フェレット編～

渡辺登喜子

東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス感染分野

要約

インフルエンザウイルスは、毎年冬に流行する季節性インフルエンザや、数十年に一度世界的に大流行するパンデミックインフルエンザを引き起こし、社会的に大きな被害をもたらす。さらに近年 H5N1 亜型や H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染の報告数が増加しており、公衆衛生上、深刻な問題となっている。したがって、インフルエンザウイルスがどのようにヒトに感染して発症するのか、そのメカニズムを解明することは最重要課題である。インフルエンザウイルスの研究には、マウスをはじめとして、様々な動物モデルが使われている。その中でもフェレットは、インフルエンザウイルスに感染して、発熱・くしゃみ・咳といった、ヒトで見られるインフルエンザ様症状を示すので、良いモデル動物として認識されている。本稿では、フェレットを用いたインフルエンザウイルスの病原性や伝播性のメカニズム解析の研究成果について紹介する。

1. インフルエンザウイルス

インフルエンザは毎年冬になると流行し、乳幼児や高齢者を中心に多くの犠牲者を出し、社会的な問題となっている。また、2009年に出現した新型 H1N1 ウイルスのように、インフルエンザウイルスは数十年に一度世界的な大流行（パンデミック）を引き起こし、甚大な被害をもたらす。さらに最近、H5N1 亜型や H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルス（以後、それぞれ“H5N1 ウイルス”と“H7N9 ウイルス”と呼ぶ）が人に感染して重篤な症状を起こす例が報告されており、鳥インフルエンザウイルスによるパンデミックの危険性が懸念されている。

インフルエンザウイルスには A, B, C, D の 4 つの型があり、H5N1 ウイルスや H7N9 ウイルスといった鳥インフルエンザウイルスは、A 型インフルエンザウイルスに属する。A 型インフルエンザウイルスは、広い宿主域を持っており、ヒトや家禽だけでなく、ウマ、ブタ、イヌ、アザラシ、クジラなど様々な動物に感染する [1]。本ウイルスの表面には HA（ヘマグルチニン）と NA（ノイラミニダーゼ）という 2 種類の表面糖蛋白質があり、抗原性の違いから、18 種類の HA と 11 種類の NA の亜型に分類されている [1-3]。前世紀と今世紀、人間社会においては、3 つ

の HA 亜型（H1, H2, および H3）と 2 つの NA 亜型（N1 および N2）のインフルエンザウイルスのみが、季節性の流行あるいはパンデミックを起こしている。一方、自然宿主である水禽は多様なインフルエンザウイルスを保有しており、ほとんど全ての HA と NA 亜型のインフルエンザウイルスが水禽類から分離されている [1]。水禽においては、インフルエンザウイルスは経口感染し、腸管内で増殖する。水禽の糞便中には腸管内で増殖したウイルスが含まれており、排泄によって湖沼に放出されたウイルスが他の個体へと伝播する。それに対して、インフルエンザウイルスの哺乳類における主要な増殖場所は呼吸器官である [1]。水禽が保有しているインフルエンザウイルスが、自然宿主でない他の動物へと伝播することはめったにない。なぜなら、A 型インフルエンザウイルスには、“宿主特異性”があるからである。最近の研究から、宿主特異性には、HA 蛋白質やウイルスポリメラーゼが大きく関与することが示唆されている。

2. インフルエンザウイルス感染モデルとしてのフェレット

インフルエンザウイルスの研究には、マウスをは



はじめとして、ハムスター、モルモット、フェレット、サルなど、様々な動物モデルが使われている。なかでも、フェレットは、インフルエンザウイルスに感染して、発熱・くしゃみ・咳といった、ヒトで見られるインフルエンザ様症状を示す。またヒトのインフルエンザウイルスがフェレット間で飛沫伝播を起こすことも知られている。そのため、フェレットはインフルエンザ研究における優れたモデル動物として認識されている。

フェレットはイタチ科に属する肉食性の哺乳小動物であり、ペットとしての人気も高い。実験動物としてのフェレットを入手する場合には、日本国内の代理店を通じて、海外のフェレットファームからの購入手続きを進める。その場合、去勢・避妊および臭腺の除去手術を受けた個体を購入するのが一般的である。さらに、犬ジステンパーおよび狂犬病のワクチン接種を受けていることの証明書や、輸出国政府が発行する衛生証明書の原本も必要となる。フェレットの種類としてはセーブルやアルビノなどがあり、オスは体長40–50センチ、体重1.5–2.5 kg、メスは体長35–45センチ、体重0.75–1.5 kg くらい大きさである。体温は38–39度程度とやや高いが、フェレットは汗腺が未発達のため、暑さに弱く、室温が28度以上になると熱中症になる危険性があるため、注意が必要である。

一般的に、インフルエンザウイルスの病原性解析にはマウスが用いられる。しかし、ウイルスの飛沫伝播性など、マウスモデルでは評価できない性状の解析にはフェレットが用いられることが多い。以下に、我々の研究室でフェレットモデルを用いて行った研究の例を紹介する。

3. スペイン風邪ウイルスの病原性解析

1918年に世界的な大流行を起こしたスペイン風邪は、世界中で4,000万人以上の死者を出したと推測されている。当時は、ウイルスを分離培養する技術が確立されていなかったため、その流行を引き起こしたインフルエンザウイルスは現存しない。そのため、なぜスペイン風邪ウイルスが、通常の流行とは異なりこれほどの大流行を引き起こしたのか、その実態は謎に包まれていた。しかし、近年、1918年当時のスペイン風邪の犠牲者の肺病理検体および永久凍土に埋葬された遺体からインフルエンザウイルス遺伝子が抽出され、その塩基配列が決定された[4–10]。

我々は、スペイン風邪ウイルスの病原性に関わるウイルス側の因子を同定するため、インフルエンザ

ウイルスを人工的に合成する遺伝子操作技術(リバース・ジェネティクス法)を用いて、1つの遺伝子がスペイン風邪ウイルス株(1918ウイルス)由来、その他7つの遺伝子がヒトの季節性インフルエンザウイルスA/Kawasaki/173/2001株(K173ウイルス)由来のリコンビナントウイルスを作製した。ヒト由来の培養細胞において、それらのリコンビナントウイルスの増殖を調べたところ、どのリコンビナントウイルスも、親株のK173ウイルスと同じくらい効率よく増えることができた。

スペイン風邪の流行では、細菌の二次感染による肺炎に加えて、ウイルスそのものが起こすウイルス性肺炎によって死亡するケースが目立っていた。我々は、以前、マカカ属のサルを用いた実験によって、1918ウイルスが、ヒトの季節性インフルエンザウイルスであるK173ウイルスとは違って、サルで重症のウイルス性の肺炎を起こすことを示した[11]。フェレットモデルを用いて、ウイルスの増殖部位を調べたところ、1918ウイルスを感染させたフェレットでは、上気道および下気道で高濃度のウイルスが検出されたのに対して、K173ウイルスの増殖は主に上気道に限られていた(図1)。この増殖部位の違いに、どのウイルス遺伝子が関わるかを調べるため、我々は、一連のリコンビナントウイルスを、インフルエンザ研究のモデル動物であるフェレットに感染させ、それらの増殖を調べた[12]。その結果、スペイン風邪ウイルスが、感染した個体で、効率よく上気道から下気道へ広がるためには、ウイルスポリメラーゼ複合体が重要な役割を果たすことが分かった。スペイン風邪流行当時、ウイルス性肺炎で死亡する人が多かったことを考え合わせると、スペイン風邪ウイルスの高病原性には、ウイルスポリメラーゼ複合体が大きく関わっていたことが推察される。

なお、スペイン風邪ウイルスの遺伝子を持ったインフルエンザウイルスを用いた実験は、米国ウイスコンシン大学の封じ込め施設で行った。

4. 中国でヒトから分離されたH7N9鳥インフルエンザウイルスの飛沫伝播性の解析

“鳥インフルエンザ”は、鳥類に感染する鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染して重篤な症状を起こす感染症である。一般的に、鳥インフルエンザウイルスはヒトに感染しにくい。しかし2013年春、中国において、H7N9鳥インフルエンザウイルスのヒトへの最初の感染が報告された。それ以降、ヒトへのH7N9ウイルス感染の報告数は増えていき、世界保健機関(WHO)の2015年11月10日現在の発表

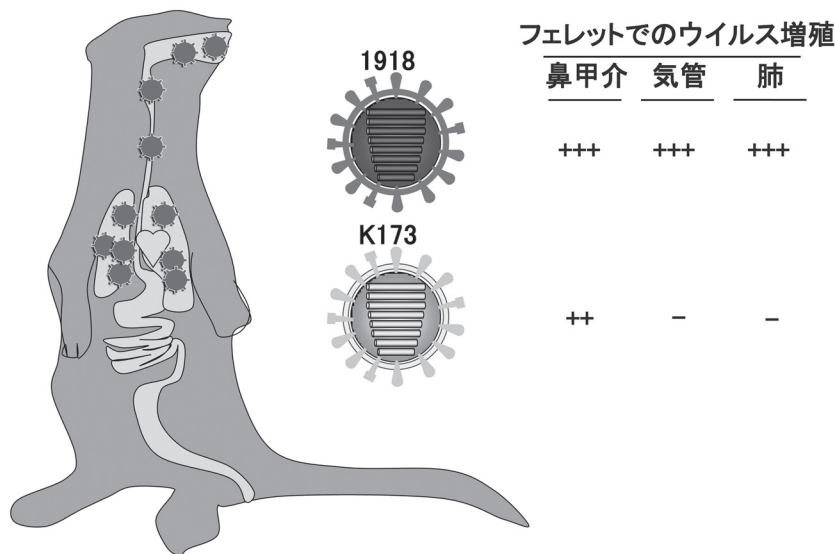


図 1. フェレットを用いた、スペイン風邪ウイルスの病原性の解析

1918–1919年にパンデミックを起こしたスペイン風邪ウイルス（1918ウイルス）はフェレットの鼻甲介、気管、肺で効率よく増えたが、ヒトの季節性インフルエンザウイルス（K173ウイルス）は鼻甲介でしか増えなかった。

によると、H7N9ウイルス感染者数は682人で、そのうち271人が亡くなっている。今までのところ、H7N9ウイルスのヒトからヒトへの伝播はほとんどない。しかし、万が一、これらのウイルスがヒトに適応し、ヒトへの感染やヒト–ヒト間での伝播が効率よく起こるようになれば、H7N9ウイルスによるパンデミックが引き起こされ、世界が深刻な状況に陥ることは必至である。

インフルエンザウイルスの感染や伝播には、ウイルスが宿主細胞に吸着し侵入する時の効率が大きく関わっている。そのような性質を決めるのが、ウイルス粒子表面にあるHAである。すなわち、ヒト型のレセプター（受容体）を認識するHAを持つウイルスは、ヒトで効率よく感染し、伝播する可能性が高くなる。実際、これまでに世界的に大流行した1918年から1919年のスペイン風邪(H1N1)ウイルス、1957年のアジア風邪(H2N2)ウイルスおよび1968年の香港風邪(H3N2)ウイルスにおいて、もとは鳥型のレセプターを認識していたHAが、ヒト型のレセプターを認識するようになったため、ヒトでパンデミックを起こしたことが知られている。中国でヒトから分離されたH7N9ウイルスの遺伝子解析の結果から、H7N9ウイルスのHAには、ヒト型レセプターを認識する変異があることが明らかとなった。さらに、ウイルスの増殖に大きな役割を担っているウイ

ルスポリメラーゼ蛋白質に、鳥インフルエンザウイルスが哺乳類細胞で増えるために重要なアミノ酸変異があることも分かった。

今回、中国でヒトから分離されたH7N9ウイルスが、ヒトに適応するために重要な変異を既に持っていることを考えると、このウイルスがヒトでパンデミックを起こす危険性は非常に高いといえる。そこで我々は、中国でヒトから分離されたH7N9ウイルス(A/Anhui/1/2013)のin vitroとin vivoにおける性状解析を行った。マウス・フェレット・カンクイザルの哺乳類モデルを用いた実験により、H7N9ウイルスは、2009年にパンデミックを起こしたH1N1ウイルス(A/California/04/2009)と同程度の病原性を示すことが分かった[13]。

これまでのところ、H7N9ウイルスのヒトからヒトへの伝播はほとんど報告されていない。我々は、H7N9ウイルスが、ヒト–ヒト間で飛沫伝播する可能性について検討するために、フェレットモデルを用いた感染実験を行った。具体的には、一つのアイソレーター内に二つのケージを配置し、一つのケージ内にウイルスを感染させたフェレット(=“感染フェレット”)を置き、隣合わせに置いたもう一つのケージ内に非感染のフェレット(=“コンタクトフェレット”)を置いた。ウイルス感染後、それぞれのフェレットから経時的に鼻腔洗浄液を採取し、ウイルス

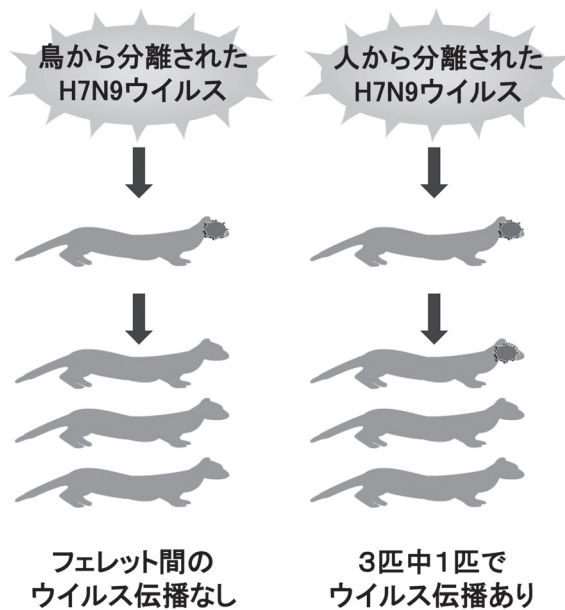


図2. フェレットを用いたウイルスの飛沫伝播実験
鳥から分離された H7N9 ウイルスと今回ヒトから分離された H7N9 ウイルスを用いて、フェレットにおけるウイルスの伝播実験を行った。鳥から分離された H7N9 ウイルスはフェレット間での伝播は見られなかったが、ヒトから分離された H7N9 ウイルスはフェレット 3 匹中 1 匹においてウイルスの伝播が確認された。

が分離されるかどうかを調べた。コンタクトフェレットの鼻腔洗浄液からのウイルス分離を指標に、ウイルスの飛沫伝播が起こったかどうかを評価した。飛沫伝播試験の結果、H7N9 ヒトウイルスは、フェレットの体内で増殖するときにいくつかのアミノ酸置換を生じ、フェレット間で限定的な飛沫伝播を起こすようになった。それに対して、鳥のウイルスのコントロールとして用いた A/duck/Gunma/466/2011 株（本ウイルスは、2011 年に群馬で鳥から分離された）はフェレット間で伝播しなかった（図2）[13]。他の研究グループも同様の結果を得ており [14–16]、H7N9 ウイルスは、さらなる変異を獲得することによって、ヒト–ヒト間で飛沫伝播する可能性があると考えられる。

おわりに

我々は、フェレットモデルを用いた研究によって、スペイン風邪ウイルスの病原性発現機構や H7N9 鳥インフルエンザウイルスの飛沫伝播の可能性について、重要な知見を得ることができた。特に、鳥イン

フルエンザウイルスが飛沫伝播する能力を持つかどうかの検証実験は、本ウイルスのパンデミック予測にもつながるため、公衆衛生上、非常に重要な研究である。得られた情報は、パンデミック予測だけでなく、ワクチン製造や抗ウイルス薬の備蓄など政策決定にも必須の情報となることが期待される。

引用文献

1. Wright PF, Neumann, G., and Kawaoka, Y. (Ed): *Orthomyxoviruses* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
2. Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, et al.: A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109: 4269–4274.
3. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, et al.: New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013, 9: e1003657.
4. Basler CF, Reid AH, Dybing JK, Janczewski TA, Fanning TG, Zheng H, Salvatore M, Perdue ML, Swayne DE, Garcia-Sastre A, et al.: Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98: 2746–2751.
5. Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK: Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96: 1651–1656.
6. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Lourens RM, Taubenberger JK: Novel origin of the 1918 pandemic influenza virus nucleoprotein gene. *J Virol* 2004, 78: 12462–12470.
7. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, McCall S, Taubenberger JK: Characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus matrix gene segment. *J Virol* 2002, 76: 10717–10723.
8. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK: Characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 6785–6790.
9. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG: Initial genetic characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus. *Science* 1997, 275: 1793–1796.

10. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG: Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005, 437: 889–893.
11. Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, Hatta Y, Kim JH, Halfmann P, Hatta M, et al.: Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 2007, 445: 319–323.
12. Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y: Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106: 588–592.
13. Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, et al.: Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 2013.
14. Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, Maines TR, Zeng H, Pappas C, Sun X, Carney PJ, Villanueva JM, Stevens J, et al.: Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature* 2013, 501: 556–559.
15. Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, Li L, Zheng Z, Yoon SW, Wong SS, Farooqui A, Wang J, Banner D, et al.: Infectivity, Transmission, and Pathology of Human H7N9 Influenza in Ferrets and Pigs. *Science* 2013.
16. Zhang Q, Shi J, Deng G, Guo J, Zeng X, He X, Kong H, Gu C, Li X, Liu J, et al.: H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet. *Science* 2013, 341: 410–414.