

エボラウイルス病の動物モデルとワクチン開発

津田祥美

北海道大学大学院医学研究科 病原微生物学分野

要 約

2014年、西アフリカで大規模なエボラウイルス病（エボラ出血熱、近年はエボラウイルス病と呼称されることが多い）のアウトブレイクが起きた。治療にあたった医療関係者にも感染が広がるなか、使用できるワクチンや治療薬が存在しないことが大きな問題となった。ワクチンなどの開発には実験動物を用いた試験が必須であり、エボラウイルス病でもエボラウイルスに感受性のあるマカクなどのサル、マウスやモルモットモデルが作出され用いられてきた。近年新たにヒトにより近い病態を示す小動物モデルとしてハムスターモデルが報告された。本稿では、これまでにワクチン開発に用いられてきた動物モデルを紹介するとともに、ハムスターモデルを用いたワクチンの評価試験の有用性について紹介する。

1. エボラウイルス

エボラウイルスはマールブルグウイルスと共にフィロウイルス科のウイルスで、それぞれ、エボラウイルス属とマールブルグウイルス属を構成する。いずれのウイルスも、ヒトやサルに感染すると重篤な急性熱性疾患を引き起こす [1]。エボラウイルス属にはザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルス、タイフォレストエボラウイルスおよびサルのみを病気を引き起こすレストンエボラウイルスの5種のウイルスがこれまでに報告されている。1976年、ほぼ同時期に発生したスーダンとコンゴ民主共和国（旧ザイール）でのスーダンエボラウイルスとザイールエボラウイルスによるアウトブレイク以来、主に中央アフリカでアウトブレイクが度々発生している。2014年に西アフリカで発生したアウトブレイクでは、初めて感染者が1000人を超えることとなり、これまでに患者総数28,454人、死亡者数11,297人（2015年10月現在）が報告されている [2]。ようやく終息の兆しが見えてきたが、アメリカやヨーロッパでも輸入感染例が報告されるなど国際的にも大きな問題となった。エボラウイルス病には現在までに認可された治療薬やワクチンは存在しない。ウイルスの発見から約40年にわたる研究で基礎研究は進んでおりいくつかのワクチンや治療薬候補の有効性が報告されていた。しかし、アフリカの局地でまれに数人から百人規模のアウトブレイクを発生する感染症であるエボラウイルス病もまた、顧みられない熱帯病（Neglected Tropical Disease）と同様になかなか臨床開発まで辿り着かなかった。そのため2014年のアウトブレイクでは、未承認ながらもこれまでの基礎研究における動物実験で有効性及び安全性が確認された治療薬とワクチン候補が緊急使用された。

チンや治療薬候補の有効性が報告されていた。しかし、アフリカの局地でまれに数人から百人規模のアウトブレイクを発生する感染症であるエボラウイルス病もまた、顧みられない熱帯病（Neglected Tropical Disease）と同様になかなか臨床開発まで辿り着かなかった。そのため2014年のアウトブレイクでは、未承認ながらもこれまでの基礎研究における動物実験で有効性及び安全性が確認された治療薬とワクチン候補が緊急使用された。

2. エボラウイルス病の動物モデル

フィロウイルスによる感染症は人獣共通感染症でありヒトだけでなくサルにも致死的な出血熱を引き起こす。実際、マールブルグウイルス属のマールブルグウイルスや、エボラウイルス属のレストンエボラウイルスはウガンダやフィリピンから輸入されたサルが感染していたことから発見された。実験動物としてはエボラウイルスに感受性のあるマカクなどのサル、マウスやモルモットモデルが作出され、病原性解析やワクチン、治療法の開発などに用いられてきた。また近年マウス馴化株を用いたハムスターモデルが報告された。その他、エボラウイルスの自然宿主と推察されているコウモリやフィリピンや中国でレス



トンエボラウイルスに感染していることが確認されたブタなどを用いた感染実験が報告されている。

1) サル

マカクなどのサルは種によって感受性に差はあるものの、すべてのエボラウイルスおよびマールブルグウイルスに感受性があり、感染するとヒトと同様に発熱から出血熱を引き起こして死に至る。エボラウイルス属のうちレ斯顿エボラウイルスはヒトが感染しても無症状であるが、サルには致死病的病原性を示す。感染後の免疫応答や血液凝固因子の変動などヒトと同様の現象が観察されることから、病原性解析に用いられるとともに、ワクチンや治療薬開発における有効性確認試験のゴールドスタンダードモデルとされている [3]。最もよく使用されているのはアカゲザルやカニクイザルのマカク属やアフリカミドリザルであり病態解析の他、ワクチンや治療薬の開発、有効性確認試験に使用されている。近年、コモンマーモセットやマントヒヒなども同様の病態を示すことが確認され、特にコモンマーモセットは小型で扱いやすいことから新しいモデルとして期待されている [4]。

2) マウス

エボラウイルスの感染によりサルがヒトと同様の致死病的病態を示す一方で、げっ歯類はエボラウイルスに感染はするが病気を引き起こすことはなく、致死病的病態モデルとして用いるためにはウイルスを動物で繰り返し継代することなどによりその動物に馴化する必要がある。エボラウイルスのうちでマウスやモルモット馴化株が存在するのは現在ザイルエボラウイルスのみである。このため、IFN- α/β レセプターノックアウトマウスや Severe combined immunodeficiency (SCID) マウスなどの免疫不全マウスは馴化していないウイルスにも致死病的感染を示すが、モルモットや C57BL/6, BALB/c 等の近交系マウスを用いた研究にはそれぞれの動物種に馴化したザイルエボラウイルスが用いられている [5]。昨年、Collaborative Cross panel of recombinant inbred mice (CC-RI) を用いた解析でマウスの遺伝子の違いにより野生株やマウス馴化株でも病態が致死から無症状まで様々に異なることが報告された [6]。これらのマウスを利用することによりこれまで免疫不全マウスでしか解析できなかった他種のエボラウイルスの解析が可能となるかもしれない。

マウスモデルは小型げっ歯類モデルとして様々な生物学的解析に汎用されている実験動物であり、更には解析ツールも多く開発されていることから実験

に用いやすい。マウス馴化株に感染したマウスは、被毛の乱れや体重減少を示したのち感染 5-10 日で死に至る。しかし、サルとは異なりその感染病態は初期のサイトカイン応答などではヒトと同様の反応も観察されるものの、血液凝固系の破綻やそれに伴う出血様症状は観察されない。またマウスモデルで有用性が確認された治療薬やワクチンがサルモデルでは効果が見られないことも多く、初期スクリーニングとしては有用である一方で有効性確認には他の動物モデルを用いた解析が必要である。

3) モルモット

エボラウイルスをモルモットで継代することで、マウスモデルと同様に、モルモット馴化株が作出されている。モルモット馴化株に感染したモルモットはヒトやサルと同様に発熱、食欲不振、体重減少などを観察した後、7-9 日で死に至る。ウイルス増殖を含む病理学的解析においてもヒトやサルと類似の所見が観察されるのに加えて、マウスモデルとは異なりモルモット馴化株の感染により、点状出血等の臨床所見は観察されないもののプロトロンビン時間の延長や血小板減少等の血液凝固障害が感染末期に観察される。治療薬やワクチンの効力試験にもマウスモデルとともに汎用されている動物モデルである [7]。一方で、マウスと異なり解析に用いることができる試薬や情報が少なく、エボラウイルス病の重要な因子であるサイトカイン応答異常やリンパ球のアポトーシスについての解析がほとんどなされておらず、病態解析や治療薬、ワクチンの作用機序解析に用いるには検査試薬の開発や解析が必要である。

4) ハムスター

近年、海老原らにより新たにマウス馴化株を用いたハムスターモデルが報告された [8]。マウス馴化株に感染したハムスターは、他のげっ歯類モデル同様に被毛の乱れや運動活性の低下、体重減少を示したのち感染 4-5 日で死に至る。また免疫組織学的解析においてもエボラウイルスの標的細胞とされるリンパ組織や脾臓、肝臓の単核食細胞系の細胞から臓器全体に広がっていくウイルス増殖と、それに続く標的臓器の壊死などヒトやサルで観察された所見が確認された。これまでに報告されていた小動物モデルであるマウスモデルは、致死病的感染を起こすことから感染モデルとしては有用であるが、血液凝固系の破綻等のエボラウイルス病に特徴的な症状が観察されないことから病態モデルとしては不十分であった。しかし、マウス馴化株を感染させたハムスターでは、エボラウイルスに感染したヒトやサルで観察される

インターフェロン応答の抑制や血液凝固系の破綻なども観察されたことから、よりヒトの病態に近い小動物モデルとして利用できる可能性が示唆された。ハムスターの全トランスクリプトーム解析が行われ、それらの情報を利用した定量 RT-PCR 等の手法も確立されていることからサイトカイン応答など宿主因子の解析も可能となった [9]。近年、ハンタウイルスやアレナウイルス、ニパウイルスなどの重篤なウイルス感染症のモデルとしても報告されており、今後様々な感染症解析に期待されるモデルである。

3. ワクチン開発

エボラウイルス病のワクチン候補として、これまでに不活化ウイルス、ウイルス様中空粒子 (Virus like particles: VLPs) や DNA ワクチンの他、ウイルスベクター (水疱性口内炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルスなど) を用いたものが報告されている。エボラウイルス病では、最も基本的なワクチンであるホルマリン等を用いて不活化した全粒子ワクチンはラットなどげっ歯類では有効性が認められたものの、サルを用いた実験では十分な防御免疫を誘導できないことが確認されるなど、ウイルス蛋白質の接種のみでは十分な免疫誘導がされない可能性が示唆されていた。近年、エボラウイルスの一部遺伝子を欠損した組換えエボラウイルスを過酸化水素水で不活化したワクチンがサルを用いた試験で高い有効性を示すことが報告された [10]。特定の細胞でのみ増殖できるウイルスを不活化した安全なワクチンであり、今後の有効性試験の結果が期待されるワクチン候補の 1 つである。一方、現時点で最も実用化の期待が高いのはげっ歯類やサルを用いた動物実験の結果から安全性と高い有効性が示唆された、エボラウイルスの蛋白質 (表面糖タンパク質 GP) を組込んだウイルスベクターを用いたワクチンである。特に水疱性口内炎ウイルスを用いたワクチンは感染前接種だけでなく、感染後に接種しても防御効果を示すことが報告されている。現在、チンパンジーアデノウイルスワクチンと水疱性口内炎ウイルスワクチン「VSV-EBOV」の臨床試験が西アフリカのエボラウイルス病の発生国で実施されており、高い有効性が報告されている [11, 12]。

4. 多価ワクチンへの応用

前述したように、エボラウイルス属には 5 種のウイルスが報告されており、アフリカではこれらのエ

ボラウイルスとマールブルグウイルスによる感染が散発的に同地域で発生している。これまでに開発されてきたエボラウイルスワクチンは、同じフィロウイルス科のマールブルグウイルスだけでなく、同属のエボラウイルス種間でも十分な交差防御を示さないという問題があり、異なるワクチンの複数回接種や 2-3 種のウイルス蛋白質を組み合わせたワクチンを作成するなど様々な試みが行われてきた。またエボラウイルス病の発生地域では、ラッサ熱、黄熱またクリミア・コンゴ出血熱など複数の重篤なウイルス感染症が発生、流行している。そのため、異なったフィロウイルスやその他の重篤な出血熱ウイルス感染に対する多価ワクチンの開発が求められている。水疱性口内炎ウイルスを用いたワクチンはこれまでにハンタウイルス、ラッサウイルスやニパウイルスなど種々のウイルスに応用され有効性が報告されている [13]。そこで我々は、多価ワクチンのコンセプトスタディとして、弱毒水疱性口炎ウイルスに、エボラウイルスと、同様にハムスターモデルを疾患モデルとして利用できるハンタウイルス肺症候群の原因ウイルスであるアンデスウイルスの表面糖タンパク質を組み込んだ 2 価ワクチン「VSV-ANDV/EBOV」を作出し、ハムスターモデルを利用した評価試験を試みた [14, 15]。VSV-ANDV/EBOV を接種されたハムスターはエボラウイルスとアンデスウイルスの両方のウイルス感染に対してすべて無症状で生残し、十分な防御効果が確認された。さらに VSV-ANDV/EBOV は単独のエボラワクチン VSV-EBOV と同様に感染後ワクチンとしても有効であった。このように、組換え水疱性口内炎ウイルスは多価ワクチンとしても作出可能であり、また新規ハムスターモデルはワクチン評価試験にも有用な動物モデルであることが確認された。

終わりに

2014 年の大流行によりエボラウイルス病に注目が集まり、これまで臨床開発に至らなかったワクチンや治療薬の実用化に向けた開発や臨床試験が加速度的に進むこととなった。これも、これまでに動物実験を含む基礎研究のデータが着実に積み重ねられていた結果であろう。しかし、エボラウイルスだけでなく世界にはウイルス、細菌、寄生虫などによるワクチンや治療薬のない感染症がまだまだ多く存在する。今回のエボラパニックを教訓に、これらの感染症の適切な動物モデルが開発され、有効なワクチンや治療薬の開発が推進されることを期待する。



引用文献

1. Kuhn JH, Becker S, Ebihara H, Geisbert TW, Johnson KM, Kawaoka Y, Lipkin WI, Negredo AI, Netesov SV, Nichol ST, Palacios G, Peters CJ, Tenorio A, Volchkov VE, Jahrling PB. 2010. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch Virol.* 155: 2083–103.
2. WHO: Ebola situation Report – 10 October 2015. <http://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-14-october-2015>
3. Geisbert TW, Strong JE, Feldmann H. 2015. Considerations in the Use of Nonhuman Primate Models of Ebola Virus and Marburg Virus Infection. *J Infect Dis.* 212 Suppl 2: S91–7.
4. Willyard C. 2014. Advances in marmoset and mouse models buoy Ebola research. *Nat Med.* 20: 1356–7.
5. Bray M. 2001. The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection. *J Gen Virol.* 82: 1365–73.
6. Rasmussen AL, Okumura A, Ferris MT, Green R, Feldmann F, Kelly SM, Scott DP, Safronetz D, Haddock E, LaCasse R, Thomas MJ, Sova P, Carter VS, Weiss JM, Miller DR, Shaw GD, Korth MJ, Heise MT, Baric RS, de Villena FP, Feldmann H, Katze MG. 2014. Host genetic diversity enables Ebola hemorrhagic fever pathogenesis and resistance. *Science.* 346: 987–91.
7. Lupton HW, Lambert RD, Bumgardner DL, Moe JB, Eddy GA. 1980. Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model. *Lancet.* 2: 1294–5.
8. Ebihara H, Zivcec M, Gardner D, Falzarano D, LaCasse R, Rosenke R, Long D, Haddock E, Fischer E, Kawaoka Y, Feldmann H. 2013. A Syrian golden hamster model recapitulating ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 207: 306–18.
9. Tchitchek N, Safronetz D, Rasmussen AL, Martens C, Virtaneva K, Porcella SF, Feldmann H, Ebihara H, Katze MG. 2014. Sequencing, annotation and analysis of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) transcriptome. *PLoS One.* 9: e112617.
10. Marzi A, Halfmann P, Hill-Batorski L, Feldmann F, Shupert WL, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. 2015. Vaccines. An Ebola whole-virus vaccine is protective in nonhuman primates. *Science.* 348: 439–42.
11. Henao-Restrepo AM, Longini IM, Egger M, Dean NE, Edmunds WJ, Camacho A, Carroll MW, Doumbia M, Draguez B, Duraffour S, Enwere G, Grais R, Gunther S, Hossmann S, Kondé MK, Kone S, Kuisma E, Levine MM, Mandal S, Norheim G, Riveros X, Soumah A, Trelle S, Vicari AS, Watson CH, Kéita S, Kiény MP, Røttingen JA. 2015. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *Lancet.* 386: 857–66.
12. Rampling T, Ewer K, Bowyer G, Wright D, Imoukhuede EB, Payne R, Hartnell F, Gibani M, Bliss C, Minhinnick A, Wilkie M, Venkatraman N, Poulton I, Lella N, Roberts R, Sierra-Davidson K, Krähling V, Berrie E, Roman F, De Ryck I, Nicosia A, Sullivan NJ, Stanley DA, Ledgerwood JE, Schwartz RM, Siani L, Colloca S, Folgori A, Di Marco S, Cortese R, Becker S, Graham BS, Koup RA, Levine MM, Moorthy V, Pollard AJ, Draper SJ, Ballou WR, Lawrie A, Gilbert SC, Hill AV. 2015. A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2015 Jan 28.
13. Marzi A, Feldmann F, Geisbert TW, Feldmann H, Safronetz D. 2015. Vesicular stomatitis virus-based vaccines against Lassa and Ebola viruses. *Emerg Infect Dis.* 21: 305–7.
14. Safronetz D, Ebihara H, Feldmann H, Hooper JW. 2012. The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res.* 95: 282–92.
15. Tsuda Y, Safronetz D, Brown K, LaCasse R, Marzi A, Ebihara H, Feldmann H. 2011. Protective efficacy of a bivalent recombinant vesicular stomatitis virus vaccine in the Syrian hamster model of lethal Ebola virus infection. *J Infect Dis.* 204 Suppl 3: S1090–7.