

## 17. 動物管理室

### 室長 山田靖子

#### 概要

村山庁舎に昨年度末、新型インフルエンザウイルスの動物実験を想定した動物実験施設(ABSL3)が完成したが、平成 21 年度に入った途端、時期をあわせたように新型インフルエンザの流行が起こった。インフルエンザウイルスに対する感受性が実験動物の中で特に高いフェレットの動物実験が必要となり、動物管理室は新施設でのフェレットの飼育管理システムを立ち上げ、対応した。また、新型インフルエンザ流行の予期せぬ影響として、動物実験施設で日常的に使用するマスクの入手が困難になったことが挙げられる。

村山庁舎では、動物施設のリヒーター、給湯設備、空調設備等の工事が相次いだ。戸山庁舎では、動物実験管理区の着衣を前着からオーバーオールに変更し、ABSL2 区ではオーバーオールの上に前着を着用することに変更した。

平成 21 年度は動物実験管理区内で 2 件、針刺しと咬傷が発生した。1 件は注射針廃棄容器の処理中に従事者が誤って指に針を刺した。もう 1 件はカニクイザルによる咬傷であった。所へ報告をし、医師の診断を受け、経過観察を行なって、問題がないことを確認した。

動物管理室は、動物実験施設の管理運営を業務とし、その一環として動物実験施設の定期的微生物検査を行っている。また、昨年度に引き続き、実験動物に関する研究を行なった。実験動物の感染症に関する研究では、以前より行なっているマウス肝炎ウイルスの研究を進めるとともに、新たにマウスノロウイルス、*Corynebacterium ulcerans* の研究を行なった。モデル動物の開発研究では、麻疹ウイルス病態モデルとしてのカニクイザル、ガングリオシド蓄積症、リフトバレー熱ウイルスの研究を行った。

動物管理室は海外および国内から動物実験施設見学や動物実験管理運営の研修に対応している。平成 21 年度に対応した実験動物関係及び獣医学関係の見学は、中国動物実験施設視察団、東京大学獣医学科（2回）、岐阜大学連合獣医学研究科、日本大学獣医学研究科、麻布

大学獣医学部、JICA 集団研修、アジアバイオセーフティ地域研修会であった。また、韓国 CDC 動物実験施設管理者 1 名の研修を 12 月に受け入れた。

厚生労働省が所管する国立研究機関（独立行政法人を含む）の動物実験施設では、国内の動物実験を取り巻く状況に対応する横の連携を取り合う協議会（名称：厚生労働省関係研究機関動物実験施設協議会）を発足し、感染研が初代の会長を務めることとなった。

#### 講習会開催及び動物管理区の利用状況

動物管理室は動物実験委員会の事務局を担当し、動物実験講習会を開催している。平成 18 年度に動物実験に関わる感染研内の各種規程を改正したが、改正後の講習会を受講した人数は平成 22 年 3 月 31 日までに 723 名となり、平成 21 年度に申請された動物実験計画は 330 件であった。

動物実験委員会の講習会とは別途に、各庁舎ではそれぞれの動物実験施設の利用方法および実験動物の飼養・保管に関する講習会を行い、受講者を施設利用者として登録している。各施設の利用登録者数は平成 22 年 3 月 31 日現在、戸山庁舎 328 人、村山庁舎 197 人、ハンセン病研究センター 16 人である。

#### 実験動物施設利用者講習会および動物実験講習会 実績

開催 月日	開催 場所	受講者数			動物 実験 (全所)
		施設利用 (戸山)	施設利用 (村山)	施設利用 (ハン セン)	
4月3日	村山		1		
4月6日	戸山	22			29
4月13日	ハンセン			1	
4月17日	戸山				2
6月11日	戸山	7			9
6月25日	ハンセン			1	
7月7日	村山		7		

7月8日	村山		3		
7月28日	戸山				3
7月29日	村山		2		
8月4日	戸山	9			14
8月7日	村山		3		
8月14日	戸山	1			
10月2日	戸山	13			20
10月21日	戸山	2			3
12月7日	戸山	7			9
2月2日	戸山	9			13
2月3日	ハンセン			1	
合計		70 新規	16 新規	3 新規	102 年度内 受講者

(斜字は外国人対照講習会)

## 業績

### 調査・研究

#### I 動物実験施設の微生物モニタリング

##### I-1 定期検査

戸山、村山両庁舎の各飼育室にモニター動物を配置し、月一回定期的に微生物モニタリングを行っている。戸山庁舎ではウサギ、モルモットの飼育匹数が減少したため、平成21年度はこれらの動物種の微生物モニタリングを行なわなかった。結果は別表1に示す。緑膿菌、黄色ブドウ球菌に陽性が散見されたが、これらはいわゆる日和見病原体で免疫機能が正常な動物には病原性はない。それ以外の病原体については全て陰性であり、飼育室は清浄に保たれている。

(網 康至、滝本一広、新倉 綾、田原口元子、平井明香、酒井宏治、小川敏雄、須崎百合子、山田靖子)

#### II 実験動物の感染症に関する研究

##### II-1 異なる受容体を持つマウスのマウス肝炎ウイルス感受性に関する研究

マウス肝炎ウイルス(MHV)はCEACAM1を受容体として利用し、感受性C57BL/6(B6)マウスはCEACAM1a(1a)を、比較的抵抗性S/JLマウスはCEACAM1b(1b)を発現している。両系統のMHV感受性が受容体に依存するか検討するために、B6マウスの1a遺伝子上のウイルス結合部位を1b遺

伝子のもとの置換したCEACAM1ba(1ba)を発現する遺伝子改変マウスcB6Ibaを作製し、これはS/JLより高度なMHV抵抗性を示し感染が認められなかった。本年度はcB6Iba生体内で1baが機能的蛋白質として発現しているか調べるためにCEACAM1のMHV受容体以外の機能を検討した。CEACAM1はインスリン代謝に関与しておりCeacam1欠損B6マウスではインスリン代謝障害が報告されている。そこでインスリンクリアランス試験を行ったところ、cB6Ibaマウスは野生型B6マウスと同様な挙動を示し相違は認められなかった。このことからcB6Ibaマウスのインスリン代謝機能は正常であることが示唆され、マウス生体に発現している1baは機能的蛋白質であると考えられた。[平井明香、網康至、田口文広<sup>1</sup>、山田靖子(<sup>1</sup>ウイルス3部、日本獣医生命科学大学)]

##### II-2 マウス肝炎ウイルスの病原性に関する研究

マウス肝炎ウイルスの親株MHV2とその変異株MHV-2fの病原性を解明するため、BALB/cマウスへの感染実験を実施した。MHV2の10<sup>4</sup>および10<sup>7</sup>PFU接種群では、感染3日目から沈鬱症状の後、消瘦等を呈し感染5日以内にそれぞれにおいて全て死亡の兆候を得て安楽死処置し、100%の致死率を示したのに対し、10<sup>1</sup>PFU接種群では20%の致死率を示した。それに対してMHV-2fの10<sup>1</sup>、10<sup>4</sup>および10<sup>7</sup>PFU接種群の全てにおいて生存し致死率は0%を示した。MHV-2fはマウスに対する病原性が著しく低下しており、遺伝子変異により病原性が変化したと考えられる。また、培養細胞に対する増殖性を検討するため、MHV2およびMHV-2fをDBT細胞に感染させ経時的にウイルス力価を測定した。その結果、MHV-2fは感染初期にMHV2よりゆっくり増殖した後、最終的にMHV2と同程度の力価まで達し増殖性の相違を認めた。

(田原口元子、新倉 綾、山田靖子)

##### II-3 実験用マウスコロニーからのマウスノロウイルスの分離と分子系統学的解析

国内実験用マウスコロニーのMNV浸潤状況の把握及び既知のMNV分離株との遺伝学的な比較を行った。複数の動物施設由来から実験用マウス糞便を採材し、抗生物質添加PBSにて乳剤作製後、RAW 264.7細胞(マウスマクロファージ由来株化細胞)に接種し、ウイルス分離を試み、MNV特異的RT-PCRによる同定を実施した。MNV陽性検体については、VP1及びVP2遺伝子の配列決定を行い、系統学的解析を実施した。これまでに64検体のマウス糞便乳剤感染細胞から、24検体についてRT-PCR陽性が認められた。様々なクラスターに分類される分離株が認められ

たが、既知の MNV と比較して遺伝学的に大きく異なる分離株は認められなかった。本研究により、実験用マウスコロニーから MNV を分離・同定し、国内の複数の動物施設において MNV が浸潤していることが明らかとなった。

[酒井宏治、網康至、須崎百合子、山田靖子]

#### II-4 サル由来 *Corynebacterium ulcerans* の性状解析

ヒトのジフテリア様疾患の原因菌であるジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が国内のイヌ、ネコ、ライオン、シャチから分離されている。海外ではサル類からも分離されているが、国内のサル類での感染状況は明らかでない。そこで、異なる 2 つの施設から当施設に導入した国内繁殖カニクイザルの咽頭から *C. ulcerans* を分離しジフテリア毒素産生性を検討した。その結果 68 頭から 31 株の *C. ulcerans* が分離され、そのうち 9 株がジフテリア毒素を産生した。これら 11 株の分子系統を検討するためにパルスフィールドゲル電気泳動解析を行った結果、2 つのグループに分けられ、それぞれのグループには異なる繁殖施設の個体からの分離株が含まれていた。以上から、国内のカニクイザルが毒素産生性 *C. ulcerans* を保菌していることが明らかとなった。また異なる繁殖施設由来の個体から同一の遺伝子型の株が分離され、これらの施設は同じ原産国のカニクイザルを繁殖していることから、共通する原産国のカニクイザルが保菌していた本菌が飼育集団内で感染・維持されている可能性が示唆された。[平井明香、小宮貴子<sup>1</sup>、高橋元秀<sup>1</sup>、酒井宏治、新倉綾、須崎百合子、網康至、山田靖子<sup>1</sup>(<sup>1</sup>細菌 2 部)]

### III モデル動物の開発

#### III-1 麻疹ウイルス感染症モデル動物の開発と病態解析

麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、感染自己単核細胞を視床に接種し、脳脊髄液中に麻疹ウイルス中和抗体が認められたカニクイザルの中枢神経細胞から、感受性細胞との共培養により、細胞変性効果をほとんど示さない麻疹ウイルスを分離した。この個体において、麻疹ウイルスの持続感染が成立していたと考えられる。(網 康至、須崎百合子)

#### III-2 MCC 系マストミス腎臓におけるガングリオシド蓄積症

MCC マストミス腎臓における GM2 およびの蓄積の原因の一つとして、 $\beta$ -hexosaminidase (GM2 分解酵素) 活性の基質濃度による反応性の違いについて検討した。PNP GlcNAc

を基質として、MCC (5 ヶ月齢) の腎臓における  $\beta$ -hexosaminidase 活性を測定し、正常マストミス (MWC) と比較した。MCC ではシグモイド状の反応が予想されたが、両系統ともに直線状の反応を示し、活性にも差は認められなかった。

(滝本一広)

#### III-3 リフトバレー熱ウイルス L 蛋白に関する研究

リフトバレー熱ウイルス (RVFV) の L 蛋白 (L) は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有し、ウイルス増殖に必須の蛋白である。分節型のウイルスがもつ L 蛋白は分子量約 250 kDa の大型蛋白質であり、ウイルスゲノムの複製および転写に含まれる各ステップやその他の多様な機能を持つと考えられているが、その詳細は明らかでない。本研究では、RVFV-L の N 末端 200-221 に見つかったロイシンジッパー様モチーフ (L-(X)6-L-(X)6-L-(X)6-L) と L 蛋白の複製および転写機能との関連を調べた。我々はまず 207 のロイシンをプロリンに置換したミュータント L207P を作製し、ミニゲノムアッセイを行った。L207P は Wildtype と同様十分に哺乳類細胞内で発現したが、ミニゲノムの転写機能が認められず、ゲノム複製機能も低下していた。また、ミニゲノム由来のルシフェラーゼ活性も L207P では認められなかった。次に、他のロイシン (200、207、214、221) ついても、ポイントミューテーションを挿入したミュータントを用いて解析を行ったところ、214 と 221 のロイシンは機能的に類似したアミノ酸に交換可能だが、200 と 207 のロイシンは交換不能であった。この事は、同じフレボウイルス属に属するサンドフライウイルス等が持つ L 蛋白の 214 と 221 のアミノ酸がバリンあるいはイソロイシンにコードされていることと一致していた。さらに CoIP-RT-PCR にて L 蛋白とミニゲノムのインタラクションを解析したところ、L207P ではミニゲノムとの相互作用が低下していることが分かった。以上の結果から、ロイシンジッパー様モチーフが、L 蛋白のポリメラーゼ機能に重要であり、ウイルスゲノムとのインタラクションに関与していること、また、フレボウイルス属のウイルスに保存されたモチーフであることが示唆された。[新倉綾、池上徹郎<sup>1</sup>、C.J.Peters<sup>1</sup>、牧野伸治<sup>1</sup>、森川茂<sup>2</sup>、山田靖子<sup>1</sup>(<sup>1</sup>テキサス大学医学部、ウイルス 1 部)]

## 発表業績一覧

### I 誌上発表

I-1 欧文発表

- 1) Takimoto K, Kawamura N, and Kasama T : Storage of gangliosides GM2 and fucosyl GM1 in the kidney of MCC strain of mastomys (*Praomys coucha*). Journal of Biochemistry, 146: 439-447 (2009)
- 2) Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, and Honda M. : Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. AIDS, 23:1485-94 (2009)
- 3) Zamoto-Niikura A, Terasaki K, Ikegami T, Peters CJ, and Makino S : Rift valley fever virus L protein forms a biologically active oligomer. J Virol., 83: 12779-12789 (2009)
- 4) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, and Morikawa S : Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. The Journal of general virology 90: 2266-2271 (2009)
- 5) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M and Morikawa S : Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. Journal of Medical Virology 81: 1102-1108 (2009)
- 6) Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, Morikawa S and Mizutani T : Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. Veterinary Microbiology. 134: 227-232 (2009)
- 7) Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S and Mizutani T : Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). Archives of virology 154: 153-158 (2009)
- 1) Hirai A, Ohtsuka N, Ikeda T, Taniguchi R, Nakagaki K, Suzuki S, Ami Y, Yamada YK, Itohara S and Taguchi F : Role of mouse hepatitis virus (MHV) receptor CEACAM1 in the resistance of mice to MHV infection as revealed by *Ceacam1* gene-replaced mice. The 9<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep 2009. Awaji, Japan
- 2) Niikura AZ, Ikegami T, Peters CJ and Makino S : Oligomerization of Rift Valle Fever Virus L protein. 28th annual meeting of American Society for virology. July 2009. Vancouver, Canada
- 3) Niikura AZ, Ikegami T, Peters CJ, and Makino S : Oligomerization of Rift Valle Fever Virus L protein. IHII/McLaughlin Colloquium. Feb 2009. Texas, U.S.A.

II-2 国内学会

- 1) 酒井宏治、網康至、水谷哲也、岩切章、山本正悟、平井明香、須崎百合子、福士秀悦、西條政幸、永田典代、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川茂 : 急性呼吸器感染症患者からの新型レオウイルス分離とマウス感染モデルの作製。第 148 回日本獣医学会学術集会、平成 21 年 9 月、鳥取
- 2) 水谷哲也、伊澤晴彦、澤辺京子、小林睦生、渡辺俊平、明石博臣、前田健、佐藤朝光、酒井宏治、緒方もも子、倉根一郎、森川茂 : ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法) の改良と新規ウイルスの検出。第 148 回日本獣医学会学術集会、平成 21 年 9 月、鳥取
- 3) 平井明香、大塚信久、池田敏男、谷口理絵、中垣慶子、鈴木秀佳、網康至、山田靖子、糸原重美、田口文広 : マウス系統間におけるマウス肝炎ウイルス感受性差に関する解析。第 57 回日本ウイルス学会、平成 21 年 10 月、東京
- 4) 酒井宏治・永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、松井珠乃、網康至、平井明香、須崎百合子、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、藤本嗣人、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎、森川茂 : 水様性下痢を呈したカニクイザルから分離したアデノウイルスの分子系統学的解析。第 57 回日本ウイルス学会、平成 21 年 10 月、東京
- 5) 森川茂、福士秀悦、酒井宏治、永田典代、長谷川秀樹、松井珠乃、水谷哲也、平井明香、網康至、西條政幸、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎 : カニクイザルの致死性的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析。第 57 回日本ウイルス学会、平成 21 年 10 月、東京
- 6) 新倉 (座本) 綾、寺崎香織、池上徹郎、C.J.Peters、牧

II 学会発表

II-1 国際学会

野伸治：リフトバレー熱ウイルス L 蛋白は多量体を形成して機能する。第 57 回日本ウイルス学会、平成 21 年 10 月、東京

- 7) 山田靖子：動物感染実験における感染対策。第 13 回予防衛生協会セミナー「サル飼育施設における個人用保護具 (Personal Protective Equipment: PPE)」、平成 21 年 12 月、筑波
- 8) 酒井宏治、池郁生、浦野徹、網康至、平井明香、須崎百合子、岡智一郎、片山和彦、山田靖子：実験用マウスコロニーからのマウスノロウイルスの分離と分子系統学的解析。第 149 回日本獣医学会学術集会、平成 22 年 3 月、東京