

17. 動物管理室

室長 山田靖子

概要

「動物の愛護及び管理に関する法律」（動愛法）が平成24年9月5日に改正された。その1年後の施行にあわせて、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」が改正され、平成25年9月1日より適用された。この改正では、「管理者は、定期的に、本基準及び本基準に則した指針の遵守状況について点検を行い、その結果について適切な方法により公表すること。なお、当該点検結果については、可能な限り、外部の機関等による検証を行うよう努めること。」という自己点検評価に関する項目が新規に加わった。感染研の動物実験委員会ではすでに自己点検、その公表、外部機関による評価を受けているところであったが、動物実験施設の施設調査チェックリストを見直し、自己点検を1年1回行うこととした。

動物管理室の主な業務は感染研動物実験施設の管理運営である。従来の業務に加えて、以前より準備を進めていた胚の凍結保存、胚操作による動物の清浄化などの業務が、本年度胚操作技術を持つ任期付き研究員が着任したことにより可能となった。

実験動物に関する研究を昨年度に引き続き行なった。実験動物の感染症に関する研究では、マウス肝炎ウイルスの研究、Tyzzer 菌の鞭毛蛋白に関する研究、モデル動物の開発研究として、カニクイザルの麻疹ウイルス病態モデル、イヌジステンパーウイルスのマウスモデル、インターフェロン欠損コウモリ細胞株の樹立、人獣共通感染症の研究として、リフトバレー熱ウイルス、ヒトバベシア症の研究を行った。

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施設管理運営の研修を受け入れている。平成25年度は獣医師育成プログラム、東京大学獣医学科学生実習、JICA「ワクチン品質管理技術コース」研修、JICA 国別研修（中国、ベトナム）、JICA 集団研修に対応した。

動物管理室長は所内の業務に加えて、日本実験動物学会常務理事、国内の動物実験施設認証制度の委員、所外

機関の実験動物感染症に関する委員会委員、GLP 評価委員会委員、実験動物管理者研修講師、など、国内の実験動物学に寄与する活動を行った。また、感染研は厚生労働省関係研究機関動物実験施設協議会に加盟し、国内情勢の情報共有に参画している。

平井明香主任研究管の研究休職期間に任期付き研究員として、平成25年4月1日より河合康洋が着任した。

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。講習会では、実験動物及び動物実験に関する法規制、機関内規程、また動物実験の3Rs を実践するための基本的な事項を受講者に解説する。講習会の会場では実技の研修を実施できないため、新規に動物実験を行う従事者に対して、国内の団体が作成した動物取扱および投与方法のビデオで実技の基本を学ぶ機会を提供している。平成25年1月10日機関内規程及び動物実験委員会の見解を改正した後、動物実験講習会の受講者数は、平成26年3月31日までに480名であった。平成25年度に申請された動物実験計画は408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26年3月31日現在、戸山庁舎227人、村山庁舎238人、ハンセン病研究センター27人である。感染研の3庁舎で飼養保管している動物の合計は平成26年3月31日現在、マウス5,046匹、ラット213匹、モルモット100匹、ウサギ62羽、スナネズミ13匹、フェレット30匹、ネコ9匹、霊長類108匹、ニワトリ14羽である。

施設利用及び動物実験講習会 受講実績

開催 月日	開催 場所	受講者数			
		施設利用 (戸山)	施設利用 (村山)	施設利用 (ハン セン)	動物 実験 (全所)
4月10日	戸山	23			30
6月3日	戸山	6			12
9月30日	戸山	1			1
10月8日	戸山	7			15
12月24日	ハンセン			4	
2月4日	戸山	9			15
2月12日	村山		6		
2月14日	村山		1		
2月18日	村山		11		
2月19日	村山		5		
3月4日	戸山	1			1
3月19日	ハンセン			1	
合計		47 新規	23 新規	5 新規	74 新規

(斜字は外国人対象講習会)

業 績

調査・研究

I 動物実験施設の管理

I-1 微生物モニタリング定期検査

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。モニタリング結果は別表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、須崎百合子、山田靖子)

I-2 胚操作業務

感染研の動物実験施設で繁殖している遺伝子改変マウス等を対象として、利用者の依頼により精子の凍結保存に加え、体外授精による受精卵の凍結保存および胚移植によるクリーニング等の研究支援業務を開始した。平成25年度は1系統の依頼があり、精子および受精卵の凍結保存を実施した。また、従来用いているマウス受精卵の凍結保存

溶液(DAP213)と比べ、受精卵の凍結保存、融解作業が簡易な凍結保存液(5E5D)が報告されている。5E5D 保存液を用いて、2系統のマウス受精卵の凍結保存および融解の効率を検討した。その結果、受精率および融解後の生存率に差は認められなかった。今後は、凍結融解後の受精卵を移植し品質の検討を行う予定である。

(田原口元子、河合康洋、山田靖子)

II 実験動物の感染症に関する研究

II-1 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 をマウスに接種し感染実験を行った結果では、病原性の著しい相違を示していた。そこで、MHV2 と MHV-2f の病原性の相違を詳細に解明するため、マウス体内での臓器別によるウイルス増殖の変化を検討した。経時的に採取した感染マウスの肝臓、脳および大腸では MHV2 の方が MHV-2f よりウイルス価 (PFU) が 10^3 から 10^5 以上も高く MHV2 接種マウス体内で顕著な増殖を示していることが分かった。さらに、肺および脾臓の検討を進めている。

(田原口元子、新倉綾、山田靖子)

II-2 走査電子顕微鏡による Tyzzer 菌 (*Clostridium piliforme*) の鞭毛分画の確認と鞭毛蛋白の塩基配列決定

SDS-PAGE の分子量 (53-56kD) から鞭毛と判断していた分画が本当に鞭毛であるかを走査電子顕微鏡で確認した。Tyzzer 菌を voltex 後の遠心 (1,000 ×g) 沈渣を「菌体分画」、その上清を遠心 (30,000 ×g) して得た沈渣を「鞭毛分画」とした。1分の voltex では、鞭毛が菌体からほとんど外れていたが、鞭毛は細切されてしまっていた。15秒の voltex では、菌体に鞭毛が若干残っていたが、鞭毛分画の鞭毛は細切されていなかった。いずれの鞭毛分画も菌体をほぼ含まず、SDS-PAGE 上では 53-56kD の分子量を示したことから、この分画が鞭毛であることが確認された。バキュロウイルスで組換え Tyzzer 菌鞭毛蛋白を発現させるため、鞭毛蛋白 flagellin 遺伝子の塩基配列を決定した。縮重プライマーを用いた PCR で得られた Tyzzer 菌 (RT 株) の鞭毛蛋白 flagellin 遺伝子断片の塩基配列をもとに PCR Walking を行い、flagellin 遺伝子の全長塩基配列 (813bp) を決定した。

(滝本一広)

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

脳内における麻疹ウイルス持続感染カニクイザルの各中枢神経組織を Vero 細胞と共培養して得られた培養細胞株について、麻疹ウイルス N 遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、大脳基底核、視床、頭頂、小脳の各組織と培養した細胞株に麻疹ウイルス N 遺伝子が認められた。これは、中枢神経の広範な部位でウイルスが持続感染していた事を示唆する。

(網 康至、須崎百合子)

III-2 イヌジステンパーウイルス(CDV)感染症モデルマウスの開発

イヌジステンパーウイルス(CDV)は、野生動物を中心として蔓延しており、マカク族サルにまで宿主域を拡大している。近年、日本に輸入されたカニクイザルコロニーにおいても致死性の CDV 感染症の流行が見られた。CDV の主たる感染経路は、飛沫/接触感染であり、最初に標的になるのは気管支周囲のリンパ節や扁桃に存在する血球系細胞である。CDV は血球系細胞に発現する SLAM を介して感染、増殖し、血流を介して呼吸器・消化器・皮膚の上皮細胞、さらに中枢神経のグリア細胞に感染する。CDV は、上皮細胞に発現する Nectin4 を介して感染することが知られている。

現在、イヌ SLAM 発現 Vero 細胞を用いた CDV の分離や野外分離株を用いてイヌでの実験的な発症に成功しているが、CDV が感染、発症するモデルマウスは存在せず、CDV の病原性を研究する上で必要不可欠となっている。そこで本研究では CDV を感染、発症するモデルマウス作製を試みる。本年度中の作製された場合、様々な野生動物から分離された CDV を感染させ、CDV 感染、発症モデルとしての有用性を検討する。

[河合康洋、森川 茂¹、阪井弘治² (1 獣医学部、²エイズ研究センター)]

III-3 インターフェロン関連遺伝子欠損コウモリ細胞株樹立

コウモリ類はエボラウイルス、マールブルグウイルス、狂犬病ウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス、SARS コロナウイルス等、多くのウイルスの自然宿主である。近年、未知/既知ウイルスの探索を目的としたコウモリのサーベイランスが世界各国で行われているが、ウイルス遺伝子や抗体が検出される検体であっても、ウイルスそのものが分離されない事例が多い。そこで本研究では、コウモリ由来細胞から抗ウイルス応答に重要な IFN 産生に関わる自然免疫関連遺伝子を、遺伝子編集技術を用いてノックア

ウトすることにより、効率的にコウモリウイルスが分離できる cell line を確立する。

実際には、ヒトおよびその他哺乳動物の抗ウイルス応答のキープクターである細胞内分子 Myd88 細胞、細胞内ウイルス RNA センサーである RIG-1、MDA5、およびインターフェロンの受容体である IFN α R1 を標的遺伝子とし、それぞれ、あるいは 2 重、3 重遺伝子欠損コウモリ細胞株を作製中であり、作製された細胞株は、様々なウイルスを用いて分離効率の評価を行う予定である。

[河合康洋、加来義浩¹ (1 獣医科学部)]

IV 人獣共通感染症に関する研究

IV-1 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、ブニヤウイルス属) は、ブニヤウイルス科フラビウイルス属に分類され、蚊媒介性の人獣共通感染症の原因ウイルスである。RVFV の L 蛋白 (RVFV-L) は 2,092 アミノ酸から成る約 250KDa の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼで、多量体を形成し N 蛋白とともにウイルスゲノムの複製と転写を行う。これまで、RVFV-L の N 末端領域に存在するロイシンジッパー様のモチーフ (Leu-6-Leu-6-Leu-6-Leu) (ZIP) の特に 200 と 207 位のアミノ酸ロイシンがポリメラーゼ機能に重要であること、ZIP が C-末端領域を介した RVFV-L の多量体形成における蛋白間相互作用分子内会合に関与している可能性を報告してきた。今年度は、ZIP と C-末端領域との相互作用をより詳細に解明することを目的として、RVFV-L の C 末端の 2,000-2,092 位のアミノ酸領域にほぼ規則的に配置しているロイシンおよび類似アミノ酸と、ZIP との相互作用について検討を行った。その結果 2,066、2,073、2,073、2,080 位のロイシンあるいはイソロイシンをプロリン置換すると、ポリメラーゼ機能は著しく低下した。さらに、2,000-2,092 位の領域を含む約 800 アミノ酸の断片 (1,300-2,092 位) は、共発現した野生型 RVFV-L と結合し、そのポリメラーゼ機能を阻害するが、2,000-2,092 位の領域を含まない断片 (1,218-2,000) ではそれが見られないことから、ZIP と 2,000-2,092 位のロイシンの相互作用が RVFV-L のポリメラーゼ機能に必須であることが明らかとなった。[新倉綾、福士秀悦¹、森川茂² (1 ウイルス一部、² 獣医科学部)]

IV-2 ヒトバベシア症に関する研究

Babesia microti US-lineage (BmUS) によるヒトバベシア症は米国北東部を主な流行地とする、マダニ媒介性

の人獣共通感染症である。我々はこれまで、道東地方の野鼠から BmUS を分離し、これが米国分離株と遺伝的に近縁であること、同地方の *Ixodes persulcatus*(シュルツマダニ、Ip)から野鼠由来株と同一の遺伝子が検出されること等を報告してきた。今年度は野外で Ip を採集し、原虫分離にはじめて成功し、分離株 4 株の抗原・遺伝子性状を野鼠由来株や米国株と比較した。分離した BmUS 株 4 株の CCT7 遺伝子配列は同一で、道東地方の野鼠由来株とも一致していた。一方米国株とは 1.54% の相違が見られた。抗原性状は Ip 由来株と野鼠由来株の間ではほぼ同様の交差反応が認められたが、米国株とは殆ど交差が認められなかった。以上の結果から、BmUS のベクターが Ip であることが証明された。Ip はヒトを吸血し、ライム病ボレリア等のベクターでもあることから、BmUS 陽性地域においてはヒトバベシア症の発生を注意深く観察していく必要がある。

[新倉綾、森川茂¹、平田 晴之²、石原智明²、山田靖子
(¹ 獣医科学部、² 酪農学園大学)]

子：塩素系消毒薬のマウスノロウイルス不活化効果と消毒薬の飲水による MNV 排除および MNV 感染防御の試み。第 60 回日本実験動物学会総会、平成 25 年 5 月、筑波。

- 2) 新倉(座本)綾、今岡浩一、木村昌伸、森川茂、平田晴之、石原智明、山田靖子：ニホンジカ (*Cervus nippon*) からの *Babesia divergens* 様遺伝子の検出。第 156 回日本獣医学会学術集会、平成 25 年 9 月、岐阜。
- 3) 新倉(座本)綾、福士秀悦、森川茂、山田靖子：リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能における C 末端領域の重要性。第 59 回日本ウイルス学会総会、平成 25 年 11 月、神戸。

発表業績一覧

I 誌上発表

I-1 欧文発表

- 1) Takimoto K, Taharaguchi M, Sakai K, Takagi H, Tohya Y, and Yamada YK. Effect of hypochlorite-based disinfectants on inactivation of murine norovirus and attempt to eliminate or prevent infection in mice by addition to drinking water. *Exp. Anim.* 62:237-245. 2013
- 2) Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol.* 163:54-61. 2013

II 学会発表

II-1 国内学会

- 1) 滝本一広、田原口元子、酒井宏治、高木弘隆、山田靖