

17. 動物管理室

室長 山田靖子

概要

平成 22 年度に開始された動物の愛護及び管理に関する法律（動愛法）の見直しが引き続き検討され、動物実験施設の届出制が見直しの焦点となった。環境省中央環境審議会動物愛護部会はこの点に関する結論を出さず、議員立法の場で検討することとなった。

平成 23 年 3 月 11 日の東日本大震災後、大幅な夏の節電の必要が生じたが、動物実験施設では動物に直接関わらない部分で節電に協力した。また、地震等大災害発生時の BCP を整備した。

戸山庁舎動物実験施設はヒューマンサイエンス振興財団による動物実験実施施設の認定を取得しているが、平成 23 年 9 月に 3 年目の更新のための調査を受け、認定を更新した。

村山庁舎では、インフルエンザウイルスワクチンの研究のため、9 号棟 ABSL3（動物バイオセーフティレベル 3）施設においてフェレット、ニワトリの飼育が開始され、動物管理室はその体制整備に尽力した。

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。平成 23 年 8 月に戸山庁舎で、免疫不全動物室において、日和見病原体 *Pneumocystis carinii* の感染が発生し、感染動物の同定、検疫区への移動、コロニーのクリーニングを行った。村山庁舎では、マウスの精巣膿瘍から *Proteus mirabilis* を分離した。

また、昨年度に引き続き、実験動物に関する研究を行った。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、マウスノロウイルス、*Corynebacterium ulcerans* の研究を進めた。モデル動物の開発研究として、麻疹ウイルス病態モデルとしてのカニクイザル、人獣共通感染症の研究として、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 23 年度はソウル大学、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」研修であった。

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、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）を設立しており、動物管理室長が会長を務めている。また、国内では現在、動物実験施設の第三者評価が 3 つの異なる団体で実施されているが、動物管理室長はそのうち 2 つの第三者評価システムに協力している。その他、国内の微生物モニタリングに関する委員会委員などを担っている。

平成 23 年 7 月以降、2 名の研究員が同時期に育児休業となったが、他の職員の協力で業務に支障はなかった。平成 24 年 3 月末で、須崎百合子の再任用が終了した。

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。講習会では実技の研修が行えないため、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することとした。平成 22 年度に開催した動物実験の継続従事者を対象にした講習会後、継続及び新規の受講者数は平成 24 年 3 月 31 日までに 562 名であった。平成 23 年度に申請された動物実験計画は 398 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 24 年 3 月 31 日現在、戸山庁舎 226 人、村山庁舎 212 人、ハンセン病研究センター 35 人である。

実験動物施設利用者講習会（新規）

動物実験講習会（新規）

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6日	戸山	14			24
6月9日	戸山	11*			12
8月2日	戸山	中止			中止
10月3日	戸山	8*			13
10月18日	戸山				2
11月1日	村山		14		
11月2日	村山		3		
12月7日	戸山	5			4
2月1日	戸山	9			9
合計		47 新規	17 新規	0 新規 なし	64 年度内 受講者

(斜字は外国対照講習会)

*登録済みの再受講者1名を含む)

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の飼育がなかったため、平成23年度はウサギの微生物モニタリングを行なわなかった。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、平井明香、小川敏雄、須崎百合子、山田靖子)

I-2 免疫不全動物室（戸山）における *Pneumocystis carinii* 汚染について

戸山庁舎の免疫不全動物室（Rm184）ではモニター動物を配置することによる汚染のリスクを考慮し、定期検査は行わず、必要に応じて利用者の動物を検査している。8月

に利用者の申し出により検査を行ったところ、*P. carinii* 汚染が確認された。他の利用者の協力により飼育されている動物の汚染状況を確認し、感染動物の殺処分または検疫区への移動を行った。Rm184 は消毒後、ヌードマウスをモニターとして配置して *P. carinii* が感染しないことを確認後、通常の運用を再開した。

(滝本一広、田原口元子、山田靖子)

I-3 村山庁舎微生物モニタリングにてマウスより分離された *Proteus mirabilis*

定期的微生物モニタリングにて、マウス(ddy 半年齢)に精巣膿瘍が見つかり、原因菌の同定を試みた。膿瘍はマニットに黄色ブドウ球菌、DHL にプロテウス様のコロニーを形成した。DHL のコロニーを純培養後、定法にて DNA を抽出、細菌の 16SrRNA 遺伝子を広く増幅するプライマ 515Fmix と 1492Rmix を用いて PCR を行ったところ、約 1kb の単一の増幅産物を得た。ダイレクトシーケンスにて PCR 産物の配列を決定し、Blast にてホモロジー検索した結果、*Proteus mirabilis* (NC_010554) の 80-1460 と 100% 一致していた。*P. mirabilis* は、ヒトの腸管常在菌で、ウレアーゼを産生し、しばしば尿路感染を起こす。また、免疫不全マウスにおいて、敗血症を起こすことが報告されている。マウスへの感染経路は不明であるが、適切な防護により、ヒトの常在菌等が実験動物に感染しないよう、改めて注意する必要がある。

(新倉綾、平井明香、網康至、須崎百合子)

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感受性差に関する研究

マウス肝炎ウイルス受容体は CEACAM1 である。感受性 C57BL/6 の CEACAM1a のウイルス結合部位を比較的抵抗性 SJL の CEACAM1b のものと置換した CEACAM1ba(1ba)を発現する遺伝子改変マウス cB6 1ba は、SJL より高度な抵抗性を示し MHV-A59 に感染しなかった。本年度は 1ba の受容体機能を検討するために BHK、HeLa、Vero などの株化細胞に発現させて受容体活性を調べたところ、CEACAM1b と同程度の受容体活性を示した。今後はマウスから分離した細胞に発現させた時の受容体活性を調べる。[平井明香、田口文広¹、山田靖子¹(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 それぞれ 3 段階の濃度 (10¹、10⁴ および 10⁷ PFU)

を BALB/c マウスに接種し経時的 (1、2、3、5、8、11 日) に採材後、感染マウスの肝臓および脳におけるウイルス増殖を検討した。MHV2 を接種したマウスにおいて、 10^1 接種マウスではウイルス感染力価が 2 日目をピークに 8、11 日目と減少傾向にあるが、 10^4 接種マウスでは 2 日目から 5 日目まで上昇傾向にあり、さらに 10^7 接種マウスでは 1 日目から高い数値を示し 5 日目まで高い推移を示した。また、MHV-2f を接種したマウスでは 2、3、5 日目にわずかな増殖を認められたが、その後 8、11 日目では増殖を認めなかった。いずれも、接種量に比例してウイルス感染力価は高い数値を示した。(田原口元子、新倉綾、山田靖子)

II-3 塩素系消毒薬のマウスノロウイルス (MNV) 除去効果について

MNV に対して *in vitro* で消毒効果の認められた塩素系消毒薬により、MNV 感染マウスから MNV を除去できるかを検討した。MNV 感染マウスに弱酸性次亜塩素酸水を飲水として 4 週間与え、糞便への MNV 排出および腸管の MNV 感染をブラックアッセイおよび RT-PCR にて調べたところ、上部小腸の MNV が排除された可能性が示唆された。しかし、盲腸の MNV には効果は認められず、糞便中への MNV 排出を抑制することはできなかった。また、MNV 感染マウスに弱酸性次亜塩素酸水または次亜塩素酸 Na 溶液を各 5 回経口投与したが、MNV 排除効果は認められなかった。

(滝本一広、山田靖子)

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

国内の異なる 2 つの繁殖施設から当施設に導入したカニクイザル 68 頭中 9 頭からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離された。本年度は分離株の毒素遺伝子塩基配列 (1,683bp) を解析した。全株で塩基配列が一致し (GenBank accession no. AB610405)、データベース上の *C. ulcerans* 株 (FJ858272) と 1 塩基、*C. diphtheria* (K01722) と 29 アミノ酸の違いがみられた。このことから毒素遺伝子は *C. ulcerans* 株間で保存性が非常に高いと考えられた。[平井明香、小宮貴子¹、須崎百合子、網康至、山本明彦¹、山田靖子 (¹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

脳内における麻疹ウイルス持続感染カニクイザルの中
枢神経組織から分離した麻疹ウイルスの遺伝子解析を行

っている。接種ウイルスの遺伝子解析から得られたプライマーを用いて、分離ウイルス持続感染細胞から抽出した RNA を RT-PCR 法で増幅を試みたところ、一部増幅されるものの、ウイルス構造タンパク遺伝子の増幅は認められず、量的にわずかであるか、変異によるものと考えられた。(網康至、須崎百合子)

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は反芻動物とヒトが感染し、蚊が媒介する人獣共通感染症で、アフリカが主な流行地である。リフトバレー熱ウイルスの L 蛋白 (RVFV-L) は多量体を形成し、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして N 蛋白とともにウイルスゲノムの複製と転写を行う。RVFV-L の N 末端領域 200-221 位にはロイシンジッパー様のモチーフ (Leu-6-Leu-6-Leu-6-Leu) (L-zip) が存在する。本研究ではその生物学的機能の解明に取り組んでいる。今年度はモチーフ内の各ロイシン残基のポリメラーゼ機能における重要性を調べた。ロイシンを類似アミノ酸あるいは強力なロイシンジッパーブレーカーであるプロリンに置換した変異 L 蛋白発現プラスミドを作製し、ミニゲノムアッセイにて評価した。200 及び 207 位のロイシンをバリンに置換するとポリメラーゼ機能は著しく低下し、特に転写機能は完全に消失した。一方、214 及び 221 位のロイシンをバリン或いはイソロイシンに置換してもポリメラーゼ機能には殆ど影響がなかった。しかし、214 及び 221 位のロイシンがプロリンに置換した変異 L 蛋白のポリメラーゼ機能は著しく低下していた。他のフレボウイルスでも 200/207 位は Leu で保存されていることから、L-zip の特に 200/207 位がフレボウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能に重要であると考えられた。

[新倉綾、池上徹郎¹、C.J.Peters¹、牧野伸治¹、森川茂²、山田靖子 (¹テキサス大学医学部、²ウイルス 1 部)]

発表業績一覧

I 誌上発表

I-1 欧文発表

- 1) Taguchi F, Hirai-Yuki A : Mouse Hepatitis Virus Receptor as a Determinant of the Mouse Susceptibility to MHV Infection. *Frontiers in Microbiology*. 68: 1-4. 2012

- 2) Fujisawa K, Nakajima R, Jinnai M, Hirata H, Zamoto Niikura A, Kawabuchi Kurata T, Arai S and Ishihara C : Intron sequences from the CCT7 gene exhibit diverse evolutionary histories among the four lineages within the *Babesia microti*-group, a genetically related species complex that includes human pathogens. Japanese journal of infectious diseases. 64:403-410. 2011
- 3) Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Tsuji S, Matsuda J : Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. The Proceedings of the Japan Academy, Series B. 87: 550-562. 2011
- 4) Li TC, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai le TQ, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T : Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. J Gen Virol. 92:2830-7. 2011
- 2) 山田靖子：人獣共通感染症の感染防御対策。第58回日本実験動物学会総会、平成23年5月、東京。
- 3) 山田靖子：パネルディスカッション「実験動物と動物実験の適正化について」（指名追加発言者）。第58回日本実験動物学会総会、平成23年5月、東京。

I-2 邦文発表

- 1) 山田靖子：実験動物感染症の現状—マウス肝炎ウイルス—。実験動物ニュース、60：17-19。2011
- 2) 山田靖子：バイオセーフティの原理と実際—動物実験におけるバイオセーフティ—。バイオメディカルサイエンス研究会 編、みみずく舎、135-144。2011

II 学会発表

II-1 国際学会

- 1) Hirai-Yuki A, Yamada YK and Taguchi F : Difference in MHV receptor activity between CEACAM1b and CEACAM1ba expressed in mice but not in cultured cell lines. The XIIth International Nidovirus Symposium. June 2011. Michigan.

II-2 国内学会

- 1) 田原口元子、滝本一広、新倉綾、山田靖子：弱酸性次亜塩素酸水のモニタリング対象微生物に対する効果