

17. 動物管理室

室長 花木 賢一

概要

動物管理室は実験動物の飼育及び健康管理並びにこれらに関する科学的調査及び研究を行うことを業務としている。実験動物の飼育及び健康管理では、動物実験施設の管理運営と微生物モニタリング、研究者が行う動物実験への技術支援、マウスの受精卵または精子の凍結保存と個体復元、帝王切開による清浄化を行っている。科学的調査及び研究では、実験動物の感染症に関する研究としてマウスノロウイルス持続感染細胞に関する研究と Tyzzer 菌の鞭毛蛋白に関する研究、モデル動物の研究としてムンプスウイルス感染モデル動物の開発、動物由来感染症の研究としてヒトバベシア症に関する研究を実施している。

我が国における動物実験に関する法規では、平成 18 年 6 月 1 日に改正施行された「動物の愛護及び管理に関する法律」第 41 条で動物実験の国際的倫理原則「3Rs (Replacement, Reduction, Refinement)」が明記され、同日施行された「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(厚労省基本指針)」で動物実験の機関管理が明示された。そこで、感染研では動物実験の最終責任者を所長とし、動物実験の適正な実施について諮問する組織として動物実験委員会、実験動物の適正な飼養保管を担保する組織として庁舎毎に実験動物管理運営委員会を設置している。動物管理室は動物実験委員会の事務局、実験動物管理運営委員会の庶務を担当している。また、「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」と厚労省基本指針に基づいて年一回公表する動物実験に関する自己点検・評価報告書原案の策定、第三者による外部検証に際して実地調査対応を行っている。戸山庁舎と村山庁舎の動物実験実施体制は、ヒューマンサイエンス振興財団動物実験実施施設認証センターより厚労省基本指針に適合していることの認定を受けている。その他、庁舎毎に設置されている連絡協議会において、動物実験施設の運営状況と動物実験の実施状況についての説明を担当している。

動物管理室は国内外からの動物実験施設見学と動物実

験施設管理運営の研修を受け入れている。主なものとして、平成 28 年度は学生インターンシップ・プログラム「人獣共通感染症・食品由来感染症実習プログラム」、東京大学農学部獣医学専修 3 年生の施設見学、タイ国立ワクチン研究所 (NVI) からの視察、JICA「ワクチン品質管理技術コース」と「ポリオ及び麻疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術」集団研修、ベトナム国立ワクチン及び生物製剤研究所 (NICVB) より研修生 1 名の受け入れに対応した。

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が主催する動物実験講習会の運営を担当している。講習会では受講者に対して動物実験に関する法規制、機関内規程、動物実験の 3Rs を実践するための基本的な事項、実験動物の飼養保管、動物感染実験におけるバイオセーフティ、等を解説している。また、講習会会場では実技研修を実施できないため、国内の団体が制作した動物飼育と基本実験手技に関するビデオ聴講に代えている。平成 28 年度新規受講者は 75 名、新規動物実験計画書の承認は 184 件であった。

動物管理室は動物実験施設毎に利用方法と実験動物の飼養・保管に関する講習会を開催し、受講者を施設利用者として登録している。平成 29 年 3 月 31 日現在の庁舎毎の施設利用登録者数は戸山庁舎 256 人、村山庁舎 268 人、ハンセン病研究センター 33 人である。また、3 庁舎で飼養保管している動物の合計は、マウス(7,169 匹)、ラット(309 匹)、モルモット(174 匹)、ウサギ(28 羽)、スナネズミ(11 匹)、ハムスター(35 匹)、フェレット(42 匹)、ネコ(7 匹)、霊長類(91 匹)、ニワトリ(8 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11日	戸山	16			19
6月6日	戸山	8			9
7月26日	戸山	1			1
8月9日	戸山	1			1
10月4日	戸山	1			1
10月17日	戸山	17			20
11月1日	戸山	3			1
11月30日	村山		4		
1月11日	戸山	4			4
2月6日	戸山	10			17
2月20日	戸山	1			1
2月27日	ハンセン			2	
3月7日	戸山	1			1
3月31日	村山		3		
合計		63 新規	7 新規	2 新規	75 新規

(斜体文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

1. 微生物モニタリング定期検査

戸山庁舎と村山庁舎の各飼育室にはモニター動物を配置し、庁舎毎に月一回の微生物検査を実施している。また、ハンセン病研究センターでも同様の微生物モニタリングを行っており、微生物検査は戸山庁舎で実施している。モニタリング結果は別表1に示す。緑膿菌と黄色ブドウ球菌について陽性例を認めるが、これらは免疫機能が正常な動物には病原性のない日和見病原体であり、免疫不全動物を用いる実験以外では許容されるものである。その他の病原体は全て陰性であり、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、花木賢一)

2. 胚操作業務

感染研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、利用者の依頼を受けて受精卵と精子の凍結保存、

及び胚移植による個体復元と SPF 化(クリーニング)の支援業務を行っている。平成28年度は29系統の依頼があり、受精卵と精子の凍結保存及び個体復元を実施した。(田原口元子、花木賢一)

II. 実験動物の感染症に関する研究

1. マウスノロウイルス持続感染細胞に関する研究

マウスノロウイルス(MNV)持続感染細胞を透過型電顕で解析すると、ほとんどの細胞は形態上の異常を認めず、エンドソームにウイルス粒子を貯蔵していた。しかし、一部の細胞は細胞膜が破綻して細胞小器官が細胞外へ漏出するネクロシスの様態を示し、漏出した二重膜小胞の中にウイルス粒子の集塊を認めた。また、一部の細胞は核の凝縮や断片化、細胞の縮小を認めるアポトーシスの様態を示し、細胞質にはウイルス増殖による形態変化である膜状構造とウイルス粒子を認めた。これまでの知見と透過型電顕観察に基づき、持続感染細胞のほとんどは MNV が増殖することなく壊死するが、一部の細胞では MNV が増殖してアポトーシスを引き起こし、新たなウイルスの供給源となるという感染環が推定された。

[花木賢一、滝本一広、田原口元子、網 康至、石山絵里¹、石田欣二¹(¹岩手医科大学)]

2. Tyzzer 菌(*Clostridium piliforme*)の組換え鞭毛蛋白の発現

Tyzzer 菌(RT株)をラット肝癌由来 H4IIE 細胞で大量培養してゲノム DNA を抽出し、Magnetic Beads により細胞由来の DNA を除去した上で、次世代シーケンサー解析により Tyzzer 菌のゲノム情報を得た。シーケンスデータの De novo アセンブルにより得られた Scaffold 配列に付加されたアノテーション情報と、以前に得た鞭毛蛋白の N 末端アミノ酸配列の情報から目的とする鞭毛蛋白 flagellin 遺伝子の塩基配列(1,545bp)を決定した。この flagellin 遺伝子を組換えバキュロウイルス DNA (Bacmid)へ挿入し、Sf9 細胞へトランスフェクションして組換えバキュロウイルスを作製した。

(滝本一広)

III モデル動物の開発研究

1. ムンプスウイルス感染モデル動物の開発と病態解析

ムンプスウイルス野外株をカニクイザルあるいはコモンマーモセットに皮下、経鼻あるいは静脈内接種し、末梢血リンパ球数の変動を解析した。いずれの動物においても皮下接種あるいは静脈内接種した場合は、接種1週から10日後に末梢血リンパ球数の増加を認めた。また、経鼻接種した場合は、接種後14日に末梢血リンパ球数の増加を認めた。これらの結果は、ヒトのムンプス臨床例で観察されるリンパ球増多症に一致する

が、血液中のウイルス遺伝子はコモンマーモセットで検出され、カニクイザルでは検出されなかった。

[網 康至、須崎百合子、木所 稔¹(¹ウイルス第3部)]

IV. 動物由来感染症に関する研究

1. 新興ヒトバベシア症に関する研究

Babesia divergens は、*B. microti* US 型に次いで感染者数の多いヒトバベシア症の原因原虫であり、日本のシカ (*Cervus nippon*) が近縁原虫を保有している。今年度は *B. divergens* と *B. venatorum* (*B. divergens* 近縁の新興種) を効率的に検出・分類する PCR 法を開発してベクター調査に用いた。シカと同一の原虫遺伝子はシュルツマダニから検出された (11/845)。一方、同所的に採集した他のマダニ種 817 匹はすべて陰性であった。また、過去のマダニサンプルについて上記 PCR 法で調べたところ、*B. venatorum* を日本で初めて検出した。吸血中のマダニ唾液腺からも *B. divergens* の遺伝子分離に成功し、シュルツマダニが上記の *B. microti* US 型だけでなく、*B. divergens* のベクターである可能性を強く示唆する結果を得た。シュルツマダニは東日本におけるマダニ刺咬症の主要種であり、ライム病やダニ媒介性脳炎等のベクターであることから、ヒトバベシア症の発生を注視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、花木賢一 (¹獣医科学部、²酪農学園大学)]

2. ヒトバベシア症の診断系に関する研究

B. microti (Bm)-like/Kobe (K)型は不顕性感染者の献血血液を介した輸血感染事故が報告されており、日本における輸血関連感染症の病原体として認知されている。輸血感染を未然に防ぐには迅速な診断が必要であるが、日本には K 型の他、Hobetsu (H)型、US 型 (US-J 株) が存在し、その遺伝子型間の抗体交差反応性は低いことが報告されている。本研究では各型における間接蛍光抗体法 (IFA) を構築し、抗体反応性を解析した。高寄生率時の感染赤血球を抗原とし、抗血清は回復期ハムスターと米国のヒト感染者由来のものを用いた。作製した IFA による各抗 Bm 抗体の反応性は、同型の抗原に対しては高い反応性を示したが、異型の抗原に対しては低反応性もしくは反応を示さなかった。そのため、各型に特異的な抗原を用いる必要があることを確認した。[新倉 綾、佐山勇輔¹、石原智明²、花木賢一 (¹日赤中央研究所、²酪農学園大学)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Uda A, Sharma N, Takimoto K, Deyu T, Koyama Y, Park ES, Fujita O, Hotta A, Morikawa S. Pullulanase Is

Necessary for the Efficient Intracellular Growth of *Francisella tularensis*. PLoS One, 11:e0159740. 2016

- 2) Zamoto-Niikura A, Morikawa S, Hanaki KI, Holman PJ, Ishihara C. *Ixodes persulcatus* Ticks as Vectors for the *Babesia microti* U.S. Lineage in Japan. Appl Environ Microbiol. 82:6624-32. 2016
- 3) Iizuka I, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Fukushi S, Ogata M, Morikawa S, Hasegawa H, Mizuguchi M, Kurane I, Saijo M. A Single Vaccination of Nonhuman Primates with Highly Attenuated Smallpox Vaccine, LC16m8, Provides Long-term Protection against Monkeypox. Jpn J Infect Dis. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.417. 2016
- 4) Sakai K, Ami Y, Suzaki Y, Matano T. First Complete Genome Sequence of a Simian Foamy Virus Isolate from a Cynomolgus Macaque. Genome Announc. 4(6). pii: e01332-16. doi: 10.1128/genomeA.01332-16. 2016
- 5) Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, John R, Wakita T. No Evidence of Rat Hepatitis E Virus Excretion in Urine Samples of Rats. Jpn J Infect Dis. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.283. 2016
- 6) Li TC, Zhou X, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Nakamura T, Takeda N, Wakita T. Production of infectious dromedary camel hepatitis E virus by a reverse genetic system: Potential for zoonotic infection. J Hepatol. 65:1104-1111. 2016
- 7) Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. TMPRSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage *In Vivo* Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. Sci Rep. 6:29430. 2016
- 8) Zhang W, Sano N, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Wakita T, Ikeda H, Li TC. Virus-like particles of porcine bocavirus generated by recombinant baculoviruses can be applied to sero-epidemic studies. Virus Res. 217:85-91. 2016
- 9) Okamoto K, Ami Y, Suzaki Y, Otsuki N, Sakata M, Takeda M, Mori Y. Analysis of the temperature sensitivity of Japanese rubella vaccine strain TO-336.vac and its effect on immunogenicity in the guinea pig. Virology. 491:89-95. 2016

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Aya Zamoto-Niikura, Haruyuki Hirata, Chiaki ishihara, Shigeru Morikawa and Ken-Ichi Hanaki. *Ixodes persulcatus* is the principal vector for U.S. Lineage parasites of *Babesia microti*-group in Japan. ASM microbe 2016. Boston, U.S.A. 2016年6月

2. 国内学会

- 1) 宇田晶彦、Neekun Sharma、滝本一広、田 徳雨、古山裕樹、朴ウンシル、藤田 修、堀田明豊、森川 茂:野兔病菌プルランナーゼ遺伝子の病原性に関する検討. 第159回日本獣医学会学術集会. 平成28年9月. 藤沢.
- 2) 佐山勇輔、新倉綾、松本千恵子、松林圭二、永井正、佐竹正博:ヒトバベシア症における解析方法の構築. 第40回日本血液事業学会総会.平成28年10月. 名古屋.
- 3) 花木賢一、滝本一広、石山絵里、網 康至、石田欣二: RAW264.7 細胞におけるマウスノロウイルス持続感染の機序. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 平成28年10月. 札幌.