

## 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実験の障害になるような特定の病原体が存在しないこと(Specific Pathogen Free; SPF)を保証するための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、及び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と A 型肝炎ウイルス感染マウスモデルの確立、動物由来感染症に関する研究としてヒトバベシア症に関する研究を行っている。

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」の第 41 条において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、環境省の「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の実地調査の対応を行っている。そして、戸山庁舎とハンセン病研究センターの動物実験実施体制は所外の有識者による第三者検証、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による外部認証により適正であるという評価を受けている。その他、庁舎毎に設置されている安全連絡協議会(村山庁舎では施設運営連絡協議会)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感染研へ依頼される動物実験施設見学と施設管理研修を受け入れている。主なものとして、平成 30 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」に参加する学生と東京大学農学部獣医学専修 3 年生の施設見学、日本獣医学生協会訪問団への施設概要説明、国立保健医療科学院「医師卒後臨床研修」、JICA「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」集団研修に対応した。

### 講習会開催及び動物実験施設の利用状況

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、動物実験におけるバイオセーフティ等を解説している。実技講習は、国内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視聴により行っている。平成 30 年度新規受講者は 68 名、新規動物実験計画書の承認は 378 件(前年度からの継続分を含む)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及び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 31 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 246 人、村山庁舎 285 人、ハンセン病研究センター 38 人である。また、3 庁舎で飼養保管している動物種(飼養数合計)は、マウス(6,455 匹)、ラット(167 匹)、モルモット(40 匹)、ウサギ(73 羽)、スナネズミ(5 匹)、ハムスター(10 匹)、フェレット(55 匹)、ネコ(13 匹)、霊長類(121 頭)、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(すべて新規)			
		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9日	村山				1
4月11日	戸山	12			20
4月17日	戸山	3			3
4月20日	ハンセン			1	
6月5日	村山		1		
6月22日	戸山	9			18
7月3日	戸山	6			
7月12日	ハンセン			3	
7月23日	村山		1		
8月3日	村山		1		
8月6日	戸山	8			11
8月17日	村山				1
9月3日	ハンセン			1	
9月5日	戸山	2			2
9月18日	村山		1		
10月22日	戸山	4			3
10月2日	村山		1		
11月16日	村山		2		
2月1日	戸山	5			9
2月27日	村山		4		
合計		49	11	5	68

(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おとり動物を配置し、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で陽性例を認めるが、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る。そのため、免疫不全動物を用いる実験以外では許容される(戸山庁舎とハンセン病研究センターでは黄色ブドウ球菌のみ許容)。そして、ハンセン病研究センターで緑膿菌陽性が確認された際は、該当飼育室内の全ケージについて個別に緑膿菌の検査を実施し、汚染が確認されたケージのマ

ウスは殺処分、その他のマウスは1ヶ月間飲水を次亜塩素酸添加水に変更して飼育した。その後、通常の飲水に戻してケージごとの検査を1ヶ月おきに2回実施し、全て緑膿菌陰性であることを確認した。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、結城明香、須崎百合子、花木賢一)

## 2. 胚操作業務

所内の動物実験施設で繁殖されている遺伝子改変マウス等を対象として、施設利用者の依頼を受けて受精卵と精子の凍結保存、胚移植による個体復元及び胚移植または自然妊娠マウスの帝王切開によるクリーニング(SPF化)の支援業務を行っている。平成30年度は16系統の依頼があり、受精卵と精子の凍結保存、個体復元、及びクリーニングを実施した。(田原口元子、花木賢一)

3. ニューモシスチス(*Pneumocystis* sp.)に対するネオマイシンの有効性について

*Pneumocystis* sp.に対するネオマイシンの有効性を確認するため、ハンセン病研究センターで *Pneumocystis* sp.に汚染され、ネオマイシン添加水が与えられていた免疫不全マウス [C57BL/6 Rag1 knockout (KO) と C57BL/6 Rag1/Mincle double knockout (DKO)] を戸山庁舎へ移動し、引き続きネオマイシン添加水を与えて飼育した。また、ネオマイシン添加を中止した場合の再発の有無を確認するため、飼育1ヶ月後から一部のマウスで飲水へのネオマイシン添加を中止した。ネオマイシン添加中止から2ヶ月後、Rag1 KO マウスでは添加群(N=2)と非添加群(N=2)には差が無く全例で背弯姿勢が観察され、*Pneumocystis* sp.陽性で重度の肺炎を認めた。一方、Rag1/Mincle DKO マウスでは、非添加群(N=3)は全例が *Pneumocystis* sp.陽性で肺炎を認めたのに対し、添加群(N=3)では1匹が *Pneumocystis* sp.陰性であり、2匹の *Pneumocystis* sp.陽性マウスのうち1匹は肺炎を認めなかった。ネオマイシンの有効性はマウスの系統によって著しく異なるために再確認が必要であるが、少なくとも飲水添加を中止することで再発することが明らかになった。[滝本一広、花木賢一;星野仁彦、河喜多智美、田村敏生、阿戸学(感染制御部)]

## 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(MNV)持続感染細胞に関する研究

MNV の研究で最も汎用される培養細胞はマウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞であるが、同じくマウスマクロファージ由来の J774.1 細胞では MNV は増殖しなかった。この両者の MNV 感受性差は、RAW264.7 細胞のみレトロウイルスを

持続産生していることに起因することが疑われた。そして、RAW264.7 細胞の内在性レトロウイルスをゲノム編集技術によりノックダウンすることで、RAW264.7 細胞の MNV に対する感受性の低下ないし喪失、MNV 持続感染を阻止できないかと考えた。そこで、内在性レトロウイルスのゲノム配列の確認を目的として、Moloney murine leukemia virus (Mo-MuLV) のゲノム情報を基に複数のプライマーを設計し、RAW264.7 細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。得られた PCR 産物をクローニングしてシーケンス解析を行い、RAW264.7 細胞由来 MuLV の gag 及び pol 遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、gag 遺伝子では 5 塩基、pol 遺伝子では 14 塩基が Mo-MuLV と異なることが確認された。[花木賢一、滝本一広、田原元子; 森一泰(エイズ研究センター)]

## 2. Tyzzer 菌 (*Clostridium piliforme*) の組換え鞭毛蛋白の発現と ELISA への応用

Tn5 細胞で発現させた Tyzzer 菌 (RT 株) の組換え鞭毛蛋白を 1% NP40/PBS で可溶化後、0.2M 尿素/PBS で精製し、これを抗原として ELISA を行った。同時に、空のベクターを用いて作製した組換えバキュロウイルスを感染させて発現させた組換え蛋白を陰性抗原として使用した。Tyzzer 菌感染マウス血清は組換え鞭毛蛋白に対し特異的かつ非常に強い反応を示した。一方、非感染マウス血清はいずれの抗原にも反応を示さなかった。市販の ELISA キットで非特異反応を示した非感染マウス 11 匹の血清も組換え鞭毛蛋白に対しては反応を示さなかった。これらの結果より、組換え鞭毛蛋白は特異性の高い抗原として有用であることが示唆された。(滝本一広)

## 3. NOJ マウスから検出された *Pasteurella pneumotropica* の病原性について

戸山庁舎で繁殖中の免疫不全マウス NOD/SCID/Jak3 KO (NOJ) マウスから検出された *P. pneumotropica* (NOJ 株とする) の NOJ マウスにおける病原性について調べるため、NOJ 株または *P. pneumotropica* 感染研標準株 (MaM 株) をそれぞれ NOJ マウスへ経鼻感染させた。MaM 株感染マウスでは感染 7 日目から体重が回復したのに対し、NOJ 株感染マウスでは 2 週目から体重が減少し始め、4 週目には感染時の体重の 80% 程度まで減少した。また、NOJ 株感染マウスでは感染後から立毛が見られ、4 週目には背弯姿勢が観察された。肺病変について比較したところ、MaM 株感染マウスでは、感染 2 週目に肺の一部に小さな膿瘍が確認されたが、4 週目でも肺病変の顕著な進行は認められなかった。一方、NOJ 株感染マウスでは感染 2 週目に多くの肺葉で膿瘍が認められ、4 週目では複数の肺葉が膿瘍化して肋骨への癒着が顕著であった。これらの結果から NOJ 株は MaM 株に比べて病原性が強く、その進

行が早いことも確認された。免疫機能が正常なマウスにおける病原性を確認するため、ICR マウスで同様の感染実験を実施したが、何れの株も病原性は認められなかった。[田原元子、滝本一広、花木賢一; 寺原和孝、岩渕龍太郎(免疫部)]

## 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

ムンプスウイルスワクチン株の神経病原性の評価法を検討する目的で、 $10^2$  PFU の Jeryl Lenn 株または国産の鳥居株をそれぞれ3頭のコモンマーモセット脊髄内に接種し、感染初期の2週間において末梢血リンパ球の変動と発熱の観察を行った。Jeryl Lenn 株接種群では3頭中1頭で接種1週後にリンパ球が減少、10日後に増加する変動が観察されたが、他の2頭では観察されなかった。また、変動が観察された個体では、接種後10日以降に発熱が認められた。鳥居株接種群では3頭全頭で同様のリンパ球数の変動が観察されたが、発熱個体は観察されなかった。これまでのコモンマーモセットを用いた感染実験の結果から、ウイルス接種後約1週から10日前後にリンパ球数の減少、10日以降に増加する特徴的変動が、接種経路における標的細胞での病原性の指標となることが示唆されている。このことから、本結果は鳥居株の神経病原性が Jeryl Lenn 株と比較して強いことを示唆している。また、鳥居株ワクチン接種後の副反応の発症率は Jeryl Lenn 株のそれと比較して高いことが知られていることから、コモンマーモセットを用いた背髄内接種法は、ムンプスウイルスワクチン株の神経病原性評価に有用であることが期待された。[網康至、須崎百合子; 加藤文博、加藤大志、木所稔(ウイルス第三部)]

### 2. A 型肝炎ウイルス (HAV) 感染症のマウスモデルに関する研究

経口感染性肝炎ウイルスの腸管からの侵入制御にインターフェロン (IFN) 応答が関与するかを明らかにすることを目的として、I 型・III 型 IFN 受容体二重欠損マウスを用いた経口感染モデルの作出を試みている。本マウス系統の凍結胚を輸入して個体復元を行ったが、繁殖能力のある雌雄ペアが得られなかった。そこで、別ロットの凍結胚を用いて2度目の個体復元を行い、繁殖能力のある雌雄ペアを得てコロニーを確立した。今後は本マウス系統を用いて、HAV の経口接種による感染成立の有無や腸管での HAV 複製を調べる。[結城(平井)明香、田原元子、花木賢一; 塩田智之、吉崎佐矢香、鈴木亮介(ウイルス第二部)]

## IV. 動物由来感染症に関する研究

### 1. ヒトバベシア症の診断系に関する研究

*Babesia divergens* の抗体保有率等を調査するため、感染

血清に強く認識される主要膜表面蛋白質に着目して解析を進めている。*B. divergens* 主要膜抗原 Bd37 の解析では、多様性に富む遺伝子であるがアミノ酸配列の保存／非保存領域により3種類(JP-A, B, C)に分類出来ること、JP-Aは全ての原虫が保有し、診断抗原として有用であることを明らかにした。[新倉綾、花木賢一、森川茂、今岡浩一(獣医科学部)、萩原克郎、石原智明(酪農学園大学)]

Genetic polymorphism and amino acid sequence variation of *Babesia divergens* Bd37 in *Ixodes persulcatus* and *Cervus nippon* in Japan. Human Babesiosis Meeting-I, 2019, New Haven.

- 2) Aya Zamoto-Niikura, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa, Katsuro Hagiwara, Chiaki Ishihara and Ken-Ichi Hanaki. Molecular analysis of Bd37 of *Babesia divergens* in Japan. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2019, Madrid.

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Qiang W, Morikawa S, Hanaki KI, Holman PJ, Ishihara C. The *Babesia divergens* Asia Lineage Is Maintained through Enzootic Cycles between *Ixodes persulcatus* and Sika Deer in Hokkaido, Japan. Appl Environ. Microbiol. 84(7). pii: e02491-17, 2018
- 2) Kumagai Y, Sato K, Taylor KR, Zamoto-Niikura A, Imaoka K, Morikawa S, Ohnishi M, Kawabata H. A relapsing fever group *Borrelia* sp. is widely distributed among wild deer in Japan. Ticks Tick Borne Dis. 9:465-470, 2018
- 3) Fujii K, Sudaka Y, Takashino A, Kobayashi K, Kataoka C, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Kotani O, Ami Y, Shimizu H, Nagata N, Mizuta K, Matsuzaki Y, Koike S. VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 Is a Key Residue for Its Receptor Attachment and Resistance to Neutralizing Antibody during Cynomolgus Monkey Infection. J Virol. 92: e00682-18, 2018
- 4) Li TC, Bai H, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Doan YH, Takahashi K, Mishiro S, Takeda N, Wakita T. Genotype 5 Hepatitis E Virus Produced by a Reverse Genetics System Has the Potential for Zoonotic Infection. Hepatol Commun. 3: 160-172, 2018
- 5) Hirai-Yuki A, Whitmire JK, Joyce M, Tyrrell DL, Lemon SM. Murine models of hepatitis A virus infection. Cold Spring Harb Perspect Med. 9:a031674, 2019

#### 2. 邦文発表

なし

### II. 学会発表

#### 1. 国際学会

- 1) Aya Zamoto-Niikura, Koichi Imaoka, Shigeru Morikawa, Katsuro Hagiwara, Chiaki Ishihara and Ken-Ichi Hanaki.

#### 2. 国内学会

- 1) Daisuke Yamane, Asuka Hirai-Yuki, Michinori Kohara, Stanley M Lemon. MAVS-independent activity of interferon regulatory factor 1 restricts replication of hepatotropic RNA viruses. 第66回日本ウイルス学会学術集会、2018年10月、京都.