

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(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、動物由来感染症の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実地調査対応を行っている。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感染研へ依頼される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 29 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、国立保健医療科学院「医師卒後臨床研修」、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、感染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 29 年度新規受講者は 78 名、新規動物実験計画書の承認は 404 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 30 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 248 人、村山庁舎 274 人、ハンセン病研究センター 28 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(7,260 匹)、ラット(197 匹)、モルモット(190 匹)、ウサギ(39 羽)、スナネズミ(8 匹)、ハムスター(8 匹)、フェレット(55 匹)、ネコ(7 匹)、霊長類(149 匹)、ニワトリ(10 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12日	戸山	12			15
5月15日	戸山	2			2
5月25日	ハンセン			1	
5月26日	ハンセン			1	
6月14日	戸山	11			18
6月14日	ハンセン			1	
6月15日	ハンセン			1	
6月30日	村山		3		
8月4日	戸山	4			0
9月4日	戸山	1			1
9月30日	村山		1		
10月4日	戸山	9			16
10月27日	村山				1
11月1日	戸山	2			2
11月17日	ハンセン			1	
12月4日	戸山	1			1
12月28日	村山		5		
2月1日				3	
2月13日	戸山	1			1
2月20日	戸山	9			20
3月9日	村山				1
3月31日	村山		1		
合計		52	10	8	78

(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。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

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、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29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.)清浄化の試み

平成29年11月にハンセン病研究センター動物実験施設で飼育中の免疫不全マウス(C57BL/6 Rag1 KO)で衰弱死が散発し、検査の結果、真菌の一種である*Pneumocystis* sp.に感染していることが判明した。*Pneumocystis* sp.の排除にはネオマイシン投与が有効であるという情報から、ネオマイシン添加水をマウスに与えて定期的に検査を行った。ネオマイシン投与開始後に生まれたマウスでは*Pneumocystis* sp.感染が認められず、ネオマイシンが有効である可能性が示唆された。現在、当該マウスの飼育を戸山庁舎動物実験施設で継続し、ネオマイシンの効果を確認している。[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持続感染細胞において、ウイルスが複製していることを証明するために、抗MNVマウス血清とウイルスの複製中間体として形成される二本鎖RNAを認識するJ2モノクローナル抗体を用いて蛍光二重染色を行った。何れの抗体もマウス由来であることから、はじめに抗MNV抗体は蛍光色素標識抗マウスIgG抗体を用いた間接標識、J2抗体は蛍光色素のスクシニミジルエステルによる直接標識を行った。しかし、後者の蛍光シグナルは弱く、顕微鏡観察が困難であった。そこで、J2抗体の蛍光色素標識をZenon®フラグメントに変えて行くと、顕微鏡観察に十分な蛍光シグナルが得られた。MNV抗原は全ての細胞で観察されたが、二本鎖RNAは約2割の細胞で観察された。なお、170継代を過ぎたMNV持続感染細胞では定量RT-PCRによってMNVが複製していることを確認できたが、顕微鏡観察ではMNV抗原を検出することができなかった。そのため、蛍光二重染色は90継代時凍結保存した細胞を起こして実施した。[花木賢一、滝本一広、田原口元子、網 康至;石山絵里、石田欣二(岩手医科大学)]

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

Tyzzer 菌 (RT 株) の鞭毛蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、Sf9 細胞で鞭毛蛋白を発現させた。そして、ウェスタンブロッティングにより発現した鞭毛蛋白が抗 Tyzzer 菌抗体で特異的に検出されることを確認した。次に、Tn5 細胞で鞭毛蛋白の大量発現を行い、精製方法について検討した。その結果、鞭毛蛋白は 1% NP40/PBS で可溶化後、0.2M 尿素/PBS で精製できることを確認した。組換え鞭毛蛋白の ELISA 抗原としての有用性は、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 Tn5 細胞に感染させて発現させた組換え蛋白を陰性抗原として用いて検討する。(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

ムンプスウイルスワクチン候補株の有効性評価のための最適な攻撃ウイルス用量を決定することを目的として、コモンマーセット(計 5 頭)にムンプスウイルス野外株(大館株) 10^3 PFU (3 頭) または 10^2 PFU (2 頭) を経鼻接種し、その病原性の解析を行った。これまでの知見として、 10^4 PFU を経鼻接種して経時的に末梢血中のリンパ球数の変動を観察した場合、個体間で接種後日数は異なるものの、感染 10 日目までに一過性のリンパ球数の減少が認められ、感染 14 日目にリンパ球数の一過性の増加を認め、すべての個体でウイルス血症、抗体の陽転を認めた。これに対して、 10^3 PFU、 10^2 PFU 接種個体では、末梢血リンパ球数の変動は一樣ではなかった。そして、 10^3 PFU 接種個体のすべてでウイルス血症を認めたものの、のうち 2 頭では抗体の陽転を認めなかった。また、 10^2 PFU 接種個体では、すべてでウイルス血症および抗体の陽転を認めなかった。これらの結果は、マーモセットにおけるムンプスウイルスの最小感染量が 10^3 PFU であることを示唆する。しかし、有効性を評価する指標が少なくなるため、大館株を用いる攻撃試験では、最小感染量の 10 倍量に当たる 10^4 PFU が必要であることも示唆された。[網 康至、須崎百合子; 加藤大志、木所稔(ウイルス第三部)]

2. A 型肝炎ウイルス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を制御する免疫応答やウイルスの病原性を明らかにすることを目的として、自然感染経路(経口)で A 型肝炎ウイルス(HAV)に感染するマウスモデルの確立を試みている。本年度は本研究に用いるウイルス株の選定を行った。候補株とした 2 つの国内分離株(遺伝子型 IA および IB)はマウスへの感染性と病原性が不明であったため、HAV に感受性であることが分かっている I 型 IFN 受容体欠損マウスに尾静脈接種した。その結果、ウイルス複製は低レベルで肝酵素

の上昇も軽度であった。接種したウイルスは細胞培養系で増殖させたものであったため、細胞へ馴化し生体への感染性や病原性が減弱した可能性があることから、患者あるいは実験的に感染した動物の糞便から精製したウイルスを用いるか、マウスで継代して感染性と病原性の高いウイルスを得る必要があると考えられた。[結城(平井)明香、花木賢一; 塩田智之、吉崎佐矢香、石井孝司(ウイルス第二部)]

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

都内などよりアクセスの多い地域(奥多摩および秩父地方) 3 か所においてマダニを採集し、マダニ種の同定と網羅的な原虫保有調査を行った。ヒト寄生例のある種類ではヒゲナガチマダニ (*Haemaphysalis kitaokai*, 49/86 匹) やヤマトマダニ (*Ixodes ovatus* 13/86 匹) が 3 か所すべてで採集され、ヒゲナガチマダニからは新規の *Babesia* sp. 18S rRNA 塩基配列を検出した。[新倉 綾、花木賢一; 佐山勇輔(日赤中央研究所)]

2. 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た。本事業ではシュルツマダニの唾液腺より 2 株の *B. divergens* (上述) ゲノムおよび mRNA を得ることができ、遺伝子および mRNA 配列の決定とバリエーションの詳細な解析が可能であった。[新倉 綾、花木賢一; 森川 茂(獣医科学部); 石原智明(酪農学園大学)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Yamano K, Ito T, Kiyonagi K, Yamazaki H, Sugawara M, Saito T, Ohashi N, Zamoto-Niikura A, Sato K, Kawabata H. Case Report: Clinical Features of a Case of Suspected *Borrelia miyamotoi* Disease in Hokkaido, Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 97:84-87. 2017
- 2) Li TC, Yoshizaki S, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Doan YH, Haga K, Ishii K, Takeda N, Wakita T. Genetic and physicochemical analyses of a novel ferret hepatitis E virus, and clinical signs of infection after birth. *Infect Genet Evol.* 51:153-159. 2017
- 3) Das A, Hirai-Yuki A, González-López O, Rhein B, Moller-Tank S, Brouillette R, Hensley L, Misumi I, Lovell W, Cullen JM, Whitmire JK, Maury W, Lemon SM. TIM1 (HAVCR1) Is Not Essential for Cellular Entry of Either Quasi-enveloped or Naked Hepatitis A

Virions. MBio. 8:e00969-17. 2017

- 4) Li TC, Yoshizaki S, Kataoka M, Doan YH, Ami Y, Suzaki Y, Nakamura T, Takeda N, Wakita T. Determination of Ferret Enteric Coronavirus Genome in Laboratory Ferrets. *Emerg Infect Dis.* 23:1568-1570. 2017
- 5) Moi ML, Ami Y, Muhammad Azami NA, Shirai K, Yoksan S, Suzaki Y, Kitaura K, Lim CK, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for evaluation of candidate dengue vaccines: induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates. *J Gen Virol.* 98:2955-2967. 2017
- 6) Yoshida A, Kawabata R, Honda T, Sakai K, Ami Y, Sakaguchi T, Irie T. A Single Amino Acid Substitution within the Paramyxovirus Sendai Virus Nucleoprotein Is a Critical Determinant for Production of Interferon-Beta-Inducing Copyback-Type Defective Interfering Genomes. *J Virol.* 92:e02094-17. 2018
- 7) Sayama Y, Zamoto-Niikura A, Matsumoto C, Saijo M, Ishihara C, Matsubayashi K, Nagai T, Satake M. Analysis of antigen-antibody cross-reactivity among lineages and sublineages of *Babesia microti* parasites using human babesiosis specimens. *Transfusion.* doi: 10.1111/trf.14558. 2018
- 8) Someya Y, Ami Y, Takai-Todaka R, Fujimoto A, Haga K, Murakami K, Fujii Y, Shirato H, Oka T, Shimoike T, Katayama K, Wakita T. Evaluation of the use of various rat strains for immunogenic potency tests of Sabin-derived inactivated polio vaccines. *Biologicals.* 52:12-17. 2018
- 9) Azami NAM, Moi ML, Ami Y, Suzaki Y, Lim CK, Taniguchi S, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Genotype-specific and cross-reactive neutralizing antibodies induced by dengue virus infection: detection of antibodies with different levels of neutralizing activities against homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 2 in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Virology.* 15:51. 2018

2. 邦文発表

- 1) 平井(結城)明香, 石井孝司. A型肝炎のウイルス学. *医学のあゆみ.* 262(14): 1257-1263. 2017

II. 学会発表

1. 国際学会

なし

2. 国内学会

- 1) 佐山勇輔、新倉 綾、松本千恵子、西條政幸、松林圭二、永井正、佐竹正博. ヒトバベシア症原因原虫 *Babesia microti* 遺伝子型間における抗体反応性の解析. 第65回日本輸血・細胞治療学会総会. 平成29年6月. 千葉.
- 2) 山野公明、伊東拓也、佐藤 梢、新倉 綾、川端寛樹、大橋典男、鬼柳かおり、山崎弘貴、菅原 睦、斉藤孝成、稲熊良仁. 北海道におけるライム病・回帰熱の血清診断について. 衛生微生物技術協議会第38回研究会 2017年6月. 東京.
- 3) 新倉(座本) 綾、森川 茂、石原智明、花木賢一. *Babesia divergens* 表面抗原 Bd37 の遺伝子解析. 第160回日本獣医学会学術集会. 平成29年9月. 鹿児島.