

## 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）は平成17年に改正されたが、5年後に見直されることとなっている。平成22年7月より中央環境審議会動物愛護部会で見直しの検討が開始された。実験動物に関しても見直しが見直されており、感染研は厚生労働省管轄の機関として各方面と協力して対応している。

平成22年に京都大学霊長類研究所のニホンザルコロニーにおいて感染症が疑われる複数固体の死亡が報告され、感染研の研究者を含めて原因究明を行なった結果、サルレトロウイルス(SRV)-4に起因することが報告された。一方、感染研村山庁舎で実験に供されたカニクイザルでは、SRV-Dに起因する免疫異常が動物実験結果に影響を与える可能性が示唆された。どちらのウイルスもヒトへの感染性は認められていないが、今後サルレトロウイルスに対する注意が必要となろう。

平成23年3月11日の東日本大震災に際し、感染研3庁舎すべての動物実験施設において、飼育ケージの落下、動物逸走、及び動物施設の破損など不測の事態は認められなかった。

村山庁舎の改修工事の一貫として、運用開始から約22年を経過した2号棟の動物管理区域の空調機器の更新を行った。更新工事は、外気温およびその変動が少ないことを考慮し11月中旬に行い、期間中は、仮設の給排気ファンを設置し、再熱コイルのみによる温度調整を行った。工事期間中、動物実験結果に影響を及ぼすほどの温湿度の変化は認められなかった。

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。また、昨年度に引き続き、実験動物に関する研究を行なった。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*の研究を進めるとともに、弱酸性次亜塩素酸水の実験動物特有の病原体に対する消毒効果について研究を行なった。モデル動物の開

発研究では、麻疹ウイルス病態モデルとしてのカニクイザル、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22年度は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、国内の動物実験を取り巻く状況に対応する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、感染研が会長を務めている。

平成22年10月1日、酒井宏治研究員が動物管理室から転出し、ウイルス3部に配置換えとなった。

#### 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。平成22年度は動物実験の継続従事者を対象にした講習会を開催し、動物福祉に関する再教育とともに最近の情勢を学んだ。平成22年度に継続者対象及び新規の動物実験従事者を対象にした講習会を受講した人数は平成23年3月31日までに498名であった。平成22年度に申請された動物実験計画は371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23年3月31日現在、戸山庁舎233人、村山庁舎218人、ハンセン病研究センター24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（新規及び継続） 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	16			26
4月21日	戸山				2
4月27日	村山		1		
4月30日	村山		7		
5月13日	村山		6		
6月1日	戸山	10			15
6月14日	戸山				292
6月24日	村山				51
6月30日	戸山				63
8月4日	戸山	7			14
9月1日	戸山	1			2*
10月5日	戸山	3			7
12月1日	戸山	8			9
1月26日	戸山	1			1
2月1日	戸山				16
2月8日	村山		7		
合計		46 新規	21 新規	0 新規 なし	498 全従事 者

(斜字は外国人対照講習会)

\*他に日本語と英語の重複受講者1名)

## 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匹数が減少したため、平成22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、

酒井宏治、小川敏雄、須崎百合子、山田靖子)

#### II 実験動物の感染症に関する研究

##### II-1 異なる受容体を持つマウスのマウス肝炎ウイルス感受性に関する研究

マウス肝炎ウイルス(MHV)はCEACAM1を受容体として利用し、感受性C57BL/6(B6)マウスはCEACAM1a(1a)を、比較的抵抗性SJLマウスはCEACAM1b(1b)を発現している。両系統のMHV感受性が受容体に依存するか検討するために、B6マウスの1a遺伝子上のウイルス結合部位を1b遺伝子のもとと置換したCEACAM1ba(1ba)を発現する遺伝子改変マウスcB6Ibaを作製し、これはSJLより高度なMHV抵抗性を示し感染が認められなかった。本年度は、1bおよび1baがマウス生体内でMHV受容体として機能しているか検討した。cB6Iba、SJLおよびF1(cB6IbaxSJL)マウスにMHVを腹腔接種した時のMHV感受性と、マウスから分離した腹腔マクロファージ(PM)のMHV感受性が一致したことから、PMを用いて*ex vivo*で解析を行った。SJLおよびF1のPMはMHVに感受性を示し、抗CEACAM1b抗体(1baは認識しない)によりウイルス感染が阻止された。一方、cB6IbaのPMではMHV感染が認められなかった。以上から、1bはマウス生体内で受容体として機能するが、1baは受容体として機能しない可能性が示唆された。[平井明香、網康至、田口文広<sup>1</sup>、山田靖子(<sup>1</sup>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の病原性を解明するため、それぞれ3段階の濃度(10<sup>1</sup>、10<sup>4</sup>および10<sup>7</sup>PFU)をBALB/cマウスに接種後、経時的(1、2、3、5、8、11日)に臓器等を採材しマウス体内におけるウイルス増殖を検討した。MHV2を接種したマウスの肝臓において、10<sup>1</sup>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日目、11日目と減少傾向にあるが、10<sup>4</sup>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<sup>7</sup>接種マウスでは1日目から高い数値を示し5日目まで、さらに上昇し10<sup>4</sup>接種マウスの場合より高い数値まで達した。肝臓でのウイルス増殖は、接種量に比例して高い数値を示す結果であった。

(田原口元子、新倉 綾、山田靖子)

##### II-3 マウスノロウイルスのコントロール法の確立に関する研究

(1) 実験用マウスコロニーからのマウスノロウイルスの分離と分子系統学的解析

昨年度に引き続き、国内マウスコロニーのマウスノロウイルス (MNV) 浸潤状況の把握及び既知の MNV 分離株との遺伝学的な比較を行った。SPF 動物施設のマウス糞便を採材し、抗生物質添加 PBS にて乳剤作製後、RAW 264.7 細胞 (マウスマクロファージ由来株化細胞) に接種し、ウイルス分離を試み、MNV 特異的 RT-PCR による同定を実施した。MNV 遺伝子陽性検体については、VP1 及び VP2 遺伝子の配列決定を行い、系統学的解析を実施した。SPF 施設 78 検体のマウス糞便から、12 検体について MNV 分離陽性、55 検体について RT-PCR によりウイルス遺伝子陽性が認められた。同一施設内においても様々なクラスターに分類される分離株が認められたが、これまでの疫学調査同様、既知の MNV と比較して遺伝学的に大きく異なる分離株は認められなかった。本研究により、SPF 施設のマウスコロニーから MNV を分離・同定し、MNV が浸潤していることが明らかとなった。[酒井宏治、網康至、須崎百合子、山田靖子]

#### (2) 迅速・簡便なマウスノロウイルス抗原検出方法の開発

国内実験用マウスコロニーの MNV 浸潤状況の把握は不十分であり、迅速かつ簡便な検査法の検討が必要である。これら検査過程の中で煩雑な作業として糞便からの RNA 精製過程がある。その過程を改良することで迅速・簡便な遺伝子検出系の改良を行った。RNA 精製を行わず、糞便乳剤遠心上清及び感染細胞培養上清から直接を熱処理後、逆転写反応及び遺伝子増幅を行った (以下、ダイレクト法)。MNV S7 株感染細胞培養上清を用いて、至適な条件を検索し、検出感度の検討を行った。RNA 精製が不要なため、判定まで約 4 時間以内に MNV 遺伝子を迅速・簡便に検出することができた (抽出 5 分、逆転写反応 35 分、遺伝子増幅反応 150 分、電気泳動 30 分)。プライマーは ORF1 の 3' 末端と ORF2 の 5' 末端において MNV で高度に保存されている領域を用い、検出限界は感染培養上清で 1PFU/reaction と比較的高感度であった。ダイレクト法は、通常の方法と比べ、糞便乳剤遠心上清では、感度 91%、特異度 81%、正確度 84%、感染細胞培養上清で感度、特異度、正確度ともに 100%であった。また、これまでウイルス分離できた検体については全てダイレクト法で遺伝子検出しており、迅速・簡便な MNV 遺伝子検出方法として有用であると考えられる。[酒井宏治、中山 博之\*、四方田 聡\*、網康至、須崎百合子、山田靖子；\*(株)島津製作所 分析計測事業部]

#### (3) マウスノロウイルス不活化の検討

鶏糞をプラントで還元焼結することで炭素を完全に除去して生成される粒子状鶏糞セラミックスを用いて、不活化の検討を行った。ウイルスと室温で転倒混和することで、マウスノロウイルスを 2000 倍以上特異的に不活化した (高力価のウイルスを調整できるサルアデノウイルスでは 10<sup>6</sup> 倍以上特異的に不活化)。鶏糞セラミックスは、これまで、*Salmonella Enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* などの細菌にも有効であることを確認している。今後、マウスの床敷きと併用し、長期的効果が期待されるバイオセキュリティ強化資材として、*in vivo* の効果の検討を予定している。[酒井宏治、竹原一明\*、網康至、須崎百合子、山田靖子；\*東京農工大学]

#### II-4 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について

実験動物特有の病原体に対する弱酸性次亜塩素酸水の不活化効果を他の広く使用されている消毒剤 (次亜塩素酸ナトリウムおよびエタノール) と比較して検討を行った。SPF 対象病原体としては、*B. bronchiseptica*、*P. pneumotropica*、*C. kutscheri*、MHV 及び HVJ、免疫不全動物に病原性を示す日和見病原体としては、*S. aureus* および *P. aeruginosa* を用いた。菌液またはウイルス液を 9 倍あるいは 99 倍量の各消毒薬と混合し、30 秒、1 分および 5 分間反応させて生菌数の測定およびウイルス感染力価の測定を行った。その結果、弱酸性次亜塩素酸水においても他の消毒剤である 0.03% 次亜塩素酸ナトリウムおよび 70% エタノールと同様に生菌数またはウイルス感染力価は減少あるいは検出限界以下に低下し、十分な効果を認めた。ただし、弱酸性次亜塩素酸水は有機物存在下では効果が減弱することがあるため施設で使用の際は、この点を考慮することが必要であるが、実験動物特有の病原体に対して高い殺菌効果および不活化効果があり、環境や安全の面からも有用であると思われる。

(田原口元子、新倉 綾、山田靖子)

#### II-5 マウスノロウイルス (MNV) およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) に対する弱酸性次亜塩素酸水の消毒効果

1 vol. の各ウイルス液と 9 vol. の弱酸性次亜塩素酸水を混和し、一定時間後のウイルス力価を測定することにより、その消毒効果を検討した。MNV (S7 株) の場合、pH6.6、残留塩素 40ppm の弱酸性次亜塩素酸水では混和 10 分後でもウイルス力価は 10<sup>3</sup> 程度しか低下しなかったが、pH6.0、残留塩素 60ppm の弱酸性次亜塩素酸水では混和 1 分後でウイルス力価が 10<sup>4</sup> 低下し、5 分後では検出限界以下になり、

MNV に対する一定の消毒効果が認められた。LCMV (Armstrong 株) の場合、pH6.0、残留塩素 60ppm の弱酸性次亜塩素水と 30 秒混和することで検出限界以下となり、LCMV に対する強い消毒効果が認められた。

(滝本一広)

## II-6 サル由来 *Corynebacterium ulcerans* の性状解析

ヒトのジフテリア様疾患の原因菌であるジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が国内のイヌ、ネコ、ライオン、シャチから分離されている。これまでの調査で国内の異なる 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 頭から毒素産生性 *C. ulcerans* が分離された。本年度はこれらの分離株について種々の抗生物質に対する感受性を調べた。その結果、耐性 *C. ulcerans* 株が報告されている erythromycin、clindamycin に対しても感受性を示した。今後は抗生物質を用いてサルから本菌を排除することが可能であるか検討したい。[平井明香、小宮貴子<sup>1</sup>、須崎百合子、網康至、高橋元秀<sup>1</sup>、山田靖子<sup>(<sup>1</sup>細菌2部)</sup>]

## 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脳神経組織から、Vero 細胞との共培養により、分離した麻疹ウイルスは、感染粒子を全く産生せず、また、分離ウイルス感染 Vero 細胞におけるウイルス蛋白の発現は、野外株と比較して H 蛋白の発現は同等であったが、N 蛋白、F 蛋白の発現が著しく低かった。

(網康至、須崎百合子)

### III-2 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) の L 蛋白 (L) は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有し、ウイルス増殖に必須の蛋白である。分節型のウイルスがもつ L 蛋白は分子量約 250 kDa の大型蛋白質であり、ウイルスゲノムの複製および転写に含まれる各ステップやその他の多様な機能を持つと考えられているが、その詳細は明らかでない。これまでの研究で、RVFV-L の N 末端に存在するロイシンジッパー様モチーフ (Zip) が、L 蛋白のポリメラーゼ機能に重要であり、ウイルスゲノムとのインタラクションに関与していること、また、フレボウイルス属のウイルスに保存されたモチーフであることが示唆された。今年度は、複製機構の詳細を明らかにするため、免疫共沈降および Bi-molecular Fluorescence Complement Analysis (BiFC) 等の方法にて、L の分子間および分子内会合に Zip 領域が関与

しているか否かを調べた。ミュータントを用いた免疫共沈降では、wild type との差は認められず、Zip 分子間会合に関与していなかった。一方、ミュータントを用いた BiFC では、L 蛋白の N および C 末端領域を介した分子内会合が明らかに阻害された。以上のことから、RNA 複製には L 蛋白の N、C 末端領域を介した分子内会合が必要であり、Zip が重要な役割を果たしている事が示唆された。[新倉綾、池上徹郎<sup>1</sup>、C.J.Peters<sup>1</sup>、牧野伸治<sup>1</sup>、森川茂<sup>2</sup>、山田靖子<sup>(<sup>1</sup>テキサス大学医学部、<sup>2</sup>ウイルス1部)</sup>]

## 発表業績一覧

### I 誌上発表

#### I-1 欧文発表

- 1) Hirai A, Ohtsuka N, Ikeda T, Taniguchi R, Blau D, Nakagaki K, Suzuki MH, Ami Y, Yamada KY, Itohara S, Holmes VK and Taguchi F : Role of mouse hepatitis virus (MHV) receptor mCEACAM1 in the resistance of mice to MHV infection: Studies on mice with chimeric mCEACAM1a and 1b. Journal of Virology. 84: 6654-6666. 2010
- 2) Shirato K, Maejima M, Hirai A, Ami Y, Takeyama N, Tsuchiya K, Kusanagi K, Nunoya T and Taguchi F : Enhanced cell fusion activity in porcine epidemic diarrhea virus adapted to suckling mice. Archive of Virology. 155: 1989-1995. 2010
- 3) Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, Hasegawa H : Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. J Med Virol. 82:1754-61. 2010
- 4) Isawa H, Kuwata R, Hoshino K, Tsuda Y, Sakai K, Watanabe S, Nishimura M, Satho T, Kataoka M, Nagata N, Hasegawa H, Bando H, Yano K, Sasaki T, Kobayashi M, Mizutani T, Sawabe K : Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from Culex mosquitoes in Japan. Virus Research 55: 147-55. 2010

5) Mizutani T, Sayama Y, Nakanishi A, Ochiai H, Sakai K, Wakabayashi K, Tanaka N, Miura E, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Ono S : Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology*. 412: 179-87. 2011

6) Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T : A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes*. in press. 2011

#### I-2 邦文発表

- 1) 田口文広、平井明香：マウス肝炎ウイルス（MHV）に対する抵抗性に関する研究。LABIO 21, 42: 24-27. 2010
- 2) 山田靖子：実験動物の福祉に関する第三者評価システムに望むこと。LABIO21、42、16-18. 2010

## II 学会発表

#### II-1 国際学会

- 1) Zamoto-Niikura A, Ikegami T, Sasaki Y, Yamada YK, Morikawa S, Peters CJ, and Makino S : Importance of leucine zipper like domain of rift valley fever virus L protein for viral RNA synthesis. The 14th International Negative Strand Virus Meeting. June 2010. Brugge, Belgium.
- 2) Hirai-Yuki A, Ami Y, Yamada KY and Taguchi F. Role of mouse hepatitis virus (MHV) receptor CEACAM1b of less susceptible mouse and chimeric CEACAM1ba of resistant gene-replaced mouse to MHV infection. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep 2010. Hyogo, Japan.
- 3) Zamoto-Niikura A, Ikegami T, Yamada YK, Morikawa S, Peters CJ, and Makino S : Leucine zipper like domain of Rift Valley fever virus L protein is important for viral RNA synthesis. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep 2010. Hyogo, Japan.
- 4) Sakai K, Ike F, Ami Y, Suzaki Y, Urano T, Yabuichi K, Kurosawa T, Oka T, Katayama K, Yamada YK, Kyuwa S :

Surveillance of murine norovirus in Japan. The 4th Asian Federation of Laboratory Animal Science Association (AFLAS) Congress Meeting. Nov 2010, Taipei, China.

#### II-2 国内学会

- 1) 酒井宏治、池 郁生、浦野 徹、網 康至、平井明香、須崎百合子、岡智一郎、片山和彦、山田靖子：迅速・簡便なマウスノロウイルス抗原検出方法の開発と分離株の分子系統学的解析。第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月、京都。
- 2) 山田靖子：ヒューマンサイエンス振興財団動物実験実施施設認証。第 106 回関西実験動物研究会：動物実験第三者認証のその後、平成 22 年 6 月、大阪。
- 3) 酒井宏治、永田典代、網 康至、岩田奈織子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、西條政幸、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川 茂：カニクイザルで致死感染を起こしたイヌジステンパーウイルスの性状と実験感染サルへの病原性の解析。第 150 回日本獣医学会、平成 22 年 9 月、帯広。
- 4) 久和 茂、酒井宏治、田中志哉、北川洋大、朴 商鎮、吉川泰弘、池 郁生、浦野 徹、藪内かおり、田島 優、黒澤 努、網 康至、山田靖子：日本の実験用マウスコロニーにおけるマウスノロウイルスの感染状況。第 150 回日本獣医学会、平成 22 年 9 月、帯広。
- 5) 水谷哲也、酒井宏治、本道栄一、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川茂、前田健：コウモリから分離された新規アデノウイルスの分子学的性状決定。第 150 回日本獣医学会、平成 22 年 9 月、帯広。
- 6) 酒井宏治、田丸精治、前田 健、永田典代、網 康至、岩田奈織子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川 茂：カニクイザルで致死感染を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析。第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11 月、徳島。
- 7) 木下一美、酒井宏治、永田典代、王麗欣、伊藤（高山）睦代、中道一生、森川茂、倉根一郎、西條 政幸：リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗

体を用いた診断法の開発。第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11 月、徳島。

- 8) 水谷哲也、酒井宏治、本道栄一、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川茂、前田健：コウモリから分離された新規アデノウイルスのゲノム配列の決定および系統学的解析。第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11 月、徳島。
- 9) 新倉 綾、池上徹郎、森川 茂、山田靖子、C.J. Peters、牧野伸治：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ロイシンジッパー様モチーフの重要性。第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11 月、徳島。