

17. 動物管理室

室長 山田 靖子

概要

実験動物の動物福祉における世界的な基本原則、いわゆる3Rs (Replacement, Reduction, Refinement)が「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法)に平成17年度に明文化され、平成18年6月1日に施行の運びとなった。これに伴い、実験動物の飼養に関しては「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」が環境省より告示され、また動物実験に関しては「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」が文科省、農水省とは別に厚生労働省独自に策定された。感染研ではこれまで、実験動物管理運営規程および動物実験委員会規程に則り、動物実験施設の管理運営を行ってきたが、今回の新たな法、基準、基本指針の内容に沿うため、従来の2つの規程の上に新たに「国立感染症研究所動物実験実施規程」を作成した。平成18年度はこれら新規及び改正された法、基準、基本指針、感染研内規程を全所の関連職員等に周知する年度であった。平成19年度より改正された規程等に基づく管理運営を実行していく予定である。

動物、特に霊長類に有効な麻酔薬として、塩酸ケタミンが使用されている。塩酸ケタミンがドラッグユーザーの間で乱用されているため、厚生労働省は塩酸ケタミンを麻薬として指定した。平成19年1月1日より麻薬としての管理が必要となるため、戸山庁舎、村山庁舎の動物管理室職員それぞれ1名を麻薬研究者として東京都に登録し、厳重な管理を行うこととなった。

平成17年度に引き続き、感染研の動物実験施設の機器等の補修を行った。戸山庁舎の動物実験施設では空調機のオーバーホールのため、一部区域で2日間空調が停止し、その間の飼育装置等の対応を行った。

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及び検査に関わる研究を行った。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、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスの持続感染及びその検出に関する研究、また、マウス肝炎ウイルスの感受性におけるリセプターの役割について、及び免疫不全マウスのマウス肝炎ウイルスへの感受性について研究を進めた。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、およびガングリオシドースの治療モデルの研究を行った。重症急性呼吸器症候群(SARS)に関する研究では、各動物のウイルスリセプターについて研究が行われた。

前年度までハンセン病研究センターの動物実験施設の管理運営に動物管理室が関与していなかったが、平成18年4月1日より同センター生体防御部松岡正則室長に動物管理室に併任していただき、連携を取っていくこととなった。平成18年7月1日に平井明香研究員が着任し、平成19年1月より座本綾研究員がアメリカに長期出張となった。平成19年3月に動物飼育担当の大池正明、吉岡利夫が定年退官を迎えた。

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、講習会を開催している。平成18年7月31日までの動物実験講習会は新規に動物実験を行う研究者を対象に改正前の内容で行った。11月6日以降は前述の法、基準、基本指針、感染研内規程の改正内容を周知するため、感染研で動物実験を行うすべての職員等を対象に動物実験委員会の講習会を開催した。初回講習会では鍵山直子先生に講演をお願いし、法、基準、基本指針の内容を解説していただいた。平成18年度内に改正後の講習会を受講した人数は414名、平成18年度に申請された動物実験計画は275件であった。

動物実験委員会の講習会とは別途に、戸山・村山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19年3月31日現在、戸山庁舎350人、村山庁舎231人である。

実験動物施設利用者講習会および動物実験講習会 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)	動物実験 (全所)
4月4日	戸山	19		30
4月25日	戸山(臨時)	2		4
5月28日	戸山(臨時)			2
6月5日	戸山	7		13
7月31日	戸山	9		11
8月8日	村山		8	
8月9日	村山		3	
10月3日	戸山	3		
10月30日	村山		2	
11月6日	戸山			269
11月13日	戸山			52
12月4日	戸山	3		15
12月14日	村山			64
2月5日	戸山	8		14
合計		51 (新規)	13 (新規)	414 (改正後 受講者数)

(斜字は外国人対照講習会)

業績

調査・研究

・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。平成18年度より村山庁舎の検査項目にリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスの抗体検査を加えた。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、須崎百合子、滝本一広、田原口元子、座本 綾、平井明香、増子芳郎、大池正明、吉岡利夫、小川敏雄、山田靖子]

I-2 定期微生物検査(細菌)におけるリファレンス株の遺伝子学的検討

1969-1985年に動物管理室で分離し形態学・生化学的性状を基に同定された細菌株をリファレンス株として使用している。近年16S rRNA 遺伝子解析により細菌の分類が

再編成されそれにより同定されていることから、*Bordetella bronchiseptica* R5、*Citrobacter rodentium* 660、*Pasteurella multocida* Ku-F-2、*P. pneumotropica* MaM、MaR、*Salmonella typhimurium* KOM-30、*Streptococcus pneumoniae* 6Lおよび*S. zooepidemicus* T0H0について同遺伝子の塩基配列を調べデータベース上で比較検討した。その結果すべての株が遺伝子レベルでも従来通りに同定され、リファレンス株として適切であることが確認された。[平井明香、須崎百合子、網 康至]

・実験動物の感染症に関する研究

II-1 持続感染マウスにおけるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス汚染検査条件の検討

新生仔期にリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)を感染させて持続感染マウスを作製し、その親マウスおよび同居成熟マウスとともにELISAによる抗体検出およびRT-PCRによるウイルス遺伝子検出を行い、持続感染マウスと同居した親マウスでは同居6週目にLCMVに対する特異抗体が検出されたが、同居成熟マウスでは8週目でも検出されない場合があった。RT-PCRでは、全同居マウスで8週目にウイルス遺伝子が検出された。ELISAによるLCMV汚染検査には複数のマウスと最低6週間の同居が必要で、RT-PCRと合わせて実施することにより、より確実な検査が可能になると思われた。[滝本一広、山田靖子、森川 茂(ウイルス第一部)、池 郁生(理研BRC)]

II-2 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(a/a)はCEACAM1aを、抵抗性SJLはCEACAM1b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を検討するため、1aを1bで置き換えたC57BL/6(b/b)置換マウスを作製し、C57BL/6(a/a)および(b/b)マウスにMHV-A59を感染させ、生存率および組織中のウイルス力価を検討した。その結果、b/bマウスはa/aマウスと比べMHVに対する生存率が顕著に高く、肝、脾、脳および血液中のウイルス力価は著しく低かった。以上のことは、MHV感受性はその受容体により決定されることを示唆している。[平井明香、網 康至、山田靖子、田口文広(ウイルス第三部)]

II-3 マウス肝炎ウイルス感染におけるマスト細胞の役割の解明

MHV感染によって遺伝的にマスト細胞を欠損する

WBB6F1-W/W マウスは、そのコントロール+/+マウスと比較して致死率が高いことが明らかになった。そこで、MHV を接種後、経時的に採材し検討を行った。抗体価は、W/W* および+/+マウス共に MHV 接種後、1 週間から徐々に上昇し、両マウス間で差は認められなかった。臓器内のウイルス遺伝子の検出は、接種後 4 日では W/W* および+/+マウス共に全ての臓器および糞便でウイルスが認められ、1 週間では+/+マウスで肝臓、小腸、腎臓のみに少しだけ認められたのに対し、W/W* マウスでは全ての臓器で認められ、特に脳での検出が著しかった。+/+マウスは、脳での増加が見られなかったことにより発症せず生存したと思われる。臓器内のウイルス価は、MHV 接種後、W/W* マウスの肝臓では 4 日に検出されてから 1 週間まで、脳では 1 週間のみで増殖が認められた。+/+マウスの肝臓では 1 週間のみで増殖し、脳では全てにおいて増殖が認められなかった。

[田原口元子、山田靖子]

・モデル動物の開発

III-1 麻疹ウイルス感染モデル動物の開発と病態解析

麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、感染自己単核細胞を視床に接種したカニクイザル 2 頭について、脳内における麻疹ウイルスの持続感染について検討を行っている。うち 1 頭においては、感染後約 200 週においても、高力価の血清中麻疹ウイルス中和抗体、脳脊髄液中の麻疹ウイルス中和抗体が持続して検出され、麻疹ウイルス特異的抗原刺激が持続しているものと考えられる。麻疹ウイルス特異的抗原刺激における細胞内 γ IFN の産生 T 細胞反応は、対照サルと比較して高いが減少傾向を示している。[網 康至、須崎百合子]

III-2 低分子化合物 NOEV の GM1 ガングリオシドーシス治療効果について

培養細胞系で酵素還元効果が認められている NOEV (1mM) を飲水に混ぜて BK48 マウスに 16 週間投与し、GM1 およびアジアロ GM1 の蓄積量の変化について生化学的に調べた。投与群の GM1 は非投与群に比べ、大脳で 1.8 倍、小脳で 1.4 倍、脳幹で 1.6 倍に増加し、投与群のアシアロ GM1 は非投与群に比べ、大脳で 2.8 倍、小脳で 2 倍、脳幹で 1.6 倍に増加した。今回のマウスは投与群が 9.6 ヶ月齢、非投与群が 7.9 ヶ月齢でももとの蓄積量に差があった為、NOEV の効果を示すことができなかつたと思われる。[滝本一広、鈴木義之 (国際医療福祉大学大学院)]

・重症急性呼吸器症候群(SARS)に関する研究

IV-1 各実験動物の ACE2 に対する SARS-CoV 感受性に

ついて

アンギオテンシン変換酵素 (ACE)2 は SARS-CoV のレセプターであることが報告されている。既に報告のある動物に加え、ネコ、フェレットなどの ACE2 の配列を決定し系統樹解析を行ったところ、各動物種の ACE2 が大きく 4 つのクラスターに分かれた。ヒト、ネコ、フェレット、マウスについて ACE2 発現細胞を作成し、SARS-CoV VSV pseudotype を用いて SARS-CoV S 蛋白との親和性を調べたところ、ヒト、ネコ、フェレット、マウス、ラットの順で 24 時間後の GFP 陽性細胞数が多かった。また、SARS-CoV 感染実験でも、同様の結果が得られた。以上のことから、実験動物の SARS 感受性には違いがあり、ネコやフェレットの感受性が高いことが予想された。[座本 綾、山田靖子、福士秀悦・森川 茂(ウイルス第一部)]

発表業績一覧

・誌上発表

I-1 欧文発表

1) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. (2006) : LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. J Virol. 80:5179-88.

I-2 和文発表

- 1) 平井明香 (2006): マラセチアの菌学. ViVeD, Vol.2:199-202.
- 2) 山田靖子(2006): 動物実験と労働安全衛生: 実験動物からヒトへの感染を防御するには。実験動物と環境、14 (2)、155-162. 及び実験動物技術、41 (2)、58-62.
- 3) 山田靖子 (2007): サルの感染症について 総論。LABIO21、27、13-16.

・学会発表

II-1 国内学会

- 1) 池 郁生、青木弘良、加瀬 廣、森川 茂、滝本一広、吉木 淳、山形 豊: マウス微量血清を用いた抗体アイソタイプマイクロ流体チップによる検出。第 53 回日本実験動物学会総会、平成 18 年 5 月、神戸。
- 2) 山田靖子、小原 徹: 動物実験の現場におけるアレルギー及び人獣共通感染症について。第 53 回日本実験動物学会総会、平成 18 年 5 月、神戸。
- 3) 座本 綾、福士秀悦、田口文広、森川 茂、山田靖子: フェレット ACE2 と SARS-CoV S 蛋白質の親和性の解析。第 54 回日本ウイルス学会、平成 18 年 11 月、名古屋。

4) 山田靖子、田原口元子、座本 綾、平井明香、滝本一
広：マウス肝炎ウイルスの流行株分離の実例。第 32 回日
本実験動物技術者協会関東支部懇話会、平成 19 年 2 月、
東京。

動物管理室

(別表1)

定期的微生物モニタリング成績

病原体検査項目		検査方法	年間検査結果 (陽性数/検査数)					
			戸山庁舎			村山庁舎		
			マウス	ウサギ	モルモット	マウス	ウサギ	モルモット
サルモネラ	Salmonella spp.	培養	0/283	0/2	0/10	0/189	0/72	0/96
ティザー菌	Clostridium piliforme	血清反応	0/283	0/2	0/10	0/189	0/72	0/96
緑膿菌	Pseudomonas aeruginosa	培養	0/283	0/2	1/10	40/189	0/72	0/96
黄色ブドウ球菌	Staphylococcus aureus	培養	4/283	0/11	24/55	55/189	1/72	48/96
腸粘膜肥厚菌	Citrobacter rodentium	培養	0/283			0/189		
肺バツレラ	Pasteurella pneumotropica	培養	0/283			0/189		
ネズミコリネ菌	Corynebacterium kutscheri	培養	0/283			0/189		
肺マイコプラズマ	Mycoplasma pulmonis	培養・血清反応	0/283			0/189		
ウサギバツレラ	Pasteurella multocida	培養		0/11			0/72	
気管支敗血症菌	Bordetella bronchiseptica	培養		0/11	0/55		0/72	0/96
溶血連鎖球菌	Streptococcus zooepidemicus	培養			0/10			0/96
肺炎球菌	Streptococcus pneumoniae	培養			0/55			0/96
センダイウイルス	Sendai virus (HVJ)	血清反応	0/283	0/2	0/10	0/189	0/72	0/96
マウス肝炎ウイルス	Mouse hepatitis virus(MHV)	血清反応	0/283			0/189		
エクトメリア	Ectromelia virus	血清反応	0/106			0/78		
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス	Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	血清反応	0/106			0/48		
ジアルジア	Giardia muris	鏡検	0/283					
スピロヌクレウス (ヘキサミタ)	Spironucleus muris (Hexamita muris)	鏡検	0/283					
ネズミ盲腸蟻虫	Syphacia spp.	鏡検	0/283					
ネズミ大腸蟻虫	Aspicularis tetraptera	鏡検	0/283					
嚢尾虫	Cysticercus fasciolaris	剖検・肉眼所見	0/283					
ネズミケモチダニ	Myobia musculi	鏡検	0/283					
ラドフォルジア	Radfordia affinis	鏡検	0/283					
コクシジウム	Eimeria caviae, Eimeria spp.	鏡検		0/2	0/10			
嚢尾虫	Cysticercus pisiformis	剖検・肉眼所見		0/2				
ウサギ疥癬ダニ	Psoroptes cuniculi	鏡検		0/2				

(空欄は検査を実施していない)