

## 17. 動物管理室

室長 花木 賢一

### 概要

動物管理室は医学用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支援、受精卵・精子の凍結保存による系統維持と清浄化を行っている。また、庁舎毎に設置されている連絡協議会では、室長が動物実験施設の管理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。科学的調査・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、マウス肝炎ウイルスの病原性に関する研究、及び Tyzzer 菌の鞭毛蛋白に関する研究、モデル動物の開発研究としてムンプスウイルス感染モデル動物の開発、イヌジステンパーウイルス感受性マウスの開発、及びインターフェロン欠損コウモリ細胞株の樹立、人獣共通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 3 R (Replacement, Reduction, Refinement) が明文化され、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、感染研における動物実験の最終責任者は所長とし、動物実験の適正な実施を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が設置されている。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く年一回の自己点検評価において原案の策定、第三者機関による外部検証に際して実地調査対応を行っている。平成 27 年度は村山庁舎についてヒューマンサ

イエンス振興財団動物実験実施施設認証センターに外部検証を依頼し、平成 27 年 12 月 10 日に実地調査が行われた。そして、昨年度の戸山庁舎に続き厚労省基本指針に適合していることの認定を受けた。

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 27 年度は獣医系大学学部生を対象とした学生インターンシップ・プログラム、東京農業大学短期大学部学生の研究調査、東京大学農学部獣医学課程学生実習、JICA「ワクチン品質管理技術コース」に対応した。

人事異動として、平成 27 年 4 月 1 日に動物管理室長として花木賢一（前職：岩手医科大学医学部准教授、動物研究センター長兼任）が任用された。

### 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実験動物の飼養及び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、動物感染実験におけるバイオセーフティを解説している。また、講習会会場では実技研修を実施できないため、新規に動物実験を行う従事者に対して、実技研修に代えて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講義を行っている。平成 27 年度は継続従事者を対象とした講習会を実施しており、新規受講者と合わせた講習会参加者は 415 名であった。関連して、平成 27 年度の動物実験計画申請は 412 件であった。

動物実験委員会の講習会とは別に、各庁舎の動物実験施設ではそれぞれの利用方法と実験動物の飼養・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 28 年 3 月 31 日現在、戸山庁舎 259 人、村山庁舎 261 人、ハンセン病研究センター 25 人である。また、3 庁舎で飼養保管している動物の合計は平成 28 年 3 月 31 日現在、マウス (5,985 匹)、ラット (196 匹)、モルモット (184 匹)、ウサギ (38 羽)、スナネズミ

(9匹)、ハムスター(11匹)、フェレット(62匹)、ネコ(7匹)、霊長類(92匹)、ニワトリ(11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			動物 実験 (全所)
		施設利用 (戸山)	施設利用 (村山)	施設利用 (ハン セン)	
4月14日	戸山	21			26
6月9日	戸山	4			12
6月29日	ハンセン			1	
10月7日	戸山	12			15
10月24日	ハンセン			1	
12月31日	村山		8		
1月6日	戸山	1			
1月12日	戸山				177
1月15日	村山				124
1月28日	ハンセン				22
2月1日	ハンセン			1	
2月9日	戸山	8			36
3月10日	戸山	2			2
3月23日	戸山	1			1
3月28日	ハンセン			1	
3月31日	村山		4		
合計		49 新規	12 新規	4 新規	415 年度内

(斜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いるが、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多数認めるが、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27年度は8系統の依頼があり、受精卵・精子の凍結保存とクリーニングを実施した。(田原口元子、河合康洋、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)は病原性が低いことから、SPFの対象微生物とするか議論が続いている。多くのMNV分離株は免疫機能の正常なマウスへ接種すると、一ヶ月近くの慢性感染を引き起こす。そこで、本研究は慢性感染の*in vitro*モデルを作出することを目的として行っている。これまでに国際的標準株と位置づけられる MNV-1 と国内分離株 MNV-S7 の持続感染細胞を樹立しており、本年度は MNV-S7 持続感染細胞について性状解析を行った。培養上清中ウイルス RNA 量を定量 RT-PCR で測定すると、培養時間とウイルス RNA 量との間に高い相関を認めた。また、ウイルス RNA 量は生細胞数よりも死細胞数と高い相関を示した。電子顕微鏡解析では初感染細胞の細胞質でウイルス増殖に伴う膜様構造物を認めるが、持続感染細胞では膜様構造物を認めない代わりに細胞質でウイルス粒子の顆粒状集積を認めた。この細胞質内集積部位を同定するため、細胞内小胞マーカーとウイルス抗原に対する二重蛍光抗体法を行った持続感染細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、ウイルス粒子は後期エンドソームに集積していることが明らかになった。

[花木賢一、滝本一広、網 康至、石山絵里<sup>1</sup>、石田欣二<sup>1</sup>(<sup>1</sup>岩手医科大学)]

### 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 は、マウスへの感染実験により病原性の著しい相違が明らかになっている。そして、臓器別によるウイルス増殖を経時的に採取した感染マウスの肝臓、脳、及び大腸で調べると、MHV2 が MHV-2f よりウイルス価(PFU)が  $10^3$  から  $10^5$  以上高かった。特に、MHV2 を  $10^4$  PFU 接種したマウスでは2日目から5日目まで感染価が上昇傾向にあり、さらに  $10^7$  PFU 接種したマウスでは1日目から人道的エンドポイントに至るまで高い感染価を示した。

(田原口元子、新倉 綾、花木賢一)

### 3. Tyzzer 菌 (*Clostridium piliforme*) の組換え鞭毛蛋

## 白の発現

Tyzzter 菌鞭毛蛋白の塩基配列について再検討するため、遺伝子情報の少ない Tyzzter 菌の全ゲノム塩基配列の解読を試みた。Tyzzter 菌 (RT 株) をラット肝癌由来 H4IIE 細胞で大量培養し、ゲノム DNA を抽出して次世代シーケンサーによりゲノム情報を得た。しかし、この抽出 DNA には H4IIE 細胞由来の DNA も含まれていることが判明した。そこで、細胞由来の DNA を除去した上で、再度シーケンス解析を行うこととし、ゲノム DNA の調製を進めている。

(滝本一広)

## III モデル動物の開発

1. ムンプスウイルス感染モデル動物の開発と病態解析  
カニクイザルにムンプスウイルスのワクチン株と野外株をそれぞれ皮下接種し、末梢血リンパ球数と血中アマミラーゼの変動を解析した。いずれの株を接種した場合でも、接種3週後に末梢血リンパ球数の減少を認めた。また、血中アマミラーゼは接種後4日から14日に上昇する個体を認めた。野外株接種群で早期に上昇する傾向があった。しかし、有意な差は認められなかった。この結果は、カニクイザルへの皮下接種では、ムンプスウイルス株間の病原性差を検出することが困難であることを示唆している。

[網 康至、須崎百合子、木所 稔<sup>1</sup> (1ウイルス第3部) ]

2. イヌジステンパーウイルス感染症モデルマウスの開発

イヌジステンパーウイルス (CDV) は野生動物を中心に蔓延しており、マカク属サルにまで宿主域を拡大している。CDV は血球系細胞に発現する SLAM を介して感染、増殖し、血流を介して呼吸器・消化器・皮膚の上皮細胞へ到達し、上皮細胞に発現する Nectin4 を介して感染、さらには中枢神経のグリア細胞や神経細胞へも感染する。しかし、CDV の病原性解明において重要な役割を担うことが期待される CDV 感受性マウスは存在しない。そこで、本研究では CDV が感染、発症するモデルマウスの作製を目指している。昨年度までにカニクイザル SLAM Knock-in と Nectin4 TG マウス作製のための相同組換え ES 細胞を樹立した。しかし、それら ES 細胞を用いる方法では目的とするマウスの作出が困難であった。そこで、新たに遺伝子編集技術 (CRISPR/Cas9 システム) を用いた作出方法を試みている。

[河合康洋、森川 茂<sup>1</sup>、阪井弘治<sup>2</sup> (1獣医科学部、<sup>2</sup>エイズ研究センター) ]

3. インターフェロン関連遺伝子欠損コウモリ細胞株樹立

コウモリ類は多くのウイルスの自然宿主であり、近年、未知/既知ウイルスの探索を目的としたコウモリのサーベイランスが世界各国で行われている。しかし、ウイルス遺伝子や抗体が検出される検体であっても、ウイルスそのものが分離できる事例は少ない。そこで、本研究ではコウモリ由来細胞から抗ウイルス応答に重要な IFN 産生に関わる自然免疫関連遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトすることにより、効率的にコウモリ由来ウイルスが分離できる細胞株の樹立を試みた。そして、ヤエヤマオコウモリ由来細胞株から Myd88 遺伝子を欠損した細胞株を樹立した。この細胞株は Myd88 遺伝子欠損により IFN 産生が低下していること、pseudotype ウイルスの感染効率が增加することを確認した。今後、様々なコウモリ由来ウイルスを用いて樹立した細胞株の評価を行っていく予定である。

[河合康洋、加来義浩<sup>1</sup> (1獣医科学部) ]

## IV. 人獣共通感染症に関する研究

1. ヒトバベシア症に関する研究

*Babesia divergens* は欧州のウシやヒトのバベシア症の原因原虫である。その近縁種は米国で死亡者を出す新興感染症の病原体として知られている。我々は欧州種と米国種に類似した *B. divergens* 遺伝子が日本のシカから検出されることを報告している。本研究では我が国における *B. divergens* の感染状況を詳細に把握するため、2012~2015年に19道府県で捕獲された日本シカの血液を検体として *B. divergens* 特異的 PCR を実施した。合計844頭の内73検体 (8.6%) から *B. divergens* 遺伝子を検出した。陽性率の最も高かったのは北海道の48%であった。また、岩手、宮城、栃木、群馬、山梨、長野、岐阜、静岡、滋賀で捕獲されたシカが *B. divergens* 遺伝子陽性であった。残る青森 (N=1)、福島 (4)、三重 (44)、和歌山 (35)、京都 (46)、兵庫 (55)、鳥取 (18)、島根 (62)、福岡 (27) で捕獲されたシカは陰性であった。日本では本原虫によるバベシア症患者の報告はないが、近年、新型原虫によるヒトバベシア症の発生が続いている。そのため、本原虫については注意深く監視していく必要がある。[新倉 綾、森川 茂<sup>1</sup>、平田晴之<sup>2</sup>、石原智明<sup>2</sup>、花木賢一 (1獣医科学部、<sup>2</sup>酪農学園大学) ]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Saito S, Ainai A, Suzuki T, Harada N, Ami Y, Yuki Y, Takeyama H, Kiyono H, Tsukada H, Hasegawa H. The effect of mucoadhesive excipient on the nasal retention time of and the antibody responses induced by an intranasal influenza vaccine. *Vaccine* 34:1201-7. 2016
  - 2) Li TC, Yoshizaki S, Yang T, Kataoka M, Nakamura T, Ami Y, Yuriko S, Takeda N, Wakita T. Production of infectious ferret hepatitis E virus in a human hepatocarcinoma cell line PLC/PRF/5. *Virus Res.* 213:283-8. 2016
  - 3) Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Kishida N, Shirakura M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Ferret hepatitis E virus infection induces acute hepatitis and persistent infection in ferrets. *Vet Microbiol.* 183:30-6. 2016
  - 4) Kataoka C, Suzuki T, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ami Y, Wakita T, Nishimura Y, Shimizu H. The Role of VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 in Viral Fitness and Pathogenesis in a Cynomolgus Monkey Model. *PLoS Pathog.* 11:e1005033. 2015
  - 5) Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Haga K, Nakamura T, Ochiai S, Takaji W, John R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 96:1320-7. 2015
  - 6) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A mutant H3N2 influenza virus uses an alternative activation mechanism in TMPRSS2 knockout mice by loss of an oligosaccharide in the hemagglutinin stalk region. *J Virol.* 89:5154-8. 2015
  - 7) Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yang T, Takeda N, Takaji W. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. *Intervirology* 58:139-42. 2015
  - 8) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Qiang W, Hirata H, Nakajima R, Morikawa S, Holman PJ, Ishihara C. Survey and Molecular Analysis of *Babesia microti* Group Parasites in Japan: Strategy and Surveying for Identification of Tick Vectors. In: *Epidemiology II - Theory, Research and Practice*. iConcept Press, ed. Hong Kong. 2015
  - 9) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the Treatment of Infections with Lethal Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *mSphere.* 1:pii: e00061-15, 2016
2. 和文発表
- 1) 河合康洋 : ゲノム編集技術の現状と可能性. *動物遺伝育種研究* 44: 23-34, 2016
- II. 学会発表
1. 国際学会
    - 1) Aya Zamoto-Niikura. Epidemiological survey and molecular analysis of *Babesia divergens* in Japan. *Veterinary Pathobiology Seminar Series in Texas A&M University. Texas, USA, January 2016*
  2. 国内学会
    - 1) 花木賢一、大岡静衣、松浦絵里、小笠原勝利、花坂智人、石田欣二、平野紀夫 : マウスノロウイルス持続感染細胞におけるウイルス粒子の分布. 第 62 回 日本実験動物学会総会. 平成 27 年 5 月. 京都.
    - 2) 新倉(座本)綾、今岡浩一、森川 茂、萩原克郎、加藤(森)ゆうこ、平田晴之、石原智明、花木賢一 : 全国の日本シカにおける *Babesia divergens* 感染状況調査. 第 158 回 日本獣医学会学術集会. 平成 27 年 9 月. 青森.