

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に指定された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ティザー(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を用いた研究、動物由来感染症に関する研究としてマダニ媒介性・動物由来感染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(動物愛護管理法)」の第 41 条に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現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て照会があった場合)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、令和元年度は JICA-NIHE プロジェクト本邦研修、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。新規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。継続講習会では令和元年 6 月 12 日に改正された動物愛護管理法に関する解説、動物実験の国際的動向、動物実験計画書の作成の注意点等を解説している。令和元年度新規講習受講者は 63 名、継続講習受講者は 396 名、新規動物実験計画書の承認は 435 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。令和 2 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 256 人、村山庁舎 295 人、ハンセン病研究センター 34 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(8,336 匹)、ラット(61 匹)、モルモット(51 匹)、ウサギ(71 羽)、スナネズミ(10 匹)、ハムスター(14 匹)、フェレット(41 匹)、ネコ(4 匹)、霊長類(122 頭)、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(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2日	村山				1
4月9日	村山		1		
4月11日	戸山	10			14
4月18日	村山		2		
5月20日	ハン セン			1	
5月24日	村山				1
6月3日	戸山	15			16
8月8日	戸山	5			8
10月11日	戸山	7			7
12月24日	戸山	3			
12月27日	村山		3		
2月3日	戸山	6			13
2月4日	村山		1		
2月7日	3庁舎				350
2月12日	戸・村				21
2月18-26 日	DVD				12
3月6-31日	DVD				13
3月30日	戸山	3			3
3月31日	村山		3		
合計		49	10	1	459

(斜体文字は外国人対象講習会;開催場所欄の「DVD」はメディア貸出による自習;動物実験欄の下線付き数字は継続講習会)

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(座本)綾、田原口元子、結城(平井)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。令和元年(平成31年)度は12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]

II. 動物福祉に関する研究

1. 体温に基づく人道的エンドポイント設定に関する研究

マウスにおける体温を指標とする新たな人道的エンドポイントの設定を目的として、ヒト用非接触赤外線体温計測定によるマウス体温の検討を行った。マウスは国家検定・検査で多く用いられている ddY を用いた。使用した2機種の赤外線体温計の測定精度には差がなかったが、操作性の違いにより1機種を選定した。測定部位の検討として、剃毛した背部皮膚、尾部、耳の3箇所を直腸温度と比較した。その結果、剃毛した背部皮膚の温度が直腸温度に近い値を示し、生理食塩水(37℃)の腹腔内投与後の温度もほぼ同じ推移を示した。一方、尾部と耳の温度では直腸温度と乖離していた。以上のことから赤外線体温計によるマウス体温の測定部位は、剃毛した背部皮膚が適していると判断された。エタノール誘導低体温による体温推移では、先行文献と異なり背部皮膚温度と直腸温度に乖離が見られたが、高い相関性($R^2=0.85$)を認めた。[田原口元子、花木賢一]

III. 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(MuLV)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 MuLV 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るのではないかと考えた。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いた内在性 MuLV を不活化した RAW264.7 細胞の作成を進めている。昨年度決定した RAW264.7 細胞由来 MuLV の gag 遺伝子と

pol 遺伝子の塩基配列を基に、ガイド RNA デザイン WEB ツール:CHOPCHOPとCRISPRdirectによりそれら遺伝子を標的としたガイド RNA の配列(4箇所)を設計した。そして、Guide-it CRISPR/Cas9 システムを用いて当該配列をプラスミドベクターにクローニングした。[滝本一広、田原口元子、花木賢一;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。過去にTyzzer菌汚染のあった2つの動物実験施設のラット血清(53例)についてELISAでの反応性を調べたところ、48例は間接蛍光抗体法(IFA)の結果と一致した(40例:+, 8例:-)。しかし、5例はIFAで陰性にも関わらず陽性を示した。また、これらのラット血清は陰性抗原への反応がなく、非特異反応を検出できなかった。そのため、組換え蛋白の精製あるいは陰性抗原の作製方法について再検討する必要性が示唆された。[滝本一広;鳥越大輔(熊本大学);三好一郎(東北大学)]

3. *Clostridium spiroforme*感染ラット血清のTyzzer菌抗原に対する反応性について

ラット血清のTyzzer菌抗原に対する非特異反応の原因として、*Clostridium spiroforme* の感染が疑われた。そこで、*C. spiroforme* の感染ラット血清を作製し、ELISAにおける反応を検討した。PBSで3回洗浄した*C. spiroforme*を抗原としたELISAでは、*C. spiroforme*感染血清のみが強い反応を示した。一方、市販のTyzzer菌検出ELISAキットでは、*C. spiroforme*感染血清はほとんど反応を示さなかった。これらの結果により*C. spiroforme*感染がTyzzer菌抗原に対する非特異反応の原因である可能性は低いことが示唆された。[滝本一広]

IV. 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

新規ムンプスウイルスワクチンの安全性評価のための動物モデル作成を目的として、カニクイザルを用いて種々の感染経路での病態解析を行った。2頭のカニクイザルにムンプスウイルス野生株であるOdate株 10^6 PFUを経口・経鼻接種し、経時的に採血を行い、末梢血中リンパ球数、血清中LDH、アミラーゼ、リパーゼの変動について解析を行った。2頭について、感染10日から感染4週後に血清中アミラーゼの有意な上昇を認め、感染6週から9週後に再び上昇が観察された。1頭につ

いては感染10日から感染4週後の血清中アミラーゼの上昇に一致して、血清中リパーゼの有意な上昇が観察された。これらはムンプスウイルスがカニクイザルの唾液腺及び脾臓に感染した結果と考えられ、ワクチン株のこれら臓器への感染、すなわち副反応を検出可能なことを意味する。現行ワクチン株の皮下接種においても血清中アミラーゼの上昇が接種後1週から10日後に観察されるが、経口・経鼻接種の方がより感受性が高く、その評価方法として優れていると考えられる。[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

(1) 腸管からの経口感染性肝炎ウイルスの侵入を制御する自然免疫応答を明らかにすることを目的として、経口感染モデルの作出を試みている。IFN受容体欠損マウスにHAVを経口投与したところ感染が成立した。腸管でのHAV複製、病態および免疫応答について解析を進めている。

(2) 細胞培養実験においてHAV複製を抑制することを見出した治療候補薬剤について、マウスモデルを用いて生体レベルでの抗ウイルス効果を調べている。HAV感染マウスに投与したところ、投与期間中におけるウイルス複製抑制効果が認められたことから、有効な抗HAV治療薬となり得ると期待される。[結城(平井)明香、田原口元子、花木賢一;松田麻未、鈴木亮介(ウイルス第二部);山根大典(東京都医学総合研究所)]

V. 動物由来感染症に関する研究

1. マダニ媒介性・動物由来感染症の野外調査

利尻島において、植生上のマダニを回収し、マダニ種および保有病原体の検出を行った。調査した37検体からPCRおよびゲノムシーケンス解析により、*Piroplasmida* sp., *Borrelia bavariensis*, *B. garinii*, *Rickettsia helvetica*, *R. tarasevichiae* が検出された。今回の調査ではヒトバベシア症病原体は検出されなかったが、ライム病を引き起こすボレリアやリケッチア症病原体が確認されたことは、それら感染者の発生が懸念される。また、北海道本島ではほとんど見られない北方系のマダニ(パブロフスキーマダニ)が利尻島では主要種であったことから、渡り鳥が多数飛来する利尻島が、ロシア-日本のマダニや病原体の往来に関与している可能性が示唆された。[新倉(座本)綾、花木賢一;安藤秀二(ウイルス第一部);川端寛樹、大久保(佐藤)梢(細菌第一部);佐藤雅彦(利尻町立博物館)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Yamane D, Feng H, Rivera-Serrano EE, Selitsky SR, Hirai-Yuki A, Das A, McKnight KL, Misumi I, Hensley L, Lovell W, González-López O, Suzuki R, Matsuda M, Nakanishi H, Ohto-Nakanishi T, Hishiki T, Wauthier E, Oikawa T, Morita K, Reid LM, Sethupathy P, Kohara M, Whitmire JK, Lemon SM .Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses. *Nature Microbiology*. 4(7):1096–1104. 2019
 - 2) Tian D, Uda A, Ami Y, Hotta A, Park ES, Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Yamada A, Hirayama K, Miura K, Koyama Y, Azaki M, Morikawa S. Protective effects of the *Francisella tularensis* ΔpdpC mutant against its virulent parental strain SCHU P9 in *Cynomolgus macaques*. *Sci Rep*. 9:9193. 2019
 - 3) Zhang W, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Muramatsu M, Li TC. High Prevalence of Hepatitis E Virus Infection in Imported *Cynomolgus* Monkeys in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 72(6):429–431. 2019
 - 4) Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Watanabe S, Kurosu T, Kataoka M, Okutani A, Kimura M, Imaoka K, Hanaki K, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda K, Morikawa S. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Phlebovirus causes lethal viral hemorrhagic fever in cats. *Sci Rep*. 9:11990. 2019
 - 5) Zhang W, Kataoka M, Doan HY, Ami Y, Suzaki Y, Takeda N, Muramatsu M, Li TC. Characterization of a Novel Simian Sapelovirus Isolated from a *Cynomolgus* Monkey using PLC/PRF/5 Cells. *Sci Rep*. 9:20221. 2019
 - 6) Zamoto-Niikura A, Hagiwara K, Imaoka K, Morikawa S, Ishihara C, Hanaki KI. Epidemiological Survey of *Babesia divergens* Asia Lineage in Wild Sika Deer (*Cervus nippon*) by Using Direct PCR in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 73(1):68–71, 2020 [Advance publication]
- 1) 滝本一広、田原口元子、網康至、花木賢一:ティザー (Tyzzar) 菌の組換え鞭毛蛋白を用いた ELISA 法による抗体検出、第 66 回日本実験動物学会総会、2019 年 5 月、福岡
 - 2) 田原口元子、滝本一広、寺原和孝、岩淵龍太郎、花木賢一: NOJ マウスから検出された *Pasteurella pneumotropica* の病原性について、第 66 回日本実験動物学会総会、2019 年 5 月、福岡
 - 3) 花木賢一、石山絵里、花坂智人、滝本一広、田原口元子、森一泰、石田欣二:マウスノロウイルス持続感染細胞のイメージング解析、第 66 回日本実験動物学会総会、2019 年 5 月、福岡
 - 4) 新倉(座本)綾、佐藤雅彦、川端寛樹、大久保(佐藤)梢、安藤秀二、石原智明、花木賢一:利尻島におけるマダニ相と保有病原体の調査、第 162 回日本獣医学会学術集会、2019 年 10 月、つくば
 - 5) 河合康洋、滝本一広、原田俊彦、篠原克明、福士秀悦:感染実験後の動物屠体の高圧蒸気滅菌機を用いた滅菌条件の検証について、第 19 回日本バイオセーフティ学会 総会・学術集会、2019 年 11 月、東京
 - 6) Daisuke Yamane, Asuka Hirai-Yuki, Michinori Kohara, and Stanley M. Lemon:RARRES3 mediates interferon regulatory factor 1-induced suppression of hepatitis A virus replication through modulation of the mTOR activity、第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 11 月、東京

2. 邦文発表

- 1) 新倉(座本)綾、佐藤雅彦、川端寛樹、大久保(佐藤)梢、安藤秀二、石原智明、花木賢一:利尻島におけるマダニ相と保有病原体の調査、利尻研究 39: 41–46, 2020.

II. 学会発表

1. 国際学会

2. 国内学会