

ツメガエル

協力：Xenopus Community in Japan (XCIJ), 広島大学理学研究科附属両生類研究施設

I. 動物の特性と拡散防止措置の概要

(1) 遺伝子組換え体の拡散防止に関するツメガエルの特性

両生類では現在、アフリカツメガエルとネッタイツメガエルが DNA 組換え実験に主に使われている。ツメガエルの幼生や成体は共に水棲であり、成体は長時間、陸上で乾燥に耐える事はできない。交配はオスがメスを抱くという抱接の形式をとり、受精は放卵と放精が同時に起きて成立する。20度以上30度以下の環境下で生存しているネッタイツメガエルが逃亡後、日本で越冬できる可能性は非常に低い。しかし、アフリカツメガエルも DNA 組換え実験に使用されているので、逃亡できないように拡散防止措置を考える必要がある。ツメガエルの幼生に関しては淡水魚に類似した拡散防止措置を、成体に関してはマウス等に準じた拡散防止措置をとれば十分であると考えられる。もし、他の遺伝子組換え両生類を使用する場合は、その種の動物特性を十分考慮した拡散防止措置が別途必要である。

(2) 遺伝子組換えツメガエルのリスク

① 精子のリスク

精子は飼育水下で 60 分以内に完全に動きを止めるし、動き回れるのは最初の数分のみである。排水溝からの精子を介しての拡散はほとんどありえない。ただし、高塩濃度溶液下では数時間、受精能を保持できるので注意を要する(高塩濃度溶液で飼育することはありえない。)

② 卵のリスク

卵子は 1.5 時間以上、飼育水下で受精能を保持できない。排水溝からの卵子を介しての拡散はほとんどありえない。ただし、高塩濃度溶液下では数時間、受精能を保持できるので注意を要する(高塩濃度溶液で飼育することはありえない。)

③ 受精卵のリスク

受精卵による拡散は精子や卵子より現実性がある。

④ 幼生のリスク

幼生の表皮は2-3層の細胞からなる、脆弱な構造であり、機械的刺激で容易に傷がつく。

そのため宅急便等の輸送でも死ぬ事が多い。それでも排水溝からの拡散に注意する。

⑤成体のリスク

ツメガエルは水棲であり、乾燥状態に弱い。万が一、飼育槽から逃亡したとしても水無しで2-3日以上生きながえる事は難しい。

(3) 拡散防止措置の概要

ツメガエルの幼生や成体は水棲とはいえ逃亡の可能性がゼロではないので、飼育室・実験室では扉や窓を必ず閉めておき、流しなどに開口部があればメッシュやフィルターでふさいでおくなど、幼生、成体が逃亡できないような構造にしておくことが必要である。飼育槽に排水口、床に排水溝がある場合は、メッシュやフィルターをかける。実験後の遺伝子組換えカエルは安楽死させてから廃棄する。ただし、生存可能な小型卵を産卵するとか、淡水中で長期間授精可能な精子を作るとか、淡水中で長期間受精可能な未受精卵を生むことができる等、卵膜や生殖系の生物特性等が変わった遺伝子組換えカエルであれば、再検討が必要である。

なお、本マニュアルにおける例示は遺伝子組換えツメガエルの P1A の拡散防止措置を対象とする。したがって、遺伝子組換えウイルス等の微生物接種を含む P1A、P2A および P3A 以上の拡散防止措置が必要な実験においては、それに対応した適切な拡散防止措置の要件が必要とされるため、本マニュアルとは別途検討する。さらに、実験計画において拡散防止措置が不明である場合には大臣確認申請を行う必要がある。

II. 拡散防止措置の要件

1. 施設等の要件(ハード要件)

[遺伝子組換えツメガエルの飼育]

P1A

(1) 受精卵、初期胚、幼生の飼育

両生類の精子は飼育水中で数分間は動き回り、60 分以内に完全に動きを止める。成熟卵も排卵後 1.5 時間で受精能を無くす。交配に用いた飼育水は一晩、放置後に受精卵や胚が死んでいることを確認して処分する。次亜塩素酸処理(最終濃度 0.02%、2 時間以上)してから廃棄しても良い。幼生は水中でしか生存できず、排水路以外の逃亡の可能性は極めて低い。

①飼育室・実験室

- ・ 扉と窓が閉鎖された部屋であること。

②排水系、飼育水処理

- ・ 排水系(流しや排水溝)に逃亡防止用のトラップ(メッシュやフィルター等)が設置される必要がある。卵を捕そくする大きさのメッシュを用いる。孔径 0.5 mm 以下のメッシュであれば、問題無い(アフリカツメガエルより小さいネッタイツメガエルの卵の大きさは 1 mm)。ただし、卵の大きさに影響を与える可能性のある遺伝子を導入した場合は、メッシュの孔径を検討する必要がある。
- ・ 卵の入った飼育水は一晩置いてから死んでいることを確認して捨て、更に、排水口でトラップされた卵を冷凍し、処分する。別法として、次亜塩素酸処理(最終濃度 0.02%、2 時間以上)してから廃棄しても良い。幼生の飼育水は幼生のない事を確認してから、トラップがある排水溝を通して廃棄する。トラップ、メッシュ、フィルターは定期的に点検する。

③飼育容器

- ・ 水槽もしくはそれに準じた容器でも良い。

④ふん尿処理設備

- ・ 飼育水からふん尿を回収することができないので、飼育水と同様に処理する。また、廃水はできるだけ化学処理される排水溝に流すことが望ましい。

⑤オートクレーブ

- ・ 飼育室・実験室に設置することが望ましい。異なる場所に設置する場合は遺伝子組換えツメガエルが逃亡しないような容器に入れて持ち運ぶこと。麻酔薬、冷凍処理等によって遺伝子組換えガエルを死滅させる場合はオートクレーブする必要性は無い。

(2) 成体の飼育

水棲のツメガエルが野外に逃亡する危険性は高くないが、指定された実験室において飼育容器を用いた拡散防止措置で飼育すること。

① 飼育室・実験室

- ・ 閉鎖された部屋であり、出入りに逃亡防止用のネズミ返し(カエル返し:15cm 以上の高さが必要)が、設置される必要がある。

② 排水系・排水溝、飼育水処理

- ・ 排水系(流しや排水溝)にトラップが設置される必要がある。
- ・ 飼育水は、一晩、放置後に幼生がいないことを確認して、孔径 0.5mm のメッシュを排水系に設置して処分する。卵の大きさに影響を与える可能性のある遺伝子を導入した場合は、メッシュの孔径を検討する必要がある。次亜塩素酸処理(最終濃度 0.02%、2 時間以上)してから廃棄しても良い。トラップ、メッシュ、フィルターは定期的に点検する。

③ 飼育容器

- ・ 蓋付きの飼育槽(図 2)で成体を飼育する。

④ ふん尿処理設備

- ・ 遺伝子組換えツメガエルの飼育で生じるふん尿や飼育水を介して組換え体が拡散するリスクはないので、特別な設備は必要としない。

⑤ オートクレーブ

- ・ 飼育室・実験室に設置することが望ましい。異なる場所に設置する場合は遺伝子組換えツメガエルが逃亡しないような容器に入れて持ち運ぶこと。麻酔薬、冷凍処理等によって遺伝子組換えガエルを死滅させる場合はオートクレーブする必要性は無い。

2. 実施上の遵守事項(ソフト要件)

[遺伝子組換えツメカエルの飼育]

P1A

① P1 レベルの実施上の遵守事項

- ② 遺伝子組換えツメガエルまたは幼生が不要になった場合は、安楽死させた後に処分する。例えば、MS222 (Tricaine Methanesulfonate) を、0.05%麻酔用、0.2%安楽死用として使用できる。

麻酔の場合は、その後冷凍処理によって完全に凍らせれば死滅させることができる。

- ③ 遺伝子組換えガエルまたは幼生が飼育中であることを示す表示を飼育容器に付けることが望ましい。また、飼育容器には、必ず種類ごとに識別できる表示を行うこと。
- ④ 遺伝子組換えガエルまたは幼生の飼育中は、(必要に応じて)個体数を確認し、記録しておくこと。
- ⑤ 実験室入り口に「組換え動物等飼育中」を表示する。
- ⑥ 受精卵、初期胚に関しては、飼育水のフィルター処理の代わりに次亜塩素酸処理(最終濃度0.02%、2時間以上)で済ませることができる。

3. その他

保管

容器の外側の見えやすい箇所に遺伝子組換えカエルの精子であることを表示すること。

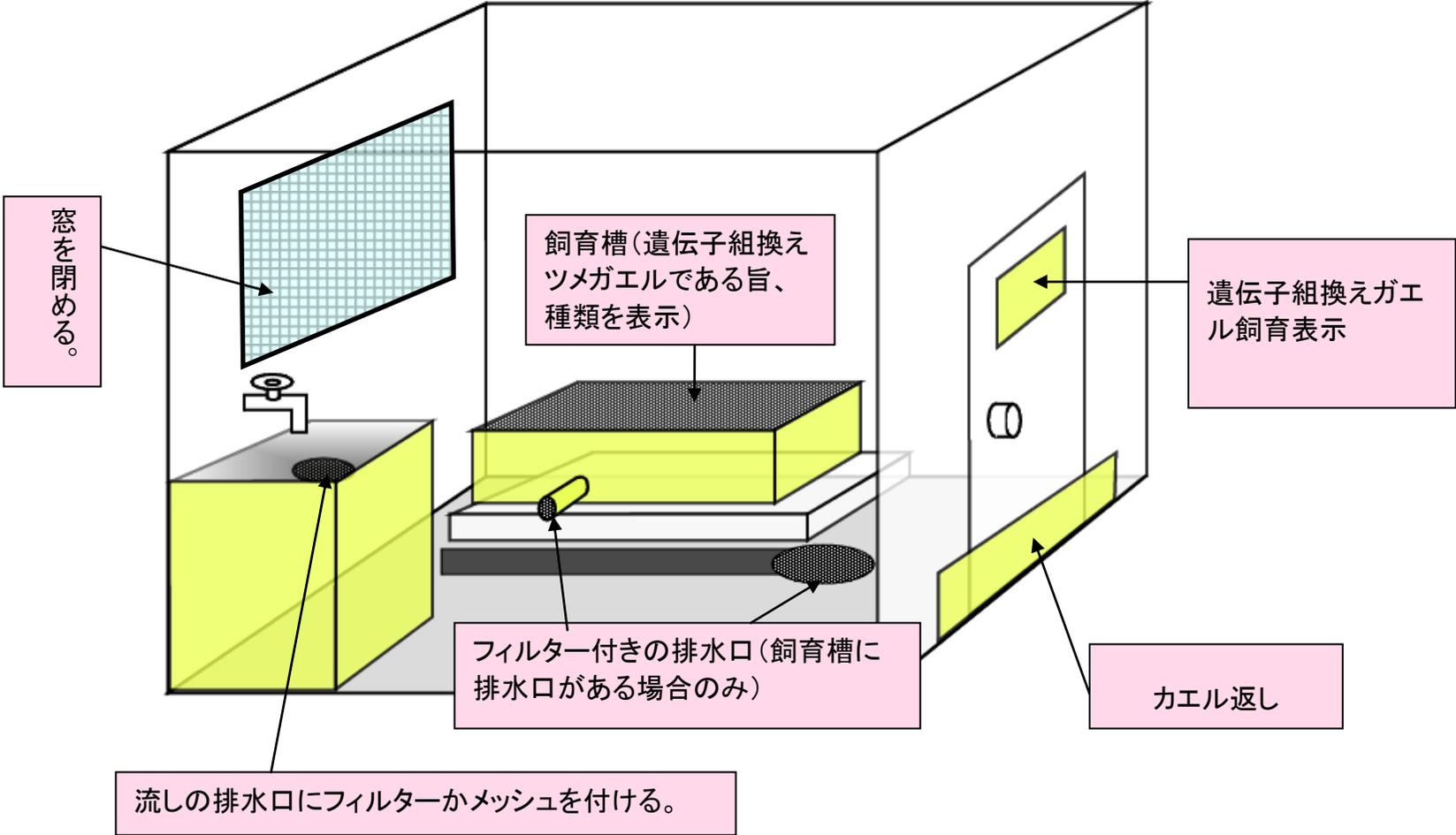
精子を冷凍保存する場合は冷凍保存する冷凍庫もしくは液体窒素タンクに遺伝子組換えカエルの精子が冷凍保存されていることを明記すること。

精子の冷凍保存の貯蔵・使用記録をつけること。

運搬

- ・ 遺伝子組換えツメガエルの運搬を行う際には、受け渡し簿への記録および管理を行い、組換え体の情報提供書を添付すること。
- ・ 輸送中にカエルが逃亡できず、かつ容易に破損しない構造の容器に入れて輸送する。なお、輸送中の容器の破損を防ぐための措置をとること。(例えば、カエルを密封されたビニール袋の中に入れて、それを発砲スチロール等の箱に詰める等の措置をとる。)
- ・ 最も外側の容器の見えやすい箇所に、取扱に注意を要する旨を表示すること。

遺伝子組換えツメガエルの拡散防止措置のイメージ

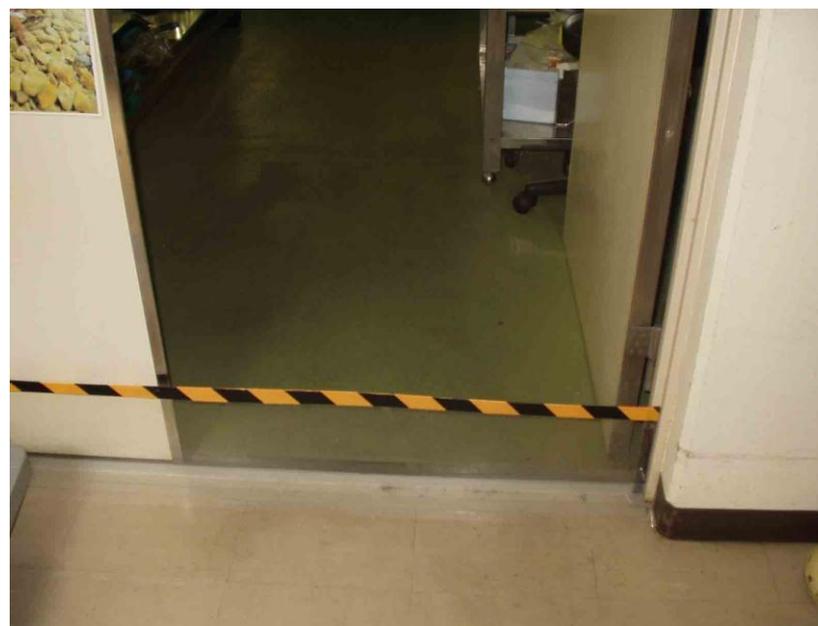


参考

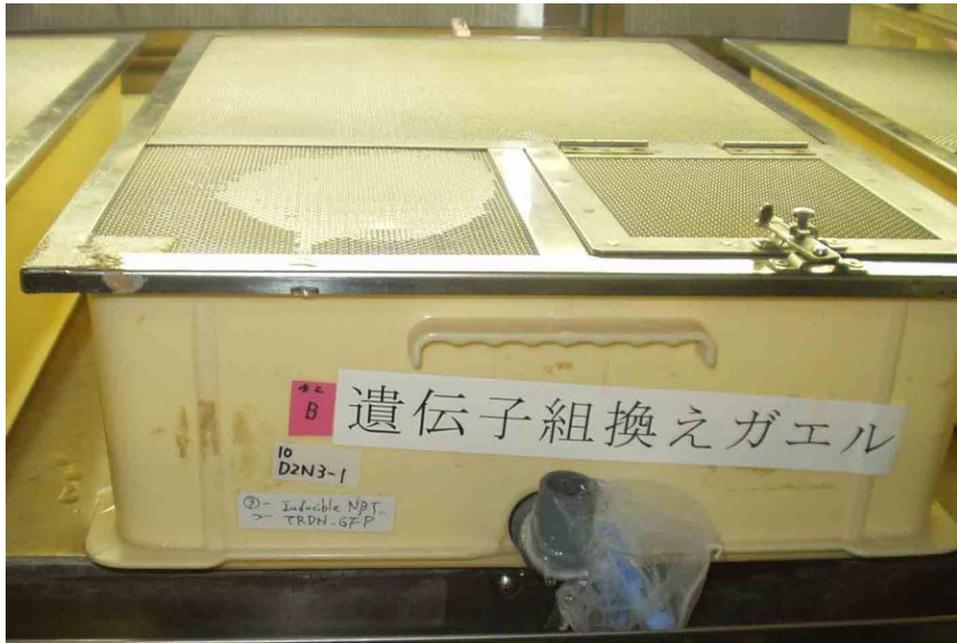
遺伝子組換えツメガエルの飼育例
(広島大学大学院理学研究科
附属両生類研究所)



飼育室の扉



カエル返し



飼育槽



使用済み飼育水の入れ物



運搬のための梱包

(ビニール袋に密封して発砲スチロールの箱に詰める。)