

## ニワトリ・ウズラなど

協力: 広島大学大学院・生物圏科学研究科・教授・堀内浩幸 先生

名古屋大学大学院生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センター・教授・  
松田洋一 先生

### I. 拡散防止措置の概要

#### (1) ニワトリ、ウズラの特性とリスク

鳥類で実験動物として汎用されるものは、家禽化されたニワトリおよびウズラであり、いずれも飛翔力が弱いので、これらは基本的に同一の拡散防止措置の方法をとれば良い。なおその取扱については、実験動物の取扱として各省庁(環境省, 文部科学省, 厚生労働省, 農林水産省)から出されている指針ならびに法律を遵守し(参考: [http:// http://www.jalas.jp/gakkai/edu\\_law.html](http://www.jalas.jp/gakkai/edu_law.html) (社)日本実験動物学会), 各研究機関が定める規則に従う必要がある。

#### ① 受精卵

ニワトリおよびウズラの受精卵は、貯卵が可能であり、18-30℃で 3 日間、16-17℃で 4-7 日間、10-12℃で一週間以上保存できる(胚が生存可能)。またこれらの受精卵は、孵卵温度 37.6-37.8℃, 湿度 60%の条件下で、それぞれ 21 日(ニワトリ)及び 16-18 日(ウズラ)で孵化する。ただし、静置状態で孵卵した場合、卵黄が卵殻膜に癒着してしまい、胚発生が停止し、孵化することができない。そこで、数時間置きに転卵(受精卵を回す操作, 一般的に孵卵器には自動転卵装置が付属している)しなければならず、放置状態で孵化することはない。

#### ② 受精卵胚

受精卵胚は、体内で受精後、3 時間後に 1 細胞期になる。その後、卵管内を移動しながら、盤割を続け、約 25 時間後には体外に排出される。このとき、胚を形成する細胞は約 6 万個に達しており、胚盤葉上層(エピブラスト)を形成している。ニワトリ胚は、全胚培養システム(Nature 331: 70-72, 1988)により1細胞期の胚から体外で卵殻

を用いた培養が可能であり、胚操作を施した後、孵化まで発生を進めることができる。ただし、この場合も受精卵と同様、転卵が必要であり、また普通の受精卵を孵卵する場合よりも管理が難しく、放置状態で孵化することはない。

### ③ヒナ

ニワトリでは、孵化1-40日齢までを幼雛(期間は系統などによりばらつきがある)と呼び、平飼いのバタリ-育雛器で飼育される場合が多い。ウズラでは、10日齢頃までバタリ-育雛器で飼育される場合が多い。ヒナはまだ体温調節がうまくできないため、どちらも孵化後4日間程度は38℃前後の高い温度で飼育し、徐々に飼育温度を下げしていく。この時期に育雛器外にでてしまった幼雛は、気温が低い場合は死亡するが、気温が高い状態が続くようであれば生存する可能性がある。

ニワトリでは孵化40-100日齢までを中雛(期間は系統などによりばらつきがある)と呼び、バタリ-育雛器からケージへ飼育場所を移行する。ウズラでは11日齢頃から30日齢頃まで徐々に飼育温度を下げしていく。31日齢頃以降は、ケージ飼育も可能になる。ニワトリもウズラもこの時期の飼育温度は25℃前後となり、逃亡により野生化することもあり得る。

### ④成鳥

ニワトリでは孵化100日齢以降を大雛(期間は系統などによりばらつきがある)と呼び、この期間を経て、成鶏となる。品種や系統によっても異なるが、4ヶ月齢から6ヶ月齢で性成熟する。ウズラでは40-50日齢で性成熟する。いずれも雌雄管理を行えば自然交配をすることはない。ただし、逃亡により野生化することもあり得る。

### ⑤ふん尿

鳥類は、直腸・排尿口・生殖口を兼ねる総排泄腔を有するため、ふん尿は一緒に排出される。ニワトリもウズラも集中飼育管理が可能のため、ふん板やローラーを利用したふん尿回収システムにより比較的容易にふん尿を回収することができる。また、遺伝子組換えウイルス等の接種実験の場合は、ふん尿に遺伝子組換え体が存在する可能性があるため、オートクレーブにより不活化する必要がある。

## ⑥接種が考えられる遺伝子組換えウイルス等の微生物

接種が考えられる遺伝子組換えウイルスとして、クラス 1 ではアデノ随伴ウイルスなど、クラス 2 ではレトロウイルス(レンチウイルスである HIV-1 の増殖力等欠損株を含む)、アデノウイルス、センダイウイルス、インフルエンザウイルス(強病原性株を除く)などがある。遺伝子組換えウイルス等を接種した卵、胚、個体は遺伝子組換えウイルス等を保有しており、さらに個体の場合はふん尿を通して排出される可能性がある。したがって、遺伝子組換えウイルスを接種する実験では、接種された卵、胚、個体および使用した器具だけでなく、ふん尿とそれが付着した機材等は必ずオートクレーブなどで不活化しておく必要がある。

### (2) 遺伝子組換えニワトリ、ウズラの拡散防止措置の概要

ニワトリ、ウズラなどの鳥類に限らず、遺伝子組換え動物において個体のゲノムに遺伝子が安定して挿入されている場合(動物作成実験)と遺伝子組換えウイルスを接種する場合(動物接種実験)とでは拡散防止措置の方法が異なってくる。そこで、本マニュアルで示す遺伝子組換え鳥類の使用実験は、関連する胚への遺伝子組換えウイルスの接種の部分を除き、もっとも一般的な動物作成実験としての P1A のみとする。

#### ①受精卵

遺伝子組換え鳥類由来の受精卵(遺伝子組換え胚を含むもの)自体は、逃亡の危険性がないこと、貯卵状態で自然に孵化して個体に成育しないことから、新たな実験に使用するまで保存する場合は保管の拡散防止措置を執ることができ、保管庫には「遺伝子組換え生物保管中」の表示をする。

#### ②胚

遺伝子組換えウイルスの胚への接種や遺伝子組換え胚を孵卵し、遺伝子組換えヒナを誕生させる実験は、ウイルスが存在する間は、遺伝子組換えウイルスの核酸防止措置のレベルに合わせた飼育室が必要となる。遺伝子組換えウイルスの胚への接種実験のみで孵化を伴わない場合は、逃亡のリスクはないので接種する遺伝子組換えウイルスの拡散防止措置のレベルと同種の微生物実験室で行うことができる。一方、

遺伝子組換えウイルスが存在せず、かつ導入遺伝子が病原性とは関係しなければ、多くの場合は P1A となる。孵化する段階までは微生物実験室でも行えるが、拡散防止措置のレベルに合わせた「組換え動物等飼育中」の表示は必要である。

### ③ヒナ

遺伝子組換えヒナを用いる実験は、P1A の飼育室で行う。出入り口、通気孔、排水溝はヒナが逃亡できない程度の目の細かさで、ネットや網で覆うこと。出入り口は前室を設けても良い。前室を設ける場合は、ネットの設置は不要であるが、この場合、実験従事者が前室と飼育室の扉を同時に開けないなど、遺伝子組換えヒナの逃亡が完全に防止できる出入のルールをあらかじめ決めておく必要がある。

### ④成鳥

遺伝子組換え成鳥を用いる実験は、P1A の飼育室で行う。出入り口、窓、通気孔、排水溝は成鳥が逃亡できない程度の目の細かさで、ネットや網で覆うこと。出入り口は前室を設けても良い。前室を設ける場合は、ネットの設置は不要であるが、この場合、実験従事者が前室と飼育室の扉を同時に開けないなど、遺伝子組換え成鳥の逃亡が完全に防止できる出入のルールをあらかじめ決めておく必要がある。

### ⑤採材

採材によって得られた遺伝子組換え鳥類の臓器は生物とは見なされないので、カルタヘナ法の規制から外れる。しかし、採材された遺伝子組換え鳥類の臓器が生殖器の場合は配偶子を含むので、遺伝子組換え生物と見なされ、カルタヘナ法で規制されることに注意する。採材した生殖器中の配偶子には逃亡のリスクはないので、多くの場合は P1A となり、その扱いも微生物実験室でも行えるが、「組換え動物等飼育中」の表示が必要である。

### ⑥ふん尿

ふん尿中に遺伝子組換えウイルス等が存在しない場合は、使用施設等の規模や構造ならびに機関等で規定される通常のふん尿処理方法に準じて行ってよい。ふん尿中に遺伝子組換えウイルス等が存在する場合は、ふん尿のオートクレーブ処理による不活化が必要である。不活性化措置を行ったものについては、通常のふん尿として扱ってよい。使用施設等の規模や構造に応じ、機関等で法律を遵守した適切な方

法を執るべき事項であるので、本マニュアルではその具体的な方法は示さないこととする。

#### ⑦接種が考えられる遺伝子組換えウイルス等の微生物

接種が考えられる遺伝子組換えウイルスとして、アデノ随伴ウイルス(クラス1)、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノウイルス、センダイウイルス、強病原性でないインフルエンザウイルス(いずれもクラス2)がある。これらの遺伝子組換えウイルスを作製する実験は、核酸供与体のクラス及び病原性・伝達性の有無を考慮する必要があるが、多くの場合はP1もしくはP2となり、個体への接種実験や胚の接種実験から個体を得る場合は、それに合わせてP1AもしくはP2Aとなる。

なお、本マニュアルにおける例示は遺伝子組換えウイルスが関連する部分を除き、遺伝子組換えウイルスが存在しないもっとも一般的なP1Aの拡散防止措置を対象としているので、特定飼育区画やP2A以上の拡散防止措置が必要な実験においては、別途それに対応した適切な拡散防止措置の要件が必要である。さらに、二種省令別表第1にあるように、実験計画において拡散防止措置が二種省令第5条で定められていない場合には大臣確認申請を行う必要がある。なお、増殖力欠損の有無にかかわらずヒナや成鳥などの個体に遺伝子組換えウイルスを接種する実験に関しては、感染実験区などとしてふん尿処理や空調、排気などにおいて大規模な設備を要するため、本マニュアルではその拡散防止措置は例示しないが、その考え方については記載したので参考にされたい。

## II. 拡散防止措置の要件

### 1. 施設等の要件(ハード要件)

#### (1) 遺伝子組換えニワトリ、ウズラの飼育 [P1A]

P2レベルの遺伝子組換えウイルス等の接種以外で P2A レベルに該当する遺伝子組換え鳥類(ニワトリ・ウズラ)はほとんど想定されないので、本マニュアルでは遺伝子組換えウイルス等を含まない P1A の拡散防止措置の例のみを示す。遺伝子組換え鳥類が外部環境中に出た場合、近縁の野生もしくは飼育個体との交配による組換え遺伝子の拡散の危険性があるので、飼育施設は必ず二重の拡散防止措置を構ずること。

#### ① 飼育室・実験室(1重目)

出入り口は前室を設置するか、もしくはヒナレベルが通過できない逃亡防止ネットを設置すること。(ネットの素材は、ポリエチレン製で市販されている野鳥よけネットなどで良い。ニワトリの場合、メッシュサイズは 2-3 cm, ウズラの場合は 1 cm 程度であれば、ヒナも通過できない)

#### ② 飼育ケージ(2重目)

飼育する鳥類の種類および成育時期に応じた飼育ケージ(育雛器を含む)内で飼育すること。

#### ③ ふん尿回収設備

ふん尿中に遺伝子組換えウイルス等が存在しないのであれば、使用施設等の規模や構造ならびに機関等で規定される通常のふん尿処理方法に準じて行ってよい。

#### ③ 排水溝・通気孔

室内洗浄用の排水溝を設ける場合には、逃亡防止のために、蓋をするか金属製の編み目構造のトラップを設けること。通気孔がある場合には、天井など明らかに逃亡が不可能な場所以外は排水溝と同様のトラップを設けること。

#### ④ 採材

孵化鶏卵からの採材を行う際、エアロゾルの発生を伴う場合は実験室内に設置

された研究用安全キャビネットの中で行うこと。なお、エアロゾルの発生が最小限に抑えられるのであれば、研究用安全キャビネットの中で行わなくてもよい。

⑥ オートクレーブ

遺伝子組換えウイルス等が存在しないので、不活化のためには特に必要としない。

⑦ 表示

実験室・飼育室の入り口に「組換え動物等飼育中」の表示を行うこと。

⑧ その他

照明・空調・施錠等は各研究機関が定める動物実験の規則に準ずること。

(2) 遺伝子組換えニワトリ、ウズラの受精卵・胚(あるいは発育鶏卵)の作成 [P1A]

文部科学省・生命倫理・安全対策室が示したポジションペーパー「発育鶏卵を使用する場合の拡散防止措置に関する考え方(平成18年4月21日)」を参考にした拡散防止措置を行う。このポジションペーパーは発育鶏卵を用いて遺伝子組換えウイルス等の増殖を行う実験等に関する拡散防止措置の考え方を示したもので、本来、発育鶏卵への接種は動物接種実験に該当するが、同ポジションペーパーに記載されている項目に該当する場合は、微生物使用実験と同等の拡散防止措置を執ることをもって、十分な拡散防止措置が執られるとしたものである。これらを参考とすると、遺伝子組換えニワトリ、ウズラの受精卵・胚(あるいは発育鶏卵)の作成は動物作成実験に該当するが、その拡散防止措置については、ポジションペーパーの記載にあるように飼育行為、逃亡行為、ふん尿等のいずれも発生しないことから、微生物使用実験と同等の拡散防止措置を執ることで実験が可能と考えられる。

① 飼育室・実験室

通常の P1 レベル実験が行える生物実験室と同種の実験室であること。

② 表示

実験室・飼育室の入り口に「組換え動物等飼育中」の表示を行うこと。

\*参考 [遺伝子組換えウイルス等の接種]

なお、参考として関連する「遺伝子組換えウイルス等の接種」についても記載した。ここでは、発育鶏卵に接種し孵化させない実験以外は具体的な拡散防止措置の例は示さないが、拡散防止措置の考え方を理解するうえでの一助としてほしい。

(1) 遺伝子組換えウイルス等を鶏卵に接種し孵化させない場合 [P1A、P2A の場合]

文部科学省・生命倫理・安全対策室が示したポジションペーパー「発育鶏卵を使用する場合の拡散防止措置に関する考え方(平成 18 年 4 月 21 日)」に準じて拡散防止措置を行う。このポジションペーパーは発育鶏卵を用いて遺伝子組換えウイルス等の増殖を行う実験等に関する拡散防止措置の考え方を示したもので、本来、発育鶏卵への接種は動物接種実験に該当するが、同ポジションペーパーに記載されている項目に該当する場合は、微生物使用実験と同等の拡散防止措置を執ることをもって、十分な拡散防止措置が執られるとしたものである。

① 飼育室・実験室

通常の P1 レベルもしくは P2 レベル実験が行える生物実験室であること。

② 安全キャビネット

P2 レベルの遺伝子組換えウイルスを扱う場合には実験室に研究用安全キャビネットが設けられていること。ヒトへの感染のリスクが考えられる P1レベルの遺伝子組換えウイルスを扱う際も、エアロゾルが発生しやすいと判断される実験である場合は、安全キャビネット内で行う方がよい。

③ 孵卵器

ウイルス接種胚の孵卵は、感染胚が完全に卵殻内に密閉されているのであれば、通常の孵卵器内で孵卵してよい。密閉されていない場合は、培養細胞の場合と同様に密閉式の培養器を使用する。これらの機器は、適切な拡散防止措置の飼育室・実験室に設置する。

④ オートクレーブ

実験室のある建物内に高圧滅菌器が設けられていること。P2 レベルでは実験室

内にあるとよい。

- ⑤ P1A であれば実験室入り口に「組換え動物等飼育中」、P2A であれば実験室入り口に「遺伝子組換え動物飼育中(P2)」と表示すること。

(2) 増殖力欠損型遺伝子組換えウイルス等を鶏卵に接種し遺伝子組換え個体を作成する場合

[P1A、P2A]

基本的に、文部科学省・生命倫理・安全対策室が示したポジションペーパー「発育鶏卵を使用する場合の拡散防止措置に関する考え方(平成 18 年 4 月 21 日)」に準じて拡散防止措置を行う。ただし、増殖力欠損型遺伝子組換えウイルス等を鶏卵に接種し遺伝子組換え個体を作製する場合、孵化させた個体中に未感染の組換えウイルスが残存していなければ、その個体は P1A での飼育が可能である。これは用いるウイルスの種類や残存ウイルスの有無によってその対応が異なるため、それぞれの機関の判断でカルタヘナ法に即した対応を行うものとする。

## 2. 実施上の遵守事項(ソフト要件)

○ 遺伝子組換えニワトリ、ウズラ(発育鶏卵を含む)の飼育 [P1A]

- ① 二種省令別表第二に記載の P1A の拡散防止措置の内容を遵守すること。
- ② 遺伝子組換え鳥類の不活化処分は、日本学術会議が定めた「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に沿って安楽死させる。死亡個体の処理は、各機関で適切に行う。
- ③ 遺伝子組換え鳥類の識別は、翼帯番号かもしくはケージ毎の表示で行う。
- ④ 飼育している遺伝子組換え鳥類の管理数と飼育実数が一致していることを確認すること。
- ⑤ 実験室入り口に、「組換え動物等飼育中」と表示すること。

### \* 参考 [遺伝子組換えウイルス等の接種]

- ① 孵化鶏卵からの採材はエアロゾルの発生を伴う可能性があるため、ヒトへの感染

のリスクが考えられる P1 レベルの遺伝子組換えウイルス等を保有する場合は、研究用安全キャビネット内での操作が望ましい。P2 レベルの遺伝子組換えウイルス等を保有する場合は、研究用安全キャビネット内での操作が必要である。

- ② 飼育に関しては、使用施設等の規模や構造に応じ、機関等で法律を遵守した適切な方法を執ること。
- ③ 遺伝子組換えウイルス等の接種実験の場合は、接種実験に使用した器具・死亡個体、ふん尿等はすべてオートクレーブ処理後に廃棄すること。胚への接種実験では、死亡胚もオートクレーブ処理後に廃棄すること。
- ④ P1A であれば実験室入り口に「組換え動物等飼育中」、P2A であれば実験室入り口に「遺伝子組換え動物飼育中 (P2)」と表示すること。

### 3. その他

#### (1) 保管

- ① 遺伝子組換え鳥類に由来する凍結した精子や始原生殖細胞の保管に関しては、保管庫(ディープフリーザーや液体窒素タンク)の外側に「遺伝子組換え生物保管中」の表示を行い、保管記録簿へ記載する。胚性幹細胞は、カルタヘナ法では生物の定義に属さないが、凍結保存細胞から遺伝子組換え個体を作成することが可能であり、保管庫(ディープフリーザーや液体窒素タンク)の外側に「遺伝子組換え生物由来細胞保管中」の表示を行い、別途保管記録簿を準備することが望ましい。

#### (2) 運搬

- ① 遺伝子組換え鳥類及びそれに由来する受精卵や凍結した精子、胚、始原生殖細胞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うこと。
- ② 遺伝子組換え鳥類を運搬する際には、輸送中に逃亡しないように、かつ容易に破損しない構造の二重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。
- ③ 遺伝子組換え個体の運搬の際は、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。

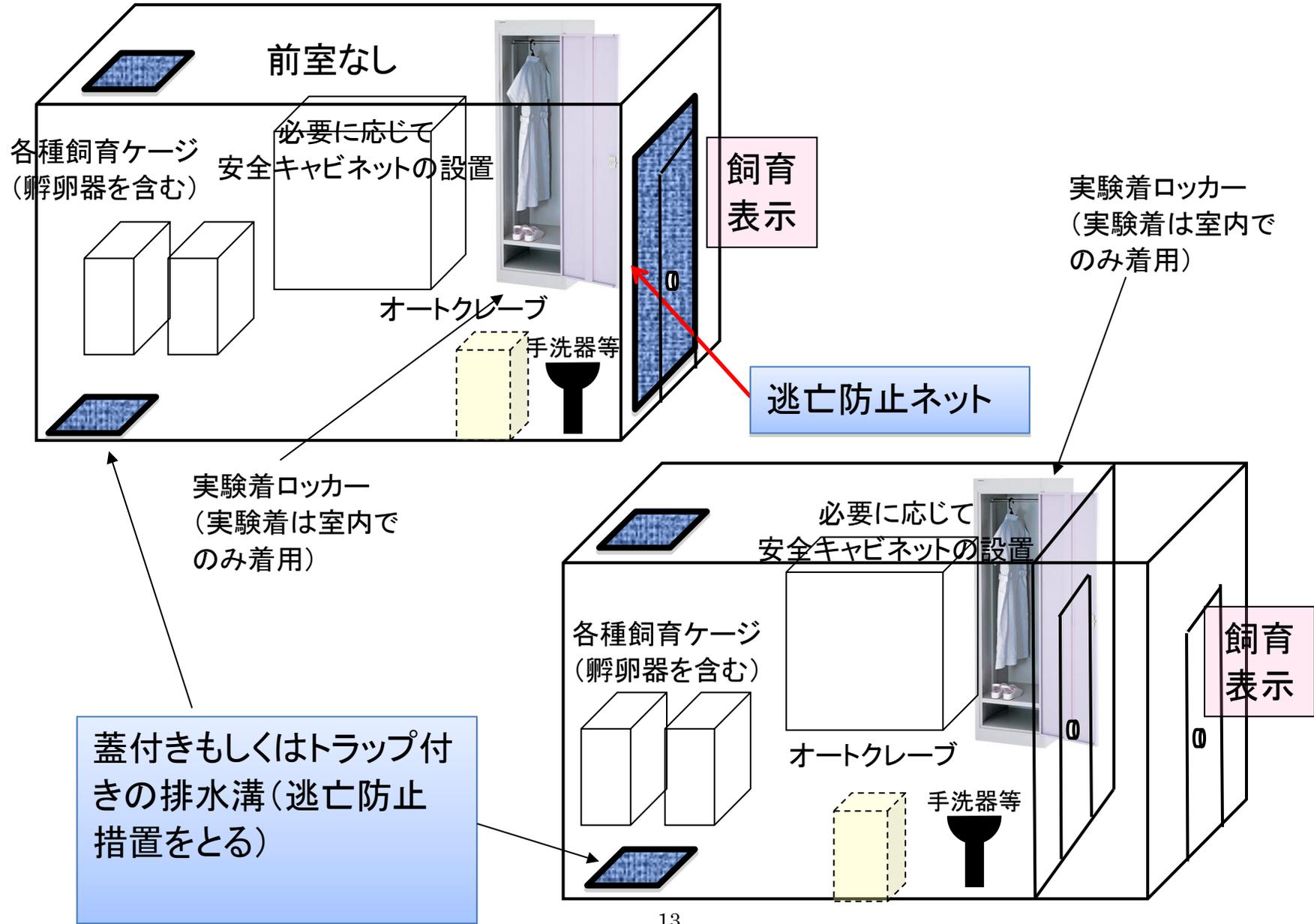
[参考]

発育鶏卵を使用する場合の拡散防止措置に関する考え方

平成18年4月21日  
生命倫理・安全対策室

- 1 組換えセンダイウイルスや組換えインフルエンザウイルス等を作成する場合、その第二種使用等の実験分類としては微生物実験が適用されることから、執るべき拡散防止措置はP1、P2、P3等となる。
- 2 しかしながら、当該ウイルスを作成後、増殖する場合においては、その手法として培養細胞による増殖ではなく発育鶏卵内における増殖を用いることから、その第二種使用等の実験分類としては動物使用実験が適用される。したがって、執るべき拡散防止措置はP1A、P2A、P3A等となる。
- 3 P1A、P2A、P3A等の拡散防止措置は、通常の微生物実験に当たって必要となる設備の使用に加えて、通常の動物実験に必要な飼育室としての設備、逃亡の経路への逃亡防止措置の設置、ふん尿等を回収するための設備等の措置が満たすべき要件として課されているところである。
- 4 したがって、発育鶏卵の培養を長期に行う等により、鶏卵が孵化することてひよことなった場合には当然これらの要件が適用されることとなるが、発育鶏卵の状態のまま実験を行う限りにおいては、
  - ① 飼育行為が発生しないことから、飼育室を必要としないこと、
  - ② 逃亡行為が発生しないことから、防止措置を必要としないこと、
  - ③ ふん尿等の発生がないことから、回収装置を必要としないこと、から、実質的に微生物使用実験と同種の拡散防止措置により、本実験に必要な拡散防止措置が担保されることとなる。
- 5 以上のことから、発育鶏卵を使用してウイルスを増殖させる実験の拡散防止措置については、申請書において
  - ① 鶏卵を孵化させないこと、
  - ② 逃亡の可能性がないこと、
  - ③ ふん尿等の排泄物が生じる可能性がないこと、が明確に示されている場合に限り、通常の微生物実験に当たって必要となる拡散防止措置（P1、P2、P3等）をもって確認することとする。
- 6 なお、5の①～③の要件が満たされない場合、当該実験において執るべき拡散防止措置は、P1A、P2A、P3A等であることに留意する。

# 遺伝子組換えニワトリ・ウズラ飼育室の拡散防止措置のイメージ



参考



ニワトリやウズラのヒナも通過できない逃亡防止ネット  
(実験室出入り口)



孵卵器は密閉式なので、逃亡防止措置が施された一時的な飼育室として利用可能  
この後、飼育室へ移動させる。

参考

広島大学・大学院生物圏科学研究科・瀬戸内圏フィールド科学センター・  
西条ステーション内に設置された遺伝子組換えニワトリの飼育施設(飼育室)



無窓鶏舎の外観



前室の入り口  
施錠システム有・各種表示



前室内と奥の飼育施設

参考

広島大学・大学院生物圏科学研究科・瀬戸内圏フィールド科学センター・西条ステーション内に設置された遺伝子組換えニワトリの飼育施設(飼育室)



日照・空調・室圧の  
制御板



飼育中の遺伝子組換えニワトリ(翼帯とケージ表示  
による個体識別管理)



天井中央2ヶ所に空調入気孔を設置し, 天井四隅に排気口を設置, それぞれへパフィルターを設置, 排気口には活性炭フィルターによる臭気の吸収も行う。排水溝の設置はなし。大型で出力の高い掃除機による清掃を行う。糞尿・死亡個体は施設内に設置された大型で環境適応型の焼却炉で焼却処分する。