

## 海産動物(カタユレイボヤ)

協力:筑波大学下田臨海実験センター 笹倉 靖徳 先生

### 1. 動物の特性と拡散防止措置の概要

カタユレイボヤは海産無脊椎動物であり、日本では広い範囲に生息している。生存に海水が必要なため、また乾燥に非常に弱いため、実験室内からは流し以外の経路での逃亡の可能性はない。流しからの逃亡の防止については、カタユレイボヤが体外受精を行うため、卵・幼生に加えて精子の逃亡を防ぐ必要がある。卵、幼生は 100 $\mu\text{m}$  以上の大きさがありフィルターなどでの逃亡防止が可能であるが、精子は小さく飼育海水中に浮遊しており、フィルターなどでの逃亡防止は不可能である。このことからカタユレイボヤの封じ込めには大腸菌など一般的に研究室で遺伝子組換え実験に利用される微生物の封じ込めに準じた防止策、すなわち遺伝子組換えホヤに触れたものを廃棄する前に確実に不活性化処理を施すことが必要である。カタユレイボヤは真水中では生存が不可能であり、不活性化には真水での処理が安価並びに効果的である。例えば非組換え体の個体では精子は一瞬、卵、幼生、幼若体は10分以内、成体でも一晩の処理で死滅する事例があり、その処理時間が目安になる。一方で遺伝子組換えによる特性変化による真水への耐性変化に留意して処理時間を決定する必要がある。遺伝子組換えウイルス等の接種の場合は、ウイルス、接種ホヤ、飼育容器、飼育水などはすべてオートクレーブで滅菌し、遺伝子組換えウイルス等を死滅させることが必要である。

なお、本マニュアルにおける例示は遺伝子組換えカタユレイボヤの P1A 及び P2A の拡散防止措置を対象としている。したがって、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。さらに、実験計画において遺伝子組換え生物等がカルタヘナ法研究二種省令別表第一に該当する場合は大臣確認申請を行う必要がある。また、本マニュアルは遺伝子組換えカタユレイボヤ以外の遺伝子組換え海産動物の拡散防止措置の参考にもなるが、別途、各々の海産動物の特性に合わせた拡散防止措置の要件を検討する必要がある。

### 2. 拡散防止措置の要件

[遺伝子組換えホヤの飼育]

P1A, P2A 共通:

① 飼育室・実験室

通常の微生物実験室と同様の構造を有する飼育室・実験室であること。

② 安全キャビネット

P2A 実験の場合は、実験室・飼育室内に安全キャビネットを設置すること。

③ 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逃亡しないような容器に入れて持ち運ぶこと。なお、P2A の場合は、オートクレーブは同じ建物内に設置されていること。

④ ふん尿の処理設備

飼育水からふん尿を回収することはできないので、飼育水と同時に処理するのであれば不要である。

A. シャーレなど小型容器で飼育する規模の飼育施設

① ピペットや解剖ばさみなど、遺伝子組換えホヤに触れた汎用器具を直ちに真水などで処置し付着した精子、卵、幼生を死滅できるよう、真水を入れた容器を設置しておくこと。

② 少量の飼育水や小型飼育容器を集め、まとめてオートクレーブ処理、もしくは過酸化水素水（終濃度 0.016%以上で一晩。但し卵、精子、幼生、幼若体に限る）、ホルマリン（終濃度 3.7%で1時間）、大量の真水で希釈（海水量1に対して真水量を9以上加えて混合し一晩）のいずれかにて不活化できるよう、バケツなどの容器を設置しておくこと。ホヤの死滅がデータにより示されるのであれば、他の死滅方法も選択可能である。

③ 小型容器は転倒などにより遺伝子組換えホヤが排水系から流れ出さないよう、排水系の近くに置かないこと。

B. 大型飼育水槽(3L以上)の設置された飼育施設

- ① 不活化と飼育が交互にそれぞれの水槽で行えるよう、1つの飼育に対して2つ(以上)の水槽をセットとして設置することが望ましい(図1A)



図1A 飼育水槽はペアで配置されている。写真では左側の水槽でホヤが飼育されている。右側の水槽は過酸化水素水で処理中であり、その後排水・新しい海水が流入され、その後ホヤを右側に移す。ホヤの移動の後、左側の水槽の飼育水を過酸化水素水で処理して残存する卵、精子、幼生、幼若体を不活性化する。

- ② 飼育水槽は転倒などにより遺伝子組換えホヤが排水系から流れ出さないよう、排水系の近くに置かないこと。

[遺伝子組換えウイルス等の接種]

P1A, P2A 共通:

遺伝子組換えウイルス等の接種実験の場合はできるだけコンパクトな容器(シャーレなどで密閉できること、持ち運びの際には容易に蓋が開かないようにパラフィルム等でシールする)で行い、接種実験直後の飼育水、容器をオートクレーブ処理により不活性化処理した後、排水もしくは廃棄すること。

① 飼育室・実験室

通常の遺伝子組換えカタユレイボヤの飼育に用いられる場合と同様の飼育室・実験室。

② 安全キャビネット

P2A 実験の場合は、実験室・飼育室内に安全キャビネットを設置すること。

③ オートクレーブ

- ・ 遺伝子組換えウイルス等の種類に関わらず、使用した飼育水及び水槽、器具等はオートクレーブ処理等による不活化を行うこと。
- ・ 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逃亡しないような容器に入れて持ち運ぶこと。なお、P2A の場合は、オートクレーブは同じ建物内に設置されていること。

④ ふん尿の処理設備

飼育水からふん尿を回収することはできないが、先に掲げたオートクレーブ処理をすることで遺伝子組換えウイルス等が不活化されるのであれば、特に必要としない。

A. シャーレなど小型容器で飼育する規模の飼育施設

- ① ピペットや解剖ばさみなど、ホヤに触れた汎用器具や飼育水、小型飼育容器を集め、まとめてオートクレーブ処理で不活化できるよう、バケツなどの容器を設置しておくこと。
- ② 小型容器は転倒などにより遺伝子組換えウイルスならびに遺伝子組換えホヤが排水系から流れ出さないよう、排水系の近くに置かないこと。

(2) 実施上の遵守事項(ソフト要件)

[遺伝子組換えホヤの飼育]

P1A, P2A 共通:

- ① P1 レベル(P1A レベルの場合)、P2 レベル(P2A レベルの場合)の実施上の遵守事項
- ② 実験中及び飼育中は窓を閉め、飼育室への出入り以外では扉を閉じておくこと。
- ② ホヤの入った海水が処理なしで排水されることがないように、飼育容器を含めてオートクレーブ処理、過酸化水素水添加(終濃度0.016%以上で一晩。但し卵、精子、幼生、幼若体に限る)、もしくはホルマリン添加(終濃度 3.7%で1時間)、大量の真水で希釈(海水量1に対して真水量

を9以上加えて混合し一晚)のいずれかにて処理し、ホヤを死滅させてから排水すること。ホヤの死滅がデータにより示されるのであれば、他の死滅方法も選択可能である。

- ③ 遺伝子組換えホヤの死滅はオートクレーブ処理、過酸化水素水(終濃度 0.016%以上で一晩。但し卵、精子、幼生、幼若体に限る)、ホルマリン(終濃度 3.7%で1時間)、大量の真水で希釈(海水量1に対して真水量を9以上加えて混合し一晚)のいずれかの方法で一晩処理する。成体の場合は死亡の確認が容易であり、乾燥死、冷凍死でもよい。ホヤの死滅がデータにより示されるのであれば、他の死滅方法も選択可能である。遺伝子組換えウイルス接種実験の場合は、オートクレーブにより死滅させること。
- ⑤ 大型飼育水槽の場合、飼育中のホヤを除去した後、排水の前に過酸化水素水(終濃度 0.016%以上)で一晩処理することにより残存する卵、精子、幼生、幼若体により不活性化する。ホヤの死滅がデータにより示されるのであれば、他の死滅方法も選択可能である。
- ⑥ 水槽には移入した組換え核酸の種類ごとに飼育中の遺伝子組換えホヤを識別することができる表示があること。
- ⑦ 実験室入り口に「組換え動物等飼育中(P1)」(P1A レベルの場合)、「組換え動物等飼育中(P2)」(P2A レベルの場合)と表示すること。

#### [遺伝子組換えウイルス等の接種]

P1A, P2A

- ① 遺伝子組換えウイルス等の接種実験の場合は、上記の要件に加えて、ウイルス等の種類に関わらず、飼育水、飼育容器及び水槽のオートクレーブ処理による不活化を行うこと。
- ② P1A ではすべての操作においてエアロゾルの発生を最小限に留めること。エアロゾルが発生する場合には、安全キャビネット内で操作することが望ましい。
- ② P2 レベルの遺伝子組換えウイルス等の接種において、エアロゾルが生じやすい操作を行う場合は必ず実験室・飼育室内の安全キャビネットを用いること。

- ③ 飼育容器のふたを開ける際は、安全キャビネット内で行うこと。
- ④ 遺伝子組換えウイルス接種によって遺伝子(同定済みで哺乳動物等に対する病原性及び伝達性に関与しないもの)を導入したホヤを動物作成実験に移行する場合は、ウイルスが存在しないことを科学的に証明した後に、P1A レベルの飼育室に移すこと。
- ⑤ 実験従事者は遺伝子組換えウイルスの付着を防止するために、実験後は手洗等の必要な措置を講じること。

### (3) その他

#### ① 保管

- ・ 遺伝子組換えカタユレイボヤの精子の保管は容易に蓋の開かない容器で行うこと。
- ・ 容器の外側の見えやすい箇所に遺伝子組換えカタユレイボヤの精子である旨(例えば系統名)を表示すること。
- ・ 容器は所定の場所に保管すること。
- ・ 容器の保管場所が冷蔵庫や液化窒素保存容器等の設備である場合には、設備の見えやすい箇所に遺伝子組換えカタユレイボヤを保管している旨を表示すること。

#### ② 運搬

- ・ 遺伝子組換えカタユレイボヤの運搬を行う際には、組換え体の情報提供書を添付すること。
- ・ 輸送中に容易に破損しない構造の容器に入れて輸送すること。例えばプラスチックボトルにホヤを入れ、さらにそのボトルを発泡スチロール箱に入れて2重の梱包をする。
- ・ 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。

遺伝子組換え海産動物(カタユレイボヤ)の拡散防止措置のイメージ

遺伝子組換えホヤ飼育水槽。  
ペアにして配置し、片方でホヤを飼育、  
もう片方は排水のための処理用とする。

