

## ゼブラフィッシュ

協力： 理化学研究所脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー・岡本仁先生  
国立遺伝学研究所・川上浩一先生、酒井則良先生  
岡崎統合バイオサイエンスセンター・東島眞一先生  
名古屋大学生命機能開発利用研究センター・日比正彦先生

### I. 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ゼブラフィッシュの特性

ゼブラフィッシュは小型淡水魚で、マウスやラットなどのほ乳類、あるいは両生類と異なり水中以外では1-2分程度しか生存できない。したがって、ゼブラフィッシュでは水でつながった経路以外からの逃亡はなく、通常人が出入りする扉や窓等は一重の拡散防止措置、飼育水槽からの排水に対して二重の拡散防止措置を取ればよい。また、ゼブラフィッシュの精子、未受精卵は淡水中では3分以内で不活化するため、措置の対象は主に受精卵、稚魚、成魚となる。ゼブラフィッシュの生殖様式は単純で、飼育室の点灯後、雄と雌がペアで同調的に放精と放卵することで受精する。ゼブラフィッシュの受精卵は、卵膜も含めたサイズで約1 mm であるが、受精卵自体の直径は約0.5 mm である。受精卵は柔軟な卵膜に覆われており、物理的に壊れて受精卵が放出する場合もあり得るが、そのような受精卵は淡水中では死滅する。受精後2日目に孵化し、1.5 日目の胚から淡水中で生存可能となる。この時期の胚および稚魚の胴径は約0.5 mm で、フィルターやメッシュでトラップするためにはこれ以下の孔径が求められる。成魚は水槽から飛び跳ねて出てくることがあるため、水槽にふたをし、飼育水槽の直下に排水溝がある場合には排水路にふたをする必要がある。ただし、卵膜や生殖系の生物特性等が変わるような遺伝子組換えゼブラフィッシュ(生存可能な小型卵を産卵する。淡水中で長期間授精可能な精子を作る。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の特性をもつ可能性がある遺伝子組換えゼブラフィッシュ)であれば、再検討が必要である。

ゼブラフィッシュはインド・バンガラディッシュ地域に生息する熱帯魚であり、自然状態では16.5-33℃の環境で生活しており、これより低温または高温では安定した生存が難しいと考えられる。

したがってゼブラフィッシュは、日本の本土では冬期に自然環境下で生存できなく、特殊な地域・条件でのみ(沖縄の冬季でも気温が高い環境や温泉等の暖かい水が絶えず提供される環

境)、屋外で例外的に生存する可能性がある。組換え体の拡散防止では以上の様なゼブラフィッシュの生殖及び発生様式を考慮した拡散防止措置が重要である。

## (2) 遺伝子組換えゼブラフィッシュのリスク

### ① 成魚、稚魚

- ・ 飼育施設の排水路への逃亡による拡散のリスクがある。また稚魚は小さいためネットやタンクに付着して逃亡するリスクがある。

### ② 精子・卵子

- ・ (1)で述べた様に、淡水中では精子や未受精卵は3分以内に不活化するので、産卵行動後3分以上経て排水することで、新たに受精することによる組換え体拡散のリスクはない

### ③ 受精卵・胚

- ・ 受精卵・胚は排水路からの放出によりリスクがある。また、ネットや水槽に付着して拡散する可能性がある。

### ④ ふん尿

- ・ 通常の動物作製実験における遺伝子組換えゼブラフィッシュの飼育では、ふん尿を介して組換え体が拡散するリスクはない。

なお、本マニュアルでは遺伝子組換えゼブラフィッシュの飼育を含めた作製実験およびゼブラフィッシュへの遺伝子組換え微生物等の接種実験における拡散防止措置の要件を記載する。また、本マニュアルにおける例示は 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、実験計画においてカルタヘナ法の研究開発二種省令に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。

## II. 拡散防止措置の要件

### 1. 施設等の要件(ハード要件)

#### (1) 遺伝子組換えゼブラフィッシュの飼育

P1A、P2A

### ① 飼育室

- ・ 通常の飼育室・実験室の構造を有すること。循環型水槽システム等で飼育水槽から飼育室の排水溝につながった構造では、飼育水槽での逃亡防止措置に加えて飼育室の外に出るまで水の経路にメッシュやフィルター等のトラップを設置し、二重の拡散防止措置をとる(参考資料図1、2)。
- ・ 排水路飼育棚直下に排水路がある場合には排水路にカバーをする。

### ② 飼育水槽システム

- ・ オーバーフロー等により自動的に排水される循環水槽システムでは排水口に逃亡防止用のメッシュまたはフィルター(卵・胚が流出しないサイズ:孔径 0.4 mm 以下を推奨)を設置する。さらに、産卵行動後3分以上経過した飼育水が排水される設備もしくは装備を有すること。
- ・ 閉鎖型飼育容器で飼育する場合、転倒などにより遺伝子組換えゼブラフィッシュが排水口から逃亡しないよう、転倒防止措置を十分にし、近辺の排水口に同様の逃亡防止措置をほどこす。

### ③ 流し排水口

- ・ 受精卵や稚魚がネット等に付着して流し排水口から逃亡する恐れがあるため、不活化処理をしていないネット等や飼育排水を流しに持ち込む場合、排水口にメッシュまたはフィルター(卵・胚が流出しないサイズ:孔径 0.4 mm 以下を推奨)を設置する。

### ④ オートクレーブ

- ・ P2A の場合は、オートクレーブを同じ建物内に設置する。P2A から持ち出す場合は、遺伝子組換えゼブラフィッシュおよび受精卵、稚魚が漏出しない構造の容器に入れる。

### ⑤ ふん尿処理設備

- ・ 飼育水からふん尿を回収することはできないが、ふん尿に遺伝子組換えウイルス等が含まれないのであれば特に必要としない。

\*排水処理—通常の飼育水では精子・未受精卵は3分以内で不活化するため、産卵行動後 3分以上経過した後排水すること、さらに排水を物理的にトラップすることで受精卵・胚の放出は防ぐことができる。しかし、等張塩類溶液中等では精子・未受精卵は1時間程度その活性を

有する場合がある。等張塩類溶液等で維持した精子や未受精卵に関しては、淡水を足して不活化処理した後に排水をおこなう等の処置を講ずる。

## (2) 遺伝子組換えウイルス等の接種

マウス等で利用されているアデノウイルスや哺乳類レトロウイルス、レンチウイルス、バキュロウイルスはゼブラフィッシュに感染することができる。したがって、ゼブラフィッシュへの遺伝子組換えウイルス接種実験で、ウイルスが活性のある状態では上記ウイルスに対しての P1A、P2A 拡散防止措置が必要である。感染ウイルスのゼブラフィッシュ体内での生存時間に関する知見がいまだ十分でないため、接種実験及び接種魚の飼育はウイルス特性に対応した施設内で、飼育水の循環やエアレーションによりエアロゾルが発生する場合は安全キャビネット内で行うなど、使用するウイルスを対象とした拡散防止措置が必要である。

P1A, P2A

### ① 実験室・飼育室

- ・ 遺伝子組換えウイルス等の接種は、飼育水槽の転倒などにより遺伝子組換えウイルス等が飼育水とともに排水されないよう、接種実験実施場所から排水系までの距離をとること、あるいは床に排水路のない実験室・飼育室で接種実験を行うこと。ウイルスが不活化されているのであれば、通常のトランスジェニックフィッシュと同様に扱う。

### ② 安全キャビネット

- ・ P2A でエアロゾルが発生する実験の場合は、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

- ・ 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処理を施すこと。そのためには、オートクレーブは実験室・飼育室内あるいは同じ建物にあること。

### ④ ふん尿処理設備

- ・ 飼育水からふん尿を回収することはできないが、先に掲げた飼育水のオートクレーブ等による処理をすることでウイルスが不活化されるのであれば、特に必要はない。

## 2. 実施上の遵守事項(ソフト要件)

### (1) 遺伝子組換えゼブラフィッシュの飼育

- 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。
- ③ 遺伝子組換えゼブラフィッシュを不活化する場合は安楽死させる。適切な安楽死の方法として麻酔薬(トリカイン等)で麻酔後、氷水で死にいたらしめることを推奨する。また、受精卵や稚魚の不活化のために飼育水を次亜塩素処理、及びネット類等を次亜塩素処理(最終濃度 0.02%, 1 時間以上浸漬)、70%エタノール処理(5分間以上)、オートクレーブすることも可能である。ただし、前述の遺伝子組換えウイルス接種実験の際には、必ずオートクレーブ処理で接種ゼブラフィッシュと遺伝子組換えウイルス等の死滅を行うこと。
- ④ 水槽には遺伝子組換えゼブラフィッシュが飼育中であることが分かるような表示があることが望ましい。また、必ず種類を識別できる表示を行うこと。
- ⑤ 実験室入り口に、「組換え動物等飼育中」(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

### (2) 遺伝子組換えウイルス等の接種

- ① 遺伝子組換えウイルス等接種実験の場合は、上記の要件に加えて、接種ゼブラフィッシュ、および飼育水、水槽のオートクレーブ処理による不活化処理を施すこと。これらを P1A、P2A から持ち出す場合は、接種個体および遺伝子組換えウイルスが漏出しない構造の容器に入れる。
- 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とどめること。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。P2A では、エアロゾルが発生する場合は、実験室・飼育室内に設置した安全キャビネット内で操作すること。
- ③ P2A では、水槽のふたを開ける際は、安全キャビネットの中で行うこと。

- 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)を導入したゼブラフィッシュを動物作製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ができる。

### 3. その他

#### [運搬]

- ① 遺伝子組換えゼブラフィッシュの運搬を行う際には、組換え体の情報提供書類を同封すること。また破損した際の処理についての指示書を同封することが望ましい。
- ② 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。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) 遺伝子組換えゼブラフィッシュをビニール袋、ペットボトルあるいはプラスチックチューブなど密閉できる容器にいれ、さらにビニール袋で二重に密閉する。密閉した容器を発泡スチロールにいれ、さらに段ボール箱等に入れること輸送途中の破損を防ぐ。これにより輸送途中の温度管理も容易となる。
- ③ 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。

#### [保管]

- ① 液体窒素保管容器による遺伝子導入体精子の保管に際しては、液体窒素タンクの外側に「遺伝子組換え生物保管中」のラベルを貼ること

## ゼブラフィッシュ遺伝子組換え体拡散防止対策

遺伝子組換え体ゼブラフィッシュの生体、およびその卵が生きたまま自然環境に拡散する事がないよう以下の対策を行っている。

ゼブラフィッシュの生体、卵が流れる可能性がある排水パイプにメッシュのキッチン用水切りゴミ袋を設置する（図1）。

さらに、全ての排水が集まる総排水口には図2のようなシステムが設けられている。排水はフィルターを通り、魚、卵が外部に流れ出さない様作られている。また、このフィルターが目詰まりしない様1ヶ月に1度以上フィルターを交換している。



図1：排水パイプ

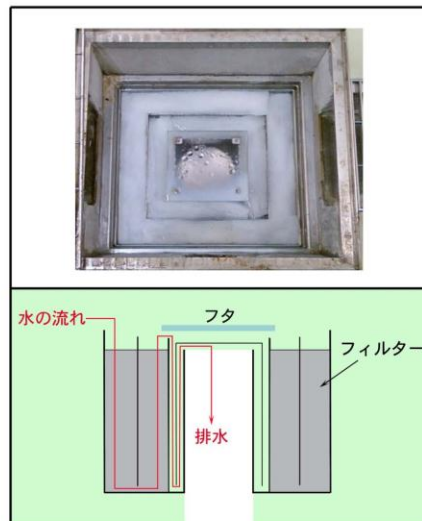


図2：総排水口システム