

B. 両生類

ツメガエル

I. 拡散防止措置の概要

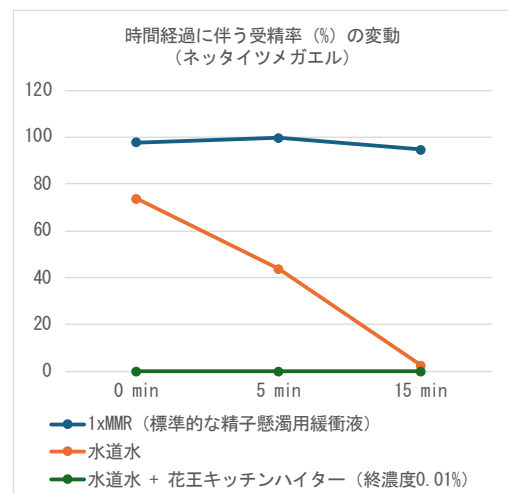
(1) 遺伝子組換え体の拡散防止に関するツメガエルの特性

アフリカツメガエルとネッタイツメガエルは、遺伝子組換え実験に汎用される両生類である。いずれの種も、幼生期から変態後まで水棲であり、陸上で長時間、乾燥に耐えることはできない。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。アフリカツメガエルは幅広い温度に適応し、日本の野外環境において越冬可能である。これに対して、ネッタイツメガエルは 22℃以上 28℃以下の環境を必要とするため、逃亡しても日本で越冬できる可能性は非常に低い。しかし、近年の気候温暖化を考慮すれば、両種共に逃亡できないように拡散防止措置をとる必要がある。ツメガエルの幼生(オタマジャクシ)に対しては淡水魚に類似した拡散防止措置を、変態後個体(カエル)に対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。近年、イベリアトゲイモリも遺伝子組換え実験に用いられるようになってきたが、この種についても基本的にはツメガエルに準じた拡散防止措置で対応可能である。

(2) 遺伝子組換えツメガエルのリスク

① 精子のリスク

オスから水道水程度の低塩濃度の飼育水中に放出された精子の運動能は、浸透圧ショックで活性化された後、概ね 15 分以内に失われる。したがって、受精能を持つ精子が排水経路から野外環境下に拡散する可能性は殆どありえない。右の参考データは、水道水中での受精率、及び市販の塩素系漂白剤を次亜塩素酸の代わりに添加した水道水中での受精率を示す。



② 卵のリスク

メスから放出された卵は、水道水程度の低塩濃度の飼育水中では 1.5 時間以上受精能を維持することはできない。したがって、受精能を持つ卵が排水経路から野外環境下に拡散する可能性は殆どありえない。ただし、高塩濃度溶液中では数時間、受精能を保持できるので注意を要する(ツメガエルを高塩濃度溶液で飼育することはない)。

③ 受精卵のリスク

野外環境への拡散に関しては、精子や卵子よりも、受精卵に現実的な危険性がある。

④ オタマジャクシのリスク

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。そのため専用容器に入れなければ、宅配便等の輸送でも死ぬことが多い。それでも排水経路からの拡散に注意する。

⑤ 変態後のカエルのリスク

変態後も水棲であり、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ことは難しい。

(3) 拡散防止措置の概要

オタマジャクシや変態後のカエルが逃亡できないように、飼育室や実験室は扉や窓を必ず閉めておき、流しや飼育槽、床などに排水口があれば、メッシュやフィルターでふさいでおくことが必要である。排水に卵を含む可能性がある場合には、卵を捕捉するのに十分な孔径のメッシュやフィルターを用いなければならない。自動排水装置を備えた飼育槽を用いる場合は、メッシュ・フィルタートラップに加えて、次亜塩素酸処理槽を排水経路に設置すると良い。実験後の遺伝子組換え体は、安楽死させてから廃棄する。

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 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)

(1) 遺伝子組換えツメガエルの飼育

P1A

[受精卵、胚、オタマジャクシの飼育]

ツメガエルの精子は、オスから水道水程度の低塩濃度の飼育水中に放出されると、概ね 15 分以内に運動能を失う。未受精卵も同様な飼育水中に排卵されると 1.5 時間以内に受精能を失う。交配に用いた飼育水は、30 分以上放置して精子を完全に失活させた後、メッシュやフィルターで濾過して卵や胚を除いてから処分する。オタマジャクシの飼育水も、メッシュやフィルター等で濾過してから処分する。オタマジャクシは水中でしか生存できず、排水経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

- ・ 排水経路に、逃亡防止用のトラップ(メッシュやフィルター等)を設置する必要がある。ネットイツメガエルとアフリカツメガエルの卵の直径は、それぞれ約 0.7-0.8 mm 及び 1.0-1.3 mm であるので、卵あるいは胚を捕捉するためには、孔径 0.5 mm 以下のメッシュやフィルターを用いる。オタマジャクシについては、排泄物がメッシュやフィルターの目詰まりを起こす可能性があるため、その大きさや

匹数に合わせて孔径を調整する必要がある。自動排水装置を備えた飼育槽を用いる場合は、メッシュ・フィルタートラップに加えて、次亜塩素酸処理槽を排水経路に設置すると良い。

- ・ 精子を含む飼育水は、30 分以上置いて精子を完全に失活させてから処分し、メッシュやフィルターで捕捉した卵や胚 は、冷凍して失活させてから処分する。精子や卵、胚をまとめて失活させる場合は、次亜塩素酸処理(最終濃度 60 ppm 以上で 30 分以上処理)でも良い。オタマジャクシの飼育水は、メッシュ・フィルタートラップ(及び次亜塩素酸処理槽)を備えた排水経路を通して廃棄する。トラップのメッシュやフィルター等は定期的に点検する。

③飼育容器

- ・ 水槽、もしくは水槽として用いるのに十分な強度を持つ容器でも良い。

④ふん尿処理設備

- ・ 排泄物を飼育水から回収することはできないので、飼育水と一緒に廃棄する。遺伝子組換え体が、オタマジャクシの排泄物あるいは飼育水を介して拡散するリスクはないため、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、遺伝子組換え体が逃亡しないような容器に入れて持ち運ぶ。麻酔や冷凍処理等によって遺伝子組換え体を死滅させる場合には、オートクレーブ処理の必要はない。

[変態後のカエルの飼育]

水棲のカエルが野外に逃亡する危険性は高くないが、指定された飼育室・実験室において、飼育容器を用いた拡散防止措置の下に飼育すること。

① 飼育室・実験室

- ・ 閉鎖された部屋であり、出入り口に逃亡防止用のネズミ返し(カエル返し:15 cm 以上の高さが必要)を設置する。

② 排水系、飼育水処理

- ・ 排水経路には、メッシュやフィルターを備えたトラップを設置する。
- ・ 飼育水は、30 分以上放置してから上記の排水経路を通して処分する。あるいは交配やオタマジャクシの飼育に用いた水と同様に、次亜塩素酸で処理して廃棄しても良い。トラップのメッシュやフィルターは定期的に点検する。自動排水装置を備えた飼育槽を用いる場合は、メッシュ・フィルタートラップに加えて、次亜塩素酸処理槽を排水経路に設置すると良い。

③ 飼育容器

- ・ 蓋付きの飼育槽(参考図)でカエルを飼育する。

④ ふん尿処理設備

- ・ 排泄物を飼育水から回収することはできないので、飼育水と一緒に廃棄する。遺伝子組換え体が、カエルの排泄物あるいは飼育水を介して拡散するリスクはないため、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、遺伝子組換え体が逃亡しないような容器に入れて持ち運ぶ。麻酔や冷凍処理等によって遺伝子組換え体を死滅させる場合には、オートクレーブ処理の必要はない。

2. 実施上の遵守事項(ソフト要件)

(1) 遺伝子組換えツメガエルの飼育

P1A

- ① P1 レベルの実施上の遵守事項
- ② 遺伝子組換え体(オタマジャクシあるいはカエル)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)の 0.05%溶液を麻酔用に、0.2%溶液を安楽死用に使用できる。麻酔の場合は、処置後に完全に冷凍することによって死滅させることができる。
- ③ 飼育容器には、遺伝子組換え体が飼育中であることを示す表示を付ける。組換え体の遺伝情報を示す標識も必要である。
- ④ 必要に応じてオタマジャクシあるいはカエルの数を確認し、記録しておく。
- ⑤ 飼育室・実験室入り口に「組換え動物等飼育中」を表示する。
- ⑥ 精子、卵及び胚は、次亜塩素酸処理(最終濃度 60 ppm 以上で 30 分以上処理)でも失活させることができる。
- ⑦ 実験時の遺伝子組換え体の運搬に関しては、下記「3. その他」の(2)の①②に従う。

3. その他

(1) 保管

(精子の凍結保存技術は確立されているが、卵の凍結保存技術は確立されていないため、精子についてのみ記載する)

- ① 容器の外側の見えやすい箇所に、遺伝子組換えガエルの精子であることを表示する。
- ② 精子を冷凍保存する場合は、用いる冷凍庫もしくは液体窒素タンクに、遺伝子組換え体が保存されていることを明記する。
- ③ 精子の冷凍保存の貯蔵・使用記録をつける。

(2) 運搬

- ① 遺伝子組換え体が逃亡できず、かつ容易に破損しない構造の容器に入れて輸送する。輸送中の容器の破損を防ぐための措置をとる。(例えばカエルを密封プラスチック容器に入れて、それを発砲スチロールの箱に詰める等の措置をとる。)
- ② 容器の最も外側の見えやすい箇所に、取扱に注意を要する旨を表示する。
- ③ なお、遺伝子組換え体の譲渡を目的として運搬する際には、受け渡し簿への記録および管理を行い、組換え体としての情報提供書を添付する。

関連文献

Stern, C. D. and Holland, P. W. H.

Essential Developmental Biology: a practical approach. Oxford University Press, 1993.

Sive, H. L., Grainger, R. M., Harland, R. M.

Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. CSH Press, 2000

Ogino, H. and Ochi, H.

Resources and transgenesis techniques for functional genomics in *Xenopus*.

Dev. Growth Differ., 51: 387-401, 2009

Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Kurabayashi, A., Hanada, H., Nakajima, K., Okada, M., Takase, M. and Yaoita, Y.

Xenopus tropicalis: an ideal experimental animal in amphibia.

Exp Anim., 59(4): 395-405, 2010

Hoppler, S. and Vize, P. D.

Xenopus Protocols: Post-Genomic Approaches. Springer, 2012.

Suzuki, N., Watanabe, D., Suzuki, M., Igawa, T., Hayashi, T. and Ogino, H.

Sperm handling as part of containment measures for laboratory amphibian species.

In preparation.

ツメガエルリソースと参考ウェブサイト

National BioResource Project -*Xenopus tropicalis* (how to raise *X. tropicalis*)

https://xenopus.nbrp.jp/NBRP_Xenopus/NBRP_X._tropicalis_Top_Page_EN.html

Xenopus Genome Project (genome browser for *X. laevis* and *X. tropicalis*)

<http://viewer.shigen.info/xenopus/index.php>

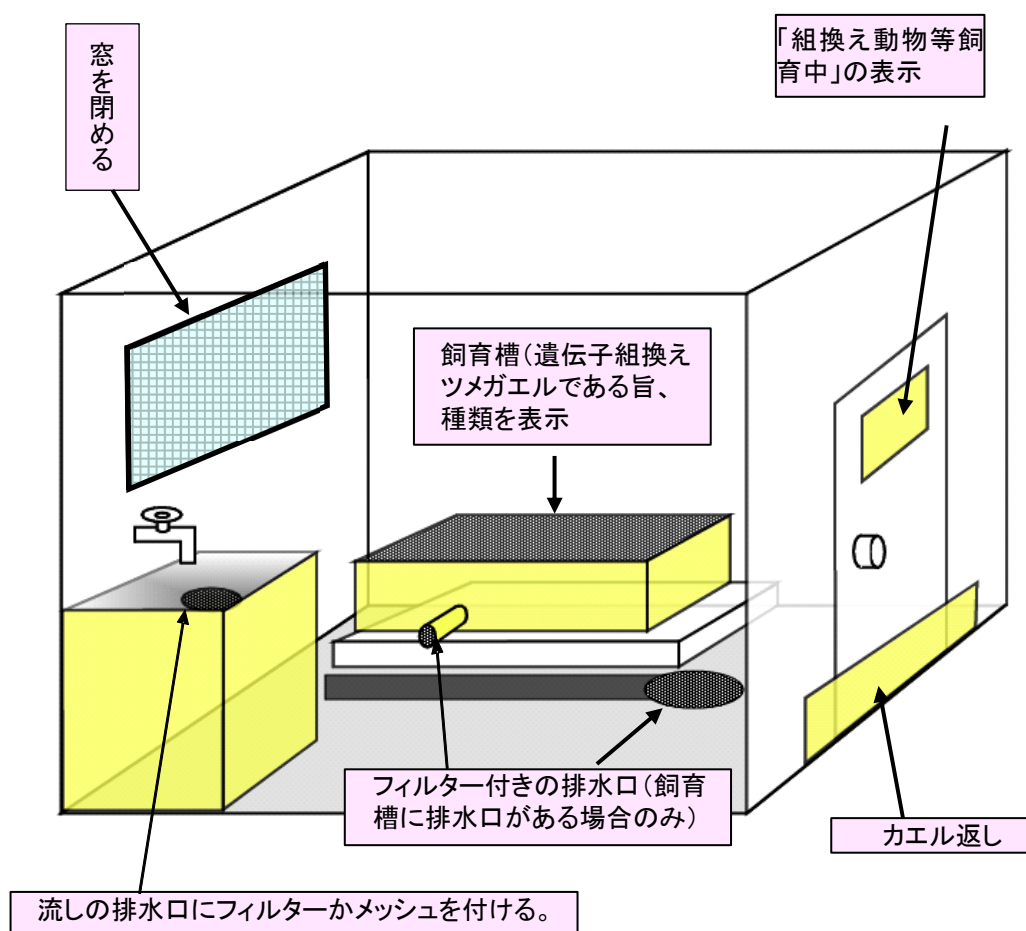
Harland Laboratory *Xenopus tropicalis* Site (*X. tropicalis* husbandry and protocols)

<http://mcb.berkeley.edu/labs/harland/>

Xenbase (international database for *X. laevis* and *X. tropicalis* research)

<http://www.xenbase.org/entry/>

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 両生類研究センター)



- (A) 飼育室の扉。「組換え動物飼育中(P1)」の標識と、逃亡防止用カエル返し(下部の青色のプラスチック板)が設置されている。
- (B) 水循環式多槽型ツメガエル飼育システムの全景。上部2段に水槽群が、下段に濾過槽(灰色)、水温コントローラー、ポンプ、紫外灯(循環水滅菌用)が設置されている。
- (C) (B)の上段に設置された小型水槽。各水槽の組換え系統名や匹数などの情報は、水槽に直接表示されている他、バーコードを用いて集中管理されている。
- (D) 水循環式多槽型ツメガエル飼育システム下部の濾過槽(透明タイプ)。濾過材(白色)に細菌を定着させて生物濾過に用いる。(A)に示す灰色の濾過槽と異なり、透明な濾過槽は濾過材の汚れの確認が容易な反面、その壁に藻類が生えることがある。
- (E) 水槽と排水口の間に設置する塩素処理槽。奥側の筒の中に次亜塩素酸タブレットが入っている。水槽からの排水は奥側で塩素と混合されてから、中央を仕切るメッシュフィルターを通過後、手前側の槽を經由して捨てられる。