

## メダカ

協力:基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・准教授・成瀬 清先生

### 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メダカの特長

メダカは小型淡水魚であるので、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長期間生存ができない。また自らの意志によって逃亡を企てるということがない。メダカの精子は淡水中では1-2分程度しか運動することができない。また未受精卵も6分後には完全に受精能を失う。一方で等張塩類溶液中(組成 0.65% NaCl, 0.04% KCl, 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )では、2時間程度は受精能を保つ場合があるので、等張塩類溶液中など、特殊な条件で遺伝子組換えメダカを飼育する場合には、精子あるいは未受精卵を介しての拡散防止に留意する必要がある(淡水を足して精子と未受精卵の不活化処理した後に、タンクの排水をおこなう等の処置を講ずる)。メダカの生殖様式は魚類の中では比較的特殊で、雄と雌がペアリングして同調的に放精と放卵しないとうまく受精できない。未受精卵は発生することなく死滅する。このことから遺伝子組換えウイルス等を含む場合を除き、淡水での飼育では精子もしくは未受精卵の流出による組換え体の拡散のリスクはほぼないと考えてよい。受精直後の卵はある程度の柔軟性があるが、受精後8分程度で卵膜が硬化を開始し、受精後40分では指で触って、強く押しつぶれない程度に硬化する(20,000mg程度の荷重に耐えることができる)。メダカの受精卵のサイズは約1.2mmであるが1mmのメッシュならば硬化後の受精卵をほぼ完全に捕捉することができる。また付着毛がメッシュに絡まるので流失した授精卵はシンクのメッシュで完全にトラップできる。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メダカ(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メダカ)であれば、再検討が必要である。

卵膜は卵膜タンパク質(choriogenin)によって構成される水に不溶性の構造体である。遺伝子組換え体によっては、卵膜が柔軟になってメッシュを通り抜ける可能性も完全に否定はできない。生合成過程もよく研究されていることから卵膜の柔軟性に影響を与えると考えられる遺伝子組換え体は比較的容易に予想できるので、あらかじめ確認しておく必要はある。メダカは卵表面にある付着毛によって、水草等に付着した状態で発生する。このような場所は比較的水中の酸素濃度が高いことから溶存酸素が低い状況(多くの卵がチューブの下部にパックされた状態や水槽の底部

の泥の中)ではメダカの発生に重篤な影響を及ぼす。また孵化までには 30℃で 7 日間を要する。組換え体の拡散防止では以上の様なメダカ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) 遺伝子組換えメダカのリスク

### 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。一方で魚は水中以外では長期間生存できない。

### ② 精子・卵子

- ・ (1)で述べた様に淡水中では精子の運動や卵子の受精能は短時間で失われるので、それを踏まえた措置をとるが、遺伝子組換えによる精子の運動特性や卵子の受精能の変化(淡水中で長期に受精可能かどうか)を考慮する必要がある。

### ③ 受精卵

- ・ 受精卵を介しての拡散リスクは最も考慮すべきものである。メダカの卵膜は硬いので空気中でも魚自身にくらべ長く生存可能である。また 1.2 mm 程度と小さいためにネットや水槽に付着して拡散する可能性がある。
- ・ 一方で孵化までは 1 週間程度を要すること、正常発生には比較的高い水中溶存酸素量が必要なことなどを考慮することで受精卵を介しての拡散を確実に防止することができる。

### ④ ふん尿

- ・ 通常の動物作成実験における遺伝子組換えメダカの飼育では、ふん尿を介して組換え体が拡散するリスクはない。
- ・ 動物接種実験では遺伝子組換えウイルス等を用いた遺伝子組換え体作成時にはふん尿に遺伝子組換えウイルス等が含まれる。飼育水からふん尿のみを回収することは不可能である。

### ⑤ 遺伝子組換えウイルス等

- ・ マウス等で利用されているアデノウイルスはメダカ胚に感染することができる。感染ウイルスのメダカ細胞内での生存時間に関する知見がいまだ十分でないため、感染実験はウイルス

特性にあわせ、P2施設内の安全キャビネット内で行うなど、少なくともマウスに準じた処置が必要である。

- ・ 飼育水槽や廃水はオートクレーブしてからP2施設から運び出す必要がある。感染個体をP2施設からP1A施設に移動させる場合には実験的に遺伝子組換えウイルス等が検出されないことを示す必要がある。

### (3) 拡散防止措置の概要

メダカは水中以外では長期間生存ができない。また自らの意志によって逃亡を企てるということがないため、水槽からの逃亡防止としては一重の拡散防止措置で良い。しかし排水用水路及び流し台のシンクを通じて流失(特に受精卵に注意)する可能性があるため、排水路を中心に十分な逃亡防止措置を講じることが必要である。またネットや水槽に付着して外部に出ること防止するため、ネット及び水槽は死滅処理し、乾燥後に再使用する。

#### ① 成魚、稚魚

- ・ メダカが水槽からジャンプし直接排水路に落ちないようにするため、飼育棚の直下に排水路がある場合には排水路にふたをする。排水路と飼育棚が近い(1 m以内)場合は、例えば、床面と間に5 cm程度の高さの仕切りを設置することにより床面に落ちたメダカが生存した状態で水路へ到達しない、などの措置が必要である。
- ・ 一方で魚は水中以外では長期間生存できないために、排水路への逃亡を防ぎ、ネットや水槽をすぐにP1A, P2A施設外へ出さないよう気を付ければ、魚自身の逃亡は比較的容易に防ぐことができる。水槽の換水時には廃水をコンテナ等に一時的にため塩素処理(次亜塩素酸最終濃度0.02%, 2時間以上処理)後に排水する(小規模施設)。大規模な飼育施設ではさらに排水路に塩素タブレット等を入れた消毒槽を設置することで成魚や稚魚が誤って流失しても死滅するような装置を設置することが望ましい。実験後の遺伝子組換えメダカはトリカイン等の麻酔薬で麻酔後、凍結あるいはオートクレーブで死滅して廃棄を行う。

#### ② 精子・卵子

- ・ 流し台のシンク部分には卵が流失しないサイズのメッシュを設置する。水槽の換水時には廃水をコンテナ等に一時的にため塩素処理(次亜塩素酸最終濃度0.02%, 2時間以上処理)後に排水する(小規模施設)。また廃水はできるだけ化学処理される排水溝につなぐことが望ましい。

- メダカ用のネットは使用后、エタノール処理(90-100%エタノールに浸潤)して、付着した卵を死滅させ、乾燥後に再使用する。使用後の水槽も塩素処理(次亜塩素酸最終濃度 0.02%, 2 時間以上浸漬)し、乾燥後に再使用する。これにより感染症の伝搬を防ぐこともできる。

### ③ 受精卵

- 受精卵を介しての拡散リスクは最も考慮すべきものである。メダカの卵膜は硬いので空気中でも魚自身にくらべ長く生存可能である。また 1.2 mm 程度と小さいためにネットや水槽を介しての拡散があり得る。メダカ用のネットは使用后、エタノール処理(90-100%エタノールに浸潤)して、付着した受精卵を死滅させ、乾燥後に再使用するなど、ネットを通じて受精卵が外部に出ることを防止する処置が必要である。使用後の水槽も塩素処理(次亜塩素酸最終濃度 0.02%, 2 時間以上浸漬)し、乾燥後に再使用する。これにより感染症の伝搬を防ぐこともできる。
- 大規模な飼育施設では排水路に塩素タブレット等を入れた消毒槽を設置することで受精卵が誤って流失しても死滅するような装置を設置することが望ましい。
- 一方で孵化までは 1 週間程度を要すること、正常発生には比較的高い水中溶存酸素量が必要なことなどを考慮することで受精卵を介しての拡散を確実に防止することができる。
- また廃水はできるだけ化学処理される排水溝につなぐことが望ましい。

### ④ ふん尿

- ふん尿を飼育水から分離することは不可能である。また、通常の遺伝子組換えメダカがふん尿を介して拡散することはありえない。したがって、特段の拡散防止措置設備を設置する必要はないが、飼育水は前述のように塩素処理してから排水する。
- 微生物接種実験では、用いた遺伝子組換えウイルス等の微生物の拡散を防ぐため、ふん尿を含む飼育水は必ずオートクレーブなどによる滅菌を行わなければならない。

### ⑤ 遺伝子組換えウイルス等

- 感染ウイルス等のメダカ細胞内での生存時間に関する知見がいまだ十分でないため、感染実験はウイルス拡散防止措置に合わせP2施設内の安全キャビネット内で行うなど、少なくともマウスに準じた処置が必要である。
- なお、遺伝子組換えウイルス等が存在しなくなるまでは、エアロゾルが発生しても実験室・飼育室内に拡散しないように飼育中は水槽にふたをし、ふたを開く際は安全キャビネット内で

行うようにする。

- ふん尿を飼育水から分離することは不可能である。用いた遺伝子組換えウイルス等の微生物の拡散を防ぐため、ふん尿を含む飼育水は必ずオートクレーブなどによる滅菌によって遺伝子組換えウイルス等の死滅を行わなければならない。

なお、本マニュアルでは遺伝子組換えメダカの飼育を含めた作成実験およびメダカ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) 遺伝子組換えメダカの飼育

P1A、P2A

#### [小規模施設]

##### ① 飼育室

- 飼育室の内から外へと向う全ての水の経路(床や流しの排水溝)に拡散防止措置をとる。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。また飼育棚から1m以内に排水路がある場合には5cm程度の高さの柵を設けるなど水槽からジャンプしたメダカが生存したまま排水路に到達しない処置が必要である(排水溝に逃亡防止用のトラップがある場合はカバーや柵の設置は不可欠ではない)。

##### ② 排水溝

- 水槽から排水される排水溝には逃亡防止用のトラップを設置する、あるいは排水溝へ繋がるパイプに逃亡防止メッシュ(卵が流出しないサイズ、孔径1mm以下のものが望ましい)を設置する。

##### ③ 流し排水口

- ・ 卵が直接排水溝に流れないようにメッシュを入れること(図 1 A 及び B)。メッシュは孔径 1 mm(図1C)以下のものとする。

#### ④ ネット

- ・ 卵がネットに付着して外部に出ないようにするため、使用後は90-100%エタノールに浸潤後、乾燥させて再使用する(図2A 及び B)。

#### ⑤ 水槽

- ・ 水槽は塩素処理(次亜塩素酸最終濃度 0.02%, 2 時間以上浸漬)し、乾燥後に再使用する。

#### ⑥ オートクレーブ、冷凍庫

- ・ 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。
- ・ P2A の場合は、オートクレーブは同じ建物内に設置すること。

#### ⑦ 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。

\*廃水処理一次のいずれかの方法で廃水を処理したうえで排水する

- ・ 数十分間以上放置し、精子等が確実に死滅したと判断できるものについては、受精卵が通過しないことが確実なメッシュを通した後に、排水をする。
- ・ 完全循環型の水槽では水替えの際には大型容器やタンクなどに廃水を一時的に貯め、次亜塩素酸処理してから排水する。
- ・ 図 4 に示されている様な塩素タブレット等を用いたトラップを排水路に設置し、流出したメダカ、授精卵を死滅処理した後に、外部につながる排水路に排水するシステムを設置する。

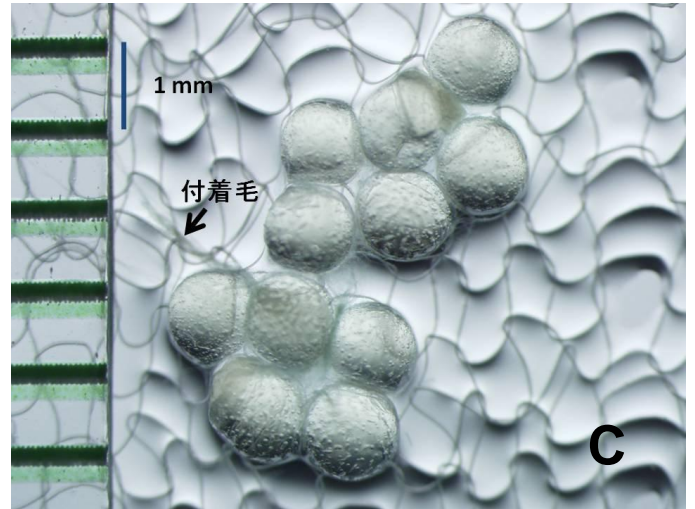
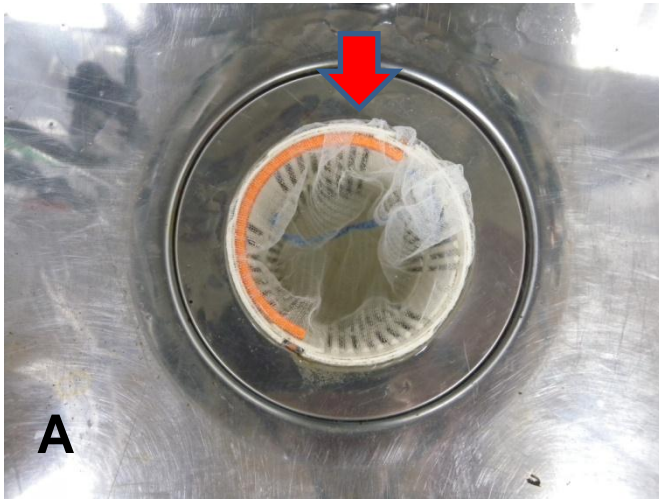


図1. 流し排水口の拡散防止措置

- A. シンクに設置したメッシュ(矢印)
- B. さらにスポンジ(矢印)(魚用フィルター)を設置してゴミもトラップする。定期的にフィルターを交換
- C. メッシュにトラップされたメダカ卵。卵がメッシュサイズより大きいため通過できないだけでなく、付着毛がメッシュに絡まるため完全にトラップされる。





**A**

**図 2.** エタノール浸潤用コンテナとウエットとドライ用ネット置き場

**A.** ネットを処理するエタノールとエタノール濃度計

**B.** エタノール処理したネットはまずウエット用にかけて乾燥する。翌日ドライ用のネット置き場に移動させる。ネットを使用する場合には常にドライ用からとって使用する。



**B**



## [大規模施設]

### ① 飼育室

- ・ 飼育室の内から外へと向う全ての水の経路(床や流しの排水溝)に拡散防止措置をとる。

### ② 排水溝

- ・ 循環水槽の排水システムにナイロンメッシュもしくはフィルターを設置して、水槽から卵、稚魚、成魚が流失した際にトラップできるシステムを設置する(図 3)。メッシュやフィルターの孔径は 1mm 以下が望ましい。
- ・ 廃水を一時貯水することが可能な場合には、遺伝子組換え体が流失しても塩素タブレット・高温滅菌等により殺処分されたのち排水されるような逃亡防止トラップシステムを設置する(図4A および B)。
- ・ 廃水を一時貯水することができない場合には、完全循環系飼育システムとして、換水時には大型のコンテナや排水タンクに貯留して、塩素処理した後に排水する。

### ③ 流し排水口

- ・ 卵が直接排水溝に流出しないように、メッシュやフィルターでトラップする(図 1 A 及び B)。メッシュの孔径は 1mm 以下とする

### ④ ネット

- ・ 卵がネットや水槽に付着して外部に出ないようにするため、使用後は90-100%タノールに浸潤後、乾燥させて再使用する(図 2A 及び B)。

### ⑤ 水槽

- ・ 塩素処理(次亜塩素酸処理 0.02%, 2 時間以上浸漬)し、乾燥後に再使用する。

### ⑥ オートクレーブ、冷凍庫

- ・ 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。
- ・ 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。

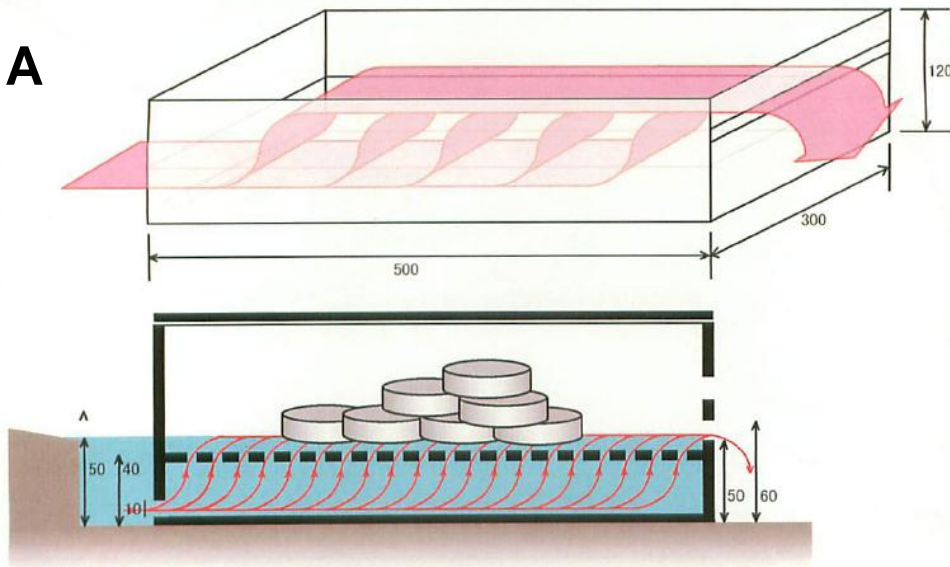
### ⑦ ふん尿処理設備

- ・ 飼育水からふん尿を回収することはできないので、特に必要としない。



**図3. 排水トラップシステム**

ナイロンフィルターを設置して流失した卵をトラップする。フィルターを定期的に交換する。フィルターモールド内ではメダカ胚は生存できないので水槽間のコンタミネーションも防止できる。



**B**



**図4. 塩素タブレットトラップ**

**A, 塩素タブレットとラップの構造。**

上流から入った卵はメッシュを通過する際に塩素処理され死亡する。

**B, 実際に設置した塩素タブレットトラップ**

このシステムではさらに下流に卵が流失しないサイズのメッシュを設置。大量の水が流れた際にも卵がトラップされて、十分な時間塩素処理をすることができる。

## (2) 遺伝子組換えウイルス等の接種

P1A, P2A

遺伝子組換えウイルス等の接種時は、前述の P1A あるいは P2A の遺伝子組換えメダカの拡散防止措置に加えて、以下の措置を執ること。

### ① 実験室・飼育室

- ・ 遺伝子組換えウイルス等の接種は、床に排水路のない実験室・飼育室で行うこと。

### 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

- ・ ウイルス等の種類にかかわらず、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、先に掲げた廃水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) 遺伝子組換えメダカの飼育

- 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 遺伝子組換えメダカの死滅はトリカイン等の麻酔薬で麻酔後、オートクレーブ処理あるいは冷凍して処理する。ただし、後述の遺伝子組換えウイルス接種の場合は、必ずオートクレーブ処理で接種メダカ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メダカ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
- ⑥ 水槽からの排水には、ハード要件に示したところの拡散防止措置を施すこと。

### (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、ウイルス等の種類にかかわらず、飼育水及び水槽のオートクレーブ処理等による不活化処理を施すこと。
- ② P1A では、すべての操作において、エアロゾルが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 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)を導入したメダカ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 レベルの床に排水路のある飼育室に移すことができる。



### 3. その他

#### [運搬]

- ① 遺伝子組換えメダカ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) 遺伝子組換えメダカをビニール袋、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2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



図1. 循環型システム水槽に入っている3種のフィルター



図2. 流しの排水溝に入れられる下水用メッシュ(孔径1mm以下)



図3. 水槽を塩素消毒するための大型容器  
(次亜塩素酸ナトリウム0.02%, 2時間以上浸漬)

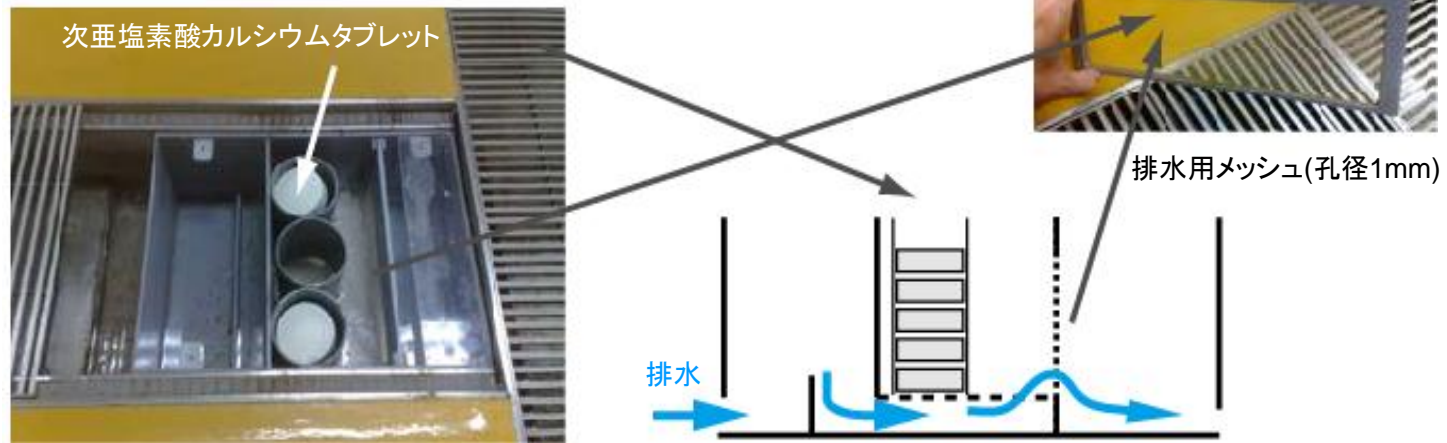


図4. 排水塩素処理装置

## 参考

基礎生物学研究所 ナショナルバイオリソースプロジェクト・メダカにおける遺伝子組換え生物の飼育水等の排水処理

1. まず下水に流れ出る卵・稚魚・成魚の量を大幅に減ずる為に、飼育水や飼育器具の洗浄水が必ず網(孔径1mm以下のフィルターやメッシュ)を通して下水溝に流れ出る様にしている。4種類の網を排水溝までの各箇所を設置して、排水が網を可能な限り複数回くぐり抜ける様にしている(最低でも一度)。

2. もしもメダカが排水溝に流れ出ても、全ての排水が塩素処理装置を通り抜けるので、この間に全てのメダカが死滅する。この排水塩素処理装置は、全ての排水が孔径1mmのメッシュを通り抜けるので、メダカ生体は必ずこの装置内に留まる。この装置内で塩素によって生体が死滅する仕組みになっている。

その他、メダカ水槽や飼育に用いた器具を、次亜塩素ナトリウム0.02%(終濃度)2時間以上の条件で浸漬消毒している。またネットは100%エタノールに浸潤し乾燥後再使用している。これは主に器具を介した魚病の感染拡大を防ぐ為であるが、この条件ではメダカ生体も死滅する。また、系統間の混入を防ぐ為に基本的に飼育器具は常に乾いた物を用いている(魚網や水槽等)。これらの対策により、飼育器具を介した生体の拡散もない。