

11 月 30 日に公開講座講演会を開催します。ぜひご参加下さい。

公開講座 島根の科学-おもしろい科学のはなし 8-

「クロレラと共生しているゾウリムシの話」

演 者：児玉有紀 氏（島根大学生物資源科学部）

日 時：平成 25 年 11 月 30 日（土）14 時-15 時 30 分

会 場：島根大学生物資源科学部 1 号館 101 号室

詳細は <http://shimane-u.org/event.htm>

### <設備・機器の修理や新設>

分野 [website](http://shimane-u.org/index.htm) に機器一覧、機器オンライン予約、お知らせ、申請書類ファイル、セミナー記録、技術講習会活動記録、ニュースなどが掲載されています。最新情報は随時更新しています。ぜひご覧ください。 <http://shimane-u.org/index.htm>

機器のオンライン予約を行うためには、利用代表者のユーザーID およびパスワードが必要です。遺伝子機能解析分野事務までお問い合わせください。

新たに予約オンライン化を希望される機器がございましたらご連絡ください。

### <行事>

第 100 回 遺伝子機能解析部門技術講習会を開催しました。

平成 25 年 5 月 16 日

「正立型共焦点レーザー蛍光顕微鏡説明会 5」

第 101 回 遺伝子機能解析部門技術講習会を開催しました。

平成 25 年 6 月 7 日

「分子間相互作用定量 QCM 装置 (Intium AFFINIX QN $\mu$ ) デモ」

第 102 回 遺伝子機能解析部門技術講習会を開催しました。

平成 25 年 6 月 27 日

「生体分子間相互作用解析システム (Pall ForteBio Octet Red96 & BLItz) デモ」

教育訓練を開催しました。

平成 25 年 5 月 14 日

「放射線業務従事者新規登録者教育訓練」

ひらめき☆ときめきサイエンスを開催しました。

平成 25 年 8 月 6 日、7 日

「細胞の世界-ミクロの世界をさぐる-」

<http://shimane-u.org/gyoji.htm> に報告があります。

### <会議・研修会等参加>

6 月 26 日 全反射蛍光顕微鏡デモ会（順天堂大学）（以下に報告があります）

7月20日 第5回遺伝子実験安全研修会（以下に報告があります）

8月27日 放射線安全管理研修会（次号で報告します）

### <セミナー開催>

第199回 平成25年5月15日

（第5回 正立型共焦点レーザー蛍光顕微鏡セミナー）

（第6回 島根大学バイオイメージング研究会講演会）

（第315回 細胞工学会講演会）

演題 細胞分裂のイメージング解析とイメージング画像の自動分類

松永 幸大 氏（東京理科大学理工学部）

第200回 平成25年6月5日

（第316回 細胞工学会講演会）

演題 生物多様性を支える物は何か：複雑性・安全性問題

舞木 昭彦 氏（島根大学生物資源科学部）

第201回 平成25年8月5日

（第7回 島根大学バイオイメージング研究会講演会）

（第318回 細胞工学会講演会）

演題 植物機能を支えるペルオキシソーム機能発現の制御機構

—生殖過程における解析を中心として—

真野 昌二 氏（基礎生物学研究所高次細胞機構）

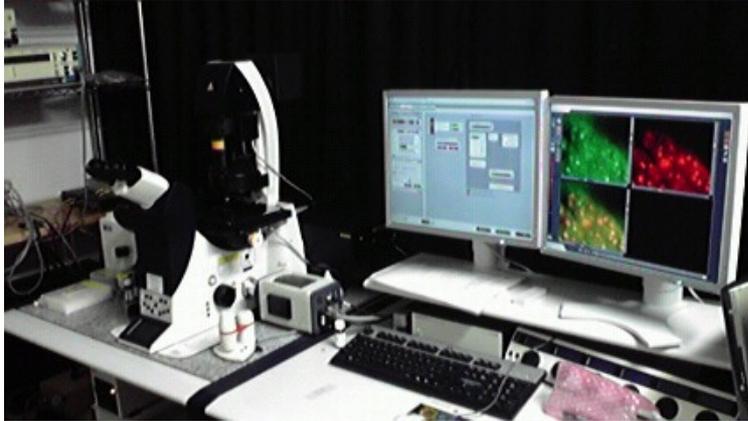
### <会議等報告>

共焦点レーザー蛍光顕微鏡のオプションのデモに参加して

（平成25年6月2日、順天堂大学）

遺伝子機能解析分野では将来的に超解像顕微鏡の導入を検討しており、その一つである全反射蛍光顕微鏡（Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy、TIRF）について、ライカ社の機器のデモに参加する機会がありました。本機は順天堂大学にあり、倒立型共焦点レーザー蛍光顕微鏡にオプションとして搭載されておりました。全反射蛍光顕微鏡は、レーザー光の入射角を全反射が起こるように傾けて、試料付近でエバネッセント場を作り出し、非常に低いバックグラウンドを実現させて、ナノレベルな微細な構造を観察するために特化された蛍光顕微鏡です。この顕微鏡を用いると、細胞膜付近の150nmの深度で細胞内の物質の動態を数百nmのレベルでライブイメージングすることが可能になります。例えば、インシュリンやアディポネクチンなどの抗肥満ホルモンの分泌過程やサイトカインなどの細胞外因子の細胞内へのエンドサイトーシスによる取り込み過程などをライブイメージングで解析することが可能となり、生活習慣病の細胞内の分子メカニズムの解析などを従来型の共焦点レーザー蛍光顕微鏡や多光子励起レーザー蛍光顕微鏡よりも、より一層詳細に行うことが可能になります。ライカ製のTIRFは、全反射が起こる深度をクリック一つで段階的に設定できる点、488nm（緑色）と561nm（赤色）レーザーの照明深度を自動で合わせてくれる便利な機能がついている点、見やすく使いやすいアプリケーション、そして場所を取らないすっきりとコンパクトなシステムといった点で、本部署に設置して共同利用機器として運用するにはと

でもメリットのある機種である印象をうけました。持参したサンプルの二重ライブイメージング観察も行いましたが、簡単な操作で綺麗な画像を取得することができました。今回のデモの結果を踏まえ、今後、TIRFの導入とその共同利用に向けて、概算要求を引き続き、積極的に行っていきたいと考えております（西村 記）。



（写真は、順天堂大学にあるライカ社製 TIRF）

### 第5回 遺伝子組換え実験安全研修会（7月20日）報告

平成25年7月20日（土）、第5回遺伝子組換え実験安全研修会が東京医科歯科大学で開催されました。この研修会は全国大学等遺伝子研究支援施設連絡協議会（大学遺伝子協：<http://www1a.biglobe.ne.jp/iden-kyo/index.html>）、中国地方バイオネットワークが主催する研究会で、第5回は東京医科歯科大学での開催となりました。中国地方バイオネットワーク連絡会議とは鳥取大学、島根大学、岡山大学、広島大学、山口大学の遺伝子関連施設で構成される組織で、情報交換や様々な連携活動を行っています。今回私はこの連絡会議の一員として裏方を兼ねて参加しました。今回は午前中に3会場に分かれて分科会、午後は1つの会場で文科省担当官説明、分科会報告、パネルディスカッション、総合討論が行われました。分科会は以下の通りです。全ての分科会の配付資料が遺伝子機能解析分や事務室に保管されていますので、ご覧になりたい方は事務室までご連絡下さい。

分科会1:安全教育訓練—多様な従事者に向けての実例—

分科会2:各機関で判断に迷う共通の事項

分科会3:遺伝子組換え生物を巡る多様な規則

今回は記述者らが参加した分科会2の内容を中心に報告します。

〈午前の部〉

〈分科会2報告〉

本会は事前のアンケートの内容を踏まえて、コーディネーターの方が各機関で判断に迷う共通の事項について、次の5点について取り上げられ、議論されました。

- 1、ゲノム編集等の取扱い
- 2、エアロゾルが発生しやすい操作
- 3、不活性化の問題
- 4、ウイルスの除去を示す判断基準
- 5、告示別表にないものの扱い

特に、1については、分科会3「遺伝子組換え生物を巡る多様な規則」とも関連の深い内容であったので、この点についてのみ、分科会2と3は同じ会場で議論しました。それ以外

は分科会3とは会場を別にして議論しました。まず、「ゲノム編集等の取扱い」については、最も時間を掛けて議論されました。ゲノム編集技術（TALEN、CRISPR/CAS、ZFNなど）には、例えば、以下については遺伝子組換え生物に該当するかの判断が難しい現状となっています。

- ・ transgeneした後、nuclease遺伝子等を抜いた場合
- ・ nuclease等のmRNAを注入する場合
- ・ タンパク質としてnuclease等を注入する場合
- ・ 接木
- ・ エピゲノム編集

こうして作成された生物は、自然界にも実在しうるかどうかは、施行規則のナチュラルオカレンスに該当するかどうかにかたがた当たるが、そもそも定義が曖昧であり、法令が決まっていない場合は文科省に問い合わせたところで曖昧な回答しかえられない現状であることが説明されました。ゲノム編集等RNAをinjectionして作成した小規模欠損変異体の場合、injectionしたRNAが細胞内で複製しなければ、一過性発現として遺伝子組換え生物として扱われないはずであるが、発現する遺伝子産物がゲノム編集を行う場合は解釈が困難になる実例が紹介されました。ゲノム編集で遺伝子欠損を作成した場合、由来不明の数塩基程度のDNAが挿入される、あるいは点変異をもつことがあり、たとえゲノム編集に関わる遺伝子を持たなくなった場合でも、こうした挿入・変異はゲノム上の任意の箇所に残ります。ここでは、各機関の対応について、特に各機関の自主的な管理の必要性、自主的な管理のやり方、遺伝子協としての対応例の公表について、主に議論されました。具体的なケースとして、ある大学のZFN編集した動物の扱い（nuclease遺伝子は削除済み）について紹介され、当初は遺伝子組換えの申請を求めなかったが、結局は遺伝子組換え動物と同じ扱いを取ることにになり、こうした場合に対応できるよう学内規則の整備の是非が議論された、との紹介がありました。また別の大学でも同様のゲノム編集により作成した動物の扱いに関しては、文科省での明確な判断がない現状で、個々の機関で独自に判断することのリスクを恐れ、今後、文科省からゲノム編集による改変生物を遺伝子組換え生物と見なすという判断が出されても対応できるよう、こうした改変生物も少なくとも遺伝子組換え生物と同等の扱いをすることにし、実験計画書の提出、拡散防止措置を取るよう申請者に求めた。また譲渡の際は、先方で拡散防止措置を執るか否かは他機関の判断に任せるようにした。遺伝子協としては問題提起にとどめ、各機関に持ち帰り議論してもらいたい旨説明がありました（西村個人的には、現状のゲノム編集技術では、数塩基の塩基挿入や点変異がゲノムの任意の場所に認められる以上、文科省で具体的な指針が出されるまでは、少なくともゲノム編集による改変生物は遺伝子組換え生物として扱うようにすべきであると考えています）。

「エアロゾルが発生しやすい操作」については、定義が無く、判断に迷うことが多いことが指摘されました。エアロゾルの発生により、組換え体が飛散する恐れがある実験は、当然、安全キャビネットで行うことが望ましいと思われます。二種省令（別表第二の一）にある「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」をどう解釈するか？結局、安全管理上の問題は各機関で判断することが重要ですが、どう判断するか難しいので、議論がなされました。参考として、WHOマニュアルに記載してあるエアロゾルを生じやすい作業としては、遠心、破碎、攪拌、強く振って混ぜる操作、超音波処理、破碎、内圧の高い容器を開ける、動物への経鼻摂取、動物や卵から感染性組織を取り出す、大量又は高濃度資料の取扱、白金針をバーナーで焼く、等があります。ピペットマンを使う操作ではすべて飛沫が飛ぶ恐れがあるとも考えられるとの意見もありました。このため、アデノ随

伴ウイルスベクターを用い動物摂取実験はP1Aレベルでも、人に感染する恐れがあるため、安全キャビネットの中で操作を行うことが望ましいことが指摘されました。P1レベルでも安全キャビネットを導入する必要があるか？ということまで、踏み込んだ議論がありました。一方で、施設として安全キャビネットを導入することが困難な場合も多々あります。動物接種実験の場合、「エアロゾルが発生しやすい操作」でない接種方法であるかどうかを各機関で判断することになります。このようなエアロゾル発生にともなう封じ込め措置に関しては、今後、より一層機関ごとで慎重に検討、判断する必要があることを感じました。

「不活性化の問題」については、法令には明確な定義がないため、不活性化をどのように考えるのが議論されました。組換え体の不活性化の方法については、平成14年3月の「組換えDNA実験指針」解説に記載があります。微生物、植物、動物について、いずれも死滅させることが前提となった方法となっています。高等動物の組換え体の場合は、その動物を殺傷すれば生物体としての機能は失われますが、そこに寄生している微生物等を殺菌するため、必ずオートクレーブ等により有効性が確認されている不活性化方法で処理する必要があることが言及されています。従って、死滅が不活性化に求められることとなります。ただ、これについて、もう少し柔軟な考え方が求められるケースとして、水棲の遺伝子組み換え動物の飼育水の廃棄が挙げられました。配偶子の不活性化については、そもそも生物種により配偶子が異なるため、配偶子の不活性化について明確な基準を設けることは困難でケースバイケースの対応となることが想定されます。水棲の遺伝子組み換え動物の廃水中に存在する精子はメッシュ等でトラップすることはできないので、適切な方法で不活性化する必要があります。他の生物に習い、オートクレーブや薬剤等で完全に死滅させることが理想的ですが、受精能が完全に無くなると判断できる時間（科学的な根拠が必要）を過ぎてから排気するという方法もありうる、という考え方が紹介されました。こうしたケースについては、遺伝子協の「各種遺伝子組換え動物の拡散防止措置の例」において、数例示されておりますので、ご参照ください。

「ウイルスの除去を示す判断基準」については、ウイルスベクターを感染させて作出させる実験生物の取扱についてが取り上げられ、遺伝子組み換え生物かどうかの基本となる考え方が先ず紹介されました。遺伝子組換えレンチウイルスは「遺伝子組換え生物」であり、これを感染させたマウス培養細胞（ウイルス成分が培養液中に検出されない場合に限る）は「遺伝子組換え生物」ではありません。さらにこの培養細胞を接種した結果、この細胞が生着したマウスは「遺伝子組換え生物」です（この細胞が生殖系に入るか否かは無関係）。このようなプロセスにおいて、ウイルスを接種して樹立された遺伝子組換え培養細胞にウイルスが混入していないかの確認については、感度の高いnested-PCRによる検出が望まれます。こうした措置は市販されている遺伝子組換え生物（バキュロウイルス）で製造された精製タンパク質標品の遺伝子組換え生物の混入の否定に対しても対応可能であることが紹介されました。しかしいずれの場合も、死細胞の残渣が含まれることにより、PCRによる判定が困難になる可能性も残されていることも指摘されました。このような遺伝子組換え培養細胞については、機関によっては遺伝子組換え生物に準じた扱いにしているケースもあります。遺伝子協としては自主的な指針を持っていません。遺伝子組換え培養細胞についてはアデノウイルスの場合、東大の齋藤先生の報告が参考になることも紹介されました。特に、動物個体にウイルスを接種する場合は実験的検証が難しいことも併せて指摘され、今後も更なる検討の余地があります。

「告示別表にないものの扱い」については、基本的には、「宿主又は拡散供与実験分類が定められていない」の取扱は定められており、以下のチェックリストに一つでも該当すると、大臣確認申請となることが確認されました。

- ・ 認定宿主ベクター系と用いていない
- ・ 核酸供与体がウイルス及びウイロイドである
- ・ 供与拡散が同定済みではない
- ・ 供与拡散が哺乳動物等に対する病原性及び伝達性に関与することが推定

また、この他の内容のアンケートについては、ご覧になりたい方は事務室までご連絡下さい。

#### 〈午後の部〉

午後には、文科省担当者から「カルタヘナ法」と「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」についての説明が行われ、引き続き、各分科会の報告と総合討論が行われました。

文科省担当者からのカルタヘナ法についての説明内容を簡単にご紹介します。まずカルタヘナ法の背景には、1992年採択された生物多様性条約が掲げる目的の1つである「生物の多様性の保全」があることに触れ、カルタヘナ法の概要、第一種使用等、第二種使用等についての説明がありました。第二種使用等については、拡散防止措置（含：実験時・保管・運搬時）、その大臣確認、留意事項についてさらに詳しい説明がありました。近年問題になっている第二種使用等における不適切な取扱いに関しては、事例集が上げられ、注意すべき点の1つとして確認が求められました。最後に災害発生時における拡散防止措置に係る対応についても触れられ、災害発生時は、基本的に災害に遭遇した方の避難などの措置が最優先されますが、可及的速やかに、文科省生命倫理・安全対策室に連絡・相談する旨のお願いがありました。

大学遺伝子協が本講習会のために事前に行ったカルタヘナ法に対応するための教育訓練に関するアンケート調査の集計結果については、保管されている配付資料をご覧ください。

次に、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に関して、その概要と平成25年4月の改正についてご説明がありました。まず、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究」、「試料・情報」の定義の説明がなされました。さらにゲノム研究の基本的な考え方としては、「人権尊重」「研究倫理」「研究管理」の三つがあることに触れ、ゲノム研究の実施体制、研究計画書、インフォームド・コンセント、情報の匿名化の原則と管理、匿名化された情報の取扱い、個人情報保護制度の体系、安全管理措置についての説明があり、試料・情報の取扱いについては多岐にわたるため一層具体的な説明がありました。最後に不適切事例の紹介があり、ヒトゲノム・遺伝子発現研究の適切な実施を強調されました。平成25年度の改正については、構成の整理、試料・情報の取扱い、研究協力者への対応、その他（教育・訓練、守秘に関する事項）の点でなされたことの説明がありました。

引き続き、各分科会の報告と総合討論が行われました。参加しなかった分科会1と3について、以下、簡単に紹介します。

#### 「分科会1：安全教育訓練—多様な従事者に向けての実例—」について

徳島大学における遺伝子組換え実験安全取扱講習会についての内容が紹介されました。新規従事者、更新従事者に加え、学生実習に特化したもの、さらには新規あるいは更新留学生向けについては、英語での教育訓練を開催し、毎年40回もの講習会を開催していることが紹介されました。また留学生・外国人研究者に向けた英語による安全教育訓練については、神戸大学での実施内容が紹介されました。大学遺伝子協では、「英語による安全教育マニュアル」

を作成し、販売しています。ただ、このマニュアルの利用は、著作権等の関係で大学遺伝子協の会員に限定されています。詳しくは、以下のURLを御参考ください。

[http://www1a.biglobe.ne.jp/iden-kyo/Anzen\\_Ed\\_Manual.html](http://www1a.biglobe.ne.jp/iden-kyo/Anzen_Ed_Manual.html)

「分科会3：遺伝子組換え生物を巡る多様な規則」について

昨年度の本研修会で紹介された内容の最近の動向についてご紹介されました。昨年度の内容については、遺伝子機能解析分や事務室に保管されていますので、ご覧になりたい方は事務室までご連絡下さい。

遺伝子組換え実験において遵守しなければいけない主な国際条約・法律・規則等として、以下が紹介されました。

- ・ 生物多様性条約（含カルタヘナ議定書）とその関連法（外来生物法）  
（生物遺伝資源の保全と資源保有国の権利および対価の支払い）  
（ABS：名古屋議定書）  
（発展途上国への技術指導・技術移転等）（外為法）  
（責任と救済：名古屋・クアラルンプール補足議定書）
- ・ カルタヘナ法とそれに関連する省令等（含：関係する地方自治体の規制等）
- ・ ヒトゲノム・遺伝子解析研究における倫理方針（生命倫理委員会）
- ・ 大学等における研究用微生物安全管理マニュアル（旧文部省）  
（感染症法や家畜伝染病法等）（バイオセーフティ委員会）  
（感染症法の大幅な改訂：生物テロへの悪用防止）
- ・ 生物（化学）兵器禁止条約
- ・ 植物遺伝資源保護条約
- ・ 動物の輸入届出制度
- ・ 動物愛護法
- ・ その他

そして検討すべき課題としては、以下の点が紹介されました。

- ・ 動物実験との兼ね合い
- ・ 病原微生物・病原遺伝子の利用との兼ね合い
- ・ 家畜伝染病との兼ね合い
- ・ 生物資源・遺伝資源の利用との兼ね合い
- ・ カルタヘナ議定書に関する残された課題
- ・ カルタヘナ法における未解決問題
- ・ その他（廃棄物処理等）

遺伝子組換えの痕跡がほとんど残らない新しい遺伝子組換え技術の取り扱いについては、昨年度の本講習会に引き続き、議論され、最近の動きがご紹介されました。これらの技術は、EUが報告書に公表しており、そこに記載してあるNew Plant Breeding Techniquesであり、以下の通りです。

- (1) Zinc Finger nuclease (ZNF) technology
- (2) Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM)
- (3) CisgenesisとIntragenesis
- (4) RNA-dependent DNA methylation (RdDM)
- (5) 接ぎ木 (grafting)
- (6) Reverse Breeding

(7) Agro-infiltration

(8) Synthetic Genomics

最近の動きとして、EUのEFSA (European Food Safety Authority) からZFN-3の関連技術に関する考え方について報告が出されました。

(<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2843.htm>)

基本的な考え方として、EU規制の従来規制ガイドラインで対応可能であり、さらなる規制は不要としています。また米国では、個別事例毎に開発会社等と意見交換しながら対応しているとのことです。(遺伝子組換え)微生物(セルフクローニングあるいはナチュラルオカレンスに近いと考えられるもの)によって生産された食品添加物に関し、外国から日本に輸入された食品添加物が法令に抵触する可能性がある(未承認・未確認)ものとして取り上げられた、とのことです。

総合討論では、特に「遺伝子組換えの痕跡がほとんど残らない新しい遺伝子組換え技術の取り扱い」について議論されましたが、結論は出ませんでした。本件については文科省も具体的な内容の明言を積極的には行っていないだけに、大学遺伝子協の中で議論をさらに深め、一定の結論を出し、文科省の方へ提言する必要があることとして共通の認識を得ました。ゲノム編集のような新しい技術についての取扱は今後も注目しなければいけないと感じました。(西村 記)