



事 務 連 絡

平成16年7月30日

各都道府県衛生主管部（局）御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が定められていない
場合の拡散防止措置の確認に関する申請書の記載例について

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（以下「法」という。）第13条に規定する遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が定められていない場合の拡散防止措置の確認に関し必要な事項については、遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成16年財務・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令1号）において示され、平成16年2月19日より施行されているところである。今般、（財）ヒューマンサイエンス振興財団により、別添のとおり第二種使用等拡散防止措置確認申請書（以下「確認申請書」という。）の記載例が作成されたので送付する。

確認申請書に記載又は添付すべき事項・内容・資料等は、個々の申請毎に相違しており、申請者において個別に判断する必要があるが、本記載例は、確認申請書作成の際等に参考になると考えられるので、貴管下関係業者に対して周知方御配慮願いたい。

法第13条第1項に規定する、「遺伝子組換え生物等の第二種使用等をしている者であつて、同項の確認を受けた拡散防止措置を執っていないもの」が、拡散防止措置の確認を受けているものとみなされる経過措置期間は平成16年8月18日までであるので、当該期間内に第二種使用等の拡散防止措置に係る確認申請が遺漏なく行われるよう、関係業者への十分な指導を願いたい。

なお、平成16年3月19日薬食審査発第0319001号「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律の施行に伴う事務取扱い等について」をもって通知したとおり、①昭和61年12月11日薬発第1051号厚生省薬務局長通知「組換えDNA技術応用医薬品等の製造のための指針について」（以下「指針」という。）に基づき、既に指針適合性確認を受けた確認申請書の取扱いについては、厚生労働省からの「組換えDNA技術応用医薬品等の製造のための指針に係る製造計画の確認について（通知）」の写しを添付するとともに、確認申請書のその他の欄に指針に基づく確認を受けている旨を記載することにより、確認申請書の遺伝子組換え生物等の特性及び拡散防止措置の欄の記載は省略して差し支えないこと、②組換えDNA技術工業化指針（平成10年通商産業省告示第259号）への適合性確認を経済産業大臣から受けている場合は、経済産業省大臣宛の

確認申請書の写しを添付するとともに、確認申請書のその他の欄に経済産業省指針への適合性確認を受けている旨を記載することにより、確認申請書の遺伝子組換え生物等の特性及び拡散防止措置の欄の記載は省略して差し支えないこととしているので、念のため申し添える。

様式第一 (第7条関係)

第二種使用等拡散防止措置確認申請書

〇〇〇〇年〇月〇日

厚生労働大臣 殿

氏名 〇〇薬品株式会社
 申請者 代表取締役社長 〇〇〇〇 印
 住所 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-3

遺伝子組換え生物等（遺伝子組換え微生物）の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認を受けたので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第13条第1項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称		BIO 増殖因子製造用遺伝子組換え大腸菌（菌株名称：KP411）	
第二種使用等を行うとする場所	名称	〇〇薬品株式会社 世田谷工場	
	所在地	郵便番号 XXX-XXXX 東京都世田谷区□□□1-2-3	
第二種使用等の目的及び概要		<p>本遺伝子組換え微生物は、医薬品原薬 BIO 細胞増殖因子 BIO-2004 の生産の手段として使用する。</p> <p>当該遺伝子組換え微生物 BIO 増殖因子製造用遺伝子組換え大腸菌（菌株名称：KP411）を大量液体培養（〇〇〇L）し、菌体内に BIO-2004 を産生させる。遠心分離後、菌体を破碎し BIO-2004 を抽出・精製する。菌体の破碎工程では高圧ホモジナイザー処理、酵素処理、有機溶媒処理が施され、抽出の工程において生菌は検出されなくなる。また、培養から抽出までに排出される廃液は全て高温蒸気滅菌を施され、不活化される。</p>	
遺伝子組換え生物等の特性	宿主又は宿主の属する分類学上の種	分類学上の位置及び自然環境における分布状況	<p>宿主は、大腸菌 <i>Escherichia coli</i> K12 株由来の JMXXX 株 (vvvV, Www⁺, Xxx⁺, Yyy, Zxx⁺, ., ., .) であり、〇〇社（市販）より購入されたものである。（別紙1(1)）</p> <p>当該宿主は「遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令別表（1）に基づき厚生労働大臣が定める GILSP 遺伝子組換え微生物（平成16年厚生労働省告示第27号）」収載されている。</p>
		使用等の歴史及び現状	〇〇薬品株式会社においては、JMXXX 株の産業上の使用実績はないが、厚生労働省告示及び経済産業省告示の自動化リストに記載されており、産業上で広く使用されていると考えられる。
		繁殖又は増殖の様式	<p>宿主の増殖様式は二分裂である。酸素の有無に関わらず増殖可能（通性嫌気性菌）である。一般に、28～40℃程度の温度条件下で増殖し、このうち 37℃付近が増殖には最も好ましく、至適条件下における宿主の倍加時間は約30分である。</p> <p>増殖にはロイシン及びチアミンを必要とし、抗生物質（アンピシリン、テトラサイクリン及びカナマイシン等）に対して薬剤感受性を示す。接合に関与する F 因子を保有しない (F⁻)。</p> <p>宿主の性質についての詳細を、別紙1(2)に示す。</p>

	病原性	宿主 JMXXX 株は、非病原性 <i>Escherichia coli</i> K12 株由来であり、病原性はない。本宿主は、病原性に関係のあるウイルス及びプラスミドを保持していない。
	その他の情報	有害な影響を及ぼす生理活性物質等の産生性はない。
	構成及び構成要素の由来	<p>BIO-2004 遺伝子及びその翻訳開始に必要な領域より構成される。</p> <p>①BIO-2004 遺伝子：ヒト胎児肝臓由来の cDNA ライブラリーより単離した BIO 増殖因子をコードする cDNA で、大腸菌内での codon usage に適合するよう塩基置換を施したもの。</p> <p>②5'改変領域：①の BIO-2004 cDNA の開始コドンから上流の 5'末端領域を除去し、大腸菌内での翻訳開始に必要な開始コドンを含む 25 塩基よりなる配列を化学合成し導入したもの。</p> <p>さらに、②の 5'側及び①の 3'側に、ベクターへの挿入を可能とするよう、制限酵素部位 <i>Bam</i>HI 及び <i>Hind</i>III をそれぞれ付加した。塩基数は、1,207 bp である。構成要素の詳細を別紙 2 (1) に示す。</p> <p>制限酵素地図、塩基配列等の供与核酸の性質を、別紙 2 (2)、別紙 2 (3) にそれぞれ示す。</p>
供与核酸	<p>構成要素の機能</p> <p>供与核酸は、preBIO 細胞に作用して、BIO 細胞への分化・増殖を促進する BIO 増殖因子 BIO-2004 の全長をコードする。</p> <p>供与核酸には、既知の有害塩基配列との相同性は認められない。(別紙 2 (4))</p>	
	名称及び由来	ベクター pKC124 は、○○○に存在することの知られたプラスミド pBIO303 に由来し、自律複製する。
	特性	<p>pKC124 は、pBIO303 の複製調節配列を含む <i>Cla</i>I-<i>Xba</i>I 領域に 4 つの機能領域 (**プロモーター領域、遺伝子組込み領域、転写終結領域、アンピシリン耐性遺伝子領域) を挿入することで作製される。塩基数は 5,392 bp である。</p> <p>①**プロモーター領域：大腸菌○○遺伝子のプロモーター配列。</p> <p>②遺伝子組込み領域：化学合成により作製された制限酵素部位から成る配列。</p> <p>③転写終結領域：大腸菌○○遺伝子の転写終結に機能する配列。</p> <p>④アンピシリン耐性遺伝子領域：プラスミド pBR322 の <i>Pvu</i>II-<i>Hind</i>III 領域。</p> <p>ベクター pKC124 の作製方法、構造、全塩基配列を別紙に示す。(別紙 3 (1)、別紙 3 (2)、別紙 3 (3))</p> <p>pBIO303 の由来である○○○について、伝染性、病原性及び伝達性を示すような報告はこれまでにない。また pBIO303 と同様に、pKC124 の宿主依存性は高く、○菌及び大腸菌以外への伝達性は乏しいと考えられる。</p>
ベクター		

遺伝子組換え微生物	調製方法	<p>(1)宿主内に移入する核酸は、ベクターpKC124 の遺伝子組込み領域中に、BIO-2004 遺伝子を挿入することで得られた BIO-2004 遺伝子発現プラスミド pBIO457 である。</p> <p>(2) BIO-2004 遺伝子発現プラスミド pBIO457 を〇〇法により目的遺伝子の移入を行い、形質転換させる。</p> <p>(3)(2)からアンピシリン含有 LB 寒天培地上において単コロニーを分離し、初代株を得る。</p> <p>(4)(3)の初代株をアンピシリン含有液体培地で培養し、マスターセルバンクを確立する。マスターセルバンクからワーキングセルバンクを確立する。</p> <p>これら(1)から(5)までの、発現プラスミドの構築法、発現プラスミドの構造、遺伝子組換え生物の育成経過等を(別紙4(1)、別紙4(2)、別紙4(3))にそれぞれ示す。</p>	
	細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性	<p>(1)宿主に移入した核酸 (pBIO457) は、細胞質内に存在し、保有する複製調節領域の機能により自律複製を行う。</p> <p>(2)〇〇代継代後の遺伝子組換え微生物及び長期保存後の遺伝子組換え微生物及びについて、〇〇により△△を、□□によりXXを確認した。(別紙4(4)) これにより、プラスミドの脱落等は示唆されず、目的蛋白質の発現も安定していると考えられる。</p>	
	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	<p>遺伝子組換え微生物の特性は、BIO 増殖因子生産能及びアンピシリン耐性が付与されたことを除いて、宿主の「繁殖又は増殖の様式」、「病原性」、「その他の情報」で記載した事項と同様である。BIO 増殖因子生産能及びアンピシリン耐性を指標として、遺伝子組換え微生物と宿主の識別は可能である。</p> <p>宿主と遺伝子組換え微生物との特性の相違について、確認した内容を別紙4(5)に示す。</p>	
拡散防止措置	使用区分	GILSP	
	作業区域の位置	〇〇薬品株式会社 世田谷工場内のパイロット工場1及び研究棟3の実験室5を使用する(別紙5)。	
	設備	配置	<p>パイロット工場1及び研究棟3内の主要な設備の位置及び名称を示す(別紙6(1))。</p> <p>区域内には必要に応じよく整備された安全キャビネット、オートクレーブ、インキュベーター、培養タンク、遠心分離機、冷凍庫が設置されている。</p>
		構造	<p>作業区域は、隔壁によりそれ以外の区域と物理的に隔離されている。床及び壁面は防水性のエポキシ樹脂で覆われている。</p> <p>運搬時には、密閉容器を用いる。</p> <p>作業区域の換気は、HEPA フィルターを通して給排気を行い、差圧を設定している(注:カテゴリー1の場合、記載すること)</p> <p>作業区域の排水は、作業区域それぞれの排水口から排水管を経て専用の排水槽に集められ不活化される。</p> <p>(別紙6(2))</p>
生産工程	予定している製造工程及び主要設備の概略、遺伝子組換え微生物の処理方法を示す(別紙6(3)、別紙6(4))。		
その他	注:以下の説明についても、必要に応じて、別紙を立てること。		

1. 第二種使用等をしようとする場所における本遺伝子組換え微生物の第二種使用等の実績に関する情報：

本遺伝子組換え微生物をもちいた大量培養等の第二種使用等の実績はない。

(注：使用実績があれば、「19XX年X月以降、本遺伝子組換え微生物を用いた製造を行っている。製造スケールは〇〇〇Lで、年間に約〇〇回の培養を行っている。」等を記載する。)

2. 過去の組換えDNA製造指針適合性の確認に関する情報：

本遺伝子組換え微生物について、組換えDNA製造指針適合性への確認申請は行っていない。

(注：過去に確認を受けていれば、実績を記載する。)

3. 予定される製造量(注：1において実績がない場合)

最終培養スケール：実容量約〇〇〇L

年間製造回数：約〇〇回

4. 同施設で既に確認を行っている遺伝子組換え生物の名称：

〇〇〇〇

5. 同一施設又は同一作業区域で取り扱う可能性のある(遺伝子組換え)微生物の名称及びクロスコンタミネーション防止策：

本工場においては、本遺伝子組換え微生物のほか、〇〇〇〇及び△△△△を扱うが、同一の期間に複数の微生物を扱うことは無く、作業区域、製造上で使用される設備は微生物毎に専用とされている。機器類は洗浄及び蒸気滅菌が行われ、最終洗浄液中の残留微生物の有無を確認する。微生物の残留が示唆される場合は、再度、洗浄及び蒸気滅菌を繰り返す。

6. 事故等緊急時における対処方法及び管理体制

作業区域は大量流出等を想定した床構造や廃水施設等を備えており、緊急時に速やかに関係者(工場長、製造管理者、製造安全主任者、製造従業者)に連絡ができる体制、手順書があらかじめ構築されている。大量流出等緊急時における手順を以下に示す。

1) マスク、手袋、防護メガネを装着し、漏出箇所を確認し直ちに流出を食い止める。

2) 専用容器に△%次亜塩素酸ナトリウム溶液をXXXmLとり、モップ等により周囲から流出液をふき取り、専用容器に絞り捨てる。使用したモップ等は、厚手のビニール袋に入れてオートクレーブで蒸気滅菌する。

3)、4)、5) … (以下、省略)

7. 連絡先：〇〇薬品株式会社 薬事部 〇〇〇〇

電話 03-XXXX-YYYY、FAX 03-XXXX-YYYY

(1) 分類学上の位置及び自然環境における分布状況

名称 : 大腸菌 JMXXX 株 (*Escherichia coli* K12 株由来)
 遺伝子マーカー : *vvvV, Wwww^t, Xxx^t, Yyy, Zxx^t · · ·*
 購入元 : ○○社製
 販売名「 」

註 :

- ・ 参考情報として、宿主の由来、性質等を示す宿主の入手に関する記録または販売されている実績など（製品証明書のコピー、カタログのコピーなど）を添付する。（可能な場合）
- ・ 宿主を入手後、増殖させ、保存したものを使用した場合には、そのときの手順、用いた培地の組成、培養条件、継代数、保存の温度管理等を記載すること。

(2) 繁殖又は増殖の様式

- ・ 増殖の様式 : 二分裂（至適条件下における宿主の倍加時間は約 30 分）
- ・ 酸素の利用法 : 通性嫌気性菌
- ・ 至適温度 : 一般に、28～40℃程度の温度条件下で増殖し、このうち 37℃付近が増殖には最も好ましい。
- ・ 栄養要求性 : 増殖にはロイシン及びチアミンを必要とする (*leuC7, thi-15*)。
- ・ 薬剤感受性 : 抗生物質（アンピシリン、テトラサイクリン及びカナマイシン等）に対して、薬剤感受性を示す。

註 : 汎用されていない微生物株の場合、他に

- ・ 増殖曲線
- ・ 自然環境水中における生存曲線
- ・ 薬剤耐性を示す実験結果 等

宿主に関するデータ等を整理して、これを示すこと。

なお、これらのデータについては遺伝子組換え微生物との比較試験を行っている場合には、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違の項（この場合、別紙4（5））で示すことも可能である。

(1) 供与核酸の構成

BIO-2004 遺伝子は、preBIO 細胞に作用して、BIO 細胞への分化・増殖を促進する BIO 増殖因子をコードするものである。BIO 増殖因子遺伝子は、ヒト第〇番染色体 q〇〇領域に存在し、〇個のエクソンと〇個のイントロンより構成され、このうち・・・(Journal Name, Vol. xx, pp zzz-zzz, (year))。

BIO 増殖因子の製造に使用される遺伝子組換え大腸菌 (KP411 株) 作製のための供与核酸は、全長 1,207 bp から成り、次に示すような 3 つの領域 (①BIO-2004 遺伝子、②その翻訳開始に必要な領域、③ベクターに挿入するための制限酵素部位) より構成される。

①BIO-2004 遺伝子

ヒト胎児肝臓由来の mRNA を〇〇法を用いて cDNA を合成し、〇〇ベクターに組込んで作製した cDNA ライブラリーより□□法を用いて、BIO 増殖因子をコードする領域を含む開始コドン上流△△塩基から終止コドン下流〇〇塩基までの cDNA を単離した。さらに、大腸菌において発現効率を高めるため cDNA 内の〇箇所のコドンに△△法を用いて変更した。(注：この場合、翻訳後のアミノ酸の置換があるのか否かを明記する)

②翻訳開始に必要な 5'改変領域

①において単離した cDNA の、開始コドンから上流の 5'末端領域 (シグナルペプチドとして機能する配列 (XXXXXXXXXXXXXXXXX) を含む) を除去し、新たに大腸菌内において翻訳開始に必要な SD 配列及び開始コドン(ATG)を含む 25 塩基よりなる配列を化学合成し付加した領域を示す。

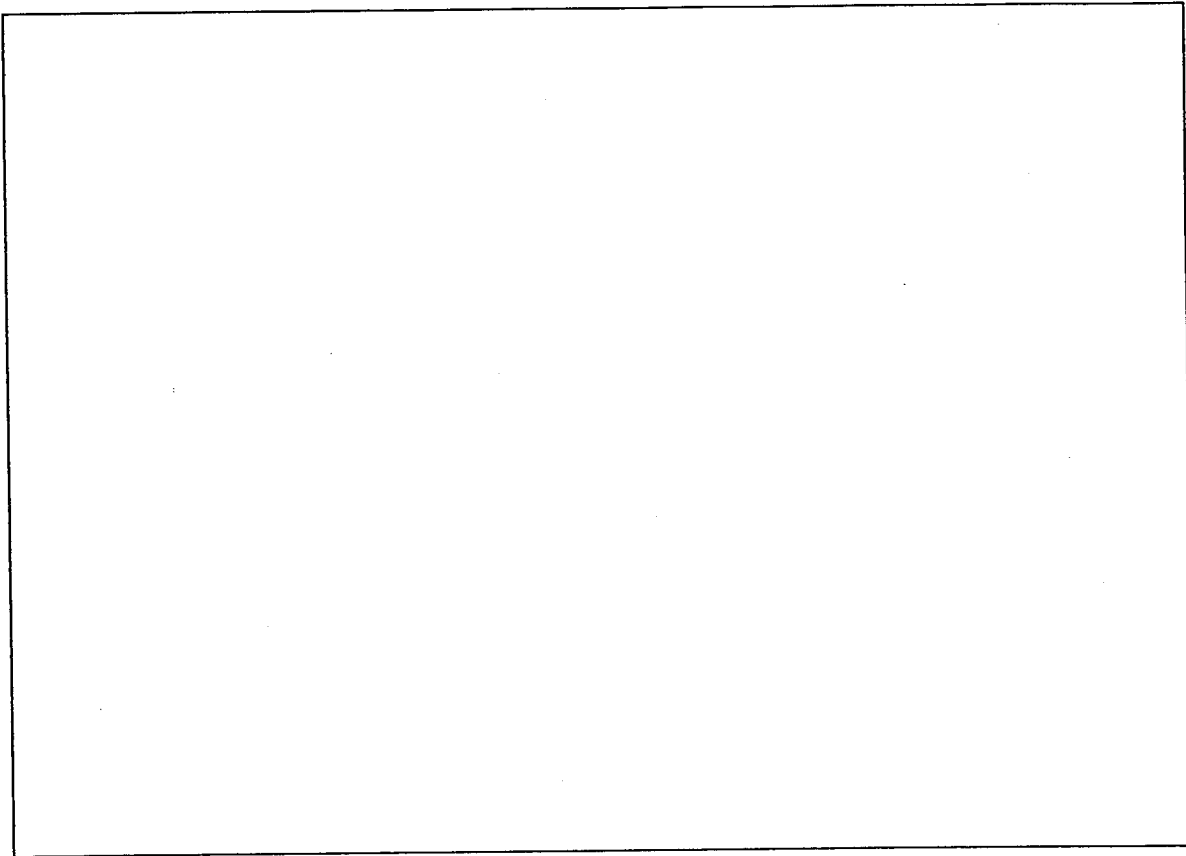
③ベクターに挿入するための制限酵素部位

②の 5'側及び①の 3'側に、ベクターへの挿入を可能とするよう、5'末端に *Bam*HI 認識配列及び 3'末端に *Hind*III 認識配列をそれぞれ付加した領域を示す。

注： 供与核酸には、目的以外の蛋白質を発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと、また、その確認に当たっては、1つの遺伝子内に開始コドンとして働く ATG 塩基配列が複数存在しないこと、及び、目的の蛋白質以外の蛋白質を発現する可能性がないことがノーザンブロット法、RT-PCR法を用いて確認できていること等を説明する。

(2) 制限酵素地図

図 2-1 に供与核酸の制限酵素地図を示す。



註：必要に応じて遺伝子地図をつける。

図 2-1 供与核酸の制限酵素地図

註：図に関する説明（領域の区分け等の説明も含む）を追加すること。

(3) 供与核酸の全塩基配列

上述の①～③の領域より構成される供与核酸の塩基配列を図 2-2 に示す。

-31 -1
GGA TCC TTTGACA GTCTAGGAG GTAGTCTAGC
*Bam*HI

1 31
ATC TCT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC
 Met Ser Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe

61 91
 GGT AAT GAG TCT GGT GCA GCA TCT GCA CTT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT
 Gly Asn Glu Ser Gly Ala Ala Ser Ala Leu Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn

121 151
 GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT GCA CTT GGT CTT GGT AAG CAC AAT TAT GGT
 Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Gly

181 211
 GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GCA CAC GTT CTT AAG AAT CGA CGA CTT ACC
 Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn Ala His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr

241 271
 GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT
 Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn

301 331
 CAG TTC GAT ATT AAG GGT GGT CTT TTC GCA GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT
 Gln Phe Asp Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn

361 391
 ATT TTC GCA AAG CAC CGA CGA TCT CCA GGT GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT
 Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn

421 451
 GAG GGT AAT TCT GAT GGT TAT TTC GGT AAT GCA TTC CAG GAG CGA TTC CCA CCA CAC CAC
 Glu Gly Asn Ser Asp Gly Tyr Phe Gly Asn Ala Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His

481 511
 GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GTT GTT CCA GGT GAG GAG GAG CAG AAG TTC
 Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe

541 571
 GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT GGT TAT TTC GGT AAT
 Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn Glu Gly Asn Ser Asp Gly Tyr Phe Gly Asn

601 631
 GCA CTT CTT CAG CTT AAG TCT GAT TCT TCT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT
 Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn

661 691
 ACC GTT TGC CTT CCA CCA GCA GAT CTT CAG GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT
 Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn

721 751
 GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT TTC TAT TCT GAG CGA CTT AAG GAG GCA CAC
 Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His

781 811
 GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT TCT CAG CAC CTT CTT AAT CGA ACC GTT ACC
 Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr

841 871
 GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT GAG GGT AAT TCT GAT TGC TAT TTC GGT AAT
 Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn

901 931
 GCA GCA CAG GGT GAT TCT GGT GGT CCA CTT GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT
 Ala Ala Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn

961 991
 GTT GGT ATT ATT TCT TGG GGT CTT GGT GCA GAG GGT AAT TCT GAT GCA TAT TTC GGT AAT
 Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Ala Glu Gly Asn Ser Asp Ala Tyr Phe Gly Asn

1021 1051
 GAG GGT AAT TCT GAT GGT TAT TTC GGT AAT GAT AAT ATG CGA CCA GAT CAC GCA TCT ACC
 Glu Gly Asn Ser Asp Gly Tyr Phe Gly Asn Asp Asn Met Arg Pro Asp His Ala Ser Thr

1081 1111
 CCA GGT TAT CTT GGT TTC GTT GAG TCT GAG ACC CTT CAG GTT CCA CGA GAT ACC CTT GGT
 Pro Gly Tyr Leu Gly Phe Val Glu Ser Glu Thr Leu Gln Val Pro Arg Asp Thr Leu Gly

1141 1171
 GCA CAG ATT GCA ACC CCA GCA TAT AAG GGG TAG ATAA AAGCTT
 Ala Gln Ile Ala Thr Pro Ala Tyr Lys Gly *

図 2-2 供与核酸の塩基配列

_____ : 大腸菌での発現のため付加した配列

: ベクターへの挿入のために付加した制限酵素部位

: 開始コドン及び終始コドン

註 : codon usage 等から塩基置換を行った場合は、置換前後を二列で並べて表示したり、コドンを変えた部分に印 (または太字) をつける等して、改変部分を見やすくすること。

(4) 既知の有害塩基配列との相同性

上記(2)の BIO-2004 遺伝子の塩基配列(コドン変更後)を問い合わせ配列として、以下の相同性検索システム及び遺伝子データを用い検索を行った。

方法

- ・システム：□□□□□□相同性検索システムver. x.x
- ・遺伝子データ：□□□□□□遺伝子データベース、△△△△△△遺伝子データベース

結果

検索の結果を、表やリスト形式で示す。

e-value が0.00以下を示す遺伝子の中に、現在までに知られている有害な遺伝子(トキシン遺伝子、がん遺伝子等)と相同性の高い配列は含まれていないことが確認された。

注：ベクター、発現プラスミドについても、有害塩基配列との相同性の検討があれば、それぞれの項において同様に結果を記載すること。

(1) ベクターpKC124の作製方法

ベクターpKC124は、○○○に存在することの知られたプラスミド pBIO303 に由来し(*Journal Name*, Vol. xx, pp zzz-zzz, (year))、この中に含まれる複製調節領域の機能により自律複製が行われるものである。

pKC124は、塩基数 5,392 bp より成り、pBIO303 の複製調節配列を含む *ClaI*-*XbaI* 領域に次に示す 4 つの機能領域 (①**プロモーター領域、②遺伝子組込み領域、③転写終結領域、④アンピシリン耐性遺伝子領域) を挿入することで作製される。

①**プロモーター領域

大腸菌○○遺伝子のプロモーター配列であり、大腸菌内において恒常的に遺伝子の転写を行う機能を有する。ただし、②の遺伝子組込み領域に組込まれた遺伝子を転写する以外の機能を有しない (*Journal Name*, Vol. xx, pp zzz-zzz, (year))。また、...

②遺伝子組込み領域

化学合成により作製された 5 つの制限酵素部位 (*EcoRI*, *BamHI*, *XhoI*, *HindIII* 及び *BgII*) から成る配列であり、開始コドンと終止コドンを有する遺伝子を組込む領域としてのみ機能する。特定の遺伝子はコードしない。また、...

③転写終結領域

大腸菌○○遺伝子の転写終結に機能する配列であり、遺伝子組込み領域に組込まれた遺伝子の転写を終結し、大腸菌内における転写産物の安定に寄与する。(*Journal Name*, Vol. xx, pp zzz-zzz, (year))。また、...

④アンピシリン耐性遺伝子領域

プラスミド pBR322 の *PvuII*-*HindIII* 領域であり、××プロモーター領域及びβ-ラクタマーゼ遺伝子領域ならびに転写終結領域からなる (厚生省告示の自動化リスト別表第三の「アンピシリン耐性遺伝子/β-ラクタマーゼ遺伝子: *Escherichia coli* transposon Tn3」)。本領域を持つプラスミドを移入された大腸菌にアンピシリン耐性の形質が付与される。本領域の機能は遺伝子移入された大腸菌の選択にのみ使用される。また、...

pBIO303 の由来である○○○について、伝染性、病原性及び伝達性を示すような報告はこれまでになく、ベクターpKC124 について伝染性、病原性及び伝達性はないものと考えられる。

註：使用するベクターの宿主域の説明を行うこと。

註：選択した薬剤耐性遺伝子の由来・性質を明らかにし、この薬剤耐性遺伝子の使用の状況 (自社の○○の製造において、○年以上の使用の歴史を有する等) を簡潔に述べること。

本ベクターは、以下の○段階を経て調製された（図3-1）。

①

②

③

註：ベクターの作製方法について、イラストや流れ図を適宜用いて示す。各操作については、操作の目的と手順、用いる試薬等を簡潔に記載する。

(2) ベクターpKC124の構造

ベクタープラスミドpKC124の構造を図3-2に示す。

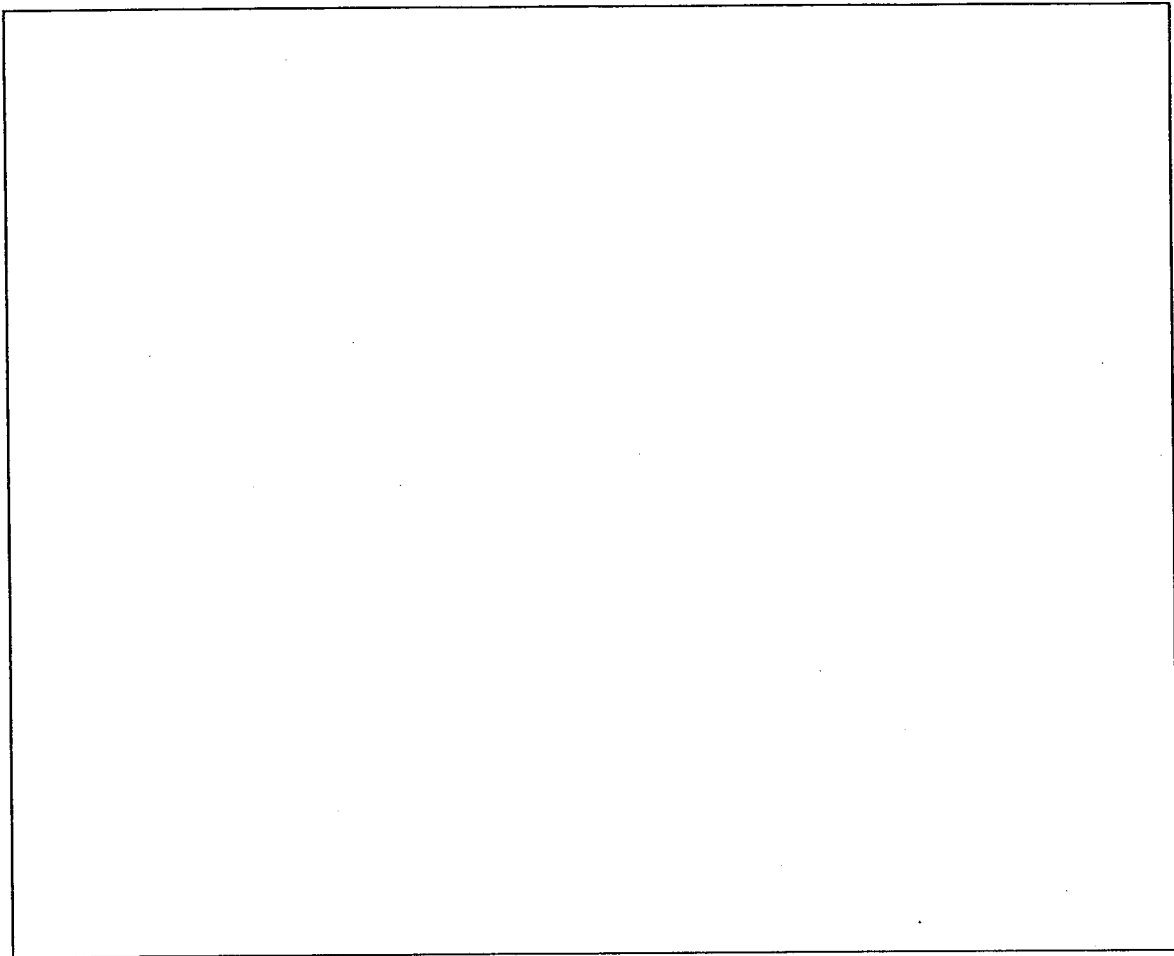


図3-2 ベクター機能領域説明図

註：機能領域を適宜区分けして示し、制限酵素切断部位、遺伝子の向き等を記入する。

(3) ベクターpKC124の塩基配列

注：ベクターの塩基配列を確認している場合は、全塩基配列を記載すること（数ページにわたってもよい）。

（全塩基配列については、発現構成体（発現プラスミド）の段階で確認を行っている場合、発現構成体の構造にかかる項に記載することでもよい。塩基配列を掲載する場合には、本確認申請者が確認したものか、ベクター供与者（入手元）で確認されたものか、あるいはその両方で確認したものか記載すること。）

全塩基配列

(1) 発現プラスミドの構築法

発現プラスミド pBIO457 は、以下のような1)～6)手順で作製された(以下に各操作1)～6)について説明すること)。

1)

2)

3)

4)

5)

6)

発現プラスミドの調製フロー図を以下に示す（図4-1）。

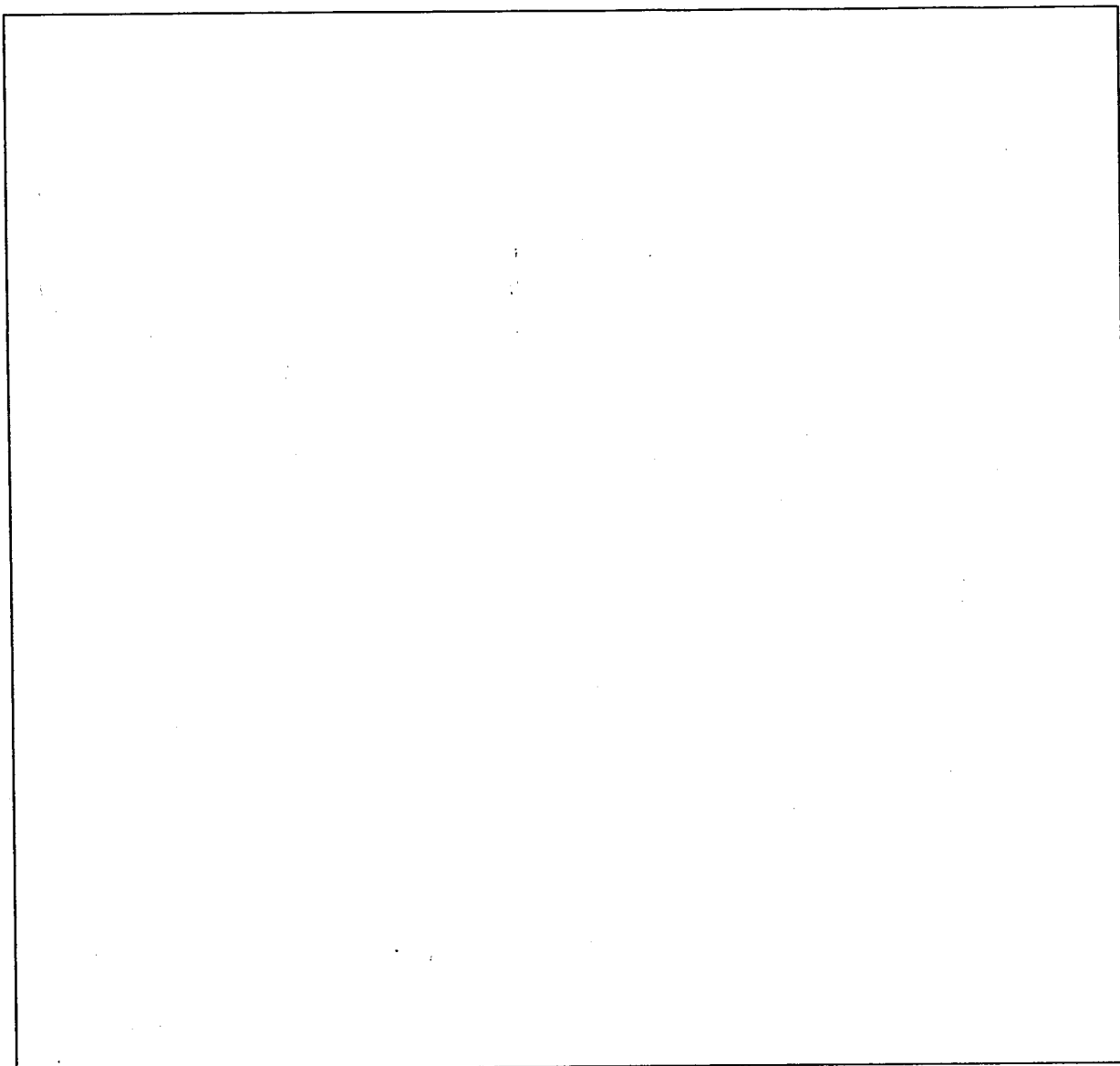


図4-1 発現構成体の調製フロー図

註：実際の構築手順を踏まえて、各段階を詳記する。

(2) 発現プラスミドの構造

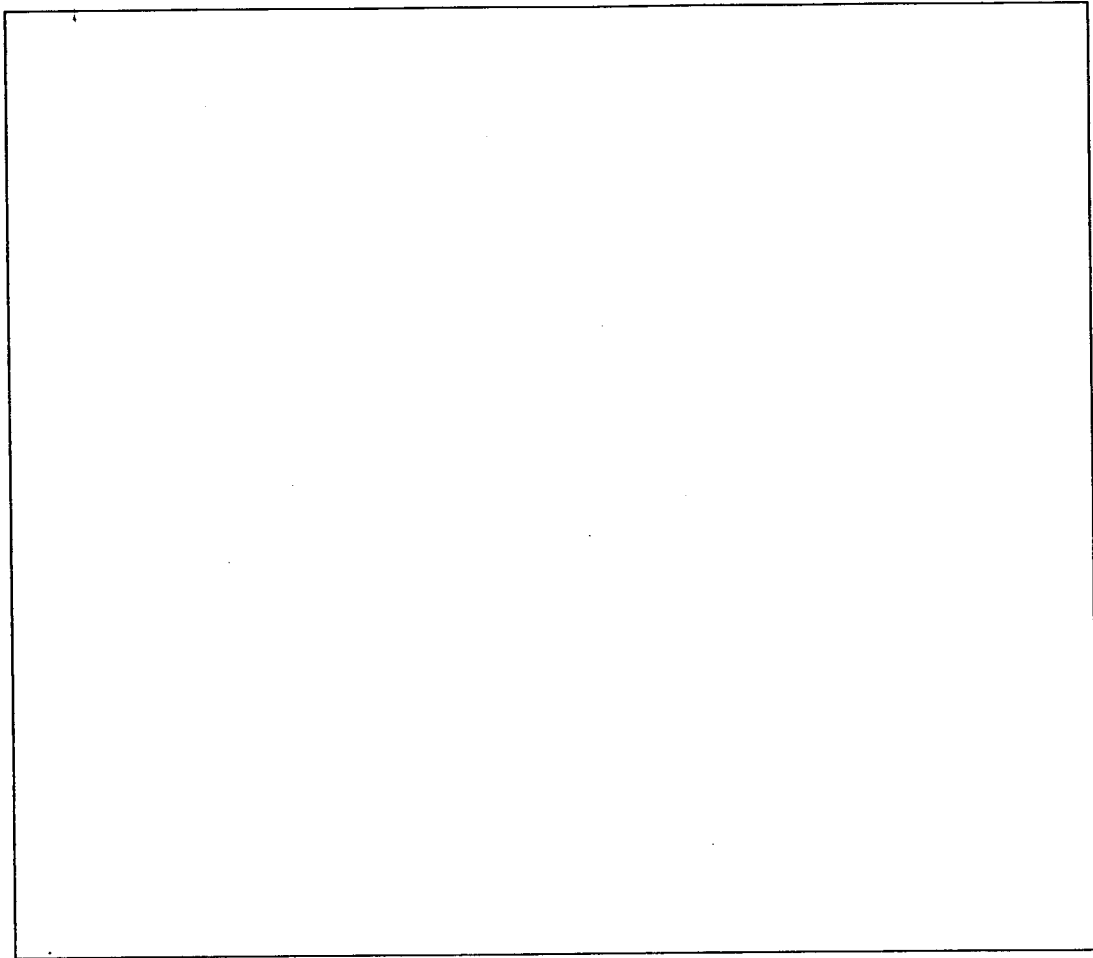


図4-2 発現プラスミドの構造

註：機能領域を適宜区分けして示し、制限酵素切断部位、翻訳領域、非翻訳領域、遺伝子の向き等を記入する。

(3) 遺伝子組換え生物の育成経過
 図4-3に・・・・・・を示す

註：宿主に発現プラスミド等を導入する部分は、単コロニー取得の方法、継代数等が明らかになるように、宿主からセル・バンクの確立までのフロー図を記載する（液量、使用培地等がわかるように）。また、フロー図には、各工程の説明を加える（セル・バンクについては、作製から保存まで記載する）。

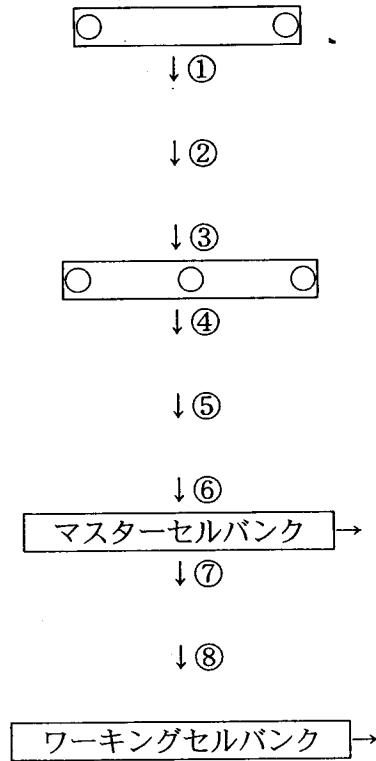


図4-3 遺伝子組換え生物作製のフロー図
 (フロー図の簡単な説明)

以下に、各操作の概略を示す。

①

②

③

④

⑤

⑥

⑦

マスターセルバンク更新時の試験項目

試験項目	試験の内容	判定基準	実測値
生存率		〇〇%以上	

⑧

⑨

ワーキングセルバンク更新時の試験項目

試験項目	試験の内容	判定基準	実測値
生存率		〇〇%以上	

註：マスター・セル・バンク、ワーキング・セル・バンクについては、更新の方法（どこから作り直すか）、更新の時期、更新時や保存時の試験項目について、簡略に説明する。なお、試験項目については、試験項目名、試験の内容、判定基準、実測値などの一覧表もつける。
試験項目に応じ、ゲルの泳動パターン、カラム溶出パターン等も掲載する。

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性

注：作製した遺伝子組換え微生物の核酸の存在状態や発現の安定性を確認した試験結果があれば、これを示すこと。

(5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

遺伝子組換え微生物 (KP411 株) は、BIO 増殖因子生産能及びアンピシリン耐性が付与されたことを除いて、宿主 (JMXXX 株) と同様の特性を示すと考えられる。本遺伝子組換え微生物は、・・・を行うことによって検出することができ、・・・を確認することによって識別が可能である。

遺伝子組換え微生物の性質、及び宿主との相違点を以下に示す試験を実施して確認した。

<検討を行った項目>

- ・
- ・
- ・
- ・
- ・
- ・

1) 耐性マーカーの確認

宿主に移入した発現プラスミド (pBIO457) は、細胞質内に存在し、保有する複製調節領域の機能により自律複製を行うものである。発現プラスミド (pBIO457) の遺伝子組換え微生物 (KP411 株) 中におけるプラスミド保持について、次のような条件にて評価を行った。

① 試験方法

作製したマスターセルバンク又はワーキングセルバンクを滅菌水で適切な菌濃度になるように希釈し、アンピシリン添加寒天培地に塗布する。これを〇℃で〇〇時間培養し、・・・

② 結果

# 1		
# 2		
宿主 (JMXXX)		

この結果から、・・・

2) プラスミドの構造確認

①試験方法

マスターセルバンク又はワーキングセルバンクを液体培養し、〇〇の方法によりプラスミドを抽出し、制限酵素処理を施し、アガロース電気泳動により測定する。用いた制限酵素は以下のものである。

泳動後、・・・

②結果

--

註：電気泳動等の結果を示す。

制限酵素名	塩基配列からの理論値 (bp)	実測値 (kbp)
<i>Bam</i> HI		
<i>Eco</i> RI		

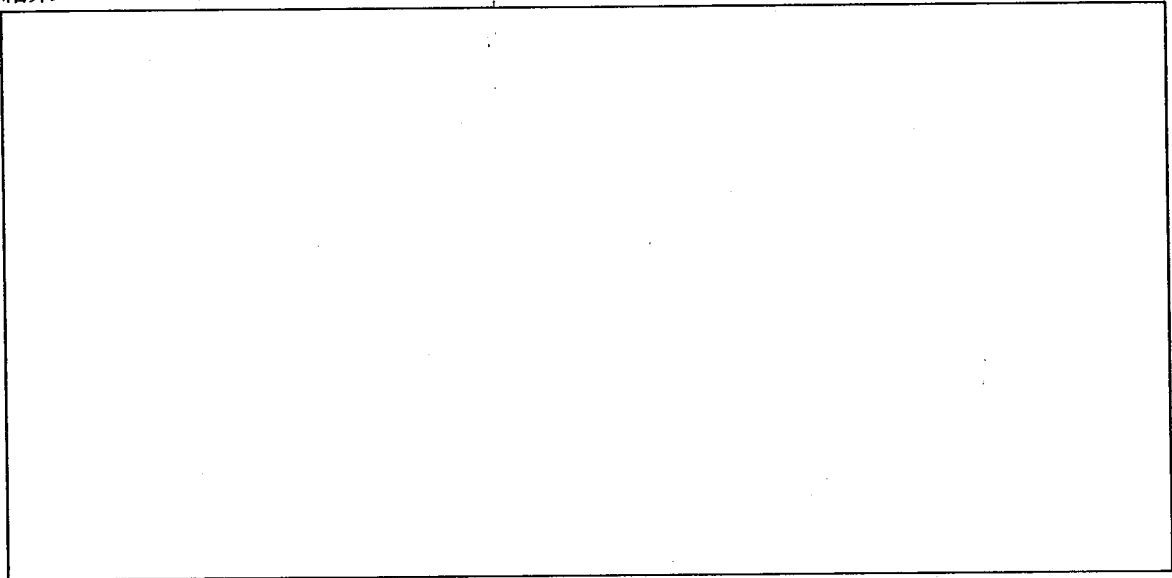
……によって、……付近に、……が確認された。

3) BIO 増殖因子の発現の確認

遺伝子組換え微生物 (KP411 株) より発現する BIO 増殖因子について、次のような条件にて評価を行った。

①試験方法

②結果



註：電気泳動等の結果（ゲル写真等）を示す。

（試験結果）

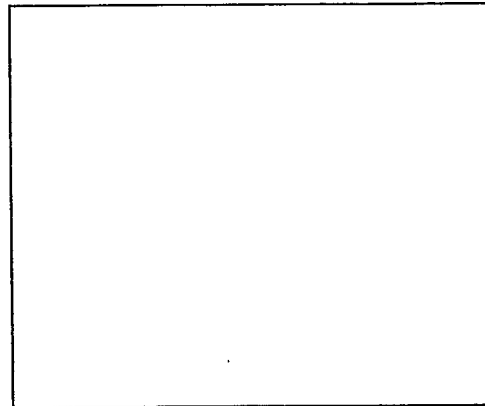
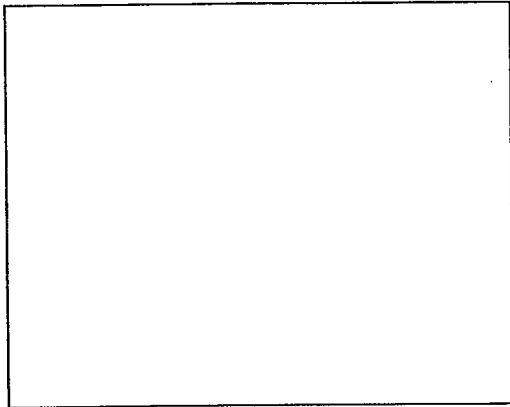
4) 下水中、土壌水等における生存能力

①試験方法

用いた〇〇：

〇水の調製：

②結果



注：宿主と同等か又はそれ以下であること等、結果を示す。

注：このほか、遺伝子組換え微生物の性質、及び宿主との相違点などについて実施した試験結果は、データを示して簡略に記載する。

- 〇〇薬品株式会社 世田谷工場を含む東京都世田谷区〇〇〇1丁目周辺地図を以下に示す。
- 〇色で囲む区域が〇〇薬品株式会社 世田谷工場である。

図〇 〇〇薬品株式会社 世田谷工場周辺地図

注 地図の添付は省略した。

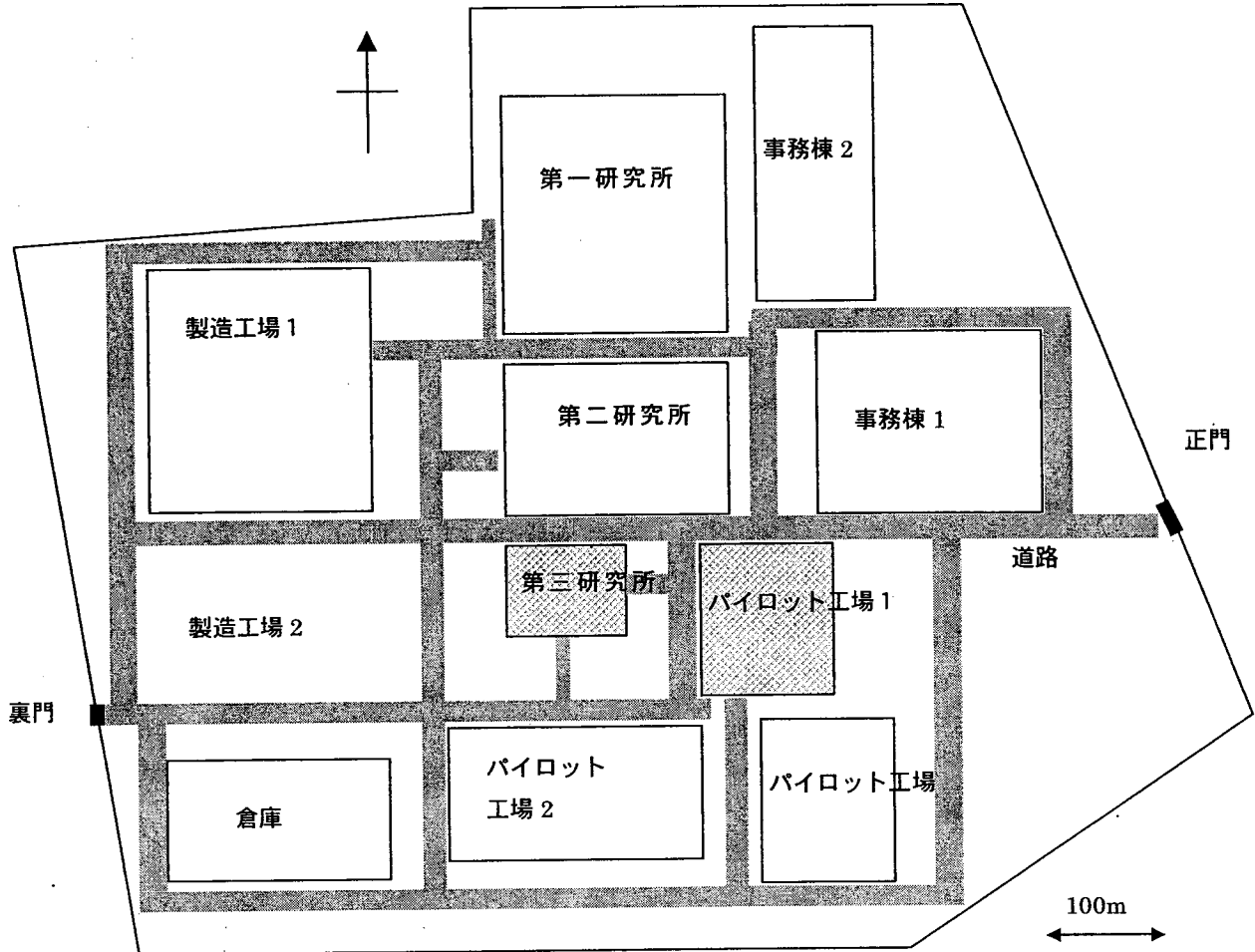
施設の周囲数百メートルの範囲がわかる程度の地図を添付すること。

施設の特定が難しい場合などには必要に応じ縮尺の異なる地図を添付すること。

(地図は大きいものを掲載し、複数枚ある場合は1ページに1枚を添付するのがよい。)

〇〇薬品株式会社 世田谷工場内の施設配置図を示す。

〇色で示す第三研究所及びパイロット工場1で遺伝子組換え微生物を使用する。(記載例では、白黒であるが、カラーを使って明確にすることが適切である：他項も同様)



図〇〇〇薬品株式会社世田谷工場施設配置図

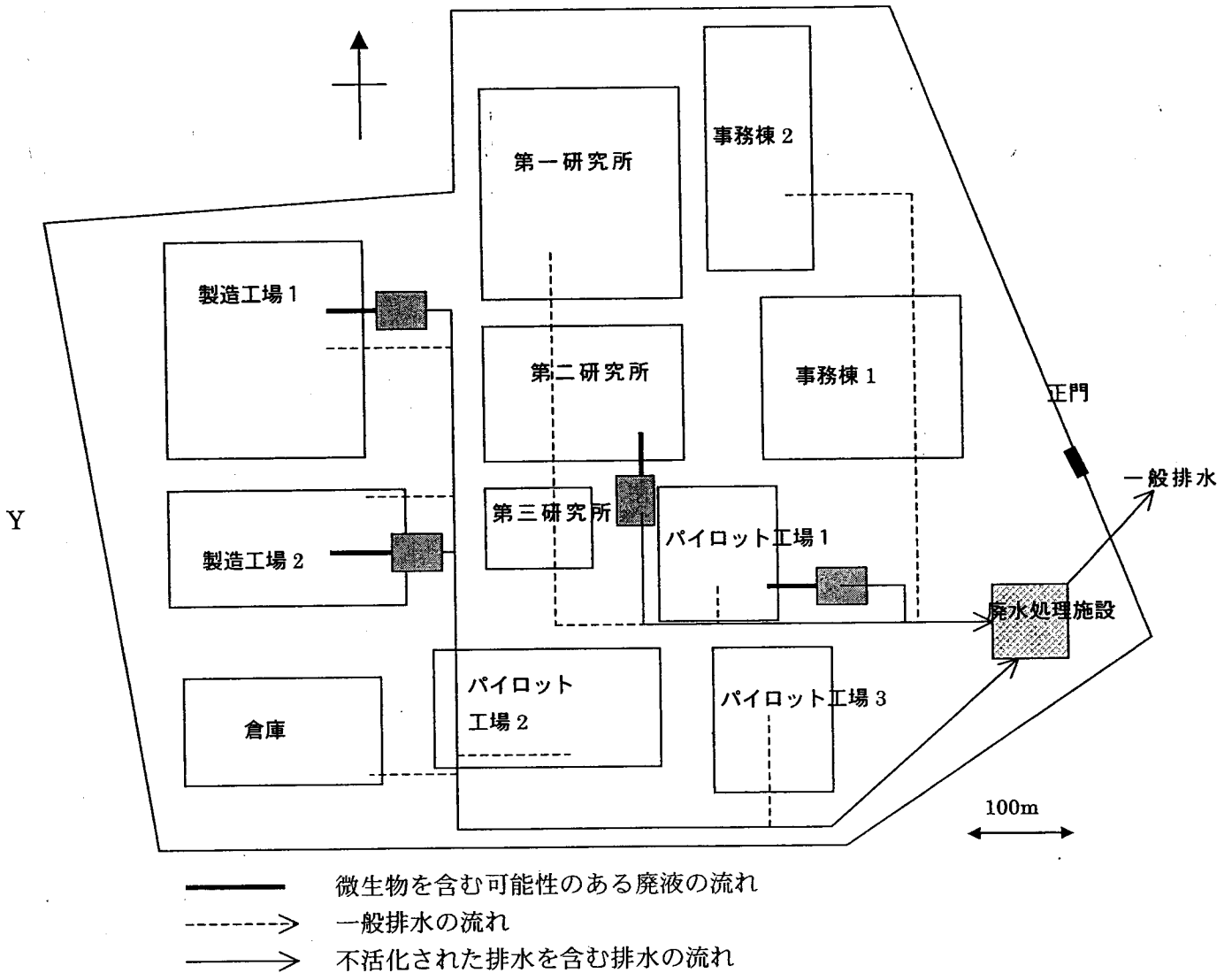
工場の周囲は、厚さ 30cm 程度、高さ 5m 程度のコンクリート製の壁で囲まれている。

〇〇薬品敷地面積：〇〇〇〇 m²

第三研究所：建物面積 〇〇〇〇 m²：1995 年建造

パイロット工場 1：建物面積 〇〇〇〇 m²：1990 年建造

〇〇薬品株式会社 世田谷工場内の排水経路図を示す。



図〇 〇〇薬品株式会社世田谷工場排水経路図

パイロット工場 1 の微生物を含む可能性のある廃液は排水管を経て専用の排水槽 (○色四角で示す) に集められ、〇〇%△△を用いて不活化される。不活化された排水は施設内の廃水処理施設へ移送され、〇〇処理及び〇〇処理 (XX, XX) を行った後に施設外の一般排水に放流される。

今回使用するパイロット工場 1 の排水槽は、〇〇製で△△△△L の容量である。パイロット工場 1 の最大培養タンク容量が 1500L であり、その培養液が一度に流出しても処理できる容量であり、一般排水への流出の危険性はない。

なお、現在、第二研究所、製造工場 1 及び製造工場 2 では他の微生物を扱うことがあり、それらについても各施設の専用の排水槽に集められ、〇〇%△△を用いて不活性化され、同様に廃水処理施設に移送される。

(1) 配置

1) 作業区域の設定

パイロット工場 1 培養室 1、2、3、4、研究棟 3 実験室 5 を作業区域とする。
作業区域と非作業区域とは、○によって明確に隔てられている。
作業区域をあらわす表示等があれば、説明すること。

2) 工場の平面図及び作業区域の平面図

研究棟 3 の平面図については、図○に示した。実験室 5 を灰色で示す。
パイロット工場 1 の平面図については、図□に示した。培養室 1、2、3、4 を灰色で示す。

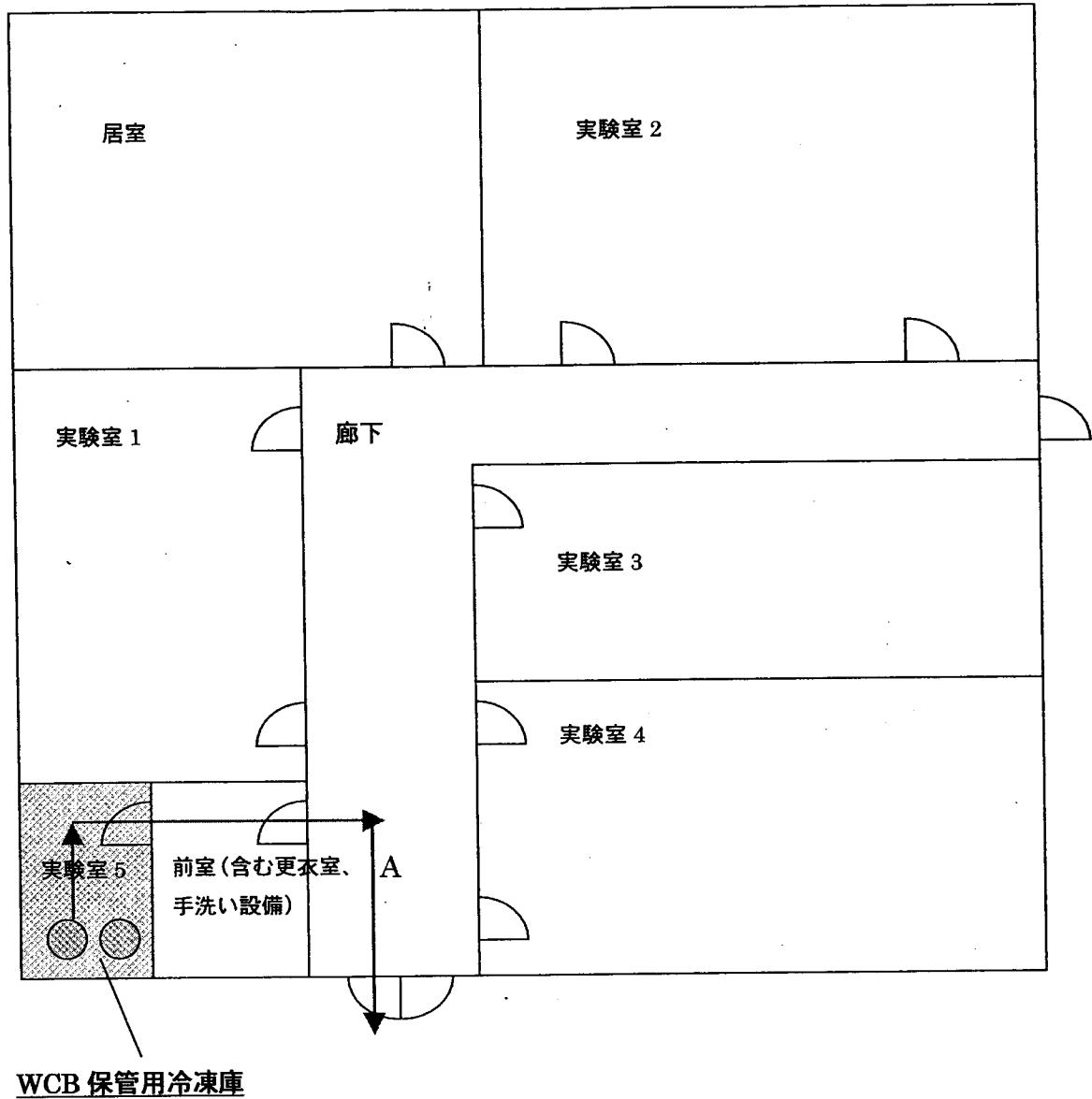
3) 生産に使用する主要な設備及び装置の配置平面図

研究棟 3 実験室 5 には、ワーキングセルバンク保管用の冷凍庫がある。
パイロット工場 1 培養室 1 及び培養室 2 には、安全キャビネット、インキュベーター、オートクレーブがある。
パイロット工場 1 培養室 3 には、150L 培養タンク 2 基、300L 培養タンク 2 基がある、
パイロット工場 1 培養室 4 には、1500L 培養タンク 2 基、遠心分離機、限外ろ過機、オートクレーブがある。
各装置の配置の概要は前掲図○、図□に示すとおりである。
培養室 3、4 の培養タンク、遠心分離機、限外ろ過機は専用の配管で連結され、ポンプが設置されている。さらに限外ろ過機と作業区域外の後処理室の反応器も配管がされている。

註：適宜、写真等を持ちいて説明すること。

4) 生産に使用する設備および装置の仕様

前掲の培養タンクはステンレス製でメカニカルシールにより密閉されている。
遠心分離機は…………… (省略)。



図〇 研究棟3 平面図

灰色で示す区域で遺伝子組換え微生物を扱う。遺伝子組換え微生物及び生産物の動きを矢印で示す。

註：この図には示されていないが、作業動線を記載すること。

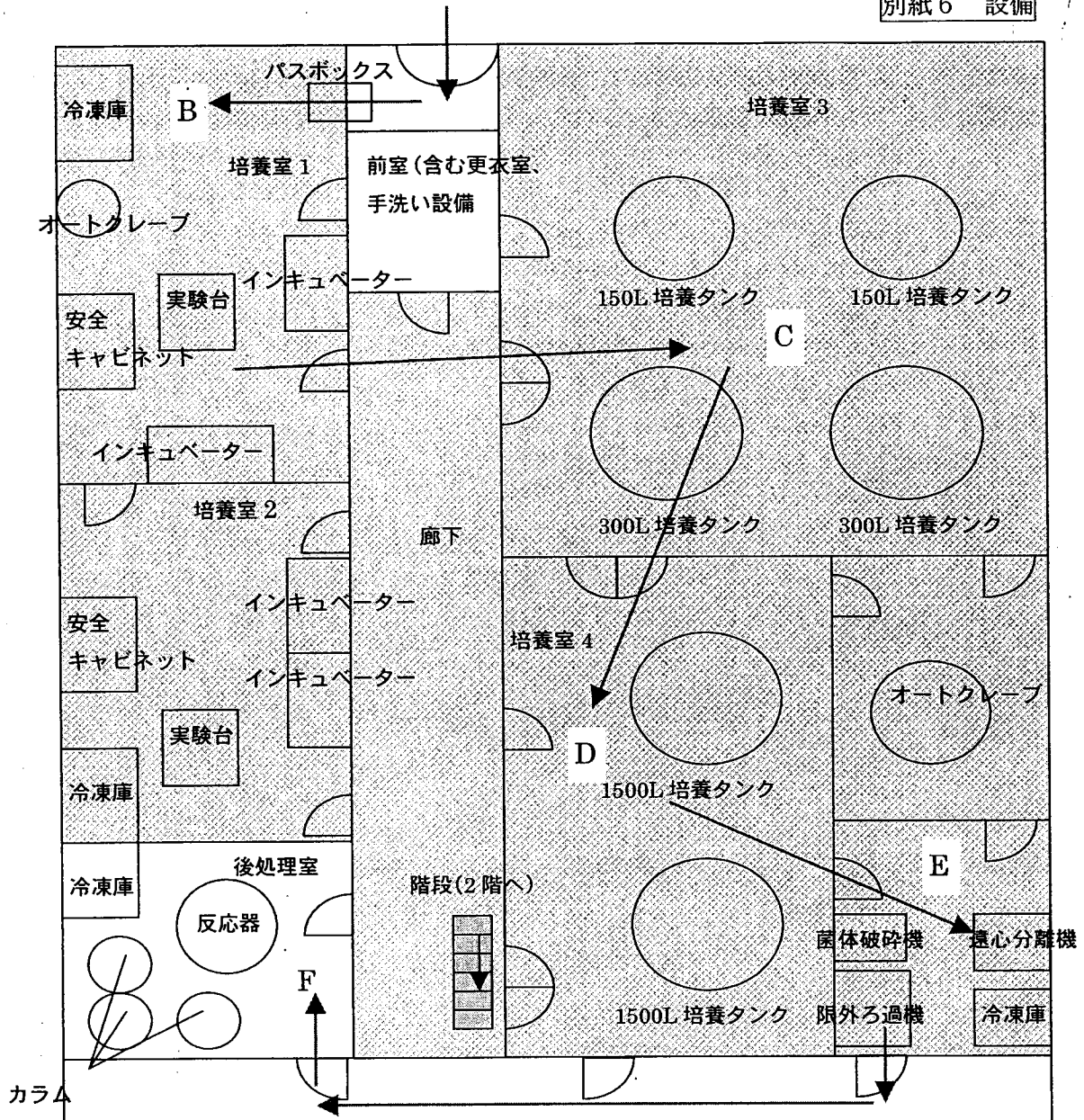
主な作業：

A) 実験室 5 内にある WCB 保管用冷蔵庫から遺伝子組み替え体の WCB のバイヤルを取り出し、密閉容器に入れる。WCB の入った密閉容器をパイロット工場 1 に運搬する。

註：運搬する場合の拡散防止措置（内容器、外容器等）についても具体的に記載する。

備考：

WCB 保管用冷蔵庫については、実験室 5 内での設置位置を移動する場合もある。



図〇 パイロット工場1 1階平面図

註：この図には示されていないが、作業動線を記載すること。

註：2階の平面図については省略したが、1階同様に作成する。

主な作業：

- B) 培養室1又は2内でWCBを融解し2Lまで培養を行う。培養液の入ったフラスコを専用の運搬容器を用い培養室3に移動する。
- C) 培養室3で100L培養する。培養液を専用のポンプ、配管で培養室4培養タンクに移送する。
- D) 培養室4で1200L培養を行う。培養液を専用のポンプ、配管で遠心分離機に移送する。
- E) 培養液を遠心分離する(組換え微生物の分離)。(註：途中の工程は省略)。得られた溶液を限外ろ過機を用いて濃縮する。
- F) 得られた溶液を専用のポンプ、配管で後処理室へ移送し修飾反応を行った後、精製を行う。

備考：

培養タンクのように装置が複数あるものについては適切な装置を選択し操作を行う。

各室に設置されている機器、装置についてはパイロット工場1内で設置位置を移動することもある。

(2) 構造

註：以下の記載を行う。適宜、写真・イラスト等を持ちいて説明すること。

1) 換気設備

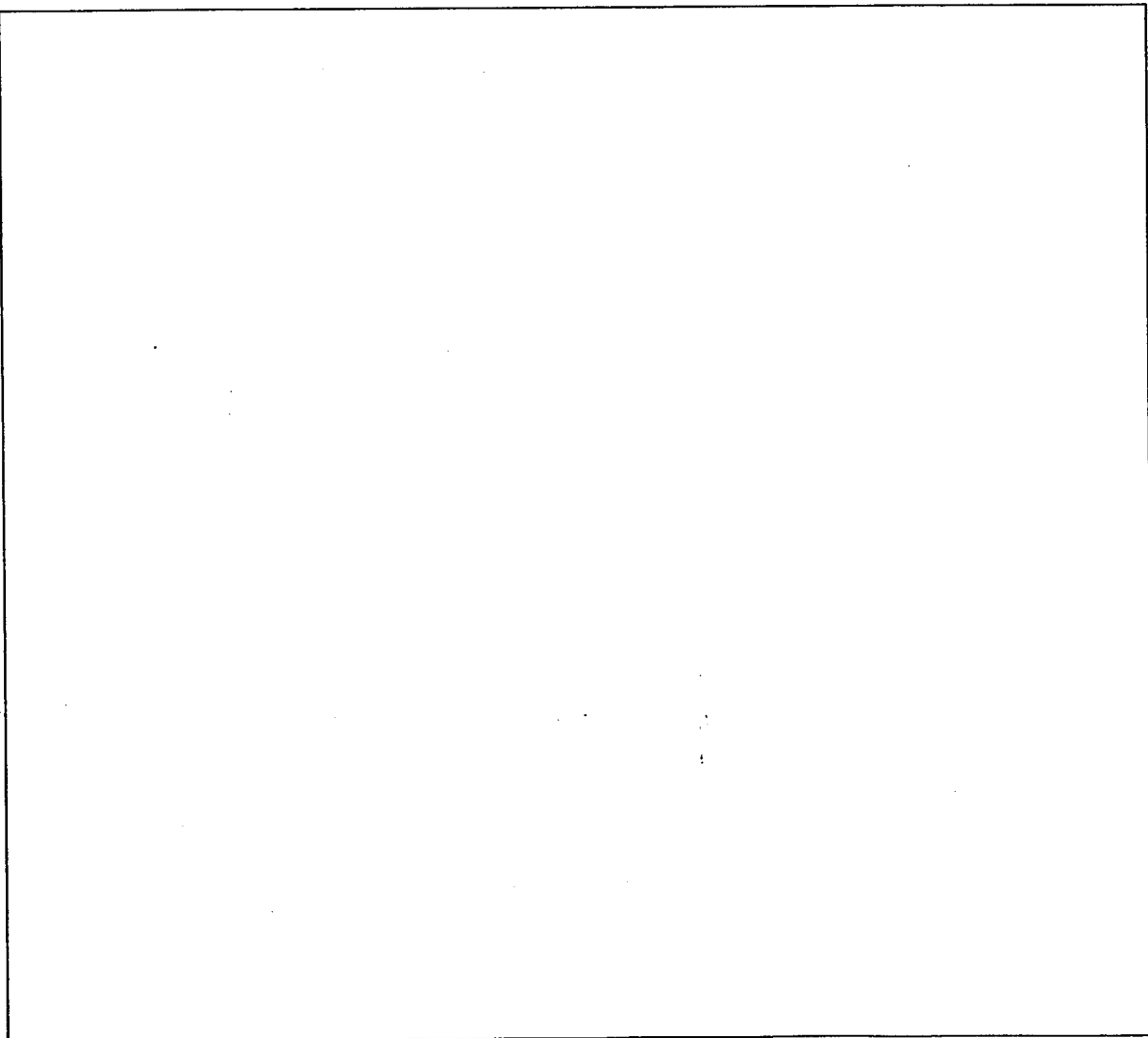
註：工場全体の空調について、吸気系および排気系の概略、換気の方法（一方向か）、HEPA フィルターの性能（その定期点検等の実施頻度）、工場・作業区域での清浄度、等について詳しく説明する。

*気圧管理

気圧管理について記載すること。気圧の数値の管理について、日々の管理の状況を反映して、記載すること（毎日、巡回等して確認をおこなっているのか）

*安全キャビネット等における、空気の流れも説明すること。

*空気の流れについて（特に、培養室等への空気の供給・排気）は、図示すること。外気の取り込みや排気の系統、平面図等の複数の図を活用すること。気圧管理を行っている場合は、陰圧の区域に色をつけるなど、工夫すること。



2) 排水設備

廃液、排水の流れ図を示すこと。(図○)
 水槽の大きさも記入すること。

3) 天井面、壁面、床の構造

それぞれの仕様について、具体的な材質をあげ、必要に応じて図示する等して、説明すること。

4) その他

培養液の送液に用いる配管、それらを構成している主要な部品についても、材質等の仕様を明記すること。

(3) 生産工程

註:以下の記載を行う。

- ① 製造工程についてその内容がわかるように文章で具体的に説明を行う。

- ② 製造工程全体を理解できるような流れ図を示す。
(製造工程については、遺伝子組換え微生物を使用しない後処理工程等も含めて全体を示し、その中で遺伝子組換え微生物を扱う工程を明示すること。)

- ③ ①で示す製造について重要な工程については、使用する機器、装置、装置のバルブ位置等を写真・イラスト等を使用して示し、詳しく説明する。

(4) 遺伝子組換え微生物の処理方法

製造に使用した遺伝子組換え微生物の不活化等の処理方法を具体的に記載する(どのような条件か、数字を挙げて具体的に示すこと)。

この処理方法が適切であることを確認した結果(生菌数のモニタリング等)があれば、これを示すこと。また文献があれば説明すること。

註：このほか、様式の「その他」の項で説明されている項目についても、必要に応じて別紙を立てること(たとえば、大量流出時の対応、管理体制の説明図等は、組織図を用いて説明を行った方が理解しやすい場合がある。)

註：この他、本申請の主旨から考えて重要度の高いと考えられる文献等は、コピーを添付すること。