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

令和〇年〇月〇日

厚生労働大臣　殿

|  |  |
| --- | --- |
| 氏名 | 〇〇株式会社代表取締役社長　〇〇　〇〇 |
| 申請者 |
| 住所 | 東京都〇〇 |

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いので、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 | 【記載例】＜キャプシドの血清型（◆）とITRの血清型（◆）が同じ場合＞*rep*及び*cap*遺伝子を欠失し、〇〇を発現するアデノ随伴ウイルス◆型（株名）＜キャプシドの血清型（◆）とITRの血清型（■）が異なる場合＞*rep*及び*cap*遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス◆型に由来するキャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス■型に由来するITRを有し、〇〇を発現するアデノ随伴ウイルス（株名） |
| 第二種使用等をしようとする場所 | 名称 | 【記載例】〇〇株式会社 〇〇工場 |
| 所在地 | 【記載例】郵便番号〇〇〇-〇〇〇〇東京都〇〇〇【留意事項】※製造施設が複数あり、住所が複数となる場合であっても、管理体制が同一の場合には1申請として差し支えない。 |
| 第二種使用等の目的及び概要 | 【記載例】*rep*及び*cap*遺伝子を欠失し、〇〇を発現するアデノ随伴ウイルス◆型（〇〇（株名）、以下「本遺伝子組換え生物等」という。）は、遺伝子治療用製品（治験製品を含む）として使用する。〇〇細胞に3種類のプラスミド（ベクタープラスミド、パッケージングプラスミド及びヘルパープラスミド）を導入し、本遺伝子組換え生物等を産生させる。培養液を回収後、精製を行い原薬とする。また、原薬を〇〇し、最終製剤とする。精製後の品質管理試験において増殖能を獲得した本遺伝子組換え生物等（rcAAV）が検出されないことを確認する。遺伝子組換え生物等を含有する可能性のある廃液、使用済み容器等は、高圧蒸気滅菌又は〇〇により不活化処理を行う。 |
| 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 | 【記載例】本遺伝子組換え生物等の宿主は、パルボウイルス科（*Parvoviridae*）パルボウイルス亜科（*Parvovirinea*）デペンドパルボウイルス属（*Dependoparvovirus*）に属するヒトアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus; AAV）と呼ばれるウイルスの一つである。AAVは通常ヒトを自然宿主とするが、サル等の霊長類から単離される場合もある。AAVの主な血清型（AAV2型、AAV5型等）では、小児期の感染により、成人の約半数が中和抗体を有するとされるが、ヒトへの病原性を有するAAVの報告はない。AAV自体は、自己複製機能を欠損しているため、AAVの感染細胞に共感染したアデノウイルス等のヘルパーウイルスの複製機能を利用する必要がある。本遺伝子組換え生物等のゲノムの一部は、AAV〇型に、キャプシドタンパク質は、AAV〇型に由来する。【留意事項】※「遺伝子組換え生物等の特性」の各項については、当該遺伝子組換え生物等の第一種使用規程が承認されている場合は、当該第一種使用規程とともに提出された生物多様性影響評価書に記載された内容を転記することで差し支えない。以下同じ。 |
| 使用等の歴史及び現状 | 【記載例】AAVは、病原性がないこと、感染が長期化すること、組織指向性が柔軟であること等の特性が知られており、遺伝子治療用製品のベクターウイルスとして開発が盛んに行われている。〇〇株式会社においては、本遺伝子組換え生物等の産業上の使用実績はない。 |
| 繁殖又は増殖の様式 | 【記載例】野生型AAVのヒトへの感染経路としては、経気道感染、糞口感染、接触感染などが知られている。感染する際には、AAV受容体及び副受容体を介したエンドサイトーシスによりウイルス粒子が取り込まれ、細胞内侵入後は、核膜孔複合体を通って核内に移行すると考えられている。AAVとアデノウイルス等のヘルパーウイルスが同時に感染している場合、AAVは感染細胞及び感染個体で増幅し、ヘルパーウイルスと共に分泌物と一緒に排泄され、次の生物に感染する。ヘルパーウイルスが共存しない場合は、AAVのゲノムは感染細胞において複製することなく、二本鎖環状DNA（エピソーム）として核内に潜伏するが、まれに、Repタンパクの関与により、第19染色体長腕のAAVS1領域への組み込まれることがある。 |
| 病原性 | 【記載例】野生型AAVの感染は不顕性に終わると考えられており、これまで野生型AAVの感染に伴う病原性は知られていない。なお、野生型AAV2型の染色体への組込みと肝がん発症との関連を示唆する報告があるが、これまでにAAVを用いて実施された臨床試験においてAAV感染が原因の肝がんの発症は確認されていない。 |
| その他の情報 | 【記載例】AAVは、一般的なパルボウイルスと同様に、エンベロープを持たないウイルスであるため、物理化学的に比較的安定であり、乾燥に抵抗性があり、常温において感染性が維持される。AAVの不活化には、85℃で数分間の加熱処理、次亜塩素酸ナトリウム（1,000ppm）、水酸化ナトリウム、紫外線（UV）照射等による処理が必要とされている。また、オートクレーブ処理（121℃、20分間）により完全に不活化される。 |
| 供与核酸 | 構成及び構成要素の由来 | 【記載例】本遺伝子組換え生物等のゲノムDNAは、両端をAAV〇型由来のITR領域に挟まれた形で、〇〇領域、ヒト〇〇領域及び〇〇由来のポリアデニル化シグナル（pA）領域からなる供与核酸を有する。また、ウイルス粒子はAAV〇型のキャプシドタンパク質を外殻に有する。本遺伝子組換え生物等の構成要素は以下のとおりである。詳細を別紙〇に示す。1. 左側AAV〇型 改変型ITR（〇～〇番、〇塩基）

AAV〇型由来の配列であり、〇〇が改変されている。1. 〇〇プロモーター領域（〇～〇番、〇塩基）

〇〇に由来する〇〇遺伝子のプロモーターを含む領域。1. 〇〇コード領域（〇～〇番、〇塩基）

ヒト〇〇タンパク質をコードする領域。 1. 〇〇pA領域（〇～〇番、〇塩基）

〇〇に由来するポリアデニル化シグナル配列を含む領域。1. 右側AAV〇型 ITR（〇～〇番、〇塩基）
2. 人工配列

ベクタープラスミド構築時のバックボーン由来及びプラスミド構築時に移入された人工配列。 |
| 構成要素の機能 | 【記載例】1. 左側AAV〇型 ITR

AAVゲノムの複製及びパッケージング等に必要な配列。1. 〇〇プロモーター領域

〇〇遺伝子の発現プロモーター。 1. 〇〇コード領域

ヒト〇〇をコードする。発現産物の〇〇は〇〇の機能を有する。1. 〇〇pA領域

mRNAの3’端末をポリアデニル化するためのシグナル配列であり、mRNAの安定化、核外輸送等に関係する。1. 右側AAV〇型 ITR

AAVゲノムの複製及びパッケージング等に必要な配列。1. 非コーディング配列

タンパク質をコードしておらず、機能は有していない。 |
| ベクター | 名称及び由来 | 【記載例】―（該当せず） |
| 特性 | 【記載例】―（該当せず） |
| 遺伝子組換え微生物 | 調製方法 | 【記載例】本遺伝子組換え生物等の育成の経過・プラスミド上記の各プラスミドは国内／海外において作製され、予想される配列と100％同一であることが確認されている。（国内で作製された場合は、第二種使用等の大臣確認を受けている旨を記載）・〇〇細胞〇〇セルバンク〇〇細胞を拡大培養後、〇〇に小分け分注し、セルバンクシステムを構築した。・本遺伝子組換え生物等の作製本遺伝子組換え生物等は、ウイルスゲノム配列を含むプラスミドp〇〇、AAV〇型由来*rep*遺伝子、AAV〇型由来*cap*遺伝子、〇〇を構成要素とするパッケージングプラスミドp〇〇、アデノウイルス〇型のE2A領域、E4領域、VA領域を構成要素とするヘルパープラスミドp〇〇を〇〇に由来する〇〇細胞に導入することによって作製される。プラスミド及びセルバンクの構築過程の概要、本遺伝子組換え生物等のゲノム構造概略図及び全塩基配列を別紙〇に示す。 |
| 細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性 | 【記載例】本遺伝子組換え生物等がヘルパーウイルスの非存在下で動物細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のゲノムが核内に移行し、最終的には染色体とは独立したエピソームとして維持されると考えられる。このエピソームに含まれる〇〇〇遺伝子によって、〇〇タンパク質が安定的に発現される。 |
| 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 | 【記載例】本遺伝子組換え生物等はAAV〇型に由来するキャプシドを有しており、感染する動植物の種類、感染経路、伝播様式等はAAV〇型と同等と考えられるが、感染してもそのゲノムの大半は染色体に組み込まれず、主に核内の染色体外にエピソームとして存在する。本遺伝子組換え生物等はゲノムの複製やウイルス粒子の形成に必要な*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子を欠失しているため、ヘルパーウイルスが共存しても増殖は起こらない。本遺伝子組換え生物等の増殖が起こるのは、*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子が組み込まれた、又はトランスフェクションされた細胞に、本遺伝子組換え生物等とヘルパーウイルスが共感染した場合、若しくは通常の細胞に本遺伝子組換え生物等、野生型AAV及びヘルパーウイルスが三重に共感染した場合のみである。また、本遺伝子組換え生物等が感染した細胞内において、供与核酸である〇〇発現プロモーターにより下流のヒト〇〇遺伝子が発現する。 |
| 拡散防止措置 | 使用区分 | 【記載例】＜GILSPの場合＞GILSP・宿主であるAAVの病原性は知られていない。・供与核酸は全塩基配列が明らかにされており、既知の有害塩基配列は認められない（註：供与核酸の全塩基配列及び相同性検索結果をもとに記載する。）。・本遺伝子組換え生物等は宿主の増殖に必要な*rep*遺伝子及び*cap*遺伝子を欠失しており、宿主と比べてさらに増殖能力が低下している。よって、産業利用二種省令の別表に掲げるGILSP区分の遺伝子組換え微生物に対応する拡散防止措置を満たす措置を執る。【留意事項】使用区分（本様式備考16）に該当することがわかるように記載する。 |
| 作業区域の位置 | 【記載例】〇〇株式会社〇〇工場、製造棟〇の〇〇室、〇〇室、〇〇室、製造棟〇の〇〇室を作業区域とする。詳細を別紙〇に示す。 |
| 設備 | 配置 | 【記載例】作業区域内には安全キャビネット、インキュベーター、遠心分離機、冷凍庫、オートクレーブ等が設置されている。主要な設備の名称及び配置を別紙〇に示す。 |
| 構造 | 【記載例】・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。・運搬時には、本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器を用いる。・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。 |
| 生産工程 | 【記載例】1. 凍結保存した〇〇細胞の〇〇セルバンク（〇CB）を拡大培養し、〇〇プラスミド、〇〇プラスミド、〇〇プラスミドをトランスフェクションする。
2. 細胞培養後に培養上清及び培養細胞を回収し、バルクハーベストとする。
3. バルクハーベストを精製して原薬とし、凍結保管する。
4. 原薬を解凍後、〇〇して製剤化する。

〇〇は製造ロット毎にrcAAV否定試験を含む品質試験を行う。詳細を別紙〇に示す。 |
| その他 | 【記載要領】以下の①～⑦について記載する。【記載例】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生物等の第二種使用等の実績に関する情報：

20〇年より研究段階での第二種使用等の実績がある。本遺伝子組換え生物等を用いた第二種使用等の実績はない。1. 過去の組換えDNA製造指針適合性の確認に関する情報：

本遺伝子組換え生物等について、組換えDNA製造指針適合性への確認申請は行っていない。1. 予定される遺伝子組換え生物等の年間製造量：

製造1回当たりの製造量：〇mL/回、年間製造予定回数：〇回又は予定される年間製造量：〇mL/年1. 同施設で既に確認を行っている遺伝子組換え生物等の名称：

別紙〇のとおり。1. 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）生物等の名称及びクロスコンタミネーション防止策：

本遺伝子組換え生物等を取り扱う作業区域では、本遺伝子組換え生物等の他に複数の遺伝子組換え生物等を同一作業区域で取り扱う可能性があるが、本遺伝子組換え生物等と同一の期間に取り扱うことはない。また、本遺伝子組換え生物等の品質試験に使用した機器類は洗浄及び高圧蒸気滅菌による不活化が行われる。1. 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）に連絡できる体制を構築している。手順書には製造従事者に対してカルタヘナ法及びその関連省令等を熟知させるとともに、遺伝子組換え生物等の取扱いに関する教育訓練を事前に行い、その記録を保管する旨等を規定し、安全管理を徹底する。1. 担当者連絡先（申請時点）：

〇〇 |

（以下の備考は、提出時に削除すること）

［備考］

１　申請者が法人の場合にあっては、「申請者の氏名」については、法人の名称及び代表者の氏名を記載し、「申請者の住所」については、主たる事務所の所在地を記載すること。

２　「遺伝子組換え生物等の種類の名称」については、当該遺伝子組換え生物等の宿主（法第２条第２項第１号に掲げる技術の利用により得られた核酸又はその複製物が移入される生物をいう。以下同じ。）の分類学上の種の名称及び遺伝子組換え生物等の特性等の情報を含め、他の遺伝子組換え生物等と明確に区別できる名称とすること。また、開発者が付した識別記号及び国際機関において統一的な識別記号が付されている場合にあっては、当該記号を記載すること。

３　「第二種使用等の目的及び概要」については、遺伝子組換え生物等が生産の手段として使用されるか、それ自体が製品として使用されるかについての別を記載するとともに、製品の種類及び利用形態を併せて記載すること。

４　「分類学上の位置及び自然環境における分布状況」については、

⑴　学名（属及び種）及び株名

⑵　公的な微生物保存機関から分与されたものである場合には、当該機関の名称と株番号

⑶　⑵でない場合には、同定の根拠となる事項（既に学名が公認されている種との同異点及びその根拠、株の分離源及びそれから作製した基準株の寄託場所及び保管番号等）

⑷　宿主を遺伝的改変を用いて得た場合にはその遺伝的改変の内容（野生株から宿主株までの遺伝的改変の経緯を示すとともに誘導するために用いた遺伝的改変の操作（例えば紫外線照射による突然変異の誘発、接合等））。ただし、宿主が既に主要な学術文献等に記載されている株である場合は、その株名を記載すること。

⑸　宿主として野生株を用いる場合には、自然環境における分布状況

を記載し、必要に応じ関連資料を添付すること。

５　「使用等の歴史及び現状」については、宿主として利用する株が産業利用された歴史を有する場合には、その内容及び期間を記載し、必要に応じ関連資料を添付すること。

６　「繁殖又は増殖の様式」については、宿主又は宿主の属する分類学上の種の有性又は無性生殖の周期、増殖温度域、増殖速度、栄養要求性、薬剤感受性等の特性について記載するとともに、必要に応じ、関連資料を添付すること。

７　「病原性」については、宿主又は宿主の属する分類学上の種の病原性の有無及びその根拠並びに病原性に関係あるウイルス及びプラスミドの有無を記載するとともに、病原性が知られている場合には、その内容並びに予防及び治療の方法を記載し、必要に応じ関連資料を添付すること。

８　「その他の情報」については、宿主又は宿主に属する分類学上の種の有害な影響を及ぼす生理活性物質等の産生性の有無を記載するとともに、該当する物質の存在が知られている場合は、その名称並びに活性及び毒性の強さについて記載し、必要に応じ関連資料を添付すること。また、抗生物質の産生性等の主要な生理学的性質について記載し、必要に応じ関連資料を添付すること。

９　「構成及び構成要素の由来」については、目的遺伝子、隣接領域及び調節系の構成並びにその由来について明らかな範囲で記載すること。また、構造について、制限酵素地図、塩基数及び塩基配列を必要に応じ記載すること。

10　「構成要素の機能」については、供与核酸（法第２条第２項第１号に規定する技術の利用により得られた核酸又はその複製物のうちベクター（法第２条第２項第１号に規定する技術の利用により得られた核酸又はその複製物を細胞内で複製させるために用いられる核酸をいう。以下同じ。）を除くものをいう。以下同じ。）が遺伝子として有する機能及び物質を生産又は処理する場合に推定される代謝経路について記載すること。

11　「名称及び由来」については、ベクターの名称及び由来する生物の分類学上の位置を記載すること。

12　「特性」については、ベクターの伝染性、病原性、伝達性、塩基数等について明らかな範囲で記載すること。なお、既知のベクターについて改造又は修飾を行い、新しいベクターを開発した場合は、改造又は修飾前のベクターに関する文献を添付し、改造又は修飾を行った部分について説明すること。また、ベクターの由来生物の特性についても必要に応じ記載すること。

13　「調製方法」については、

⑴　細胞内に移入する核酸の構成（目的遺伝子、プロモーター、マーカー等の配列）及びベクターへの目的遺伝子の挿入方法

⑵　宿主への核酸の移入方法

⑶　遺伝子組換え微生物の育成経過（遺伝子組換え微生物を選抜した方法及びその後の育成経過の概要）

を記載し、必要に応じ図示すること。

14　「細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性」については、

⑴　移入した核酸が遺伝子組換え微生物の染色体に組み込まれているか細胞質内に存在するかの別

⑵　目的遺伝子の宿主内での発現の安定性

を記載すること。

15　「宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」については、遺伝子組換え微生物の宿主又は宿主の属する分類学上の種との特性の違いに関し、繁殖又は増殖の様式、病原性、その他の情報について相違点を記載すること。なお、遺伝子組換え微生物の宿主又は宿主の属する分類学上の種からの識別を可能とする特徴があれば、それを併せて記載すること。

16　「使用区分」については、以下の区分に分類し、別表の上欄に掲げる遺伝子組換え生物等の区分に応じて、別表の下欄に定める拡散防止措置を実施する旨を記載すること。なお、以下の区分に該当しないものは「その他」と記載し、予定している拡散防止措置の内容を別紙に記載すること。

ａ．GILSP（宿主、供与核酸、ベクター及び遺伝子組換え微生物が次の基準を満たすもの）

⑴　宿主

（ア）　病原性がないこと

（イ）　病原性に関係のあるウイルス及びプラスミドを含まないこと

（ウ）　安全に長期間利用した歴史がある又は特殊な培養条件下では増殖するがそれ以外では増殖が制限されていること

⑵　供与核酸及びベクター

（ア）　性質が十分明らかにされており、有害と認められる塩基配列を含まないこと

（イ）　伝達性に乏しく、かつ、本来耐性を獲得することが知られていない生細胞に耐性マーカーを伝達しないこと

⑶　遺伝子組換え微生物

（ア）　病原性がないこと

（イ）　宿主と比べて増殖する能力が高くないこと

ｂ．カテゴリー１（遺伝子組換え微生物が病原性がある可能性が低く、かつGILSPに含まれないもの。）

17　「作業区域の位置」については、事業所内外の建屋の配置及び名称並びに作業区域を図示すること。

18　「配置」については、作業区域を含む平面図を示し、遺伝子組換え微生物を取り扱う主要な設備の位置及び名称を記載すること。

19　「構造」については、遺伝子組換え微生物の取扱いに係る設備又は装置に関し、

⑴　設備の仕様

⑵　排水系統

⑶　換気設備（「使用区分」を「カテゴリー１」と分類した場合であって、作業区域のうち強制換気を行っている建屋又は部屋の換気設備）

を記載し、必要に応じ図示すること。

20　「生産工程」については、遺伝子組換え微生物の生産又は遺伝子組換え微生物を使用して行う物質の生産の工程についてその概略を図示すること。図には、各種機器の名称、バルブの箇所等を記載し、必要に応じ各工程の名称及び内容を記載すること。

21　「その他」については、

⑴　上記以外の遺伝子組換え微生物の使用に関し得られている知見

⑵　事故時等緊急時における対処方法

⑶　事業者における管理体制

等について必要に応じ記載すること。

22　用紙の大きさは、日本産業規格Ａ４とすること。

1. **本遺伝子組換え生物等のゲノム構造**

【記載例】

本遺伝子組換え生物等は、*rep*及び*cap*遺伝子を欠失した非増殖性の遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）〇型であり、〇〇プロモーター、ヒト〇〇遺伝子由来のコード領域を組み込んでいる。また、AAV〇由来の逆位末端反復配列（inverted terminal repeats：ITR）を改変することで〇〇している。本遺伝子組換え生物等のゲノム構造を図〇、ゲノムの塩基配列を図〇、アミノ酸残基配列を図〇に示す。

|  |
| --- |
|  |

図〇 本遺伝子組換え生物等のゲノム構成

1. **本遺伝子組換え生物等の構成要素の由来及び機能**

【記載例】

・左側AAV〇型 改変型ITR（〇～〇番、〇塩基）

AAV〇型由来の配列であり、〇〇が改変されている。

・〇〇プロモーター領域（〇～〇番、〇塩基）

〇〇特異的に遺伝子の発現を調節する領域であり、〇〇遺伝子の近接領域由来の配列を元に、〇〇の改変を行った。

・〇〇コード領域（〇～〇番、〇塩基）

〇〇タンパク質が機能するために必要なドメインをコードする。

・〇〇pA領域（〇～〇番、〇塩基）

〇〇に由来するポリアデニル化に必要な配列で、〇〇遺伝子の転写終了時にポリアデニル化する。合成されたポリAはRNAの安定化、転写終結、核外輸送及び翻訳に補助的な役割を担う。

・右側AAV〇型 ITR（〇～〇番、〇塩基）

〇〇

・人工配列

ベクタープラスミド構築時のバックボーン由来及びプラスミド構築時に移入された人工配列。

人工配列を表〇に、本遺伝子組換え生物等のゲノム中での位置を図〇に示した。

1. **本遺伝子組換え生物等の全塩基配列**

【記載例】

本遺伝子組換え生物等の全塩基配列を図〇に示す。

|  |
| --- |
|  |

図〇 本遺伝子組換え生物等の全塩基配列

1. **本遺伝子組換え生物等のキャプシド及び発現遺伝子のアミノ酸配列**

【記載例】

本遺伝子組換え生物等のキャプシド及び本遺伝子組換え生物等により発現する〇〇タンパク質のアミノ酸配列を図〇及び図〇にそれぞれ示す。

|  |
| --- |
|  |

図〇 キャプシドタンパク質のアミノ酸配列

|  |
| --- |
|  |

図〇 〇〇タンパク質のアミノ酸配列

1. **既知の有害塩基配列との相同性**

〇〇の配列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：〇〇相同性検索システムver. x.x

・遺伝子データ：〇〇遺伝子データベース、〇〇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が〇〇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。

1. **本遺伝子組換え生物等の作製に用いるプラスミドに関する情報**
	1. AAVベクタープラスミド（p〇〇）

p〇〇は、ITR配列の間に位置する〇〇遺伝子発現カセットを含むプラスミドであり、改変〇〇プロモーター、〇〇遺伝子及び合成ポリアデニル化シグナルを含む。合成により作製した〇〇遺伝子発現カセット配列をp〇〇に挿入し、p〇〇を作製した。p〇〇のプラスミドマップ及び構成要素を図〇及び表〇に示す。

|  |
| --- |
|  |

図〇 p〇〇のプラスミドマップ

表p〇〇プラスミドの構成要素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 構成要素 | 位置 | 由来生物等 |
| 5’-ITR | 〇～〇 | AAV〇 |
| 人工配列A | 〇～〇 | ― |
| 〇〇プロモーター | 〇～〇 |  |
| 人工配列B | 〇～〇 | ― |
| 〇〇遺伝子 | 〇～〇 | ヒト |
| 〇〇ポリアデニル化シグナル | 〇～〇 |  |
| 3’-ITR | 〇～〇 | AAV〇 |
| 〇〇耐性遺伝子 | 〇～〇 |  |

* 1. パッケージングプラスミド（p〇〇）

p〇〇プラスミドの構成要素は以下のとおりであり、AAV〇由来の*rep*遺伝子とAAV〇由来の*cap*遺伝子を含むパッケージングプラスミドである。

〇〇プラスミドから野生型AAV〇の*cap*遺伝子と同様にVP1、VP2及びVP3タンパク質が生じる。また、*rep*遺伝子から野生型AAV〇と同様に4種のRepタンパク質が生じる。

|  |
| --- |
|  |

図〇 p〇〇のプラスミドマップ

表p〇〇プラスミドの構成要素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 構成要素 | 位置 | 由来生物等 |
| *rep*遺伝子 | 〇～〇 | AAV〇 |
| *cap*遺伝子 | 〇～〇 | AAV〇 |
|  |  |  |

* 1. ヘルパープラスミド（p〇〇）

〇〇プラスミドの構成要素は以下のとおりであり、内在性プロモーターに続いて、AAVを効率的に複製、パッケージングするためのヘルパー遺伝子として必須のE2A領域、E4領域及びVA領域が含まれている。

|  |
| --- |
|  |

図〇 p〇〇のプラスミドマップ

表p〇〇プラスミドの構成要素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 構成要素 | 位置 | 由来生物等 |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

1. **本遺伝子組換え生物等の育成の経過**

・プラスミドの構築

各プラスミドの構築過程の概要を示す。

（国内で作製された場合は、第二種使用等の大臣確認を受けている旨を記載する。）

・〇〇細胞〇〇セルバンク

〇〇細胞〇〇セルバンクの構築過程の概要を示す。

・本遺伝子組換え生物等の作製

本遺伝子組換え生物等は、ウイルスゲノム配列を含むプラスミドp〇〇、AAV〇型由来*rep*遺伝子、AAV〇型由来*cap*遺伝子、〇〇を構成要素とするパッケージングプラスミドp〇〇、アデノウイルス〇型のE2A領域、E4領域、VA領域を構成要素とするヘルパープラスミドp〇〇を〇〇に由来する〇〇細胞に導入することによって作製される。

* + 1. **製造施設**
1. **製造所の位置**

〇〇株式会社〇〇工場を含む〇〇周辺地図を以下に示す。

〇色で囲む区域が〇〇株式会社〇〇工場である。

|  |
| --- |
| 註：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。  |

**図〇　〇〇株式会社**〇〇**工場周辺地図**

1. **施設の配置**

〇〇株式会社 〇〇工場内の施設配置図を示す。

〇色で示す〇〇研究所及び〇〇で遺伝子組換え生物等を使用する。

|  |
| --- |
|  |

**図**〇　〇〇**株式会社**〇〇**工場施設配置図**

製造棟〇：〇〇年建造

製造棟〇：〇〇年建造

* + 1. **作業区域及び設備**
			1. **作業区域**

・製造棟〇の〇〇室、〇〇室、〇〇室、製造棟〇の〇〇室を作業区域とする。製造棟〇の平面図を図〇に示す。

・作業区域と非作業区域とは、隔壁によって明確に隔てられている。

・作業区域は遺伝子組換え生物等管理区域として表示されている。

* + - 1. **生産に使用する主要な設備・装置**

・生産に使用する主要な設備及び装置を表〇に示す。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **設置場所** | **設備・装置** | **用途** |
| 製造棟〇、〇〇室 | 冷凍庫 | 〇〇セルバンク保管用 |
| 製造棟〇、〇〇室 | 安全キャビネット | 〇〇細胞の培養及び遺伝子導入操作 |
| 製造棟〇、〇〇室 | インキュベーター | 〇〇細胞の培養 |
| 製造棟〇、〇〇室 | オートクレーブ | 本遺伝子組換え生物等の不活化 |
| 製造棟〇、〇〇室 |  |  |

・各装置の配置の概要を図〇、図〇に示す。

|  |
| --- |
|  |

図〇　製造棟〇、〇〇室の平面図

※〇色で示す区域で本遺伝子組換え生物等を扱う。

※遺伝子組換え生物等の動線及び作業動線を示す。

* + - 1. **構造**
1. **換気設備**

【記載要領】

・工場全体の空調について、吸気系および排気系の概略、換気の方向（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。

・安全キャビネット等における、空気の流れも説明する。

・空気の流れについて（特に、培養室等への空気の供給・排気）図示する。気圧管理を行っている場合は、陰圧の区域に色をつける等の工夫をする。

1. **排水設備**

【記載例】

・本遺伝子組換え生物等を含む廃液は、全て〇に回収し、高圧蒸気滅菌により不活化した後に産業廃棄物として廃棄される。したがって、本遺伝子組換え生物等を含む可能性のある廃液が作業区域から排水設備を経て廃棄されることはない。

1. **天井面、壁面、床の構造**

【記載要領】

・各部屋における仕様について、具体的な材質を挙げて説明する。

* + 1. **生産工程**

【記載要領】

・遺伝子組換え生物等の生産工程の概要を製造フロー等を用いて簡潔に記載する。

・製造工程におけるrcAAVの発生リスク評価及び管理方法について記載する。

【記載例】

1. **製造フロー図**

（略）

1. **製造工程の概略**
2. **原薬の製造**

本遺伝子組換え生物等の原薬は、〇〇細胞に〇〇を〇〇して培養した後、回収したハーベストを精製して製造する。原薬の製造工程の概略図を図〇に示す。

1. **製剤の製造方法**

本遺伝子組換え生物等の製剤は、原薬を〇〇、〇〇して製造する。製剤は〇〇製のバイアルに充填して−〇°C以下で保存する。製剤の製造工程の概略図を図〇に示す。

1. **品質試験**

原薬及び製剤の規格を表〇及び表〇に示す。〇〇の規格試験において、rcAAVが管理されている。

1. **遺伝子組換え生物等の不活化方法**

【記載要領】

・製造に使用した遺伝子組換え生物等の不活化等の処理方法・処理条件を具体的に記載する。

（参考）施設及び設備については、「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について（平成16年2月19日付け薬食発第0219011号）」（以下「局長通知」という。）第2章の内容を満たしていることが読み取れるように記載する。

|  |
| --- |
| 遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について（平成16年2月19日薬食発第0219011号）（抄）第二章　拡散防止措置第一　GILSPの施設及び設備等 1．製造（1）施設及び設備1. 作業区域（遺伝子組換え微生物を使用等する区域であって、それ以外の区域と明確に区別できるもの。以下同じ）が設けられていること。
2. 作業区域内に、遺伝子組換え微生物を利用して医薬品等を製造するための培養又は発酵の用に供するよく整備された装置が設けられていること。
3. 作業区域内に、製造又は試験検査に使用する器具器械、容器等を洗浄し、又はそれらに付着した遺伝子組換え微生物を不活化するための設備が設けられていること。
4. 遺伝子組換え微生物の生物学的性状について試験検査をするための設備が設けられていること。
5. 遺伝子組換え微生物を他のものと区別して保管できる設備が設けられていること。
6. 培地等を調整するための設備が設けられていること。
7. 製造従事者の更衣設備が設けられていること。
8. 作業区域内を清潔に保ち、げっ歯類、昆虫類等の駆除に努めること。
9. 作業区域および遺伝子組換え微生物の保管設備には、その見やすいところに、遺伝子組換え微生物の作業レベルに関する必要な事項（例「GILSP取扱い中」）を表示すること。
10. 教育訓練を受けた製造従事者以外の者の作業区域への立入りを作業レベルに応じ制限することとし、仮に立ち入る場合は、製造従事者の指示に従わせること。
 |

1. **管理体制**

【記載要領】

・組織図（製造管理者、製造安全主任者、製造従業者（局長通知第3章第2～4参照）を有することが分かるように記載する。）

・製造安全委員会の構成（局長通知第3章第5参照。人名は記載しないこと。）

・連絡・指示体制

1. **教育訓練**（局長通知第3章第6参照）

【記載例】

手順書中の教育訓練に係る内容を以下に示す。

製造管理者は、製造作業の開始前に製造従事者に対し、カルタヘナ法、拡散防止措置省令及び本通知を熟知させるとともに、次の事項に関する教育訓練を行う。

・遺伝子組換え微生物の安全性に関する知識

・製造に用いる遺伝子組換え微生物の安全な取扱いに関する技術

・設備・装置に関する知識及び技術

・製造工程の安全性に関する知識

・事故発生時の措置に関する知識

1. **遺伝子組換え生物等の漏出等、緊急事態の対応**

（参考）

|  |
| --- |
| 遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について（平成16年2月19日薬食発第0219011号）（抄）第三章　組織並びに運営上の遵守事項第一　製造業者医薬品等の製造工程において遺伝子組換え微生物を使用等する者（以下、製造業者という。）は、次の任務を果たすこと。* 1. 製造所ごとに製造管理者（医薬部外品、化粧品、医療用具の場合には、「責任技術者」と読み替える。以下同じ。）及び製造安全主任者を任命すること。
	2. 製造上の安全性を確保するため製造業者ごとに製造安全委員会を設置し、その委員を任命すること。また、製造安全委員会に、製造業務の安全確保について、調査審議を求めること。
	3. 製造管理者が業務を遂行するに当たって支障を生じることがないようにすること。

第二　製造管理者製造管理者は、カルタヘナ法、拡散防止措置省令及び本通知を熟知し、次の任務を果たすこと。* 1. 製造計画の立案及びその実施に際し、カルタヘナ法、拡散防止措置省令及び本通知を十分に遵守し、製造安全主任者との緊密な連絡の下に製造作業全体の適切な管理・監督に当たること。
	2. 製造従事者に対して教育訓練を行うこと。
	3. 製造安全委員会と十分連絡を取るとともに、必要な事項について製造安全委員会に報告すること。
	4. その他製造上の安全性の確保に必要な事項を実施すること。

第三　製造安全主任者* 1. 製造安全主任者は、遺伝子組換え微生物の使用等に関し、製造管理者を補佐するものであり、製造上の安全性を確保するための知識及び技術に高度に習熟した者であること。
	2. 製造安全主任者は、カルタヘナ法、拡散防止措置省令及び本通知を熟知し、次の任務を果たすこと。
	3. 製造がカルタヘナ法、拡散防止措置省令及び本通知に従って適正に遂行されていることを確認すること。
	4. 製造管理者に対し助言、報告を行うこと。
	5. その他製造上の安全性の確保に関し、必要な事項の処理に当たること。

第四　製造従事者* 1. 製造従事者は、製造管理者の行う教育訓練をあらかじめ受けた者であること。
	2. 製造従事者は、次の事項を遵守すること。
1. 製造作業を行うに当たって製造上の安全確保について十分に自覚し必要な配慮をすること。
2. 作業区域内では、作業レベルに応じた作業衣を着用すること。

第五　製造安全委員会* 1. 製造安全委員会は、高度に専門的な知識及び技術並びに広い視野に立った判断が要求されることを十分に考慮し、適切な分野の者により構成されること。
	2. 製造安全委員会は、製造業者の求めに応じて次の事項について調査審議し、製造業者に報告すること。

（1）製造作業標準のカルタヘナ法、拡散防止措置省令及び本通知に対する適合性（2）製造従事者に対する安全教育訓練及び健康管理の状況（3）事故発生の際の必要な処置及び改善策（4）その他製造上の安全性の確保に関する必要な事項* 1. 製造安全委員会は、必要に応じて製造管理者又は製造安全主任者から報告を求めることができる。

第六　教育訓練製造管理者は、製造作業の開始前に製造従事者に対し、カルタヘナ法、拡散防止措置省令及び本通知を熟知させるとともに、次の事項に関する教育訓練を行うこと。* 1. 遺伝子組換え微生物の安全性に関する知識
	2. 製造に用いる遺伝子組換え微生物の安全な取扱いに関する技術
	3. 設備・装置に関する知識及び技術
	4. 製造工程の安全性に関する知識
	5. 事故発生時の措置に関する知識

第七　健康管理* 1. 製造業者は、製造従事者に対し、定期健康診断を行うとともに、医薬品等を取扱うのに不適当な者を製造作業に従事させないこと。
	2. 製造業者は、製造従事者がカテゴリー2及び3の製造作業に従事する場合は、あらかじめ予防及び治療の方策について検討しておくこと。
	3. 製造業者は、カテゴリー2及び3の製造作業において作業区域内感染のおそれがある場合は、直ちに製造従事者に対し健康診断を行い、適切な措置を採ること。なお、カテゴリー3の製造従事者については、製造従事前に血清をあらかじめ採取し、当該製造従事者が製造に従事することを終えた日から2年間はこれを保存すること。

第八　記録及びその保存1. 製造管理者は、帳簿を備え、次の事項を記載すること。
2. 遺伝子組換え微生物の名称及びその容器に付された番号
3. 遺伝子組換え微生物の保管及び継代の状況
4. 遺伝子組換え微生物の生物学的性状及びその試験検査の年月日
5. 遺伝子組換え微生物の譲受けの相手方の氏名及び住所
6. 製造従事者の氏名、所属機関、職名、製造業務に従事している期間（カテゴリー1、2及び3の場合に限る）
7. 健康診断の結果
8. 製造安全委員会の審議記録（製造作業標準がカルタヘナ法、拡散防止措置省令及び本通知に適合していることを確認する根拠となった資料を含む。）
9. 設備・装置の定期点検記録及び製造記録
10. 前項の帳簿は、当該医薬品等の製造終了の日から5年間保存すること。

第九　報告製造業者は、製造に用いる遺伝子組換え微生物に関する情報を収集するとともに、当該遺伝子組換え微生物の評価に影響を及ぼす知見を発見した場合には、速やかに厚生労働大臣に報告すること。 |