

記載例（カテゴリー 1）

宿主：GILSP でない（バキュロウイルス）

供与核酸：GILSP（Protein A の部分配列）

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

年 月 日

経済産業大臣 殿

氏名 〇〇株式会社
申請者 代表取締役社長 〇〇 〇〇
住所 東京都〇〇区〇〇 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			<i>Staphylococcus aureus</i> 由来 Protein A 遺伝子の一部を移入したバキュロウイルス（菌株名称：AcNPV-SPA1C）
第二種使用等をしようとする場所	名称	〇〇株式会社〇〇事業所 〇〇棟2階 〇〇室	
	所在地	〇〇県〇〇市〇〇1丁目1番-1号	
第二種使用等の目的及び概要			I. 第二種使用等の目的 1. 当該遺伝子組換え微生物は、産業用タンパク質 Protein A の IgG 結合ドメイン C（以下 SPA1C）の生産を目的として使用する。 2. 当該遺伝子組換え生物等の概要は次のとおり。黄色ブドウ球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> 由来の Protein A 遺伝子の IgG 結合ドメイン C（以下 spa1C）をトランスファーベクター pTRANS に挿入し、これをウイルスゲノムベクター pVV と共に昆虫細胞 AA に導入し、遺伝子組換え微生物 AcNPV-SPA1C を作成する。AcNPV-SPA1C を昆虫細胞 BB に感染させ培養し、培養液中に SPA1C を産生させる。 II. 第二種使用等の概要 1. 製品（SPA1C）の種類は、試薬である。 2. 製品は、抗体精製用担体の研究開発等に使用される。 ※経済産業省における試薬とは、「検査、試験、研究、実験など試験・研究的な場合において、測定基準、物質の検出・確認、定量、分離・精製、合成実験、物性測定などに用いられるものであって、それぞれの使用目的に応じた品質が保証され、少量使用に適した供給形態の化学薬品」という概念に基づいている。 ※「体外診断用医薬品」は厚生労働省の所管となるため、経済産業省への申請は不可。 3. 容量OL のフラスコ〇本を用いた培養を行い、1回の生産あたり約〇mg の SPA1C を得る。1年間におよそ〇回の生産を行い、年間約〇mg の SPA1C を生産する。 4. 最終的な産物は、アフィニティ精製することにより、生きた遺伝子組換え微生物を除去する。（図〇） 菌体残渣・廃液及び器具等はオートクレーブ（121℃ 〇分）処理または薬剤処理（〇%の〇〇溶液に〇分間浸漬）により不活化する。 ※生きた遺伝子組換え微生物の除去については、エビデンス資料を添付。ただし遺伝子組換えバキュロウイルスの場合は、アフィニティ精製による除去については添付不要。 ・拡散防止措置は、〇年〇月〇日、確認番号〇〇〇で確認済みのものと同ーである。 ・遺伝子組換え生物等は、〇年〇月〇日、確認番号〇〇〇で確認済みのものと同ーである。 ※該当する大臣確認がなければ記載不要。
遺伝子組換え	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	宿主： <i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus（AcNPV）△株 ・ <i>Autographa californica</i>（ヤガ科）から分離された核多角体病ウイルス。

え 生 物 等 の 特 性		・ 30 種以上の鱗翅目昆虫を感染対象とする。 ・ 包埋体を形成し、自然環境下で非常に安定的に存在する。 本申請では、〇〇社より販売されている〇〇システムのウイルスベクターpVW を使用する。
	使用等の歴史及び現状	弊社において、△株についての使用実績はないが、〇〇システムのウイルスベクターpVW については、産業用生産用宿主としておおむね 10 年以上の利用実績がある。また、研究用として 20 年以上の使用履歴がある。
	繁殖又は増殖の様式	宿主 AcNPV は、鱗翅目昆虫の幼虫が包埋体 AcNPV を経口摂取することにより当該昆虫に感染する。 摂取された包埋体は、中腸で溶解され、中のウイルス粒子が中腸細胞に侵入・増殖し、体内中に拡散・増殖する。感染後期になると包埋体が形成される。感染した昆虫が致死後、速やかに死体を崩壊させ、飛散する。
	病原性	核多角体病ウイルスは、昆虫に特異的に感染し、感染対象昆虫体内のあらゆる組織に拡散して増殖し、対象昆虫を感染後数日で死亡させる。 AcNPV は、〇〇、〇〇等 30 種以上の鱗翅目昆虫を感染対象とする。その他の動植物に対しては、病原性の報告はない。
	その他の情報	特になし
供与核酸	構成及び構成要素の由来	※ウイルスゲノム DNA に導入される塩基配列全長を供与核酸とする。 <spa1C カセット>〇塩基 ①ポリヘドリン遺伝子上流配列 ・ベクター由来の AcNPV ポリヘドリン遺伝子上流側〇bp ※機能性のある配列を含む場合は、個別に記載。 ② spa1C ・ <i>Staphylococcus aureus</i> 由来の Protein A をコードする配列（全長 516 残基）のうち〇～〇番目の IgG 結合ドメイン C をコードする部分に開始コドンと終止コドン付加した〇bp の配列。Ac 番号〇〇の情報を参考に合成した。 ・ 5' 側に BamHI 及び 3' 側に XhoI の制限酵素サイトを付加している。 ③ポリヘドリン遺伝子下流配列 ・ベクター由来の AcNPV ポリヘドリン遺伝子下流側〇bp ・塩基配列及びアミノ酸配列を図〇に示す。 ・ <i>Staphylococcus aureus</i> は日本細菌学会の病原微生物の BSL レベルによると BSL2 であり、その病原因子は毒素、付着因子および免疫回避因子等がある。 供与核酸について、ORF 検索を行ったところ、既知の有害と認められる配列との相同性は認められなかった。その結果を図〇に示す。（確認日：〇年〇月〇日）

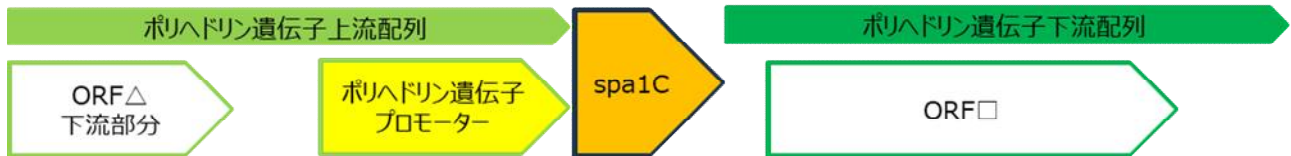
	構成要素の機能	Protein A は、細菌壁の表面タンパク質である。免疫グロブリン（特に IgG）の Fc 領域に特異的に結合する。Protein A は抗体に結合することから、Protein A が菌体表面にあることは黄色ブドウ球菌の感染を成立させる上で重要な役割を果たしている。グラム陽性菌で異種発現させた場合に菌体表面に固定される可能性があるため、病原因子の一つといえるが、SPA1C は、5 つの IgG 結合ドメインのうちの 1 つであり、細胞壁への結合領域を含まない。
ベクター	名称及び由来	pTRANS ・ pUC ベクターを由来とするバキュロウイルスゲノムへのトランスファーベクターである。 ・ pUC の ori は、大腸菌 ColE1 プラスミドを由来とする。 ・ ○○社より販売されている○○システムに含まれている。 ※ウイルスベクターは、宿主のゲノム DNA と捉えるため本欄に記載不要。ただし、ウイルスベクターを使用していることを遺伝子組換え微生物の調整方法の欄に記載すること。
	特性	・ pTRANS は、○○bp からなり、バキュロウイルスベクター pVV のポリヘドリン遺伝子上流および下流の相同配列間にマルチクロニングサイトが存在する。また、マーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子を有し、pUC の ori を有する。 ・ 強力なポリヘドリン遺伝子プロモーター下に目的遺伝子を導入した、組換えバキュロウイルスを産生することができる。 ・ pTRANS の構成図及び塩基配列を図○に示す。 ・ 由来生物大腸菌にはヒトへの病原性示す株が存在するが、ColE1 プラスミドの ori はその病原性には関与しない。 ・ pTRANS について、動植物に対する伝染性、病原性及び伝達性を示すような報告はこれまでにない。
遺伝子組換え微生物	調製方法	・ ○○システムを使用して構築する。 ・ spa1C を pTRANS の遺伝子組込み領域中に挿入し、spa1C トランスファーベクター pTRANS-SPA1C を作成する。pTRANS-SPA1C 構築フロー図及び最終構築図を図○に示す。 ・ ウイルスベクター pVV は、宿主△株に対し、ポリヘドリン遺伝子領域を欠失している。 ※宿主に対して塩基配列を置換・挿入している場合は、ORF 検索等を実施して安全性を確認する。 ・ pTRANS-SPA1C とウイルスベクター pVV を混合し、昆虫細胞 AA に○○の手法により導入する。相同組換えにより、spa1C はバキュロウイルス DNA のポリヘドリン遺伝子部位に導入される。AcNPV-SPA1C ゲノム DNA 構築フロー図及び最終構築図を図○に示す。 ・ ○○の方法により、目的遺伝子組換え微生物 AcNPV-SPA1C を選択する。得られた AcNPV-SPA1C は、凍結保管する。
	細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性	・ 宿主に移入した spa1C は、バキュロウイルスのゲノム DNA 上に存在する。 ・ AcNPV-SPA1C の spa1C の発現量を○○により確認したところ、ロットによる差は認められないことから、安定的に存在していると考えられる。

		宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	・ AcNPV-SPA1C は、宿主 AcNPV △株からポリヘドリン生産能が除去され、SPA1C 生産能が付与されている。AcNPV-SPA1C は、ポリヘドリンが生産されないため、包埋体を形成することができない。 ・ AcNPV-SPA1C は、野外に漏出した場合、包埋体が形成されないため紫外線などの影響により速やかに不活化される。また、多角体に包埋されていないウイルス粒子では、鱗翅目昆虫への経口感染ができないため、野外では増殖できない。
拡散防止措置	使用区分		・ 宿主 AcNPV △株は昆虫に対して病原性を有するため、備考 16a の(1) アの「病原性がないこと」を満たさないため、GILSP に含まれない。 ・ 当該遺伝子組換え微生物においては、包埋体を形成することができず自然環境下での安定性が著しく下がるため、当該遺伝子組換え微生物の病原性は低いと言える。 ・ 以上のことより、AcNPV-SPA1C は、備考 16b の「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」に該当するため、カテゴリー 1 であると判断した。 ※(参考) 備考 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) (1) 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 (2) 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 (3) 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。)
	作業区域の位置		産業利用二種省令別表の第二項の拡散防止措置を満たす措置を執る。
	設備	配置	同上
		構造	同上
		生産工程	同上
その他		・ 遺伝子組換え微生物を含む微生物の使用に関する生産業務を管理するために事業所ごとに「〇〇安全委員会」を組織している。安全委員会委員の氏名、役職、専門分野と従事経験の有無は図〇のとおり。	

	・ 事故時の緊急時における対処方法は「〇〇マニュアル」に定めている。 ・ 責任者及び現場担当者の氏名及び連絡先： 責任者：〇〇事業所長 〇〇 〇〇 （電話番号・E-mail） 担当者：〇〇 〇〇 （電話番号・E-mail）
--	---

図〇 spa1 カセットの塩基配列及びアミノ酸配列

<構成図>



<塩基配列> (○塩基)

・・・ **gactcactataggggtctatatagcggattcctcttccctctagtcattctttat** **ttttt** ccttttcgtcggag
atatacataatgctagcaatacatgatgacagctcaatggtcgc

GGATCC**ATG**TGTGAGTGTGACAATTAATCTGATCTGTGACTAGTGTGAGTGAATGCATCATGTGCATTAGTGACAATACATATATC
BamHI

・・・
AATATCAATAGCCATAGTGGCAGCTGTAATAGCTGGACTGCTGCGCGTGCTA**TGA**CTCGAG
XhoI

aatgctagcaatacatgatgacagctcaatggtaatgctagcaatacatgatgacagctcaatggt・・・

大文字 : spa1C

小文字 : ポリヘドリン遺伝子の上流配列と下流配列

ATG : 開始コドン、終止コドン

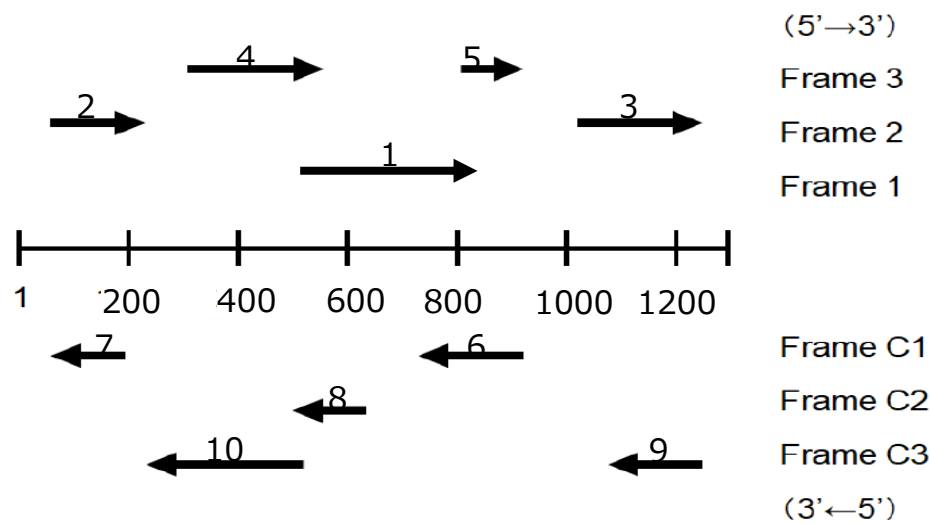
gactcactataggggtctatatagcggattcctcttccctctagtcattctttat : ポリヘドリン遺伝子プロモーター

<アミノ酸配列> (○残基)

MNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLG・・・TADKIAADNKLA

図〇 spa1 カセットにおける ORF 検索

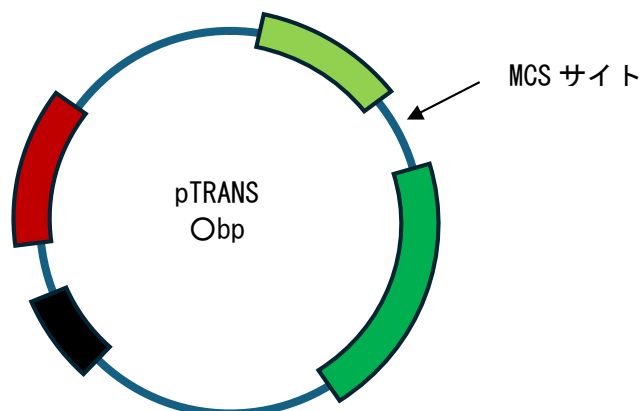
検索対象：供与核酸内に存在する〇AA 以上の ORF を対象とした。
（なお、終止コドンが同一のものについては最も長いもののみを検索対象とした。）
検索方法：上記 ORF について、NCBI blastp デフォルト設定条件にて検索を行った。
検索結果：「ヒットせず」相同性を示すタンパク質はなかった。
：「* 1」病原性・毒性への関与が疑われるタンパク質との相同性は認められなかった。



No.	Frame	Start	Stop	NA size	AA size	検索結果
1	1	500	8xx	X	X	〇〇（目的産物名）
2	X	X	X	X	X	ヒットせず
3	Y	.	.	.	.	* 1
.						

図〇 ベクターの構成図及び塩基配列

(1) 構成図



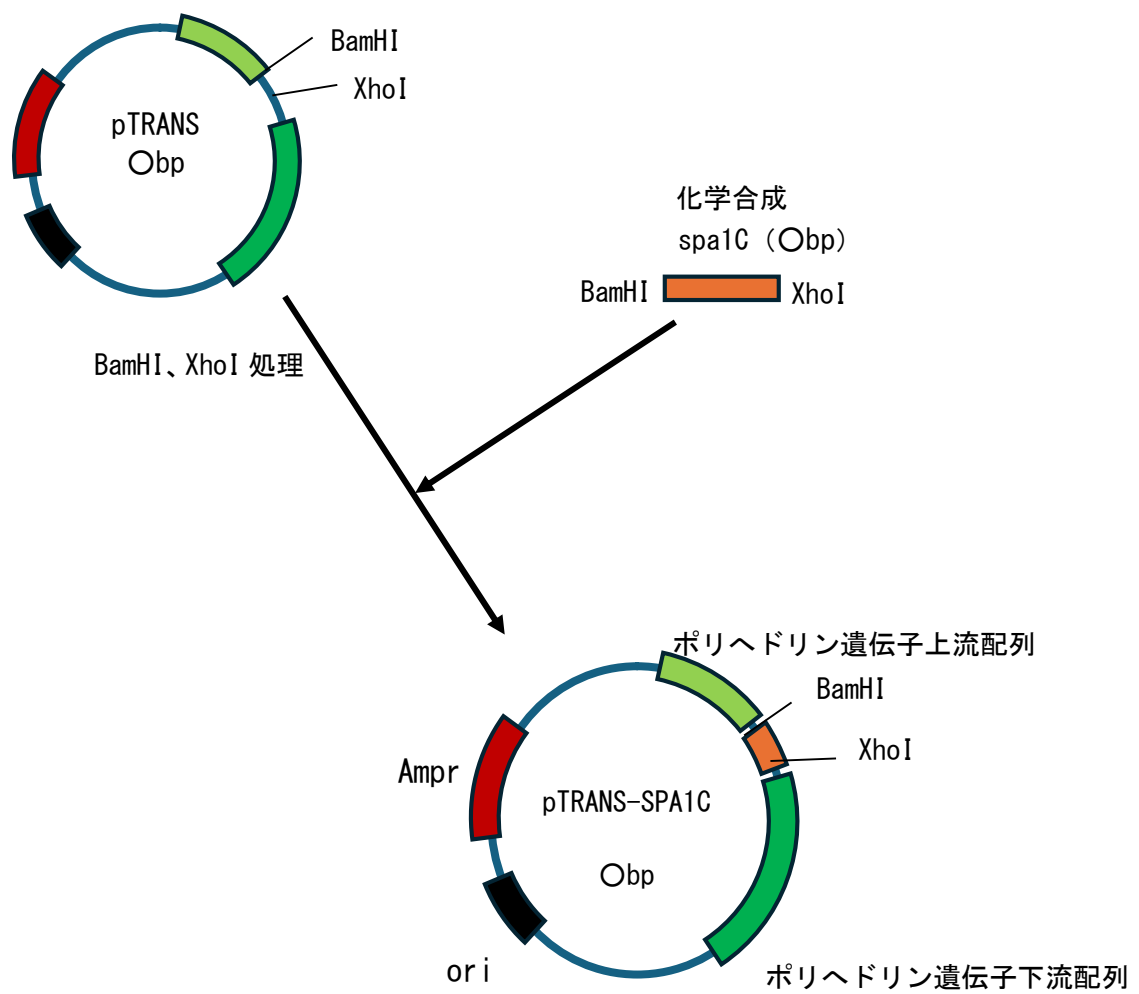
	50..550	ポリヘドリン遺伝子上流配列 (AcNPV 由来)
	551..600	MCS サイト
	...	ポリヘドリン遺伝子下流配列 (AcNPV 由来)
	...	pUC ori
	...	アンピシリン耐性遺伝子 (〇〇由来)
		スペーサー配列など

(2) 塩基配列

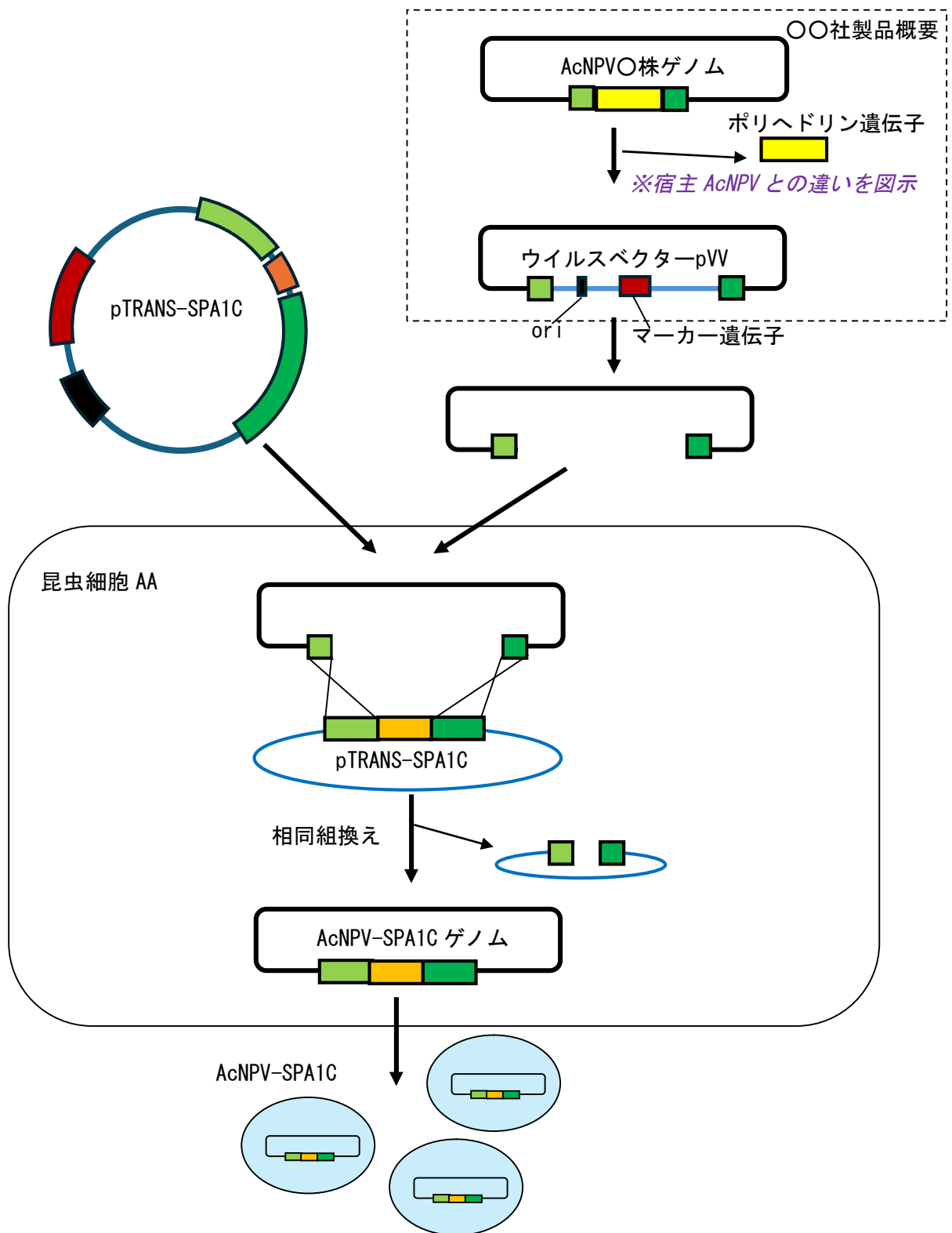
```

TCCCAAGAC AAGTTCATGG CCCAATCATG ACTCGAACAA AGGTGTAACG GCAGCATGTC CTCATGCTGG AGCAAAAAGC      80
TTCTACAAAA ATTTAATATG GCTAGTTAAA AAAGGAAATT CATACCCAAA GCTCAGCAAA TCCTACATTA ATGATAAAGG      160
GAAAGAAGTC CTCGTGCTAT GGGGCATTCA CCATCCATCT ACTAGTGCTG ACCAACAAAG TCTCTATCAG AATGCAGATG      240
...
  
```

図〇 pTRANS-SPA1C の構築フロー図

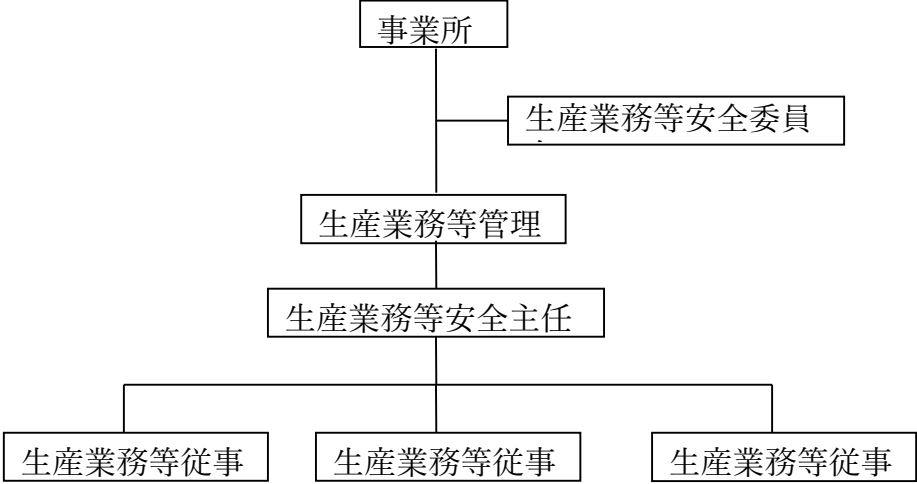


図〇 AcNPV-SPA1C ゲノム DNA 構築フロー図



図〇 安全管理体制

〇組織図



〇生産業務等安全委員会構成

担当	職名	氏名	専門分野	組換え生物取扱い経験
生産業務等安全委員会委員長	工場長	〇〇 〇〇	化学	有
生産業務等管理者	副工場長	〇〇 〇〇	発酵	有
生産業務等安全主任者	研究所長	〇〇 〇〇	微生物	有
委員	研究員	〇〇 〇〇	動物	無
委員	研究員	〇〇 〇〇	微生物	有