

2. 第二種使用等確認申請書記入例

<包括確認>

様式第一（第7条関係）

包括確認申請書記入例
(内容は架空のもの)

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 株式会社〇〇〇〇
申請者 代表取締役社長 □□ □□ 印
住所 東京都〇〇区〇〇1丁目2番地

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		遺伝子組換え大腸菌 (<i>Escherichia coli</i> B 及びその由来株等/pET-15b 等) (包括)	
第二種使用等をし ようとする場所	名称	株式会社〇〇〇〇 △△工場	
	所在地	〇〇県〇〇市〇〇町〇番地	
第二種使用等の目的及び概要		<p>I. 第二種使用等の目的 当該遺伝子組換え微生物は、工業用タンパク質や工業用酵素等の生産工程中で使用され、培養し発現させたタンパク質・酵素を取りだして生産する。</p> <p>II. 第二種使用等の概要</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 製品の種類は工業用に用いられるタンパク質や酵素であり、その利用形態は工業用原料、工業用酵素、研究試薬用原料等に用いられる。 2. 各種生産に使用した遺伝子組換え微生物は、最終的に酸・アルカリによる薬液処理、若しくは熱処理により不活化される。 3. 生産規模は、容量1 L三角フラスコ、50 Lタンク及び容量1 m³のタンクを用いた培養のいずれかを行い、1回の生産あたり数十グラム～数十キログラムの菌体から、数グラム～数百グラムの目的タンパク質等を得る。使用する遺伝子組換え微生物毎に、一年間に1回～数回の生産を行う。 	
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	<ul style="list-style-type: none"> ・ 本申請で使用する宿主の学名は以下のものである。 <i>Escherichia coli</i> B 及びその由来株 ・ 〇〇株式会社より市販されている株を購入して用いる。 ・ 上記に記載した各株は、経済産業大臣が定めるG I L S P 遺伝子組換え微生物（経済産業省告示〇〇号）に掲載されている。
		使用等の歴史及び現状	<ul style="list-style-type: none"> ・ 同上。 <p><GILSP リストに掲載されていない宿主の場合の記載例></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 〇〇 xx 株、xx 株、・・・は、それぞれ弊社において組換え微生物による工業用酵素生産用宿主としておおむね10年以上の継続的利用実績がある。また、研究用として30年以上の使用実績がある。
		繁殖又は増殖の様式	<ul style="list-style-type: none"> ・ 使用頻度の高いものの代表例として、xx 株について以下に記載する。 <p><〇〇 xx 株></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子型は以下の通りである。 F⁻、dcm、・・・

		<ul style="list-style-type: none"> 増殖温度域は約 10～42℃であり、至適温度域における増殖速度はおよそ 25 分に 1 回分裂する。 カナマイシン、アンピシリンなどの薬剤感受性を有する。
	病原性	<ul style="list-style-type: none"> 同上。 <p><GILSP リストに掲載されていない宿主の場合の記載例></p> <ul style="list-style-type: none"> 独立行政法人製品評価技術基盤機構 微生物有害情報リスト及び、日本細菌学会が公開する「病原細菌のバイオセーフティレベル」によると、〇〇はレベル 1（個体及び地域社会に対する低危険度）に分類される。
	その他の情報	<ul style="list-style-type: none"> 有害な影響を及ぼす生理活性物質等の産出は知られていない。
供与核酸	構成及び構成要素の由来	「包括確認申請手続による拡散防止措置の確認について（通知）（20201125 商局第 2 号）」第 1 に記載される「備考 17a に定める GILSP の基準」（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）を満たすと安全委員会が予め判定した供与核酸のみとする。
	構成要素の機能	構成要素の機能については、上記「構成及び構成要素の由来」欄に記載したものとなる。
ベクター	名称及び由来	<ul style="list-style-type: none"> 本申請で使用するベクターの名称は以下のものである。 pET-15b、pET-21a(+)、・・・ 上記各ベクターは、宿主用のベクターとして、経済産業大臣が定める G I L S P 遺伝子組換え微生物（経済産業省告示〇〇号）に掲載されている。 弊社においてはおおむね 5 年～10 年の産業利用の使用実績がある。
	特性	<ul style="list-style-type: none"> 同上。 <p><GILSP リストに掲載されていないベクターの場合の記載例></p> <ul style="list-style-type: none"> 代表例として宿主 xx 株用のベクターとして使用頻度の高いベクターについて以下に記載する。 <p>< x x x ></p> <ul style="list-style-type: none"> x x x は pBR322 由来のベクターであり、5708 塩基からなり、T7 プロモーター の下流に lac オペレーター、His タグ、thrombin 認識部位及びクローニングサイトを持ち、その下流には T7 ターミネーターが存在する。 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、さらに pBR322 の ori を持つ。

			<p>古くからクローニング研究に利用されてきたプラスミドベクターである。</p> <ul style="list-style-type: none"> 動植物に対する伝染性、病原性及び他の微生物への伝達性は知られていない。
遺伝子組換え微生物	調製方法		<ul style="list-style-type: none"> 細胞内に移入するベクターの構築方法のフロー図及び構築図は別添図 1-1 及び図 1-2 のとおりである。 形質転換は塩化カルシウム法、ヒートショック法、エレクトロポレーション法のいずれかによって行い、ベクターに存在するマーカー遺伝子に対応した薬剤 (pET-15b 及び pUC18 の場合は、アンピシリン) を含む培地を用いた培養を行うことによって形質転換体の選択を行う。
	細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性		<ul style="list-style-type: none"> 細胞内に移入した核酸は宿主大腸菌の細胞質内に存在する。 細胞内に移入した核酸の安定性については、生産開始前に確認する。
	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違		<ul style="list-style-type: none"> 作成する遺伝子組換え微生物は、宿主大腸菌に新たに目的の工業用タンパク質等を生産する能力と、ベクター由来の薬剤耐性が付与される以外の性質は、基本的に同等となる。 宿主 <i>Escherichia coli</i> B 及びその由来株には病原性はなく、挿入遺伝子についても、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ため、作成する遺伝子組換え大腸菌は新たな病原性を持つものではなく、宿主と同等の安全性を有する。
拡散防止措置	使用区分		<ul style="list-style-type: none"> 以上の判断により、本申請で使用する遺伝子組換え微生物の拡散防止措置の区分は G I L S P であると判断した。 なお、審議官通知第 5 に基づき供与核酸及び遺伝子組換え微生物に関する情報及び安全委員会での審議記録等を保管する。
	作業区域の位置		<ul style="list-style-type: none"> 図 2 を参照のこと。
	設備	配置	<ul style="list-style-type: none"> 各設備等の配置は、図 3、図 4 のとおり。 本申請で使用する遺伝子組換え微生物と非組換え体の識別をするための分析機器として PCR 装置、アガロースゲル電気泳動装置、DNA シーケンサーを作業区域内に備えている。設置場所及びその設備等は図 3、図 4 のとおり。 本申請で使用する遺伝子組換え大腸菌のグリセロールストックは、図 4 のとおり、ディープフリーザーの限定されたスペースに保管されており、非組換え体及び他の遺伝子組換え微生物とは隔離している。
		構造	<ul style="list-style-type: none"> 図 5、図 6 を参照のこと。
		生産工程	<ul style="list-style-type: none"> 図 7 を参照のこと。
その他：			

- 拡散防止措置は、○年○月○日、確認番号○○○で確認済みのものと同一である。
- 弊社では、過去に○○件の遺伝子組換え生物等の産業利用を目的とした第二種使用申請の大臣確認を受けた実績がある。最新のものから3件は以下のとおり。
 - 年○月○日、確認番号○○○
 - 年○月○日、確認番号○○○
 - 年○月○日、確認番号○○○
- 本申請において遺伝子組換え微生物を産業利用する際には「包括確認申請手続による拡散防止措置の確認について（通知）（20201125商局第2号）」に従うものとする。
- 弊社では遺伝子組換え生物の使用に関して、安全かつ適正な実施を図ることを目的とする安全管理規程を定めている。また、弊社では同規定に基づき、事業所ごとに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等安全委員会を組織し、生産に関わる業務を管理している。生産業務等安全委員会委員の氏名、役職、専門分野と遺伝子組換え微生物の取扱い業務その他これに類する業務への従事経験年数を別添図8に示す。
- 責任者及び現場担当者の氏名及び連絡先：
 - 責任者：○○ ○○ （電話番号・E-mail）
 - 担当者：○○ ○○ （電話番号・E-mail）