

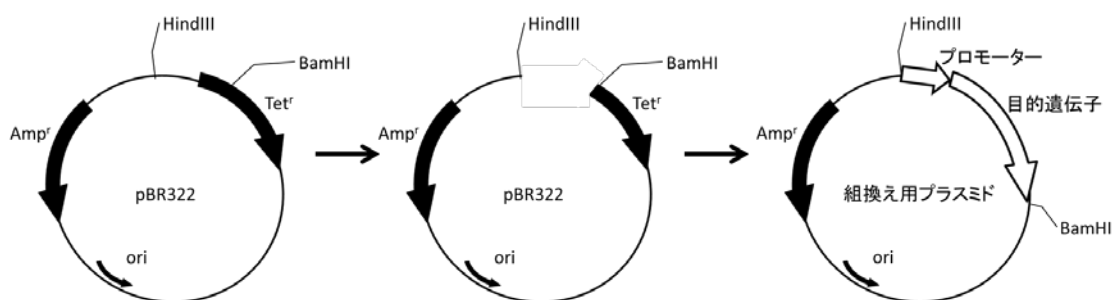
包括確認制度における運用の確認について

包括確認制度においては、宿主、ベクター及び拡散防止措置についてあらかじめ経済産業大臣の確認を受けていれば、使用する供与核酸が包括申請の対象範囲を満たすかどうか申請者が自主判断した上で、遺伝子組換え微生物を作成して使用することが可能。

申請者の自主判断に委ねるのは供与核酸のみであるが、実際に遺伝子組換え微生物を作成するにあたっては、遺伝子組換え用ベクターを構築する過程で、大臣確認を受けたベクターをある程度改造することがある。

※供与核酸における生産量の増大や遺伝子組換え用プラスミドを安定的に宿主に挿入するために、ベクターの構成要素（プロモーターや抗生物質耐性遺伝子等）を置換・欠失させるなどの改造が行われることがある。

(例) pBR322 を制限酵素処理し(これによりテトラサイクリン耐性遺伝子が欠損)、プロモーターと目的遺伝子を挿入し、遺伝子組換え用プラスミドを構築。



上記のような改造を行った場合でも、最終的に作成された遺伝子組換え微生物の安全性評価を「供与核酸の判定指針 2. 4 遺伝子組換え微生物」（別紙参照）に基づき実施することにより、元の宿主と比較して、増殖速度の上昇や薬剤に対する生残性の増大等、有害性が増大しておらず、包括確認された拡散防止措置で使用できることを確認することから安全性は担保できると考えられ、運用で認めることとし、当該内容の周知をQ&Aで行う。

なお、ベクターの改造を認める範囲については、カルタヘナ法第12条に基づくGILSP遺伝子組換え微生物においてGILSP告示注釈(4)で規定された範囲を準用する。

(4) 別表第一のベクターは、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、生理活性を有しないリンカー、アダプター、クローニングサイト、スペーサー、オペレーター及びシャイン・ダルガーノ配列の挿入、欠失又は変異導入処理によって改造されたものであっても別表第一のベクターと同等なものとして扱うものとし、また、別表第一のベクターに存在する耐性マーカー等の欠失又は変異導入処理によって改造されたものであっても同等なものとして扱うものとする。

ただし、当該改造によって水平伝播を生じさせるおそれがある場合は、この限りではない。

Q & A（案）

Q	A
包括確認を受けたベクターについて、遺伝子組換え生物を構築する過程において構成要素を置換・欠失させてもよいか。	包括確認制度においては、包括確認を受けたベクターに存在するプロモーター、ターミネーター、エンハンサー、生理活性を有しないリンカー、アダプター、クローニングサイト、スパーサー、オペレーター、シャイン・ダルガーノ配列及び耐性マーカー等を置換、欠失又は変異導入処理によって改造することを可能とする。ただし、当該改造により当該改造によって水平伝播を生じさせるおそれがある場合は、この限りではない。また、最終的に作成された遺伝子組換え微生物について、「供与核酸の判定指針 2. 4 遺伝子組換え微生物」で示す項目について調査し、包括確認された拡散防止措置で利用できる範囲となることを確認すること。特に、構成要素を置換・欠失させた部位については意図しない性質の発現がないことを確認すること。 なお、当該運用は、カルタヘナ法第 13 条に基づく個別確認には適用しない。

(別紙)

供与核酸の判定指針

平成30年1月11日
経済産業省生物化学産業課

1. はじめに

包括申請においては、使用する供与核酸を構成する全ての要素について、最終的な判断として「供与核酸における判定基準」を満たす必要がある。このため、包括確認を受けた事業者は、使用したい遺伝子組換え微生物を作成した場合には、供与核酸に関する要素について確認すると共に、使用する遺伝子組換え微生物そのものが、包括確認された拡散防止措置に合致するかどうかを、下記の判定基準及びチェック項目に従って、安全委員会で判断すること。(概要は別添「供与核酸の判定指針・フローチャート」を参照。)

安全委員会で判断できない場合は、遺伝子組換え微生物毎に個別の申請を行い、経済産業省の大臣確認を受けること。

【供与核酸における判定基準】

供与核酸の由来生物が、動植物、ヒト又は微生物（バイオセーフティレベルがBSL1であるものに限る。）であること。供与核酸が、以下の①～④に該当しないものであって、当該供与核酸からの生成物の機能が動植物及びヒトに対し、最新の科学的知見に照らし安全であることが推定される同定済核酸であること。

- ① 供与核酸が由来生物の病原性に関係するもの
- ② 供与核酸が由来生物の毒性に関係するもの
- ③ 供与核酸が宿主以外の生物への伝達性に関係するもの
- ④ 遺伝子組換えにより、宿主の病原性、毒性、増殖能力、生残性を変化させる又はヒトに危害を与える生物活性を獲得することにより、有害性を増大させると推定される供与核酸

2. チェック項目及び使用区分の判定

2. 1 供与核酸の由来生物における判定基準

- (1) 宿主に移入する核酸のうち、包括確認されたベクターに由来するもの以外の全ての核酸が供与核酸となる。これら供与核酸は、目的遺伝子のほか、その隣接領域及び調節領域の核酸を含むものであり、具体的には、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、オペレーターの核酸がこれに当たる。なお、合成配列からなるリンカー、アダプター、クローニングサイト、スパーサーは、由来生物の判定の対象とはしない。

これら全ての供与核酸の由来生物において、動植物及びヒトに対する病原性を以下

の検索サイトによって調べ、全ての供与核酸の由来生物が「BSL 1」であることを確認すること。データベースによる検索や文献情報の収集は、対象となる供与核酸及び遺伝子組換え微生物の使用の可否を判定する時点における、最新の情報及び知見に基づくものであること。

なお、供与核酸の由来生物が動植物及びヒトである場合、バイオセーフティレベル（BSL）の確認は不要なため、次項（2. 2）の判定から開始してよい。

【チェック項目】

供与核酸の由来生物が微生物である場合、バイオセーフティレベルが「BSL 1」であって、動植物及びヒトに対する病原性が報告されていないこと。なお、由来生物の種が不明で同属内に病原性があるものが存在する場合には、使用する供与核酸の由来生物が安全であることを証明する科学的根拠が存在すること。

①第 1 次検索調査

以下のような病原体名に基づく検索公開リストを全て参照し、多面的に病原性の有無の確認を行うこと。

- (ア) 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
(<http://www.nite.go.jp/nbrc/list/risk/index.html>)
- (イ) 国立感染症研究所 病原体等安全管理規程、同研究所ホームページ
(<http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/>)
- (ウ) 日本細菌学会 (http://jsbac.org/infectious_disease/index.html)
- (エ) 農林水産省 動物検疫所 (<http://www.maff.go.jp/aqs/>)
- (オ) DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
Bacterial Nomenclature Up-to-date
(<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>)

②第 2 次検索調査

利用する供与核酸の由来生物の種が不明であって、上記第 1 次検索調査において同属内に病原性があるものが存在する場合は、次に示すような文献検索等により関連資料を収集し、由来生物の安全性が確保できるものであることを論文等の文献情報により確認すること。

- (ア) NCBI National Library of Medicine (医学、生物科学全般)
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)
- (イ) 科学技術振興機構(JST) 科学技術情報 情報発信・流通総合システム(J-STAGE)
(<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/-char/ja/>)

【留意点】

- (i) 由来生物については、遺伝子組換え微生物の作成が終わった時点での上記第1次検索調査により最新の学名を検索し、その上でバイオセーフティーレベルの確認や文献検索を行うものとする。
- (ii) 由来生物の種が不明な場合には、由来生物のリボソームRNA遺伝子等のシーケンス解析を行って系統分類を行い、可能な限り種を特定して評価する。
- (iii) 種名まで特定できない場合、かつ、同属内に病原性があるものが確認された場合には、文献検索及び系統分類の結果から、目的の供与核酸の由来生物が、病原性のある種ではないことを確認する。

2. 2 構成要素の機能における判定基準

- (1) 宿主に移入する核酸のうち、包括確認されたベクターに由来するもの以外のものであって、目的遺伝子のほか、その隣接領域及び調節領域の核酸が有する機能が全ての項目において「供与核酸における判定基準」に照らし安全であることを確認すること。

具体的には、目的遺伝子のほか、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、オペレーター、生理活性を有しないリンカー、アダプター、クローニングサイト及びスペーサーの核酸を含んだ構成要素を用いる場合は、その機能と目的に関する情報を論文などの文献で確認することにより、以下に挙げる項目について検索調査し、動植物及びヒトに対して病原性、毒性、若しくは有害と認められる塩基配列を含まず、伝達性に乏しいことを確認すること。

- ① 供与核酸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等の性質が十分明らかにされており、その性質に照らして有害と認められる塩基配列を含まないことを確認する。
- ② 供与核酸の発現産物である酵素もしくは遺伝子組換え微生物を用いて物質生産及び処理を行う場合は、発現産物の機能と推定される宿主の代謝経路について調べ、物質生産又は処理との関係を示し、安全性上の問題がないことを確認する。
- ③ 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を確認する。

ここで、「有害と認められる塩基配列を含まない」とは、「有害な既知のタンパク質又はポリペプチドをコードするDNAを含まないこと」を意味している。また、「伝達性に乏しい」とは、「核酸がある生物個体から他の生物個体へ伝達される程度が低いこと」を意味し、具体的には、微生物から微生物への遺伝子の水平伝達を高頻度にもたらすプラスミドの接合伝達やバクテリオファージによる形質導入等が起こらないことを指

す。

なお、包括申請においては、供与核酸の由来生物が病原性を有しない場合のみ判定となるため、当該生物由来の供与核酸は有害でないとは判定することが妥当であるとも考えられる。しかしながらこの判定は、宿主及びベクターの性質と合わせて、供与核酸の性質を個別に考慮することが重要である。例えば、サイトカイン等の生理活性物質や毒物・薬剤の分解・代謝に関わる酵素、細胞壁等の構成成分に対して加水分解活性を示す酵素等は例外的に特段の判定基準を明示することが求められることがある。

また、WHOの安全性マニュアル (Laboratory biosafety manual Third edition) によれば、供与核酸が既知の生物活性を有するタンパク質等をコードしており、その産物が危害を生じさせる可能性のある状況において、その発現レベルと併せて評価すべきものとして、トキシン、サイトカイン、ホルモン、発現調節因子、病原性に関わる因子又はエンハンサー、腫瘍形成因子、抗生物質耐性因子、アレルゲンを要注意遺伝子として指摘している。したがって、物質としての安全性だけでなく、その物質を発現した遺伝子組換え微生物としての安全性を確認する必要がある。

これらが確認できない場合は、包括申請の範囲内であることが判定できないため、当該供与核酸を含む遺伝子組換え微生物については、個別に申請を行うこと。

【チェック項目】

各文献検索等の結果、供与核酸における構成要素の機能において、物質を生産又は処理する場合に推定される経路などの性質が明らかになっており、これらの性質が動植物及びヒトに対して病原性や毒性、有害と認められる塩基配列を含まず、かつ、伝達性にも乏しい安全なものであること。

検索調査

以下の検索サイトを使用して供与核酸が有害な機能を含まないことを確認すること。

(ア) NCBI National Library of Medicine (医学、生物科学全般)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

(イ) 科学技術振興機構 (JST) 科学技術情報 情報発信・流通総合システム (J-STAGE)

(<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/-char/ja/>)

【留意点】

- (i) 複数の供与核酸を移入する場合には、それらを組み合わせたことにより発現する機能や活性について考慮すること。例えば酵素などは、サブユニット単体では酵素活性を有しないが、サブユニット同士が会合することにより活性を示す場合がある。
- (ii) 供与核酸の病原性については、文部科学省のポジションペーパー「二種省令における「病原性」等の考え方について

(http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/data/anzen/position_08.pdf)
を参考とし、以下の活性が報告されていないかをキーワード検索等により確認する。

- イ) トキシン
- ロ) サイトカイン
- ハ) ホルモン
- ニ) 発現調節因子
- ホ) 病原性に関わる因子又はエンハンサー
- ヘ) 腫瘍形成因子
- ト) 抗生物質耐性因子
- チ) アレルゲン

(iii) トキシン及び病原性に関係する因子の中には、外毒素等の様に単独で感染宿主に多大な影響を与えるものと、多数の因子と作用し病原性に寄与するものがあることに留意する。供与核酸遺伝子が宿主内で発現した時に、動植物及びヒトにどのような作用を示すのかを各々検索調査し、申請遺伝子を発現させた場合のリスクについて判定する。

(iv) 発現調節因子のうち、遺伝子発現量の単純な調節を目的としたものは含まない。ただし、当該調節機構により制御を受ける遺伝子の性質が、「供与核酸における判定基準」④に示した宿主の有害性を増大させる可能性がある場合（例えば、遺伝子の活性化により細胞の癌化等が起きる場合など）には、病原性を高める可能性が否定できないものと判定する。

(v) 抗生物質耐性因子には、包括確認されたベクター由来のもの、もしくは、G I L S P リストに掲載されている薬剤耐性マーカー遺伝子は含まない。ただし、供与核酸遺伝子単独あるいは薬剤耐性マーカー遺伝子を加えて多剤耐性を宿主に付加する可能性がある場合には、「供与核酸における判定基準」④に示した宿主の有害性を増大させる可能性も含めたリスクについて判定する。

(vi) アレルゲンとは、アレルギーを起こす原因物質（食物・花粉・ダニ・動物・カビなど）のことをいう。例えば食物アレルゲンについては、消費者庁より、これまで食物アレルギーに係る呼吸困難等の重篤な健康危害が見られた症例から、その際に食した食品の中で明らかに特定された原材料についてアレルギー物質を含む「特定原材料」及び「特定原材料に準ずるもの」を指定しており、これらを参考にして、リスクについて判定する。

「食品表示基準」（平成27年内閣府令第10号）

「特定原材料」及び「特定原材料に準ずるもの」

http://www.caa.go.jp/foods/pdf/foods_index_18_170329_0005.pdf

(vii) 検索でヒットした文献に何らかの病名が出ている場合は、申請遺伝子が病因や疾病の進行に関係しているかどうかを当該文献等に記載されているキーワードを利用して追加で検索調査をする。

(viii) 当初に検索調査を行ったときから新たに病原性が報告されている場合や、過去に疾病

の原因遺伝子とされていても現在の知見ではそうではないというケースもあるため、可能な限り最新の文献で現在の評価を確認する。現在においても評価に決着がついていない場合で疾病との関連が疑わしいものについては、病原性の可能性が否定できないものと判定し、当該供与核酸を含む遺伝子組換え微生物については、個別に申請を行うこと。

なお、上記キーワード等で文献検索を行い、各因子として文献に記載されたものであっても、当該供与核酸の機能の安全性が他の論文等によって明確に確保されている場合は、安全委員会で使用の可否についての判断を行うことができる。

2. 3 供与核酸の安全性における判定基準

供与核酸が目的遺伝子及び調節配列の核酸以外の機能未知なオープンリーディングフレーム（ORF）を含む場合は、供与核酸（周辺配列を含む場合は周辺配列にコードされるORFを含む）が既知の病原因子等に有意に類似してしないことを慎重に確認する必要がある。この場合、供与核酸の6つのフレーム（1塩基ずつずらした3フレーム及び逆方向の合計6フレーム）について可能な限り新しいアミノ酸配列データベースでホモロジー検索を行い、病原性、毒素、発ガン性、ウイルスなどに関連する遺伝子との相同性の程度を検討することによって、既知の有害なDNAを含まないことを確認すること。

具体的には、供与核酸全長内のアミノ酸残基がおおむね40残基以上のORFを対象とし、NCBIのNon-redundant protein sequences (nr)等の最新のデータベースを対象とするblastp（“アミノ酸配列”対“アミノ酸配列”）検索を行った際に、有意な相同性を持つタンパク質の中に既知の病原因子等がないことを確認する。必要な場合には、有意な相同性を持つタンパク質のアミノ酸配列を使って分子系統解析を行い、目的タンパク質を含むクレード（単系統群）の中に既知の病原因子等が含まれないことを確認する。各系統分類や分子系統解析にはClustal W等の多重整列・系統解析プログラムを用いることができる。なお、供与核酸が極端に短い場合は、供与核酸を含むベクターの一定領域（300塩基程度）を選択し、その部分に対してORF検索を行うものとする。

BLAST検索の結果については、既知の遺伝子にヒットしないもの、もしくは、既知の有害なDNAにヒットしない場合には、安全であると判定する。なお、供与核酸の有害性については、項目2.2の具体例に示した内容に従って判定をすること。

既知の有害なDNAにヒットした場合は、ORF検索及び相同性検索結果のみでは安全であることが判定できないため、個別に申請を行うこと。

【チェック項目】

供与核酸に含まれるORFの相同性検索において、既知の有害なDNA配列を含まないこと。

検索調査

以下の検索サイトを使用して既知の有害なDNA配列を含まないことを確認すること。

(ア) NCBI ORF検索サイト(ORF finder)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

(イ) NCBI Blast検索サイト(Protein BLAST)

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

2. 4 遺伝子組換え微生物

2. 1～2. 3で示すチェック項目に基づき、基準を満たすと判定した供与核酸を用い作成した遺伝子組換え微生物について、以下の項目について調査し、包括確認された拡散防止措置の範囲となることを確認すること。

(1) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性

①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を確認すること。

②組換えDNA分子の安定性については、以下の2つの方法のどちらかで確認を行い、移入した供与核酸の構成が維持されていることを確認すること。

(ア) 生産時と同様な培養条件において、組換えDNA分子の脱落率と変化のしやすさを継代の状況をもとに確認すること。また、組換えDNA分子を安定化する方法があれば確認すること。

(イ) 挿入遺伝子の発現の程度を酵素活性等によって見積り、その継代変化から安定性についての知見を確認すること。

③相同組換え等によって移入した核酸が染色体へ組み込まれる場合は、当該挿入DNAを宿主に導入することによって宿主の性質がリスクを増幅させる方向に変わることがないことを確認すること。具体的には、宿主染色体の挿入される部位についての情報、フレームシフトや新たなフュージョンタンパク質の生起の有無、及び新規なORFの出現の有無について調査し、意図しない性質の発現がないことを確認する。

(2) 宿主（又は宿主の属する分類学上の種）との相違

①増殖の様式の相違点については、遺伝子組換え微生物と宿主の増殖能力の比較結果を確認すること。なお、明確な根拠がある場合には実験的に比較する必要はない。

②病原性の相違については、遺伝子組換え微生物が新たな病原性を有しているかどうかについて根拠と共に確認すること。

③その他の情報として、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する生理学的・生化学的性質、核酸伝達性等の情報を確認するこ

と。

④遺伝子組換え微生物と宿主（又は宿主の属する分類学上の種）との識別を可能とする特徴などを確認すること。

（３）当該施設における生産工程の確認

当該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を確認すること。また、実際に使用する各種機器、バルブの箇所や各工程内容等が包括確認された拡散防止措置の範囲に合致するかを確認すること。

特に遺伝子組換え微生物を不活化する方法について、以下の内容が包括確認された拡散防止措置の範囲内に合致するかを確認すること。

（ア）製造設備又は試験検査に使用する器具、容器等を洗浄する設備又は、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及びその方法。

（イ）廃液又は廃棄物について、それらに含まれる遺伝子組換え微生物が検出されないレベルにとどめるための措置をとるための方法。

【チェック項目】

これら全ての項目において、新たな供与核酸を導入した遺伝子組換え微生物の性質が、元の宿主と比較して、増殖速度の上昇や（不活化用）薬剤に対する生残性の増大等、有害性が増大しておらず、包括確認された拡散防止措置で使用できる範囲内であること。

＜参考文献＞

２．１．供与核酸の由来生物における判定基準及び２．２ 構成要素の機能における判定基準においては、第２次検索調査における文献調査のほかに、以下のような専門の参考文献があるので必要に応じて参照しても良い。

（ア）日本植物病害大事典 （出版社） 全国農村教育協会

（イ）植物病理学事典 （出版社）養賢堂

（ウ）改訂・魚病学概論 （出版社）恒星社厚生閣

（エ）魚病学 （出版社）学窓社

（オ）生物農薬・フェロモンガイドブック （出版社）日本植物防疫協会

（カ）Bergey's Manual of Systematic Bacteriology （出版社）Springer

（キ）Fields Virology （出版社）Lippincott Williams & Wilkins

（ク）Manual of Clinical Microbiology

（出版社）American Society for Microbiology Press

（ケ）The Desk Encyclopedia of Microbiology （出版社）Academic Press