

(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）。

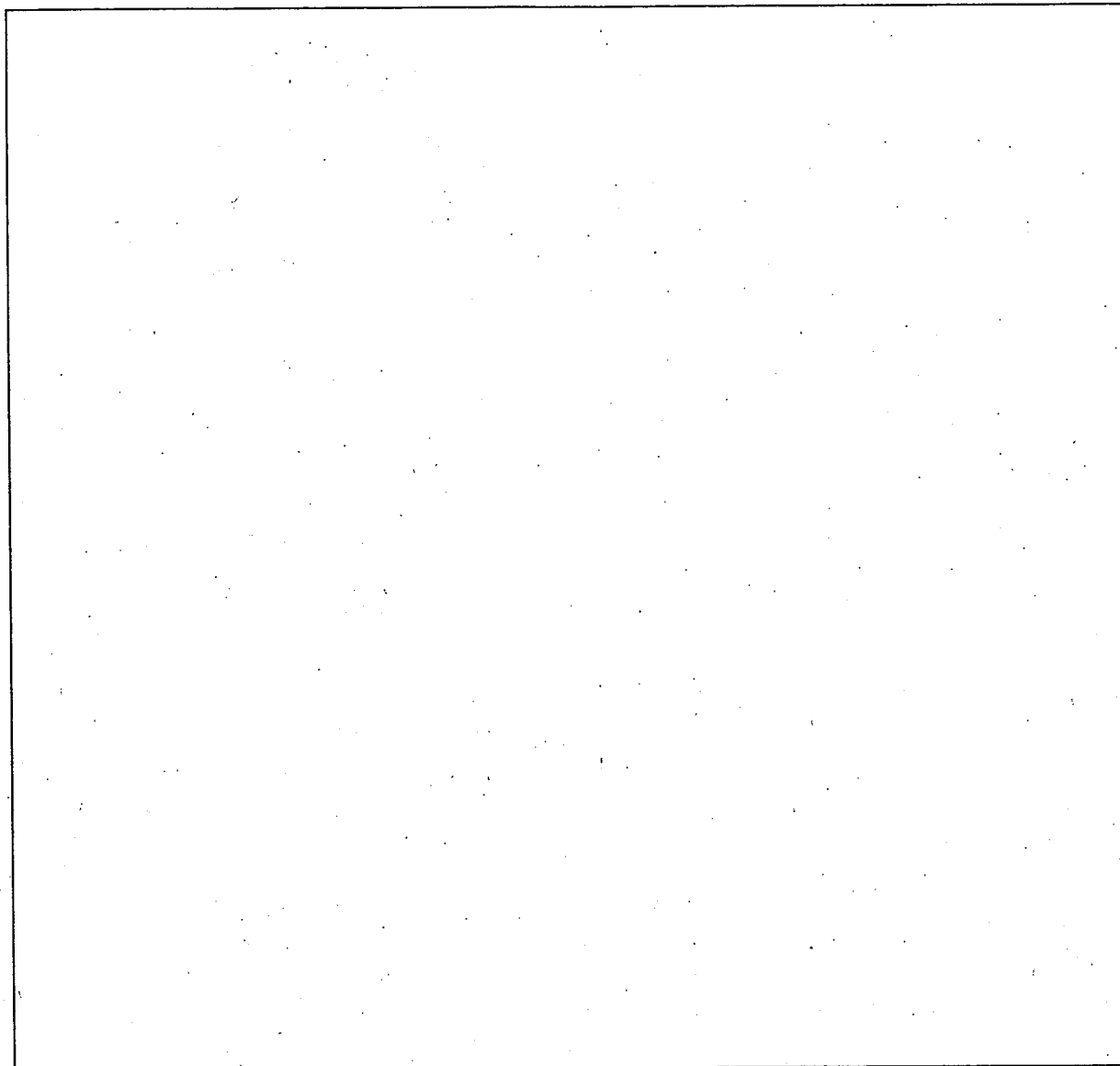


図4-1 発現構成体の調製フロー図

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

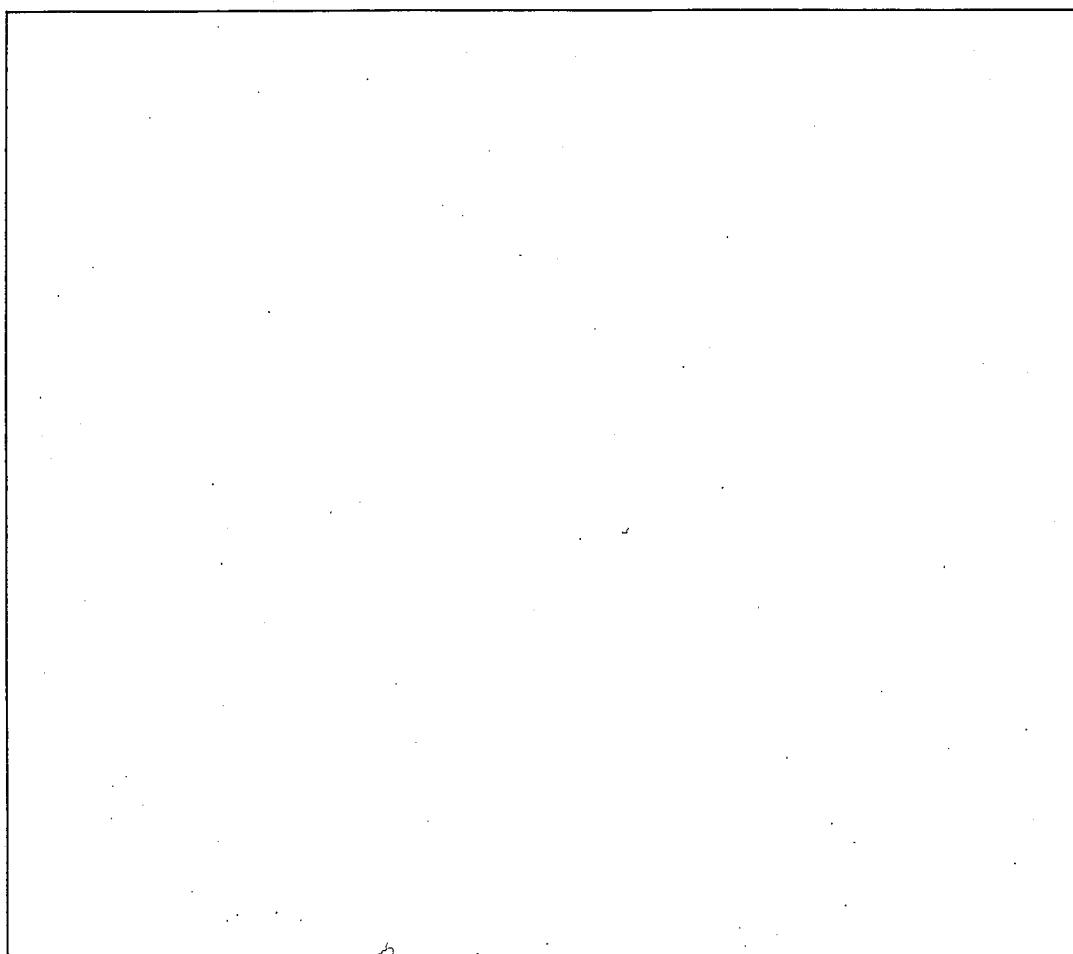


図 4-2 発現プラスミドの構造

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）。

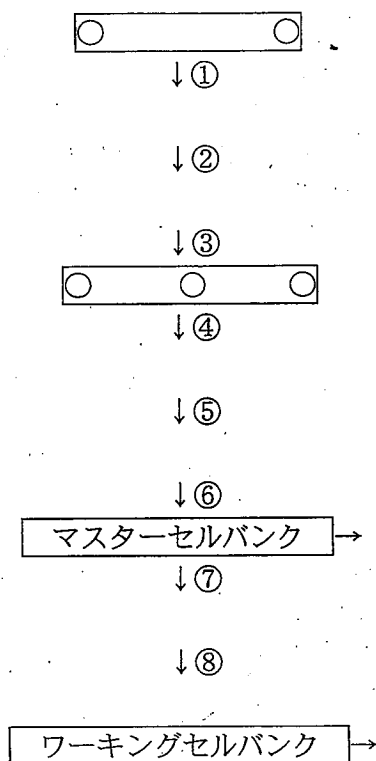


図4-3 遺伝子組換え生物作製のフロー図
(フロー図の簡単な説明)

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	

注：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

註：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、○○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

注：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		

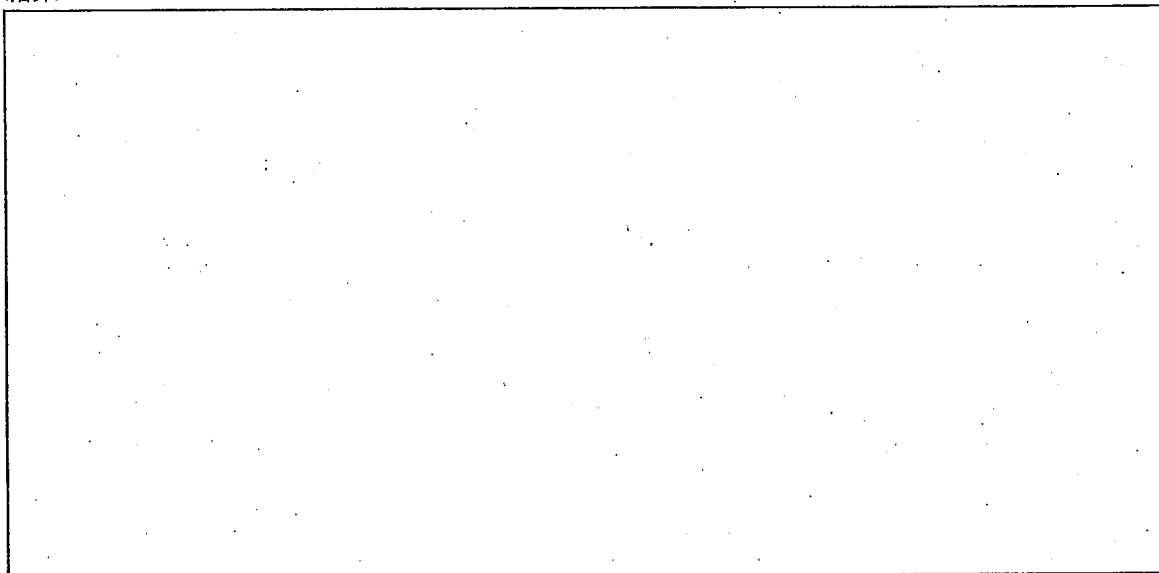
……によって、……付近に、……が確認された。

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



注：電気泳動等の結果（ゲル写真等）を示す。

（試験結果）

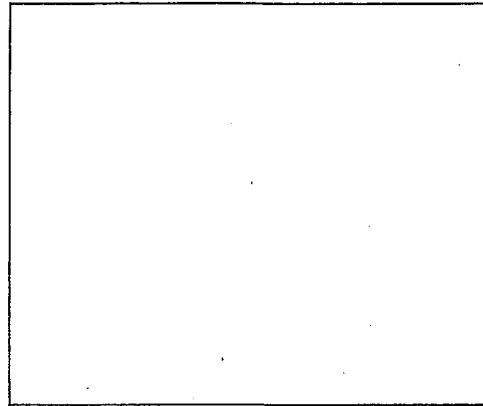
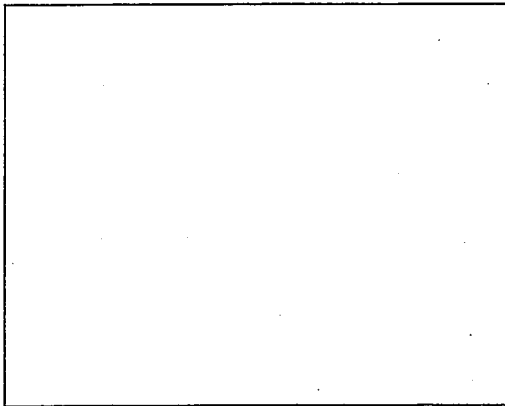
4) 下水中、土壌水等における生存能力

①試験方法

用いた〇〇：

〇水の調製：

②結果

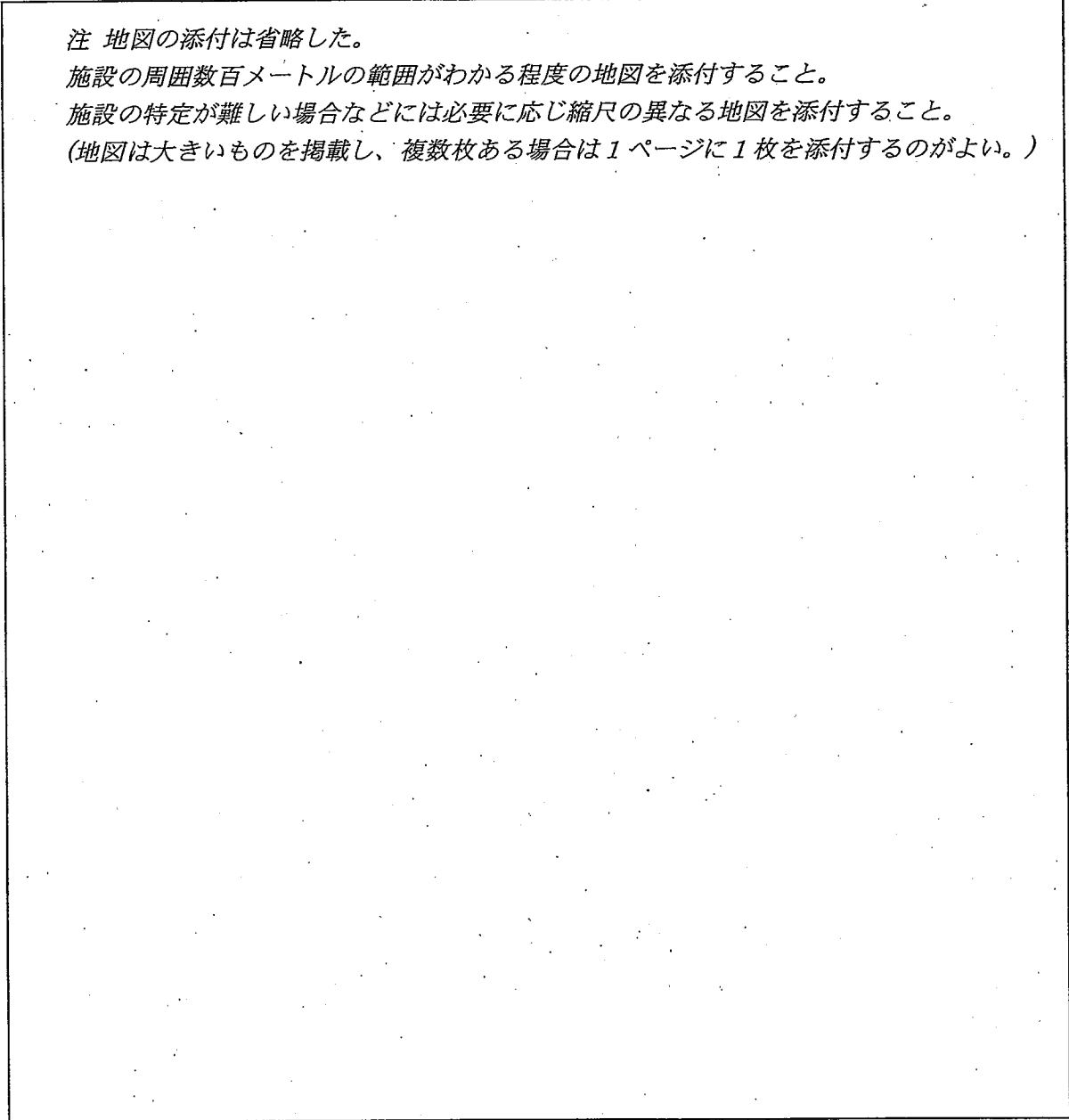


註：宿主と同等か又はそれ以下であること等、結果を示す。

註：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。

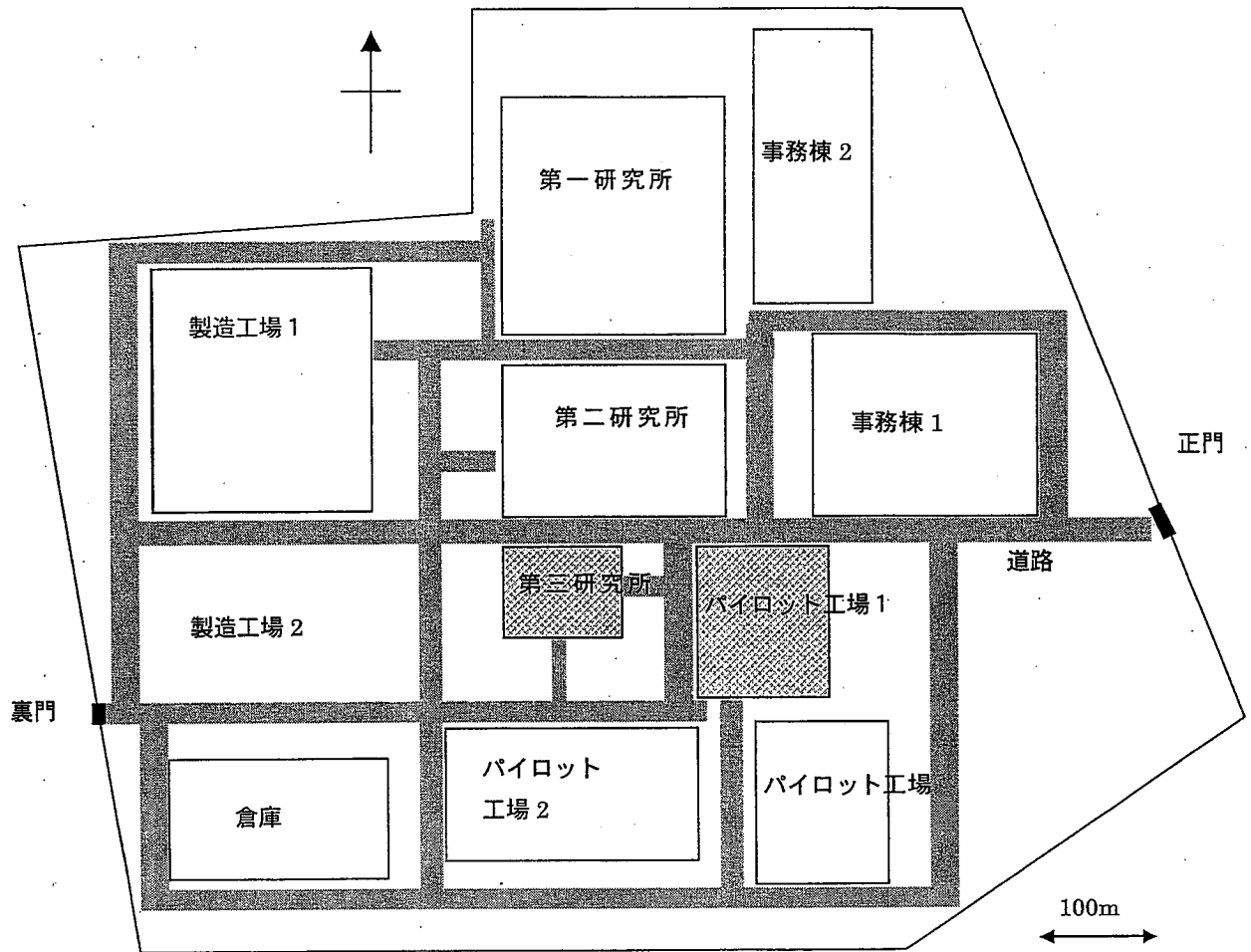
- 薬品株式会社 世田谷工場を含む東京都世田谷区□□□1丁目周辺地図を以下に示す。
- 色で囲む区域が○●薬品株式会社 世田谷工場である。

図○ ○●薬品株式会社 世田谷工場周辺地図



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

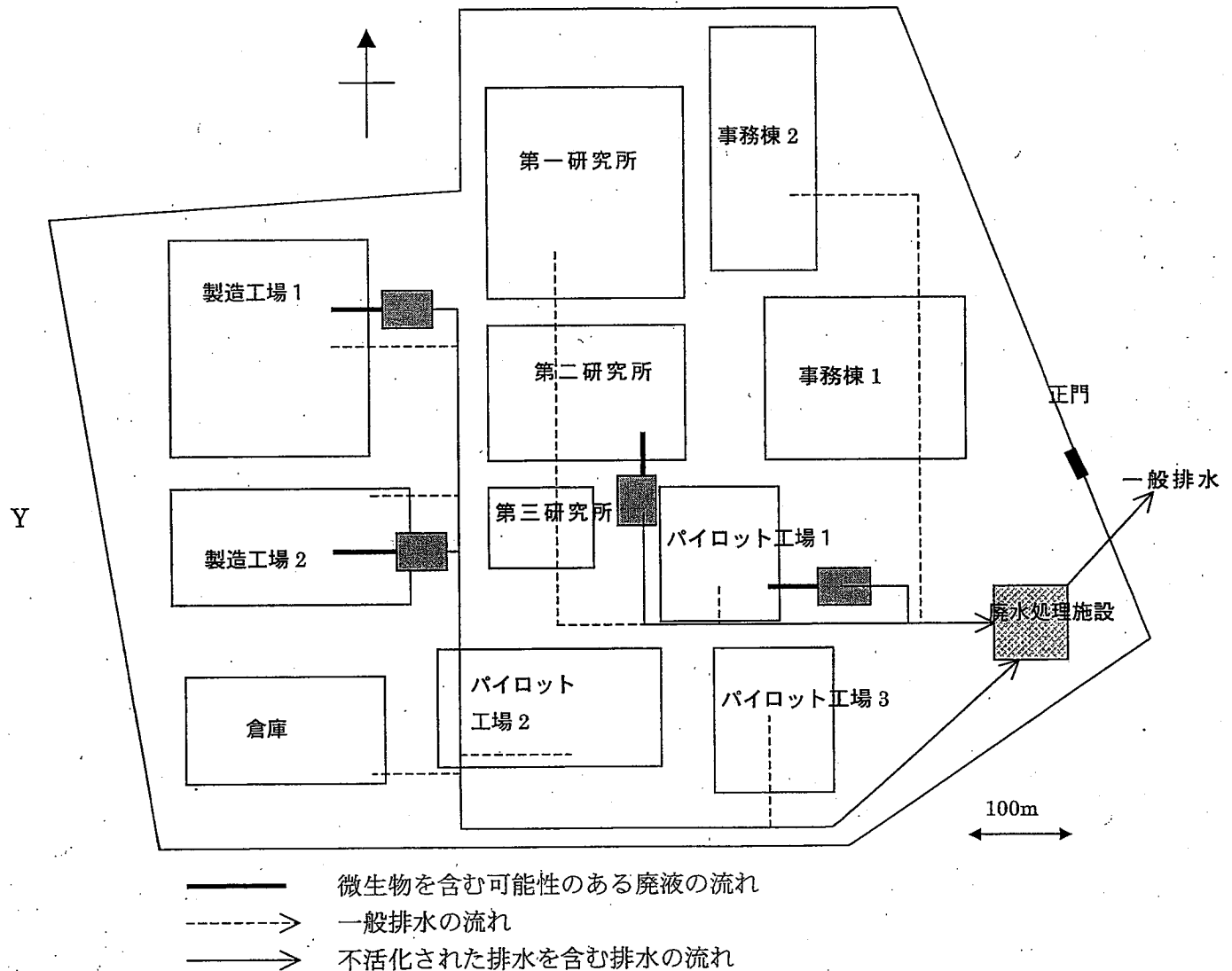
工場の周囲は、厚さ30cm程度、高さ5m程度のコンクリート製の壁で囲まれている。

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 (〇色四角で示す) 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、○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、□に示した。培養室1、2、3、4を灰色で示す。

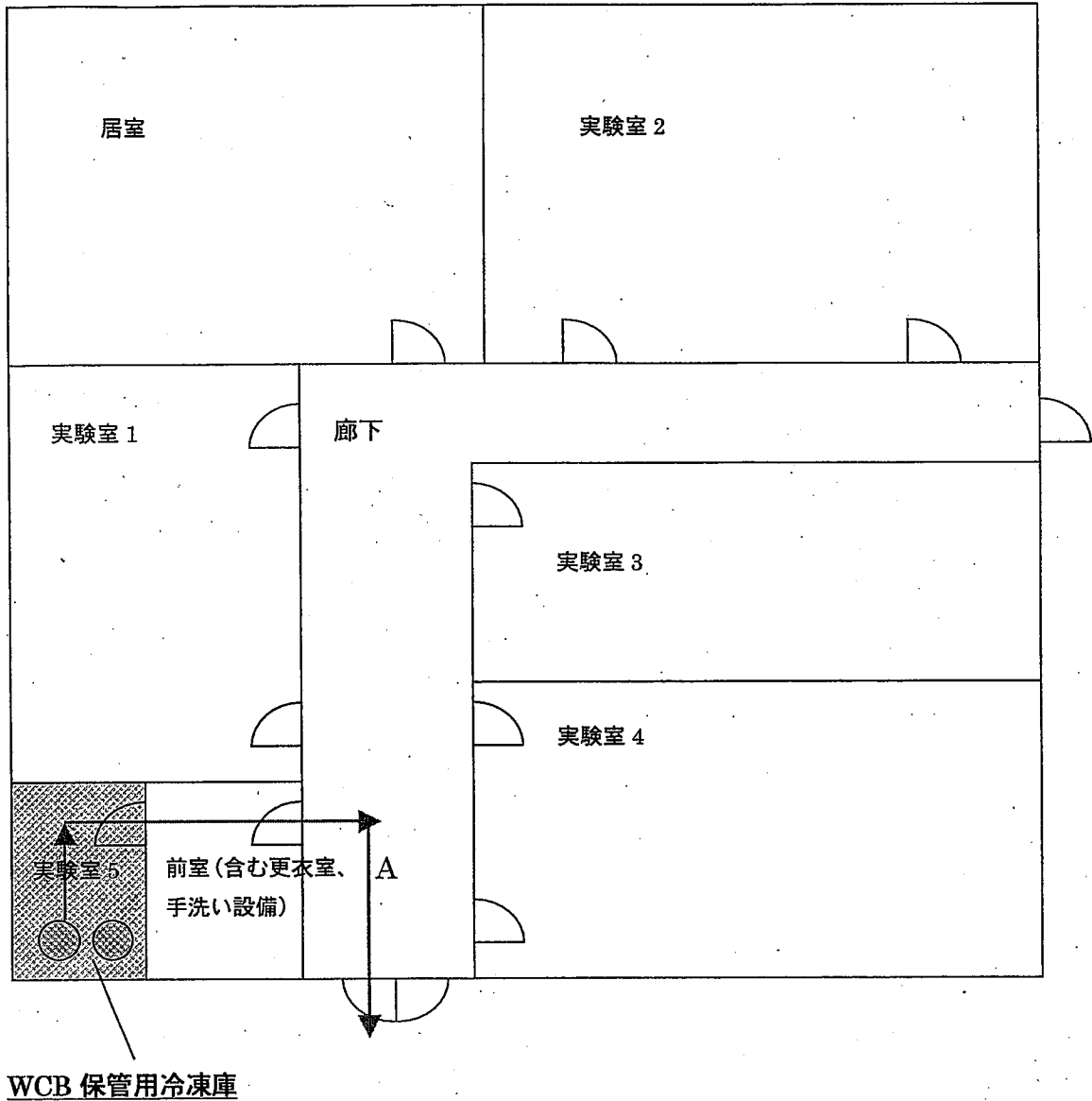
3) 生産に使用する主要な設備及び装置の配置平面図

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○、□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。

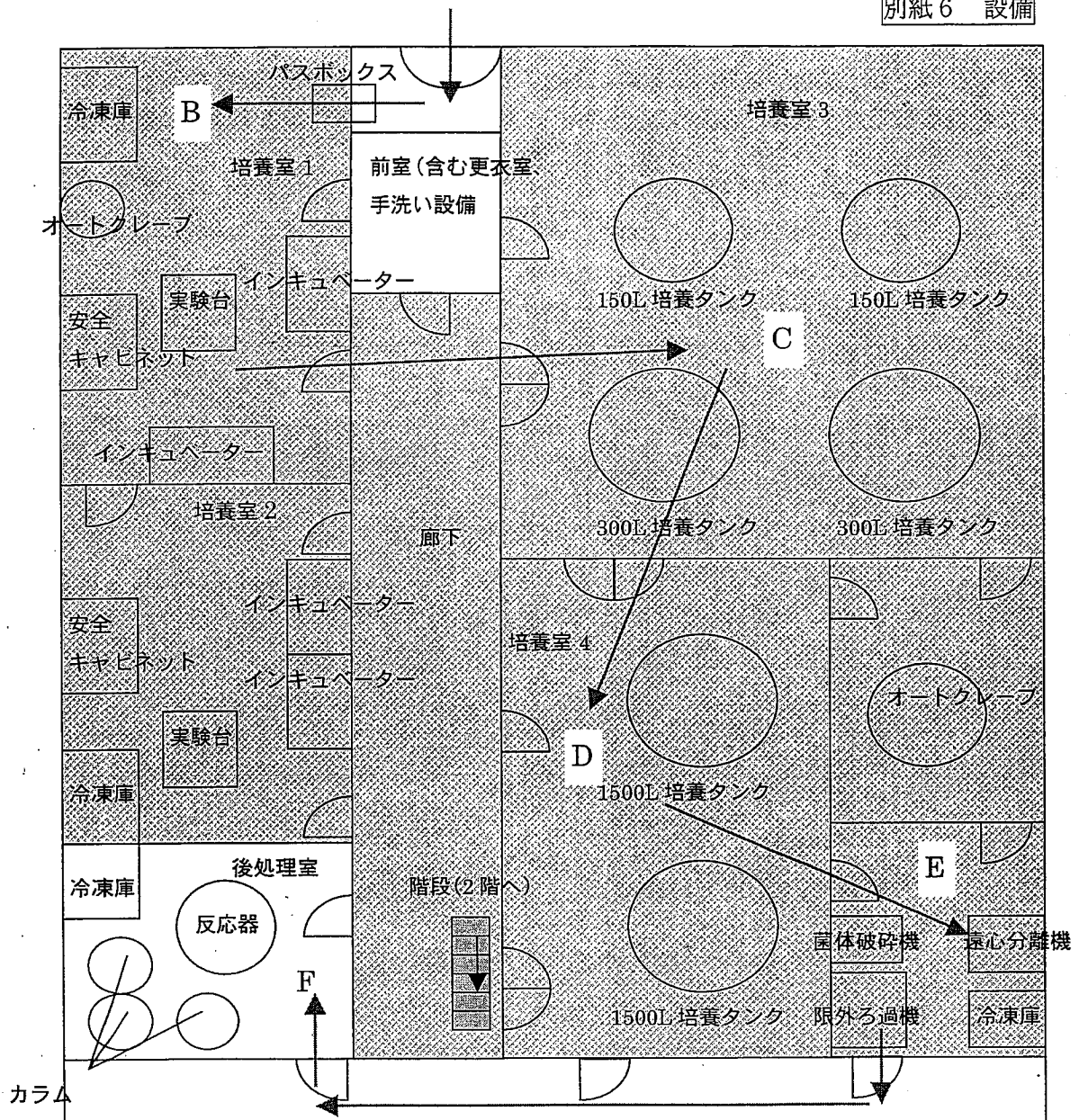
主な作業：

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・イラスト等をもちいて説明すること。

1) 換気設備

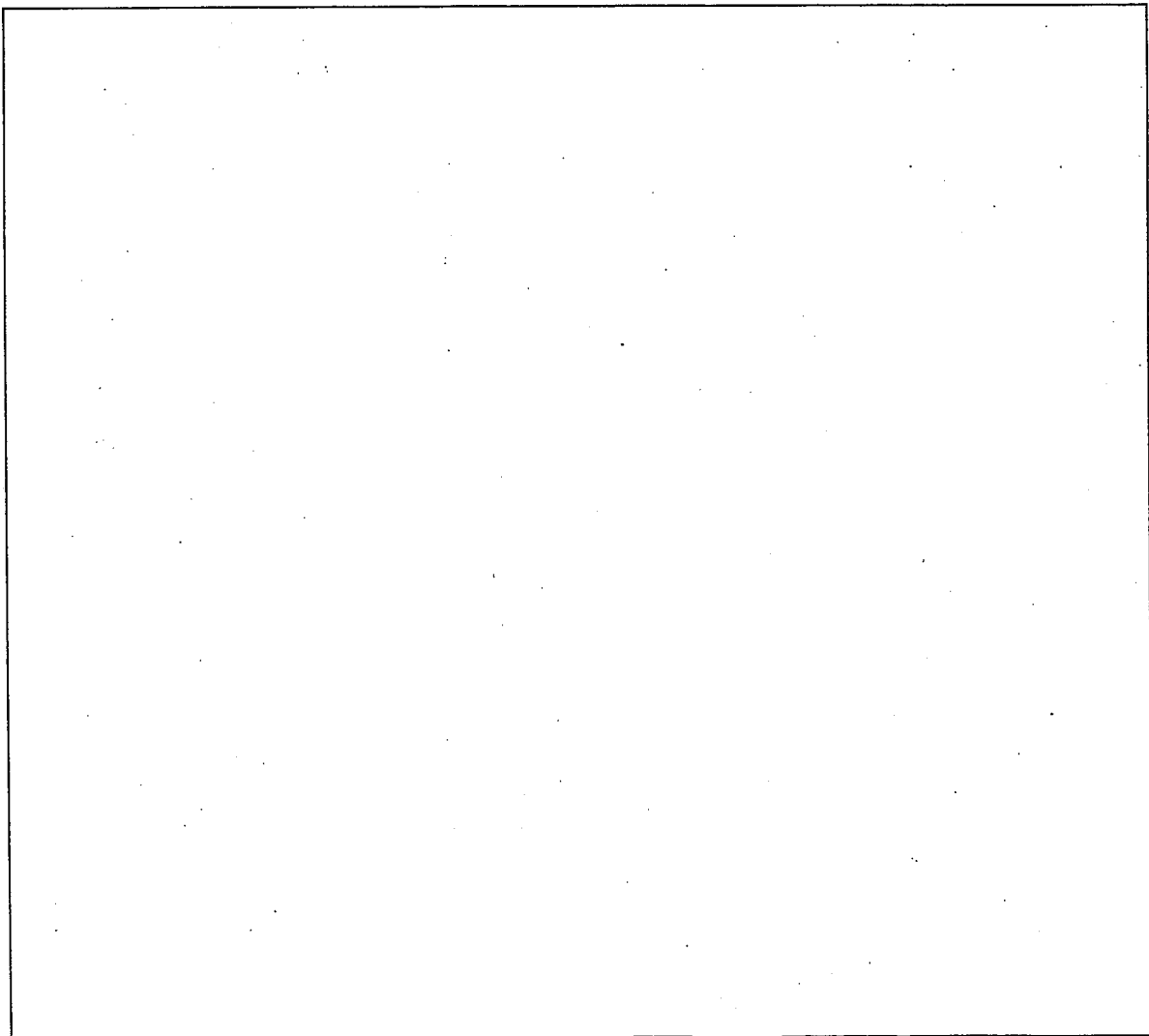
註：工場全体の空調について、吸気系および排気系の概略、換気の方法（一方向か）、HEPA フィルターの性能（その定期点検等の実施頻度）、工場・作業区域での清浄度、等について詳しく説明する。

*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。