

(様式2)

アデノウイルスベクターを用いた実験申請書の記入例について

組換えDNA実験計画書

(兼、第二種使用等拡散防止措置確認書)

XX年XX月XX日

申請の種類 (注1)	第二種使用等実験の種類 (注2)	執るべき拡散防止措置 (注2)	公的経費 (注3)
<input checked="" type="checkbox"/> 新規 <input type="checkbox"/> 継続 (課題番号:Hxx-xx) <input type="checkbox"/> 変更 (課題番号)	<input checked="" type="checkbox"/> 微生物使用実験 <input type="checkbox"/> 大量培養実験 <input checked="" type="checkbox"/> 動物使用実験 <input type="checkbox"/> 動物作成・使用 <input checked="" type="checkbox"/> 動物接種 <input type="checkbox"/> 植物等使用実験 <input type="checkbox"/> 植物作成 <input type="checkbox"/> 植物接種 <input type="checkbox"/> きのこ作成 <input type="checkbox"/> 細胞融合実験 <input type="checkbox"/> Gene Drive 使用実験 <input type="checkbox"/> ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変生物	<input checked="" type="checkbox"/> P1 <input type="checkbox"/> P1A <input checked="" type="checkbox"/> P2 <input checked="" type="checkbox"/> P2A <input type="checkbox"/> P3 <input type="checkbox"/> P3A <input type="checkbox"/> その他	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無

継続又は変更課題の場合のみ記載

実験課題名	アデノウイルスベクターの in vivo 遺伝子導入効率の検討
実験実施期間 (注4)	2017年4月から2020年3月まで
実験責任者	所属部局の所在地 (〒113-8602) 東京都文京区千駄木 1-1-5
	所属機関・部局・職名 日本医科大学・医学部・教授
	氏名 日本医大 太郎
	連絡先 Tel:03-3822-2131(内 xxxx) Fax:03(5814)xxxx E-mail:TaroNMS@nms.ac.jp
実験場所	所在地 (〒113-8602) 東京都文京区千駄木 1-1-5
	名称 日本医科大学

実験従事者	氏名	所属機関・職名	組換えDNA実験経験の有無(注5)
	日本医大 太郎	日本医科大学・教授	微生物(有)、動物(有)
山田 次郎	日本医科大学・講師	微生物(有)、動物(有)	
鈴木 太郎	日本医科大学・助教	微生物(有)、動物(無)	
山本 花子	日本医科大学・大学院生	微生物(無)、動物(無)	

実験課題名	アデノウイルスベクターの in vivo 遺伝子導入効率の検討
実験の目的	アデノウイルスベクターをマウス、ラットへ in vivo 投与した時の各臓器への遺伝子導入効率を検討することを目的とする。
実験の概要	GFP 発現アデノウイルスベクターを作製し、これらをマウス、ラットへ経静脈または腹腔内投与し、4 週間後に各臓器への遺伝子導入効率を免疫染色、および PCR を用いて検討する。
当該組換え DNA 実験の必要性(注 6) * 機関承認実験として申請する場合のみ	アデノウイルスベクターを作製する実験 (P2)、およびマウス、ラットにウイルスベクターを用いて遺伝子導入する実験 (P2A) が組換え DNA 実験に相当する。実験実施場所は物理的封じ込めレベル P2 及び P2A の部屋で行う。実験従事者はウイルスベクター、動物共に実験経験のある者中心で行い、初心者が行う場合は、必ず経験者が指導し、一緒に実験を行う。(申請実験課題の内容の必要性でなく、組換え DNA 実験を安全に実施できると認める理由について簡潔に説明すること(実験計画、場所、従事者の妥当性など))

実験に使用する核酸等について (注 7)						
No.	核酸供与体および核酸供与体の実験分類(注 8、注 9)	供与核酸の名称(注 10)	使用する宿主-ベクター系(注 11) (宿主ごとに分類して記入すること)	保有動植物等(注 12)	拡散防止措置の区分(注 13)	備考
1	アデノウイルス クラス 2 オワンクラゲ クラス 1 ヒト クラス 1	E1/E3 遺伝子欠損ゲノム (AC_000008) eGFP 遺伝子 (M28668) EF1 α プロモーター (NM_001402)	宿主 E. coli K12 由来株 DH5 α ベクター pBlue script (Stratagene 社) pAd/EF1 α /V5-DEST (Invitrogen 社)		P1	eGFP 発現アデノウイルスベクター作製の為のプラスミド作製
2	アデノウイルス クラス 2 オワンクラゲ クラス 1 ヒト クラス 1	E1/E3 遺伝子欠損ゲノム (AC_000008) eGFP 遺伝子 (M28668) EF1 α プロモーター (NM_001402)	宿主 アデノウイルス ベクター 上記(1)で作成したプラスミド	293 細胞	P2	プラスミドを細胞にトランスフェクションしアデノウイルスベクターを作製する。
3			宿主 上記(2)で作成した eGFP 発現アデノウイルス	HeLa 細胞 マウス ラット	P2 P2A	アデノウイルスベクターの培養細胞への接種 アデノウイルスベクターのマウス、ラットへの接種

遺伝子組換え生物等の特性について	
DNA (核酸) 供与体の特徴 (病原性、有害物質産生性その他の特性) (注 14)	ヒト、オワンクラゲは病原性、寄生性、腐生性などはなく研究従事者に対する生物学的リスクはない。 アデノウイルス 5 型は咽頭炎、扁桃炎などの上気道感染症を起こす。
使用予定の DNA (核酸) 又は供与 DNA (核酸) 並びにその産物の特徴及び性質 (注 15)	本実験で使用するアデノウイルスベクター作製プラスミドは E1/E3 欠損アデノウイルス DNA で本プラスミドのみではウイルスの産生、増幅は出来ない。 eGFP (enhanced green fluorescent protein) はオワンクラゲ由来の蛍光蛋白質であり、マーカーとして使用する。オワンクラゲ由来の eGFP の生物学的リスクは知られていない。 EF1 α プロモーターは eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 の転写開始点より約 500bp 上流から第一イントロンの 3' splice site までの領域の DNA でベクターの内部プロモーターとして用いられる。
ベクター等の特徴、伝達性、宿主依存性 (注 16)	アデノベクター作成用プラスミドは真核生物遺伝子発現プラスミドベクターであり、EF1 α プロモーターをもつ。原核生物内では β ラクタマーゼを産生し、プラスミドで形質転換した大腸菌はアンピシリン等の β ラクタム系の抗生剤に耐性を獲得する。いずれも大腸菌用クローニングプラスミドで伝達性はない。
宿主等の特徴、遺伝子交換範囲とその機構 (注 17)	DH5 α は <i>E. coli</i> K12 株由来であり、チアミン要求性であるので自然界では生育できない。 アデノウイルスベクターは、E1a および E3 欠損株のため、野生型と異なり増殖しない。
遺伝子組換え生物等の特性、宿主等との相違点 (注 18)	該当せず。
遺伝子組換え生物を保有する動植物又は細胞等の特性 (注 19)	eGFP 発現アデノウイルスベクターを接種したマウス、ラットは遺伝子導入された部位で GFP の発現を認める。アデノウイルスベクター自体はマウス、ラット内において増殖はしない。

拡散防止措置 (物理的封じ込め) について	
実験施設名及び位置 (注 20)	RD32: 日本医科大学大学院棟 3 階 高度先端医療技術開発センター遺伝子治療研究部門研究室 1 (3A05) RD33: 日本医科大学大学院棟 3 階 高度先端医療技術開発センター遺伝子治療研究部門研究室 2 (3B03, 3B04) RD38: 日本医科大学大学院棟地下 2 階 実験動物管理室内動物実験室 P 1 A RD39: 日本医科大学大学院棟地下 2 階 実験動物管理室内動物実験室 P 2 A 安全委員会に登録してある施設のみで実験が可能であり、その施設番号および名称を記入
施設に含まれる主な設備の概要 (注 21)	RD31、RD 32 および RD 33: 大学院棟は鉄筋コンクリート建てで、正面玄関には守衛室、裏玄関出入り口にカードリーダー方式のセキュリティーシステムが設置され、登録した者しか入館できない。実験室には安全キャビネット 2 台及びオートクレーブを保有し、空調設備をもち、P 2 実験施設である。 RD 38, および RD 39: 鉄筋コンクリート建てで、出入り口にカードリーダー方式のセキュリティーシステムが設置され、登録した者しか入館できない。P 2 A には安全キャビネットを有し、各セクションにはねずみ返しなど逃亡防止のための設備を有する。
遺伝子組換え生物等を不活化するための措置 (注 22)	使用した器具等はオートクレーブ (121 $^{\circ}$ C 20 分) 後、廃棄する。オートクレーブ不可能な物品は 70%エタノールまたは次亜塩素酸で滅菌する。ウイルスベクター使用時は、取扱いは安全キャビネット内で行い、密閉した培養器 (恒温 CO ₂ インキュベーター) でのみ管理する。遺伝子組換え動物に関しては、個体識別の為に耳穴パンチやタグ標識を利用するとともに、飼育ケージに個体数と出生年月日を掲示する。排泄物を含むおがくずはオートクレーブ (121 $^{\circ}$ C、20 分間) 後に 廃棄 し、飼育水は消毒の後 廃棄 する。実験終了後の動物は -20 $^{\circ}$ C の指定された冷蔵庫に保存後、一括して焼却処分する。
その他、特記すべき事項	

この計画書は、法律*に伴って公布された省令**をもとに、学校法人日本医科大学組換えDNA実験安全委員会が実験従事者に作成を依頼するものです。法の趣旨をよくご理解いただき、協力をお願いします。作成に当たって不明な点があれば、組換えDNA実験安全委員に問合せください。文部科学省が公開しているウェブページもぜひご参照ください。<http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html>

*「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（平成十五年法律第九十七号）」

**「研究開発等に係る第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」<研究二種省令>

計画書記入要領

本様式の各項目に記入する。記入しきれない場合は別紙を添付し、該当項目に別紙番号を記入すること。

- 注 1. 該当項目にチェックを入れ、継続あるいは変更の場合は前回届出あるいは承認を行った年月日または届出あるいは承認番号を記入すること。
- 注 2. 本計画において該当する項目すべてにチェックを入れること。植物使用実験および大量培養実験を含む場合は「その他」をチェックし、空きスペースにP1P、P2P、P3P、LSC、LS1、LS2 など該当する拡散防止措置のレベルを記入する。
- 注 3. 文科省科研費など、公的経費の有無（予算申請中の場合も「有」にチェックを入れる）について該当項目にチェックを入れること。
- 注 4. 予定している実験実施期間（5年を限度とする）を記入すること。
- 注 5. 宿主として使用する生物種の取扱い経験の有無を記入すること。なお、宿主が微生物、動物、植物を同時に含む実験計画の場合は、その宿主毎について記入すること。
- 注 6. 封じ込めレベルに応じて届出（P1, P1A）あるいは承認申請（P2, P2A, P3, P3A など）となる。機関承認を必要とする実験を行わない場合は「該当せず」と記入する。承認申請については、安全委員会及びその委員長が本計画を安全に実施できると認める理由を簡潔に説明すること（実験計画、場所、従事者の妥当性など）。大量培養実験、組換え体を動植物に接種する実験、蛋白性毒素産生遺伝子を扱う実験が含まれる場合は、上記の理由に加え当該実験を行う必要性について簡潔に記入すること。
- 注 7. DNA供与体、ベクター、宿主の組み合わせ毎に番号、野線等でまとめ、相互の関連を明らかにすること。ウイルスベクター使用時は1. プラスミドの作製、増幅実験、2. ウイルスベクターの作製、増幅実験、3. ウイルスベクターで遺伝子を導入する実験を分けて書くこと。
- 注 8. DNA供与体となる生物の種名又は系統名をわかる範囲で記入すること。
- 注 9. 「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に基づいてクラス1、クラス2、クラス3、クラス4のいずれかの分類を記入すること。
- 注 10. 供与核酸について、名称（データベースのアクセッションナンバーあるいは文献等があればそれも記入する）を記入すること。
- 注 11. 注7にあるように、宿主ごとに分類して野線等でまとめること。宿主の種名、系統名の名称等を記入し、その宿主に用いるベクターの名称を記入すること（文献等があればそれも記入、市販品の場合はメーカー名および商品名等わかる範囲で記入）。
- 注 12. 組換え体を動植物に接種する場合については、接種に係る動植物を「保有動植物等欄」に記入すること。
- 注 13. 上記「研究二種省令」**を参照して必要な拡散防止措置の区分について宿主-ベクターの組み合わせ毎に記入すること。
- 注 14. DNA供与体についてその特徴、自然界における分布、病原性、寄生性、腐生性などの実験従事者に対するリスクについて記入すること。また、蛋白性毒素を産生する場合は毒素遺伝子の構造について記入すること。
- 注 15. 使用するDNA又はその産物等について簡潔な説明を記入すること。蛋白性毒素等、人体に影響を与える可能性のあるものについては詳述すること。
- 注 16. ベクターの由来・薬剤耐性・特異形質等の特徴、伝達性、宿主依存性について記入し、必要に応じて実験結果・文献を添付すること。また、ウイルスベクターは宿主に分類されることに注意する。
- 注 17. 微生物を宿主とする場合は、栄養要求性、薬剤耐性、生育条件等の特徴を、培養細胞をウイルスの保有動植物として使用する場合は、培養細胞内における培養細胞の核酸や共存するウイルス由来の核酸との遺伝情報の交換の可能性について記入すること。また、ウイルスに病原性、発がん性及び毒素産生性がある場合は、その説明についても記入すること。
- 注 18. 認定宿主-ベクター系以外の微生物、ウイルス等を作成する場合、および組換え動植物を作成・使用する場合に記入すること。それ以外は該当せずと記入する。
- 注 19. 遺伝子組換え生物（主にウイルス）を動植物及び細胞等に接種することで新たに獲得することが予想される形質について記入すること。感染性、病原性、寄生性、腐生性又は毒素産生性等の形質が変化すると予想される場合は、その旨明記すること。
- 注 20. 21 P1 および P1A レベルの実験においては、実験を行う室名、位置、設備を記すこと。P2A および P2 レベル以上の実験においては、安全委員会に登録してある施設のみで実験が可能であり、その施設番号および名称（組換え DNA 実験の手引き参照、または安全委員会に問合せ）を記入すること。
- 注 22. 培養・飼育・栽培時における漏出・逃亡・飛散防止に係る管理方法、培養液・水・排泄物・種子等の不活化等、封じ込め方法について記入すること。