

(別紙様式1)

### 遺伝子組換え実験計画書

提出年月日：令和 3 年 4 月 1 日

機関承認                       大臣確認 (                      年                      月                      号)

申請の種類 (注1)	実験の区分 (注2)	拡散防止措置の区分 (注2)
<input checked="" type="checkbox"/> 新規 <input type="checkbox"/> 継続 ( 年 月 号) <input type="checkbox"/> 変更 ( 年 月 号)	1) 微生物使用実験 <input checked="" type="checkbox"/> 2) 動物使用実験 作成 (使用) <input type="checkbox"/> 接種 <input type="checkbox"/> 3) その他 (上記以外) ・ 大量培養実験 <input type="checkbox"/> ・ 植物等使用実験 作成 (使用) <input type="checkbox"/> 接種 <input type="checkbox"/> きのこ作成 <input type="checkbox"/> ・ 細胞融合実験 <input type="checkbox"/>	1) <input checked="" type="checkbox"/> P 1 <input checked="" type="checkbox"/> P 2 <input type="checkbox"/> P 3 2) <input type="checkbox"/> P 1 A <input type="checkbox"/> P 2 A <input type="checkbox"/> P 3 A 3) <input type="checkbox"/> その他 (                      )

倫理委員会の承認 (ヒトの遺伝子を用いる実験計画の場合) (注3)	1) 倫理委員会承認済 <input type="checkbox"/> 2) 倫理委員会申請中又は申請準備中 <input type="checkbox"/> 3) 倫理委員会の承認を要しない <input checked="" type="checkbox"/> (理由： 個人情報扱う研究でなく、本研究で使用するヒトの遺伝子は、市販の cDNA ライブラリーから得られたものであるため…など)
---	--

実験実施機関	所在地	(〒520-2192) 大津市瀬田月輪町			
	名称	国立大学法人滋賀医科大学			
	代表者の職名・氏名	学長・上本 伸二			
課題名		分子 A が心筋細胞の収縮機能に及ぼす影響の解析			
実験実施期間 (注4)		安全委員会の承認日から                      令和 8 年 3 月まで			
実験責任者	所属部局の所在地	(〒520-2192) 大津市瀬田月輪町			
	所属機関・部局・職名	滋賀医科大学・XXXXXX 学・教授			
	氏名	XX XX TEL:077-548-21XX FAX:077-548-21XX E-mail:xxx@belle.shiga-med.ac.jp			
実験場所	所在地	(〒520-2192) 大津市瀬田月輪町			
	名称	滋賀医科大学・XXXXXX 学・実験室 V			
実験従事者	氏名	所属機関・職名	経験年数		
			微生物実験 (注5)	動(植)物実験 (注5)	遺伝子組換え実験
	XX XX	滋賀医科大学・教授	大腸菌・20 年	マウス・18 年	20 年
	YY YY	滋賀医科大学・助教	大腸菌・10 年	マウス・10 年	10 年
ZZ ZZ	滋賀医科大学・大学院生	大腸菌・1 年	マウス・1 年	1 年	

承認日から 5 年以内です。

非専門家にも理解できるよう分かりやすい記載をお願いします。

実験の目的

分子 A は心筋細胞で発現しているものの... .. 発現の増減による心筋細胞への影響については不明である。本研究では、レトロウイルスを用いて分子 A を培養心筋細胞に長期間安定的に発現させ、... .. 分子 A が心筋細胞の収縮機能に及ぼす影響を解析することを目的とする。

予定されている実験内容について、具体的かつ要領よく記載下さい。

実験の概要  
(注 6)

1. 分子 A の遺伝子 cDNA を pMXs レトロウイルスベクターにクローニングする。次に、この cDNA を組み込んだベクターを大腸菌に導入してトランスフォームし、ベクターを増幅する (P1 レベル)。
2. 非増殖性レトロウイルス粒子の産生に必要な遺伝子 (*gag*, *pol*) が組み込まれたベクター (pCMV-Gag-Pol) と、広範な宿主感染性を可能にする遺伝子 (*VSV-G*) が組み込まれたベクター (pCMV-VSV-G) をそれぞれ大腸菌に導入してトランスフォームし、ベクターを増幅する (P1 レベル)。
3. 1.および 2.で作製・増幅したベクターを 293T 細胞にトランスフェクションして分子 A 遺伝子の入ったレトロウイルス (Molony murine leukemia virus [MoMLV] 由来) を作製する (P2 レベル)。
4. 3.で得られたレトロウイルスを培養心筋細胞に感染させて分子 A 遺伝子を導入し、分子 A が発現することで心筋細胞の収縮機能がどのように変化するかを、... .. の実験を行うことで解析する (心筋細胞へ感染当初は P2 レベル。なお、感染から 1 週間後には別紙 1 の実験結果から感染性ウイルス粒子は存在しないと考えられるため、遺伝子組換え実験の規制対象外となる)。

各実験について P1、P1A、P2 など、どの封じ込めレベルが必要か明記して下さい。

組換え生物等の詳細：供与体・供与核酸・プラスミドベクター・宿主の組み合わせ (注 7)

宿主に導入される核酸		宿主から除去される核酸	プラスミドベクターの名称 (注 11)	宿主 (実験分類) (注 12)	認定宿主ベクター系 (B1、B2) (注 13)	物理的封じ込めレベル (注 14)	備考 (注 15)
核酸供与体 (実験分類) (注 8)	供与核酸の名称 (注 9)	核酸の名称 (生物種) (注 10)					
ヒト (クラス 1)	遺伝子 A (XXXXXXXX)		pMXs	大腸菌 DH5α 株 (クラス 1)		P1	pMXs ベクターに含まれる供与核酸は一部省略している
モロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) (クラス 2)	5' Long terminal repeat (LTR) (J02255.1)						
MoMLV (クラス 2)	Ψ 配列 (J02255.1)						
MoMLV (クラス 2)	3' LTR (J02255.1)						
MoMLV (クラス 2)	<i>gag</i> (J02255.1)		pCMV-Gag-Pol	大腸菌 DH5α 株 (クラス 1)		P1	pCMV-Gag-Pol ベクターに含まれる供与核酸は一部省略している
MoMLV (クラス 2)	<i>pol</i> (J02255.1)						

水疱性口内炎ウイルス (クラス 2)	VSV-G (NC_001560)		pCMV-VSV-G	大腸菌 DH5α 株 (クラス 1)		P1	pCMV-VSV-G ベクターに含まれる供与核酸は一部省略している
ヒト (クラス 1)	遺伝子 A (XXXXXXXXX)		pMXs pCMV-Gag-Pol pCMV-VSV-G	非増殖性レトロウイルス (MoMLV) (クラス 2)		P2	

核酸供与体の特性 (注 16)	<p>マウス (クラス 1) については病原性はない。</p> <p>MoMLV、水疱性口内炎ウイルスは共にクラス 2 であるが、本研究ではこれら核酸供与体に含まれる一部の配列のみを用いるだけで、それらの配列による病原性および伝達性は考えられない。</p>
供与核酸 (その産物を含む) の特性 (注 17)	<p>遺伝子 A の産物である分子 A はヒト生体内で発現しており、これまでに病原性や毒性を示すとの報告はない。</p> <p>5'および 3' LTR はウイルスゲノムが宿主ゲノムに組み込まれる際に用いられるペアの配列で、5'に位置する LTR はプロモーターとしても働く。病原性はない。</p> <p>Ψ配列はウイルスゲノム RNA が感染粒子に収納される際に使われるパッケージングシグナルである。病原性はない。</p> <p>gag、pol はウイルス粒子内部の構造タンパク質と逆転写酵素をコードする遺伝子で、この産物に病原性はない。</p> <p>VSV-G はレトロウイルスのエンベロープをコードする遺伝子で、この産物は広範囲の細胞種にレトロウイルスが感染することを可能とする。病原性はない。</p> <p>Accession No. 遺伝子 A: XXXXXXXXX 5'および 3' LTR、Ψ配列、gag、pol: J02255.1 VSV-G: NC_001560)</p>
プラスミドベクターの特性 (注 18)	<p>今回の研究で使用するレトロウイルス作製用のベクター (pMXs、pCMV-Gag-Pol、pCMV-VSV-G) は市販され、生命科学研究で汎用されており、安全性の確立されたものである。それぞれのベクターに含まれる供与核酸は、物理的封じ込めレベルに影響を与えない。ベクターマップを別紙 2~4 に添付する。</p>
宿主の特性 (注 19)	<p><b>大腸菌 DH5α 株 (クラス 1) :</b> <i>E. coli</i> K12 株由来で区分は B1 である。この株の大腸菌は自然環境中では原則として生育しない。基本的に無害と考えて良いが、条件によって疾患の原因、例えば、可能性は極めて低いものの、人体の血液中や尿路系に侵入した場合には、内毒素を産生しエンドトキシンショックを引き起こすことがあるので十分注意して取り扱う。</p> <p><b>非増殖性レトロウイルス (MoMLV・クラス 2) :</b> 補助因子を既に持つあるいはトランスフェクションした特殊な細胞以外では自己複製能を持たない。ヒト細胞に接着した場合に感染する可能性はあるが、自己複製能を持たないため感染は極めて限局され、人体の安全性に関わる病原性は生じないと考えられる。</p>

<p>組換え生物等の特性 (宿主等との相違を含む) (注 20)</p>	<p><b>市販あるいは遺伝子組換えベクターでトランスフォームされた大腸菌</b>: 導入されたベクター内にアンピシリン耐性遺伝子があるため、アンピシリンに対して耐性を持つ。一方、供与核酸は全て同定済みのものであり、元の大腸菌と比べて、病原性、伝達性は変化しないと考えられる。</p> <p><b>ヒト遺伝子 A を含む非増殖性レトロウイルス (MoMLV)</b>: この遺伝子組換えレンチウイルスは、293T 細胞内で一過性に発現させた gag、pol、VSV-G で感染粒子を構成するが、ウイルスゲノム RNA にはこれらの遺伝子は存在しないため、培養細胞などへの感染性は持つものの、その後は増殖できず、伝達性も消失している。培養細胞に感染すると、LTR に挟まれた部位にある遺伝子 A が、培養細胞のゲノムに組み込まれる。</p>
--	---

(組換え)微生物の(組換え)動植物への接種実験 (注 21)			
(組換え)微生物	(組換え) 動植物	物理的 封じ込めレベル (注 22)	備考
該当なし	該当なし	該当なし	

(組換え) 微生物を保有している (組換え) 動物、植物等の特性 (注 23)	該当なし
---	------

拡散防止措置	<p>区分及び選択理由 (注 24)</p>	<p><b>組換えベクターでトランスフォームされた大腸菌</b>: P1 レベル 理由: 宿主である大腸菌はクラス 1 である。核酸供与体にはクラス 1 またはクラス 2 が含まれ、用いるベクターにもクラス 2 由来の核酸が含まれているが、全て同定済みのものであり宿主の病原性や伝達性に影響を与えないと推定される。したがって、物理的封じ込めレベルは P1 にて安全性は確保できると考えられる。</p> <p><b>作製した非増殖性レトロウイルス (MoMLV)</b>: P2 レベル 理由: 宿主であるレトロウイルス (MoMLV) はクラス 2 である。核酸供与体にはクラス 1 またはクラス 2 が含まれ、用いるベクターにもクラス 2 由来の核酸が含まれているが、全て同定済みのものであり宿主の病原性や伝達性に影響を与えないと推定される。したがって、物理的封じ込めレベルは P2 にて安全性は確保できると考えられる。</p> <p><b>作製した非増殖性レトロウイルス (MoMLV) を感染させた培養心筋細胞</b>: 感染当初は P2 レベルで、感染から 1 週間後は遺伝子組換え実験の規制対象外 理由: 作製した非増殖性レトロウイルス (MoMLV) は上記のように P2 レベルの物理的封じ込め措置を執る必要がある。心筋細胞に感染させた当初 1 週間は培養液中に感染性ウイルスが残存している可能性があるが、感染から 1 週間後には別紙 1 の実験結果から感染性ウイルス粒子は培養液中および細胞内に存在しないと考えられるため。</p>
	<p>組換え生物等を不活化するための処置 (注 25)</p>	<p>本研究で作製した組換え生物 (大腸菌、非増殖性レトロウイルス) はオートクレーブ装置を用いて不活化する。非増殖性レトロウイルスに感染させて 1 週間以内の培養心筋細胞もオートクレーブ装置で不活化する。</p>

物理的封じ込めに係る施設・設備(注26)	基礎研究棟 X 階・XXXXXX 学・実験室 V (P2) (許可年月日: 20XX 年 XX 月 XX 日)
----------------------	---

その他	特になし
-----	------

安全主任者確認欄	上記実験計画は、 <input type="checkbox"/> 大臣確認実験 <input type="checkbox"/> 機関承認実験 であり、実験計画書に不備のないことを認めます。  令和 年 月 日 安全主任者の部局・職 生化学・分子生物学講座 (分子病態生化学部門)・教授 氏名 扇田 久和 印
	付記

## 計画書記入要領

### 1) 機関承認実験-項目にチェックを入れる。

本様式の各項目に記入する。余白が不足して記入できない場合は、適宜、枠を縦に拡大するか、あるいは別紙を添付し該当項目に別紙番号を記入する。

### 2) 大臣確認実験-項目にチェックを入れ、大臣確認を受けた年月及び確認番号を記入する。

大臣確認実験は、第二種使用等拡散防止措置確認申請書を文部科学大臣に提出し大臣確認を受ける。その後、大臣確認申請書の写しと本申請書を提出する。ただし、本申請書は、1 ページ目を記入するだけでよい。

注 1. 該当項目にチェックを入れる。

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。

注 3. 該当項目にチェックを入れる。

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。

注 5. 宿主名（大腸菌、マウスなど）とその取扱い経験年数を記入する。

注 6. 実験が複数のステップからなる場合、実験番号をつける。

注 7. 作成（使用）する組換え生物等毎に、核酸供与体、供与核酸、プラスミドベクター、宿主の組み合わせを記入する。

注 8. 核酸供与体となる生物の種名又は系統名を実験分類とともに記入する。

注 9. 同定済み核酸のときは、その名称と GenBank accession number を記入する。そうでないときは、未同定核酸と記入する。ベクターの中に存在する供与核酸は、物理的封じ込めレベルに影響を与えない限り、この欄には記入しない。

注 10. 宿主から核酸が除去される場合（ノックアウト動物やノックアウトウイルスなど）は、その核酸の名称と GenBank accession number、そしてその核酸の由来する生物種名を記入する。

注 11. 宿主に遺伝子を導入するときプラスミドベクターを利用する場合はその名称を記入する。ウイルスベクターは組換えウイルスなので、ベクター欄には記入しないこと。

注 12. 宿主の種名、系統名を実験分類とともに記入する。ここでいう宿主は感染実験の宿主ではなく、遺伝子が導入される生物（多くの場合、大腸菌、ウイルス、マウス等が該当）のことです。

注 13. 封じ込めのレベルダウンを要求する場合は、認定宿主ベクター系の各々の組み合わせについてその区分（B1 か B2）を記入する。

注 14. 作成（使用）される組換え生物等が複数の場合、順に番号をふる。各々の組換え生物等毎に物理的封じ込めレベルを記入する。

注 15. 組換え生物等を作成する過程が複雑な場合、備考欄にその説明を簡潔に記入する。

注 16. 核酸供与体の実験分類と病原性（毒素産生性及び発がん性など）及び伝達性について記入する。

注 17. 哺乳類動物等に対する供与核酸又はその産物の病原性（毒素産生性及び発がん性など）及び伝達性について記入する。同定済み核酸の場合は GenBank accession number とその機能に関する文献資料を引用する。毒素遺伝子の場合は、LD50 及びその構造についても記入する。

注 18. プラスミドベクター（複製起点）について各々の由来を記入する。プラスミド中の各種プロモータ・ターミネータ等は、宿主由来の核酸でない場合は供与核酸となるので、それらの由来についても記入する。これらを記入する代わりに、プラスミドベクターの遺伝子構成マップを添付してもよい。

注 19. 宿主について実験分類を記入する。特に微生物や寄生虫等を宿主とする場合は、病原性（毒素産生性及び発がん性など）および伝達性についても記入する。

注 20. 導入された供与核酸の特性によって、宿主にどのような形質が新たに付与されるかについて考察し記入する。

注 21. 前欄で記述した組換え微生物を組換え動（植）物に接種する実験（感染実験）を行う場合に記入する。組換え微生物と組換え動（植）物、組換え微生物と通常の動（植）物、通常の微生物と組換え動（植）物のいずれかの組み合わせで接種（感染）実験を行う場合が該当する。

注 22. 接種（感染）実験の組み合わせ毎に物理的封じ込めレベルを記入する。

注 23. （組換え）微生物の接種により新たに獲得することが予想される宿主の特性について記入する。また、（組換え）微生物の病原性（毒素産生性及び発がん性など）や感染性などが変化すると予想される場合は、その旨明記する。

注 24. 作成（使用）する組換え生物等各々について、拡散防止措置の区分とその選択理由を記入する。接種実験を行う場合は、その拡散防止措置の区分と選択理由も記入する。

注 25. 具体的な不活化の方法を記入する。

注 26. 物理的封じ込めに係る施設・実験室の名称と安全委員会による認可年月日を記入する。