

※整理番号		
-------	--	--

第二種使用等拡散防止措置確認申請書

2500 第00号
平成00年00月00日

文部科学大臣 殿

氏名 国立大学法人 〇 〇 〇 〇
申請者 代表者 〇 印
住所 〇 〇 〇 〇

遺伝子組換え生物等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。

第二種使用等の名称		組換えヒト免疫不全ウイルスを用いた〇〇発症機構の解明に関する研究	
第二種使用等をする場所	名称	〇〇大学〇〇研究棟 〇〇室 (P3 実験室) 〇〇大学〇〇研究棟 動物実験施設 〇〇室 (P3A 飼育・実験室)	
	所在地	郵便番号 (〇〇-〇〇) 〇〇市	
		電話番号 〇〇-〇〇-〇〇 (直通)	
事務連絡先	実験の管理者	所属機関の名称及び職名	〇〇大学・教授
		氏名	〇〇
		住所	郵便番号 (〇〇-〇〇) 〇〇市
			電話番号 〇〇-〇〇-〇〇 (直通)
			ファクシミリ番号 〇〇-〇〇-〇〇
		電子メールアドレス 〇〇@〇〇	
	その他の連絡先	所属機関の名称及び職名	〇〇大学〇〇課 〇〇掛
		氏名	〇〇
		住所	郵便番号 (〇〇-〇〇) 〇〇市
			電話番号 〇〇-〇〇-〇〇 (直通)
ファクシミリ番号 〇〇-〇〇-〇〇			
	電子メールアドレス 〇〇@〇〇		
第 種類	1. 微生物使用実験		

二種使用等の目的及び概要		<p>2. 大量培養実験</p> <p>3. 動物使用実験</p> <p>(1) 動物作成実験</p> <p>(2) 動物接種実験</p> <p>4. 植物等使用実験</p> <p>(1) 植物作成実験</p> <p>(2) 植物接種実験</p> <p>(3) きのこと作成実験</p> <p>5. 細胞融合実験</p>
	目的	<p>各種マーカー遺伝子を発現する自立増殖型組換えヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus type 1 : HIV-1) もしくは非自立増殖型組換え HIV-1 を作製し、培養細胞ならびにヒト免疫細胞を有するマウスに感染させ、感染細胞の状態を解析することによってエイズウイルスの病原性を解明する。</p>
	概要	<p>[実験 1]</p> <p>ウイルスの細胞への感染の指標となるレポーター蛋白質 (GFP, mCherry, mWasabi, mRuby, ルシフェラーゼ [Luc], Thy-1) をコードする各遺伝子を PCR 法で増幅し、完全長の HIV-1 cDNA もしくは構造遺伝子ならびに調節遺伝子の一部を欠損する HIV-1 cDNA をもつプラスミドを用いて、レポーター遺伝子をこれらのウイルス遺伝子に挿入する。一部の HIV-1 cDNA にはレポーター遺伝子の発現を補助する IRES を挿入する。また、合成オリゴ DNA を用い、エピトープタグ配列 (FLAG, HA) を完全長ならびに一部ウイルス遺伝子欠損 HIV-1 cDNA に挿入する (P3 レベル) (別紙 4)。</p> <p>[実験 2]</p> <p>上記完全長あるいは一部ウイルス遺伝子を欠損する組換え HIV-1 cDNA をもつプラスミドを大腸菌 (<i>Escherichia coli</i> E12 株誘導体) に導入し、大腸菌内でプラスミドを増幅する (P3 レベル)。</p> <p>[実験 3]</p> <p>抽出したこれらのプラスミド DNA をヒト由来の 293T 細胞にトランスフェクションし、培養上清中の組換えウイルスを回収する。非自立増殖型組換え HIV-1 については、HIV の構造遺伝子や調節遺伝子を発現するヘルパープラスミド DNA を同時にトランスフェクションし、組換えウイルスを回収する (P3 レベル、二種省令別表第一第一号ハと二種省令別表第一第一号へに該当、大臣確認実験) (別紙 5 ならびに 6)。</p> <p>[実験 4]</p> <p>回収された各種の組換え HIV-1 をヒトやマウス由来の培養細胞に感染させ、細胞での増殖性、感染細胞内におけるウイルス蛋白質の挙動・性質を解析する (P3 レベル、二種省令別表第一第一号ハと二種省令別表第一第一号へ</p>

		<p>に該当、大臣確認実験)。</p> <p>[実験 5]</p> <p>回収された組換えウイルスのうち、GFP、mCherry、mWasabi、mRuby、ルシフェラーゼ(Luc)、あるいはThy-1 発現 HIV-1 については、ヒトリンパ球あるいはヒト血液幹細胞を移植してヒト T 細胞を有する免疫不全マウスに接種する。接種後、マウス個体内におけるウイルスの増殖性や分布を把握し、HIV 感染組織の病理的な解析から、〇〇の発症に関与する分子を解明する (P3A レベル、二種省令別表第一第一号ハと二種省令別表第一第一号ヘならびに第一第三号イに該当、大臣確認実験)。</p> <p>遺伝子組換え生物等及び拡散防止措置の一覧表は別紙 1 を参照。</p> <p>実験全体の流れは別紙 3 を参照。</p>
	<p>確認を申請する使用等</p>	<p>レポーター遺伝子 (<i>GFP, mCherry, mWasabi, mRuby</i>) を発現する組換え HIV-1 は、自立的な増殖力及び感染力を保持したウイルスであって、その使用等を通じて増殖することが科学的知見に照らして推定される。よって二種省令別表第一第一号ハと二種省令別表第一第一号ヘに該当するため大臣確認を要する。</p> <p>レポーター遺伝子 (<i>GFP, mCherry, mWasabi, mRuby, Luc, Thy-1</i>)、もしくは、エピトープタグ付加ウイルス蛋白質を発現するそれぞれの非自立増殖型組換え HIV-1 は、増殖力を欠損したウイルスであるが、1) 調節遺伝子、構造遺伝子、およびアクセサリ遺伝子の機能の幾つかを有しており、2) プロウイルスにおいて LTR のプロモーター活性をもつことから、それらの使用等を通じて自立的な増殖力及び感染力又は病原性を獲得する可能性も推測される。よって二種省令別表第一第一号ハと二種省令別表第一第一号ヘに該当するため大臣確認を要する。</p> <p>各種組換え HIV-1 をヒトリンパ球あるいはヒト血液幹細胞移植免疫不全マウスに接種する実験は、動物使用実験である。よって二種省令別表第一第一号ハと二種省令別表第一第一号ヘならびに第一第三号イに該当するため大臣確認を要する。</p>
<p>遺伝子組換え生物等の特性</p>	<p>核酸供与体の特性</p>	<p>(1) オワンクラゲ (<i>Aequorea victoria</i>) : 軟クラゲ目オワンクラゲ科に属する。病原性や有害物質の産生性、その他の特性は該当なし (クラス 1)。</p> <p>(2) Firefly (<i>Photinus pyralis</i>) : コウチュウ目ホタル科に属する。病原性や有害物質の産生性、その他の特性は該当なし (クラス 1)。</p> <p>(3) イソギンチャク (<i>Discosoma sp.</i>) : ホネナシサンゴ目</p>

		<p>イソギンチャクモドキ科に属する。病原性や有害物質の産生性、その他の特性は該当なし(クラス1)。</p> <p>(4) サンゴイソギンチャク (<i>Clavularia coral.</i>)ハタゴイソギンチャク科に属する。病原性や有害物質の産生性、その他の特性は該当なし(クラス1)。</p> <p>(5) シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana.</i>)アブラナ科シロイヌナズナ属に属する。病原性や有害物質の産生性、その他の特性は該当なし(クラス1)。</p> <p>(6) 軟体サンゴ (<i>Clavularia coral.</i>)Clavularia 属の軟体サンゴ。病原性や有害物質の産生性、その他の特性は該当なし(クラス1)。</p> <p>(7) ハツカネズミ (<i>Mus musculus</i>) : 齧歯目ネズミ科に属する (クラス1)。</p> <p>(8) 脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus : EMCV) : ピコルナウイルス科に属する。一本(+)鎖 RNA をゲノムとしてもつ非エンベロープ型ウイルスである。ウイルスの増殖は細胞質でおこなわれる (クラス2)。</p>
	<p>供与核酸の特性</p>	<p>(1) Green fluorescent protein (GFP) : オワンクラゲ由来。紫外線照射により蛍光を発する。cDNA は市販のプラスミド pCMS-EGFP を使い、PCR によって増幅したものを用いる。Accession # L29345。大きさ : 757 bp (別紙 7-1)。</p> <p>(2) monomeric Red fluorescent protein(mCherry):イソギンチャク四量体赤色蛍光蛋白質(DsRed)由来。紫外線照射により蛍光を発する。cDNA は市販のプラスミド pLVX-mCherry-C1 を使い、PCR によって増幅したものを用いる。Accession # ACY24904。大きさ : 708 bp (別紙 7-2)。</p> <p>(3) Monomeric variant of the red fluorescent protein eqFP611 (mRuby) : サンゴイソギンチャク四量体赤色蛍光蛋白質 (eqFP611) 由来。紫外線照射により蛍光を発する。cDNA は市販のプラスミド PB514B-2 を使い、PCR によって増幅したものを用いる。Accession # AY130757。大きさ : 678 bp (別紙 7-2)。</p> <p>(4) monomeric green fluorescent protein (mWasabi) : 軟体サンゴ由来 mTFP1 より得られた単量体緑色蛍光蛋白質。紫外線照射により蛍光を発する。cDNA は市販のプラスミド pmWasabi-IRES を使い、PCR によって増幅したものを用いる。Accession # EU024648。大きさ : 820</p>

		<p>bp (別紙 7-2)。</p> <p>(5) ルシフェラーゼ (luciferase : luc) : Firefly 由来。ATP 存在下で基質であるルシフェリンの発光反応を触媒する。cDNA は市販のプラスミド pGL3 を用い、PCR によって増幅したものをを用いる。Accession # E02267。大きさ : 1649 bp (別紙 7-1)。</p> <p>(6) Thy-1 抗原 (thymus cell antigen 1) : マウス由来の GPI アンカー型膜分子。CD90 と呼ばれ、マウスのすべての胸腺細胞と T リンパ球に主に発現する。市販の抗 Thy-1 抗体によって特異的に認識され、発現細胞はフローサイトメトリー等によって検出できる。cDNA は PCR によって増幅したものをを用いる。Accession # NM_009382。大きさ : 489 bp。</p> <p>(7) Internal ribosomal entry site (IRES) : EMCV 由来の配列内部リボソーム進入部位。この配列を有することにより、mRNA はキャップ構造非依存的に蛋白質を翻訳することができる。cDNA は市販のプラスミド pIRES を用い、PCR によって増幅したものをを用いる。Accession # U-89673。大きさ : 596 bp (別紙 7-1)。</p> <p>(8) FLAG エピトープタグ : 8 アミノ酸からなる親水性ペプチド。目的の蛋白質に融合して発現し、市販の抗 FLAG 抗体によって特異的に認識される。cDNA は 24 塩基の合成オリゴ DNA を用いる。アミノ酸配列 : Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys。</p> <p>(9) HA エピトープタグ : 9 アミノ酸からなるペプチド。目的の蛋白質に融合して発現し、市販の抗 HA 抗体によって特異的に認識される。cDNA は 27 塩基の合成オリゴ DNA を用いる。アミノ酸配列 : Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala。</p>
	ベクター等の特性	<p>(1) 完全長ならびにウイルス遺伝子を部分欠損する HIV-1 cDNA をもつ大腸菌発現用プラスミド DNA ベクター : プラスミド DNA (pUC18 等、別紙 8 参照) は <i>Escherichia coli</i> (腸内細菌科大腸菌属、クラス 1) に由来する (参考文献 Gene 33: 103-119, 1985、Accession #L09137。大きさ : 2,686 bp)。伝達性における供与交換の交換や持ち出しの可能性はない。宿主は大腸菌に特異性がある (別紙 8 を参照)。</p>
	宿主等の特性	<p>(1) <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) E12 株誘導体 : 腸内細菌科大腸菌属に属する。自然環境において生育可能であるが、遺伝的欠陥をもつために特殊な培養条件下以外での生存率が極めて低い。本誘導体は通常に分布していない。増殖の様式は通性嫌気性環境において増殖する。病原性や有害物質の産生性はない (クラス 1)</p> <p>(2) ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) : レトロウイ</p>

		<p>ルス科レンチウイルス属に属する。ヒトに病原性を示し、免疫不全症を発症する。HIV-1 の全ゲノム領域は、ウイルス増殖に関与する <i>gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu</i> ならびに <i>nef</i> という 9 個の蛋白質コーディングフレーム、そしてその発現の調節領域 (long terminal repeat : LTR) をもつ (クラス 3) (別紙 9 を参照)。</p>
	<p>遺伝子組換え生物等の特性 (宿主等との相違を含む。)</p>	<p>自立増殖型組換え HIV-1 の特性 (1)</p> <p>(1) GFP, mCherry, mWasabi などの蛍光蛋白質発現 HIV-1 は、<i>GFP, mCherry, mWasabi</i> 遺伝子を <i>env</i> と <i>nef</i> の間、もしくは <i>gag</i> 中に有しており、LTR によって発現が調節される。一部の cDNA は IRES 配列をもつ <i>nef</i> 遺伝子が増えられており、その Nef の発現は LTR ならびに IRES によって調節される (別紙 4 左)。</p> <p>非自立増殖型組換え HIV-1 の特性 (2) (3) (4) (5)</p> <p>調節遺伝子 (<i>tat, rev</i>)、アクセサリ遺伝子 (<i>nef, vif, vpr, vpr</i>)、および構造遺伝子 (<i>gag, pol, env</i>) のうち一部もしくは多くの機能を欠損した HIV-1。標的細胞に感染後、染色体にプロウイルスを挿入するが、プロウイルスから増殖力をもつ HIV-1 は産生されない。プロウイルスにおいては LTR のプロモーター活性をもつ。</p> <p>(2) ルシフェラーゼ(<i>luc</i>)発現組換え HIV-1 は、<i>env</i> と <i>nef</i> 遺伝子の機能が欠損しており、その領域に <i>luc</i> 遺伝子を有している。<i>luc</i> 遺伝子の発現は LTR によって調節される。一部のベクターでは、<i>vpr</i> 遺伝子も欠損している (別紙 4 右)。</p> <p>(3) Thy-1 発現組換え HIV-1 は、<i>env</i> と <i>nef</i> 遺伝子の機能が欠損しており、その領域に <i>Thy-1</i> 遺伝子を有している。<i>Thy-1</i> 遺伝子の発現は LTR によって調節される (別紙 4 右)。</p> <p>(4) GFP 発現組換え HIV-1 は <i>gag, pol, env</i> そしてほとんどのアクセサリ遺伝子の機能が欠損しており、GFP 遺伝子の発現は LTR と IRES によって調節される (別紙 4 右)。</p> <p>(5) FLAG および HA エピトープタグ発現 HIV-1 は、FLAG 配列を <i>gag</i> の直後に有しており、HA 配列を <i>pol</i> の直後に有しており、LTR によって発現が調節される (別紙 4 右)。</p> <p>上記 (1)、(2)、(3)、(4) および (5) の組換えウイルスは遺伝子操作によって病原性、伝達性の変化はないと考えられる。</p>

		<p>各種組換え HIV-1 をもつプラスミド DNA の代表的な制限酵素マップについては別紙 10 を参照。</p>
<p>遺伝子組換え生物等を保有している動物、植物又は細胞等の特性</p>		<p>(1) <i>E. coli</i> E12 株誘導体：腸内細菌科大腸菌属に属する。自然環境において生育可能であるが、遺伝的欠陥をもつために特殊な培養条件下以外での生存率が極めて低い。本誘導体は通常に分布していない。増殖の様式は通性嫌気性環境において増殖する。病原性や有害物質の産生性はない（クラス 1）</p> <p>(2) レポーター遺伝子もしくはエピトープタグ配列をもつ各種組換え HIV-1 ゲノムの <i>E. coli</i> E12 株誘導体への移入方法は、薬剤耐性遺伝子導入によるトランスフォーメーションである。形質転換体は自然環境において生育は不可能であり、通常には分布しえない。一度トランスフォーメーションしたものは、継代の必要はない。この組換え体の作製は 25 年以上にわたり種々の実験室で行われてきたことから（参考文献 Nature 334: 444-447, 1988、AIDS Res Hum Retroviruses 13:1077-1081, 1997）、供与核酸の存在様式ならびに形質の発現は極めて安定である。形質転換体は通性嫌気性環境において増殖する。生育ならびに生存には、気象などの環境条件による影響はない。組換え体の残存性ならびに他の生物への伝播はない。</p> <p>(3) 293T 細胞は adenovirus type 5 DNA 導入ヒト胎児由来腎臓細胞であり、自然環境において生育可能でない。病原体、有害物質産生性はない。ヒト胎児から単離された腎臓細胞に、adenovirus type 5 DNA を導入し不死化させた細胞株である 293 細胞（参考文献 J. Gen Virol 36 : 59-74, 1977）に SV40 large T 抗原遺伝子を導入した細胞株である。ジェネティシン耐性細胞であり、栄養要求性はなく、ほとんど実験室外での増殖は不可能である。この細胞株に各種組換え HIV-1 の cDNA を導入する。組換え遺伝子の導入方法はカルシウムトランスフェクション法による。組換え体保有細胞は自然環境において生育は不可能であり、通常には分布しえない。本遺伝子は染色体への組込みはほとんど発生しないので、一度トランスフェクションしたものは継代の必要はない。この細胞を用いたウイルス全領域を含む HIV の組換えウイルス作製実験は 20 年以上にわたり多くの実験室で行われてきたことから、供与核酸の存在様式ならびに形質の発現は極めて安定であり、予想できない組換え体の出現は考えづらい。HIV を産生するので、組換え生物の残存性ならびに他の生物へ伝播性があるので P 3 レベルの拡散防止措置を執る（別紙 3）。</p> <p>(4) GFP, mCherry, mWasabi, mRuby などの蛍光蛋白質発現自立増殖型組換え HIV-1 が感染した細胞ではウイルスの全ゲノムがプロウイルスとして染色体に組み込まれ、LTR のプロモーター活性により複製に必要な構</p>

造遺伝子、調節遺伝子、アクセサリ遺伝子、そして *GFP* ならびに *mCherry*, *mWasabi*, *mRuby* 遺伝子が発現する。これらの蛍光蛋白質は紫外線照射により細胞内で発光する。組換え HIV-1 の移入方法は、上述の組換え DNA を導入した 293T 細胞の培養上清から回収されるウイルスによる。組換え HIV-1 の感染性は非組換えウイルスのそれよりは低下するが、実験室外へ分布しないように P3 レベルの拡散防止措置を執る。HIV-1 の生物学的機能から、感染によって細胞はすべて死滅するので、一度、組換えウイルスを移入した細胞は継代の必要がない。本組換え体の作製は 20 年以上にもわたり種々の実験で行われてきたことから、供与核酸の存在様式ならびに形質の発現は極めて安定である。増殖の様式は通性環境による。感染細胞の生育ならびに生存は気象などの環境条件による影響を受けない。

(5) GFP などの蛍光蛋白質、ルシフェラーゼ(*luc*)、Thy-1、エピトープタグを発現する非自立増殖型組換え HIV-1 が感染した細胞では、ウイルス遺伝子の一部が染色体に組み込まれ、LTR のプロモーター活性により各種レポーター遺伝子が発現する。蛍光蛋白質は紫外線照射により細胞内で発光し、*luc* は細胞抽出液に基質 (ルシフェリン) を添加することによって発光する。Thy-1 は、ウイルス感染細胞の膜表面に露出する。エピトープタグ発現 HIV-1 が感染した細胞では、ウイルス性蛋白質が発現し、さらに FLAG タグ融合 Gag 蛋白質ならびに HA タグ融合 Pol 蛋白質が発現する。これらの組換え HIV-1 の移入方法は、上述の組換え DNA を導入した 293T 細胞の培養上清から回収されるウイルスによる。組換えウイルスの感染性は非組換えウイルスのそれとほとんど差がなく、実験室外へ分布しないように P3 レベルの拡散防止措置を執る。感染細胞から新たなウイルスが産生されることはない。本組換え体の作製は 15 年以上にもわたり種々の実験で行われてきたことから、供与核酸の存在様式ならびに形質の発現は極めて安定である。増殖の様式は通性環境による。感染細胞の生育ならびに生存は気象などの環境条件による影響を受けない。

(6) 免疫不全マウスは、*Mus musculus* 由来 DNA activated protein kinase 欠損マウス (クラス 1) である CB17-SCID マウスに由来する (Nature 301: 527-530, 1983)。この CB17-SCID マウスと自然発生マウス NOD マウスの交配マウス NOD-SCID マウスを、さらにガンマ鎖ノックアウトマウスとの交配により作製した NOG マウス (参考文献 ○○) を使用する。さらに NOG マウスにサイトカインであるヒト由来の IL-3 と GM-CSF cDNA、もしくはヒト HLA DR0405 cDNA の遺伝子導入をおこなったトランスジェニックマウスを実験動物中央研究所より入手し、実験に使用する。このマウスは重症のため自然環境において生育可能でな

	<p>い。病原性はなく、有害物質産生性はない。栄養要求性はなく、ほとんど実験室外での増殖は不可能である。このマウスにヒトリンパ球あるいはヒト血液幹細胞を移植し、ヒト T 細胞を保有するマウスを作製する。このヒト T 細胞を保有するマウスに組換え核酸の移入を行う。方法は上記 293T 細胞遺伝子導入細胞の培養上清から回収される組換えウイルスの感染法による。組換え HIV-1 の感染性は非組換えウイルスのそれよりは低下するが、実験室外へ分布しないように、P3A レベルの拡散防止措置を執る。本遺伝子は染色体への組込みが発生するが、ウイルスの生物学的機能による感染により細胞はすべて死滅するので、一度導入した細胞は継代の必要ない。上述したように供与核酸の存在様式ならびに形質の発現は極めて安定である。1988 年の SCID マウスへの HIV 感染実験（参考文献 Science 242:1684-1686, 1988）の報告以来、これまで 20 年以上このマウスを使った HIV 感染実験が行われてきており、マウス個体内の内在性レトロウイルスと HIV の組換え反応の報告はなく、組換えウイルスの出現は極めて少ないと考える。</p>
<p>拡散防止措置</p>	<p>区分及び選択理由</p> <p>上述した概要のうち、実験 1 はオワンクラゲ、firefly、ハツカネズミならびに EMCV (クラス 1) 由来の遺伝子 (GFP、ルシフェラーゼ、Thy-1 および IRES)、もしくは人工合成配列 (FLAG、HA タグ) を、HIV-1 (クラス 3) の cDNA に組み込む実験であり、P3 レベルの拡散防止措置を執る。</p> <p>実験 2 は実験 1 で作製した組換えウイルス cDNA をもつプラスミド DNA を大腸菌 (<i>E. coli</i> E12 株誘導体) 内で増幅する機能承認実験である。P3 レベルの拡散防止措置を執る。</p> <p>実験 3 は、human retrovirus である HIV-1 の組換えウイルス cDNA をヒト由来の 293T 細胞にトランスフェクションし、感染性ウイルスを産生する実験であるが、この過程は二種省令別表第一第一号ハと二種省令第四条関係別表第一第一号へに該当する大臣確認実験であり、P3 レベルの拡散防止措置を執る。当該拡散防止措置を選択した理由は、供与核酸と宿主における組み込み部位の組み合わせを科学的知見に照らした場合、クラス 3 である HIV-1 の増殖性・感染性に影響しないと考えられ、P3 レベルの拡散防止措置を執ることが妥当であると考えられるためである。</p> <p>実験 4 ならびに 5 は、産生した組換えウイルスを培養細胞 (実験 4) もしくは SCID マウス (実験 5) に感染させ、組換えウイルスの増殖性・感染性・細胞障害性等を解析する実験であるが、この過程は二種省令別表第一第一号ハと二種省令第四条別表第一第一号へならびに二種省令第四条別表第一第三号イに該当する大臣確認実験であり、P3 レベル (実験 4) もしくは P3A レベル (実験 5)</p>

		<p>の拡散防止措置を執る。当該拡散防止措置を選択した理由は、供与核酸と宿主における組み込み部位の組み合わせを科学的知見に照らした場合、クラス3である HIV-1 の増殖性・感染性に影響しないと考えられ、P3 レベルまたは P3A レベルの拡散防止措置を執ることが妥当であると考えられるためである。</p>
	<p>施設等の概要</p>	<p>(1) ○○大学○○実験棟○○室(P3 実験室) (別紙 2A および C) ならびに分子生物実験研究棟動物実験施設地下 B27 室 (P3A 飼育・実験室) (別紙 2B および C) は、それぞれの P3 あるいは P3A 施設として、第二種省令別表第二の三のイとロおよび別表第四の三のイとロに規定する拡散防止措置をすべて講じている。いずれの実験室も電子ロックにて常時施錠した前室を設けている。さらに実験区画内は陰圧に保たれており、吸気、排気は天井のヘパフィルターを通して行なわれるため、建物内の他のいずれの部屋にも再循環されない。</p> <p>(2) ○○大学○○動物実験施設○○室 (P3A 飼育・実験室) では前室を設けている。さらに実験区画内は陰圧に保たれており、吸気、排気は天井のヘパフィルターを通して○○屋上から外排気される。動物逃亡防止にはねずみ返しを設置し、ウイルス飛散防止には排気が再循環されない動物飼育用のアイソレーターを設置している。組換え HIV 接種動物は常にアイソレーター内で飼育される。</p> <p>(3) 以上の施設については、平成○○年○月○○日に○○組換え DNA 実験安全委員会委員長○○教授による現地確認が行なわれている。</p>
	<p>遺伝子組換え生物等を不活化するための措置</p>	<p>(1) 実験終了後は感染細胞、安楽死処理後のマウスならびに組換えウイルス暴露の危険がある器具はすべてオートクレーブ処理 (121度、20分) で不活化する。</p> <p>(2) 組換えウイルス実験終了後は組換え生物等の付着の有無に関わらず、必ず実験施行領域を0.1%次亜塩素酸含消毒剤にて組換え体を不活化する。</p> <p>(3) マウス逃亡防止とウイルス飛散防止のためにフィルターが設置された組換えウイルス接種マウス飼育用アイソレーターは毎回、実験終了時にオートクレーブ処理 (121 度、20 分) 後に、洗浄される。動物の取り扱いには常時安全キャビネット内で行われ、組換えウイルス接種マウスは当然のことながら、組換えウイルスの飛散は防がれている。</p>

<p>その他</p>	<p>(1) 第二種使用等の実施予定期間:大臣確認後より平成〇〇年〇〇月〇〇日まで</p> <p>(2) 遺伝子組換え生物等の安全な取扱いについて検討する委員会等の設置状況及び当該委員会等の委員長の職名及び氏名等</p> <p>〇〇大学組換えDNA実験安全委員会委員長 〇〇学部 教授 〇〇</p> <p>(3) 動物を飼育する施設等の管理者による確認状況(動物使用実験の場合に限る): 〇〇大学〇〇実験動物委員会 〇〇委員長により毎年度確認されている。</p> <p>(4) 本申請は、平成〇〇年〇〇月〇〇日に確認済の第二種使用等拡散防止措置(2 1 受文科振.第670号)に関して、供与核酸の追加及び期間の延長を申請するものである。</p>
------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

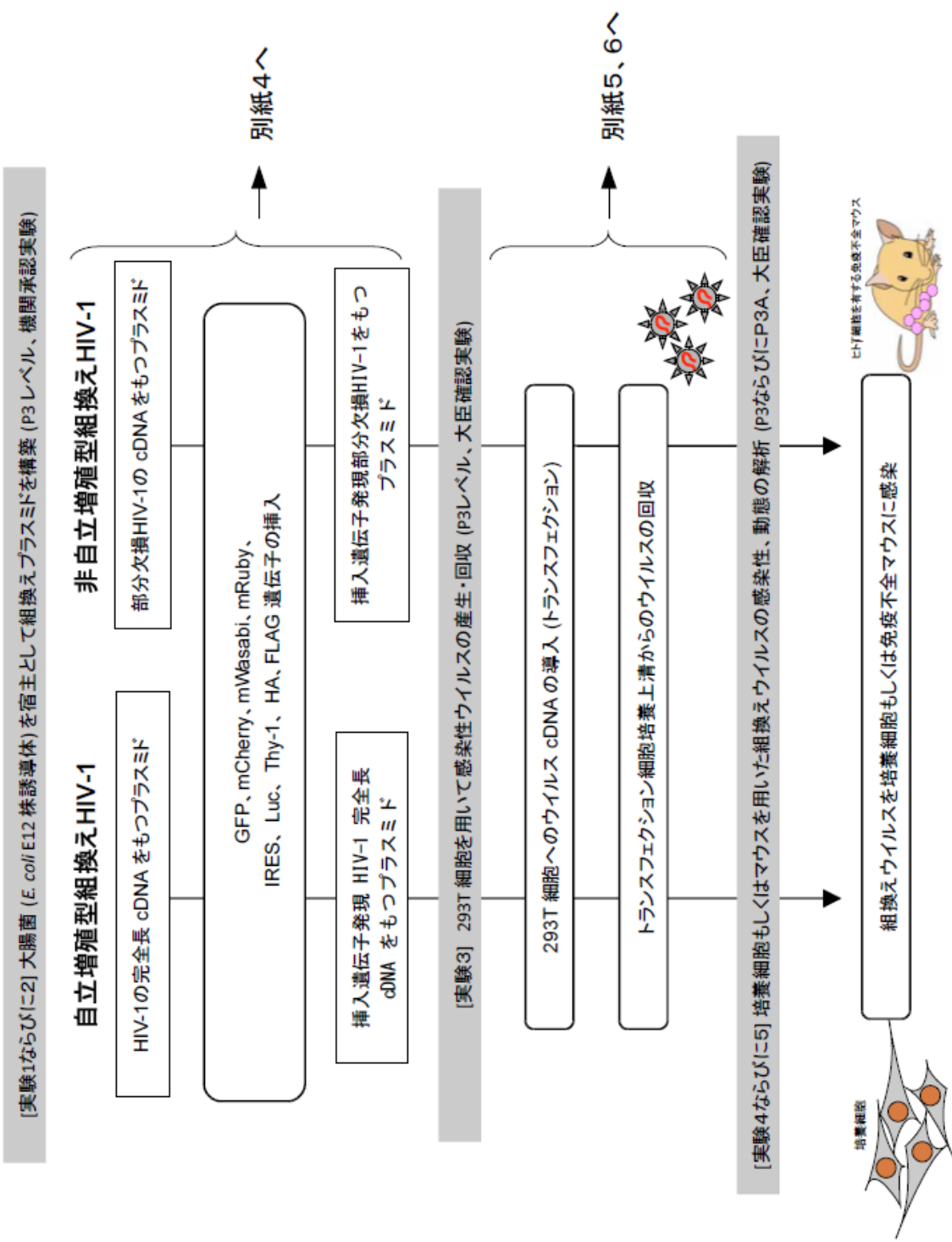
遺伝子組換え生物等および拡散防止措置の一覧表

核酸供与体	供与核酸	ベクター	宿主等	保有動物等	拡散防止措置の区分	備考
オワンクラゲ	GFP遺伝子	・完全長ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1) cDNAをもつプラスミドDNA ・HIV-1由来ウイルス遺伝子部分欠損cDNAをもつプラスミドDNA	E. coli K12株誘導体		P3	機関承認実験
インゲンチャク	mCherry遺伝子					組換えウイルスcDNAをもつプラスミドDNAの作製
サンゴインゲンチャク	mRuby遺伝子					
シロイヌナズナ	miniSOG遺伝子					
軟体サンゴ	mWasabi遺伝子					
Firefly	ルシフェラーゼ遺伝子					
ハツカネズミ	Thy-1遺伝子					
脳心筋炎ウイルス(EMCV)	IRES遺伝子					
その他(人工合成配列)	FLAGエピトープタグ HAエピトープタグ					
			上記組換えHIV-1	ヒト由来293T細胞	P3	大臣確認実験 組換えウイルスの産生
			上記組換えHIV-1	ヒトもしくはマウス由来培養細胞	P3	大臣確認実験 ウイルスの細胞への感染実験とその解析
			上記組換えHIV-1	・ヒトT細胞を保有するSCIDマウス ・ヒトT細胞を保有するNOG(NOD/Shi-scid IL2R γ KO)-hIL-3 GM-CSF Tg、NOG-hDR0405 Tgマウス	P3A	大臣確認実験 ウイルスのマウスへの接種実験とその解析

実験区画内詳細図

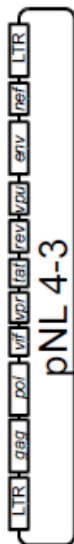
敷地区

実験計画のフローチャート

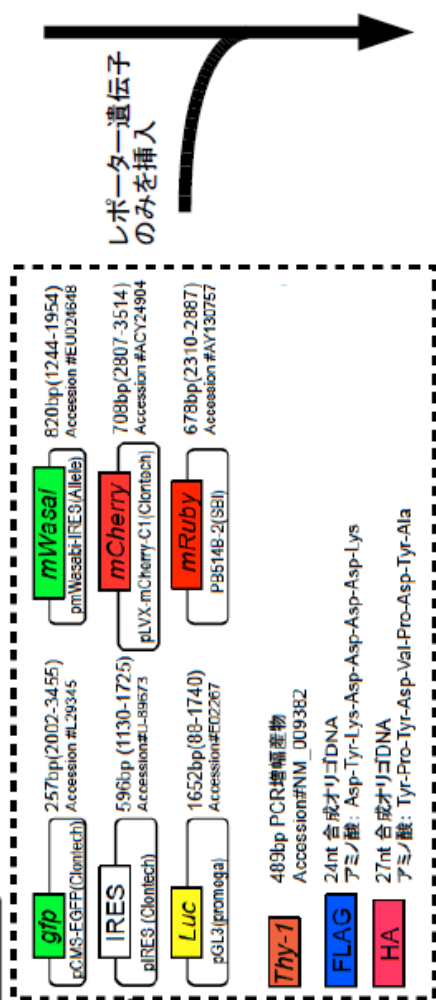


組換えHIV-1のcDNAをもつプラスミドの構築

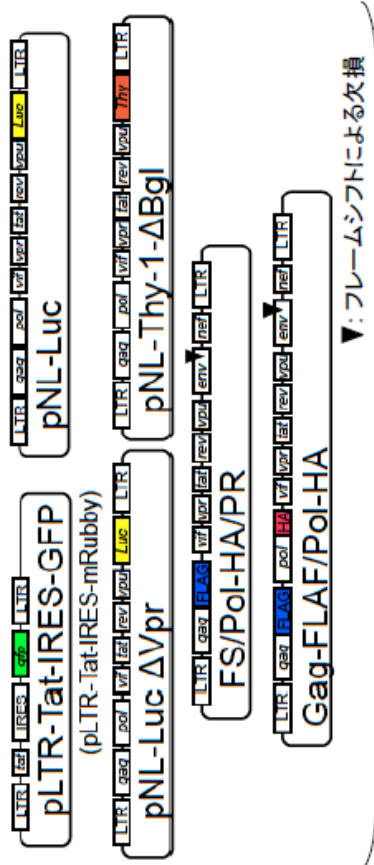
HIV-1の完全長cDNAを持つプラスミド(別紙8)



部分欠損HIV-1 cDNAを持つプラスミド



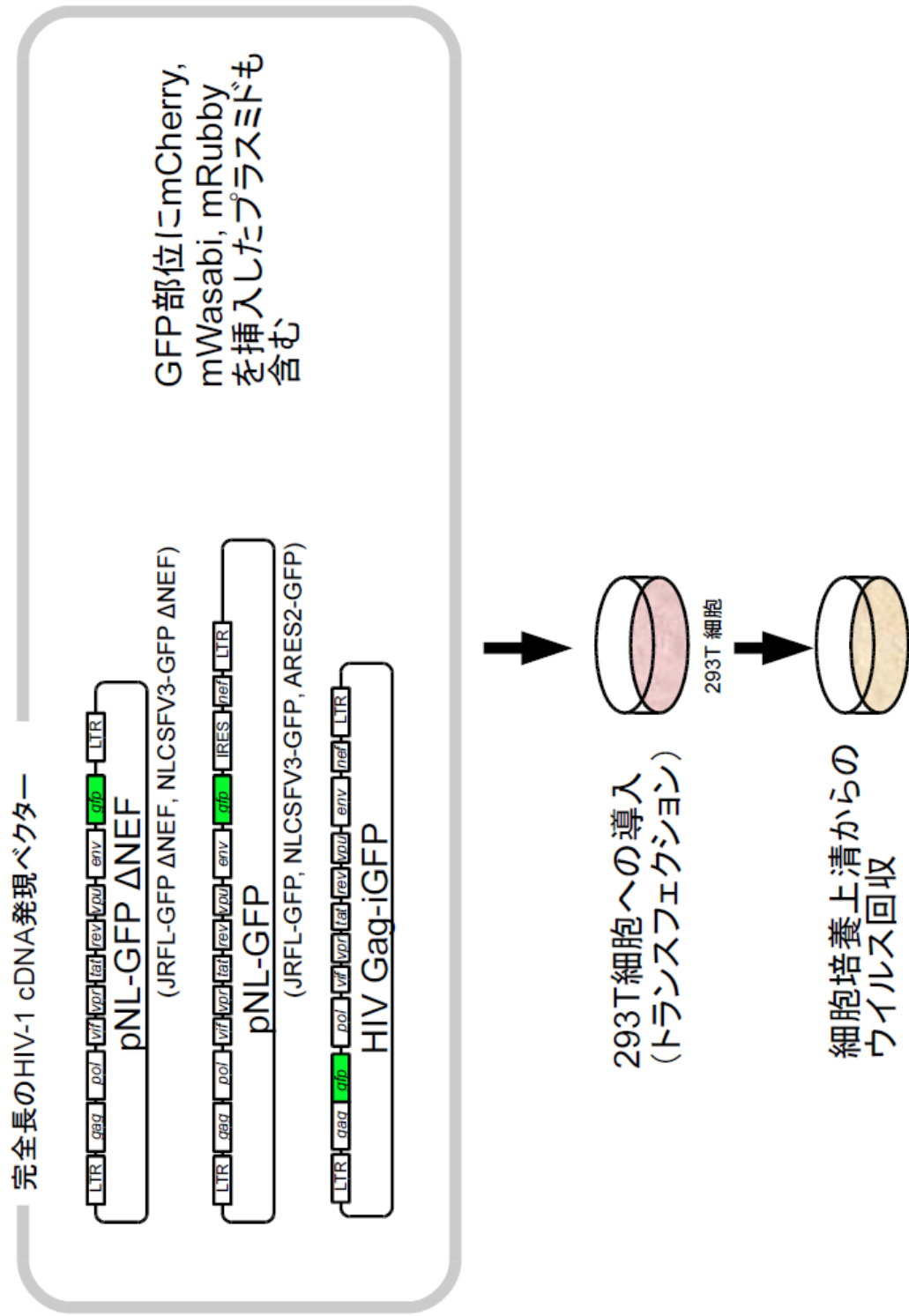
別紙5へ



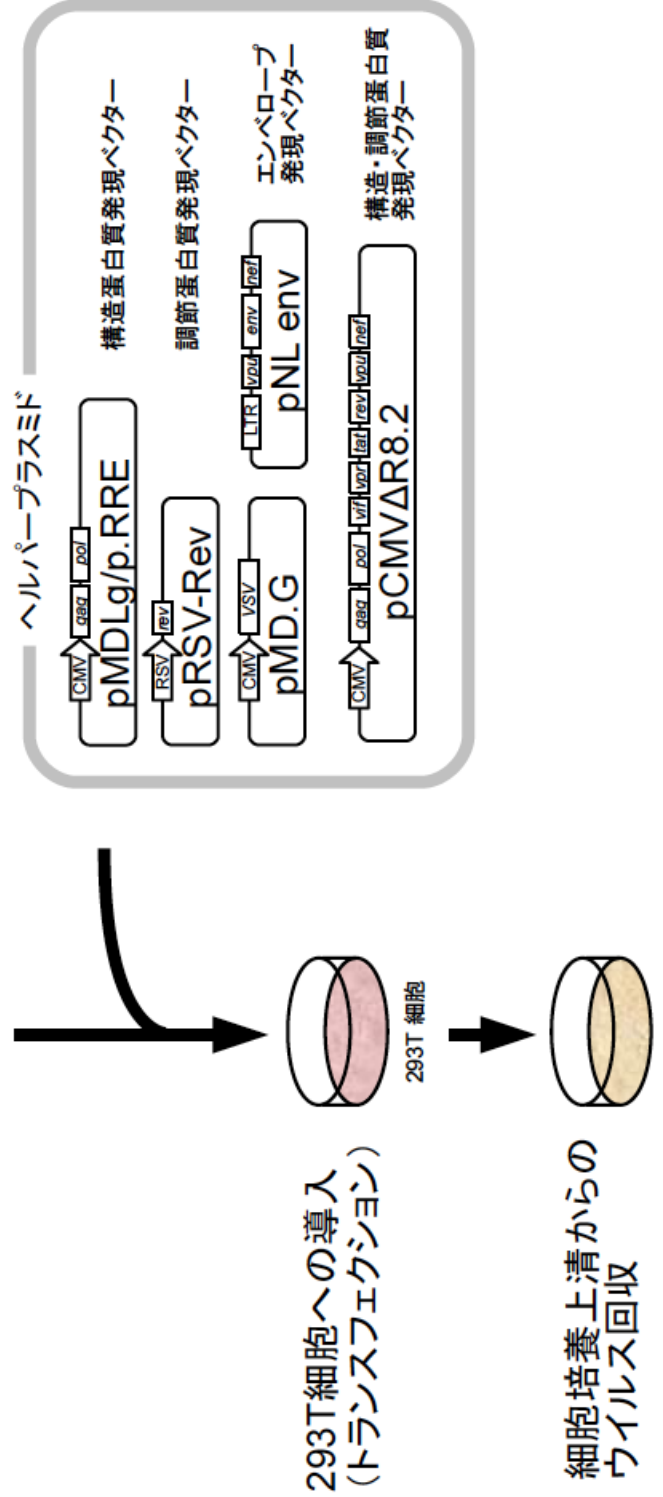
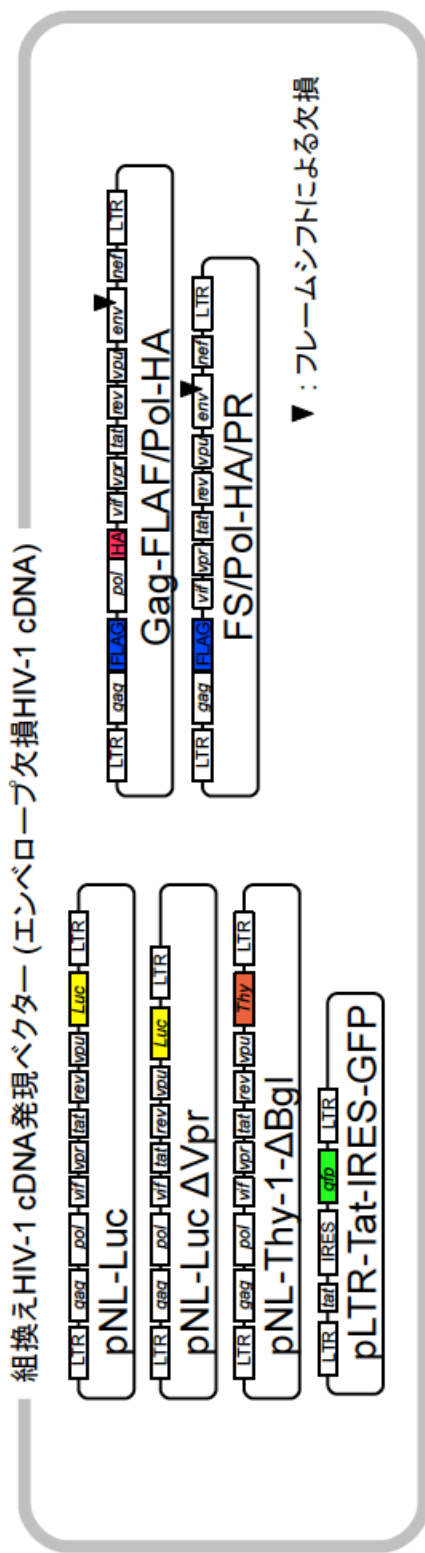
▼: フレームシフトによる欠損

別紙6へ

自立増殖型組換えHIV-1の感染性ウイルスを回収する方法

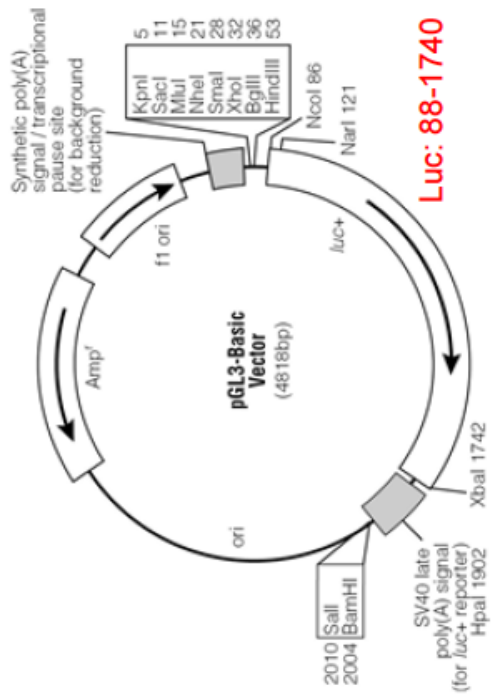


非自立増殖型組換えHIV-1の感染性ウイルスを回収する方法

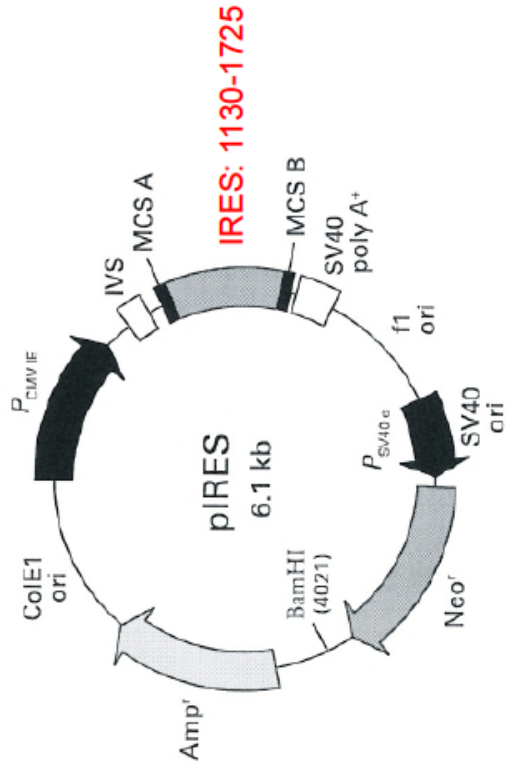


供与核酸を持つプラスミド

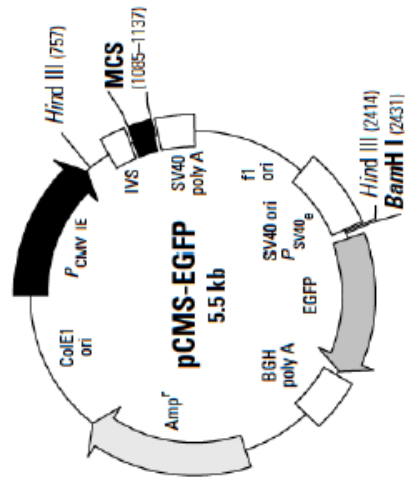
ルシフェラーゼ(luciferase: luc)を持つプラスミド



Internal ribosomal entry site(IRES)を持つプラスミド

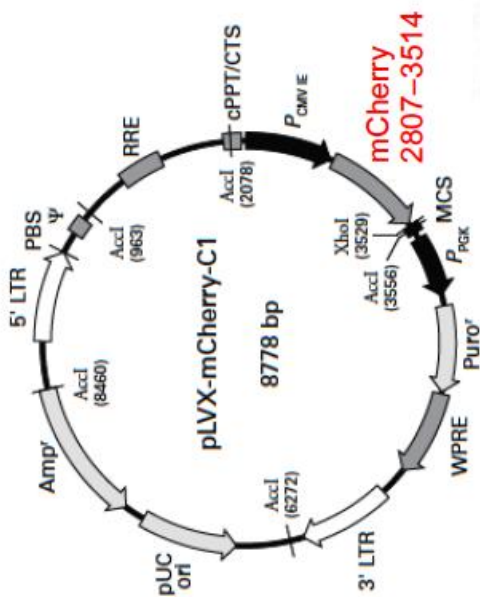


Green fluorescent protein(GFP)を持つプラスミド

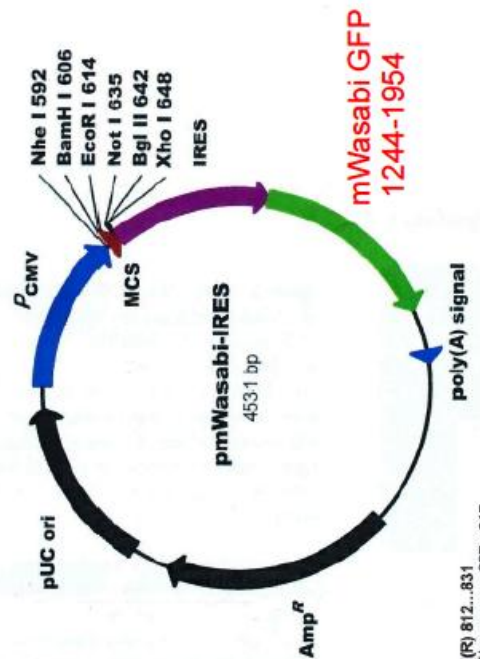


供与核酸を持つプラスミド

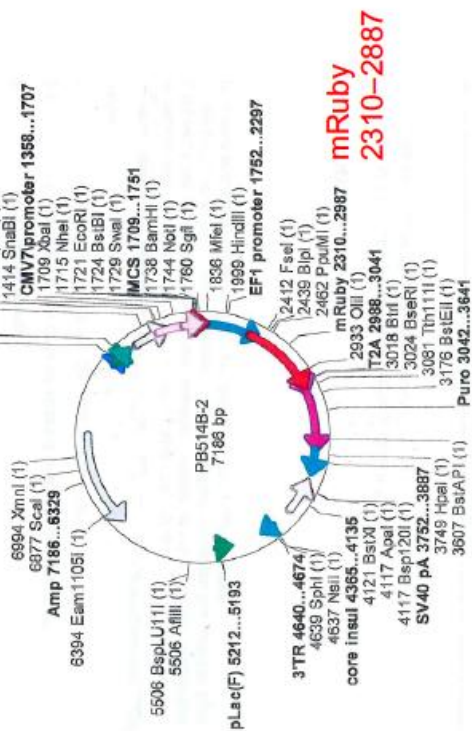
mCherryを持つプラスミド



mWasabiを持つプラスミド

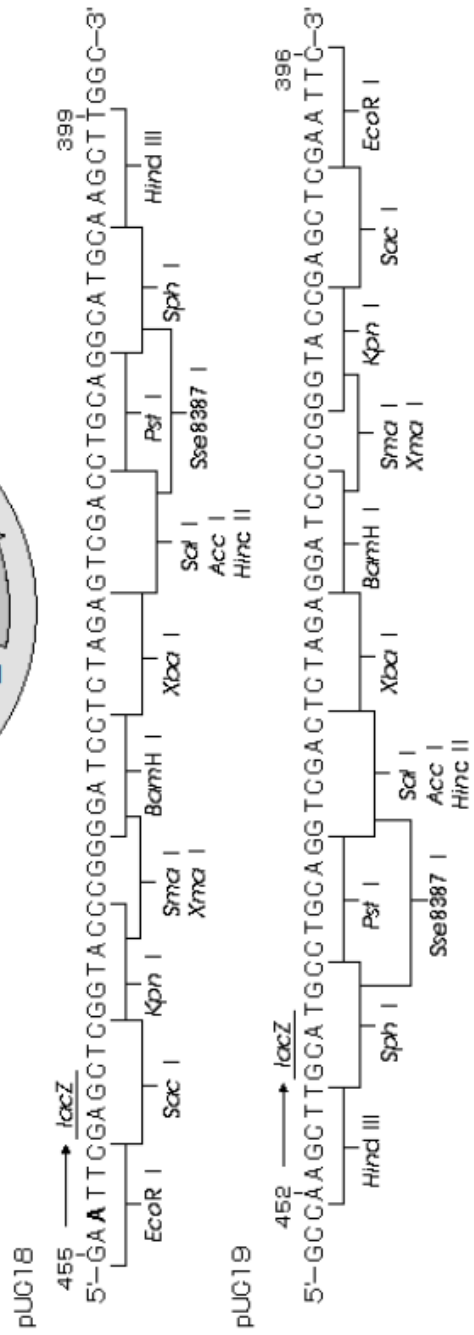
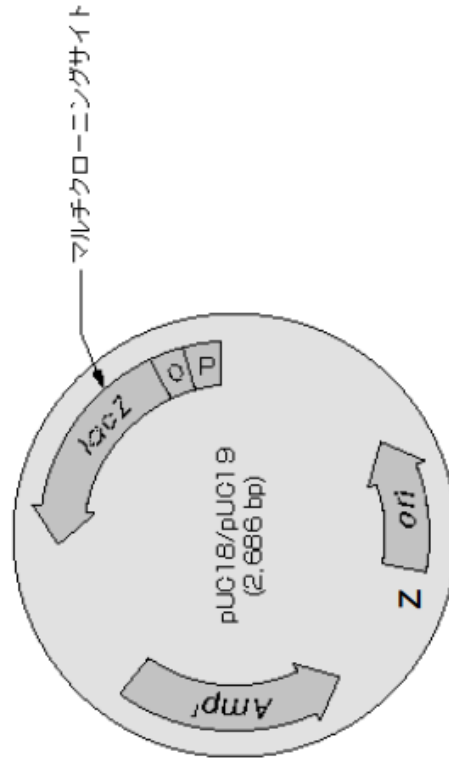


mRubyを持つプラスミド

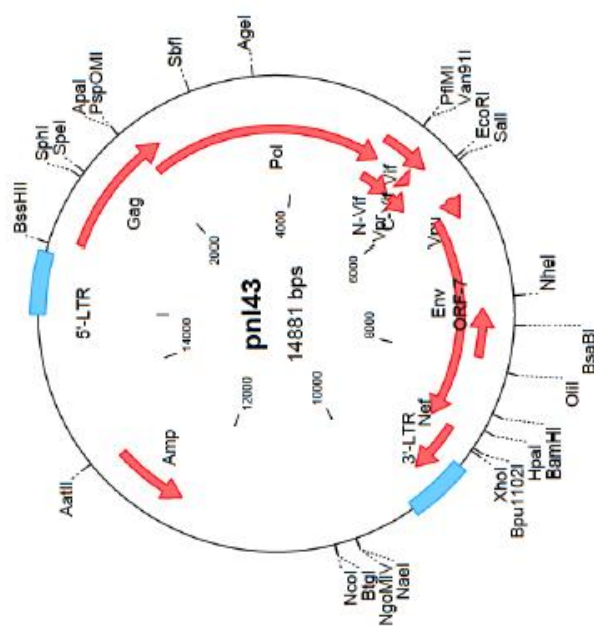
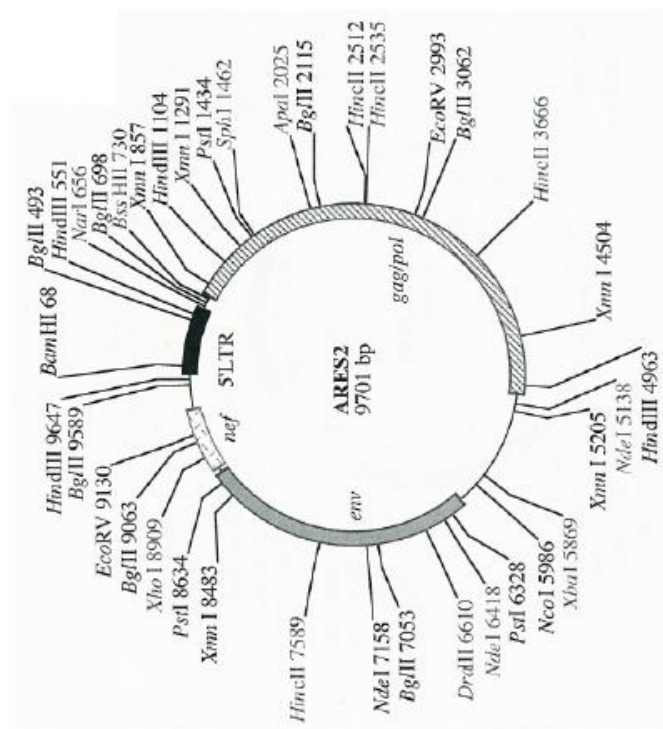


pUC18のクローニングサイト図

Accession 番号: L09137 (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J., 1985, Gene 33, 103-119. **EcoRI**サイトに **HIV**を挿入

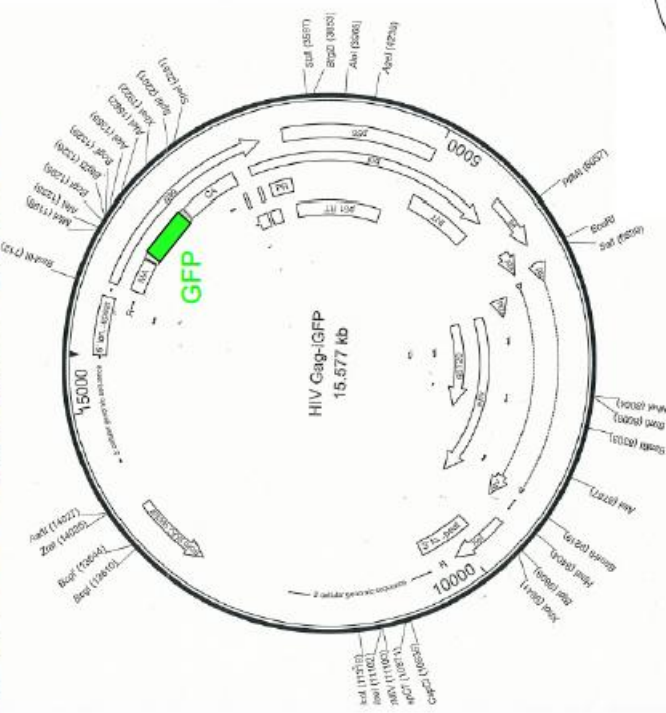


HIV-1の完全長cDNAを持つプラスミド(制限酵素マップ)

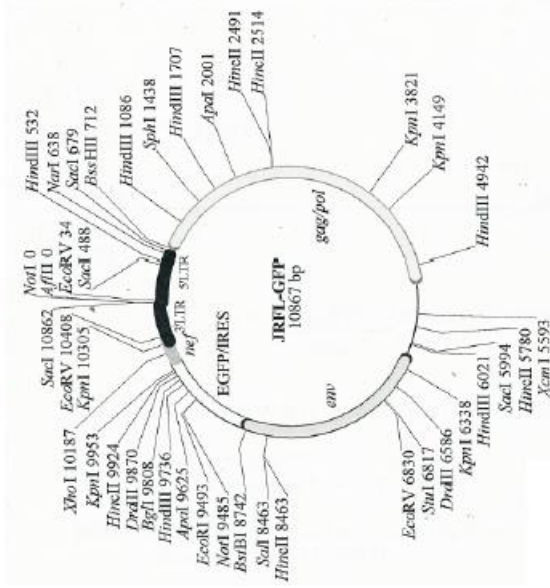


組換えHIV-1を持つプラスミド (制限酵素マップ)

gag遺伝子部位にGFP遺伝子を挿入した組換えHIV-1



GFP遺伝子を持つ完全長HIV-1



Thy-1抗原(thymus cell antigen 1)をもつ組換えHIV-1

