

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

①ベクターへの挿入遺伝子の組込方法に関する事項

- ベクターへの挿入遺伝子の組込方法が明らかであること。具体的には、
- ・微生物へ導入するDNA構築物（コンストラクト）の作成方法
  - ・ベクターにプロモーター、オープンリーディングフレーム及びターミネーターを導入した順序及び方法
- が明らかであること。

②挿入遺伝子の宿主への導入方法

- 発現に用いるプラスミドやDNA構築物（コンストラクト）等、挿入遺伝子の宿主（微生物）への導入方法が明らかであること。具体的には、
- ・挿入遺伝子の宿主への導入方法
  - ・選抜方法（遺伝子が導入された宿主を選抜する方法）
  - ・微生物としての再生方法
- が明らかであること。

(3) 構造に関する事項

①プロモーターに関する事項

- 用いたプロモーターの由来、性質等が明らかでないこと。

②ターミネーターに関する事項

- 用いたターミネーターの由来、性質等が明らかでないこと。

③有害塩基配列の有無に関する事項

- 宿主に挿入されるDNAの全塩基配列が明らかにされ、既知の有害塩基配列が含まれていないこと。

(4) 性質に関する事項

①挿入DNAの機能に関する事項

- 挿入DNAの機能及び挿入DNAから産生される蛋白質の性質、機能等が明らかであり、その蛋白質が有害作用をもたないこと。

②制限酵素による切断地図に関する事項

- 宿主（微生物）に導入されたDNA断片について、切断地図が明らかにされていること。なお、この場合、用いた制限酵素の名称、断片の数、サイズ及びサザンブロット解析パターンが明らかにされていること。

③分子量を示す事項

- 挿入遺伝子の分子量又は塩基数が明らかであること。

(5) 純度に関する事項

- ・挿入しようとする遺伝子全体の塩基配列、大きさ及び由来が明らかであること。

- ・挿入しようとする全ての遺伝子はクローニングされ、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること。

#### (6) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

抗生物質耐性マーカー遺伝子を使用している場合は、当該遺伝子及び遺伝子産物の構造及び機能が明らかであること。また、生産物の製造工程において遺伝子及びその産物が安全性に問題のない程度まで除去されることが明らかでない場合は、さらに次の①及び②の各項目について、組換え体内における変化等に関して行われた考察も含め、総合的に判断して、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に問題がないと判断できること。

##### ①遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項

###### ・構造及び機能

遺伝子については塩基配列、蛋白質については機能が明らかであること。

挿入した抗生物質耐性マーカー遺伝子以外に有害塩基配列を含まないこと。

必要に応じ、遺伝子産物の基質特異性が明らかであること。

遺伝子産物について、既知のアレルゲンとの構造相同性がないこと。

###### ・耐性発現の機序、使用方法及び関連代謝産物

抗生物質の使用法（経口、静注等）が明らかであること。耐性発現の機序が明らかであること。耐性発現に関連する代謝物質が安全性に問題のないものであること。

###### ・同定及び定量方法

遺伝子産物の同定及び定量方法が明らかであること。

###### ・調理又は加工を行った場合の熱又は物理的圧力による変化

熱等の物理的処理に対する感受性があること（酵素活性を失っていること等が明らかにされていること）。

###### ・消化管内環境における酸又は消化酵素による変化

人工胃液及び人工腸液に対する安定性の試験により、安定性がないことが明らかであること。安定性がある場合においては、安全性に問題ないことを示す合理的な理由があること。

###### ・アレルギー誘発性

アレルギー誘発性に関する知見が明らかにされていること。

##### ②遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項

- ・ 予想摂取量  
発現量から予想される当該蛋白質の摂取量を推定すること。
- ・ 耐性の対象となる抗生物質の使用状況  
耐性の対象となる抗生物質の使用状況（使用方法、使用量、使用目的等）が明らかであること。
- ・ 通常存在する抗生物質耐性菌との比較  
微生物に挿入された抗生物質耐性マーカー遺伝子の由来は、通常存在する抗生物質耐性菌と同様のものであること。
- ・ 経口投与をした抗生物質の不活化推定量とそれに伴って問題が生ずる可能性  
抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現蛋白質（抗生物質代謝酵素）の摂取量、調理過程及び消化管内における分解量、抗生物質の使用状況等から検討した抗生物質の不活化に伴う問題がないことが推察されていること。

(7) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

- ・ 原則として、導入した遺伝子には、目的以外の蛋白質を発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと。なお、その確認に当たっては、1つの遺伝子内に開始コドンとして働くATG塩基配列が複数存在しないこと、及び、目的の蛋白質以外の蛋白質を発現する可能性がないことがノーザンブロッティング法、RT-PCR法等を用いて確認できていること。
- ・ 仮に、目的以外の蛋白質を発現する可能性のある遺伝子が含まれている場合は、当該遺伝子及びその遺伝子が発現する蛋白質はアレルギー誘発性を含め、安全性に問題のないものであること。

6 組換え体に関する事項

(1) 組換えDNA操作により新たに獲得された性質に関する事項（非病原性であること。）

挿入遺伝子がどのように発現するかが明らかであり、病原性を獲得しないことが明らかであること。挿入DNAから産生される蛋白質の性質・機能等が明らかであり、その蛋白質は人に対する有害作用をもたないこと。

(2) 外界における生存性及び増殖性に関する事項

宿主株と組換え体の外界における生存及び増殖能力がどの程度相違するかについての情報が明らかであり、安全性に問題がないものであること。