



表2 厚生労働大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物¹⁾(1)

厚生省「組換えDNA技術応用医薬品等の製造のための指針¹²⁾に基づいたGILSP確認の実績及び学識経験者の意見等を踏まえて、表2-①に示された宿主-ベクター^{a)}-挿入DNA^{b)}に表2-②の選択マーカー遺伝子を組み合わせて構成された遺伝子組換え微生物は、「厚生労働大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物」に該当するとされている。これを用いた医薬品等の製造など「産業上の使用等」としての第二種使用等を行う際に規定の拡散防止措置(表6-③参照)を執るかぎり、厚生労働大臣への第二種使用等拡散防止措置確認申請は不要となる。なお、経済産業大臣が別途定めるGILSP遺伝子組換え微生物^{c)}や文部科学大臣が別途定める認定宿主ベクター系等^{d)}の分類とは必ずしも一致しておらず、例えば、経済産業大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物の中には、厚生労働大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物に該当しないものもあるので注意すること。

①宿主-ベクター^{b)}-挿入DNA [由来生物]^{c)}

< *Escherichia coli* (宿主)-ベクター-挿入DNA >

宿主	ベクター	挿入DNA [由来生物]
<i>Escherichia coli</i> B株	pCZ(pBR322由来)	アシルCoAシンテターゼ [<i>Pseudomonas fragi</i>]、N-アシルマンノサミンデヒドロゲナーゼ [<i>Flavobacterium</i> sp. 141-8]、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ [ヒト]、アセチルポリアミンヒドロラーゼ [<i>Mycoplana bullata</i>]、アラニンアミノトランスフェラーゼ[ヒト]、アラニンデヒドロゲナーゼ [<i>Bacillus stearothermophilus</i>]、アルカリフォスファターゼ [<i>Bacillus badius</i>]、ウリカーゼ [<i>Arthrobacter globiformis</i>]、 <i>Candida utilis</i> 、 <i>Cellulomonas flavigena</i> 、 <i>Bacillus</i> sp.]、3-オキソ-5β-ステロイドΔ4-デヒドロゲナーゼ [<i>Pseudomonas testosteroni</i>]、L-カルチニンデヒドロゲナーゼ [<i>Alcaligenes</i> sp.]、B型肝炎ウイルスコアたん白質 [ヒトB型肝炎ウイルス]、B型肝炎ウイルスコアたん白質の一部(HBe抗原部分) [ヒトB型肝炎ウイルス]、C型肝炎ウイルスコアたん白質 [ヒトC型肝炎ウイルス]、C型肝炎ウイルスコアたん白質の一部 [ヒトC型肝炎ウイルス]、グリセロリン酸オキシダーゼ [<i>Streptococcus faecium</i>]、グリセロールキナーゼ [<i>Thermus flavus</i> 、 <i>Flavobacterium meningosepticum</i>]、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ [<i>Enterococcus faecium</i>]、L-α-グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ [<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>]、グルコースデヒドロゲナーゼ [<i>Bacillus megaterium</i>]、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ [<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> 、 <i>Bacillus</i> sp.]、α-グルコシダーゼ [<i>Bacillus stearothermophilus</i>]、グルタミンシンテターゼ [<i>Bacillus</i> sp.]、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ [<i>Pseudomonas vesicularis</i> 、 <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM3638]、クレアチナーゼ [<i>Bacillus</i> sp.、 <i>Flavobacterium</i> sp. U-188]、クレアチニナーゼ [<i>Pseudomonas putida</i>]、クレアチンキナーゼ [ヒト]、クレアチニンデイミナーゼ [<i>Bacillus lentus</i>]、コレステロールオキシダーゼ [<i>Brevibacterium sterolicum</i> 、 <i>Cellulomonas</i> sp.、 <i>Streptomyces aspergilloides</i>]、サルコシンオキシダーゼ [<i>Arthrobacter</i> sp.、 <i>Bacillus</i> sp.、 <i>Bacillus</i> sp. NS-129]、シチジン3リン酸シンテターゼ [<i>Escherichia coli</i>]、シチコリンシンテターゼ及びコリンキナーゼ [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]、スクロースホスホリラーゼ [<i>Leuconostoc mesenteroides</i>]、胆汁酸硫酸スルファターゼ [<i>Pseudomonas testosteroni</i>]、NADシンテターゼ [<i>Bacillus stearothermophilus</i>]、乳酸オキシダーゼ [<i>Aerococcus viridans</i>]、ヒトT細胞白血病ウイルス1型のgagたん白質とenvたん白質の融合たん白質 [ヒトT細胞白血病ウイルス1型]、ヒト免疫不全ウイルス1型gag-p24 [ヒト免疫不全ウイルス1型]、3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ [<i>Alcaligenes faecalis</i> IFO13111]、β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ [<i>Pseudomonas testosteroni</i>]、3-α-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ [<i>Pseudomonas</i> sp.]、ビルビン酸オキシダーゼ [<i>Aerococcus viridans</i>]、フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ [<i>Thermoactinomyces intermedius</i>]、L-フコースデヒドロゲナーゼ [<i>Pseudomonas</i> sp. No.1143]、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ [<i>Bacillus</i> sp.]、フルクトサミンオキシダーゼ [<i>Fusarium oxysporum</i>]、ヘキソキナーゼ [<i>Bacillus</i> sp.、 <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM3638、 <i>Saccharomyces pastorianus</i>]、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ [<i>Bacillus</i> sp.]、モノグリセリドリンパーゼ [<i>Bacillus</i> sp.]、リボフラビンキナーゼ [<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>]、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ [<i>Bacillus stearothermophilus</i> 、 <i>Thermus flavus</i>]、ルシフェラーゼ [<i>Luciola cruciata</i>]、ロイシンデヒドロゲナーゼ [<i>Bacillus stearothermophilus</i>]
<i>Escherichia coli</i> K12株及びその由来株	pACYC184、pBluescript KS(-)、同(+)、pBluescript SK(-)、pBR322、pGd1(pBR322由来)、pGEMEX-1、pHSG398、pKK223-3、pKK233-JC、pKK233-2、pLSA 1 (pBR322由来)、pSC101、pSTT ktrp、pTL33(pBR322由来)、pTrp771、pTrp781、pTrs31(pBR322由来)、pTrs321(pBR322由来)、pUC 8、pUC 9、pUC12、pUC13、pUC18、pUC18N、pUC19、pWA51 (pBR322由来)、pWA53(pBR322由来)、runaway pBEU17由来、λファージ、同 slp1s、同 slp501s	



表2 厚生労働大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物¹⁾(2)

< *Corynebacterium ammoniagenes* (宿主)-ベクター-挿入DNA >

宿主	ベクター	挿入DNA[由来生物]
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> PGX 2 株、XUX106株	pCG116(pCG11誘導体： <i>Corynebacterium</i> 属細菌由来)、pRI109(<i>E. coli</i> 及び <i>Corynebacterium</i> 属細菌由来)	コンパクチンヒドロキシラーゼ [<i>Bacillus</i> sp.]、リボフラビンシンターゼ [<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>]

< *Serratia liquefaciens* (宿主)-ベクター-挿入DNA > < *Penicillium camembertii* (宿主)-ベクター-挿入DNA >

宿主	ベクター	挿入DNA[由来生物]	宿主	ベクター	挿入DNA[由来生物]
<i>Serratia liquefaciens</i> IFO12979株	pBluescript KS(+)	クレアチンアミジノヒドラーゼ [<i>Alcaligenes faecalis</i>]	<i>Penicillium camembertii</i> U-150	pUC19	アスコルビン酸オキシダーゼ [<i>Eupenicillium brefeldianum</i>]

< *Acronium chrysogenum* (宿主)-ベクター-挿入DNA > < *Streptomyces lividans* (宿主)-ベクター-挿入DNA >

宿主	ベクター	挿入DNA[由来生物]	宿主	ベクター	挿入DNA[由来生物]
<i>Acronium chrysogenum</i> ATCC 11550株	pBSFAHY83	アスコルビン酸オキシダーゼ [<i>Acronium</i> sp.]	<i>Streptomyces lividans</i> TK23株、TK54株	pJ702	コレステロールオキシダーゼ [<i>Brevibacterium sterolicum</i>]、コレステロールデヒドロゲナーゼ [<i>Nocardia asteroides</i>]

< *Saccharomyces cerevisiae* (宿主)-ベクター-挿入DNA >

宿主	ベクター	挿入DNA[由来生物]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH22株、AH22R株、SHY4株、CL3ABYS86株	pAPCPB-1、pBR322、pEMBL yex4、pJDB207、pONY-S、pYGB 1、pYG701c、YEpl3、YEpl24	アネキシンV [ヒト]、ウレアミドリラーゼ [<i>Candida utilis</i>]、血液凝固第Ⅳ因子の構造遺伝子を含むEco RI-Hin dIII 2.3kb DNA断片 [ヒト]、B型肝炎ウイルスエスたん白質 [ヒトB型肝炎ウイルス]、B型肝炎ウイルスコアたん白質 [ヒトB型肝炎ウイルス]、単純ヘルペスウイルスgBたん白質 [単純ヘルペスウイルス]

< *Pichia pastoris* (宿主)-ベクター-挿入DNA >

宿主	ベクター	挿入DNA[由来生物]
<i>Pichia pastoris</i>	pBR322、pUC19	血清アルブミン [ヒト]

< *Pseudomonas putida* (宿主)-ベクター-挿入DNA >

宿主	ベクター	挿入DNA[由来生物]
<i>Pseudomonas putida</i>	pTM33	グルコースデヒドロゲナーゼ [<i>Acinetobacter baumannii</i>]

② 選択マーカー遺伝子(薬剤耐性マーカー、栄養要求性相補遺伝子等) [遺伝子の由来]

選択マーカー遺伝子(薬剤耐性マーカー、栄養要求性相補遺伝子等) [遺伝子の由来]
アンピシリン耐性遺伝子/ β -ラクタマーゼ遺伝子 [<i>Escherichia coli</i> (Bacterial transposon Tn3)]、ウラシル選択マーカー(<i>URA3</i>) [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]、カナマイシン耐性遺伝子[pUC4K、 <i>Escherichia coli</i> (Bacterial transposon Tn5)]、 β -ガラクトシダーゼ(<i>lacZ</i>) [<i>Escherichia coli</i>]、クロラムフェニコール耐性遺伝子 [<i>Escherichia coli</i> (Bacterial transposon Tn9)]、ストレプトマイシン耐性遺伝子 [<i>Corynebacterium</i> 、 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>]、スペクチノマイシン耐性遺伝子 [<i>Corynebacterium</i>]、チオストレプトン耐性遺伝子/23S rRNA A1067メチルトランスフェラーゼ [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 、 <i>Streptomyces azureus</i>]、テトラサイクリン耐性遺伝子 [<i>Salmonella</i> plasmid pSC101]、ロイシン選択マーカー(<i>LEU2</i>) [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]

- 経済産業省：遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の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別表第一号に基づき経済産業大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物、平成16年経済産業省告示第13号(2004)。
- GILSP遺伝子組換え微生物を構成するベクターとして、表2-①に示したベクターの一部を改変して得た誘導体も含む。但し、当該改変によって水平伝播を引き起こす可能性のあるものは除く。
- GILSP遺伝子組換え微生物を構成する挿入DNAは、(1)表2-①に示した挿入DNA [由来生物] に由来するDNA、(2)表2-①に示した挿入DNAの一部を改変して得たDNAであって、当該DNAから産生される物質の機能上の基本的性質に著しい変化が認められないもの、(3) (1)又は(2)と同一の配列を有する合成DNAである。
- 科学的知見の充実等によって、表2に示した宿主、ベクター、挿入DNA及び選択マーカー遺伝子を組み合わせる構成された遺伝子組換え微生物について、環境及びヒトへの健康の安全性を損なうおそれなどが認められた場合は、これらの宿主などは本表に含まれないものとされ、法に基づく大臣確認が必要となる。
- それ自身が有害な影響を及ぼす可能性が低いプロモーター、ターミネーター、生理活性を有しないリンカー、アダプター、クローニングサイト等は安全性が高いと考えられることから安全性評価の対象としないものとされ、本表にも記載されていない。
- 医薬品等の製造などに関する個別事例について、使用予定のLMOが上記のGILSP遺伝子組換え微生物に該当するかどうか不明の場合には、事前に④医薬品医療機器総合機構生物系審査部に相談すること。



表3 遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等における保管・運搬(生産工程中での保管・運搬を除く)に当たって執るべき拡散防止措置⁸⁾

保管 (生産工程中における保管を除く)	① 遺伝子組換え生物等が漏出、逃亡その他拡散しない構造の容器に入れ、かつ当該容器の見やすい個所に、遺伝子組換え生物等である旨を表示すること。 ② ①の遺伝子組換え生物等を入れた容器は、遺伝子組換え生物等以外の生物等と明確に区別して保管することとし、当該保管のための設備の見やすい個所に、遺伝子組換え生物等を保管している旨を表示すること。
運搬 (生産工程中における運搬を除く)	① 遺伝子組換え生物等が漏出、逃亡その他拡散しない構造の容器に入れること。 ② ①の遺伝子組換え生物等を入れた容器(容器を包装する場合にあっては、当該包装)の見やすい個所に、取り扱いに注意を要する旨を表示すること。

「厚生労働大臣の定める GILSP 組換え微生物」(表2)¹¹⁾に該当するものであれば、医薬品等の製造者は省令⁸⁾および通知¹³⁾で定められた拡散防止措置(表6参照)を執って製造を行う義務がある(この場合、厚生労働大臣への第二種使用等拡散防止措置確認申請は不要)。それ以外の場合には、まず厚生労働大臣に対して第二種使用等拡散防止措置確認申請を行って確認を受けたあとに、その拡散防止措置を執りながら製造を行うことが必要となる。また、動物用医薬品等の製造の場合には、現時点では「農林水産大臣の定める GILSP 遺伝子組換え微生物」が定められていないことから、必ず製造開始前に農林水産大臣に対して第二種使用等拡散防止措置確認申請を行わなければならない(表1参照)。

LMOが遺伝子組換え微生物(ヒト用医薬品等の製造に関する「厚生労働大臣の定める GILSP 遺伝子組換え微生物」(表2)¹¹⁾は除く)または遺伝子組換え動物に該当する場合に必要な拡散防止措置確認申請書の様式および記入上の注意事項は省令⁸⁾に示されている(表4)。研究開発等にかかる第二種使用等拡散防止措置確認申請書の様式⁵⁾とは異なっているので注意されたい。

従前は、医薬品等の製造工程においてLMOを用いるケース、すなわち医薬品等の製造工程で組換えDNA技術を応用するケースに関して、ヒト用医薬品等については厚生省から「組換えDNA技術応用医薬品等の製造のための指針」(以下、「旧指針」という)¹²⁾が、動物用医薬品等については農林水産省から「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」(平成元年農林水産事務次官依命通達元農会第747号)が示されていたが、法の施行に伴い両指針は廃止された^{13)、14)}。両指針においては、遺伝子組換え微生物などとともに、動植物培養細胞の遺伝子組換え体を用いるケースも指針の適用範囲とされていたが、今回、法において適用対象外となったことから、法施行後にこれらの遺伝子組換え体の使用等を行う際には、主務省令により定められた拡散防止措置は存在せず、主務大臣(医薬品等分野での産業利用等の場合には、ヒト



表4 遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に関して必要となる場合の第二種使用等拡散防止措置確認申請書の記載事項⁸⁾

遺伝子組換え微生物(厚労大臣の定めるGILSP遺伝子組換え微生物以外)の場合	遺伝子組換え動物の場合
<p>○申請年月日、申請者氏名、申請者住所 (注：申請者が法人の場合には、申請者氏名としては法人の名称及び代表者の氏名、申請者住所としては主たる事務所の所在地)</p> <p>○遺伝子組換え生物等の種類の名称 (注：当該LMOの宿主の分類学上の種の名称及び当該LMOの特性等の情報を含め、他のLMOと明確に区別できる名称。開発記号や国際的な識別記号が付されている場合には、その記号)</p> <p>○第二種使用等をしようとする場所 ・名称、所在地</p> <p>○第二種使用等の目的及び概要 (注：当該LMOが生産の手段として使用されるか、それ自体が最終製品として使用されるかについての別。最終製品の種類及び利用形態)</p> <p>○遺伝子組換え生物等の特性 ・宿主又は宿主の属する分類学上の種 分類学上の位置及び自然環境における分布状況 (注：学名(属及び種)及び株名。公的な微生物保存機関から分与されたものである場合には当該機関の名称及び株番号、そうでない場合には分類学的同定の根拠となる事項(既に学名が公認されている種との同異点及びその根拠、株の分離源及びそれから作製した基準株の寄託場所及び保管番号等)。遺伝的に改変された宿主のうち、既に主要な学術文献等に記載されている株の場合にはその株名、そうでない場合にはその遺伝的改変の内容(野生株から宿主株までの遺伝的改変の経緯。紫外線照射による突然変異の誘発や接合等、誘導するために用いた遺伝的改変の操作)。宿主として野生株を用いる場合には自然環境における分布状況)</p> <p>使用等の歴史及び現状 (注：産業利用された歴史を有する場合にはその内容及び期間)</p> <p>繁殖又は増殖の様式 (注：有性又は無性生殖の周期、増殖温度域、増殖速度、栄養要求性、薬剤感受性等の特性)</p> <p>病原性 (注：病原性の有無及びその根拠並びに病原性に関係あるウイルス及びプラスミドの有無。病原性が知られている場合にはその内容並びに予防及び治療の方法)</p> <p>その他の情報 (注：有害な影響を及ぼす生理活性物質等の産生性の有無。該当する物質の存在が知られている場合にはその名称並びに活性及び毒性の強さ。抗生物質の産生性等の主要な生理学的性質)</p> <p>・供与核酸 構成及び構成要素の由来 (注：目的遺伝子、隣接領域及び調節系の構成並びにその由来。必要に応じて、構造について、制限酵素地図、塩基数及び塩基配列)</p>	<p>○申請年月日、申請者氏名、申請者住所 (注：同左)</p> <p>○遺伝子組換え生物等の種類の名称 (注：同左)</p> <p>○第二種使用等をしようとする場所 ・名称、所在地</p> <p>○第二種使用等の目的及び概要 (注：具体的に記載)</p> <p>○遺伝子組換え生物等の特性 ・宿主又は宿主の属する分類学上の種 分類学上の位置及び自然環境における分布状況 (注：学名(属及び種)及び動物種名(和名及び英名)。品種名又は系統名がある場合にはその名称。遺伝的に改変された宿主品種の場合には遺伝的改変の内容(由来品種等から利用しようとする宿主品種までの系統図。近交系による継代等、作出するのに用いた遺伝的改変の操作)。自然環境における分布状況)</p> <p>使用等の歴史及び現状 (注：使用の歴史、主たる使用形態、主たる用途等)</p> <p>繁殖の様式 (注：ほ乳動物の胎生の場合には性成熟期、繁殖季節、発情周期、妊娠期間、産子数等、そうでない場合にはこれらに相当する内容)</p> <p>自然界における生存能力及び繁殖能力 (注：宿主品種等の生存能力及び繁殖能力について、一般の開放された環境における状況を主たる利用形態の環境と比較して想定される点)</p> <p>その他の情報 (注：有害物質等他の生物個体に影響を及ぼす物質の産生性等の主要な生理学的性質)</p> <p>・供与核酸 構成及び構成要素の由来 (注：同左)</p>



<p>構成要素の機能 (注：供与核酸が遺伝子として有する機能。その機能により物質を生産又は処理する場合には推定される代謝経路)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ベクター 名称及び由来 (注：名称及び由来する生物の分類学上の位置) 特性 (注：伝染性、病原性、伝達性、塩基数等。 既知のベクターについて改造又は修飾を行い、新しいベクターを開発した場合にはその改造又は修飾についての説明。必要に応じて、ベクターの由来生物の特性) ・遺伝子組換え微生物 調製方法 (注：細胞内に移入する核酸の構成(目的遺伝子、プロモーター、マーカー等の配列)及びベクターへの目的遺伝子の挿入方法。宿主への目的遺伝子の移入方法。当該LMOの育成経過(選抜方法及びその後の育成経過の概要)) <p>細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性 (注：移入した核酸が当該LMOの染色体に組み込まれているか、細胞質内に存在するかの別。目的遺伝子の宿主内での発現の安定性)</p> <p>宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 (注：「宿主又は宿主に属する分類学上の種」における「繁殖又は増殖の様式」、「病原性」及び「その他の情報」で記載した事項に関する宿主との相違点。宿主との識別を可能とする特徴)</p> <p>○拡散防止措置</p> <ul style="list-style-type: none"> ・使用区分 (注：「GILSP」、「カテゴリー1」、又は「その他」) ・作業区域の位置 (注：事業所内外の建屋の配置及び名称並びに作業区域を示した図) ・設備 配置 (注：作業区域を含む平面図。当該LMOを取り扱う主要な設備の位置及び名称) <p>構造 (注：当該LMOの取扱いに係る設備又は装置の様式。排水系統。「使用区分」をカテゴリー1と分類した場合には作業区域のうち強制換気を行っている建屋又は部屋の換気設備)</p> <p>生産工程 (注：当該LMOの生産又は当該LMOを使用し行う物質の生産の工程の概略図(各種機器の名称、バルブの個所等、並びに必要に応じて各工程の名称及び内容を図中に明示))</p> <p>○その他 (注：必要に応じて、上記以外の当該LMOの使用に関し得られている知見、事故時など緊急時における対処方法、事業者における管理体制等)</p>	<p>構成要素の機能 (注：供与核酸が遺伝子として有する機能。代謝経路の変化)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ベクター 名称及び由来 (注：同左) 特性 (注：同左) <ul style="list-style-type: none"> ・遺伝子組換え動物 調製方法 (注：細胞内に移入する核酸の構成(目的遺伝子、プロモーター、マーカー等の配列)及びベクターへの目的遺伝子の挿入方法。宿主への核酸の移入方法(顕微注入法、ウイルスベクターを用いる方法、ES細胞を用いる方法等)。当該LMOの育成経過(選抜方法及びその後の育成経過の概要)) <p>細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性 (注：移入した核酸が当該LMOの染色体に組み込まれているか、細胞質内に存在するかの別。目的遺伝子の宿主内での発現の安定性(当該LMOを継代した結果得られた目的遺伝子の発現に関する知見))</p> <p>宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 (注：繁殖の様式、自然界における生存能力及び繁殖能力、感染性ウイルスの産生性、その他の情報について、宿主との相違点。宿主との識別を可能とする形態的特徴)</p> <p>○拡散防止措置</p> <ul style="list-style-type: none"> ・作業区域の位置 (注：同左) <ul style="list-style-type: none"> ・設備 配置 (注：作業区域を含む作業場の平面図。当該LMOを取り扱う主要な設備の位置及び名称。必要に応じて、部外者への注意書き等の位置) <p>構造 (注：当該LMOを取り扱う設備の様式。当該LMOを取り扱うために排水系統等について特別な設備を設置した場合にはその設備の図)</p> <p>○その他 (注：同左)</p>
--	---



用であれば厚生労働大臣および環境大臣、動物用であれば農林水産大臣および環境大臣)への拡散防止措置確認申請も不要とされた。これは、動植物の細胞(個体および配偶子(生殖細胞)を除く)およびヒト由来の細胞が自然条件において個体に生育することは現在の科学ではあり得ないことより、これらの細胞が法では「生物」とみなされていないことから⁴⁾、無用の規制を課すことを避ける目的で拡散防止措置に関する規制等が不要とされたものと解される。ただし、ヒト用医薬品等の製造にかかる遺伝子組換え動物培養細胞の産業上の使用等に関しては、当分の間、遺伝子組換え微生物の使用等によるヒト用医薬品等の製造における具体的な拡散防止措置および運営上の遵守事項などについての通知(7.4(2)で詳述)¹³⁾の中の第3章「組織並びに運営上の遵守事項」に掲げられた事項(表6参照)を遵守するよう求められている¹⁵⁾。

ヒト用医薬品等の製造の場合、法施行前に厚生労働大臣による旧指針¹²⁾の適合確認または経済産業大臣による「組換えDNA技術工業化指針」(平成10年通商産業省告示第259号。法施行に伴い廃止)の適合確認を受けていたLMOであっても、「厚生労働大臣の定めるGILSP遺伝子組換え微生物」(表2)¹¹⁾に該当しない場合には、厚生労働大臣に対して第二種使用等拡散防止措置確認申請を改めて行う必要がある。但し、この場合には、当該確認通知の写しを添付した上で、申請書の「遺伝子組換え生物等の特性」および「拡散防止措置」の欄の記載を省略できる¹⁵⁾。また、厚生労働大臣に対する第二種使用等拡散防止措置確認申請の標準的事務処理期間は、申請書が提出されたあとにその不備が明らかになり、申請者がこれを修正するために要する期間および学識経験者の意見に基づき必要となった追加情報・書類を申請者が提出するまでの期間を除いて3か月とされている¹⁵⁾。

以上は、医薬品等の産業規模での製造に関して、LMOの第二種使用等を行う場合についての記載である。一方、環境中への拡散を防止せずに行う医薬品等の大量生産(例えば、遺伝子組換え動植物による医薬品等の開放系での大量生産)の場合には、LMOの第一種使用等に該当する。この場合、本稿7.5で詳述するとおり、ヒト用医薬品等であれば厚生労働大臣および環境大臣に、動物用医薬品等であれば農林水産大臣および環境大臣に対して、製造開始前に第一種使用規程承認申請書および当該LMOの生物多様性影響評価書を提出し、承認を得なければならない(表1参照)。

(2) 遺伝子組換え微生物の使用等によるヒト用医薬品等の製造における拡散防止措置等

遺伝子組換え微生物の第二種使用等によってヒト用医薬品等を産業規模で製造する場合、すなわち①ヒト用医薬品等の製造工程において遺伝子組換え微生物を第二種使用等として利用する場合や、②遺伝子組換え微生物を含有するヒト用医薬品の製造を第二種使用等として行う場合(すなわち遺伝子治療用医薬品のうちウイルスなど微生物



物由来のもの、および遺伝子組換え生ワクチン)に関して、法施行前には、厚生労働省から、①の場合については旧指針¹²⁾が、②のうち遺伝子治療用医薬品の場合については「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」¹⁶⁾が示され運用されてきた。法の施行に伴い旧指針¹²⁾は廃止され、新たに「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」との通知¹³⁾が厚生労働省から発出された。それによると、①の場合については、(i)LMOとして「厚生労働大臣の定めるGILSP遺伝子組換え微生物」(表2)¹¹⁾を用いるケースでは、使用等に際して通知¹³⁾に具体的に定められた拡散防止措置(省令⁸⁾で定められた措置を含んでい(る)を執らなければならない(厚生労働大臣への第二種使用等拡散防止措置確認申請は不要)。また、(ii)LMOとしてそれ以外の遺伝子組換え微生物を用いるケースでは、通知¹²⁾に示された具体的な拡散防止措置および運営遵守事項など(後述)に従い、個々の遺伝子組換え微生物ごとに厚生労働大臣に対し第二種使用等拡散防止措置確認申請を行って確認が得られたあとに製造を開始すること、並びに製造開始時と終了時および毎年度末に製造実施状況を、製造業者または製造管理者もしくは責任技術者の氏名または住所や製造所の名称が変更になったときには速やかにその旨を厚生労働省に報告することが必要とされている。また、②の場合については、①の場合と同様に製造時に拡散防止措置を執ることなどが必要となることに加えて、治験開始前には厚生労働大臣および環境大臣に対して第一種使用規程承認申請(7.5参照)を、さらに、遺伝子組換え微生物を含有する遺伝子治療用医薬品では、治験実施前に「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」¹⁶⁾に基づく厚生労働大臣への確認申請もあわせて行うことなどが必要とされている。これらの関係を表5にまとめる。なお、「厚生労働大臣の定めるGILSP遺伝子組換え微生物」(表2)¹¹⁾に該当しない遺伝子組換え微生物によってヒト用医薬品を製造する場合の第二種使用等拡散防止措置確認申請書の記載例が作成・公表されているので¹⁷⁾、申請を行う際には参考にされたい。

「厚生労働大臣の定めるGILSP遺伝子組換え微生物」(表2)¹¹⁾以外の遺伝子組換え微生物を用いて産業規模でのヒト用医薬品等の製造を行う際において、遺伝子組換え微生物の拡散防止を的確に実施するために、前述のとおり厚生労働省から「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」との通知¹³⁾が発出されている(表6)。その中では、製造業者側の行うべきこととして、

- ① 遺伝子組換え微生物に関する情報(宿主の性質、ベクターおよび供与核酸の遺伝情報、遺伝子組換え微生物の性質など)などに基づき、遺伝子組換え微生物についてGILSP並びにカテゴリー1、2および3の使用区分を選定した上で(表6-②)、製造に際しては使用区分に応じて定められた拡散防止措置(表6-③)を執ること
- ② 製造管理者(医療機器、医薬部外品または化粧品の場合には責任技術者)および製造安全主任者を任命すること



表5 遺伝子組換え微生物の第二種使用等によってヒト用医薬品等を産業規模で製造する際の規制(産業上の使用等の場合)

最終製品(ヒト用医薬品等)はLMOを含有する、又は最終製品はLMOから構成されているか	用いるLMOは「厚生労働大臣の定めるGILSP遺伝子組換え微生物」(表2) ¹¹⁾ に該当するか	執るべき拡散防止措置	厚生労働大臣に対する第二種使用等拡散防止措置確認申請の必要性	備考
No (LMOは製造工程中で使用)	Yes	→ 通知(GILSP) ^{13.a)}	不要	—
	No	→ 通知(GILSP~) ¹³⁾	製造開始前に必要	—
Yes (遺伝子治療用医薬品のうちウイルス等微生物由来のもの、及び遺伝子組換え生ワクチン)	Yes	→ 通知(GILSP) ^{13.a)}	不要	各段階の臨床試験開始前に当該LMOについて第一種使用規程承認申請が必要 ^{b)} 。遺伝子治療用医薬品の場合、各段階の臨床試験開始前に「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」 ¹⁶⁾ に基づく確認申請も必要 ^{c)}
	No	→ 通知(GILSP~) ¹³⁾	製造開始前に必要	

- a) 通知¹³⁾で定められている拡散防止措置の内容には、省令⁸⁾で定められている拡散防止措置の内容が含まれている。
- b) すでに承認された第一種使用規程に従って実施する場合には申請不要。
- c) 治験実施計画ごとに申請が必要。

- ③ 製造安全委員会を設置して、製造業務の安全確保について調査審議を求めること
- ④ 製造従事者に対して製造作業の開始前に教育訓練を実施すること
- ⑤ 製造従事者の健康管理を行うこと
- ⑥ 製造に用いる遺伝子組換え微生物の保管状況や試験結果の記録、製造従事者の製造従事期間や健康診断結果の記録、製造安全委員会の審議記録、設備・装置の定期点検記録、製造記録など必要な記録を当該医薬品等の製造終了日から5年間保存すること
- ⑦ 製造に用いる遺伝子組換え微生物に関する情報を製造開始後も収集するとともに、当該遺伝子組換え微生物の評価に影響をおよぼす知見を発見した場合には速やかに厚生労働大臣に報告すること

などが挙げられている。

7.5 医薬品等分野における第一種使用等の取り扱い(産業上の使用等の場合)

医薬品等分野においてLMOの第一種使用等を産業利用で行う場合として現実的に



想定されるケースは、

①遺伝子組換え微生物を含有する医薬品をヒトまたは動物に投与する場合(治験を含む)

②医薬品等の製造工程で使用する遺伝子組換え動植物を開放系で飼育/栽培する場合の二つであると思われる(表1参照)。特に①については、医薬品等の国際的な開発状況を考慮すると、現時点で具体的に想定されるものとして、ウイルスなどに由来する遺伝子組換え微生物を含有する遺伝子治療用医薬品、および遺伝子組換え生ワクチンの2種が挙げられるであろう。

LMOの第一種使用等を行おうとする際には、使用等の開始に先立ち、LMOの種類ごとに主務大臣に対して生物多様性影響評価書を添付して第一種使用規程承認申請を行い、承認を得ておかなければならない。また、日本にLMOを輸入して第一種使用等を行おうとする場合には、

①国内で実際に第一種使用等を行う予定の者が第一種使用規程承認申請を行うことが必要

②輸出元が直接、第一種使用規程承認申請を行うことが可能である。この場合に輸出元は、日本において当該LMOの適正な使用等のために必要な措置を執らせるための国内管理人を選定しておく必要がある。なお、すでに承認されている第一種使用規程(承認後、官報に告示されるとともに日本版バイオセーフティクリアリングハウス(J-BCH)のホームページ(<http://www.bch.biodic.go.jp>)に掲載される)に従って当該LMOの第一種使用等を行おうとする場合には改めて第一種使用規程承認申請を行う必要はない¹⁾。

第一種使用規程承認申請書の様式および記入方法は、法律施行規則⁴⁾で定められているとおりであり、申請者の氏名および住所、用いるLMOの種類と名称並びに当該LMOの使用等の内容および方法を記入する。また、申請者が申請前に実施する当該LMOの生物多様性影響評価は、「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三条の規定に基づく基本的事項」¹⁸⁾に示された留意事項(表7)に留意しながら、具体的には「遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領」¹⁹⁾に従って実施し(表8)、その結果を生物多様性影響評価書に記入する。なお、産業上の使用等には該当しないが、法の適用対象となる遺伝子治療薬を用いてヒトで遺伝子治療臨床研究(治験ではないもの)を行う際にも、厚生労働大臣および環境大臣への第一種使用規程承認申請が必要となる。その際の生物多様性影響評価書の様式および記入方法が厚生労働省から示されている²⁰⁾。



第4章 安全性評価の国内規制と技術

表6 ヒト用医薬品等の製造に関して、遺伝子組換え微生物の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置¹³⁾(1)

①通知¹³⁾の概略

第1章 総則	第1 目的	ヒト用の医薬品等を製造する場合の拡散防止措置及び運営上の遵守事項等について定め、遺伝子組換え微生物の拡散防止を的確に実施することを目的とする。
	第2 製造に当たって執る拡散防止措置(下表②参照)	
第2章 拡散防止措置(下表③参照)	第1 GILSPの施設及び設備等	1. 製造 (1)施設及び設備、(2)設備管理、(3)汚染の防止 2. 保管 3. 運搬
	第2 カテゴリー1の施設及び設備等	1. 製造 (1)施設及び設備、(2)設備管理、(3)汚染の防止 2. 保管 3. 運搬
	第3 カテゴリー2及び3の施設及び設備等	1. 製造 (1)施設及び設備、(2)設備管理、(3)汚染の防止 2. 保管 3. 運搬
第3章 組織並びに運営上の遵守事項	第1 製造業者	医薬品等の製造工程において遺伝子組換え微生物を使用等する者(製造業者)の任務：(1)製造所ごとに製造管理者(医療機器、医薬部外品又は化粧品の場合には、責任技術者)及び製造安全主任者を任命すること。(2)製造上の安全性を確保するため製造業者ごとに製造安全委員会を設置し、その委員を任命すること。また、製造安全委員会に製造業務の安全確保について調査審議を求めること。(3)製造管理者が業務を遂行するに当たって支障を生じることがないようにすること。
	第2 製造管理者又は責任技術者	製造管理者又は責任技術者は、法 ¹⁾ 、省令 ⁸⁾ 及び本通知を熟知していること。 任務：(1)製造計画の立案及びその実施に際し、法 ¹⁾ 、省令 ⁸⁾ 及び本通知を十分に遵守し、製造安全主任者との緊密な連絡の下に製造作業全体の適切な管理・監督に当たること。(2)製造従事者に対して教育訓練を行うこと。(3)製造安全委員会と十分連絡を取るとともに、必要な事項について製造安全委員会に報告すること。(4)その他製造上の安全性の確保に必要な事項を実施すること。
	第3 製造安全主任者	製造安全主任者は、遺伝子組換え微生物の使用等に関し、製造管理者又は責任技術者を補佐するものであり、製造上の安全性を確保するための知識及び技術に高度に習熟した者であること。法 ¹⁾ 、省令 ⁸⁾ 及び本通知を熟知していること。 任務：(1)製造が法 ¹⁾ 、省令 ⁸⁾ 及び本通知に従って適正に遂行されていることを確認すること。(2)製造管理者又は責任技術者に対し助言、報告を行うこと。(3)その他製造上の安全性の確保に関し、必要な事項の処理に当たること。
	第4 製造従事者	製造従事者は、製造管理者又は責任技術者の行う教育訓練をあらかじめ受けた者であること。 遵守すべき事項：(1)製造作業を行うに当たって製造上の安全確保について十分に自覚し必要な配慮をすること。(2)作業区域内では、作業レベルに応じた作業衣を着用すること。
	第5 製造安全委員会	製造安全委員会は、高度に専門的な知識及び技術並びに広い視野に立った判断が要求されることを十分に考慮し、適切な分野の者により構成されること。 製造安全委員会が、製造業者の求めに応じて調査審議し、製造業者に報告する事項：(1)製造作業標準の法 ¹⁾ 、省令 ⁸⁾ 及び本通知に対する適合性。(2)製造従事者に対する安全訓練教育及び健康管理の状況。(3)事故発生の際の必要な処置及び改善策。(4)その他製造上の安全性の確保



第3章 組織並びに運営上の遵守事項		に関する必要な事項。 製造安全委員会は、必要に応じて製造管理者又は責任技術者あるいは製造安全主任者から報告を求めることができる。
	第6 教育訓練	製造管理者又は責任技術者は、製造作業の開始前に製造従事者に対し、法 ¹⁾ 、省令 ²⁾ 及び本通知を熟知させること。 教育訓練を行うべき事項：(1)遺伝子組換え微生物の安全性に関する知識。(2)製造に用いる遺伝子組換え微生物の安全な取扱いに関する技術。(3)設備・装置に関する知識及び技術。(4)製造工程の安全性に関する知識。(5)事故発生時の措置に関する知識。
	第7 健康管理	(1)製造業者は、製造従事者に対し、定期健康診断を行うとともに、医薬品等を取り扱うのに不適当な者を製造作業に従事させないこと。(2)製造業者は、製造従事者がカテゴリ2及び3の製造作業に従事する場合は、あらかじめ予防及び治療の方策について検討しておくこと。(3)製造業者は、カテゴリ2及び3の製造作業において作業区域内感染のおそれがある場合は、直ちに製造従事者に対し健康診断を行い、適切な措置を執ること。なお、カテゴリ3の製造従事者については、製造従事前に血清をあらかじめ採取し、当該製造従事者が製造に従事することを終えた日から2年間はこれを保存すること。
	第8 記録及びその保存	製造管理者又は責任技術者が、帳簿を備え、記載すべき事項：(1)遺伝子組換え微生物の名称及びその容器に付された番号。(2)遺伝子組換え微生物の保管及び継代の状況。(3)遺伝子組換え微生物の生物学的性状及びその試験検査の年月日。(4)遺伝子組換え微生物の譲受けの相手方の氏名及び住所。(5)製造従事者の氏名、所属機関、職名、製造業務に従事している期間(カテゴリ1～3の場合にかぎる)。(6)健康診断の結果。(7)製造安全委員会の審議記録(製造作業標準が法 ¹⁾ 、省令 ²⁾ 及び本通知に適合していることを確認する根拠となった資料を含む)。(8)設備・装置の定期点検記録及び製造記録。 この帳簿は、当該医薬品等の製造終了の日から5年間保存すること。
	第9 報告	製造業者は、製造に用いる遺伝子組換え微生物に関する情報を収集するとともに、当該遺伝子組換え微生物の評価に影響を及ぼす知見を発見した場合には、速やかに厚生労働大臣に報告すること。

②使用区分を選定する際の遺伝子組換え微生物の性質などの基準

使用区分	基準
GILSP*	宿主、供与核酸及びベクター並びに遺伝子組換え微生物が以下の基準を満たすもの (1)宿主 ・病原性がないこと ・病原性に関係のあるウイルス及びプラスミドを含まないこと ・安全に長期間利用した歴史がある、又は特殊な培養条件下では増殖するがそれ以外では増殖が制限されていること (2)供与核酸及びベクター ・性質が十分に明らかにされており、有害と認められる塩基配列を含まないこと ・伝達性に乏しく、かつ本来耐性を獲得することが知られていない生細胞に耐性マーカーを伝達しないこと (3)遺伝子組換え微生物 ・病原性がないこと ・宿主と比べて増殖する能力が高くないこと
カテゴリ1	遺伝子組換え微生物が病原性がある可能性が低く、かつGILSPに含まれないもの
カテゴリ2	遺伝子組換え微生物がヒトに感染性はあるが発症の可能性は少なく、予防対策及び有効な治療法があるもの
カテゴリ3	遺伝子組換え微生物がヒトに対し病原性があり、取り扱う際にかなりの注意を必要とするが、感染・発症してもその危険度は比較的 low、予防対策及び有効な治療法があるもの

*優良工業製造規範(Good Industrial Large-Scale Practice)の略。「GILSP遺伝子組換え微生物」は省令²⁾において「特殊な培養条件下以外では増殖が制限されること、病原性がないこと等のため最小限の拡散防止措置を執ることにより使用等を行うことができるものとして財務大臣、厚生労働大臣、農林水産大臣、経済産業大臣又は環境大臣が定めるもの」と定義されている。



表6 ヒト用医薬品等の製造に関して、遺伝子組換え微生物の第二種使用等のうち産業上の使用等にあって執るべき拡散防止措置¹³⁾(2)

③各使用区分における拡散防止措置

	GILSP	カテゴリー 1	カテゴリー 2 及び 3
製 造	施設及び設備	<p>GILSPにおける措置に加えて</p> <p>(1)その外の大気、水又は土壌と遺伝子組換え微生物とを物理的に分離する施設等であること</p> <p>(2)作業区域内に、製造従事者が使用する洗浄又は消毒のための設備が設けられていること</p> <p>(3)必要に応じ、作業区域内に設置された室内における空気中の遺伝子組換え微生物の数を最小限にとどめるための換気設備(遺伝子組換え微生物を捕捉できるものにかぎる)が設けられていること</p>	<p>カテゴリー 1 における措置に加えて</p> <p>(1)作業区域内を清潔に保ち、げっ歯類、昆虫類等を防除すること</p> <p>(2)別表に掲げる措置</p>
	製造	<p>GILSPにおける措置と同</p>	<p>カテゴリー 1 における措置に加えて</p> <p>(1)製造作業中、培養又は発酵の用に供する設備及び当該設備に直接接続された設備の機能を適切な方法により確認すること</p> <p>(2)製造に用いられる設備・装置には一連の識別番号を付し、厳重な管理の下に置くこと</p>
	設備管理	<p>(1)作業終了後、使用した設備・装置を十分に洗浄し、又はそれに付着した遺伝子組換え微生物を不活化すること</p> <p>(2)設置時及び定期的に、培養又は発酵の用に供する設備及び当該設備に直接接続された設備並びに除菌装置の密閉の程度又は性能の検査を行うこと</p> <p>(3)設備・装置の機能に係る部分の改造又は交換を行った場合は、その都度、当該設備・装置の密閉の程度又は性能の検査を行うこと</p> <p>(4)除菌装置については、交換時、定期検査時及び製造業務内容の変更時に、付着した遺伝子組換え微生物を不活化すること</p>	<p>GILSPにおける措置(1)及び(3)に加えて</p> <p>(1)廃液又は廃棄物は不活化すること</p> <p>(2)製造従事者は専用の作業着を着用すること</p> <p>(3)遺伝子組換え微生物を培養又は発酵の用に供する設備に入れ、又はこれから取り出す場合に、遺伝子組換え微生物が施設等から漏出しないよう注意すること</p>
汚染の防止	<p>(1)廃液又は廃棄物はそれに含まれる遺伝子組換え微生物の数を最小限にとどめる措置を執った後、廃棄すること*</p> <p>(2)遺伝子組換え微生物を培養又は発酵の用に供する設備に入れ、又はこれから取り出す場合に、遺伝子組換え微生物が施設等から漏出しないよう注意すること</p> <p>(3)遺伝子組換え微生物を含む培養液の大量流出に対する対策及び緊急時の作業手順を確立しておくこと</p>	<p>GILSPにおける措置(1)及び(3)に加えて</p> <p>(1)廃液又は廃棄物は不活化すること</p> <p>(2)製造従事者は専用の作業着を着用すること</p> <p>(3)遺伝子組換え微生物を培養又は発酵の用に供する設備に入れ、又はこれから取り出す場合に、遺伝子組換え微生物が</p>	<p>カテゴリー 1 における措置(3)までに加えて</p> <p>(1)目的の物質を分離する場合であって、その物質がたん白質等のように失活しやすいものであるときは、培養液の取扱いは、その漏出を防止</p>



製造	汚染の防止		施設等から漏出しないよう取り扱うとともに、培養設備等の外面に遺伝子組換え微生物が付着した場合は直ちに不活化すること(GILSP(2)参照) (4) 目的の物質を分離する場合であって、その物質がたん白質等のように失活しやすいものであるときは、培養液の取扱いは、遺伝子組換え微生物の漏出を最小限にして作業を行うことで差し支えないこと (5) 設備・装置からのエアロゾルの漏出を最小限にするよう注意すること	して作業を行うことで差し支えないこと(カテゴリー1(4)参照) (2) 設備・装置からのエアロゾルの漏出を防止すること(カテゴリー1(5)参照)
	保管	(1) 遺伝子組換え微生物が漏出しない構造の容器に入れ、かつ当該容器の見やすい個所に遺伝子組換え微生物である旨を表示すること (2) (1)の遺伝子組換え微生物を入れた容器は、遺伝子組換え微生物以外の生物と明確に区別して保管することとし、遺伝子組換え微生物を保管している旨を当該保管設備の見やすい個所に作業レベルに応じて表示(例：「GILSP 遺伝子組換え微生物保管中」)すること (3) 製造管理者又は責任技術者は、遺伝子組換え微生物を含む保管物の明細目録を作成し、保存すること	GILSPにおける措置と同	カテゴリー1における措置に加えて (1) 作業区域内の保管設備に安全に保管すること
	運搬	(1) 遺伝子組換え微生物を含む材料を作業区域外へ運搬する場合には、遺伝子組換え微生物が漏出しない構造の容器等に入れること* (2) 遺伝子組換え微生物を含む材料を入れた容器等(容器を包装する場合にあつては、当該包装)の見やすい個所に取り扱いに注意する旨を表示すること	GILSPにおける措置と同	カテゴリー1における措置に加えて (1) 遺伝子組換え微生物を含む材料を作業区域外へ運搬する場合には、容器が万一破損しても内容物が外部に漏出しないようにすること

* 省令⁴⁾で定められているGILSP遺伝子組換え微生物についての拡散防止措置の内容と共通する、若しくはその内容を含むもの。

7.6 立入検査等・LMOの輸出入

法の施行に伴い、第一種使用等、第二種使用等の別を問わずLMOの使用等をしている者または過去にした者、LMOを譲渡しまたは提供した者、国内管理人、LMOを輸出した者、その他の関係者に対して、国の機関または国の指定した独立行政法人が、立入検査を行ったり、検査に必要な量のLMOを無償で収去することができるが、新たに法律のレベルで明確に規定された¹⁾。

また、LMOを輸出する際に必要な措置(相手国への通告など)が法で定められているが、LMOを含有するヒト用医薬品の場合、それらは適用除外とされている¹⁾。



表6 ヒト用医薬品等の製造に関して、遺伝子組換え微生物の第二種使用等のうち産業上の使用等にあって執るべき拡散防止措置¹³⁾ (3)

<別表> (カテゴリー 2 及び 3 における製造「施設及び設備」に関する拡散防止措置)

	カテゴリー 2	カテゴリー 3
(1) 遺伝子組換え微生物を取り扱う工程	閉鎖系	閉鎖系
(2) 閉鎖系からの排気ガス	遺伝子組換え微生物の漏出を防止	遺伝子組換え微生物の漏出を防止
(3) サンプリング、閉鎖系への物質の添加及び他の閉鎖系への遺伝子組換え微生物の移動の場合	遺伝子組換え微生物の漏出を防止	遺伝子組換え微生物の漏出を防止
(4) 培養液を閉鎖系から開放系に移す場合	遺伝子組換え微生物を不活化してから行う	遺伝子組換え微生物を不活化してから行う
(5) 閉鎖系の密閉のための設計	遺伝子組換え微生物の漏出を防止	遺伝子組換え微生物の漏出を防止
(6) 閉鎖系を設置する作業区域の条件		
a) バイオハザードの標識	必要	必要
b) 指定された製造従事者以外の立ち入り	制限	制限。製造従事者は、エアロックを経由して入ること
c) 製造従事者の着衣	専用の作業衣	専用の作業衣に完全に交換
d) 製造従事者が作業区域から退出する際のシャワー設備	場合による	必要
e) 洗浄設備及びシャワー室からの排水処理設備	場合による	必要
f) 空気の汚染を最小限にするための換気設備	場合による	必要
g) 作業区域が陰圧に保たれていること	場合による	必要
h) 作業区域において、流入・流出する空気が高性能除塵フィルターを通されていること	場合による	必要
i) 作業区域は、閉鎖系のすべての内容物が漏出してもこれを外部に漏らさないように設計されていること	場合による	必要
j) 作業区域は、燻蒸消毒ができるように設計されていること	場合による	必要

表7 遺伝子組換え生物等の第一種使用等に関して生物多様性影響評価書を作成する際の留意事項¹⁸⁾

- ① 生物多様性影響の評価に際して着目すべき点は、LMOの特性によって様々であることから、植物、動物及び微生物ごとに評価の項目を定めること
- ② 生物多様性影響の評価に必要とされる情報は、最新の科学的知見によることとし、当該LMOの宿主又は当該宿主の属する分類学上の種に関する情報、LMOの調製等に関する情報及びLMOの使用等に関する情報とすること
- ③ 生物多様性影響の評価は、影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、影響の具体的内容の評価、影響の生じやすさの評価、生物多様性影響が生じるおそれの有無等の判断の手順によること(表8参照)
- ④ ②のLMOの使用等に関する情報には、必要に応じ、承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集、生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置、実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等(原則としてLMOの生活環又は世代時間に相応する適当な期間行われるもの)の結果などを含むこと



表8 遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領¹⁹⁾の概略(1)

<p>I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 (注:「宿主」とは、遺伝子組換え技術の利用により得られた核酸が移入される生物をいう)</p>	<p>① 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 ② 使用等の歴史及び現状 ③ 生理学的及び生態学的特性 (1)基本的特性、(2)生息又は生育可能な環境の条件、(3)捕食性又は寄生性、(4)繁殖又は増殖の様式、(5)病原性、(6)有害物質の産生性、(7)その他の情報</p>
<p>II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報</p>	<p>① 供与核酸に関する情報(注:「供与核酸」とは、遺伝子組換え技術の利用により得られた核酸のうち、移入された宿主内でその全部又は一部を複製させるもの(以下、「ベクター」という)以外のものをいう) (1)構成及び構成要素の由来、(2)構成要素の機能 ② ベクターに関する情報 (1)名称及び由来、(2)特性 ③ 遺伝子組換え生物等の調製方法 (1)宿主内に移入された核酸全体の構成、(2)宿主内に移入された核酸の移入方法、(3)遺伝子組換え生物等の育成の経過 ④ 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性 ⑤ 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性 ⑥ 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違</p>
<p>III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報</p>	<p>① 使用等の内容(注:第一種使用規程承認申請書の記載と同) ② 使用等の方法(同上) ③ 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法 ④ 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置 ⑤ 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果(注:原則として遺伝子組換え生物等の生活環又は世代時間に相応する適当な期間行われるもの) ⑥ 国外における使用等に関する情報</p>
<p>IV 項目ごとの生物多様性影響の評価</p>	<p>申請したLMOが植物(注:きのこ類も含む)の場合 ① 競合における優位性(注:野生植物と栄養分、日照、生育場所などの資源を巡って競合し、それらの生育に支障を及ぼす性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定(注:分類学上の種その他の属性により特定。多数に上る場合は適切なものを選定。なお、その宿主又は宿主の属する種についてわが国での長期使用などの経験のある遺伝子組換え生物等に関しては、IV章に記載する性質のすべてについて当該遺伝子組換え生物等と宿主又は宿主の属する分類学上の種との間で異なるところがない場合には、影響を受ける可能性のある野生動植物などを特定しなくてもよい。以下同) (2)影響の具体的内容の評価(注:(1)で特定又は選定された野生動植物などが遺伝子組換え生物等から受ける影響の具体的内容について評価。以下同) (3)影響の生じやすさの評価(注:申請している第一種使用規程に従って第一種使用等を行った場合に、(1)で特定又は選定された野生動植物などが遺伝子組換え生物等から受ける影響の生じやすさについて評価。以下同) (4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断(注:(1)で特定又は選定された野生動植物などの種又は個体群の維持に支障を及ぼすおそれがあるか否かを判断。なお、その宿主又は宿主の属する種についてわが国での長期使用などの経験のある遺伝子組換え生物等に関しては、当該宿主又は宿主の属する種と比較して影響の程度が高まっているか否かにより判断してよい) ② 有害物質の産生性(注:野生動植物または微生物の生息または生育に支障を及ぼす物質を産生する性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 ③ 交雑性(注:近縁の野生植物と交雑し、遺伝子組換え技術により移入された核酸をそれらに伝達する性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p>



表8 遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領¹⁹⁾の概略(2)

	<p>④ その他の性質 (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>申請したLMOが動物の場合</p> <p>① 競合における優位性(注：野生動物と食物、営巣場所、生息場所等の資源を巡って競合し、それらの生育に支障を及ぼす性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>② 捕食性又は寄生性(注：野生動植物又は微生物を捕食し、あるいは野生動植物に寄生することにより野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>③ 有害物質の産生性(注：野生動植物又は微生物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>④ 交雑性(注：近縁の野生動物と交雑し、遺伝子組換え技術により移入された核酸をそれらに伝達する性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>⑤ その他の性質 (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>申請されたLMOが微生物(注：きのこ類以外の菌界に属する生物、原生動物界に属する生物、原核生物界に属する生物、ウイルス及びウイロイド)の場合</p> <p>① 他の微生物を減少させる性質(注：競合、有害物質の産生等により他の微生物を減少させる性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>② 病原性(注：野生動植物に感染し、それらの野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>③ 有害物質の産生性(注：野生動植物の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生する性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>④ 核酸を水平伝達する性質(注：遺伝子組換え技術により移入された核酸を野生動植物または他の微生物に伝達する性質) (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p> <p>⑤ その他の性質 (1)影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定、(2)影響の具体的内容の評価、(3)影響の生じやすさの評価、(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断</p>
<p>V 生物多様性影響の総合的評価 (注：Ⅳの項目ごとの評価結果の概要及びこれらの評価結果を踏まえた総合的な判断の結果)</p>	

注：それぞれ記載の根拠となる情報の出典や判断の根拠を明示する。



7.7 おわりに

以上、医薬品等分野における生物多様性影響評価にかかる規制や拡散防止措置等について概説した。法施行後、まだ日が浅いこともあって、現時点ではこれらの規制の運用について若干試行錯誤しているという面があることは否めないものの、今後、法および関連政省令を遵守しつつ事例や経験の蓄積が進むに従って、よりの確でスムーズな運用が行われると期待される。

<引用・参考文献>

- 1) 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15年法律第97号(2003).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 2) 生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書、平成15年条約第7号および外務省告示第444号(2003).
(http://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/treaty/treaty156_6.html)
- 3) 早川堯夫、永田龍二：バイオロジクスの品質と安全性評価。長尾拓編：医薬品の安全性、南山堂、pp. 33-51(2004).
- 4) 財務省、文部科学省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：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施行規則、平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第1号(2003).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 5) 文部科学省、環境省：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、平成16年文部科学・環境省令第1号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 6) 文部科学省：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の規定に基づき認定宿主ベクター系等を定める件、平成16年文部科学省告示第7号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 7) 文部科学省：「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」の解説資料(平成16年3月8日版)(2004).
(http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/04030901.htm)
- 8) 財務省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の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、平成16年財務・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省令第1号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
- 9) 財務省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：「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(産業上の使用等)(案)」に対する意見の概要と対応方針について(2004).



- (<http://www.env.go.jp/info/iken/result/h151225a.pdf>)
- 10) 厚生労働省：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の施行について、平成16年厚生労働省医薬食品局長通知薬食発第0219008号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/tuchi1.html>)
 - 11) 厚生労働省：遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の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別表第一号に基づき厚生労働大臣が定めるGILSP遺伝子組換え微生物、平成16年厚生労働省告示第27号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
 - 12) 厚生省：組換えDNA技術応用医薬品等の製造のための指針、昭和61年厚生省薬務局長通知薬発第1051号(1986). [以後、廃止に至るまで複数回の改正が行われている]
 - 13) 厚生労働省：遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について、平成16年厚生労働省医薬食品局長通知薬食発第0219011号(2004).
(<http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/index.html>の「通知検索」から検索)
 - 14) 社団法人農林水産先端技術産業振興センターホームページ.
(http://www.biotech-house.jp/glossary/glos_27.html)
 - 15) 厚生労働省：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の施行に伴う事務取扱い等について、平成16年厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知薬食審査発第0319001号(2004).
 - 16) 厚生省：遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針、平成7年厚生省薬務局長通知薬発第1062号(1995).
厚生労働省：遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について、平成14年厚生労働省医薬局長通知医薬発第0329004号(2002).
(<http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/guidline/index.html>)
 - 17) 厚生労働省：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が定められていない場合の拡散防止措置の確認に関する申請書の記載例について、平成16年7月30日厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡(2004).
(<http://www.hourei.mhlw.go.jp/hourei/index.html>の「通知検索」から検索)
 - 18) 財務省、文部科学省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：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三条の規定に基づく基本的事項、平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省告示第1号(2003).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
 - 19) 財務省、文部科学省、厚生労働省、農林水産省、経済産業省、環境省：遺伝子組換え生物等の第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領、平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業・環境省告示第2号(2003).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/hourei1.html>)
 - 20) 厚生労働省：遺伝子治療臨床研究に関する「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」に基づく第一種使用規程承認申請の手続等について、平成16年厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知科発第0219001号(2004).
(<http://www.bch.biodic.go.jp/tuchi1.html>)

<早川 堯夫/永田 龍二>



N-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1 by liquid chromatography with graphitized carbon column/ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes

Satsuki Itoh^a, Nana Kawasaki^{a,b,*}, Noritaka Hashii^b, Akira Harazono^a,
Yukari Matsuishi^a, Takao Hayakawa^c, Toru Kawanishi^a

^a Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Science, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^b CREST, Japan Science and Technology Agency (JST), Japan

^c Pharmaceutical and Medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

Received 25 July 2005; received in revised form 10 November 2005; accepted 14 November 2005

Available online 20 December 2005

Abstract

We have previously described the site-specific glycosylation analysis of rat brain Thy-1 by LC/multistage tandem mass spectrometry (MSⁿ) using proteinase-digested Thy-1. In the present study, detailed structures of oligosaccharides released from Thy-1 were elucidated by mass spectrometric oligosaccharide profiling using LC/MS with a graphitized carbon column (GCC-LC/MS). First, using model oligosaccharides, we improved the oligosaccharide profiling by ion trap mass spectrometry (IT-MS) coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR-MS). Sequential scanning of a full MS¹ scan with FT-ICR-MS followed by data-dependent MSⁿ with IT-MS in positive ion mode, and a subsequent full MS¹ scan with FT-ICR-MS followed by data-dependent MSⁿ with IT-MS in negative ion mode enabled the monosaccharide composition analysis as well as profiling and sequencing of both neutral and acidic oligosaccharides in a single analysis. The improved oligosaccharide profiling was applied to elucidation of N-linked oligosaccharides from Thy-1 isolated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. It was demonstrated that Thy-1 possesses a significant variety of N-linked oligosaccharides, including Lewis a/x, Lewis b/y, and disialylated structure as a partial structure. Our method could be applicable to analysis of a small abundance of glycoproteins, and could become a powerful tool for glycoproteomics.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mass spectrometric oligosaccharide profiling; Graphitized carbon column; Ion trap mass spectrometry; Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; Data-dependent MSⁿ; Thy-1

1. Introduction

Glycosylation is one of the most abundant post-translational modifications of proteins [1]. It is already known that glycosylation influences the biological functions as well as the physicochemical properties of proteins, i.e., folding, solubility, aggregation, and stability. A number of reports have noted a positive relationship between a change in glycosylation and

development, aging, and certain diseases [2–4]. Elucidation of structural detail in oligosaccharides is necessary to clarify the biological properties of glycoproteins.

MS is now a powerful tool for structural analysis of glycoproteins. There are two major mass spectrometric approaches to the structural analysis of glycoproteins, i.e., MS of glycopeptides [5–7] and of oligosaccharides [8–13]. For oligosaccharide sequencing, tandem mass spectrometry as well as exoglycosidase digestions in conjunction with MS is recognized as an effective means of oligosaccharide sequencing [14–16]. Mass spectrometric peptide/glycopeptide mapping by LC coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) is effective for the determination of glycosylation sites and the analysis of site-specific heterogeneity [17–22]. However, structural detail in

* Corresponding author. Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Science, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel.: +81 3 3700 1141; fax: +81 3 3707 6950.

E-mail address: nana@nihs.go.jp (N. Kawasaki).

oligosaccharides is not always available by product ion spectra of glycopeptides, as many of the precursor ions consist of uniform peptides carrying different oligosaccharides with identical m/z values. LC/MS/MS of glycopeptides has limitations for the structural analysis of carbohydrates due to the difficulty of isolating of glycopeptide isomers. Mass spectrometric oligosaccharide profiling through the separation of isomers by LC can supply the structural detail of each oligosaccharide although it cannot provide information regarding glycosylation sites and site-specific glycosylation [23–29]. MS of both glycopeptides and oligosaccharides is needed for glycosylation analysis of a glycoprotein [30].

Thy-1 is a cell adhesion molecule that belongs to the immunoglobulin superfamily and is attached to the cell membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor. We recently studied the glycosylation of Thy-1 in rat brain by mass spectrometric peptide/glycopeptide mapping, and demonstrated that Thy-1 possesses various *N*-glycans at Asn23, 74, and 98 [31]. The monosaccharide composition of *N*-glycan at each glycosylation site was estimated by masses of molecular ions; however, structural detail regarding some of the oligosaccharides could not be elucidated by MSⁿ since many glycopeptides with identical m/z values contained several oligosaccharide isomers and yielded product ions from a mixture of these glycopeptide isomers. Mass spectrometric oligosaccharide profiling is necessary for detailed structural analysis of oligosaccharides.

We have previously demonstrated a simple means of oligosaccharide profiling using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with a graphitized carbon column (GCC–LC/MS) [32–34], in which oligosaccharides can be separated on the basis of their branching, sequence, and linkage, and can be characterized based on their monosaccharide compositions estimated from their calculated molecular masses. Here, we study the glycosylation of Thy-1 by oligosaccharide profiling with GCC–LC/MS. First, we improved our oligosaccharide profiling by ion trap mass spectrometry (IT–MS) coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT–ICR–MS). This instrument is capable of both monosaccharide composition analysis by acquisition of accurate masses and data-dependent multistage tandem MS (MSⁿ) for sequencing with fast switching between positive and negative ion modes. Using a mixture of typical oligosaccharides, including high-mannose-type, and asialo-, trisialylated, and tetrasialylated complex-types, we confirmed that the improved method can be used for monosaccharide composition analysis and detailed structural analysis of both neutral and acidic oligosaccharides. The method was then applied to *N*-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1.

2. Experimental

2.1. Materials

Man7/D1, Man7/D3, and asialo-triantennary (Tri) were obtained from Oxford Glycosystems (Abingdon, UK). Trisialylated triantennary (TriNA₃) and tetrasialylated tetraantennary (TetraNA₄) were purchased from Dionex (Sunnyvale, CA,

USA). Rat brain was purchased from Nippon SLC (Hamamatsu, Japan). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC) from *Bacillus cereus* was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Peptide-*N*-glycosidase F (PNGase F) was purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). SimplyBlue SafeStain was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

2.2. Release of *N*-linked oligosaccharides from rat brain Thy-1 by in-gel PNGase F digestion

PIPLC-treated GPI-anchored proteins were prepared from rat brain as reported previously [31]. Briefly, the homogenate of rat brain was defatted and solubilized with 2% Triton X-114 at 4 °C overnight [35,36]. After centrifugation, the supernatant was subjected to Triton X-114 phase-partitioning at 37 °C. Solubilized membrane proteins in the detergent phase were precipitated with cold acetone, and the precipitates were digested with PIPLC. After resubjecting the digest mixture to Triton X-114 phase-partitioning, PIPLC-treated soluble GPI-anchored proteins in aqueous phase were precipitated by adding cold acetone. These proteins were carboxyamidomethylated [30], and were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) (12.5%) followed by staining with SimplyBlue SafeStain.

In-gel PNGase F digestion of Thy-1 and extraction of *N*-linked oligosaccharides were performed as previously described

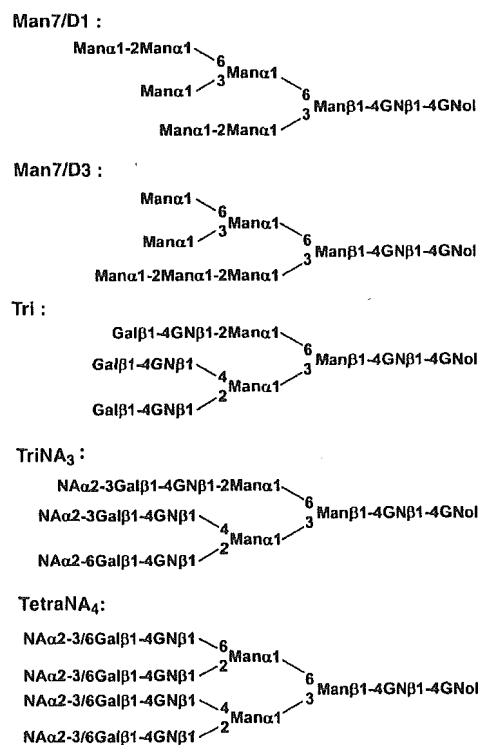


Fig. 1. Structures of major oligosaccharides and their abbreviations. Man: mannose, Gal: galactose, GN: *N*-acetylglucosamine, GNol: *N*-acetylglucosaminol, NA: *N*-acetylneuramic acid.