

(9) インフォームド・コンセント

被験者となることを求められた者が、研究者等から事前に臨床研究に関する十分な説明を受け、その臨床研究の意義、目的、方法を理解し、自由意思に基づいて与える、被験者となること及び試料等の取扱いに関する同意をいう。

(10) 未成年者

満20歳未満の者であって、婚姻をしたことがないものをいう。

(11) 行為能力

法律行為を単独で確定的に行うために必要な能力をいう。

第2 研究者等の責務等

1 研究者等の責務等

(1) 被験者の生命、健康、プライバシー及び尊厳を守ることは、臨床研究に携わる研究者等の責務である。

(2) 研究責任者は、被験者に対する説明の内容、同意の確認方法、臨床研究に伴う補償の有無（臨床研究に伴う補償がある場合にあっては、当該補償の内容を含む。第4の1の（1）において同じ。）その他のインフォームド・コンセントの手続に必要な事項を臨床研究計画に記載しなければならない。

<細則>

臨床研究計画書に記載すべき事項は、一般的に以下のとおりとするが、臨床研究の内容に応じて変更できる。

- ・ 被験者の選定方針
- ・ 当該臨床研究の意義、目的、方法及び期間、当該臨床研究に参加することにより期待される利益及び起こりうる危険並びに必然的に伴う不快な状態、当該臨床研究終了後の対応、当該臨床研究に係る個人情報の保護の方法（被験者を特定できる場合の取扱いを含む。）
- ・ 共同臨床研究機関の名称
- ・ 研究者等の氏名
- ・ インフォームド・コンセントのための手続
- ・ インフォームド・コンセントを受けるための説明事項及び同意文書
- ・ 当該臨床研究に係る資金源、起こりうる利害の衝突及び研究者等の関連組織との関わり
- ・ 当該臨床研究に伴う補償の有無（当該臨床研究に伴う補償がある場合にあっては、当該補償の内容を含む。）

【被験者からインフォームド・コンセントを受けることが困難な場合】

- ・ 当該臨床研究の重要性、被験者の当該臨床研究への参加が当該臨床研究を実施するに当たり必要不可欠な理由及び代諾者等の選定方針

(3) 研究者等は、臨床研究を実施する場合には、被験者に対し、当該臨床研究の実施に関し必要な事項について十分な説明を行い、文書でインフォームド・コンセントを受けなければならない。

<細則>

研究者等ごとに同意文書を受理しなければならないわけではなく、研究責任者が代表で受理する等、被験者ごとに一つの同意文書を受理することで対応可能である。

(4) 研究責任者は、臨床研究に伴う危険が予測され、安全性を十分に確保できると判断できない場合には、原則として当該臨床研究を実施してはならない。

<細則>

1. 研究責任者は、臨床研究を終了するまでの間、危険の予測や安全性の確保に必要な情報について、把握しておかなければならない。
2. 研究責任者は、臨床研究を実施する場合には、当該臨床研究の安全性を十分確保することが特に重要である。

- (5) 研究責任者は、臨床研究を実施し、又は継続するに当たり、臨床研究機関の長の許可を受けなければならない。

<細則>

1. 「臨床研究の継続」には、臨床研究を何らかの理由により中止し、再開する場合が含まれる。
2. 「臨床研究機関」の長とは、例えば、以下のとおりである。
 - ・病院の場合は、病院長
 - ・保健所の場合は、保健所長
 - ・企業等の研究所の場合は、研究所長
3. 臨床研究機関が小規模であること等により研究責任者と臨床研究機関の長が同一人物にならざるを得ない場合には、研究責任者は、共同臨床研究機関、公益法人、学会等に設置された倫理審査委員会に審査を依頼する等により、臨床研究における倫理性に十分配慮した上で実施しなければならない。

- (6) 研究責任者は、臨床研究計画において、臨床研究の実施計画及び作業内容を明示しなければならない。

- (7) 研究責任者は、臨床研究を適正に実行するために必要な専門的知識及び臨床経験が十分にある者でなければならない。

<細則>

健康に影響を与えるような行為を伴う人を対象とする臨床研究（いわゆる介入研究）を行う場合には、臨床経験が十分にある医師による適切な助言を得なければならない。ただし、臨床経験が十分にある医師が当該臨床研究に参加している場合には、この限りではない。

- (8) 研究者等は、臨床研究を実施するに当たっては、一般的に受け入れられた科学的原則に従い、科学的文献その他科学に関連する情報源及び十分な実験に基づかなければならない。

- (9) 研究者等は、環境に影響を及ぼすおそれのある臨床研究を実施する場合又は臨床研究の実施に当たり動物を使用する場合には、十分な配慮をしなければならない。

- (10) 研究責任者は、臨床研究機関の長に対し、重篤な有害事象その他の臨床研究の適正性及び信頼性を確保するための調査に必要な情報を報告しなければならない。

- (11) 研究責任者は、他の臨床研究機関と共同で臨床研究を実施する場合には、当該他の臨床研究機関の研究責任者に対し、臨床研究に起因する重篤な有害事象を報告しなければならない。

- (12) 研究責任者は、臨床研究により期待される利益よりも起こりうる危険が高いと判断される場合又は臨床研究により十分な成果が得られた場合には、当該臨床研究を中止し、又は終了しなければならない。

<細則>

1. 研究責任者は、臨床研究を終了するまでの間、臨床研究に関する国内外における学会発表、論文発表等の情報（以下「発表情報等」という。）について把握しておくとともに、把握した当該発表情報等について、臨床研究機関の長に対し、報告することが望ましい。
2. 研究責任者は、他の臨床研究機関と共同で臨床研究を実施する場合には、当該他の臨床研究機関の研究責任者に対し、把握した発表情報等について報告することが望ましい。

3. 研究責任者は、臨床研究を中止し、又は終了した場合には、その旨を臨床研究機関の長へ報告しなければならない。この場合において、研究責任者は、臨床研究により期待される利益よりも起こりうる危険が高いと判断される場合等緊急性の高い理由により当該臨床研究を中止した場合については、遅滞なく、その旨を臨床研究機関の長へ報告しなければならない。

(13) 研究責任者は、臨床研究を実施するに当たり、被験者の個人情報の保護のために必要な措置を講じなければならない。

<細則>

研究責任者は、臨床研究機関の長と協力しつつ、個人情報を厳重に管理する手続、設備、体制等を整備することが望ましい。

(14) 研究者等は、臨床研究の結果を公表する場合には、被験者を特定できないように行わなければならない。

(15) 研究責任者は、臨床研究終了後においても、被験者が当該臨床研究の結果により得られた最善の予防、診断及び治療を受けることができるよう努めなければならない。

2 臨床研究機関の長の責務等

(1) 倫理的配慮の周知

臨床研究機関の長は、当該臨床研究機関における臨床研究が、倫理的、法的又は社会的問題を引き起こすことがないように、研究者等（当該臨床研究機関の長を除く。）に対し、臨床研究を実施するに当たり、被験者の個人の尊厳及び人権を尊重し、個人情報を保護しなければならないことを周知徹底しなければならない。

(2) 倫理審査委員会の設置

臨床研究機関の長は、臨床研究計画がこの指針に適合しているか否かその他臨床研究に関し必要な事項の審査を行わせるため、倫理審査委員会を設置しなければならない。ただし、臨床研究機関が小規模であること等により当該臨床研究機関内に倫理審査委員会を設置できない場合には、共同臨床研究機関、公益法人、学会等に設置された倫理審査委員会に審査を依頼することをもってこれに代えることができる。

<細則>

臨床研究機関に既に設置されている類似の委員会をこの指針に適合する倫理審査委員会に再編成することで対応可能であり、その名称の如何は問わない。

(3) 倫理審査委員会への付議

臨床研究機関の長は、1（10）の規定により、研究責任者から臨床研究の適正性及び信頼性を確保するための調査に必要な情報が報告された場合には、倫理審査委員会に報告しなければならない。ただし、1（5）の規定により研究責任者から臨床研究の実施若しくは継続について許可を求められた場合又は1（10）の規定により研究責任者から重篤な有害事象が報告された場合には、臨床研究の実施又は継続の適否その他の臨床研究に関し必要な事項について、速やかに倫理審査委員会の意見を聴かななければならない。

<細則>

1. 臨床研究機関の長は、他の臨床研究機関と共同で臨床研究を実施する場合においても、臨床研究計画について、それぞれの臨床研究機関に設置された倫理審査委員会による承認を得ることを原則とする。
2. 臨床研究機関の長は、他の臨床研究機関と共同で臨床研究を実施する場合には、当該臨床研究の実施又は継続の適否について、倫理審査委員会への付議に当たり、共同臨床研究機関における臨床研究計画の承認状況、インフォームド・コンセントの取得状況等の情報も提供しなければならない。

(4) 臨床研究機関の長による許可

臨床研究機関の長は、倫理審査委員会の意見を尊重し、臨床研究の実施又は継続の許可又は不許可その他の臨床研究に関し必要な事項を決定しなければならない。この場合において、臨床研究機関の長は、倫理審査委員会が実施又は継続が適当でない旨の意見を述べた臨床研究については、その実施又は継続を許可してはならない。

<細則>

臨床研究機関の長は、公衆衛生上の危害の発生又は拡大を防止するため緊急に臨床研究を実施する必要があると判断する場合には、倫理審査委員会の意見を聴く前に許可を決定することができる。この場合において、臨床研究機関の長は、許可後遅滞なく倫理審査委員会の意見を聴くものとし、倫理審査委員会が臨床研究の変更又は中止の意見を述べた場合には、これを踏まえ、研究責任者に対し、当該臨床研究の変更又は中止を指示しなければならない。

(5) 臨床研究計画等の公開

臨床研究機関の長は、臨床研究計画及び臨床研究の成果を公開するよう努めるものとする。

第3 倫理審査委員会

- (1) 倫理審査委員会は、臨床研究機関の長から臨床研究計画がこの指針に適合しているか否かその他臨床研究に関し必要な事項について意見を求められた場合には、倫理的観点及び科学的観点から審査し、文書により意見を述べなければならない。
- (2) 倫理審査委員会は、学際的かつ多元的な視点から、様々な立場からの委員によって、公正かつ中立的な審査を行えるよう、適切に構成され、かつ、運営されなければならない。

<細則>

1. 倫理審査委員会は、医学・医療の専門家等自然科学の有識者、法律学の専門家等人文・社会科学の有識者及び一般の立場を代表する者から構成され、かつ、外部委員を含まなければならない。また、男女両性で構成されなければならない。
 2. 審議又は採決の際には、自然科学分野だけではなく、人文・社会科学分野又は一般の立場を代表する委員が1名以上出席していなければならない。
 3. 臨床研究機関の長など審査対象となる臨床研究に携わる者は、当該臨床研究に関する審議又は採決に参加してはならない。ただし、倫理審査委員会の求めに応じて、会議に出席し、説明することはできる。
- (3) 倫理審査委員会の委員は、職務上知り得た情報を正当な理由なく漏らしてはならない。その職を退いた後も同様とする。
 - (4) 倫理審査委員会は、実施されている、又は終了した臨床研究について、その適正性及び信頼性を確保するための調査を行うことができる。

第4 インフォームド・コンセント

<細則>

被験者又は代諾者等に対する説明事項は、一般的に以下のとおりとするが、臨床研究の内容に応じて変更できる。

- ・ 当該臨床研究への参加は任意であること
- ・ 当該臨床研究への参加に同意しないことをもって不利益な対応を受けないこと
- ・ 被験者又は代諾者等は、自らが与えたインフォームド・コンセントについて、いつでも不利益を受けることなく撤回することができること
- ・ 被験者として選定された理由
- ・ 当該臨床研究の意義、目的、方法及び期間
- ・ 研究者等の氏名及び職名
- ・ 予測される当該臨床研究の結果、当該臨床研究に参加することにより期待される利益及び起こりうる危険並びに必然的に伴う不快な状態、当該臨床研究終了後の対応
- ・ 被験者及び代諾者等の希望により、他の被験者の個人情報保護や当該臨床研究の独創性の確保に支障がない範囲内で、当該臨床研究計画及び当該臨床研究の方法についての資料を入手又は閲覧することができること
- ・ 個人情報の取扱い、提供先の機関名、提供先における利用目的が妥当であること等について倫理審査委員会で審査した上で、当該臨床研究の結果を他の機関へ提供する可能性があること
- ・ 当該臨床研究の成果により特許権等が生み出される可能性があること及び特許権等が生み出された場合の帰属先
- ・ 被験者を特定できないようにした上で、当該臨床研究の成果が公表される可能性があること
- ・ 当該臨床研究に係る資金源、起こりうる利害の衝突及び研究者等の関連組織との関わり
- ・ 当該臨床研究に伴う補償の有無（当該臨床研究に伴う補償がある場合にあっては、当該補償の内容を含む。）
- ・ 問い合わせ、苦情等の窓口の連絡先等に関する情報

【被験者からインフォームド・コンセントを受けることが困難な場合】

- ・ 当該臨床研究の重要性及び被験者の当該臨床研究への参加が当該臨床研究を実施するに当たり必要不可欠な理由

1 被験者からインフォームド・コンセントを受ける手続

- (1) 研究者等は、臨床研究を実施する場合には、被験者に対し、当該臨床研究の目的、方法及び資金源、起こりうる利害の衝突、研究者等の関連組織との関わり、当該臨床研究に参加することにより期待される利益及び起こりうる危険、必然的に伴う不快な状態、当該臨床研究終了後の対応、臨床研究に伴う補償の有無その他必要な事項について十分な説明を行わなければならない。
- (2) 研究者等は、被験者が経済上又は医学上の理由等により不利な立場にある場合には、特に当該被験者の自由意思の確保に十分配慮しなければならない。
- (3) 研究者等は、被験者が(1)の規定により説明した内容を理解したことを確認した上で、自由意思によるインフォームド・コンセントを文書で受けなければならない。
- (4) 研究者等は、被験者に対し、当該被験者が与えたインフォームド・コンセントについて、いつでも不利益を受けることなく撤回する権利を有することを説明しなければならない。

<細則>

研究者等は、被験者に対し、インフォームド・コンセントの撤回について、文書で行うよう説明することが望ましい。

2 代諾者等からインフォームド・コンセントを受ける手続

<細則>

1. 代諾者等からインフォームド・コンセントを受けることができる場合及びその取扱いは、以下のとおりとし、いずれの場合も、研究責任者は、当該臨床研究の重要性、被験者の当該臨床研究への参加が当該臨床研究を実施するに当たり必要不可欠な理由及び代諾者等の選定方針を臨床研究計画書に記載し、当該臨床研究計画書について倫理審査委員会による承認及び臨床研究機関の長による許可を受けなければならない。
 - ・ 被験者が疾病等何らかの理由により有効なインフォームド・コンセントを与えることができないと客観的に判断される場合
 - ・ 未成年者の場合。ただし、この場合においても、研究者等は、被験者にわかりやすい言葉で十分な説明を行い、理解が得られるよう努めなければならない。また、被験者が16歳以上の場合には、代諾者等とともに、被験者からのインフォームド・コンセントも受けなければならない。
【被験者が生存している段階にインフォームド・コンセントを受けることができない場合】
 - ・ 被験者の生前における明示的な意思に反していない場合
 2. 研究責任者は、一般的には、被験者の家族構成や置かれている状況等を勘案して、以下に定める者の中から被験者の意思及び利益を代弁できると考えられる者を選定することを基本とし、臨床研究計画書に代諾者等の選定方針を記載しなければならない。
 - ・ 任意後見人、親権者、成年後見人、未成年後見人、保佐人及び補助人が定まっているときはその者
 - ・ 被験者の配偶者、成人の子、父母、成人の兄弟姉妹若しくは孫、祖父母、同居の親族又はそれらの近親者に準ずると考えられる者
 3. 研究責任者は、一般的には、死亡した被験者の家族構成や置かれていた状況、慣習等を勘案して、以下に定める者の中から被験者の生前の意思を代弁できると考えられる者を代諾者として選定することを基本とし、臨床研究計画書に代諾者等の選定方針を記載しなければならない。
 - ・ 死亡した被験者の配偶者、成人の子、父母、成人の兄弟姉妹若しくは孫、祖父母、同居の親族又はそれらの近親者に準ずると考えられる者
- (1) 研究者等は、被験者からインフォームド・コンセントを受けることが困難な場合には、当該被験者について臨床研究を実施することが必要不可欠であることについて、倫理審査委員会の承認を得て、臨床研究機関の長の許可を受けたときに限り、代諾者等（当該被験者の法定代理人等被験者の意思及び利益を代弁できると考えられる者をいう。）からインフォームド・コンセントを受けることができる。
- (2) 研究者等は、未成年者その他の行為能力がないとみられる被験者が臨床研究への参加についての決定を理解できる場合には、代諾者等からインフォームド・コンセントを受けるとともに、当該被験者の理解を得なければならない。

第5 細則

この指針に定めるもののほか、この指針の施行に関し必要な事項は、別に定める。

第6 見直し

この指針は、必要に応じ、又は施行後5年を目途としてその全般に関して検討を加えた上で、見直しを行うものとする。

第7 施行期日

この指針は、平成15年7月30日から施行する。

[トップへ](#)

[戻る](#)

論点メモ

I. 議論の前提

1. 平成14年度研究における検討結果について

検討の対象

マウスの繊維芽由来の細胞をフィーダー細胞として利用する培養皮膚

検討結果

指針「3. 3 インフォームド・コンセントの方法及び内容」、「5. 1 移植患者 (1)、(5)、(7)」、「5. 4 移植患者の記録」、「6. 1. 2 感染症発生時の報告」について当該移植に該当する箇所について、適用することとし、他については適用しないこととする。移植の実施に当たっては、当該移植に該当する箇所について、予め研究計画書の中で規定する必要がある。また、移植の実施に当たっては「臨床研究に関する倫理指針」(厚生労働省告示第255号)を厳守すること。

- (1) 皮膚の培養に使用する細胞のワーキングセルバンクについて、指針の別添1のうちからマイコプラズマ属に関する検査等、適切なものをあらかじめ選択し、スクリーニング検査を含めた品質管理を実施する。移植の実施に当たっては、品質管理の具体的方法等について、予め研究計画書の中で規定する必要がある。
- (2) 最終培養製品について、フィーダー細胞が存在するか否かの確認試験を実施する。
- (3) 最終製品の試料を冷凍保存する。

備考

米国における Epicel (3T3-J2 による) の規制状況を念頭に置いて議論を行っている。

2. 厚生労働省の他の動き

(株) ジャパンティッシュエンジニアリング (J-TEC)

培養皮膚について、薬事法承認を得るため現在治験中である。(医薬食品局審査管理課)

ヒト幹細胞等を用いた臨床応用の在り方に関する専門委員会

現在検討中であるが、少なくとも、数年内に「ヒト肝細胞を用いた臨床研究に関する倫理指針」策定される予定である。(健康局疾病対策課)

II. 今年度の論点

1. 共培養細胞の品質管理の問題
2. インフォームド・コンセント
3. 資料の保管状況
4. 患者の追跡調査
5. 対象組織の範囲

メールタイトル：国内における異種細胞との共培養による再生医療の臨床応用の状況調査について

本文：
日本組織工学会会員 各位

この調査の依頼は、その意義について日本組織工学会長の上田実先生にご理解いただき、そのご許可を得た上で送付致しております。

年明け早々にご協力をお願い致しまして大変恐縮ですが、何卒ご協力の程、宜しくお願い申し上げます。

本特別研究班のこれまでの研究内容は、次のとおりです。

－平成13年度－

公衆衛生学的な見地から、異種移植に関係する感染症拡大に関する問題を扱う指針（「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」）を作成致しました。この指針は、厚生労働省により、平成14年7月9日付け厚生労働省医政局研究開発振興課長通知として周知されました。

－平成14年度－

本指針の適用対象となる「異種細胞との共培養による培養皮膚」について、公衆衛生上の観点から、その具体的な製造方法、使用の実態等を調査した上で、指針に照らし、異種移植の一つとして対策を検討致しました。

【調査へのご協力をお願い】

平成15年度におきましては、我が国における異種細胞との共培養により培養された再生組織の臨床応用について、網羅的に調査するとともに、再生医療分野において、異種移植指針をどのように適用すべきであるかについて具体的に検討することとしております。

つきましては、異種細胞を用いた再生医療研究の実施の調査に関してご回答いただき、別添の調査票を1月20日（火）までに下記の宛先（事務局：鎌田）まで電子媒体又は書面にて返送いただければ幸いに存じます。

なお、異種細胞を用いた再生医療研究を実施しておられない場合につきましても、調査票にて「無し」とご回答いただけると幸いに存じます。

内容に関してご質問・ご不明な点等ございましたら、下記照会先（国立感染症研究所：神田）までご照会ください。

【調査結果について】

本研究班においては、この調査の集計・検討結果を施設名も含め、報告書として取りまとめると共に国立感染症研究所のホームページ上で公開することを予定しております。

それでは、御多忙のところ大変恐縮ですが、何卒ご協力いただきますようお願い申し上げます。

厚生労働科学研究研究費補助金
厚生労働科学特別研究事業
「異種移植の実施に関する実態調査及び安全確保に関する研究」
主任研究者 吉倉 廣（国立感染症研究所所長）

【回答の返送先】

鎌田 貴子（日本組織工学会 事務局）
住所：〒650-0033 神戸市中央区江戸町93 栄光ビル2F
プロアクティブ・コンベンション株式会社 内
E-mail: jste@pac.ne.jp
Tel: 078-334-6873 Fax: 078-334-6662

【照会先】

神田 忠仁（国立感染症研究所 遺伝子解析室室長）
住所：〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
E-mail: kanda@nih.go.jp
Tel: 03-5285-1111(ex 2524) Fax: 03-5285-1166

国内における異種細胞との共培養による
再生医療の臨床応用の状況調査について 回答状況

調査項目	件数	率
調査件数 (会員数) *不達もの除く	545件 (545名)	
有効回答施設数	64件	
有効回答会員数	93名	17%
異種による再生医療の実 施について 「有り」と回答した		
・施設数	8件	
・会員数	21名	3.8% (/会員数) 22.6% (/回答会員数)

共培養に使われている 3T3 細胞

1. 3T3-Swiss albino (Green H が直接分与)

由来 : Swiss mouse albino embryo

Todaro GJ and Green H: J. Cell Biol. 17, 299-313, 1963

約 3 倍体。J2 株は、この細胞の subclone と思われるが、文献で完全に追跡できない。Epicel の製造に使われている。

使用施設 : 名古屋大学 (皮膚、角膜)、聖マリアンナ医科大学 (皮膚)、及び新潟大学歯学総合病院 (口腔粘膜)。

2. 3T3-Swiss albino (大日本製薬で販売。ATCC CCL-92)

J2 株とは異なる可能性あり。

使用施設 : 東京女子医科大学形成外科 (表皮)

3. NIH3T3 (ATCC CRL-1658)

由来 : Swiss mouse embryo

Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ: J. Virol. 4, 549-553

2 倍体

使用施設 : 大阪大学大学院医学系研究科 (角膜、口腔粘膜)

4. NIH3T3-3-4 (理研細胞バンクで販売。RCB1862)

NIH3T3 の subclone (理研で分離)

使用施設 : 東京大学医学部附属病院ティッシュ・エンジニアリング部 (角膜)、京都府立医科大学眼科 (角膜、口腔粘膜)

参考

3T3-L1 (ATCC Cl-173) は、3T3-Swiss albino の subclone

BALB/3T3 (ATCC CCL-163) は、BALB/c mouse embryo 由来。樹立は Aaronson and Todaro

CONFIDENTIAL

**CHARACTERIZATION OF SWISS MOUSE EMBRYO 3T3 CELL BANK USED
IN EPICEL™ AUTOGRAFT CULTIVATION**

Testing of the 3T3 Master cell bank and Master Working cell bank were carried out by Microbiological Associates Inc. (now Bioreliance) following the requirements in FDA's Points to Consider in the characterization of a cell substrate for production of a biological material.

Master Cell Bank TestingIsoenzyme Analysis

The identity of a species of origin of a cell line can be determined on the basis of the electrophoretic mobilities and banding patterns of the isoenzymes of a number of intracellular enzymes including lactate dehydrogenase (LD), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), malate dehydrogenase (MD), nucleoside phosphorylase (NP), and peptidase B (PepB). Cells are burst and the proteins recovered run on an electrophoresis gel to determine the banding pattern. The migration distances for each isoenzyme band are determined and compared to a reference table with standard migration distances for different species. The results obtained on the cells from the Master cell bank were consistent with the expected species of origin for the test article (i.e., mouse).

Bacterial and Fungal Contaminants

The direct inoculation method used for this testing meets or exceeds the USP 23 and/or 21 CFR 610.12 requirements for sterility testing. Cells are lysed and lysate inoculated into fluid thioglycollate broth and soybean-casein digest broth (as required by the sterility test, 21CFR 610.12), pre-reduced peptone yeast glucose (PYG) medium (to detect anaerobic contaminants), and Sabouraud-dextrose agar (to detect fungal contaminants). The test article showed no

CONFIDENTIAL

evidence of fungal or bacterial contamination in any of the culture conditions during the observation period.

Mycoplasma

Mycoplasma testing was performed using a large sample volume and exceeds recommendations in *the Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals* (CBER 1993). This assay is designed to detect the presence of agar-cultivable and non-cultivable mycoplasma species under aerobic and anaerobic growth conditions. For agar-cultivable mycoplasma, a lysate of the test article was inoculated onto Type A and Type B agar. For amplification of low level organisms, lysate material was inoculated into broth culture followed by subculture onto agar plates on days three, seven, and fourteen. Under these conditions, the test article was negative for agar-cultivable mycoplasma. For detection of non-cultivable mycoplasma, the test article was inoculated directly onto cultures of Vero cells. After incubation for three to five days, the cultures were stained with Hoechst bisbenzimid stain and examined by ultraviolet microscopy. All wells of Vero cells inoculated with the test article were negative for the presence of mycoplasma.

In Vitro Assay for Viral Contaminants

The *in vitro* assay employs three indicator cell lines (MRC-5, human diploid lung cells; Vero, African green monkey kidney cells; and NIH/3T3, Swiss mouse embryo cells) to screen for potential viral contaminants that may be present in the test article. The indicator cells are inoculated with a low speed supernatant collected from a thawed cell lysate, and observed at least three times per week for the appearance of cytopathic effects (CPE). In addition, indicator cell culture supernatants were tested for hemagglutination (HA) and hemadsorption (HAD) using chicken, guinea pig, and rhesus monkey erythrocytes at 4°C and 36°C. No cytopathic effects, hemadsorption, or hemagglutination was observed in any of the indicator cell cultures inoculated with the test article.

CONFIDENTIAL

Test for the Presence of Inapparent Viruses

Since inapparent (latent) viruses may not always be detected by inoculating a battery of indicator cells and observing cytopathic effects or other indications, an *in vivo* screening assay was performed on the test article. Aliquots of the test article were inoculated into both adult and suckling mice, guinea pigs, and embryonated hens' eggs. In all cases, multiple inoculation routes were employed to maximize detection of infectious agents. Adult mice and guinea pigs were observed for twenty eight days for clinical signs. Suckling mice were observed for fourteen days, after which all surviving mice were euthanized using cervical dislocation. A homogenate was prepared and inoculated into a new group of suckling mice by the same routes and in the same volumes as the original group. These newly inoculated mice were observed for a period of fourteen days. Embryonated eggs were inoculated via two routes, allantoic and yolk sac. Following allantoic inoculation, the eggs were checked for viability at 1 and 3 days post-inoculation, and fluid collected from the eggs was tested for hemagglutination at 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) and 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) using chicken, guinea pig and human type O erythrocytes. Pooled allantoic fluids were passaged to a new group of embryonated eggs and observed and tested in the same way. Following yolk sac inoculation, eggs were checked for viability at 1 and 10 days post-inoculation. At 10 days, pooled yolk sacs were passaged into a new group of embryonated eggs and were checked for viability at 1, 2 and 10 days post-inoculation. All adult and suckling mice, and guinea pigs inoculated with the test article appeared normal and healthy during the observation period. All hens' eggs inoculated via the allantoic or yolk sac routes were viable and fluids were negative for hemagglutination. No evidence of viral contamination was observed due to the test article.

Presence of Murine Specific Adventitious Agents

The Mouse Antibody Production test determines whether any of sixteen murine specific adventitious agents were present. Viral antibody free mice were inoculated with the test article via multiple routes to maximize the potential immune response in the animals.

CONFIDENTIAL

Plasma or serum from one group of mice was collected within 10 days of inoculation and tested for lactate dehydrogenase (LDH) activity; elevated levels of this enzyme are indicative of the presence of lactic dehydrogenase virus (LDV). This same group was subsequently inoculated with a known lethal strain of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), and monitored for morbidity and mortality for up to 3 weeks. Animals would be protected from this lethal challenge only if antibody to this virus is present. The other groups of mice were bled no sooner than 28 days post-inoculation and their serum assayed by ELISA, Hemagglutination Inhibition (HI) or Indirect Fluorescent Antibody (IFA) assays for the presence of antibody to known murine viruses. All sera from animals inoculated with the test article were negative for the presence of antibody to Ectromelia, GDVII, Lymphocytic Choriomeningitis (LCM), Hantaan Virus, Minute Virus of Mice (MVM), Mouse Adenovirus, Mouse Hepatitis Virus (MHV), Pneumonia Virus of Mice (PVM), Polyoma, Reovirus Type 3, Epizootic Diarrhea of Infant Mice (EDIM), Mouse Salivary Gland Virus (Mouse Cytomegalovirus - CMV), K, Mouse Thymic Virus (MTV) and Sendai viruses as determined by ELISA, IFA, or HI. All plasma from animals tested for lactate dehydrogenase activity showed normal levels except for LDV inoculated control animals, which showed elevated levels of LDH activity. All animals challenged with LCM virus died within 10 days of challenge, indicating that they were not protected by antibody to LCMV produced in response to the original test inoculum. Based on the data obtained in the assays performed, the test was shown to be free of all of the 16 murine viruses for which it was examined.

Presence of Bovine Viruses

An *in vitro* assay was performed to determine whether the cells were contaminated with any of five bovine viruses. Indicator cells specific for these viruses, bovine turbinate cells, were inoculated with cell lysate prepared from the test article and cultured for a period of 14 days. During this time, all cultures were monitored for cytopathic effect (CPE). Any cultures exhibiting CPE were harvested and fixed when approximately 50% of the monolayer was involved. All remaining cultures were harvested and fixed after the 14 day incubation. The cells were then examined by fluorescent antibody staining

CONFIDENTIAL

techniques for the following bovine specific viruses: Bovine Viral Diarrhea virus (BVD), Bovine Adenovirus Type 3 (BAV3), Bovine Parvovirus (BPV), Infectious Bovine Rhinotracheitis virus (IBR), and Bovine Parainfluenza Virus Type 3 (PI3). None of the cultures inoculated with the test article exhibited CPE. Fixed cells did not exhibit fluorescence when tested with antisera specific for the 5 viruses used in this analysis. Based on these data, the test article was determined to be free of the 5 specific bovine viruses for which it was examined.

Retrovirology: Presence of Xenotropic Murine Retrovirus

The extended S⁺L⁻ focus assay was used to test the cells for the presence of infectious xenotropic retrovirus. The development of foci in the mink S⁺L⁻ cells is indicative of the presence of xenotropic retrovirus contamination. The test article was inoculated directly onto mink S⁺L⁻ cells as well as onto mink lung cells (extended portion) for amplification of potential low level contaminants. After 2 passages on the mink cells, culture fluids were harvested and assayed in the S⁺L⁻ focus assay. No foci were observed on either the direct or extended portions of this assay for cultures inoculated with the test article. Based on these data, the test article was found to be negative for xenotropic murine retrovirus.

Presence of Ecotropic Murine Retrovirus

The extended XC plaque assay was used to test the cells for the presence of infectious murine ecotropic retrovirus (both N-tropic and B-tropic). The test article was inoculated onto SC-1 cells for both the direct and extended portions of the assay. The extended portion is used to amplify potential low level contaminants. In the direct portion, the cultures were incubated for 5-6 days, irradiated, and overlaid with XC cells. In the extended portion, the cells were passaged twice, after which the culture fluids were inoculated onto fresh SC-1 cells and processed as in the direct assay. No plaques were observed in either the direct or extended portions of the assay for cultures inoculated with the test article. Based on these data, the test article was found to be negative for murine retrovirus.

CONFIDENTIAL

Presence of Viral-like Particles

Cells are examined by transmission electron microscopy (TEM) for the presence of virus-like particles. Cells are pelleted and fixed with Trump's fixative. Thin sections of the cell pellet are cut, mounted, and stained with 5% methanolic uranyl acetate and Reynold's lead citrate. The cell types are characterized via a morphological examination. Two hundred test article cells are examined for any particles with a virus-like morphology. The number of viral particles are tabulated and the morphology of each particle examined to determine whether it is A-, B-, C-, D-, and R-type retrovirus. Examination of the fixed test article cells revealed no identifiable virus-like or retrovirus-like particles.

Presence of Retrovirus

A lysate prepared from the test article was assayed for retroviral-derived reverse transcriptase activity as an indicator for potential retrovirus contamination. The test article was incubated in reaction mixtures containing the appropriate concentrations of Mg^{++} or Mn^{++} to differentiate between C type and D type retrovirus reverse transcriptase. All reaction mixtures containing the test article (diluted or undiluted) incorporated less than 500 cpm of 3H -thymidine above background. The diluted test article (1:2) did not inhibit 3H -thymidine incorporation in a control mixture containing Rauscher Murine Leukemia Virus (R-MuLV). Based on these data, the test article showed no evidence of the presence of type C or type D retrovirus reverse transcriptase activity.

Tumorigenicity

The ability of the test article cells to form colonies in soft agar was assessed as an indicator of possible transformation and the potential ability for the cell line to form tumors in animals. A single-cell suspension of test article cells were inoculated in a soft agar overlay of a hard agar base. Cultures were monitored for 28 days for the formation of colonies of greater than 10 cells. No colonies formed in cultures inoculated with the test article cells.

CONFIDENTIAL

Master Working Cell Bank Testing

Bacterial and Fungal Contaminants

The direct inoculation method used for this testing meets or exceeds the USP 23 and/or 21 CFR 610.12 requirements for sterility testing. Cells are lysed and lysate inoculated into fluid thioglycollate broth and soybean-casein digest broth (as required by the sterility test, 21CFR 610.12), pre-reduced peptone yeast glucose (PYG) medium (to detect anaerobic contaminants), and Sabouraud-dextrose agar (to detect fungal contaminants). The test article showed no evidence of fungal or bacterial contamination in any of the culture conditions during the observation period.

Mycoplasma

Mycoplasma testing was performed using a large sample volume and exceeds recommendations in *the Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals* (CBER 1993). This assay is designed to detect the presence of agar-cultivable and non-cultivable mycoplasma species under aerobic and anaerobic growth conditions. For agar-cultivable mycoplasma, a lysate of the test article was inoculated onto Type A and Type B agar. For amplification of low level organisms, lysate material was inoculated into broth culture followed by subculture onto agar plates on days three, seven, and fourteen. Under these conditions, the test article was negative for agar-cultivable mycoplasma. For detection of non-cultivable mycoplasma, the test article was inoculated directly onto cultures of Vero cells. After incubation for three to five days, the cultures were stained with Hoechst bisbenzimid stain and examined by ultraviolet microscopy. All wells of Vero cells inoculated with the test article were negative for the presence of mycoplasma.

CONFIDENTIAL

In Vitro Assay for Viral Contaminants

The *in vitro* assay employs three indicator cell lines (MRC-5, human diploid lung cells; Vero, African green monkey kidney cells; and NIH/3T3, Swiss mouse embryo cells) to screen for potential viral contaminants that may be present in the test article. The indicator cells are inoculated with a low speed supernatant collected from a thawed cell lysate, and observed at least three times per week for the appearance of cytopathic effects (CPE). In addition, indicator cell culture supernatants were tested for hemagglutination (HA) and hemadsorption (HAD) using chicken, guinea pig, and rhesus monkey erythrocytes at 4°C and 36°C. No cytopathic effects, hemadsorption, or hemagglutination was observed in any of the indicator cell cultures inoculated with the test article.

Test for the Presence of Inapparent Viruses

Since inapparent (latent) viruses may not always be detected by inoculating a battery of indicator cells and observing cytopathic effects or other indications, an *in vivo* screening assay was performed on the test article. Aliquots of the test article were inoculated into both adult and suckling mice, guinea pigs, and embryonated hens' eggs. In all cases, multiple inoculation routes were employed to maximize detection of infectious agents. Adult mice and guinea pigs were observed for twenty eight days for clinical signs. Suckling mice were observed for fourteen days, after which all surviving mice were euthanized using cervical dislocation. A homogenate was prepared and inoculated into a new group of suckling mice by the same routes and in the same volumes as the original group. These newly inoculated mice were observed for a period of fourteen days. Embryonated eggs were inoculated via two routes, allantoic and yolk sac. Following allantoic inoculation, the eggs were checked for viability at 1 and 3 days post-inoculation, and fluid collected from the eggs was tested for hemagglutination at 4°C (\pm 2°C) and 25°C (\pm 2°C) using chicken, guinea pig and human type O erythrocytes. Pooled allantoic fluids were passaged to a new group of embryonated eggs and observed and tested in the same way. Following yolk sac