

**CONFIDENTIAL**

---

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.

**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.

**Production Cell Bank Testing**

Production banks of 3T3 cells undergo raw material Quality Control testing prior to acceptance for use in the Epicel™ manufacturing process.

**Source**

Documentation accompanying each lot of Production 3T3 cells must specify that these cells were grown from the 3T3 Master Working Cell bank.

**Cell Number**

Documentation accompanying each lot of Production 3T3 cells must specify that there are  $\geq 1.4 \times 10^8$  cells/vial.

CONFIDENTIAL

---

### Bacterial and Fungal Contaminants

Sterility testing is performed in-house by GTR's Quality Control Department on 5% of each lot of Production 3T3s. The direct inoculation method used for this testing is done according to USP "Sterility Tests" <71>. Cells from each test vial are inoculated into and tryptic soy broth to test for the presence of aerobic and fungal contaminants and fluid thioglycollate medium to test for the presence of anaerobic contaminants. The tryptic soy broth is incubated for fourteen days and monitored for turbidity, which is an indicator of microbial growth. Because the fluid thioglycollate medium has a gel base and is thicker than tryptic soy broth, the inoculated 3T3s do not settle and the medium remains cloudy. Therefore, in accordance with USP, between days 3 and 5, 1 mL of the medium is withdrawn and directly inoculated into another bottle of fluid thioglycollate medium. This medium is then incubated for fourteen days and monitored for turbidity. The test article must show no evidence of fungal or bacterial contamination in any of the culture conditions during the observation period to be acceptable for use.

### Mycoplasma

Mycoplasma testing is performed using three vials of cells from each Production cell bank. For each vial, five flasks of cells are plated and grown in antibiotic-free medium. Cells are scraped from the flasks and the cells and supernatants pooled. Two aliquots from the pooled sample are sent to Bionique Testing Laboratory for mycoplasma testing in accordance with the procedure outlined 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. All samples must be negative for mycoplasma in order to be acceptable for use.

CONFIDENTIAL

---

***Irradiated Production 3T3 Testing***

Production 3T3 cells were tested for retroviral activation, as a result of the cells receiving a radiation dose of 6000 rads during the manufacturing process. An amp of Production 3T3 cells was thawed and irradiated in accordance with current manufacturing practices. The irradiated cells (either frozen or in monolayer culture) were sent to Bioreliance to undergo various retroviral tests.

**Retrovirology: Presence of Xenotropic Murine Retrovirus**

The extended S<sup>+</sup>L<sup>-</sup> focus assay was used to test the cells for the presence of infectious xenotropic retrovirus. The development of foci in the mink S<sup>+</sup>L<sup>-</sup> cells is indicative of the presence of xenotropic retrovirus contamination. The test article was inoculated directly onto mink S<sup>+</sup>L<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>L<sup>-</sup> 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  $Mn^{++}$  in order 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.

**End-Of-Production 3T3 Testing**

Testing was conducted on production 3T3s which had been grown several population doublings beyond the point at which they would be used in the Epicel™ process. An amp of Production 3T3 cells was thawed in accordance with the current manufacturing process and plated into culture using the medium which is used by Quality Control to

**CONFIDENTIAL**

---

grow 3T3 cells for raw material testing. The cells were sent to Bioreliance (tumorigenicity) and Applied Genetics Laboratory (karyology) for testing.

**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. The cultures were equivalent to that acceptable for negative control.

**Karyology**

The cells underwent karyological analysis to determine the number of chromosomes and to check for the presence of abnormalities. Cells are swollen, fixed onto slides, and stained with Giemsa stain. One hundred cells in metaphase were examined for chromosome count. Fifty of these metaphases were examined for cytogenetic aberrations. The types of chromosomal aberrations present were classified. Two chromosome aberrations were found with 2% cells aberrant. Cytogenetic analysis showed that the cells were of mouse origin. There was a wide variety of normal chromosomes and chromosomal rearrangements, as is consistent with a cell line. The modal chromosome number was 60 (range 47 to 128) and chromosomes 18 and Y were absent in all karyotypes. There results are consistent with the results of karyology on a sample of this cell line deposited with ATCC, which had a modal number of 68, no Y chromosomes, and very few cells with chromosome 18.

**Characterization of Epichel™ Final Product**

Characterization testing was conducted on three lots of Epichel™ final product. Because the final product was an intact sheet of cells which could not be disaggregated without damaging the cells, testing was performed on keratinocytes in culture prior to achieving

CONFIDENTIAL

---

confluence (formation of an intact sheet). Lots of Epichel™ were grown by Manufacturing in accordance with current practices. The 3T3s were removed from the culture flasks by washing and shaking with EDTA. The culture flasks with only keratinocyte colonies remaining were sent to Bioreliance (tumorigenicity) and Applied Genetics Laboratory of Genzyme Genetics (karyology) for testing.

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. Typically, a single-cell suspension of test article cells is inoculated in a soft agar overlay of a hard agar base. Because the sample consisted of keratinocyte colonies which did not easily disaggregate into single cells, the protocol was modified to include a baseline colony count of the agar plates at 24 hours. All cells in the entire plate were examined. If any aggregates greater than 10 cells were present at 24 hours, these were attributed to incomplete disaggregation, and the test was discontinued. Cultures were monitored for 28 days for the formation of colonies of greater than the original baseline. No colonies formed in cultures inoculated with the three lots of test article cells.


Karyology

Karyological analysis was conducted on cells to determine the number of chromosomes and check for the presence of abnormalities. Cells are swollen, fixed onto slides, and stained with Giemsa stain. Twenty metaphases were examined for chromosome count and three metaphases were karyotyped. In the one lot analyzed by Genzyme Genetics, the results showed a normal 46,XX karyotype consistent with the patient's known sex. There was no evidence of clinically significant numerical or structural chromosome abnormalities, although this method would not detect small rearrangements, microdeletions, and low level mosaicism. Karyotyping studies on the last two lots are on-going at this time at Applied Genetics Laboratory.

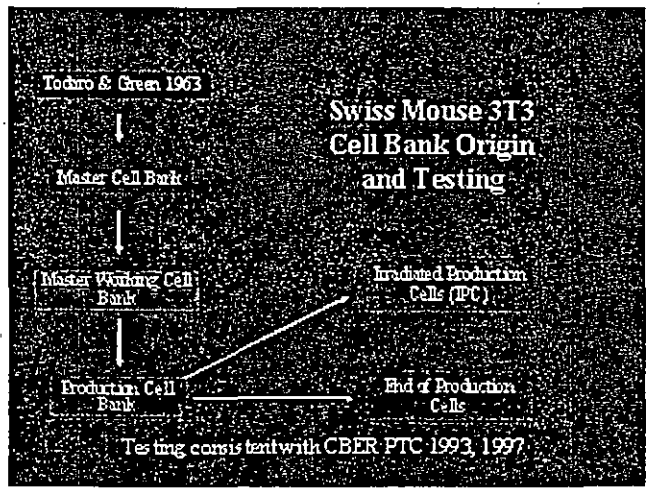
# Characterization of Swiss Mouse Embryo 3T3 Cell Bank used in Epicel™ Autograft Cultivation

Author: Bruce Wentworth

<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3581b1g/index.htm>



**Bruce M. Wentworth, Ph.D.**  
Genzyme Tissue Repair  
January, 2000



### 3T3 Master Cell Bank Cell Culture Authenticity

- ▶ Isoenzyme Analysis
  - Confirms Species of Origin

**Mouse**

### 3T3 Master Cell Bank Sterility Testing

- ▶ Bacterial and Fungal Contaminants
  - Direct Inoculation (21CFR 610.12)

**No Bacterial or Fungal Contaminants Detected**

### 3T3 Master Cell Bank Mycoplasma Testing

- ▶ Agar Isolation and Vero Cell Culture Assay (Hoechst Stain)

**Negative**

### 3T3 Master Cell Bank General Virology

- ▶ Presence of Viral contaminants
  - Inoculation and Observation of Indicator Cells

**No Adventitious Viral Contaminants**

- ▶ Presence of Inapparent Viruses
  - Inoculate into adult mice, guinea pigs, suckling mice and embryonated hens' eggs

**No Evidence of Contamination**

### 3T3 Master Cell Bank General Virology

- ▶ Presence of Murine Specific Adventitious Agents
  - Mouse Antibody Production (MAP) Test

**Free of All 16 Murine Viruses Tested**

- ▶ Presence of Bovine Viruses
  - Bovine Turbinate Cells Inoculated With Cell Lysate

**All Five Specific Bovine Viruses Not Detected**

### 3T3 Master Cell Bank Retrovirology

- ▶ Presence of Xenotropic Murine Retrovirus
  - Extended S+L Assay

**Negative**

- ▶ Presence of Ecotropic Murine Retroviruses
  - Extended XC Plaque Assay

**Negative**

### 3T3 Master Cell Bank Retrovirology

- ▶ Presence of Viral-Like Particles
  - Transmission Electron Microscopy

**No Identifiable Virus-Like Particles**

- ▶ Presence of Retrovirus
  - *In Vitro* Assay for Retroviral Derived Reverse Transcriptase Activity

**No Evidence of Type C or D RT Activity**

### 3T3 Master Cell Bank Tumorigenicity

- ▶ Growth of Mammalian Cells in Soft Agarose

**No Viable Colonies Formed**

### 3T3 Master Working Cell Bank Microbiology

- ▶ Bacterial and Fungal Contaminants
  - Direct Inoculation (21CFR 610.12)

**No Bacterial or Fungal Contaminants Detected**
- ▶ Mycoplasma
  - Agar Isolation and Vero Cell Culture Assay (Hoechst Stain)

**Negative**

### 3T3 Master Working Cell Bank Virology

- ▶ Presence of Viral contaminants
  - Inoculation and Observation of Indicator Cells

**No Adventitious Viral Contaminants**
- ▶ Presence of Inapparent Viruses
  - Inoculate into adult mice, guinea pigs, suckling mice and embryonated hens' eggs

**No Evidence of Contamination**



### 3T3 Master Working Cell Bank Tumorigenicity

- ▶ Growth of Mammalian Cells in Soft Agarose

**No Viable Colonies Formed**

### 3T3 Production Cell Bank Sterility Testing

- ▶ Bacterial and Fungal Contaminants

**No Growth**

- ▶ Mycoplasma

**Negative**

### Irradiated Production 3T3 Cell Retrovirology

- ▶ Presence of Xenotropic Murine Retrovirus
  - Extended S\*<sub>L</sub> Assay

**Negative for Murine Retrovirus**

- ▶ Presence of Ecotropic Murine Retroviruses
  - Extended XC Plaque Assay

**Negative for Murine Retrovirus**

- ▶ Presence of Retrovirus
  - *In Vitro* Assay for Retroviral Derived Reverse Transcriptase Activity

**No Evidence of Retroviral RT Detected**

### Irradiated Production 3T3 Cell General Virology

- ▶ Presence of Viral Like Particles
  - Transmission Electron Microscopy

**No Identifiable Virus Like Particles**

### 3T3 End-of-Production Cell Characterization

- ▶ Tumorigenicity
  - Growth of Mammalian Cells in Soft Agarose

**Equivalent to That Acceptable For Negative Control**

- ▶ Chromosome Analysis (Karyology)

**Mouse Origin Cell Line with Polyploidy**

### Characterization of End-of-Production Cell Bank

- ▶ Tumorigenicity
  - Growth of Mammalian Cells in Soft Agarose

**NEGATIVE**

- ▶ Chromosome Analysis (Karyology)  
Testing Underway. No Evidence of Numerical or Structural Chromosome Abnormalities  
Additional Results Pending

### Summary of 3T3 Cell Bank Characterization

- ▶ A well characterized cell bank in accordance with regulatory standards (PTC 1993 & 1997)
- ▶ Master cell bank established from single clone
- ▶ Quality established from master bank to production and end-of-production cells
- ▶ Master cell bank represents a cell reserve frozen-in-time

「再生医療分野における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」に基づく 3 T 3 J 2 株及び 3 T 3 N I H 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針

## 前書き

平成 13 年度厚生科学研究費厚生科学特別研究事業で策定された「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」（以下、「異種移植指針」という。）は、再生医療分野でフィーダー細胞として異種動物の細胞を使用する場合も適用範囲としているところである。同研究事業において平成 15 年度は中でも 3 T 3 J 2 株及び 3 T 3 N I H 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療を行う場合について、「異種移植指針」の適用条項について再検討を行い、それらの条項について必要な改正を行うべき検討を行った。本指針は、現場の利便を考え「異種移植指針」の適用条項について抜き出しものである。

また、本指針も異種移植そのものの有効性、倫理性等の確保及び移植患者における感染症一般の予防を目的とするものではないこと「異種移植指針」と同様である。そのため、臨床研究一般の指針である「臨床研究に関する倫理指針（平成 15 年 7 月 30 日医政発 730009 号）を併せて用いることが重要である。

## 1 総則

### 1.1 目的

公衆衛生的な観点から、異種移植に起因する未知の感染症に対して、感染及びその拡大を防止することを目的とする。

指針に示された方法以外の方法であって、公衆衛生上、指針に示された方法よりも感染症予防の観点から科学的に妥当なものがある場合には、その根拠を示した上で、その方法を採用することができる。

### 1.2 定義

#### 1.2.1 異種移植

(1) 本指針において、異種移植とは、次に掲げることをいう。

a ヒト以外の動物に由来する生きた細胞、組織又は臓器をヒトに移植、埋め込み又は注入すること。

b 体外において、ヒト以外の動物に由来する生きた細胞、組織又は臓器に接触したヒトの体液、細胞、組織又は臓器をヒトに移植、埋め込み又は注入すること（接触には、共培養による間接的な接触を含む。）。

(2) 従って、動物由来のものであっても、それ自身が生きていない物、例えば、心臓弁、インスリン、血清アルブミン等の材料又は薬剤をヒトに使用することは、異種移植に含めない。

#### 1.2.2 フィーダー細胞

ヒト由来の細胞を増殖させるために共培養される異種細胞をいう。

#### 1.2.3 培養組織

ヒトに移植するため、ヒト由来の細胞をフィーダー細胞との混合培養により増殖させた組織をいう。

#### 1. 2. 4 微生物学的監視

ドナー動物、移植患者及び医療従事者等に対して、血清学的検査等適切な方法を用いて、感染性病原体の感染の有無を継続的に調べることをいう。

#### 1. 2. 5 医学的記録

移植患者についての、異種移植実施前後における健康状態及び微生物学的監視の結果を記録したものをいう。

#### 1. 2. 6 マスターセル

実際のフィーダー細胞を作成するための元となる細胞をいう。

#### 1. 2. 6 ワーキングセル

マスターセル由来の、実際にフィーダー細胞を培養するために使用される培養された細胞をいう。

### 1. 3 基本原則

#### 1. 3. 1 異種移植を実施する前提

ヒトの細胞、組織又は臓器を患者に移植する同種移植は、既に臨床の場で定着しているが、その需要に対して供給がはるかに少ない。そのような問題を背景に、異種移植についての研究が進展してきたところである。

しかし、異種移植については、フィーダー細胞に由来する病原体の移植患者への感染及び伝播による公衆衛生学的な危険性を、現在の医学では完全には排除し得ないおそれがあるため、サーベイランス等感染症対策を十分に行うことができることが実施の前提となる。

#### 1. 3. 2 薬事法との関係

薬事法の対象となる場合には、これに従うこと。薬事法に規定されない部分等については、本指針を参照されたい。

#### 1. 3. 3 その他の指針

薬事法及び遺伝子治療臨床研究に関する指針の他、遵守すべき指針等がある場合、当然のことながらそれらに従うこと。

#### 1. 3. 4 個人情報の保護

異種移植に関係する者は、取り扱う際に知り得た移植患者に関する個人情報を漏らしてはならない。また、その職務を離れた後でも同様である。

### 1. 4 指針の見直し

本指針は、科学技術の進歩、フィーダー細胞等の取扱いに関する社会情勢の変化等を勘案して、必要に応じて適切な場で見直すことが必要である。

## 2. 培養組織

### 2. 1 確認試験

培養組織に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こと。

## 2. 2 試料の保存

培養組織の試料を30年間、冷凍保存すること。

## 3 インフォームド・コンセントの方法及び内容

### 3. 1 インフォームド・コンセントの方法

異種移植の実施にあたっては、予測される医療上の利益や危険性、移植患者の医学的記録や管理、個人情報の保護等について、ヘルシンキ宣言（2000年10月エジンバラ修正）及び本指針の趣旨を踏まえ、次項に示した内容を含めて、移植患者に文書を用いた適切な説明を行い、移植実施及び関連する事項について文書による同意を受けること。

### 3. 2 インフォームド・コンセントの内容

移植患者に対する説明事項のうち、異種動物由来感染症に関する事項として、少なくとも以下の事項を含めること。

- (1) フィーダー細胞に由来することが判明している病原体による感染の可能性。
- (2) 現在まで報告が無いものの、フィーダー細胞由来の未知の病原体の感染の可能性を理論的には否定出来ず、その症状や発病時期についても予測出来ないこと。
- (3) 上記病原体は、移植患者に接触する家族や性的交渉相手等体液に接触する可能性のある者に感染する可能性を完全には否定できないこと。
- (4) 移植患者に異種動物由来の感染がもしも成立すれば、例えば、無防備な性的交渉、授乳、同じ注射針を用いての薬の使用等血液又は体液への接触を伴う行為により他の人に感染させる可能性があること。また、移植患者又は接触者に原因不明の症状が見られた場合、移植実施施設の担当医に直ちに報告する必要があること。
- (5) 必要に応じて組織や血清を採取して検査を行う必要があること。
- (6) 採取された試料及び医学的記録は移植実施後30年間保管し、診療、研究及び感染症の原因究明の目的での使用に備えること。
- (7) 移植患者は、当該移植の感染症に関する公衆衛生上の安全性が確立する迄、移植後全血、血清、血球、骨髄液、さい帯血、臓器、組織、乳汁、卵子、精子、その他身体の部分についてヒトへの使用を目的として提供する場合は、感染のリスクについて医療従事者、被移植者等に伝えるとともに、その必要性和安全性について関係者と十分に検討した上でのみ提供し得ること。
- (8) 将来、出産する場合は、受胎から発育期間、出産及び授乳の際に、子供に異種動物由来感染症が生じることを否定できないこと。
- (9) 長期間の健康管理のために、移植患者は、住所、電話番号等の変更があった場合、必ず移植実施施設の担当医に連絡する必要があること。
- (10) 移植による感染が疑われる場合、死後、剖検を実施し、臓器等が採取・保存され、研究及び感染症の原因究明の目的で使用されること。また、剖検を実施する必要性を、家族に伝えておくこと。

(11) すべての医学的記録は、要請があった場合には関係する公衆衛生機関（厚生労働省、国立感染症研究所、保健所、関係する医療・研究機関）に開示する必要があること。ただし、移植患者のプライバシーは最大限守られること。

#### 4. フィーダー細胞

##### 4. 1 マスターセルの品質管理

各移植実施施設は、マスターセルについて別添1に掲げる品質管理を実施し、病原体に感染していないことを確認すること。

##### 4. 2 ワーキングセルの品質管理

ワーキングセルについても、必要な検査を行うこと。

##### 4. 3 継代培養

マスターセル及びワーキングセルの継代は最小限とし、細胞株の同一性を確認すること。

##### 4. 4 その他

その他、汚染等を防ぐための品質管理を厳重に行うこと。また、以上を全て研究計画書で規定すること。

#### 5. 移植患者

##### 5. 1 移植患者の微生物学的監視

一般に移植患者の移植後の微生物学的監視は、異種動物由来感染性病原体の一般への伝播及び遺伝子を介した伝播を監視する上で重要である。この微生物学的監視の実行と記録作製は移植実施施設の長の責務であり、移植患者の一生涯にわたって続けられなければならない。以下に、適切な監視方法を述べる。

(1) 共培養するフィーダー細胞又は培養組織にフィーダー細胞由来病原体の存在が判明した時又はそれが疑われた時には、移植した組織中に存在し得ることが判明した病原体の検索を、移植患者の血清、末梢単核球又は組織について移植後定期的に行わなければならない。微生物学的監視は、術直後にはより頻回（例えば術後2、4、6週間目）に行う必要があるが、その後臨床症状が認められなければ頻度を減らすことができる。対象とする異種動物由来ウイルスと同等のウイルスがヒトにも存在する場合、両者を区別する検査法を採用しなければならない。移植患者の免疫抑制状態によっては血清学的検査が信頼できないこともあり、共培養法など適切な検査法と組合せて実施することも考慮する。判定には、検査法の感度、特異性及び精度の考慮が必要である。

(2) 当該移植実施施設において、移植患者からの報告を受けることが可能な体制を整備しておくこと。報告を受ける体制の整備ができなくなる場合には、別の医療施設において実施するよう措置すること。なお、引き継ぐ医療施設は、検査及び試料の保存、施設内の感染対策等移植後の感染対策について移植実施施設と同等の対応を実施できる施設でなければならない。

##### 5. 2 移植患者等の記録

###### 5. 2. 1 記録の保存

移植実施施設の長は、次に掲げる記録を移植実施後30年間保存し、管理すること。これらの記録は必要に応じ、正確に相互照合ができるものでなければならない。系統的にデー

タを維持することは、有害事象が発生した際にその原因を疫学的に究明する上で役立つ。

(1) 当該移植のすべての過程を記した移植記録

責任者、共培養に用いた細胞と共培養に関する記録、調製施設、移植の日付と方法、移植患者とその臨床経過の要旨、培養及び移植手術に関与した医療従事者について記載すること。

5. 2. 2 保存施設の変更

何らかの理由により、移植実施施設において、前項に掲げる記録の保存ができなくなる場合には、別の医療施設において実施するよう措置すること。なお、引き継ぐ医療施設は、記録の保存に関して移植実施施設と同等の対応を実施できる施設でなければならない。

6. 感染症発生時の報告

異種動物由来感染症、同種移植で予期できない感染症又は公衆衛生学的に問題となり得ると思われる感染症が疑われる時には、診断及び適切な感染防御に務めるとともに、速やかに厚生労働省医政局研究開発振興課に報告すること。なお、同部署への報告のほか、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（平成10年法律第114号）において求められている報告が必要な場合は、別途同法に従った報告を行うこと。

## 3T3 細胞の品質管理

## I 定義

種細胞株：フィーダー細胞に用いる 3T3 細胞株。

マスター・セル・バンク：種細胞株を一定の培養条件下で最低限の継代数を経て増殖させ、複数のアンプルに分注したもの。

ワーキング・セル・バンク：マスター・セル・バンクの一個又は複数個のアンプルをプールして得た細胞浮遊液を一定条件下でさらに増殖させ、複数のアンプルに分注したもの。

## II 記録

種細胞株の由来、継代歴等に関する情報、マスター・セル・バンクの調製・保存方法及びその管理方法、製造用細胞バンクの調製・保存方法及びその管理方法を記載した記録を保存すること。

## III 試験

## A. マスター・セル・バンクの細胞に行う試験

1. 細胞の同定試験（アイソザイムやゲノム分析など）によって種細胞と同一であることを確認する。

2. 細菌・カビ・マイコプラズマ否定試験を行う。

3. ウイルス否定試験を行う。

(1)MRC-5(human diploid lung cells)、Vero(African green monkey kidney cells)等のインジケータ細胞に細胞溶解液を接種し、CPE の出現を観察する。さらに chicken、guinea pig、rhesus monkey の赤血球の凝集試験、吸着試験を行う。

(2)adult および suckling mice、guinea pig に細胞溶解液を接種し、adult mice と guinea pig は 28 日後、suckling mice は 14 日後に安楽殺して臓器を回収する。臓器のホモジネートを再度 suckling mice に接種し、14 日間観察



する。発育鶏卵の allantoic cavity に細胞溶解液を接種し、allantoic fluid の HA 試験 (chicken、guinea pig、人 O 型赤血球) を行う。発育鶏卵の yolk sac に細胞溶解液を接種し 10 日観察する。必要に応じ、さらに yolk sac で passage を繰り返す。

(3)Xenotropic マウスレトロウイルスの有無を延長 S+L- focus assay (mink S\*L cells) で、Ecotropic マウスレトロウイルスの有無を延長 XC plaque assay (SC-1 細胞) で調べる。細胞を透過型電子顕微鏡で観察し、レトロウイルス様粒子の有無を観察する。細胞溶解液の逆転写酵素活性を測定する。

(4)その他の感染性微生物の否定試験を行う。細胞溶解液を mouse に接種する。血清ないし血漿の lactic dehydrogenase 活性を測定し、高ければ lactic dehydrogenase virus の感染を疑う。細胞溶解液を接種した mouse に Lymphocytic Choriomeningitis Virus(LCMV)を接種する。抗体が無ければ感染で死亡する。細胞溶解液を接種した mouse から 28 日後に血清を回収し ELISA、HI、IndirectFA で既知の齧歯類ウイルスに対する抗体の有無を調べる。対象となるウイルスは Ectromelia、GDVII、LCMV、Hantaan Virus、Minute Virus of Mice、Mouse adenovirus、Mouse Hepatitis Virus、Pneumonia Virus of Mice、Polioma Virus、Repvirus Type3、Epizootic Diarrhea of Infant Mice、Mouse Salivary Gland Virus(Mouse Cytomegalovirus)、K Virus、Mouse Thymic Virus、Sendai Virus。

(5)培養にウシ血清を使う場合は、ウシウイルスの否定試験を行う。bovine turbinate cell をインジケータ細胞とし、細胞溶解液を接種後、14 日間 CPE を観察する。CPE が出現したら、細胞を固定し IndirectFA によってウイルス抗原を調べる。対象は Bovine Viral Diarrhea Virus、Bovine Adenovirus Type3、Bovine Parvovirus、Infectious Bovine Rhinotrachetist Virus、Bovine Parainfluenza Virus Type3。

4. 細胞に腫瘍原性の無いことを確認する。細胞を soft-agar medium で培養し、コロニー形成を調べる。

## B. ワーキングセルバンクの細胞に行う試験

1. 細菌・カビ・マイコプラズマ否定試験を行う。

2. ウイルス否定試験のうち、上記 (1)及び(2)を行う。

3. 細胞に腫瘍原性の無いことを確認する。

#### C. フィーダー細胞に行う試験

1. レトロウイルス活性化の有無を調べるため、放射線照射や IudR、BudR 等で処理したフィーダー細胞について、ウイルス否定試験のうち、上記 (3)を行う。

2. 培養組織を取り外した後に、培養器に残存するフィーダー細胞の染色体数と腫瘍原性につき（例えば寒天内コロニー形成能、単層増殖を維持しているかなど）検討する。

## 異種移植実施報告書 (厚生労働省医政局研究開発振興課宛)

平成 年 月 日

報告責任者 (移植実施施設長)

氏名 \_\_\_\_\_ (職印)

## a. 移植実施施設

名称	
所在地	住所 〒 電話番号： FAX 番号：
総括責任者	氏名： 所属部局・職名： 電話番号： FAX 番号： E-mail アドレス：
連絡先	事務担当者氏名： 所属部局・職： 電話番号： FAX 番号： E-mail アドレス：

## b. 移植患者

性別		年齢	(生年月日)	国籍	
疾患名					

注：実施施設は患者との連絡を常に可能にしておくこと。

c. 移植内容

移植臓器の由来		ヒト（自己/非自己） ヒト以外
ヒトへの移植部位		
移植臓器 がヒト由 来の場合	動物と の接触 方法	(例 1、共培養、7日) (例 2、体外灌流、3時間)
	接触し た動物 組織	動物（例、マウス BALB/c） 細胞/組織（例、BALB3T3 細胞）
移植臓器 がヒト以 外の場合	移植臓 器の由 来	動物（例、ブタ、生後2年2ヶ月） 飼育施設と出荷年月日（例、実験動物センター、 2003.9.12）移植臓器（株細胞の場合は細胞名） 移植された臓器・組織等の総量
実施年月日		

d. (移植患者及びドナー動物の) 記録及び試料の保管場所

名称	
所在地	〒  電話番号
試料と 保存方 法	保存細胞/臓器（量）（例、ブタ心臓（1g）、3T3 と共培養した患 者皮膚（10 <sup>6</sup> 細胞） 保存方法（温度）（例、冷凍庫（-90度）、液体窒素、など）