

The molecular mechanisms underlying the regulation of Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency are likely to be highly complex given that Pin1 interacts with multiple substrates in pluripotent stem cells, as revealed by our proteomics analysis. However, our current findings also indicate that Pin1 is involved in the growth and maintenance of pluripotency in stem cells through its phosphorylation-dependent prolyl isomerization of substrates such as Oct4. In this regard, a recent report by Moretto-Zita *et al.* (30) has demonstrated that Pin1 can also associate with another pluripotent transcription factor, Nanog, in murine ES cells and sustain the self-renewal and teratoma formation of these cells in immunodeficient mice. These results indicate that Pin1 is a crucial modulator of the transcription factor network governing cellular stemness. It is possible also that Pin1 could regulate this process by modulating the function of other substrates. Further studies of Pin1 function in stem cells at various stages might shed new light on the underlying molecular pathways and factors that control self-renewal and multipotency.

It has been demonstrated that Pin1 knock-out mice develop normally but display some proliferation abnormalities, including a decreased body weight, retinal degeneration, and impaired mammary gland development (31, 32). Pin1 knock-out mice also exhibit testicular atrophy with a significantly impaired proliferation of primordial germ cells and the progressive loss of spermatogenic cells (33). These phenotypes can now be attributed to the impaired maintenance and proliferation of germ-related stem cells due to the loss of Pin1 function.

In many circumstances, Pin1 acts as either a repressor or an enhancer of the degradation of substrate proteins (15–17, 34). Our current data now additionally demonstrate that Pin1 can also prolong the protein half-life of Oct4, thereby enhancing its transcriptional activity. Oct4 has been shown to be regulated by post-translational modifications such as SUMOylation (35). Our current findings reveal that Oct4 is also regulated by phosphorylation and subsequent prolyl isomerization. Identification of the kinase(s) responsible for the association of Pin1 and Oct4 will enhance our understanding of the regulatory pathways that operate during and after the induction of pluripotency.

It is desirable to utilize pluripotent stem cells such as iPS cells for future regenerative medicine applications. However, there are already concerns surrounding the use of iPS cells in a clinical setting because prior studies have suggested that they are likely to develop cancers (4, 36). Our current findings suggest, however, that the Pin1 inhibition could effectively block the proliferation of iPS cells in an undifferentiated state. Pin1 could therefore act as a molecular switch that can reversibly control the proliferation and survival of iPS cells, thereby reducing the risk of cell transformation and tumor formation.

Acknowledgments—We are grateful to the Riken Bioresource Center for providing human iPS cells and MRC5 fibroblasts. We also thank M. Machida, A. Hosoda, and S. Yoshizaki for comments on the manuscript and critical discussions and S. Baba and T. Taniguchi for technical assistance.

REFERENCES

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998) *Science* **282**, 1145–1147
- Watt, F. M., and Hogan, B. L. (2000) *Science* **287**, 1427–1430
- Lewitzky, M., and Yamanaka, S. (2007) *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 467–473
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) *Cell* **126**, 663–676
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., and Young, R. A. (2005) *Cell* **122**, 947–956
- Eiselleova, L., Matulka, K., Kriz, V., Kunova, M., Schmidtova, Z., Neradil, J., Tichy, B., Dvorakova, D., Pospisilova, S., Hampl, A., and Dvorak, P. (2009) *Stem Cells* **27**, 1847–1857
- Dvorak, P., Dvorakova, D., Koskova, S., Vodinska, M., Najvirtova, M., Krekac, D., and Hampl, A. (2005) *Stem Cells* **23**, 1200–1211
- Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., and Deng, H. (2007) *Differentiation* **75**, 299–307
- Sun, H., and Tonks, N. K. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 480–485
- Brill, L. M., Xiong, W., Lee, K. B., Ficarro, S. B., Crain, A., Xu, Y., Terskikh, A., Snyder, E. Y., and Ding, S. (2009) *Cell Stem Cell* **5**, 204–213
- Prudhomme, W., Daley, G. Q., Zandstra, P., and Lauffenburger, D. A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 2900–2905
- Hunter, T. (2009) *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 140–146
- Lu, K. P., Hanes, S. D., and Hunter, T. (1996) *Nature* **380**, 544–547
- Ryo, A., Liou, Y. C., Lu, K. P., and Wulf, G. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 773–783
- Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y. C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S., and Lu, K. P. (2003) *Mol. Cell* **12**, 1413–1426
- Ryo, A., Nakamura, M., Wulf, G., Liou, Y. C., and Lu, K. P. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 793–801
- Lu, K. P., and Zhou, X. Z. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 904–916
- Esnault, S., Shen, Z. J., and Malter, J. S. (2008) *Crit. Rev. Immunol.* **28**, 45–60
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007) *Nat. Protoc.* **2**, 3081–3089
- Yamada, M., Hamatani, T., Akutsu, H., Chikazawa, N., Kuji, N., Yoshimura, Y., and Umezawa, A. (2010) *Hum. Mol. Genet.* **19**, 480–493
- Liu, Y., and Labosky, P. A. (2008) *Stem Cells* **26**, 2475–2484
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S., and Niwa, H. (2007) *Nat. Cell Biol.* **9**, 625–635
- Yang, H. M., Do, H. J., Oh, J. H., Kim, J. H., Choi, S. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M., and Kim, J. H. (2005) *J. Cell. Biochem.* **96**, 821–830
- Takahashi, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2006) *Methods Mol. Biol.* **329**, 449–458
- Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, K. P., Grabley, S., Küllertz, G., and Fischer, G. (1998) *Biochemistry* **37**, 5953–5960
- Shen, Z. J., Esnault, S., Schinzel, A., Borner, C., and Malter, J. S. (2009) *Nat. Immunol.* **10**, 257–265
- Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C., and Lu, K. P. (1997) *Science* **278**, 1957–1960
- Lu, P. J., Zhou, X. Z., Liou, Y. C., Noel, J. P., and Lu, K. P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 2381–2384
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000) *Nat. Genet.* **24**, 372–376
- Moretto-Zita, M., Jin, H., Shen, Z., Zhao, T., Briggs, S. P., and Xu, Y. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 13312–13317
- Fujimori, F., Takahashi, K., Uchida, C., and Uchida, T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 658–663
- Liou, Y. C., Ryo, A., Huang, H. K., Lu, P. J., Bronson, R., Fujimori, F., Uchida, T., Hunter, T., and Lu, K. P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1335–1340
- Atchison, F. W., and Means, A. R. (2003) *Biol. Reprod.* **69**, 1989–1997
- Ryo, A., Hirai, A., Nishi, M., Liou, Y. C., Perrem, K., Lin, S. C., Hirano, H., Lee, S. W., and Aoki, I. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 36671–36681
- Zhang, Z., Liao, B., Xu, M., and Jin, Y. (2007) *FASEB J.* **21**, 3042–3051
- Knoepfler, P. S. (2009) *Stem Cells* **27**, 1050–1056

Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization

Takatoshi Sato^{1,*}, Yoshitaka Iso^{2,*}, Taro Uyama³, Keisuke Kawachi², Kohei Wakabayashi², Yasutoshi Omori¹, Teruko Soda¹, Makoto Shoji¹, Shinji Koba¹, Shin-Ichiro Yokoyama⁴, Noboru Fukuda⁵, Satoshi Saito⁴, Takashi Katagiri¹, Youichi Kobayashi¹, Youichi Takeyama², Akihiro Umezawa³ and Hiroshi Suzuki²

Few reports have examined the effects of adult bone marrow multipotent stromal cells (MSCs) on large animals, and no useful method has been established for MSC implantation. In this study, we investigate the effects of MSC infusion from the coronary vein in a swine model of chronic myocardial infarction (MI). MI was induced in domestic swine by placing beads in the left coronary artery. Bone marrow cells were aspirated and then cultured to isolate the MSCs. At 4 weeks after MI, MSCs labeled with dye ($n = 8$) or vehicle ($n = 5$) were infused retrogradely from the anterior interventricular vein without any complications. Left ventriculography (LVG) was performed just before and at 4 weeks after cell infusion. The ejection fraction (EF) assessed by LVG significantly decreased from baseline up to a follow-up at 4 weeks in the control group ($P < 0.05$), whereas the cardiac function was preserved in the MSC group. The difference in the EF between baseline and follow-up was significantly greater in the MSC group than in the control group ($P < 0.05$). The MSC administration significantly promoted neovascularization in the border areas compared with the controls ($P < 0.0005$), though it had no effect on cardiac fibrosis. A few MSCs expressed von Willebrand factor in a differentiation assay, but none of them expressed troponin T. In quantitative gene expression analysis, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were significantly higher in the MSC-treated hearts than in the controls ($P < 0.05$, respectively). Immunohistochemical staining revealed VEGF production in the engrafted MSCs. *In vitro* experiment demonstrated that MSCs significantly stimulated endothelial capillary network formation compared with the VEGF protein ($P < 0.0001$). MSC infusion via the coronary vein prevented the progression of cardiac dysfunction in chronic MI. This favorable effect appeared to derive not from cell differentiation, but from enhanced neovascularization by angiogenic factors secreted from the MSCs.

Laboratory Investigation (2011) 91, 553–564; doi:10.1038/labinvest.2010.202; published online 31 January 2011

KEYWORDS: angiogenesis; bone marrow; chronic myocardial infarction; coronary vein; multipotent stromal cells

In recent years, cell-based therapy has emerged as a potential new strategy for organ repair. The optimal source of cells for repairing damaged tissue is a topic of intense research. Bone marrow mononuclear cells (BMNCs) have been the cell source most frequently used for the angiogenic cell therapies

applied for cardiovascular disease.^{1–5} Two randomized controlled trials in Europe, however, failed to prove any functional benefit of intracoronary applied BMNCs in patients with acute myocardial infarction (MI).^{4,5} The results of these trials suggest that the effects of BMNC implantation may be

¹Division of Cardiology, Department of Medicine, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan; ²Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, Showa University Fujigaoka Hospital, Yokohama, Japan; ³Department of Reproductive Biology and Pathology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan; ⁴Division of Cardiology, Department of Medicine, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan and ⁵Advanced Research Institute of the Sciences and Humanities, Nihon University, Tokyo, Japan

Correspondence: Dr H Suzuki, MD, PhD, Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, Showa University Fujigaoka Hospital, 1–30 Fujigaoka, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa 227-8501, Japan.

E-mail: hrsuzuki@med.showa-u.ac.jp

*These authors contributed equally to this work.

Received 11 February 2010; revised 1 November 2010; accepted 11 November 2010

insufficient to improve cardiac function. A new cell therapy using other cell types, a therapy more effective than BMNC implantation, is expected to be established soon.

Our group previously demonstrated the important contributions of the stem/progenitor cells among the BMNCs in improving limb ischemia.⁶ There has been considerable interest in the development of a new therapy with a non-hematopoietic subset of adult bone marrow (BM) stem/progenitor cells referred to as the mesenchymal stem cells or multipotent stromal cells (MSCs) in cardiac repair or regeneration.⁷⁻¹¹ MSCs have been shown to protect against ischemic injury through both direct prevention of cell death and through the stimulation of angiogenesis.^{7,11} In experiments comparing cultured human MSCs with BM hematopoietic stem/progenitor cells, Iso *et al*⁷ found that the former expressed higher mRNA levels for angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and adrenomedullin. Encouragingly, translational studies on small and large models toward clinical implication have shown that MSC administration in the acute phase of MI improves cardiac function.^{8,9,12-14} It remains undetermined, however, whether MSC implantation is effective in a chronic MI or heart failure model.

As the selection of cell types advances, methods and devices for cell delivery will also have to be developed for clinical cell therapies. The methods used for cell implantation have included direct injection into myocardium after thoracotomy,¹⁴ transendocardial injection via an injection catheter,⁸ and intracoronary injection via a balloon catheter.⁹ The first of these methods, via thoracotomy, poses an increased risk of morbidity and mortality, as it requires highly aggressive intervention and general anesthesia. The second method, transendocardial injection with a catheter, also has flaws, including risks such as cardiac tamponade and ventricular arrhythmia. As hopeful alternatives, new methods of cell transplantation have recently been reported.¹⁵⁻¹⁸ We previously demonstrated the safety and efficacy of retrograde injection of BMNCs via the coronary vein into the myocardium through a single balloon infusion catheter in a swine MI model.¹⁵

Our group conducted this study for two purposes: first, to investigate whether the low invasive delivery of MSCs via the coronary vein restores cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy model; second, to explore the mechanism behind the improvement, if any improvement is found.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Swine MSCs

This study was conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the United States National Institutes of Health. The experimental protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of Showa University School of Medicine.

Swine BM cells were harvested from the femurs of the swine as the MI model was being created (Figure 1a). These

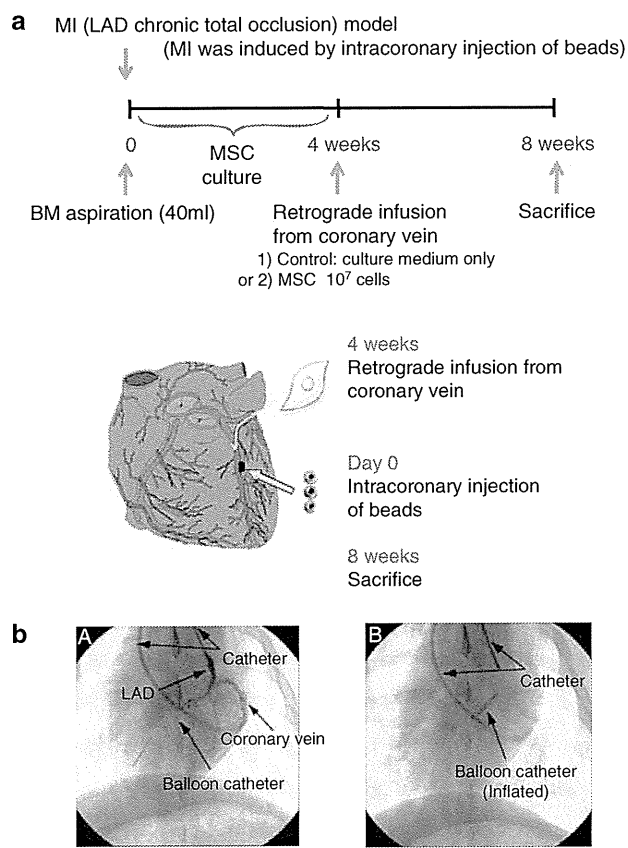


Figure 1 Experimental protocol and procedure. (a) Schedule and scheme for the experimental protocol. (b) Left coronary angiography and coronary venography (left), and X-ray image at balloon inflation with cell infusion (right). MI, myocardial infarction. BM, bone marrow. MSC, multipotent stromal cell.

cells were resuspended in MSC culture medium (10% fetal bovine serum in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/l glucose) with antibiotic/antimycotic supplements (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. When the cultures reached subconfluence, the cells were harvested with 0.25% trypsin and 1 mM EDTA, then one-half of the harvested cells were replaced. After one series of passages, the attached MSCs were devoid of hematopoietic cells. After two series of passages, the cells were harvested again with 0.25% trypsin and 1 mM EDTA, washed with phosphate buffer saline, labeled with Celltracker Orange (Invitrogen), and resuspended in 10 ml RPMI Medium 1640 (Invitrogen).

Chronic MI Model and Cell Implantation

In all, 19 male domestic swine, aged 2-4 months and weighing about 25 kg, were used. After receiving an intramuscular injection of ketamine (20 mg/kg) and atropine (60 µg/kg), each animal was intubated, ventilated, and maintained with a mixture of halothane (2%) and oxygen.

Electrocardiograph monitoring was performed continuously, and a coronary angiography was carried out after inserting an introducer from the right cervical artery. Next, the guidewire was inserted into the left anterior descending coronary artery and sterilized beads were placed in the mid left anterior descending coronary artery by microcatheter (Figure 1a and b) according to a method previously described.¹⁵ Peripheral blood was collected before and 1 and 4 days after MI. Serum creatine kinase (CK) levels were determined.

At 4 weeks after the induction of MI by permanent coronary occlusion with the beads, the 13 surviving animals were anesthetized again by the same procedure. After coronary angiography and left ventriculography (LVG), a balloon catheter (2.5 mm in diameter) was advanced through the coronary sinus into the anterior intraventricular vein and positioned just beside the occlusive site of the left anterior descending coronary artery (Figure 1a and c). The swine were randomly assigned to either an MSC infusion group (MSC group: $n=8$) or medium infusion group (control group: $n=5$). In the MSC group, MSCs ($1.02 \pm 0.34 \times 10^7$ cells) labeled with the red fluorescent dye were suspended in 10 ml culture medium and infused retrogradely through the balloon catheter from the anterior intraventricular vein over a 10-min period of balloon inflation. The same volume of medium was infused in the control group by the same procedure.

LVG was performed before and at 4 weeks after the cell implantation to determine cardiac function as previously described.¹⁹ Later, on the completion of follow-up coronary angiography and LVG at 4 weeks after the treatment, the animals were killed and their hearts were harvested. Samples were collected from the infarcted, border, and remote areas in the treated hearts. The tissue was prepared as previously described.¹⁹

Flow Cytometric Analysis of the Cultured Cells

The characteristics of the cultured MSCs were confirmed by flow cytometric analyses using purified or directly conjugated antibodies against SWC3a (BD PharMingen, San Diego, CA, USA), CD44 (BD PharMingen), SLA-class I (BD PharMingen), CD29 (BD PharMingen), CD44H (FITC-labeled, BD PharMingen), SLA-DQ (BD PharMingen), CD31 (BD PharMingen), and CD90 (PE-labeled; BD PharMingen). The cells were detached and stained for 30 min at 4°C with primary antibodies and immunofluorescent secondary antibodies. After washing, the cells were analyzed on a Cytomics FC500 analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Immunostaining and Morphometric Analysis

Immunohistochemistry and the morphometric analysis were performed as previously described.¹⁹ The primary antibodies were anti-von Willebrand factor (vWF) for endothelial cells at a 1:400 dilution (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti- α -smooth muscle actin (SMA) for small arteries at a 1:300 dilution (Sigma, Saint Louis, MO, USA)

and phospho-signal transducer and activator of transcription 3 (phospho-STAT3, Cell Signaling Technology, MA, USA) at a 1:50 dilution.

Images of the Mallory-stained sections were recorded, digitized, and analyzed with Win ROOF image analysis software (Mitani, Fukui, Japan) to measure the fibrotic area. The measurements were taken in 10 sections for each animal. To evaluate neovascularization, the numbers of α -SMA- and vWF-positive vessels in the border areas were manually counted in a randomly selected high-power field ($\times 400$). The measurements were taken in 10 areas for each animal. The investigator performing this analysis was blinded to the treatment.

Immunofluorescence

Before staining, frozen sections were fixed for 10 min in chloroform at room temperature. The sections were incubated with the first antibody: either anti-vWF antibody (Santa Cruz Biotechnology) at a 1:300 dilution for 60 min at room temperature, or anti-troponin T antibody (NeoMarkers, Fremont, CA, USA) at a 1:100 dilution for 60 min at room temperature, or anti-VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology) at a 1:800 dilution for 24 h at 4°C. After incubation with the first antibody, the sections were incubated with the second antibody: Alexa 488-labeled IgG (green color; Molecular Probes, Eugene, OR, USA; 1:400 dilution) for 1 h. Nuclear staining was performed by DAPI.

Quantitative mRNA Expression Analysis for Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and VEGF

An RNA extraction, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis and quantification of the PCR products were performed as previously described.¹⁹ The PCR primers were as follows: bFGF, forward 5'-TCAAAG GAGTGTGTGCGAAC-3' and reverse 5'-CAGGGCCACATA CCAACTG-3'; VEGF, forward 5'-ATGCGGATCAAACC TCACC-3' and reverse 5'-ATCTGGTTCCCGAAACGCTG-3'; GAPDH, forward 5'-TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3' and reverse 5'-CACAATGCCGAAGTGGTCGT-3'. PCR reactions were carried out as follows: for bFGF, 35 cycles of denaturation for 60 s at 94°C, annealing for 45 s at 59°C, and extension for 45 s at 72°C; for VEGF, 27 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 1 min at 60°C, and extension for 2 min at 68°C, followed by a final extension for 7 min at 68°C; for GAPDH, 30 cycles of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 90 s at 55°C, and extension for 2 min at 72°C.

The sizes and quantities of the PCR products were detected by an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. In brief, 9 ml of gel-dye mix was fed into each of 16 wells and then forced into a micro channel network. Each of two buffer wells was also filled with 9 ml of the gel-dye mix, and sample and ladder wells were filled with 5 ml of marker mix followed by 1 ml of DNA sizing ladder and sample, respectively. The

prepared microchip was vortexed and placed into the bio-analyzer for analysis. All experiments were performed using Agilent biosizing software (Version A.02.12).

Immunoblotting

The immunoblotting was performed by a method previously described,²⁰ with minor modifications. A total of 20 μg of protein was separated by SDS-PAGE. The protein was transferred from gel to a clear blot P membrane sheet (Atto,

Tokyo, Japan) by horizontal electrophoresis at 108 mA for 90 min at room temperature. Immunostaining was carried out with anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology) and bFGF (Millipore, CA, USA) antibodies.

In Vitro Angiogenesis Assay

Tubule formation experiments were conducted using an Angiogenesis kit (Kurabo, Osaka, Japan), according to the manufacturer’s instructions. Briefly, human umbilical vein

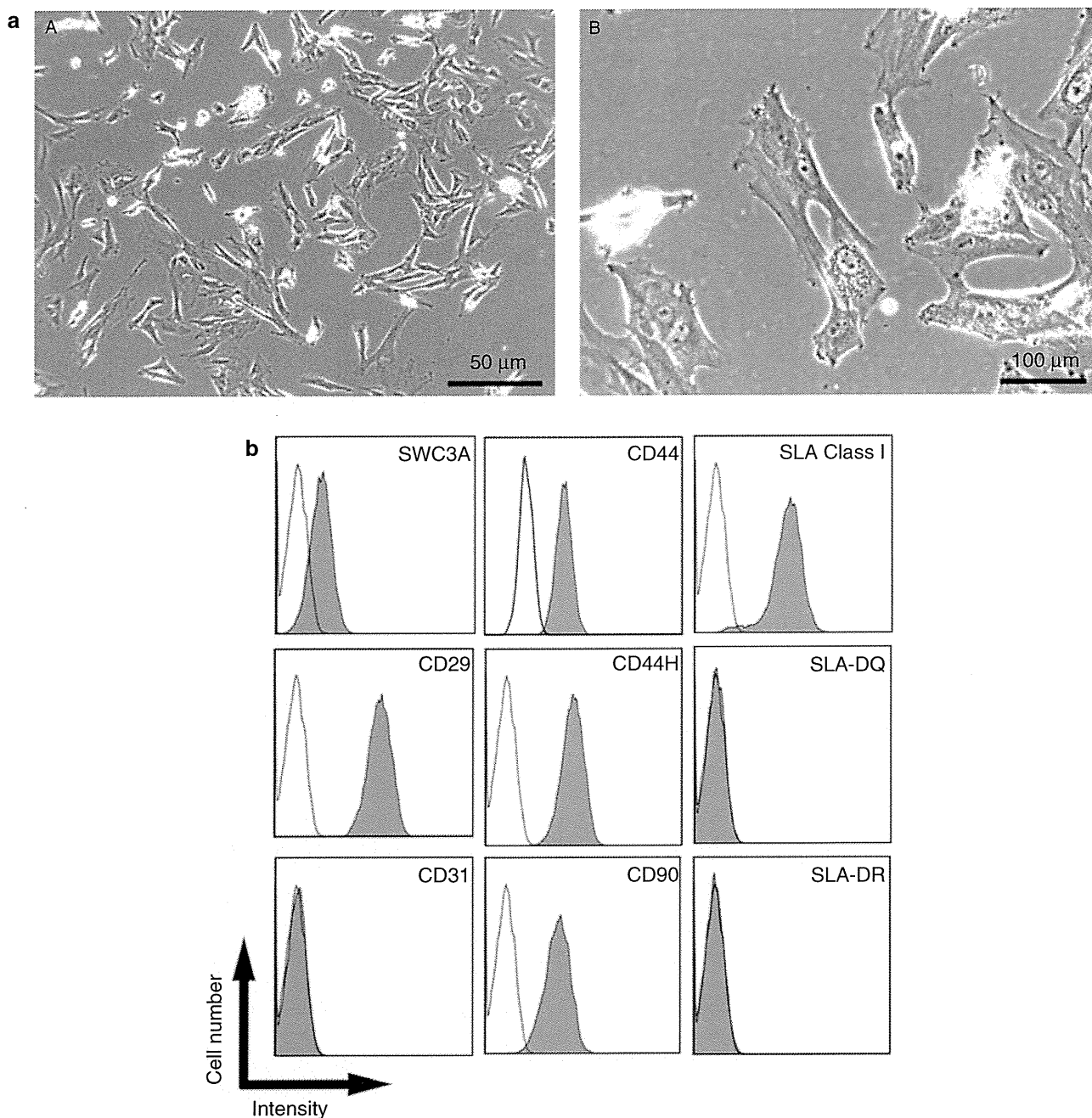


Figure 2 Phenotype of swine MSCs. (a) Phase contrast microscopic images of MSCs (A, low magnification; B, high magnification). (b) Flow cytometric analysis of swine MSCs. MSCs are positive for SWC3a, CD44, SLA class I, CD29, CD44H, and CD90, and negative for SLA-DQ, CD31, and SLA-DR.

endothelial cells (HUVECs) and human fibroblasts were admixed and seeded into 24-well plates. Human MSCs (5×10^4 cells/well) were applied and co-cultured for the experiments. After 10 days of culture, the HUVECs were fixed with 70% ethanol at 4°C and immunostained with an anti-human CD31 antibody using BCIP/NBT as a substrate for the secondary antibody. Five fields per well were selected for digital photography under a microscope (Olympus, Tokyo, Japan), and the areas of the tubule-like structures were measured quantitatively using angiogenesis image analyzer software (Kurabo).

Statistical Analysis

All values are expressed as means \pm s.e.m. The means were compared by the unpaired Student's *t*-test. The paired *t*-test was used for comparison of temporal changes in the ejection fraction (EF). Comparisons among the three groups were conducted by one-way analysis of variance followed by Scheffé's multiple comparison test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Phenotype of Swine MSCs

Bone marrow was aspirated from the swine femurs as the MI model was being created (Figure 1a). The mononuclear cell

layer from the BM was cultured, and the MSCs adhering to the culture plastic after 24–48 h were isolated. The cultured swine MSCs were phenotypically similar to human MSCs. They had a fibroblastic spindle-like shape typical of mesenchymal cells and were positive for CD44, SLA class I, CD29, and CD90, and negative for CD31 (Figure 2).

Cardiac Function in Chronic MI after the MSC Implantation

We measured the serum CK levels to assess acute myocardial damage after the sterilized beads were implanted in the swine LADs. The levels of CK peaked at 1 day after the infarction, and the peak levels were similar in the two groups (3338.6 ± 538.5 mg/dl in the control group, 3447.7 ± 561.7 mg/dl in the MSC group).

At 4 weeks after the MI, the swine were treated with the MSCs ($1.02 \pm 0.34 \times 10^7$ cells, $n=8$) or vehicle ($n=5$) via coronary vein infusion (Figure 1c). Coronary venography confirmed that the vessels were free of complications such as vein rupture or embolization during the procedure. To determine cardiac function, LVG was performed immediately before and at 4 weeks after the treatment. The EF assessed by the LVG did not significantly differ between the two groups at baseline. The EF significantly decreased in the

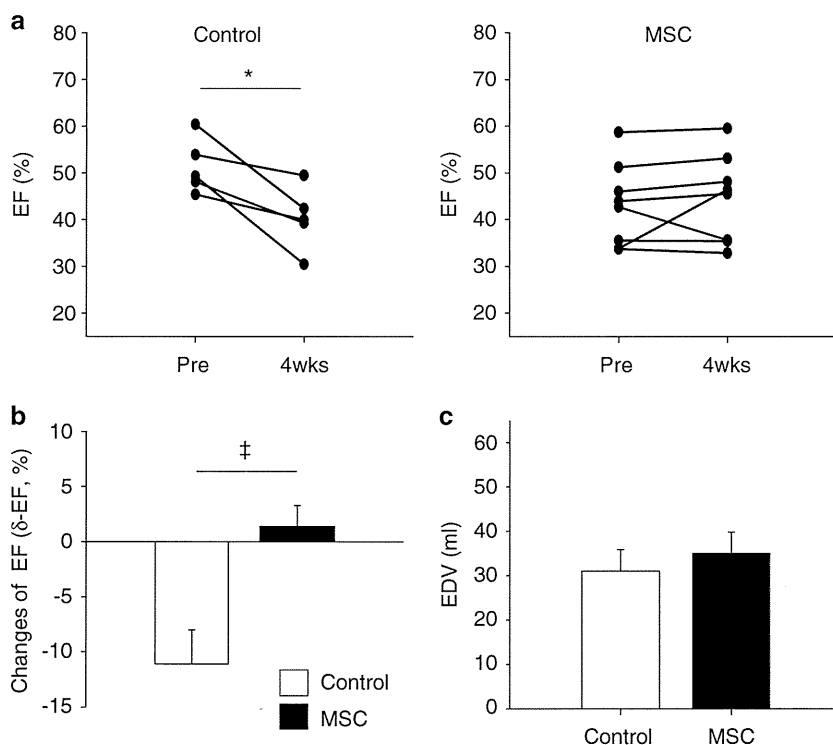


Figure 3 Cardiac function assessed by left ventriculography. (a) Time course changes in ejection fraction (EF) immediately before and at 4 weeks after treatment. Left, control group ($n=5$); right, MSC infusion group ($n=8$). (b) Differences between pre-treatment EF and EF after 4 weeks (δ -EF). (c) Endodiastolic volumes at 4 weeks after treatment. No significant differences between the two groups were observed. Data are means \pm s.e.m.* $P < 0.05$; $\ddagger P < 0.01$.

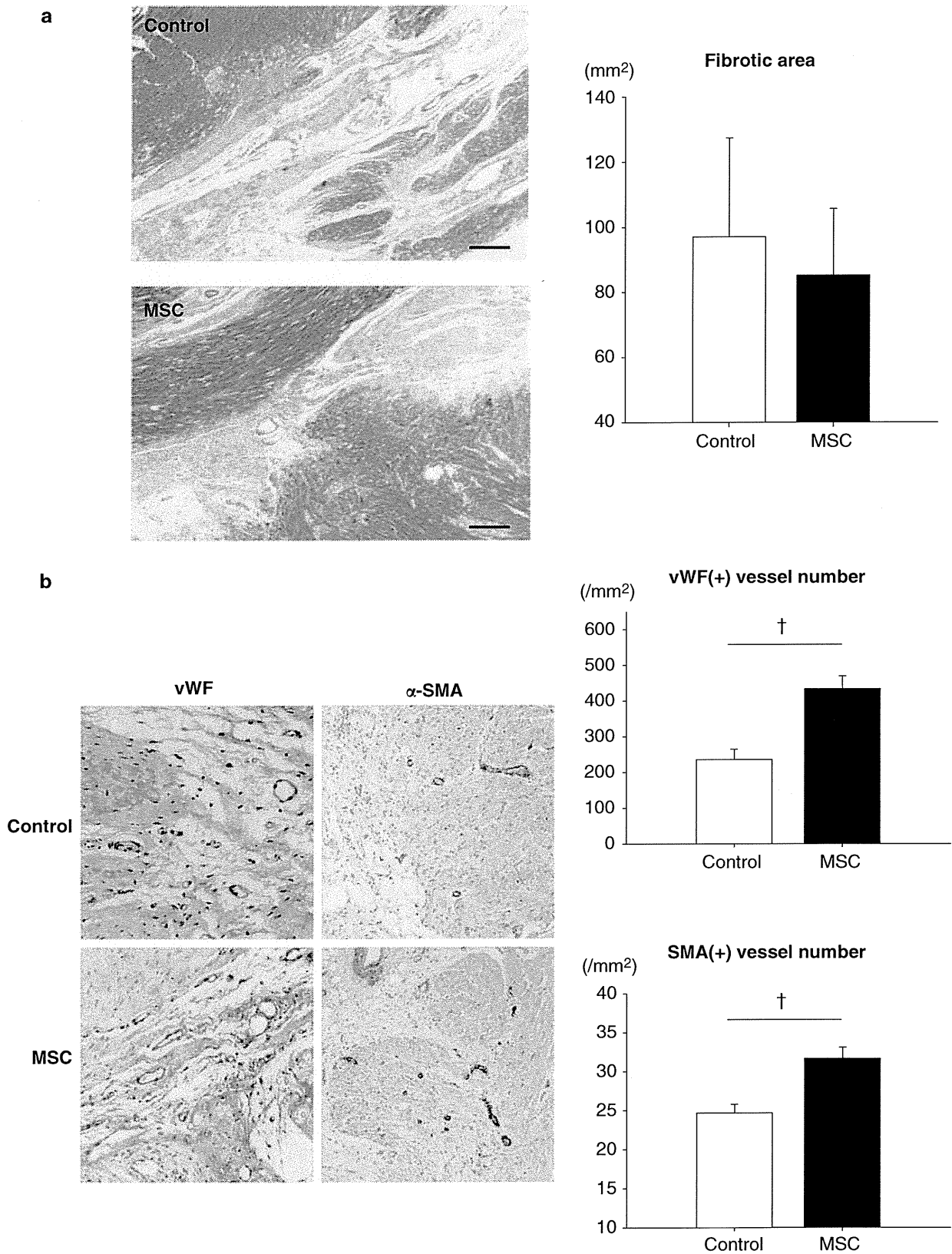


Figure 4 Cardiac fibrosis and neovascularization in hearts after cell infusion. (a) Left, blue staining indicates fibrosis in the Azan-Mallory-stained sections. Right, the morphometric analysis shows no significant differences in the fibrotic area between the two groups. (b) Left, neovessels are evaluated in the von Willebrand factor (vWF)- and the α -smooth muscle actin (α -SMA)-stained sections. Right, the numbers of vWF- and α -SMA-positive vessels in the border areas. Data are means \pm s.e.m. $^\dagger P < 0.0005$.

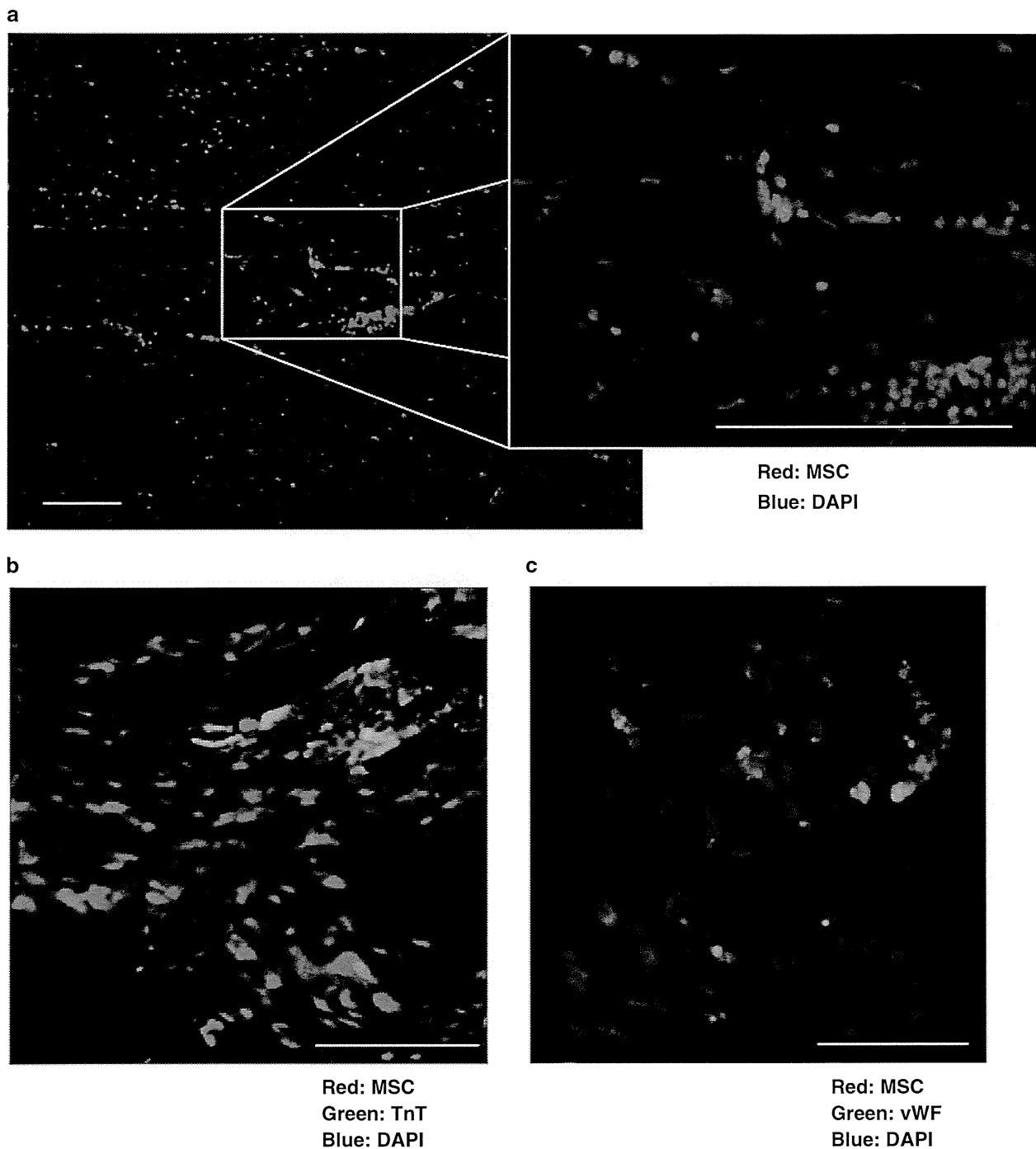


Figure 5 MSC engraftment and differentiation. **(a)** Engraftment of MSCs implanted in the border area. Red fluorescence indicates MSCs. Blue fluorescence indicates DAPI nuclear staining. **(b)** Lack of cardiomyocyte differentiation of the engrafted MSCs. Implanted Red fluorescence indicates MSCs. Green fluorescence indicates myocardium (TnT = troponin T). Blue fluorescence indicates DAPI nuclear staining. **(c)** Endothelial cell differentiation of the engrafted MSCs. Red fluorescence indicates MSCs. Green fluorescence indicates endothelial cells (vWF). Yellow (red and green) fluorescence indicates MSC differentiation. Blue fluorescence indicates DAPI nuclear staining. Bar = 100 μ m.

control group over time ($P < 0.05$), whereas the cardiac function was preserved in the MSC group (Figure 3a). The difference in the EF (δ -EF) between the baseline and follow-up was significantly smaller in the controls than in the MSC animals ($P < 0.01$, Figure 3b). There were no statistically

significant differences between the two groups in the EF or end-diastolic volume at follow-up (Figure 3c).

These findings from the LVG studies indicate that retrograde delivery of the MSCs via the coronary vein suppresses the progression of systolic LV dysfunction in chronic MI.

Effects of the Cell Infusion on Cardiac Fibrosis and Neovascularization

We conducted histopathological studies to address the effects of the MSC administration on cardiac fibrosis and neovascularization. Azan-Mallory-stained sections of hearts from the MSC-treated swine showed somewhat less fibrosis than those from the controls, but the difference was not significant in quantitative analysis (Figure 4a). The numbers of vWF- and α -SMA-positive vessels were assessed in the border areas (Figure 4b). The number of vWF-positive vessels was significantly higher in the MSC-treated swine hearts than in the control group ($P < 0.0005$). Likewise, α -SMA-positive vessel counts were also significantly higher in the MSC group than in the control group ($P < 0.0005$).

The effects of the MSC infusion were limited in terms of modification of cardiac fibrosis in the chronic post-infarcted myocardium, while the cell administration significantly promoted angio/arteriogenesis in the border zones. Thus, the favorable effects of the MSCs on cardiac function appeared to derive, at least in part, from enhanced neovascularization.

In a previous report from another group,²¹ freshly isolated BM cell implantation induced a calcified lesion formation in the infarcted myocardium of rat. Noting this, we carried von Kossa staining to detect abnormal calcium deposition in the frozen sections. This staining, however, revealed no calcified lesions (data not shown).

Engraftment and Differentiation of the Implanted MSCs

We assessed MSC engraftment and differentiation by immunofluorescence. MSCs marked by red fluorescence dye were sparsely observed in an interstitial area of the border area at 4 weeks after the infusion, but we could not detect any cells differentiated to cardiomyocytes (Figure 5a and b). A few MSCs expressed vWF and were incorporated into the vessel structure (Figure 5c).

The effect of the engrafted MSCs in promoting neovascularization seemed to be conferred partly through endothelial differentiation. The extent of the differentiation, however, was far too low to account for the significant increases in the vessel numbers.

Enhanced Expression of Angiogenic Factors after the MSC Implantation

Noting the reduced extent of cell incorporation to neovessels, we examined whether factors related to angiogenesis contributed to the increased neovascularization in the treated myocardium.

We determined the gene expression levels of bFGF and VEGF relative to GAPDH by quantitative RT-PCR analysis.

The bFGF and VEGF levels were significantly higher in the MSC-treated hearts than in the control hearts ($P < 0.05$, respectively; Figure 6a). Immunoblotting analysis confirmed the increased protein expressions of both bFGF and VEGF in the MSC group compared with the controls (Figure 6b). Of note, the MSC infusion enhanced the transcriptional levels not only in the border and infarcted areas, but also in the remote areas with little to no MSC engraftment (Figure 6a). In response to the MSC infusion, resident cardiac cells in the remote areas appeared to produce these angiogenic cytokines.

Immunohistochemical staining revealed that the MSCs engrafted in the border zones produced VEGF (Figure 7a).

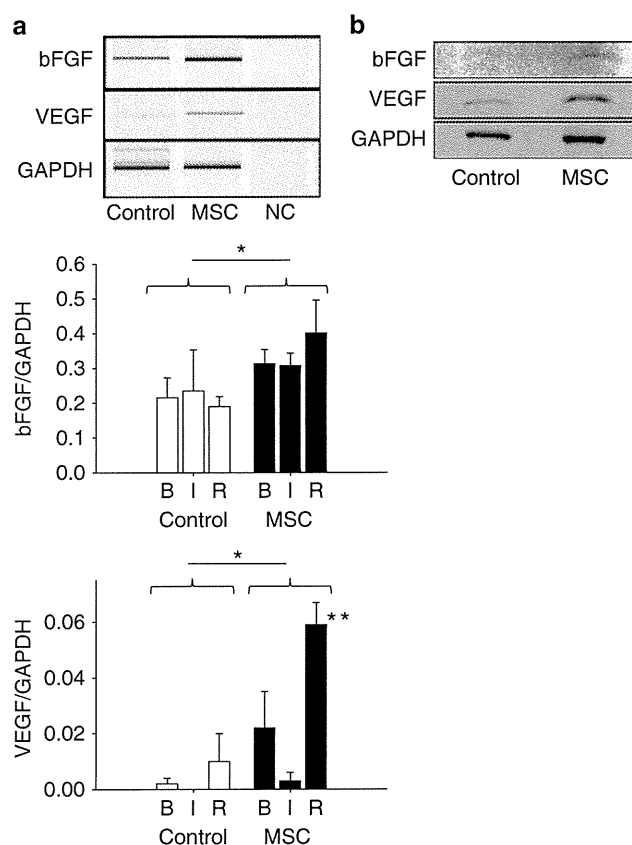
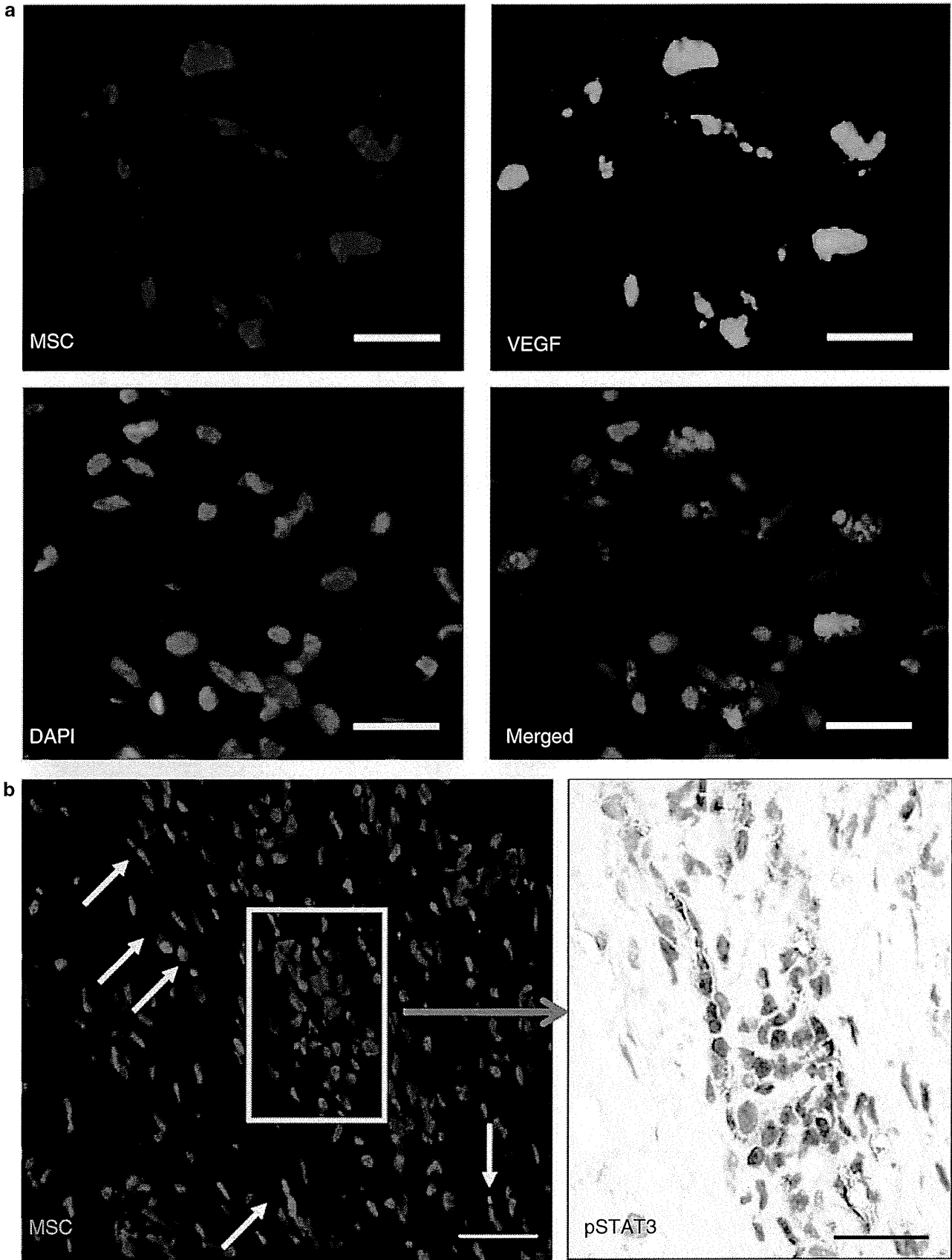


Figure 6 Expressions of bFGF and VEGF in the hearts after cell infusion. (a) Representative images of electrophoretic gels after PCR amplification of bFGF and VEGF mRNA in the border areas (upper). Quantitative analysis of bFGF mRNA expression relative to GAPDH mRNA in each area of the heart (middle). Quantitative analysis of VEGF mRNA expression relative to GAPDH mRNA in each area of the heart (bottom). Data are means \pm s.e.m., $n = 3$ in each area. * $P < 0.05$. ** $P < 0.05$ vs infarcted area in the MSC group. B, border area. I, infarcted area. R, remote area. (b) Immunoblotting analysis for bFGF and VEGF protein expressions in the border area. bFGF, basic fibroblast growth factor. VEGF, vascular endothelial growth factor.

Figure 7 Expressions of VEGF and pro-angiogenic signal in the MSC-treated hearts. (a) VEGF production from the engrafted MSCs. Red fluorescence indicates MSCs. Green fluorescence indicates VEGF. Blue fluorescence indicates DAPI nuclear staining. Merged image (yellow fluorescence) shows VEGF expression in the MSCs. Bar = 20 μ m. (b) STAT3 activation in the resident cardiac cells. Left, MSC engraftment (red fluorescence and white arrow). Blue fluorescence indicates DAPI nuclear staining. Right, clusters of cardiac cells with activated STAT3. Brown indicates positive staining for phospho-STAT3. Bar = 50 μ m. STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.



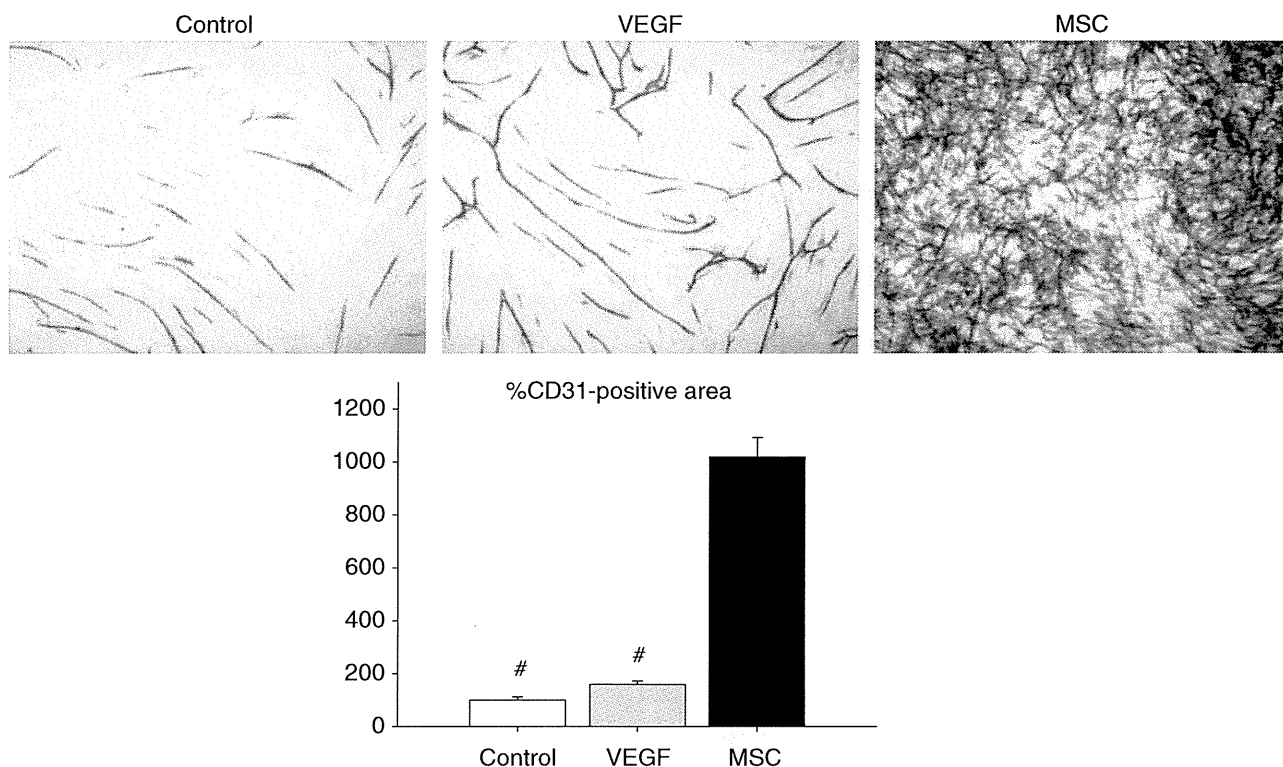


Figure 8 *In vitro* angiogenesis assay. Comparison of %CD31 areas among the growth medium (100%), the growth medium supplemented with VEGF 10 ng/ml, and the MSC co-culture. Data are means \pm s.e.m., $n = 3-4$. # $P < 0.0001$ vs MSC.

MSCs have been shown to secrete IL-6 and leukemia inhibitory factor.^{7,22} The transcriptional factor STAT3 is activated by IL-6 family members, and its activation promotes capillary growth in adult heart via acceleration of VEGF transcription.²³ We found that the area surrounded by the engrafted MSCs contained clusters of cells positive for phosphorylated + -STAT3 in sequential sections of the swine infarcted myocardium (Figure 7b).

Thus, VEGF might be produced not only the MSCs, but also by resident cardiac cells with STAT3 activated by the MSC-secreted factors.

In Vitro Angiogenesis Assay

We examined the culture system by an angiogenesis assay. HUVECs were immunostained with an anti-CD31 antibody, and the colored areas were quantified as capillary growth. Co-culture with human MSCs (5×10^4 cells) prominently induced the capillary network formation (Figure 8). The capillary area was significantly larger in the MSCs than in the control medium or the control medium supplemented with a high concentration (10 ng/ml) of VEGF ($P < 0.0001$, respectively).

DISCUSSION

Various reports have demonstrated a potential relationship between cardiac angiogenesis and cardiac function.²⁴⁻²⁶

Disruption of the balance between myocyte growth and angiogenesis leads to contractile dysfunction and heart failure. VEGF plays a critical role in this process.

In an earlier study by our group, BMNCs implanted via the coronary vein improved cardiac function in the acute and subacute phase of MI.¹⁵ MSCs have been shown to be a robust source of angiogenic factors compared with hematopoietic cells in BM.^{7,27} The low-invasive local delivery of MSCs preserved cardiac function in the swine chronic MI model in our present study. In comparisons against our controls, swine hearts implanted with MSCs exhibited increased expression of VEGF and bFGF and larger numbers of vessels in vWF and α -SMA staining. The enhanced neovascularization induced by the increased VEGF may help to prevent the progression of cardiac dysfunction in the chronic MI model.

Immunohistochemical staining revealed that the elevated VEGF levels were at least partly due to VEGF release from the engrafted MSCs. MSCs significantly promoted capillary network formation in our endothelial tube formation assay *in vitro*. The results of this *in vitro* study may support the hypothesis that factors secreted by the MSCs *in vivo* are responsible for enhanced neovascularization and preserved contractile function. Several previous studies support the paracrine hypothesis for MSC-mediated angiogenesis and cardioprotection.^{7,11,27,28} Moreover, our RT-PCR analysis showed significant increases in the VEGF levels in the remote

areas wholly devoid of MSCs. The MSC-treated heart contained clusters of resident cells positive for phospho-STAT3, the regulator of VEGF production. Human MSCs expressed higher mRNA levels of both VEGF and IL-6 family members than the human BM CD133+ progenitors, and secreted those factors *in vitro*.⁷ On this basis, we speculate that MSC-secreted factors, such as VEGF and IL-6, promote neovascularization both directly through endothelial proliferation and indirectly through activation of STAT3 in the resident cells.

Our previous study demonstrated that the safety and feasibility of the cell delivery via the coronary vein in a pre-clinical trial with the pig models.¹⁵ For the reasons explained below, we also selected coronary vein infusion as the route for MSC delivery into the myocardium in the present study. We did not, however, compare it with the other delivery methods (eg, intracoronary infusion and intramyocardial injection) in our hands. Intracoronary infusion of MSCs may cause distal embolization and consequent no-reflow phenomena. Freyman *et al*²⁹ reported that intracoronary MSC infusion impaired coronary flow distal to the infusion site in half of their treated pigs. Similar to this report, the intracoronary administration showed elevated cardiac enzymes and micro infarctions in dogs with normal coronary arteries.³⁰ Hoshino *et al*¹⁸ compared three methods for the injection of gelatin hydrogel microspheres, namely, antegrade injection, retrograde injection, and direct injection. The greatest number of microspheres was retained in the target area after the antegrade injection, but this method induced microinfarctions and failed to show any angiogenic effect. An increased coronary flow reserve was observed in the animals receiving retrograde injection and direct injection therapy, thus confirming the superior efficacy of these methods compared with antegrade injection. Importantly, retrograde injection was much less invasive than direct intramyocardial injection.

Coronary vein infusion of MSCs is a promising therapeutic strategy for the treatment and prevention of heart failure. Yet, the cell implantation failed to reduce cardiac fibrosis or achieve reverse remodeling in this study. Further studies in large animals to explore the methods to enhance or modify MSC function, such as gene transfer¹¹ and pharmacological preconditioning,³¹ will be necessary.

Taken together, our results show that MSC implantation via the coronary vein is feasible and prevents cardiac contractile dysfunction in ischemic cardiomyopathy of pigs. The mechanism behind this benefit appears to be partly attributable to increased local expression of angiogenic factors such as VEGF and enhanced neovascularization in response to the cell implantation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms Matsuzaki for her technical assistance. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (to Y Iso).

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

1. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, *et al*. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:427–435.
2. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, *et al*. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210–1221.
3. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, *et al*. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141–148.
4. Janssens S, Dubois Ch, Bogaert J, *et al*. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *Lancet* 2006;367:113–121.
5. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, *et al*. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1199–1209.
6. Iso Y, Soda T, Sato T, *et al*. Impact of implanted bone marrow progenitor cell composition on limb salvage after cell implantation in patients with critical limb ischemia. *Atherosclerosis* 2010;209:167–172.
7. Iso Y, Spees JL, Serrano C, *et al*. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:700–706.
8. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, *et al*. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:11474–11479.
9. Lim SY, Kim YS, Ahn Y, *et al*. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model. *Cardiovasc Res* 2006;70:530–542.
10. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, *et al*. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:1128–1135.
11. Gnechchi M, He H, Liang OD, *et al*. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005;11:367–368.
12. Wolf D, Reinhard A, Seckinger A, *et al*. Dose-dependent effects of intravenous allogeneic mesenchymal stem cells in the infarcted porcine heart. *Stem Cells Dev* 2009;18:321–329.
13. Krause U, Harter C, Seckinger A, *et al*. Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart. *Stem Cells Dev* 2007;16:31–37.
14. Makkar RR, Price MJ, Lill M, *et al*. Intramyocardial injection of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2005;10:225–233.
15. Yokoyama S, Fukuda N, Li Y, *et al*. A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:24–34.
16. Baklanov DV, Moodie KM, McCarthy FE, *et al*. Comparison of transendocardial and retrograde coronary venous intramyocardial catheter delivery systems in healthy and infarcted pigs. *Catheter Cardiovasc Interv* 2006;68:416–423.
17. Thompson CA, Nasser BA, Makower J, *et al*. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1964–1971.
18. Hoshino K, Kimura T, De Grand AM, *et al*. Three catheter-based strategies for cardiac delivery of therapeutic gelatinmicrospheres. *Gene Ther* 2006;13:1320–1327.
19. Sato T, Suzuki H, Kusuyama T, *et al*. G-CSF after myocardial infarction accelerates angiogenesis and reduces fibrosis in swine. *Int J Cardiol* 2008;127:166–173.
20. Jimi T, Wakayama Y, Inoue M, *et al*. Aquaporin 1: examination of its expression and localization in normal human skeletal muscle tissue. *Cells Tissues Organs* 2006;184:181–187.

21. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, *et al*. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:3154–3157.
22. Whitney MJ, Lee A, Ylostalo J, *et al*. Leukemia inhibitory factor secretion is a predictor and indicator of early progenitor status in adult bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2009;15:33–44.
23. Hilfiker-Kleiner D, Limbourg A, Drexler H. STAT3-mediated activation of myocardial capillary growth. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:152–157.
24. Sano M, Minamino T, Toko H, *et al*. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 2007;446:444–448.
25. Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP, *et al*. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5780–5785.
26. Yoon YS, Uchida S, Masuo O, *et al*. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation* 2005;111:2073–2085.
27. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, *et al*. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 2005;66:543–551.
28. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, *et al*. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678–685.
29. Freyman T, Polin G, Osman H, *et al*. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:1114–1122.
30. Vulliamt PR, Greeley M, Halloran SM, *et al*. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004;363:783–784.
31. Amin AH, Abd Elmageed ZY, Nair D. Modified multipotent stromal cells with epidermal growth factor restore vasculogenesis and blood flow in ischemic hind-limb of type II diabetic mice. *Lab Invest* 2010;90:985–996.

ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)

—総則，原材料及び製造関連物質，製造工程に関する留意事項について—

早川 堯夫 (近畿大学薬学総合研究所所長)

青井 貴之 (京都大学iPS細胞研究所教授)

梅澤 明弘 (国立成育医療センター生殖医療研究部部長)

小澤 敬也 (自治医科大学医学部内科学講座血液学部門教授)

佐藤 陽治 (国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部第2室長)

澤 芳樹 (大阪大学大学院医学系研究科外科学講座教授)

松山 晃文 ((財)先端医療振興財団再生医療研究開発部門部門

長補佐)

大和 雅之 (東京女子医科大学先端生命医学研究所教授)

山中 伸弥 (京都大学iPS細胞研究所所長)

研究の経緯と視点

本研究の経緯については、本シリーズ第1報¹⁾において詳細に述べた。本稿ではそのうちヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関連の深い事項、特に総則、並びに製造方法のうち原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項についてその要約を述べる。

厚生労働省は平成20年度からヒト幹細胞の細胞・組織加工医薬品等への利用に関連した学問・技術の進歩、倫理上の重要ポイント、各種規制、国際動向等を調査・研究し、適切な安全性評価基準の作成や規制のあり方を検討することにより、ヒト幹細胞由来製品の実用化の推進を図ることを目的として厚生労働科学研究事業「ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究班(研究代表者：早川堯夫)」を立ち上げ、検討を行うこととした。

20年度中における研究結果から、ヒト間葉系幹細胞等を中心とする体性幹細胞、iPS細胞、ES細胞などに由来する製品の薬事法下での臨床応用に向けて、研究・開発、確認申請(治験開始[First-in-Man])、評価等を効率的、効果的、合理的に行う上で、必要と思われる技術、製造方法、特性解析方法、品質管理方法及び安定性評価に関する具体的留意事項、安全性及び有効性に関する各種データとしてどのようなものがあるかに関しては、これらの3種類の原料細胞それぞれに特化した形でまとめる方向性が打ち出された。

この方向性と科学的原則の一貫性という観点から、平成21年度の研究活動では、平成20年2月及び9月に通知された自己細胞・組織加工医薬品等全般に関する指針

「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第0208003号)(ヒト自己親指針)」²⁾をベースとして、ヒト(自己)体性幹細胞及びヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等に関するそれぞれの指針案(中間報告)^{3,4)}を作成した。また、平成20年9月に通知された同種細胞・組織加工医薬品等全般に関する指針「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第0912006号)(ヒト同種親指針)」⁵⁾をベースとして、ヒト(同種)体性幹細胞、ヒト(同種)iPS細胞及びES細胞加工医薬品等に関する指針案(中間報告)を作成し、公表した⁶⁾⁻⁸⁾(ヒトES細胞関連：再生医療9(1)：166-180, 2010)。平成22年度、これをベースにさらに諸外国での状況、その後の当該分野の進歩、さまざまな観点からの論議を踏まえて最終案を作成した。

以下に、ヒトES細胞を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件に関する指針案作成のもととなる、総則、並びに製造方法のうち原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項について提示した。本稿における提示と、他報における「最終製品の品質管理」⁹⁾及び「非臨床試験及び臨床試験関連留意事項」¹⁰⁾とを併せてヒトES細胞加工医薬品等に関する指針最終案となる。

分化能及び自己複製能が有限である体性幹細胞と比較した場合、ヒトES細胞はその幅広い多能性ゆえに、いままで入手が困難であった各種細胞を作製することのできる素材となることが期待され、またその無限の自己複製能ゆえに、ひとたび目的細胞への効率的分化誘導方法が確立すれば、再生医療に利用できる細胞を大量に、安定に供給することが可能となることが期待されている。最近米国では、再生医療におけるヒトES細胞の活用につい

て、治験開始の試みが具体的に成されるまでに至っている。しかし、ヒトES細胞が人の生命の萌芽であるヒト胚を滅失させて樹立されたものであること、また、すべての細胞に分化する可能性があること等の生命倫理上の問題が存在することから、ヒトES細胞の樹立・使用には慎重な配慮が必要とされる。

我が国ではヒトES細胞の樹立及び分配・使用においては、人の尊厳を侵すことのないよう、平成21年8月21日付け文部科学省告示第156号「ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針」及び告示第157号「ヒトES細胞の使用に関する指針」を遵守することが求められている。これら2指針では個人情報の保護やヒトES細胞の樹立・使用目的の要件など、生命倫理上の観点から遵守すべき基本的な事項が定められている。これら2指針によれば、ヒト受精胚を用いたヒトES細胞の樹立及び使用は「ヒトの発生、分化及び再生機能の解明」又は「新しい診断法、予防法若しくは治療法の開発又は医薬品等の開発」に資する基礎的研究を目的とする場合に限定されている。

「新しい診断法、予防法若しくは治療法の開発又は医薬品等の開発」に資する基礎的研究の出口とは治療法の開発や医薬品等の開発に他ならない。そこで本指針では、そのような出口からみた製品開発のあり方を想定して、ES細胞の樹立から製品の品質及び安全性確保上の留意事項を明らかにするべく作成された。

現実的なことを考慮すると、本研究班が目指す指針案が対象とできるものは当面、既に存在するES細胞由来分化細胞を加工して製造された医薬品等になる可能性が高い。しかし、将来的にヒトES細胞を新たに樹立して医薬品等の製造を意図する場合も当然考えられる。ヒトES細胞を細胞・組織加工医薬品等の原材料となる細胞の供給源として捉えた場合、最終製品の品質・安全性確保の観点から必要とされる原材料の特性・適格性等に関する情報は、原則的には「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(薬食発第0912006号)」に示されているものと同等のものがあることが望ましい。しかし、文部科学省告示第156・157号と薬食発第0912006号とはそもそも立脚する観点が異なるため、前者2指針を遵守して受精胚提供者の個人情報

を十分に保護した場合、後者の指針で必要とされる原材料の情報のすべてを得ることが不可能となる等の問題も想定される。また、ヒト受精胚からES細胞株樹立を経て分化細胞株を作製する基礎的研究の段階に關与する不妊治療や基礎的研究の現場に、臨床応用を見据えた医薬品等製造レベルの品質管理を求めることは困難であるという問題もある。今回の指針案の目的・趣旨はこれらの課題の解決策のすべてを提供しようとするものではない。

今回の指針案はあくまで、関係者がヒトES細胞を新たに樹立して医薬品等の製造を意図する場合に、なすべきこと、課題を乗り越え、目標に達成するために留意すべき方策や事項を示したものである。ちなみに本指針案では、医薬品等の製造までを想定又は意図していることの趣旨に関する説明と同意をドナーに徹底して行った上で第2章製造方法、第1項原材料及び製造関連物質、1体外受精胚に記載された必要情報が可能な限り提供できるよう措置し、さらに連結不可能匿名化を行い、しかる後、同第2章、第1項の3ヒトES細胞株及びヒトES細胞株由来分化細胞株の記載に準拠して適切な方策を講じ、その妥当性について説明する必要があるとしている。これは、文部科学省告示の2指針をふまつつ、基礎的研究が医薬品等製造面で必要とされる情報の取得にも配慮して遂行されれば、その過程において樹立されたヒトES細胞由来分化細胞株を医薬品等原材料として受け入れられることを示し、基礎から実用化への橋渡しを図ろうとする方策である。なお、ヒトクローン胚を用いて樹立(第二次樹立)されたES細胞の使用は、多くの議論を要する考えたので本指針案では適用外とした。

生物起源の医薬品等(バイオリジクス)は、原材料において非特定起源からの由来や複雑さのために品質特性解析及び管理が必ずしも必要十分にはなし得ず、最終製品においても量的制約や複雑な品質特性のために、必要十分な管理ができないことが多い。それらを補完する上で、あらゆるバイオリジクスに通底する最も重要な概念及び方策は、製造工程の一定性・恒常性を確保するということである。その中核をなす最も重要な要素は、全工程のある段階において、最も徹底した品質特性解析及び管理が可能で、次の段階へのステップを常に確実にかつ安定

して進行させ、ゴールとしての最終製品に向かうことを可能にするベースキャンプたる医薬品等製造基材である。

細胞・組織加工医薬品等の安定的な製品製造における最も理想的なベースキャンプは、十分に解析され、安定で、増殖性を有し、更新も、安定供給も可能で、かつ目的細胞に適切に分化できる細胞(バンク)や中間細胞株である。ある製品においては、原材料段階での困難な検討や解析結果にウエイトをおくよりも、中間製品としての細胞株(中間細胞株:バンク)を適切に、確実に樹立することが、安全な最終目的製品を安定的に製造する上で重要であり、むしろ科学的にも合理的な場合がある。もちろん、そのような方策を選択した場合は、その利点と妥当性を説明しておく必要がある。その際、別の表現型を示す細胞株を段階的に樹立する際は、それぞれの細胞株樹立までの方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養及び株化の方法、細胞株樹立までの各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等)を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにする必要がある。このような中間細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種特性指標(細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、分化能など)のうちから重要指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示す必要がある。

本指針では、体外受精胚から始まり、最終のヒト ES 細胞加工医薬品等に至る製造方法について、留意すべき事項を挙げ、必要な情報を明らかにすることを求めている。これらの情報等は、最終目的製品の品質や安全性等の確保に資するとともに、品質の恒常性を製造方法面から保証するために重要なものである。しかし、品質・安全性やその恒常性確保は、製造方法全体で相互補完的方策により達成され、その方策が合理的で合目的性に叶うことが最も肝要である。したがって、上述したようにバンクや中間製品、さらには最終製品における品質試験や管理あるいは製造過程における管理において、品質や安全性及びその恒常性の確保という目的が達成されるのであれば、その科学的妥当性を明示した上で指針に列挙された措置や情報の一部を省略しても差し支えないともしてい

る。その意味で、ES細胞由来分化細胞株あるいはそれ以外のベースキャンプたる医薬品等製造基材(中間細胞株等)の徹底解析と管理、以降の目的最終製品に向けての製造工程の一定性・恒常性が確保されていれば、科学的な観点からみる限り、より上流の情報に関しては、必ずしも全てが充たされなければならないというものではない。

ES細胞由来製品においては、最終製品における未分化細胞の存在が異所性組織形成や腫瘍形成・がん化の可能性など安全性上の重要な関心事である。これはES細胞の最大の特徴の裏返しであり、ES細胞のレベルで、これに対策を講ずることは、きわめて困難であると考えられる。ES細胞を特徴できる固有の内因性な要素を取り除くことは原理的に二律背反であり、困難であると考えられる。したがって、将来的にはES細胞レベルでの安全性を主題にするのではなく、製造工程や工程管理を工夫することにより、より安全性の高い最終製品を創出する戦略や戦術が大きな意味を持つてくるのではないかと考えられる。それ故、本指針案では、可能な限り、セル・バンクや中間製品段階等での徹底的な解析により、混在の可能性を否定するか、あるいは、目的細胞から未分化細胞の効果的分離・除去法や不活化法の開発、適用により、混在の可能性を最小限にする努力を求めている。さらに、投与経路等の選択も安全性上の懸念を最小限にするための有用な方策であることも示唆している。ES細胞からより安全、安定、特性が明確で、適切な原材料となり得る任意の体性幹細胞の作製を可能にする技術や品質・特性解析技術の開発研究の重要性にも言及している。個々の細胞由来ES細胞の多能性や分化できる細胞の種類を予め見極める「検査技術」や、効率よく確実に目的とする細胞に分化誘導したり、分化細胞を未分化細胞から分離する「加工技術」の研究開発は、新たなビジネスチャンスを生むことになると考えられる。

本指針案を作成するに当たっては、以上のようなES細胞をめぐる課題も盛り込むことにした。一般の体性幹細胞以上に多分化能を有し、かつ自己複製能力を維持しているES細胞から加工した製品は、加工内容や適用部位に応じて、元来の細胞とは異なり、また、存在していた、

あるいは存在すべきであった細胞環境とは異なる状態のものとして臨床上適用される可能性が高い。これらの点に関する留意事項がベースとなった「ヒト同種親指針：薬食発第0912006号」に付加された部分である。

なお、本指針を解釈し、運用していくにあたって、前提と考えるべきことがある。本来の目的は再生医療という新たな医療によって病に苦しむ患者さんが救われる機会を提供することである。指針の役割は、最も効率的、効果的に所定の目標に達するための要素と方策の提示である。指針にはさまざまな事態、状況を想定して、網羅的に留意事項が記述されているが、これらは、細胞の特性や臨床目的、適用法等によって取捨選択されるべきものであり、また適用項目についても適切、柔軟に解釈・運用すべきものである。新たな治療法への可能性が期待できること(Proof of Concept: POC)、ヒトに初めて適用しても差し支えない程度に既存の知見の中で想定し得る安全性上の問題がクリアされていること、倫理的妥当性の

確保・堅持(ヘルシンキ宣言遵守、ドナー/患者に対する徹底的な説明と同意や自己決定権が前提)は当然であるが、手段である指針への遵守が主となり、他に代え難い患者さんへの医療機会の提供という目標が従になるような解釈や運用は本末転倒であり、避けなければならない。

再生医療実用化の推進が、国民の保健衛生の維持・向上のために重要課題であることは、自明の理である。革新的医薬品等や医療技術の開発は、国(民)益に叶い、国際益(公衆衛生益)にもなる。人類共通の遺産の創出という平和的な国際貢献に繋がるからである。ここにおける国の役割は、臨床研究や産業化推進のアシスト役であり、規制や指針はこうした共通のゴールに向かって科学的、合理的、効率的、効果的に進むための方策である。全関係者は同じピッチに立ち、共にゴールに向かうプレーヤーであり、英知を結集して、より早く患者さんのもとに画期的な細胞・組織加工医薬品等や革新的医療技術が届けられるよう、より高い達成度を目指して努力する必要がある。

ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)

—総則、原材料及び製造関連物質、製造工程に関する留意事項について—

はじめに

1 本指針は、ヒト由来の胚性幹細胞(ES細胞)を加工した医薬品又は医療機器(以下「ヒトES細胞加工医薬品等」という)の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めるものである。

しかしながら、本指針は、当面、既に存在するES細胞由来分化細胞を主たる医薬品製造基材として、これを加工して製造された医薬品等に適用されることを想定している。将来的にヒトES細胞を新たに樹立して医薬品等の製造を意図する場合には、その趣旨に関する説明と同意をドナーに徹底して行った上で第2章製造方法、第1項原材料及び製造関連物質、1体外受精胚に記載された必要情報が可能な限り提供できるよう措置し、さらに必要に応じて連結不可能匿名化等を行い、しかる後、同第2章、第1項の3ヒトES細胞株及びヒトES細胞株由来分化細胞株の記載に準拠して適切な方策を講じ、その妥当性について説明する必要がある。なお、ヒトES細胞加工医薬品等は、その種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、また、本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩である。本指針を

一律に適用したり、本指針の内容が必要事項すべてを包含しているともなしたりすることが必ずしも適切でない場合もある。したがって、個々の医薬品等についての試験の実施や評価に際しては本指針の目的を踏まえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応することが必要であること。

2 平成11年7月30日付け薬発第906号厚生省医薬安全局長通知「細胞・組織を利用した医療用具又は医薬品の品質及び安全性の確保について」による確認申請時点における本指針への適合性の確認の趣旨は、当該ヒトES細胞加工医薬品等の治験を開始する(First-in-Man)に当たって支障となる品質及び安全性上の問題が存在するか否かの確認にある。(薬事戦略相談等におけるヒト体性幹細胞加工医薬品等の治験を開始する[First-in-Man]に当たっての基本的留意点は、当該製品にヒトへの適用により支障となる品質及び安全性上の明らかな問題が存在するか否か、臨床で得られた知見との関係性を照合できる程度に品質特性が把握され、その一定範囲の恒常性が確保されているか否かを確認することにある。)その際、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥

当性を明らかにした上で、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことによりQOLを著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない「患者が新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるとする視点をもち、ことも重要である。したがって、確認申請(治験開始(First-in-Man))の場合、その申請に当たって添付すべき資料について本指針に示された要件や内容をすべて満たすことを必ずしも求めている訳ではない。製造販売承認申請時における品質及び安全性の確保のための資料は治験の進行とともに本指針に沿って充実整備されることを前提に、確認申請では、当該(治験開始(First-in-Man))時点でその趣旨に適合する条件を満たし、合理的に作成された適切な資料を提出すること。

また、確認(治験開始(First-in-Man))に必要なとされる資料の範囲及び程度については、当該製品の由来、対象疾患、対象患者、適用部位、適用方法及び加工方法等により異なり、本指針では具体的に明らかなでないことも少なくないので、個別に独立行政法人医薬品医療機器総合機構に相談することが望ましい。

3 本指針に記述された事項、試験方法、基準その他の技術要件は、それぞれの目的に適合する内容と程度をもとに考慮、選択、適用、及び評価されるべきことを意図しており、必ずしも常に同一(最高)水準での解釈、運用を求めている訳ではない。この趣旨を踏まえ、申請者は、考慮した背景、選択、適用、及び評価した内容と程度がそれぞれの目的に相応しく、科学的合理性からみて妥当であることを明らかにすること。

第1章 総則

第1 目的

本指針は、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)を加工した医薬品又は医療機器(以下「ヒトES細胞加工医薬品等」という)の品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めるものである。

第2 定義

本指針における用語の定義は以下のとおりとする。

1 「ヒト胚性幹細胞」とは、ヒト胚から採取された細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、胚でないもののうち、多能性(内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞に分化する性質をいう。)を有し、かつ、自己複製能力を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるものをいう。

2 「細胞・組織の加工」とは、疾患の治療や組織の修復又は

再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖・分化、細胞の株化、細胞の活性化等を目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、非細胞成分との組み合わせ又は遺伝子工学的改変等を施すことをいう。

組織の分離、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等は加工とみなさない。

3 「製造」とは、加工に加え、組織の分離、組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離、抗生物質による処理、洗浄、ガンマ線等による滅菌、冷凍、解凍等、当該細胞・組織の本来の性質を改変しない操作を含む行為で、最終製品であるヒトES細胞加工医薬品等を出荷するまでに行う行為をいう。

4 「表現型」とは、ある一定の環境条件のもとで、ある遺伝子によって表現される形態学的及び生理学的な性質をいう。

5 「HLAタイピング」とは、ヒトの主要組織適合性抗原型であるHLA(ヒト白血球抗原)のタイプを特定することをいう。

6 「ドナー」とは、ヒトES細胞加工医薬品等の原料となる細胞を提供するヒトをいう。精子と未受精卵の提供者がドナーである。

7 「遺伝子導入構成体」とは、目的遺伝子を標的細胞に導入するための運搬体、目的遺伝子及びその機能発現に必要な要素をコードする塩基配列等から構成されるものをいう。

第2章 製造方法

製造方法について、下記の事項に留意し、必要な情報を明らかにすること。これらの情報等は、最終目的製品の品質や安全性等の確保に資するとともに、品質の恒常性を製造方法から保証するために重要なものである。しかし、品質・安全性やその恒常性確保は、製造方法全体で相互補完的方策により達成され、その方策が合理的で合目的性に叶うことが最も肝要である。したがって、最終製品や中間製品における品質試験や管理あるいは製造過程における管理において、品質や安全性及びその恒常性の確保という目的が達成されるのであれば、その科学的妥当性を明示した上で下記の措置や情報の一部を省略しても差し支えない。

第1 原材料及び製造関連物質

1 体外受精胚

(1) 起源及び由来、選択理由

ヒトES細胞株の樹立に使用する体外受精胚の起源及び由来について説明し、当該体外受精胚を選択した理由を明らかにすること。

(2) 体外受精胚の特性と適格性

①生物学的構造・機能の特徴と選択理由

体外受精胚について、その生物学的構造・機能の特徴を、例えば、形態学的特徴、増殖特性、その他適切な指標から適宜選択して示し、当該体外受精胚を原料として選択した理由を説明すること。

②ドナーの選択の倫理的妥当性

本指針発効以降に、臨床利用を目的として新たにヒトES細胞株を樹立する場合には、ドナーの選択が倫理的に適切に行われ、かつ適切な手続きで行われたことを、体外受精卵提供機関における倫理審査委員会の審査過程記録等によって示すこと。本指針発効よりも前に樹立されているヒトES細胞株に関しては、ドナーの選択が倫理的に適切に行われ、かつ適切な手続きで行われたことを、ヒトES細胞加工医薬品等の製造者の責任において明確にすること。

③ドナーの選択基準、適格性

年齢、性別、遺伝的特徴、病歴、健康状態、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症に関する検査項目、免疫適合性等を考慮して、選択基準、適格性基準を定め、その妥当性を明らかにすること。ドナーのゲノム・遺伝子解析を行う場合は、平成16年12月28日全部改正文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従うこと。

感染症に関連しては、特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病(HTLV)、パルボウイルスB19感染症については、問診及び検査(血清学的試験や核酸増幅法等)により否定すること。また、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染及びウエストナイルウイルス感染については必要に応じて検査により否定すること。

この他、次に掲げるものについては既往歴の聴取、問診等を行うとともに、輸血、移植医療を受けた経験の有無等からドナーとしての適格性を判断すること。

- ・梅毒トレポネマ、クラミジア、淋菌、結核菌等の細菌による感染症
- ・敗血症及びその疑い
- ・悪性腫瘍
- ・重篤な代謝及び内分泌疾患
- ・膠原病及び血液疾患
- ・肝疾患
- ・伝達性海綿状脳症及びその疑い並びにその他の認知症
- ・特定の遺伝性疾患や家族歴

なお、ドナー情報について体外受精胚と連結不可能匿名化がなされている場合には、可能な範囲で上記③の選択基準・適格性基準に関するドナーの情報を収集すること。しかし、特定の遺伝的特徴や各種感染症に関する調査等でES細胞由来分化細胞あるいはそれ以降の段階で行うことが可

能で、かつ倫理的妥当性及び科学的合理性からみてより適切な項目については、その妥当性を明示した上で、ES細胞由来分化細胞の段階での検討に委ねてもよい。

ES細胞由来分化細胞を原材料とした場合は、当該細胞について可能な限り、上記に関する情報を収集すること。また、さらに分化が進んだ段階(中間製品)において、上記に関する検討を行い、妥当性を示すことでも良い。

いずれにしても、原材料あるいは中間製品の適切などこの段階で徹底解析すること及びその妥当性を明らかにすることが肝要である。

(3) ドナーに関する記録

体外受精胚について、安全性確保に必要な情報が確認できるよう、可能な限りドナーに関する記録が整備、保管されていること。また、可能な範囲で情報提供の具体的方策を示すこと。

(4) 配偶子の採取・体外受精胚の作製及び保存・運搬

ヒトES細胞株樹立のために使用する配偶子の採取・体外受精胚の作製及びこれらの保存・運搬については以下の①～⑧に従うこと。ヒトES細胞株の樹立及び分配は、平成21年8月21日付文部科学省告示第156号「ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針」に準じて行うものとする。ヒトES細胞はヒト体外受精胚を用いて樹立(第一次樹立)されたものであること。なお、ヒトクローン胚を作成し、作成したクローン胚を用いて樹立(第二次樹立)されたES細胞については使用しないこと。また、「体内受精胚」も使用しないこと。

①採取者及び採取医療機関等の適格性

ヒト体外受精胚を作製して使用する場合には男性及び女性配偶子の採取者及び採取医療機関等に求めるべき技術的要件について、明らかにすること。

②受精胚の作製方法の妥当性

体外受精胚の作製方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選択され、かつ適切な手続きが行われたものであることを明らかにすること。配偶子の採取方法、及び体外受精の方法については、用いられる器具及び薬剤、微生物汚染防止、取り違えやクロスコンタミネーション防止のための方策等を具体的に示すこと。

③ドナーに対する説明及び同意

配偶子のドナーに対する説明及び同意の内容を、臨床利用も含めて規定すること。

④ドナーの個人情報の保護

ドナーの個人情報の保護方策について具体的に規定すること。

⑤ドナーの安全性確保のための試験検査

配偶子の採取時にドナーの安全性確保のために採取部位の状態の確認など試験検査を行わなければならない場合には、その内容、検査結果等に問題があった場合の対処法に

ついて具体的に規定すること。

⑥保存方法及び取り違い防止策

採取した配偶子，もしくは作製した体外受精胚を一定期間保存する必要がある場合には，保存条件や保存期間及びその設定の妥当性について明らかにすること。また，取り違いを避けるための手段や手順等については，平成21年2月20日付け雇児母発第0220001号通知厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知「不妊治療における安全管理の徹底について」等を参考にし，その内容を具体的に説明すること。

⑦運搬方法

採取した配偶子，もしくは作製した体外受精胚を運搬する必要がある場合には，運搬容器，運搬手順(温度管理等を含む。)を定め，その妥当性について明らかにすること。

⑧記録の作成及び保管方法

①～⑦に関する事項について，実施の記録を文書で作成し，適切に保管する方法について明らかにすること。

ES細胞由来分化細胞を原材料とした場合は，当該細胞について可能な限り，上記に関する情報を収集することで良い。

2 体外受精胚，既存のES細胞及びES細胞由来分化細胞以外の原材料及び製造関連物質

体外受精胚，既存のES細胞及びES細胞由来分化細胞以外の原材料及び製造関連物質を明らかにし，その適格性を示すとともに，必要に応じて規格を設定し，適切な品質管理を行うことが必要である。

なお，生物由来製品又は特定生物由来製品を原材料として使用する場合は，その使用量を必要最小限とし，「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示第210号)をはじめとする関連法令及び通知を遵守すること。特に，ウイルス不活化及び除去に関する情報を十分に評価する必要があるほか，遡及調査等を確保する方策についても明らかにすること。

(1) 細胞の培養を行う場合

①培地，添加成分(血清，成長因子及び抗生物質等)及び細胞の処理に用いる試薬等のすべての成分等についてその適格性を明らかにし，必要に応じて規格を設定すること。各成分等の適格性の判定及び規格の設定に当たっては，最終製品の適用経路等を考慮すること。

②培地成分については，以下の点に留意すること。

ア 培地に使用する成分及び水は，可能な範囲で医薬品又は医薬品原料に相当する基準で品質管理されている生物学的純度の高い品質のものを使用すること。

イ 培地に使用する成分は主成分のみでなく使用するすべての成分について明らかにし，選択理由及び必要に応じて品質管理法等を明確にすること。ただし，培地の

構成成分が周知のもので，市販品等が一般的に使用されているDMEM，MCDB，HAM，RPMIのような培地は1つのものと考えてよい。

ウ すべての成分を含有した培地の最終品については，無菌性及び目的とした培養に適していることを判定するための性能試験を実施する必要がある。その他，工程管理上必要と思われる試験項目を規格として設定し，適切な品質管理を行う必要がある。

③異種血清及び異種もしくは同種の血清に由来する成分については，細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと。特に繰り返して使用する可能性のある製品では可能な限り使用を避けるよう検討すること。血清等の使用が避けられない場合には，以下の点を考慮し，血清等からの細菌，真菌，ウイルス及び異常プリオン等の混入・伝播を防止するとともに，最終製品から可能な限り除去するよう処理方法等を検討すること。

ア 血清等の由来を明確にすること。

イ 牛海綿状脳症発生地域からの血清を極力避ける等感染症リスクの低減に努めること。

ウ 由来動物種に特異的なウイルスやマイコプラズマに関する適切な否定試験を行い，ウイルス等に汚染されていないことを確認した上で使用すること。

エ 細胞の活性化，増殖に影響を与えない範囲で細菌，真菌及びウイルス等に対する適切な不活化処理及び除去処理を行う。例えば，潜在的なウイルス混入の危険性を避けるために，必要に応じて加熱処理，フィルター処理，放射線処理又は紫外線処理等を組み合わせて行うこと。

オ 培養細胞でのウイルス感染のモニター，患者レベルでのウイルス性疾患の発症に対するモニター及び異種血清成分に対する抗体産生等の調査のために，使用した血清の一部を保管すること。

④フィーダー細胞を使用する場合には，平成12年7月14日付け医薬審第873号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基材の由来，調製及び特性解析」，平成14年7月9日付け医政研発第0709001号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知「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」及び平成16年7月2日付医政研発第0702001号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知「「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3T3J2株及び3T3NIH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」を参考にし品質評価を行い，フィーダー細胞からの細菌，真菌，ウイルス，異常プリオン等の混入・伝播を防止するとともに，使用時の分裂能不活化方法及び細胞密度等の条件について明らかにすること。ただし，例えば既に臨床使用されてい