



Table 1 | Telomere length measurement for iPS cells

Cell	Metaphase No. of Metaphase Spreads Examined	Mean Values of Median TFI	Sample TFI/Control TFI	Telomere Length (kbp)
AT1OS	4	5187	0.598	4.13
ATiPS-262	8	16495	1.902	13.14
TIG-1	5	8671	1.000	6.91
ATiPS-264	12	17539	2.263	15.64
TIG-1	7	7751	1.000	6.91
ATiPS-024	14	17654	2.393	16.54
TIG-1	10	7378	1.000	6.91

Telomere length of TIG-1 cells at 34 population doublings is 6.91 kbp.
TFI: Telomere Fluorescence Intensity.

0.5 Gy, the phosphorylation of ATM increased in MRC5-iPS cells. In contrast, ATM protein was undetectable in the non-irradiated state, and was barely induced and phosphorylated in AT-iPS cells even after irradiation.

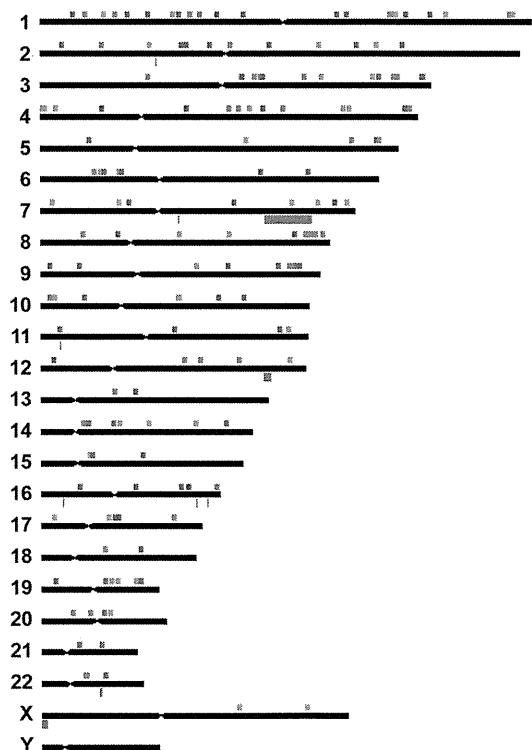
Two days after X-ray irradiation, cell number was measured in four independent AT-iPS cell clones and three MRC5-iPS cell clones to estimate growth retardation and cell survival (Figure 5B,

Supplemental Figure S7A). All AT-iPS clones exhibited markedly lower survival rates than those of MRC5-iPS clones at all different doses examined. At the low dose of irradiation (0.5 Gy), cell growth curve profiles showed that AT-iPS cell growth decreased between day 5 and day 7 post-irradiation, but recovered their proliferation rate at day 8 (Figure 5C). AT-iPS cells exhibited higher sensitivity morphologically to irradiation, compared with MRC5-iPS cells

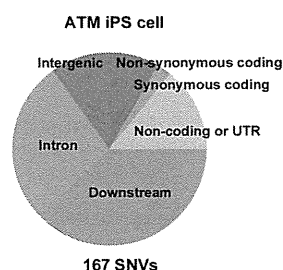
A

iPS cell	hg19	Start coordinate	Stop coordinate	Length	Type of CNV
ATiPS-262	chr7	113745701	137059416	23,314 kb	CNLOH
ATiPS-262	chr12	113139939	116725911	3,586 kb	Loss
ATiPS-262	chr16	11181244	11965741	784 kb	Gain
ATiPS-262	chr22	29314636	30374281	1,060 kb	Gain
ATiPS-263	chrX	154939018	155234707	296 kb	Loss
ATiPS-263	chrX	43118	2697868	2,655 kb	Gain
ATiPS-264	chr7	69798648	70137481	339 kb	Loss
ATiPS-264	chr11	9910728	10290923	380 kb	Loss
ATiPS-264	chr16	83853095	84103302	250 kb	Gain
ATiPS-024	chr2	58193774	58830445	637 kb	Gain
ATiPS-024	chr16	78402908	78624007	221 kb	Loss
ATiPS-024	chr16	82835886	83069631	234 kb	Loss

B



C



D

Ancestral \ Altered	T	C	A	G
T	-	17	9	7
C	21	-	15	8
A	8	4	-	19
G	24	11	24	-

Each number shows single nucleotide changes from a left base to a top base.

Figure 4 | Genomic alterations in AT-iPS cell cultivation. (A). Structural alterations identified by a comparison between parental AT1OS cells and AT-iPS cells. (B). Genome-wide distribution of SNVs identified in the AT-iPS cells. Filled squares above a chromosomal bar stand for genomic position of each SNV. Orange, yellowish green, and blue squares indicate alteration events occurred in the ATiPS-262, ATiPS-263, ATiPS-264, and ATiPS-024 iPS cells, respectively. A 23-Mb copy-neutral LOH region on chromosome 7 (ATiPS-262), a 3.6-Mb deletion on chromosome 12 (ATiPS-262), and a 0.23-Mb deletion on chromosome 16 (ATiPS-024) involved 2, 37, and 1 nucleotide mismatches detected during the course of our exome analysis, respectively. (C). Pie chart illustrating the ratio of protein-coding and non-coding sequences. Our exome analysis targeted 93,907,534 bases in the genome, and 30,331,579 bases within them are considered coding sequences, start or stop codons. Covering large part of non-coding sequences was one of features of the present exome study. Note that numbers of non-synonymous coding bases are larger than those of synonymous coding bases in the AT-iPS cells. Annotations were performed using SnpEff 3.1 (http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff_manual.html). For example, if a variation was positioned within 5 kb from the 3' end of a gene, it was annotated as "downstream." (D). Single nucleotide change patterns observed in AT-iPS cells.

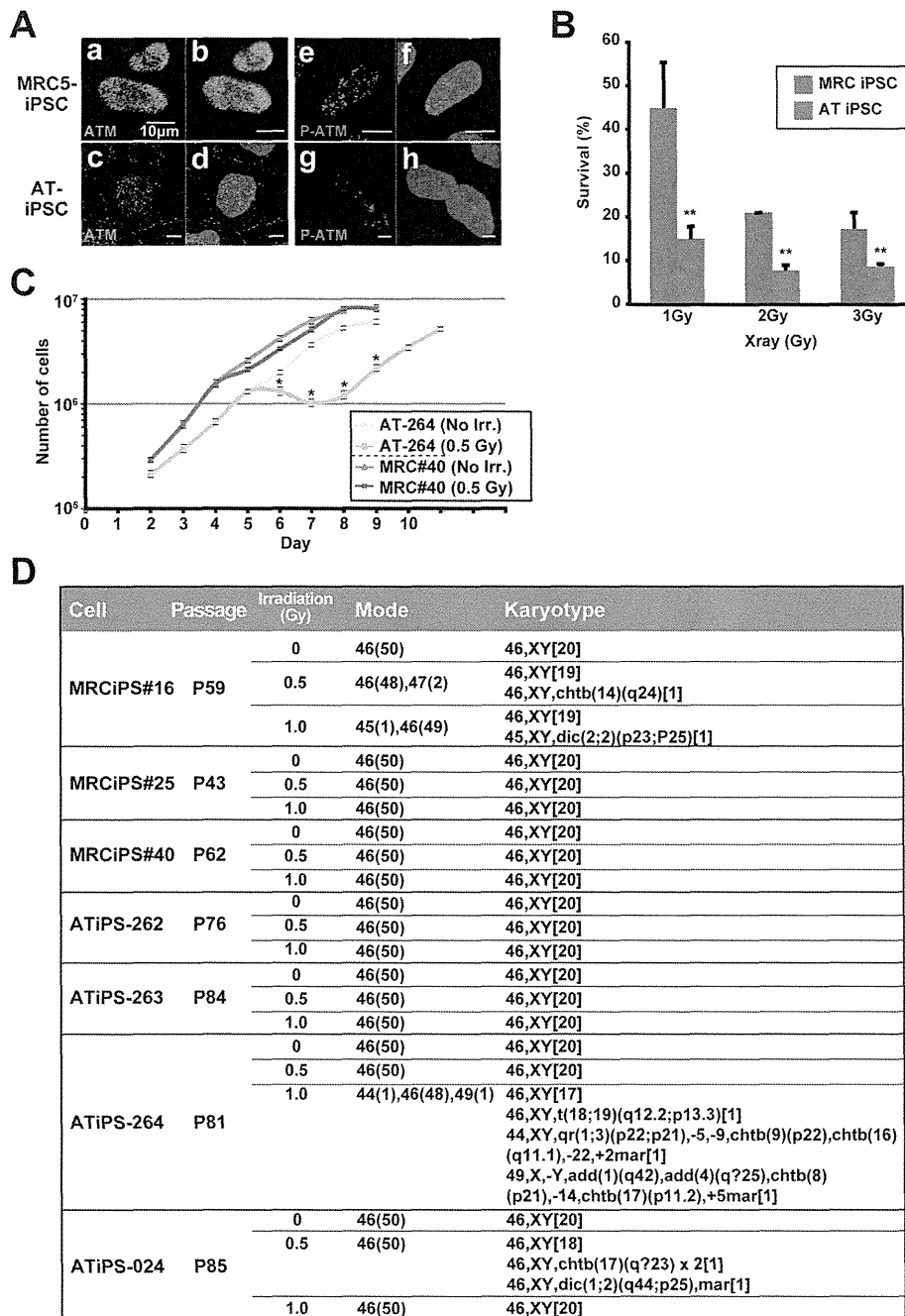


Figure 5 | Effect of X-ray irradiation on AT-iPS cells. (A). Immunocytochemistry of ATM (a and c: green) and phosphorylated ATM (e and g: red, labeled as P-ATM). AT-iPS (ATiPS-262) and MRC5-iPS (MRCiPS#16) cells were analyzed at 5 min after 0.5-Gy irradiation. (a), (b), (e) and (f): MRC5-iPS cells; (c), (d), (g) and (h): AT-iPS cells (ATiPS-262). (b) and (d): Merge of ATM and DAPI stain; (f) and (h): Merge of phosphorylated ATM and DAPI stain. (B). Dose effect of irradiation on AT-iPS cells (ATiPS-262, -263, -264, -024) and MRC5-iPS cells (MRCiPS#16, #25, #40). Frequencies of viable cells were calculated from the cell number on 2 days after irradiation at the indicated doses to estimate growth retardation and cell survival. Data for AT-iPS and MRC5-iPS cells were obtained from the quadruplicate and triplicate independent experiments, respectively. Nonirradiated cells were regarded as equal to 100%. Asterisks (**) denote statistically significant with $p < 0.01$ by student's t-test (1 Gy, $p = 1.2 \times 10^{-3}$; 2 Gy, $p = 5.1 \times 10^{-6}$; 3 Gy, $p = 2.8 \times 10^{-3}$). (C). Effect of irradiation on growth of AT-iPS and MRC5-iPS cells. iPS cells were irradiated at 0.5 Gy on Day 4. Cell number was calculated at the indicated days after cells (10^5) were seeded on Day 0. Non-irradiated (No Irr.) iPS cells were also shown for control. Asterisks (*) denote statistically significant between irradiated and nonirradiated cells with $p < 0.01$ by student's t-test (Day 6, $p = 3.2 \times 10^{-4}$; Day 7, $p = 6.1 \times 10^{-6}$; Day 8, $p = 3.8 \times 10^{-6}$; Day 9, $p = 9.9 \times 10^{-7}$). (D). Irradiation effect on karyotypes of AT-iPS cells. Mode: 50 cells were analyzed for chromosomal aneuploidy. Number of cells with each chromosomal number is shown in Parentheses. Karyotype: For karyotypic analysis, 20 cells were analyzed and the number of karyotype was shown in brackets.

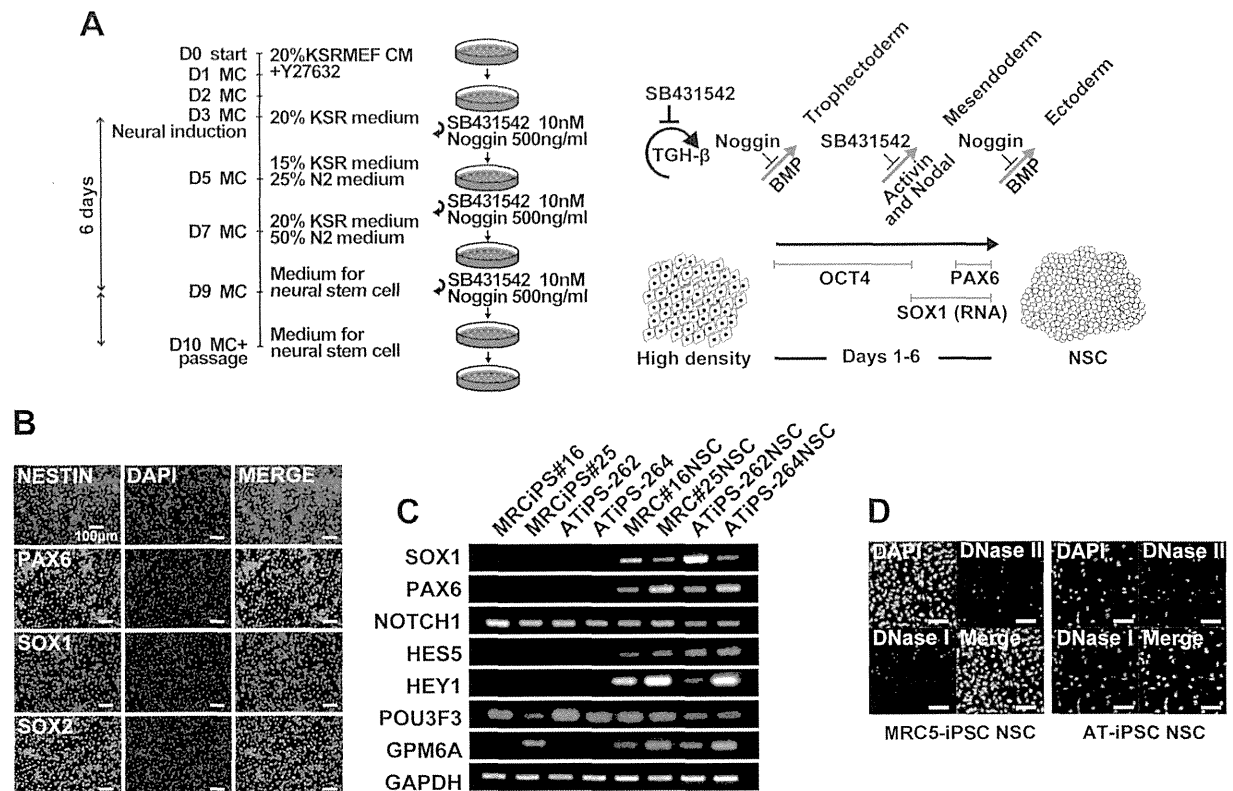


Figure 6 | Neural differentiation of AT-iPS cells. (A). Protocol for neural induction of AT-iPS cells. Neural differentiation of iPS cells was performed according to the standard protocol³⁷. MC: Medium change. (B). Immunocytochemistry of AT-iPS cells (ATiPS-262). (C). RT-PCR analysis on AT-iPS cells (ATiPS-262, ATiPS-264) and MRC5-iPS cells (MRCiPS#16, MRCiPS#25) after neural differentiation. Primers are listed in Supplemental Table S1. (D). Apoptosis of AT-iPS cells after neural differentiation. Apoptosis was detected by the ApopTag ISOL Dual Fluorescence Apoptosis Detection Kit (DNase Types I & II) APT1000 (Millipore). Left panels: neural differentiation of MRC5-iPS cells (MRCiPS#25), right panels: neural differentiation of AT-iPS cells (ATiPS-262).

(Supplemental Figure S7B, C). These results indicate that AT-iPS cells have higher radiation sensitivity than the intact iPS cells when growth characteristics are considered.

Karyotypic analyses of AT-iPS cells and MRC5-iPS cells were performed after X-ray irradiation, and did not reveal any significant difference in the radiation sensitivity. Most cells analyzed showed an intact chromosomal pattern even after longer cultivation (ATiPS-264: Passage 81 and 20 months, ATiPS-024: Passage 86 and 22 months). Only low frequencies of chromosomal abnormalities such as chromosomal loss and amplification, deletion, and translocation were detected in AT-iPS cells; MRC5-iPS cells showed similar results (Figure 5D).

Neural differentiation of iPS cells. Since one of the most common symptoms in patients with ataxia telangiectasia is neural impairment, we investigated neural differentiation of AT-iPS cells (ATiPS-262 and -264) and MRC5-iPS cells (MRCiPS#16 and #25) (Figure 6A). AT-iPS cells exhibited neural phenotypes by morphological analysis, immunocytochemistry (Figure 6B), and RT-PCR analysis (Figure 6C, Supplemental Figure S8), and no significant difference between AT-iPS cells and MRC5-iPS cells were detected. However, apoptosis significantly increased after neural differentiation of AT-iPS cells, compared with MRC5-iPS cells (Figure 6D). We obtained consistent results from all iPS cells examined.

Discussion

Human pluripotent stem cells deficient for the ATM gene have successfully been generated in two ways: Disruption of the ATM gene in

human ES cells by genetic manipulation with bacterial artificial chromosome and derivation of disease-specific iPS cells from patients with ataxia telangiectasia^{11–13}. The ATM-deficient pluripotent stem cells serve as disease model cells for clarification of pathogenic mechanisms and for screening novel compounds to treat the disease. In this study, we generated iPS cells from fibroblasts (ATiPS) of a human AT patient, and compared them with those from a healthy donor. The AT-iPS cells exhibited the same proliferation activity as wild type-iPS cells (WT-iPS cells), a gene expression profile characteristic of pluripotent stem cells such as ES cells and WT-iPS cells, the capability to differentiate into all three germ layers, and hypersensitivity in growth characteristics to X-ray irradiation. Apoptosis could be induced upon neural differentiation of AT-iPS cells. These results indicate that the established cells kept both characteristics of pluripotent stem cells and ATM-deficient cells.

Though normal ATM function was not a prerequisite for the establishment and maintenance of iPS cells, the reprogramming efficiency of the fibroblasts derived from an AT patient was extremely low, suggesting indirect roles of ATM in the somatic reprogramming process. One of the major targets of ATM is p53¹⁴, and ATM-dependent phosphorylation is directly responsible for p53 activation. ATM and p53 are two proteins that are believed to play a major role in maintaining the integrity of the genome. In spite of having the related function of maintaining the integrity of the genome, p53 is known to serve as a barrier in iPS cell generation. Genetic ablation or decreased amounts of p53 remarkably increases reprogramming efficiency in mouse and human somatic cells^{15–19}. Thus, ATM and p53



appear to have opposite roles on the reprogramming of differentiated cells to pluripotent cells. ATM kinase phosphorylates a broad range of substrates, and is involved in a wider range of safeguard systems than p53, such as DNA repair, apoptosis, G1/S, intra-S checkpoint and G2/M checkpoints. Thus, p53-independent reprogramming processes may have a crucial need for some ATM functions, and other phosphatidylinositol 3-kinase like enzymes, such as ATR, may partially compensate the ATM-deficiency.

Alternatively, telomere damage may explain the low reprogramming efficiency found in AT-derived fibroblasts. Telomeres found at the ends of eukaryotic chromosomes prevent their erosion, facilitate the recruitment of telomere-binding factors and stop the activation of the DNA damage response pathways. In humans, ATM deficiency results in accelerated telomere loss, and T lymphocytes derived from AT-patients exhibit frequent telomeric fusions²⁰. Mouse cells with short telomeres cannot be reprogrammed to iPS cells despite their normal proliferation rates, probably reflecting the existence of 'reprogramming barriers' that abort the reprogramming of cells with uncapped telomeres^{21,22}.

Unexpectedly, we found that AT-iPS cells did not show any chromosomal instability *in vitro*, i.e., maintenance of intact chromosomes was observed after 80 passages (560 days). Even after X-ray irradiation at low dose, the most of AT-iPS cells still maintained an intact karyotype. In contrast, the parental fibroblastic cell line, AT1OS, showed frequent chromosomal abnormalities, such as deletion, addition and translocation. However, the AT-iPS cells still exhibited hypersensitivity to X-ray irradiation in the growth profile, which are major characteristics of ATM-deficient cells. These results indicate that AT-iPS cells maintain the defective response to ionizing irradiation, but that the defects do not affect maintenance of intact chromosomes.

What are the causes of the differences in the chromosomal stability between AT-iPS cells and AT1OS cells, the source of AT-iPS cells? The major difference between iPS cells and somatic cells may be the ability to undergo unlimited self-renewal. Somatic cells usually have limited growth potential, gradually decline with advancing age, and finally fall into senescence. In contrast, pluripotent stem cells are characterized by unlimited self-renewal and the ability to generate differentiated functional cell types. One of the causes of immortality is the presence of a terminal DNA polymerase capable of synthesizing telomeres, and somatic cell mortality is the result of a progressive loss of the telomeric DNA because of the absence of the immortalizing polymerase. The function of telomerase in terminal DNA elongation is necessary in order to overcome the "end-replication problem" whereby conventional DNA polymerases cannot fully replicate linear DNAs²³. Telomere erosion (by 50–100 bp per cellular division) limits the replicative capacity of the majority of somatic cells, which do not express active telomerase²⁴. In humans, ATM deficiency results in accelerated telomere loss in somatic cells, and T lymphocytes derived from AT patients exhibit frequent chromosomal instability²⁰.

Response to oxidative stress may be one of the causes of the accelerated telomere loss. It has been suggested that somatic cells, such as fibroblasts and neuronal cells from AT patients are in a chronic state of oxidative stress, which could contribute to their enhanced telomere shortening²⁵. ATM protein is suggested to have a role in the prevention or repair of oxidative damage to telomeric DNA, and enhanced sensitivity of telomeric DNA to oxidative damage in AT cells results in accelerated telomere shortening and chromosomal instability. Further study using telomerase inhibitors and anti-oxidants using the human AT-iPS cells may clarify the cause of the difference between somatic cells and iPS cells derived from AT patients.

The number of single-nucleotide mutations per cell genome was estimated from 22 human iPS cells by extensive exome analysis on protein-coding sequences²⁶. The exome analysis on the AT-iPS cell lines from 17 to 27 passages after the establishment in this study

included not only coding but also untranslated, non-coding RNA, and their adjacent regions, covering up to 93.9 Mb. The number of observed coding mutations during reprogramming was comparable or smaller in all the three lines than those reported by the preceding study²⁶, supporting a genetic stability of the AT-iPS cells.

AT is characterized by early onset progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia, susceptibility to bronchopulmonary disease, and lymphoid tumors. The pathologic tissues are generally not easily accessible, resulting in a substantial disadvantage for medical and biological studies of the pathogenesis of the disease and for development of novel therapeutic interventions. Generation of *Atm*-deficient mice partially overcomes such difficulties. However, oculocutaneous telangiectasias and histological evidence of neuronal degeneration, which are characteristics of human AT patients, have not been seen in these mice, suggesting that the mouse model for AT is limited. Thus, the established human AT-iPS cells described in this study show promise as a tool for clarifying the pathogenesis of AT, and may facilitate development of drugs that inhibit ataxia and hypersensitivity to ionizing radiation.

Methods

Ethical statement. Human cells in this study were performed in full compliance with the Ethical Guidelines for Clinical Studies (2008 Notification number 415 of the Ministry of Health, Labor, and Welfare). The cells were banked after approval of the Institutional Review Board at the National Institute of Biomedical Innovation (May 9, 2006).

Human cells. AT1OS cells were obtained from a ten-year-old Japanese boy (JCRB Cell Bank, Osaka, Japan). The patient history is contained in the original report²⁷. The patient was referred to the hospital because of progressive cerebellar ataxia and repeated upper respiratory infection. He raised his head well at 5 months and walked alone at 14 months of age. At the age of 2 years, his parents first noticed his tottering gait. He suffered from severe suppurative tympanitis at 4 years of age, since then he was recurrently afflicted with upper respiratory infections. Before school age, he had already developed a progressive ataxic gait. At the age of 10 years, he could walk alone only a short distance. The neurological examination revealed hyporeflexia, choreoathetosis, oculomotor apraxia and cerebellar dysarthria. Telangiectasia was seen in his bulbar conjunctivae. He showed mild mental retardation (IQ, 72). X-ray computed tomography revealed the fourth ventricular enlargement, suggesting mild cerebellar atrophy. Laboratory tests disclosed a decreased serum level of IgA (17 mg/dl) and a markedly elevated level of α -fetoprotein (560 ng/ml). Serum IgE and IgM were within normal levels. His parents are first cousins.

AT1OS cells were cultured in culture dishes (100 mm, Becton Dickinson). All 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 a Trypsin-EDTA solution (cat# 23315, IBL CO., Ltd, Gunma, Japan), and re-plated at a density of 5×10^5 cells in a 100-mm dish. Medium changes were carried out twice a week thereafter. MRC5-iPS cells were maintained on irradiated MEFs as previously described^{28,29}. MRC5iPS#16 (Fetch), MRC5iPS#25 (Tic), and MRC5iPS#40 (Skipper) were used as controls for AT-iPS cells. MRC5 (ATCC, CCL-171), a parental cell of MRC5-iPS cells, is from lung fibroblasts of 14-week fetus (Caucasian male).

Generation of iPS cells. AT-iPS cells were generated according to the method as previously described²⁸. Briefly, to produce VSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein) retroviruses, 293FT cells (Invitrogen) were plated at 2×10^6 cells per 10-cm culture dish with DMEM supplemented with 10% FBS, and incubated overnight. On the next day, the cells were co-transfected with pMXs-OCT4, SOX2, KLF4 or c-MYC, pCL-GagPol, and pHCMV-VSV-G vectors using the TransIT-293 reagent (Mirus Bio LLC, Madison WI). The virus-containing supernatants were collected 48 h after incubation. The supernatants were filtered through a 0.45 μ m pore-size filter, centrifuged, and then resuspended in DMEM supplemented with 4 μ g/ml polybrene (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). Human AT1OS cells were seeded at 1.0×10^5 cells per well of 6-well plate 24 h before infection. A 1 : 1 : 1 mixture of OCT3/4, SOX2, KLF4, and c-MYC viruses was added to AT1OS cells^{28–31}. The retrovirus carrying the EGFP gene was infected to estimate infection efficiency in a separate experiment. One-half of the medium was changed every day and colonies were picked up at around day 28.

RT-PCR. Total RNA was isolated from cells using the TRIzol (Invitrogen) or the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) with random hexamers according to the manufacturer's instructions. Template cDNA was PCR-amplified with gene-specific primer sets (Supplemental Table S1).

Quantitative RT-PCR. RNA was extracted from cells using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen). An aliquot of total RNA was reverse transcribed using an oligo (dT) primer. For the thermal cycle reactions, the cDNA template was amplified (ABI PRISM



7900HT Sequence Detection System) with gene-specific primer sets using the Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX (11743-100, Invitrogen) under the following reaction conditions: 40 cycles of PCR (95°C for 15 s and 60°C for 1 min) after an initial denaturation (95°C for 2 min). Fluorescence was monitored during every PCR cycle at the annealing step. The authenticity and size of the PCR products were confirmed using a melting curve analysis (using software provided by Applied Biosystems) and a gel analysis. mRNA levels were normalized using GAPDH as a housekeeping gene.

Western blot analysis. Western blot analysis of total cell lysate for p53 and phospho-p53(Ser15) and of nuclear fractions for ATM was performed as described³². The membrane filter was probed with the antibodies to p53 (Enzo Life Sci., BML-SA293), phospho-p53 (S15) (Cell signaling, #9284), and ATM (MBL, PM026), and then incubated with HRP-conjugated antibody to rabbit IgG. The protein signals were detected by ECL detection (Amersham).

Immunocytochemical analysis. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at 4°C. After washing with PBS and treatment with 0.2% trypsin in PBS (PBST) for 10 min at 4°C, cells were pre-incubated with blocking buffer (10% goat serum in PBS) for 30 min at room temperature, and then reacted with primary antibodies in blocking buffer for 12 h at 4°C. Followed by washing with 0.2% PBST, cells were incubated with secondary antibodies; anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated with Alexa 488 or 546 (1:300) (Invitrogen) in blocking buffer for 1 h at room temperature. Then, the cells were counterstained with DAPI and mounted.

Karyotypic analysis. Karyotypic analysis was contracted out at Nihon Gene Reserch Laboratories Inc. (Sendai, Japan). Metaphase spreads were prepared from cells treated with 100 ng/mL of Colcemid (Karyo Max, Gibco Co. BRL) for 6 h. The cells were fixed with methanol:glacial acetic acid (2:5) three times, and dropped onto glass slides (Nihon Gene Reserch Laboratories Inc.). Chromosome spreads were Giemsa banded and photographed. A minimum of 10 metaphase spreads were analyzed for each sample, and karyotyped using a chromosome imaging analyzer system (Applied Spectral Imaging, Carlsbad, CA).

Quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH). We measured telomere length by Q-FISH analysis as previously described^{33–35}. The parental cells and iPSCs were subjected to telomere measurements by the telomere fluorescent intensities of the p- and q-arms of all the chromosomes in the metaphase spread individually. The telomere lengths were determined by the median telomere fluorescent unit values.

Exome sequencing. Approximately 2.0 µg of genomic DNA from each cell sample was sonicated to give a fragment size of 200 bp on a Covaris S220 instrument. After 5–6 cycles of PCR amplification, capture and library preparation were performed with Agilent SureSelect Human All Exon V4 + UTRs + lincRNA (80 Mb), followed by washing, elution, and additional 10-cycle PCR. Enriched libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 1000 operated in 101-bp paired-end mode. Image analyses and base calling on all lanes of data were performed using CASAVA 1.8.2 with default parameters.

Read mapping and variant analysis. Reads from each sample were first trimmed by removing adapters and low quality bases at ends using Trimmomatic 0.22 and then aligned to the hs37d5 sequence (hg19 and decoy sequences) using the Burrows-Wheeler Aligner 0.6.2. Uniquely mapped reads were selected by a custom script, converted from sam to bam using SAMtools 0.1.18, and processed by Picard 1.83 to mark PCR duplicates. Genome Analysis Toolkit (GATK) 2.3–9 was then used to remove the duplicates, perform local realignment and map quality score recalibration to produce calibrated bam files for each sample. Multi-sample callings for SNVs were made by GATK. Target regions for variant detection were expanded to 93.9 Mb in total by following the manufacturer's instruction. The annotated VCF files were then filtered using GATK with a stringent filter setting and custom scripts. Variant calls which failed to pass the following filters were eliminated: QUAL < 400 || QD < 2.0 || MQ < 40.0 || FS > 60.0 || HaplotypeScore > 13.0 || GQ <= 60. When genotype is 0/1, 0/2, or 1/2, only SNVs that meet the following conditions were selected: both of the allelic depths >= 8 && difference of the allelic depths within twofold. When genotype is 0/0, 1/1, or 2/2, only SNVs that meet the following conditions were selected: difference of the allelic depths no less than 32-fold, one allelic depth is 1 and the other is no less than 16, or one allelic depth is 0 and the other is no less than 8. Annotations of altered bases were made using SnpEff 3.1 based on GRCh37.69³⁶. Custom Perl scripts and C programs are available at <http://github.com/glires/genomics/>.

Structural mutation analysis. The structural mutation analysis by genome-wide SNP genotyping was performed using Illumina HumanCytoSNP-12 v2.1 DNA Analysis BeadChip Kit. The microarray contains approximately 300,000 SNP markers with an average call frequency of > 99%. Subsequent computational and manual analyses were performed using the Illumina KaryoStudio software. The data have been submitted to the GEO database under accession number GSE54576.

Irradiation. Cells were irradiated by X-ray at 0.87 Gy/min, using MBR-1520R-3 (Hitachi, Tokyo, Japan). Immediately after irradiation, cells were returned to the incubator at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂, and

incubated until further processing. Cell number was counted with Vi-CELL 1.00. (Beckman Coulter K.K., Tokyo, Japan).

Teratoma formation. AT-iPSCs were harvested by accutase treatment, collected into tubes, and centrifuged. The same volume of Basement Membrane Matrix (354234, BD Biosciences) was added to the cell suspension. The cells (>1 × 10⁷) were subcutaneously inoculated into immuno-deficient, non-obese diabetic (NOD)/severe combined immunodeficiency (SCID) mice (CREA, Tokyo, Japan). After 6 to 10 weeks, the resulting tumors were dissected and fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde. Paraffin-embedded tissue was sliced and stained with hematoxylin and eosin (HE). The operation protocols were accepted by the Laboratory Animal Care and the Use Committee of the National Research Institute for Child and Health Development, Tokyo.

Neural differentiation of iPSCs. We employed the standard protocol for neural differentiation of iPSCs cells^{37,38}. Apoptosis was detected by the ApopTag ISOL Dual Fluorescence Apoptosis Detection Kit (DNase Types I & II) APT1000 (Millipore), according to the manufacturer's protocol.

1. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
2. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
3. Hankowski, K. E., Hamazaki, T., Umezawa, A. & Terada, N. Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface. *Lab Invest* **91**, 972–977 (2011).
4. Mavrou, A., Tsangaris, G. T., Roma, E. & Kolialexi, A. The ATM gene and ataxia telangiectasia. *Anticancer Res* **28**, 401–405 (2008).
5. McKinnon, P. J. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO reports* **5**, 772–776 (2004).
6. Kurz, E. U. & Lees-Miller, S. P. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3**, 889–900 (2004).
7. Gatei, M. *et al.* Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res* **60**, 3299–3304 (2000).
8. Barlow, C. *et al.* Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86**, 159–171 (1996).
9. Kinoshita, T. *et al.* Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPSCs. *Biochem Biophys Res Commun* **407**, 321–326 (2011).
10. Kuljis, R. O., Xu, Y., Aguila, M. C. & Baltimore, D. Degeneration of neurons, synapses, and neurofilament and glial activation in a murine Atm knockout model of ataxia-telangiectasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12688–12693 (1997).
11. Song, H., Chung, S. K. & Xu, Y. Modeling disease in human ESCs using an efficient BAC-based homologous recombination system. *Cell Stem Cell* **6**, 80–89 (2010).
12. Lee, P. *et al.* SMRT compounds abrogate cellular phenotypes of ataxia telangiectasia in neural derivatives of patient-specific hiPSCs. *Nat Commun* **4**, 1824 (2013).
13. Nayler, S. *et al.* Induced pluripotent stem cells from ataxia-telangiectasia recapitulate the cellular phenotype. *Stem Cells Transl Med* **1**, 523–535 (2012).
14. Meek, D. W. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1049–1056 (2004).
15. Hong, H. *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**, 1132–1135 (2009).
16. Kawamura, T. *et al.* Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* **460**, 1140–1144 (2009).
17. Li, H. *et al.* The Ink4/Arf locus is a barrier for iPSC cell reprogramming. *Nature* **460**, 1136–1139 (2009).
18. Marion, R. M. *et al.* A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPSC cell genomic integrity. *Nature* **460**, 1149–1153 (2009).
19. Utkal, J. *et al.* Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPSCs. *Nature* **460**, 1145–1148 (2009).
20. Metcalfe, J. A. *et al.* Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nat Genet* **13**, 350–353 (1996).
21. Marion, R. M. *et al.* Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **4**, 141–154 (2009).
22. Davy, P. & Allsopp, R. Balancing out the ends during iPSC nuclear reprogramming. *Cell Stem Cell* **4**, 95–96 (2009).
23. Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**, 197–201 (1972).
24. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).
25. Tchirkov, A. & Lansdorp, P. M. Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* **12**, 227–232 (2003).
26. Gore, A. *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 63–67 (2011).
27. Ikenaga, M., Midorikawa, M., Abe, J. & Mimaki, T. The sensitivities to radiations and radiomimetic chemicals of cells from patients with ataxia telangiectasia. *Jinruï Idengaku Zasshi* **28**, 1–10 (1983).



28. Makino, H. *et al.* Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res* **315**, 2727–2740 (2009).
29. Nishino, K. *et al.* DNA Methylation Dynamics in Human Induced Pluripotent Stem Cells over Time. *PLoS Genet* **7**, e1002085 (2011).
30. Nagata, S. *et al.* Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells* **14**, 1395–1404 (2009).
31. Nishino, K. *et al.* Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One* **5**, e13017 (2010).
32. Toyoda, M., Kojima, M. & Takeuchi, T. Jumonji is a nuclear protein that participates in the negative regulation of cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 332–336 (2000).
33. Poon, S. S. & Lansford, P. M. Measurements of telomere length on individual chromosomes by image cytometry. *Methods Cell Biol* **64**, 69–96 (2001).
34. Terai, M. *et al.* Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence *in situ* hybridization. *Tissue Cell* **45**, 407–413 (2013).
35. Takubo, K. *et al.* Chromosomal instability and telomere lengths of each chromosomal arm measured by Q-FISH in human fibroblast strains prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev* **131**, 614–624 (2010).
36. Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* **6**, 80–92 (2012).
37. Chambers, S. M. *et al.* Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* **27**, 275–280 (2009).
38. Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J. A., Ladewig, J. & Brüstle, O. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for *in vitro* instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3225–3230 (2009).

Acknowledgments

We would like to express our sincere thanks to M. Yamada for fruitful discussion and critical reading of the manuscript, to H. Abe and H. Kobayashi for providing expert technical assistance, to Dr. C. Ketcham for English editing and proofreading, and to E. Suzuki, Y. Kajiyama, Y. Suehiro, and K. Saito for secretarial work. This research was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) of Japan; by Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) Sciences

research grants; by a Research Grant on Health Science focusing on Drug Innovation from the Japan Health Science Foundation; by the program for the promotion of Fundamental Studies in Health Science of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; by the Grant of National Center for Child Health and Development. We acknowledge the International High Cited Research Group (IHCRC #14-104), Deanship of Scientific Research, King Saudi University, Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia. AU thanks King Saud University, Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia, for the Visiting Professorship.

Author contributions

A.U. designed experiments. Y.F., M.T., K.O., K.Nakamura, K.Nakabayashi, M.Y.I. and K.T. performed experiments. Y.F., M.T., K.O., K.Nakabayashi, M.Y.I., M.N., K.Hata and K.Hanaoka analyzed data. Y.F., M.T., K.O., K.Nakabayashi, S.T., M.Y.I., M.N., K.Hata, A.H. and K.Hanaoka contributed reagents, materials and analysis tools. A.M. and A.U. wrote this manuscript.

Additional information

Accession codes The SNP genotyping by SNP array data was uploaded to the ncbi web site (GSE47498: Increased X-ray sensitivity and sustained chromosomal stability in Ataxia Telangiectasia-derived induced pluripotent stem (AT-iPS) cells, GSM1151202: AT10S cells, GSM1151203: ATiPS-262 cells at passage 17, GSM1151204: ATiPS-263 cells at passage 27, GSM1151205: ATiPS-264 cells at passage 25, GSM1151206: ATiPS-024 cells at passage 25). The exome data was uploaded to the DDBJ Sequence Read Archive (DRP001084).

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Fukawatase, Y. *et al.* Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci. Rep.* **4**, 5421; DOI:10.1038/srep05421 (2014).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder in order to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

第4章 再生医療／細胞治療における 細胞培養に関する規制

佐藤陽治*

1 はじめに

わが国において、人または動物の細胞に培養その他の加工を施したものをを用いた再生医療など（再生医療または細胞治療）を実用化するためには、「製品としての開発トラック」と「医療としての開発トラック」との二つの道筋がある。

人または動物の細胞に培養その他の加工を施し、再生医療などに用いられることを目的とした製品（再生医療等製品）を開発するトラックでは、『薬事法』の規制を受け、薬事法に基づき、治験を行った上で品質、有効性及び安全性を示し、厚生労働省の製造販売承認を受けなければならない。

一方、医師・歯科医師が自らの患者に「医療」を施すことを目的に、ヒトまたは動物の細胞に医師・歯科医師が自ら加工を施し、これを患者に投与することはこれまで、「医師法」「医療法」などの医事関連法規や「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」などの行政指針に従い、「臨床研究」およびその結果を踏まえた「先進医療」（保険診療との併用が認められる保険外診療）あるいは「保険外診療」として行われてきた。

「製品としての開発トラック」では、薬事法に記され、かつ医薬品国際ガイドライン（ICHガイドライン）に沿った国内基準（例えばGood Laboratory Practice（GLP）、Good Manufacturing Practice（GMP）/Quality Management System（QMS）、Good Clinical Practice（GCP）など）に従う必要があるが、「医療としての開発トラック」にはその必要がない。すなわち、「製品としての開発トラック」は「医療としての開発トラック」と比べ、費用も時間も余計にかかる。ただし、「医療」としての「臨床研究」は、研究費が尽きれば実施不可能になるという点で持続可能な医療ではないことが問題である。「先進医療」では実施可能な医療機関が限定されると同時に、製品の品質にばらつきが生じる恐れがあり、また「保険外診療」は、開発に多くの投資を要する新規製品を用いるために高額となりやすく、いずれの場合も多くの国民が享受できない恐れがある。従って、国民が広くアクセスできるようにするためには、治験を通じて薬事法上の承認を得て保険診療として実施されることが好ましい。

なお、欧米では、緊急時や治験などの例外を除き、ヒト・動物の細胞に培養その他の加工を施したものを臨床適用する場合には、「医療」か「製品」かの区別なく、ICHガイドラインに沿った薬事の基準に則って開発した上で、その有効性、安全性および品質について製品ごとに、規制当

* Yoji Sato 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長

局の審査を受け承認を受けなければならない。したがって、日本国内で開発された再生医療などを国際的に展開することを考えた場合も、治験を通じて薬事法上の承認を得る方が好ましい。

2 再生医療関連法の成立

平成25年、わが国では再生医療に関する規制を大きく変化させる3つの法律、すなわち「再生医療を国民が迅速かつ安全に受け入れられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律」（通称「再生医療推進法」）、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」（通称「再生医療等安全確保法」または「再生医療新法」）、および「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（通称「医薬品医療機器等法」）が成立した。平成25年5月に成立した「再生医療推進法」は、再生医療の実用化に向けて、研究開発や普及を促進する際の国の責務を明記した議員立法である。平成25年11月に成立した「医薬品医療機器等法」は、「薬事法」を改正するとともに法律名を変更したものである。同法では、再生医療等製品（遺伝子治療用製品を含む）は、医薬品からも医療機器からも独立した第3のカテゴリーとして分類される。再生医療等製品のうち、申請に係る再生医療等製品が均一でない場合、治験により効能、効果又は性能を有すると推定され、安全性の確認が行われたものは、条件及び期限付製造販売承認を得ることができるようになるなど、特別な規制が適用される。また、「医薬品医療機器等法」と同時に成立した「再生医療等安全確保法」は、「医療としての再生医療等」を規制するものである。同法により、医師・歯科医師は細胞の加工を外部の「特定細胞加工物製造業者」に委託することが可能となる一方、そのリスク区分に応じて、再生医療など提供計画を厚生労働大臣などに提出しなくなってきた。

2.1 「医薬品医療機器等法」

「医薬品医療機器等法」における主な改正点としては、1) 医薬品、医療機器等に係わる安全対策の強化、2) 医療機器の特性を踏まえた規制の構築、3) 再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築、がある。ここでは再生医療製品に係わる一部の項目について述べる。「医薬品医療機器等法」では、「再生医療等製品」が以下のように新たに定義づけされている。

- | |
|---|
| <p>① 次に掲げる医療又は獣医療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したもの</p> <p>イ. 人又は動物の身体の構造又は機能の再建、修復又は形成</p> <p>ロ. 人又は動物の疾病の治療又は予防</p> <p>② 人又は動物の疾病の治療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に導入され、これらの体内で発現する遺伝子を含有させたもの</p> |
|---|

上記①は、いわゆる再生医療製品（細胞・組織加工製品）を指し、②は遺伝子治療薬を指す。

第4章 再生医療／細胞治療における細胞培養に関する規制

つまり、これらを併せた製品群が「再生医療等製品」ということになる。(ちなみに、①のイは組織工学製品、①のロは細胞治療薬を指すことになる。)なお、内因性幹細胞を活性化・分化させ組織再生を行う細胞増殖分化因子やスキャホールドのような、人又は動物由来の細胞の投与を伴わない広義の再生医療を目的として使用される製品は、「再生医療等製品」の定義には含まれていない。

特筆すべき点は、本法律第23条の26にある。本項によれば、1) 再生医療等製品が均質でないこと、2) 効能、効果又は性能を有すると推定されるものであること、3) 効能、効果又は性能に比して著しく有害な作用を有することにより再生医療等製品としての使用価値がないと推定されるものでないこと、のいずれにも該当する再生医療製品である場合は、厚生労働大臣は薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、その適正な使用の確保のために必要な条件及び7年を超えない範囲内の期限を付して製造販売承認を与えることが可能となる。これは再生医療等製品の条件及び期限付承認制度であり、人における製品の安全性が治験により確認され、その有効性の推定ができれば、早期に暫定的な製造販売承認が与えられることを示している。通常の製造販売承認を得るには、市販後に有効性とさらなる安全性を検証し、期限内に再度承認申請を行う必要がある。

2.2 「再生医療等安全確保法」

「再生医療等安全確保法」の概要としては、1) 再生医療等の分類、2) 再生医療等の提供に係わる手続き、3) 適正な提供のための措置等、4) 特定細胞加工物の製造の許可等、である。「再生医療等」は、「再生医療等技術を用いて行われる医療」と定義づけされている。本法律案では、「細胞加工物」とは、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したものを指す。また、「特定細胞加工物」とは、再生医療等に用いられる細胞加工物のうち再生医療等製品であるもの以外のもの、すなわち前述の薬事法改正案の対象にならないものをいう。

1) の再生医療等の分類に関しては、人の生命及び健康に与える影響の程度に応じ、人に未実施などの高リスクな医療等は「第1種再生医療等」、現在実施中などの中リスクな医療等は「第2種再生医療等」、第1種と第2種以外のリスクの低い医療等は「第3種再生医療等」に分類するというものである。現在のところ、第1種はiPS細胞／ES細胞等、第2種は体性幹細胞等、第3種は体細胞等が想定されているが、実際分類には様々なリスク要因を考慮した総合的な判断が必要になる。2) の再生医療等の提供に係わる手続きに関しては、第1種、第2種、第3種再生医療等によりそれぞれ必要な手続きが異なる。第1種再生医療等の場合、医療機関から申請された提供計画は、特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施することになるが、一定の提供制限期間を設け、その期間内に厚生労働大臣が厚生科学審議会の意見を聴いて安全性などについて確認する。提供計画が安全性などの基準に適合していないときは、計画の変更が厚生労働大臣によって命令される。第2種再生医療等の場合、提供計画について特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施する。第3種再生医療等の場合、提供計画について認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出

再生医療の細胞培養技術と産業展開

して実施する。認定再生医療等委員会とは、再生医療等技術や法律の専門家等の有識者からなる合議制の委員会であり、一定の手続きにより厚生労働大臣の認定を受けたものである。特定認定再生医療等委員会は、認定再生医療等委員会のうち、特に高度な審査能力、第三者性を有するものである。第1種、第2種、第3種再生医療等すべてにおいて、厚生労働大臣への提供計画の提出の手続きが義務付けされており、臨床研究のみならず、これまで実質的な規制のなかった自由診療にも適用される。3)の適正な提供のための措置等に関しては、再生医療等の安全性確保のために必要なときは、改善命令を実施でき、改善命令違反の場合は再生医療等の提供が制限される、などが挙げられる。4)の特定細胞加工物の製造の許可等に関しては、特定細胞加工物の製造を許可制（医療機関などの場合には届出）とし、医療機関が特定細胞加工物の製造を委託する場合には、許可などを受けた者又は届け出をした者に委託しなければならないこととする旨が記載された。すなわち医療機関で採取された細胞・組織の細胞培養加工施設への外部委託が可能となり、許可を受けた施設ならば再生医療などに使用する細胞の加工培養を行うことができるようになる。なお、この法律案に基づき医師の責任の下で実施される細胞の培養・加工の委託については、「医薬品医療機器等法」の適用外になる。

3 再生医療に係わる基準・指針など

再生医療等製品は、薬事法上の取扱い方法の分類からすれば、主にヒトの血液や組織に由来する原料又は材料を用いた製品であり、「医薬品医療機器等法」（薬事法）上の「特定生物由来製品」とみなされるケースも少なくないと予想される。「特定生物由来製品」であれば保健衛生上の危害の発生又は拡大を防止するための措置を講ずる必要となってくる。また先端的製品であるために臨床使用経験や情報の蓄積が乏しく、製品の態様も多種多様であることから、リスクの判断が難しい。したがって再生医療等製品の開発においては、規制当局が評価基準を作成し、研究開発を実施する企業・研究者のみならず審査官に対しても適用することにより、評価基準に対する理解を各者が共有することが重要である。再生医療等製品の開発に係わる現在の主な基準・指針などを表1に示す。

3.1 ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」は、「医療としての再生医療開発トラック」において、ヒト幹細胞を用いる臨床研究が社会の理解を得て、適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重しかつ科学的知見に基づいた有効性及び安全性を確保するために、遵守すべき事項を定めたものである。本指針は、平成25年10月に改正され、ヒト胚性幹（ES）細胞を含むヒト幹細胞の樹立と分配に関し、まず指針の適用範囲について、疾病の治療を目的として、人の体内にヒト幹細胞などを移植又は投与する臨床研究のみならず、臨床研究における使用を目的としてヒト幹細胞などを調整又は保管する研究にも広げられた。また対象となるヒト幹細胞などにお

第4章 再生医療／細胞治療における細胞培養に関する規制

表1 再生医療等の開発に係わる主な基準・指針など

文書名	初版／最新版 (平成26年2月現在)	概略
ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針	平成18年7月3日厚生労働省告示第425号／平成25年10月1日厚生労働省告示第317号	ヒト幹細胞臨床研究が社会の理解を得て、適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいた有効性及び安全性を確保するための指針。
生物由来原料基準	平成15年5月20日厚生労働省告示第210号／平成17年3月31日厚生労働省告示第177号	医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器に使用されるヒトや動物に由来する原料又は材料について、製造に使用される際に講ずべき必要な措置に関する基準を定めることにより、医薬品等の品質、有効性及び安全性を確保することを目的とする。
細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方	平成12年12月26日医薬発第1314号別添1	「生物由来原料基準」と併せてGTPの根幹を形成する。細胞・組織を取り扱う際の基本的要件を示すとともに、細胞・組織を利用した製品の品質・安全性、並びに細胞・組織の取扱いに関する科学的及び倫理的妥当性を確保することを目的とする。
ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について	平成24年9月7日薬食発第0907第2,3,4,5,6号	ヒト幹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を定めたもの。自己体性幹細胞、同種体性幹細胞、自己iPS（様）細胞、同種iPS（様）細胞およびES細胞加工医薬品等に特化した留意事項を示した。
ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について		
ヒト（自己）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について		
ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について		
ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保について		
ヒト（自己）由来細胞や組織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に関する指針	平成20年2月8日薬食発第0208003号	ヒト細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器について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たもの。細胞提供者が自己（患者本人）の場合と同種（他人）の場合を区別して整理し、それぞれの注意事項をまとめている。
ヒト（同種）由来細胞や組織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に関する指針	平成20年9月12日薬食発第0912006号	
医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令	平成9年3月26日厚生省令第21号／平成20年厚生労働省令第114号	GLP省令。非臨床試験施設の構造設備、標準操作手順書の作成、動物の管理、プロトコールや最終報告書の作成などを規定。承認申請時に提出する非臨床安全性試験の結果はGLPに従っていることが原則。
医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令	平成17年3月23日厚生労働省令第37号／平成20年厚生労働省令第115号	
医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令	平成16年12月24日厚生労働省令第179号	GMP省令。医薬品及び医薬部外品の製造販売承認の要件として、医薬品および医薬部外品の製造所における製造管理・品質管理の基準を定めたもの。
医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令	平成16年12月17日厚生労働省令第169号	QMS省令（医薬品のGMP省令に相当）。医療機器及び体外診断用医薬品の製造販売承認の要件として、医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理・品質管理の基準を定めたもの。
治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬GMP）	平成20年7月9日薬食発第0709002号別添	治験薬GMP。企業から提供を受けた医薬品を治験薬として取り扱う際の製造管理・品質管理等の基準。
ヒト（自己）細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について	平成20年3月27日薬食監麻発0327025号	ヒト自己由来細胞・組織加工製品のGMP。患者本人から直接細胞・組織を採取するという特殊性等を踏まえた製造管理・品質管理の考え方。
医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令	平成9年3月27日厚生省令第28号／平成24年12月28日厚生労働省令第161号	GCP省令。治験を依頼する者、治験を自ら（医師主導治験）実施しようとする者に係る「治験の準備に関する基準」及び「治験の管理に関する基準」、治験を実施する医療機関が行うべき「治験を行う基準」などを定めたもの。
医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令	平成17年3月23日厚生労働省令第36号／平成25年2月8日厚生労働省令第11号	

再生医療の細胞培養技術と産業展開

いては、これまでヒトES細胞を用いる臨床研究は実施しないこととされていたが、一部のヒトES細胞を用いた臨床研究が可能となった。一部のES細胞には、①外国で樹立されたヒトES細胞で、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針」と同等の基準に基づき樹立されたものと認められるもの、②文部科学省の関連指針におけるヒトES細胞の臨床研究利用に関する考え方が示された後に、新規に樹立するヒトES細胞、が該当する。現時点においては、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針」に基づき国内で既に樹立されたヒトES細胞は、樹立・使用が基礎研究に限定されており、臨床利用におけるインフォームド・コンセントが不明確である理由から、品質および安全性が確保されている場合であってもそのまま臨床研究に用いることができないとされている。なお「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」は、「再生医療等安全確保法」と内容が重複するため、平成26年に予定されている同法の施行とともに廃止される予定である。

3.2 生物由来原料基準

「生物由来原料基準」は、薬事法第42条に基づき、厚生労働大臣が保健衛生上特別の注意を要する医薬品等（医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器）につき、その製法、性状、品質、貯法等に関し必要な基準を示したものとして策定されたものである。本基準は、医薬品等に使用される人その他の生物（植物を除く）に由来する原料又は材料（添加剤、培地等として製造工程において使用されるものを含む）を対象とし、医薬品等の製造に使用される際に講ずべき必要な措置に関する基準（standard）を定め、医薬品等の品質、有効性及び安全性を確保することを目的とする。

3.3 製造販売承認の要件としての基準

薬事法には同第42条に基づく基準（standard）の他に、医薬品等の製造販売承認の要件としてその製造販売業者が遵守しなければならない基準（good practice）がある。これらには、同法第14条第2項第4号に基づく、「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」（GMP省令）、「医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」（QMS省令）や、製造販売承認申請を行う際の申請資料作成のためのデータの信頼性基準である「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」、「医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（上記2省令を併せてGLP省令と呼ぶ）、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」、「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令」（上記2省令をあわせてGCP省令と呼ぶ）、さらにGCP省令を根拠にした「治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬GMP）」などがある。中でも、再生医療などにおける細胞培養に関して重要なのは、医薬品などの製造・施設基準であるGMP/QMSおよび治験薬GMPである。

3.4 「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」

「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」は、細胞・組織を取り扱う際の基本的要件を示すとともに、細胞・組織を利用した製品（医薬品・医療機器および再生医療等製品、加工の有無に拘わらない）の品質・安全性、並びに細胞・組織の取扱いに関する科学のおよび倫理的妥当性を確保することを目的とし、製品の承認後のみならず、治験時においても適用される。この「基本的考え方」の中で製品の安全性に関して最も強調されているのは、細菌、真菌、ウイルスなどの汚染の危険性への対策である。なお、わが国のGTP（good tissue practice）の根幹は、この「基本的考え方」と生物由来原料基準とで形成されている。

3.5 ヒト（自己／同種）由来細胞や組織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に関する指針

「ヒト（自己）由来細胞や組織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に関する指針」と「ヒト（同種）由来細胞や組織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に関する指針」は、ヒト細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器について品質および安全性確保のための技術要件についてまとめたもので、製造販売承認申請時のみならず、治験開始の際に求められる資料についても記されている。ヒト（自己）由来製品とヒト（同種）由来製品との間の根本的な差異は、自己由来の細胞・組織を用いる場合には、その細胞・組織を介する感染症伝播のリスク及び免疫学的な問題が理論上無いことである。しかし、自己由来であっても製造工程におけるクロスコンタミネーションの問題や、製造従事者・医療従事者等の安全上の問題は同種由来の場合と同様に存在する。また、培養工程においてウイルスが増殖するリスクを考慮することが必要な場合もある。さらに、自己由来の場合、個別製品の製造となるので、それらの品質のばらつきを最小限にとどめる工夫が必要な反面、製品レベルでの各種試験の実施に試験検体の量的制約がある。それらに留意した合理的な品質確保の方策（製造工程のより厳密な恒常性維持・管理など）を採用する必要がある。また自己由来であっても、遺伝子改変細胞の場合には相応の留意が必要である。

3.6 ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する5指針

ヒト体性幹細胞、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞等のヒト幹細胞を加工した製品のより早期の実用化のために、これらに特化した品質及び安全性確保に関する留意事項について記した指針が、平成24年9月に発出された。ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する5指針（自己体性幹細胞、同種体性幹細胞、自己iPS（様）細胞、同種iPS（様）細胞、ES細胞）である。これらの指針のまえがきには、治験開始における基本的な考え方として、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、製品に付随するリスクの「所在」と「その重み」だけではなく、「患者が新たな治療機会を失うことにより被るかもしれないリスク」すなわち医療としてのリスクを勘案することとある。またリスク・期

再生医療の細胞培養技術と産業展開

待されるベネフィットの情報を開示した上で、治験に入るかは患者の自己決定権に委ねるという視点を合わせて評価することの重要性が示されている。iPS（様）細胞加工製品においては、原材料の細胞は特定の治療（目的に）に適う品質・有効性・安全性を有する最終製品を製造するのに適切な細胞であれば良く、三胚葉系への分化等は必須ではないことから、iPS細胞ではなくiPS（様）細胞と表記されている。言い換えると、製品製造における最も理想的な素材は、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、目的細胞に適切に分化できる細胞（バンク）や中間細胞株ということである。セルバンク樹立の目的は、最終製品の品質の安定性・継続性の確保にあり、このことは他の生物製剤の製造にも共通する。さらにiPS（様）細胞加工製品の安全性においては、最終製品における未分化細胞の存在による異所性組織形成や腫瘍形成・がん化の可能性などが重要な関心事であるが、混在の可能性を否定するか、あるいは、目的細胞からの未分化細胞の除去／不活性化による混在の可能性を最小限にする努力が求められることが示されている。

4 再生医療等製品に関する新しい基準の策定

「医薬品医療機器等法」の中では、再生医療等製品が新たに独立したカテゴリーとなった。平成26年2月現在、厚生労働省では医薬食品局を中心に、同法律の施行に向けた基準などの策定が進んでいるところである。再生医療等製品の特徴として、最終製品に含まれる細胞が、複雑な構造およびダイナミックな特性を持ち、他の生物薬品において実施されるような高度な精製やウイルスなど感染因子の不活化・除去の過程を製造工程中に組み込むことが非常に困難、もしくは不可能であるということがある。従って、再生医療等製品の品質・安全性確保の観点から最終製品への感染因子の混入を防止するためには、製造工程の入り口の段階にあたる原料・材料および原材料の選択と適格性評価、および製造工程における品質管理が非常に重要なポイントとなる。従って、同法第42条に基づいた基準として、医薬品および医療機器を対象とした「生物由来原料基準」とは別に、再生医療等製品の原料・材料および原材料に関する基準、すなわち「再生医療等製品原料基準」を策定する必要があると考えられる。また、再生医療等製品に特化した製造基準・施設基準、すなわち「再生医療等製品GMP」を策定する必要もあると考えられている。

筆者らは厚生労働省の「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」の一環として、「『再生医療等製品原料基準』のあり方に関する検討ワーキンググループ」を組織し、再生医療等製品の製造の現実にそぐわない要件を整理し、現実的かつ合理的と考えられる方策で、最終製品のリスクを低減するための原料基準のありかたを提言している。興味のある方は同ワーキンググループの報告書¹⁾を参照していただきたい。

なお、再生医療等製品には先述のように、条件付き製造販売承認の制度が設けられたことから、条件付承認後の有効性・安全性データの取得方法および評価方法に関する基準ないし指針も必要と考えられる。

5 再生医療等提供基準

医療としての再生医療などを規制する「再生医療等安全確保法」にも従うべき基準についての記述がある。同法3条には、「厚生労働大臣は、厚生労働省令で、再生医療等の提供に関する基準（以下「再生医療等提供基準」という。）を定めなければならない。」とあり、第一種再生医療等、第二種再生医療等及び第三種再生医療等のそれぞれにつき、次に掲げる事項（第三種再生医療等にあつては、第一号に掲げる事項を除く。）について定めることとされている。

- 一 再生医療等を提供する病院（医療法（昭和二十三年法律第二百五号）第一条の五第一項に規定する病院をいう。以下同じ。）又は診療所（同条第二項に規定する診療所をいう。以下同じ。）が有すべき人員及び構造設備その他の施設に関する事項
- 二 再生医療等に用いる細胞の入手の方法並びに特定細胞加工物の製造及び品質管理の方法に関する事項
- 三 前二号に掲げるもののほか、再生医療等技術の安全性の確保等に関する措置に関する事項
- 四 再生医療等に用いる細胞を提供する者及び再生医療等（研究として行われる場合その他の厚生労働省令で定める場合に係るものに限る。）を受ける者に対する健康被害の補償の方法に関する事項
- 五 その他再生医療等の提供に関し必要な事項

平成26年2月現在、厚生労働省では医政局を中心に、「再生医療等提供基準」の策定作業が進められている。なお、経済産業省も「グローバル認証基盤整備事業」の一環として「再生医療等基準検討委員会」を立ち上げ、細胞加工事業者及び再生医療に係る装置・機器等の製造事業者の事業環境の整備という観点から、培養加工施設や培養加工装置・機器の国際標準化・国際展開のあり方を検討し、その成果を「再生医療等提供基準」の策定作業にインプットしている。

医療としての再生医療等であれ、製品としての再生医療等製品を用いた治療であれ、患者にとってみれば加工した細胞を投与されることには変わらない。したがって、投与される細胞の安全・品質の基準が準拠する法律によって大きく異なってしまうことは避けなければならない。そのため、「再生医療等製品」および「特定細胞加工物」の全てに最低限必須かつ共通の要件・基準および評価技術を定め、これに各製品の種類・特性、対象疾患、開発段階などに応じた上乘せ方を適用するというアプローチが有効だと考えられる。こうした最低限の要件などは「ミニマム・コンセンサス・パッケージ（MCP）」と呼ばれている²⁾。再生医療などの開発において、MCPは例えば、臨床研究その他の「医療としての開発」と「製品としての開発」の切れ目のない移行を可能にする共通のプラットフォームともなると考えられ、その充実が、今後のわが国の再生医療などの発展を促すためには極めて重要となると考えられる。

再生医療の細胞培養技術と産業展開

文 献

- 1) 『再生医療等製品原料基準』のあり方に関する検討WG報告書. <http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/sispsc/html/index.html> (平成26年2月25日アクセス)
- 2) 早川堯夫「ヒト幹細胞加工製品の品質及び安全性の確保について」厚生労働省 厚生科学審議会 科学技術部会 第18回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会 (平成24年5月9日)<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000029kw0-att/2r9852000002a0tg.pdf> (平成26年2月25日アクセス)

第5章 第1節 製品領域ごとに見る関連規制と対応の留意点

[1] 再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点

安田 智

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第4室 室長 博士(薬学)

佐藤 陽治

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 部長 博士(薬学)

(株)技術情報協会

2014年4月発刊

「最新動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術」抜刷

第1節 製品領域ごとに見る関連規制と対応の留意点

[1] 再生医療製品の品質関連規制と対応の留意点

はじめに

ヒト由来細胞を用いた再生医療・細胞治療は、これまで治療が困難であり、重篤・致死性ないしQOLを著しく損なう疾患・損傷の有効な治療法として期待されている。再生医療・細胞治療を目的とし、生きた細胞または組織を加工することにより製造される製品は、細胞・組織加工製品と呼ばれ、世界的にも熾烈な開発競争が展開されている。なお、細胞・組織加工製品は近年国内では「再生医療製品」と呼ばれることが多いため、本稿では以後「再生医療製品」と称することにする。平成26年3月現在、国内で製造販売承認を得ている製品としては、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング(J-TEC)の重傷熱傷を適用疾患としたヒト自己培養表皮と、関節軟骨損傷を適用疾患としたヒト自己軟骨細胞がある。このような体細胞を加工した製品が世界的にも主に実用化しているが、近年では体性幹細胞や、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)といった多能性幹細胞を原材料とした製品の開発も盛んに行われている。難治性疾患等の患者にいち早く有効な再生医療を届けるためにも、高品質で有効性及び安全性の高い製品の開発・実用化を国内で適正に推進することが強く望まれている。

1. 再生医療における薬事法改正と新法

現在、再生医療製品の国内実用化には、主に2つのルートがある。一つは、治験を行った上で厚生労働省の製造販売承認を受けて保険適用医療として実現するルート、言い換えれば薬事法上の「業」としての実用化である。もう一つは、「ヒト幹細胞臨床研究指針」に則った臨床研究(ヒト幹細胞臨床研究)の成果に基づく先進医療・高度医療評価制度による医療、もしくは保険適用外医療としての実用化であり、これらは医療法・医師法の下で行われる「医療行為」として実施される。ヒト幹細胞臨床研究は、手続きや費用などの面で治験よりも実施が比較的容易であるものの、治験の国際ガイドライン(ICH-GCP)に沿った国内GCP(good clinical practice)ガイドラインの準拠が義務ではなく、得られたデータを薬事承認申請資料としてそのまま使用できない場合が多い。また臨床研究と自由診療全般において言えることであるが、長期フォローアップが困難であり、有効性のネガティブデータも公開されにくい傾向があるという問題点があり、安全性・有効性情報が蓄積されないことが指摘されている。

平成26年3月現在での再生医療における規制上のトピックスとして、「再生医療推進法(再生医療を国民が迅速かつ安全に受け入れられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律)」「薬事法等の一部を改正する法律」「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」の3つの再生医療関連法律が挙げられる。平成25年4月に再生医療の実用化に向けて、研究開発や普及を促進する際の国の責務を明記した議員立法の「再生医療推進法」が成立した。さらに内閣提出法案として、「再生医療等製品」(後述)の条件及び期限付き承認制度の創設等が記載された「薬事法等の一部を改正する法律」と、「特定細胞加工物」(後述)の製造の許可等の制度などが定められた「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が、平成25年11月に成立した。「薬事法等の一部を改正する法律案」は治験を対象とし、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」は臨床研究・自由診療を対象としており、以下にそれらの法律案の概要を記載する。

1.1 薬事法の改正

「薬事法等の一部を改正する法律」は、平成25年11月20日に成立した。薬事法の題名が「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に改められ、その概要としては、1. 医薬品、医療機器等に係わる安全対策の強化、2. 医療機器の特性を踏まえた規制の構築、3. 再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築、である。ここでは再生医療製品に係わる一部の項目について述べたい。この改正薬事法では、「再生医療等製品」が以下のように新たに定義づけられている。

- ①次に掲げる医療又は獣医療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したもの
- イ. 人又は動物の身体の構造又は機能の再建、修復又は形成
 - ロ. 人又は動物の疾病の治療又は予防
- ②人又は動物の疾病の治療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に導入され、これらの体内で発現する遺伝子を含有させたもの

①はいわゆる再生医療製品（細胞・組織加工製品）を指し、②は遺伝子治療薬を指す。つまり、これらを併せた製品群が「再生医療等製品」ということになる。なお、内因性幹細胞を活性化・分化させ組織再生を行う細胞増殖分化因子やスキャホールドのような、人又は動物由来の細胞の投与を伴わない広義の再生医療を目的として使用される製品は、「再生医療等製品」の定義には含まれていない。

薬事法改正は多岐に渡っているが、特筆すべき点は、第6章 再生医療等製品の製造販売業及び製造業の（条件及び期限付承認）の第23条の26である。本項によれば、1. 再生医療等製品が均質でないこと、2. 効能、効果又は性能を有すると推定されるものであること、3. 効能、効果又は性能に比して著しく有害な作用を有することにより再生医療等製品としての使用価値がないと推定されるものでないこと、のいずれにも該当する再生医療製品である場合は、厚生労働大臣は薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、その適正な使用の確保のために必要な条件及び7年を超えない範囲内の期限を付して製造販売承認を与えることが可能となる。これは再生医療等製品の条件及び期限付承認制度であり、人における製品の安全性が確認され、その有効性の推定ができれば、早期に暫定的な製造販売承認が与えられることを示している。通常の製造販売承認を得るには、市販後に有効性とさらなる安全性を検証し、期限内に再度承認申請を行う必要がある。

1.2 再生医療等の安全性の確保等に関する法律

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」は、平成25年11月20日に成立した。その概要としては、1. 再生医療等の分類、2. 再生医療等の提供に係わる手続き、3. 適正な提供のための措置等、4. 特定細胞加工物の製造の許可等、である。再生医療等は、再生医療等技術を用いて行われる医療と定義づけられている。本法律案では、「特定細胞加工物」とは、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したものを指す。また、「特定細胞加工物」とは、再生医療等に用いられる細胞加工物のうち再生医療等製品であるもの以外のもの、すなわち前述の改正薬事法の対象にならないものをいう。

1. の再生医療等の分類に関しては、人の生命及び健康に与える影響の程度に応じ、人に未実施などの高リスクな医療等は「第1種再生医療等」、現在実施中などの中リスクな医療等は「第2種再生医療等」、第1種と第2種以外のリスクの低い医療等は「第3種再生医療等」に分類するというものである。現在のところ、第1種はiPS細胞/ES細胞等、第2種は体性幹細胞等、第3種は体細胞等が想定されているが、実際の分類には様々なリスク要因を考慮した総合的な判断が必要になるとと思われる。2. の再生医療等の提供に係わる手続きに関しては、第1種、第2種、第3種再生医療等によりそれぞれ必要な手続きが異なる。第1種再生医療等の場合、医療機関から申請された提供計画は、特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施することになるが、一定の提供制限期間を設け、その期間内に厚生労働大臣が厚生科学審議会の意見を聴いて安全性等について確認する。提供計画が安全性等の基準に適合していないときは、計画の変更が厚生労働大臣によって命令される。第2種再生医療等の場合、提供計画について特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施する。第3種再生医療等の場合、提供計画について認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施する。認定再生医療等委員会とは、再生医療等技術や法律の専門家等の有識者からなる合議制の委員会で、一定の手続きにより厚生労働大臣の認定を受けたものである。特定認定再生医療等委員会は、認定再生医療等委員会のうち、特に高度な審査能力、第三者性を有するものである。第1種、第2種、第3種再生医療等すべてにおいて、厚生労働大臣への提供計画の提出の手続きが義務付けられており、臨床研究のみならず、これまで実質的な規制のなかった自由診療にも適用される。3. の適正

な提供のための措置等に関しては、再生医療等の安全性確保のために必要なときは、改善命令を実施でき、改善命令違反の場合は再生医療等の提供が制限される、などが挙げられる。4.の特定細胞加工物の製造の許可等に関しては、特定細胞加工物の製造を許可制(医療機関等の場合には届出)とし、医療機関が特定細胞加工物の製造を委託する場合には、許可等を受けた者又は届け出をした者に委託しなければならないこととする旨が記載された。すなわち医療機関で採取された細胞・組織の細胞培養加工施設への外部委託が可能となり、許可を受けた施設ならば再生医療等に使用する細胞の加工培養を行うことができるようになる。なお、この法律案に基づき医師の責任の下で実施される細胞の培養・加工の委託については、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（薬事法等）の適用外になる。

2. 再生医療に係わる通知・指針等

再生医療製品は、薬事法上の取扱い方法の分類からすれば、主にヒトの血液や組織に由来する原料又は材料を用いた製品であり、「特定生物由来製品」とみなされるケースも多いと予想され、そうなれば保健衛生上の危害の発生又は拡大を防止するための措置を講ずる必要となってくる。また先端的製品であるために臨床使用経験や情報の蓄積が乏しく、製品の態様も多種多様であることから、リスクの判断が難しい。したがって再生医療製品の開発においては、規制当局が評価基準を作成し、研究開発を実施する企業・研究者のみならず審査官に対しても適用することにより、評価基準に対する理解を各者が共有することが重要である。再生医療製品の開発に係わる主な省令、通知、指針等を表1に示す。ここでは、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究」、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」、「ヒト（自己／同種）由来細胞や組織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に関する指針」および「ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する5指針」を取り上げて説明したい。