

	Practice for Repositories: Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research (2008)
FACT	細胞療法認定マニュアル (第4版、2010) Cellular Therapy Accreditation Manual (4 th Edition, 2010)
AHCTA	ポジションペーパー：同種HSCおよび関連細胞治療の提供、収集、テスト、処理、保管、および配布分布のグローバルスタンダードを指して (2008) Position Paper: Towards Global Standard for Donation, Collection, Testing, Processing, Storage and Distribution of Allogeneic HSC and Related Cellular Therapies (2008)
ECVAM	良好な細胞培養の実践のガイダンス・優れた細胞培養実践の第二 ECVAM 作業部会報告 (2005年) Guidance of Good Cell Culture Practice – A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice (2005)
NCI – NIH-USA	生物検体の資源のためのNCIのベストプラクティス (改訂案、2010) NCI Best Practice for Biospecimen Resources (Revised Draft, 2010)
ISSCR	<ul style="list-style-type: none"> ● 幹細胞の臨床的翻訳のためのガイドライン (2008) Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells (2008) ● ヒト胚性幹細胞研究の実施のためのガイドライン (2006) Guidelines for the Conduct of Human Embryonic Stem Cell Research (2006)
Japan	ヒト幹細胞の臨床研究のためのガイドライン (2010年改定) Guideline for the Clinical Research of Human Stem Cells (2010 Under amendment) http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000000lbgv-att/2r9852000000lbnm.pdf (Proposal, Japanese)

Embryonic Stem Cell Bank A Work Proposal

胚性幹細胞バンク

作業提案

A. Nieto, F. Cobo, A. Barroso-deljesus, A.H. Barnie, P. Cataline, C.M. Cabrera, J. L. Cortes, R. M. Monotes, and A. Concha

アンダルシア幹細胞、アンダルシア幹細胞バンク、グラナダ、スペイン

要旨

ヒト胚性幹細胞(hESC)は自己増殖による無限増殖能と3胚葉に分化する能力があり、欠如したり損傷を受けた細胞を入れ替える新たな臨床治療の扉を開いている。ヒト胚性幹細胞を使った多くの研究グループと研究プロジェクトは過去五年間で大きく増えてきた。幹細胞バンクの創設はこの分野の研究の発展をサポートするために重要なもう一つのステップである。バンクは国際的な標準品質システムを順守した最高基準と品質システムの履行を担保した good manufacturing practices(GMP) や good laboratory practices(GLP)といった厳しい規制体制の枠内で運営されなければならない。GLP を保証するために認定を目的とするのは妥当である。幹細胞バンクは他のグループによって以前に樹立された細胞株を受託しなければならないそして hESC は倫理委員会で容認された研究プロジェクトで hESC の使用を正当化されたグループに細胞を分配しなければならない。幹細胞バンクは研究者たちに hESC が信頼性のある安全株であることを保証するために微生物学的分析とともに典型的な hESC に一般的に受け入れられている分析をしなければならない。本稿においてアンダルシア幹細胞バンクは hESC 株の流れ図を作るため、そして国際幹細胞研究主唱に従って、完全な細胞の特徴づけと hESC 培養の簡素化のためのプロトコール標準化を達成するために幹細胞貯蔵過程のモデルを提示する。

索引項目：バンク、特徴づけ、流れ図、hESC、品質管理、微生物学的規制

導入

Thomson らが胚の多能性内部細胞塊よりヒト胚性幹細胞(hESC)の樹立を最初に達成してから、生物医学的研究上の新しく刺激的な分野が生まれた。マウス胚性幹細胞を用いた予備的な実験においては、糖尿病、心筋梗塞、神経疾患、脊髄損傷といった疾患が治療され有望な結果が得られた。明らかに、ヒトの医療について実験からでは一定の成果の獲得は

ならなかったが、過去数年間の進歩には目を見張るものがある。hESC はヒトの発生中の遺伝子発現を調べるためヒト胚モデルとして使うことができる。製薬会社によって創薬研究や毒性試験のための in vitro のモデルを作り出したりすることに使うこともできる。

このような科学的な用途や商業的な可能性にも関わらず、胚性幹細胞を用いた仕事は人工授精胚使用に関連した倫理的問題を含んでいる。さらにさまざまな hESC 株を維持するための標準化したプロトコルの欠如といった物流上の問題は研究室における胚性幹細胞の効率的な研究における面倒な障害となっている。この点について、ES 細胞株を樹立する研究グループは免疫外科手術、すべての胚盤胞のプレーティング、支持細胞層上での共培養、または細胞外基質上といった様々な手法を使っている。培養液もまたグループ間で違っている。hESC 株と研究室間におけるデータ標準化のために、hESC の特徴づけの規格化が www.stemcellforum.org により提示されている。樹立培養法に関する似たような標準化も必要とされている。幹細胞バンクの創設は貯蔵される hESC 株の検査に使用する標準化された培養条件のプロトコール開発を助けとなろう。国際的な研究団体が hESC 株の標準化されたプロトコールを規定すればバンクはこれらのプロトコールを興味を持っている研究グループに分配することができる。

英国幹細胞バンクは欧州における先駆的なバンクのひとつであり、バンクが規定しなければいけない基盤、細胞凍結や細胞の特徴づけを含む幹細胞の貯蔵を改良する研究プログラムを提供してきた。

バンクにある hESC 株は委託を決めた研究グループのために樹立された株にその起源がある。そして、幹細胞バンクは研究団体に細胞株を提供することにより、各研究チームが自身で幹細胞株を樹立する必要性やプロジェクトのために使われる組織や胚の数を減少させることができる。備蓄においては、国際品質基準を考慮に入れた検証、スクリーニング、処理、貯蔵そして使用者への幹細胞株の配給に関して EU の優良製造規範に沿ってすべての処理が開発されていかなければならない。この点においてバンクはヒト幹細胞株に従事する際にみられるような、欧州組織令および組織医療規範(European Tissue Directive and Codes on Tissue Therapies)で規定されている基準要綱の作業規範がなければならない。

設備に関しては、幹細胞バンクは将来的な医療利用のため特殊な GMP 設備があることが期待されている。そしてそこで細胞は製薬企業に適用されるのと同じ規則の元で生産されることが求められている。微生物学および微粒子的な汚染を最小限に抑えるための監視可能な環境制御設備のあるさまざまな無菌室において細胞が処理される必要がある(図 1)。設備は品質基準を満たしていることを保証するため計画通り維持及び補正されていなければならない。

監視基準は非常に厳しく設定されている。バンクには ESC 株を貯蔵するため事細かな書類も提供されていなければならない。これらの文書は hESC 株が樹立された際のプロジェクトの承認情報や、インフォームドコンセントに関する情報、そして委託者が細胞株を培養したり、特徴づけた時の実験室におけるプロトコールもこれに含まれる。

hESC 株の提供を受けたい研究グループは規制委員会により承認された細胞使用の目的記述したプロジェクトを提示しなければならない。幹細胞バンクの作業基準は細胞株の委託者に属する細胞株の所有権や知的所有権についても考慮に入れている。

本稿において、私たちは貯蔵分割、バンクに適用される微生物学的規制そして多能性や遺伝子の安定性に関する hESC の品質を保証する貯蔵過程で実行されるべき試験を含む貯蔵に関する提案をしたい。

ヒト胚性幹細胞株の貯蔵

支持細胞のストック

現在得られる大多数の胚性幹細胞株はマウスやヒト由来の有糸分裂不活化細胞を支持細胞として使うのみならず、血清や動物由来物質を含む培地やならし培地を樹立や培養に使ってきた。

支持細胞なしで、またはヒト由来の構成物からなる培地のみで細胞株を樹立培養しようとする試みは、増殖が複雑化し分化が迅速に起こる細胞コロニーを生み出す結果となった。Xu らは不活化したマウスの胎児由来繊維芽細胞を用いて調整された培地を追加的に使うことによって Matrigel™ (細胞外基質) やラミニンでコーティングしたプレートやフラスコ上で未分化 hESCs を支持細胞なしでの長期増殖することに成功した。しかし Richards らは未分化 hESCs の長期的な増殖には支持細胞なしの基質よりも支持細胞の方がよいことを示した。由来の異なる細胞で分析すると、ヒト胎児筋肉、皮膚、ヒト成体皮膚そしてマウス胎児繊維芽細胞(MEF)が支持細胞として良い結果が得られた。これらの細胞のいくつかは American-Type Culture Collection (ATCC, LGC promochem) といった民間サポートから D551/CCL-10(skin) か CCL-2552 (neonatal foreskin) として得られるし、そして他の場合はマウス胎児か生検組織から樹立される。

新たに組み替え物およびヒト由来の原料より支持細胞なしの hESC 培養法が開発されてきた。この条件で樹立培養された株は核型の変化がみられるものの、将来的な hESC の医療応用にとって有望な方法である。今のところ臨床目的にかなう hESC 株の培養はなされていない。

バンクには不活化後に支持細胞として使える細胞のストックを求められている。その細胞は hESC 株の増殖に用いられるのと起源を同じにすることが望ましい。このストックは凍結保存された細胞アンプルとして貯蔵されていて、幹細胞バンクに適用されている品質管理に従ったマスター支持細胞バンクを構成しなければならない。

その一方で、バンクは支持細胞上あるいは支持細胞なしで樹立培養された細胞株の委託をいうけることができる。この hESC 株の貯蔵処理は別々に開発されなければならない。支持細胞上で増やされてきた hESC 株の貯蔵処理が終了したら、支持細胞や動物由来物質の非存在下での株の培養を試みなければならない。そしてその条件下で細胞株が増殖しな

がら未分化状態を維持できるのか調べるのである。

ヒト胚性幹細胞株のストック

幹細胞バンクの目的は継体数が増加したり細胞が *in vitro* の増殖状態に適応した時起こりやすい遺伝子変異を防ぐため低継体数の凍結 hESCs の数を最大限保つことである。hESC は寄託される前で継体数はさまざまであるし実用的な理由からわれわれはバンクに寄託された凍結物をバンク継体数(BP)0 とみなし、この継体数を続けて用いていく。

英国幹細胞バンクの指針に従って、バンクには次のようなことが期待される。

- 1、少なくともそれぞれの細胞株について4つのアンプルがあること。そしてそれぞれのセクションの凍結アンプルにある数と継体数が同じでなければならない。
- 2、バンク自身で5回継体(BP5)した細胞から少なくとも10本のアンプルからなるプレマスター貯蔵があること。
- 3、10継体(BP10)において少なくとも10本のアンプルからなるマスターバンクがあること。
- 4、15継体(BP15)において少なくとも15本のアンプルからなる配給バンクがあること、この区分に属するバンクは細胞を増幅させる役割を担い、20,25,そして30継体数において凍結アンプルを維持しなければならない。

プレマスターバンクの準備

バンクに委託する細胞株の申請書が通れば、細胞を提供する研究グループは少なくとも4つの細胞株の凍結アンプルを委託しなければならない。細胞株に加えて特に凍結融解のプロトコール、支持細胞か細胞外基質の使用、使用される培地、継体のタイミング、そして継体は物理的あるいは酵素的に執り行うのかといった細胞培養に使われるプロトコールを委託者はバンクに渡さなければならない。上記の通り今のところ標準化されたプロトコールはないし細胞培養に用いる培地はそれぞれの hESC 株に特有なので、プロトコールの引き渡しは必須である。

2つのアンプルは元の履歴(アーカイブ)として凍結されたままにしなければならない。そして他の2つは溶解され株の委託者により示されたプロトコールにおいて規定された条件で培養される。溶解後すぐに2つのアンプルから溶解されたサンプルは微生物学的及び生存試験と交差汚染解析に用いられる。

最初の溶解後に使う培養培地には培地調製に示されている抗生物質を含んでいなければならない。継体培養の地点(BP1)まで到達したら、細胞の半分は凍結されなければならない。そしてそのアンプルはアーカイブの一部を構成する。残りの細胞はフラスコや細胞培養プレートが16枚になる BP5 まで抗生物質なしで培地中で継体されなければならない。この時点で、培養フラスコの一つを使ってマイコプラズマテストを含む微生物学的試験、細胞

株の遺伝的安定性を調べるための核型分析、株の信頼性を点検するために交差感染分析を実行しなければならない。もう一つのフラスコを用いて細胞株の分化状態や *ex vivo* における細胞分化能力を査定するため表現型における特徴づけを行わなければならない。この作業は次のものを含む。(1)多能性マーカーの表面抗原を測定する。(2)未分化状態に関連する遺伝子の発現レベルを測定する。(3)細胞が胚様体を形成し *ex vivo* で分化する能力の測定をする。残りの細胞は凍結し 14 アンプル作成しなければならない。そのうち 11 アンプルはプレマスターバンクを構成し、1つは BP5 のアーカイブとしそして残りの 2 つはマスターバンクを準備するために用いられる。我々はプレマスターバンクに相当する凍結アンプルが少なくとも 10 個はなくてはいけないと考えている。上記に述べた手順で作られた余剰凍結アンプルは汚染や培養フラスコの紛失に備えられる。

マスターバンクの準備

2つのアンプルを溶解した後、培養細胞の一部は溶解後の微生物学的試験と細胞生存試験を行うために使われ、残りの細胞は最初の細胞数からもう一度 16 倍になるまで継体培養しなければならない(BP10)。培養細胞が充分増えたら培養フラスコに含まれているコロニーのサンプルを使って BP5 の時プレマスターバンクで微生物学的品質そして細胞品質を担保するために行った分析をしなければならない。残りの細胞は 14 アンプルに分けて凍結保存されなければならない。そこから 11 個の凍結アンプル(少なくとも 10 個)はマスターバンクとして管理され、1つは BP10 としてアーカイブに含まれなければならない。そしてもう一つは委託者に渡され、最後の一つは配給バンクを準備するために使われる。(図 3、英国幹細胞バンクの流れ図 11 を改変)

配給バンクの準備

アンプルを融解したのち、ルーチンとなっている融解後の微生物学的試験と生存試験が執り行わなければならない。一つのアンプルしか融解されないので、細胞のフローサイトメトリー解析は免除される。細胞は 16 倍になるまで継体される(BP15)。この時点で新たに微生物学的試験と凍結前生存試験が行われる。前の場合と同じように、残りの細胞の一部は核型分析、交差汚染試験、そして培養細胞の未分化除隊や *in vitro* における分化能力を含んだ特徴づけが行われる。(図 4 英国幹細胞バンク流れ図 11 より改変)。いつも通りに残りの細胞を使って 13 凍結アンプルが作られる。そのうち 12 アンプルは配給バンクに収められ、1つはアーカイブとなる。この場合、一つの培養フラスコが確保され完全な細胞株の特徴づけを行うのに十分な細胞数を得るまで増幅される(配給バンクの拡張。図 5。英国幹細胞バンク流れ図 11 より改変)。この作業には最初からプレマスターやマスターバンクを作る際に行われていて、これから 5 回継体される度に行われるすべての微生物学的、生存、表現型、遺伝的、そして交差汚染分析を含む。それにプラスして細胞株の特異的な遺伝子発現や、*vivo* における分化能力を確定するために一度だけ行われる調査がここで実施される。

細胞株に特徴的な遺伝子発現プロファイリングは全ゲノムマイクロアレイ解析と miRNA プロファイリングよりなる。In vivo における分化能は免疫不全マウスに hESC を注入しその後起こる奇形種形成を観察することにより確認される。それに加えて、これらの細胞の標準化のため、異なった培養条件で行う補完的調査も実行される。

この段階において、DNA と RNA バンクを準備するためゲノム DNA と全 RNA のサンプルが調整される。私たちは継体を続け、細胞は BP20, BP25 そして BP30 において凍結保存されていなければならない。前述のように 5 継体ごとに汚染、生存、遺伝そして表現型の安定性に関するルーチンの管理分析を実行しなければならない。

幹細胞バンクの微生物学的制御

実験室環境下における汚染は欧州薬物類試験(European Pharmacopoeia tests)の手引きに従って細菌、菌類、イーストとマイコプラズマのルーチンスクリーニングにより監視することができる。細菌、イーストそして菌類を検出する規定の試験はプレマスター、マスターそして分配バンクにおいてルーチン標準品質管理スクリーニング手順の一部として用いられる。

幹細胞バンクは細胞培養における品質、追跡可能性そして安全性について保証しなければならない。そしてこれらは伝染性の疾患を回避するのに特に重要である。これは手順標準化への周到な注意、品質管理プログラムと今現在における最良の操作を反映させた方法を実施することにより達成されなければならない。最近になって実験室より移されてきた細胞株はその培養履歴や過去の微生物汚染に依存した汚染源を含んでいるからである。

よって細胞株の寄託者は継体履歴や適切な試験についての詳細をバンクに提供する準備ができていなければならない。細胞株が信頼のおける委託元から得られたら、できるだけ早い時期にプレマスターバンクを作り、微生物学的汚染を除去するために妥当な試験を実施することは重要である。

幹細胞バンクは全ての細胞に対して深刻なヒトや動物の病原体のスクリーニングをし、保存を含めて貯蔵手順中に汚染源が混入していないことを保証する必要がある。明らかに、深刻なヒトおよび動物病原のどちらもが他の組織、細胞、従事者そして将来的には移植患者に感染する危険性を持っている。

細胞培養からのサンプルやその産物は安定した増殖培地か液体中に入れられる。これら培地は、ヒト病原体培養やそれぞれの試験基準により微生物培養器で調べられた、低温における環境微生物の増殖条件を反映した様々な温度でインキュベーションされる。マイコプラズマ試験においては培養中での検出や Hoechst33258 による間接的な DNA の染色、PCR 法、そして Gen-probe MTC-NI 検出システムといった様々な試験方法が利用可能である。最高の感受性と特異性を保証するために細胞バンクでのテストには少なくとも 2 種類の方法でおこなわれることが通常推奨されている。

マイコプラズマに加えて、培養細胞を汚染しうる特定の分離法でなければ検知できない

様々なタイプの微生物が存在する。それらの微生物を分離するためには非常に異なる培養法が検出のために必要とされるし、すべての潜在的な汚染を対象とするのは不可能である。それにもかかわらず、これら頻度の低い汚染の可能性を考慮に入れ微生物を単離する試みに常に備えておくことは賢明である。そしてそのような汚染によって説明できる異常が観測されるはずである。

細胞培養のウイルス混入という点について、ある株は内在的にウイルスを保持しているだろうし外来ウイルスにも感染しているであろう、そしてその表面にウイルス抗原を提示していたり、ウイルス微粒子を分泌しているかもしれない。細胞バンクは深刻な病原体や内外在性ウイルスを検出するための一連の試験を準備していなければいけない。この一連のテストは通常電子顕微鏡、レトロウイルスのための通常試験としての逆転写検出、*in vivo* そして *in vitro* における感染ウイルスに対する試験、マウス抗体産生試験、ラット抗体産生試験などといった動物に反応する抗体産生試験、そしてその他、ヒト、牛、豚、または齧歯類といった培養に用いた生物産物の起源に依存したウイルスを見つけるための特定の試験を含む。

牛血清といった共通の補完物やマウスの支持細胞といった細胞培養に必要なものは患者に感染すると疑われるような動物由来のウイルスに汚染されうる。ヒトの生物産物の製造に使われる前の牛血清のスクリーニングについて記述された新しい指針が最近導入された。血清には検出可能な細菌、菌類、そしてマイコプラズマが含まれていてはいけない。すでに知られている牛病原体を含むウイルス試験のリストも含まれていなければいけない。そして、欧州の規制機関が反芻動物由来の全産物に対し脳海綿症の危険性の評価を認めたため、クロイツフェルトヤコブ病といった感染性脳海綿症因子試験に対する緊急な対応が必要とされる。

マウス支持細胞そしてヒト支持細胞を用いて樹立された胚性幹細胞株は患者に微生物を感染させる可能性がある。現在の規制では提供者からの細胞や組織産物について広い範囲における HIV1/2、肝炎ウイルス A,B,C そして E,hCMV そして HTLV-I,II といった深刻なヒト疾患を引き起こすウイルスの広範囲なスクリーニングが要求され、医療応用のヒト支持細胞にも適用される。このような試験に必要な hESC 培養に使われる支持細胞バンクは個別の原則により点検される。しかも、これらの因子のいくつかはヒトの癌に関与している。

非ウイルス因子については梅毒トレパノール抗体による血清テストを含むヒト提供者の試験が望まれる、またアメリカでは淋菌そしてクラミジアトラコマチスに対する提供者の生殖細胞や組織の試験もまた提言されている。そしてヒト支持細胞にも同じような試験が推奨されるであろう。いくつかの病原因子は地理的分布にばらつきがあり支持細胞バンクの安全試験制度を確立するときには支持細胞の地理学的出所を考慮に入れるべきである。

ヒト細胞産物を使う前に、品質管理の結果と当該汚染について信任された研究室によるスクリーニング試験を元にしてこれらの産物が受託可能かどうか決定されるまで、それらを隔離したままにしておくこと、そして“処理中”として区分された窒素貯蔵容器に保

管しておかなければならないことは明らかである。

貯蔵機関におけるヒト胚性幹細胞の品質と特徴づけに関する査定のための規制

生存率、セルサイクル分析そしてアポトーシス

生存分析では貯蔵過程における細胞凍結融解後の生存細胞の割合を測る。生存率試験は細胞の生存率を知るため、そしてプレマスター、マスターそして分配バンクにおけるプロトコールが適切に取り扱われているかを知るために、細胞の凍結前と溶解後にしなければならない。試験はトリパンブルーや PI (propidium iodide) といった通常細胞には不透過性の染料の取り込みや diacetyl fluorescein といった生存細胞に取り込まれ内部にとどまるはずの染料の放出によって測定され、これは細胞の膜統合性の崩壊に準拠している。トリパンブルー検定は死細胞の割合を大まかに算出するため迅速簡単にできる生存細胞試験である。しかしながら PI を用いた検定はフローサイトメーターを使うため細胞計測の際の人為的な間違いを取り除くことができるので生存細胞数を計測するのに最も正確な方法である。DNA に接着する蛍光物質である PI の挿入特性は死細胞の細胞膜透過性により生存率を決定するのに使われる。

フローサイトメーターによって DNA 検定がなされる。DNA 量を測ることにより計測される S フェーズの細胞数を用いて細胞増殖をモニターし、異常な DNA 量の存在を感知することもできる。染色体数が足りない (hypodiploid) と DI (DNA index) が 1 以下になるし、染色体数が多い (hyperdiploid) と DI は 1 以上になる。そしてそれらは DNA 量を示すヒストグラム中で異常なピークを示す。

フローサイトメーターは浮遊 hESCs 中のアポトーシスを計測するのにも使われる。初期のアポトーシスイベントとしてプラズマ膜の表面外側にフォスファチジルセリン (phosphatidylserine) が暴露される。カルシウムイオンの存在下でフォスファチジルセリンに選択的に接着し高い親和性を示す Annexin V がアポトーシス細胞を検出する強力な選別ツールとなっている。FITC (fluorescein isothiocyanate) といった蛍光物質と供役させた Annexin と PI を組み合わせることによって 3 つの違った細胞の表現型を立証することができる。生存細胞はラベルされない。初期のアポトーシス細胞は Annexin V 陽性、PI 陰性である。そしてアポトーシスあるいはネクロトーシス細胞は annexin V 陽性、PI 陽性となる。(元文献では IP とあるが PI と思う。また最後は annexin V 陽性、IP 陰性であるが、PI は陽性と思う。)

多能性と分化マーカー

ヒト ES 細胞は細胞質の割に核のサイズが大きく、一つあるいは複数の顕著な核小体が細胞内にあり、丸く平らなコロニーを形成することにより形態的に特徴づけられる。しかしながら hESC の完全な特徴づけには長期培養期間を通して保たれる典型的な幹細胞マーカー

一、核型そして *in vitro* そして *in vivo* 条件における分化能力についての分析が必要とされる。

ヒトの奇形種細胞株(ES 細胞株)と同じく、hESC は SSEA-3,SSEA-4,TRA-1-60 そして TRA-1-81 といった表面マーカーを高いレベルで発現しているが SSEA-1 は発現していない。hESC はアルカリホスファターゼや未分化状態維持に重要な役割をする転写因子である Oct-4 を高レベルで発現している。細胞表面抗原の発現はプレマスター、マスター、そして分配バンクを用いた免疫細胞染色やフローサイトメトリー分析によって検証されなければいけない。

細胞の未分化状態の特徴づけを補完する方法として、(疑似) 定量 PCR 法により幹細胞の表現型に特に関連した遺伝子の発現レベルを決定することがある。いろいろな幹細胞マーカーのうちで特に広く用いられているのは、Oct3/4,Sox2 そして Rex1 である。ほかの有用なマーカーとして、テロメラーゼ関連因子である TERF1,TERF2,UTF-1 遺伝子そして FGFR4 がある。

分化能力

hESC の完全な特徴づけは *in vitro*、*in vivo* で全ての胚葉に hESC が分化する能力があることを示すということが含まれている。In vitro で hESC を浮遊培養すると胚様体(EB)を自律的に形成する。これは成体に見られる体細胞の元になる細胞が含まれている。この試験はプレマスター、マスターそして配分バンクを用いて行われなければならない。そして外胚葉、内胚葉、そして中胚葉マーカーとしてそれぞれ β -tublin, z-fetoprotein そして muscle actin を用いた免疫染色により証明される。培養中の分化過程もまた RT-PCR 法によってモニターされる。その際、細胞が 3 胚葉に分化する過程で特異的に発現する遺伝子をマーカーとして用いる。

細胞の分化能力は *in vivo* の奇形種形成によって調べなければいけない。この実験は配布バンクを使って行わなければならない。hESCs は免疫不全マウスに細胞を注入することによって奇形種を形成する。奇形種は軟骨、平滑筋、層状の上皮組織そして結合組織といった 3 胚葉由来の組織を含んでいる。

核型分析

核型分析はプレマスター、マスターそして分配バンクで行なわなければならない。これは以後 5 継体ごとに行う必要がある。Draper らは 3 つの由来の異なった hESC 株で染色体 17q が増えること、そして時々第 12 染色体が増える核型変異を確認した。この事実は細胞が *in vitro* の培養条件に適応するのを可能にし細胞分化を限定し自己増殖を有利にするような遺伝子に関する有用な手がかりを与えてくれる。著者の何人かはコロニーを分解したり、継体する際に用いる酵素法がこのような核型変化を引き起こすと考えていて、機械的な切断により核型変化を最小限に抑えることができると提案している。結局のところは、

バンクに貯蔵された hESCs の核型は繰り返し調べなければならないということになるだろう。例えば検知された遺伝子変異が最終的には医療に用いられる誘導細胞の作用に大きな影響を及ぼさないとしても。

hESC の抗有糸分裂処理後 Wright または Giemsa 染色することで G-バンドが明らかになる。標準のバンド分析において線引きはできないような染色体異常の特徴づけには蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションが適用される。M-蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションは染色体を様々な色で染色することを可能とし、重複や染色体の再配置 (rearrangements) を感知することができる。比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH: comparative genomic hybridization) は染色体分析のための標準的な核型解析を使う代わりに細胞由来の DNA を使う技術である。これは DNA の獲得と欠如といった遺伝的変化を DNA だけしか得られない時に検出するのに有用な方法である。

交差汚染

交差汚染されていないか査定するための細胞株の品質管理において DNA フィンガープリント法の重要性がますます認識されてくるようになってきた。この方法にはイソエンザイム解析や細胞遺伝学的な標準的な方法に比べて有利な点があるからである。細胞株の品質管理において、DNA フィンガープリント法は細胞株を特定するためにユニークな方法であり、一回の試験で交差汚染を確認することができる。この技術によって個人間で極端に違うゲノム DNA の繰り返し配列の構造を可視化することによって細胞株を特定することができる。

遺伝子発現のプロファイリング

細胞株の品質保証に加え完全に hESC の特徴を定めるための補完的な分析が必要とされる。遺伝子の発現プロファイリングは特定の性質や潜在能力の元になっている細胞株間のわずかな違いを明らかにするのに役立つ。それらの違いは細胞株の起源や使われた細胞培養状態の両方に起因する。高密度 DNA マイクロアレイ分析は大規模な遺伝子発現のプロファイリングを限られた量の出発材料からできるハイスループット法である。全ゲノムマイクロアレイに加えて、microRNAs として知られている固有分子の部分集合の発現プロファイリングは癌形成で示されたものと同じく細胞株のクラス分けに有用である。これらの分析はマスターバンクによって行われるが、同時に細胞株の分化能力も確定しなければならない。

DNA と RNA バンク

DNA と RNA バンクは幹細胞バンクによって提供される機能である。そして望むグループには特定の細胞株からのゲノム DNA (例えば、クローニングしたい特定の遺伝子や異種組織に発現している遺伝子の増幅のために用いられる) またはトータル RNA (例えば遺伝子発現分析を行うため) を提供する。これらの核酸バンクの準備は十分な原料を得るのに多

くの細胞が必要なため、配分バンク準備後まで延期されるであろう。

謝辞

この仕事は Fundacion Progreso y Salud と Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Servicio Andaluz de Salud)によってサポートされている。我々は英国産細胞バンクの Dr. Dlyn Stracy からの幹細胞バンクに関する情報に感謝をする。

参考文献。

References

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Marchall VS, Jones JM. *Science* 1998;282:1145-1147.
2. Bonner-Weis S, Weir GC. *Nature Biotech* 2005;23:857-861.
3. Wei H, Juhasz O, Li J, Tarasova YS, Boheler KR. *J Cell Mol Med*2005;9:804-817.
4. Zhang SC. *J Hematol Stem Cell Res* 2003;12:625-634.
5. Pera MF, Reubinoff B, Trouson AJ. *Cell Sci* 2000;113:5-10.
6. Amit M, Itskovitz-Eldor J. *J Anat* 2002;200:225-232.
7. Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, West M, Lanza R. *Lancet* 2005;365:1636-1641.
8. Kim HS, Oh SK, Park YB, et al. *Stem Cells* 2005;23:1228-1233.
9. Loring JF, Rao MS. *Stem Cells* 2006;24:145-150.
10. Healy L, Hunt C, Young L, Stacey G. *Adv Drug Deliver Rev*2005;57:1981-1988.
11. Stacey G. (2005), Available at [http://www.ukstemcellbank.org.uk/pdf/First%20Annual%20Report%20UKSCB%2008.10.04%20\(Web%20version\).pdf](http://www.ukstemcellbank.org.uk/pdf/First%20Annual%20Report%20UKSCB%2008.10.04%20(Web%20version).pdf).
12. Inzunza J, Gertow K, Stromberg MA, et al. *Stem Cells* 2005;23:544-549.
13. Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. *Stem Cells* 2003;21:546-556.
14. Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. *Nature* 2001;391:971-974.
15. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, et al. *Nat Biotechnol*2006;24:160-161.
16. Draper JS, Smith K, Gokhale P, et al. *Nat Biotechnol* 2004;22:53-54.
17. European Pharmacopeia. (2002), Pharmaceutical Inspection Convention. Recommendation on Sterility testing. Pharmaceutical Inspection Convention, PI D12-1, Nov 1, 2002.
18. European Pharmacopeia. (2004), European Pharmacopeia section 2.6.1 (Sterility), Maisonneuve SA, Sainte Ruffine.

19. European Pharmacopeia. (2004), European Pharmacopeia section 2.6.7 (Mycoplasma), Maisonneuve SA, Sainte Ruffine.
20. Cobo F, Stacey GN, Hunt C, et al. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;68:456-466.
21. Stacey GN, Masters JRW, Hay RJ, Drexler HG, MacLeod RAF, Freshney RI. *Nature* 2000;403:356.
22. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use. (1997), ICH harmonised tripartite guideline. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin.
23. European Medicines Evaluation Agency. (2003), Note for Guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products (EMEA/CVMP 1743/00). Canary Wharf, London, UK (<http://www.emea.eu.int>).
24. European Medicines Evaluation Agency. (1999), EMEA workshop on application of pharmaceutical assays for markers of TSE: report to CPMP from the BIOT-WP (CPMP/BWP/257/99), London.
25. US Food and Drugs Administration. (1999), CFR (Code of Federal Regulations) section 1271 Subpart C-Suitability Determination for Donors of Human Cellular and Tissue Based Products, Proposed rule 64 FR 189, 30 September 1999, US Food and Drugs Administration, Rockville, MD.
26. Directive 2004/C 24/03. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMEA 410/01 Rev 2nd October 2003) adopted by the Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) and by the Committee for Veterinary Medicinal products (CVMP).
27. European Medicines Evaluation Agency. (1997), ICH Consensus guideline on quality of biotechnology products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, publication n CPMP/ICH/295/95, European Medicines Evaluation Agency, Canary Wharf, London.
28. UK MSBT (2000), Guidance on the Microbiological Safety of Human Organs, Tissues and Cells used in Transplantation. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Blood and Tissues for Transplantation, MSBT, London.
29. AATB. American Association of Tissue Banks (2002), Standards for tissue banking. 10th edition. McLean, Va.: American Association of Tissue Banks.
30. EMEA. (1999), Points to Consider on Human Somatic Cell Therapy Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP/BWP/41450/98) European Medicines Evaluation Agency, 7 Westferry Circus, Canary Wharf, London, E14 4HBUK.

(<http://www.eudra.org/emea.html>).

31. Takeuchi H, Kobayashi R, Hasegawa M, Hirai K. *J Virol Methods* 1996;58:81-89.
32. Garbuglia AR, Liezzi T, Capobianchi MR, et al. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003;16:109-118.
33. Freshney, RI. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. Wiley-Liss, Inc. New York: 1994.
34. Nunez R. *Curr Issues Mol Biol* 2001;3:67-70.
35. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutetingsperper C. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
36. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, et al. *Stem Cells* 2002;20:329-337.
37. Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW. *J Anat* 2002;200:249-258.
38. Hoffman LM, Carpenter MK. *Nature Biotechnol* 2002;23:699-708.
39. Hyslop LA, Amstrong L, Stojkovic M, Lako M. *Expert Rev Mol Med* 2005;7:1-21.
40. Ginis I, Luo Y, Miura T, et al. *Dev Biol* 2004;269:360-380.
41. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trouson A, Bongso A. *Nat Biotechnol* 2000;18:399-404.
42. Amit M, Itskovitz-Eldor J. *J Anat* 2002;200:225-232.
43. Draper JS, Fox V. *Arch Med Res* 2003;34:558-564.
44. Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. *Reproduction* 2004;128:259-267.
45. Amit M, Margulets V, Segev H, et al. *Biol Reprod* 2003;68:2150-2156.
46. Buzzard JJ, Gough NM, Crool JM, Colman A. *Nat Biotechnol* 2004;22:381-382.
47. Pinkel D, Straume T, Gray JW. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2934-2938.
48. Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, et al. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1999;52:243-251.
49. Stacey GN, Bolton BJ, Doyle A. *Nature* 1992;357:261-262.
50. Tautz D. (1993), in *Fingerprinting: State of the Science*, Pena S, Chakraborty JT, Eppelen JT, pp. 21-28.
51. Koreth J, O'Leary JJ, O'D McGee J. *J Pathol* 1996;178:239-248.
52. Skottman H, Stromberg AM, Matilainen E, Inzunza J, Hovatta O, Lahesmaa R. *Stem Cells* 2006;24:151-167.
53. Skottman H, Mikkola M, Lundin K, et al. *Stem Cells* 2005;23:1343-1356.
54. Bartel DP. *Cell* 2004;116:281-297.
55. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. *Nature* 2005;435:834-838.

Figure legends

- 図 1、アンダルシア幹細胞バンク施設のクリーンルーム
- 図 2、プレマスターバンクの準備。(英国幹細胞バンク流れ図 11 を改変)
- 図 3、マスターバンクの準備。(英国幹細胞バンク流れ図 11 を改変)
- 図 4、分配バンクの準備。(英国幹細胞バンク流れ図 11 を改変)
- 図 5、分配バンクの拡張。英国幹細胞バンク流れ図 11 を改変)

Banks, Repositories and Registries of Stem Cell Lines in Europe: Regulatory and Ethical Aspects

欧州における幹細胞株のバンク、保管機関、登録機関：
規制と倫理の観点

Kristina Hug

Abstract

概要

骨髄と臍帯血バンクを除く、欧州における幹細胞のバンク、保管機関、登録機関を概観するためには、また、もっとも重要な幹細胞バンクについて科学的、規制的、倫理的観点で、非専門家にも判り易く正確に議論するためには、十分な情報があるとは言い難い。2008年9月までの本領域の科学的発表、法律、倫理的ガイドラインの調査と幹細胞バンキングに携わるキーパーソンの意見ヒアリングを行った。本稿では、幹細胞バンクの手続きと関連する安全性の問題について議論し、また、地域（欧州）レベルと国レベルでの幹細胞バンキングに対する規制に関し、調査する。幹細胞バンキングは、科学的並びに倫理的必須要件に適合しなければならない。しかし、異なる法律、ガイドライン、倫理基準という意味で複雑である。異なる法律に繋がる文化的多様性を持つ多元的な欧州社会では、幹細胞バンキングを規制する国際的ガイドラインと国内法の調和が、国レベルでの導入と同様に必要である。

Introduction

紹介

ヒト幹細胞を使用した研究グループとプロジェクトの数は、過去5年間増え続けている。試験管内と生体での研究の数が増えていることは、理論的には人体の全ての組織になり得る幹細胞が、病気に罹ったり損傷を受けたりした組織を入れ替えたり、再生させることにより、病気や損傷を治療できるようになるのであろう。また、幹細胞は、遺伝子治療に対しても価値があるであろう。しかし、幹細胞がその可能性を活かすためには、研究と出来得る治療の双方への供給が信頼しうるソースであることが必要である。この目的のために倫理的ソースで高品質の細胞株のバンクは、細胞株を高品質の条件で保存するため、またその安全性と有効性を確実にするために、設立される必要がある。

幹細胞バンクは、二つの異なる使命を持ち、二つの異なる部分で成り立っている。幹細胞保管機関は、生物化学のサンプルを保管するものである。幹細胞登録機関は、幹細胞株の情報を保有するデータバンクである。2007年に出された国際幹細胞研究学会ガイドライ

ンでは、幹細胞バンクは、保管要求を受け付け、審査すること、保管されたものにカタログ番号を付けること、細胞株を特定すること、病原菌試験を行うこと、ヒト胚性幹細胞を増殖させ、維持し、保管すること、全ての工程の品質保証と品質管理を行うこと、配布された細胞株のトラッキングを行うこと、適切な細胞特定データ、プロトコル、ヒト胚性幹細胞の入手可能性を載せたウェブサイトを経営することをすると記述されている。

文書の中で、「幹細胞バンク」という用語は、たびたび幹細胞保管機関の意味で使われ、幹細胞登録機関としてはそれほど使われず、両方の意味でも良く使われる。用語の異なる使われ方は、「幹細胞バンク」が実際何を意味するのかにつき、混乱を生んでいる。本稿では、私は、「幹細胞バンク」という用語を幹細胞保管機関と幹細胞登録機関の双方を含む機関として使用する。

幹細胞バンクを設立することは、明確に文書化され、倫理的に採択され、十分に特定化され、安全で純粋な幹細胞株を作り、高品質の研究を進めている科学と医療の双方のコミュニティに提供出来ることは、幹細胞研究を進展させるステップとして重要である。幹細胞保管機関は、主たる生物科学的工程のある部分がはっきり判っていない様々な性質をもつバンク細胞を保管するという大きな挑戦をしている。そのため、バンクしている幹細胞株が培養時に安定していること、キーとなる生物化学的指標が正確であること、細胞株が治療目的に使用可能であることを証明するしっかりとした工程を確立しなければならない。幹細胞登録機関も、また研究者間の情報共有を進めるという重要な仕事を果たしている。例えば、欧州 **ESCReg** のウェブサイトは、研究者に対し、世界中の現存し、入手可能な幹細胞株の情報を提供している。

幹細胞バンキングとそれに対する規制は、幹細胞研究者にとってとても重要である。というのは幹細胞保管機関と登録機関は、高品質の幹細胞科学の効率的かつ倫理的な進展に不可欠であるからである。同様に、規制当局と政治家に幹細胞バンクの目的と活動に慣れていただくことも重要である。安全な研究グレードと治療グレードの細胞株が提供され、幹細胞バンクが、誤った使用から保護されるために、その行動は、厳格に規制されるからである。

幹細胞バンクについては、学術論文で既に議論されている。しかし、欧州における幹細胞株のバンク、保管機関、登録機関の機能と国レベル、欧州レベルの規制に関して、全体像を示した学術論文が欠けているように見える。本稿は、そのギャップを埋めるべく、バンキング工程とそれに関する問題、欧州レベルと国レベル（英国、スペイン 二つの幹細胞バンクの元）の規制について調査する。

欧州における現在の倫理ガイドラインと法的規制に関する正確で、しかも包括的な概要を伝え、その目的、活動、管理、安全性、その他関連事項を説明することにより、この調査論文が先ず幹細胞研究者に有用なものであることを願っている。欧州における幹細胞バンキングを規制する様々な法律ガイドラインが調和されることを願って、本稿が、幹細胞の複雑な領域の紹介を手供することで、規制当局、立法者にとっても有用であることを願

っている。

骨髄と臍帯血バンクに関する調査は本稿の対象外である。骨髄と臍帯血バンクは多くの特別な問題を抱えており、別の論文の対象とした方がよいと思われる。

方法として、2008年9月までの欧州で動いているヒト幹細胞バンク、保管機関、登録機関に関わる科学論文、法律文書、倫理ガイドラインを調査している。材料は、ルンド大学図書館データベース、PubMed、インターネットでの調査、キーパーソン（例 幹細胞バンクの管理者、幹細胞領域に詳しい研究者）へのヒアリング調査で入手した。

Procedure of Stem Cell Banking

幹細胞バンキングの手続き

世界レベルでは、ヒト胚性幹細胞に関するいくつかの拘束力のないガイドラインがある。例えば、よい細胞培養行動のガイダンス（よい細胞培養活動に対する第二回 ECVAM の報告）、ヒト胚性幹細胞研究に対する米国国立研究カOUNシルのガイドライン、14カ国の研究者、倫理学者、法律の専門家を集め、世界レベルでの統一された研究活動を進めるために国際幹細胞学会が出したヒト胚性幹細胞研究ガイドラインがある。最後のガイドラインは、この領域に特化した個々の学者と共に幹細胞バンクを設立し、運営するには、次のような必要十分条件を示唆している。

1. 幹細胞バンクが GMP, GLP レベルの厳格な規制の枠組みと国際品質システム標準に合致する品質システムを導入していることが保証されている。
2. 幹細胞バンクは、新しい万能性幹細胞の作製に関し、科学的に正当化し、科学者が適切なやり方で活動したことを証明する。
3. 幹細胞バンクは、中央集約された保管機関に早めに細胞株を預けることを勧める。そこで、細胞株は、論文発表後に配布されるし、最初の発表の場合、出来るだけ早く新しい株を一般に入手可能にする。
4. 幹細胞バンクは、バンク内で実行される全ての活動の詳細な工程表を準備する。全ての工程が適切な手続きであることを明確に認識するため、細胞の寄託から受領者に対する配布までの全工程が再現性を保つ目的で適切に管理され、文書化されているためである。
5. 保管機関は、共通方法と標準を作り、それを固守する。そして、公開され、入手可能な、ガイドラインと、ヒト胚性幹細胞と関連材料の寄託、保管、配布のプロトコルを確立する。
6. 幹細胞バンクは、次に述べる文書を収集し、保管し、公開入手可能にする。
 - a. 新株作成のプロトコルと倫理的並びに法的原則に基づいて研究材料を調達することに対する機関承認の証拠
 - b. ドナーのインフォームド・コンセント文書、もしあるとすれば、ドナーに対する直

接経費と金銭的配慮に関わる文書

- c. 細胞株に関する最大限の情報（民族的背景、病歴、感染症のスクリーニングを含む）。将来的治療応用を可能にすると同時にドナーのプライバシーとドナー情報を保護するため（例 国際的に認められた暗号化、コード化の適用）
- d. 寄託者からの全ての技術情報（例 株の作製プロトコル、培養条件、感染症試験、継代回数、機能特定データ、寄託者プロトコルからの改良点、保管機関で新たに得られた情報）。細胞株の期限は、その品質に重要な影響を持つからである。

7. 細胞株が国際的に配布されていること。必要経費だけが、請求されていること。（運送費と取扱費を含む）

細胞バンクングの手続きには、次に記述するステージが含まれる。

1. バンクへの細胞材料の受入。バンクに到着してから、バンクする前の安全基準に適合するまで、細胞は、検疫所で冷凍保存される。

2. プレマスター細胞バンクの作成。信頼できるソースから細胞株が作られ、安全基準をクリアしたならば、できるだけ早くプレマスターバンクを作る、マイクロ生物化学的な汚染をなくすために適切な試験を行うことが重要です。プレマスターバンクは、細胞の限定的なバンクである。バンクされた細胞の大半は、更なる品質確認と寄託時の細胞株の特性を確定するための安全性試験に使われる。（多くの試験は、全ての細胞に対し、共通だが、他は特定の細胞株に対してだけである。）このバンクからの材料は、長期保存するものとして、冷凍される。寄託者が細胞培養のプロトコルを移転することが、とても重要である。（例 凍結と融解のプロトコル、フィーダー細胞の使用、使用されている細胞培地）プロトコルの移転は、もっとも重要である。というのは、それぞれのヒト胚性幹細胞株毎に、条件と培地が特定されているからである。

3. マスター細胞バンク作成

同一性が確認された方法で、取り扱われ、安定性を確認された状態で冷凍ほぞんされた完全に特定された細胞を培養することである。品質確認と安全性試験が終わった後のプレマスター細胞バンクから、冷凍保存させた形態である。これらの細胞株は、特定の細胞株で行われる将来の行動に対する参照点となる。このバンクから、今後、配布用の全ての細胞が用意される。それゆえ、本稿の次の章で詳細に述べられるように、十分な特定と品質管理試験が行われる。マスター細胞バンクに保管された細胞は、配布されないので、常時、特定された状態で保管される。

4. マスター細胞バンクからの配布用バンク作成。配布用細胞バンク（ワーキング細胞バンク）は、マスター細胞バンクの一つもしくは限定された数のアンプルから準備された細胞の大きなバンクである。このバンクからの細胞は、配布され、研究や製造目的に使用される。厳しい試験が、出所となるバンクとの互換性を確認するために、このバンクのスト

ックに対して行われる。このバンクが無くなった場合、新しい配布バンクがマスター細胞バンクの材料から、準備される。

完全に試験済みの細胞バンクと一部試験済み、試験未済みのバンクと隔離は、液体窒素冷凍保存庫の中で、物理的に離すことで確認されている。

"Safety Issues in Stem Cell Banking for Clinical Application"

幹細胞バンキングの医療応用の安全性の課題

確認、スクリーニング、作成、保管、幹細胞株の使用者への配布に関わる EU の GMP は、幹細胞バンクが、これらの行動基準に適合すること、将来の医療用途にも適するように、製薬メーカーに適用されると同じ規制のもと、細胞を作成することを要求する。よって、幹細胞バンクは、微粒子や微粒子が入り込み、増加し、残ることが最小減となるように作られ、運営されねばならない。また微生物、微粒子による汚染を最小限になるように、モニター機能付きで環境管理が出来るクリーンルームを設置しなければならない。また、使用される設備も、容認可能な品質基準に適合するために、補修され、調整されねばならない。欧州ヒト組織と細胞指針 2004/23/EC により、2006 年 4 月から、そのような環境管理の要求事項が実施されている。中でも、幹細胞バンクは、新規治療に使われる細胞の品質とバイオ面での安全性を確保する責任を持つ。これを勝ちうるために、EU 指針は、関連する工程と手続きを標準化し、確認すること、有効で、厳重な品質確認プログラムを導入することを求めている。

環境モニタリング。 環境モニタリングは、患者への感染リスクを最小限にするために適切な環境で、細胞が作成されたことの確証を提供する。環境モニタリング・プログラムは、環境の観点から、細胞培養が、空気中の微粒子数、細菌の空気感染、作業員や表面の汚染が定められた水準内で行われていることを確認する手続きを含んでいる。環境モニタリングの正式プログラムは、それぞれの細胞バンクで、主たる要因とその工程と製品のマイクロ生物学的品質に与える影響を特定し、評価することに、機能する。幹細胞バンクは、例えば、特定領域での設備の機能が変更した後、正常動作モードから一定時間以上逸脱した後には、追加の環境管理試験を受けねばならない。

1. 細胞バンク活動に適切な空気の品質。ヒトの治療に応用される幹細胞の作成には空気の品質（空気中の微粒子数）が汚染リスクを最小限にするために管理できる物理的環境を要求される。クリーンルーム領域では、空気清浄度、気圧差、温度のレベルが特定されねばならない。相対湿度、音や光のレベルも特定の限度に維持されねばならない。モニタリ