

97 Oh SKW, Choo ABH: Human embryonic stemcells: Technological challenges towards therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:489–495.

98 Skottman H, Dilber MS, Hovatta O: The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines. *FEBS Lett* 2006;580:2875–2878.

## figure legends

図1：典型的な hESC コロニーの形態。A 未分化 hESC コロニー B 中心の未分化細胞を文化細胞が取り囲んでいる目玉焼きのように見える hESC のコロニー。コロニーの外側の繊維芽細胞用細胞は不活化されたマウス支持細胞である。(写真提供 L young と L Healy, コピーライト NIBSC)

図2：文献 23 を参照にした hESC 株の貯蔵手順。コロニー数は細胞凍結のために十分な量の細胞が作られるまでの反復的な手順を通して増えていく。バンク間を移動するときには連続性があるか凍結融解のサイクルを経た細胞が元のバンクから取り出される。一度、最初の DCB が枯渇すると新しい DCB が MCB より調製される。

図3：hESC コロニーの物理的裁断。コロニーの大きさはまちまちである。通常、それぞれのコロニーは 30,000-50,000 個の細胞からなる。コロニーの端にある分化細胞は分断化する前に取り除かれる。コロニーは切断用具を使い縦と横に小さく断片化される。(通常 500-1000 個の細胞からなる。)。塊は毛細管に移され培地の中につけられる。そして継体や凍結保存が行われる。(写真提供 P Timmons, コピーライト NIBSC)

## Revision of PTC Document with Actions in underlined

### Points to Consider in the Development of Stem Cell Banks for Clinical Use

#### International Stem Cell Banking Initiative

#### PTC 文書の改訂と対応処置（下線）

#### 臨床に使用する幹細胞バンクの構築における留意事項

#### 国際幹細胞バンクイニシアチブ

### 1. 規制及び品質保証

#### 1.1 品質保証の定義：

品質保証に関する一連の重要な用語の代表的な定義を付録 1 に示す。

QA の重要な要素の概要に関する総論を追加し（アクション QAWG）、この内にバリデーションのパラグラフを含める（アクション GS）。

#### 1.2 諸外国の規制

ISCB ウェブサイトで、各バンクのコーディネーターによる幹細胞バンクの登録を運営し、登録バンクの国内規則及び連絡先に関する情報を提供する。また、各国の幹細胞株に対する倫理管理を示した比較表も用意する。比較表を付録 XX に示す（BGWG）。ISCF ウェブサイトには他にも幹細胞株に基づく遺伝子データの使用及び発表に関する声明を示す（ここに声明を記載するか、相互参照先又は付録として用意するか？BGWG）。

### 2. 腫瘍原性の検定

腫瘍原性（発癌性）の明確な定義はまだ確立されておらず（注、UK PAS、ASTM を考慮しているか？—全て）、一般的な標準試験法はない。腫瘍原性（動物における腫瘍形成能）と多分化能（3 胚葉を代表する細胞の形成能）を明確に区別するものとする。標準プロトコルがあれば有用かもしれないが、まず第 1 に、使用するマーカー（例、RTPCR、EB の抗体分析等）の確立が役立つだろう。*in vivo* 腫瘍原性試験では、奇形腫と奇形癌の形成を鑑別できること、ひいては細胞療法製品に対して低レベルの良性又は悪性発癌性細胞を検出できる検定法を確立することが重要である。

（新しい WG が更新パラグラフを示す）

試験方法：最小接種量は不明ながら、動物ごとに細胞  $10^6$ ~ $10^7$  個の集中注入が推奨されている。細胞の調製と接種部位は結果に影響する可能性があると考えられている（Prokhovora ら 2008 年）。現地の方法はさまざまで、例えば、トリプシン処理後の単一細胞等がある。

（新しい WG が、質問表により諸検査機関を比較し、腫瘍アッセイ（tum assay）を同等な形で確実に実施するためにキーとなる重要な課題に合意を形成する）

### 3. 遺伝子的安定性

培養下の細胞は絶対安定な核型を有するとみなさないが、ヒト二倍体線維芽細胞の安定性は顕著である。「正常」組織内に少ない割合で異常核型が含まれるかどうかは不明だが、*in vitro* における上記細胞の重要性はまだ明らかにされていないとはいえ、細胞株の臨床使用における重要課題になるだろうと言える。線維芽細胞培養の SNP 変異から、遺伝子的安定性の許容基準値を設定できるかもしれない。*in vitro* における継代培養の時間及び回数を最小限に抑えた培養過程の管理が、遺伝子的不安定性に起因するリスクを最小限に抑えるための有用な取り組みと考えられる。

個別の細胞株そのものより細胞株安定性が問題となり得る培養条件で一定の変化又は変異の影響を考慮することが重要である。

未分化シードストックの場合、細胞遺伝学的解析には、20 の分裂中期染色体数やさらに 10 の分裂中期 G バンド分析を含めること。全ての細胞は二倍体とし、構造転位が認められないものとする（旧指針書の表を見直すこと）。

遺伝子的安定性のモニタリングと検出される変化の解釈に使用される可能性がある試験方法についての専門家のコメント – ISCI を参照すること。

生産安定性逸脱に関する新たなパラグラフ – WHO 細胞基質研究グループと調整。

### 4. 形質転換 DNA

輸液や移植の過程で患者には多量な細胞 DNA が注入されるが重大な有害作用は生じない。内在性レトロウイルスに対するこのような曝露経路に固有のリスクは、極端な低値とされている（Weiss, 1991）。しかし、CBER の未発表データを見ると、ある種の DNA は動物体内にごく小用量でしばらくの間とどまり、腫瘍を生じさせる可能性があることが示唆される（Sheng-Fowler, Lewis and Peden, 2009）。結論は？

サイトカインや癌遺伝子のような生物活性分子の幹細胞株での発現はほとんどが未同定の状態で、発現する分子の種類／レベルに関するデータを収集することは当該細胞株の相対的な安全性を立証するために有用だろう。細胞基質に関する WHO 勧告の文言と同様な総論の追加を検討すること。協議の提言事項：治療用細胞株の開発にあたっては、発現プロファイル及び細胞マーカーを詳細に評価し、発現のレベルやバラツキ、安全性面や治療上から考えられるその影響を理解することが重要である。

### 5. 外来性物質

医療用幹細胞の送達において外来性物質は重大な課題である。研究用細胞の指針と同様に、重大な血液由来ヒト病原体に関する検査を盛り込むことが重要と言えるが、細胞培養で持続又は複製される物質があれば患者にとって重大な危険となる恐れがあることも明らかである。ある種の物質に対して幹細胞の感受性を抑えれば臨床使用への信頼が得られるが、このような感受性プロファイルはまだ確立されていない。

微生物試験については対象とする細胞に考慮すべき代表的な試験を付録 2 に示す。既知のウイルス因子に対する全面的な試験の試みが望ましい場合も不可能な場合もあり、両者の兼ね合いを取って、細胞株の起源や培養経過に基づき最も生じやすい汚染物質を確実に試験しなければ

ばならない。重要な原則として、培養経過のデータを十分に記録していれば、それだけ信頼性の高いリスクアセスメントによって細胞バンクの安全性試験法を設定できる。完全な試験法を採用する時期は製品によって異なることがある。細胞が供給業者から製造業者へ受け渡される場合は、製造業者に応じてさまざまな条件と試薬が用いられ、規制当局は製造目的で設置されたバンクに改めて十分な適格性評価を求めることがある。バンクによって、目的とする細胞に対して完全な試験一式を使用するものもあれば、最も生じやすい重大な汚染物質に対応する試験を実施するものもある。

#### 規制当局からコメントを求める（アクションGS）

バンクは現地試験法の設定を支援する諮問グループを組織することとし、バンク間でこのような活動を調整することが重要である。バンクが試薬のリスクを評価し、微生物学的リスクが最も低い採取源に応じた適切な外部調達を確保することが重要で、特に血清やトリプシンのように滅菌できない試薬はその重要性が高い。

試薬に対するリスクアセスメントの一般的な方法は研究用細胞の指針に記載されたとおりである。迅速試験法は細胞バンクに有用だが、有効期間が短い製品には欠かせない。研究用指針に示すとおり、新たな疾患や汚染の発生に遅れを取らないようにしなければならない。

新しいDNAシーケンス及びマイクロアレイ法によって、細胞培養にある事実上全ての物質の検出に大きな進歩が期待できる。しかし、このような手法はまだ実証されておらず、臨床使用の細胞バンクで使用される際の妥当性も確認されていないことから、バンクは上記の手法に関して「監視の指示」を守りながら、臨床評価に有用なデータを作成するための開発に取り組むものとする。

#### AAWG から以下の詳細を得ること。

##### バンクにおける最低限の試験で考慮すべき微生物の一覧

##### プリオン汚染への対応策

##### 安全な評価経路図

## 6. リスク軽減策

### 6.1 ドナーの選択

さまざまな地域によってドナーの選択にバラツキが生じることから、臨床使用の細胞を得る者は原産国で適用される現地規則を確認することとする。ドナーの選択基準登録はISCF ウェブサイトで対応する（BG WG 表の考察）。生物学的製剤の生産における細胞基質の勧告（CBER, 1993; ICH Q5 を追加）1998,WHO 準備中）にはリスク評価の重大な課題が明らかにされているが、非常に多くの人（ワクチンで言えば罹患していない健常者等）に使用され、多くの場合高度に精製される産生物にもこの勧告が規定されることへの注意が重要である。したがって、リスク・ベネフィットの釣り合いは救命的細胞療法によって大きく異なり、このような療法に使用される細胞株に関する要件もこれに応じて異なる可能性が高い。

#### 新しいWHO 指針の有効な包括的要素について細胞基質に関するWG の追加インプットは？

幹細胞株分離用の細胞及び組織が、ある疾患の発生率が他より高い患者集団に由来する可能性がある点を認識しておくことが重要であり、リスクアセスメントでこの課題を調整すべきである。1例として、クラミジア等の微生物学的感染（及びヒト生殖路に関連するその他の疾患）や流行性耳下腺炎があり、これらが hESC 株の試験法へ影響する可能性がある。

#### AAWG、セクション5を踏まえて照査する

国によっては、規制経路図を作成し、規制の見通しに関して国立の細胞／組織バンク、病院及び業界による協議を図っており、英国の例については、以下の URL で確認できる。

[www.advisorybodies.doh.gov.uk/.../gtac/InterimUKSCroutemap120309.pdf](http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/.../gtac/InterimUKSCroutemap120309.pdf).

#### 他国の経路図を付加するか？

### 6.2 患者の既往歴

いくつかの地域では、疾患に即するか、感染リスクを伴うライフスタイルに関連する可能性がある既往歴を求められることがある。バンクはこれに応じて当該情報を照合するものとし、いずれにせよ（研究用指針に記載のとおり）、受入れ細胞株と引渡し試料の追跡可能性を確保し、提供後の疾患や臨床使用における有害事象を生じた場合に適切な双方向の追跡を可能にすること。

既往歴の収集がない場合は追って必要になることがあり、そのときドナーの所在地が変わっていればドナーの再診が困難又は不可能になるかもしれない。ドナーの既往歴に関する要件を設定する場合には有用とされる情報の決定が重要で、対象とする情報詳細の中には家族性 CJD 等の遺伝性疾患に関する家族歴も対象になるかもしれない。所定のリスク因子（性的行為、薬物乱用等）に関してドナーから与えられる情報の信憑性についての判断は困難なことを理解しておく必要があり、ドナーの管理は国によって大きく異なることがある。

### 6.3 提供後の疾患及び有害事象報告

十分に立証された副作用迅速警報システムを配備し、臨床試験における提供後の疾患及び有害事象の報告に対応する。バンクはこの体制中で組織立てるものとする。

#### QAWG で収集すべき詳細

### 7 必須試薬

プロセスの完全な理解を得て、グループ間でその情報を交換し、汚染を受けやすい急所を特定する上で図 1 (UKSCB 導出プロセスマップ) に示すようなプロセスマップが役立つ。バンクは製品仕様を基礎づける原材料ごとに最小限の等級及び仕様を定めるものとする。

バンクは、原材料供給業者の監査を考慮して仕様の遵守を確保するものとし、検討にあたっては監査の負担を分担できるような仕組みを考慮することが望ましいと言えよう。高コストの試薬は複数のバンクで共通して使用できる製品を開発すれば実用上コストの低減に役立つだろう。

QAWG – 監査を減らす仕組みを検討する。 – 提言事項：「試薬のリスク評価（セクション5を参照）を用いれば、監査に対応するバンクの利用可能な資源をリスクが最も高い製品へ重点的に投入することが可能になるだろう。監査に係る負担の分担にあたって、あるバンクの品質シ

システムが別なバンクで実施された監査結果を受入れることは難しいかもしれないが、リスクアセスメントの報告に役立つ監査の共有を検討することが望ましい」。

標準化に関するWGが質問確認リスト（供給業者向け手引）を作成する

## 8. 保存及び貯蔵

### 凍結保存

細胞は、適切な凍結保存プロトコルを用いることにより安定状態で維持することができる。凍結保存プロセスは、低温保存前及び凍結保存物質の培養前に行ういくつかの加工段階で構成される。また、材料の保存及び運搬は安定状態が保たれる条件下で行わなければならない。凍結保存プロトコルは一般に次の2種類に分類される。細胞内外を問わず系内で氷生成を生じさせるもの（冷凍）と、氷生成を抑えるもの（ガラス化）。

有効な凍結保存プロセスの計画や使用において、考慮すべき重要な技術的問題がいくつかある。

- 凍結保存プロセスからの細胞回収率を評価するための方法
- 凍結防止剤（CPA）の選定
- 容器及び包装の選定
- 凍結保存の形態（冷凍かガラス化か）
- 冷却方法（受動的か冷却速度制御か）
- 保存条件
- 凍結保存物質の運搬
- 回収方法（復温や凍結保護剤の溶出）

### 凍結保存からの回収率の評価

凍結保存プロトコルを設計又は最適化するために回収率の評価が必要である。トリパンブルーや、アクリジンオレンジ/ヨウ化プロピジウム等の蛍光化合物を用いた試験は「生死判別試験」と呼ばれることも多いが、正確には細胞膜完全性試験である。細胞の正常機能を示す試験の正確性、特に培養下のヒト胚性幹細胞に対する複雑な要件については議論の余地がある。このような試験では、生存、付着、増殖、未分化状態の維持、必要な細胞型への分化等の細胞の能力が過大又は過小評価されることがある。解凍時に細胞膜の完全性を示す細胞であっても以降の時点でアポトーシスにより死亡する可能性がある。このような試験は分離に使用すべきではない。凍結保存の回収率を評価する際は、適切な機能解析を含む一連の試験を検討する必要がある。解凍後、例えば24/48時間時点において生存物質の評価及び定量化を考慮する。

### 凍結保護剤の選定

適切な凍結保護剤を選定する際、細胞に対する既知の具体的な効果（例えば、分化促進剤としてのジメチル・スルホキシド等）を検討する必要がある。保護するためには冷却前に凍結保護剤溶液中で細胞を平衡化しなければならない。CPAは細胞毒性を示すことがあり、このような化合物については、時間、温度及び濃度に伴う固有の毒性に考慮しなければならない。溶液の添加物（血清等）があれば毒性等の作用に対する軽減能力を評価するものとする。

凍結保護剤溶液は細胞との関係で添加時及び溶出時に浸透圧効果を発揮する。非管理状態の場合、このような効果は損傷を引き起こしたり、細胞生存に支障をきたしたりすることがある。

段階的な添加・溶出プロトコルを採用することで浸透圧損傷の低減や除去が可能である。一段階プロトコル（例えば、遠心分離や凍結保護剤を含む媒質中の再懸濁等）が生存へ及ぼす影響を評価することとする。段階的又は緩徐な添加もしくは溶出プロトコルは、CPA 毒性により損傷を引き起こす可能性を踏まえたものとする。

#### 一次容器の選定

細胞懸濁液に関する一次容器の選定は、一般に凍結保存の状態を条件とする。現行の選択肢にはストロー、バイアル、バッグがある。各選択肢の適格性は、凍結保存状態（必要な冷却速度の達成の可否等）だけでなく、主に冷却や保存時に生じる汚染の低減又は防止能力、規制指針への適合性（一次容器の表示要件等）を評価すべきである。オープンシステムの採用は最良実施基準に即したものとは言えない。

#### 凍結保存状態

幹細胞の凍結保存には2通りの手法、ガラス化と徐冷が用いられている。どちらの手法も適切に応用すれば高い生存率を確保できる。

#### ガラス化

現行で応用されるガラス化法は低濃度の CPA で超高速冷却を用いて氷結しないガラス状態を達成する非平衡法である。この場合、ガラス化状態の維持に必要な状態（特に安定した低温状態）が保たれなければ失透を起こしやすい（有害な氷生成を続発する可能性がある）メタ安定状態をいう（保存及び運搬を参照）。

ガラス化法を採用する際は、容器の選定と冷却物質の単位体積が最大達成可能な冷却速度に影響するため、この両者を考慮する必要がある。ガラス化の達成に必要な超高速冷却速度には、高い表面積対体積率（容器の幾何形状に関連）と小容量（単位試料あたりマイクロリットルの桁）の両方が必要である。細胞の大型バンクを用意する場合には、スケールアップに際してこの手法の実用性を考慮すべきである。

また、オープン・ストローや、未滅菌の液体窒素（LN<sub>2</sub>）を入れストローを刺入するデュワーの使用についても検討する必要がある。どちらも、微生物学的及び規制上の両面から最良実施基準に即したものとは言えない。オープン・ストロー法に代わる方法には、クローズド・ストロー法やストロー・イン・ストロー法等があり、物流上の制約（バンクのサイズ、運搬形態等）を伴うと考えられる場合にはこのような代替法を考慮してもよい。他にクローズド・ストローを推奨すべき場合はないだろうか？

他に氷結しない保存処理の代替法には、高濃度 CPA の使用もしくは天然又は人工の氷結防止分子の添加に徐冷を組み合わせた平衡法のような手法があるが、今のところ幹細胞へは応用されていない。

#### 従来の徐冷

徐冷中、系内で氷生成が生じ、細胞が収納される残留液相の溶質が濃縮される。損傷の原因は主にこの際の高い溶質濃度への曝露（溶液効果）によるものだが、細胞内の氷生成によっても生じることがある。細胞内の氷生成は急冷によることが一般的だが、緩徐な冷却速度においても偶発的な事象として組織内に生じ、周辺細胞へ氷結の波及を引き起こすことがある。CPA が不



利に働くのは徐冷の有害な溶液効果であって、細胞内の氷生成による損傷ではない点に留意すべきである。

従来の徐冷法は一般に「単一」細胞懸濁液として生成される大型の細胞バンクによる影響を他より受けやすい。幹細胞の凍結保存コロニー断片に徐冷法を用いる場合には、氷核剤の選択や高い氷点下温度における播種試料等の氷核形成抑制方法を検討する必要がある。

#### 冷却方法

ガラス化に必要とされる急速な冷却速度は、寒剤、通常は液体窒素へ試料を直接浸漬することで得られる。徐冷は、冷却速度制御か受動冷却器具の使用のいずれかで実現できる。いずれの場合も、試料汚染やクリーンルームの汚染問題、ならびに再現性やバリデーションの問題（バリデーションを参照）を考慮しなければならない。

生成物を収めたチャンバーを LN<sub>2</sub> の注入により冷却速度を制御する冷凍機（CRF）はほとんどの場合クリーンルーム環境外に設置するが、その結果生じる窒素蒸気のクリーンルーム外側への排出や、冷却サイクル間の効率的な滅菌が可能であればこの限りではない。製造区域外でこのような機器を使用する場合は、CRF への細胞の移動方法を考慮し、CPA 曝露時間/温度が細胞生存に支障をきたすことがないようにしなければならない。

代替手法として、スターリングサイクル原理などを取り入れた、液体窒素を使わない速度制御冷凍機等が考えられる。このような装置は冷凍速度を制御するためにクリーンルームに対応する溶液を備える中、必要な冷却速度、単位体積及び貯蔵する細胞株に応じたバンクサイズのサポート能力を評価する。

細胞を CRF から低温保存へ移行する際の最終温度は十分な低温に設定し、取扱い及び永久保存移行時に試料の温度上昇により細胞が有害な氷点下温度（一般には -40°C より上）へ曝露することがないようにしなければならない。

受動冷却器具は一般に機械的冷凍機内に置いて平衡を保つ。氷点下環境の慎重な管理があれば再現性のある一定の冷却速度を得ることができる。氷点下温度は -70°C 以下とし、最も有害な氷点下温度（氷点平衡状態から約 -40°C の間）への細胞の曝露を制限するとともに、この温度範囲で線形の冷却速度が得られるようにすること。QC 用対照試料の温度管理記録、指定した冷凍機の使用、この冷凍機に対する凍結保存時の立入制限方法を考慮する必要がある。

#### 保存条件

科学的根拠から、超低温氷点下温度での保存（一般に LN<sub>2</sub> 以上の平均保存温度）は、安定して一定の温度が保たれるならば長期間（何十年単位）にわたって物質の大幅な変質を引き起こさないことが示唆されている。この根拠は -160°C 以下の機械的冷凍にも展開することができる。また、-80°C ~ -85°C の機械的冷凍機における保存は短期間であれば許容できる。この温度における保存が必要と考えられる場合には、保存期間の妥当性を確認して細胞に有害作用が現われないことを実証することとする。-80°C を上回る保存はできる限り避ける。ガラス化した物質には、失透温度（約 -130°C）を上回る温度、又はこの間の繰り返しサイクルは避けなければならない。

細胞を超低温で保存する最も安定した状態は液体窒素下の保存によって実現できる。上記の形で保存される試料に、液体を介して交差汚染が生じる可能性を考慮する必要がある。文献には、ウイルスを含む汚染物質が液体窒素下でも生存し得ることを示すいくつかの報告があり、この

経路からのウイルス伝播を示す報告も1件にとどまらない。試料封じ込め（一次及び二次容器）及び考慮される条件の代替手段に対して形式に従ったリスクアセスメントを実施する必要がある。

これまでに液体窒素上方気相中の保存（別称、気相保存）が推奨されている。このような保存は、交差汚染リスクを低減する一方で、LN<sub>2</sub>冷却装置固有の底面から上面に及ぶ温度勾配により温度不安定の可能性が高まる。このような温度勾配は、それを抑えるようなタンクの購入又は改良により低減や除去が可能である。提供される保存冷却装置には、保存コンパートメントからLN<sub>2</sub>を取り除いたもの（別称、恒温器）や、試料容器より下の区域にのみ液体窒素を使うもの（気相プラットフォームの採用等）がある。温度勾配は、LN<sub>2</sub>を注入する受器を被覆する方法（恒温化）、又はタンク内に熱分離器を使用するか、受器への低損失アクセス設計を用いた方法のいずれかにより低減又は除去される。

### 運搬

徐冷によって凍結保存された細胞はドライアイスを入れて運搬することができる。ガラス化した物質は、失透と細胞損傷を避けるため、ドライアイス（固体CO<sub>2</sub>）中、-79°Cで運搬してはならない。いずれの方法で凍結保存した細胞も、LN<sub>2</sub>乾燥出荷容器で運搬することができる。バンクは必要な技術専門知識を備えた運送会社を選定して当該出荷に取り組むこととする。原産国外の出荷に係る可能性が高い場合、バンクは乾燥出荷容器による細胞の安全な出荷に関する規制要件を十分に理解する必要がある。

### 凍結／ガラス化物質の回収

不適切な解凍やCPA溶出プロトコルを用いると細胞の破損を招くことがある。一般的に、急速解凍は、復温時の細胞内氷生成やCPA溶液効果による細胞損傷を防止する上で有効と考えられる。凍結保存プロトコルの計画や使用において、特定の復温方法に最適化された冷凍／ガラス化プロトコルや復温方法を考慮するものとする。

熱暴走の抑制又は防止（比較的高い温度で細胞がCPAに曝露した状態を可能にする方法）及び浸透圧損傷を防止するCPA溶出方法についても考慮する必要がある。過度の膨潤防止にショ糖やマンニトールのような非透過性成分の使用を考慮する。被提供者には、検証済みの解凍・溶出プロトコル及び有害事象／不具合報告体制を提供することとする。ガラス化に使用するストローには、試料の不要な解凍を防止するため、迅速かつ慎重な取扱いが必要な点を考慮すべきである。

### バリデーション、モニタリング及び警報要件

全てのプロセス、装置及び設備の妥当性を確認して意図した目的に適合することを実証しなければならない。それには、正式な仕様体系、設計時適格性評価、ならびに据付時、運転時及び稼動性能適格性評価が必要となる。また、製品品質に影響する可能性があるパラメータをモニタリングして警報を発するようにしなければならない。

凍結保存プロセスそのものに関しては、その妥当性を確認し、凍結保存から回収される細胞が特性を有し、仕様書に規定された機能を実行できることを実証する必要がある。

速度制御冷凍機、機械的冷却装置、LN<sub>2</sub>保存冷却装置及び乾燥出荷容器等の装置は、使用中の継続した温度モニタリングと記録により、必要条件が維持されていることを実証する必要がある。温度データ収集装置がない状態で細胞を運搬する場合には、化学的又はその他のインジケータを用いた運搬時の温度に関する情報提供を考慮する。温度限界が必要な場合（不適切な温度による保存を防止する場合等）、装置には上下限を必要に応じて設定して警報を発するものとする。また、この他のパラメータ（LN<sub>2</sub>の低値、LN<sub>2</sub>供給不足等）の警報も必要になるだろう。

### 災害復旧 – Cryo WG/QAWG の新規項目は？

#### 9. リスク分析

幹細胞バンクは、適切なリスク評価モデルを採用することとする。リスク分析は主として、リスクの特定と評価、実施する管理の評価と残存リスク、継時的な変化に応じたリスクの見直しからなる。このプロセスでは一般にリスク記録の保守管理を通してリスクの継続したモニタリングを確保する。バンクはリスクマネジメントにより資源投資の重点分野を特定する必要がある。リスクマネジメントの要素には以下のものがある。

- リスクの特定と評価及びリスク記録の取りまとめ
- リスクの評点と優先順位付け
- 有効な管理を適用した後の残存リスクの測定
- 容認できない残存リスクと対策の受入れ、対策のモニタリング
- リスクの定期的な見直しによる変化の確認と新規リスクの特定

QAWG/AAWG からの文言の追加は？ 勧告文言：「各種のルートから新しいリスクを特定することができる。例えば、試験不良、顧客苦情の原因調査、有害事象の調査等がある」。

#### 10. 細胞バンクの QC 及び安全性試験

各種サービスは、業務について適切に認定を受けた検査機関により、医薬品安全性試験実施基準（OECD 参照先を付記）や ISO17025 等の国内又は国際的に認められた品質基準に従って実施されるものとする。

倫理的及び効率上の観点から、臨床使用向けに確立された幹細胞株は広範な治療に使用できることが望ましい。このため、幹細胞バンクのストックが最終的にどのように臨床使用されるかを把握することは難しいことから、目的とする臨床使用の完全なリスク分析を実施することは不可能であり、これによって幹細胞株の各医療用シードストックやフィーダー細胞培養に必要なとされる試験法を正確に決定することはできないだろう。以上から試験法は必然的に、細胞型に伴う可能性の高い一般的な危険や、各細胞株の採取源及び培養「歴」に関連する固有の危険に基づく、その場に応じたものになる（AAWG による表 XX を参照）。

出荷基準試験は、適切に認定された検査機関で可能な限り実施する。相応する認定試験が用意されていない場合には、実施する試験の技能に関するバリデーションデータをバンクが提示できるものとする。複数又は統一した局方の試験法を満たす基準サービスが提供されていること

もあり、細胞株の国際的な臨床使用が予測される場合にはこのような対応が望ましい。臨床使用向けに幹細胞株を出荷するバンクで使用可能な出荷基準の具体例を付録 2 に示す (AAWG)。

細胞由来の生物学的製品を製造するために細胞基質を使用する製造業者にとって、マスターセルバンク (MCB) の重点的な試験や特性化が典型的な活動だが、策定中の指針 (細胞基質に関する WHO ガイダンス準備中、EMEA 参照先) には、製造に従った各ワーキングセルバンク

(WCB) に対する全数試験のような代替法も正当化できると提言されている。当該試験は臨床使用向けの幹細胞バンクにも正当化されるかもしれないが、幹細胞バンクシードストックには、MCB の重点的な全数試験に WCB 試験を合わせて試験コストを削減し、将来的な WCB の製造に対応する最良実施基準に従って MCB の適合性を確保することが推奨される。科学的根拠のあるリスクアセスメントに基づいて妥当性が示される場合、例えば遺伝子変化のリスクが考えられるようなケースでは、WCB の追加試験を検討できるものとする。

### 10.1 同一性試験

試験方法は科学捜査で標準化されているもので、研究用細胞に関する指針に記載するとおり、商業的なサービスやキットも容易に利用できる (ISCB, 2009)。ほとんどの商用 STR キットは主に 5 つの共通 STR アレルを用い、センター間で細胞株プロファイルの直接比較を可能にしている。使用可能な SNP を用いた代替手法があるが、統一された STR プロファイリングシステムで一般的に使用されるものと STR 遺伝子座を合わせて使用することで、固有の細胞株を用いた細胞療法の送達に加わるかもしれない別なグループのデータとの比較が可能になる。完全な DNA プロファイルの報告はドナーの特定が可能になることもあって望ましいものとは言えない。

### 10.2 無菌試験

標準試験法は USP や EP 等の国内当局による公表に従う。各バンクは自国の薬局方を採用するものとする。ただし、このような試験プロトコルは無菌操作の違反を検出するためのものであり、一般的に、細胞培養の複合培地や複合条件下で増殖し得るある種の栄養要求性菌を分離するような培地や培養条件を使用するものではない。局所環境又は特定の試薬で特別な危険と見なされる場合に上記のような微生物を検出する際は追加の分離培地も考慮できる。重要な点として、バンクは無菌試験前の培地に抗生物質を使用しないこと、治療用の細胞を調製する際は原則的に抗生物質を使用しないことを強調する。

### 10.3 マイコプラズマ

ベロ細胞接種/DNA 染色に基づく標準試験法及び培養単離法は薬局方による公表に従う。PCR 法も公開されるが、必ずしも薬局方に収載されとは限らない (AAWG、薬局方マイコプラズマ否定試験に関する最新の展開を更新する)。

ネスト PCR 法は偽陰性を引き起こす可能性があるが、接種後のマイコプラズマ液体培地に適用される直接 PCR 法は、感度に関して大きな利点が得られる。試験の標準化を図るには標準物質が必要とされる (CSWG が、WHO と協調してマイコプラズマ検出における国際的な標準物質の展開を進める)。

### 10.4 核学

治療を目的とする幹細胞株のシードストックバンクに対する核学試験の要件は、他の (未分化及び部分的分化) 細胞バンクや、製造工程に使用される最終製品細胞バンクの要件とは異なる

ことがある。シードストックに対する核学的分析の要件は問題とする細胞株の特性（注、遺伝子的安定性の程度）によって異なる。シードストックバンクでは、20のGeimasaバンド染色体分裂中期スプレッドに関するデータを示し、さらに10の分裂中期スプレッドに、研究用細胞株で提唱される（ISBI, 2009）染色体数を確保することで十分と考えられる。これにより、培養に5%レベルの核学的な異常細胞を検出する可能性を示す。ただし、特定の異常は検出されないこともあるが、検出されることが望ましい。シードストックでは、治療用の細胞を調製する際、異常細胞又は最終的な患者に引き起こされる可能性がある危険を取り除く手順が用意されていれば、一定レベルの遺伝子学的異常は許容可能となる。医療用シードストックの出荷試験は必ず資格のある認定検査機関が国内/国際規定に従って実施することとする。

部分的な分化が考えられる細胞バンクや最終製品に義務付ける一連の試験に関する記載を追記すること。

新しい技術（例えば、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（aCGH）、「分光」による染色体解析、一塩基多形型試験用大規模配列、「全ゲノム」配列解読等）によって、異常細胞に対する検出力の向上が期待される。このような新技術によるデータの要否は新しい手法に関して多くのデータが公開されるとともに評価を受け、細胞の臨床使用においてどの程度の遺伝子的不安定性が許容できるかを検討することが重要となる。

#### 10.5 生存率と生育測定

解凍直後に試験を行うと生存率を過大評価する可能性があるため、死判別試験の実施時期に留意する必要がある。解凍後のコロニーの生存生着率との比較に経験を積むことが重要である。他の生物学的製剤では、トリパンブルー色素排除試験で70%を超える生存率が得られれば許容範囲とされている（FDA）。この他に、ヨウ化プロピジウム、蛍光ジアセテート、アルマーブルー等の一連の試験が用いられるが、各試験では「生存」のそれぞれ異なる側面に関するデータが得られる。生存率からは、細胞調製の機能性に関する情報は得られない点を心得ておくことが重要である。

生育測定の内容は、細胞が単一細胞懸濁液として継代培養されたものか、又は剥離又はコラゲナーゼによるコロニー断片として処理されたものかによって異なる。単一細胞懸濁液の継代培養は広く使用されるようになってきているが、検査機関ごとにバリデーションを行い、細胞培養の安定性及び多能性が影響を受けないことを保証しなければならない。形質転換が反映されることもあって、生育速度はモニタリングを要する重要な特性である。成長培地を交換すると生育速度に影響することがあるが、細胞が形質転換していなければ元の培地へ戻す可逆的なものとするべきである。アルカリフォスファターゼのようなコロニー形成検定法が有効とされる（OConnor et al., Cell Stem Cell）。

#### RC 及び Cryo に関する WG がコメントする

生育速度の推奨される測定方法に関するコメントを追記する。例えば、クローニング・コロニー形成効率/播種効率に関するコメント等

#### 10.6 遺伝子及び抗原発現

遺伝子及び抗原発現の特性化により、細胞状態に関する有用な基本的情報が得られ、特に、マイクロフルイディクスアレイ（例、ISCIで使用されるTLDAカード等）や細胞の複合蛍光色素標

識でいくつかの標的に対する同時評価が可能な場合には、培養のパラツキや一貫性に関する情報も得られる。しかし、多能性検定法であれば、細胞能力の機能的指標を示す点でさらに有効性が高い。

出荷基準に関する WG が策定する - 多分化能/奇形腫 WG も加わる

質問事項：

臨床で使用するために細胞株を多能性にする必要があるか？協議の提言事項：「多能性検定法により、体外培養によって細胞株が変化していないことを示すある程度の指標が得られる。ただし、1つ又は限られた数の細胞型の発生を重視した特定の細胞療法製品の場合、非多能性で分化能が制限された細胞株を利用可能と実用的に考えられ、実際、細胞は部分的に分化した状態で貯蔵できる。療法に関与する患者の部位で発現し得る細胞型の範囲を狭くすれば、一定の製品に関する安全性便益を想定できるだろう」。

部分的に分化した、治療製造向け細胞バンクの設定から安全性又はその他の有望な指標が得られるか。

### 11. 遺伝子的安定性

核学はゲノム完全性を評価する上で最新の基準手法だが、小規模な遺伝子変化に対する感度はあまり高くない。一方、SNP や CGH マイクロアレイのような手法は有効ながら、十分な経験が求められる。

RCWG、付録 2 に遺伝子的安定性を取りまとめる

遺伝子的安定性の専門家とともに本文を新たに作成する。注、iPSC 及び hESC

### 12. 試験方法の標準化

幹細胞の特性化には十分に立証された表面マーカー及び広範囲な遺伝子マーカーを使用し、検定法に応じた特定の標準物質が有用かもしれない（例えば、固定細胞の調製、RNA の調製）。統一した機能解析を開発する必要があり、検定法や試薬は検査機関によって異なるため、この領域の進歩には標準化された多能性検定法が特に重要となる。

さらに、細胞培養で使用する成長因子の標準化は医療用細胞培養における再現性の強化に役立つだろう。

RCWG、細胞データ及び文書化の標準化を検討する

TumWG、アンケートを実施して使用する方法に関するデータをさまざまなグループから収集する

### 13. 管理及び規則

ある地域から別な地域へ製品を運搬する者にとって、倫理基準の同等性、国ごとの政治的枠組みのパラツキを考慮することが重要になる。[www.stemgen.org](http://www.stemgen.org) に、ある程度の情報を公開しており、ガイドラインも策定している（[www.isscr.org](http://www.isscr.org) 等を参照）。研究用細胞株の指針に記載したとおり、他国からの細胞の受入れ時や他国への供給時、バンクは倫理規定の妥当性を確保する必要がある。3つの基準を考慮するものとする。

- 倫理上及び法律上の同等性
- 互恵的政策合意の正式な確立（UKSCB は NIH、CIRM は UKSCB を受入れ）
- 「許容可能な派生物」の基準、すなわち共通の手法から得られる実質的同等性がある状態。例えば UKSCB の場合、「英国規則と広く合致する」条件に従って得られた細胞を受入れる。

ドナーに関する側面を評価する際、バンクが対応すべき重要な課題は、同意書、報奨金、利益相反、機密性及び個人情報の保護等と数多い。バンクが細胞株の正真正銘の使用者を確認するには大きな難題が伴う。

**BGov/Regul WG の対応処置、本文の見直しと同意書に関する国際的な移行及び「実質的同等性」の定義を検討する。諸国の同意書テンプレートを比較することが有効かもしれない (BGov WG が検討)**

#### 14. 表示

材料の追跡可能性を確保する上で表示は重要な要素であり、バンクは、移植用細胞の供給に関して策定中の表示基準に適合する適切な表示システムの採用を目指すものとする。USA で開発された ISPT 28 システム (AATB) は、欧州への改良型の採用を現在検討中であり、臨床使用を目的とした幹細胞株の国際的な流通が予測される場所には、幹細胞バンクを使用する際の基盤としてこのシステムを考慮すべきであろう。

#### 15. 出荷

欧州には組織の輸出入に関する指令があるが、状況には大きな開きがある。イスラエルのような一部の国では、商業的価値に関する簡単な陳述書が求められるが、台湾には輸出入に関する特定の規制があり、またシンガポールのようないくつかの国ではこのような問題は今もなお検討中となっている。

非常に時間がかかり、急激な変化を受けやすいかもしれないが、ヒト組織及び細胞に関する輸出入規制を包括的に精査することが有用だろう。提言事項：関係国規制当局の連絡先一覧を示すこと。中国の状況に関する要約を付記するか？

要求を満たす国際宅配業者が効率的な出荷に不可欠であり、バンクが出荷に責任を持つものの、受領者は輸入に関する現地の要件を十分に心得ておくことが望ましい。**Cryo WG、本文を見直す**

**文書にセクションの新設は？**

**バンキング手順**

**データベース及び関連する QA 手順**

**その他、現行の本文書で取り上げられていない側面や考慮すべき事項：**

**前臨床開発及び試験における動物モデル（「製品」に関する RCWG 表で示唆）**

**現地語（日本）への指針の翻訳。注、「ISCF ガイダンス全国版」**

## 参考文献：

ISCBI (2009) SCRR

筆者 O'Connor MD, Kardel MD, Iosfina I, Youssef D, Lu M, Li MM, Vercauteren S, Nagy A, Eaves CJ. 表題「Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells.」(2008)。掲載先 Stem Cells. 26, 1109-16.

Terry Fox Laboratory, 675 West 10th Avenue, Vancouver, British Columbia, Canada V5Z 1L3.  
moconnor@bccrc.ca

ヒト胚性幹細胞 (hESC) は *in vitro* において不死化した多能性細胞として維持できるが、多くの分化誘導シグナルへの反応は残る。自己複製能を有する多能性 hESC の具体的で確固たる定量分析が利用できたならば、分化誘導に関与する初期の重大な事象に対する調査が大きく促進されると思われる。今回、未分化 hESC の増殖に最適化した条件下における付着性のアルカリホスファターゼ陽性 (AP(+)) コロニーの形成がこのような要求を満たすかどうかを判定するために一連の実験を実施したので、本稿にその結果を説明する。観察結果は以下のとおり要約できる。

(a) 上記の条件下で得られたコロニーの大半は、OCT4、NANOG、SSEA3、SSEA4、TRA-1-60、及び TRA-1-81 を共発現する AP(+)細胞 30 個以上で構成される。(b) このようなコロニーの多くは SSEA3(+)細胞から派生する。(c) 主要なコロニーは、同一成分の二次性コロニーを生成する細胞を包含し、この中には胚様体 (EB) の多分化を引き起こす細胞も含まれる。(d) コロニー形成は広範な細胞濃度にわたって試験集団の播種密度やコロニー形成細胞 (CFC) 含量と無関係である。(e) EB 形成を刺激する条件又はレチノイン酸のいずれかに曝露して分化が誘導される場合、CFC 頻度は低下する。興味深いことに、AP(+)クローン原性の低下も SSEA3 又は OCT4 の発現低下より急速に生じる。そのため、CFC アッセイは自己複製能を有する未分化 hESC を定量する際の単純で信頼性のある特異度の高い機能解析となり幅広く適用できる。標準化された検定条件下で使用すれば、hESC 増殖及び早期分化を調節する機構に関する今後の説明が強化されるはずである。

筆者 Sheng-Fowler L, Lewis AM Jr, Peden K. 表題「Quantitative determination of the infectivity of the proviral DNA of a retrovirus *in vitro*: Evaluation of methods for DNA inactivation.」、掲載先 Biologicals. 2009 May 18. [Epub ahead of print]

Laboratory of Retrovirus Research, Division of Viral Products, Center for Biologics Research and Evaluation, Food and Drug Administration, Bethesda, MD 20892, United States.

全てのウイルスワクチンは、生産細胞基質に由来する汚染物質となる残留 DNA を包含する。このような DNA の潜在的なリスクは、特に発癌性細胞に由来する場合は 40 年以上にわたって議論されてきた。主要なリスクは DNA の発癌性とされているが、この DNA に感染性ウイルスのゲノムが含まれることがさらに別な潜在的リスクとなる。当該ゲノムは感染性物質を産生する可能性があり、ワクチン接種者の感染を確定するおそれがある。細胞内 DNA にあるレトロウイルスのプロウイルス量を定量し、*in vitro* における増殖感染を確立し得る量を明らかにするため、われわれは、1pg のクローン HIV DNA 及び HIV 感染細胞の細胞内 DNA 2 mug から感染性ウイルスを回収できる形質移入/共培養システムを開発した。試験の結果、DNA の中央値サイズを 350 塩基対へ短縮するか、ベータプロピオラク톤を投与することで感染力を検出限界未満へ抑えられることが明らかになっている。感染力の減少量から計算すると、残留細胞基質 DNA に伴う感染力に 10(7)を超えるクリアランス値が得られる。このため、DNA に関連する潜在的リスクは分解又は化学的不活性化により大幅に低減できると考えられる。



## 付録 1. GMP に準拠する製造で使用される QA の定義例

**バリデーション：**一定のシステムが事前に規定した一連の仕様及び指針に従って構成され、機能する根拠を示す書類を作成する手順。バリデーションは以下のものを対象とするが、それに限定されるものではない。装置、コンピュータシステム、製造工程、洗浄方法、設備、公益設備ならびに分析法。

**プロセスバリデーション：**一定のプロセスが、事前に規定した仕様及び品質特性を満たす製品を一貫して製造することを高度に保証できる根拠を示す書類を作成すること。

**品質：**品質という用語は、仕様要件への適合性を含め、明示又は黙示の要求を充足し得る能力に影響する製品の機能及び特性の総体として使用される。

**品質システム：**品質マネジメントを実施するための組織構造、手順、プロセス、及び資源

**品質保証：**品質保証とは、製品の製造全体が幅広い動作条件下で品質要件を満たすことに十分な信頼性を与えるように計画された正式な方法をいう。品質保証には、管理の正式な照査、問題の確認、欠陥を改善するための是正措置及び実施した措置の評価等が含まれる。

**品質保証部門：**品質保証部門は方針、手順及び仕様を設定し、品質プログラム全体の妥当性及び有効性に対して、監査、審査、判定を行うとともに、継続した評価を含む訓練を実施する。

**品質管理：**品質管理は、規定した一式の品質基準に対する製造製品の適合を確保することを目的とする手順又は一連の手順。

**品質管理部門：**品質管理部門とは、品質部門の中で製品及び環境品質の継続した管理に責任を持つ職務部門を指す。したがって、品質管理部門 (QC) は以下のようなものの合否に全責任を負う。

1. 原材料
2. 細胞株／中間生成物／最終製品
3. 包装資材
4. 工程内管理 (IPC)
5. 表示及び検査
6. 補助システムの管理及び監視の保証

**バッチ：**バッチはロットとも呼ばれ、均一な特性と品質を持つことを意図される製品からなり、時間又は量もしくはその両方で分けられた物質単位として定義される。バッチは、規定の製造工程に従い、事前に規定した指定条件範囲内で製造されるものとする。

**バッチ製造記録 (BMR)：**バッチ製造記録 (BMR) はバッチ又はロットの完全な製造サイクルを追跡するための必須の品質文書記録である。

**バッチ記録の照査：**全ての製品製造及び管理記録を再確認して承認するプロセスをバッチ記録の照査という。この中には包装及び表示も含まれるが、これに限定されるものではない。バッチ記録の照査は品質部門が実施し、承認を得た確実な手順書への完全な遵守をバッチ出荷前に確認する。

**合否判定基準**：合格品質基準や不合格水準等と、関連する検体採取計画を含めた仕様及び合否判定基準で、原材料、中間体、包装資材、製品のバッチ又はロットの合否判定を行うために必要なもの。バリデーションにもこの用語が適用される。

**仕様**：仕様という用語は、製品又はシステムを試験する際の化学、物理、生物学的及び環境特性をあらかじめ定義した書面に使用する。この中には、出発物質、包装資材、中間体、バルク原薬、製品等がこの対象となるが、これに限定されるものではない。

**設備**：ここでいう設備は、例えば、微粒子や微生物汚染等の適用規格に従い、事前に規定した環境管理によって細胞療法製品を製造する際に使用されるものをいう。設備の構成及び使用は区域内における汚染物質の移入、発生、滞留を抑えるように行われるものとする。

**文書記録**：文書記録とは、製品の開発、製造、試験、販売及び流通に関して、世界各国で適用される規制要件への適合を示すために必要とされる手順書、指図書、記録簿、記録、生データ、取扱説明書、方針書と定義する。

**工程内管理 (IPC)**：生産中に実施される試験及び活動で、工程をモニタリングし、必要に応じて工程を調節して製品仕様への適合を確保するもの。

**中間体**：中間生成物。例えば細胞株等で、最終製品になる前にさらに加工処理を受けなければならないものをいう。

**規格**：An a 一般に認められるか、正式に確立された、品質保証に関する原則又は実施要領 (例、SOP 等)。

**無菌操作**：環境、職員及び／又は装置からの微生物汚染を阻止するか最小限に抑える方法を用いた細胞／製品の加工処理。

**監査**：手順、記録、職員の活動、試薬、材料、装置及び設備を検査して規格及び規則の遵守状況を判定すること。

**処分**：研究、移植又は廃棄に向けた細胞／製品の行き先。

**流通**：細胞／製品の依頼の受領から、細胞／製品の選定、検査、さらに受領者への出荷、受渡しからなるプロセス。

**装置の適格性確認**：据付けから使用するまでの間に装置性能を評価して、要求される許容範囲内の正常機能を保証するための手続き。

**ラベル**：容器／包装に添付される書面、印刷、又は図示による表示で、細胞／製品に関する重要情報を記述するもの。

**ロット**：ドナーから得られた細胞／製品、同じ試薬と材料を用いて同時に貯蔵し、独自の ID で識別されたもの。

**手順**：一連の順序付けられた段階で、これに従えば一定の結果を達成するように計画されたもの。

**隔離保管**：安全に使用できると判断 (許可／承認) されるまで材料／細胞／製品を隔離領域で保管すること。

**標準業務手順書：**品質保証の手順又はプロセスを詳細に記述したもの。

**追跡可能性：**製造、加工処理、試験、保存、流通又は処分のいかなる時点／段階においても細胞／製造物の所在を特定できること。

付録2 医療用バンクの hESC における出荷基準/仕様 (草案)

試験*	試験方法	基準/仕様	試験感度	試験特異度	出荷前の試験結果
同一性 <sup>1</sup>	短タンデム反復 (STR) 試験  ヒト白血球抗原 (HLA) 試験	全てのアレルが親細胞株と一致すること			仕様に適合
細菌/真菌	微生物培地を接種し、細菌及び真菌の発育を検出 <sup>2</sup>	汚染の検出不能			仕様に適合
マイコプラズマ <sup>3</sup>	直接培養 (hESC 及び上清)、寒天/ブイヨンを使用 (培養可能な部分) 及び DNA 蛍光色素染色を用いたベロ培養 (培養不能な部分)	汚染の検出不能			仕様に適合
核型 <sup>4</sup>	20 の分裂中期染色体数及びさらに 10 の分裂中期 G バンド分析	供試細胞全ての二倍体染色体、構造転位がないこと			仕様に適合
生存率?	生存率を定量化しなければならない。方法は?及び許容下限の決定	解凍後の生存細胞が $\geq 50\%$			仕様に適合
生育特性	増殖速度を定量	20~40 時間??			
安定性 - 抗原発現	hESC マーカーのフローサイトメトリー、 <u>P5</u> 、 <u>P10</u> 、 <u>p15</u> 及び <u>P20</u> 時点で、以下を対象とするがこれに限定されるものではない。 <u>Oct-4</u> 、 <u>TRA 1-60</u> 、 <u>TRA 1-</u>	hESC の $\geq 70\%$ で hESC マーカーを発現及び <u>SSEA-1</u> を発現する hESC が $\leq 10\%$			仕様に適合