

表 1 治療開始基準

1. 好中球 750/ μ L 以上、血小板 50,000/ μ L 以上
2. 血清 Cr 0.8mg/dL 以下 (5 歳未満)
3. T.bil 1.8 mg/dL 以下、AST(GOT) 160 IU/L 以下
4. 24 時間 CCr (体表面積補正) 70ml/min/1.73m² 以上
5. 治療が必要な心電図異常がないこと、BNP 100pg/mL 以下、左室駆出率 50%以上
6. 活動性感染症がないこと
7. 脳波：平坦脳波でないこと
8. Performance status
 - 1) 表情があること
 - 2) 四肢の動きがあること

分担研究報告書

重症低ホスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植

- 間葉系幹細胞培養および疾患モデルマウスの研究 -

研究分担者 弓場俊輔（産業技術総合研究所健康工学研究部門研究グループ長）

研究要旨

同種間葉系幹細胞 (MSC) の増殖をセルプロセッシングセンターにて行い、品質を保証した細胞を低ホスファターゼ症患者に対する移植用として供給するとともに、疾患モデルマウスを用いた動物実験に着手した。

A. 研究目的

低ホスファターゼ症患者は骨を作るのに必要な ALP が生まれつき正常に働かないことにより、骨を作ることが障害される遺伝性疾患である。本計画では骨形成障害を改善するために、同種 MSC を患者に移植して骨形成能を付与することにある。そこで、分担研究者、弓場は同種 MSC をセルプロセッシングセンターにて培養し、品質を保証した細胞を代表研究者に

供給することで臨床研究を遂行する。同時に、同疾患モデルマウスを用いた動物実験において、臨床研究で得られた有効性を検証することを目的とする。

B. 研究方法

1. 間葉系幹細胞培養（詳細は、資料 1）
島根大学で採取された骨髄を産総研に搬送し、セルプロセッシングセンターで

骨髓由来間葉系細胞の培養を行った。搬送中は10~30°Cを保つようにした。培養は20mg/mL 硫酸ゲンタマイシンと15%牛胎児血清を含んでいる液体培地(α -MEM)に採取した骨髓を混和し、培養容器を用いて炭酸ガス培養器(5%CO₂、37°C)内で行った。移植に必要な細胞数を得るために、培養容器底面に接着し増殖した間葉系細胞をプロテアーゼを用いて培養容器より剥がし、新たな培養容器で継代培養(2次培養)した。培養期間および継代回数は安全性を考え、1ヶ月以内で継代回数3回(3次培養)までとした。移植当日に間葉系幹細胞を剥離し、10mLのPBSに浮遊させた状態で島根大学へ搬送した。

また移植細胞の安全性は、まず骨髓採取に先立ちドナーのウイルス試験を行い、培養中の無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査で確認した。

(倫理面への配慮)

移植・骨髓採取のたびに島根大にて患者・ドナーへの説明を行い、同意を得た上で行った。

2. 疾患モデルマウス

低ホスファターゼ症の原因遺伝子である組織非特異的ALP遺伝子に変異を導入したマウス(TNALP KOマウス)について、米国ジャクソン研究所にて凍結受精卵から個体復元を行い、当該遺伝子についてヘテロ接合体の個体(9週齢)を入手した(図1)。



図1. TNALP KOマウス(ヘテロ接合体)

分担者研究機関の動物施設にて、この個体と野生型BL6との交配を開始し、ヘテロ接合体個体の繁殖を行った。また、繁殖で得た個体について、解析手法の確認として、軟X線写真撮影、 μ CT、下肢全

体の DXA（骨密度）測定を株式会社クレハ分析センターに、血清 ALP の測定をオリエンタル酵母株式会社に依頼した。さらに、患者同様、新生仔は、未処置では致死性であるため、ピリドキサル（ビタミン B6）投与の細胞移植前の生存維持にかかる処置についても実験手技を確立した。一方、移植するマウス MSC は、定法に従って 8 週齢マウス大腿骨内腔より採取し、培養を行うとともに、対照として市販のマウス MSC（DS ファーマ社製 C57BL/6 由来 [passage 6]）も入手して培養した(図 2)。

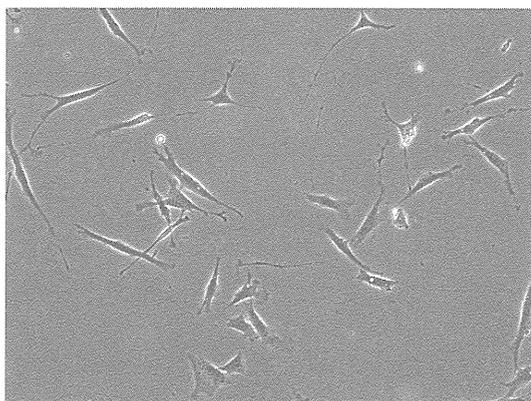


図2. 市販MSC（C57BL/6由来）

C. 研究結果

1. 間葉系幹細胞培養

2 例の患者に対する間葉系幹細胞移植用の細胞培養を行った(1 例目：2 回、2 例目：4 回)。15~25mL の骨髄を 2~3 週間かけて培養し、何れの場合も体重(kg)あたり 1×10^6 細胞以上、細胞生存率 80%以上という規定の細胞を調製できた。無菌検査、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査等の安全性試験結果はすべて異常なかった。また培養した間葉系幹細胞は、骨分化能を有していることが確認できた。

2. 疾患モデルマウス

ヘテロ接合体♂ 5匹と野生型♀ 10匹の交配を行い、既報通り、メンデルの法則に従ってヘテロ接合体が得られた。また、試験的にヘテロ接合体同士の交配から、疾患モデルになりうるホモ接合体も死産ながら得られた。これら個体の骨形成についての形態学的解析では、ホモ接合体のみならず、ヘテロ接合体にも異常が疑

われた。血清ALP値についても、ホモ接合体の検体は得られなかったが、ヘテロ接合体のALP値が野生型に比べ、有意に低かった。

移植用のマウスMSCについては、培養直後から血球系細胞(CD45+, TER119+)が混入(図3)し、磁気ビーズによる分離(図4)も試みたが、残存血球系細胞も増殖した。

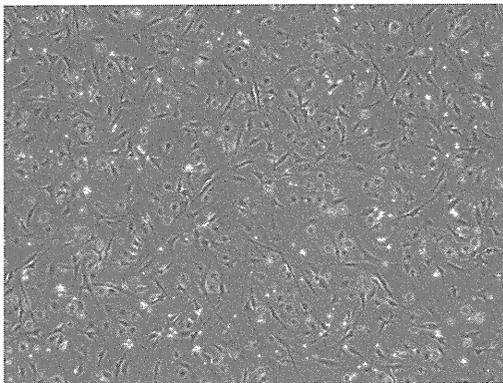


図3. 磁気ビーズ分離前のMSC培養

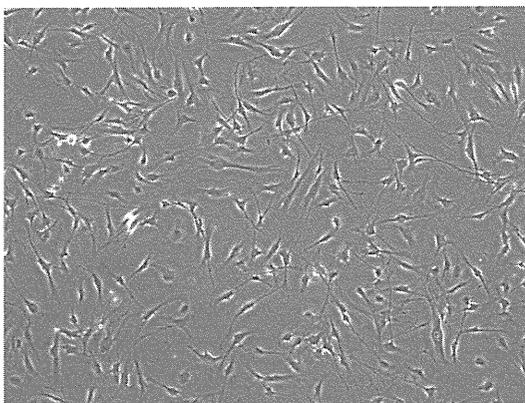


図4. 磁気ビーズ分離直後のMSC培養

D. 考察

1. 間葉系幹細胞培養

計6回、移植用間葉系幹細胞の培養を行ったが、有害事象は発生しなかった。現在行っているプロトコールで問題ないと思われる。また、培養した間葉系幹細胞が骨分化能を有していることから、患者の骨再生に寄与し得る可能性が示された。

2. 疾患モデルマウスを用いた動物実験

ヘテロ接合体同士の交配で得られた個体は、同腹仔3匹で、予備的に加えた形態学的解析・血清学的解析結果については個体差の可能性が排除できない。

また、これまでに予備的に得たホモ接合体は全個体死産であり、親の育児放棄による哺乳障害もその原因の一つとして考えられる。

また、大腿骨から新鮮採取した骨髓細胞からのMSC分離は、ヒトやラットのMSCのような接着性の差異、さらに磁気

ビーズによる血球系細胞の選別を利用しても困難であり、さらなる培養法の改善が求められる。

E. 結論

安全性が担保された移植用間葉系細胞を計6回、島根大学へ供出できた。疾患モデルマウスにおいて、ヘテロ接合体・ホモ接合体に対する解析結果については、同腹仔に限らず、交配を重ねて検体数を増して、個体差・再現性の有無を検討する。ホモ接合体個体の出生直後の生存についても親を代えるか、遺伝的背景の異なる別系統への戻し交配を試みる。

移植用マウスMSCについては、採取骨髄細胞の培養法の改善を試みる一方、当面の実験には市販のMSCを用いることとした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

1. Ohnishi H., Yuba S., and Ohgushi H. "Forced Expression of Transcription Factors in Human Mesenchymal Cells to Promote Proliferation and Osteogenic Differentiation." *Bioceramics Development and Applications Vol. 1* (2011)

2. Ohnishi H, Oda Y, Aoki T, Tadokoro M, Katsube Y, Ohgushi H, Hattori K, Yuba S. A comparative study of induced pluripotent stem cells generated from frozen, stocked bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011 Jun 27. doi: 10.1002/term.428.

3. Kihara T, Haghparast SM, Shimizu Y, Yuba S, Miyake J.

Physical properties of mesenchymal stem cells are coordinated by the perinuclear actin cap. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 May 27;409(1):1-6.

2. 学会発表：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

資料 1

<骨髄提供者の細胞培養>

I : 依頼受付工程

1. 島根大学附属病院は骨髄提供者名を患者医療機関IDに変換し、産業技術総合研究所に培養を依頼する。
2. 産業技術総合研究所は、患者および骨髄提供者がインフォームドコンセントを受け、研究に同意している事を確認する。また、感染症検査の結果が陰性であること等を確認し、島根大学附属病院に受け入れの可否を連絡する。
3. 産業技術総合研究所では患者医療機関IDを更に症例IDに置き換え、当研究所内での作業には症例IDを用いる。

II : 運搬容器発送工程

1. 産業技術総合研究所は搬送専用のクーラーボックスを準備し島根大学附属病院に送る。
2. 清拭した搬送専用クーラーボックスに患者医療機関IDを記入し、以下の物品を入れておく。

- ・ 温度記録計
- ・ 50mLチューブで二重包装されたアシストチューブ入りヘパリン/PBS溶液
- ・ チューブラック
- ・ ヘパリンナトリウム注射液
- ・ 保冷剤

○ 保冷剤は島根大学附属病院で骨髄採取当日まで凍結しておく。

III : 骨髄採取工程

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスを、島根大学附属病院の手術室や無菌室等の骨

髓採取場所へ持ち込む。

2. 骨髓提供者の自家骨髓を所定のチューブに採取する。担当医師が必要に応じて、骨髓採取時にヘパリンナトリウム注射液を用いる。
3. あらかじめ凍結しておいた保冷剤を搬送専用のクーラーボックスに入れ、担当医師は産業技術総合研究所まで骨髓を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10℃以上30℃未満で保たれるようにし、骨髓採取から12時間以内に産業技術総合研究所CPCに搬入するようにする。

IV:受入工程

1. 産業技術総合研究所の居室において、グループ長もしくは管理責任者が骨髓の状態等の確認をする。
2. 産業技術総合研究所まで骨髓を搬送した担当医師は、骨髓採取時間や骨髓に関する報告を行う。
3. 製造管理責任者は骨髓採取から12時間以内にCPCへ搬入できることを確認する。同様に温度記録計より搬送中、骨髓が10℃以上30℃未満に保たれていたことも確認する。

- 以降は産業技術総合研究所CPC細胞調製室での作業
- 産業技術総合研究所CPC細胞調製室へは、決められた手順に従い入室する。
- CPC細胞調製室に持ち込む試薬、消耗品についての情報、各工程の作業記録は製造指図記録書に記録する。

V:FBS(牛胎児血清)培地調製工程

FBS培地の調製

1. 分注し凍結保存されているFBSを骨髓採取日の前日にサプライ室薬品保冷庫(冷凍)から必要本数取り出し細胞調製室薬品保冷庫(冷蔵)に移し解凍する。
2. 硫酸ゲンタマイシン(40mg/mL)1mLをPBS7mLで希釈し5mg/mLの濃度に調製する。
3. α -MEM 500mLに解凍したFBS 88mLと希釈したゲンタマイシン2.4mLを添加する。
4. ボトルトップフィルター 150mL 0.22 μ mで吸引濾過する。

5. 同様の手順で必要量を調製する。
6. 調製後のFBS培地を一部採取して持ち出し、無菌試験Aおよびエンドトキシン試験を行う。

○ 培養に用いるFBSは牛海綿状脳症の発生していない地域原産で放射線照射処理されたものを使用する。

VI:細胞培養工程(1次培養)

(1) 骨髄の播種

1. 50mLチューブに骨髄液をプールする。
2. 新しいアシストチューブに骨髄液を等分に分注する。
3. 骨髄を搬送してきたアシストチューブは廃棄せずにPBSを添加して持ち出し、無菌試験Aを行う。
4. 骨髄を分注したアシストチューブは4℃にて900rpm、10分間、遠心分離を行う。ただし、分離が悪ければ追加で遠心分離する。
5. 遠心分離後の骨髄は、下層から赤血球層、有核細胞層(buffy coat)、血漿の3層に分離されるので確認する。
6. 注意深く血漿を吸引除去する。
7. 新しい50mLチューブに残った赤血球層と有核細胞層をプールする。
8. 75cm²フラスコ当たりの分注量(骨髄+培地)が15mLとなるように、FBS培地をプールした赤血球層と有核細胞層に追加する。
9. フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
10. フラスコに骨髄を播種する。
11. 37℃、CO₂濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。

(2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 目視にて培養フラスコを観察し、凝固・血餅塊の有無、血球成分の残り具合等を調べる。
2. 培養上清を吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で

保存する。

5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含めた培養スケジュールを再検討する。

○ 上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返す。

(3) 間葉系幹細胞の回収

1. TrypLE Select (動物由来成分不含のトリプシン様酵素)をサプライ室薬品保冷庫(冷蔵)から必要本数持ちこむ。
2. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
3. フラスコの培養上清の一部を15mLチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectを75cm²フラスコに2mL添加し、インキュベーター内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 回収した細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
11. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。
12. 回収した細胞浮遊液は4℃にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、培養上清を吸引除去する。
13. 5×10⁵cells/mLにResuspensionする。
14. 継代に必要な細胞浮遊液(5×10⁵cells/75cm²)を50mLチューブにとる。

VII:細胞培養工程(2次培養)

(1) 間葉系幹細胞のフラスコへの播種

1. 播種する75cm²フラスコに症例ID、作業日、継代数を記載する。
2. 培養スケジュールと培養培地残量より10～13mLの範囲でフラスコあたりの培地量を決定する。

3. 継代用細胞浮遊液の入った50mLチューブにFBS培地を加える。
 4. フラスコに細胞浮遊液を播種する。
 5. 37℃、CO₂濃度5%のインキュベータにフラスコを収納し培養する。
 6. マイコプラズマ否定試験用として細胞浮遊液200 μL (1×10⁵ cells) にFBS培地を加え、6 well plateの2 wellへ播種し、それもインキュベータで培養する。
 7. サプライ室薬品保冷庫(冷蔵)に保存してあるTCプロテクター(動物由来成分不含の細胞凍結保護液)を必要本数持ち込み、余剰細胞は凍結保存する。
- 必要細胞数が多い場合は、75cm²フラスコでは本数が多くなるので、225cm²フラスコの使用を製造管理責任者は検討する。その場合、培地量および播種する細胞数は面積に合わせて調整する。

(2) 間葉系幹細胞の増殖

1. 培養上清を吸引除去する。
 2. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量の不足が予想される場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
 3. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
 4. マイコプラズマ否定試験用プレートも2mL/well で培地交換を行う。
 5. 細胞増殖の状態、細胞集団の状態を適宜製造管理責任者に伝え、継代の時期等を含めた培養スケジュールを再検討する。
- 上記手順の操作を、細胞が増殖するまで週3回繰り返し行う。
- 225cm²フラスコ使用の場合、培地量は面積に合わせて調整する。

(3) 搬出前、最終培地交換

1. 培養上清の一部を15mLチューブに採取して持ち出し、無菌試験Bを行う。
2. 残りの培養上清は吸引除去する。
3. FBS培地は13mL/Flaskで、出来るだけゆっくり注ぐ。培地量に不足が見られる場合、製造管理責任者と協議の上、10mL/Flaskとするなど調整する。
4. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する
5. マイコプラズマ否定試験用プレートを持ち出し、マイコプラズマ否定試験を行う。

- 225cm²フラスコ使用の場合、培地量は面積に合わせて調整する。

(4) 間葉系幹細胞の回収

1. サプライ室薬品保冷庫(冷蔵)のTrypLE Selectを必要本数持ち込む。
2. ×40、×100の位相差顕微鏡像をデジタルカメラで撮影しスマートメディアにJPEG形式で保存する。
3. 培養上清の一部を15mLチューブに採取し無菌試験Aに出す。
4. 残りの培養上清は吸引除去する。
5. PBSにて洗浄する。
6. TrypLE Selectをフラスコに2mL(225cm²フラスコの場合は5mL)添加し、インキュベータ内で3分間反応させる。3分間で接着細胞が剥離しない場合、反応時間を延長する(15分以内)。
7. FBS培地で反応を停止させ、数回Suspensionする。
8. 50mLチューブに回収後、フラスコ内に残っている細胞をFBS培地で回収する。
9. 全ての培養フラスコを上記の手順で処理し間葉系幹細胞を回収する。
10. 4℃にて900rp、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。
11. 沈殿した全細胞を50mLのPBSに懸濁する。
12. 4℃にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄1回目)
13. 沈殿した細胞を50mLのPBSに懸濁する。
14. 細胞浮遊液の一部をマイクロチューブに採取する。
15. Nucleo Counterにて死細胞数、全細胞数を測定し、生細胞数を計算する。移植に必要な量(患者体重(kg)×10⁶個以上)の細胞が確保できているか、生存率が80%以上であるか確認する。
16. 細胞浮遊液は4℃にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄2回目)
17. 5×10⁶cells/mLになるようにPBSを用いて細胞浮遊液を調製する。
18. 参考品等に必要な量の細胞浮遊液を別の15mLチューブにとる。
19. 残りの移植用細胞浮遊液は4℃にて900rpm、5分間、遠心分離を行ない、上清を吸引除去する。(洗浄3回目)
20. 新しいPBSを開封し、移植用間葉系幹細胞を10mLのPBSに懸濁する。
21. 清潔下、安全キャビネット内に滅菌シートを広げ、シート上に新しい50mLチューブとアシストチューブを取り出す。
22. アシストチューブを差し出し、別の作業者に移植用細胞浮遊液を入れてもらう。このとき、元のチューブに残った細胞浮遊液は無菌試験A、エンドトキシン試験に出す。

23. 移植用間葉系幹細胞が入ったアシストチューブを50mLチューブに入れ二重包装にする。
 24. 50mLチューブに症例IDと細胞数を記載し、チューブ立てに立てて細胞調製室外に搬出する。
 25. 製造責任者は細胞保存室にてチューブに記載してある症例IDを患者医療機関IDに変換する。
 26. 搬送専用クーラーボックス内へ温度記録計とともに梱包し、隙間には緩衝材として滅菌済みペーパータオルを入れる。
 27. 搬送専用クーラーボックスにも患者医療機関IDを記入して、居室へ運ぶ。
 28. サプライ室薬品保冷库(冷蔵)に保存してあるTCプロテクター(動物由来成分不含の細胞凍結保護液)を必要本数細胞調製室へ持ち込み、18.で取り分けておいた細胞は凍結保存する。
 29. 未使用のFBS培養培地と移植用間葉系幹細胞を懸濁させたPBSはクライオチューブに採取し参考品として保管する。
- 細胞数が必要量に満たない場合、VII:細胞培養工程(2次培養)(1)から繰り返す。ただし、移植用間葉系幹細胞は、安全性を考慮して培養日数は1ヵ月以内で継代回数3回までとする。

VIII:受渡工程

1. 居室にて管理責任者または品質管理責任者が安全性試験の結果等を担当医師に説明し、担当医師は調製した細胞の品質と安全性を判断する。
2. 担当医師は搬送専用クーラーボックスの中身を確認し、島根大学附属病院まで間葉系幹細胞を搬送する。搬送中はクーラーボックス内の温度が10℃以上30℃未満で保たれるようにし、移植はCPCを出てから12時間以内に完了するようにする。

IX:細胞移植工程

1. 担当医師は搬送専用クーラーボックスのまま、島根大学附属病院の病室に細胞浮遊液を持ち込む。この時、担当医師は温度記録計から記録を呼び出し、搬送中、搬送専用クーラーボックス内が10℃以上30℃未満に保たれていた事を確認する。
2. 50mLチューブから細胞浮遊液が入っているアシストチューブを取り出し、沈殿している細

胞を攪拌し注射器で吸引する。

3. 経静脈的に間葉系幹細胞を投与する。
4. 担当医師は産業技術総合研究所に、温度記録計の入った搬送専用クーラーボックスを返却する。製造管理責任者は温度記録計から記録を呼び出し、搬送中、搬送専用クーラーボックス内が10℃以上30℃未満に保たれていた事を確認する。

<間葉系幹細胞の安全性試験>

- 各試験で使用する試薬についての情報、作業の記録は、オリジナルデータを含め所定の記録様式を用い、文書として保管する。

エンドトキシン試験

- エンドトキシン試験は住化分析センターに委託する。（日本薬局方（ゲル化法）に準拠）

（1）委託

1. 培養担当者から試験サンプルを受け取る。委託する検体は、サンプリングした試験サンプルから安全キャビネット内で無菌的に必要量（2.5mL以上）を分取し、委託検体名を記載したアシストチューブに移したものとする。
2. 検体を委託する。
3. 報告書を受領する際は以下の内容を確認する。
 - ・ 分析・試験項目
 - ・ 検体名
 - ・ エンドトキシン濃度
 - ・ 委託先責任者、担当者印
4. 試験結果の受け入れ承認は品質管理責任者が行う。

（2）判定

承認された報告書のエンドトキシン濃度により、判定を行う。

- ・ エンドトキシン濃度が<0.5 EU/mLの時、陰性と判定する。（試験終了）

(*日本薬局方における「生理食塩水」のエンドトキシン濃度は<0.5 EU/mL)

- ・ 0.5 EU/mLを超える場合は陽性が疑われるため、要再試験と判断する。
- ・ 判定不能（試験無効など）の場合も、要再試験と判断する。

(3) 再試験および再判定

要再試験と判断した場合は、品質管理責任者の指示を受け、再サンプリングの上、再試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に再サンプリングを依頼する。
2. 手順(1)に従い委託先に再試験の依頼を行う。委託検体名は再試験であることが明確なものにする。
3. 手順(2)に従い、試験結果の判定を行う。
 - ・ 再試験で陰性判定の場合は、当該間葉系幹細胞を陰性と判断する。
 - ・ 再試験でも陽性が疑われる場合は、ただちに状況を品質管理責任者に報告する。

品質管理責任者はグループ長と各責任者に報告し、対応を協議する。

(4) 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。

無菌試験（細菌・真菌検査）

○間葉系幹細胞の工程内試験及び調製試液の無菌試験の際は「無菌試験A」を、間葉系幹細胞の最終試験の際は「無菌試験B」を実施する。

○無菌試験を行う際は、専用白衣（青色）を着用する。ディスポーザブルのゴム手袋を装着し、クリーンベンチ内に入る部位（手、腕）のエタノール消毒を行って検体を取り扱う。

無菌試験A

○BacT/ALERT 3D微生物培養システムを利用する。

○BacT/ALERT機器にサンプルを播種した専用培養ボトルを設置し、培養および判定は機器に負う。

○使用する専用ボトルの有効期限を確認し、培養終了予定日が、表示されている月の最終日を越えないものを用いる。

(1) .BacT/ALERT専用培養ボトルへの検体サンプル播種

1. 培養担当者または試薬の調製者より受け取ったサンプルは試験開始まで室温で保管する。受け取り後は5時間以内に無菌試験を実施すること。
2. 安全キャビネット内にサンプル及び以下のものを準備する。すべて70%エタノールで清拭し、消毒してからキャビネット内に入れること。
 - ・ 5 mLシリンジ
 - ・ 21 G注射針
 - ・ サインペン
 - ・ BacT/ALERT FA培養ボトル(好気性菌用) サンプル1本につき1つずつ用意する。
3. ボトルに症例IDから年齢性別を除いたもの（以下、検体ID）、サンプル名、試験日を記入する。
4. ボトルから緑のキャップを取り去りゴム部分を70%エタノールで十分に清拭する。
5. シリンジに針を取り付け、サンプルを2 mL 吸引する。
6. ボトルのゴム部分に針を立てる。（陰圧によりサンプルが自動的に注入される。）
7. シリンジを引き抜き、注入部のゴムを70%エタノールで清拭する。
8. 使用したシリンジ・注射針等の鋭利な感染性廃棄物は安全キャビネット内に備え付けの専用箱に一時保管し、全ての作業終了後にプラスチック製の医療系廃棄物入れに捨てる。（安全のため、リキャップはせずにそのまま廃棄すること）
9. サンプルの残りはフタをしてパラフィルムで封をし、冷蔵庫で保存する。
10. ボトルはBacT/ALERT機器に設置し、培養を行う。

(2) .BacT/ALERT機器への設置、培養

ボトルの機器への設置、取り出しは必ず1本ずつ行うこと。

(複数本同時に扱う場合は前のボトルの処理が終わってから次のボトルを取り扱う。)

1. BacT/ALERTメイン画面からボトル設置ボタンを押し、設置モードへ切替える。
2. ボトルID入力: バーコードを読み取らせる、またはキーボードにて直接入力する。
3. 検体受付番号入力: ボトル名を登録する。ボトル名は[検体ID_サンプル名_試験日]
(15文字まで) とする。
4. ラックを引き出し、緑のランプが点灯しているセルにボトルを設置する。
5. 各ボトルについて2~4を繰り返す。
6. 全てのボトルを設置し終わったらラックを閉じる。
7. 最後にチェックボタンを押し、設置モードを終了する。
8. 7日間、35°Cで培養する。

(3) .ボトルグラフの表示と印刷

培養期間中いつでもボトルグラフの確認が出来る。

1. メイン画面中央のラック状況確認コマンドからボトルの設置位置を確認する。
2. メイン画面から画面右下の右矢印ボタンで、セットアップ画面に移動する。
3. パスワードを入力する。
4. ボトル編集ボタンを選択する。
5. 表示したいボトルのセル位置を指定する。
6. 画面右下のグラフボタンでボトルグラフを表示させる。
7. 画面右下の印刷ボタンを押し、結果をプリントアウトする。

(4) .判定

試験後、使用した機器に間違いはないか、校正有効期限内であるか、試薬の品名・量・有効期限に問題はないかを確認の上、判定を行う。

<1次判定>

培養3日目に1次判定を行う。BacT/ALERT の画面に陽性判定表示が出ていないかを確認する。手順(3)に従いボトルグラフを表示し目視によるCO₂量変動の確認を行う。

- ・ グラフの上昇が認められない場合、陰性と判定し、培養を続行する。
- ・ グラフの上昇が認められる場合、陽性が疑われるため、要再試験と判断する。

<最終判定>

1. 陰性のまま培養7日間が過ぎたボトルは、メイン画面に判定結果が表示される。
(陰性の場合には陰性ボトルのボタンが青色に点灯し、陽性の場合には画面全体が黄色になり、陽性ボトルのボタンが点灯する。)
2. 機器の判定を参考に、以下の判定を行う。
 - ・ 機器の判定が陰性の場合には、最終判定を陰性と判断する。(試験終了)
 - ・ 機器の判定が陽性の場合には、要再試験と判断する。

(5) 再試験および再判定

要再試験と判断した場合は、品質管理責任者の指示を受け、再サンプリングの上、再試験を行う。

1. 製造管理責任者に報告の上、培養担当者に再サンプリングを依頼する。
2. 再試験前には試薬の使用期限、操作マニュアルのチェックおよび試験機器の稼働状況のチェックを行う。
3. 再試験のためのサンプルを培養担当者より受け取り、手順(1)、(2)と同様に無菌試験を行う。ただし再試験では1サンプルにつきボトル2本に播種する(n=2)。
4. 手順(4)～(6)に従い判定と処理を行う。
 - ・ 再試験で2本とも陰性判定の場合、最終判定を陰性とする。(試験終了)
 - ・ 再試験でいずれか1本または2本とも陽性判定の場合、ただちに品質管理責任者に状況を報告する。品質管理責任者はグループ長と各責任者に報告し、対応を協議する。

(6) 陽性判定時の処置

陽性と判定した場合、当該間葉系幹細胞を不適合品とし、各責任者と担当医師で対応を協議する。