

表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究

骨髄間葉系幹細胞の培養に関する手順書
MTR-S****-05-00

制定：2010年**月**日

承認	確認	作成

大阪大学医学部附属病院
未来医療センター
Cell Processing Center (CPC)

文書番号 MTR-S****-05	骨髄間葉系幹細胞の培養 に関する手順書	改訂番号	00
		2頁の内1頁	

1. 目的

Cell Processing Isolater（以下、CPI）における骨髄間葉系幹細胞の培養に関する手順を記す。

2. 適応範囲

大阪大学医学部附属病院未来医療センターCPI調製室内CPIにて骨髄間葉系幹細胞の培養を行う全ての者に適応する。

3. 責任体制

本手順書は製造管理責任者が作成し、臨床研究管理責任者が承認する。
製造管理責任者が大阪大学医学部附属病院未来医療センターCPI調製室内CPIにおける骨髄間葉系幹細胞の培養に関する責任と権限を有する。

4. 遵守事項

表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞製品標準書

5. 手順

5-1 播種

5-1-1 CPI（機器番号：CPI-1、2）内の清浄度を確認し、未除染の場合は、過酸化水素を用いてCPI内の除染を行う。

5-1-2 ドナー骨髄液、必要試薬、消耗品をパスボックス経由でCPI内に搬入する。

5-1-3 6本のフラスコに各々15mLの骨髄細胞培養に培地を入れる。

5-1-4 骨髄液を5-1-4の6本のフラスコに均等に分注する。

5-1-5 培養容器に被験者識別ID、播種日を表記したラベルを貼る。

5-1-6 項目5-1-7で作製した培養容器を、インキュベータ内にて温度 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 濃度 $5\pm 1\%$ 、湿度 $95\pm 5\%$ の環境下で培養を行う。

5-2 培地交換

5-2-1 初回培地交換は培養開始3日以内に行う。

5-2-2 培養上清及び浮遊細胞を吸引除去し、滅菌PBSで2回洗浄した後、新たに培養液を10~15 mL加える。培地交換時には、細胞観察モジュールにて細胞形態、増殖状態を確認し、異常の有無を確認する。

5-2-3 以降、4日を越えない範囲で2~3回/週の間隔で項目5-2-2と同様の方法で、培地交換を行う。細胞観察モジュールにて細胞がSub-confluentであることが確認できれば、継代培養を行う。

5-2-3 移植3日前には上記の手順で培地交換を行う。その際、吸引上清の一部（10mL）を感染症検査のために品質管理責任者に提出する。（尚、何らかの理由で培養期間を延長せざるを得ない場合、2日以内の延長であれば、この感染症検査結果をもって出荷判定を行うことができることとする。3日以上の場合、移植3日前に新たに培地を採取して感染症検査を実施する。）

5-3 継代培養

5-3-1 滅菌PBSを用いて、1回洗浄した後、TrypZean solution（Sigma-Aldrich Corp.、

文書番号 MTR-S****-05	骨髄間葉系幹細胞の培養 に関する手順書	改訂番号	00
		2 頁の内 2 頁	

T3449) を 1~2.5 mL 加え、インキュベータ内にて温度 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 CO_2 濃度 $5 \pm 1\%$ 、湿度 $95 \pm 5\%$ の環境下で 5~10 分間反応させる。

- 5-3-2 細胞の剥離を確認後、培養液 4~7.5 mL を加えて反応を停止させる。
- 5-3-3 細胞懸濁液を遠心チューブに移し、遠心し（遠心条件：1500 rpm、室温、5 min）、上清を吸引除去する。
- 5-3-4 滅菌 PBS で再懸濁し、再度遠心する。（遠心条件 1500 rpm、室温、5 min）
- 5-3-5 上清を吸引除去し、細胞数に応じて培養フラスコ数を決定し、培養液 2 mL × 培養フラスコ本数分を細胞入り滅菌チューブに加えて、再懸濁する。
- 5-3-6 必要とする培養フラスコ本数に培養液を各々 9~13 mL 加え、そこに項目 5-3-5 で調製した細胞懸濁液を各々 2 mL 加える。
- 5-3-7 培養容器に被験者識別 ID、継代日を表記したラベルを貼る。
- 5-3-8 項目 5-3-7 で作製した培養容器を、インキュベータ内にて温度 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 CO_2 濃度 $5 \pm 1\%$ 、湿度 $95 \pm 5\%$ の環境下で培養を行う。
- 5-3-9 以降、項目 5-2 に準じて培地交換を行う。移植 3 日前の培地交換では、5-2-3 の手順に従って、吸引上清の一部（10mL）を感染症検査のために品質管理責任者に提出する。
- 5-3-10 継代回数は最大 2 回まで、培養期間は 20 ± 10 日間とする。

6. 関連文書

- ・表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞製品標準書【MTR-S****】
- ・骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書【MTR-S****-02】
- ・滅菌 PBS の調製に関する手順書【MTR-S****-10】
- ・CPI の使用に関する手順書【MTR-AS-15】

7. 記録と様式

平成 24 年 10 月 11 日

承認番号：第 HM1102 号

研究課題名：『表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植臨床研究』

文書名：試験物概要書

新旧対照表

変更箇所	変更前	変更後	変更理由
P2 4. 試験物の原材料、製造方法等 2)製造方法 (3) ドナー骨髄液から骨髄間葉系幹細胞の培養	③、、、 フラスコ <u>2</u> 本に播種する。	③、、、 フラスコ <u>6</u> 本に播種する。	複数回のコールドランで確認した結果、20ml の骨髄血をフラスコ6本に播種するプロトコールで20日後に必要な細胞が得られたため。
P2 4. 試験物	④培養開始 <u>24</u> 時間後に、、、	④培養開始 <u>3</u> 日以内に、、、	複数回のコールドランで確認した結果、培養開始 48～72 時間後の培地交換で最適結果が得ら

<p>の原材料、製造方法等</p> <p>2)製造方法</p> <p>(3) ドナー骨髄液から骨髄間葉系幹細胞の培養</p>			<p>れたため。</p>
<p>P2</p> <p>4. 試験物の原材料、製造方法等</p> <p>2)製造方法</p> <p>(3) ドナー骨髄液から骨髄間葉系幹細胞の培養</p>	<p>⑦ <u>2回の継代の後に細胞数を計測し、必要細胞数以下であればもう一度継代を繰り返す。</u>なお、培養期間は20日±10日間とする。また、この時点でfluorescence-activated cell sorter (FACS) 解析を行い、CD105⁺ CD34⁻ 細胞が50%未満であれば培養を中止し、再度ドナーの血清及び骨髄液の採取を行い、同様の工程を経て骨髄間葉系幹細胞の培養を行う。</p>	<p>⑦ <u>継代時に細胞数を計測し、必要細胞数が得られない場合はもう一度継代を繰り返す。</u>なお、培養期間は20日±10日間とする。</p>	<p>複数回のコールドランで確認した結果、1回の継代で必要細胞数（1x10⁷ 個）が得られることが確認された。そこで、1度目の継代時に必要細胞数が得られない場合にのみ2継代目を行うこととした。また、FACSによる細胞純度の確認は移植時の細胞を評価することとした。</p>

<p>P2 4. 試験物の原材料、製造方法等 2)製造方法 (3) ドナー骨髄液から骨髄間葉系幹細胞の培養</p>	<p>⑩ <u>移植の当日に、試験移植のために細胞の一部（約 100 個分）を剥離し、生理食塩水 100μL に懸濁し、注射筒に充填する。</u></p>	<p>全文削除</p>	<p>移植当日の細胞規格検査で規格が満たされなければ移植中止となるため、規格検査終了後に試験移植を実施すべきと判断したため、当該項目は規格検査の項目に挿入した。</p>
<p>P2 4. 試験物の原材料、製造方法等 2)(3) ドナー骨髄液から骨髄間葉系幹細胞の培養</p>	<p>⑩ <u>移植当日、トリプシンにより細胞を剥離し、1/10 量を用いて細胞数、純度、細胞生存率の検査を行い、基準を満たすことを確認する。この際、規格に満たない場合は培養細胞を凍結保存し、再度ドナーの血清及び骨髄液の採取を行い、同様の工程を経て骨髄間葉系幹細胞の培養を行う。</u></p>	<p>⑪ <u>移植当日、フラスコ1つを取り出し、トリプシンにより細胞を剥離し、試験移植のために細胞の一部（約 100 個分）を生理食塩水 100μL に懸濁し、注射筒に充填する。また細胞数、細胞生存率、純度（fluorescence-activated cell sorter (FACS) 解析）の検査を行い、規格を満たすことを確認する。この際、規格に満たない場合は培養細胞を凍結保存し、再度ドナーの血清及び骨髄液の採取を行い、同様の工程を経て骨髄間葉系幹細胞の培養を行う。規格を満たすことが確認された場合は試験移植を行う。尚、試験</u></p>	<p>コールドランを実施した結果、細胞剥離開始から細胞規格検査および試験移植終了まで1時間程度かかることが明らかとなり、その間に移植用間葉系幹細胞にダメージが生じることの無いように、フラスコ一つの細胞で細胞規格検査および試験移植を行うこととした。また、試験移植でアナフィラキシー症状が確認された場合は本移植を中止することを明記した。</p>

		移植でアナフィラキシー反応が確認された場合は本移植を中止する。	
P2 4. 試験物の原材料、製造方法等 2)製造方法 (3) ドナー骨髄液から骨髄間葉系幹細胞の培養	⑬ トリプシンで剥離した骨髄間葉系幹細胞を、PBSで2回洗浄し、細胞数を再度計測する。	⑫ 細胞が規格を満たし、試験移植でアナフィラキシー症状がないことを確認した上で、残りのフラスコを取り出し、トリプシンで剥離した骨髄間葉系幹細胞を、PBSで2回洗浄し、細胞数を再度計測する。	細胞規格検査および試験移植で合格した場合にのみ、必要細胞数が得られていることを最終確認し、本移植に進むことを明記した。
P2 4. 試験物の原材料、製造方法等 2)製造方法 (3) ドナー骨髄液	⑭ 培養骨髄間葉系幹細胞を、 0.5×10^6 個/250 μ Lの濃度になるように、0.5%自己血清加生理食塩水に懸濁し、2mL注射筒に充填する。移植に必要な数の注射筒に充填する。	⑬ 培養骨髄間葉系幹細胞を、 0.5×10^6 個/250 μ Lの濃度になるように、0.5%自己血清加生理食塩水に懸濁し、1mL注射筒に充填する。移植に必要な数の注射筒に充填する。	コールドランの結果、2ml注射筒よりも1ml注射筒の方が正確に移植可能であると判断し、1ml注射筒を使用することとした。

から骨髄 間葉系幹 細胞の培 養			
---------------------------	--	--	--

表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞
製品標準書

MTR-S1102-00

制定：2011年10月14日

承認	確認	作成

大阪大学医学部附属病院
未来医療センター
Cell Processing Center (CPC)

表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞製品標準書

改訂履歴表

改訂 番号	年月日	改訂内容	改訂理由	承認
00	2011/10/14	制定		

目次

目次	2
緒言	3
2.3.S. 原薬	4
2.3.S.1. 一般情報	4
2.3.S.1.1. 名称	4
2.3.S.1.2. 構造	4
2.3.S.1.3. 一般特性	4
2.3.S.2. 製造	5
2.3.S.2.1. 製造業者	5
2.3.S.2.2. 製造方法及びプロセス・コントロール	5
2.3.S.2.3. 原材料の管理	15
2.3.S.2.4. 重要工程及び重要中間体の管理	16

緒言

培養骨髄間葉系幹細胞の名称、原薬等は下記の通りである。

一般名称	骨髄間葉系幹細胞
原材料摘出場所	大阪大学医学部附属病院及び大阪大学医学部附属病院輸血部
製剤処理場所	大阪大学医学部附属病院 未来医療センターCell Processing Center (CPC) 閉鎖系細胞調製培養装置 (Cell Processing Isolator)
剤型	細胞懸濁液
投与経路	患部へ注入移植
適応症	表皮水疱症

2.3.S. 原薬

2.3.S.1. 一般情報

2.3.S.1.1. 名称

1. INN 該当なし
2. 化学名 該当なし
3. 会社又は研究所コード
大阪大学医学部附属病院
4. 一般名称 (JAN)
一般名称
(日本名) 骨髄間葉系幹細胞
(英名) Mesenchymal stem cell
5. CAS 登録番号
該当する CAS 番号なし

2.3.S.1.2. 構造

骨髄間葉系幹細胞は CD34⁻、CD105⁺ となる特性を持つ細胞集団であり、試験物は、その細胞集団を 50%以上含み、0.5%自己血清加生理食塩水で懸濁したものである。

1. 化学構造 骨髄間葉系幹細胞は細胞集団であり、化学構造での表現は適さない。
2. 分子式 骨髄間葉系幹細胞は細胞集団であり、分子式での表現は適さない。
3. 質量 骨髄間葉系幹細胞は CD34⁻、CD105⁺となる特性を持つ細胞集団であり自己血清加生理食塩水に懸濁されているため、総質量での表現は適さない。

2.3.S.1.3. 一般特性

表皮水疱症治療のために、ドナー（被験者と親族関係にあり、性別の異なる者）より骨髄液を採取し、これから間葉系幹細胞を分離し、培養する。このために必要な技術は骨髄液から、間葉系幹細胞分離し、増殖させる技術である。増殖した間葉系幹細胞は 0.5%自己血清（被験者由来の血清）加生理食塩水に懸濁した後、患部に注入し、欠損した表皮真皮間結合の構築を行う。

1. 性状
付着細胞

2. 構造

骨髄間葉系幹細胞が 0.5%自己血清加生理食塩水に懸濁されている。

- | | |
|-----|---|
| 細胞数 | : 1.0×10 ⁷ 個以上 |
| 純度 | : CD34 ⁻ 、CD105 ⁺ 細胞として 50%以上 |

3. 生物活性

表皮水疱症患者の皮下に移植することにより、皮膚基底膜細胞に分化し、コラーゲンを産生する。

2.3.S.2. 製造

2.3.S.2.1. 製造業者

大阪大学医学部附属病院

未来医療センターCell Processing Center (以下、CPC) 及び Cell Processing Isolator (以下、CPI)

2.3.S.2.2. 製造方法及びプロセス・コントロール

1. 製造方法 (フローチャート)

製造方法を以下に示す。

なお、骨髄液採取工程は手術室であり、細胞分離培養システム外となるため GMP 対象外として参考情報とする。

1) ドナー血清作製工程 (医学部附属病院輸血部)

目的：培養培地 (以下、培養液) に用いる自己血清の作製

手技：針付き血液採取バッグによる静脈血採血、無菌操作

主な使用材料：血液採取バッグ (テルモ株式会社、BB-TO40CJ)

重要管理項目：ドナー血清量 160 mL 以上/400 mL 全血

Step1【MTR-S1102-01】採血及び自己血清の作製

目的：採血を行い、ドナー血清を作製する。

手技：針付き血液採取バッグによる静脈血採血

機器：血液採取バッグ (テルモ株式会社、BB-TO40CJ)

容器：血液採取バッグ専用容器

操作管理項目：血液採取量；初回 400 mL、2 回目以降 200 mL

工程内管理：ドナー血清 160 mL (初回)、80 mL (2 回目以降)

保存温度： 5 ± 3 °C

保存期間：1 日以内

その日の以内に使用しない場合は、 -20 ± 5 °C で保存し、保存期間は 3 ヶ月以内。

期限切れは廃棄する。

関連 SOP：【MTR-S1102-01】採血及びドナー血清作製に関する手順書

2) 培養培地調製工程 (未来医療センターCPC 内 CPI)

目的：骨髄細胞の培養に用いる培養液や洗浄等に用いる滅菌 Phosphate Buffered Salines (以下、PBS) の調製

手技：CPI での無菌操作

主な使用材料：ドナー血清 (Step1 で作製)、 α MEM、Antibiotic Antimycotic solution
PBS

重要管理項目：培養液調製量 593 mL

滅菌 PBS 調製量 500 mL

Step2【MTR-S1102-10】滅菌 PBS の調製

目的：骨髄細胞を洗浄等するために使用する滅菌 PBS を調製する。

手技：CPI での無菌操作

機器：CPI (機器管理番号：CPI-1、2)

器具又は容器： Filter system (500 mL、0.22 μ m) (Corning Incorp.、430769)

原材料：PBS

調製液量：500 mL

ラベル：品名、被験者識別 ID、調製日、有効期間 (3 ヶ月)

操作管理項目：CPI (CPI 内の清浄度確認)

無菌化：0.22 μ m フィルターにてろ過滅菌

工程内管理：保存温度 5 ± 3 °C

保存期間 3 ヶ月以内。期限切れは廃棄する。

関連 SOP：【MTR-S1102-10】滅菌 PBS の調製に関する手順書

【MTR-AS-15】CPI の使用に関する手順書

Step3 【MTR-S1102-02】骨髄細胞培養培地の調製

目的：骨髄細胞を培養するための培養液を調製する。

手技：CPI での無菌操作

機器：CPI (機器管理番号：CPI-1、2)

ピペットエイド (機器管理番号：PA-1~4)

器具又は容器： Filter system (500 mL、0.22 μ m) (Corning Incorp.、430769)

原材料： α MEM 500 mL、ドナー血清 88 mL、Antibiotic Antimycotic solution 5 mL

調製液量：593 mL

ラベル：品名、被験者識別 ID、調製日、有効期間 (2 ヶ月)

操作管理項目：CPI (CPI 内の清浄度確認)

無菌化：0.22 μ m フィルターにてろ過滅菌

工程内管理：保存温度 5 ± 3 °C

保存期間 2 ヶ月以内。期限切れは廃棄する。

関連 SOP：【MTR-S1102-02】骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書

【MTR-AS-04】原材料の選定・入手・管理に関する手順書

【MTR-AS-15】CPI の使用に関する手順書

3) 骨髄液採取工程 (手術室)

目的：ドナーから表皮水疱症治療に用いる骨髄液を採取する。

手技：穿刺部位の局所麻酔後、ドナー腸骨より骨髄液を採取する。

主な使用材料：消毒液 (イソジン)

麻酔 (エピネフリン含有 2%塩酸リドカイン溶液、生理食塩水、7%炭酸水素ナトリウム溶液) 滅菌された容器

ヘパリン Na ロック 100 シリンジ製剤

重要管理項目：骨髄液採取量 約 20 mL

骨髄液保存条件 5 ± 3 °C

骨髄液保存期間 採取後 1 日以内に調製

Step4 【MTR-S1102-03】骨髄液の採取

目的：ドナーから表皮水疱症治療に用いる骨髄液を採取する。

手技：骨髄穿刺針を用いた骨髄液の採取

機器：注射器、骨髄穿刺針

器具又は容器：滅菌された容器

採取量：約 20 mL

ラベル：品名、被験者識別 ID、採取日、有効期限、バッチ No.

工程管理項目：採取量（参考値）

保存期間 採取後 1 日以内に播種

関連 SOP：【MTR-QS-11】ドナーの選定に関する手順書

【MTR-S1102-03】骨髄液の採取に関する手順書

Step5 【MTR-S1102-04】骨髄液の搬送

目的：採取した骨髄液を、手術室から CPI まで搬送する。

容器：滅菌された容器、専用搬送容器

関連 SOP：【MTR-S1102-04】骨髄液の搬送に関する手順書

4) 骨髄間葉系幹細胞培養工程（未来医療センターCPC 内 CPI）

目的：骨髄間葉系幹細胞の培養

手技：CPI での無菌操作

主な使用材料：培養液（Step3 で調製）、滅菌 PBS（Step2 で調製）、TrypZean solution

重要管理項目：CPI（CPI 内の清浄度確認）

受入れ骨髄液（約 20 mL）

参考管理項目：骨髄液洗浄液（QC サンプルとして保存）

余剰骨髄液（参考品として保存）

Step6 【MTR-S1102-05】骨髄液の播種

目的：骨髄細胞を播種する。

手技：CPI での無菌操作

機器：CPI（機器管理番号：CPI-1、2）

ピペットエイド（機器管理番号：PA-1～4）

脱着式 CO₂ インキュベータ（機器管理番号：CO-17、18）

細胞観察モジュール（機器管理番号：MSC-1、2）

フリーザ付薬用保冷庫（機器管理番号：RF1-5）

器具又は容器：COASTAR 75 cm² Flask Vent Cap（以下、培養フラスコ）（Corning、3276）

又は培養ディッシュ（Corning、430293）

原材料：培養液（Step3 で調製）、滅菌 PBS（Step2 で調製）

ラベル：品名、被験者識別 ID、調製日、有効期間（2 ヶ月）

操作管理項目：CPI（CPI 内の清浄度確認）

関連 SOP：【MTR-S1102-05】骨髄間葉系幹細胞の培養に関する手順書

【MTR-S1102-10】滅菌 PBS の調製に関する手順書

【MTR-AS-04】原材料の選定・入手・管理に関する手順書

【MTR-AS-15】CPI の使用に関する手順書

Step7 【MTR-S1102-05】培地交換

目的：初代培養の培地を新鮮な培地に交換する。

手技：CPI 内での無菌操作、培地交換

機器：CPI（機器管理番号：CPI-1、2）
脱着式 CO₂ インキュベータ（機器管理番号：CO-17、18）
細胞観察モジュール（機器管理番号：MSC-1、2）
原材料：培養液（Step3 で調製）、滅菌 PBS（Step2 で調製）
操作管理項目：CPI（CPI 内の清浄度確認）
脱着式 CO₂ インキュベータ（温度 37.0±1.0 °C、CO₂ 濃度 5.0±1.0%、
湿度 95±5% 庫内無菌水の有無を目視確認）
工程管理項目：培養期間 20 日間±10 日間
培地交換時期：最大 4 日以内（2～3 回/週）
関連 SOP：【MTR-S1102-02】骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書
【MTR-S1102-05】骨髄間葉系幹細胞の培養に関する手順書
【MTR-S1102-10】滅菌 PBS の調製に関する手順書
【MTR-AS-15】CPI の使用に関する手順書

Step8【MTR-S1102-05】継代培養

目的：初代培養細胞を回収し、継代培養を開始する。
手技：CPI 内での無菌操作、継代培養
機器：CPI（機器管理番号：CPI-1、2）
脱着式 CO₂ インキュベータ（機器管理番号：CO-17、18）
細胞観察モジュール（機器管理番号：MSC-1、2）
器具又は容器：培養容器（Corning Inc.、3276 又は Corning Inc.、430293）
原材料：培養液（Step3 で調製）、滅菌 PBS（Step2 で調製）、TrypZean solution
ラベル：品名、被験者識別 ID、バッチ No.、継代日
操作管理項目：CPI（CPI 内の清浄度確認）
脱着式 CO₂ インキュベータ（温度 37.0±1.0 °C、CO₂ 濃度 5.0±1.0%、
湿度 95±5% 庫内無菌水の有無を目視確認）
多本架遠心モジュール（回転数 1500 rpm、時間 5 min、温度 室温）
工程内管理項目：継代回数（最大 2 回まで）
関連 SOP：【MTR-S1102-02】骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書
【MTR-S1102-05】骨髄間葉系幹細胞の培養に関する手順書
【MTR-S1102-10】滅菌 PBS の調製に関する手順書
【MTR-AS-15】CPI の使用に関する手順書

Step9【MTR-S1102-05】培養終了の確認

目的：細胞の回収を行うための時期を判定する。
手技：CPI での無菌操作、顕微鏡観察
機器：CPI（機器管理番号：CPI-1、2）
脱着式 CO₂ インキュベータ（機器管理番号：CO-17、18）
細胞観察モジュール（機器管理番号：MSC-1、2）
操作管理項目：CPI（CPI 内の清浄度確認）
脱着式 CO₂ インキュベータ（温度 37.0±1.0 °C、CO₂ 濃度 5.0±1.0%、
湿度 95±5% 庫内無菌水の有無を目視確認）
工程管理項目：顕微鏡観察下にて、細胞密度が 60～90%

継代培養終了日保存期間（すみやかに回収工程に移行する。）

関連 SOP：【MTR-S1102-02】 骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書
【MTR-S1102-05】 骨髄間葉系幹細胞の培養に関する手順書
【MTR-S1102-10】 滅菌 PBS の調製に関する手順書
【MTR-AS-15】 CPI の使用に関する手順書

5) 骨髄間葉系幹細胞回収工程（未来医療センターCPC 内 CPI）

目的：骨髄間葉系幹細胞を回収し、出荷準備を行う。

手技：CPI での無菌操作

主な使用材料：培養液（Step3 で調製）、滅菌 PBS（Step2 で調製）、TrypZean solution
被験者血清、生理食塩水、トリパンプルー溶液

重要管理項目：CPI（CPI 内の清浄度確認）

培養上清（エンドトキシン試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験）

細胞数（ 1.0×10^7 cells 以上）

生存率（70%以上）

Step10 【MTR-S1102-06】 0.5%自己血清加生理食塩水の調製

目的：試験物で用いる 0.5%自己血清加生理食塩水を調製する。

手技：CPI での無菌操作

機器：CPI（機器管理番号：CPI-1、2）

器具又は容器：50 mL チューブ、シリンジフィルター（0.22 μ m）

原材料：被験者血清、生理食塩水

操作管理項目：CPI（CPI 内の清浄度確認）

工程管理項目：被験者血清 60 μ L

調製量：10 mL 以上

関連 SOP：【MTR-S1102-06】 0.5%自己血清加生理食塩水の調製に関する手順書
【MTR-AS-15】 CPI の使用に関する手順書

Step11 【MTR-S1102-07】 骨髄間葉系幹細胞の回収

目的：継代培養細胞を回収し、試験物として準備する。

手技：CPI での無菌操作

機器：CPI（機器管理番号：CPI-1、2）

細胞観察モジュール（機器管理番号：MSC-1、2）

脱着式 CO₂ インキュベータ（機器管理番号：CO-17、18）

器具又は容器：血球計算盤

原材料：培養液（Step3 で調製）、滅菌 PBS（Step2 で調製）、TrypZean solution、トリパ
ンプルー溶液

操作管理項目：CPI（CPI 内の清浄度確認）

脱着式 CO₂ インキュベータ（温度 37.0 ± 1.0 °C、CO₂ 濃度 5.0 ± 1.0 %、
湿度 95 ± 5 % 庫内無菌水の有無を目視確認）

多本架遠心モジュール（回転数 1500 rpm、時間 5 min、温度 室温）

工程管理項目：培養終了日時

回収細胞数（ 1.0×10^7 個以上）

生存率 (70%以上)

関連 SOP : 【MTR-S1102-02】 骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書
【MTR-S1102-07】 骨髄間葉系幹細胞の回収と出荷準備に関する手順書
【MTR-S1102-09】 骨髄間葉系幹細胞の表面マーカーの検索に関する手順書
【MTR-S1102-10】 滅菌 PBS の調製に関する手順書
【MTR-AS-15】 CPI の使用に関する手順書

Step12 【MTR-S1102-07】 出荷準備

目的 : 回収した細胞を 0.5%自己血清加生理食塩水に懸濁し、注射筒に充填する。
手技 : CPI での無菌操作
機器 : CPI (機器管理番号 : CPI-1、2)
器具又は容器 : 注射筒 (滅菌済み、透明プラスチック製、1 mL もしくは 2 mL)
原材料 : 0.5%自己血清加生理食塩水 (Step10 で調製)
操作管理項目 : CPI (CPI 内の清浄度確認)
工程管理項目 : 細胞数 (0.5×10^6 cells/250 μ L)
関連 SOP : 【MTR-S1102-06】 0.5%自己血清加生理食塩水の調製に関する手順書
【MTR-S1102-07】 骨髄間葉系幹細胞の回収と出荷準備に関する手順書
【MTR-AS-15】 CPI の使用に関する手順書

6) 試験物の搬送・投与工程

目的 : 出荷手続き、試験物を搬送し、被験者に投与する。
手技 : 試験物の投与 (患部へ注射)
重要管理項目 : 使用期限 : 即日
培養上清 (エンドトキシン試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験)
細胞数 (1.0×10^7 cells 以上)
生存率 (70%以上)
純度 (CD34⁻、CD105⁺ 細胞として 50%以上)

Step13 【MTR-S1102-08】 出荷判定

目的 : 最終製品の出荷判定を行う。
品質管理者がロット毎に製造記録・試験記録を確認し、出荷判定表を作成する。
工程管理項目 : 総細胞数 (1.0×10^7 cells 以上)
生存率 (70%以上)
表面マーカーの検索 (CD34⁻、CD105⁺ 細胞として 50%以上)
培養上清及び未使用培養液の無菌試験 (negative であること)
エンドトキシン試験 (1.0 EU/mL 以下)
マイコプラズマ否定試験 (negative であること)
関連 SOP : 【MTR-S1102-08】 試験物の出荷及び搬送に関する手順書
【MTR-QS-09】 出荷判定に関する手順書
【MTR-CS-01】 エンドトキシン試験に関する手順書
【MTR-CS-02】 無菌試験法に関する手順書
【MTR-CS-03】 マイコプラズマ否定試験に関する手順書