

Step14【MTR-S1102-08】試験物の搬送

目的：試験物を処置室まで搬送する。

器具又は容器：クーラーボックス

工程管理項目：使用期限 当日中

保管温度 室温

関連 SOP：【MTR-S1102-08】試験物の出荷及び搬送に関する手順書

Step15【MTR-S1102-08】試験物の投与

目的：出荷された試験物の投与を行う。

手技：患部への注射方法

器具又は容器：注射筒（滅菌済み透明プラスチック製）注射針（23G）

2. バッチ及びスケール

ナンバリングシステム及びスケールに関しては、表 2.3.S.2.2-1 の通り。

表 2.3.S.2.2-1 ナンバリングシステム及びスケール

工程	分類番号	バッチ及びスケール
ドナー血清作製工程	被験者識別 ID	Step1 : ドナー血清 160 mL 以上
ドナー骨髄液採取工程	被験者識別 ID	Step4 : ドナー骨髄液 約 20 mL
骨髄細胞培養培地調製工程	バッチナンバー	Step2 : 滅菌 PBS 500 mL Step3 : 骨髄細胞培養培地 593 mL
骨髄間葉系幹細胞培養工程	バッチナンバー	Step6 : 培養容器×N 個
骨髄間葉系幹細胞回収工程	バッチナンバー	Step10 : 0.5%自己血清加生理食塩水 10 mL Step12 : 注射筒×N 本

3. 原材料採取工程

1) ドナー血清作製工程

主要機器：特殊機器なし

ドナーの選定に関しては、インフォームド・コンセント（通常2回行う）が揃っていることを確認する。既往歴、現病歴、社会歴の聴取を行い、血液検査、ウイルスチェックなどのドナースクリーニングを十分に行い、これを決定する。

輸血部にてドナー腕部より末梢血を採取する。採血部十分な消毒などに注意し、無菌的採取に心がける。ドナーより採取した末梢血を4連採血バッグ内にて冷却遠心機（5±1℃）にて2500回転、10分、遠心を3回行う。分離した血清を4連採血バッグ内の閉鎖系にて他のバッグに移し、全血400mL又は200mLから160mL又は80mL以上の自己血清を作製する。

作製した自己血清は5±3℃で保存し、その日の内に調製する。その日の内に使用しない場合は、-20±5℃で保存し、3ヵ月を過ぎた場合は廃棄する。

関連 SOP：【MTR-QS-14】ドナー選定に関する手順書

- 【MTR-S1102-01】採血及び自己血清作製に関する手順書
- 【MTR-AS-04】原材料の選定・入手・管理に関する手順書
- 【MTR-MS-MDF】フリーザ付薬用保冷庫の使用手順書

2) 骨髓液採取工程

主要機器：特殊機器なし

骨髓液採取前に滅菌 Phosphate Buffer Saline（以下、滅菌 PBS）、骨髓細胞培養培地（以下、培養液）を調製する。滅菌 PBS は CPI 内で PBS を 0.22 μm フィルターに通すことにより調製する。培養液は α Minimum Essential Medium（以下、 α -MEM）500 mL に対して、ドナー血清 88 mL、Antibiotic Antimycotic solution 5 mL を、ピペットエイドを用いて添加し、良く混和後、0.22 μm フィルターに通すことにより滅菌を行い調製する。調製した滅菌 PBS、培養液は 5 ± 3 $^{\circ}\text{C}$ で保存する。滅菌 PBS の使用期限は調製後 3 ヶ月とする。培養液の使用期限は調製後 2 ヶ月とする。

クラス 100000 の手術室にて患者に対して穿刺部位の局所麻酔を行う。穿刺部位をイソジン消毒液にて消毒する。骨髓穿刺針及びシリンジを用いて、ドナー腸骨より骨髓液を一回 2~6 mL、合計約 20 mL 採取する。器具の取扱い及び採取手技を無菌的に行い、移送容器の無菌的取扱いにも注意する。採取した骨髓液は滅菌された容器に入れ密閉し、クーラーボックスにて大阪大学医学部附属病院未来医療センターCPC 内 CPI へ搬送後、当日中に播種する。

関連 SOP：【MTR-QS-14】ドナーの選定に関する手順書

- 【MTR-S1102-02】骨髓細胞培養培地の調製に関する手順書
- 【MTR-S1102-03】骨髓液の採取に関する手順書
- 【MTR-S1102-04】骨髓液の搬送に関する手順書
- 【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
- 【MTR-MS-PA】ピペットエイドの使用手順書
- 【MTR-MS-MDF】フリーザ付薬用保冷庫の使用手順書

4. 培養工程

1) 骨髓間葉系幹細胞培養工程

Step1－骨髓液の播種

主要機器：特殊機器なし

6 本のフラスコに各々 15mL の骨髓細胞培養に培地を入れる。受け入れた骨髓液を 6 本のフラスコに均等に分注する。その後、2 本の培養容器（培養フラスコ）に播種する。培養容器に播種した骨髓細胞は、CO₂ インキュベータ内にて温度 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ 濃度 $5 \pm 1\%$ 、湿度 $95 \pm 5\%$ の環境下で培養を行う。初回培地交換は播種後 3 日以内に行う。

- 関連 SOP：【MTR-S1102-02】骨髓細胞培養培地の調製に関する手順書
- 【MTR-S1102-05】骨髓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

【MTR-MS-PA】ピペットエイドの使用手順書

【MTR-MS-MDF】フリーザ付薬用保冷庫の使用手順書

Step2－培地交換

主要機器：特殊機器なし

培養容器を CO₂ インキュベータから取り出し、培養容器内の培地を除去する。予め小型振とう恒温器にて 37±1 °C に加温した培養液を量り加える。培地交換時には細胞観察モジュールを用いて、細胞形態、増殖状態、異常の有無を確認する。観察後、培養容器を CO₂ インキュベータ内に入れ、温度 37°C±1 °C、CO₂ 濃度 5±1%、湿度 95±5% の条件で培養を再開する。

培地交換は基本的に 4 日間を越えない範囲で 2～3 回/週の培地交換を行う。Confluent になった場合は継代を行う。ただし、継代は 2 回までとする。

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

【MTR-MS-PA】ピペットエイドの使用手順書

【MTR-MS-MSD】細胞観察モジュールの使用手順書

Step3－継代培養

主要機器：特殊機器なし

予め小型振とう恒温器で培養液及び TrypZean solution を加温しておく。培養容器を CO₂ インキュベータより取り出し、培養容器内の培地を吸引除去し、滅菌 PBS (10～15 mL) にて 1 回洗浄する。培養容器に TrypZean solution (1～2.5 mL) を入れ CO₂ インキュベータ内にて 5～10 分間加温する。培養容器に培養液 (4～7.5 mL) を添加し、その全量を遠心用滅菌チューブ内に移し、細胞を回収する。細胞浮遊液を遠心して (1500 rpm (390×g)、室温、5 分間)、上清をピペットにより除去し、PBS (20 mL) にて洗浄する。細胞数に応じて培養フラスコ数を決定し、培養液 2ml×培養フラスコ本数分を滅菌チューブに加えて再懸濁した後、あらかじめ 9～13ml の培養液を加えた培養フラスコ又は培養ディッシュに細胞懸濁液を各々 2ml ずつ播種する。CO₂ インキュベータ内にて温度 37±1 °C、CO₂ 濃度 5±1%、湿度 95±5% の条件で培養する。

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

【MTR-MS-PA】ピペットエイドの使用手順書

【MTR-MS-TB】小型振とう恒温器の使用手順書

Step4－骨髄間葉系幹細胞の回収

主要機器：特殊機器なし

予め小型振とう恒温器で培養液及びTrypZean solution を加温しておく。培養容器を CO₂ インキュベータより 1 つ取り出し、培養容器内の培地を感染症検査用に滅菌チューブへ移した後、PBS (10~15 mL) にて 1 回洗浄する。培養容器に TrypZean solution (1~2.5 mL) を入れ CO₂ インキュベータ内にて 5~10 分間加温する。培養容器に培養液 (4~7.5 mL) を添加し遠心チューブ内に移し、細胞を回収する。空になった培養容器を更に培養液 5 mL を添加し残った細胞を遠心チューブ内に回収する。回収した細胞懸濁液を生理食塩水で 2 回洗浄した後、生理食塩水 5~10ml を加え、細胞懸濁液の一部をパスボックス経由で CPI 外へ持ち出し、トリパンプルーを用いて細胞数、生存率及び幹細胞の表面マーカーの検索を行う。残りの細胞は遠心チューブのまま CPI 内に置いておく。細胞が規格を満たしていることを確認した後、試験移植のために残りの細胞の一部をおおよそ 1 個 /1 μ L となるよう生理食塩水で懸濁し、1m の注射筒に充填する。細胞懸濁液 100 μ L を被験者の健常皮膚 (皮内) に試験移植し、重篤なアレルギー反応が無いことを確認する。

CO₂ インキュベータより培養容器を 5 つ取り出し、それぞれの培地を吸引して先に回収していた培地と滅菌チューブ内で混和した後、10ml を感染症検査用に SP チューブに移す。CO₂ インキュベータより残りの培養容器をすべて取り出し、培養容器内の培地を吸引除去した後、PBS (10~15 mL) にて 1 回洗浄する。TrypZean solution (1~2.5 mL) を入れ CO₂ インキュベータ内にて 5~10 分間加温する。培養容器に培養液 (4~7.5 mL) を添加し遠心チューブ内に移して細胞を回収する。

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-S1102-09】 骨髄間葉系幹細胞の表面マーカー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 の使用手順書

【MTR-MS-PA】 ピペットエイドの使用手順書

【MTR-MS-TB】 小型振とう恒温器の使用手順書

【MTR-MS-MS-C】 細胞観察モジュールの使用手順書

【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

3) 骨髄間葉系幹細胞と 0.5%自己血清加生理食塩水との混合工程

Step1-0.5%自己血清加生理食塩水の調製

主要機器：特になし

被験者血清 (融解済)、生理食塩水、0.22 μ m シリンジフィルターなど必要な試薬・消耗品をパスボックス経由で CPI 内に搬入する。CPI 内で、生理食塩水 9.95 mL に被験者血清 50 μ L を加え、0.22 μ m シリンジフィルターにて濾過滅菌を行う。

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

【MTR-MS-PA】 ピペットエイドの使用手順書

Step2-骨髄間葉系幹細胞と 0.5%自己血清加生理食塩水との混合

主要機器：特になし

回収した骨髓間葉系幹細胞懸濁液を生理食塩水で2回洗浄し、0.5%自己血清加生理食塩水を 0.5×10^6 cells/250 μ Lとなるように混合し、2 mLの注射筒に充填する。充填した注射筒は、ジッパー付のビニール袋に入れて密閉し、CPI外に搬出後、クーラーボックス（保冷剤入り）に入れ、出荷判定が終わるまで静置する。

関連 SOP：【MTR-S1102-07】 骨髓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

4) 出荷・搬送

主要機器：搬送容器

骨髓間葉系幹細胞の培養終了の確認及び出荷判定を行い、0.5%自己血清加生理食塩水に懸濁し終えた最終製品（骨髓間葉系幹細胞/0.5%自己血清加生理食塩水）を、専用の搬送容器に入れ、手術室に搬送する。最終参考品（最終製品と同じ工程で作製された参考品）は、凍結保存する。

関連 SOP：【MTR-QS-09】 出荷判定に関する手順書
【MTR-S1102-08】 試験物の出荷及び輸送に関する手順書

5) 投与

主要機器：搬送容器

手術室にて、搬送容器から最終製品を取り出し、そのラベルを確認後、直ちに患部に注入する。

2.3.S.2.3. 原材料の管理

1. 原薬の製造に使用される原材料

ドナー由来の血清及びドナー骨髓液由来間葉系幹細胞の原材料は、受入れ時に試験され、確認された後に使用する。

表 2.3.S.2.3-1 に、各原材料の使用される工程及びそのグレードを示す。

表 S.2.3-1

原材料	使用される工程	グレード
α -MEM	骨髓細胞培養培地の調製 step3	供給元規格
PBS	滅菌 PBS の調製 step2	供給元規格
TrypZean Solution	継代培養 step8 培養終了の確認 step9 骨髓間葉系幹細胞の回収 step11	供給元規格
ドナー血清	ドナー血清作製 step1 骨髓細胞培養培地の調製 step3	施設内規格
ドナー骨髓液	骨髓液の採取 step4 骨髓の洗浄・播種 step6	施設内規格

生理食塩水	0.5%自己血清加生理食塩水の調製 step10	日本薬局方
被験者血清	0.5%自己血清加生理食塩水の調製 step10	施設内規格
0.22 μm フィルター	滅菌 PBS の調製 step2 骨髄細胞培養培地の調製 step3 0.5%自己血清加生理食塩水の調製 step10	供給元規格

JP 以外の規格の原料は、その業者等の資料を添付すること。

供給元規格の原材料に関しては、メーカーより規格試験法及び製品の品質証明書入手し、その安全性を検証・確保しておく。

施設内規格においては、ドナー及び被験者の健康状態を十分に考慮し、その量と品質を文書として設定すること。

2. 生物起源の原材料の管理

自家間葉系幹細胞の製造に用いられる原材料のうち、ヒト又は動物に由来するものを表 S.2.3-2 に示す。

表 2.3.S.2.3-2 ヒト又は動物由来の原材料

原材料	由来	使用される工程
ドナー骨髄液	ヒト	骨髄液の採取 step4
ドナー血清	ヒト	ドナー血清作製 step1 骨髄細胞培養培地の調製 step3
被験者血清	ヒト	0.5%自己血清加生理食塩水調製 Step10
TrypZean Solution	微生物由来組み換え体	継代培養 step8 培養終了の確認 step9 骨髄間葉系幹細胞の回収 step11

3. 培地及び添加因子の組成

自己脂肪組織由来幹細胞製造で使用される培地の組成について表 S.2.3-3 に示す。

表 2.3.S.2.3-3 骨髄間葉系幹細胞製造で使用される培地及び保存液等の組成

名称	添加物	容量・濃度
骨髄細胞培養培地	α-MEM	500 mL
	ドナー血清	88 mL
	Antibiotic Antimycotic solution	5 mL
0.5%自己血清加生理食塩水	生理食塩水	9.95 mL
	被験者血清	50 μL

2.3.S.2.4. 重要工程及び重要中間体の管理

1. 重要工程

骨髄間葉系幹細胞における製造工程の内、以下の 1) の工程を重要工程と設定した。重要工程について、重要工程と判断した理由を併せて示す。

1) 骨髄間葉系幹細胞培養工程

治療効果に係る骨髄間葉系幹細胞を産生させる主工程及び無菌管理が必要な工程であることから重要工程と設定した。

2. 重要中間体

骨髄間葉系幹細胞製造の工程の内、以下の 1) を重要中間体と設定した。重要中間体について、その判断した理由及び工程内試験並びに保存条件を併せて示す。

1) ドナー血清作製工程：ドナー血清

(1) 重要中間体と判定した理由

基本培地の主成分であり、閉鎖系による無菌下操作管理が必要なため、重要中間体と設定した。

(2) 保存条件

作製後 1 日以内に調製する際には 5 ± 3 °C のフリーザ付薬用保冷庫にて冷所保存し、作製後 2 日以内に調製する際には -20 ± 5 °C のフリーザ付薬用保冷庫又はバイオメディカルフリーザにて保存する。

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：製品標準書

新旧対照表

変更箇所	変更前	変更後	変更理由
P12 4. 培養工程、1) 骨髄間葉系幹細胞培養工程、Step1	Step1-骨髄液の <u>洗浄・播種</u> ,,,,、受け入れた骨髄液を滅菌 PBS で洗浄した後に、培養液 30ml を加える。その後、 <u>2</u> 本の培養容器、,,,,。	Step1-骨髄液の <u>播種</u> ,,,,、受け入れた骨髄液に 3 倍量の培養液を加える。その後、 <u>6</u> 本の培養容器、,,,,。	複数回のコールドランで確認した結果、骨髄液 20ml を直接 3 倍量の培地と混合して 6 本の培養フラスコに播種することで、必要十分数の付着細胞が得られること、PBS 洗浄により間葉系幹細胞を含む細胞集団の喪失がかなりあることが明らかとなったため。
P13 同上、Step3	,,,,、滅菌-PBS (10~15ml) にて <u>2</u> 回洗浄する。 ,,,,、CO2 インキュベータ内にて <u>10</u> 分間加温する。	,,,,、滅菌-PBS (10~15ml) にて <u>1</u> 回洗浄する。 ,,,,、CO2 インキュベータ内にて <u>5~10</u> 分間加温する。	コールドランで確認した結果、継代作業により細胞に与えるストレスを減らす為に洗浄は1回で良いと判断された。また、細胞剥離のための酵素反応は5分で完了することが確認されたため、やはり細胞へのストレスを軽減する目的で基本的に5分で終了し、十分に細胞の剥離が得られなかった場合には10分まで延長することを可能とするプロトコールに変更した。

<p>P13～14 同上、 Step4</p>	<p>、、、<u>培養容器をCO2 インキュベータより取り出し、培養容器内の培地を感染症検査用に滅菌SP チューブへ合計 10ml 取り、残りを吸引除去し、PBS (10～15ml) にて 2 回洗淨する。</u></p> <p>、、、CO2 インキュベータ内にて <u>10 分間加温する。</u></p> <p>、、、回収した<u>細胞懸濁液の 1/10 量</u>をパスボックス経由で、、、細胞数、生存率、および幹細胞の表面マーカーの検索を行う。</p>	<p>、、、<u>培養容器 1 つを CO2 インキュベータより取り出し、培養容器内の培地を吸引除去し、PBS (10～15ml) にて 1 回洗淨する。</u></p> <p>、、、CO2 インキュベータ内にて <u>5～10 分間加温する。</u></p> <p>、、、回収した<u>細胞懸濁液</u>をパスボックス経由で、、、細胞数、生存率、および幹細胞の表面マーカーの検索を行う。<u>細胞が規格を満たしていることを確認した後、残りの培養容器を CO2 インキュベータより取り出し、培養容器内の培地を感染症検査用に滅菌 SP チューブへ合計 10ml 取り、以下上記の手順で残りの細胞を回収する。</u></p>	<p>コールドランの結果、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、その間に出荷判定結果が得られるまで移植用間葉系幹細胞を生理食塩水内で浮遊させていた場合に細胞死が生じることが容易に予想されるため、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い、残りの本移植用細胞は規格検査結果、試験移植結果が得られるまで培養維持することとした。その際、感染症検査は本移植用フラスコから回収した培養液で施行するため、Step4 から感染症検査用培養液の採取工程は除き、また前述の理由で培養細胞剥離前の洗淨は1回のみ、剥離のための酵素反応時間は5～10分とした。</p>
<p>P14 4. 培養工程、2) 骨髄間葉系幹細胞と0.5%自己血清加生理食塩水</p>	<p>、、、となるように混合し、<u>2ml</u>の注射筒に充填する。</p>	<p>、、、となるように混合し、<u>1ml</u>の注射筒に充填する。</p>	<p>コールドランの結果、2ml の注射筒では微量液の注入が困難と判明したため、1ml の注射筒を用いることとした。</p>

との混合 過程、 Step2			
P15 表 S.2.3-1 ドナー骨 髄液	骨髄の <u>洗浄</u> ・播種	骨髄の <u>播種</u>	上述したように、コールドランの結果、間葉系幹細胞培養開始時に骨髄液の洗浄操作は得られる細胞数を減らす可能性が判明したため、洗浄操作は行わないこととした。

平成 25 年 2 月 7 日

再生誘導医学 教授
玉井 克人 殿

大阪大学医学部附属病院長
氏名 吉川 秀樹



ヒト幹細胞臨床研究に関する通知書

承認番号第 HM1102 号の臨床研究について、ヒト幹細胞臨床研究審査委員会よりの審査結果を受け、以下の病院長の指示、決定を通知する。

研究 題 目	表皮水疱症患者を対象とした骨髄間葉系幹細胞移植
研究 期 間	2011年10月14日~2015年10月13日
登 録 期 間	2011年10月14日~2013年10月13日
<p>(1) 承認する (2) 修正の上承認する (3) 承認しない (4) 既に承認した事項を取り消し等（臨床研究の中止、中断又は終了を含む）</p>	

添付書類

1. 様式 3 「ヒト幹細胞臨床研究の審査結果報告書」の写し

