



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

骨髄液の採取に関する手順書  
MTR-S1102-03-00

制定：2013年06月17日

承認	<del>確認</del>	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-S1102-03	骨髓液の採取に関する手順書	改訂番号	00
		1 頁の内 1 頁	

1. 目的
 

手術室における骨髓液採取を無菌的に支障なく行うための手順を定める。
2. 適応範囲
 

本臨床研究に用いる骨髓由来間葉系幹細胞を得るための、骨髓液の採取を行う全ての人に適応する。
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。臨床管理責任者が手術室内での骨髓採取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髓間葉系幹細胞製品標準書
5. 手順
  - 5-1 ドナー骨髓液は、下記に記す手順に従ってドナー腸骨から採取する。
    - 5-1-1 手術室内にてドナーに対して穿刺部位の局所麻酔を行う。
    - 5-1-2 穿刺部位をイソジン消毒液（明治製菓株式会社）にて消毒する。
    - 5-1-3 ヘパリン Na ロック 100 シリンジ製剤（三菱ウェルファーマ株式会社）を約 0.3 mL～1 mL 注射器に入れる。
    - 5-1-4 骨髓穿刺針及び注射器にて腸骨から骨髓液を採取する。採取は1回の吸引あたり約 2～5mL の骨髓液を吸引し、注射器から滅菌チューブに骨髓液を移す。骨髓液は、ヘパリン Na ロック 100 シリンジ製剤との混合物として合計約 20 mL 採取する。
    - 5-1-5 骨髓液を採取した滅菌チューブを清潔操作にてジッパー付き滅菌ビニール袋にいれ、袋にラベルを貼る。（記載事項：製品名、被験者識別 ID、バッチ No.、作成日／保存期限）
    - 5-1-6 骨髓液入のチューブをビニール袋のままクーラーボックス（室温）に入れて、未来医療センターCPI調製室内CPIに搬送後、当日中に播種する。
6. 関連文書
  - ・表皮水疱症患者を対象とした骨髓間葉系幹細胞製品標準書【MTR-S1102】
  - ・骨髓間葉系幹細胞の培養に関する手順書【MTR-S1102-05】
  - ・ドナー選定に関する手順書【MTR-QS-14】
  - ・原材料の選定・入手・管理に関する手順書【MTR-AS-04】
7. 記録と様式

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

**骨髄液の搬送に関する手順書**  
MTR-S1102-04-00

制定：2013年06月17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-S1102-04	骨髓液の搬送に関する手順書	改訂番号	00
		1頁の内1頁	

1. 目的

ドナーから採取した骨髓液を無菌的に搬送するための手順を定める。

2. 適応範囲

大阪大学医学部附属病院未来医療センターにて骨髓液の搬送に関する工程に適応する。

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。

研究分担者が大阪大学医学部附属病院未来医療センターにおける骨髓液搬送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髓間葉系幹細胞製品標準書

5. 手順

5-1 骨髓液の搬送は下記に記す手順に従って行う。

5-1-1 エタノール消毒を施したクーラーボックスの中にチューブ立てを準備する。

5-1-2 骨髓液の入ったビニール袋のラベルを確認し、クーラーボックス（室温）の中にあるチューブ立てに立てかける。

5-1-3 搬送者はクーラーボックスを出来る限り揺らさずに、未来医療センターCPI調製室まで搬送する。

6. 関連文書



- ・表皮水疱症患者を対象とした骨髓間葉系幹細胞製品標準書【MTR-S1102】
- ・骨髓間葉系幹細胞の培養に関する手順書【MTR-S1102-05】

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-S1102-05-00

制定：2013年06月17日

承認	<del>確認</del>	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-S1102-05	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の骨髄細胞培養培地を入れる。

5-1-4 骨髄液を5-1-3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5-1-5で作製した培養容器を、インキュベータ内にて温度 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$ 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（10～15mL）で2回洗浄した後、新たに培養液を10～15mL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。

5-2-4 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日以上延長の場合は、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-S1102-05	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  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$ 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4~7.5mL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  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$ 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  $20\pm 10$  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-S1102】
- ・骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書【MTR-S1102-02】
- ・滅菌 PBS の調製に関する手順書【MTR-S1102-10】
- ・CPI の使用に関する手順書【MTR-AS-15】

## 7. 記録と様式

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

**0.5%自己血清加生理食塩水の調製に関する手順書**  
MTR-S1102-06-00

制定：2013年06月17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-S1102-06	0.5%自己血清加生理食塩水の調製 に関する手順書	改訂番号 00	2頁の1内頁
----------------------	------------------------------	------------	--------

## 1. 目的

未来医療センター内で行う 0.5%自己血清加生理食塩水の調製に関する手順を定める。

## 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調製室にて骨髄間葉系幹細胞の投与に用いる製剤の調製に関わる全ての人に適応する。

## 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。

臨床管理責任者が未来医療センターCPCにおいて、0.5%自己血清加生理食塩水の調製に関する全ての権限を有する。

## 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 血清の作製

5-1-1 血清は、移植前日までに被験者から血液 5mL を採取して作成する。

5-1-2 採取した血液は、その場で無菌操作にて滅菌チューブ（池田理科 滅菌済み ポリプロピレン スクリューキャップ付き BD ファルコンコニカルチューブ 50mL）にいれ、しっかり蓋をした後さらにジッパー付きビニール袋に入れて2時間 37℃恒温槽にてインキュベートする。

5-1-3 5-1-2 により沈殿した凝血を舞い上げさせないように注意しながらビニール袋のまま保冷剤入りのクーラーボックスに入れて CPI 調製室に搬入する。

5-1-4 中の滅菌チューブをチューブ立てに立ててパスボックスから CPI 内に入れ、遠心機にて 2100rpm、室温、10min 遠心する。

5-1-5 凝血塊が混入しないように上清を別の滅菌チューブに分離する。

5-1-6 血清入り滅菌チューブは CPI 内で滅菌ビニール袋に入れて CPI から出し、被験者識別 ID、作製日、使用期限を表記したラベルを貼付し、未来医療センター CPC 内のフリーザ（機器番号：RF1-5）にて、 $-20 \pm 5$  °C で保存する。

### 5-2 混合（混合は CPI 内で行う）

5-2-1 調製当日、保存してある血清の被験者識別 ID、使用期限を確認し、融解する。

5-2-2 融解した血清、生理食塩水（日本薬局方、大塚製薬）、シリンジフィルター（MILLIPORE、0.22 μm）などをパスボックス経由で CPI に搬入する。

5-2-3 生理食塩水 9.95 mL に対して、自己血清 50 μL を添加して、十分に混合する。

5-2-4 シリンジフィルター（0.22 μm）を用いて、濾過滅菌を行う。

5-2-5 このようにして得られた被験者の自己血清と生理食塩水の混合液を「0.5%自己血清加生理食塩水」として骨髄間葉系幹細胞出荷時の懸濁液として用いる。

## 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-S1102】
- ・原材料の選定・入手・管理に関する手順書【MTR-AS-04】

文書番号 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	改訂番号	00
		2頁の2内頁	



- ・採血及び血清分離に関する手順書【MTR-S1102-01】
- ・骨髄間葉系幹細胞の回収と出荷準備に関する手順書【MTR-S1102-07】

7. 記録と様式

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回収と出荷準備に関する手順書  
MTR-S1102-07-00

制定：2013年06月17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-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	改訂番号	00
		2頁の内1頁	

## 1. 目的

骨髄間葉系幹細胞の回収と出荷準備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Cell Processing Center (CPC) にて骨髄間葉系幹細胞の回収と出荷準備を行う全ての工程に適応する。

## 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CPC内CPIにおける骨髄間葉系幹細胞の回収と出荷準備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 試験移植用細胞の回収

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 CO<sub>2</sub> インキュベータから培養容器を一つ取り出し、細胞観察モジュールを用いて、培養細胞の状態 (細胞密度、異常の有無など) を確認した後、培養上清吸引し、感染症検査用に 50 mL 滅菌チューブに回収してCPI内に置いておく。

5-1-3 培養容器をPBS (10~15mL) で1回洗浄後、TrypZean solution (Sigma-Aldrich Corp., T3449) を1~2.5 mL 加え、インキュベータ内で5~10分間反応させる。

5-1-4 細胞の剥離を確認後、培養液を4~7.5 mL 加えて反応を停止させ、全量を50 mL 滅菌遠心チューブに回収する。

5-1-5 培養容器に培養液を5mL 添加し、培養容器内残存細胞と一緒に上記の遠心チューブに追加回収する。

5-1-6 回収した骨髄間葉系幹細胞を生理食塩水 (10~15ml) で2回洗浄する。(遠心条件: 1500 rpm、室温、5 min)

5-1-7 生理食塩水 5~10mL を加え、細胞懸濁液の一部を規格試験のためにパスボックス経由でCPIの外に持ち出す。残りの細胞は遠心チューブのままCPI内に置いておく。

5-1-8 持ち出した細胞を用いて細胞数、生存率、表面マーカーの規格検査を行う。

5-1-9 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CPIに残しておいた細胞の一部をおおよそ1個/1 $\mu$ Lとなるよう生理食塩水で懸濁し、1mLの注射筒に充填する。

5-1-10 上記細胞懸濁液 100 $\mu$ 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。

### 5-2 回収

5-2-1 CO<sub>2</sub> インキュベータから回収を行う5個の培養容器を取り出し、細胞観察モジュールを用いて、培養細胞の状態 (細胞密度、異常の有無など) を確認する。

文書番号 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	改訂番号	00
		2頁の内2頁	

- 5-2-2 培養上清を 5-1-2 で回収した培養上清とあわせて滅菌チューブに合計約 10 mL、感染症検査用に採取する。
- 5-2-3 未使用の培養液を QC サンプルとして別の滅菌 SP チューブに約 10 mL 採取し、凍結保存(-20°C±5°C)する。
- 5-2-4 残りの培養容器の培養上清を吸引除去し、滅菌 PBS (10~15mL) で 1 回洗浄する。
- 5-2-5 TrypZean solution (Sigma-Aldrich Corp、T3449) を 1~2.5 mL 加え、インキュベータ内で 5~10 分間反応させる。
- 5-2-6 細胞の剥離を確認後、培養液を、4~7.5 mL 加えて反応を停止させ、全量を 50 mL 滅菌チューブに回収する。
- 5-3 出荷準備
- 5-3-1 剥離、回収した骨髄間葉系幹細胞を生理食塩水 (10~15mL) で 2 回洗浄する。  
(遠心条件: 1500 rpm、室温、5 min)
- 5-3-2 細胞数、及び細胞生存率を計測し、骨髄間葉系幹細胞が  $0.5 \times 10^6$  個 / 250  $\mu$ L と  
なるように 0.5% 自己血清加生理食塩水に懸濁し、移植に必要とする本数分、注  
射筒 (滅菌済み透明プラスチック製、1mL) に充填する。
- 5-3-3 注射筒にラベルを貼付し、ジッパー付ビニール袋に梱包する。



## 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-S1102】
- ・ 骨髄細胞培養培地の調製に関する手順書【MTR-S1102-02】
- ・ 骨髄間葉系幹細胞の培養に関する手順書【MTR-S1102-05】
- ・ 滅菌 PBS の調製に関する手順書【MTR-S1102-10】
- ・ CPI の使用に関する手順書【MTR-AS-15】
- ・ 細胞観察モジュールの使用に関する手順書【MTR-MS-MS-C】

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

試験物の出荷及び搬送に関する手順書  
MTR-S1102-08-00

制定：2013年06月17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)

