

B 羊膜の加工および微生物学的安全性試験に関する標準書

平成22年9月22日作成

平成23年8月23日改訂

平成25年7月1日改訂

1.0 目的

本標準書は、羊膜移植等臨床応用される羊膜の品質を確保することを目的として、京都府立医科大学内の再生医療・細胞治療研究センターに付置される組織（羊膜）バンク（以下、羊膜バンクという）が定める。

2.0 適用範囲

本標準書は、保存液中に保存された未処置羊膜の細切加工、微生物学的安全性試験実施業者への委託、細切加工羊膜の保存に係わる作業に適用する。

3.0 未処置羊膜の細切加工

3.1 未処置羊膜の絨毛膜剥離

3.1.1 微生物学的安全性試験用「採取時」試料の採取およびラベル表示

未処置羊膜を室温で解凍した後、ステンレスバットに移し、未処置羊膜の端の部分から約3cm×3cmを手術用メスで採取し、ゲンタマイシン無添加羊膜保存液1mLを入れた2mL容量の外ねじバイアルチューブに入れて密栓する。

管理番号および「採取時」を表示したラベルを外ねじバイアルチューブに貼付する。

3.1.2 未処置羊膜の洗浄および絨毛膜剥離

ステンレスバットに生理食塩液約250mLを加え、絨毛膜側を上面にし、指先で羊膜を均一に広げ、表面を撫でるようにして絨毛膜及び付着血液を除去する。除去後、生理食塩液を取り除き、これに新たに生理食塩液約250mLを加える。付着した血液および絨毛膜を完全に取り除くことができるまで、この操作を2~4回繰り返す。

3.2 絨毛膜剥離羊膜の細切加工

指先の触感及び目視観察にて血管跡、微孔が無く、凹凸が少ない領域の羊膜を手術用メスで約3cm×3cmに裁断する。

3.3 細切加工羊膜の外観検査

裁断した羊膜を1枚ずつゲンタマイシン添加リン酸緩衝生理食塩液(PBS(-))30mLを入れた100mm径のペトリディッシュに移し、肉眼にて外観検査を行い、以下の規格に適合しているものを細切加工ヒト羊膜とし、不適合のものを学内規則に従って廃棄する。

外観検査の規格

検査部位	検査項目	規格
上皮側	血管跡，微孔の有無	血管跡・微孔が無いこと
絨毛膜側	繊維状組織の有無	繊維状組織が無いこと
	血管跡，微孔の有無	血管跡・微孔が無いこと

3.4 細切加工ヒト羊膜の洗浄

細切加工ヒト羊膜をゲンタマイシン添加リン酸緩衝生理食塩液(PBS(-))30mLを入れた50 mL 遠心チューブにチューブあたり20枚以下の枚数で移し、チューブローターを用いて、10 rpmで5分間回転させることで洗浄する。洗浄後の洗浄液は無色澄明でなければならない。内容液が白濁等を示した場合には、無色澄明になるまで洗浄操作を繰り返す。洗浄後、さらに、これらの細切加工ヒト羊膜をゲンタマイシン添加羊膜保存液30 mLを入れた50 mL 遠心チューブにチューブあたり20枚以下の枚数で移し、チューブローターにて10 rpmで5分間回転させることで洗浄する。

3.5 細切加工ヒト羊膜の充填

羊膜保存液で洗浄した細切加工ヒト羊膜をゲンタマイシン添加羊膜保存液1 mLを入れた2 mL容量の外ねじバイアルチューブに1枚ずつ入れて密栓する。

3.6 ラベル表示

3.6.1 微生物学的安全性試験用「保存前」試料の確保およびラベル表示

3.5で得られた細切加工ヒト羊膜充填外ねじバイアルチューブの1管に管理番号および「保存前」を表示したラベルを貼付する。

3.6.2 細切加工ヒト羊膜のラベル表示

3.5で得られた細切加工ヒト羊膜充填外ねじバイアルチューブに管理番号および枝番号を下のように表示したラベルを貼付する。

例) KPU1305-① KPU1305-② KPU1305-③

3.7 保存

3.7.1 微生物学的安全性試験用試料の保存

3.1.1 微生物学的安全性試験用「採取時」試料および3.6.1 微生物学的安全性試験用「保存前」試料は4℃の冷蔵庫にて保存する。

3.7.2 細切加工ヒト羊膜の保存

3.6.2 細切加工ヒト羊膜は-80℃の超低温槽にて保存する。細切加工羊膜を超低温槽Aの所定の場所に保存し、「羊膜台帳」(様式B-1)および「羊膜保存場所リスト」(様式B-2)に必要事項を記入する。

4.0 微生物学的安全性試験の委託

3.7.1 微生物学的安全性試験用試料の保存を行った後、可及的速やかに三菱化学メディエンス株式会社京都支店に電話（075-313-3401）あるいはメールにて微生物学的安全性試験を委託する。

試験項目および試験法は下の通り。なお、5. 抗酸菌分離培養検査は長期間を要するため、他の5項目の結果が出た時点で中間報告をして貰う。

1. 無菌テスト：一般細菌・真菌（嫌気性菌、淋菌、*Lactobacillus* sp.、*Bifidobacterium* sp.、*Gardnerella vaginalis*を含む）
2. クラミジア トラコマチス核酸増幅同定
3. アデノウイルス核酸増幅同定
4. 単純ヘルペスウイルス核酸増幅同定
5. 抗酸菌分離培養検査
6. *Mycoplasma* spp.

三菱化学メディエンス株式会社からの「試験結果報告書」は、全項目が陰性であることを確認した後、当該管理番号のファイルに保管する。

B 羊膜の加工および微生物学的安全性試験に関する標準書

平成22年9月22日作成

平成23年8月23日改訂

1.0 目的

本標準書は、羊膜移植等臨床応用される羊膜の品質を確保することを目的として、京都府立医科大学内の再生医療・細胞治療研究センターに付置される組織（羊膜）バンク（以下、羊膜バンクという）が定める。

2.0 適用範囲

本標準書は、保存液中に保存された未処置羊膜の細切加工、微生物学的安全性試験実施業者への委託、細切加工羊膜の保存に係わる作業に適用する。

3.0 未処置羊膜の細切加工

3.1 未処置羊膜の絨毛膜剥離

3.1.1 微生物学的安全性試験用「採取時」試料の採取およびラベル表示

未処置羊膜を室温で解凍した後、ステンレスパットに移し、未処置羊膜の端の部分から約3cm×3cmを手術用メスで採取し、ゲンタマイシン無添加羊膜保存液1mLを入れた2mL容量の外ねじバイアルチューブに入れて密栓する。

管理番号および「採取時」を表示したラベルを外ねじバイアルチューブに貼付する。

3.1.2 未処置羊膜の洗浄および絨毛膜剥離

ステンレスパットに生理食塩液約250mLを加え、絨毛膜側を上面にし、指先で羊膜を均一に広げ、表面を撫でるようにして絨毛膜及び付着血液を除去する。除去後、生理食塩液を取り除き、これに新たに生理食塩液約250mLを加える。付着した血液および絨毛膜を完全に除去することができるまで、この操作を2～4回繰り返す。

3.2 絨毛膜剥離羊膜の細切加工

指先の触感及び目視観察にて血管跡、微孔が無く、凹凸が少ない領域の羊膜を手術用メスで約3cm×3cmに裁断する。

3.3 細切加工羊膜の外観検査

裁断した羊膜を1枚ずつゲンタマイシン添加リン酸緩衝生理食塩液(PBS(-))30mLを入れた100mm径のペトリディッシュに移し、肉眼にて外観検査を行い、以下の規格に適合しているものを細切加工ヒト羊膜とし、不適合のものを学内規則に従って廃棄する。

外観検査の規格

検査部位	検査項目	規格
上皮側	血管跡、微孔の有無	血管跡・微孔が無いこと
絨毛膜側	繊維状組織の有無	繊維状組織が無いこと
	血管跡、微孔の有無	血管跡・微孔が無いこと

3.4 細切加工ヒト羊膜の洗浄

細切加工ヒト羊膜をゲンタマイシン添加リン酸緩衝生理食塩液(PBS(-))30mLを入れた50 mL遠心チューブにチューブあたり20枚以下の枚数で移し、チューブローターを用いて、10 rpmで5分間回転させることで洗浄する。洗浄後の洗浄液は無色澄明でなければならない。内容液が白濁等を示した場合には、無色澄明になるまで洗浄操作を繰り返す。洗浄後、さらに、これらの細切加工ヒト羊膜をゲンタマイシン添加羊膜保存液30 mLを入れた50 mL 遠心チューブにチューブあたり20枚以下の枚数で移し、チューブローターにて10 rpmで5分間回転させることで洗浄する。

3.5 細切加工ヒト羊膜の充填

羊膜保存液で洗浄した細切加工ヒト羊膜をゲンタマイシン添加羊膜保存液 1 mL を入れた 2 mL 容量の外ねじバイアルチューブに1枚ずつ入れて密栓する。

3.6 ラベル表示

3.6.1 微生物学的安全性試験用「保存前」試料の確保およびラベル表示

3.5 で得られた細切加工ヒト羊膜充填外ねじバイアルチューブの1管に管理番号および「保存前」を表示したラベルを貼付する。

3.6.2 細切加工ヒト羊膜のラベル表示

3.5 で得られた細切加工ヒト羊膜充填外ねじバイアルチューブに管理番号および枝番号を下のように表示したラベルを貼付する。

例) KPU1305-① KPU1305-② KPU1305-③

3.7 保存

3.7.1 微生物学的安全性試験用試料の保存

3.1.1 微生物学的安全性試験用「採取時」試料および3.6.1 微生物学的安全性試験用「保存前」試料は4℃の冷蔵庫にて保存する。

3.7.2 細切加工ヒト羊膜の保存

3.6.2 細切加工ヒト羊膜は-80℃の超低温槽にて保存する。細切加工羊膜を超低温槽Aの所定の場所に保存し、「羊膜台帳」(様式B-1)および「羊膜保存場所リスト」(様式B-2)に必要事項を記入する。

4.0 微生物学的安全性試験の委託

3.7.1 微生物学的安全性試験用試料の保存を行った後、可及的速やかに三菱化学メディエンス株式会社京都支店に電話（075-313-3401）あるいはメールにて微生物学的安全性試験を委託する。

試験項目および試験法は下の通り。なお、5. 抗酸菌分離培養検査は長期間を要するため、他の5項目の結果が出た時点で中間報告をして貰う。

1. 無菌テスト：一般細菌・真菌（嫌気性菌、淋菌、*Lactobacillus* sp.、*Bifidobacterium* sp.、*Gardnerella vaginalis*を含む）
2. クラミジア トラコマチス核酸増幅同定
3. アデノウイルス核酸増幅同定
4. 単純ヘルペスウイルス核酸増幅同定
5. 抗酸菌分離培養検査
6. *Mycoplasma* spp.

三菱化学メディエンス株式会社からの「試験結果報告書」は、全項目が陰性であることを確認した後、当該管理番号のファイルに保管する。

