

眼科所見 B

	1W	1M	3M	6M	12M
睫毛所見	0	0	0	0	0
涙液検査		5mm			
涙点閉鎖	0	0	0	0	0

眼科所見 C

	1W	1M	3M	6M	12M
前房所見	0	0	0	0	0
虹彩所見	0	0	0	0	0
白内障	0	0	0	0	0
緑内障	0	0	0	0	0
網膜疾患	0	0	0	0	0

矯正視力

	1W	1M	3M	6M	12M
矯正視力	0.6	1.0	1.0	1.2	1.0

I.別紙

③ 症例スコア 2

臨床スコア：症例 2

自覚症状スコア

	1W	1M	3M	6M	12M
異物感 痛み	0	0	0	0	
乾燥感	1	1	1	1	
眩しさ	0	0	0	0	
眼精疲労	0	0	0	0	
室外行動	2	2	1	1	
家事・入 浴・着替え	2	2	1	1	
娯楽	2	2	1	1	
人の姿や 顔の判別	2	2	1	1	

眼科所見 A

① 結膜所見

	1W	1M	3M	6M	12M
結膜充血	1	1	1	1	
毛様充血	1	1	1	0	
角化	0	0	0	0	
瞼球癒着	0	1	1	1	

② 角膜所見

	1W	1M	3M	6M	12M
上皮欠損	2	0	0	0	
結膜進入	0	0	0	1	
角膜血管進入	1	1	1	1	
角膜混濁	1	1	1	1	
角化	0	0	0	0	

眼科所見 B

	1W	1M	3M	6M	12M
睫毛所見	0	0	0	0	0
涙液検査					
涙点閉鎖	0	0	0	0	0

眼科所見 C

	1W	1M	3M	6M	12M
前房所見	0	0	0	0	0
虹彩所見	0	0	0	0	0
白内障	0	0	0	0	0
緑内障	0	0	0	0	0
網膜疾患	0	0	0	0	0

矯正視力

	1W	1M	3M	6M	12M
矯正視力	0.05	0.04	0.15	0.3	

I.別紙

④ 製品標準書:KVPC-PMFOPH-01

緒言

ヒ角膜上皮シートの名称、剤型等は下記のとおりである。

一般名称	ヒ角膜輪部培養上皮シート
原材料摘出場所名	慶応義塾大学医学部
製剤処理場所名	慶応義塾大学医学部
剤型	重層化上皮細胞群

1. 原薬

2.3.S.1 一般情報

1. 名称:ヒ角膜輪部上皮シート

1.1 INN 該当なし

1.2 化学名 該当なし

1.3 JAN (日本名)ヒ角膜輪部培養上皮シート

(英名)human corneal limbal epithelial cell sheet

1.4 CAS 番号 該当なし

2. 構造

ヒ角膜輪部上皮から分離培養した重層化角膜上皮シート。

1. 化学構造

ヒ角膜輪部上皮由来の重層化上皮であり、化学構造での表現は適さない。

2. 分子式

ヒ角膜輪部上皮由来の重層化上皮であり、化学構造での表現は適さない。

3. 質量

ヒ角膜輪部上皮由来の細胞数 10 万から 100 万個から直径 24mm 以内に作られた円状の培養重層化上皮であり、総質量の大きさは一定でない。

3. 一般特性

ヒ角膜輪部上皮から分離した上皮細胞には角膜上皮特異的なケラチン3、12陰性の細胞群が存在し、slow cycling cell であるとともに高い増殖能を持つことから知られている。これらの細胞に角膜上皮のstem cellの存在が想定されている。このヒ角膜輪部上皮から分離した上皮細胞をフィブリノコートウェル上で培養し、MASC フィーダー細胞と共培養することによって、角膜上皮に類似した角膜上皮シートを形成させることができる。この上皮シートは眼表面再建術において、急性期眼表面疾患へアプローチする新しい治療法として期待される。

1. 性状

ヒ角膜輪部上皮から分離培養し重層化させた角膜上皮細胞シート。
 キャリヤーフリーで高い透明性を保っている。

2. 構造

直径 20～24mm、
 厚さ約 30～60μm、
 2層以上に重層化した上皮
 ケラチン 3、12 陽性、

生物活性

無虹彩症、化学症、Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡などの角結膜上皮疾患では結膜上皮が角膜上皮侵入し、角膜上皮stemセルが消失していると考えられている。このような疾患へ角膜輪部由来の培養上皮シートを移植することでその部位に生着し、増殖・分化することが期待される。また、培養上皮シート移植による速やかな上皮化が術後早期の消炎に効果的であることが期待される。

2.3.S.2 製造

2.1 製造所

慶應義塾大学ベクタープロセッシングセンター (KVPC)

2.2 製造法およびプロセスコントロール

1. 製造方法のフローチャート

製造方法を以下に示す。

: 工程区分

: 重要工程

なお使用機器は表のとおりであり、以下の文章では機器一般名、KVPC 施設内機器番号、および KVPC 施設内所在で示す。

機器一般名	KVPC 施設 内機 器番 号	機器：品名	メーカー	型番	KVPC 施設内 所在
冷蔵庫	FR02	LABCOOL	SANYO	MPR-720	サプライ室
冷蔵冷凍庫	FR03	MEDICOOL	SANYO	MPR-214F	P2 ルーム 1
冷凍庫	FR01	BIOMEDICAL FREEZER	SANYO	MDF-U537D	サプライ室
-80℃超低温フリーザー	FR05	-80℃超低温フリーザー	SANYO	MDF-192	P2 ルーム 1

-150℃超低温フリーザー	FR06	-150℃超低温フリーザー	SANYO	MDF-1155ATN	細胞保存室
安全キャビネット	BSC01	BIOLOGICAL SAFETY CABINET	SANYO	MHE-130AB3	P2 ルーム 1
サンコート EX システム	EX01	サンコート EX システム	旭テクネイオン	EX-1000	細胞保存室
炭酸ガス培養器	MC01、 MC02	CO2 INCUBATOR	SANYO	MCO-20AIC	P2 ルーム 1
冷却遠心器	CF01	MULTIPURPOSE REFRIGERATED CENTRIFUGE	トミー精工	LX-140	P2 ルーム 1

準備工程 [P2 ルーム 1、ただし保管はサブライ室]

ステップ 1 (原材料の分注および管理に関する手順書 KVPC-PMFOPH01-001)

目的: 製造に使用される原材料を分注・保存する。

機器: 冷蔵庫 (FR02/サブライ室)、冷蔵冷凍庫 (FR03/P2 ルーム 1)、冷凍庫 (FR01/サブライ室)、安全キャビネット (BSC01/P2 ルーム 1)

各原材料の保存温度および分注量:

- 4℃ 保存品: D-MEM/F-12 (45ml)、PBS (30ml)、 α -MEM (45ml)、H₂O (5ml)、0.02%DETA (10ml)、アプロチニン (50 μ l)、2.5M 塩化カルシウム溶液 (10ml)、生理食塩水 (50ml)
- -20℃ 保存品: 抗菌剤ミックス (ストック 1ml、ワーキング 500 μ l)、hEGF (ストック 50 μ l、ワーキング 5 μ l)、human Insulin (ストック 500 μ l、ワーキング 65 μ l)、FCS (ストック 50ml、ワーキング 2ml)、Dispase II (ストック 20ml、ワーキング 1ml)、マイトマイシン C (80 μ l)

操作管理項目: ロット付番 (施設内ロット番号)、ラベリング (ラベル数の確認)

ステップ 2 (Fibrin coat well 作成に関する手順書 KVPC-PMFOPH01-004)

目的: Fibrin coat well を作成する。

機器: 機器名 (KVPC 施設内機器番号/機器: 品名/メーカー/型番/所在)

: 冷蔵庫 (FR02/サブライ室)、冷蔵庫 (FR03/P2 ルーム 1)、安全キャビネット (BSC01/P2 ルーム 1)

各 well における分注量: 300 μ l

操作管理項目: 移動容器の清拭 (70%エタノール)

: クリーンの確認; 使用前クラス 100、温度 25℃ \pm 5℃

: 冷蔵庫 (温度 4℃ \pm 0.5℃ (機器指示計目視))

保存温度: ヒト血液由来 Fibrin coat well (4℃ \pm 0.5℃)

MASC の運搬工程 [細胞保存室、P2 ルーム 1]

(MASC 凍結細胞から培養開始工程に関する手順書 KVPC-PMFOPH01-021)

目的:細胞保存室から P2 ルーム 1 へ細胞を搬入

機器:-150℃超低温フリーザー (FR06/細胞保存室)、-80℃超低温フリーザー (FR05/P2 ルーム 1)、サノコート EX システム (EX01/細胞保存室)

操作管理項目:ロットの確認(目視、サノコート EX システム)、移動容器の清拭(70%エタノール)

MASC 培養工程 [P2 ルーム 1]

ステップ 1 (MASC 凍結細胞から培養開始工程に関する手順書 KVPC-PMFOPH01-021)

目的:培地調整、細胞の解凍と培養の開始

機器:恒温槽、安全キャビネット(BSC01/P2 ルーム 1)、炭酸ガス培養器(MC01 あるいは MC02/P2 ルーム 1)、冷却遠心器(CF01/P2 ルーム 1)、サノコート EX システム (EX01/細胞保存室)

培地: MASC の培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-011) 参照

容器:6 well plate

操作管理項目:

解凍用恒温槽:恒温槽温度;37℃±2.0℃

:解凍時間; 30 秒±3 秒

安全キャビネット:クリーン度の確認;使用前クラス 100、

炭酸ガス培養器:CO₂濃度 5.0%±0.5%(ファイバ測定)、

温度 37℃±0.5℃(機器指示計目視)

湿度の確認(庫内バット水位目視)

遠心機:回転数;5 分、440G

工程管理項目: MASC 細胞培養上清に対する培地無菌試験(JP)、エンドトキシン試験(JP)、マイコプラズマ検査、ウイルス検査(HIV、HBV、HCV、HTLVプロウイルス、ヒトパルボウイルス B19)。

培養期間 2 日

細胞数:100,000 個以上、生細胞率が 50%以上

ステップ 2 MASC マイトマイシン C 処理操作に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-014)

目的:MASC をマイトマイシン C 処理する。

機器:安全キャビネット(BSC01/P2 ルーム 1)、炭酸ガス培養器(MC01 あるいは MC02/P2 ルーム 1)

培地: MASC マイトマイシン C 処理培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-013) 参照

容器:6well plate

同時に行う操作:検体採取:MASC 細胞の品質確認手続きに関する手順書(KVPC-PMFOPH01-006) 参照

操作管理項目:

安全キャビネット:クリーン度の確認;使用前クラス 100、
炭酸ガス培養器:CO₂濃度 5.0%±0.5%(ファイブ測定)、
温度 37°C±0.5°C(機器指示計目視)
湿度の確認(庫内バット水位目視)

工程管理項目:

細胞密度:70%以上

角膜輪部上皮細胞培養開始工程

ステップ 1(角膜輪部組織の搬入)[サブライ室から P2 ルーム 1]

ドナー角膜から角膜輪部上皮細胞培養開始工程に関する手順書
(KVPC-PMFOPH01-023)参照

目的:P1 ルーム 1 へ角膜輪部を搬入

操作管理項目:ドナースクリーニング情報の確認(目視)

ステップ 2(角膜輪部上皮細胞培養開始)[P2 ルーム 1]

ドナー角膜から角膜輪部上皮細胞培養開始工程に関する手順書
(KVPC-PMFOPH01-023)参照

目的:角膜輪部上皮の培養開始

機器:安全キャビネット(BSC01/P2 ルーム 1)、炭酸ガス培養器(MC01 あるいは MC02/P2 ルーム 1)、
冷却遠心器(CF01/P2 ルーム 1)

培地:角膜輪部上皮細胞培養の培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-012)参照

容器:Fibrin coat well :Fibrin coat well 作成に関する手順書
(KVPC-PMFOPH01-004)参照

操作管理項目:

安全キャビネット:クリーン度の確認;使用前クラス 100、
炭酸ガス培養器:CO₂濃度 5.0%±0.5%(ファイブ測定)、
温度 37°C±0.5°C(機器指示計目視)
湿度の確認(庫内バット水位目視)

遠心機:回転数;5分、440G

工程管理項目:ドナー角膜保存液に対する培地無菌試験(JP)、エンドトキシン試験(JP)、
マイコプラズマ検査、ウイルス検査(HIV、HBV、HCV、HTLVプロウイルス、ヒトパルボウイルス B19)。

培養期間 13~15 日

細胞数:200,000 個以上、生細胞率が 50%以上

角膜輪部上皮細胞培養工程 [P2 ルーム 1]

培地交換に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-024)

マイトマイシンC処理したMASC交換に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-025)

目的:培地の追加・交換またはMASCの交換

機器:安全キャビネット(BSC01/P2ルーム1)、炭酸ガス培養器(MC01あるいはMC02/P2ルーム1)

培地:輪部上皮細胞培養の培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-012)参照

:MASCの培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-011)参照

:MASCマイトマイシンC処理培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-013)参照

容器:6well plate

操作管理項目:

安全キャビネット:クリーン度の確認;使用前クラス100、

炭酸ガス培養器:CO₂濃度5.0%±0.5%(ファイブ測定)、

温度37°C±0.5°C(機器指示計目視)

湿度の確認(庫内バット水位目視)

遠心機:回転数;5分、440G

工程管理項目:

培養7日目における細胞培養上清(重要中間体)の培地無菌試験(JP)、エンドトキシン試験(JP)、マイコプラズマ検査、ウイルス検査(HIV、HBV、HCV、HTLVプロウイルス、ヒトパルボウイルスB19)。

細胞集団倍加数:10前後

上皮シート回収運搬工程 [P2ルーム1]

角膜上皮シート回収・包装に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-007)

目的:角膜上皮シートの回収・運搬

溶液:(角膜上皮シート包装培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-028)参照)

容器:35mm dish

機器:安全キャビネット(BSC01/P2ルーム1)

操作管理項目:

安全キャビネット:クリーン度の確認;使用前クラス100、

工程管理項目:

合否判定試験

出荷直前の細胞培養上清の無菌試験(JP)、エンドトキシン試験(JP)、マイコプラズマ検査、ウイルス検査(HIV、HBV、HCV、HTLVプロウイルス、ヒトパルボウイルスB19)。

α₂血清アルブミン濃度測定試験

2. ロット構成

ロットのサイズおよび構成に関しては、表2.3.S.2.2-1のとおり。

工程	ステップ	スケール
準備工程	1	

	2	Transwell 6 枚
MASC の運搬工程	-	1 本
MASC の培養工程	1	6well 中 3well
	2	6well 中 3well
角膜輪部上皮細胞培養開始工程	1	1 輪部組織
	2	600,000cells 以上
	3	6well 中 3well
角膜輪部上皮細胞培養工程	-	6well 中 3well
上皮シート回収・運搬工程	-	1well

3. 作業手順

準備工程

ステップ 1

原材料の分注および管理(原材料の分注および管理に関する手順書:

KVPC-PMFOPH01-001)

主要機器:安全キャビネット(BSC01/P2 ルーム 1)、冷蔵庫(FR03/P2 ルーム 1)、および冷凍庫(FR01/サブライ室)

製造に使用される原材料を搬入し、それぞれ適量に分注する。指定する原材料については、まず大容量のマスターストックを分注し、次にマスターストックをワーキングストックに分注する。施設内のロット番号を添付し、保存チューブを適切な温度に保存する。分注量および保存温度:

4℃保存品: D-MEM/F-12(45ml)、PBS(30ml)、 α -MEM(45ml)、H₂O(5ml)、0,02%DETA(10ml)、アプロチニン(50 μ l)、2.5M 塩化カルシウム溶液(10ml)、生理食塩水(50ml)
-20℃保存品: 抗菌剤ミックス(ストック 1ml、ワーキング 500 μ l)、hEGF(ストック 50 μ l、ワーキング 5 μ l)、human Insulin(ストック 500 μ l、ワーキング 65 μ l)、FCS(ストック 50ml、ワーキング 2ml)、Dispase II(ストック 20ml、ワーキング 1ml)、マイトマイシン C(80 μ l)

工程管理:ロット構成に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-009)

ステップ 2

Fibrin coat well 作成(Fibrin coat well 作成に関する手順書:(KVPC-PMFOPH01-004))

主要機器:冷蔵庫(FR03/P2 ルーム 1)

特定生物製剤の使用に伴い必要事項の記録手続きを行う。ホルヒール(一般名フィブリノゲン加第 13 因子)および作成に使用されるその他の原材料を搬入し、Fibrin coat well を作成する。施設内のロット番号を添付して適切な温度へ保存する。

分注量:300 μ l/well (0~4℃)

MASC の運搬工程

MASC 凍結細胞から培養開始工程に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-021)

主要機器: ココート EX システム (EX01/細胞保存室)

ココート EX システムを用いて出庫手続き後、指定された場所から凍結チューブを取り出し、ロットを確認し、適切な容器に入れ、保存庫より P1 ルーム 1 まで運搬する。細胞調整室 (P2 ルーム 1) に入れる前に 70%エタノールで清拭する。

MASC の培養工程

ステップ 1

凍結細胞から培養開始 凍結細胞から培養開始工程に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-021)

主要機器: 安全キャビネット (BSC01/P2 ルーム 1)、炭酸ガス培養器 (MC01 または MC02/ P2 ルーム 1)

MASC 培地調整に関する手順書に従い MASC 培地を調整する。安全キャビネット内で 15ml コニカルチューブに MASC 培地を 10ml 入れる。細胞搬入の手続きに基づき搬入された保存チューブを 37℃の恒温槽で 30 秒間温める。保存チューブ内の細胞を MASC 培地に移し軽くピペティングする。15ml コニカルチューブに細胞を移し、440g、4℃、5 分間遠心する。上清を廃液に捨て、もう一度 MASC 培地に懸濁後細胞数をカウントする。生存率が 50%以上であることを確認し、12.5 万個 / ml 以上になる様に 6well plate へ播種する。培養は炭酸ガス培養器にて 2 日間行う。

工程管理項目: MASC 細胞培養上清に対する無菌試験 (JP)、エンドトキシン試験 (JP) マイコプラズマ検査、ウイルス検査 (HIV、HBV、HCV、HTLV プロウイルス、ヒトパルボウイルス B19)。ただし初回ないし 20 アンブルおき。

ステップ 2

MASC マイトマイシン C 処理 (MASC マイトマイシン C 処理操作に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-014) 参考)

主要機器: 安全キャビネット (BSC01/P2 ルーム 1)、炭酸ガス培養器 (MC01 または MC02/ P2 ルーム 1)

MASC マイトマイシン処理培地調整に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-013) に従い、MASC マイトマイシン処理培地を調整する。培養中の MASC から培地を取り除き、細胞を洗浄するため各 well に 2ml ずつ PBS を分注する。PBS を取り除いたのち、MASC マイトマイシン処理培地を各 well に 2ml ずつ分注し、炭酸ガス培養器に移して 37℃で 2 時間処理する。処理中、角膜輪部上皮細胞培養の培地調整に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-012) に従って上皮用培地を作成する。処理後、MASC 細胞からマイトマイシン C 処理培地を取り除き、細胞を洗浄するため各 well に 2ml ずつ上皮用培地を分注したのちに取り除く。細胞を 3 回洗浄した後、上皮用培地を各 well に 2ml ずつ加え、炭酸ガス培養器に移

して使用するまで培養する。

工程管理項目：細胞密度：70%以上

角膜輪部上皮細胞培養開始工程

ステップ 1

角膜の搬入・運搬

ドナー角膜輪部を本施設に搬入する。角膜の搬入に先立ち、ドナー角膜の品質を確認するための手続きに関する手順書(KVPC-PMFOPH01-005)に従ってドナースクリーニング情報を確認し施設内の管理番号を付番する。付番した容器を施設内へ搬入する。管理番号を確認し、ドナー角膜から角膜輪部上皮細胞培養開始工程に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-023)の搬入方法に従って、細胞調整室(P2ルーム1)まで運搬する。

工程管理項目：管理番号の付番(ロット構成に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-009)参照)：管理番号の確認

ステップ 2

ドナー角膜輪部上皮細胞培養開始

主要機器：安全キャビネット(BSC01/P2ルーム1)、炭酸ガス培養器(MC01またはMC02/P2ルーム1)

ドナー角膜から角膜輪部上皮細胞培養開始工程に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-023)の培養開始方法に従って培養を開始する。採取した角膜輪部上皮細胞は細胞数が20万個以上で、かつViabilityが50%以上のものを適正として使用する。培養開始に先立ち、培養輪部上皮培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-012)に従って、培地の調整を行う。培地調整作業が終了した後に、細胞調整室でドナー角膜の入った容器を受け取り、ドナー角膜から角膜輪部上皮細胞培養開始工程記録表(様式 023)を参考にしながら作業を行う。培養は準備工程の(KVPC-PMFOPH01-004)Fibrin coat well 作成に関する手順書に従って作成したFibrin coat well と、MASC 培養工程の(KVPC-PMFOPH01-014)MASC マイトマイシ C 処理操作に関する手順書に従って準備したマイトマイシ C 処理済み MASC を用いて培養を開始する。

工程管理項目：ドナー角膜保存液に対する培地無菌試験(JP)、エンドトキシン試験(JP)、マイクロプラズマ検査、ウイルス検査(HIV、HBV、HCV、HTLVプロウイルス、ヒトパルボウイルスB19)。

角膜輪部上皮細胞培養工程

主要機器：安全キャビネット(BSC01/P2ルーム1)、炭酸ガス培養器(MC01またはMC02/P2ルーム1)

角膜輪部上皮細胞培養は炭酸ガス培養器内で2週間±2日とする。培地の交換は培養輪部上皮培地調整に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-012)に従って作成した培地を用いて培地交換を行う。1週間目は2日おきの交換とし、2週間目は毎日の交換とす

る。また、培養開始から 1 週間後、マイトマイシン C 処理した MASC 交換に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-025) に従ってマイトマイシン C 処理した MASC の交換をおこなう。

工程管理項目：培養 7 日目における細胞培養上清（重要中間体）の培地無菌試験 (JP)、エンドトキシン試験 (JP)、マイコプラズマ検査、ウイルス検査 (HIV、HBV、HCV、HTLV プロウイルス、ヒトパルボウイルス B19)。

上皮シート回収・包装・出荷工程

主要機器：安全キャビネット (BSC01/P2 ルーム 1)

完成した上皮シートは規格および試験方法に従って合否の判定を行い、合格した上皮シートは角膜上皮シート回収に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-026) に従って回収する。回収した上皮シートは角膜上皮シート包装に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-027) に従って包装したものを施設内からの搬出を行う。

工程管理項目：合否判定試験、

出荷直前の細胞培養上清の無菌試験 (JP)、エンドトキシン試験 (JP)、マイコプラズマ検査、ウイルス検査 (HIV、HBV、HCV、HTLV プロウイルス、ヒトパルボウイルス B19)。

血清アルブミン濃度測定試験

2.3.S.2.3 原材料の管理

1. 現約の製造に使用される原材料

ヒト角膜輪部上皮シート製造に使用される原材料は品質試験された所内基準合格品を使用する。表 2.3.S.3-1 に、各原材料とそれが使用される工程及びその品質規格を示す。

表 2.3.S.3-1

原材料	使用工程	品質規格
ドナー角膜輪部組織	角膜輪部上皮細胞培養開始工程	供給元規格
MASC	MASC 培養工程	供給元規格
D-MEM/F-12	角膜輪部上皮細胞培養開始工程 角膜輪部上皮細胞培養工程	供給元規格
Penicillin-Streptomycin, liquid	MASC 培養工程 角膜輪部上皮細胞培養開始工程 角膜輪部上皮細胞培養工程	供給元規格
Recombinant human EGF 溶液	角膜輪部上皮細胞培養開始工程 角膜輪部上皮細胞培養工程	供給元規格
Recombinant human Insulin 溶液	角膜輪部上皮細胞培養開始工程 角膜輪部上皮細胞培養工程	供給元規格
PBS	準備工程	供給元規格

	MASC 培養工程	
Dispase II	角膜輪部上皮細胞培養開始工程	供給元規格
α-MEM	MASC 培養工程	供給元規格
FCS	MASC 培養工程	供給元規格
0.02%EDTA	角膜輪部上皮細胞培養開始工程	供給元規格
脱イオン蒸留水 (H ₂ O)	準備工程	供給元規格
フィブリノゲン加第 13 因子	準備工程	供給元規格
塩化カルシウム溶液	準備工程	供給元規格
生理食塩水	準備工程	日本薬局方
アプロチン	角膜輪部上皮細胞培養開始工程 角膜輪部上皮細胞培養工程	供給元規格

ヒト由来の輪部組織は慶応義塾大学眼球銀行医学基準に従ってウイルス及び感染症の有無がチェックされる。また、MASC 細胞は供給元で病原性の感染についてスクリーニングされていると同時に当施設において受け入れ時 (KVPC-PMFOPH01-06) MASC 細胞の品質を確認するための手続きに関する手順書に従って品質の確認を行う。

DMEM/F12, Penicillin-Streptomycin liquid, α-MEM, Recombinant human EGF, Insulin, PBS, Dispase II, 0.02%EDTA, 脱イオン蒸留水 (H₂O), フィブリノゲン加第 13 因子, アプロチンは供給元よりその安全性を証明する書類を入手し、GMP に遵守した製品であることを確認する。FCS は供給元よりその安全性を証明する書類を入手するとともに、牛海綿状脳症など未知のウイルス感染の可能性を最小限にするため、発生していないオーストラリア産のものをを用いる。

2. 生物起源の原材料の管理

ヒト角膜輪部上皮シート製造に使用される原材料のうち、ヒトまたは動物に由来するものを表 2.3.S.2.3-2 に示す。

表 2.3.S.2.3-2

原材料	由来	使用される工程
ヒト角膜輪部組織	ヒト	角膜輪部上皮細胞培養開始工程
MASC		MASC 培養工程
Recombinant human EGF 溶液	ヒト	角膜輪部上皮細胞培養開始工程 角膜輪部上皮細胞培養工程
Recombinant human Insulin 溶液	ヒト	角膜輪部上皮細胞培養開始工程 角膜輪部上皮細胞培養工程
FCS	ウシ	MASC 培養工程
フィブリノゲン加第 13 因子	ヒト	準備工程

アプロチニン	ウシ	角膜輪部上皮細胞培養開始工程 角膜輪部上皮細胞培養工程
--------	----	--------------------------------

3. 培地及び緩衝液の組成

ヒ角膜輪部上皮シート製造で使用される培地の組成について表 2.3.S.2.3-3 に示す。

表 2.3.S.2.3-3

名称	添加物	最終濃度
MASC の培地	α-MEM	45ml
	Penicillin-Streptomycin, liquid	100unit/ml-100µg/ml
	FCS	5ml
MASC マイトマイシン処理用の培地	α-MEM	45ml
	Penicillin-Streptomycin, liquid	100unit/ml-100µg/ml
	FCS	5ml
	MitomycinC	4µg/ml
輪部上皮細胞培養の培地	D-MEM/F-12	45ml
	Human recombinant EGF	10ng/ml
	Human recombinant Insulin	5µg/ml
	Penicillin-Streptomycin, liquid	100unit/ml-100µg/ml
	FCS	2ml
	aprotinin	150 KIU/ml

Invitorgen 社製品はすべて cGMP に基づいて製造されており、α-MEM ならびに DMEM/F12 は GMP 対応の製品である。また、その Certificate of Analysis により適合性が確認されている。培地の適合条件はエンドトキシン含有量が適合範囲内であること、無菌試験に合格していること、pH が適合範囲内であることが満たされていることである。

2.3.S.2.4 重要工程及び重要中間体の管理

1. 重要工程

ヒ角膜輪部上皮シート製造の工程のうち、準備工程、MASC の培養工程、角膜輪部上皮細胞培養開始工程、角膜輪部上皮細胞培養工程を重要工程と設定した。重要工程と判断した理由を合わせて示す。

1) 準備工程

培養の成否に大きな影響を与える原材料の分注・作成工程であり、無菌管理に特に注意を払うべき工程のため、重要工程と設定した。

2) MASC の培養工程

培養の成否に大きな影響を与える MASC 細胞の培養工程であり、角膜輪部上皮細胞を培養・増殖させるのに欠かせない工程であるため、重要工程と設定した。

3) 角膜輪部上皮細胞培養開始工程、角膜輪部上皮細胞培養工程

これらの工程は細胞の品質に関わる角膜輪部上皮細胞を回収・培養・増殖そして重層化させる工程であることと無菌管理に特に注意を払うべき工程のため重要工程と設定した。

2. 重要中間体

角膜輪部上皮シート製造の工程のうち、以下を重要中間体と設定した。重要中間体と判断した理由及び工程内試験ならびに保存条件を合わせて示す。

角膜輪部上皮培養工程にて作成される培地(培養液)

(1) 重要中間体と判断した理由

培養における主成分であり、滅菌濾過による無毒化を行って工程内管理を行うことにより、重要中間体と設定した。

(2) 工程内試験および保存条件

工程内試験:無菌検査(細菌(好気性、嫌気性)、真菌)、ウイルス検査(HCV(リアルタイム PCR)、HBV、HIV-1RNA 定量、HTLV-I(ALTV)プロウイルス DNA、パルボウイルス(B19))、エンドトキシン検査、マイコプラズマ検査をすること。

保存条件:短期(1~2日)で5℃の薬用保冷庫保存とする。

2.3.S.3 特性

2.3.S.3.1 構成及び特性

1. 構成

角膜輪部上皮由来の重層化した角膜上皮シートである。増殖可能な角膜上皮の幹細胞/前駆細胞を含んでおり、移植した眼表面で長期にわたり上皮細胞の供給が期待される上皮シートである。

2. 特性

上皮マーカーとしてケラチン 3/12 が陽性であり、2層以上に重層化した上皮シートである。

2.3.S.4 原薬の管理

2.3.S.4.1 規格及び試験方法

試験項目名	試験方法名	規格値/適否判定基準
-------	-------	------------

性状	形態観察	敷石状形態であり、細胞欠損域がある場合は不可
	細胞層数測定。	細胞が重層する。
定量	細胞密度測定。	2,000 個/mm ² 以上
確認試験	ケラチン 3/12 の免疫染色	ケラチン 3/12 に染色される。
生細胞率	色素排除法	生細胞率 80%以上である。
微生物検査	細菌検査、真菌検査、ウイルス検査、エンドトキシン検査、マイコプラズマ検査	細菌陰性、真菌陰性、ウイルス陰性、エンドトキシン 25 EU/ml 以下、マイコプラズマ陰性
牛血清濃度	アルブミン濃度測定	0.4µg/ml 以下

2.3.S.4.2 試験方法

1. 性状

細胞を敷き詰めた敷石状の上皮シートであり、細胞欠損域のないことを形態観察により確認する。また、同じロットの上皮シートから凍結切片を作成して角膜上皮シート中の細胞層を測定し、2層以上であることを確認する。

2. 定量

角膜上皮シート中の細胞密度を測定し、2,000 個/mm² 以上であることを確認する。

3. 確認試験

同じロットの上皮シートを凍結包埋し、組織切片を作成後ケラチン 3/12 の免疫染色により重層化した上皮シートが染色されることを確認する。

4. 生細胞率

同じロットの上皮シートを用いて色素排除法により生細胞率を測定する。80%以上であることを確認する。

5. 微生物検査

培養液を採取し、上記の検査を検査機関へ依頼する。

6. 牛血清濃度

輸送容器中の培養液を採取し、牛アルブミンELISA測定キット（BETHYL社）を使って牛アルブミン濃度を測定する。

MASC細胞のロット変更時やその他試薬の変更等、SOP変更の際は製品を作成し、以上の規格に適合している事を確認する。

2.3.S.4.3 試験方法のバリデーション

各試験法の特異性、真度、併行精度、室内再現精度、直線性、範囲に関するバリデーションパラメータの検討を行う。

1. 定量

特異性	
真度	
併行精度	
室内再現精度	
直線性	
範囲	

2. 確認試験

特異性	
真度	
併行精度	
室内再現精度	
直線性	
範囲	

3. Viability

特異性	
真度	
併行精度	
室内再現精度	
直線性	
範囲	

2.3.S.4.4 ロット分析

2.3.S.4.5 規格及び試験方法の妥当性

2.3.S.5 標準品又は標準物質

本製品は新規製品であるため、標準品は存在しなかった。

2.3.S.6 容器及び施栓系

本製品の容器はポシヨムジヤパン製ビューイングチャンバー(IVC-12)である。材質は容器・栓ともにメタクリル酸メチル樹脂(PMMA)である。

I.別紙

⑤ 作業手順書

作業手順書 KVPC-PMFOPH01-001 から-016、-021、-023 から-025、-028 を以下に添付する。
なお、KVPC-PMFOPH01-017 から-020、-022、-26、-027 は欠番である。

I. 別紙

⑤作業手順書

KVPC-PMFOPH01-001：原材料の分注および管理に関する手順書

目次

No. 内容

表紙、変更履歴

目次

1. 目的
2. 適応範囲
3. 責任体制
4. 遵守事項
5. 作業者の分担範囲
6. 使用するもの
7. 原材料分注および管理工程の手順
8. 指図記録書の保管
9. SOP 逸脱時の対応
10. 関連する書類

1. 目的

品質マニュアル (KVPC-QM-01)、製造管理基準書 (KVPC-P-00)、衛生管理基準書 (KVPC-H-00) および角膜上皮シート製品標準書 (KVPC-PMFOPH-01) に基づき、原材料の分注および管理工程の手順を定める。

2. 適応範囲

品質マニュアル・衛生管理基準書に従って、CPC 内で作業する従事者に本手順書を適用する。本手順書においては、CPC とは Keio Vector Processing Center (KVPC)を指す。

3. 責任体制

品質マニュアルに定めるように、Project 責任者が製造部門責任者および品質部門責任者を監督し、製造部門責任者が指示記録書の発行および製造記録の作成に責任と権限を有し、品質管理者が試験結果判定の責任と権限を有する。

4. 遵守事項

品質マニュアル・衛生管理基準書を遵守する。

5. 作業者の分担範囲

作業工程は、作業担当者と記録担当者の 2 人 1 組で行う。作業担当者と記録担当者は日に