

よって担当を替えても良い。ただし、無菌性を担保するため、P2ルーム1入室していったん作業を開始した後は、P2ルーム1を退室するまで担当を変更してはならない。

作業担当者は、安全キャビネット内の作業を第一義的に行う。無菌性を担保するため、作業担当者は安全キャビネット起動時に浮遊菌検査を開始し、作業終了後に手指の付着菌検査を実施する。また、安全キャビネット外の物品および滅菌されていないものに触れた場合には、エタノールにより手指を消毒すること。

記録担当者は、指図記録書への記録、および安全キャビネット外に限った作業補助を行う。記録担当者は安全キャビネット内にいかなる部分も入れてはならない。

物品の準備、エタノール噴霧、滅菌不織布による清拭、ラベル添付は手指の汚染を招くため、安全キャビネット外で記録担当者が行う。

6. 使用するもの

本工程においては、角膜上皮シート製品標準書で定められた物品を用い、本手順書で指定された手順に従って使用する。物品の詳細は指図記録書 KVPC-PMFOPH01-001-R01 から R029 に記載する。

本手順書では作業の概略を記載し、詳細は指図記録書 KVPC-PMFOPH01-001-R01 から R029 に記載する。

7. 培養上皮および MASC の培地原材料分注および管理工程の手順

- ・ 居室での指図記録書印刷
- ・ 本工程の指図記録書および MASC 凍結細胞から培養開始工程の指図記録書をクリーンルーム用印刷用紙に印刷後、オートクレーブ滅菌する。
- ・ 指図指示書、2次更衣、浮遊菌付着菌検査用培地、廃棄用オートクレーブバック、およびその他の必要品のサブライ室への持ち込み
 - ① エントランスで手指洗浄後、手袋を着用して上記必要品類をエタノール噴霧しながらパストボックスに入れる。(KVPC-PMFOPH01-003)物品の搬入搬出に関する手順書に従うこと。
- ・ サブライ室への入室
 - ① 1次更衣に着替え、サブライ室に入室する。
- ・ ラベルの印刷
 - ① 細胞保存室に移動し、必要となるラベルを、サコート EX システムを用いて印刷する
- ・ 必要品の持ち込み
 - ① 必要品を (KVPC-PMFOPH01-003)物品の搬入搬出に関する手順書に従って P1ルーム1に搬入する。
- ・ P2ルーム1での安全キャビネット立ち上げ
 - ① 安全キャビネットの UV ランプを消灯し、照明及びフローのスイッチを入れる。
 - ② 浮遊菌検査用培地を左右2箇所置き、培地のフタを空ける。
- ・ 分注保管作業

- ① 指図記録書に従い、作業担当者が分注保管作業を行う
- ② 取り違えを防ぐため、安全キャビネット内で同時に作業する試薬は1つまでとする。このため、分注した試薬を冷蔵あるいは冷凍した後に、別の試薬を調整する。ただし、融解等に時間のかかるものについては、作業効率化を図るために安全キャビネット外で融解等を行い、待ち時間の間に安全キャビネット内で別試薬の調整を行ってもよい。
- ③ 恒温槽などで試薬を融解する場合、作業担当者の手指の汚染を防ぐため、記録担当者が融解作業を安全キャビネット外で行う。

・ 退室

- ① 作業担当者は左右手指及び安全キャビネット中央の付着菌検査を行ったのち、安全キャビネットの前面ガラスドアを閉めてグローを切り、安全キャビネットの UV ランプを点灯する。
- ② 記録担当者はゴミを回収した後、P2 ルーム 1 で体が触れた場所をエタノールおよび不織布で清拭し、無菌検査用の培地と共に退室する。
- ③ 作業担当者は P2 ルーム 1 の床をエタノールおよび不織布で清拭したのち、退室する。
- ④ 作業担当者はゴミをオートクレーブにかけた後、前室を退室する。

6. 指図記録書の保管

記録済みの指図記録書は、製造工程責任者が承認し、品質管理責任者が確認した後、保管ファイルに 10 年間保管する。

7. SOP 逸脱時の対応

SOP 逸脱時の手続きに関する手順書に従い、逸脱報告書に必要な事項を記載し、品質管理者に報告する。

8. 関連する書類

品質マニュアル (KVPC-QM-01)、衛生管理基準書 (KVPC-H-00)、角膜上皮シート製品標準書 (KVPC-PMFOPH-01)、原材料分注および管理工程指図記録書 (KVPC-PMFOPH-01-001-01-R01 から-R29)

I. 別紙

⑤作業手順書

KVPC-PMFOPH01-002：角膜上皮シートの品質確認手続きに関する手順書

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. 角膜上皮シートの品質確認項目
6. 角膜上皮シートの品質確認に関する工程作業と文書体系
7. 角膜上皮シートの出荷前判定と出荷後判定
 - 7.1. 出荷前判定と出荷判定書
 - 7.2. 出荷後判定と製品試験成績書
8. 角膜上皮シートの品質確認手続き
 - 8.1. 性状試験：形態観察手順
 - 8.2. 性状試験：細胞層数測定手順
 - 8.3. 定量試験：細胞密度測定手順
 - 8.4. 確認試験：ケラチン 3/12 免疫染色手順
 - 8.5. 生細胞率測定手順
 - 8.6. 微生物検査手順
 - 8.7. カシ血清濃度測定手順
9. 品質検査書の保管
10. SOP 逸脱時の対応
11. 関連する書類

1. 目的

品質マニュアル・衛生管理基準書に基づき、角膜上皮シートの品質を確認するための手続きに関する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 内外で角膜上皮シート作成に従事する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、製造記録の作成、原材料の保管管理、出納、ならびにその記録に対して責任と権限を有し、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. 角膜上皮シートの品質確認項目

角膜上皮シート製品標準書 (KVPC-PMFOPH01) に基づき、角膜上皮シートの品質を性状試験 (形態観察、細胞層数測定)、定量試験 (細胞密度測定)、確認試験 (ケラチン 3/12 の免疫染色)、生細胞率 (色素排除法)、微生物検査 (細菌検査、真菌検査、マイコプラズマ検査、ウイルス検査、エンドトキシン検査)、ウシ血清濃度検査で確認する。

6. 角膜上皮シートの品質確認に関する文書体系

角膜上皮シートの品質確認に関する工程作業、およびそれに対応する文書体系は、付図 1 のとおりである。

7. 角膜上皮シートの出荷前判定と出荷後判定

・ 出荷前判定：出荷前に判定を行い、出荷判定書を作成する。

① 実施時期：出荷前判定は培養 13 日目に行う。

② 適否判定基準：出荷時に検体を採取する項目を除く全ての項目が許容値以内である場合、製品を出荷前判定合格とする。但し、上皮培養 1 週目の微生物検査など試験結果が出荷前判定日に間に合わない項目は、途中経過を判定に用いる。

③ 出荷判定書の作成手順：

1. 出荷判定書 KVPC-PMFOPH01-002-R02 を印刷する。

2. 各品質確認試験の結果を記入する。

3. 品質管理責任者が出荷判定基準に従い出荷判定を行い、所定位置に品質管理責任者の名前及び出荷日を自書する。

4. 出荷判定書のコピーを作成し、製品に添付するか、あるいは事前にプロジェクト責任者に提出する。

・ 出荷後判定：全ての検査の終了を持って出荷後判定を行い、製品の試験成績書を作成する。

① 適否判定基準：全ての項目が許容値以内である場合、製品の角膜上皮シートを合格とする。

② 試験成績書の作成手順：

1. 製品の試験成績書 KVPC-PMFOPH01-002-R01 を印刷する。

2. 各品質確認試験の結果を記入する。

3. 試験成績書のコピーを作成し、プロジェクト責任者に提出する。

8. 角膜上皮シートの各品質確認試験の手続き

・ 性状試験：形態観察手順

- ① 日程：形態観察は培地交換ごとに行う。
- ② 適否判定基準：敷石状形態であり、細胞欠損域がないこと。
- ③ 方法：倒立顕微鏡を用いて目視にて形態及び細胞欠損域の有無を確認する。指図記録書に目視結果を記録するとともに、デジタルカメラを用いて顕微鏡写真を撮影し、JPEG形式で保存する。撮影倍率は対物4倍および20倍とし、細胞を撮影する前に対照として対物マイクロメーターを撮影する。
- ④ 記録保存手順：撮影した全ての顕微鏡写真は電子ファイル名として保存する。

・ 性状試験：細胞層数測定手順

- ① 日程：培養12日目。
- ② 適否判定基準：細胞が重層すること。
- ③ 測定手順：同一ロットの上皮シート1枚を回収、凍結切片を作成して核染色にて重層を確認する。詳細は確認試験：ケラチン3/12免疫染色手順を参照のこと。
- ④ 記録保存手順：撮影した全ての顕微鏡写真は電子ファイルとして保存する。

・ 定量試験：細胞密度測定手順

- ① 日程：培養12日目撮影、培養13日目判定。
- ② 適否判定基準：細胞密度が2000個/mm²以上であること。
 1. 撮影手順：顕微鏡を用いて、対物20倍で対物マイクロメーターを撮影した後、上皮シート基底層をデジタルカメラで撮影し、JPEG形式で保存する。
- ③ 測定手順：詳細は指図記録書KVPC-PMFOPH01-002-R07に記載する。具体的には、細胞の倒立顕微鏡写真から100umx100umの範囲の細胞数をカウントし、これを100倍して1mm²あたりの細胞数を求める。
 1. 記録保存手順：全ての画像を電子ファイルとして保存する。また細胞測定後に加工した顕微鏡写真を撮影日、電子ファイル名、上皮シートの番号がわかるようポイントファイルに貼り付けてA4サイズでプリントアウトし、作成者のサイン、確認者のサイン、承認者のサインを記入する。画像の電子ファイル、プリントアウトした顕微鏡写真、指図記録書とともに、製造工程責任者が承認し、品質管理責任者が確認した後、保管ファイルに10年間保管する。

・ 確認試験：ケラチン3/12免疫染色手順

- ① 日程：培養12日目上皮シート凍結、培養13日目凍結切片作成、免疫染色
- ② 前提：性状試験（細胞層数測定）仮判定に合格していること。
- ③ 適否判定手順：ケラチン3/12陽性であること。

- ④ 陽性対照：ドナー角膜中央部
- ⑤ 染色方法：詳細は指図記録書 KVPC-PMFOPH01-002-R05 に記載する。
- ⑥ 記録保存手順：撮影した全ての顕微鏡写真は電子ファイルとして保存する。また、顕微鏡写真を見やすいよう撮影日および上皮シートの番号とともにパワーポイントファイルに貼り付け、A4 サイズでプリントアウトして作成者のサイン、確認者のサイン、承認者のサインを記入する。画像の電子ファイル、プリントアウトした顕微鏡写真、指図記録書とともに、製造工程責任者が承認し、品質管理責任者が確認した後、保管ファイルに 10 年間保管する。

・ 生細胞率測定手順

- ① 日程：培養 12 日目
- ② 前提：性状試験（細胞層数測定）仮判定に合格していること。
- ③ 適否判定手順：生細胞率が 50%以上であること。
- ④ 手順：確認試験（本手順書 7.4.）で用いる上皮シートの一部を、生細胞率測定にも用いる。
 1. 本手順書 7.4.5.1 から 7.4.5.6 まで述べた手順で、KVPC から眼科研究室に無菌的に移動した上皮シートの一部を 6 mm 径トリパンで 2 枚打ち抜く。
 2. 培地を取り除くため、打ち抜いた残りの上皮シートを、滅菌 PBS を用意した 60 mm ディッシュに移す。2 回繰り返す。
 3. 上皮シートを TrypLE Express (Invitrogen (Life technologies), 5 ml) を用意した 50 ml 遠心管に移し、37 度で 10 分処理する。
 4. 5ml の上皮用培地を添加し、ピペティングして細胞を剥離する。
 5. 上皮シートに付属していたセルカチャーシートを取り除く。
 6. 4 °C, 1500rpm, 5 min で遠心する。
 7. 上清を除去し、1ml の上皮用培地に再懸濁する。
 8. 細胞懸濁液 10 μ l を採取してトリパンブルー 10 μ l と混合する。
 9. 細胞の入った血球計算板の顕微鏡像をデジタルカメラで撮影する。後にその撮影画像を用いて細胞数が計算できるように、血球計算板の 9 視野が収まるよう撮影すること。
 10. 細胞数を血球計算板を用いて測定し、指図記録書に記録する。

・ 微生物検査手順

- ① 日程：MASC 交換時（培養 7 日目）および出荷当日
- ② 内容：上皮細胞培養上清を検体とし、細菌検査（好気性、嫌気性、真菌、マイコプラズマ）、エンドトキシン検査、ウイルス検査（HCV, HBV, HIV-1, HTLV-1 プロウイルス, パルボウイルス）を行う。
- ③ 適否判定基準：細菌検査（好気性、嫌気性、真菌、マイコプラズマ）陰性、ウイルス検査（HCV, HBV, HIV-1, HTLV-1 プロウイルス, パルボウイルス）陰性、エンドトキシン 25 EU/ml 以下とする。
- ④ 微生物検査の手続き：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) および角膜上皮シート回収・包装・出荷に関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-007) に掲げる手順で検体 9ml を採取し、うち 8.5ml を微生物検査委託手続きに関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-008) に掲げる手順で検査委託し、残り 0.5ml を再検査用に細胞保存室-150℃超低温フリーザー-FR05 で凍結保存する。

・ ウィ血清濃度測定手順

- ① 日程：出荷当日以降
- ② 検査法：検査法には ELISA を用い、ELISA キットにはウシアブシ ELISA 定量セット (BETHYL 社) を用いる。
- ③ 適否判定基準：0.4 µg/ml 以下
- ④ 方法：キット付属のプロトコルに従う
- ⑤ 記録：吸光度計で測定したオリジナルデータおよび計算後のデータを共にプリントアウトして添付文書として保存すると共に、電子データとして CD-R で保存する。

9. 品質検査書の保管

全ての項目を記録した品質検査書は、製造工程責任者が承認し、品質管理責任者が確認した後、コピーを一部作成し、原本を KVPC が、コピーを慶應義塾大学眼科学教室が 10 年間保管する。

10. SOP 逸脱時の対応

SOP 逸脱時の手続きに関する手順書に従い、逸脱報告書に必要な事項を記載し、品質管理者に報告する。

11. 関連する書類

品質マニュアル(KVPC-QM)、製造管理基準書 (KVPC-P)、品質管理基準書 (KVPC-Q)、上皮シート製品標準書 (KVPC-PMFOPH01)

I. 別紙

⑤作業手順書

KVPC-PMFOPH01-003：物品の搬入搬出に関する手順書

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. 使用するもの
6. CPC への物品の搬入搬出の概要
7. 搬入手順
 - ① 通常の搬入手順
 - ① エントランス室からの物品の搬入の手順
 - ② サプライ室での物品の受け取り
 - ③ 前室から P1 ルーム 1 への物品の搬入
 - ④ P1 ルーム 1 での物品の受け取り
 - ② 搬入する物品が凍結 MASC 細胞である場合
 - ③ 搬入する物品がドナー角膜組織である場合
8. 搬出手順
 - ④ 通常の搬出手順
 - ⑤ 搬出される物品が角膜上皮シートである場合
 - ⑥ 搬出される物品が検体である場合
9. 参考文献
10. SOP 逸脱時の対応
11. 関連する書類

1. 目的

品質マニュアル・衛生管理基準書に基づき、CPC の物品の搬入搬出の手順を定める。本手順書においては、CPC とは Keio Vector Processing Center (KVPC)を指す。

2. 適応範囲

品質マニュアル・衛生管理基準書に従って、CPC 内で作業に用いる物品を搬入搬出する全ての者に本手順書を適用する。

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、製造記録の作成、原材料の保管管理、出納、なら

びにその記録に対して責任と権限を有し、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. 使用するもの

- ・ コミの廃棄では以下の物品を用い、本手順書で指定された手順に従ってこれらを使用する。
 - ・ 消毒用 70%エタノール
 - ・ エタノール用スプレー
 - ・ クリーンルーム用織布
 - ・ 物品搬入かご

6. CPC への物品の搬入搬出の概要

- ・CPC 内での物品の移動は、物品移動に伴う空気の汚染を防ぐため、衛生管理基準書に定められた動線を遵守しなければならない。
- ・外部から CPC 内部へ物品を搬入する際は、原則としてパースボックスを通じて紫外線照射を行う。
- ・パースボックスの紫外線ランプは常時点灯させておく。
- ・パースボックスのドアは片側が開いているときには、反対側のドアは開くことはできない。
- ・パースボックス内に同じ物品を 24 時間以上とどめてはならない。
- ・材質表面から浮遊塵埃が生ずるような物品(段ボール等)は持ち込まないこととする。
- ・搬入物品は外部包装を消毒用エタノールで表面を清拭し、破損がないことを確認する。
- ・パースボックスに入らない大きさの物品類は消毒用エタノールで表面を清拭し、通路から搬入する。

7. 搬入の手順

・ 通常の搬入手順

① エントランス室からの物品の搬入手順

1. 外部から搬入された物品が段ボールに梱包されている場合、段ボールから物品を出す。
2. 物品を消毒用エタノールをしみ込ませたクリーンルーム用不織布で清拭する。
3. 物品をパースボックスに投入する前に、パースボックスのドア、ドアノブを消毒用アルコールを用いて清拭し、ドアを開け内部も消毒用アルコールを用いて清拭する。
4. 清拭済みの物品を投入し、ドアを閉める。
5. 紫外線ランプが点灯していることを確認する。このとき完全にドアが閉まっていなないと紫外線ランプは点灯しない。

② サプライ室での物品の受け取り

1. パースボックスのドア、ドアノブを消毒用アルコールを用いて清拭した後、ドアを開いて物品を取り出す。
2. ドアを完全に閉め、紫外線ランプが点灯していることを確認する。このとき完全にドアが閉まっていなないと紫外線ランプは点灯しない。

3. 搬入した物品を適宜、冷蔵庫・冷凍庫・物品棚等に移動し保管する。
- ③ 前室から P2 ルーム 1 への物品の搬入
 1. 物品を消毒用エタノールをしみ込ませたクリーンルーム用不織布で清拭する。搬入する物品が、すでにサブライ室に搬入する際に清拭された物品である場合、清拭は行わず、表面に消毒用アルコールを噴霧するだけでよい。
 2. 物品をパストボックスに投入する前に、パストボックスのドア、ドアノブを消毒用アルコールを用いて清拭し、ドアを開け内部も消毒用アルコールを用いて清拭する。
 3. 清拭済みの物品を投入し、ドアを閉める。
 4. 紫外線ランプが点灯していることを確認する。このとき完全にドアが閉まっていないと紫外線ランプは点灯しない。
- ④ P1 ルーム 1 での物品の受け取り
 1. パストボックスのドア、ドアノブを消毒用アルコールを用いて清拭した後、ドアを開いて物品を取り出す。
 2. ドアを完全に閉め、紫外線ランプが点灯していることを確認する。このとき完全にドアが閉まっていないと紫外線ランプは点灯しない。

・ 搬入する物品が凍結 MASC 細胞である場合

- ① MASC 細胞の品質確認手続き (KVPC-PMFOPH01-006) に従い、MASC 細胞に添付されるドナースクリーニング情報にて、微生物検査について許容値以下であることを確認する。
- ② 小型のステンレス製デュービン (D-1000、池本理化工業など) の容器内外、および細胞を取り出すための大型ステンレス製ピペットを、消毒用エタノールをしみ込ませたクリーンルーム用不織布で清拭する。
- ③ 液体窒素をデュービンに 6 割ほど移し、凍結 MASC 細胞をケーンごとデュービンの中に移動させる。
- ④ デュービンおよび大型ピペットをパストボックスを通してサブライ室に搬入する。細胞が UV に当たることを避けるため、消毒用エタノールで滅菌したアルミホイル等で遮光すること。このとき、液体窒素の爆発的な飛散事故を避けるため液体窒素の入ったデュービンは絶対に密閉しないこと。
- ⑤ 細胞保存室に移動し、サコート EX システムを用いて入庫処理を行う。4 桁のコード名は MASC とし、ラベルは細胞本数+2 枚を印刷し、ラベルを細胞、細胞を纏めて保存する容器、および指図記録書に貼り付ける。細胞をラベルする際は、そのラベルを貼り付けた後も、もともと貼られていたラベルあるいは情報が読めるように留意すること。

・ 搬入する物品がドナー角膜組織である場合

- ① ドナー角膜輪部組織の品質確認手順書 (KVPC-PMFOPH01-005) に従い、角膜添付のドナースクリーニング情報を用いてドナーの安全性を確認、記録する。

- ② ドナー角膜組織の入った容器を消毒用エタノールをしみ込ませたグリーンルーム用不織布でよく清拭したのち、遮光容器に入れる。
- ③ 通常の搬入手順に従い搬入する。ただし、なるべく早く P2 ルーム 1 に移動させること。
- ④ 遮光容器からドナー角膜容器を取り出し、消毒用エタノールでドナー角膜容器をよく清拭した後、使用するまで FR03 冷蔵庫へ保存する。入庫時間を記録する。

8. 搬出手順

・ 通常の搬出手順

- ① 物品をパースボックスに投入する前に、パースボックスのドア、ドアノブを消毒用アルコールを用いて清拭し、ドアを開け内部も消毒用アルコールを用いて清拭する。
- ② 清拭済みの物品を投入し、ドアを閉める。
- ③ 紫外線ランプが点灯していることを確認する。このとき完全にドアが閉まっていないと紫外線ランプは点灯しない。
- ④ 前室側で、パースボックスのドア、ドアノブを消毒用アルコールを用いて清拭した後、ドアを開いて物品を取り出す。
- ⑤ ドアを完全に閉め、紫外線ランプが点灯していることを確認する。このとき完全にドアが閉まっていないと紫外線ランプは点灯しない。

・ 搬出される物品が角膜上皮シートである場合：角膜上皮シート回収・包装・出荷に関する手順書（PVPC-PMFOPH01-007）に従い、以下の手順で搬出する。

- ① 角膜上皮シートを輸送用チャンバーに入れ、これを小型の滅菌済み金属性遮光容器に入れ、更に大型の滅菌済み金属性遮光容器に入れる。
- ② 作業員 1 が P2 ルーム 1 から前室のパースボックス前に移動する
- ③ 作業員 2 がパースボックスのドア、ドアノブを消毒用アルコールを用いて清拭した後、ドアを開け内部も消毒用アルコールを用いて清拭する。
- ④ 作業員 2 がパースボックス内に角膜上皮シートを投入して、ドアを閉める。
- ⑤ 作業員 1 はパースボックスの P2 ルーム 1 側のドアが完全に閉まったのち、直ちに前室側のドアを開けて角膜上皮シートを受け取り、サブライ室に移動する。
- ⑥ 作業員 2 が P2 ルーム 1 からエントランス室パースボックス前まで移動する。
- ⑦ 作業員 1 がパースボックスのドア、ドアノブを消毒用アルコールを用いて清拭した後、ドアを開け内部も消毒用アルコールを用いて清拭する。
- ⑧ 作業員 1 がパースボックス内に角膜上皮シートを投入して、ドアを閉める。
- ⑨ 作業員 2 はパースボックスのドアが完全に閉まったのち、直ちにエントランス室側のドアを開けて角膜上皮シートを受け取る。
- ⑩ 作業員 2 は上皮シートをビニール袋で更に密閉した後、輸送用発泡スチロールに入れ、手術担当者に連絡する。

① 上皮シート、出荷検査書、領収書とともに手術室に移動し、手術スタッフから出荷検査書と上皮シートと引き換えに領収書にサインをもらう。

- ・ 搬出される物品が検体である場合：UV 照射を避けるため、角膜上皮シートと同じ手順で遮光しながら搬出するか、少量ならば密閉してデガウニング室経由で搬出する。

8. 参考文献

旭テクネイオン株式会社 検体管理システムソフトウェア操作マニュアル

9. SOP 逸脱時の対応

SOP 逸脱時の手続きに関する手順書に従い、逸脱報告書に必要な事項を記載し、品質管理者に報告する。

10. 関連する書類

衛生管理基準書、廃棄物の手順書、手洗いに関する手順書

I. 別紙

⑤作業手順書

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

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. Fibrin coat well 作成工程の手順
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、製造記録の作成、原材料の保管管理、出納、ならびにその記録に対して責任と権限を有し、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よって担当を替えても良い。ただし、無菌性を担保するため、P2 ルーム 1 入室していったん作

業を開始した後は、P2ルーム1を退室するまで担当を変更してはならない。

作業担当者は、安全キャビネット内の作業を第一義的に行う。無菌性を担保するため、作業担当者は安全キャビネット起動時に浮遊菌検査を開始し、作業終了後に手指の付着菌検査を実施する。また、安全キャビネット外の物品および滅菌されていないものに触れた場合には、エタノールにより手指を消毒すること。

記録担当者は、指図記録書への記録、および安全キャビネット外に限った作業補助を行う。記録担当者は安全キャビネット内にいかなる部分も入れてはならない。

物品の準備、エタノール噴霧、滅菌不織布による清拭、ラベル添付は手指の汚染を招くため、安全キャビネット外で記録担当者が行う。

6. 使用するもの

本工程では角膜上皮シート製品標準書で定められた以下のものを用い、本手順書で指定された手順に従ってこれらを使用する。物品の詳細は指図記録書 KVPC-PMFOPH01-004-R01 に記載する。

7. Fibrin coat well 作成工程の手順

本手順書では作業の概略を記載し、詳細は指図記録書 KVPC-PMFOPH01-004-R01 に記載する

- ・ 居室での指図記録書印刷
 - ① 本工程の指図記録書をクリーンルーム用印刷用紙に印刷後、オートクレーブ滅菌する。
- ・ 指図指示書、2次更衣、浮遊菌付着菌検査用培地、廃棄用オートクレーブバック、およびその他の必要品のサブライ室への持ち込み
 - ① エントランスで手指洗浄後、手袋を着用して上記必要品類をエタノール噴霧しながらパストボックスに入れる。(KVPC-PMFOPH01-003)物品の搬入搬出に関する手順書に従うこと。
- ・ サブライ室への入室
 - ① 1次更衣に着替え、サブライ室に入室する。
- ・ ラベルの印刷
 - ① 細胞保存室に移動し、必要となるラベルを、サノコード EX システムを用いて印刷する。
- ・ 必要品の持ち込み
 - ① 必要品を (KVPC-PMFOPH01-003)物品の搬入搬出に関する手順書に従って P1 ルーム 1 に搬入する。
- ・ P2 ルーム 1 での安全キャビネット立ち上げ
 - ① 安全キャビネットの UV ランプを消灯し、照明及びブローのスイッチを入れる。
 - ② 浮遊菌検査用培地を左右 2 箇所に置き、培地のフタを空ける。
- ・ 希釈用溶液（塩化カルシウム含有生理食塩水）の調整
 - ① 生理食塩水に塩化カルシウム溶液を添加し、1mM 塩化カルシウム・生理食塩水を調整する。
- ・ 希釈トロンビン溶液の調整

- ① ボルセル付属の調整キットを用い、粉末トロンビンを融解する (125 U/0.5 mL)
- ② 上記トロンビン液 50 uL を、希釈用溶液 4.1 mL に希釈する。
- ・ 希釈フィブリゲン溶液の調整
 - ① ボルセル付属の調整キットを用い、粉末フィブリゲンを融解する (0.5 mL)
 - ② 上記フィブリゲン液を、希釈用溶液 6.2 mL に希釈する。
- ・ フィブリンゲルの作成
 - ① セルチャーインサートのフタを空ける
 - ② 1000μLピペットを用いて、インサート x 1 に希釈トロンビン液を 100 uL 乗せる
 - ③ 別の 1000μLピペットを用いて、希釈フィブリン液 100 uL を希釈トロンビン液に加える。
 - ④ セルスクレイパーを用いて手早く混合し、インサート面に塗布する
 - ⑤ 以上の工程をインサートごとに繰り返す
- ・ フィブリンゲルの保存
 - ① エンバックで密閉し、冷蔵庫 FR03 に冷蔵保存する。
- ・ 退室
 - ① 作業担当者は左右手指及び安全キャビネット中央の付着菌検査を行ったのち、安全キャビネットの前面ガラスドアを閉めてブローを切り、安全キャビネットの UV ランプを点灯する。
 - ② 記録担当者はゴミを回収した後、P2 ルーム 1 で体が触れた場所をエタノールおよび不織布で清拭し、無菌検査用の培地と共に退室する。
 - ③ 作業担当者は P2 ルーム 1 の床をエタノールおよび不織布で清拭したのち、退室する。
 - ④ 作業担当者はゴミをオートクレーブにかけた後、前室を退室する。

8. 指図記録書の保管

記録済みの指図記録書は、製造工程責任者が承認し、品質管理責任者が確認した後、保管ファイルに 10 年間保管する。

9. SOP 逸脱時の対応

SOP 逸脱時の手続きに関する手順書に従い、逸脱報告書に必要な事項を記載し、品質管理者に報告する。

10. 関連する書類

品質マニュアル (KVPC-QM-01)、衛生管理基準書 (KVPC-H-00)、角膜上皮シート製品標準書 (KVPC-PMFOPH-01)、Fibrin coat well 作成工程指図記録書 (KVPC-PMFOPH01-004-01-R01)

I. 別紙

⑤作業手順書

KVPC-PMFOPH01-005：ドナー角膜輪部組織の品質確認手続きに関する手順書

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. ドナー角膜輪部組織の品質確認手順
 - ⑦ ドナー角膜のドナースクリーニング情報確認手段
 - ⑧ ドナー角膜の微生物検査試験手順
 - ⑨ ドナー角膜の細胞数および生存率測定手順
6. 品質検査書の保管
7. SOP 逸脱時の対応
8. 関連する書類

1. 目的

品質マニュアル・衛生管理基準書に基づき、ドナー角膜輪部組織の品質を確認するための手続きに関する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 内外で角膜上皮シート作成に従事する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、製造記録の作成、原材料の保管管理、出納、ならびにその記録に対して責任と権限を有し、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. ドナー角膜輪部組織の品質確認手順

ドナー角膜輪部組織の品質を確認するための手続きに関する工程作業は、付図 1:ドナー角膜輪部組

織の品質確認手続きに関する工程作業フロー図のとおり行う。

・ ドナー角膜のドナースクリーニング情報確認手順

ドナースクリーニング情報を慶應義塾大学眼球銀行のドナー選択基準に順じて確認し、以下の項目に当たる場合はドナー角膜の使用を禁忌とする。なお死因が悪性腫瘍であるドナーに関しては、以下の項目に該当しない場合でもなるべく使用を避ける。ウエストナイルウイルスに関しては、以下の項目 5.1.3 及び 5.1.5 に包括される。ドナー角膜品質確認試験成績書 KVPC-PMFOPH01-005-R01 に結果を記録する。

- ① 原因不明の死
- ② 原因不明の中枢神経系疾患
- ③ 活動性ウイルス脳炎および、原因不明の脳炎、進行性脳症
- ④ 亜急性硬化性全脳炎、進行性多巣性白質脳炎等の遅発性ウイルス感染症
- ⑤ 細菌、真菌、ウイルス性全身性活動性感染症
- ⑥ HIV 抗体、HTLV-1 抗体、HBs 抗原、HCV 抗体が陽性
- ⑦ Creutzfeldt-Jakob 病およびその疑い
- ⑧ 白血病
- ⑨ 悪性リンパ腫 (Hodgkin 病、非 Hodgkin リンパ腫)
- ⑩ Reye 症候群
- ⑪ 眼内悪性腫瘍

・ ドナー角膜の微生物検査試験手順

① 検体

検体にはドナー角膜保存液を用いる。

② 検体採取手順

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指図指示書 KVPC-PMFOPH01-023-R1 に従い検体を採取する。

③ 検体委託手順

微生物検査委託手続きに記載のとおり検体を委託する。

④ 微生物検査合格基準

微生物検査合格基準は、細菌検査 (好気性、嫌気性、真菌、マイコプラズマ) 陰性、ウイルス検査 (HCV, HBV, HIV-1, HTLV-1 プロウイルス, ハルボウイルス) 陰性、エンドトキシン 25EU/ml 以下とする。結果はドナー角膜品質確認試験成績書 KVPC-PMFOPH01-005-R01 に記録する。

・ ドナー角膜の細胞数および生存率測定手順

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 及び指図

指示書 KVPC-PMFOPH01-023-R1 に従い、角膜上皮細胞分離時の生細胞数および死細胞数を色素排除法によって計測し、同指図指示書 KVPC-PMFOPH01-023-R1 及びドナー角膜品質確認試験成績書 KVPC-PMFOPH01-005-R01 に記録する。この際、生存率 50%以上のものを適正として使用する。

6. 品質検査書の保管

全ての項目を記録したドナー角膜品質確認試験成績書 KVPC-PMFOPH01-005-R01 は、製造工程責任者が承認し、品質管理責任者が確認した後、コピーを一部作成し、原本を KVPC が、コピーを慶應義塾大学眼科学教室が 10 年間保管する。

7. SOP 逸脱時の対応

SOP 逸脱時の手続きに関する手順書に従い、逸脱報告書に必要な事項を記載し、品質管理者に報告する。

8. 関連する書類

衛生管理基準書、廃棄物の手順書、手洗いに関する手順書、ドナー角膜品質確認試験成績書 KVPC-PMFOPH01-005-R01-02、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 及び指図記録書 KVPC-PMFOPH01-023-R1

I. 別紙

⑤作業手順書

KVPC-PMFOPH01-006 : MASC 細胞の品質確認手続きに関する手順書

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. MASC 細胞の品質を確認するための手続きに関する工程の手順
 - ⑩ 品質確認手続き
 - ⑪ MASC 細胞のドナースクリーニング情報の確認
 - ⑫ MASC 細胞の微生物検査手続き
 - ① 微生物検査の対象
 - ② 微生物検査の内容
 - ③ 微生物検査検体採取法
 - ④ 微生物検査検体委託手続き
 - ⑬ MASC 細胞の生存率確認手続き
 - ⑭ MASC 細胞の細胞密度確認手続き
6. 品質確認書の保管
7. SOP 逸脱時の対応
8. 関連する書類

1. 目的

品質マニュアル・衛生管理基準書・製品標準書に基づき、MASC 細胞の品質を確認するための手続きに関する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 内外で角膜上皮シート作成に従事する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、製造記録の作成、原材料の保管管理、出納、ならびにその記録に対して責任と権限を有し、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. MASC 細胞の品質を確認するための手続きに関する工程の手順

MASC 細胞の品質を確認するための手続きに関する工程作業は、付図 1 の MASC 細胞の品質を確認するための手続きに関する工程作業フロー図に従う。

- 品質確認手続き

MASC 品質検査書をクリーンルーム用印刷用紙に印刷し、原本を KVPC 居室に保管する。以下の品質確認項目のデータが取れるごとにデータ内容、データ採取日、データ記入日、添付書番号を記入する。

- MASC 細胞のドナースクリーニング情報の確認

MASC 細胞に添付されるドナースクリーニング情報にて、微生物検査について許容値以下であることを確認し、MASC 品質検査書に記録する。

- MASC 細胞の微生物検査手続き

- ① 微生物検査の対象

MASC 細胞が初めて使用するロットの場合、あるいは検査済みロットであっても 20 本毎に、安全性を確認するために微生物検査を行う。

- ② 日程：MASC 細胞培養 2 日目、MASC マイトマイシン C 処理時に検体を採取する。

- ③ 微生物検査の内容：MASC 細胞培養上清を検体とし、細菌検査（好気性、嫌気性、真菌、マイコプラズマ）、エンドトキシン検査、ウイルス検査（HCV, HBV, HIV-1, HTLV-1 プロウイルス, パルボウイルス）を行う。

- ④ 微生物検査の適否判定基準：細菌検査（好気性、嫌気性、真菌、マイコプラズマ）陰性、ウイルス検査(HCV, HBV, HIV-1, HTLV-1 プロウイルス, パルボウイルス)陰性、エンドトキシン 25EU/ml 以下とする。

- ⑤ 微生物検査の手続き：MASC マイトマイシン C 処理に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-014)に掲げる手順で検体 12ml を採取し、うち 8.5ml を微生物検査委託手続きに関する手順書(KVPC-PMFOPH01-008)に掲げる手順で検査委託し、残り 3.5ml を再検査用に細胞保存室-150℃超低温フリーザー-FR05 で凍結保存する。

- MASC 細胞の生存率測定手続き