

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 $\mu$ l

操作管理項目:移動容器の清拭(70%エタノール)

:クリーン度の確認;使用前クラス 100、温度 25 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C

:冷蔵庫(温度 4 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C(機器指示計目視))

保存温度:ヒト血液由来 Fibrin coat well(4 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C)

#### 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 $^{\circ}$ C超低温フリーザー (FR06/細胞保存室)、-80 $^{\circ}$ C超低温フリーザー (FR05/P2 ルーム 1)、サンコート 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、サンコート 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)、サンコート 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 $^{\circ}$ C $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ C

:解凍時間; 30 秒 $\pm$ 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:CO<sub>2</sub>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: 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:CO<sub>2</sub>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:CO<sub>2</sub>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：CO<sub>2</sub> 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）。

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）。

ウシ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、それぞれ適当量に分注する。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)、 $\alpha$ -MEM(45ml)、H<sub>2</sub>O(5ml)、0,02%DETA(10ml)、**ハイコロチゾン(ストック 400 $\mu$ l、ワーキング 50 $\mu$ l)**、**イソプロテルール(ワーキング 62.5 $\mu$ l)**、**アプロチニン(50 $\mu$ 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 $\mu$ l)、**hKGF(ストック 50 $\mu$ l、ワーキング 5 $\mu$ l)**、human Insulin(ストック 500 $\mu$ l、ワーキング 65 $\mu$ l)、FCS(ストック 50 ml、ワーキング 2ml)、Dispase II(ストック 20ml、ワーキング 1ml)、**トリオートサイロニン(ストック 5mL、ストック 50 $\mu$ l)**、**Y-27632(ワーキング 50 $\mu$ 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  $\mu$ 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: サコर्ट EX システム (EX01/細胞保存室)

サコर्ट 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 コナルチューブに 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°C 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ッティングする。15ml コナルチューブに細胞を移し、440g、4°C、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)。ただし初回のみ。

### 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 マイトマイシン 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ン C 処理済み MASC を用いて培養を開始する。

工程管理項目：ト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)。

#### 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)。

#### 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う。合否判定試験のうち性状試験（免疫染色）に日数を要するため、合否判定用の上皮シートサンプルは移植 2 日前に採取する。またこのとき、上皮シートの一部を参考品として凍結保存する。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)。

ウシ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

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
ト角膜輪部組織	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	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	日本薬局方
Streptomycin	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	日本薬局方
Recombinant human KGF	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
hydrocortisone 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	日本薬局方
Triiodothyronine	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
Isoproterenol hydrochloride 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	日本薬局方
Y-27632	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 MASC 培養工程	供給元規格
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
注射用水	準備工程	日本薬局方

フィブリノゲン加第 13 因子	準備工程	日本薬局方
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
アプロチニン	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,  $\alpha$ -MEM, Recombinant human KGF, Insulin, triiodothyronine, PBS, Dispase II, 0.02%EDTA, 注射用水, フィブリノゲン加第 13 因子, アプロチニ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用いる。

#### 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
ドナー角膜輪部組織	ヒト	角膜輪部上皮細胞培養開始工程
MASC	ヒト	MASC 培養工程
Recombinant human KGF	大腸菌	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	大腸菌	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

ヒト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
	PenicillinG	100unit/ml
	Streptomycin	100µg/ml
	FCS	5ml
MASC マイトマイシン処理用の培地	α-MEM	45ml
	PenicillinG	100unit/ml
	Streptomycin	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 KGF	10ng/ml
	Human recombinant Insulin	5µg/ml
	ハイト <sup>®</sup> ロコルチゾン	0.5µg/ml
	トリヨート <sup>®</sup> チロニン	2nM
	イソプ <sup>®</sup> ロテレノール	0.25µg/ml
	PenicillinG	100unit/ml
	Streptomycin	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

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っていることにより、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(ALTIV)プロウイルス検査、パルボウイルス B19 検査、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

ヒト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 <sup>2</sup> 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/mm<sup>2</sup> 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

本製品の容器はポリプロピレン製ビューイングチャンバー(IVC-12)である。材質は容器・栓ともにメクリル酸メチル樹脂(PMMA)である。

別紙

改訂版 SOP 案

KVPC-PMFOPH01-001

-----  
原材料の分注および管理に関する手順書  
-----

制定 2009 年 06 月 01 日

施行 2009 年 06 月 01 日

改定案策定 2011 年 11 月 01 日

承認	確認	作成
坪田一男 印	榛村重人 印	宮下英之 印

慶応義塾大学 医学部 眼科学教室

改正履歴表

改正番号	年月日	改正内容	改正理由	承認
01	2009/6/01	機器、文書フォーマット等を生理学 CPC から KVPC 準拠へ	KVPC の CPC を用いるため	
02	2011/11/01	作業者分担範囲の明記、手順の簡略化、使用物品及び手順詳細の指図記録書への移動	責任の明確化、作業の効率化、および培地変更への対応	

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

### 7.1. 居室での指図記録書印刷

7.2. 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。

7.3. 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

7.3.1. エントランスで手指洗淨後、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。

### 7.4. サブライ室への入室

7.4.1. 1 次更衣に着替え、サブライ室に入室する。

### 7.5. ラベルの印刷

7.5.1. 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

### 7.6. 必要品の持ち込み

7.6.1. 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。

### 7.7. P2 ルーム 1 での安全キャビネット立ち上げ

7.7.1. 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。

7.7.2. 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。

### 7.8. 分注保管作業

7.8.1. 指図記録書に従い、作業担当者が分注保管作業を行う

7.8.2. 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。

7.8.3. 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。

### 7.9. 退室

7.9.1. 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