

201206002A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

ヒト幹細胞を用いた臨床研究のエビデンス創出から
高度医療制度による実用化を目指した研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 坪田 一男

平成25(2013)年3月

目 次

I. 総括研究報告

ヒト幹細胞を用いた臨床研究のエビデンス創出から 高度医療制度による実用化を目指した研究	1
坪田一男	

A. 研究目的	1
B. 研究方法	3
C. 研究結果	5
D. 結論	8
E. 健康危険情報	9
F. 研究発表	9
G. 知的財産権の出願・登録情報	9
別紙：製品標準書、作業手順書等	10

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

ヒト幹細胞を用いた臨床研究のエビデンス創出から 高度医療制度による実用化を目指した研究

研究代表者 坪田一男 慶應義塾大学医学部眼科学教室

研究要旨：角膜輪部上皮幹細胞不全症の治療法に培養上皮シート移植があるが、従来はマウス線維芽細胞株がフィーダー細胞に用いられており、またロット管理も厳密になされていなかった。本研究では、眼科としては全国で始めてヒト幹細胞臨床研究指針の承認下(平成 21 年 1 月 21 日・厚生労働省発医政第 0191004 号)で、GMP 準拠のロット管理のもとヒト間葉系幹細胞をフィーダー細胞に用いて培養上皮シート移植を行っていた。平成 24 年度においては、KGF 及び ROCK 阻害剤を利用した改良培養法をヒト幹細胞臨床研究に再申請するとともに、平行して CPC 内でのテストラン及び各種培養条件の追加検討を行った。テストランでは培養 3 週間で K12/K15 陽性の重層シートを得ることができた。また、3 回行われた安全性試験においては好気性菌、嫌気性菌、真菌、マイコプラズマ、HIV,HBV,HCV,HTLV-1,ヒトパルボウイルス B19 陰性であり、エンドトキシンに関しても基準値以下であった。平行して行った追加検討において、我々の培養法では 3 カ月間にわたり、上皮シートを免疫染色パターン及びコロニー形成率に影響を与えずに維持できることが明らかになった。これは、移植スケジュールや培養管理に柔軟性を与え、産業化を考慮する上で有用である。加えて、フィブリンを用いずとも基底層ごと上皮シートを剥離できる可能性も示された。培地の Xeno free 化、および出荷後の保存条件等については、さらなる検討が必要であると思われる。なお、新規培養法については平成 25 年 1 月 31 日に大臣意見をうけ承認された(厚生労働省発医政 0131 第 4 号)。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

研究分担者	榛村重人	慶應義塾大学医学部 眼科学教室	准教授
研究協力者	宮下英之	慶應義塾大学医学部 眼科学教室	特任助教

A. 研究目的

①研究目的

角膜上皮幹細胞不全を伴う重症眼表面疾患において、新規に開発した手法による培養角膜上皮シート移植の治療効果及び安全性を検討する。本研究の意義は、幹細胞不全による失明者の社会復帰を実現するために、従来の培養上皮シートで必要とされていた異種細胞や羊膜を用いない、より安全な再生技術確立することである。

②研究の背景

角膜上皮移植術の対象となる疾患は、その目的により二つに大別される。一つは、健全な角膜上皮の供給による視力改善および ocular surface の安定を目的として行うもので、これに該当する疾患群は Stevens-Johnson 症候群(SJS)、眼類天疱瘡(OCP)、

化学・熱による角膜腐食(角膜腐食)などの癬痕性角結膜疾患、および膠様滴状角膜ジストロフィ(GDLD)、Salzmann 角膜変性(SCD)などの上皮変性疾患である。もう一つは、原疾患の治療を目的として行うものであり、蚕食性角膜潰瘍を代表とする周辺部角膜潰瘍(周辺部潰瘍)、角結膜上皮腫瘍(腫瘍)、再発翼状片などである。

角膜上皮移植術には角膜上皮形成術(keratoepithelioplasty)、輪部移植(limbal transplantation)、および本研究において実施する培養上皮移植術の3術式があり、それぞれ適する対象疾患が異なる。角膜上皮形成術は、transient amplifying cell (TA cell)および分化細胞を角膜表層実質とともに移植する術式であり、また輪部移植は、角膜上皮幹細胞を含む輪部組織を移植する術式である。一方、培養上皮移植術は、角膜上皮幹細胞を含む角膜上皮細胞を角膜輪部組織より採取し、生体外で培養して上皮シートを作成させた後、これを眼表面に移植する術式である。

一般に、急性期の重症眼表面疾患、例えば Stevens-Johnson 症候群や重症角膜化学外傷などにおいては、全角膜上皮欠損とともに著しい炎症が生じ、しばしば遷延性上皮欠損の状態となる。強い炎症を伴う遷延性上皮欠損は、角膜融解から角膜穿孔、あるいは角膜感染症といった重篤な状態に至りやすく、臨床的に非常に危険であるため、本来は早期の角膜上皮移植による治療が望ましい。しかし従来の角膜上皮移植術である角膜上皮形成術や輪部移植では、角膜全体の上皮化を得るまでに術後 1-2 週間を要し、また急性期の遷延性上皮欠損に対して施行しても、上皮化が得られない、移植片が生着しにくい、拒絶反応が生じやすいといった問題がある。このためこれらの疾患の急性期は上皮移植術の適応外とされているが、保存的治療のみでは結膜上皮が結合組織を伴って侵入し、瞼球癒着も進行するため、視力予後は著しく不良となる。

これに対して培養上皮移植術は、従来外科的治療の対象となり得なかった急性期のこれら重症眼表面疾患に対し、新しい外科的アプローチを提供する。具体的に、実際の培養上皮移植術は以下の手順で行われる。(1)まず角膜上を覆う瘢痕、肉芽組織とともに結膜上の異常粘膜組織を除去し、(2)次に結膜下組織の増殖を抑える目的で MMC 処理を行ない、(3)最後に培養した角膜上皮シートを移植する。すなわち培養上皮移植術は、遷延性上皮欠損眼に対して幹細胞を含む上皮シートを一期的に患部全体へ供給する術式であり、移植後ごく早期の上皮化と上皮幹細胞の再供給を得ることができる。またこの特徴から、上皮幹細胞が疲弊し上皮細胞の供給が減少している慢性期においても、培養上皮移植術は有効であると考えられる。培養上皮シートの調製方法としては福田恵一(慶応義塾大学医学部教授)らが開発したキャリアを用いないフィブリンシートを用いる。福田らは、心筋細胞をフィブリンシート上に培養し、層状にこれを重ねることで心筋組織の作成に成功した。この研究成果を基に、坪田一男(慶應義塾大学医学部眼科教授)、榛村重人(慶應義塾大学医学部眼科標準教授)らは、ウサギ輪部角膜上皮を、フィブリンシート上でマウス 3T3 細胞によるフィーダー層と共培養し、さらに air-lift することによって、上皮シートの作成に成功した(Higa K, Shimmura S, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Feb;48(2):597-604.)。この手法による上皮シートは、生体の角膜上皮と同様に重層化しており、輪部上皮をドナーとした場合、免疫組織化学的検討において角膜上皮特異的ケラチン(K3/K12)陽性であった。加えてこれらの上皮シートは、コロニー形成能を有する未分化細胞を含んでいた。さらに、これらの上皮シートを外科的処理あるいは薬剤処理(n-heptanol)による角膜上皮障害モデルウサギに移植したところ、縫合を行うことなく眼表面に生着し、長期にわたって角膜上皮を再構築すること

ができた。これらの結果は、フィブリン上で作成した上皮シートが輪部幹細胞不全の治療に有効であることを強く示唆している。

実地医療にこの術式を応用するにあたり、坪田、榛村らはさらに安全性を考慮し、フィーダー細胞としてマウス 3T3 細胞の代わりにヒト骨髄間葉系幹細胞(MASC 細胞)を用いて上皮細胞シートを作成する技術を確立した(Omoto M, Miyashita H, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 May;50(5):2109-15.)。マウス由来の 3T3 細胞をフィーダー層として用いた培養上皮移植はすでにヒト角膜に対して行われているが、3T3 細胞由来と考えられる異種感染症発生の報告は全くないため、培養時の異種細胞併用に起因する感染症のリスクは一般に低いものと考えられる。しかし、ヒト由来 MASC 細胞を用いることで、研究被験者がマウス細胞由来の未知の感染症にさらされるリスクは完全に排除することができる。今回、米国において安全性が保証されている GMP 準拠のヒト MASC 細胞の使用が可能となったため、本研究ではこの細胞をフィーダー細胞として用いた。さらに、上皮細胞シート作成時に用いるウシ胎児血清については、狂牛病の発症していない地域(オーストラリア、ニュージーランド)産の血清を用いることでプリオン感染リスクを極力抑えて培養した。加えて本研究では GMP 準拠の上皮細胞シートを供給するため、クリーンルーム(一般には Cell processing center, CPC。本学の Keio vector processing center:KVPC を使用)内で標準作業書(SOP)に従い、GMP 品の無い一部例外を除いて GMP 準拠の物品を用いて培養を行った。安全性を担保するため培養 1 週ごとに 3 回微生物検査を行うと共に、出荷検査を行って合格品のみを出荷した。3 例の移植を行ったものの、3 例目の移植(2012.3.10 実施)では翌日上皮欠損を生じていた。これに対し再発防止の観点から、最新の知見に基づいた上皮シートの培養法見直しを行った。この結果、EGF に替えて KGF を用い、さらに ROCK 阻害剤を併用することで、上皮細胞シートにおける未分化細胞及び分化細胞がともに増大し、より強固な上皮シートが形成されることを見出した。平成 24 年度においてはヒト幹指針への再申請を行うとともに、平行して CPC におけるテストランおよびその他の培養条件検討を行った。

③ 既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項

本研究は角膜上皮シート移植としては、フィーダーとして異種細胞である 3T3 細胞を用いない点、羊膜を用いない点で新規性が認められる。加えて培地改良後には、EGF に替えて KGF を用い、ROCK 阻害剤を追加することで、上皮シートのコロニー形成率、未分化細胞マーカー、及び分化細胞マーカーがすべて増大する点で新規性が認められる。

B. 研究方法

① 研究方法概要

本研究では、ヒト幹指針に新規培養法の審査を申請するとともに、SOP に従い CPC 内でテストランを行った。また平行して、CPC 外で以下の実験を行った。培養日数でどの程度の上皮シートの質が変化するか確認するため、長期培養実験を行った。出荷後の保存性の確認のため、上皮シートを出荷用容器に包装用培地を用いて封入後、4度で一晩静置して上皮シートの質の変化を確認した。さらなる Xeno free 化の検討のため、ウシ胎児血清に替えて Xeno free 血清代替物 (KSR-XF) を用いて上皮シートの培養を試みた。また、フィブリンなしで重層、剥離が可能かについても検討を行った。

② 研究方法各論

培地

上皮用培地には F12/DMEM (Life Technologies) に 4%ウシ血清、KGF (final 10 ng/mL, Peprotech)、ROCK 阻害剤 (Y-27632, final 10 μ M, ナカライテスク)、human recombinant insulin (final 10 μ g/mL, Sigma-Aldrich)、hydrocortisone (final 500 ng/mL, ヒドロコルチゾン、日医工)、triiodo-L-thyronine (final 2 nM, Sigma-Aldrich)、isoproterenol hydrochloride (final 250 ng/mL, プロタノール L 注、興和創薬)、aprotinin (final 150 U/mL, Wako)、streptomycin (final 100 μ g/mL、明治製菓)、penicillinG (final 100 U/mL、明治製菓)、を添加した。長期培養実験では、対照群として従来の方法と同様、KGF ではなく EGF を 10 ng/mL 含み、Y-27632 を含まない培地を用いた。上皮シートのコロニー形成率の検討では、KGF(-)、EGF(+), Y-27632(+), aprotinin (-) の培地を用いた。Xeno free 培地の検討では、ウシ血清の代わりに Xeno free 血清代替物 (KSR-XF, Gibco, Life technologies) を用いた。

ヒト角膜輪部上皮細胞の分離

移植およびテストラン用には、アメリカ合衆国のアイバンクである SightLife 社より移植用強角膜切片を購入した。研究用には、同様に米国より購入した移植用角膜のうち、中央部を移植に用いた残りをを用いるか、あるいは SightLife 社より研究用角膜を購入した。なお、研究用角膜は、内皮細胞数や実質混濁などの理由により移植に不適と判断された移植用角膜である。輪部は以下のように用意した。強角膜切片より角膜中央を切除、内皮をデスマ膜ごと除去し、結膜および余分な強膜を切除した。輪部を Dispase II (Roche Diagnosis, 1.2 U/ml in DMEM/F12 with 100 μ g/mL streptomycin and 100 U/mL penicillinG) で 37 度 1 時間処理した後、セルスクレイパーを用いて輪部上皮を剥離した。回収した輪部上皮は Dispase 液ごと遠心管に回収し、440g、4 度、5 分遠心したのちに上清を吸引

除去し、DMEM/F12 (条件検討時)あるいは上皮用培地 (テストラン時) に懸濁して細胞数をカウントした。

上皮シート作成

上皮シート作成は、臨床用と同様の基質、培地、フィーダー細胞、培養期間、培養方法を用いて行った。フィーダー細胞にはヒト骨髓間葉系幹細胞 (marrow adherent stem cells, MASC, SanBio 社) を用い、MEM-alpha (Life Technologies) に 10%ウシ胎児血清および Streptomycin, Penicillin を添加した培地で解凍した後、6 ウェルプレートに 2.5×10^5 /ウェルで播種した。コンフルエントに達した MASC を MMC (final 4 μ g/mL, 37C, 2h) 処理してフィーダー細胞とした。基質にはフィブリンゲル (ボルヒール、化血研) を用い、6 ウェル用セルカルチャーインサート (5 cm², 3450, Corstar) に final 600 μ g/insert となるよう塗布した。なお、一部の実験ではフィブリンゲルを用いなかった。ここに上皮細胞を $1 \sim 2 \times 10^5$ 個/insert となるよう播種し、各種上皮用培地を用いて培養した。培地交換は、培養 3 日目、5 日目、7 日目、以降毎日行った。

免疫染色

上皮シートを回収し、包埋剤 (4% CMC, サクラファインテック) に包埋して液体窒素で凍結した。-20 度のマイクロームを用いて 10 μ m の凍結切片を作成し、風乾後に用事調整して氷冷した 4% paraformaldehyde in PBS を用いて 5 分固定した。一次抗体には抗 Keratin 3/12 (mouse clone AE5, sc-80000, Santa Cruz)、抗 K12 (rabbit, sc-25722, Santa Cruz)、抗 K15 (mouse clone LHK15, MS-1068-P1, Neomarkes)、抗 p63 (mouse clone 4A4, sc-8431, Santa Cruz)、抗 Pax6 (rabbit, PRB-278P, Covance)、抗 E-cadherin (rabbit, sc-7870, Santa Cruz) を用い、1 μ g/mL で室温 1 時間反応させた。二次抗体にはそれぞれの動物種に対する緑色蛍光色素 (Alexa flour 488, Life technologies) あるいは赤色蛍光色素 (Alexa flour 555) 標識抗体を用い、1 μ g/mL で室温 1 時間反応させた。核は DAPI (final 1 μ g/mL, Dojindo) で染色した。

上皮シートのコロニー形成率

セミコンフルエントの NIH/3T3 を MMC で 37 度、2 時間処理し、フィーダー化したのちに細胞保護材で凍凍保存した。使用前日に 100 ミリディッシュに 2.5×10^4 /cm² で播種した。1 条件あたり 4 ディッシュを用意した。翌日上皮シートを酵素処理して細胞を分散させ、40 μ m セルストレイナーで細胞塊を除去したのち、100 ミリディッシュあたり 1000 個になるよう希釈して播種した。上皮用培地 (EGF+, KGF-, Y27632+, aprotinin-) で約 2 週間培養し、コロニーが融合する前にホルマリン固定してローダミン B でコロニーを可視化した。コロニー形成率は、コロニー数/播種細胞数の百分率として求めた。

CPC 内テストラン

CPC 内のテストランは、あらかじめ定めた作業標準書に従って行った。出荷時にウシ血清の持込を防ぐため、ウシ血清を含まない培養液で5回洗浄を行い、その後ウシ血清を含まない培養液で角膜ビューイングチャンバー(ボシユロム)に包装して出荷した。無菌試験は、株式会社SRLに委託した。無菌検査の検体には、ドナー角膜の保存液、培養1週目の培養上清、および培養3週目(移植時)の培養上清を用いた。ウシ血清アルブミン(BSA)量検査の検体には、出荷時の上皮シート洗浄後の培養液、および陽性および陰性対象としてウシ血清を含まない培養液を使用し、ELISAキット(E10-113, BETHYLE)を用いた検査を株式会社ホクドーに委託した。出荷検査は培養19日目に行い、はじめに密度検査用に撮影した後、Triplicateしたシートのうち1シートを検体として回収、凍結切片として免疫染色を行った。

シート剥離試験

臨床で行うのと同様に、出荷したシートに対し、眼科用マイクロ鑷子を用いて剥離試験を行った。

C. 研究結果

平成25年度においては改良SOPによるヒト幹臨床研究の再申請を進めるとともに、そのSOPに基づいたテストランを行った。また並行して、産業化に向けいくつかの追加実験を行った。

① テストラン結果

再申請中のヒト幹臨床研究のSOPに基づき、テストランを行った。その結果、培養19日目の破壊検査で、サイトケラチン12/サイトケラチン15陽性の重層上皮が形成されていることが確認できた(図1)。細胞密度は3893 cells / mm²で合格基準を満たした。しかしながら、以前用いていたEGF培養上皮シートに比べ、KGF+Y-27632培養上皮シートは酵素処理に抵抗性で、生細胞数測定のための細胞分散に長時間の酵素処理と激しいピペッティングを要した。おそらくこのために生細胞率は77%であり、合格基準を満たさなかった。治療のためには生きた細胞を移植する必要があるため、上皮シート内の生細胞率の確認は必須である。しかし、酵素処理分散による生細胞数測定は酵素処理そのものが細胞に悪影響を与えるため、必ずしも上皮シートにおける生細胞数を反映しない。加えて、移植に適する強固な細胞間接着を持つ上皮シートは酵素処理分散のために処理が過酷となり、かえって見かけの生細胞率が低下する。今後は上皮シートの実際の生細胞率を反映できるような生細胞率測定法、たとえばシートそのものをPI(細胞膜不透過性の核酸染色赤色蛍光色素)とHoechst33342(生細胞膜透過性の核酸染色青色蛍光色素)で2重染色し、生細胞率をもとめるような手法

の方がよいと思われる。なお、カルセインCM(細胞膜透過性で代謝後に緑色蛍光性となる色素)とPIを用いる通常の生細胞測定法は、検査用の上皮シートを蛍光免疫染色による確認試験に用いるため、避けたほうがよいと思われる。

安全性試験は、培養開始時のドナー角膜保存液、上皮培養1週の培養上清、および出荷時の培養上清についておこなった。すべてのサンプルにおいて、好気性菌、嫌気性菌、真菌、マイコプラズマ、HCV,HBV, HIV,HTLV-1、ヒトパルボウイルスB19は検出されなかった。また、エンドトキシンは0.0056 EU/mL以下で、基準値である25 EU/mLを下回った。出荷時には培地に用いられるウシ血清の持ち込みを避けるため、上皮シートを血清を含まない包装用培地で洗浄する。各洗浄液におけるウシ血清量をBSA濃度として測定したところ、培地のBSA量が672 μg/mLだったのに対して、洗浄1回目が6.0 μg/mL, 2回目が2.2 μg/mL, 3回目が0.28 μg/mLとなり、洗浄3回で基準である0.4 μg/mL以下を充たした(図1)。

これらの結果より、現在のSOPを用いて出荷基準にほぼ準じた上皮シートが作成できることが示された。しかし、生細胞測定率等若干の改良も必要であると思われる。

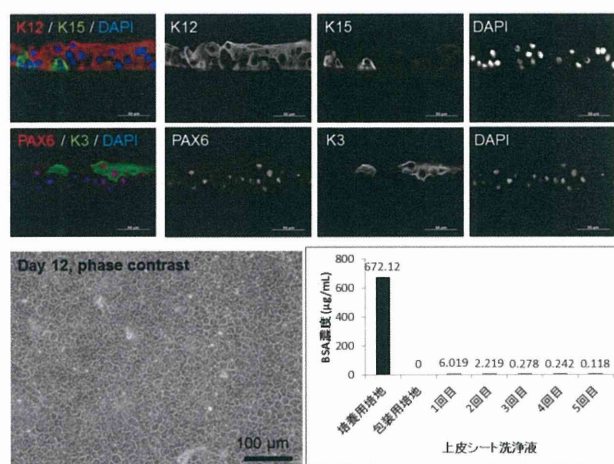


図1: テストランで作成した上皮シート

上段: 確認試験。培養12日目上皮シートの凍結切片に対する抗サイトケラチン12抗体(赤)及び抗サイトケラチン15抗体(緑)による蛍光染色像。核はDAPI(青)で染色。スケールバーは50 μm。中段: 抗PAX6抗体(赤)及び抗サイトケラチン3抗体(緑)による蛍光染色像。下段左: 培養12日目の位相差顕微鏡像。下段右: 培地及び上皮シート洗浄液に対するウシ血清アルブミン量のELISAによる測定結果。出荷基準値は0.4 μg/mL。

② 長期培養実験

産業化を考えると、患者さんの状態等、さまざまなアクシデントによって既定の期日通りに移植を行えないことも考えられる。そこで、培養日数の延長が上皮シートの質にどの程度影響するのか確認するため、長期培養実験を行った。培地は毎日交換し、3カ月間まで培養した。

その結果、培養3週、培養1カ月、培養3カ月で上皮シートにおける免疫染色パターンに変化は見られなかった(図2)。すなわち、基底層マーカーであるサイトケラチン15は基底層に、分化マーカーであるサイトケラチン12及びサイトケラチン3は主にSuprabasal layerに、細胞間接着分子であるE-カドヘリン及び眼表面特異的転写因子であるPAX6はほぼ全層に、及び未分化マーカーであるp63は基底層を中心に認められた。

また、増殖能力を維持する細胞の存在を確認するため、上皮シートを酵素処理で分散後にクローナルな密度(1000個/100 mm dish)で3T3フィーダー上に播種しなおしたところ、以前用いていたEGF添加培地で培養した上皮シートからはコロニーがほとんど形成されなかったのに対し(培養1カ月シート、 $0.4\% \pm 0.3\%$, mean \pm S.D., $n=4$ 、培養3カ月シート、 $0\% \pm 0\%$, $n=4$)、今回の培養法の上皮シートでは回収細胞のうち2割程度がコロニー形成能を維持しており、かつ培養日数でコロニー形成率がほとんど変化していなかった(培養1カ月シート、 $22.3\% \pm 16.0\%$, $n=4$ 、培養3カ月シート、 $23.3\% \pm 7.3\%$, $n=5$)。

これらの結果は、少なくとも3カ月は培養上皮シートの質を変化させずに維持できることを示す。これは、培養や移植のタイミングに融通が利くという点で有利である。

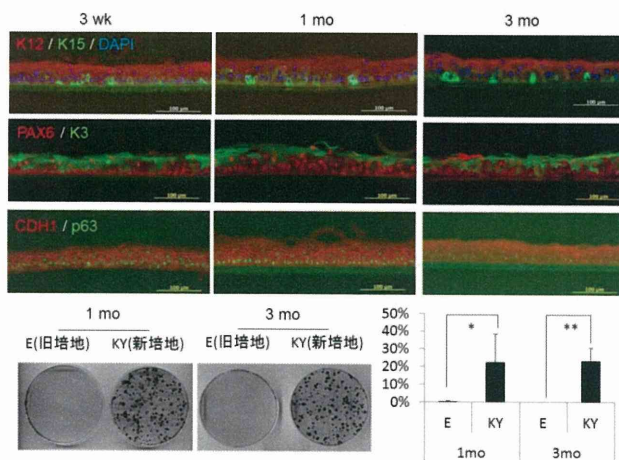


図2: 長期培養実験結果。上段: 培養3週(左)、培養1カ月(中)、培養3カ月(右)後の上皮シートの凍結切片蛍光免疫染色像。上よりK12(赤)及びK15(緑)、PAX6(赤)及びK3(緑)、CDH1(赤)及びp63(緑)、下段: 上皮シートから分散させた細胞によるコロニー形成: 培養1カ月(右)および培養3カ月(中)の上皮シートからのコロニー。左: それぞれのコロニー形成率。スチューデントのt検定。 $*p<0.05$, $**p<0.01$

③ 出荷後保存実験

現行のSOPでは培養上皮シートの出荷の際、培養上皮シートをセルカルチャーインサートごと切り出し、血清を含まない包装用培地を用いて角膜用ビューイングチャンバーに封入し、密閉したのち、学内の手術室に輸送して移植する。将来の産業化を考えた場合、移植場所が遠隔地となる可能性もあり、この際に輸送に1日程度かかることも予想される。そこで、包装して冷蔵で1日経過した後に、上皮シートの質が未分化細胞含めてどの程度維持されているか検討した。

上皮シート同一ロット2枚のうち、1枚をそのまま1日間培養継続してコントロールとし、もう1枚をSOP通りに包装、出荷後、包装用容器のまま4度で1日保存した。免疫染色のパターンはあまり差がないように思われたものの、別のロットのシートをもちいて上皮シートのコロニー形成率を比較したところ、保存後の上皮シートではコロニー形成率は有意に低下していた。今後のさらなる検討が必要であると思われる。

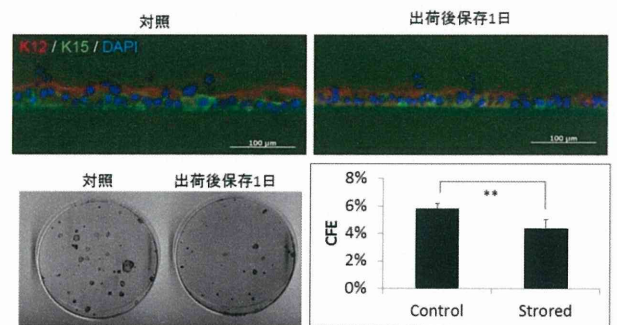


図3: 上段: 培養3週の上皮シートのK12(赤)及びK15(緑)に対する蛍光免疫染色像、同一ロット、右: 対象群。培養継続1日、左: 包装後4度保存1日。下段: 上皮シートからのコロニー。左: それぞれのコロニー形成率。スチューデントのt検定。 $**p<0.01$

④ Xeno free培地検討

現行のフィーダー共培養系で、ウシ胎児血清を排することができると検討した。同一ロットのヒト角膜輪部上

皮細胞を、ウシ胎児血清(FBS)、あるいは異種を排した血清代替物(Knockout Serum Replacement -Xeno free, KSR-XF)を添加した培地でそれぞれ3週間培養した。FBS添加群でも重層は若干悪かったものの、免疫染色のパターンには特に大きな差は認められなかった。しかしながら、上皮シートのコロニー形成率はKSR-XF培養上皮シートが有意に低かった。

今後のさらなる検討が必要なものの、現時点ではFBSを用いる方が望ましいことが示唆される。

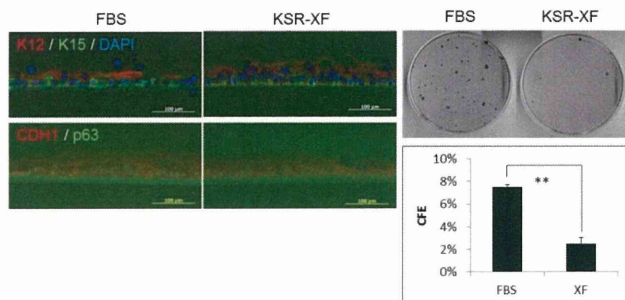


図4:ウシ胎児血清(右)およびKSR-Xeno free(中)で培養した上皮シートの蛍光免疫染色像。上段:K12(赤)及びK15(緑)、下段:CDH1(赤)及びp63(緑)。核はDAPI(青)で染色。p63の免疫染色像では緑色がわかりやすいよう、DAPIによる核染色像は示していない。左:それぞれの上皮シートのコロニー形成率。** $p < 0.01$, スチューデントのt検定。

⑤ フィブリンフリー培養検討

フィブリンは上皮シートの基質として、基質ごと剥離、移植するために広く使用される。我々もセルカルチャーインサート上にフィブリンを用意し、この上に上皮を播種している。我々は上皮シート培養を行う中で、フィブリンはメニスカスのためインサート周辺で厚くなるが、上皮シートの培養の際にしばしばフィブリンのメニスカスが消失すること、その状態でも上皮シートが剥離すること、逆にフィブリンメニスカスが残っているような場合でも上皮シートが剥離しないことがあること、セルカルチャーインサートごと包埋して凍結切片を作成した上皮シートが抗フィブリン抗体に染色されないことを経験した。そこで、フィブリン基質あり、なしで上皮シートを培養し、フィブリンがない場合には上皮が剥離できないことを確認しようと試みた。

その結果、予想に反し、フィブリンを塗布しかなかったセルカルチャーインサートからも上皮シートを物理的に剥離することができた(図5)。上皮シートの免疫染色パターンは、フィブリン塗布のあり、なしで変化しなかった。なお、このロットではフィブリンのメニスカスが培養3日目には消失していた。剥離後のインサートに細胞がほ

とんど観察されなかったことから、上皮シートは基底層/翼細胞層間ではなく、基底層/インサート間で剥離したものである。図6に、別のフィブリン上培養上皮シートの剥離様式を示す。アプロチニンの必要性、上皮シート剥離の様式についてはさらなる解析が必要であるが、フィブリン及びアプロチニンの使用を排することができれば、コストの面でも、異種(アプロチニン)の使用を減らすという面でも有用であると考えられる。

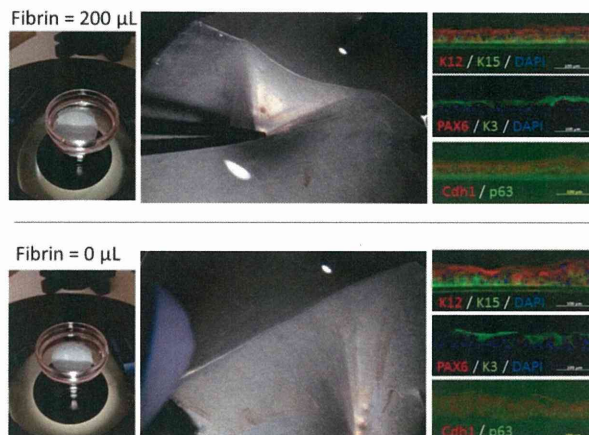


図5:フィブリンフリー上皮シートの免疫染色パターンと剥離。フィブリンを20 μ L用意したセルカルチャーインサート(上段)か、あるいはまったく用意しないセルカルチャーインサート上(下段)に同一輪部の上皮細胞を播種し、同一の培地で3週間培養を行った。(左、中)臨床と同様にセルカルチャーインサートを切り出したのち、マイクロ鑷子で剥離を試みたところ、どちらもインサートから剥離した。この際、上皮シートのインサートへの固着は特に認めなかった。(右)それぞれの上皮シートの免疫染色像。免疫染色パターンに特に差は認めなかった。

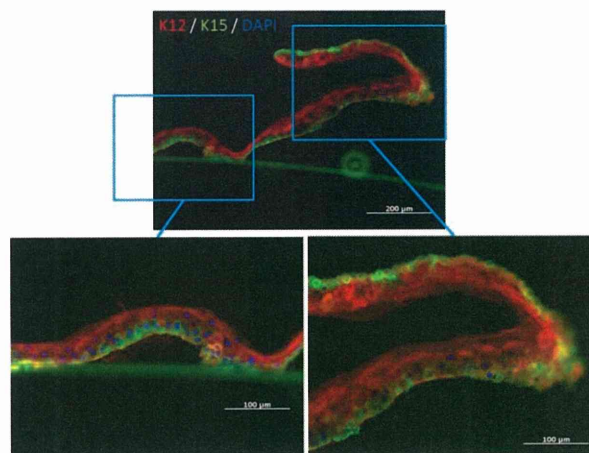


図6:剥離した上皮シートにおける基底層とSuprabasal layers。フィブリンを20 μ L用意したセルカルチャーインサート上で培養した、図5と同一ロットの上皮シート。シートを半分程度剥離したのちに、剥離中の部位を上皮シート、セルカルチャーインサート含めて6ミリトレパン

で打ち抜き、包埋後に凍結切片を作成してK12(赤)およびK15(緑)で蛍光免疫染色した。剥離した上皮シートもK15陽性であり、上皮の剥離は基底層(K15陽性)/Suprabasal layers(K12陽性)間ではなく基底層/セルカルチャーインサート間であることを示す。

D. 結論

改良 SOP に基づいたテストランにより、重層した上皮シートを得ることができた。また並行して行った実験より、以下の結果を得た。

長期培養試験によって、我々の手法で作成した上皮シートは少なくとも 3 カ月間品質に変化なく維持できることが明らかになった。もちろん毎日の培養コストはかかるものの、一度作成した上皮シートを品質変化なく長期間維持できることは、出荷のタイミングを調整できることを意味する。これはアクシデント等に対する対応能力を高め、産業化の際に有利であると考えられる。たとえば、患者さんの体調不良、あるいは荒天等といった事情で手術が数週間延期になったとしても、培地交換を継続するだけで延期に対応可能である。

保存試験においては、少なくとも包装用培地を充たした密閉容器で 4 度保存するだけでは、1 日後の上皮シートの質は若干低下することが明らかとなった。今回ヒト幹臨床研究に再申請した SOP では、安全性の担保のために包装用培地はウシ血清を含まず、またフィーダーを含まない密閉容器内で保存される。今回申請の臨床研究では出荷後数時間以内に移植を想定しているので問題はないものの、今後産業化で長時間移動後に移植するような場合では、包装用培地も含めた出荷形態の見直しが必要になると考えられる。たとえば、以前東京歯科大で行われていたように、上皮シートをフィーダー細胞含めて培養プレートごと輸送し、移植直前に洗浄及び剥離を行うような手法も含めて検討が必要になると考えられる。

Xeno free 試行においては、ウシ血清に替えて KSR-Xeno free での培養を試みた。免疫染色像においては若干の差をみとめ、上皮シートのコロニー形成率においては KSR-XF 群で有意な低下を認めた。今後も継続的な検討は必要であるが、少なくとも現時点においては、患者さんに良好な上皮シートを供給するという観点からウシ血清を用いた培養上皮シートのほうが望ましいと考えられる。

フィブリンフリー試行においては、予想に反し、フィブリンコートしていないセルカルチャーインサートを用いても上皮シートを剥離することがで

きた。今後のさらなる検討が必要であるが、培養系からヒト血液由来フィブリン及び、フィブリン分解を抑制するために添加されるウシ肺アプロチン排除できるならば、安全性の確保においても、コスト削減においても、将来の産業化において有利である。上皮シート自体の強度はある程度あるため、少なくとも角膜上移植に用いられる 5 cm² 程度の大きさであれば、移植に問題ないと考えられる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし (投稿準備中)

2. 学会発表

The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2012 Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA, May/6-10/2012

Miyashita H, Shimmura S, Tsubota K. Combination of ROCK inhibitor and KGF improves the quality of epithelial cell sheets

15th International Ocular Surface Society Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA, May/5/2012

Miyashita H, Shimmura S, Tsubota K. Effect of combined application of ROCK inhibitor and KGF/FGF7 on the quality of human limbal epithelial cell sheets.

角膜カンファランス 2013, 2013/2/14-16、白浜町、和歌山県

宮下英之、吉田悟、川北哲也、坪田一男、榛村重人
培養下における角膜輪部ニッチ自己組織化

第12回日本再生医療学会総会、2013/3/21-23、横浜市、

宮下英之、坪田一男、榛村重人

In vitro における組織恒常性維持: ヒト角膜輪部上皮シート

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし。

角膜上皮シート製品標準書

制定 2009 年 06 月 01 日

施行 2009 年 06 月 01 日

改定案策定 2012 年 08 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

1. 緒言

ヒト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	ヒト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

2. 原薬

1. 一般情報

1. 名称:ヒト角膜輪部上皮シート

1. INN 該当なし

2. 化学名 該当なし

3. JAN (日本名)ヒト角膜輪部培養上皮シート

(英名)cultivated human corneal limbal epithelial cell sheet

4. CAS 番号 該当なし

2. 構造

ヒト角膜輪部上皮から分離培養した重層上皮シート。

① 化学構造

ヒト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

ヒト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

ヒト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

ヒト角膜輪部上皮には角膜上皮の幹細胞が含まれるとされる。ヒト角膜輪部上皮はケラチン 15 陽性細胞からなる基底層と、その上に重層し、角膜上皮特異的ケラチンであるケラチン 3、ケラチン 12 を発現する翼細胞及び表層細胞からなる扁平重層上皮である。このヒト角膜輪部上皮から分離した上皮細胞をファイブリノコートワエル上で培養し、MASC フィーダー細胞と共培養することによって、角膜輪部上皮に類似した構造及び性質を

示す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のアプローチする新しい治療法として期待される。

1. 性状

ヒト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、
 ケラチン 12 陽性細胞及びケラチン 15 陽性細胞からなる 2 層以上に重層化した上皮

3. 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角膜上皮stem細胞が消失しているため角膜上皮が維持されず、この結果結膜上皮が角膜に侵入して視力を損なっていると考えられている。このような疾患に対し、stem細胞を含むと想定される角膜輪部由来の培養上皮シートを移植することで、角膜上皮が再生されると期待される。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. 製造

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. 製造法およびプロセス・コントロール

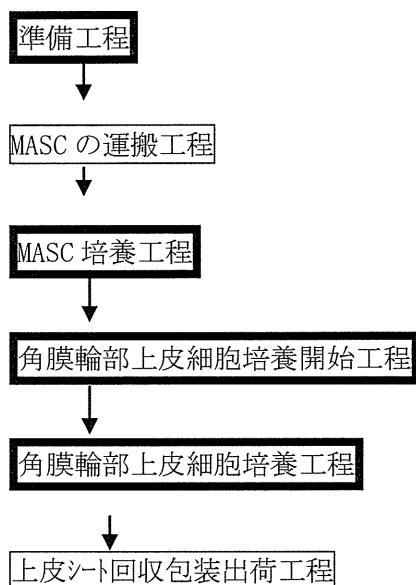
1. 使用機器

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	サブライ室
冷蔵冷凍庫	FR03	MEDICOOL	SANYO	MPR-214F	P2 ルーム 1
冷凍庫	FR01	BIOMEDICAL FREEZER	SANYO	MDF-U537D	サブライ室
-80℃超低温7	FR05	-80℃超低温7	SANYO	MDF-192	P2 ルーム 1

リーザー		リーザー			
-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	トミ精工	LX-140	P2 ルーム 1

2. 製造方法のフローチャート

製造方法を以下に示す。なお、 : 工程区分、 : 重要工程とする。



3. 製造工程詳細

準備工程 重要工程。[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)、Human Insulin (ワーキング 50 μ L) 1M 塩化カルシウム溶液 (10ml)、ハイト[®]ロルチゾン (ストック 400 μ l、ワーキング 50 μ l)、イソ[®]プロレノール (ワーキング 62.5 μ l)、ア[®]ロチニン (50 μ l)、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)、hKGF (ストック 50 μ l、ワーキング 5 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)、トリオートサイロニ (ストック 5ml、ワーキング 50 μ L)、Y-27632 (ワーキング 50 μ l)

操作管理項目: ロット付番 (施設内ロット番号)、ラベルシグ (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)

: クリーン度の確認; 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

重要工程。 [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°C±2.0°C

: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%(フイライト測定)、

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 6 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:6 well 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%(フイライト測定)、

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(庫内ハット水位目視)

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)

目的:培地の交換

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

容器:6 well 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

上皮シート回収包装出荷工程 [P2ルーム1]

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

目的:角膜上皮シートの回収・包装・出荷

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:6 well plate, 35mm dish, 角膜ビュイキングチャンパー

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)。

血清アルブミン濃度測定試験

4. ロット構成

ロットのサイズおよび構成。

工程	ステップ	スケール
準備工程(フィブリンゲル)	-	Transwell 6枚
MASCの運搬工程	-	クライチューブ 1本
MASCの培養工程	-	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・包装・出荷工程	-	6well 中 1~2well
-----------------	---	-----------------

5. 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)、 α -MEM(45ml)、H₂O(5ml)、0, 02%DETA(10ml)、ハイトロコルチゾン(ストック 400 μ l、ワーキング 50 μ l)、イソプロテノール(ワーキング 62.5 μ l)、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)、hKGF(ストック 50 μ l、ワーキング 5 μ l)、human Insulin(ストック 50 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)、トリオートサイロニン(ストック 5mL、ストック 50 μ l)、Y-27632(ワーキング 50 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:サンコート EX システム (EX01/細胞保存室)

カート 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°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 コニカ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%以上である事を確認し、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°C 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、1週間目以降は毎日の交換とする。また、培養開始から1週間後、培養上清を安全性試験用検体として採取する。

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、