

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・包装・出荷に関する手順書(KVPC-PMFOPH01-007)に従って回収し、角膜ビュイキングチャンバー内に包装用培地で包装し、施設内から搬出する。可能ならば1ロット2上皮シートを出荷する。

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

3. 原材料の管理

1. 原薬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。

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。

原材料	使用工程	品質規格
トナー角膜輪部組織	角膜輪部上皮細胞培養開始工程	供給元規格 (SightLife 社)
MASC	MASC 培養工程	供給元規格 (SanBio 社)
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 (Life Technologies 社)
• -MEM	MASC 培養工程	供給元規格 (Life Technologies 社)
Fetal Calf Serum (FCS)	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 (SAFC Biosciences 社)
Recombinant human KGF, animal free	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 (Peprotech 社)
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 (Sigma-Aldrich 社)
Triiodothyronine	角膜輪部上皮細胞培養開始工程	供給元規格

	角膜輪部上皮細胞培養工程	(Sigma-Aldrich 社)
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 (NacalaiTesque 社)
PBS	準備工程 MASC 培養工程	供給元規格 (Life Technologies 社)
Dispase II	角膜輪部上皮細胞培養開始工程	供給元規格 (Roche diagnosis 社)
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 (Wako Chemical 社)
塩化カルシウム	準備工程	供給元規格 (Sigma-Aldrich 社)
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
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
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
MitomycinC	MASC 培養工程	日本薬局方
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
生理食塩水	準備工程	日本薬局方

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おり、かつ当施設において受け入れ後に MASC 細胞の品質を確認するための手続きに関する手順書 (KVPC-PMFOPH01-06) に従って品質の確認を行う。FCS は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扱い、供給元よりその品質保証書を入手する。その他の原材料についても、日本薬局方を

除き品質保証書を入手し、品質が確認されたもののみ使用する。また上皮培養用培地については、培養1週目および培養2週目の培養上清として、エンドトキシン及び無菌試験（好気性菌、嫌気性菌、及び真菌の培養試験、マイコプラズマ、HIV, HBV, HCV, ヒトパルボウイルスB19のPCR検査, HTLVのWB検査）に供される。

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以下のとおりである。

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
Fetal Calf Serum (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は以下のとおりである。

名称	添加物	最終濃度
MASC の培地	• -MEM	45ml
	PenicillinG	100unit/ml
	Streptomycin	100µg/ml
	FCS	5ml
MASC マイトマイシン処理用の培地	• -MEM	45ml
	PenicillinG	100unit/ml
	Streptomycin	100µg/ml
	FCS	5ml
	MitomycinC	4µg/ml
角膜輪部上皮細胞の培養用培	D-MEM/F-12	45ml

地	Human recombinant KGF	10ng/ml
	Human recombinant Insulin	10µg/ml
	ハイト [®] ロルチゾン	0.5µg/ml
	トリョート [®] チロニン	2nM
	イソフ [®] ロテレノール	0.25µg/ml
	PenicillinG	100unit/ml
	Streptomycin	100µg/ml
	FCS	2ml
	aprotinin	150 KIU/ml
ヒト角膜輪部上皮シートの包装用 培地	D-MEM/F-12	45ml
	Human recombinant KGF	10ng/ml
	Human recombinant Insulin	10µg/ml
	ハイト [®] ロルチゾン	0.5µg/ml
	トリョート [®] チロニン	2nM
	イソフ [®] ロテレノール	0.25µg/ml
	PenicillinG	100unit/ml
	Streptomycin	100µg/ml

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。

MASC マイトマイシン処理用培地は MASC 培養用培地に MitomycinC を添加したものである。

上皮シートの包装用培地は上皮細胞の培養用培地よりウシ胎児血清を除いたものである。

4. 重要工程及び重要中間体の管理

1. 重要工程

ヒト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

ヒ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 (ALTV)検査、パルボウイルス B19 検査、エントトキシン検査、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°C の薬用保冷庫保存とする。

5. 特性

1. 構成

ヒ角膜輪部上皮由来の重層化した角膜上皮シートである。培養器材であるポリエチレンテレフタレート (PET) 製セルルチャーシート、及びその上に用意されたヒ血清由来フィブリンゲルごと切り出された上皮シートが、ボッシュロビンゲルチャンバー内に輸送用培地に浸漬された状態で供給される。移植手術 1 回当たり、同一ロットの上皮シートが予備含め 2 シート、それぞれチャンバーに入った状態で用意され、この 2 チャンバーが滅菌されたステンレス製容器 1 個に納められて輸送される。

2. 特性

角膜上皮マーカーとしてケラチン 12 が陽性、上皮未分化マーカーとしてケラチン 15 が陽性であり、2 層以上に重層化した上皮シートである。重層扁平上皮由来であるため、本品には表裏(基底層、および基底層以外の分化した層)の区別がある。本品の基底層には角膜上皮の幹細胞を含んでいると考えられ、移植した眼表面で長期にわたり角膜上皮細胞を供給することが期待される。また、本品は分化細胞に由来する強固な細胞・細胞間接着を持ち、シートとして扱いやすい。

6. 原薬の管理

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 12 及びケラチン 15 の免疫染色	抗ケラチン 12 抗体及び抗ケラチン 15 抗体によって染色される。
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	0.4・g/ml 以下

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 12 及びケラチン 15 の免疫染色によって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。

7. 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イングチャンバー(IVC-12)である。材質は容器・栓ともにマクリル酸メチル樹脂 (PMMA) である。このビュイングチャンバーは、オートクレーブ滅菌済みステンレス製容器にクラス 100 安全キャビネット内で格納されて輸送される。

8. 使用法

本製品は生細胞からなるため、保存は室温以上を避け、製造後数時間以内に移植することが望ましい。また、移植直前に容器を開栓することが望ましい。本製品は輸送用培地中に生理活性物質を含むため、これを除去する目的で上皮シートを数回生理食塩水で優しく洗うこと。洗浄後、生理食塩水中で上皮シートの端を鑷子でつまみ、培養器材 (プラスチック) から優しく剥離する。本製品は表裏 (基底層/それ以外の層) の区別があるが、いったん剥離したのちは判別しづらいため注意すること。また本製品は生細胞からなるため、乾燥による細胞死には注意すること。剥離後は培養器材を支えとして眼表面まで輸送し、基底層 (裏面) が下になるように移植する。

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 2012 年 03 月 01 日

承認	確認	作成
坪田一男 印	榛村重人 印	宮下英之 印

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グ、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。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、サノコート 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、安全キャビネットの UV ランプを点灯する。

7.9.2. 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。

7.9.3.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。

7.9.4.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)

トナー角膜輪部組織の品質確認手続きに関する手順書

制定 2009 年 06 月 01 日

施行 2009 年 06 月 01 日

改定案策定 2012 年 03 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	2012/03/01	トナースクリーニング情報確認手順への項目追加	ヒト幹細胞研究新指針に合わせた改正	
03	2012/8/1	文書付番の変更	文書属性の明確化	

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
 - ① ドナー角膜のドナースクリーニング 情報確認手段
 - ② ドナー角膜の微生物検査試験手順
 - ③ 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
9. 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

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。

5.1. 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-QOPH01-002-R01 に結果を記録する。

- 5.1.1. 原因不明の死
- 5.1.2. 原因不明の中樞神経系疾患
- 5.1.3. 活動性ウイルス脳炎および、原因不明の脳炎、進行性脳症
- 5.1.4. 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
- 5.1.5. 細菌、真菌、ウイルス性全身性活動性感染症
- 5.1.6. HIV 抗体、HTLV-1 抗体、HBs 抗原、HCV 抗体が陽性
- 5.1.7. Creutzfeldt-Jakob 病およびその疑い
- 5.1.8. 白血病

5.1.9. 悪性リンパ腫 (Hodgkin 病、非 Hodgkin リンパ腫)

5.1.10. Reye 症候群

5.1.11. 眼内悪性腫瘍

5.2. ドナー角膜の微生物検査試験手順

5.2.1. 検体

検体にはドナー角膜保存液を用いる。

5.2.2. 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。

5.2.3. 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。

5.2.4. 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, パルボウイルス) 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-QOPH01-002-R01 に記録する。

5.3. 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-QOPH01-002-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-QOPH01-002-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-QOPH01-002-R01、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

MASC 細胞の品質を確認するための手続きに関する手順書

制定:2009年6月01日
施行:2009年6月01日
改定案策定:2012年8月01日

承認	確認	作成
坪田一男 印	榛村重人 印	宮下英之 印