

試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号	LE0	文書作成日	2009/7/6
-----	---------	-------	-----	-------	----------

試験成績表

試験項目	試験方法名	合否判定基準		試験結果	合否	判定日および文書番号					
性状	形態観察	敷石状形態である		敷石状形態を示す上皮細胞と、敷石状形態を示さない線維芽細胞が混在する。	否						
性状	形態観察	細胞欠損域がない		細胞欠損域がない。ただし過半を線維芽細胞が占める。	合						
性状	細胞層数測定	3層以上である		1.6層	否						
定量	細胞密度測定	2,000個/mm <sup>2</sup> 以上		4,300個/mm <sup>2</sup>	合						
確認試験	ケラチン3/12免疫染色	ケラチン3/12陽性		陽性	合						
生細胞率	色素排除法	90%以上が染色されない		86%が染色されない	否						
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査	0.4 ug/ml以下		0.65 ug / mL	否						
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV-I (ATLV) プロウイルスDNA (pX)	ヒトパルボウイルスB19DNA	備考
合否判定基準	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養開始時	陰性	陰性	陰性	検査中	0.8 pg/ml以下	陰性(*1)	陰性(*1)	陰性	陰性(*2)	陰性	(*1)検出限界(200E <sup>-</sup> )以下、(*2)PCR増幅、内部コントロール増幅ともになし
上皮培養1週目	陰性	陰性	陰性	検査中	0.8 pg/ml以下	陰性(*1)	陰性(*1)	陰性	陰性(*2)	陰性	
出荷時	陰性	陰性	陰性	検査中	0.8 pg/ml以下	陰性(*1)	陰性(*1)	陰性	検査中	陰性	

追補情報

項目	内容	文書番号
	上皮播種時フィーダー	交換用フィーダー
MASCロット	090609 MASC-022	090609 MASC-021
MASC解凍時細胞数	living: 4.9x10 <sup>5</sup> , dead: 1.9x10 <sup>5</sup> , total: 6.8x10 <sup>5</sup>	living: 5.4x10 <sup>5</sup> , dead: 4.1x10 <sup>5</sup> , total: 9.5x10 <sup>5</sup>
MASC解凍時生存率	72%	57%
ドナー角膜ロット	09-1306-OSCN	
ドナー年齢	51	
ドナー性別	Female	
ドナー死亡時刻 (time of death)	6/8/2009, 0025	
ドナー摘出時刻 (preservation)	6/8/2009, 0740	
ドナー死因 (Primary COD)	Cancer-Breast	
ドナー供給組織	SightLife, Seattle, WA, USA	
角膜上皮細胞回収時細胞数	3.3x10 <sup>5</sup>	
角膜上皮細胞回収時生存率	81%	
角膜上皮細胞播種数(1ウェルあたり)、およびウェル数	10 <sup>5</sup> /well, 3 well	
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数	コンフルエントに達せず	
角膜上皮細胞培養日数	14 days	
細胞生存率測定時の上皮細胞数	living: 1.4x10 <sup>5</sup> , dead: 4x10 <sup>4</sup> , total: 1.8x10 <sup>5</sup>	
その他備考	ドナー角膜CFE: 0.33% (10 <sup>3</sup> 個播種中上皮コロニー2個、3個、5個)	

作成者	確認者	承認者	記録様式	正改定年月日
宮下			KVPC-PMFOPH01-002-R01-01	2009/6/16

試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号	LE#1	文書作成日	2009/8/20
-----	---------	-------	------	-------	-----------

試験成績表											
試験項目	試験方法名		合否判定基準		試験結果				合否	備考	
性状	形態観察		敷石状形態である		敷石状形態である				合格		
性状	形態観察		細胞欠損域がない		細胞欠損域を認める				不合格		
性状	細胞層数測定		3層以上である		2.5層				不合格		
定量	細胞密度測定		2,000個/mm <sup>2</sup> 以上		4046個/mm <sup>2</sup>				合格		
確認試験	ケラチン3/12免疫染色		ケラチン3/12陽性		ケラチン3/12陽性				合格		
生細胞率	色素排除法		90%以上が染色されない		92%の細胞がトリパンブルーに染色されない				合格		
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査		0.4 ug/ml以下		0.12 ug/ml				合格		
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV- I (ATLV) プロウイルス DNA (pX	ヒトヘルペウイルス B19DNA	
合否判定基準	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	合否
上皮培養開始時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	合格
上皮培養1週目	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	合格
出荷時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	合格

追補情報			
項目	内容		備考
	上皮播種時フィーダー		交換用フィーダー
MASCロット	090609 MASC-020		090609 MASC-019
MASC解凍時細胞数	9.7×10 <sup>5</sup>		1.15×10 <sup>6</sup>
MASC解凍時生存率	92%		87%
ドナー角膜ロット	09-1531-ODCN		
ドナー年齢	71		
ドナー性別	Female		
ドナー死亡時刻 (time of death)	2009年7月3日, 0235		
ドナー摘出時刻 (preservation)	2009年7月3日, 1058		
ドナー死因 (COD)	Congestive Heart Failure		
ドナー供給組織	Sight Life		
角膜上皮細胞回収時細胞数	3.4×10 <sup>5</sup>		
角膜上皮細胞回収時生存率	91%		
角膜上皮細胞播種数(1ウェルあたり)、およびウェル数	1.1×10 <sup>5</sup> /inserts, x 3 well		
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数	5日でほぼコンフルエント、ただしその後14日まで細胞の無い領域が認められる		
角膜上皮細胞培養日数	14日		
細胞生存率測定時の上皮細胞数	4.3×10 <sup>5</sup>		
その他備考	培養開始日: 2009/7/13		

作成者	確認者	承認者	記録様式	改定年月日
			KVPC-PMFOPH01-002-R01-01	2009/6/16

試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号	LE#2	文書作成日	
-----	---------	-------	------	-------	--

試験成績表

試験項目	試験方法名	合否判定基準	試験結果							合否	判定日および文書番号
性状	形態観察	敷石状形態である	主な細胞は敷石状形態を示す。ただし線維芽細胞に占有される箇所も認める。							不合格	
性状	形態観察	細胞欠損域がない	上皮様細胞は約8割、他に線維芽細胞や細胞欠損域を認める							不合格	
性状	細胞層数測定	3層以上である	2.6層							不合格	
定量	細胞密度測定	2,000個/mm <sup>2</sup> 以上									性状試験で不合格のため測定せず
確認試験	ケラチン3/12免疫染色	ケラチン3/12陽性	陽性細胞を認める							合格	
生細胞率	色素排除法	90%以上が染色されない									性状試験で不合格のため測定せず
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査	0.4 ug/ml以下									性状試験で不合格のため測定せず
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV-I (ATLV) プロウイルス DNA (pX)	ヒトヘルペスウイルス B19DNA	文書番号
合否判定基準	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養開始時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/ml以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養1週目	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/ml以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
出荷時	検査せず	検査せず	検査せず	検査せず	検査せず	検査せず	検査せず	検査せず	検査せず	検査せず	不合格のため測定せず

追補情報

項目	内容	文書番号
	上皮播種時フィーダー	交換用フィーダー
MASCロット	090609 MASC-018	090609 MASC-017
MASC解凍時総細胞数	1.55×10 <sup>6</sup>	1.63×10 <sup>6</sup>
MASC解凍時生存率	86.2%	89.0%
ドナー角膜ロット	09-1785-ODCN	
ドナー年齢	60	
ドナー性別	Female	
ドナー死亡時刻 (time of death)	8/3/2009 05:30	
ドナー摘出時刻 (preservation)	8/3/2009 15:25	
ドナー死因 (COD)	Gastrointestinal Bleed	
ドナー供給組織	SightLife	
角膜上皮細胞回収時総細胞数	2.76×10 <sup>5</sup>	
角膜上皮細胞回収時生存率	83%	
角膜上皮細胞播種数 (1ウェルあたり)、およびウェル数	0.77×10 <sup>5</sup> /well、3ウェル	
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数	コンフルエントに達せず	
角膜上皮細胞培養日数	14日	
細胞生存率測定時の上皮細胞数	測定せず	
その他備考	2009/8/12培養開始	

作成者	確認者	承認者	記録様式	正改定年月日
			KVPC-PMFOPH01-002-R01-01	2009/6/16

試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号	LE3	文書作成日	
-----	---------	-------	-----	-------	--

試験成績表											
試験項目	試験方法名		合否判定基準		試験結果				合否	判定日および文書番号	
性状	形態観察		敷石状形態である		敷石状形態である				合格		
性状	形態観察		細胞欠損域がない		細胞欠損域がない				合格		
性状	細胞層数測定		3層以上である		2.4層				不合格	但し1層の部分は無く、全体にわたり2-3層に重層	
定量	細胞密度測定		2,000個/mm <sup>2</sup> 以上		7970/mm <sup>2</sup>				合格		
確認試験	ケラチン3/12免疫染色		ケラチン3/12陽性		ケラチン3/12陽性				合格		
生細胞率	色素排除法		90%以上が染色されない		88%以上が染色されない				不合格	ただし、生細胞率はほぼ90%であり、移植に耐えるものと判断される	
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査		0.4 ug/ml以下		0.27 ug/mL				合格		
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV-I (ATLV) フロウイルス DNA (pX)	ヒトパルボウイルス B19DNA	その他特記事項
合否判定基準	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養開始時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056EU/ml以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養1週目	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056EU/ml以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
出荷時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056EU/ml以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	

追補情報												
項目	内容										その他特記事項	
MASC	上皮播種用フィーダー				交換用フィーダー							
MASCロット	090609 MASC-015				同時に播種							
MASC解凍時総細胞数	1.40×10 <sup>6</sup>				同時に播種							
MASC解凍時生存率	91.40%				同時に播種							
ドナー角膜ロット	09-2315-ODCN					ドナー年齢	52					
ドナー死因(COD)	Cerebral Vascular Accident					ドナー性別	Male					
死亡時刻(time of death)	2009/10/10 20:35					供給組織	SightLife					
摘出時刻(preservation)	2009/10/11 3:45											
角膜上皮細胞培養開始日	2009/10/21											
角膜上皮細胞回収時総細胞数	1.11×10 <sup>6</sup> (生細胞8.4×10 <sup>5</sup> )											
角膜上皮細胞回収時生存率	75.40%											
ウェルあたり上皮細胞播種数およびウェル数	生細胞2.8×10 <sup>5</sup> 個/ウェル					ウェル数	3					
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数	10日(ただし13日でも一部シートに欠損認める)											
角膜上皮細胞培養日数	14日											
細胞生存率測定時の上皮細胞数	総細胞数3.7×10 <sup>4</sup> 個、生細胞数3.3×10 <sup>4</sup> 個 / 0.28cm <sup>2</sup> 径6ミリトラン(0.3×0.3×3.14)											
上皮コロニー形成率	測定せず											
上皮シートコロニー形成率	測定せず											

作成者	確認者	承認者	記録様式	正改定年月日
			KVPC-PMFOPH01-002-R01-02	2009/6/16

試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号	LE4	文書作成日	
-----	---------	-------	-----	-------	--

試験成績表											
試験項目	試験方法名		合否判定基準		試験結果				合否	判定日および文書番号	
性状	形態観察		敷石状形態である		敷石状形態である				合格		
性状	形態観察		細胞欠損域がない		細胞欠損域がない				合格		
性状	細胞層数測定		3層以上である		2.2層				不合格	但し、ほとんどの部分は2層、場所によっては3層に重層	
定量	細胞密度測定		2,000個/mm <sup>2</sup> 以上		3353/mm <sup>2</sup>				合格		
確認試験	ケラチン3/12免疫染色		ケラチン3/12陽性		ケラチン3/12陽性				合格		
生細胞率	色素排除法		90%以上が染色されない		88%以上が染色されない				不合格	但し、生細胞率はほぼ90%であり、移植に耐えうると判断される	
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査		0.4 ug/ml以下		0.592 ug/mL				不合格		
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV-I(ATLV)プロウイルスDNA (pX)	ヒトパルボウイルスB19DNA	その他特記事項
	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/ml以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/ml以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/ml以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	

追補情報											
項目	内容									その他特記事項	
MASC											
MASCロット	090609 MASC-014										
MASC解凍時細胞数	総細胞数1.37×10 <sup>6</sup> 個、生細胞数1.27×10 <sup>6</sup> 個										
MASC解凍時生存率	92.70%										
ドナー角膜ロット	10-1346-ODCN				ドナー年齢	70					
ドナー死因(COD)	Pulmonary Edema				ドナー性別	Male					
死亡時刻(time of death)	2010/5/29 0044				供給組織	SightLife					
摘出時刻(preservation)	2010/5/29 0500										
角膜上皮細胞培養開始日	2010/6/9										
角膜上皮細胞回収時細胞数	5.56×10 <sup>5</sup>										
角膜上皮細胞回収時生存率	97.30%										
ウェルあたり上皮細胞播種数およびウェル数	1.8×10 <sup>5</sup>				ウェル数						3
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数										14	
角膜上皮細胞培養日数										14	
細胞生存率測定時の上皮細胞数	生細胞8.4×10 <sup>4</sup> 個、総細胞数9.5×10 <sup>4</sup> 個/4.4cm <sup>2</sup> (5-0.3×0.3×3.14×2)										
上皮コロニー形成率	測定せず										
上皮シートコロニー形成率	測定せず										

作成者	確認者	承認者	記録様式	正改定年月日
			KVPC-PMFOPH01-002-R01-02	2009/6/16

試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号	LE#5	文書作成日	2011/2/14
-----	---------	-------	------	-------	-----------

試験成績表											
試験項目	試験方法名		合否判定基準		試験結果				合否	判定日および文書番号	
性状	形態観察		敷石状形態である		敷石状である				合格		
性状	形態観察		細胞欠損域がない		細胞欠損域を示さない				合格		
性状	細胞層数測定		細胞が重層する		2.4層				合格		
定量	細胞密度測定		2,000個/mm <sup>2</sup> 以上		3160個/mm <sup>2</sup>				合格		
確認試験	ケラチン3/12免疫染色		ケラチン3/12陽性		陽性細胞を認める				合格		
生細胞率	色素排除法		90%以上が染色されない		99.00%				合格		
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査		0.4 ug/ml以下							微生物検査陽性のため検査中止	
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV-I (ATLV) プロウイルス DNA (pX)	ヒトヘルペスウイルス B19DNA	その他特記事項
合否判定基準	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養開始時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0063EU/mL	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	ヘルペスウイルス陽性のため移植中止
上皮培養1週目	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
出荷時	検査中止	検査中止	検査中止	検査中止	検査中止	検査中止	検査中止	検査中止	検査中止	検査中止	微生物検査陽性のため検査中止

追補情報												
項目	内容										その他特記事項	
MASC	上皮播種用フィーダー				交換用フィーダー							
MASCロット	090609 MASC-013				播種用と同一							
MASC解凍時総細胞数	1.81×10 <sup>6</sup>											
MASC解凍時生存率	92.20%											
ドナー角膜ロット	AAB-620-ODCN					ドナー年齢	60					
ドナー死因 (COD)	Congestive Heart Failure					ドナー性別	Male					
死亡時刻 (time of death)	1/11/2011 00:19					供給組織	SightLife					
摘出時刻 (preservation)	1/11/2011 14:23											
角膜上皮細胞培養開始日	2011/1/20											
角膜上皮細胞回収時総細胞数	総細胞数5.97×10 <sup>5</sup> 、生細胞数5.3×10 <sup>5</sup>											
角膜上皮細胞回収時生存率	88.8%											
ウェルあたり上皮細胞播種数およびウェル数	生細胞数1.77×10 <sup>5</sup>					ウェル数	3					
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数	12~14日											
角膜上皮細胞培養日数	14日											
細胞生存率測定時の上皮細胞総数	4.46×10 <sup>5</sup> / 4.43cm <sup>2</sup> (5cm <sup>2</sup> -0.3*0.3*3.14*2)											
上皮コロニー形成率	測定せず											
上皮シートコロニー形成率	測定せず											

作成者	確認者	承認者	記録様式	正改定年月日
			KVPC-PMFOPH01-002-R01-02	2009/6/16

試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号		文書作成日	
-----	---------	-------	--	-------	--

試験成績表

試験項目	試験方法名	合否判定基準	試験結果				合否	備考			
性状	形態観察	敷石状形態である	敷石状形態である				合格				
性状	形態観察	細胞欠損域がない	細胞欠損域はなくなると見込まれる				条件付き合格	移植2日前で90%コンフルエント			
性状	細胞層数測定	3層以上である	重層を認める				合格				
定量	細胞密度測定	2,000個/mm <sup>2</sup> 以上	4026個/mm <sup>2</sup>				合格				
確認試験	ケラチン3/12免疫染色	ケラチン3/12陽性	ケラチン3/12陽性細胞を認める				合格				
生細胞率	色素排除法	90%以上が染色されない	90.1%が染色されない				合格				
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査	0.4 ug/ml以下	0.03ug/mL				合格				
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV-I (ATLV) プロウイルスDNA (pX)	ヒトパルボウイルスB19DNA	その他特記事項
合否判定基準	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養開始時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養1週目	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
出荷時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	

追補情報

項目	内容				その他特記事項
MASC	上皮播種用フィーダー		交換用フィーダー		
MASCロット	090606 MASC-012		播種用と同一		
MASC解凍時細胞数	総細胞数1.4×10 <sup>6</sup> 、生細胞数1.3×10 <sup>6</sup>				
MASC解凍時生存率	92.89%				
ドナー角膜ロット	AAC-061-OSCN		ドナー年齢	48	
ドナー死因(COD)	Myocardial Infarction		ドナー性別	Female	
死亡時刻(time of death)	2011/2/16 17:30		供給組織	SightLife	
摘出時刻(preservation)	2011/2/17 17:10				
角膜上皮細胞培養開始日	2011/2/24				
角膜上皮細胞回収時細胞数	総細胞数6.5×10 <sup>5</sup> 、生細胞数6.4×10 <sup>5</sup>				
角膜上皮細胞回収時生存率	98.20%				
ウェルあたり上皮細胞播種数およびウェル数	生細胞数2.1×10 <sup>5</sup> 個/ウェル		ウェル数	3	
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数	14日				
角膜上皮細胞培養日数	14日				
細胞生存率測定時の上皮細胞数	総細胞数5.6×10 <sup>5</sup> 、生細胞数5.0×10 <sup>5</sup> / 4.43cm <sup>2</sup> (5cm <sup>2</sup> -0.3*0.3*3.14*2)				
上皮コロニー形成率	測定せず				
上皮シートコロニー形成率	測定せず				

作成者	確認者	承認者	記録様式	正改定年月日
			KVPC-PMFOPH01-002-R01-02	2009/6/16

試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号	LE7	文書作成日	2011.12.20
-----	---------	-------	-----	-------	------------

試験成績表

試験項目	試験方法名	合否判定基準	試験結果							合否	備考
性状	形態観察	敷石状形態である	敷石状形態である							合格	
性状	形態観察	細胞欠損域がない	細胞欠損域がない							合格	
性状	細胞層数測定	重層する	重層を認める							合格	
定量	細胞密度測定	2,000個/mm <sup>2</sup> 以上	5306個/mm <sup>2</sup>							合格	
確認試験	ケラチン3/12免疫染色	ケラチン3/12陽性	ケラチン3/12陽性細胞を認める							合格	
生細胞率	色素排除法	90%以上が染色されない	91.6%が染色されない							合格	
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査	0.4 ug/ml以下	0.07ug/mL							合格	
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV-I(ATLV)プロウイルスDNA (pX)	ヒトヘルペウイルスB19DNA	その他特記事項
合否判定基準	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養開始時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養1週目	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
出荷時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	

追補情報

項目	内容							その他特記事項
MASC	上皮播種用フィーダー			交換用フィーダー				
MASCロット	090606 MASC-010			播種用と同一				
MASC解凍時細胞数	総細胞数1.45×10 <sup>6</sup> 、生細胞数1.33×10 <sup>6</sup>							
MASC解凍時生存率	91.20%							
ドナー角膜ロット	AAC-196-ODCN				ドナー年齢	54		
ドナー死因(COD)	Anoxic Encephalopathy			ドナー性別	Female			
死亡時刻(time of death)	2011/10/26 16:24			供給組織	SightLife			
摘出時刻(preservation)	2011/10/26 22:40							
角膜上皮細胞培養開始日	2011/11/2							
角膜上皮細胞回収時細胞数	総細胞数4.8×10 <sup>5</sup> 、生細胞数4.1×10 <sup>5</sup>							
角膜上皮細胞回収時生存率	86.50%							
ウェルあたり上皮細胞播種数およびウェル数	生細胞数1.3×10 <sup>5</sup> 個/ウェル			ウェル数	3			
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数	14日							
角膜上皮細胞培養日数	14日							
細胞生存率測定時の上皮細胞数	総細胞数4.3×10 <sup>5</sup> 、生細胞数3.95×10 <sup>5</sup> / 3.87cm <sup>2</sup> (5cm <sup>2</sup> -0.3*0.3*3.14*4)							
上皮コロニー形成率	測定せず							
上皮シートコロニー形成率	測定せず							

作成者	確認者	承認者	記録様式	正改定年月日
			KVPC-PMFOPH01-002-R01-02	2009/6/16



試験成績書

製品名	角膜上皮シート	ロット番号	LE#8	文書作成日	2013.1.28
-----	---------	-------	------	-------	-----------

試験成績表											
試験項目	試験方法名		合否判定基準		試験結果				合否	その他特記事項	
性状	形態観察		敷石状形態である		敷石状形態である				合格		
性状	形態観察		細胞欠損域がない		細胞欠損域を認めない				合格		
性状	細胞層数測定		重層する		重層する				合格		
定量	細胞密度測定		2,000個/mm <sup>2</sup> 以上		3893個/mm <sup>2</sup>				合格		
確認試験	ケラチン12/ケラチン15免疫染色		K12陽性、K15陽性		K12陽性、K15陽性				合格	並行して行った免疫染色によればK3も陽性	
生細胞率	色素排除法		90%以上が染色されない		77%				不合格		
ウシ血清濃度	アルブミン濃度検査		0.4 ug/ml以下		0.12 ug/mL				合格		
微生物検査	好気性菌	嫌気性菌	真菌	マイコプラズマ	エンドトキシン	HCV(リアルタイムPCR)	HBV(リアルタイムPCR)	HIV-1RNA定量	HTLV-I(ATLV)(WB法)	ヒトパルボウイルスB19DNA	その他特記事項
合否判定基準	陰性	陰性	陰性	陰性	25 EU/ml	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養開始時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
上皮培養1週目	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	
出荷時	陰性	陰性	陰性	陰性	0.0056 EU/mL以下	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	

追補情報												
項目	内容									その他特記事項		
MASC	上皮播種用フィーダー			交換用フィーダー								
MASCロット	090609 MASC-009			交換なし								
MASC解凍時細胞数	9.5x10 <sup>5</sup>											
MASC解凍時生存率	87.30%											
ドナー角膜ロット	AAJ-880 ODCN				ドナー年齢		43					
ドナー死因(COD)	EtOH cirrhosis				ドナー性別		Male					
死亡時刻(time of death)	2012/11/17 5:50				供給組織		SightLife					
摘出時刻(preservation)	2012/11/17 15:00											
角膜上皮細胞培養開始日	2012/11/28											
角膜上皮細胞回収時細胞数	3.8x10 <sup>5</sup>											
角膜上皮細胞回収時生存率	90.76%											
ウェルあたり上皮細胞播種数およびウェル数	1.2x10 <sup>5</sup>				ウェル数		3					
角膜上皮細胞コンフルエントまでの日数	11											
角膜上皮細胞培養日数	21											
細胞生存率測定時の上皮細胞数	2.0x10 <sup>5</sup> /inserts											

作成者	確認者	承認者	記録様式	正改定年月日
			KVPC-GOPH01-001-R01-00	2012/8/1

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ン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、  
 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、角膜上皮スチム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	FR06	-150℃超低温フリーザー	SANYO	MDF-1155A	細胞保存室

温フリーザー				TN	
安全キャビネット	BSC01	BIOLOGICAL SAFETY CABINET	SANYO	MHE-130AB3	P2 ルーム 1
サノコート EX システム	EX01	サノコート 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	CO2INCUBATOR	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)、 $\alpha$ -MEM(45ml)、H<sub>2</sub>O(5ml)、0,02%DETA(10ml)、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)、hEGF(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 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 $\mu$ l)

操作管理項目:ロット付番(施設内ロット番号)、ラベルリング(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 $\mu$ 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℃ $\pm$ 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)、サコト 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、サコト 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)、サコト 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:CO<sub>2</sub>濃度 5.0%±0.5%(フラインド測定)、

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:CO<sub>2</sub>濃度 5.0%±0.5%(フラインド測定)、

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)[P1 ライ室から P2 ルーム 1]

ト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:ト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]

ト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%(ワイライト測定)、

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: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)。

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)。

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)、7 $\beta$ 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)、hEGF(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 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 $\mu$ 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。ボルヒール(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  $\mu$ 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:サコード EX システム (EX01/細胞保存室)

サコード 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。細胞搬入の手續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°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續きに関する手順書(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

#### ト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)

ト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、細胞調整室でトナー角膜の入った容器を受け取り、ト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 フロウイルス、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 フロウイルス、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 フロウイルス、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

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
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
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 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
□-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 <sub>2</sub> 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, □-MEM, Recombinant human EGF, Insulin, PBS, Dispase II, 0.02%EDTA, 脱イオン蒸留水 (H<sub>2</sub>O), 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。

## 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
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		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	□-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	□-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