【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】令和7年1月7日(2025.1.7)

【公開番号】特開2023-139164(P2023-139164A)
【公開日】令和5年10月3日(2023.10.3)
【年通号数】公開公報(特許)2023-186
【出願番号】特願2023-119210(P2023-119210)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　1/04(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　5/071(2010.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　1/04
Ｃ１２Ｎ　5/071

【手続補正書】
【提出日】令和6年12月23日(2024.12.23)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）の含有量が形質転換を引き起こす濃度未満である培地を用いて増殖させたヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞であって、該ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）の含有量が形質転換を引き起こす濃度未満である培地を用いて増殖及び／又は分化・成熟させて得た細胞集団のＦＡＣＳによる純度試験結果が以下の範囲
$CD166^{+}$＞９９％
$CD24^{+}$＜５％
$CD44^{high}$＜５％
$CD44^{neg\sim low}$＞９０％
$CD90^{+}$＜５％
を全て満たすヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、以下に挙げる（ａ）～（ｄ）のいずれか１つ又は複数の条件を満たす時期に採取し、懸濁状態にして保存することを特徴とするヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞の保存方法。
（ａ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、紡錘状の形態から長径短径の比が１に近い多角形状又は円形状の形態に転じた直後から、細胞間の境界が不明瞭になる直前までの期間である。
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が直近の継代後にみられる最大値の半分以下になった時からプラトーに達するまでの期間である。
（ｃ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が、９００ｃｅｌｌｓ／mm^2以上２５００ｃｅｌｌｓ／mm^2以下である。
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／mm^2以上５００ｃｅｌｌｓ／mm^2以下の細胞密度で播種した場合において、直近の継代からの培養日数が、４日以上１４日以下である。
【請求項２】
ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）を非添加の培地を用いて増殖させたヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、以下に挙げる（ａ）～（ｄ）

のいずれか１つ又は複数の条件を満たす時期に採取し、懸濁状態にして保存することを特徴とするヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞の保存方法。
（ａ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、紡錘状の形態から長径短径の比が１に近い多角形状又は円形状の形態に転じた直後から、細胞間の境界が不明瞭になる直前までの期間である。
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が直近の継代後にみられる最大値の半分以下になった時からプラトーに達するまでの期間である。
（ｃ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が、９００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上２５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下である。
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種した場合において、直近の継代からの培養日数が、４日以上１４日以下である。
【請求項３】
ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）の含有量が形質転換を引き起こす濃度未満である培地を用いて増殖させたヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞であって、該ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）の含有量が形質転換を引き起こす濃度未満である培地を用いて増殖及び／又は分化・成熟させて得た細胞集団のＦＡＣＳによる純度試験結果が以下の範囲
ＣＤ１６６$^+$＞９９％
ＣＤ２４$^+$＜５％
ＣＤ４４^{high}＜５％
ＣＤ４４$^{neg\sim low}$＞９０％
ＣＤ９０$^+$＜５％
を全て満たすヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、以下に挙げる（ａ）～（ｄ）のいずれか１つ又は複数の条件を満たす時期に採取し、懸濁状態にすることを特徴とする、ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞の懸濁液調製方法。
（ａ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、不規則な細長い突起を持つ紡錘状の線維芽細胞様の形態から前記突起を含めた長径短径の比が１に近い敷石状の形態に転じた直後から、細胞間の境界が不明瞭になる直前までの期間である。
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が直近の継代後にみられる最大値の半分以下になった時からプラトーに達するまでの期間である。
（ｃ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が、９００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上２５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下である。
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種した場合において、直近の継代からの培養日数が、４日以上１４日以下である。
【請求項４】
ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）を非添加の培地を用いて増殖させたヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、以下に挙げる（ａ）～（ｄ）のいずれか１つ又は複数の条件を満たす時期に採取し、懸濁状態にすることを特徴とする、ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞の懸濁液調製方法。
（ａ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、不規則な細長い突起を持つ紡錘状の線維芽細胞様の形態から前記突起を含めた長径短径の比が１に近い敷石状の形態に転じた直後から、細胞間の境界が不明瞭になる直前までの期間である。
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が直近の継代後にみられる最大値の半分以下になった時からプラトーに達するまでの期間である。
（ｃ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が、９００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上２５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下である。
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種

した場合において、直近の継代からの培養日数が、４日以上１４日以下である。
【請求項５】
ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）の含有量が形質転換を引き起こす濃度未満である培地を用いて増殖させたヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞であって、該ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）の含有量が形質転換を引き起こす濃度未満である培地を用いて増殖及び／又は分化・成熟させて得た細胞集団のＦＡＣＳによる純度試験結果が以下の範囲
ＣＤ１６６$^{+}$＞９９％
ＣＤ２４$^{+}$＜５％
ＣＤ４４^{high}＜５％
ＣＤ４４$^{neg\sim low}$＞９０％
ＣＤ９０$^{+}$＜５％
を全て満たすヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、以下に挙げる（ａ）～（ｄ）のいずれか１つ又は複数の条件を満たす時期に採取し、継代することを特徴とする、ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞の培養方法。
（ａ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、不規則な細長い突起を持つ紡錘状の線維芽細胞様の形態から、長径短径の比が１に近い敷石状の形態に転じた直後から、細胞間の境界が不明瞭になる直前までの期間である。
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が直近の継代後にみられる最大値の半分以下になった時からプラトーに達するまでの期間である。
（ｃ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が、９００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上２５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下である。
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種した場合において、直近の継代からの培養日数が、４日以上１４日以下である。
【請求項６】
ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）を非添加の培地を用いて増殖させたヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、以下に挙げる（ａ）～（ｄ）のいずれか１つ又は複数の条件を満たす時期に採取し、継代することを特徴とする、ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞の培養方法。
（ａ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、不規則な細長い突起を持つ紡錘状の線維芽細胞様の形態から、長径短径の比が１に近い敷石状の形態に転じた直後から、細胞間の境界が不明瞭になる直前までの期間である。
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が直近の継代後にみられる最大値の半分以下になった時からプラトーに達するまでの期間である。
（ｃ）前記ヒト角膜内皮細胞及び／又は前記ヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が、９００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上２５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下である。
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種した場合において、直近の継代からの培養日数が、４日以上１４日以下である。
【請求項７】
培養したヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞であって、該ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）の含有量が形質転換を引き起こす濃度未満である培地を用いて増殖及び／又は分化・成熟させて得た細胞集団のＦＡＣＳによる純度試験結果が以下の範囲
ＣＤ１６６$^{+}$＞９９％
ＣＤ２４$^{+}$＜５％
ＣＤ４４^{high}＜５％
ＣＤ４４$^{neg\sim low}$＞９０％
ＣＤ９０$^{+}$＜５％
を全て満たすヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を保存する方法であって

、
複数のヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞を得る工程と、
前記複数の細胞の少なくとも一部を分離して、評価用の細胞集団と保存用の細胞集団を生成する工程と、
前記細胞集団の少なくとも一部を、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の評価基準うちの１つ以上について評価する工程と、
（ａ）ヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、紡錘形から、（ｉ）多角形または（ｉｉ）長軸と短軸の比が１に近い楕円形のいずれかに変化し、かつ細胞間の境界がはっきりしている細胞を特定するものである、
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が、直前の継代後に観察された最大値の半分以下のレベルでＣＤ４４を発言した後、一定量のＣＤ４４を発現する細胞を特定するものである、
（ｃ）ヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が９００個／ｍｍ^{2}以上２５００個／ｍｍ^{2}以下であることを識別するものである、及び
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種した場合において、前記評価から直前の継代までの期間が４日以上１４日以下であるかどうかを特定するものである。
評価用の細胞集団が、前記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）のいずれかの評価基準を１つ以上満たしている場合に、細胞集団から少なくとも一部の細胞を保存するために保存媒体に配置する工程と、を備える保存方法。
【請求項８】
ＥＧＦを非添加の培地で培養したヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞を保存する方法であって、
複数のヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞を得る工程と、
前記複数の細胞の少なくとも一部を分離して、評価用の細胞集団と保存用の細胞集団を生成する工程と、
前記細胞集団の少なくとも一部を、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の評価基準うちの１つ以上について評価する工程と、
（ａ）ヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、紡錘形から、（ｉ）多角形または（ｉｉ）長軸と短軸の比が１に近い楕円形のいずれかに変化し、かつ細胞間の境界がはっきりしている細胞を特定するものである、
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が、直前の継代後に観察された最大値の半分以下のレベルでＣＤ４４を発言した後、一定量のＣＤ４４を発現する細胞を特定するものである、
（ｃ）ヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が９００個／ｍｍ^{2}以上２５００個／ｍｍ^{2}以下であることを識別するものである、及び
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種した場合において、前記評価から直前の継代までの期間が４日以上１４日以下であるかどうかを特定するものである。
評価用の細胞集団が、前記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）のいずれかの評価基準を１つ以上満たしている場合に、細胞集団から少なくとも一部の細胞を保存するために保存媒体に配置する工程と、を備える保存方法。
【請求項９】
培養したヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞であって、該ヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を、ＲＯＣＫ阻害剤を含有し、かつ上皮成長因子（ＥＧＦ）の含有量が形質転換を引き起こす濃度未満である培地を用いて増殖及び／又は分化・成熟させて得た細胞集団のＦＡＣＳによる純度試験結果が以下の範囲
$CD166^{+}$＞９９％
$CD24^{+}$＜５％
$CD44^{high}$＜５％
$CD44^{neg\sim low}$＞９０％
$CD90^{+}$＜５％

を全て満たすヒト角膜内皮細胞及び／又はヒト角膜内皮前駆細胞を処理する方法であって、
複数のヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞を、培養液を含む培養容器内で培養する工程と
前記複数のヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の少なくとも一部を分離して、評価用の細胞集団と残りの細胞集団とを生成する工程と、
細胞集団の少なくとも一部を、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の評価基準の１つ以上について評価する工程と、
（ａ）ヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、紡錘形から、（ｉ）多角形または（ｉｉ）長軸と短軸の比が１に近い楕円形のいずれかに変化し、かつ細胞間の境界がはっきりしている細胞を特定するものである、
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が、直前の継代後に観察された最大値の半分以下のレベルでＣＤ４４を発言した後、一定量のＣＤ４４を発現する細胞を特定するものである、
（ｃ）ヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が９００個／ｍｍ^{2}以上２５００個／ｍｍ^{2}以下であることを識別するものである、及び
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種した場合において、前記評価から直前の継代までの期間が４日以上１４日以下であるかどうかを特定するものである。
前記評価用の細胞集団が前記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の評価基準のうち１つ以上を満たしている場合に、細胞集団から細胞の少なくとも一部を保存するために保存媒体に配置する工程、または前記評価用の細胞集団が（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の各評価基準を満たさない場合に、培養液を含む培養容器に前記残りの細胞集団から少なくとも一部の細胞を入れて、さらに一定期間培養する工程と、を含む処理方法。
【請求項１０】
ＥＧＦを非添加の培地で培養したヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞を処理する方法であって、
複数のヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞を、ＥＧＦを非添加の培養液を含む培養容器内で培養する工程と
前記複数のヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の少なくとも一部を分離して、評価用の細胞集団と残りの細胞集団とを生成する工程と、
細胞集団の少なくとも一部を、以下の（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の評価基準の１つ以上について評価する工程と、
（ａ）ヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の形態が、紡錘形から、（ｉ）多角形または（ｉｉ）長軸と短軸の比が１に近い楕円形のいずれかに変化し、かつ細胞間の境界がはっきりしている細胞を特定するものである、
（ｂ）ＣＤ４４の発現量が、直前の継代後に観察された最大値の半分以下のレベルでＣＤ４４を発言した後、一定量のＣＤ４４を発現する細胞を特定するものである、
（ｃ）ヒト角膜内皮細胞および／またはヒト角膜内皮前駆細胞の細胞密度が９００個／ｍｍ^{2}以上２５００個／ｍｍ^{2}以下であることを識別するものである、及び
（ｄ）３００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以上５００ｃｅｌｌｓ／ｍｍ^{2}以下の細胞密度で播種した場合において、前記評価から直前の継代までの期間が４日以上１４日以下であるかどうかを特定するものである。
前記評価用の細胞集団が前記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の評価基準のうち１つ以上を満たしている場合に、細胞集団から細胞の少なくとも一部を保存するために保存媒体に配置する工程、または前記評価用の細胞集団が（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）の各評価基準を満たさない場合に、培養液を含む培養容器に前記残りの細胞集団から少なくとも一部の細胞を入れて、さらに一定期間培養する工程と、を含む処理方法。