

## 殺菌灯(UV灯)の効果

- ・ 紫外線による殺菌の原理は、細菌細胞内にエネルギーの大きい紫外線が吸収されて、核蛋白構造が変化し、細菌生命の維持や新陳代謝に障害をきたし、死滅すると考えられている。紫外線で発生するオゾンの量は僅かである。
- ・ 殺菌作用は波長253.7nm付近が最も強く、その殺菌力は直射日光にも含まれている波長350nmの紫外線の約1,600倍にも達する。
- ・ UV灯の寿命は、一般的に6000~8000時間とされている。1日12時間使用すると、500~650日で規定の出力は出なくなる。
- ・ 殺菌効果があるのは、ランプから1m以内まで。殺菌効果は、距離の二乗に反比例する。また、反射光は効果が大きく下がる。
- ・ バスボックス内のUV灯は、物が何も入っていない状態でバスボックス内の殺菌を目的としている。

平成23年度 細胞育成学実践論

## ろ過滅菌の完全性試験

腿蝦蟇糞炎  
(バクテリアチャレンジテスト)

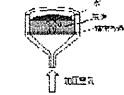
薬液ろ過：フィルター孔径；0.2 $\mu$ m  
フィルターの性能を保証推定する非破壊試験。  
大きさのわかっている細菌を濾過して、その漏れの程度によって膜の細孔径を決定する方法。

公称孔径 0.22 $\mu$ mを決める指標菌 (Pseudomonas diminuta)、  
および 0.45 $\mu$ mを決める指標菌 (Serratia marcescens)  
(いずれも1.5:1の長さ：径比をもつ短桿菌)が決められる。

平成23年度 細胞育成学実践論

バブルポイント法：

精密濾過膜をよく濡らす液体（水またはアルコール）をあらかじめ膜の細孔内に吸収させておき、下記のような器具に設置する。膜の裏側から空気圧をかけて、膜表面に気泡の発生が観察できる最小圧力を測定する。これをバブルポイントと呼ぶ。液体の表面張力とこの圧力との関係式から細孔径が推算できる。



$$d = \frac{4\gamma \cos\theta}{\Delta P}$$

[d[m]: 細孔径、 $\theta$  : 膜素材と溶媒の接触角（完全に濡れる溶媒（イソプロピルアルコール）の場合は0°で、 $\cos\theta=1$ ）、  
 $\gamma$  [N/m]: 溶媒の表面張力、 $\Delta P$  [Pa]: バブルポイント圧力]

平成23年度 細胞育成学実践論

## 消毒剤の選択

平成23年度 細胞育成学実践論

## 無菌・清浄区域の清掃と消毒

- ・清掃と消毒は定期的に行うべきである。
- ・洗剤は、最終製品と接触しない区域にのみ使用する。
- ・環境菌をモニタリングし、使用する消毒剤の適合性を確認する。
- ・消毒剤は、使用前に滅菌処理を行う。
- ・消毒剤は、ロット毎に管理し、有効期限を表示し、詰め替えはしない。
- ・耐菌性の観点から、違う種類の消毒剤と交替使用を検討すべきである。
- ・カビ、酵母が発生した場合、胞子殺滅薬剤の使用を検討すべきである。
- ・製品接触面で消毒剤の残留が無いことを確認する。
- ・定められた条件に従って、消毒剤を保管する。

平成23年度 細胞育成学実践論

## 消毒の基本原則

- 消毒の効果 = 消毒薬の効力
- × 消毒の技術・機械の性能
  - × 徹底度・丁寧さ
  - × 頻度

平成23年度 細胞育成学実践論

## エンドトキシン(Endotoxin: 内毒素)

- ▶ エンドトキシンは、グラム陰性桿菌の細胞壁外膜の構成成分の1つであり、リポ多糖体(Lipopolysaccharide: LPS)である。バイロジェンと同義語として用いられている。
- ▶ エンドトキシンは、菌体の形状保持だけでなく、外部からの攻撃に対して、細胞内部を保護する役目を有している。
- ▶ エンドトキシンが非経口的投与により体内に入ると、発熱やショック、白血球増多など多彩な生体作用を引き起こし、致死に至ることもある。
- ▶ エンドトキシンは熱に安定であり、通常の滅菌処理では除去できないので、原料段階から汚染管理が必要である。  
(250°C、30分間の乾熱滅菌でエンドトキシンは分解可能)

平成23年度 細胞育成学実践論

## エンドトキシンの定量

### リムルス試験

- ▶ カプトガニの血液成分(Limulus Amoebocyte)とエンドトキシンとが反応し凝固することを応用した試験。
- ▶ エンドトキシンの単位として重量単位の「 $\mu\text{g}$ 」と、力価を示す「EU」が用いられる。
- ▶ E. Coli の UKT-B 株では 125 $\mu\text{g}$  が 1EU に相当するが、グラム陰性菌の菌種によって力価は異なっている。

日本薬局方(JP)では、医薬品に含まれるエンドトキシン量に関して厳密な規定を設けている。

### エンドトキシン規格値の設定 (第16改訂 日本薬局方)

投与経路	(EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内:放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2

平成23年度 細胞育成学実践論

## エンドトキシン測定標準操作法

### ▶ 検量線の作成

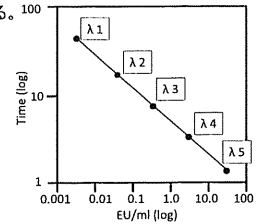
使用するリムルス試薬の測定範囲内で、少なくとも3濃度以上の標準液を使って検量線を作成する。

### ▶ 検量線の信頼性確認

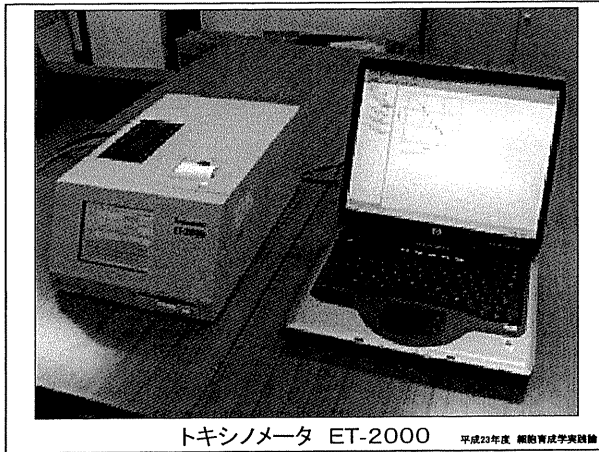
検量線を作成して相関係数「 $r$ 」を求める。「 $r$ 」の絶対値は、0.980 以上でなければならない。

### ▶ 反応干渉因子試験

試料中のエンドトキシンを測定する場合には、既知の濃度のエンドトキシンを添加し、その回収率を調べ、反応に影響を及ぼす因子の有無を試料ごとに調べる必要がある。



平成23年度 細胞育成学実践論

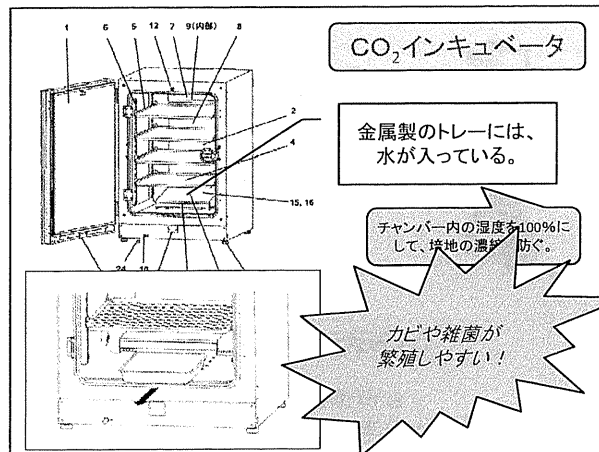


トキシノメータ ET-2000

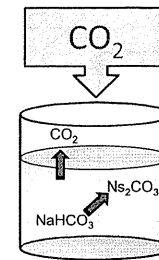
平成23年度 細胞育成学実践論

## 細胞培養で使用する装置の基礎知識

- CO<sub>2</sub>インキュベーター
- 安全キャビネット

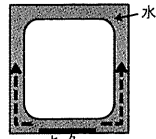
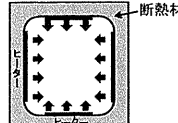


## なぜ、培養にCO<sub>2</sub>が必要なの？



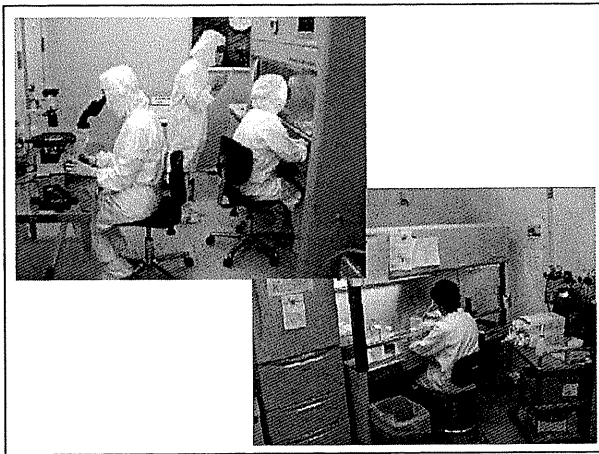
- 培地のpHや浸透圧を一定の範囲に維持するため、培地の中にはNaHCO<sub>3</sub>が含まれている。
- 37°Cに保温された培地の中では、NaHCO<sub>3</sub>からCO<sub>2</sub>が放出され、その結果Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>が残りpHが上昇する。
- 一定圧の炭酸ガスをインキュベーター内に吹きこむと、pHが下がりに生理的なpH(7.2~7.4)で維持できる。

## インキュベーターの温度制御方式

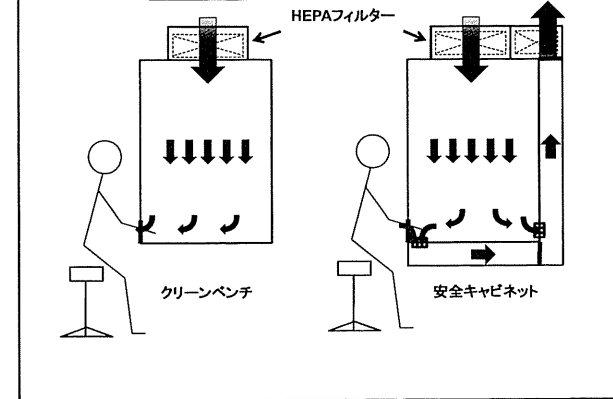
- ウォータージャケット方式: 外壁と内壁の空間に満たされた水を、ヒーターで温めて温度制御を行う方法。  

 メリット:  
 保温効果が高く、温度が安定している。  
 デメリット:  
 構造が複雑なため、若干高価  
 大量の水を扱うので、クリーンルーム内には不適切
- エアージャケット方式: チャンバーの各壁面に設置したヒーターにより直接チャンバーを温めて温度制御を行う方法。  

 メリット:  
 設定温度の変更が速やかに行える  
 乾熱滅菌することもできるタイプもある。  
 デメリット:  
 外気の影響を受けやすい  
 停電があると、短時間で温度が低下する。

「クリーンベンチ」と「安全キャビネット」  
の違いを知っていますか？

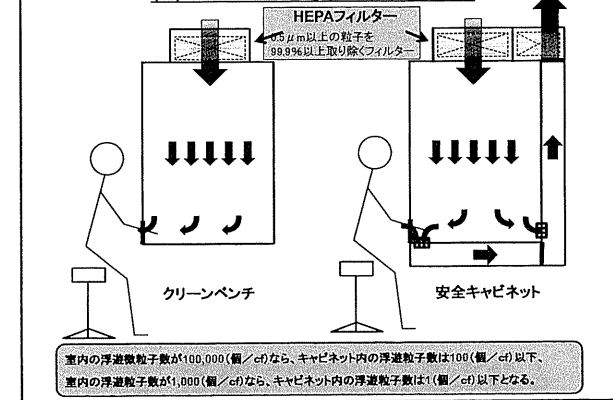
間違えると、大変なことに...




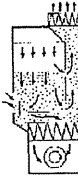
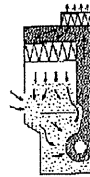



クリーンベンチと安全キャビネット

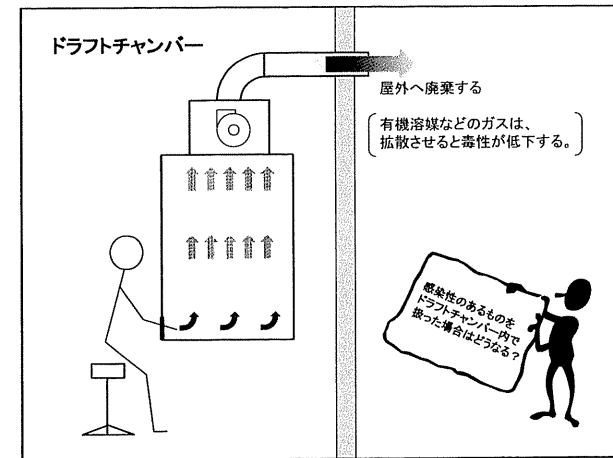
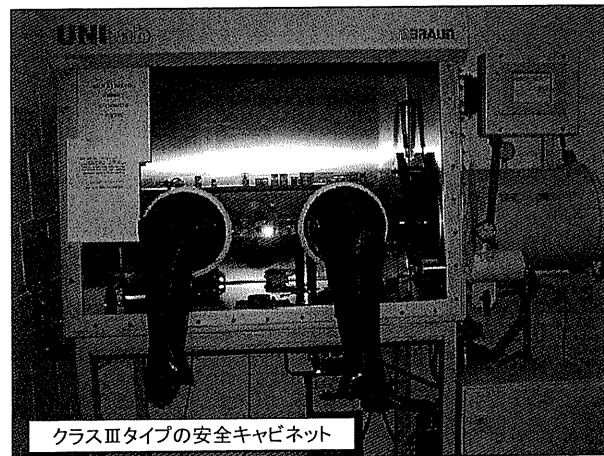


クリーンベンチと安全キャビネット



### 安全キャビネットの分類

 <p>クラス I</p>	<p><b>クラス I</b> 前面開口部から空気を流入させてエアロゾルの排出を防止する構造になっており、実験従事者を保護することを目的し、実験装置などの隔離用に用いられます。キャビネット内部は無菌状態ではない。</p>	 <p>クラス IB</p>
 <p>クラス IIA</p>	<p><b>クラス IIA</b> クラスIIの安全キャビネットは、実験従事者およびキャビネット内の実験試料を保護することを目的としている。循環空気の割合が70%程度となっている。</p>	 <p>クラス IIB</p>
 <p>クラス IIA</p>	<p><b>クラス IIB</b> クラスIIAとほぼ同じ構造になっている。循環空気の割合が30%で、残り70%が室外に排出される。化学発癌剤などの有害化学物質や低レベルの放射性物質を用いる実験に用いられる。</p> <p><b>クラス III</b> このタイプの安全キャビネットは、完全密閉式になっており、内部は陰圧に保たれ、キャビネットに取付けられた手袋を用いて実験を行う。P4実験室で用いる安全キャビネット</p>	 <p>クラス III</p>



そのために・・・

- ・雑菌の殺菌、滅菌が必要 → 環境や器具類
- ・ヒトに関しては作業前の手洗い消毒、白衣・手袋・マスクなどを着用して雑菌の飛散などを防ぐ

<滅菌とは>

無菌操作に用いる材料内部や容器表面に存在する雑菌を殺菌する方法

滅菌方法

高圧蒸気滅菌、放射線滅菌、フィルター濾過滅菌、アルコール滅菌など

## 無菌操作について

谷 美穂

### 無菌培養の方法①

<事前準備>

使用する器具や容器、培養液を滅菌処理しておく  
器具・容器・・・できる限りディスポ製品を使用無  
理な物は適切な滅菌処理を行っ  
ておく

試薬・・・無菌が保証されている製品をその都度  
購入し、使い回しはしない  
(分注している物を使用する場合は無  
菌性が担保されていることを確認する  
こと)

滅菌方法の例・・・フィルター濾過滅菌、オートク  
レイブ滅菌、乾熱滅菌等

なぜ無菌培養が必要なのか？

<細胞培養>

目的とする細胞だけをフラスコやシャーレなどの中で培養しなければならぬ。

↓

私たちの生活環境の中にはどこにも雑菌がいる。

↓

細胞培養を行うにあたっては、雑菌の混入を防ぐことが何よりも重要。

↓

そのために、余計な雑菌を排除する必要がある。

(雑菌を排除しなければ汚染(コンタミ)の原因になり目的の細胞の培養が行えない)

\*一度コンタミしてしまうと雑菌を除去するのはほとんど不可能

↓

そのために、適した環境での適した操作(無菌操作・滅菌)が必要である。

### (1) 作業者

- ① 白衣を着用し、長髪の方はまとめておく
- ② 手を石鹼で洗い、アルコール消毒をして手袋を着用する
- ③ 手袋の上からも消毒用エタノールで消毒する

<無菌操作とは>

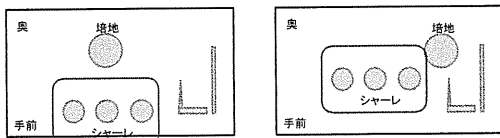
培養中の細胞に雑菌が入らないようにする操作

そのためには・・・

- ① 作業環境や使用する器具・材料が微生物に汚染されていないことが重要  
(無菌操作に適した作業環境とは雑菌が混入しない綺麗な所  
→無菌室、クリーンベンチ等)
- ② ヒトを通じての汚染防止も重要  
(衣服のほこり、手の雑菌や、口の中の雑菌など)

\* 蓋が空いているチューブ・容器がある場合は、その上を手などが決して通らないように気を付けなければならない。

\* 左の図はシャーレが手前にありすぎるので、外部からのコンタミの危険性が高い。培地がシャーレの真上にあるので取るときに手がシャーレの上を通らざるを得ない



## (2) クリーンベンチ

\* クリーンベンチ内に持ち込む道具は、事前に消毒用アルコールで外側を清潔にしておかなければならない  
→表面に付着している微生物を殺菌するため

- ① クリーンベンチ床面をアルコール清拭する
- ② クリーンベンチ内で使用する全ての器具・試薬をアルコール清拭して持ち込む

## 無菌操作方法③

- ① クリーンベンチ内の物の配置を確認する  
・ベンチの手前は外部からの混入の機会が多く、風の流れは上から下、奥から手前なので、できるだけ奥の方を使用するようにする。
- ② 作業中は容器の内部を空気中にさらすことは極力避ける。(どうしてもさらさなければならない場合は短時間に留める)  
ex シャーレの場合は蓋を開けっ放しにせず蓋を縁にかける、フラスコは斜めに持つなど

## ③ 容器の蓋を置く場合

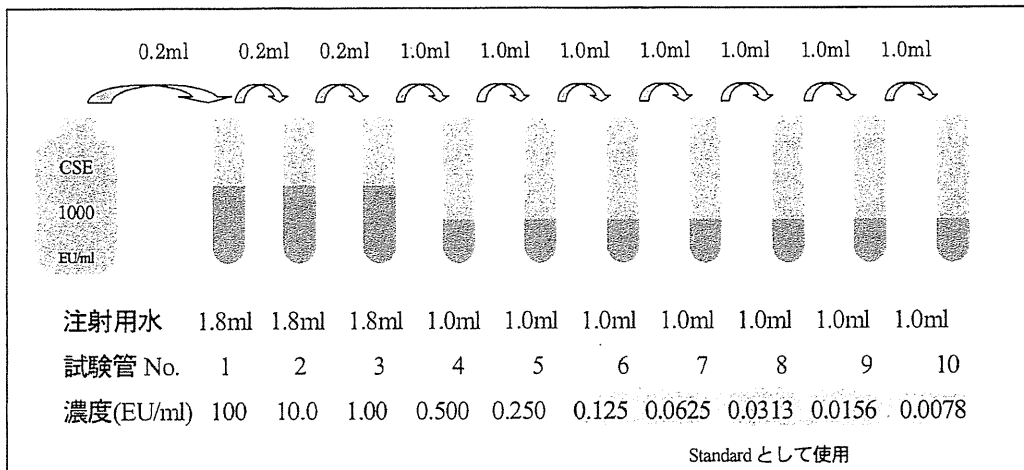
床面に内側を下にして置く場合は、置く場所を決めアルコールを含ませた布で清拭する。

チューブ立ての上など床面に直接触れない場所に置く。



文書番号 CCMT-C03-〇〇〇〇	エンドトキシン測定に関する 手順書	改定番号	0
		2頁の内 1頁	

1. 目的  
トキシノメーターを用いたエンドトキシン測定に関する手順。
2. 適応範囲  
トキシノメーターを用いたエンドトキシン測定全般。
3. 責任体制  
品質管理者の責任の下で、作業担当者がこの手順書を使用する。
4. 遵守事項  
当該の製品標準書に基づきエンドトキシンを測定する際に下記の手順を遵守する。
5. 準備
  1. 試薬（リムルステスト）の Lot が更新された時には、測定に先立ちキャリブレーションを実施する。
  2. 使用するチップや希釈用チューブは全てエンドトキシンフリーの資材を使用する。
    - リムルス試薬（リムルス ES-II シングルテスト Wako）
    - コントロールスタンダード エンドトキシン（CSE）
    - 1000 $\mu$ l ピペッター（1本）
    - 200 $\mu$ l ピペッター（1本）
    - 1000 $\mu$ l ピペッター用チップ
    - 200 $\mu$ l ピペッター用チップ
    - 5ml ファルコンチューブ
    - 希釈液（注射用蒸留水） 20ml $\times$ 1本
6. 手順
  - ① キャリブレーション
    1. トキシノメーターの電源投入（光源が安定するまで、20～30分程掛かる）。
    2. ノート PC の電源を投入後、pass word を入力する。
    3. サンプル配置の設定を行う（NC、PC、STD（5濃度）、いずれも二重測定）。
    4. 10本の希釈用チューブを準備し、1から10の番号を記入する。
    5. 1番から3番のチューブに注射用水を1.8ml（0.9ml $\times$ 2回）分注する。
    6. 4番から10番のチューブに注射用水を1.0ml分注する。
    7. CSEを1000EU/バイアルとなるように注射用水で溶解する（溶解日付記入）。
    8. 約2分間、ボルテックス。
    9. 溶解済みのCSEを使用する場合には、約1分間ボルテックス。
    10. CSE（1000EU）から0.2mlを取り1番に添加し、約30秒間ボルテックス。
    11. 1番から0.2mlを取り2番へ添加し、約30秒間ボルテックス。
    12. 2番から0.2mlを取り3番へ添加し、約30秒間ボルテックス。
    13. 3番から1.0mlを取り4番へ添加し、約30秒間ボルテックス。
    14. 4番から1.0mlを取り5番へ添加し、約30秒間ボルテックス。
    15. 5番から1.0mlを取り6番へ添加し、約30秒間ボルテックス。（Conc 0.1250）
    16. 6番から1.0mlを取り7番へ添加し、約30秒間ボルテックス。（Conc 0.0625）
    17. 7番から1.0mlを取り8番へ添加し、約30秒間ボルテックス。（Conc 0.0313）
    18. 8番から1.0mlを取り9番へ添加し、約30秒間ボルテックス。（Conc 0.0156）
    19. 9番から1.0mlを取り10番へ添加し、約30秒間ボルテックス。（Conc 0.0078）



20. 検量線用には、6 番から 10 番を使用する。
21. トキシノメーターの温度 ( $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) を確認する。
22. トキシノメータのスタートボタンを押す。
23. ノート PC の測定開始ボタンを押す (担当者名と日付を入力)。
24. NC (注射用水)、PC (Conc 0.0078)、各標準液を  $200 \mu\text{L}$  ずつライセート試薬チューブへ 1 本ずつ分注する。
25. 約 5 分間ボルテックス (泡立てないこと)
26. チューブの汚れを拭き取り、トキシノメーターの緑色のランプがついているウェルへチューブをセットする。反応は、約 1 時間で終了する。
27. 検量線を作成して相関係数を求め、その絶対値が 0.980 以上を合格とする。

## ② 検体測定

1. トキシノメーターの電源投入 (使用可能になるまで、20~30 分程掛かる)。
2. ノート PC の電源を投入後、pass word を入力する。
3. サンプル配置の設定を行う (NC、PC、試料はいずれも二重測定)。
4. PC には、検量線用の Conc 0.0078 を使用する。
5. 添加回収試験のため、被検試料  $270 \mu\text{l}$  に Conc 0.500 の標準液  $30 \mu\text{l}$  を加える。
6. トキシノメーターの温度 ( $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) を確認する。
7. トキシノメータのスタートボタンを押す。
8. ノート PC の測定開始ボタンを押す (担当者名と日付を入力)。
9. NC (注射用水)、PC (Conc 0.0078)、各試料を  $200 \mu\text{L}$  ずつライセート試薬チューブへ 1 本ずつ分注する。
10. 約 5 分間ボルテックス (泡立てないこと)。
11. チューブの汚れを拭き取り、トキシノメーターの緑色のランプがついているウェルへチューブをセットする。反応は、約 1 時間で終了する。

## 7. 関連する文章

トキシノメーター取扱説明書

トキシノメーター用 アプリケーションソフトウェア取り扱い説明書

## エンドトキシン添加回収試験（簡易法）

エンドトキシン濃度を測定する際には、試料に含まれる共存物質による反応への影響を常に確認する必要がある。そのために、試料ごとに添加回収試験を実施する。

### 【手順】

- ① エンドトキシンの測定範囲（検量線の範囲）の中央値に対して約 10 倍の濃度のエンドトキシン標準液 A を準備する。

注) 例えば、エンドトキシンの測定範囲が 0.0078~0.125 (EU/ml)であれば、その中央値は 0.0664 (EU/ml) であり、エンドトキシン標準液 A の濃度を 0.664 (EU/ml) 付近に調製する。

- ② エンドトキシン標準液 A と試料を正確に 1 対 9 の割合で混合し、混合液と試料のエンドトキシン量をそれぞれ測定する。
- ③ エンドトキシン標準液 A の濃度が  $a$  (EU/ml) で、試料のエンドトキシン測定値が、 $b$  (EU/ml) であったとすると、混合液のエンドトキシン濃度  $Y$  (EU/ml) は、

$$\begin{aligned} Y &= (1/10) \times a + (9/10) \times b \\ &= 0.1a + 0.9b \end{aligned}$$

と予測される。

- ④ 実際に測定した混合液のエンドトキシン濃度が  $y$  (EU/ml) であったとすれば、

$$\text{回収率} = (y/Y) \times 100 \quad (\%)$$

となる。

- ⑤ 日本薬局方によれば、エンドトキシンの回収率が 50~200 (%) の範囲内であれば、反応への影響は許容される。
- ⑥ 許容範囲を超える影響があった場合は、反応に影響を及ぼす物質を除去するか、あるいは試料を希釈して影響を受ける度合いを軽減する。ただし、試料を希釈する場合には、検出限界値に注意する。

文書番号 CCMT-C03-〇〇〇〇	エンドトキシン測定作業記録書	改定番号 0
		1頁の内 1頁

1. 準備

使用するチップや希釈用チューブは全てエンドトキシンフリーの資材を使用する。

- リムルス試薬 (リムルス ES-II シングルテスト Wako)  
Lot No. \_\_\_\_\_ Exp. \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- コントロールスタンダード エンドトキシン (CSE)  
Lot No. \_\_\_\_\_ Exp. \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- 1000  $\mu$ l ピペッター (1本)
- 200  $\mu$ l ピペッター (1本)
- 1000  $\mu$ l ピペッター用チップ
- 200  $\mu$ l ピペッター用チップ
- 5ml ファルコンチューブ
- 希釈液 (注射用蒸留水) (20ml  $\times$  1本)

2. キャリブレーション

検量線作成日 : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

検量線作成者 : \_\_\_\_\_

1. 手順書の内容に従って標準液の希釈系列を作成する。
2. 検量線を作成して相関係数を求め、その絶対値が 0.980 以上を合格とする。  
検量線の相関係数 : \_\_\_\_\_ ( $\geq 0.980$ )  
検量線の合否 :      合格      不合格

逸脱記録 : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3. 検体測定

試料測定日 : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

測定担当者 : \_\_\_\_\_

試料名 : \_\_\_\_\_

測定値 : \_\_\_\_\_ (EU/ml)

添加回収率 : \_\_\_\_\_ (%)

許容範囲 : 50~200 (%)

逸脱記録 : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

文書番号 HHS-01-01	試薬・器材の準備・確認の手順書 および記録書	改定番号	1
		2 頁の内 1 頁	
製造番号: U-2 OS -	製造年月日: 年 月 日	承認:	

### 試薬・器材の確認

記載されている試薬・器材のロット番号・使用期限を記載する。

試薬	容量	メーカー	物品番号
<input type="checkbox"/> DMEM	500mL	SIGMA	D6046
<input type="checkbox"/> ペニシリンストレプトマイシン	100mL	GIBCO	15070-063
<input type="checkbox"/> FBS	500mL	Hyclone	
<input type="checkbox"/> TrypLE Select	100mL	GIBCO	12653-011
<input type="checkbox"/> トリパンプルー溶液	100mL	Wako	207-17081

試薬	ロット番号	使用期限
<input type="checkbox"/> DMEM	_____	_____
<input type="checkbox"/> ペニシリンストレプトマイシン	_____	_____
<input type="checkbox"/> FBS	_____	_____
<input type="checkbox"/> TrypLE Select	_____	_____
<input type="checkbox"/> トリパンプルー溶液	EPF7004	2012/10

逸脱記録: \_\_\_\_\_

日付                    年        月        日

確認者                    \_\_\_\_\_

文書番号 HHS-01-01	試薬・器材の準備・確認の手順書 および記録書	改定番号	1
		2 頁の内 2 頁	
製造番号: U-2 OS -	製造年月日: 年 月 日	承認:	

器 材	容量	メーカー	物品番号
<input type="checkbox"/> ピペット	2mL	BD Falcon	356507
<input type="checkbox"/> ピペット	5mL	BD Falcon	356543
<input type="checkbox"/> ピペット	10mL	BD Falcon	356551
<input type="checkbox"/> ピペット	25mL	BD Falcon	356525
<input type="checkbox"/> 遠沈管	15mL	旭テクノグラス	2325-015
<input type="checkbox"/> 遠沈管	50mL	旭テクノグラス	2345-050
<input type="checkbox"/> 100mm培養皿		旭テクノグラス	3020-100
<input type="checkbox"/> ストレージボトル	250mL	Corning	431431
<input type="checkbox"/> 注射器	2.5mL	テルモ	SS-02LZ
<input type="checkbox"/> 注射針	18G	ニプロ	01-001
<input type="checkbox"/> エンドトキシン用チューブ			
<input type="checkbox"/> 滅菌チューブ(1.5mL)	1.5mL	Eppendorf	0030 121.589

器 材	ロット番号	使用期限
<input type="checkbox"/> ピペット 2mL	_____	_____
<input type="checkbox"/> ピペット 5mL	_____	_____
<input type="checkbox"/> ピペット 10mL	_____	_____
<input type="checkbox"/> ピペット 25mL	_____	_____
<input type="checkbox"/> 遠沈管 15mL	_____	_____
<input type="checkbox"/> 遠沈管 50mL	_____	_____
<input type="checkbox"/> 100mm培養皿	_____	_____
<input type="checkbox"/> ストレージボトル	_____	_____
<input type="checkbox"/> 注射器 2.5mL	_____	_____
<input type="checkbox"/> 注射針 18G	_____	_____
<input type="checkbox"/> エンドトキシン用チューブ	_____	_____
<input type="checkbox"/> 滅菌チューブ(1.5mL)	_____	_____

逸脱記録: \_\_\_\_\_

日付            年        月        日  
 確認者        \_\_\_\_\_

文書番号 HHS-01-02	細胞播種の手順書および 記録書	改定番号	1
		4頁の内 1頁	
製造番号: U-2 OS -	製造年月日: 年 月 日	承認:	

### 試薬・器材の準備

\* 安全キャビネット内に入れる

試薬	容量	メーカー	物品番号	数量	備考
<input type="checkbox"/> * DMEM	500mL	SIGMA	D6046	1	
<input type="checkbox"/> * ペニシリン・ストレプトマイシン	100mL	GIBCO	15070-063	1	
<input type="checkbox"/> * FBS	500mL	Hyclone		1	
<input type="checkbox"/> * TrypLE Select	100mL	GIBCO	12653-011	1	
<input type="checkbox"/> トリパンプルー溶液	100mL	Wako	207-17081	1	
器材	容量	メーカー	物品番号	数量	備考
<input type="checkbox"/> * ピペットエイド		ファルコン		1	
<input type="checkbox"/> マイクロピペット	200uL	Gilson	P-200	1	
<input type="checkbox"/> マイクロピペット	1000uL	Gilson	P-1000	1	
<input type="checkbox"/> 滅菌イエローチップ		BM機器	BM3040	1箱	
<input type="checkbox"/> 滅菌ブルーチップ		BM機器	BM3070	1箱	
<input type="checkbox"/> * ピペット	2mL	BD Falcon	356507	3	
<input type="checkbox"/> * ピペット	5mL	BD Falcon	356543	6	
<input type="checkbox"/> * ピペット	10mL	BD Falcon	356551	3	
<input type="checkbox"/> * ピペット	25mL	BD Falcon	356525	2	
<input type="checkbox"/> * 100mm培養皿	100mm	旭テクノグラス	3020-100	5	細胞播種時にキャビネット内に入れる
<input type="checkbox"/> * 遠沈管	15mL	旭テクノグラス	2325-015	2	
<input type="checkbox"/> * ストレージボトル	250mL	Corning	431431	1	廃液用
<input type="checkbox"/> * 滅菌チューブ(1.5mL)	1.5mL	Eppendorf	0030 121.589	3	1本を安全キャビネット内に入れる
<input type="checkbox"/> セルカウントプレート		OneCell	OC-C-S02	1	
<input type="checkbox"/> カウンター					
<input type="checkbox"/> 計算機					
<input type="checkbox"/> はさみ					
<input type="checkbox"/> マジック					
<input type="checkbox"/> * チューブ立て 15mL用				1	
<input type="checkbox"/> * チューブ立て 1.5mL用				1	
<input type="checkbox"/> 滅菌敷布				1	
<input type="checkbox"/> ワイプ				1包	
<input type="checkbox"/> 70%アルコールスプレー				1	
<input type="checkbox"/> オートクレーブバッグ Lサイズ				1	
<input type="checkbox"/> 記録書					

器材

滅菌年月日

チューブ立て 15mL用×1, 1.5mL用×1

日付 年 月 日

確認者

文書番号 HHS-01-02	細胞播種の手順書および 記録書	改定番号	1
		4 頁の内 2 頁	
製造番号: U-2 OS -	製造年月日: 年 月 日	承認:	

### 試薬の調整

- DMEM 培地 (500mL) に FBS (55mL) とペニシリン-ストレプトマイシン (5mL) を加える。
- 遠心機のスイッチを入れ 1000rpm, 5 分 に設定する

逸脱記録: \_\_\_\_\_

### 細胞数計測

#### 1. 細胞の観察

- 培養皿を顕鏡し細胞を観察する。

\_\_\_\_\_

#### 2. 培養皿からの細胞解離

- 培養皿の培地をピペット(10mL)で廃液用ストレージボトル(250mL)に移す。
- TrypLE Select をピペット(5mL)で 3mL 加え、37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 5 分静置する。
- 遠沈管 (15mL)、滅菌チューブ (1.5mL) に必要事項を記入する。
- 顕微鏡視下に培養皿から細胞が剥がれたのを確認する。(細胞が剥がれていない場合は、再びインキュベーター内に静置する。)
- ピペット(5mL)で培養皿の表面を洗うようにして細胞懸濁液を回収し、遠沈管(15mL)に移す。
- 1000rpm, 5 分, 室温で遠心する。
- ピペット(5mL, 2mL)で上清を吸引し、廃液用ストレージボトル(250mL)に移し廃棄する。
- ペレットに、ピペット(5mL)で FBS 入り DMEM 培地を 3mL 加え懸濁する。
- 細胞懸濁液を十分攪拌する。

逸脱記録: \_\_\_\_\_



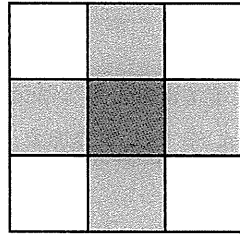
文書番号 HHS-01-02	細胞播種の手順書および 記録書	改定番号	1
製造番号: U-2 OS -	製造年月日: 年 月 日	4 頁の内 3 頁	
		承認:	

## 2. 細胞数及び生存率の測定

- 細胞懸濁液をピペット(2mL)で滅菌チューブ(1.5mL)に約 0.2mL 分注する。

ここから細胞懸濁液を 100uL 採取し滅菌チューブ(1.5mL)に入れる。トリパンブルー100uL と  
攪拌する(2 倍希釈)

セルカウントプレートを用いて倍率 100 倍で生細胞数(染色されていない細胞)と  
死細胞数(青く染色された細胞)を計測する。



1mL あたりの生細胞数

$$= \boxed{\phantom{00}} + \boxed{\phantom{00}} + \boxed{\phantom{00}} + \boxed{\phantom{00}} / 4 \times 2 \times 10^4 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ 個/mL}$$

1mL あたりの死細胞数

$$= \boxed{\phantom{00}} + \boxed{\phantom{00}} + \boxed{\phantom{00}} + \boxed{\phantom{00}} / 4 \times 2 \times 10^4 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ 個/mL}$$

- 細胞懸濁液量          mL
- 生細胞数                                  個
- 死細胞数                                  個
- 総細胞数                                  個
- 細胞生存率                  %

文書番号 HHS-01-02	細胞播種の手順書および 記録書	改定番号	1
		4 頁の内 4 頁	
製造番号: U-2 OS -	製造年月日: 年 月 日	承認:	

### 3. 細胞の播種

培養皿(100mm) 1枚あたり 生細胞数 =  $1.0 \times 10^6$  個 となるように細胞を播種する.

- 培養皿(100mm 培養皿面積  $55 \text{ cm}^2$ )を 5枚と遠沈管(15mL)を 1本準備する.
- 遠沈管(15mL)に、生細胞数  $1.0 \times 10^6$  個/mL となる様に FBS 入り DMEM で希釈する.

細胞懸濁液量 \_\_\_\_\_ mL  
 FBS入りDMEM \_\_\_\_\_ mL          合 計 \_\_\_\_\_ mL

- 培養皿(100mm) にピペット(25mL)で FBS 入り DMEM 培地を 9mL ずつ加える.
- ピペット(2mL)で細胞懸濁液(生細胞数  $1.0 \times 10^6$  個/mL)を 1mL ずつ加え、ゆるやかに攪拌する.
- $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内に静置する.

終了時刻 : \_\_\_\_\_ 時 \_\_\_\_\_ 分

逸脱記録: \_\_\_\_\_

日付                    年            月            日

作業者                    \_\_\_\_\_

記録者                    \_\_\_\_\_

文書番号 HHS-01-03	第1回細胞数計測及び培地交換の 手順書および記録書	改定番号	1
		3頁の内 1頁	
製造番号: U-2 OS -	製造年月日: 年 月 日	承認:	

試薬・器材の準備

\* 安全キャビネット内に入れる

	容量	メーカー	物品番号	数量	備考
<input type="checkbox"/> * FBS入りDMEM	500mL			1	
<input type="checkbox"/> * TrypLE Select	100mL	GIBCO	12653-011	1	
<input type="checkbox"/> トリパンプルー溶液	100mL	Wako	207-17081	1	
器 材	容量	メーカー	物品番号	数量	備考
<input type="checkbox"/> * ピペットエイド		ファルコン		1	
<input type="checkbox"/> マイクロピペット	200uL	Gilson	P-200	1	
<input type="checkbox"/> マイクロピペット	1000uL	Gilson	P-1000	1	
<input type="checkbox"/> 滅菌イエローチップ		BM機器	BM3040	1箱	
<input type="checkbox"/> 滅菌ブルーチップ		BM機器	BM3070	1箱	
<input type="checkbox"/> * ピペット	2mL	BD Falcon	356507	2	
<input type="checkbox"/> * ピペット	5mL	BD Falcon	356543	3	
<input type="checkbox"/> * ピペット	10mL	BD Falcon	356551	2	
<input type="checkbox"/> * ピペット	25mL	BD Falcon	356525	1	
<input type="checkbox"/> * 遠沈管	15mL	旭テクノグラス	2325-015	2	
<input type="checkbox"/> * ストレージボトル	250mL	Corning	431431	1	
<input type="checkbox"/> * 滅菌チューブ(1.5mL)		Eppendorf	0030 121.589	4	2本を安全キャビネット内に入れる
<input type="checkbox"/> セルカウントプレート		OneCell	OC-C-S02	1	
<input type="checkbox"/> カウンター					
<input type="checkbox"/> 計算機					
<input type="checkbox"/> はさみ					
<input type="checkbox"/> * マジック					
<input type="checkbox"/> * チューブ立て 15mL用				1	
<input type="checkbox"/> * チューブ立て 1.5mL用				1	
<input type="checkbox"/> 滅菌敷布				1	
<input type="checkbox"/> ワイプ				1包	
<input type="checkbox"/> 70%アルコールスプレー				1	
<input type="checkbox"/> オートクレーブバッグ Lサイズ				1	
<input type="checkbox"/> 記録書					

器 材

滅菌年月日

チューブ立て 15mL用×1, 1.5mL用×1

日付 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

確認者 \_\_\_\_\_

文書番号 HHS-01-03	第1回細胞数計測及び培地交換の 手順書および記録書	改定番号 3頁の内 2頁	1
製造番号: U-2 OS -	製造年月日: 年 月 日	承認:	

第1回細胞数計測（播種後 \_\_\_\_日目）

1. 細胞の観察

- 全ての培養皿を鏡し細胞を観察する。そのうち 2 枚を細胞数計測に用いる。

\_\_\_\_\_

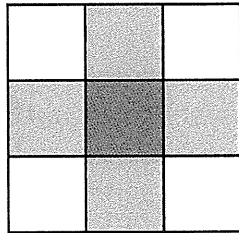
2. 培養皿からの細胞解離

開始時刻： \_\_\_\_ 時 \_\_\_\_ 分

- 培養皿の培地をピペット(10mL)で廃液用ストレージボトル(250mL)に移す。
- TrypLE Select をピペット(5mL)で 3mL ずつ加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 5 分静置する。
- 遠沈管(15mL)2 本、滅菌チューブ(1.5mL)2 本に必要事項を記入する。
- 顕微鏡視下に培養皿から細胞が剥がれたのを確認する。(細胞が剥がれていない場合は、再びインキュベーター内に静置する。)
- ピペット(5mL)で培養皿の表面を洗うようにして細胞懸濁液を回収し、遠沈管(15mL)に移す。  
培養皿の細胞はそれぞれ別の遠沈管(15mL)に回収する。
- 細胞懸濁液を十分攪拌する。

3. 生細胞数の測定

- 細胞懸濁液をピペット(2mL)で滅菌チューブ(1.5mL)に約 0.2mL 分注する。ここから細胞懸濁液を 100uL 採取し、滅菌チューブ(1.5mL)の中でトリパンプルー100uL と攪拌する(2 倍希釈)。セルカウントプレートを用いて倍率 100 倍で生細胞数(染色されていない細胞)を計測する。



ディッシュ — 1

1mL あたりの生細胞数

$$= \boxed{\quad} + \boxed{\quad} + \boxed{\quad} + \boxed{\quad} / 4 \times 2 \times 10^4 = \underline{\hspace{2cm}} \text{個/mL}$$

生細胞数 = 1mLあたりの細胞数 × 3 mL 合計    個

ディッシュ — 2

1mL あたりの生細胞数

$$= \boxed{\quad} + \boxed{\quad} + \boxed{\quad} + \boxed{\quad} / 4 \times 2 \times 10^4 = \underline{\hspace{2cm}} \text{個/mL}$$

生細胞数 = 1mLあたりの細胞数 × 3 mL 合計    個