

試薬管理標準作業書

SOP No. XXXX

項目 試薬の調整

適用 ウイルス検査に使用する細胞の継代

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ○○課 氏名

承認者 氏名

(検査部門責任者)

失効日 平成 年 月 日

○○○研究所

○○課

試薬管理標準作業書

[細胞の継代]

	年 月 日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作 成	平成 年 月 日			
第 1 回改訂				
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 1 0 回改訂				

〇〇〇研究所

〇〇課

細胞の継代標準作業書

1 検査の項目

培養細胞の継代（接着細胞）。

2 試験品の種類

実験室内において使用している細胞。

5 検査等に用いる試薬

- ① PBS(-)
- ② Trypsin-EDTA(0.05%)
- ③ イーグル MEM 培地(10%FBS)
- ④ トリパンプルー染色液

7 検査等に用いる機器・器具及び器材

1) 機器・器具

- ① 炭酸ガス培養装置 (SOP No.)
- ② メスピペット
- ③ オートピペッター
- ④ マイクロピペット

2) 器材

- ① 細胞培養フラスコ(75cm²)
- ② 顕微鏡 (SOP No.)
- ③ チップ(p-100 用)
- ④ 1.5ml エッペンチューブ
- ⑤ ビルケルチュルク血球計算盤
- ⑥ カウンター

8 操作上の注意

- 1) 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
- 2) 細胞の計数以外の作業はすべて安全キャビネット内で行うこと
- 3) 細胞のクロスコンタミネーションを避けるため、細胞ごとに培地は用意し、作業は同時に行わないこと。

9 細胞継代

1. 細胞の状態を観察する。90%程度コンフルエントのものをを用いる。細菌や真菌のコ

- ンタミネーションが認められるものは使用せず廃棄する。
2. PBS(-)で細胞を3回洗浄する。
 3. Trypsin/EDTAを3ml加え、細胞表面に均一に分散させる。Trypsin/EDTAを取り除く。
 4. Trypsin/EDTAを1ml加え、細胞全体にいきわたらせる。トリプシン溶液は細胞に直接かからないよう、壁をはわすように静かに加える。
 5. 37°Cのインキュベーターに5分程度静置。
 6. 細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。
 7. イーグルMEM培地(10%FBS)を10ml加え、泡立たないよう優しくピペッティングし、single cellにする。
 8. 7.の増殖培地細胞数をエッペンチューブに100 μ lとり、等量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。
 9. 新しいフラスコに移す。(目安量 $1\sim 2\times 10^5$ 個/ml、25ml、75cm²フラスコ)
 - (1) 目的量の培地を新しいフラスコに入れる。
 - (2) 目安量となるように細胞浮遊液を新しいフラスコに加える。
 - (3) 以下を明記する。
 - i 自分の名前
 - ii 細胞の名前
 - iii 日付
 - iv 継代数(継代毎に1代ずつ数を増やす)
 10. 蓋をしっかりと閉め、37°Cのインキュベーターに静置。

培養細胞の継代記録用紙

実施日： _____ 実施者： _____

使用細胞： _____

使用培地 (MEM) Lot. No. _____

(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot. No. 記載不要、作成日： _____)

PBS(-) Lot. No. _____

(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot. No. 記載不要、作成日： _____)

Trypsin-EDTA(0.05%) Lot. No. _____

トリパンブルー染色液 Lot. No. _____

継代 (開始時間： _____ : _____)

継代する細胞が 90%程度のコンフルエントかどうか顕微鏡で確認する。



細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

細胞名： _____ 継代可能? yes 、No

PBS(-) で細胞を 3 回洗浄する。



Trypsin/EDTA を 3ml 加え、細胞表面に均一に分散させる。Trypsin/EDTA を取り除く。



Trypsin/EDTA を 1ml 加え、細胞全体にいきわたらせる。



□37℃のインキュベーターに5分程度静置する。

(時間： : ~ :)



□細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。



□イーグル MEM 培地(10%FBS)を10ml 加え、泡立たないよう優しくピペッティングし、single cell にする。



□増殖培地細胞数をエッペンチューブに100 μ l とり、等量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。

細胞名	実測数	細胞密度	希釈



□目的量の培地を新しいフラスコに入れ、冷蔵庫の細胞浮遊液を加える。

フラスコには以下を明記する。

- i 自分の名前
- ii 細胞の名前
- iii 日付
- iv 継代数(継代毎に1代ずつ数を増やす)



□37℃のCO₂インキュベーターで培養する。

終了時間： :

試薬管理標準作業書

SOP No. △-1

実施項目 細胞の凍結保存

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ウイルス課 ○○××

承認者 △△□□

(検査部門責任者)

失効日 平成 年 月 日

○県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

試薬管理標準作業書
[細胞の凍結保存]

	年 月 日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作 成	平成 26 年 月 日	〇〇××	△△□□	
第 1 回改訂				
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 10 回改訂				

○県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

細胞の凍結保存標準作業書

1 目的および適応範囲

実験室内で使用している細胞について凍結保存方法の基準を定め、試験等の信頼性確保を図ることを目的とする。

2 必要な試薬および器具・機械

- ・CELLBANKER® 1plus または CELLBANKER® 1 (日本全薬工業株式会社)
- ・PBS (-)
- ・トリプシン-EDTA 液
- ・細胞増殖培地 (10%FBS 加 MEM) (作成については標準手順書「培地作成」を参照)
- ・滅菌チューブ (15ml 容量)
- ・血球計算盤
- ・マイクロピペット、チップ
- ・クライオチューブ (1.8ml 容量)
- ・炭酸ガス培養装置 (SOP No.)
- ・倒立顕微鏡 (SOP No.)
- ・遠心分離機 (1,000rpm) (SOP No.)
- ・ディープフリーザー (-80°C) (SOP No.)

3 操作法

- ① 細胞汚染の有無や細胞の状態を確認する。80~90%コンフルエント状態の細胞が望ましい。
- ② 培養フラスコ内の培地を捨て、5ml の PBS (-) で細胞を洗浄する操作を 2 回行う。
- ③ トリプシン-EDTA 液を 5ml 加え細胞を浸漬後トリプシン溶液は捨てる。
- ④ 37°C の炭酸ガス培養装置に入れ、静置する。
- ⑤ 細胞が円形になり剥離してきたら 10ml の細胞増殖培地を加え、ピペッティングにより細胞を懸濁させる。
- ⑥ 細胞懸濁液の一部を取り、等量のトリパンプルー溶液と混合し血球計算盤で生細胞数を計測する。
- ⑦ 細胞懸濁液を 1,000rpm、5 分遠心し、上清を捨てる。
- ⑧ $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個の細胞に対し 1 ml の割合で CELLBANKER® を加え優しくピペッティングする。
- ⑨ 細胞懸濁液をクライオチューブ(予め、以下の情報を記載しておく)に 1ml ずつ分注する。
 1. 細胞名、2. 継代数、3. 凍結年月日また、保存した細胞の情報を記録簿に記す。
- ⑩ クライオチューブを-80°Cのディープフリーザーに入れ凍結する。
- ⑪ 後日、保存した細胞を用いて再起することを確認すると良い。

凍結細胞記録簿

No.	凍結年月日	細胞名	由来	実施者	保存場所	再起培養 年月日	備考
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							

細胞の凍結保存記録用紙

実施日： _____ 実施者： _____

使用細胞： _____

使用培地 (MEM) Lot. No. _____
(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot. No. 記載不要、作成日： _____)

PBS(-) Lot. No. _____
(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot. No. 記載不要、作成日： _____)

Trypsin-EDTA (0.05%) Lot. No. _____

トリパンブルー染色液 Lot. No. _____

保存 (開始時間： _____ : _____)

保存する細胞が 90%程度のコンプルエントかどうか顕微鏡で確認する。

細胞名： _____ 保存可能? yes 、No

細胞名： _____ 保存可能? yes 、No

細胞名： _____ 保存可能? yes 、No

細胞名： _____ 保存可能? yes 、No

細胞名： _____ 保存可能? yes 、No

↓
 PBS(-)で細胞を 2 回洗浄する。

↓
 Trypsin/EDTA を 5ml 加え、細胞表面に均一に分散させる。Trypsin/EDTA を取り除く。

↓
 37°Cのインキュベーターに 5 分程度静置する。
(時間： _____ : _____ ~ _____ : _____)

↓
 細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。

↓
 イーグル MEM 培地 (10%FBS) を 10ml 加え、泡立たないよう優しくピペッティングし、single cell にする。

□増殖培地細胞数をエッペンチューブに100 μ lとり、等量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。

細胞名	実測数	トータル細胞数	CELLBANKER®添 加量

□細胞懸濁液を1,000rpm、5分遠心し、上清を捨てる。

(時間： : ~ :)

□ $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個の細胞に対し1mlの割合でCELLBANKER®を加え優しくピペッティングす
す。

□細胞懸濁液をクライオチューブ(予め、以下の情報を記載しておく)に1mlずつ分注する。

- i 細胞名
- ii 継代数
- iii 保存年月日

□ -80°C のディープフリーザーに入れ凍結する。

終了時間： :

試薬管理標準作業書

SOP No. △-1

実施項目 細胞の再起培養

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ウイルス課 ○○××

承認者 △△□□

(検査部門責任者)

失効日 平成 年 月 日

○県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

試薬管理標準作業書
[細胞の再起培養]

	年 月 日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作 成	平成 26 年 月 日	〇〇××	△△□□	
第 1 回改訂				
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 10 回改訂				

○県保健環境研究所
保健科学部 ウイルス課

細胞の再起培養標準作業書

1 目的および適応範囲

凍結保存している細胞について再起培養方法の基準を定め、試験等の信頼性確保を図ることを目的とする。

2 必要な試薬および器具・機械

- ・細胞増殖培地（培地作成については、標準手順書「培地作成」を参照 SOP No. ）
- ・70%アルコール綿
- ・滅菌チューブ（15ml 容量）
- ・培養フラスコ（75cm²）
- ・恒温水槽（37℃）
- ・遠心分離機（1,000rpm）（SOP No. ）
- ・炭酸ガス培養装置（SOP No. ）
- ・倒立顕微鏡（SOP No. ）

3 操作法

- ① 保存されているクライオチューブを取り出し、直ちに 37℃の恒温水槽で振盪し素早く融解させる。
- ② クライオチューブの外側を 70%アルコール綿で拭く。
- ③ 保存していた細胞懸濁液を 10ml の細胞増殖培地が入った 15ml チューブに移し混和する。
- ④ 1,000rpm、5 分遠心分離し、上清を捨てる。
- ⑤ 5ml の細胞増殖培地を加え細胞を再懸濁する。
- ⑥ 培養フラスコに細胞懸濁液を全量移し、細胞増殖培地 15ml を加える。
- ⑦ 培養フラスコに以下の情報を記入する。
1. 実施者 2. 細胞名 3. 実施日 4. 継代歴
- ⑧ 炭酸ガス培養装置に入れ 37℃、5%二酸化炭素下で 1 晩培養する。
- ⑨ 翌日、細胞の定着状態を確認し、培地を新しい細胞増殖培地に交換する。
定着細胞が少ない場合は再度再起培養を行う。

細胞の再起記録用紙

実施日： _____ 実施者： _____

再起細胞： _____ 保存年月日： _____ 継代数： _____

再起細胞： _____ 保存年月日： _____ 継代数： _____

使用培地 (MEM) Lot. No. _____

(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot. No. 記載不要、作成日： _____)

PBS(-) Lot. No. _____

(自家製の場合で作成記録がある場合は Lot. No. 記載不要、作成日： _____)

再起 (開始時間： _____ : _____)

保存されているクライオチューブを取り出し、直ちに 37°C の恒温水槽で振盪し素早く融解させる。

↓

クライオチューブの外側を 70% アルコール綿で拭く。

↓

保存していた細胞懸濁液を 10ml の細胞増殖培地が入った 15ml チューブに移し混和する。

↓

1,000rpm、5 分遠心分離し、上清を捨てる

↓

(時間： _____ : _____ ~ _____ : _____)

↓

5ml の細胞増殖培地を加え細胞を再懸濁する。

↓

培養フラスコに細胞懸濁液を全量移し、細胞増殖培地 15ml を加える。

↓

培養フラスコに以下の情報を記入する。

↓

i 自分の名前

↓

ii 細胞の名前

↓

iii 日付

↓

iv 継代数

炭酸ガス培養装置に入れ 37°C、5% 二酸化炭素下で 1 晩培養する。

↓

(時間： _____ : _____)

↓

翌日、細胞の定着状態を確認し、培地を新しい細胞増殖培地に交換する。定着細胞が少ない場合は再度再起培養を行う。

終了確認日時：

検査実施標準作業書(ひな形)

SOP No. XXX

試験品の種類 培養細胞

検査項目 細胞感受性試験

試験法 参照ウイルスを用いた力価試験

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ウイルス課 山田太郎

承認者
(検査部門責任者)

失効日 平成 年 月 日

〇〇〇〇研究所
〇〇部 〇〇課
検査実施標準作業書

[細胞感受性試験]

	年 月 日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作 成	平成 26 年 月 日	〇〇××	△△□□	
第 1 回改訂				
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 10 回改訂				

細胞感受性試験標準作業書

1 検査の項目

ポリオウイルスに対する細胞感受性試験

2 試験品の種類

RD-A 細胞および L20B 細胞

3 検査法

原理：弱毒参照ポリオワクチン株（BSL1）を用いて力価試験を行う。

出典：World Health Organization. Polio laboratory manual 4th edition, WHO/IVB/04.10, page 73-79, 2004

4 検査等に用いる試薬

試薬

- ① イーグル MEM 培地：和光(型番)
- ② PBS(-)：和光(型番)
- ③ FBS：シグマ
- ④ EDTA-トリプシン溶液：シグマ(型番)

- ⑤ トリパンブルー溶液：シグマ(型番)

※培地作製については、「培地作製標準作業書」（番号 XXX）を参照すること。

参照ウイルス

弱毒参照ポリオワクチン株（NIBSC 株）

※参照ポリオウイルスの調整（in house 参照ウイルス）、保管条件は「培地作製標準作業書」（番号 XXX）を参照すること。

5 検査等に用いる機器・器具及び器材

1) 機器・器具

- ① 炭酸ガス培養装置（〇〇〇〇社 型番）
- ② 顕微鏡（〇〇社 型番）
- ③ ボルテックス（〇〇社 型番）
- ④ マイクロピペット
- ⑤ 数取器
- ⑥ 試験管立て

- ⑦ マルチチャンネルマイクロピペット
- ⑧ 冷凍庫
- ⑨ 冷蔵庫

2) 器材

- ① 細胞培養用 96 穴マイクロプレート
- ② 15ml 滅菌チューブ
- ③ 細胞培養フラスコ 25cm²
- ④ ビルケルチュルク血球計算盤
- ⑤ フィルター付き滅菌チップ (p-200 用, p-1000 用)
- ⑥ 25ml リザーバー

6 作業環境、操作上の注意

- 1) 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
- 2) 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブのフタを開ける時はその前に軽く遠心すること。
- 3) 検査工程により作業エリアを区分する。

作業内容	作業エリア
細胞の調整	無菌室 (細胞調整室)
ウイルス接種	無菌室 (病原体取扱室)
CPE の観察	無菌室 (病原体取扱室)

- 4) 作業工程の操作は、検査工程管理チェックシートで確認する。

7 検査法

- 1. カルチャーボトルの培養液を捨てる。
- 2. PBS で細胞を 3 回洗浄する。
- 3. トリプシン溶液を 1ml 加える。
- 4. トリプシン溶液で細胞を満たしたらトリプシン溶液は捨てる。
- 5. 細胞がすべて壁面から剥がれたのを確認し、10%細胞増殖培地 5ml で懸濁し細胞懸濁液とする。(注：懸濁時、泡が立たないようにする。)
- 6. 細胞懸濁液とトリパンプルーを等量混合する。
- 7. ビルケルチュルク血球計算盤の片側に 6 の混合液 10 μ l を入れ、顕微鏡下で細胞を