

計測する。

8.  $1\sim 4\times 10^5$  個/ml になるように細胞懸濁液を希釈する。
9.  $10^{-1}$  から  $10^{-8}$  までの希釈系列用チューブを準備する。
10. それぞれのチューブに 2%細胞維持培地を 9ml 入れる。
11. マイクロピペットを用いて  $10^{-1}$  と記載されたチューブにウイルス溶液 1ml 加え 10 回転倒混和でよく攪拌し  $10^{-1}$  希釈とする。
12.  $10^{-8}$  希釈まで同様に調製する(図 1)。
13.  $10^{-5}$  から  $10^{-8}$  まで希釈したウイルス溶液  $100\mu\text{l}$  をウェル番号 1 から 10 番に 2 列ずつ計 20 穴に加える(図 2)。
14.  $100\mu\text{l}$  の 2%細胞維持培地をウェル番号 11 と 12 番すべてに加え細胞コントロールとする。
15. すべてのウェルに  $1\sim 4\times 10^5$  個/ml の細胞浮遊液を  $100\mu\text{l}$  加える。
16. プレートに蓋をして、 $36^{\circ}\text{C}$ 、5%炭酸ガス存在下で培養する。
17. 7 日間観察し、毎日、CPE の出現を記録する。
18. ウイルス力価を Kärber の式を用いて計算する(別紙)。
19. 求めたウイルス力価の log 値が内部基準の  $\pm 0.5$  の範囲に入っていることを確認する。

図 1

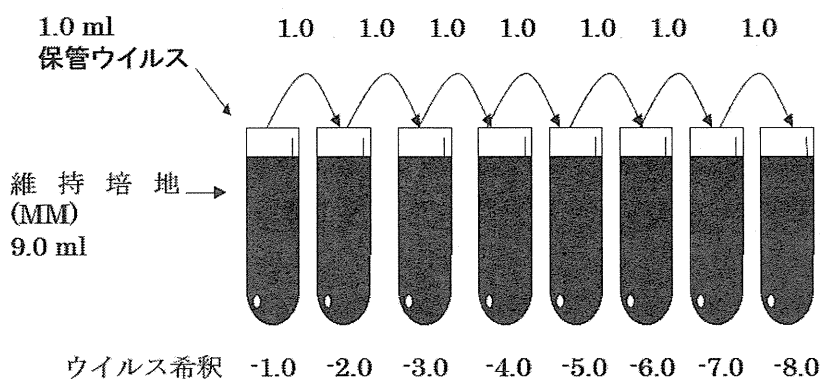
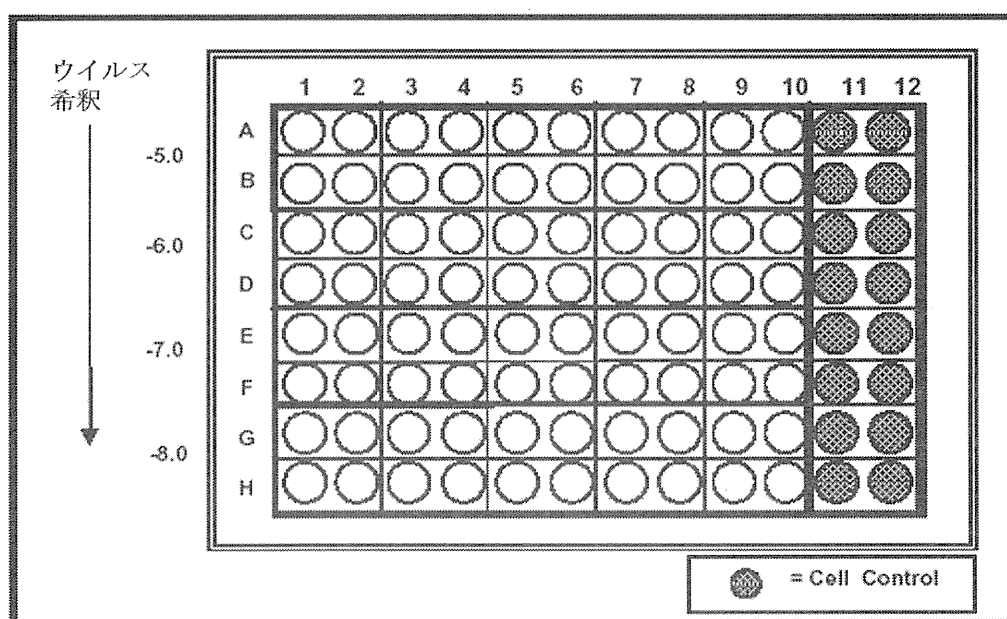


図 2



## 8 結果判定

In house 参照ウイルス株のウイルス力価の log 値が内部基準の±0.5 の範囲ならば合格、再度試験を行っても範囲外ならば細胞のリカバリー、あるいは新たな細胞入手、ウイルス保管温度管理条件等を検討し適切な対応をとること。

### 作成上の留意点

培地作製、in house 参照株の調製方法、保管方法は「試薬などの調製」の項で別の SOP を作成する。特に in house 参照株の保管は温度管理モニター導入が望まれる。

ウイルス同定時のウイルス力価測定試験の SOP は異なる。

細胞の保存、リカバリー、継代の SOP は、「試薬などの調製」の項で SOP を作成すること。

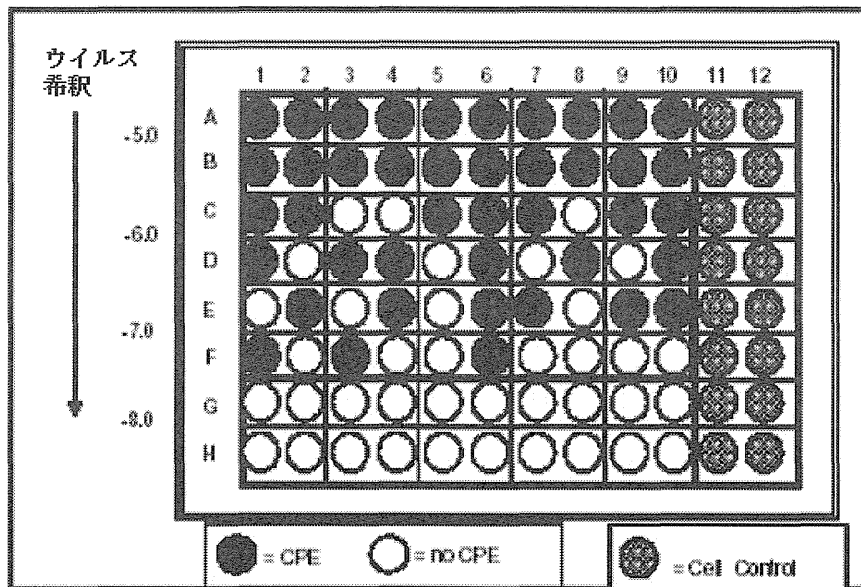
## Kärber 法によるウイルス力価の計算

公式  $\log \text{CCID}_{50} = L - d(S - 0.5)$

L = 試験で用いられた最も低い希釈倍率(対数)

d = 各希釈倍率間(対数)の差;

S = 各希釈倍率における、CPEが出現したウエル数の比率



-5: 20/20=1  
 -6: 13/20=0.65  
 -7: 9/20=0.45  
 -8 0/20=0

### 上記の結果を得た時の、計算例

(20ウエル中何個のウエルにCPEが現れたか数え、比率を求め、各希釈列の割合を足す)

$L = -5.0; d = 1.0; S = 1 + 0.65 + 0.45 + 0 = 2.1$  :

$\log \text{CCID}_{50} = -5 - 1(2.1 - 0.5) = -6.6$

ウイルス力価 =  $10^{6.6} \text{CCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$

細胞の調整

①使用細胞(継代数): \_\_\_\_\_ 継代日(実施者): \_\_\_\_\_

②使用細胞(継代数): \_\_\_\_\_ 継代日(実施者): \_\_\_\_\_

開始日時: \_\_\_\_\_ 試験実施者 \_\_\_\_\_

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. 全ての細胞が壁面から剥がれたのを確認し適当な量の培養液に懸濁し細胞懸濁液とする。
6. 細胞懸濁液とトリパンブ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10 $\mu$ lの細胞懸濁液を入れ、顕微鏡下で細胞を計測
8. 1~4 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mlになるように細胞懸濁液を希釈する。

検体番号	計測結果		1ml当たりの細胞数	希釈	
	実測	平均		細胞懸濁液	培地

使用した試薬又はキット

イーグルMEM Lot: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_

トリプシン Lot: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_

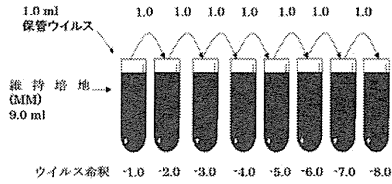
PBS Lot: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_

FBS Lot: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_

本試験

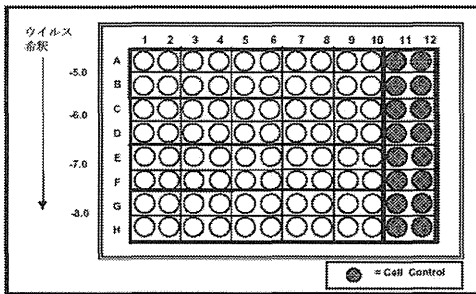
開始日時: \_\_\_\_\_ 試験実施者 \_\_\_\_\_

図 1



1. イーグルMEM培地を用いてウイルスを $10^{-8}$ 希釈する
2.  $10^{-5}$ から $10^{-8}$ 希釈のウイルス溶液を $100 \mu\text{l}$ ずつ96穴マイクロプレートに下図のように分注する。

図 2



3. 全てのウェルに $1 \sim 4 \times 10^5$ 個/mlに調整した細胞を加える
4.  $36^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス存在下で培養する



計算法

公式  $\log CCID50 = L - d(S - 0.5)$   
L = 試験で用いられた最も低い希釈倍率(対数)  
d = 各希釈倍率間(対数)の差;  
S = 各希釈倍率における、CPEが出現したウエル数の比率

最も低い希釈率(L):

それぞれの希釈率でのCPEの出現割合

10 <sup>5</sup> 希釈	/20
10 <sup>6</sup> 希釈	/20
10 <sup>7</sup> 希釈	/20
10 <sup>8</sup> 希釈	/20

計算結果:

用いたin house ウイルス

力価:

測定年年月日:

細胞の種類:

判定日時:

判定者:

検査実施標準作業書

SOP No. XXXX

試験品の種類 培養細胞

検査項目 マイコプラズマ汚染否定試験

試験法 PCR法によるマイコプラズマゲノムの検出

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ○○課 ○○○○

承認者 ○○○○

(検査部門責任者)

失効日 平成 年 月 日

○○○研究所

○○課



検査実施標準作業書

[マイコプラズマ試験]

	年 月 日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作 成	平成 年 月 日	〇〇〇〇	〇〇〇〇	
第 1 回改訂	平成 年 月 日	〇〇〇〇	〇〇〇〇	検出キットの変更
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

## 細胞感受性試験標準作業書

### 1 検査の項目

マイコプラズマ汚染否定試験

### 2 試験品の種類

培養細胞

### 3 検査法

原理：細胞培養液の上清について、マイコプラズマ特異的なプライマーを用いた PCR でマイコプラズマ遺伝子を検出する。判定は電気泳動で PCR 産物の有無で行う。

出典：タカラバイオ社製 PCR Mycoplasma Detection Set の取扱説明書

### 4 検査等に用いる試薬

- ① PCR Mycoplasma Detection Set : TAKARA
- ② 蒸留水

### 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
- ② ボルテックス
- ③ 冷却遠心器
- ④ サーマルサイクラー
- ⑤ マイクロ冷却遠心器
- ⑥ マイクロピペット
- ⑦ チューブオープナー

#### 2) 器材

- ① マイクロチューブ (1.5ml) 及びマイクロチューブラック (冷蔵冷凍用)
- ② フィルター付き滅菌チップ (P-2, 10 用, P-20 用, p-100 用, p-200 用, p-1000 用)
- ③ PCR 用チューブ・蓋及びチューブラック (冷蔵冷凍用)

### 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し、チューブオープナーを使用すること。
- 3) 試薬の調整は試薬専用のクリーンベンチ内で行うこと。その際クリーンベンチのファンを止め、コンタミ防止、DNase 及び RNase の混入防止に細心の注意を払うこと。
- 4) 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
試験品の前処理	無菌室（病原体取扱室）
試薬の調製	専用クリーンベンチ
PCR	血清実験室
電気泳動	化学実験室

6) 作業工程の操作は、検査工程管理チェックシート（別添 No1-3）で確認する。

## 7 検査法

PCR 反応に使用する試薬は、全てキットに付属のものを用いる。

### ・試験品の前処理

1. 継代後、3～6 日間細胞培養を行った培養上清 1ml を 1.5ml のマイクロチューブに移す。
2. 3000rpm×10 分遠心。上清を検査に用いる。
3. 上清を 94 度、5 分加熱後、冷却（4 度）。検査を当日行わないなら -20 度保管

### ・試薬の調製

4. 表 1 に従い PCR カクテルを調整する。冷却用ラックを用いる

表 1 1<sup>st</sup>PCR 反応液の調整

試薬	容量
10 × PCR Buffer	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
MCGp F1 Primer	0.5 μ l
MCGp R1 Primer	0.5 μ l
TaKaRa Taq	0.25 μ l
Distilled water	34.75 μ l
Subtotal	45 μ l
細胞培養上清	5 μ l
Total	50 μ l

5. サーマルサイクラーの電源を入れる
6. PCR チューブのラベリング(サンプル番号、陽性、陰性コントロール)
7. PCR 用チューブに反応液を 45 μ l ずつ分注する。
8. 細胞培養上清 5 μ l を加え、しっかりと蓋を閉める。
9. 別の PCR チューブに陰性対照として水 5 μ l を加え、しっかりと蓋を閉める。
10. PCR 用 8 連チューブを緩やかに転倒混和した後にスピンドウンする。
11. 8 連チューブをサーマルサイクラーにセットする。
12. 液晶画面でマイコプラズマ検査プログラムを選択する。反応条件は、94℃で 30 秒後、[94℃、30 秒間→55℃、2 分間→72℃、1 分間]を 30 サイクル後に 4℃に保持する。
13. “RUN” を選択し反応液量を入力する。50 μ l
14. 反応が終了したら PCR 用チューブを取り出しサーマルサイクラーを止める。

## ・電気泳動

15. 2%アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の確認を行う。

## 8 結果判定

電気泳動写真から PCR 産物の有無を判定する。陰性対照でバンドが確認されないこと、陽性対象で 810bp 付近にバンドが確認できること。370-680bp 付近にバンドが確認された検体は陽性、バンドが確認できないものは陰性と記載する。

## 作成上の留意点

作業に用いる機器、器材、消耗品、試薬名などは各検査室の状況にあわせ、名称、操作法など変更訂正する。

マイコプラズマ検出には PCR のほか、リアルタイム PCR、IF など別の原理で測定できる各種キットが販売されている。キットの種類により操作法、判定法など適宜変更する。

電気泳動、細胞培養についても別途、マニュアルあるいは SOP の作成が望ましい



電気泳動

2%アガロースゲル

調製日：

開始日時：

試験実施者



(レーンの説明)

## 結果の判定

電気泳動写真から PCR 産物の有無を判定する。陰性対照でバンドが確認されないこと、陽性対象で 810bp 付近にバンドが確認できること。370-680bp 付近にバンドが確認された検体は陽性、バンドが確認できないものは陰性と記載する。

## 結果判定表

結果判定表

検体番号	判定

## 判定

判定日時： \_\_\_\_\_ 判定者： \_\_\_\_\_

微生物検査区分 ○○-●●-□□

検体（病原体）取扱標準作業書

作成日：年 月 日

改定日：年 月 日

検査部門責任者

検査区分責任者

作成者

○○衛生研究所

標準作業書改定の履歴

区 分 名

記 号

微生物検査区分 No. ○○○○○

	作成日	事 由	備 考
1	年月日		新規

	改訂日	事 由	備 考
2	年月日		
3	年月日		
4	年月日		



## 1. 目的

この作業書は、微生物検査における検体の取扱いについて管理基準を定め、検査等の信頼性確保を図ることを目的とする。

## 2. 適用範囲

この作業書は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第14条に基づく検査または試験（以下「感染症発生動向調査検査」）を行う検体に適用する。

## 3. 検体の定義

検査等に供する目的で採取された臨床検体、その他の検体及び病原体をいう。

臨床検体：糞便・嘔吐物・咽頭拭い液・鼻洗浄液・喀痰・水泡液・眼粘膜拭い液・髄液・血液・血清等をいう。

その他の検体：病原体媒介性生物等をいう。

病原体：細菌、ウイルス、原虫等をいう。

## 4. 検体の受領

### 4. 1 検体受領時の確認

検体を受領する職員は、次の事項について確認する。

- (1) 一類感染症・二類感染症・三類感染症・四類感染症及び五類感染症検査票（病原体）、または保健所長による検査依頼書の記載事項と検体に同一性があること。
- (2) 検体は検査の目的に合っていること。
- (3) 検体の状態（外観、量）が適切であること。

### 4. 2 検体受領時の記録

検体受領の確認を行った後、受付番号等の必要事項を検体受付管理簿へ記入する。

- (1) 検体の取り違えや紛失等を防ぐため、検体受付管理簿の記入事項を複数確認すること。

### 4. 3 検体の分割

複数検査を行う場合は、検査目的に応じて検体を適切に分割する。

- (1) 分割した場合は、必要に応じて新たな受付番号等を検体受付管理簿に記入すること。

## 5. 検体受領後の検体の保管

検体受領後、必要に応じて、次により検体を適切に保管する。

- (1) 検体の保管にあたっては、検体を保管する容器ごとに番号等を表示すること。
- (2) 検査の目的に応じた適切な条件で検体を保管すること。
- (3) 検体受付管理簿に保管場所等を記載し、検体の取り違え、紛失等を防ぐこと。

## 6. 検査終了後の検体の保存

検査に用いた検体については、検査結果通知の発行後一定の期間、適切な条件の下に保存する。

- (1) 保存期間及び保存条件は病原体検査 SOP で定めること。

## 7. 検体の廃棄

検体の廃棄は、次により適切に行う。

- (1) 検体を廃棄した時は関係帳簿に記録し、検査区分責任者の確認を受けること。
- (2) 検体の廃棄にあたっては、廃棄物の処理及び清掃に関する法律を遵守すること。
- (3) 滅菌の要否及び感染性廃棄物容器への収納方法等については、病原体検査 SOP で定めること。

## II 研究班提言

平成27年3月18日

感染症発生動向調査事業における病原体検査に関する提言

平成26年度厚生労働科学特別研究  
「科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」  
研究班とりまとめ

研究代表者 調 恒明	山口県環境保健センター	所長
研究分担者 大石和徳 宮崎義継 小澤邦壽 佐多徹太郎 橋本修二 皆川洋子 高橋和郎 四宮博人 岸本剛 神谷信行 三崎貴子	国立感染症研究所 国立感染症研究所 群馬県衛生環境研究所 富山県衛生研究所 藤田保健衛生大学 愛知県衛生研究所 大阪府立公衆衛生研究所 愛媛県立衛生環境研究所 埼玉県衛生研究所 東京都健康安全研究センター 川崎市健康安全研究所	感染症疫学センター長 真菌部長 所長 所長 衛生学教授 所長 副所長 所長 副所長 主任 企画・調整担当課長

はじめに

近年、新興・再興感染症等の増加により国及び自治体による感染症対策の重要性が高まっている。国内では2013年の重症熱性血小板減少症候群の日本における初めての患者の報告、同年の風しんの流行に伴う40例を超える先天性風しん症候群の発生、2014年のデング熱の国内感染など、また国外においては鳥インフルエンザH5N1、H7N9、中東におけるMERSコロナウイルス、西アフリカにおけるエボラ出血熱の流行など新たな問題が持続的に発生しており、早期に効果的な対策を行うための迅速な検査診断と分子疫学等による病原体の詳細な解析が求められている。さらに世界的には薬剤耐性菌が急速に拡がっており、我が国においても耐性菌の増加を阻止するための遺伝子検査等に基づく監視と対策が重要となっている。

このため、感染症の原因病原体について、頻度が低く重症度が高いものについては主に検査診断を目的として全例について、発生数が多いものについては一定数について病原体を検出・分離し、病原体の基本的性状解析に加えて、分子疫学及び血清型、薬剤耐性、病原性の変化等の把握を目的として、広域的に継続して調査する必要がある。

一類感染症は国立感染症研究所で検査が行われるが、その他の二類から五類までの感染症は原則として地方衛生研究所で検査が行われる。地方衛生研究所で実施さ