

健 感 発 1117 第 2 号
平成 27 年 11 月 17 日

各 $\left\{ \begin{array}{l} \text{都 道 府 県} \\ \text{保健所設置市} \\ \text{特 別 区} \end{array} \right\}$ 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省健康局結核感染症課長
(公 印 省 略)

検査施設における病原体等検査の業務管理要領の策定について

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（平成 10 年法律第 114 号。以下「法」という。）に基づく感染症の患者等の検体又は感染症の病原体の検査については、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施行規則の一部を改正する省令（平成 27 年厚生労働省令第 147 号）において、検査の信頼性を確保するための実施体制等について規定されたところである。

今般、検査の信頼性確保の取組を促進するため、別添のとおり検査施設における病原体等検査の業務管理について要領を策定したので、貴職におかれては、法に基づく病原体等検査について、本要領に基づき実施されたい。

なお、本通知のうち、法第 14 条の 2 に規定する事務については、地方自治法第 245 条の 4 第 1 項の規定に基づく技術的助言とする。

検査施設における病原体等検査の業務管理要領

1 目的

本要領は、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（以下「法」という。）に基づき感染症の患者の検体又は当該感染症の病原体（以下「病原体等」という。）の検査を行う施設（以下「検査施設」という。）において、病原体等検査の業務管理について細則を定め、病原体等検査の信頼性を確保することを目的とする。

2 適用等

（１）本要領は、法第１４条の２第３項、第１５条第４項、第１６条の３第７項、第２６条の３第５項、第２６条の４第５項及び第４４条の７第５項の規定に基づき都道府県、保健所を設置する市及び特別区が行う検査に適用する。ただし、本要領中６、７、８及び１０の規定については、法第１４条の２第３項の規定による検査及び法第１５条第４項の規定により三類感染症、四類感染症又は五類感染症に係る検査を実施する場合においては適用しない。

また、法第１５条第４項に基づく検査のうち、病原体の探索等に係る検査については、本要領を適用しないことができる。

（２）本要領中別添の標準作業書の例は、あくまで標準作業書のひな形を参考として添付するものであり、標準作業書に記載する事項等を含め、各検査施設で作成する標準作業書の内容を制限するものではない。そのため、実際の標準作業書は、各検査施設における必要性や実情等に合わせ、検査施設ごとに作成すること。

なお、標準作業書の作成に当たっては、検査手順等を検討する際に参考とした文献等を明示するとともに、試験検査法等の妥当性について評価を行うことが望ましい。

3 組織

（１）病原体等検査を行う部門に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施行規則（以下「規則」という。）第７条の３第２項第３号に規定する検査部門管理者を検査施設ごとに１名以上設置し、必要に応じて区分ごとに検査区分責任者を設置すること。（検査部門管理者が検査区分責任者を兼ねることも可とする。）

また、規則第７条の３第２項第４号に規定する信頼性確保部門管理者を施設ごとに１名以上設置すること。

なお、検査部門管理者及び信頼性確保部門管理者が不在の場合にあつては、あらかじめ当該業務を代理する者を指名し、業務を行わせることができる。

さらに、検査区分責任者は病原体等の取扱いの知識及び経験を有する者を、また検査部門管理者は病原体等検査の質を確保するために十分な資質を有する者を確保するよう努めなければならない。

（２）検査部門管理者は、規則第７条の３第２項第３号イからホまでに掲げる業務のほか、次の業務を行うこと。なお、検査部門管理者及び検査区分責任者（以下「検査部門管理者等」という。）は、業務に支障がない限り、検査業務に従事することができる。

- ① 検査区分責任者及び検査員の職務分掌を明らかにする文書の作成及び保存
 - ② 標準作業書の作成及び改定の承認
 - ③ 検査結果書の確認及び発行の承認
 - ④ 検査区分責任者及び検査員の研修計画の策定並びに研修に関する記録の作成及び保存
 - ⑤ 信頼性確保部門管理者から検査の信頼性に影響を及ぼすおそれのある問題について改善の指摘があった場合は、必要な是正処置
 - ⑥ その他検査部門を統括するために必要な業務
- (3) 検査部門管理者等は、規則第7条の3第2項第3号ハに掲げる業務のほか、検査員を指揮監督して次の業務を行うこと。
- ① 標準作業書の作成及び改定並びにその保存
 - ② 病原体等検査に係る施設設備及び機械器具の管理
 - ③ 検体の受領等取扱いの状況の確認
 - ④ 病原体の検出、分離、同定等の結果が確認できる資料（以下「データ」という。）及び検査結果の確認
 - ⑤ 標本、データ及び検査結果書の控えの保存
 - ⑥ その他当該検査区分において検査の業務を管理するために必要な業務
- (4) 検査部門管理者等は、規則第7条の3第2項第3号ハについては、逸脱が生じた場合には、その内容を評価し、検査の結果に影響がない場合にあっては逸脱した原因を明確にするとともに必要に応じ標準作業書の改定等を行うこととし、影響がある場合には、病原体等検査の結果の撤回及び是正処置等の必要な措置を講ずること。
- (5) 信頼性確保部門管理者は、規則第7条の3第2項第4号イからニまでに掲げる業務のほか、次の業務を行い、又は規則第7条の3第2項第4号に規定する業務の内容に応じてあらかじめ指定した者（以下「あらかじめ指定した者」という。）に行わせること。
- ① 規則第7条の3第2項第8号トの文書に基づく精度管理
 - ② 当該文書からの逸脱が生じた場合の内容の評価及び必要な措置
 - ③ 標準作業書の写しの保存その他病原体等検査の信頼性の確保に係る必要な業務
- (6) 検査部門及び信頼性確保部門の責任、相互関係（組織の相互関係が分かる組織図を含む。）、各部門の管理者の権限及び責任並びに各業務の責任者又は担当者を明らかにすること。

4 検査室等の管理

- (1) 検査部門管理者は、適切な病原体等検査が実施可能となるよう十分な広さの検査室を確保し、必要に応じ区画を設けること。
- (2) 検査部門管理者は、病原体等検査に支障を生じないよう次の事項に留意して検査室の維持管理を行うこと。
- ① 適切な温度、湿度、換気、照明等の確保
 - ② 部外者の立ち入り及び目的外使用の制限
 - ③ 試薬及び機械器具等の汚染防止に必要な設備及び環境の確保

- (3) 病原体等検査を行う検査室等は、取り扱う病原体のバイオセーフティーレベルに応じた構造及び設備を備えていること。

5 遺伝子検査の管理

- (1) 遺伝子検査を行う場合、遺伝子検査の精度を適正に保つため、以下の事項に留意すること。
- ① 核酸抽出作業を行う室と遺伝子増幅産物の検出作業を行う室が明確に区分されていること
 - ② 試薬の調製を行う場所は他と区分されていること
 - ③ できる限り空調設備は前記の室ごとに独立していること
- (2) 遺伝子検査については、交差汚染防止のため、次の事項を含む検査のための汚染防止要領を作成し、これに従うことが望ましい。
- ① 遺伝子検査室の構造
 - ② 作業動線の注意点、
 - ③ 機器の扱い
 - ア 安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内における試薬調製、汚染防止のための定期点検、
 - イ 遠心分離器
 - ウ 専用の微量分注器
 - ④ 試薬消耗品の管理
 - ア 試薬の調整時の分注（プライマー、コントロールなど使い切り等）
 - イ 使い捨て消耗品の事項（フィルター付きチップ、0.2 ml チューブの種類など）
 - ウ 使い捨て手袋の使用
 - ⑤ 陰性コントロール、陽性コントロールの事項
 - ⑥ 非特異反応への対処法（解釈）
 - ⑦ 検体の取り違い防止
 - ⑧ 研修
 - ⑨ その他注意事項

6 機械器具の管理

- (1) 機械器具保守管理標準作業書の作成及び改定については、別添1を参考とすること。
- (2) 検査部門管理者等は、操作、保守点検、維持等が容易に行われるよう機械器具を適切に配置すること。
- (3) 検査部門管理者等は、機械器具保守管理標準作業書に従い、個別の機械器具について管理を担当する検査員を定め、保守管理維持に努めること。

7 試薬等の管理

- (1) 試薬等管理標準作業書の作成及び改定については、別添2を参考とすること。

(2) 検査部門管理者等は、試薬等管理標準作業書に従い、試薬、試液、培地、細胞、参照株、陽性コントロール（病原体遺伝子）等（以下「試薬等」という。）について管理を担当する検査員を定め、次の事項の確認を行うこと。

- ① 試薬等については、その容器に名称、純度又は濃度、保存方法、調製年月日、使用期限、受領年月日、開封年月日等を表示し、適切に保存すること。なお、変質したもの、使用期限を経過したものを使用しないこと。
- ② 培地、参照株及び陽性コントロールについては、その容器に名称、純度又は濃度、保存方法、入手源、入手年月日、使用期限のほか、必要に応じ製造年月日等を表示すること。また、変質を防止するために適切な条件下に保存し、適切なものを病原体等検査に使用すること。
- ③ 試薬等を調製した場合は、その記録を作成し保存すること。
- ④ 参照株については、名称及び保存方法を表示した専用の容器に保存すること。

8 培養細胞等の管理

- (1) 培養細胞管理標準作業書の作成及び改定については、別添3を参考とすること。
- (2) 検査部門管理者等は、培養細胞管理標準作業書に従い、細胞同士の交差汚染、ウイルス分離偽陰性を防ぐため培養細胞の維持管理に努めること。

9 有毒な又は有害な物質及び危険物の管理

- (1) 検査部門管理者等は、毒物、劇物、高圧ガスその他の有毒又は有害物質及び危険物の保管、設置等について関係法令を遵守して適切に管理すること。
- (2) 検査部門管理者等は、病原体等検査に用いられる全てのものに係る廃棄物について安全かつ衛生的に管理すること。

10 検体（病原体を含む。以下同じ。）の取扱いの管理

- (1) 検体取扱標準作業書の作成及び改定については、別添4を参考とすること。また、検体の取扱いに当たっては、バイオセーフティに十分配慮すること。
- (2) 検体を受領する職員は、次の事項を確認し受領すること。
 - ① 検査依頼書（検査票）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 受付番号を検査依頼書（検査票）及び検体受付管理簿へ記入すること。
 - ⑤ 検体の取り違いや紛失等を防ぐため、複数の担当者が記載事項について誤りがないか確認すること（搬入者とのダブルチェック等、ダブルチェックの方法を工夫する）。
- (3) 検査部門管理者等は、検体の取扱いについて、検体取扱標準作業書に従い管理を担当する検査員を定め、次の事項を確認すること。
 - ① 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こと。
 - ② 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。
 - ③ 検査の目的に応じた適切な条件で検体を保管すること。

- ④ 検体受付管理簿に保管場所等を記載し、検体の取り違い、紛失等を防ぐこと。
- (4) 検査部門管理者は、他の地方公共団体又は国等への検体の運搬に当たって、次の事項を含む検体の運搬に係る実施要領を作成し、必要に応じて所定の研修を受講した包装責任者を指定すること。
 - ① 搬送容器
 - ② 包装方法・包装責任者・包装確認表（チェックリスト）
 - ③ 温度管理
 - ④ 検査依頼書
 - ⑤ 搬送（受領）確認
 - ⑥ 研修
 - ⑦ 遵守すべき規定等

1 1 病原体等検査の管理

- (1) 検査標準作業書の作成及び改定については、別添5を参考とすること。
- (2) 検査部門管理者等は、検査終了後、次の事項を確認し、記録すること。
 - ① 検査員の氏名
 - ② 検体受付番号 I D
 - ③ 検体の保管場所
 - ④ 検査の実施の方法
 - ⑤ 検査を開始した年月日時及び検査を終了した年月日時
 - ⑥ 検査の結果
 - ⑦ 検査の結果を確認した旨
 - ⑧ その他の必要な事項
- (3) 検査結果書には、次の事項を記載すること。
 - ① 検査依頼及び検体採取年月日
 - ② 検体の種類
 - ③ 検査項目
 - ④ 検査の実施方法
 - ⑤ 検査の結果
 - ⑥ 検査結果書の発行年月日及び番号

1 2 検体の保管及び廃棄

- (1) 検査に用いた検体については、その一部を検査結果書の発行後一定期間、適切な条件の下に保存すること。ただし、現状を維持することが困難な場合にあってはこの限りではない。
- (2) 検体の廃棄については廃棄物処理法等を遵守し適切に行うこと。また、廃棄した際は、関係帳簿（書類）に記録し、検査部門管理者等の確認を受けること。

1 3 データの作成

- (1) 検査中に得られるデータの作成は、次により行うこと。

- ① 読み易く、かつ、容易に消すことのできない方法で作成すること。
- ② 作成の年月日を記載し、検査員等の署名又は捺印を行うこと。
- (2) データの内容を変更する場合にあっては、変更前の内容を不明瞭にしない方法で行うとともに、変更の理由及び年月日を記入し、変更者の署名又は捺印を行うこと。
- (3) コンピュータ等によりデータの作成を行い、保存する場合にあっては、次の事項を確認すること。
 - ① 作成されたデータの保存、管理の方法を規定していること。
 - ② データの処理、記録、伝送、保存等の完全性並びに機密保持等に関して、データ保護のための手順を確立していること。
 - ③ 使用するソフトウェアが十分な信頼性を有すること。
 - ④ コンピュータその他の設備を適切な方法で保守管理していること。
 - ⑤ 電磁的記録のバックアップ及び保護の手順並びに記録への無許可のアクセス又は修正を防止する手順を持つこと。
 - ⑥ データの内容を変更する場合にあっては、変更前のデータを残すとともに、変更者の氏名、年月日、変更理由を明確にすること。

1 4 データ等の保存

- (1) データ、記録、報告書、検査依頼書、検査結果書の控え等（以下「データ等」という。）は適切に保存すること。

なお、データ又は記録を検査結果書の控えと別の施設に保存する場合は、当該検査結果書の控えを保存する施設において、データ又は記録の保存場所を確認可能とすること。
- (2) 検査部門管理者等は、データ等の保存に際し担当者を定め、索引を付ける等、検索に便利な方法で整理するとともに、データ等の損傷又は品質の変化を最小限にとどめるよう適切に措置すること。なお、電磁的記録については、バックアップを取り、セキュリティ対策を講じること。

1 5 内部監査

- (1) 信頼性確保部門管理者は、規則第7条の3第2項第4号イの規定により内部監査を行い、又はあらかじめ指定した者に行わせ、次の事項を含む記録をすること。
 - ① 監査を実施した年月日
 - ② 監査項目（内容）
 - ③ 監査結果
 - ④ 必要な是正処置又は指導の内容
 - ⑤ 是正処置の信頼性確保部門管理者による確認結果の記録
- (2) 検査部門管理者は、規則第7条の3第2項第3号ロに掲げる是正処置を講じた場合には、その内容を信頼性確保部門管理者に文書により報告すること。

なお、是正処置を講じるに当たって、検査部門管理者が関係検査員に改善の内容を指示したときは、指示内容及び講じた措置の確認内容を記録すること。
- (3) 信頼性確保部門管理者は、(2)の報告を受けたときは、講じた措置の確認内容

を記録すること。

1 6 不適合業務及び是正処置等

(1) 信頼性確保部門管理者は、不適合業務について、次の事項を明らかにし、その結果を記録すること。

- ① 不適合業務が特定された場合の処置（不適合業務が発生した場合の緊急処置（検査部門管理者への報告、業務の中止、検査結果書の発行保留等）に加えて、是正処置への移行プロセスも含む。）
- ② 不適合業務に係る記録の方法

(2) 信頼性確保部門管理者は、是正処置等について、次の事項を明らかにし、その結果を記録すること。

- ① 不適合業務の原因を除去し再発を防止するための適当な是正処置を実施する方法
- ② 是正処置の効果を確認する方法
- ③ 是正処置に係る記録の方法
- ④ 起こりうる不適合が発生することを防止するため、その原因の除去等を行う予防処置の実施に関する事項

1 7 精度管理

(1) 検査の信頼性確保試験標準作業書の作成及び改定については、別添 6 を参考とすること。

(2) 信頼性確保部門管理者は、規則第 7 条の 3 第 2 項第 4 号ロの規定により、検査部門管理者と協議の上、検査の質を保証するため、信頼性確保試験標準作業書に基づき、定期的に信頼性確保試験が実施されていることを確認すること。なお、検査員の技能について評価を行う場合は、次の事項を参考に行うこと。

- ① 通常の検体を用いて、定められた方法により病原体等検査の再現性を維持できる能力
- ② 既知の病原体等を検出、分離、鑑別及び同定する技能

(3) 検査部門管理者等は、(2) の評価及び必要に応じこれに基づく是正処置を記録し、信頼性確保部門管理者又はあらかじめ指定した者にその写しを提出すること。

(4) 信頼性確保部門管理者は、(3) の報告に基づき、精度管理の結果をとりまとめ、規則第 7 条の 3 第 2 項第 4 号ハの規定により、是正処置が必要な場合には、その内容を含め、検査部門管理者に対し文書により報告を行うこと。

(5) 検査部門管理者は、規則第 7 条の 3 第 2 項第 3 号ロに掲げる是正処置を講じた場合には、その内容を信頼性確保部門管理者に文書により報告すること。

(6) 信頼性確保部門管理者は、(5) の報告を受けたときは、講じた是正処置の確認を行い、又はあらかじめ指定した者に行わせること。

(7) 信頼性確保部門管理者は、規則第 7 条の 3 第 2 項第 4 号ハの規定に基づき、次の事項について記録すること。

- ① 実施年月日

- ② 実施内容
- ③ 実施結果
- ④ 必要な是正処置
- ⑤ 是正処置の信頼性確保部門管理者による確認結果

1 8 外部精度管理調査

- (1) 信頼性確保部門管理者は、規則第7条の3第2項第4号ロ及びハの規定により、検査部門管理者と協議の上、外部精度管理調査（国又は都道府県その他の適当と認められる者が行う精度管理に関する調査をいう。以下同じ。）の定期的な参加計画を作成すること。
- (2) 信頼性確保部門管理者は、外部精度管理調査の結果をとりまとめ、是正処置が必要な場合には、その内容を含め、検査部門管理者に対し文書により報告を行うこと。
- (3) 検査部門管理者は、規則第7条の3第2項第3号ロに掲げる是正処置を講じた場合には、その内容を信頼性確保部門管理者に対し文書により報告すること。
信頼性確保部門管理者は、上記の報告を受けたときは、講じた是正処置の確認を行い、又はあらかじめ指定した者に行わせること。
- (4) 信頼性確保部門管理者は、規則第7条の3第2項第4号ハの規定に基づき、次の事項について記録すること。
 - ① 実施年月日
 - ② 実施内容
 - ③ 実施結果
 - ④ 必要な是正処置
 - ⑤ 是正処置の信頼性確保部門管理者による確認結果

1 9 教育訓練及び研修

- (1) 検査部門管理者は、信頼性確保部門管理者及び検査区分責任者と協議の上、教育訓練及び研修（以下「研修等」という。）の実施計画を定期的に策定すること。
- (2) 検査部門管理者は、検査員に対し、次の事項を含む研修等の機会を与えること。
なお、新たに検査員となった者又は検査員として経験の浅い者については、特に十分な研修等を行うとともに、外部研修、学会等に参加した場合は、報告会などの方法により、組織内にその内容の共有化を図ること。
 - ① 病原体等検査方法（検体の受領及び搬送を含む）に関する研修等
 - ② 精度管理の実施結果に基づき行われる研修等
 - ③ 内部研修、外部研修、学会等への参加
- (3) 信頼性確保部門管理者は、あらかじめ指定した者に対して、信頼性確保に関する必要な研修等の機会を与えること。

2 0 実施時期

本要領は、平成28年4月1日から施行する。

- 別添 1－1 機械器具保守管理標準作業書の例（DNA シーケンサー）
- 別添 1－2 機械器具保守管理標準作業書の例（リアルタイムPCR 装置）
- 別添 1－3 機械器具保守管理標準作業書の例（冷凍庫）
- 別添 2－1 試薬等管理標準作業書の例（全般）
- 別添 2－2 試薬等管理標準作業書の例（細胞培養に使用する培地）
- 別添 3 培養細胞管理標準作業書の例
- 別添 4 検体取扱標準作業書の例（全般）
- 別添 5－1 検査標準作業書の例（インフルエンザウイルス分離）
- 別添 5－2 検査標準作業書の例（インフルエンザウイルスのリアルタイム R T－P C R 検査）
- 別添 5－3 検査標準作業書の例（ポリオウイルス分離）
- 別添 5－4 検査標準作業書の例（コレラ菌の定性試験）
- 別添 5－5 検査標準作業書の例（コレラ菌特異的遺伝子の検出）
- 別添 6 検査の信頼性確保試験標準作業書の例（マイコプラズマ汚染否定試験）

機械器具保守管理標準作業書

管理番号 ○-△

対象機器 DNA シーケンサー 3500xl

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○○○

承 認 者 ○○
(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

検査実施標準作業書

[DNA シーケンサー]

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

1 適用範囲

この標準作業書は、〇〇県保健環境研究所〇〇課の DNA シーケンサー 3500xl に適用する。

2 保守点検計画

1) 使用時点検

使用者は機器の使用を開始する前に使用時点検を行う。

2) 定期点検

メーカーによる定期点検を年 1 回実施する。

3 保守点検の手順

(1) 使用時点検

点検者は使用時点検基準（表 1）に従って点検し、使用時点検簿（様式 1）に記入する。異常が認められた場合は、使用時点検基準（表 1）の「処置」に従う。

表 1 使用時点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処 置
緩衝液	機器のモニターより確認	使用期限内	新しい緩衝液に交換する。
ポリマー	機器のモニターより確認	使用期限内	新しいポリマーに交換する。
キャピラリー	機器のモニターより確認	使用期限内	新しいキャピラリーに交換する。
外観	扉の開閉、汚れ等目視で点検	完全に開閉ができること。	調整、機器の修理行う。

(2) 定期点検

年 1 回のメーカーによる定期点検を実施しその記録を保管する。

4 DNA シーケンサー使用時点検簿（様式 1）記入方法

a) 点検年月日を記入し、点検項目ごとに正常を○、異常を×と記入する。

また、表示値を記入するものにはその数値を記入する。

b) 判定欄は点検項目毎に定めた許容範囲内にあるか否かを判定し、正常は○、異常は×と記入する。

c) 異常の場合は異常時点検・修理簿（様式 2）に記入し必要な処置を行い、復旧時は×→○と記入する。

5 異常時の処置

1) 機器の取扱い

保守点検時又は使用中に機器の異常が認められた場合、使用者は直ちに管理担当者又は検査区分責任者に報告する。管理担当者はメンテナンスガイドに従って点検し、点検結果から修理が必要と判断された場合は、使用を中止し、修理又は修理を外部委託するなどの処置を行う。その経過を異常時点検・修理簿（様式2）に記録する。

2) 試験品の取扱い

検査中に機器の異常が認められた場合は、検査担当者は直ちに検査を中止し、試験品及びその検査の取り扱いについて検査区分責任者と協議の上適切に処置する。検査担当者は経過を検査等に関する記録に記録する。

6 異常時の連絡または問い合わせ先

購入先名 電話：〇〇〇－〇〇〇〇（担当）

機器メーカー名 電話：〇〇〇－〇〇〇〇

DNA シーケンサー使用時点検簿

使用年月日	緩衝液交換	ポリマー交換	キャピラリー 交換	外観	備考
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		

異常時点検・修理簿

点検年月日： 年 月 日

管理番号：

管理担当者：

機種名：

検査区分責任者：

1 異常の状況（異常発生日、状況等）

2 原因と処置内容及び結果

3 修理の依頼年月日、依頼先、依頼内容

4 修理等の概要

（作業報告書を添付すること。ただし、メーカー等に依頼しないで修理した場合、その内容を記入すること）

機械器具保守管理標準作業書

管理番号 ○-△

対象機器 遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課

承 認 者 ○○
（検査部門管理者）

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

検査実施標準作業書
[遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）]
改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

1 適用範囲

この標準作業書は、〇〇県保健環境研究所〇〇課の遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）に適用する。

2 保守点検計画

1) 使用開始時点検

使用者は、機器の使用を開始する前に使用開始時点検を行う。

2) 使用時点検

使用開始時点検を終了した機器を使用する場合は、使用時点検を行う。

3) 使用終了時点検

使用を終了する場合は、使用終了時点検を行う。

4) 定期点検

メーカーによる点検を年 1 回実施する。

3 保守点検の手順

1) 使用開始時点検

使用者は使用開始時点検基準（表 1）に従って点検し、点検時刻および点検結果を遺伝子増幅装置使用記録表（様式 1）に記入する。異常が認められた場合は、使用開始時点検基準（表 1）の「処置」に従う。

2) 使用時点検

使用開始時点検が終了した機器を使用する場合は、使用時点検基準（表 2）に従って点検し、遺伝子増幅装置使用記録表（様式 1）に記入する。異常が認められた場合は、使用時点検基準（表 2）の処置に従う。

3) 使用終了時点検

メインスイッチを切る際に使用終了時点検を行う。使用終了時点検基準（表 3）に従って点検し、点検時刻および点検結果を遺伝子増幅装置使用記録表（様式 1）に記録する。異常が認められた場合は、使用終了時点検基準（表 3）の処置に従う。

4) 定期点検

年 1 回のメーカーによる点検を実施しその記録を保管する。

4 遺伝子増幅装置使用記録表（様式 1）記入方法

a. 正常を○、異常を×と記入する。

b. 全ての点検項目が良好であった場合は、判定欄に○を記入する。

c. 異常の箇所があった場合は正常な状態に復旧するよう処置し、復旧時は×→○を記入する。また、備考欄または欄外に処置内容を記入する。

5 異常時の処置

1) 機器の取扱い

保守点検時又は使用中に機器の異常が認められた場合、使用者は直ちに管理担当者又は検査区分責任者に報告する。管理担当者はメンテナンスガイドに従って点検し、点検結果から修理が必要と判断された場合は、使用を中止し、修理又は修理を外部委託するなどの処置を行う。その経過を異常時記録及び修理記録表（様式 2）に記録する。

2) 試験品の取扱い

検査中に機器の異常が認められた場合は、検査担当者は直ちに検査を中止し、試験品及びその検査の取り扱いについて検査区分責任者と協議の上適切に処置する。検査担当者は経過を検査等に関する記録に記録する。

6 異常時の連絡または問い合わせ先

購入先名 _____ 電話：〇〇〇－〇〇〇〇（担当）

機器メーカー名 _____ 電話：〇〇〇－〇〇〇〇

表 1 使用開始時点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処置
設置状態	目視による。	高温多湿を避け温度・湿度等の安定した場所に設置及び収納すること。機器ならびに使用器材が清潔に保持されており、外見上変形・傷・腐食などが無いこと。	環境条件の安定した場所に設置する。 汚れは清拭及び洗浄などメンテナンスガイドに従い除去し、汚染器材は使用しないこと。 器具に傷みがあり機器の性能に影響を与えるものは修理を行う。
性能	電源を入れる。機器を試験的に作動させ、性能を確認する。	電源が入り作動すること。 本機のセルフテスト機能でエラーが出ないこと。	異常の原因を確認し修理を行う、またはメーカーに修理を依頼する。 エラーの発生時、メンテナンスガイドに記載されている内容にそって、メーカーへの修理の依頼等対処する。

表 2 使用時点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処置
プログラムの運転状況	操作パネルによる目視による。	プログラムが正常に稼働していること。	異常発生時、メンテナンスガイドに従い対処し、改善されない場合メーカーに連絡の上修理を依頼する。
音 (冷却ファン) (シャッター)	冷却ファンが異常音を発していない事を確認する。 シャッターの音が正常音を発している事を確認する。	プログラム上、冷却のステージにある時に正常に稼働していること。 プログラム上、サイクルが進む毎に正常音を発している事を確認する。	異常発生時、メンテナンスガイドに従い対処し、改善されない場合メーカーに連絡の上修理を依頼する。

表 3 使用終了時点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処置
設置状態	目視による。	機器ならびに使用器材が清潔に保持されており、外見上変形・傷・腐食などが無いこと。	汚れは清拭及び洗浄などメンテナンスガイドに従い除去し、汚染器材は使用しないこと。
延べ点灯時間	ソフトウェア 【Instrument】 メニューから延べ点灯時間を確認し、記載する。	交換したハロゲンランプの延べ点灯時間が2000時間を超えないこと。	延べ点灯時間が2000時間を超えた場合は、メンテナンスガイドに従い、ハロゲンランプを交換し、ROI キャリブレーションを実施後、使用する。

遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）使用記録表

メーカー名：〇〇〇〇 形式： 管理番号：
 備品番号：ID 設置場所：〇〇〇〇室 管理担当者名：
 異常発生時連絡先： TEL 〇〇〇－〇〇〇〇

点検年 月 日	点検 区分	点検 時刻	設置 状態	性能	フロ グラム	音	延べ点 灯時間	判定	点検者	備考
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									
年 月 日	開始時									
	使用時									
	終了時									

* 使用開始時：作動状態以外の全項目を点検する。

* 使用時：作動状態の項目を点検する。

* 使用終了時：設置状態の項目を点検する。

(様式 2)

遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）異常時記録および修理記録表

メーカー名：〇〇〇〇

形式：_____

器番：_____

管理番号：_____

管理担当者：_____

設置場所：〇〇〇 室

設置年月日：_____ 年 _____ 月 _____ 日

異常発生時連絡先：_____

TEL 〇〇〇－〇〇〇〇

年月日	使用者	点検者	異常事項	処置	修理等

機械器具保守管理標準作業書

管理番号 ○-△

対象機器 冷凍庫

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○○○

承 認 者 ○○
(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

検査実施標準作業書

[冷凍庫]

改訂履歴

[illegible]

1 適用範囲

この標準作業書は、〇〇県保健環境研究所〇〇課の冷凍庫に適用する。

2 保守点検計画

1) 日常点検

担当者又は代行者は、1日1回日常点検を行う。

2) 定期点検

担当者又は代行者は、年に1回定期点検を実施する。

3 保守点検の手順

(1) 使用時点検

点検者は日常点検基準（表1）に従って点検し、日常点検簿（様式1）に記入する。異常が認められた場合は、使用時点検基準（表1）の「処置」に従う。

表1 日常点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処置
温度表示	機器のモニターより確認	設定温度±3℃	調整、機器の修理等依頼する。
扉の開閉、汚れ等の異常箇所	扉の開閉、汚れ等目視で点検	完全に開閉ができる。	調整、機器の修理行う。

(2) 定期点検

管理担当者は定期点検基準（表2）に従って点検し、定期点検簿（様式2）に記入する。

表2 定期点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処置
温度表示	温度計にて指示温度を確認する。	機器毎に定められた管理基準内であること。	修理依頼
汚れ	汚れの有無を目視で確認	汚れがないこと。	必要に応じ清掃する。
異常音	外から庫内の音を聞く。	モーター音など異常音がないこと。	修理依頼
霜	霜の状態観察	吹き出し口がふさがれていないこと。	霜取りを設定する。 霜を取り除く。
フィルター 廃水	汚れの有無を目視で確認 廃水だめを目視で確認	ほこり、ゴミ等によりフィルターがふさがっていないこと。 廃水がたまっていないこと。	清掃する。 排水する。

4 冷凍庫日常点検簿（様式1）及び冷凍庫定期点検簿（様式2）記入方法

- a) 点検年月日を記入し、点検項目ごとに正常を○、異常を×と記入する。
また、表示値を記入するものにはその数値を記入する。
- b) 判定欄は点検項目毎に定めた許容範囲内にあるか否かを判定し、正常は○、異常は×と記入する。
- c) 異常の場合は異常時点検・修理簿（様式3）に記入し必要な処置を行い、復旧時は×→○と記入する。

5 異常時の処置

1) 機器の取扱い

保守点検時又は使用中に機器の異常が認められた場合、使用者は直ちに管理担当者又は検査区分責任者に報告する。管理担当者はメンテナンスガイドに従って点検し、点検結果から修理が必要と判断された場合は、使用を中止し、修理又は修理を外部委託するなどの処置を行う。その経過を異常時記録及び修理記録表（様式3）に記録する。

2) 試験品の取扱い

検査中に機器の異常が認められた場合は、検査担当者は直ちに検査を中止し、試験品及びその検査の取り扱いについて検査区分責任者と協議の上適切に処置する。検査担当者は経過を検査等に関する記録に記録する。

6 異常時の連絡または問い合わせ先

購入先名 _____ 電話：〇〇〇－〇〇〇〇（担当）

機器メーカー名 _____ 電話：〇〇〇－〇〇〇〇

冷凍庫日常点検簿

備品・器具の設置場所 / 種類等			管理番号	〇〇検査室 フリーザー マイナス20℃			
記入例		設定温度	実測温度	異常箇所	その他	判定	点検者
2015/2/2	月	-20℃	-20℃	なし	なし	○	〇〇
		設定温度	実測温度	異常箇所	その他	判定	点検者
	日	-20℃					
	月	-20℃					
	火	-20℃					
	水	-20℃					
	木	-20℃					
	金	-20℃					
	土	-20℃					
	日	-20℃					
	月	-20℃					
	火	-20℃					
	水	-20℃					
	木	-20℃					
	金	-20℃					
	土	-20℃					
	日	-20℃					
	月	-20℃					
	火	-20℃					
	水	-20℃					
	木	-20℃					
	金	-20℃					
	土	-20℃					
	日	-20℃					
	月	-20℃					
	火	-20℃					
	水	-20℃					
	木	-20℃					
	金	-20℃					
	土	-20℃					
	日	-20℃					
	月	-20℃					
	火	-20℃					
異常箇所の所見：							
振動 騒音 蓋の開閉 エラーランプの点滅 外観 その他感知できる異常							

冷凍庫定期点検簿

点検年月日： 年 月 日 点検者： _____

管理番号： _____ 機種： _____

(1) 温度表示

設定温度	温度計の示す温度
判定	

(2) 汚れ

汚れていないか	
判定	

(3) 異常音

異常音の有無	
判定	

(4) 霜

霜の状態確認	
判定	

(5) フィルター

汚れの確認	
判定	

(6) 廃水

廃水だめの確認	
判定	

異常時点検・修理簿

点検年月日： 年 月 日

管理番号：

管理担当者：

機種名：

検査区分責任者：

1 異常の状況（異常発生日、状況等）

2 原因と処置内容及び結果

3 修理の依頼年月日、依頼先、依頼内容

4 修理等の概要

（作業報告書を添付すること。ただし、メーカー等に依頼しないで修理した場合、その内容を記入すること）

試薬等管理標準作業書

管理番号 △-1

項目 □□□□

適用 ○○○○

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○○○

承 認 者 ○○

(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

〇〇〇〇

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

1 適用範囲

感染症法第14条及び第15条に基づくウイルス学的な検査又は試験（以下「検査等」という）を行う際に使用する試薬等全般に適用する。

2 定義

試薬等の定義は次の通りとする。

試薬等とは、試薬、試液、細胞、参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）、陽性コントロール（病原体遺伝子）をいう。

1) 試薬

検査等に使用する化学物質及び生物学的製剤をいう。（基礎培地、液体培地、培地添加物質、細胞、免疫血清、抗原、赤血球等を含む）

2) 試液

試薬を調製して得られた溶液等をいう。（調製した培地、抗血清、抗原等を含む）

3) 細胞

ウイルス分離に使用する株化細胞等をいう。由来及び継代歴が明確なものを使用する。

4) 参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）

ATCC 等の生物資源データベースに登録されているウイルス、細菌株で文献等で公に基準株として使われているものをいう。

5) 陽性コントロール（病原体遺伝子）

病原体遺伝子（抽出 RNA 液、抽出 DNA 液、cDNA 液、PCR 増幅産物等）で、遺伝子検査時に陽性コントロールとして使われるものをいう。

3 調製方法

1) 試液

検査実施標準作業書に記載された方法で調製する。

2) 細胞

維持管理方法（凍結保存、継代方法、品質管理方法）について別に定める。

3) 参照株

参照株を再度保存する場合は、元の特性が引き継がれていることを遺伝子増幅法等により確認すること。

4) 陽性コントロール（病原体遺伝子）

検査実施標準作業書に記載された方法で調製する。

4 表示方法と管理台帳への記載項目

1) 試薬

（1）試薬の容器には、次の事項のうち①～⑧を表示するとともに、試薬管理台帳（様

式 1) に①～⑪の事項を記載する。

- ① 入手年月日
- ② 入手源（製造者又は販売者等）
- ③ 識別名称
- ④ ロット番号（又は製造番号）
- ⑤ 純度（グレード）又は濃度
- ⑥ 保存方法
- ⑦ 保存場所
- ⑧ 使用期限
- ⑨ 開封年月日
- ⑩ 開封確認者氏名
- ⑪ 使用終了年月日
- ⑫ 使用終了確認者氏名

2) 試液

（1）試液の調製は、それぞれの検査実施標準作業書に定める試液調製方法に従って行い、次の事項を試液管理簿（様式 2）に記録する。また、別の標準作業書で調整記録があるものについては試液管理簿への記載は不要。

- ① 調製年月日
- ② 調製者氏名
- ③ 名称（濃度が含まれる）
- ④ 調製に使用した試薬の名称および量
- ⑤ 調製量
- ⑥ 保存方法
- ⑦ 保管場所
- ⑧ 使用期限
- ⑨ 使用開始年月日
- ⑩ 使用開始確認者氏名
- ⑪ 使用終了年月日
- ⑫ 使用終了確認者氏名

（2）試液の容器には、次の事項を表示する。

- ① 調製年月日
- ② 試液名称（濃度が含まれる）
- ③ 調製者氏名

3) 参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）

(1) 遺伝子検査実施時など、核酸抽出法の質の管理のため、参照株を添加し検査を行う場合等、次の事項を参照株管理簿（様式3）に記録する。

- ① 入手年月日
- ② 入手先名称
- ③ 病原体名
- ④ 保存年月日／保存者氏名
- ⑤ 保存方法／保管場所／保存量
- ⑥ 廃棄年月日／廃棄者氏名
- ⑦ 備考（血清型・遺伝子型等）

4) 陽性コントロール（病原体遺伝子）

(1) 遺伝子診断用陽性コントロールは専用の容器に保管し、容器には次の事項を表示する。陽性コントロールは、遺伝子診断用試薬類と交差汚染が起こらないよう、注意深く保管せねばならない。

- ① 陽性コントロール名
- ② 病原体株名（ウイルス遺伝子保存場合は RNA、DNA、cDNA、PCR 増幅産物等の別）
- ③ 保存年月日

5 試薬等の管理に関する注意事項

- 1) 試薬等は必要量以上に購入しないこと。また、必要量以上に調製しないこと。
- 2) 試薬等の使用期限は使用目的に応じて設定すること。
- 3) 試薬等は適切な条件で保存し、純度の低下したもの、変質したもの、使用期限を過ぎたものは使用してはならない。ただし、十分に使用に耐えることが証明された場合には期限を延長することができる。
- 4) 試液は試液調整実施標準作業書に従って調製すること。
- 5) 使用時ごとに調製する必要のある試液は、当該検査終了時に廃棄すること。
- 6) 冷蔵、冷凍で保存している試薬等を、使用時に室温まで戻すときは吸湿あるいは体積の変化等に注意すること。通常、室温まで戻して使用すること。
- 7) 毒物、劇物、危険物の取扱いは、関係法令に従うこと。
- 8) 病原体及び有害物質の取扱いは、作業従事者が危害を被ることのないよう、また環境汚染がないよう十分配慮すること。
- 9) 試薬等の廃棄に当たっては、各種法令に違反することなく、環境汚染のないように十分配慮すること。
- 10) 標準ウイルス株・ウイルス遺伝子（陽性コントロール）は必要量以上に保存しないこと。

- 11) 標準ウイルス株等感染性を有する可能性があるものの廃棄に当たっては、各種法令に違反することなく、環境汚染のないように十分配慮し、必ず滅菌処理を施した上で廃棄すること。

試藥管理台帳

[illegible]

試薬名：

調製年月 日	調製者氏 名	調製量	試薬名称 ／量	試薬名称 ／量	試薬名称 ／量	保存方法 ／保存場所	使用期限	使用開始年 月日／確認 者氏名	使用終了年 月日／確認 者氏名	備考

参照株管理簿

[illegible]

試薬等管理標準作業書

管理番号 △-○

項目 試薬の調製

適用 細胞培養に使用する培地

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○課○○

承 認 者 ○○
(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

検査実施標準作業書

[細胞培養用培地作成]

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

1 適用範囲

ウイルス分離培養で使用する培地の調製方法

2 種類

RD-A及びL20B細胞に使用する増殖培地と維持培地

3 出典

- 1) イーグル MEM 培地「ニッスイ」① 製品説明書
- 2) 井出利憲「細胞培養入門ノート」1999 羊土社
- 3) ポリオ実験室マニュアル第4版 World Health Organization. Polio laboratory manual 4th edition, WHO/IVB/04.10, 2004

4 調製に使用する機器・器具及び器材

1) 機器・器具

ガラスビン

電子天秤（機械器具保守管理 SOP 管理番号 ）

冷蔵庫（機械器具保守管理 SOP 管理番号 ）

ピペッター

メスシリンダー

オートクレーブ（機械器具保守管理 SOP 管理番号 ）

2) 器材

10ml ピペット（滅菌済み）

アルミ箔

オートクレーブテープ

5 試液の調整

MEM 培地

1) 試薬

イーグル MEM 培地「ニッスイ」①（粉末）（同等品）

牛胎児血清：メーカー名

7.5%炭酸水素ナトリウム：

L-グルタミン（200mM）：

ペニシリン/ストレプトマイシン溶液（下記参照）

2) 調製法

- ① イーグル MEM 9.4g を電子天秤で量りとりビンに入れる。
- ② 蒸留水 1000ml をメスシリンダーで量りとり、イーグル MEM を完全に溶解する。

- ③ ビンの蓋を軽く閉め、アルミ箔で覆う。
- ④ オートクレーブシール(日付記載)を貼る。
- ⑤ 121℃で 15 分間オートクレーブする。
- ⑥ 室温まで冷やす。(翌日まで置く。)
- ⑦ 密栓して、冷蔵庫 (2～10℃) に保存する。

培地調製

安全キャビネット内で下表に従い混合する。

	増殖培地 (220 ml)	維持培地 (210 ml)
MEM	200 ml	200 ml
L-グルタミン(200mM)	2.2 ml	2.1 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液*	0.22 ml	0.21 ml
牛胎児血清	20 ml (final 10%)	4.4 ml (final 2%)
7.5%Bicarbonate	3.3 ml (final 0.11%)	5.5 ml (final 0.19%)

*ペニシリン G (20,000,000 units/12.5 g) とストレプトマイシン 20 g を 100 ml の水で溶解し、ろ過滅菌 (0.22 μ m フィルター)。分注し凍結保存。培地 100 ml あたり 0.1 ml 添加 (最終濃度はペニシリン : ストレプトマイシン=100 units/ml : 100 μ g/ml)

- ⑧ 密栓して、冷蔵庫 (2～10℃) に保存する。
- ⑨ 作成した培地には、種類、調整日、使用期限、作成者を記載すること。

6 培地調整時の注意事項

- ① 安全キャビネットでの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 オートクレーブする際、ビンは密栓しない。
- ③ オートクレーブ後の操作は、安全キャビネット内で行うこと。
- ④ 細胞ごとに増殖培地、維持培地を区別し保管する (細胞同士の交差汚染防止のため)。
- ⑤ 作成した培地には、種類、調製日、使用期限、作成者(イニシアル等)を記載すること。

MEM 培地作成記録用紙

作成年月日：_____

作成者氏名：_____

作成量(容量 x 本数)： m l x 本

作成

イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末（以下イーグル MEM 培地）

Lot No. : _____

☐以下の表に従って必要量を測り取り混合する。

作成する 量に○	作成する MEM 培 地の量(蒸留水の 量)	イーグル MEM 培 地の必要量	作成した本数 (例 500ml X 4 本)
	1L	9.4g	
	2L	18.8g	
	3L	28.2g	
	4L	37.6g	

☐オートクレーブ滅菌する（121℃ 15 分）。(時間： ～)

☐密栓して、冷蔵庫（2～10℃）に保存

増殖培地、維持培地の作成

作成年月日：_____ 作成者氏名：_____

増殖培地

☐ 作成する増殖培地（保管ボトル容量 x 本数）：_____ mL x _____ 本

☐ 安全キャビネット内で以下の試薬を加える

作成する 量に ○	容量	7.5%炭酸水素 ナトリウム溶液	200mM グルタミン溶液	牛胎児血 清	ペニシリン/ ストレプトマイ シン
	200ml	3.3ml	2.2ml	20ml	0.22ml
	500ml	8.25ml	5.5ml	50ml	0.55ml

維持培地

☐ 作成する維持培地（本数）：_____ L(_____ 本)

☐ 安全キャビネット内で以下の試薬を加える

作成する 量に ○	容量	7.5%炭酸水素ナト リウム溶液	200mM グルタミン溶液	牛胎児血 清	ペニシリン/ス トレプトマイ シン
	200ml	5.5ml	2.1ml	4.4ml	0.21ml
	500ml	13.75ml	5.25ml	11ml	0.525ml

添加日時：_____ 添加実施者：_____

☐ 試薬添加後は直ちに冷蔵庫で保存する。

培養細胞管理標準作業書

管理番号 XXXX

項目 ウイルス検査に使用する細胞の維持管理

適用 ポリオウイルス分離に使用する RD-A 細胞及び L20B 細胞

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○

承 認 者 ○○

(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

培養細胞管理標準作業書

[細胞の継代]

改訂履歴

[illegible]

1 作業の項目

- 1) 培養細胞の継代（接着細胞）。
- 2) 培養細胞の凍結保存
- 3) 培養細胞の再起培養

2 細胞の種類

ポリオウイルス分離に使用する細胞（RD-A 細胞、L20B 細胞）。

3 作業に用いる試薬

- ① PBS(-)
- ② Trypsin-EDTA(0.05%)
- ③ イーグル MEM 培地(10%FBS)
- ④ トリパンブルー染色液
- ⑤ CELLBANKER® 1plus または CELLBANKER® 1（日本全薬工業株式会社）（同等品）
- ⑥ 細胞増殖培地（10%FBS 加 MEM）（作成については標準手順書「試薬等管理標準作業書培地作成」を参照）

4 作業等に用いる機器・器具及び器材

1) 機器・器具

- ① 炭酸ガス培養装置「機械器具保守管理標準作業書 No. _____」
- ② 倒立顕微鏡「機械器具保守管理標準作業書 No. _____」
- ③ 遠心分離機（1,000rpm）「機械器具保守管理標準作業書 No. _____」
- ④ デュープフリーザー（-80℃）「機械器具保守管理標準作業書 No. _____」（あるいは液体窒素容器）
- ⑤ メスピペット
- ⑥ オートピペッター
- ⑦ マイクロピペット

2) 器材

- ① 細胞培養フラスコ(75cm²)
- ② チップ(P-100 用)
- ③ 1.5ml エッペンチューブ
- ④ 滅菌チューブ（1.8ml 容量）
- ⑤ ビルケルチュルク血球計算盤
- ⑥ カウンター

5 操作上の注意

- 1) 無菌室（細胞調製区域）にて、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（あるいはクリーンベンチ）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。

6 細胞継代方法

- 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℃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℃のインキュベーターに静置。

7 細胞の凍結保存方法

- 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℃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℃のディープフリーザーに入れ凍結する(あるいは液体窒素容器へ)。
- 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。

8 細胞の再起培養方法

- 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。

9 記録の作成

1) 細胞入手時の記録

細胞入手時に細胞管理台帳(様式 1)に以下の事項について記載する。

- ① 細胞名と由来又は ATCC 番号等の情報

② 入手年月日

③ 購入先又は分与先

2) 凍結保存時の記録

凍結保存時に細胞管理台帳（様式 1）に以下の事項について記載する。

① 管理番号

② 保存年月日及び実施者氏名

③ 保存時の継代数

④ 保存場所

凍結保存操作の記録（実施日、実施者、使用試薬、細胞名、操作手順）を細胞の凍結保存記録用紙（様式 3）に記載する。

3) 再起培養時の記録

再起培養時に細胞管理台帳（様式 1）に以下の事項について記載する。

① 再起培養年月日及び実施者氏名

再起培養操作の記録（実施日、実施者、使用試薬、細胞名、継代数、操作手順）を細胞の再起培養記録用紙（様式 4）に記載する。

4) 培養細胞の継代の記録

培養細胞の継代の記録（実施日、実施者、使用試薬、細胞名、細胞数、細胞密度、希釈、操作手順）を細胞の培養細胞の継代記録用紙（様式 2）に記載する。

5) 廃棄する場合

保存した細胞を廃棄する時、細胞管理台帳（様式 1）に以下の事項について記載する。

① 廃棄年月日及び実施者氏名

細胞管理台帳

[illegible]

(様式 2)

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ティングし、single
↓
cell にする。



☐ 増殖培地細胞浮遊液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。計算中、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： ：

(様式3)

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% 程度のコンフ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℃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 1 ml の割合で CELLBANKER® を加え優しくピペッティン
↓ する。

☐ 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℃のディープフリーザーに入れ凍結する。

終了時間： ：

(様式4)

細胞の再起培養記録用紙

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：_____

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℃ 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℃、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：

検体取扱標準作業書

管理番号 △-1

項目 □□□□

適用 ○○○○

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○

承 認 者 ○○

(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

〇〇〇〇

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

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) 検体の取り違い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、検体の取り違い、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。

検査実施標準作業書

管理番号 △－○

試験品の種類 鼻咽頭ぬぐい液等

検査項目 インフルエンザウイルス分離

試験法 インフルエンザ診断マニュアル第3版
 (平成 26 年 9 月 国立感染症研究所監修)

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○

承 認 者 ○○
(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

検査実施標準作業書
[インフルエンザウイルス分離]

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

1 検査の項目

季節性インフルエンザウイルス分離

2 試験品の種類

鼻咽頭ぬぐい液等

3 検査法

出典

インフルエンザ診断マニュアル第3版（平成26年9月 国立感染症研究所監修）

原理

MDCK細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離

4 作業環境

検体を開封する場所：BSL2かつ管理区域内

安全キャビネットが設置されていること。

検体接種：第〇無菌室（BSL2）の安全キャビネット内

5 検査に使用する試薬

1) 試薬等

- ① MDCK細胞の単層培養（24wellプレート（他のプレート、チューブでも差し支えない））
- ② DMEM 液体培地（SIGMA） 同等品
- ③ ペニシリン/ストレプトマイシン（GIBCO） 同等品
- ④ ファンギゾン溶液（ $250 \cdot \mu\text{g/ml}$ ）（GIBCO） 同等品
- ⑤ アセチルトリプシン（ 10 mg/ml ）（SIGMA） 同等品
- ⑥ リン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）（GIBCO） 同等品

2) 分離用培地の調製

試 薬	最終濃度	使用量
DMEM	—	500 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン	100 単位/ml ペニシリン G	5 ml
	100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン	
アムホテリシン B	0.5 $\mu\text{g/ml}$	1 ml

6 検査に使用する機械器具

1) 器具

- ① 天秤（クボタ） 同等品
- ② ボルテックスミキサー（デルタミキサー Se-08） 同等品

- ③ 炭酸ガス培養装置（パナソニックヘルスケア MCO-170AICUVH）同等品
- ④ 冷却遠心器（KUBOTA 6000）同等品
- ⑤ 超低温槽（パナソニックヘルスケア MDF-594AT）同等品
- ⑥ マイクロ冷却遠心器（KUBOTA 1920）同等品
- ⑦ マイクロピペット（ピペットマン P-2、10、20、100、200、1000 μ l）同等品
- ⑧ 倒立顕微鏡
- ⑨ 冷凍庫
- ⑩ 冷蔵庫
- ⑪ 高圧蒸気滅菌器（平山製作所 HV-50）同等品
- ⑫ 安全キャビネット

2) 器材

- ① ピペット
- ② 滅菌スポイド
- ③ 遠心管（15 ml）
- ④ マルチプレート
- ⑤ フィルター付き滅菌チップ（P-2 用、P-10 用、P-20 用、P-100 用、P -200 用、P -1000 用）
- ⑥ ピンセット

7 検体等の取扱

1) 検体の受付

搬入された検体は、検体台帳に情報を記載する。

2) 検体処理

鼻咽頭ぬぐい液

- ① 綿棒が液体に浸っている場合は滅菌済ガラス棒等で良くしごいた後に綿棒を抜き取る。
- ② チューブ内容物を全て 15 ml チューブに移し、3,000 rpm 15 分間遠心あるいはフィルター濾過を行う。
- ③ 上清を接種試料や RNA 抽出用検体とする。

3) 検体の保存

処理済みの検体は、 -80°C 以下で保存することが望ましい。

8 検査操作上の注意点

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけ、実験者への感染を防ぐために、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- ① 作業中はマスク及びガウン、使い捨ての手袋を着用する。
- 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。
- ③ 分離、同定の作業の際はクラス 2 以上の安全キャビネットを使用する。
- ④ 観察記録を記入する。(必須項目：接種日、CPE 確認日、観察終了日)

9 検査の手順

接種に供する細胞は、「清浄区域」で準備することが望ましい。

1) MDCK 細胞シート法^{*1}

24 well プレート^{*2}を使用する方法

- ① 単層培養したプレートから培養液を除去し、PBS(-), Medium, Hanks 液等 1 ml で洗う。
- ② 接種試料を 0.1 ml 接種する。
- ③ 30～60 分 34～37℃の炭酸ガス培養装置（若しくはふらん器）でウイルスを吸着させる。
- ④ 0.5～5 μ g/ml アセチルトリプシン添加 - 分離用培地を 1 ml 加えて 34～37℃の炭酸ガス培養装置（若しくはふらん器）で培養する。
- ⑤ 7 日後までに CPE が認められない場合は回収し、その 0.1 ml を新たな well に継代(blind passage)接種する。(標準検査は CPE を認めない場合 2 継代目で終了する)
- ⑥ CPE が全体に広がったら培地を全量回収する。

注意

***1**：24 穴プレート以外のプレート及びチューブ若しくは培養フラスコを使用しても差し支えない。

***2**：インフルエンザ診断マニュアル第 3 版に記載されている MDCK 細胞浮遊培養法で行っても差し支えない。

2) 分離株の保存

分離されたウイルス株は－80℃以下で保存する。

3) 分離株の取扱い

分離株は、HI 試験、リアルタイム PCR 等による同定・型別を行い、抗原性解析等に供する。

10 検査に関する記録の作成要領及び保管方法

1) 病原体検査指針に基づいて記載する。インフルエンザウイルス検査に関して記載する事項は以下に示す。

- ① 検体の情報（検体番号、検体採取年月日、検体搬入年月日、検体の種類、臨床診断名）

- をウイルス検査台帳に記載する。
- ② 検査記録（細胞名、検体接種年月日、検体番号、観察記録、観察終了年月日）を記録用紙に記載する。
 - ③ 検査結果を成績書に記載する。

2) 記録の保管

それぞれの記録は適切な場所に保存する。

11 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講したもの。区分責任者が許可したもの。

検査実施標準作業書

管理番号 ○－△

試験品の種類 咽頭ぬぐい液等

検査項目 季節性インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査

試験法 インフルエンザ診断マニュアル第 3 版
(平成 26 年 9 月 国立感染症研究所監修)

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○

承 認 者 ○○
(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

検査実施標準作業書
[インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査]
改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

1 検査の項目

季節性インフルエンザウイルス（五類感染症）のリアルタイム RT-PCR 検査

2 試験品の種類

鼻咽頭ぬぐい液等

3 検査法

出典

インフルエンザ診断マニュアル第3版(平成26年9月 国立感染症研究所監修)

原理

リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe) を用いたインフルエンザウイルスの検出

4 作業環境

検体を開封する場所：BSL2 かつ管理区域内

安全キャビネットが設置されていること。

RNA 抽出：第○無菌室

試薬の調製：準備室内の安全キャビネット

陽性コントロールの調製：準備室内のクリーンベンチまたは安全キャビネット（試薬の調製とは別の場所）

リアルタイム RT-PCR 反応：第○検査室

5 検査に使用する試薬

1) 試薬

- ① QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 同等品
- ② Ethanol (99.5%) (和光純薬) 同等品
- ③ QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) 同等品
- ④ RNase Inhibitor (20 units/ μ l ABI) 同等品
- ⑤ Distilled water DNase・RNase free (和光純薬) 同等品
- ⑥ リアルタイム RT-PCR 用プライマー及びプローブ

(A 型同定用)

Type A M 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ：

MP-39-67For 5' -CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC

MP-183-153Rev 5' -TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA

MP-96-75ProbeAs 5' -(FAM)ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG (MGB)

PCR 産物の長さ：146bp

(AH1pdm09*1 亜型同定用)

AH1pdm09 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ：

NIID-swH1 TaqMan Primer-F1 5' - AGAAAAGAATGTAACAGTAACACACTCTGT

NIID-swH1 TaqMan Primer-R1 5' - TGTTCCACAATGTARGACCAT

NIID-swH1 Probe2 5' -(FAM) CAGCCAGCAATRTTTCATTACC (MGB)

PCR 産物の長さ : 187bp

※1 : AH1pdm09 インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子をターゲットとしており、H1 ソ連型インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子には反応しない。

(H3 亜型同定用)

H3HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-H3 TaqMan Primer-F1 5' - CTATTGGACAATAGTAAAACCGGGRGA

NIID-H3 TaqMan Primer-R1 5' - GTCATTGGGRATGCTTCCATTGG

NIID-H3 Probe1 5' -(FAM) AAGTAACCCCKAGGAGCAATTAG (MGB)

PCR 産物の長さ : 178bp

(H1*2 亜型同定用)

H1HA 遺伝子 (A ソ連型) 検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-H1 TaqMan Primer-F1 5' - CCCAGGGYATTTTCGCGACTATGAG

NIID-H1 TaqMan Primer-R1 5' - CATGATGCTGAYACTCCGGTTACG

NIID-H1 Probe1 5' -(FAM) TCTCAAAYGAAGATACTGAACT (MGB)

PCR 産物の長さ : 133 bp

※2 : H1 ソ連型インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子をターゲットとしており、AH1pdm09 インフルエンザウイルス由来の H1 HA 遺伝子には反応しない

(B 型同定用)

TypeB NS 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

NIID-B TaqMan Primer-F1 5' - GGAGCAACCAATGCCAC

NIID-B TaqMan Primer-R1 5' - GTKTAGCGGTCTTGACCAG

NIID-B Probe1 5' -(FAM) ATAAACTTTGAAGCAGGAAT (MGB)

PCR 産物の長さ : 105 bp

(B 型ビクトリア系統同定用)

Type B ビクトリア系統 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

TypeB HA F3vic v2 5' -CCTGTTACATCTGGGTGCTTTCCTATAATG

TypeB HA R3vic v2 5' -GTTGATARCCTGATATGTTTCGTATCCTCKG

FAM-Type B HA Victoria 5' -(FAM) TTAGACAGCTGCCTAACC (MGB)

PCR 産物の長さ : 98 bp

(B 型山形系統同定用)

Type B 山形系統 HA 遺伝子検出用プライマーおよびプローブ :

TypeB HA F3yam v2 5' -CCTGTTACATCCGGGTGCTTYCCTATAATG

TypeB HA R3yam v2 5' -GTTGATAACCTKATMTTTCATATCCTCTG

FAM-Type B HA Yamagata 5' -(FAM) TCAGGCAACTASCCAATC (MGB)

PCR 産物の長さ : 98 bp

6 検査に使用する機械器具

1) 器具

- ① ボルテックスミキサー（デルタミキサー Se-08）同等品
- ② マイクロ遠心機（スピンドウン用）同等品
- ③ 冷却遠心器（KUBOTA 6000）同等品
- ④ 超低温槽（パナソニックヘルスケア MDF-594AT）同等品
- ⑤ マイクロ冷却遠心器（KUBOTA 1920）同等品
- ⑥ マイクロピペット（ピペットマン P-2、10、20、100、200、1000 μ l）同等品
- ⑦ 7500 Fast Real-Time PCR System（ABI）同等品
- ⑧ 高圧蒸気滅菌器（平山製作所 HV-50）同等品
- ⑨ 冷凍庫
- ⑩ 安全キャビネット
- ⑪ クリーンベンチ
- ⑫ 製氷機

2) 器材

- ① ピペット
- ② 滅菌スポイド
- ③ 遠心管（15 ml）
- ④ マイクロチューブ（1.5 ml、2.0 ml）
- ⑤ MicroAmp Fast 8-Tube Strip(0.1 ml) または MicroAmp Fast Optitcal 96-Well Reaction Plate with Barcode(0.1 ml) (ABI)（使用機器に対応した器材）
- ⑥ MicroAmp Optical 8-cap Strip または MicroAmp Optical Adhesive Film (ABI)（使用機器に対応した器材）
- ⑦ フィルター付き滅菌チップ（P-2 用、P-10 用、P-20 用、P-100 用、P-200 用、P-1000 用）

7 検体等の取扱

1) 検体の受付

搬入された検体は、検体台帳に情報を記載する。

2) 検体処理

鼻咽頭ぬぐい液

- ① 綿棒が液体に浸っている場合は滅菌済ガラス棒等で良くしごいた後に綿棒を抜き取る。
- ② チューブ内容物を全て 15 ml チューブに移し、3,000 rpm 15 分間遠心を行う。
- ③ 上清を接種試料や RNA 抽出用検体とする。

3) 検体の保存

処理済みの検体は、 -80°C 以下で保存することが望ましい。

8 検査操作上の注意点

通常の実験室では複数の検体进行处理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけ、実験者への感染を防ぐために、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- ① 作業中はマスク及びガウン、使い捨ての手袋を着用する。
- 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。
- ③ リアルタイム PCR は高感度な検出法であるため、コンタミには十分注意する。試薬の調製とサンプルを混合する場所は分けることが望ましい。RNA 抽出からサンプル混合においては動線を遡ることのないよう留意して作業する。
- ④ 検査記録を記入する。(必須項目：検査日、検査結果)

9 検査の手順

1) RNA 抽出

(1) 検体の前処理

- ① 1.5 ml チューブに Carrier RNA を添加した Buffer AVL $560\mu\text{l}$ を予め分注する。
- ② 処理済みの検体あるいは陰性対照 $140\mu\text{l}$ を ①に入れ、サンプルと Buffer を充分混合するため 15 秒間 Vortex にかき、室温 ($15\sim 25^{\circ}\text{C}$) に 10 分間置く。チューブをスピンドウンする。
- ③ エタノール (96~100%) $560\mu\text{l}$ をチューブに加え、15 秒間 Vortex をかけた後、スピンドウンする。
- ④ 混合液 $630\mu\text{l}$ を QIAamp スピнкаラム (2 ml コレクションチューブ付) に注入し、蓋を閉め、 $6,000\times g$ (8,000 rpm) で 1 分間遠心する。
- ⑤ QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、残りの液 $630\mu\text{l}$ を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う (サンプル量が $140\mu\text{l}$ のときには、通常この操作は 2 回で終わる)。
- ⑥ QIAamp スピнкаラムを新しい 2 ml のコレクションチューブに移し、Buffer AW1 $500\mu\text{l}$ を入れる。
- ⑦ 蓋を閉め、 $6,000\times g$ (8,000rpm) で 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移す。ろ液の入っているチューブは捨てる
- ⑧ QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 $500\mu\text{l}$ を加え、 $20,000\times g$ (14,000rpm) で 3 分間遠心する。
- ⑨ QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5 ml のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- ⑩ QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE $60\mu\text{l}$ を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、 $6,000\times g$ (8,000rpm) で 1 分間遠心する。
- ⑪ このろ液が抽出 RNA であり、直ちに使用しない場合、抽出 RNA は -80°C で保存す

る。

2) リアルタイム RT-PCR

(1) カクテルの調製

- ① 表 1. に従い必要な分量 (検体数+陰性コントロール+陽性コントロール+予備 1) を 1.5 ml チューブ (滅菌済み) にまとめて調製し、MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0.1 ml) または MicroAmp Fast 8-Tube Strip (0.1 ml) の所定の位置に 20 μ l ずつ分注する。

表 1.

試薬	容量	最終濃度
2×QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12.5 μ l	1×
Forward primer (10 μ M)	1.5 μ l	0.6 μ M
Reverse primer (10 μ M)	1.5 μ l	0.6 μ M
Probe (5 μ M)	0.5 μ l	0.1 μ M
QuantiTect RT Mix	0.25 μ l	
RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	0.1 μ l	
RNase free Water	3.65 μ l	
RNA template	5 μ l	
Total 容量	25 μ l	

(2) RT-PCR 反応 (ABI 7500 Fast Real-Time PCR System を使用する場合)

- ① 7500 Fast Real-Time PCR System を起動し、サンプルリストの作成、反応チューブのセッティングを行い、「Start RUN」を押し、反応を開始する。
- ② RT-PCR 反応は、Standard モードで使い以下の反応条件で行う。
50°C 30 分、95°C 15 分、(94°C 15 秒、56°C 75 秒) × 45 回 (約 3 時間)

(3) 結果の解釈と判定

検査結果の判定は、以下の条件が満たされた時のみ有効である。それ以外の場合は、検査中に何らかの事故が発生して検査精度を保つ事ができなかった事が推察されるので、原因を究明した上で再検査を行う。

- ① 各々の検出系で陽性コントロールに蛍光シグナルの立ち上がりがあり、かつそれが予測された Ct 値の範囲内であること。
- ② 全ての陰性コントロールについて、規定のサイクル内において蛍光シグナルの立ち上がりを確認されないこと。

10 検査に関する記録の作成要領及び保管方法

- 1) 病原体検査指針に基づいて記載する。インフルエンザウイルス検査に関して記載する

事項は以下に示す。

- ① 検体の情報（検体番号、検体採取年月日、検体搬入年月日、検体の種類、臨床診断名）をウイルス検体台帳に記載する。
- ② 検査記録（検査実施年月日、検体番号、リアルタイム RT-PCR 結果）を記録用紙に記載する。
- ③ 検査結果を成績書に記載する。

2) 記録の保管

それぞれの記録は適切な場所に保存する。

11 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講したもの。区分責任者が許可したもの。

検査実施標準作業書

管理番号 XXX

検査項目 ポリオウイルス分離試験

検体の種類 糞便、咽頭ぬぐい液、髄液

検査法 培養細胞によるウイルス分離

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作 成 者 ○○部○○課○○

承 認 者 ○○

(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

検査実施標準作業書

[ポリオウイルス分離試験]

改訂履歷

[illegible]

1 検査の項目

ポリオウイルス分離検査

2 検体の種類

糞便、咽頭ぬぐい液、髄液

3 検査法

原理：培養細胞によるウイルス分離

出典：

- 1) ポリオ実験室マニュアル第4版 World Health Organization. Polio laboratory manual 4th edition, WHO/IVB/04.10, page 73-79, 2004
- 2) ポリオウイルスの分離の変更 第4版の補足
S1. Supplement to the WHO Polio Laboratory Manual An alternative test algorithm for poliovirus isolation and characterization
http://apps.who.int/immunization_monitoring/Supplement_polio_lab_manual.pdf
- 3) ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル

4 検体等の取り扱い

「検体取扱標準作業手順書*」(別に定める)に基づき扱う。

4-1 受付から検査まで

なおウイルス材料の保管・輸送中の凍結、融解の繰り返しはウイルス力価が低下するので避けなければならない。-20℃での保管・輸送が確保できなければ、0-8℃で保管・輸送する。輸送にあたっては冷却が保たれる状態で包装し、検体送付書には被験者の氏名、年齢、ワクチン歴、発病日、検体採取日、検体種別など必要事項を記入のうえ送付する。検体容器には検体種別を明記すること。ポリオウイルスは-20℃以下で長期間保存できる。

4-2 検査終了後

糞便など臨床検体は検査終了後-20度以下で少なくとも3か月間保存しなければならない。保管した臨床材料、乳剤、分離株を廃棄した場合は、保管台帳に記録すること。WHO ポリオ根絶計画の進捗とともに、施設に長期保存する必要性はなくなるため、不要な分離株はバイオセーフティ規則により、廃棄することが望ましい。

「検体取扱標準作業手順書」は他の病原体にも利用可能なように汎用性の有るものを策定する。

5 検査に用いる試薬等

試薬等

抗生物質を高濃度(ペニシリン 500U/ml, ストレプトマイシン 500 μ g /ml)含む PBS (+)、
クロロホルム

細胞増殖培養液 (10%FBS 含 MEM)

(細胞維持培養液 (2%FBS 含 MEM))

RD-A 細胞、L20B 細胞 (ポリオウイルス受容体を発現しているマウス L 細胞)-あらかじめ 3ml
チューブに 2ml の細胞浮遊液を入れ単層になったものを準備

※培地作製については、「試薬等管理標準作業書」(管理番号 XXX)を参照すること。

※細胞の維持管理については、「培養細胞管理標準作業書」(管理番号 XXX)を参照すること。

6 検査に用いる機器・器具及び器材

1) 機器・器具

ふ卵器あるいは炭酸ガス培養装置 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)

顕微鏡 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)

ボルテックスミキサー (名称、メーカー名)

糞便処理用シェーカー(名称、メーカー名)

マイクロピペット(P1000)

マイクロピペット (P200)

ピペッター

試験管立て

冷凍庫 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)

冷蔵庫 (部屋番号、機器番号)

バイオハザード対応冷却遠心分離機 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)

クラスⅡA/B 安全キャビネット (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)

高圧蒸気滅菌器 (名称、メーカー名、設置している部屋番号、機器番号)

2) 器材

50ml 滅菌チューブ

培養チューブ 3ml (例: Thermo Scientific 156758)

フィルター付き滅菌チップ (p-200 用, p-1000 用)

ウイルス希釈用滅菌済み綿付き長チップ (～200 μ l)

メスピペット

捨て缶

3) 機器点検・消耗品管理

使用する機器は機器保守点検標準作業書に基づき、維持管理を行わなければならない。

炭酸ガス培養装置、冷凍庫、冷蔵庫は「機械器具保守管理標準作業書」(番号 XXX-YYY)に基づき温度管理を行うこと。

バイオハザード対応冷却遠心分離機、クラスⅡA/B 安全キャビネット、高圧蒸気滅菌器は「機械器具保守管理標準作業書」(番号 XXX-YYY)に基づき保守管理を行うこと。

7 作業環境、操作上の注意

通常の実験室では複数の検体を処理する機会が多いと思われる。他の病原体の混入をさけるためにも、あるいは実験者への感染を防ぐためにも、検体の取り扱いには十分注意を払わなければならない。

- 1) 作業中は必ずマスク及びガウン、使い捨ての手袋を着用する。
- 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
細胞の調製	無菌室（細胞調整室）
検体接種	BSL2:病原体取扱室
CPE の観察	BSL2：病原体取扱室

- 4) 分離、同定の作業の際はクラス2の安全キャビネットを使用のこと。
- 5) ポリオウイルスあるいはポリオウイルスを含む可能性のある検体等を取扱う場合には、事前にポリオワクチンを接種する。
- 6) ポリオウイルスの分離（同定）に際して感染細胞の保温は37℃を越えないように注意する。
生ワクチンに使われているセービン株は温度感受性であること、また分離中のウイルス変異を極力さけることなどを考慮すること。
- 7) 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。

8 検査法の手順

1) 検体の前処理

糞便乳剤の作製

- ① 50 ml のポリプロピレン製の遠心管に、糞便 2g、抗生物質を含んだ PBS（+） 10 ml、クロロホルム 1ml を加える。
- ② 20 分間激しく攪拌の後、3,000 rpm 20 分遠心する。
- ③ 上清を新しいストックチューブにとり、ウイルス分離に用いる。

糞便以外の検体の処理

咽頭拭い液の調製は滅菌綿棒で局所をぬぐい、直に細胞培養液に浸して密栓し、2時間ほど液に溶出させる。それを良く攪拌した後遠心し、その上清が検査材料となる。髄液はそのまま細胞に接種できる。

2) ウイルス分離

接種と観察

- ① ポリオウイルス分離には最小限 RD-A と L20B の2種類の細胞を原則として用い、検体・ウイルス分離株の混入を避けるためウイルス分離には培養チューブを使用。一検体あたり各細胞2本ずつ使用する。また陰性対照の培養チューブも用意する。
- ② 1) で用意した糞便抽出液の 200 μ l を各細胞に接種する (RD-A:2 本、L20B:2 本)。
- ③ 35℃で培養し5日間観察する。5日間観察して CPE が現われない時は別の新しい細胞に継代し、更に5日間観察する。計10日間観察して CPE が現われなければ、ウイルス分離陰性とする。
- ④ 完全な CPE が現われたら、培養液を-20℃に保存する。
- ⑤ RD-A で分離したウイルスは必ず L20B 細胞に接種する。

細胞毒性

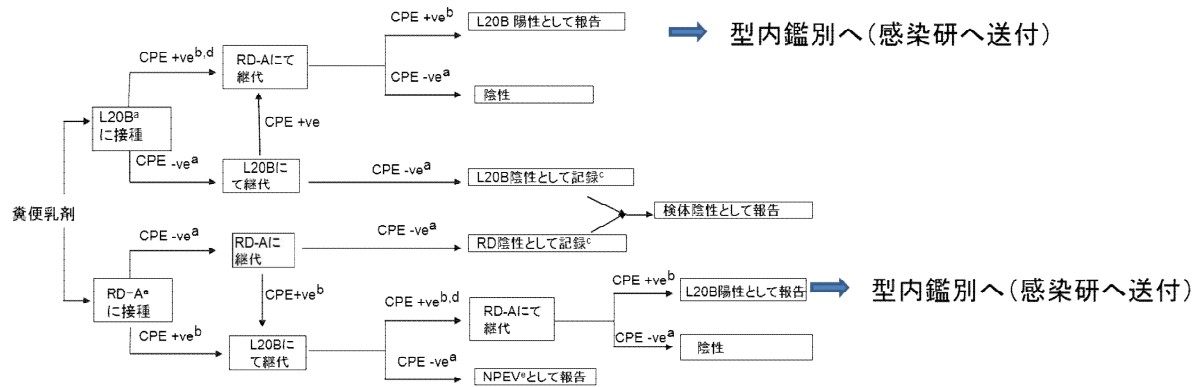
接種後24時間以内に CPE が現われたら、糞便抽出物による非特異的細胞毒性の可能性が高い。新しい細胞にその培養液を 200 μ l 接種し観察を続ける。

初代ウイルスと思われたものでも2代目の継代で CPE が現われなければ、糞便抽出物による非特異的变化と考えて良い。計10日の観察で分離の結果を判定する。

その他

L20B 以外の細胞でウイルスが分離できたら必ず、L20B 細胞に再接種しポリオウイルスの有無を調べる必要がある (図1)。L20B 細胞はポリオウイルスだけに感受性のある細胞であり、エンテロウイルスとポリオウイルスが混在する時に非常に便利である。稀に L20B 細胞でアデノウイルスやレオウイルス、非ポリオエンテロウイルスが分離される場合があるが、ポリオウイルスとの力価の違いや CPE の形状により区別できることが多い。

ポリオウイルス分離の流れ(WHOマニュアルより)



a. 少なくとも5日間の観察

b. CPEが+3以上になるまで観察(通常1-2日間, 最長5日間; 細胞毒性、細菌などのコンタミが見られたら再接種)

c. 観察期間は延べ10日間(2 x 5日間)

d. 最終のRD経代前に陽性チューブは2つを合わせる(同日に2本とも+3以上のCPEが出現した場合)

e. 分離株はNPEVあるいは訓練のために血清型を調べてよい

分離の結果次のパターンのものは、ポリオウイルスである可能性がある

RD-A (+) → L20B (+) → RD-A (+)

L20B (+) → RD-A (+)

このため速やかに感染研ウイルス第二部に送付する。

3) ウイルス分離後の対応

- ① 上記のフローに基づき RD-A 及び L20B で分離されたウイルスはポリオウイルスである可能性が高い。現在、分離株は WHO の標準法であるリアルタイム PCR 法にてポリオウイルスかどうかの確認と、Sabin 株あるいは非 Sabin 株の型内鑑別を同時に行う手法が導入されている。型内鑑別で非 Sabin 株と判定された場合は、さらに VP1 全領域の塩基配列解析を実施し、WHO へ報告する流れである。
- ② 型内鑑別、塩基配列の検査・報告は WHO による認定ラボ(日本は感染研ウイルス第二部)が、あらかじめ指定されているため、ウイルス分離後は行政検査として直ちに感染研へ送付する。
- ③ 地方衛生研究所で、感染研での行政検査と並行して「ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル」に基づき塩基配列に基づく同定を行うことができるが、この場合は必ず SOP を作成することが望ましい。
- ④ ウイルス分離、同定後の行政対応は通知に基づく。
- ⑤ 国立感染症研究所にはあらかじめ検体数、搬入予定などを連絡。ポリオ疑い患者から分離されたポリオウイルスや、流行予測事業等で分離され、行政検査が必要な場合は国立感染症研究所ウイルス第二部第二室(東京都武蔵村山市学園 4-7-1)に送り、型内株鑑別(リアルタイム PCR 法による鑑別試験と VP1 塩基配列解析)を依頼する。
- ⑥ 病原体等の輸送・運搬に際しては、輸送中の安全を確保し輸送業者に安心して運搬していただくため、適切な梱包および輸送方法等に留意する。

連絡先：国立感染症研究所ウイルス第二部第二室

住所：〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

電話番号：042-561-0771

9 検査に関する記録の作成及び保管方法

1) 病原体検査の業務管理要領に基づいて記載する。ポリオウイルス検査に関して記載する事項は以下に示す。

- ① 検体の情報（検体番号、検体採取日、検体搬入日、検体の種類、臨床診断名）をウイルス検査台帳に記載する。
- ② 検査記録（実施日、実施者、使用細胞、継代数、細胞調整日、検体番号、搬入日、検体の種類、操作手順）をポリオウイルス分離検査記録用紙（様式 1）に記載する。
- ③ 観察記録（細胞名、使用細胞の継代歴、検体接種日、検体番号、観察記録、観察終了日）をポリオウイルス分離記録用紙（様式 2 及び 3）に記載する。
- ④ 使用した試薬の記録を試薬等管理標準作業書（管理番号××）に従って記載する。
- ⑤ 使用した培養細胞の記録を培養細胞管理標準作業書（管理番号〇〇 培養細胞の継代記録用紙）に従って記載する。
- ⑥ 使用した機器の記録を機械器具保守管理標準作業書（管理番号△△）に従って記載する。
- ⑦ 検査結果を成績書に記載する。

2) 記録の保管

それぞれの記録は適切な場所に保存する。

10 検査を実施するために必要な資格に関する事項

ポリオワクチンを接種していること。病原体取扱研修を受講したもの。検査区分責任者が許可したもの。

ポリオウイルス分離検査記録用紙

実施年月日：_____ 実施者：_____

使用細胞(継代数)：L20B (P _____) 調製年月日：_____

使用細胞(継代数)：RD-A (P _____) 調製年月日：_____

検体番号：_____ 搬入年月日：_____ 種類： 咽頭ぬぐい液 ・ 糞便 ・ 髄液

検体番号：_____ 搬入年月日：_____ 種類： 咽頭ぬぐい液 ・ 糞便 ・ 髄液

検体番号：_____ 搬入年月日：_____ 種類： 咽頭ぬぐい液 ・ 糞便 ・ 髄液

☐ 検体処理 (糞便)

☐ 50 ml のポリプロピレン製の遠心管に、糞便約 2g、抗生物質を含んだ PBS (+) 10 ml、クロロホルム 1ml を加える。



☐ 20 分間激しく攪拌の後、3,000 rpm 20 分遠心する。



(時間 : ~ :)

☐ 上清を新しいストックチューブにとり糞便抽出液とし、ウイルスの分離に用いる。

☐ 検体処理 (咽頭ぬぐい液)

☐ ぬぐった綿棒が培地中に有れば取り除く。



☐ 3,000 rpm 20 分遠心する。(時間 : ~ :)



☐ 上清を新しいストックチューブにとり、ウイルスの分離に用いる。

ウイルス分離

☐ ポリオウイルス分離には RD-A と L20B の 2 種類を原則として用い、検体相互の混入を避けるためウイルス分離には培養チューブを使用。各細胞 2 本ずつ使用する。また陰性対照の培養チューブも用意する。



☐ 単層になった細胞の増殖培養液を捨て、1ml の維持培養液にかえる。



□検体処理を行ったもの 200 μ l を各細胞に接種する (RD-A:2 本、L20B:2 本)。



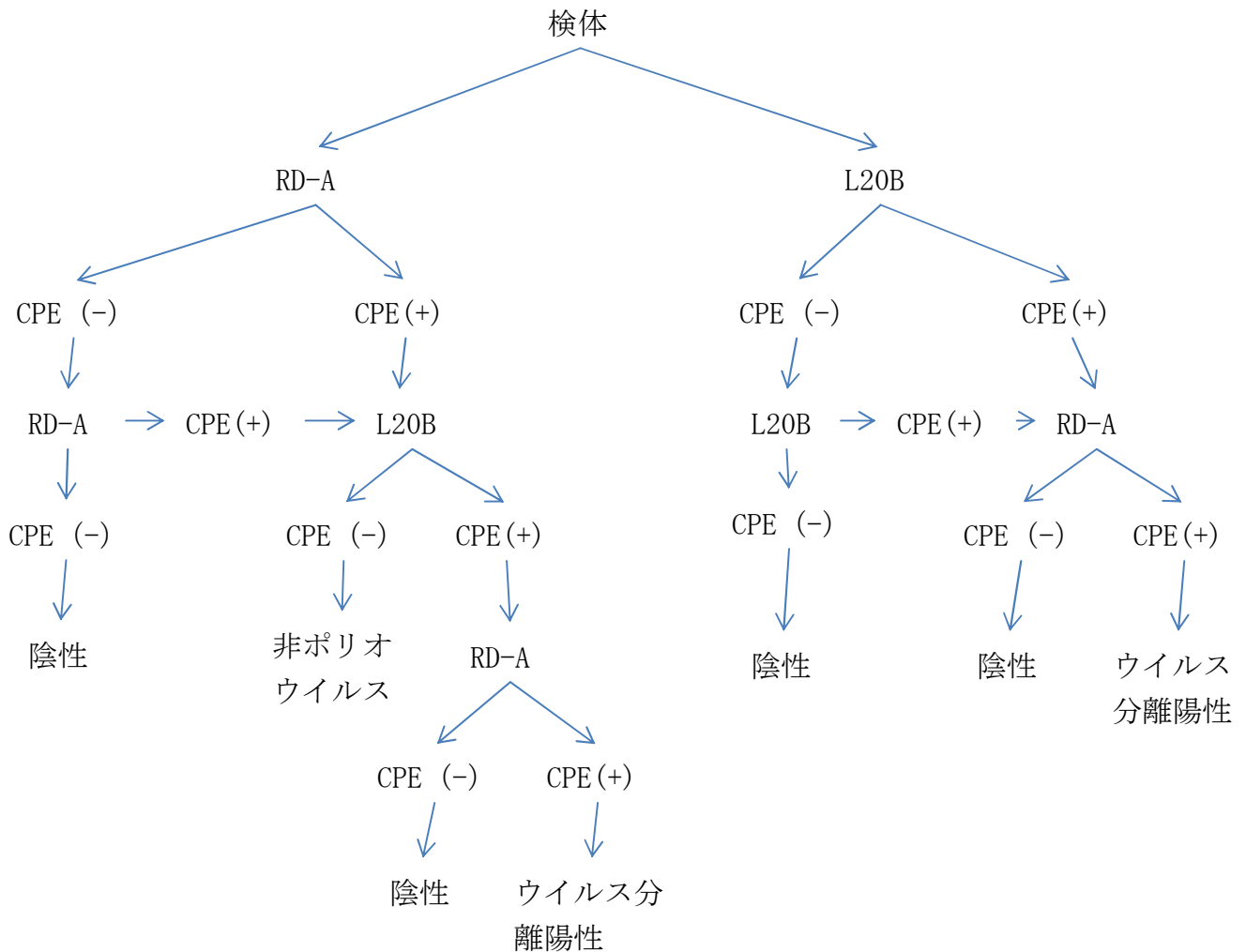
□35℃で培養し 5 日間観察する。5 日間観察して CPE が現われない時は別の新しい細胞に継代し、更に 5 日間観察する。計 10 日間観察して CPE が現われなければ、ウイルス分離陰性とする。



□完全な CPE が現われたら、培養液を-20℃に保存する。



□RD-A で分離したウイルスは必ず L20B 細胞に接種する。L20B で分離したウイルスは RD-A に接種する。



RD-A細胞を用いたウイルス分離記録用紙

(様式2)

検体受付日
初代接種日

試料調製日
2代目接種日

		初代 (用いるRD-Aの継代歴P= 観察日	2代目 (用いるRD-Aの継代歴P= 観察日	L20Bによる分離 (用いるL20Bの継代歴P= 観察日	L20Bから RD-Aへ の再接種 *	判定結果と日付	
検体番号	培養 チューブ No.	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5		結果と日付	備考
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
陰性対照	7						
	8						

最終判定は、R-R-, R+L+R+の様に記載 *RD+をL20B+の時は、再度RDに接種し、CPEを確認。分離したウイルスを型内鑑別に用い
CPEが観察されたものは“+” ~”++++”、CPEが観察されないものは“-”と記載する。

サンプル調製者:

観察者:

最終判定者(日付):

L20B細胞を用いたウイルス分離記録用紙

(様式3)

検体受付日
初代接種日試料調製日
2代目接種日

初代		2代目					RD-A細胞による分離					最終判定結果と日付						
(用いるL20Bの継代歴P=) 観察日		(用いるL20Bの継代歴P=) 観察日					(用いるRD-Aの継代歴P=) 観察日											
検体番号	培養 チューブ 番	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	結果と日付	備考
	1																	
	2																	
	3																	
	4																	
	5																	
	6																	
陰性対照	7																	
	8																	

最終判定は、L-L-, L+R+の様に記載

CPEが観察されたものは“+” ～”++++”、CPEが観察されないものは“-” と記載する。

サンプル調製者:

観察者:

最終判定者(日付):

検体番号	最終判定				判定日	(所内同定実施日*)	(結果*)	感染研への送付日	感染研からの結果戻り	最終結果と判定日
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						
		要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性						

最終判定者(日付):

(記載例)

検体番号	最終判定				判定日	(所内同定実施日*)	(結果*)	感染研への送付日	感染研からの結果戻り	最終結果	
A001	L+R+L+	○	要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性	2015. 08. 01	2015. 08. 02	ポリオ1型	2015. 08. 02	2015. 08. 05 Sabin 1	2015. 08. 05 Sabin 1
	L+R+	○	要型内鑑別	非ポリオウイルス	陰性	2015. 08. 01	2015. 08. 02	ポリオ1型	2015. 08. 02	2015. 08. 05 Sabin 1	
A002	R+L-		要型内鑑別	○	非ポリオウイルス	陰性	2015. 08. 03				2015. 08. 03 非ポリオウイルス
	L-L-		要型内鑑別	非ポリオウイルス	○	陰性	2015. 08. 03				
A003	R-R-		要型内鑑別	非ポリオウイルス	○	陰性	2015. 08. 03				2015. 08. 03 陰性
	L-L-		要型内鑑別	非ポリオウイルス	○	陰性	2015. 08. 03				

検査実施標準作業書

管理番号	○－△
試験品の種類	コレラ菌疑い株
検査項目	コレラ菌の同定試験
試験法	生化学的性状試験および血清学的検査 (参照: コレラ菌検査・診断マニュアル 平成 27 年 9 月)
施行年月日	平成 年 月 日
改訂年月日	平成 年 月 日
作 成 者	〇〇部〇〇課〇〇
承 認 者	〇〇 (検査部門管理者)
失効年月日	平成 年 月 日

〇〇県保健環境研究所〇〇課

検査実施標準作業書
[コレラ菌の同定試験]
改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

1 検査の項目

コレラ菌の同定試験

2 目的

コレラ菌疑い株に関して、生化学的性状試験や血清学的検査により、同定と血清型別を行うことで、三類感染症コレラの原因であるコレラ菌であるかを判定する。

3 適用範囲

同定確認を依頼されたコレラ菌疑い株

4 実施場所・作業環境

BSL2かつ管理区域内

5 培地、試薬

使用する培地は培地作成マニュアルに従い作成する。培地作成日、使用した血清の使用期限は別紙1 記録書に記録する。

6 検体等の取り扱い

搬入された検体について、菌株台帳に必要事項を記載する。

7 実施手順

7.1 概要・原理

非選択寒天平板及び選択分離寒天平板に直接塗抹する。生化学的性状試験や血清学的検査により同定、血清型別を行う。コレラ毒素産生性試験（コレラ菌特異的遺伝子の検出の手順書 SOP VC-002）の結果と総合して判定する。迅速性を求められる際には、被検菌株の純培養が確認された場合に限り、非選択培地上（6.2.1）の集落から直接6.2.3.3へ進んだ結果を採用する。被検菌株の純培養が確認されなかった場合は、非選択培地あるいは選択培地上（6.2.1 あるいは6.2.2）の疑わしい集落を用いて、6.2.3.1から試験を実施する。結果は別紙1 記録書に記録する。

* 純培養の判断は6.2.1の18±2時間培養の結果で判断する。

* 6.2.4は6.2.3.3と並行して実施して良い。

7.2 検査手順

7.2.1 非選択培養（培地名：2%NaCl加普通寒天培地）

- 被検菌株を非選択寒天平板に画線塗抹する。
- 接種した寒天培地を36±1℃で培養する。集落形成が確認されたら6.2.3.3に進む。
- 18±2時間まで継続し純培養であることの確認を行う。

7.2.2 選択分離培養（培地名：TCBS寒天培地）

- 6.2.1と同時に、被検菌株を選択寒天平板に画線塗抹する。

- ・接種した寒天培地を $36\pm1^{\circ}\text{C}$ 、 18 ± 2 時間培養する。

7.2.3 確認培養

- 7.2.3.1 非選択寒天平板もしくは選択分離寒天平板に形成された集落から、ためしスライド凝集反応を実施する。スライド凝集反応を実施した結果を記録する。
- 7.2.3.2 凝集が認められた集落を3個以上、NaCl加普通寒天平板に画線塗抹し、 $36\pm1^{\circ}\text{C}$ 、4時間程度培養する。
- 7.2.3.3 6.2.1 あるいは6.2.3.2で培養した菌を用いて、2% NaCl加TSI培地を用いブドウ糖発酵試験及び乳糖又は白糖発酵試験、2% NaCl加LIM培地を用いリジン脱炭酸試験・インドール産生性・運動性試験、2% NaCl加VP培地を用いアセトイン産生性、耐塩性培地での発育試験、オキシダーゼ試験の各生化学性状試験を実施し、また耐塩性試験において0% NaClにおいても増殖することを確認し、結果を記録する。耐塩性試験のために生理食塩水に懸濁した菌液を適宜調整する。さらに、6.2.3.2の培養は $36\pm1^{\circ}\text{C}$ にて継続する。

7.2.4 血清型別

コレラ菌の性状を示した菌株については6.2.1 あるいは6.2.3.2で発育した菌体を用いて市販の免疫血清（デンカ生研）を用いたスライド凝集法による血清型別試験を添付文書に従い行う。生菌を用いて抗血清に凝集が認められない場合は、加熱菌を用い再び凝集反応を実施する。6.2.3.3と並行して実施して良い。

8 判定、報告および決裁

確認試験において典型的な*Vibrio cholerae*の生化学的性状を示し、抗血清凝集試験で01あるいは0139抗血清に凝集し、かつ、コレラ毒素産生性がコレラ菌特異的遺伝子の検出の手順書（VC-002）・コレラ毒素検出の手順書（VC-003）で確認できた場合、三類感染症コレラの原因菌であるコレラ毒素産生性コレラ菌01あるいは0139と判断する。*V. cholerae* 01あるいは0139であってもコレラ毒素陰性のもの、*V. cholerae*であるが01でも0139でもないものは、コレラの届出を必要としない。試験実施者は別紙2に結果ならびに判定を記載する。検査部門責任者は結果を確認し、試験実施者が作成した成績書を確認する。毒素産生性試験は「コレラ菌特異的遺伝子の検出の手順書」に則り実施する。

9 記録の保存

検査結果の記録（別紙1）および報告書のコピーをファイルし定められた場所に保管する。

標準の手順と異なる試験を行った場合には試験実施者は検査部門管理者に報告しその妥当性を検討し、記録に残す（別紙2）

使用した培地・試薬により通常の反応と異なる状態が認められた際にも、試験実施者は検査部門管理者に報告し、別紙1に記録を残す。

10 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講したもの。検査部門管理者が許可したもの。

別紙 1

コレラ菌同定試験記録書 試験実施担当者 (○○ ○○)

被検菌株	検体 ID		受付日時		依頼者		保存	
------	-------	--	------	--	-----	--	----	--

非選択培養 培地作成日 XXXX/XX/XX 接種 XX/XX 釣菌 XX/XX 孵卵器 #X , XX. X℃ コメント: 純培養/否

選択培養 培地作成日 XXXX/XX/XX 接種 XX/XX 釣菌 XX/XX 孵卵器 #X , XX. X℃ コメント:

確認培養および血清型別

2% NaCl 加 TSI 寒天培地 培地作成日 XX/XX

2% N aCl 加 LIM 培地 培地作成日 XX/XX

2% VP 半流動培地 培地作成日 XX/XX

耐塩性 (salt tolerance) 試験培地 培地作成日 XX/XX

使用した孵卵器 #X , XX. X℃

使用した血清 _____ 使用期限 XX/XX

集落	由来・集落性状 (色調)	ためし凝集	TSI				LIM			VP	オキシダーゼ試験	耐塩性培地発育 (0%)	血清型		判定
			Suc/Lac	Glu	Gas	H2S	L	I	M				01	0139	
1	非選択 / 選択 ()														
2	非選択 / 選択 ()														
3	非選択 / 選択 ()														
例	非選択 / 選択 (Y)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	/	V. cholerae 01

コメント: <通常と異なる反応等が認められた場合等留意すべき性状を記載

別紙2

試験手順サマリー

異なる手順が必要であった場合、その内容、理由、妥当性について記録する。

内容：

理由：

判定に及ぼす影響および妥当性：

SOP 改定の必要性： あり ・ なし

試験実施者 (署名) : 日付)
検査部門管理者 (署名) : 日付)

検査実施標準作業書

管理番号	○－△
試験品の種類	コレラ菌疑い株
検査項目	コレラ菌特異的遺伝子の検出
試験法	01、0139 抗原合成遺伝子、コレラ毒素遺伝子の PCR 検査 (参照: コレラ菌検査・診断マニュアル 平成 27 年 9 月)
施行年月日	平成 年 月 日
改訂年月日	平成 年 月 日
作 成 者	〇〇部〇〇課〇〇
承 認 者	〇〇
	(検査部門管理者)
失効年月日	平成 年 月 日

〇〇県保健環境研究所〇〇課

検査実施標準作業書
[コレラ菌特異的遺伝子の検出]
改訂履歴

[illegible]

1 検査の項目

コレラ菌特異的遺伝子の検出

2 目的

コレラ菌疑い株に関して、01、0139抗原合成遺伝子、コレラ毒素遺伝子を検出する。

3 適用範囲

同定確認を依頼されたコレラ菌疑い株

4 実施場所・作業環境

〇〇県保健環境研究所 保健科学部 XX-XXX

5 機器、試薬

- ・ バイオセーフティキャビネット
- ・ ヒートブロック (“機器名”)
- ・ 遠心機 (“機器名”)
- ・ 遺伝子増幅装置 (“機器名”)
- ・ マイクロピペット (ピペットマンP-2、10、20、100、200、1000 μ l)
- ・ 電気泳動装置 (“機器名”)
- ・ 滅菌水 (購入して使用する場合は製品名を記載)
- ・ PCR酵素 (製品名を記載)
- ・ プライマー

01-up	01	GTTTCACTGAACAGATGGG
01-down	01	GGTCATCTGTAAGTACAAC
0139-up	0139	AGCCTCTTTATTACGGGTGG
0139-down	0139	GTCAAACCCGATCGTAAAGG
CT-up	CT	ACAGAGTGAGTACTTTGACC
CT-down	CT	ATACCATCCATATATTTGGGAG
- ・ マイクロチューブ
- ・ ピペットチップ
- ・ アガロース (“製品名”)
- ・ 電気泳動バッファー (購入して使用する場合は “製品名”)
- ・ ゲルローディングバッファー (“製品名”)
- ・ 陽性コントロール1、2、 (1: 01 CT+ “菌株名” , 2: 0139 CT+ “菌株名”)
- ・ 陰性コントロール (“菌株名”)
- ・ サイズマーカー (“製品名”)

6 実施手順

6.1 概要・原理

非選択寒天平板及び選択分離寒天平板に発育した菌の01あるいは0139抗原合成遺伝子、コレラ毒素遺伝子の特異的塩基配列を利用したPCR法を利用して、血清型について参考結果および毒素産生性を検査する。

6.2 検査手順

6.2.1 テンプレートDNAの作成

- ・1.5 mlチューブを検体数分チューブスタンドに立て、1から順に番号をラベルする。記録紙のチューブ番号欄に1から番号をふる。
- ・2% NaCl加普通寒天培地あるいはTCBS寒天培地に発育した純培養菌を少量、1.5 mlチューブに入れた滅菌水50 μ Lに懸濁する。
- ・100°C 10分加熱し、12,000回転 5分遠心した上清をテンプレートDNAとして使用する。

6.2.2 PCRプライマーの調整

- ・各プライマー（6種：10 μ MになるようにTEにて溶解し、分注し-20°Cフリーザで保存）溶液を溶解する。
- ・PCR反応液を検体数分（陽性コントロール2種、陰性コントロール1種を加えた数分）調整する。
- ・PCR反応チューブに番号をラベルし、27 μ lのPCR反応液を各チューブに分注する。
- ・5.2.1で作成したテンプレートDNAのラベルを確認し、同一番号のPCR反応液チューブに3 μ lずつ加える。

6.2.3 PCR

- ・増幅装置の電源を入れ、プログラム番号『XXX』が試験記録書に記載された条件と同一であることを確認し、『XXX』をセットしてスタートする。
- ・PCR反応チューブを増幅装置にセットし、反応を開始する。

6.2.4 アガロースゲル電気泳動

- ・2% アガロースゲルを作成する。
- ・PCR反応液 10 μ l をラベルした新たなチューブにとり、2 μ lのローディングバッファーを加える。
- ・サイズマーカー（10 μ l）を右端ウェルに加え、続けて順次番号順にローディングバッファー加PCR反応液を10 μ lとりウェルに加える。最後に陽性コントロール検体を加える。
- ・100V、45分間程度泳動する。ローディングバッファーの色素がゲル下端より1 cm程度に達する前に泳動を停止する。
- ・染色液に30分間浸し、水洗後泳動像を写真にとる。写真は別紙1試験記録書に添付する。

7 判定、報告および決裁

陽性コントロール1に200 bp, 300bp程度の2本の、陽性コントロール2に300 bp, 450 bp程度の2本の増幅産物が確認され、陰性コントロールではいずれの増幅産物も存在しないことで試験成立とする。

300 bp 増幅産物陽性はコレラ毒素遺伝子陽性を示す。200 bp増幅産物陽性は01抗原合成遺伝子、450 bp増幅産物陽性は0139抗原合成遺伝子陽性を示す。

試験実施者は別紙1 試験記録書に結果ならびに判定を記載する。検査部門管理者は結果を確認し、試験実施者が作成した成績書を確認する。コレラ菌同定試験(SOP VC-001)、コレラ毒素の検出(SOP VC-003)の結果と合わせて3類感染症コレラの原因菌であるコレラ毒素産生性コレラ菌01あるいは0139と判断する。

8 記録の保存

検査結果の試験記録書（別紙1）および報告書のコピーをファイルし定められた場所に保管する。
試験実施者は標準の手順と異なる試験を行った場合は、検査部門管理者に報告しその妥当性を検討し、記録に残す（別紙2）

9 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講したもの。検査部門管理者が許可したもの。

別紙 1

コレラ菌特異的遺伝子検出 試験記録書 試験実施担当者 (○○ ○○)

プライマー		ワーキングストック保管状態		
01-up (10 μM)	GTTTCACTGAACAGATGGG			
01-down (10 μM)	GGTCATCTGTAAGTACAAC			
0139-up (10 μM)	AGCCTCTTTATTACGGGTGG			
0139-down (10 μM)	GTCAAACCGATCGTAAAGG			
CT-up (10 μM)	ACAGAGTGAGTACTTTGACC			
CT-down (10 μM)	ATACCATCCATATATTTGGGAG			

PCR 増幅反応 実施日 XXXX/XX/XX 使用したPCR増幅装置 # X
プログラム (XXX) 94℃ 5分 + { 94℃ 1分 + 55℃ 1分 + 72℃ 1分} 3 5サイクル + 72℃ 7分

	μl /sample	X 検体数 X 1.1
10 倍濃度添付バッファー	3.0	
dNTP 混合液 (各 2.5mM を含む)	2.4	
01-up (10 μM)	1.5	
01-down (10 μM)	1.5	
0139-up (10 μM)	0.8	
0139-down (10 μM)	0.8	
CT-up (10 μM)	0.5	
CT-down (10 μM)	0.5	
滅菌精製水	15.85	
耐熱性DNA ポリメラーゼ (5U/μL)	0.15	
計	27.0	

番号	(検体番号) (コロニー性状等)
1	
2	
3	
4	
5	
6	陽性コントロール名
7	陽性コントロール名
8	陰性コントロール名



コメント :

別紙2

試験手順サマリー

異なる手順が必要であった場合、その内容、理由、妥当性について記録する。

内容：

理由：

判定に及ぼす影響および妥当性：

SOP 改定の必要性： あり ・ なし

試験実施者 （署名 ： 日付 ）
検査部門管理者 （署名 ： 日付 ）

検査の信頼性確保試験標準作業書

管理番号 XXXX

試験品の種類 ポリオウイルス分離用細胞

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 ○○部○○課○○

承 認 者 ○○

(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

○○県保健環境研究所○○課

検査の信頼性確保試験標準作業書

[マイコプラズマ試験]

改訂履歴

[illegible]

1 検査の信頼性確保試験実施計画の作成要領

信頼性確保試験の実施に当たって、次の事項を含む実施計画を作成し、これに基づき実施すること。

① 実施頻度と実施時期

ポリオウイルス分離用の RD-A 細胞と L20B 細胞は再起培養後、15 代を目安に新たな保存細胞と入れ替える（およそ 3 か月ごと）。その前にマイコプラズマ感染の有無を確認することが望ましい。または必要に応じて(ウイルス感受性に変化がみられた時など)実施する。このため細胞の由来、継代数、検査年月日等を記録しておくこと。

② 対象検査項目

検査対象の細胞名を記録すること。

③ 実施方法

実施に用いる方法論を記載すること。

マイコプラズマ検出には上記の PCR 法のほか、別のメーカー、あるいはリアルタイム 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。

2 検査の信頼性確保試験の実施方法

(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

ポリオウイルス分離用培養細胞（RD-A 及び L20B 細胞等）

(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（参考例）

- ① PCR Mycoplasma Detection Set : TAKARA（製品コード TKR6601）
- ② TaKaRa Taq（製品コード R001A）
- ③ 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 ボルテックスミキサー
- ② 遠心器
- ③ サーマルサイクラー

- ④ マイクロピペット
- ⑤ 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 (細胞調製室)
試薬の調製	遺伝子検査室 (専用クリーンベンチ等)
PCR	遺伝子検査室
電気泳動	遺伝子検査室

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。

1) 試験品の前処理

- ① 細胞継代後、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

2) 試薬の調製

- ④ 表 1 に従い PCR 用反応液を調整する。冷却用ラックを用いる。

表 1 1stPCR 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 (DW)	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 陽性対照 0.5 μ l (+DW 4.5 μ l)、陰性対照として DW 5 μ l、を要請用、陰性対照用のチューブに加え、しっかりと蓋を閉める。
- ⑩ PCR 用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 PCR 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。

3) 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。

(9) 作業上の留意点

- ・ PCR Mycoplasma Detection Set : TAKARA (製品コード TKR6601) は 2ndPCR までデザインされている。高感度に検出する場合はマニュアル通りに行うのが望ましい。
- ・ 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。

3 信頼性確保試験の記録の作成及び保管

試験実施時の記録用紙は様式 1 を参照にする。

試験記録は様式 2 に取りまとめる。なおマイコプラズマ汚染がみられたときは、検査部門管理者に報告し、是正措置を講じ、記録する。

様式 1

マイコプラズマ試験工程管理チェックシート（フォーム）

No. 1

細胞の調整（検査に用いた種類を記載）

①使用細胞（継代数）： サンプルング日（実施者）：

②使用細胞（継代数）： サンプルング日（実施者）：

③使用細胞（継代数）： サンプルング日（実施者）：

④使用細胞（継代数）： サンプルング日（実施者）：

⑤使用細胞（継代数）： サンプルング日（実施者）：

PCR 開始日時： 試験実施者

10 × PCR Buffer	5 μ l	×	=	μ l
dNTP Mixture	4 μ l	×	=	μ l
MCGp F1 Primer	0.5 μ l	×	=	μ l
MCGp R1 Primer	0.5 μ l	×	=	μ l
TaKaRa Taq	0.25 μ l	×	=	μ l
Distilled water	34.75 μ l	×	=	μ l
Subtotal	45 μ l		=	μ l

45 μ l ずつ分注し、細胞培養上清を 5 μ l 加える

94°C 30 秒
 ↓
 94°C 30 秒
 55°C 2 分 30cycle
 72°C 1 分
 ↓
 4°C ∞

使用した試薬又はキット：

タカラバイオ PCR Mycoplasma Detection Set Lot：

電気泳動

2%アガロースゲル

調製日：

開始日時：

試験実施者

電気泳動の写真

(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

判定日時：

判定者：

様式2 マイコプラズマ試験結果記録(総表*)

実施年月日	対象とする細胞	結果	実施者	承認者	是正措置の有無
(例) 平成 年 月 日	RD-A (P14)	陰性	〇〇〇〇 〇〇〇〇		なし
	L20B (P14)	陰性			なし
	FL(継代歴不明)	陽性			新規購入し、入替を行った(〇年〇月△日)

*様式1の内容を転記する。