

目次

1. 表題.....	3
2. 管理番号.....	3
3. 委託者.....	3
4. 受託者.....	3
5. 作業期間.....	3
6. 作業概要.....	3
7. 材料.....	4
7.1 被験検体.....	4
7.2 陽性検体.....	4
7.3 主な使用試薬.....	4
7.4 主な調製試薬.....	5
7.5 主な使用資材.....	5
8. 主な使用機器.....	5
9. 方法.....	5
10. 結果の報告.....	6
11. 変更.....	9
12. 納品物.....	9
13. 資料及び記録の保管.....	9
14. 委託者提供物および中間産物の取り扱い.....	10
15. 関連文書.....	10

7. 材料

7.1 被験検体

項目	内容
検体名称	QC_AL
採取施設	STEMCELL 株式会社
検体種別	凍結細胞
数量	1 本 8.5×10^6 cells
保管条件	液体窒素気相

7.2 陽性検体

項目	内容
検体名称	MSC 増殖試験用細胞 hBM-MSC ^{†1}
採取施設	タカラバイオ株式会社
検体種別	凍結細胞
数量	1 本 5×10^5 cells/vial
保管条件	液体窒素気相

^{†1} 骨髄由来間葉系幹細胞 (Rooster Bio/Cat.MSC-001/Lot.00177) を 1 継代で拡大培養し、凍結保存したもの。

7.3 主な使用試薬

製品名	メーカー	製品コード
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose With 1000 mg/L glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	Merck	D6046-500ML
Dulbecco's PBS w/o Calcium and Magnesium	PromoCell	C-40232
Gram's crystal violet solution	Merck	1.09218.0500
大塚蒸留水 (注射用水) (20 mL)	大塚製薬工場	035061113
Fetal bovine serum (FBS)	SAFC Biosciences	12007C

7.4 主な調製試薬

試薬名	調製方法・保管条件
非働化 FBS	FBS を解凍し、56°C に設定した恒温水槽にて 30 分間加温することで非働化した。-40~-20°C で保存した。有効期限は FBS の有効期限に従った。
10%FBS/DMEM	DMEM に非働化 FBS を加えて、終濃度 10 %とした。調製後は 2~8°C で保管した。有効期限は調製日より 2 か月とした。

7.5 主な使用資材

製品名	メーカー	製品コード
6-well plate	CORNING	3516
Vial-Cassette	Chemometec	941-0012/941-0011

8. 主な使用機器

機器名	メーカー	型式
安全キャビネット	日立産機システム	SCV-1307EIIAB3
遠心機	Thermo Fisher Scientific	Sorvall Legend X1R
CO ₂ インキュベーター	Thermo Fisher Scientific	310
蛍光顕微鏡	キーエンス	BZ-X800
恒温水槽	タイテック	SM-05R
セルカウンター	Chemometec	NC-200
マイクロピペッター	Gilson	P1000, P200, P100, P20, P10
薬用保冷庫	三洋電機	MPR-504(H)

9. 方法

試験計画書（図書番号：P_6453_K23028-02）に記載の方法で実施した。試験計画書と異なる方法で実施した事項は 12. 変更に記載する。

10. 結果の報告

以下の事項を報告する。

- 1) コロニー数（小数第1位まで）
- 2) コロニー面積（小数第2位まで）

解析結果を表1に示すとともに解析画像を図1、2として示す。

表1 解析結果

検体名	播種細胞数	コロニー数 平均（個）	コロニー面積 平均（ μm^2 ）
陽性検体	250 cells	21.0	1.12×10^6
	500 cells	28.0	7.61×10^5
被験検体	250 cells	18.5	1.27×10^6
	500 cells	11.5	8.19×10^5

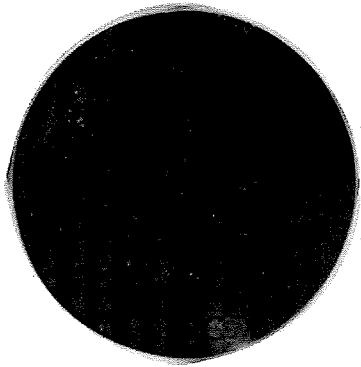
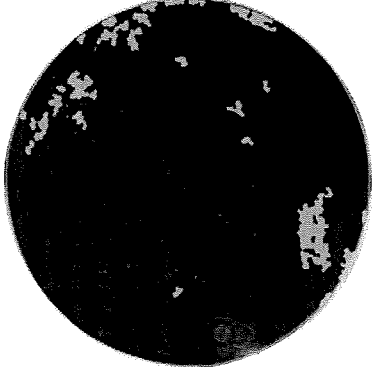
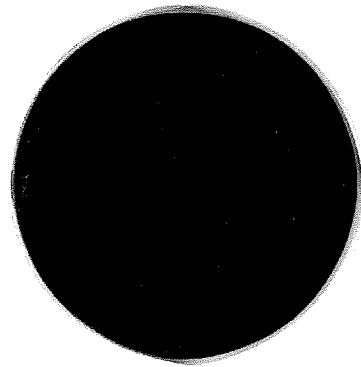
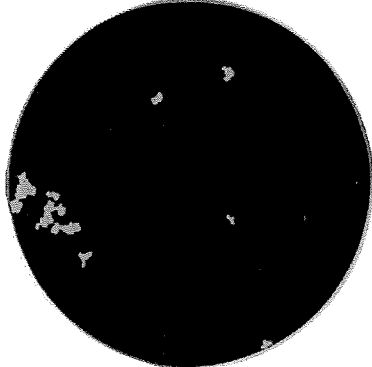
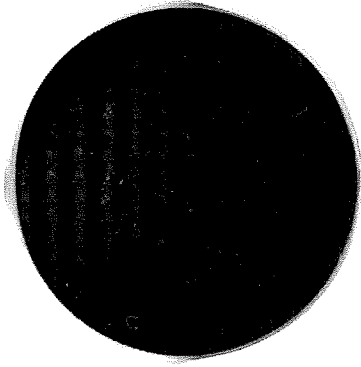

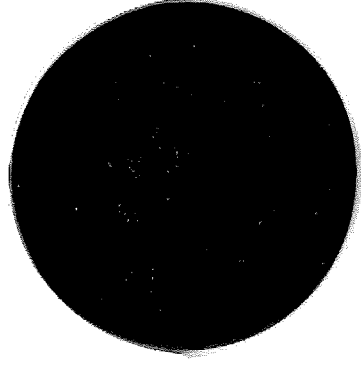
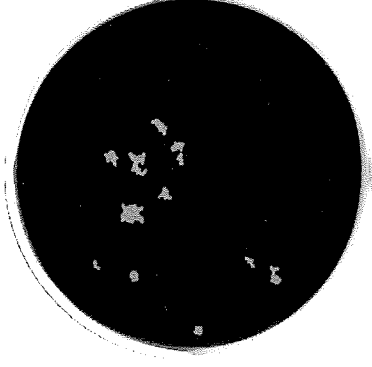
条件	well	実際の画像	コロニー判定画像
250 cells播種	well 1		
	well 2		
500 cells播種	well 1		
	well 2		

図 1 被験検体の解析画像

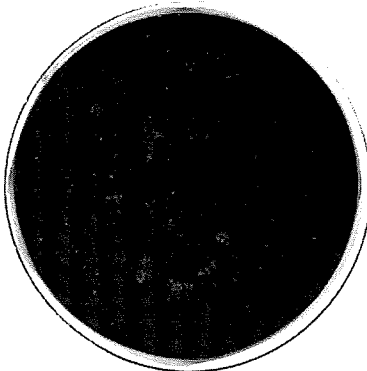

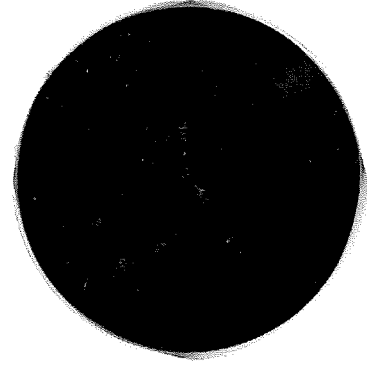
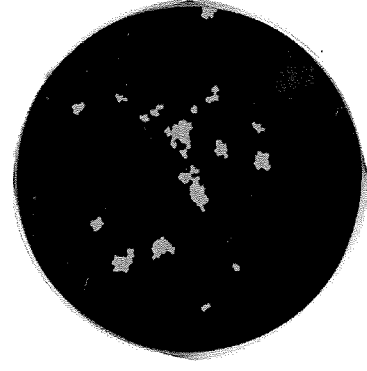
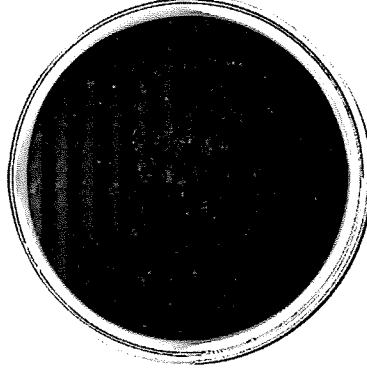

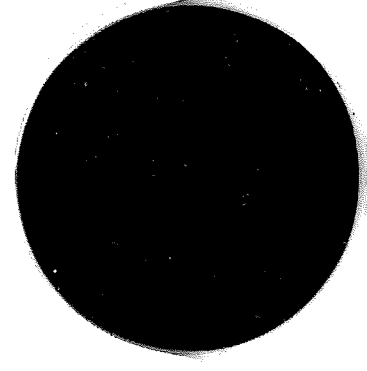
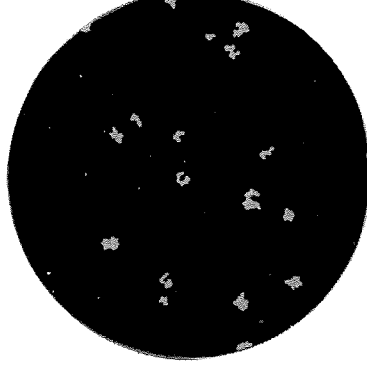
条件	well	実際の画像	コロニー判定画像
250 cells播種	well 1		
	well 2		
500 cells播種	well 1		
	well 2		

図 2 陽性検体の解析画像

11. 変更

試験計画書（図書番号：P_6453_K23028-02）記載事項のうち下表の事項について実施内容を変更した。

変更前		変更後	
項番号	内容	項番号	内容
7.1 被験検体	予定数量 <u>2本 2×10^6 cells/ (内1本は予備)</u>	7.1 被験検体	委託者からの提供された被験検体の細胞数が変更となった為、下記の通り修正した。 <u>1本 8.5×10^6 cells</u>
9.4 画像解析	2) 機器設定条件表 <u>領域指定：楕円、$33,000 \times 33,000 \mu\text{m}^2$</u>	9.4 画像解析	規定の設定値では測定した well の大きさに合致しなかった為、下記設定で対応した。 <u>領域指定：楕円、手動設定</u>
9.4 画像解析	2) 機器設定条件表 <u>しきい値：200</u>	9.4 画像解析	陽性検体の 500 cells 播種において、既定のしきい値では画像に白飛びが発生した為、当該検体のみ下記設定で対応した。 <u>しきい値：170</u>
9.4 画像解析	2) 機器設定条件表 <u>不要な領域を除去する：面積、$450,000 \mu\text{m}^2$</u>	9.4 画像解析	規定の設定値では検出されたコロニーの一部が除去されることが認められたため、下記設定で対応した。 <u>不要な領域を除去する：面積、$300,000 \mu\text{m}^2$</u>

12. 納品物

- | | |
|--------------|----|
| 1) 試験計画書（原本） | 1部 |
| 2) 試験報告書（原本） | 1部 |

13. 資料及び記録の保管

- 1) 資料及び記録名
- ・ 試験計画書（写し）
 - ・ 試験報告書（写し）
 - ・ 作業記録類

2) 保管場所

タカラバイオ株式会社 本社

3) 保管期限

- ・ 10年

14. 委託者提供物および中間産物の取り扱い

委託者からの提供物および中間産物は、別途期限を定めている場合を除き、業務終了3か月後から順次廃棄する。

15. 関連文書

- 1) なし。

以上