

標 準 操 作 手 順 書

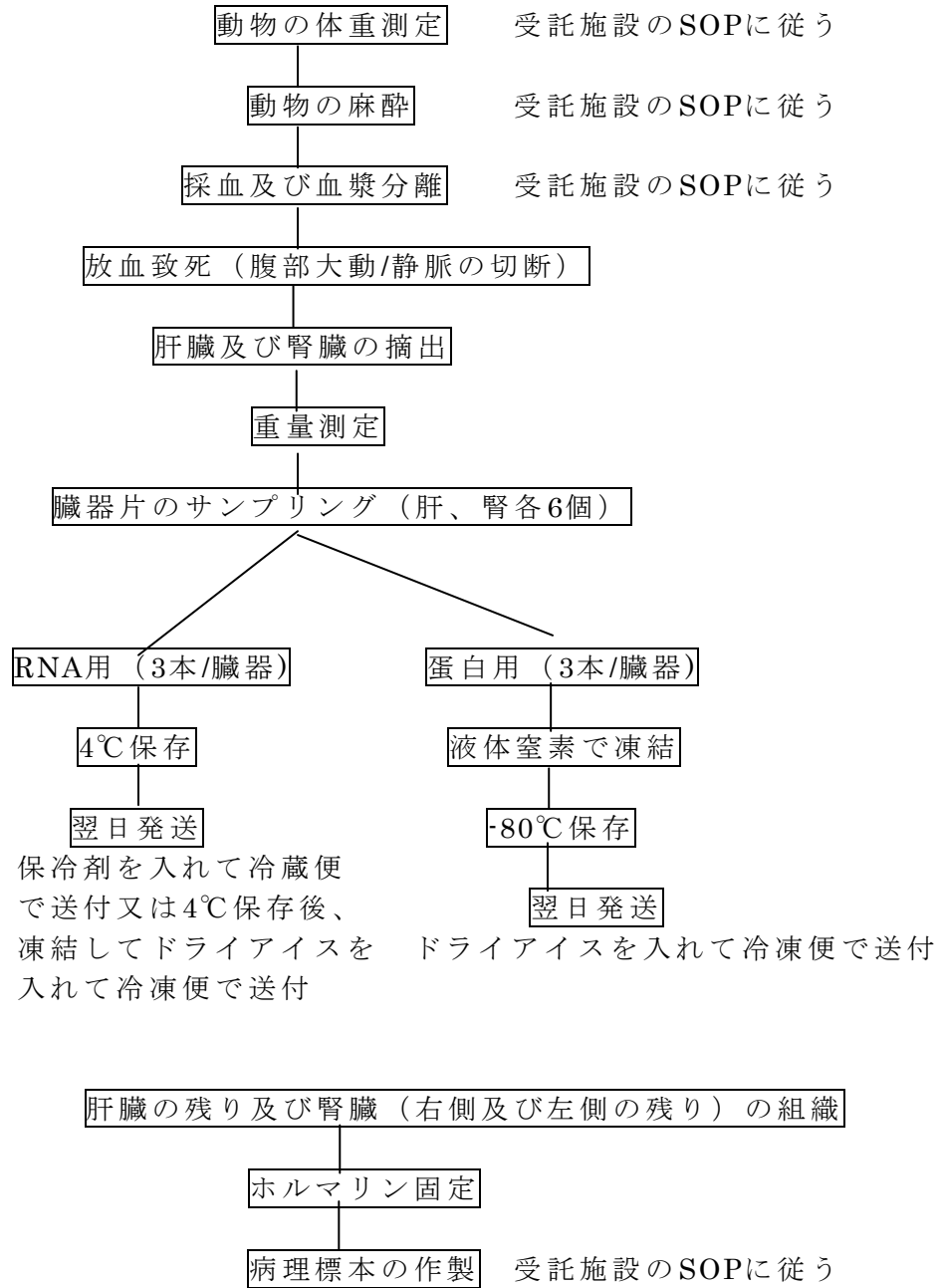
検体の採取、保存及び輸送

承認 _____ 年 月 日

目 次

分 類	項 目	ページ
GEN102 Ver.3	検体の採取、保存及び輸送	
	作業手順の流れ図	1
	1.序	2
	2.サンプル採取用チューブの送付	2
	3.解剖の準備	2
	4.動物の体重測定	3
	5.動物の麻酔	3
	6.採血及び血漿分離	3
	7.放血致死	3
	8.臓器（肝臓及び腎臓）の摘出	3
	9.臓器（肝臓及び臓器）の重量測定	3
	10.臓器（肝臓及び腎臓）のサンプリング	4-5
	11.採取用チューブに問題がある場合の対応	6
12.採取用チューブを間違えた場合の対応	6	
13.サンプルの輸送	6	

作業手順



1序

RNAは非常に分解されやすいため、サンプリングは、臓器を4℃に冷却しつつ速やかに行う必要がある。特に人（実験動物）の毛髪（体毛）や体液（汗、唾液など）には大量のRNA分解酵素が存在しているので、サンプリングに際してはこれらの混入を避けなければならない。

2サンプル採取用チューブの送付

試験開始前に RNA、蛋白および血漿サンプル採取用チューブ、RNA および蛋白サンプルチェックシート、返送用クーラーボックスを試験受託施設に送付する。なお RNA、蛋白および血漿サンプル採取用チューブの作成については SOP/GEN101 を参照のこと。

3解剖の準備

- 1) 実験者は、作業着（白衣や解剖着等）、マスク、帽子及び手袋を着用する。
- 2) ピンセット、はさみ、生検トレパン（アズワン、BP-50F）及び4連刃は、解剖前に必要数だけ用意し、個体毎に取り替える。同一群のサンプル採取に同じものを使用する場合には、使用前に必ず生理食塩液（大塚製薬等）で洗浄した後、純エタノールで軽く洗う（エタノールがサンプルに混入しないようによく振って、乾燥させる）。特に、トレパンは内壁が汚れやすく、内壁に洗浄した水滴も残りやすいので注意する。



- 3) RNA サンプル用チューブは、蓋や壁についた RNA *later* をチューブをふるなどして下に落とした状態で使用する（遠心機で落とすのが理想的）。

注）蓋を開けた際に RNA *later* がもれると組織重量が誤って算出されるので注意する。

- 4) 各チェックシートの Lab. code の欄は、あらかじめ各受託施設での実験群 ID 及び動物 ID 等を記入しておく。

4動物の体重測定

- 1) 受託施設のSOPに従う。

5動物の麻酔

- 1) エーテルを用いて麻酔を行う。麻酔方法は、受託施設のSOPに従う。

6採血及び血漿分離

- 1) 腹部大動脈より採血する。採血及び血漿/血清分離の方法は、受託施設のSOPに従う。

ただし採血は以下の順に実施する。

EDTA血：血液学検査用

→ ヘパリン血：血液化学検査用

→ クエン酸血：凝固検査用

→ ヘパリン血：送付用

7放血致死

- 1) 腹部大動脈及び大静脈を切断して放血し、放血後は以後の操作を速やかに行う（サンプリングは放血後10分以内）。

8臓器（肝臓及び腎臓）の摘出

- 1) はさみで肝臓及び腎臓を摘出し、プラスチックシャーレ等の容器に移し、氷上もしくは4℃に静置する。腎臓については皮膜や脂肪を取り除く。



- 2) 臓器を生理食塩液で洗う。

9臓器（肝臓及び腎臓）の重量測定

- 1) 受託施設のSOPに従う。

10 臓器（肝臓及び腎臓）のサンプリング

1) 作業は、氷上に置いたデッシュ等の上でおこなう。

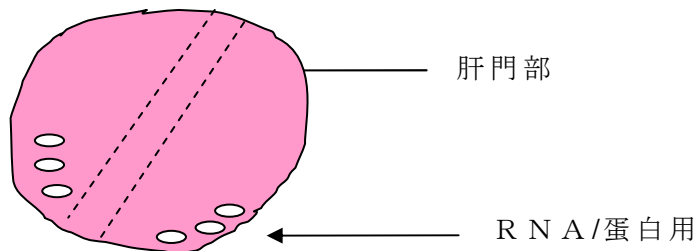
（写真：氷をアルミバットで被い、ポリエチレン板の上にベンキュートを敷き、その上で作業を実施）



2) 肝臓のサンプリング

図1のように門脈等を避け、肝臓葉辺縁の厚みの均一な肝実質領域を選び、トレパンを用いて1個体につきRNA用に3個、蛋白用に3個の計6個の臓器片を打ち抜く。中央部分は病理組織用の切り出し部位とする（点線）。ただし、肉眼的病変が見られる場合は、その部位を避けてRNA用サンプル採取を行い、チェックシート備考欄にその旨記載する。

図1
肝外側左葉



3) 腎臓のサンプリング

図2のように左腎の長軸に対角になるように4連刃にて、皮質・髓質を含む3枚の1 mm厚のスライスを作成する。その後、図3のように3枚のスライスは、さらに腎乳頭を含むようにメスで各々2片に切り分ける。ただし、左腎に肉眼的病変があった場合には、右腎についてサンプリングを行い、チェックシート備考欄にその旨記載する。

図2

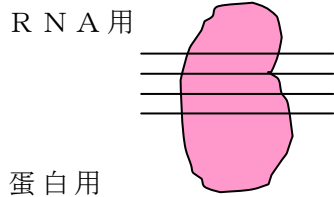
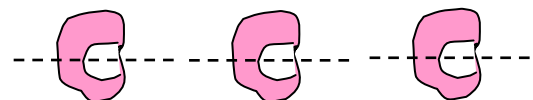


図3



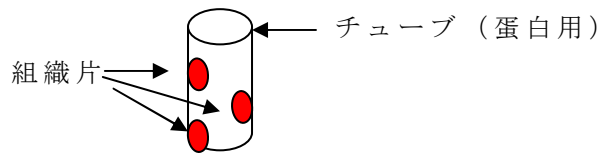
- 4) 肝および腎について各 3 個の臓器片はピンセット等を用いて、RNA *later* 入りの 2 ml 容マイクロチューブに入れる。その際、組織片が完全に RNA *later* に漬かるように転倒混和する（激しく振らない）。

注 1) ピンセットを RNA *later* に漬けない。

注 2) RNA *later* 入りチューブの蓋は組織片を入れる直前に開ける。

注 3) RNA 用チューブは風袋重量を測定済みなので、中の液 (RNA *later*) がこぼれた際にはそのチューブは使用せず、予備のチューブを使用する。

- 5) 残りの 3 個の臓器片は、1 本の蛋白用（スクリーキャップ）チューブに入れる。その際、各組織片同士が付着しない様に、チューブの下方から互いに間隔を空けてチューブ内壁に組織片を付着させる。



- 6) サンプルを採取した後、バーコードラベルの割付けシールをはずして、チェックシートの対応する欄に貼り付ける。
- 7) サンプル採取済みの RNA 用チューブは、氷を入れた発泡スチロール等の箱の中に置いたチューブラックに入れる。
- 8) サンプル採取済みの蛋白用チューブは、液体窒素で瞬間凍結した後、ドライアイスを入れた発泡スチロール等の箱の中に置いたチューブラックに入れる。



- 9) 実験終了後、RNA 用サンプルは組織が RNA *later* に完全に浸かっていることを確認して 4℃で一晩、蛋白用サンプルは -80℃で保管する。その後サンプルをすぐに発送しない場合は、RNA 用サンプルは 4℃で一晩放置後、-80℃に移して保管する。

注) RNA 用サンプル (凍結済み) については、発送する前にもう一度、組織が RNA *later* に完全に浸かっているか確認すること。

- 10) 返送用の血漿用チューブには、採血後、遠心分離して得られた血漿の一部を分注し、-80℃で保管する。チェックシートは受託施設の採血チェックシートのコピーをもって代用しても良い。

11 採取用チューブに問題がある場合の対応

チューブの破損、紛失、RNA *later*をこぼした場合、あるいはRNA *later*が結晶化していた場合等、採取用チューブに何らかの問題があった場合には、そのチューブは使用せず、RNAサンプル採取用チューブについては予備チューブ（キャップにNo.記載済み、通常10本）を、また蛋白サンプル採取用チューブについては、各施設にあるスクリーキャップチューブ（冷凍保存対応）を使用する。予備チューブの使用は以下のように行う。

- 1) 予備チューブにサンプルを採取する。
- 2) チェックシートのロストチェック欄にチェックを入れ、RNAサンプル採取用チューブについてはバーコード貼り付け欄に予備チューブのキャップNo.を記載する。蛋白サンプル採取用チューブについては、バーコードシールがある場合、そのまま貼り付ける。無い場合は、チューブに数字を記載し（各試験No.1から使用）、バーコード貼り付け欄にNo.を記入する。

12 採取用チューブを間違えた場合の対応

- 1) 間違えたチューブの割りシールを、採取した臓器サンプルのチェックシートに貼り付けて、ロストチェック欄にチェックを入れる。
- 2) 前項で使用したために本来入れるべきチューブが無くなったサンプルについては、予備チューブに採取し、チェックシートのロストチェック欄にチェックして、バーコード貼り付け欄に予備チューブのキャップNo.を記載する。蛋白採取用の場合は、各施設で用意したチューブに数字を記載し（各試験No.1から使用）、バーコード貼り付け欄にNo.を記入する。

13 サンプルの輸送

RNA用サンプル、蛋白用サンプル及び血漿サンプルは、サンプル採取翌日以降（-80℃保存時）に、バーコードチェックシートと共にドライアイスの入ったクーラーボックスに入れてトキシコゲノミクスプロジェクト事務局宛に冷蔵宅急便で輸送する。

以下余白