

## iCROWN リポジトリ試料調製手順書

2025 年 4 月 1 日 第 1.1 版

- ・ iCROWN リポジトリ参加医療機関（以下、参加医療機関）で採取された検体は、検査会社において以下の手順で調製され、試料として iCROWN リポジトリの試料保管施設で保存される。

### ○血液検体からの各試料の調製

#### 血漿の調製

1. EDTA-2Na 採血管（テルモ社 ベノジェクト II EDTA-2Na 7mL）に血液 7mL を採取する。
2. 5～6 回転倒混和。
3. 室温で最大 48 時間保存（参加医療機関から検査会社への検体の回収移動等のため）。
4. 650 x g /20°C/10 分で遠心する。
5. 血漿を回収、分注後、-80°Cで保存する（血漿回収後保存まで、20～30 分程度室温に静置）。iCROWN リポジトリの試料保管施設に移送した後、-80°Cあるいは-150°C（長期保存）で保管する。

#### ヒトゲノム DNA の調製

1. 血漿を除いた採血管チューブに PBS(-)をチューブの約 8 割添加し、ピペッティングを行い攪拌する。
2. 50 mL 遠沈管に PBS(-)懸濁液を 5mL 分注する。
3. Precision System Science 社の magLEAD 5bL、試薬キット MagDEA Dx LV を用い TE (pH 8.0) 1ml にて DNA を抽出する。
4. 超微量分光光度計 NanoDrop で DNA 濃度を測定する。
5. 分注後、4°C保存する（保存期間は、1～2 週間程度）。iCROWN リポジトリの試料保管

施設に移送した後、-80°Cあるいは-150°C（長期保存）で保管する。

#### PBMC（Peripheral Blood Mononuclear Cells）の調製

1. 血漿を除いた採血管チューブに約 2 倍量の PBS(-)を添加し、均一になるまで攪拌する。
2. PBS(-)懸濁液を STEMCELL Technologies 社製 SepMate-50 に垂直にしてゆっくり管壁に這わせながら重層する。
3. 250 x g /20°C/12 分で遠心する（不十分な場合はさらに 10 分追加する）。
4. PBMC を含む上清を SepMate-50 から PBS PBS(-)を添加した回収用 50mL 容遠沈管 1 本に 2 秒以内に全量回収する。
5. 400 x g/20°C/5 分で遠心する。
6. スポイトを用いて上清を除去する。
7. セルバンカーI（タカラバイオ）に懸濁し、保存用チューブに分注し、-80°Cで保存する（5 の遠心から保存するまで室温で 1-3 時間静置）。
8. iCROWN リポジトリの試料保管施設に移送した後、-150°Cで保管する。

#### ○その他試料の調製

##### ぬぐい液（鼻咽頭、咽頭、水疱）の調製

1. スワブを用いて検体を採取し、輸送容器（極東製薬 UTM330C）に入れる。  
鼻咽頭ぬぐい液：ハイドロフロックスワブ 25-3317H  
それ以外のぬぐい液： 502CS01（コパン FLOQ）
2. 冷蔵で 最大 48 時間保存（参加医療機関から検査会社への検体の回収移動等のため）。
3. 650 x g /20°C/1 分で遠心する。
4. 保存用チューブに分注し、-80°Cで保存する（分注後最大 4 時間室温静置した後）。

5. iCROWN リポジトリの試料保管施設に移送した後、-80°Cあるいは-150°C（長期保存）で保管する。

#### 唾液の調製

1. 唾液を、唾液採取容器（ロート付 10ml 滅菌スピッツ）に 2 ml 以上採取する。
2. 冷蔵で 最大 48 時間保存(参加医療機関から検査会社への検体の回収移動等のため)。
3. 650 x g /20°C/1 分で遠心する。
4. 保存用チューブに分注し、-80°Cで保存する（分注後最大 4 時間室温静置した後）。
5. iCROWN リポジトリの試料保管施設に移送した後、-80°Cあるいは-150°C（長期保存）で保管する。

#### 便の調製

1. 便をザルスタット社製採便コンテナ 70ml (80.992.027) に採取する。
2. 冷蔵で 最大 48 時間保存(研究協力機関から検査会社への検体の回収移動等のため)。
3. 保存用チューブに分注し、-80°C保存する（分注後 1 時間程度室温静置した後）。
4. iCROWN リポジトリの試料保管施設に移送した後、-80°Cあるいは-150°C（長期保存）で保管する。

以上