

# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

2017年10月7日版

- **監修者：** 春日雅人  
榊 佳之  
水谷修紀  
高坂新一
- **著者：** 東北大学東北メディカルメガバンク機構 (ToMMo)  
峯岸直子  
小柴生造  
三枝大輔
- バイオバンクジャパン (BBJ)  
湯地晃一郎  
朝長 毅  
小寺義男
- ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク (NCBN)  
服部功太郎 富田 努  
新飯田俊平 市川 仁  
永田有希 金井弥栄  
後藤雄一 清水厚志 (いわて東北メディカルメガバンク機構)  
南野直人 落合淳志  
錦織充広 吉田輝彦  
植田初江

#1

## 目次

● 用語説明	4
● はじめに (著者からの御願い)	5
● 品質確保に向けた三大バイオバンクの役割分担	6
● サマリー	7
● 第1部…東北大学東北メディカルメガバンク機構「血漿・血清・脳脊髄液の代謝物安定性の検討」	11
【A】総論	12
【B】ベストプラクティス (案)	13
【C】上記ベストプラクティス (案) の根拠となる実証解析データ	15
【D】参考文献	48
● 第2部…バイオバンク・ジャパン「血清・血漿試料の品質評価マーカーの開発と測定法の確立」	49
【A】総論	50
【B】ベストプラクティス (案)	51
【C】上記ベストプラクティス (案) の根拠となる実証解析データ	53
【D】参考文献	77
● 第3部…ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク「生体試料の国際標準化への対応及び臨床オミックス検査への応用」	79
【A】全体の総論	80
3-1 脳脊髄液	81
【A】総論	82
【B】ベストプラクティス (案)	83
【C】上記ベストプラクティス (案) の根拠となる実証解析データ	85

#2

# 目次

3-2 骨格筋	95
【A】総論	96
【B】ベストプラクティス（案）	97
【C】上記ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ	99
3-3 心筋	101
【A】総論	102
【B】ベストプラクティス（案）	103
【C】上記ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ	109
3-4 がん（FFPE）	131
【A】総論	132
【B】ベストプラクティス（案）	133
【C】上記ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ	139
3-5 ゲノム医療実現に向けたオミックス検査・解析に係る国内外の品質管理の枠組の全体像の整理と提案	161
【D】参考文献	168
● 第4部「想定される国際標準規格を踏まえた3大バンク等のSOPの調査と考察」	169

#3

## 用語説明

- 
- DIN : DNA integrity number (DNA試料の品質を評価するための指標)
  - FFPE : Formalin-fixed paraffin-embedded (ホルマリン固定パラフィン包埋)
  - LN2 : Liquid nitrogen (液体窒素)
  - MRM : Multiple reaction monitoring (多重反応モニタリング)
  - OPLS-DA : Orthogonal Partial Least Squares Data Analysis (部分的最小二乗判別分析)
  - RIN : RNA integrity number (RNA試料の品質を評価するための指標。7未満は分解が進行)
  - SIMCA : Stable isotope labeling using amino acids in cell culture (安定同位体ラベルしたアミノ酸を利用する相対定量)
  - SRM : Selected reaction monitoring (選択反応モニタリング)
  - TMT : Tandem mass tagging (質量数の異なるタグを持つ標識試薬を利用する相対定量)
- 

#4

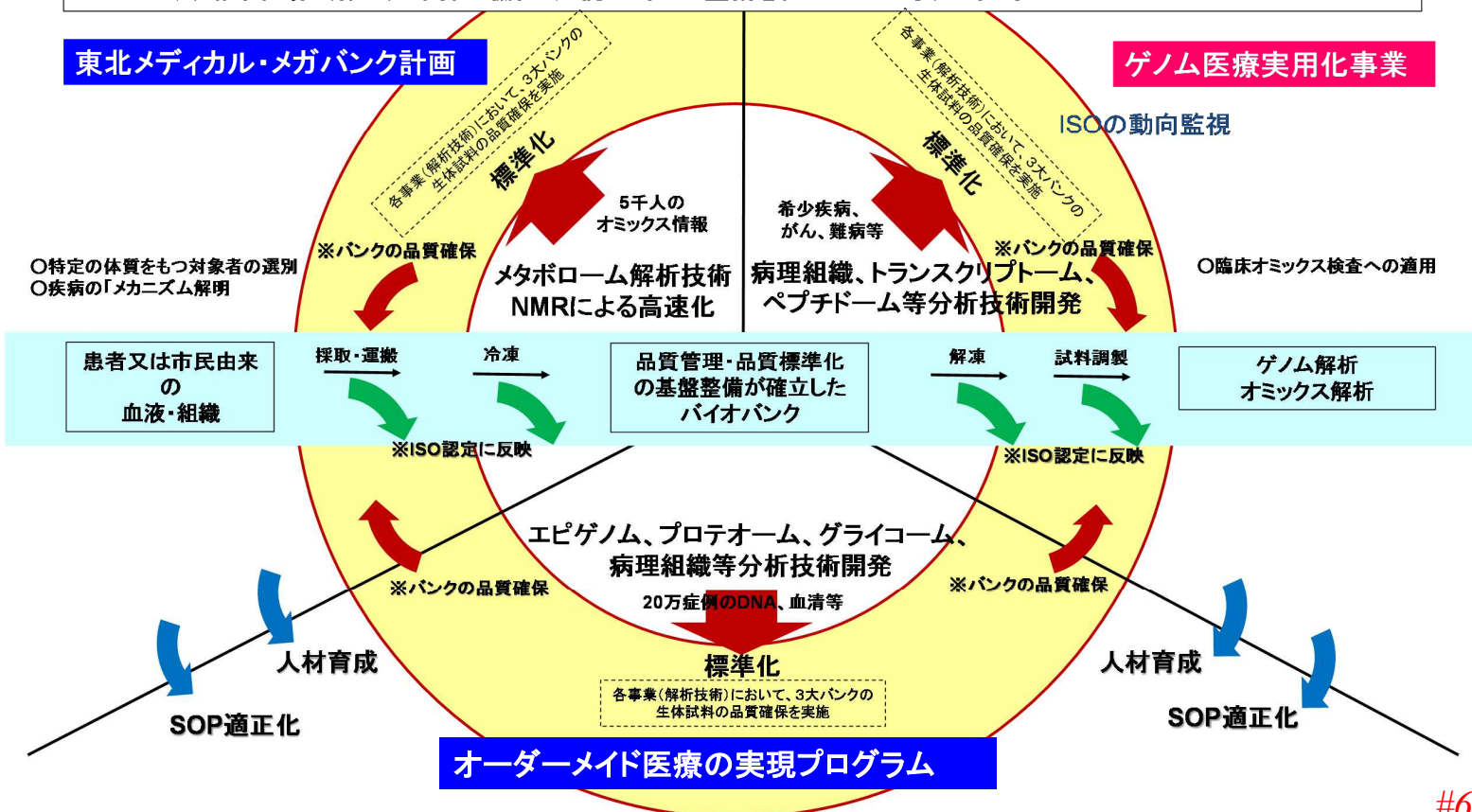
# はじめに（著者からのお願い）

- 本報告書は、厚生労働省と文部科学省の連携のもと、平成28年度日本医療研究開発機構（AMED）の春の調整費に基づく研究事業の一環として、我が国のいわゆる三大バンク（東北メディカルメガバンク、バイオバンクジャパン、ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク）の研究者が協働して、バイオバンクの必須の要件である試料の品質に関する検討を行い、その成果をまとめたものである。本研究における、三大バンクのそれぞれの個性・特長を活かした分担と連携の基本概念は以下の図に示したとおりである。
- 本報告書の主たる部分の構成は、AMED「オーダーメイド医療の実現プログラム」の一環として、一般社団法人日本病理学会が平成28年3月1日に発表した「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程」に倣っている。すなわち、各バンクによる本事業の取組についての【A】総論に引き続き、オミックス研究に利活用する場合に求められる品質確保に焦点をあてた生体試料の取扱いを、【B】ベストプラクティス（案）として簡潔にまとめた。このベストプラクティス（案）は、その根拠を【C】実証解析データにおいて示しているが、基本的に各研究担当者によるexpert opinionに基づく「試案・素案」と言える。
- すなわち、この資料の内容は今後、多くの修正・加筆などの改訂や、対象とする試料の種類・解析技術等のさらなる拡充を図っていく必要がある。そのために、この公開する資料を手にとってくださった方々にとって何らかの参考になり、お役に立つことと、忌憚の無い御意見や情報等のフィードバックをいただくことが著者一同の心からの願いである。

#5

## バイオバンクに関する品質確保に向けた三大バイオバンクの役割分担

ゲノム医療実現推進協議会の中間とりまとめ（平成27年7月）を受けて、品質の確保された生体試料を供用できる体制整備、生体試料の品質の標準化の推進を行う。とくに3大バイオバンクにおいては、研究基盤・連携のハブとなるべく再構築が求められており、臨床現場・研究・産業界の協働・連携に向けた整備を行っていく必要がある。



#6

## サマリー ToMMo : オミックス研究用生体試料の取扱い

### □ 血漿・血清のメタボローム解析

採血後保管条件の影響を受けて変化する血液中代謝物を同定するために、健常人ボランティア6名から採血を行い、保管時間・温度条件の異なる血漿と血清を作成した。得られた試料についてGC-MS/MSおよびNMRによるメタボローム解析を行い、採血後の保管条件（保管時間や温度）に依存して変化する代謝物を同定した。その結果、

- 血液に含まれる代謝物は、採血後4°Cに保管すると12時間後までは比較的安定である。
- このため、血漿あるいは血清をバンキングする場合、採血後できるだけ速やかに4°Cに保管したのち、12時間以内に遠心分離することが望ましい。
- 一方で、室温（4°C保管が困難な機関）で得られた検体は、室温に置かれた正確な時間を記載した上で、保管温度の影響を受けにくい安定な成分のみの解析に使用することが望ましい。

### □ CSFのメタボローム解析

脳脊髄液（CSF）採取後保管条件の影響を受けて変化するCSF中代謝物を同定するために、NCBNから多種の保管条件で得られたCSFについて、GC-MS/MSおよびNMRによるメタボローム解析を行った。結果、各種保管条件（保管温度・時間、凍結融解、遠心分離、赤血球数、保管チューブの種類）に依存して変化するCSF中代謝物の同定に成功した。その結果、

- CSFは、採取から4時間以内に保管し、凍結融解は1回程度、遠心力は4,000G、チューブは対象化合物によって低吸着チューブを用いて保管することが望ましい。

#7

## サマリー B B J : オミックス研究用生体試料の取扱い

- バイオバンク検体のタンパク質品質評価の指標やその測定法についてはこれまで国際標準が存在していなかった。
- 新指標作成のために、血清・血漿検体のタンパク質の品質評価マーカーを最先端のプロテオミクス技術を用いて開発し、高精度かつ迅速に評価できる測定法を確立した。
- 血清・血漿保存検体の品質に影響を及ぼす要因として、採血から遠心分離までの時間、保存条件、凍結融解などが想定される。
- 健常人の血清・血漿を、遠心分離までの時間や保存温度・時間を変化させ、影響をうける不安定ペプチドの同定を実施した。
- 網羅的プロテオーム解析で約5千種類のペプチドが同定され、そのうち不安定なペプチドが数百種類同定された。
- それらのペプチドをもつタンパク質には安定なペプチド群が存在した。次に、それらの品質評価候補ペプチドについて、SRM/MRM法を用いて検証した。
- 室温での遠心分離までの時間の品質評価マーカーペプチドは、血清18種類、血漿36種類、計54種類に絞られた。
- また、保存条件の品質評価マーカーペプチドは、血清15種類、血漿41種類、計56種類に絞られた。
- SRM/MRM法を用いて、これらの最終的な品質評価マーカーペプチド群を1検体30分で測定する方法を確立した。

#8



## □ 脳脊髄液のプロテオーム及びメタボローム解析

- 赤血球数 $5,000$ 個/ $\text{mm}^3$  (約 $0.1\%$ ) の血液の混入までは、タンパク質に与える影響は比較的小さい。
- 採取～保存までの時間と温度について、 $25^\circ\text{C}$ では4時間まで、 $4^\circ\text{C}$ では24時間まで、影響は比較的小さい。
- 保存用チューブの材質 (ポリプロピレン、タンパク質低吸着処理) が試料に与える影響は大きい。

## □ 骨格筋凍結試料のゲノムを含むオミックス解析

- 生検試料は、採取後可及的速やかに急速凍結固定する。可及的速やかに凍結固定を行えない場合には、 $4^\circ\text{C}$ 保管 3 時間以内を目安にして組織検体を採取する。
- 30年未満の検体を使用することが望ましい (30年以上ではRNAの劣化が認められた)

## □ 心筋凍結試料のゲノムを含むオミックス解析

- ゲノム・エピゲノム解析については、国立循環器病研究センターバイオバンクの取扱い法に準拠。
- トランスクリプトーム解析では、死亡後あるいは手術時摘出後、6時間以内でRIN6以上が必要と推定。
- プロテオーム解析では、死亡や手術摘出後6時間を超えるとプロテアーゼによる消化・分解が増加し、定量性に問題が発生する可能性があり、6時間以内に収集・凍結することが望ましい。

## □ がんFFPE試料のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析

- ゲノム解析用の品質評価法として、定量PCR測定DNA量 (A) と蛍光法測定DNA量 (B) の比、すなわちPCR増幅可能DNA比率 (A/B) が有効である。
- 保存FFPEがん組織検体には目視で認識できない他症例組織が混入している場合があり、得られたNGSデータに対しコンタミネーション検出プログラムによる評価を行うことが推奨される。
- 標準的なFFPE組織検体から抽出したDNAで、Infiniumアレイを用いたDNAメチル化解析は十分に実施可能である。この時、FFPE DNA Restorationキットを用いた修復反応を実施することを推奨する。
- FFPE組織検体由来RNAは、概ね強く断片化されており、その状態は検体ごとに大きく異なる。解析開始前にRNA断片化の評価を行うことを推奨する。ターゲットキャプチャー法を用いることである程度NGS解析可能であるが、断片化の亢進は高リード重複率につながる。nCounter解析では低シグナルにつながる。

#9

# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

- 第1部・・・東北メディカルメガバンク機構  
「血漿・血清・脳脊髄液の代謝物安定性の検討」

## 【A】総論

## 【B】ベストプラクティス（案）

## 【C】ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ

#11

## 【A】総論

- 東北大学東北メディカル・メガバンク機構（ToMMo）は、未来型医療を築いて震災復興に取り組むことを目的に設置された。機構は、東日本大震災の被災地の地域医療再建と健康支援に取り組みながら、医療情報とゲノム情報を複合させたバイオバンクを構築している。ToMMoの品質管理に向けた取組のうち、本研究事業ではメタボローム解析に焦点を当てた。具体的な研究項目は下記の通り：
  - 血漿の品質評価法の高精度化  
解析対象数の拡張による情報の拡大  
他のバイオバンクと連携したオミックス解析用試料の品質評価法の開発
  - 血漿、血清及び脳脊髄液（CSF）など他の生体試料の品質管理のためのメタボローム解析  
各種生体試料の品質評価法を他のバイオバンクと連携して解析  
オミックス解析のための試料の品質の標準化
  - 長期保管された各種バイオバンク試料の品質評価  
バイオバンクに保管されている長期保存検体のメタボローム解析  
各種代謝物の変化を調査
  - ToMMoの血漿試料のメタボローム解析による、各検体の代謝プロファイルの情報集積・提供  
全国の研究者が必要とする試料・情報の迅速な提供が可能になる  
最先端の解析機器によるデータの提供と世界標準化への貢献

#12

## 【B】ベストプラクティス（案）

1. 血漿及び血清の詳細なメタボローム解析を実施し、採血後の保管条件（保管時間や温度）に依存して変化する代謝物を同定した。  
具体的には、Phosphoric acid、2-ketoglutaric acid、Ornithine、Phenylalanine、Cysteine、Lactic acid、5-Oxoproline、3-Aminoglutaric acid、Glutamic acid、Glycyl-Glycine等は増加傾向であり、5-Dehydroquinic acid、Glucose、N-Acetyl-Lysine、Pyridoxal、Hippuric acid等は減少傾向であった。  
一方、3-Hydroxyglutaric acid、Urea、Tyrosine、Citric acid、Acetoacetic acid等は、比較的どの条件においても安定して検出される傾向が見られた。
2. 血漿・血清ともに採血後4℃に保管すると12時間後までは比較的安定であった。従って、血漿あるいは血清をバンキングする場合、採血後できるだけ速やかに4℃に保管したのち、12時間以内に遠心分離することが望ましい。
3. 一方、室温（4℃保管が困難な機関）で得られた検体は、室温に置かれた正確な時間を記載した上で、保管温度の影響を受けにくい安定な成分のみの解析に使用することが望ましい。

#13

4. 脳脊髄液（CSF）のメタボローム解析を実施し、保管条件（保管時間や温度）に依存して変化する代謝物を同定した。具体的には、
  - ✓ 温度条件：CSFを室温（25℃）に24時間保管した場合、Threonic acid、Glutamic acid、4-Aminobutyric acid等の増加、Pyruvic acidの減少が観察された。また、Sucroseは、保管温度・時間に関わらず、コントロールと比較して減少傾向であった。
  - ✓ 凍結融解：2-Hydroxyglutaric acid、5-Aminovaleric acid、Decanoic acid、Fumaric acid等、多くの代謝物は、凍結融解1回で減少することが示された。
  - ✓ 遠心条件：多くの代謝物は遠心条件における変化は見られなかったが、Adenineは4,000Gにおいて高値になることが示された。
  - ✓ 赤血球数：Spermidine、Glycerol等は、赤血球数によって代謝物の変化が見られたが、有意に変化がみられる化合物は少なかった。
  - ✓ チューブ条件：Jacket tubeと比較し、PP（ポリプロピレン）あるいはPS（ポリスチレン）チューブで保管されたCSFに含まれる代謝物は、5-Oxoproline、Adipic acid、Glycerolに加え、Leucine、Tryptophan等のアミノ酸類、Succinic acid等の化合物が定値であることが判った。
  - ✓ CSFに含まれる一部の代謝物は、保管条件の影響を受けるため、4時間以内に保管し、凍結融解は1回程度、遠心力は4,000G、チューブは対象化合物によって低吸着チューブを用いて保管する必要があると考えられる。

#14

## 実証解析の方法：血漿のGC-MS/MSメタボローム解析

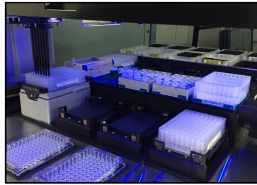
### 測定対象検体（血漿 108 検体）

健康人 6 名（男女 各 3 名）  
 タイムコース 4℃保管：0、0.5、1、2、3、6、12、24、48 時間  
 25℃保管：0、0.5、1、2、3、6、12、24、48 時間

\* 上記時間保管後に血清・血漿を得た

### 実験プロトコル (216 検体)

#### 1. 前処理（抽出）



Microlab® STARlet robot system (Hamilton)

#### 2. 前処理（誘導体化）



AOC 6000 robot system (Shimadzu)

Sample (50 uL)  
 2-isopropylmalate (0.5 mg/mL), 10 uL  
 H<sub>2</sub>O:MeOH:CHCl<sub>3</sub>=1:2.5:1, 250 uL  
 Incubation: 30 min/37 °C/1,200 rpm  
 Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000×g  
 Supernatant (200 uL)  
 H<sub>2</sub>O, 200 uL  
 Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000×g  
 Supernatant (250 uL)  
 Evaporation by Speed Vac: 25 min  
 Freeze-drying: 18 hr  
 Sample (powder)  
Derivatization  
 Methoxyamin hydrochloride in Pyridine (20 mg/mL), 80 uL  
 Sonication: 20 min  
 Incubation: 90 min/30 °C/1,200 rpm  
 MSTFA, 40 uL  
 Incubation: 30 min/37 °C/1,200 rpm  
 Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000×g  
 Supernatant (40 uL)

### 3. GC-MS/MS 測定



TQ8040 (Shimadzu)

### 4. データ処理



Traverse MS™ (Reifycs)

ライブラリ作成、化合物ピークの同定

475 イオン > ~250 イオン > ~200 代謝物

プロジェクト作成

血漿毎に解析

### 5. 多変量解析

階層クラスター解析  
 主成分分析  
 ヒストグラム作成

#15

## 血漿のGC-MS/MSメタボローム解析

- 採血後の保管条件（保管時間や温度）に依存して変化する代謝物を同定するために、以下の検体の種類・条件で安定性試験を行った。

- 解析対象者：ToMMoでリクルートした健康人ボランティア合計 6 名
- 解析検体：血漿（EDTA）
- 検討対象：採血から遠心分離・冷凍保管までの時間と温度
  - 保管時間：0、0.5、1、2、3、6、12、24、48時間（9条件）
  - 保管温度：4℃、25℃（2条件）

参考文献： Saigusa et al, 2016. Yin et al, 2015, 2013.  
 Kamlage et al, 2014. Bernini et al, 2011.

- GC-MS/MS測定の方法

- 前処理 1（抽出）：Microlab® STARlet robot system (Hamilton)
- 前処理 2（誘導体化）：AOC 6000 robot system (Shimadzu)
- MS測定：TQ8040 (Shimadzu)、Smart Metabolites Database (Shimadzu)

参考文献： Nishiumi et al, 2017.

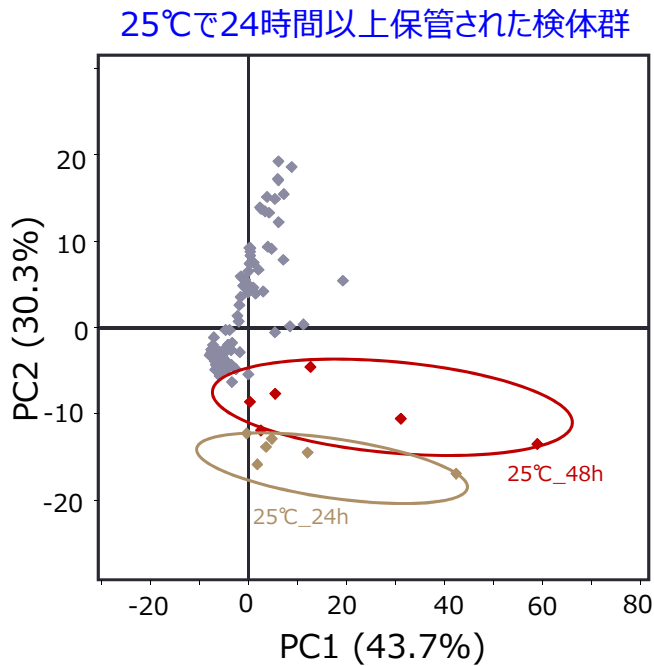
- データ処理の方法

- ライブラリ、プロジェクト作成：Traverse MS™ (Reifycs)
- 統計解析、多変量解析：Traverse MS™ (Reifycs)、SIMCA13 (Infocom)

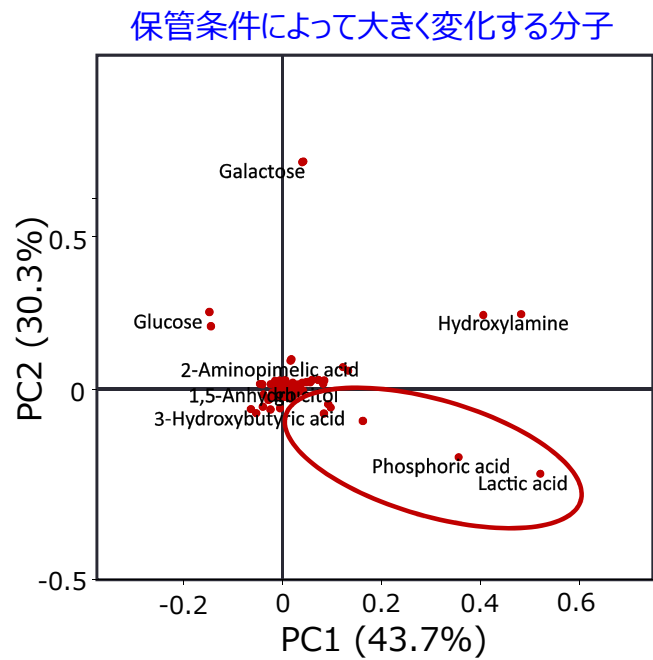
- 以上の解析の流れの全体像は上記の図のとおりである。



## PCA (Score plot)



## PCA (Loading plot)



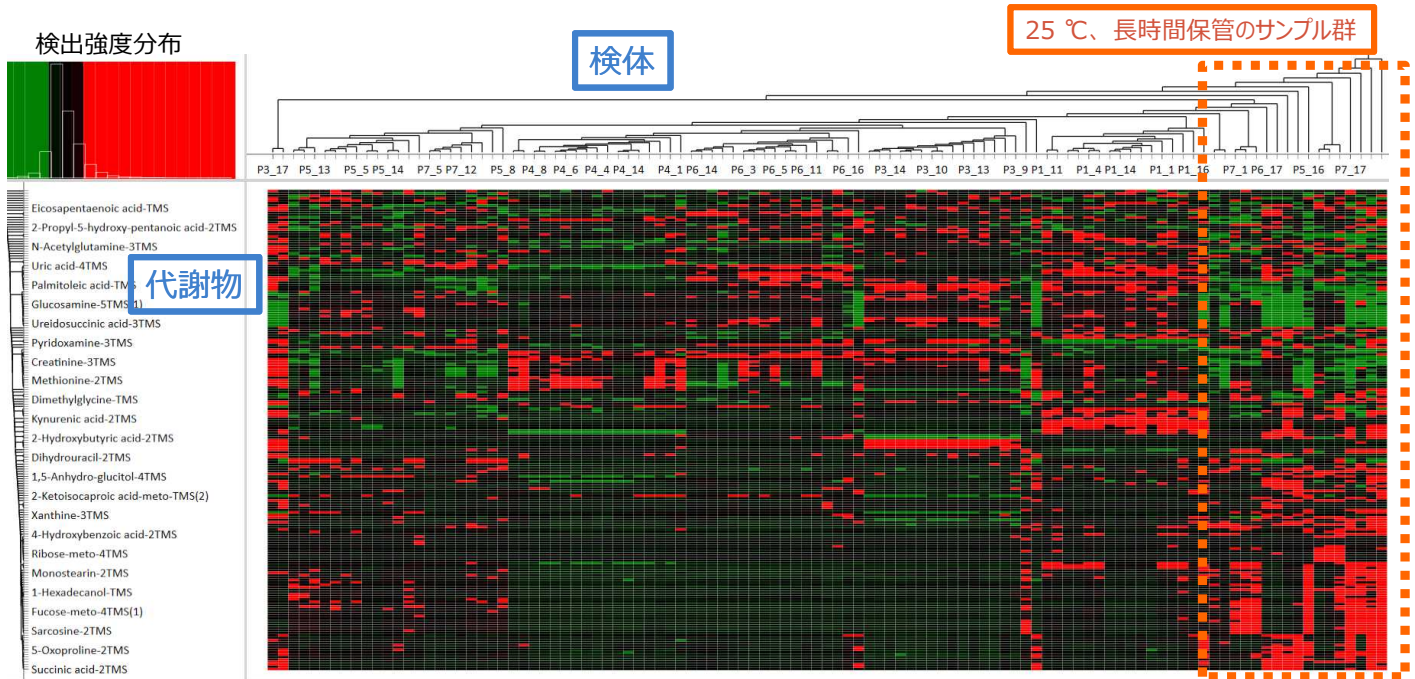
### 主成分分析 (PCA : Principal Component Analysis)

#17

## 血漿のGC-MS/MS測定結果の主成分分析

- GC-MS/MS測定から、血漿から201種の代謝物が検出された。
- また、主成分分析 (PCA) を行ったところ、血液を 25°C にて24~48時間保管した検体がScore plot上で分離がみられ、分離に大きく寄与する代謝物 (25°C 保管で不安定な代謝物) の同定に成功した。また4°C保管された検体に含まれる代謝物は、24時間以内であれば比較的安定であった。

#18



## 階層クラスター解析 (HCA、Hierarchical Cluster Analysis)

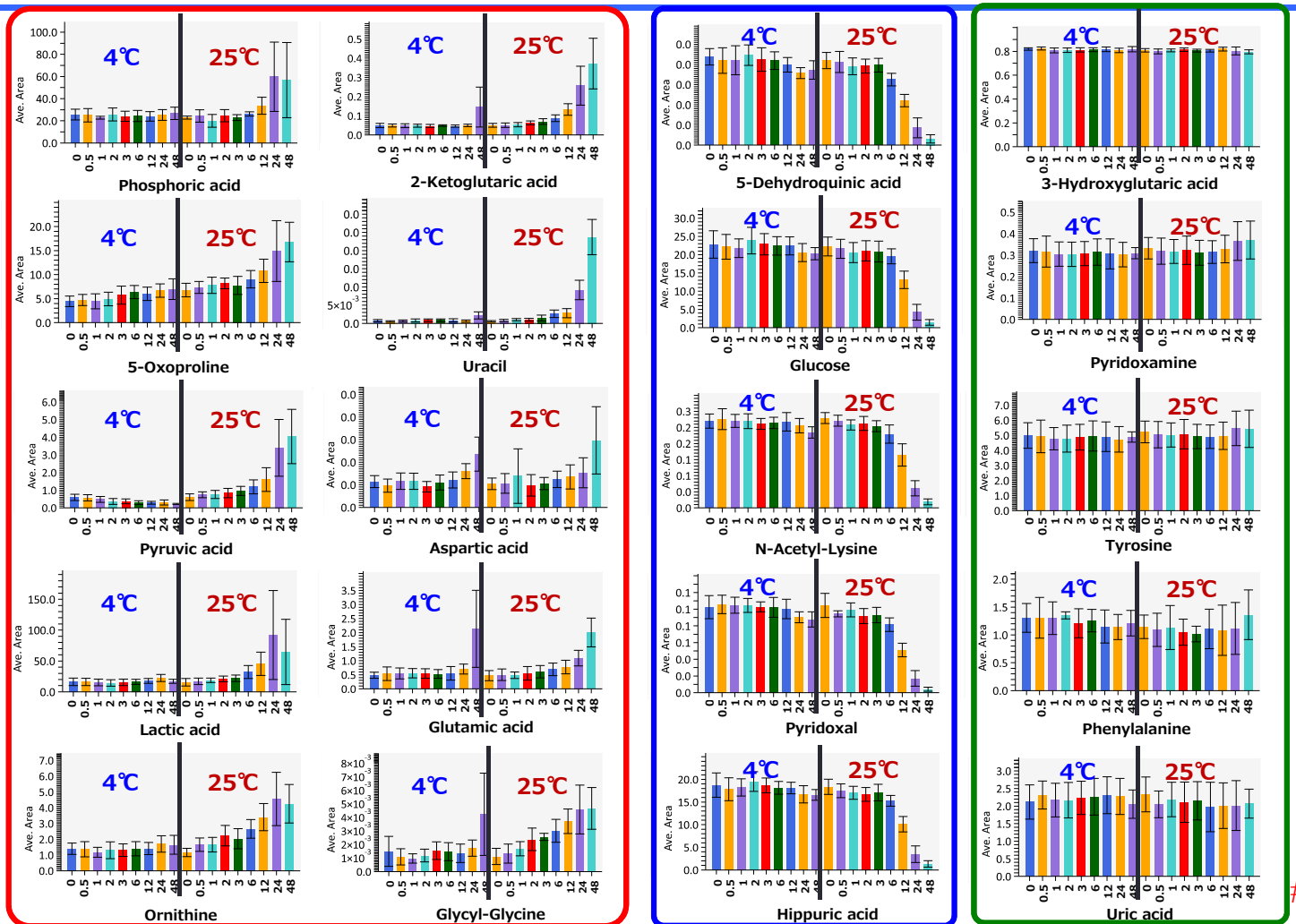
室温に長時間保管された検体が明確に区別された

#19

## 血漿のGC-MS/MS測定結果の階層クラスター解析

- 血漿の測定から得られた化合物（縦軸）の強度に基づき、サンプル（横軸）間の階層クラスター解析を実施したところ、室温（25℃）に長時間保管された検体において頻度分布が類似する成分のクラスターが観察された。
- 具体的には、5-Oxoproline等、PCAで得られた結果と類似の化合物であった。以上により、保管条件に応じて変化を示す化合物群を明らかにした。

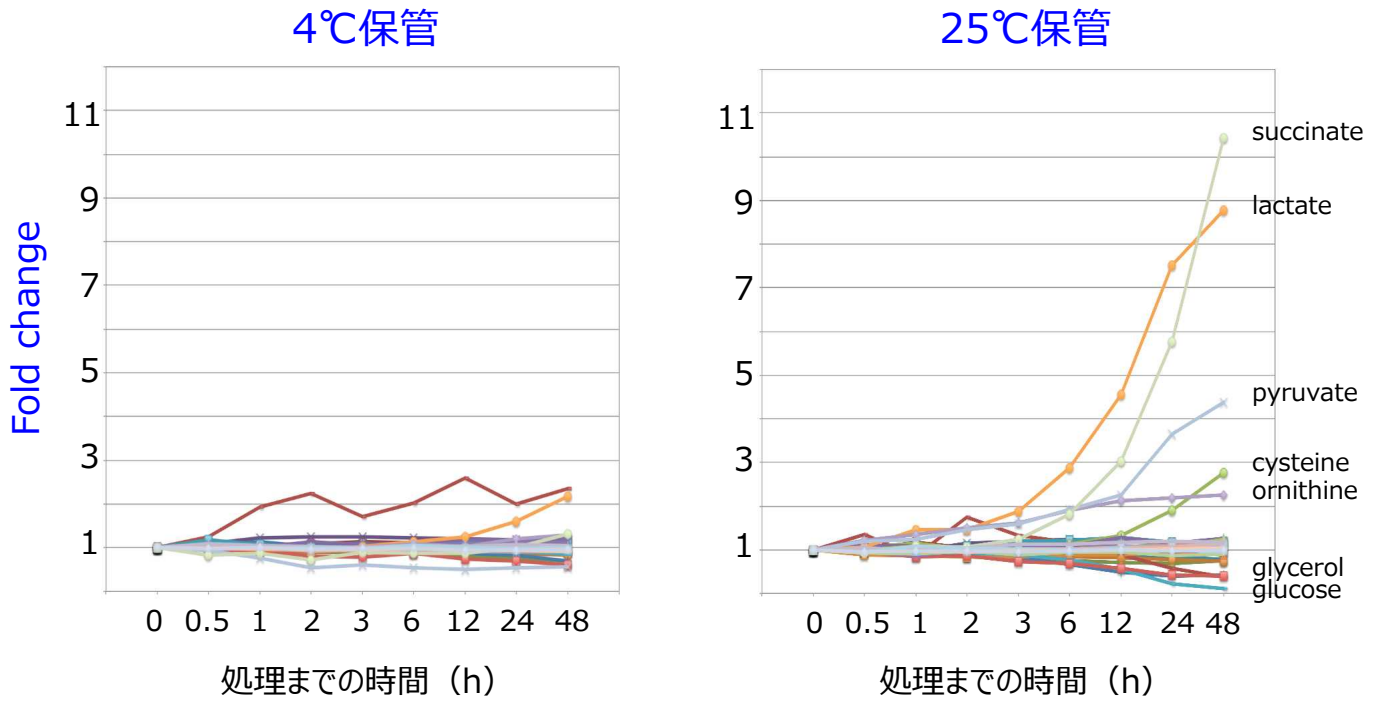
#20



#21

## 血漿中の各化合物のヒストグラム

- 上図に、GC-MS/MS 測定の結果から、保管温度と時間（横軸）の違いで特に検出強度値（縦軸）の変化が観察された化合物を示した。（赤：増加する化合物群、青：減少する化合物群、緑：変化の少ない化合物）。
- 具体的には、Phosphoric acid や 2-Ketoglutaric acid 等は、室温（25°C）に長時間保管された場合、平均値（n=6）が2倍程度上昇する。
- また、5-Dehydroquinic acid や Glucose 等は、室温（25°C）に長時間保管された場合、平均値が10倍程度減少することが示された。
- 4°Cに保管された検体に含まれる代謝物は、24時間以内であれば比較的安定であった。



各代謝物の変化量 (fold change) の平均 (合計 6 名) を表示

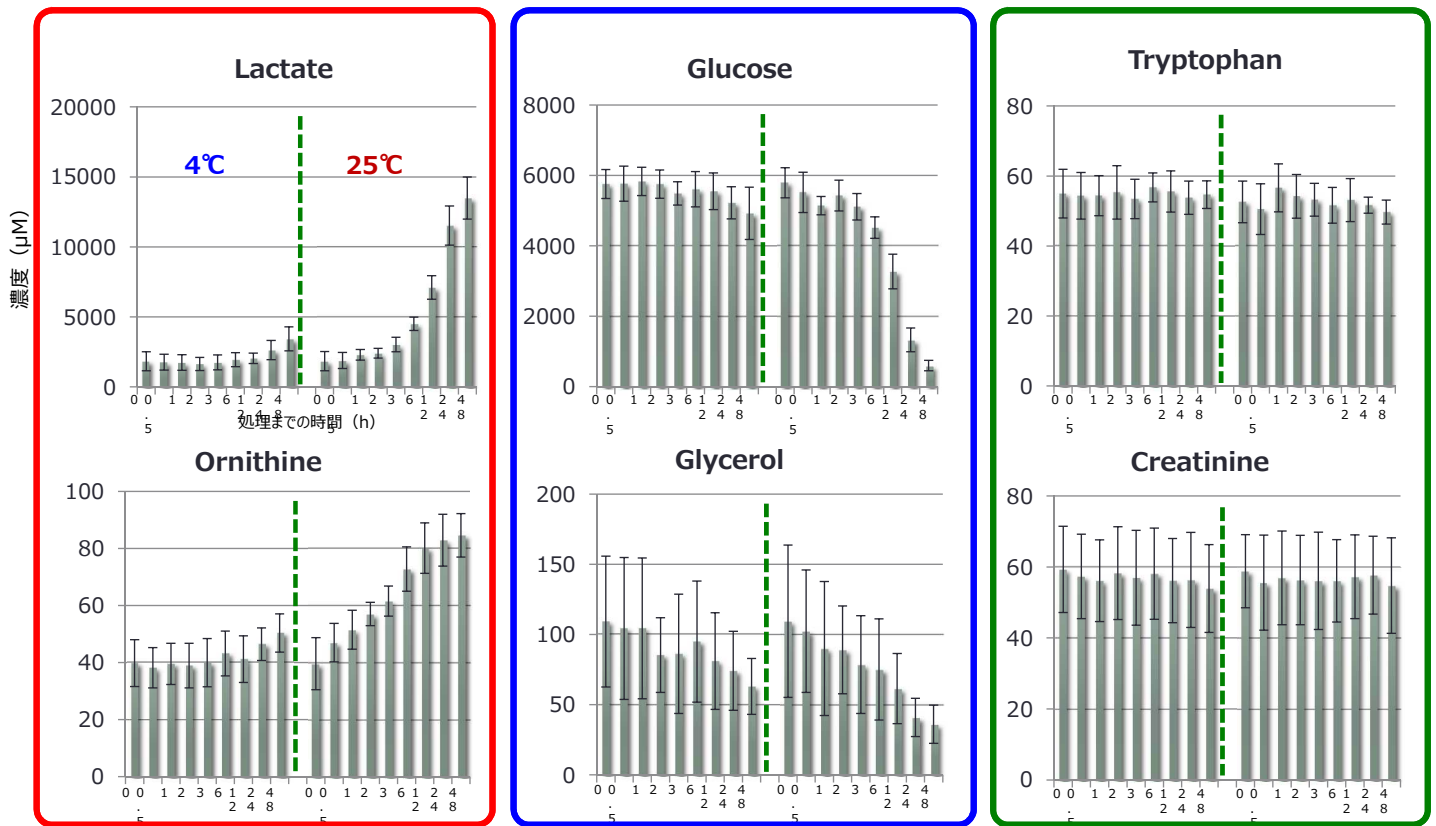
#23

## 血漿のNMR測定結果

- MS解析と同じ検体をNMR測定を行い同様の解析を行った。  
参考文献： Koshiba et al, 2016.
- MS解析の結果と同様、室温に放置した検体は、時間の経過に伴い一部の代謝物が大きく変動した。
- 4 °Cに保管した検体は 12 時間までは比較的安定であった。

#24



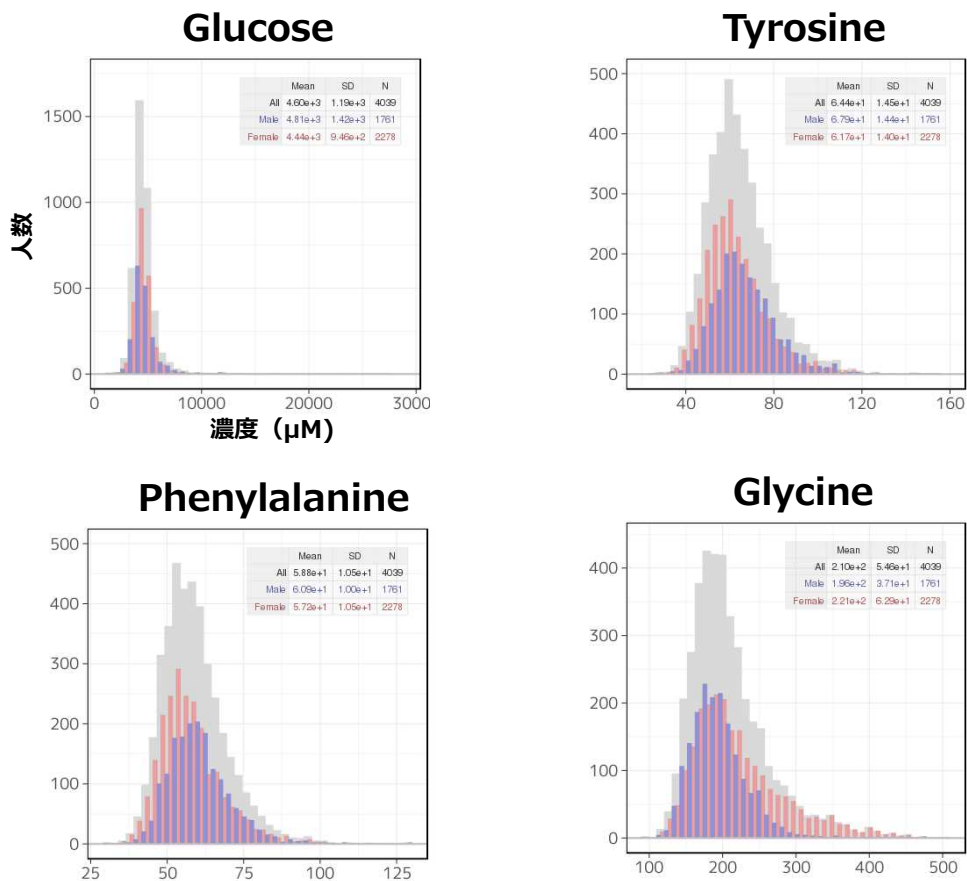


#25

## 血漿のNMR測定結果

- 上図に、NMR 測定の結果から、保管温度と時間の違いで特に大きな変化のあった化合物あるいは変化の少ない化合物を示した  
(赤：増加する化合物群、青：減少する化合物群、緑：変化の少ない化合物)。
- 具体的には、室温（25℃）に長時間保管された場合、LactateやOrnithine等の代謝物の量が平均値で2~6倍程度上昇する。
- 一方、同じ条件ではGlucoseやGlycerol等の代謝物の量が平均値でそれぞれ約2~10倍程度上昇する。
- それに対し、Tryptophan等のアミノ酸やCreatinine等の代謝物は、室温（25℃）に長時間保管された場合でも比較的安定であった。
- また低温（4℃）に保管された場合は、12 時間までは比較的安定であった。

#26



#27

## コホート検体4,000人分の血漿NMRメタボローム解析

- 上図に、コホートに登録した4,000人分の血漿のNMRメタボローム解析による代謝物の定量値の分布を示す。
- 統計値は近日中に高精度版「日本人多層オミックス参照パネル」(<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/>)として公開予定である。
- 上図に、代表的な化合物の分布を示した。

#28

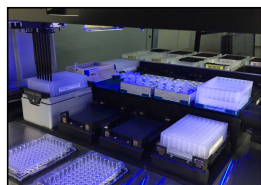
## 測定対象検体（血清 108 検体）

健康人 6 名（男女 各 3 名）  
 タイムコース 4℃保管：0、0.5、1、2、3、6、12、24、48 時間  
 25℃保管：0、0.5、1、2、3、6、12、24、48 時間

\* 上記時間保管後に血清を得た

## 実験プロトコル (216 検体)

### 1. 前処理（抽出）



Microlab® STARlet robot system (Hamilton)

### 2. 前処理（誘導体化）



AOC 6000 robot system (Shimadzu)

Sample (50 uL)

2-isopropylmalate (0.5 mg/mL), 10 uL  
 H<sub>2</sub>O:MeOH:CHCl<sub>3</sub>=1:2.5:1, 250 uL

Incubation: 30 min/37 °C/1,200 rpm  
 Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000×g

Supernatant (200 uL)

H<sub>2</sub>O, 200 uL

Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000×g

Supernatant (250 uL)

Evaporation by Speed Vac: 25 min  
 Freeze-drying: 18 hr

Sample (powder)

Derivatization

Methoxyamin hydrochloride in Pyridine (20 mg/mL), 80 uL

Sonication: 20 min

Incubation: 90 min/30 °C/1,200 rpm

MSTFA, 40 uL

Incubation: 30 min/37 °C/1,200 rpm  
 Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000×g

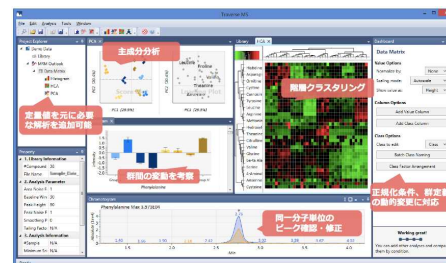
Supernatant (40 uL)

## 3. GC-MS/MS 測定



TQ8040 (Shimadzu)

## 4. データ処理



Traverse MS™ (Reifycs)

ライブラリ作成、化合物ピークの同定

475 イオン > ~250 イオン > ~200 代謝物

プロジェクト作成

血清毎に解析

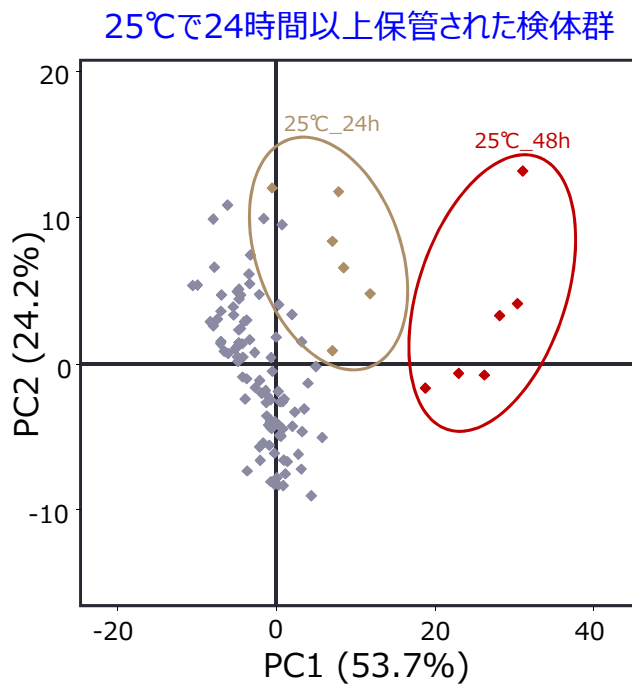
## 5. 多変量解析

階層クラスター解析  
 主成分分析  
 ヒストグラム作成

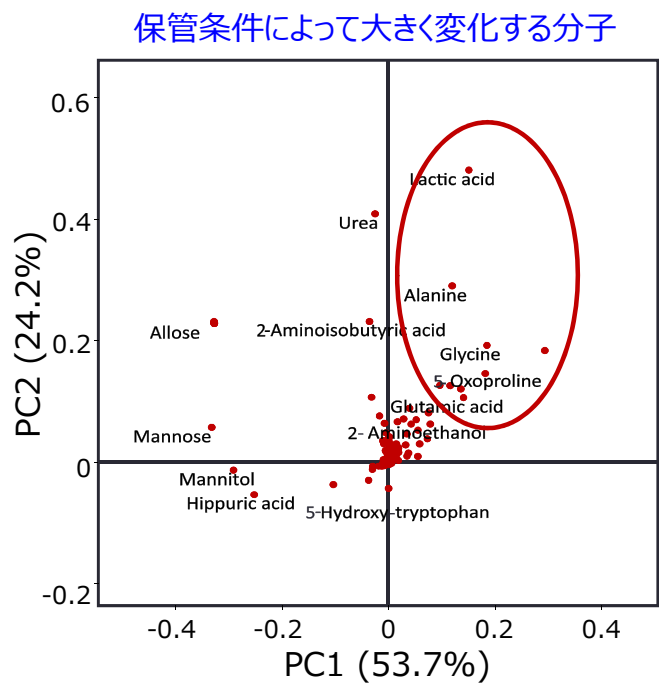
## 血清のGC-MS/MSメタボローム解析

- 採血後の保管条件（保管時間や温度）に依存して変化する代謝物を同定するために、以下の検体の種類・条件で安定性試験を行った。
  - 解析対象者：ToMMoでリクルートした健康人ボランティア合計 6 名
  - 解析検体：血清
  - 検討対象：採血から遠心分離・冷凍保管までの時間と温度
    - 保管時間：0、0.5、1、2、3、6、12、24、48時間（9条件）
    - 保管温度：4℃、25℃（2条件）
  - GC-MS/MS測定の方法
    - 前処理 1（抽出）：Microlab® STARlet robot system (Hamilton)
    - 前処理 2（誘導体化）：AOC 6000 robot system (Shimadzu)
    - MS測定：TQ8040 (Shimadzu)、Smart Metabolites Database (Shimadzu)
      - 参考文献：Nishiumi et al, 2017.
  - データ処理の方法
    - ライブラリ、プロジェクト作成：Traverse MS™ (Reifycs)
    - 統計解析、多変量解析：Traverse MS™ (Reifycs)、SIMCA13 (Infocom)
- 以上の解析の流れの全体像は上記の図のとおりである。

## PCA (Score plot)



## PCA (Loading plot)



## 主成分分析 (PCA : Principal Component Analysis)

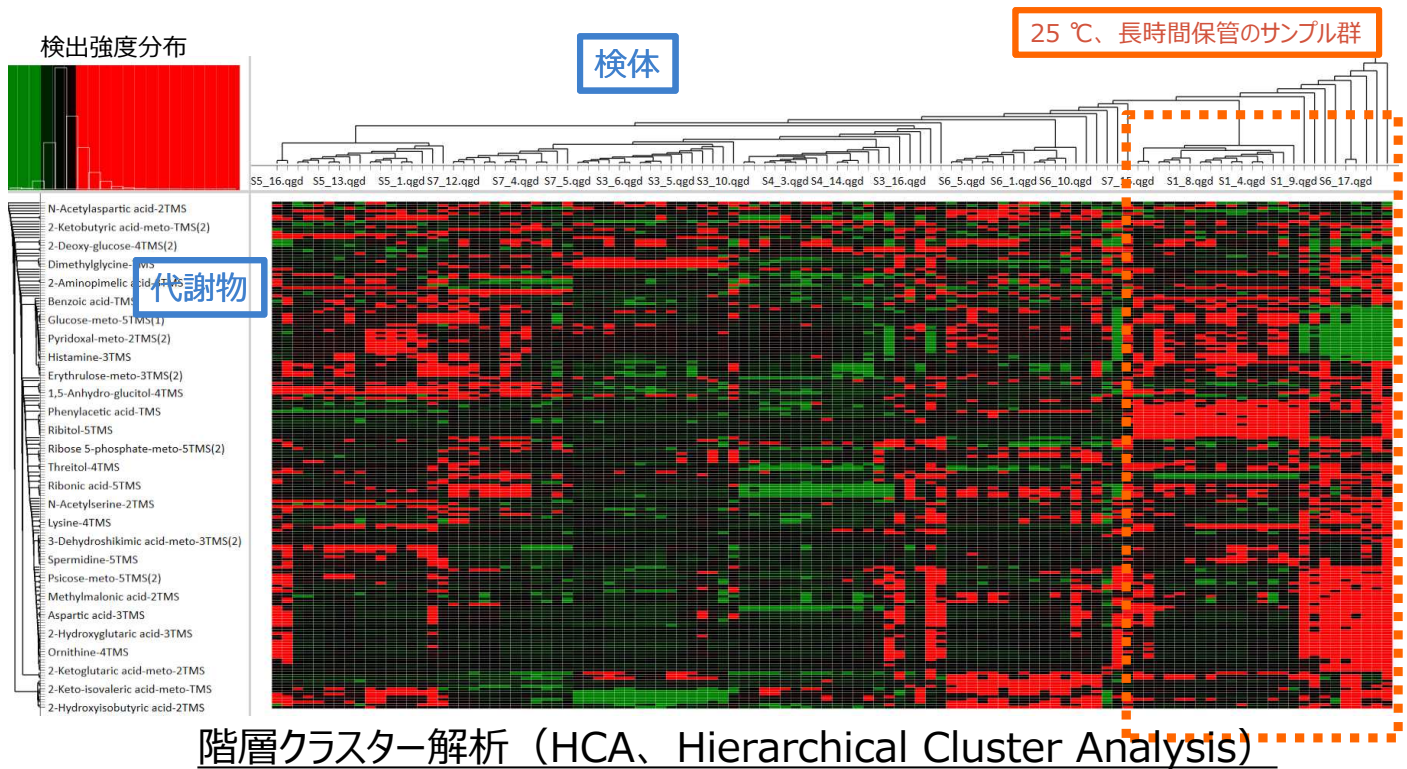
#31

## 血清のGC-MS/MS測定結果の主成分分析

- GC-MS/MS測定から、血清から193種の代謝物が検出された。
- また、主成分分析 (PCA) を行ったところ、血液を 25℃ にて24~48時間保管した検体がScore plot上で分離がみられ、分離に大きく寄与する代謝物 (25℃ 保管で不安定な代謝物) の同定に成功した。

#32



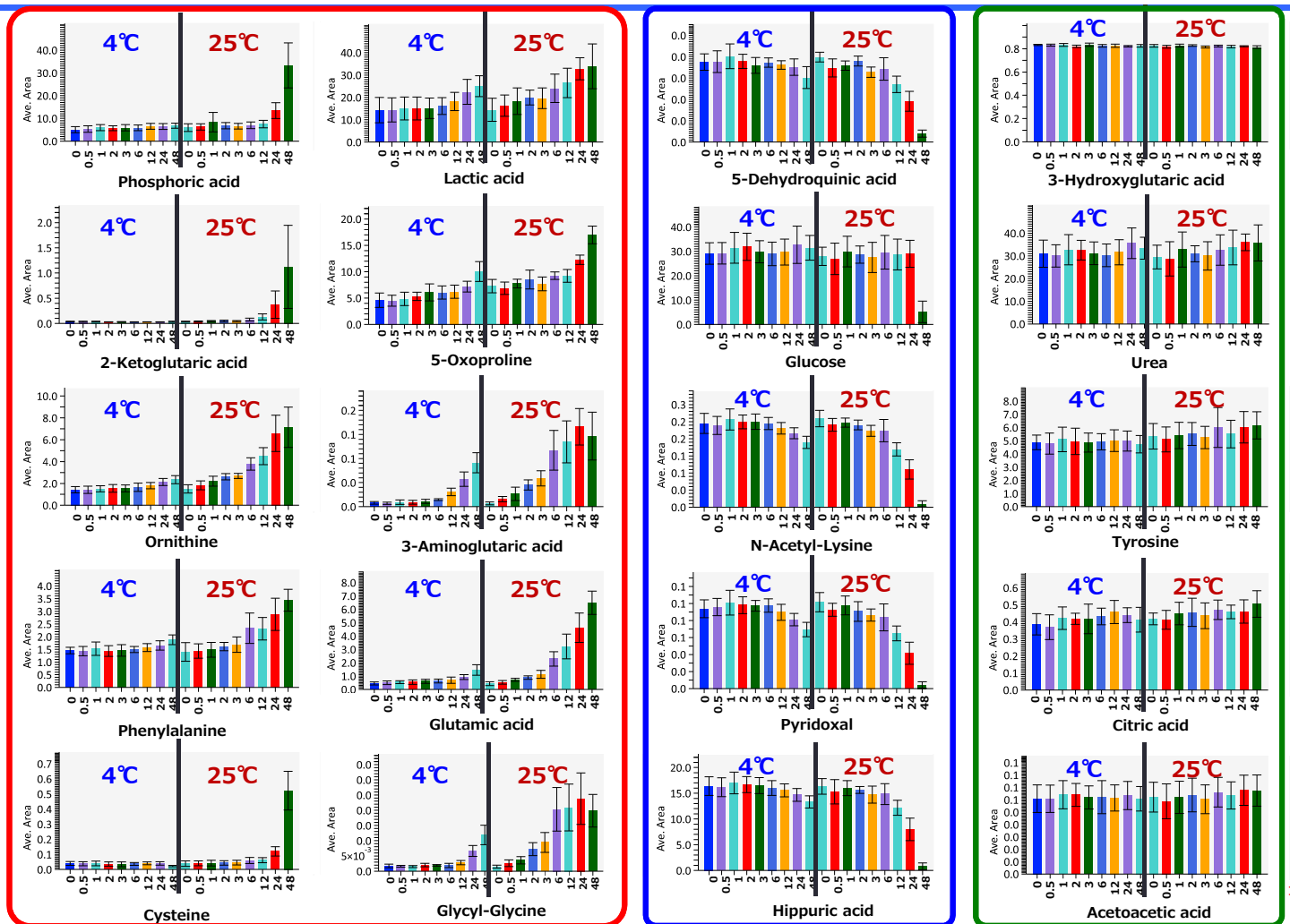


室温に長時間保管された検体が明確に区別された

#33

## 血清のGC-MS/MS測定結果の階層クラスター解析

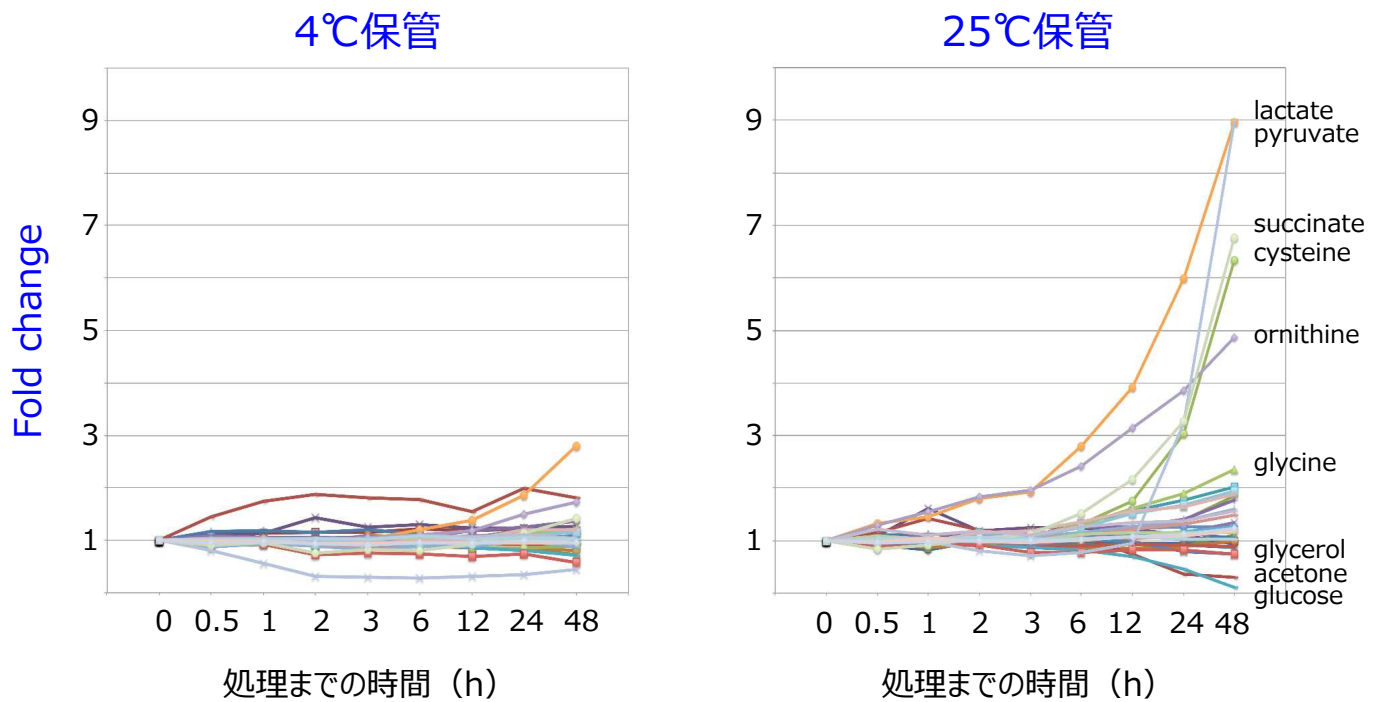
- 血清の測定から得られた化合物（縦軸）の強度に基づき、サンプル（横軸）間の階層クラスター解析を実施したところ、室温（25℃）に長時間保管された検体において頻度分布が類似する成分のクラスターが観察された。
- 具体的には、2-Ketoglutaric acidやOrnithine等、PCAで得られた結果と類似の化合物であった。
- 以上により、保管条件に応じて変化を示す化合物群を明らかにした。



#35

## 血清中の各化合物のヒストグラム

- 上図に、GC-MS/MS 測定の結果から、保管温度と時間（横軸）の違いで特に検出強度値（縦軸）の変化が観察された化合物を示した。（赤：増加する化合物群、青：減少する化合物群、緑：変化の少ない化合物）。
- 具体的には、Phosphoric acid や 2-Ketoglutaric acid 等は、室温（25°C）に長時間保管された場合、平均値（n=6）が2倍程度上昇する。
- また、5-Dehydroquinic acid や Glucose 等は、室温（25°C）に長時間保管された場合、平均値が10倍程度減少することが示された。
- 4°Cに保管された検体に含まれる代謝物は、12時間以内であれば比較的安定であった。



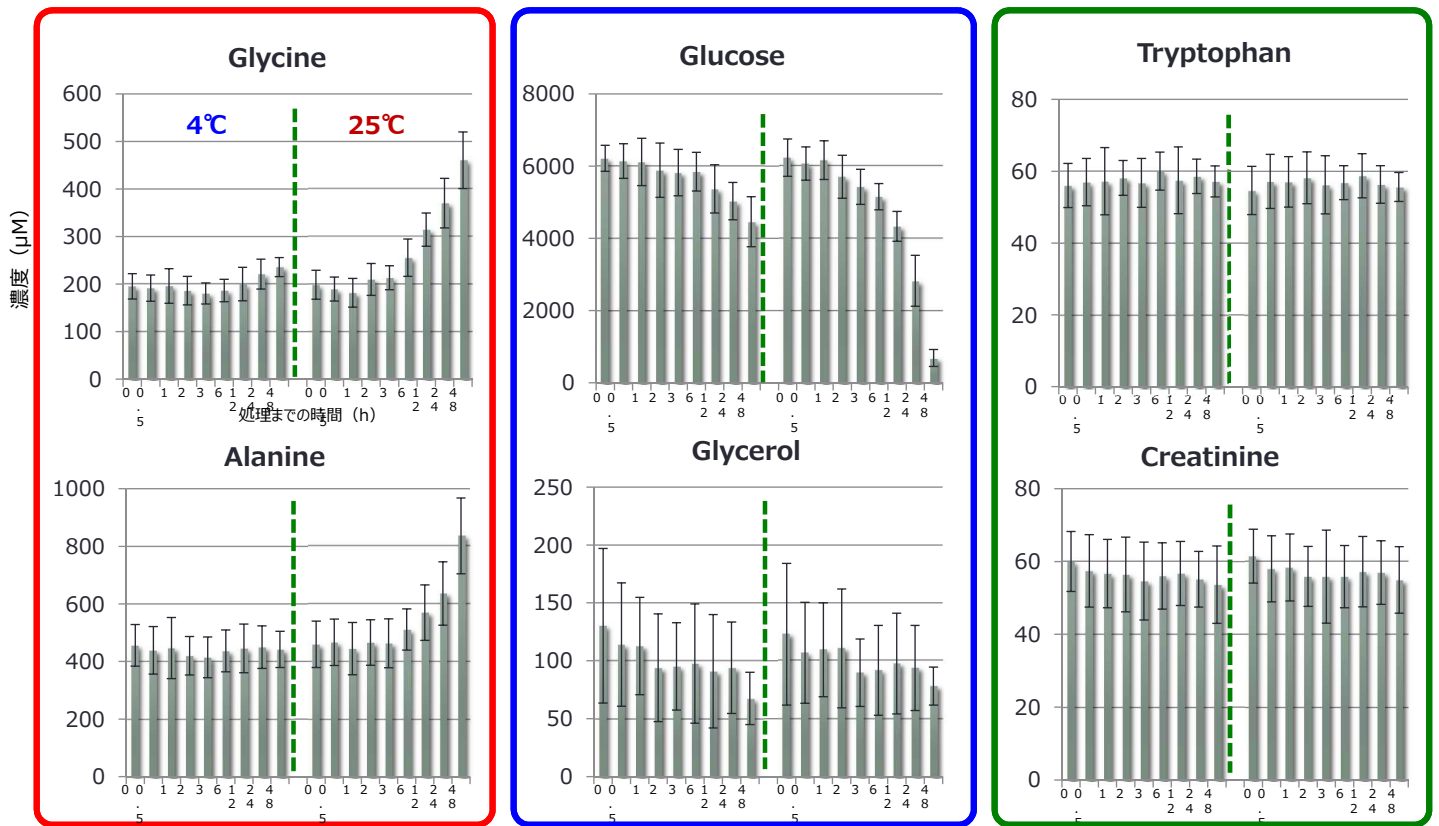
各代謝物の変化量 (fold change) の平均 (合計 6 名) を表示

#37

## 血清のNMR測定結果

- MS解析の結果と同様、室温に放置した検体は、時間の経過に伴い一部の代謝物が大きく変動した。
- 4°Cに保管した検体は 12 時間までは比較的安定であった。

#38



#39

## 血清のNMR測定結果

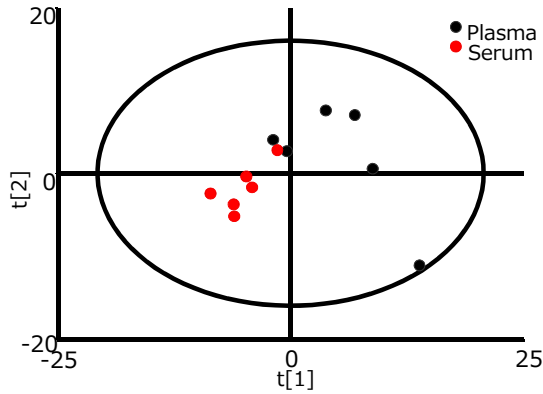
- 上図に、NMR 測定の結果から、保管温度と時間の違いで特に大きな変化のあった化合物あるいは変化の少ない化合物を示した。  
（赤：増加する化合物群、青：減少する化合物群、緑：変化の少ない化合物）。
- 血漿と比較して、代謝物の変動幅が相対的に大きい傾向にあった。

#40

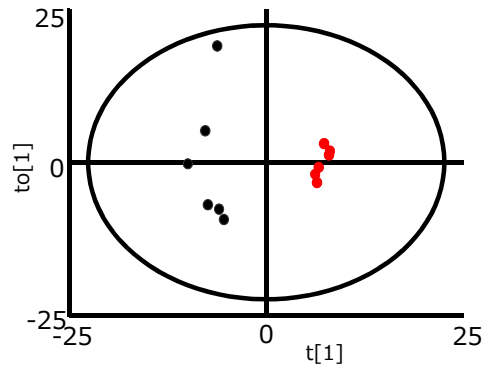


## PCA (Score plot)

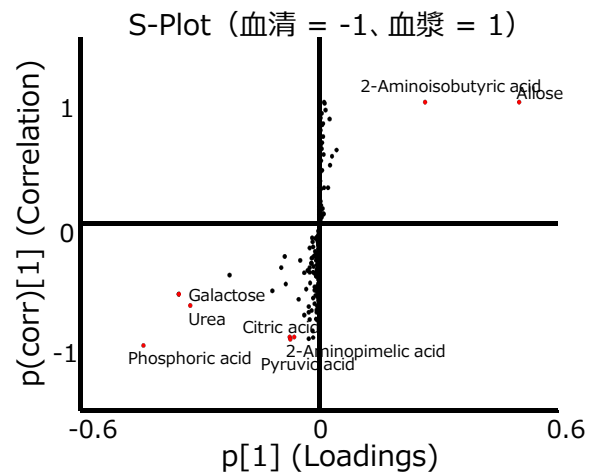
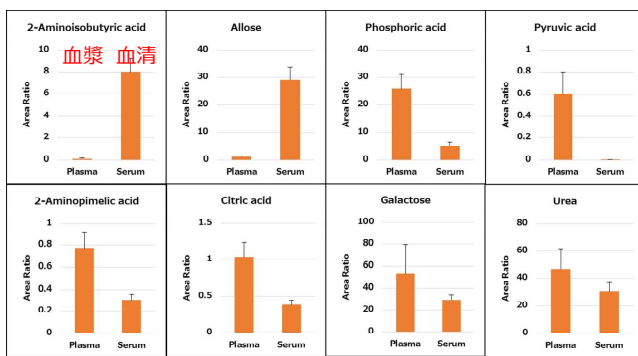
\*それぞれ4℃、0 h保管の検体 (n=6を用いた)



## OPLS-DA (Score plot)



## 血漿と血清で違いのある代謝物群



#41

## 血漿・血清の代謝物の違い

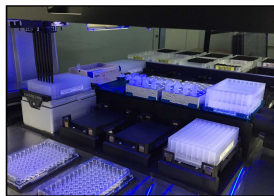
- 血清と血漿における成分の違いを明らかにするため、それぞれ4℃、0 h保管の検体による PCA 及び判別分析 (OPLS-DA) を用い、S-plotから特に二種の違いに寄与する分子を抽出したところ、2-Aminobutyric acid、Alloseが血清において高値であり、Phosphoric acid、Pyruvic acid、2-Aminopimelic acid、Citric acid、Galactose、Ureaが血漿において高値であると示された。

測定対象検体（CSF 21 条件（n=3）、合計 63 検体）

処理前条件：4℃（2h、4h、24h）、25℃、（2h、4h、24h）  
凍結融解：0回、1回、2回、10回  
遠心条件：1 KG、2 KG、4 KG  
保管チューブ：JKT、PP、PS  
赤血球：0、1e5、5e5、5e6

実験プロトコル（63 検体）

## 1. 前処理（抽出）



Microlab® STARlet robot system (Hamilton)

## 2. 前処理（誘導体化）



AOC 6000 robot system (Shimadzu)

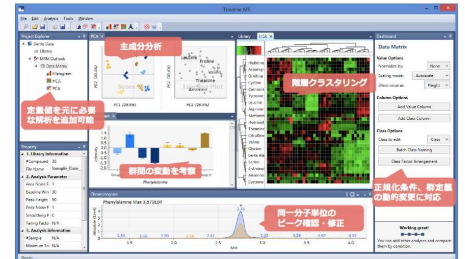
Sample (50  $\mu$ L)  
2-isopropylmalate (0.5 mg/mL)、10  $\mu$ L  
H<sub>2</sub>O:MeOH:CHCl<sub>3</sub>=1:2.5:1、250  $\mu$ L  
Incubation: 30 min/37 °C/1,200 rpm  
Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000 $\times$ g  
Supernatant (200  $\mu$ L)  
H<sub>2</sub>O、200  $\mu$ L  
Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000 $\times$ g  
Supernatant (250  $\mu$ L)  
Evaporation by Speed Vac: 25 min  
Freeze-drying: 18 hr  
Sample (powder)  
Derivatization  
Methoxyamin hydrochloride in Pyridine (20 mg/mL)、80  $\mu$ L  
Sonication: 20 min  
Incubation: 90 min/30 °C/1,200 rpm  
MSTFA、40  $\mu$ L  
Incubation: 30 min/37 °C/1,200 rpm  
Centrifugation: 3 min/4 °C/16,000 $\times$ g  
Supernatant (40  $\mu$ L)

## 3. GC-MS/MS 測定



TQ8040 (Shimadzu)

## 4. データ処理



Traverse MSTM™ (Reifycs)

ライブラリ作成、化合物ピークの同定

475 イオン > ~200 イオン > ~148 代謝物

プロジェクト作成

## 5. 多変量解析

主成分分析  
ヒストグラム作成

#43

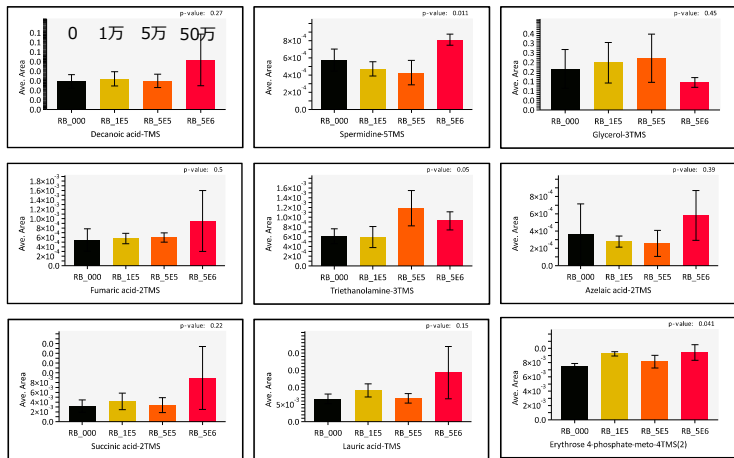
## CSFのGC-MS/MSメタボローム解析

- CSF採取後の保管条件（保管時間や温度）に依存して変化する代謝物を同定するために、以下の検体の種類・条件で安定性試験を行った。なお、CSF試料は、NCBNを構成する国立精神・神経医療研究センターで収集・調整が行われた。その詳細については第3部の3-1のCSFの項（#81）を参照のこと。
  - 解析対象者：提供試料 21条件（n=3）、合計 63 検体
  - 解析検体：CSF、50 $\mu$ L
  - 検討対象：
    - 1. 処理前条件：4℃（2、4、24時間）、25℃（2、4、24時間）
    - 2. 凍結融解：0、1、2、10回
    - 3. 遠心条件：1,000G、2,000G、4,000G
    - 4. 赤血球：0、1e5、5e5、5e6
    - 5. 保管チューブ：JKT、PP、PS
    - ->
  - GC-MS/MS測定の方法
    - 血漿・血清と同様である（#15、#29を参照）。
- 以上の解析の流れの全体像は上記の図のとおりである。

#44

## CSF 中代謝物の赤血球数による影響

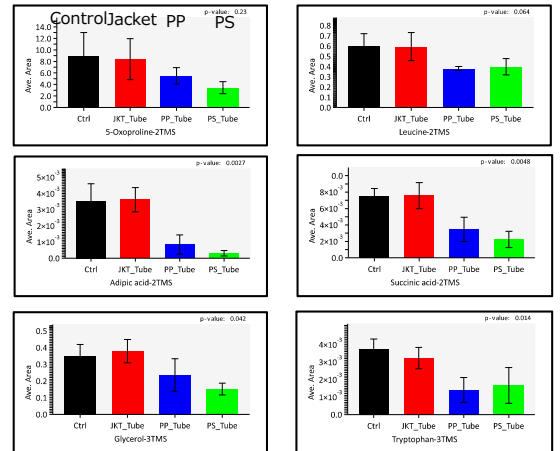
代謝物毎のヒストグラム



\*Ave. Area (Area Ratio, Compound/internal standard)

## CSF 中代謝物の保管チューブの違いによる影響

代謝物毎のヒストグラム



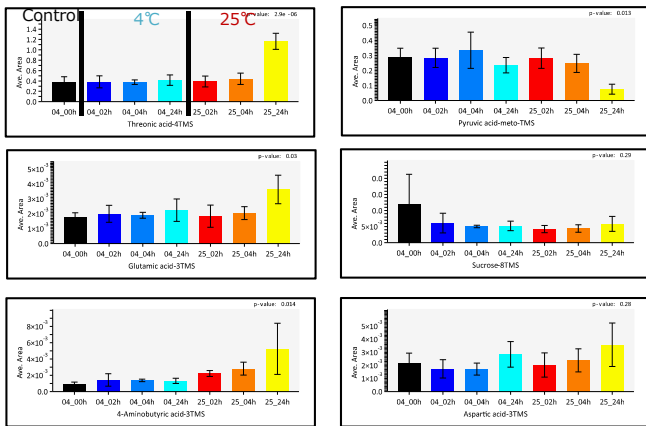
\* 測定できなかった1検体を解析から除外した。

#45

# CSFのGC-MS/MSメタボローム解析

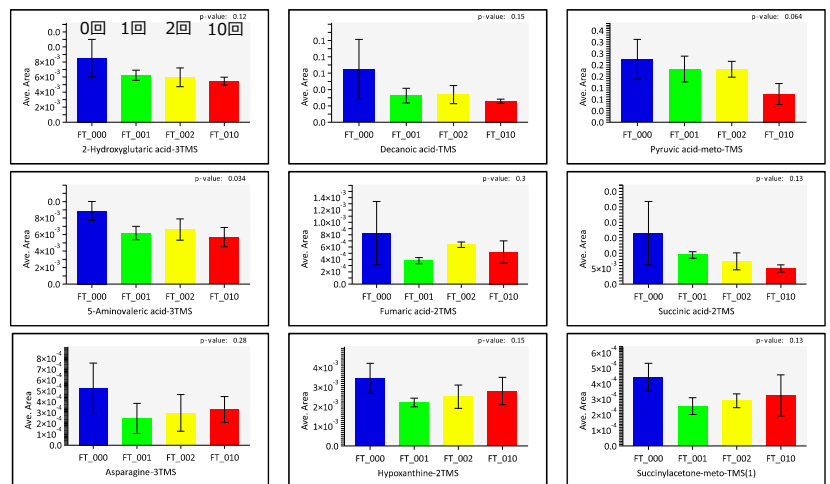
## CSF 中代謝物の保管温度条件による影響

代謝物毎のヒストグラム



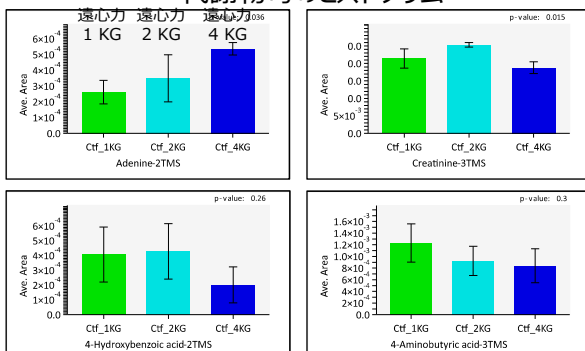
## CSF 中代謝物の凍結融解による影響

代謝物毎のヒストグラム



## CSF 中代謝物の遠心条件による影響

代謝物毎のヒストグラム



\*Ave. Area (Area Ratio, Compound/ internal standard)

#46

- #45の左図に、GC-MS/MS 測定の結果から、CSFに混入する赤血球数の違いによる代謝物の変化をヒストグラムで示した。また、右図には、保管チューブによる違いによる代謝物の変化をヒストグラムで示した。
- 同様に#46には、保管温度条件・凍結融解・遠心条件による代表的な代謝物の変化をヒストグラムで示した。
  - ✓ 赤血球数：Spermidine、Glycerol等は、赤血球数によって代謝物の変化が見られたが、有意に変化がみられる化合物は少なかった。
  - ✓ チューブ条件：Jacket tubeと比較し、PP（ポリプロピレン）あるいはPS（ポリスチレン）チューブで保管されたCSFに含まれる代謝物は、5-Oxoproline、Adipic acid、Glycerolに加え、Leucine、Tryptophan等のアミノ酸類、Succinic acid等の化合物が定値であることが判った。
  - ✓ 温度条件：CSFを室温（25℃）に24時間保管した場合、Threonic acid、Glutamic acid、4-Aminobutyric acid等の増加、Pyruvic acidの減少が観察された。また、Sucroseは、保管温度・時間に関わらず、コントロールと比較して減少傾向であった。
  - ✓ 凍結融解：2-Hydroxyglutaric acid、5-Aminovaleric acid、Decanoic acid、Fumaric acid等、多くの代謝物は、凍結融解1回で減少することが示された。
  - ✓ 遠心条件：多くの代謝物は遠心条件における変化は見られなかったが、Adenineは4,000Gにおいて高値になることが示された。

#47

## 参考文献

1. Bernini P et al. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *Biomol NMR*, 2011, 49, 231-243.
2. Kamlage B et al. Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling. *Clin Chem*, 2014, 60, 399-412.
3. Koshiba S et al. The structural origin of metabolic quantitative diversity. *Sci Rep*, 2016, 6:31463.
4. Nishiumi S et al. Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *Oncotarget*, 2017, 8(10), 17115-17126.
5. Saigusa D. et al. Establishment of Protocols for Global Metabolomics by LC-MS for Biomarker Discovery. *PLoS One*, 2016, 11(8), e0160555.
6. Yin P et al. Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clin Chem*, 2013, 59, 833-845.
7. Yin P et al. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 4879-4892.

#48

# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

---

## ● 第2部・・・バイオバンク・ジャパン

「血清・血漿試料の品質評価マーカーの開発と測定法の確立」

### 【A】総論

### 【B】ベストプラクティス（案）

### 【C】ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ

#49

## 【A】総論

---

- バイオバンクジャパン（BBJ）は、2003年以来、多因子疾患を中心に、51疾患、26万人、42万症例を収集・解析し、世界最大級の疾患バイオバンクを構築してきた。登録症例は、5,837項目のクリーニング済み情報を有し、平均追跡率95%、平均追跡期間約10年に及ぶ生存情報を含む。試料のDNA・血清・組織は、全ゲノムシーケンシング・メタボローム・プロテオーム等のオミックス解析に応用可能な実績を有し、試料配布実績はDNA 約16,000 検体、血清約10,000 検体で、試料全体の13%にあたる。
- BBJの品質管理に向けた取組のうち、本研究事業では血液・血漿試料の品質評価マーカーの開発と測定法の確立、FFPE由来DNAを用いたゲノム解析と基盤整備に焦点を当てた。バイオバンク試料の品質評価を実施するためには、試料採取直後・保存前と、試料保存後の2者の検体比較が必要であるが、バイオバンク試料では試料採取の採血直後の検体が存在しないため、試料保存後の検体のみで品質評価を実施する必要がある。また、品質評価を実施する場合には、血中指標の差が採血から遠心分離までの時間、保存条件、凍結融解により生じたのか、あるいは個体間変動・個体内変動により生じたのか、等の解釈が問題となる。
- 血液・血漿試料の品質評価マーカーの開発と測定法の確立試料の品質評価マーカーを決定し、評価法を確立するために、日本プロテオーム学会と共同でプロテオーム解析を実施した。

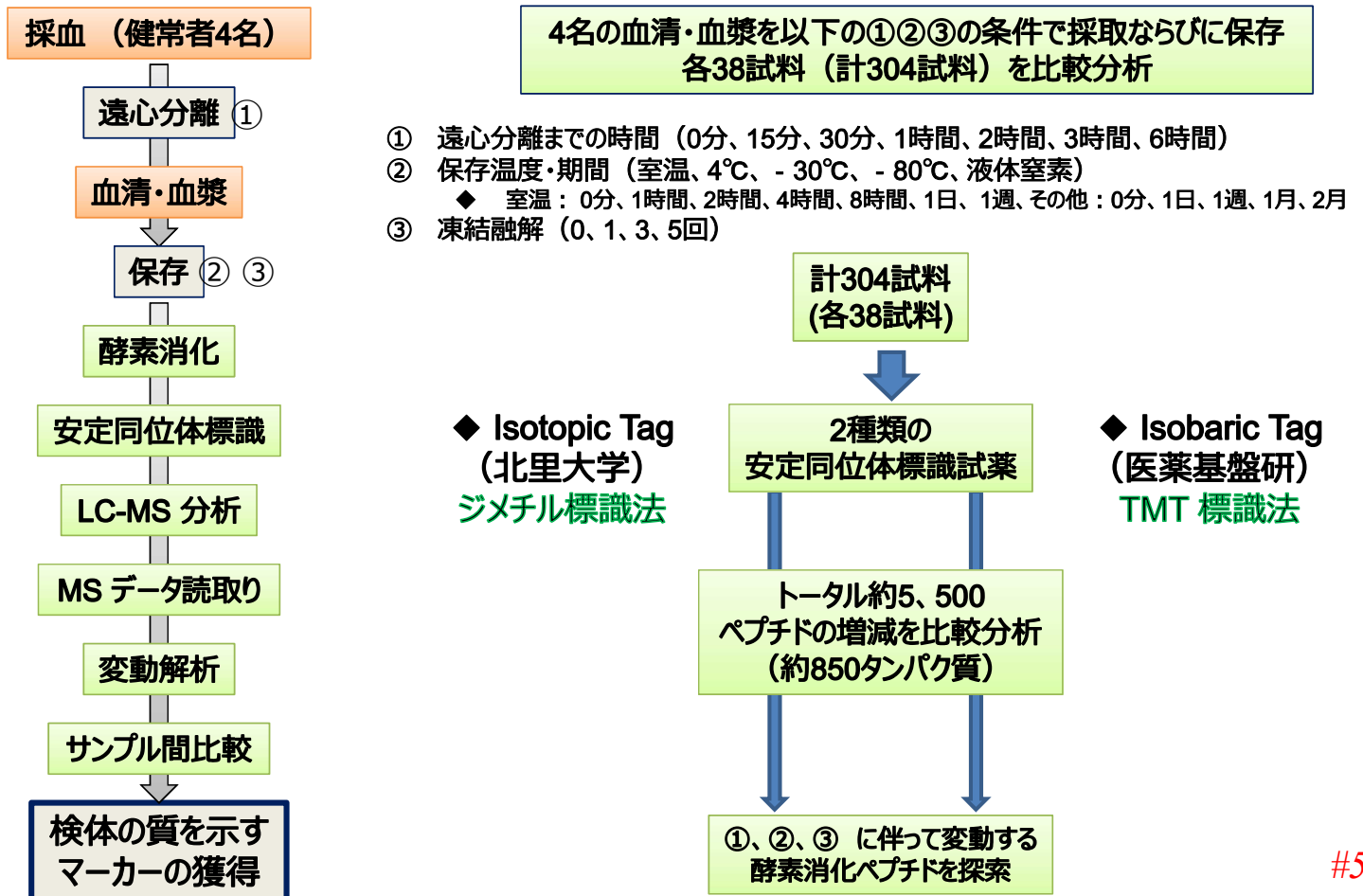
#50



1. これまでバイオバンク検体中のタンパク質の品質評価の指標やその測定法については国際標準というものがなく、いくつかの文献が散見されるのみであり、品質評価に十分であるとは言い難い (Rai et al, 2005; Elliott et al, 2008; Hubel et al, 2014)。従って、バイオバンク検体のタンパク質品質評価のための新たな指標が必要である。そこで我々は、血清・血漿検体のタンパク質の品質評価マーカーの開発と測定法の確立を最先端のプロテオミクス技術を用いて行うこととした。
  2. 血清・血漿保存検体の品質に影響を及ぼす要因として、採血から遠心分離までの時間、保存条件、凍結融解などが考えられるが、それらの影響を評価できるタンパク質・ペプチドマーカーを同定し、定量プロテオミクスを用いて、高精度かつ迅速に評価できる測定法の確立を目指した。
  3. 血液中のタンパク質の量は個人差があるため、タンパク質の量的変化を指標にした場合、それが品質劣化によるものかそれとも個人差によるものかの区別がつかない。そこで我々は、血清・血漿をトリプシン消化してできるペプチドの量的変化に着目した。なぜならば、タンパク質をトリプシン消化して生成されるペプチドの中に、遠心分離までの時間や保存条件の影響を受けて量的・質的变化を起こす不安定なものと、まったく影響を受けない安定なものが存在するからである。従って、その安定なペプチドと不安定なペプチドの比を取ることによって、検体の品質評価が可能である。この比は個人差に依存しない。#51
- 
4. まず、健常人4名の血清と血漿を遠心分離までの時間や保存温度・時間を変化させて、影響を受ける不安定ペプチドの同定を試みた。遠心分離までの時間は15分から6時間まで、保存温度・時間は室温、4°C、- 30°C、- 80°C、液体窒素で数時間から2か月までの保存の影響を検討した。
  5. その結果、血清・血漿の網羅的プロテオーム解析で約5千種類のペプチドが同定され、そのうち遠心分離までの時間や保存条件に影響される不安定なペプチドが数百種類同定された。それらのペプチドをもつタンパク質には安定なペプチド群が存在した。
  6. 次に、それらの品質評価候補ペプチドについて、SRM/MRM法を用いて検証した。その結果、室温での遠心分離までの時間の品質評価マーカーペプチドは、血清18種類、血漿36種類、計54種類に絞られた。また、保存条件の品質評価マーカーペプチドは、血清15種類、血漿41種類、計56種類に絞られた。それらが最終的な品質評価マーカーペプチドである。
  7. SRM/MRM法を用いてそのペプチド群を1検体30分で測定する方法を確立した。

# 【C】ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ

## 実証解析の方法：試料の準備



#53

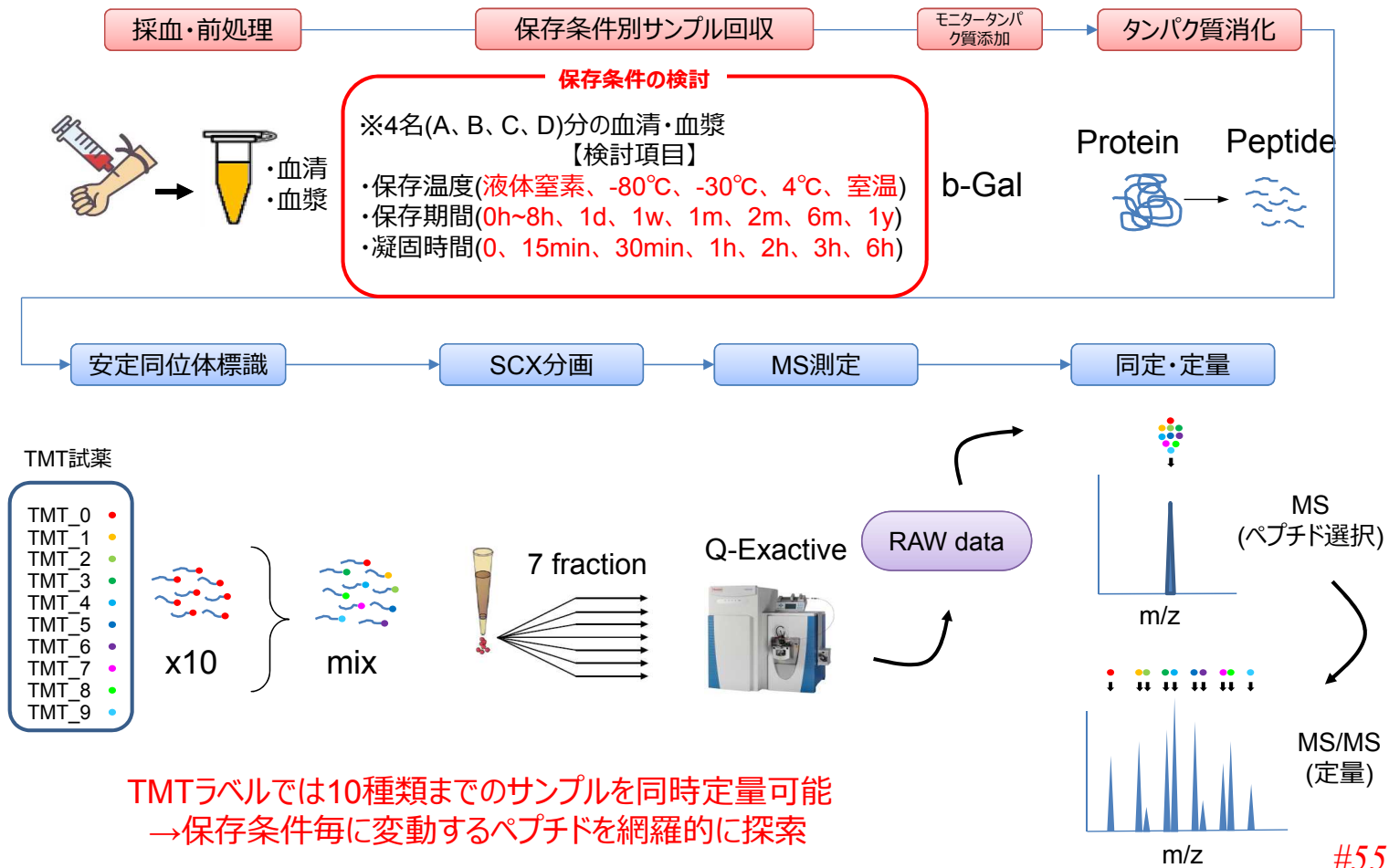
## 実証解析のための試料の準備

- 血清ならびに血漿について、①採血から遠心分離までの時間、②保管条件（保管時間や温度）、③凍結融解の状態を判断する品質評価法を確立するために、以下の検体の種類・条件で各酵素消化ペプチドの比較解析を行った。
  - 解析対象者：北里大学でリクルートした健常人ボランティア合計4名
  - 解析検体：血清・血漿に対して各38試料（合計304試料）
    - ✓ ②、③の試料の採血から遠心分離までの時間：1時間（血清）、0分（血漿）
  - 試料調製：未処理血清ならびに血漿を還元アルキル化後にトリプシン消化
  - 2種類の安定同位体標識法を用いた比較解析
    - ✓ 北里大学：Isotopic Tag法（ジメチル標識法）を用いたMSスペクトルによる比較分析
    - ✓ 医薬基盤・健康・栄養研究所：Isobaric Tag法（TMT標識法）を用いてMS/MSスペクトルによる比較分析（粗分画試料を対象にnanoLCを用いたLC-MS/MSによる高感度比較分析）
  - 同一タンパク質内で各条件変化に対して変動する酵素消化ペプチド(X)と、変動しない酵素消化ペプチド(Y)を同定し、XとYの比(X/Y)で各条件を推測するための品質評価マーカーを探索

以上の解析の流れの全体像は上記の図のとおりである。

#54

# 実証解析の方法： 血清・血漿サンプルの解析ワークフロー（TMT）

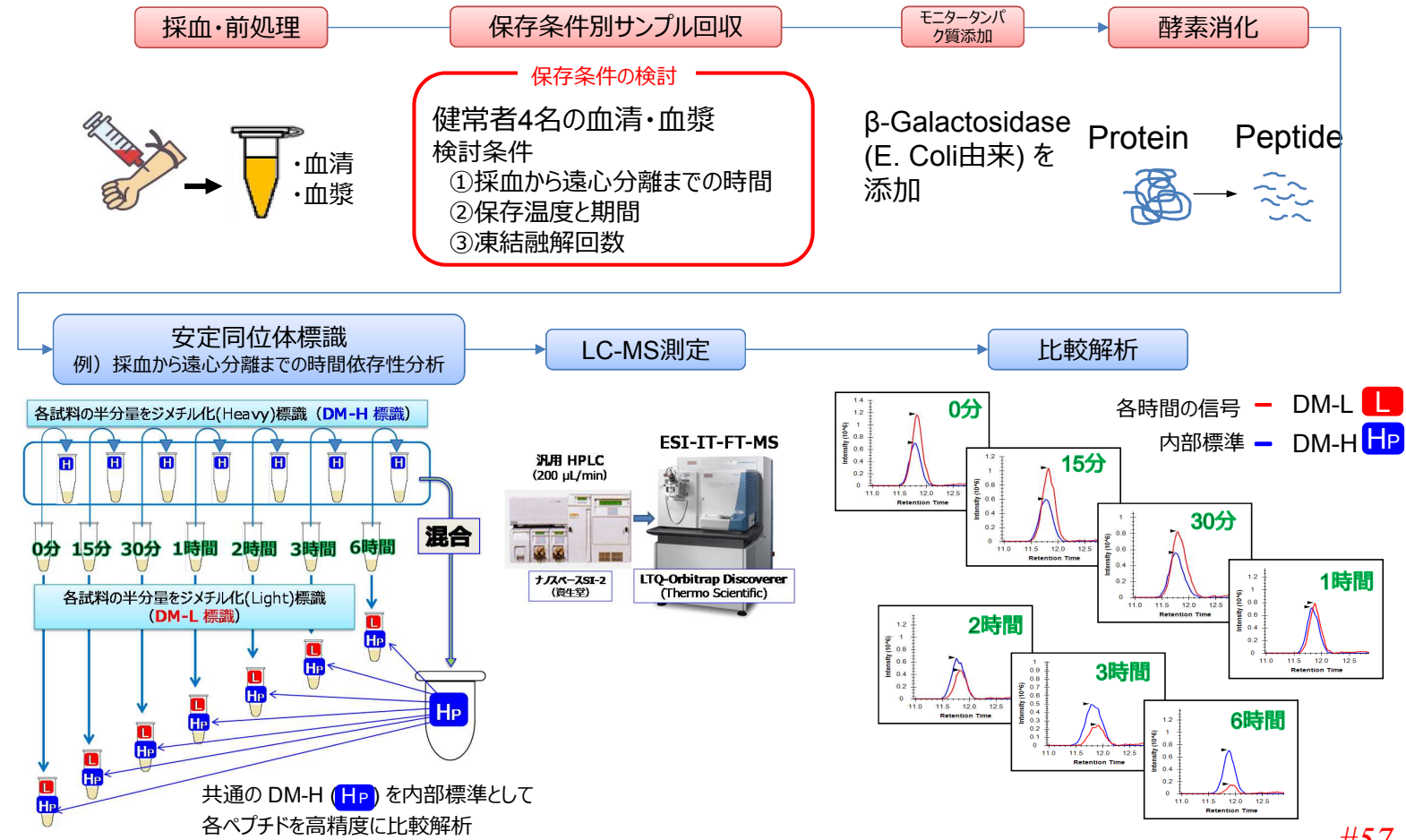


## 血清・血漿サンプルの解析ワークフロー（TMT）

- 【採血・前処理】  
健康人4名分より採血し、血清・血漿サンプルそれぞれ、保存条件別に分けて処理
- 【保存条件別サンプル回収】  
保存温度、保存期間、凝固時間別にサンプルを回収
- 【モニタータンパク質添加】  
定量値補正用内部標準として、等量の精製タンパク質(大腸菌由来のβ-ガラクトシターゼ)を添加
- 【タンパク質消化】  
トリプシンによるタンパク質の消化
- 【安定同位体標識】  
消化ペプチドをTMT試薬で安定同位体化した後、ひとつにまとめる。(一組、最大10種類のサンプル)
- 【SCX分画】  
陽イオン交換チップカラムで7分画
- 【MS測定】  
分画後サンプルを質量分析器(Q-Exactive)で解析
- 【同定・定量】  
取得したRAWデータを解析ソフトウェア(Proteome Discoverer)で解析、同定タンパク質と定量値を算出

以上の解析の流れの全体像は上記の図のとおりである。

# 実証解析の方法： 血清・血漿サンプルの解析ワークフロー（ジメチル標識法）



#57

## 血清・血漿サンプルの解析ワークフロー（ジメチル標識法）

### ● 試料調製

- 試料調製ならびに質量分析の精度をモニターするために、処理前の各試料に大腸菌由来のタンパク質（β-Galactosidase）を一定量添加
- 各試料を2つに分けて一方は安定同位体を含まないジメチル標識（L）を、他方に安定同位体標識試薬を用いたジメチル標識（H）を行い、各試料の H を混合した混合 H（Hp）を各試料に等量添加

### ● 質量分析

- 溶媒流速 200μL/min の汎用 LC を使用し安定性の高い分析を実現
- 質量分析精度 3 ppm、分析時間 90分/試料

### ● 比較解析

- 解析ソフトウェア SEQUEST Search（Thermo Scientific）を用いてペプチドを同定
- 同定されたペプチドについて、LC-MSデータ解析ソフトウェア Skyline（MacCoss Lab）を使用して各ペプチドの MSクロマトグラムを表示し、誤認識ならびに他のペプチドとの重複なく目的のペプチドのクロマトグラムを検出できているか否かを判断。
- 採血から遠心分離までの各時間におけるペプチドのMSクロマトグラム（L）と全試料を混合した試料のMSクロマトグラム（Hp）の強度の比（L/Hp）をもとに採血から遠心分離までの時間に伴う各ペプチドの変動を正確に分析。

#58

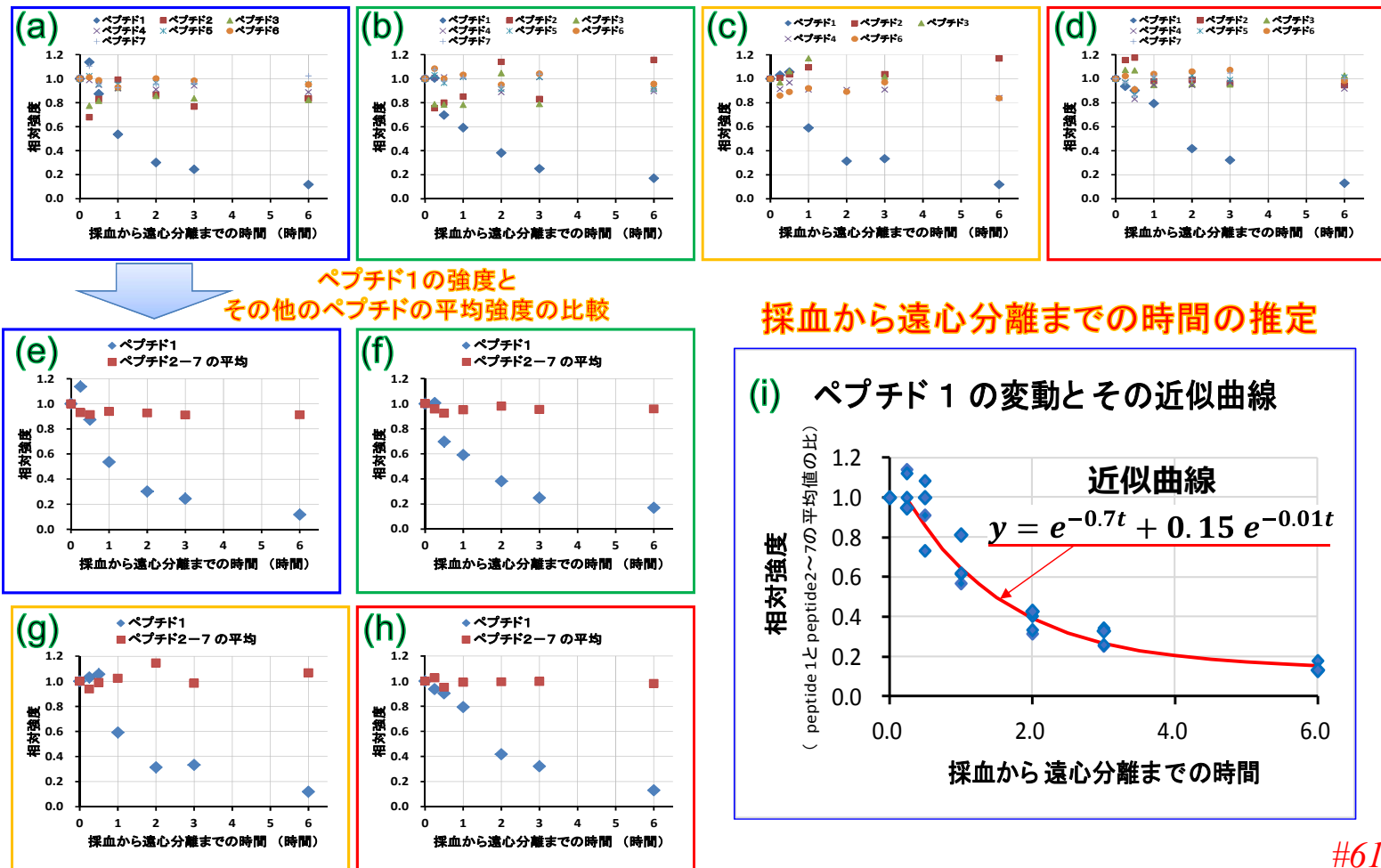


# 実証データ1. ペプチドレベルの経時的変化の観測（例）

Protein Name	Peptide No.	Sequence	血清 A						血清 B						血清 C						血清 D										
			0h	15	30	1h	2h	3h	6h	0h	15	30	1h	2h	3h	6h	0h	15	30	1h	2h	3h	6h	0h	15	30	1h	2h	3h	6h	
Alpha-2-macroglobulin	1	AIGYLNTGYOR	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0		
	2	VTGEGCVYLQTSLK	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	
	3	VDLSFSPQSPLSAHAHLR	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9	0.8	0.9	0.8	1.0	0.9	1.0	0.9	0.8	1.0	0.8	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	
	4	LLLQQVSLPELPGEYSMK	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	
	5	NEDSLVRFVQTK	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	6	QTVSWAVYFK	1.0	1.1	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	1.1	0.9	1.0	1.0	0.8	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	
	7	YGAATFTR	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9	0.8	1.0	1.0	0.8	0.9	1.0	1.0	0.9	
Alpha-1-acid glycoprotein 1	1	TYMLAFDYNDEK	1.0	0.6	0.8	0.7	0.8	0.9	0.8	1.0	0.7	0.6	0.7	1.0	0.6	0.8	1.0	0.9	1.0	1.0	1.2	0.9	1.2	1.0	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0	0.9	
	2	SDVYVDTWK	1.0	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	1.0	0.7	1.1	1.0	1.2	0.9	1.0	1.0	1.1	1.1	1.2	1.5	1.1	1.4	1.0	1.0	1.1	1.4	1.0	1.0	1.0	
	3	TEDTIFLR	1.0	0.8	0.9	1.0	0.8	0.9	0.9	1.0	0.8	0.8	0.8	1.2	0.8	1.2	1.0	1.0	1.1	1.2	1.5	1.1	1.6	1.0	1.1	1.4	1.0	1.0	1.0	1.0	
	4	NWGLSVYADKPEYTK	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	
Alpha-1-acid glycoprotein 2	1	TLMFGSYLDDEK	1.0	0.8	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	1.0	0.6	0.7	0.7	1.0	0.7	0.8	1.0	1.1	1.2	1.2	1.2	1.1	1.6	1.0	1.1	1.2	0.9	0.9	0.9	0.9	
	2	SDVYVDTWK	1.0	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	0.7	1.1	1.0	1.2	0.9	1.0	1.0	1.1	1.2	1.5	1.1	1.4	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9	
	3	EQLGEFYALDCLCIPR	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	0.8	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	4	EHWALLFLR	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	0.8	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	0.3	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	1.0	1.2	1.4	1.7	1.2	1.8	1.6	
Antithrombin-III	1	LQPLDFK	1.0	0.9	0.6	0.4	0.4	0.5	0.4	1.0	1.0	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	1.0	1.1	0.8	0.8	0.6	0.7	0.6	1.0	1.0	0.9	0.6	0.6	0.7	0.6	
	2	GDDITMVLIPKPEK	1.0	0.9	0.6	0.5	0.4	0.5	0.4	1.0	1.0	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	1.0	0.9	0.7	0.7	0.6	0.6	0.5	1.0	1.0	0.8	0.7	0.6	0.8	0.6	
	3	DDLIVSDAFHK	1.0	0.8	0.6	0.5	0.4	0.5	0.4	1.0	1.0	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	1.0	0.9	0.7	0.7	0.6	0.6	0.5	1.0	1.1	0.9	0.6	0.6	0.7	0.6	
	4	EQLQDMLGLVDFSPK	1.0	0.9	0.6	0.4	0.5	0.4	0.5	1.0	1.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	1.0	0.8	0.6	0.7	0.6	0.6	0.5	1.0	1.1	0.9	0.7	0.6	0.7	0.6	
	5	FATTFYQHILADSK	1.0	0.9	0.6	0.5	0.4	0.5	0.4	1.0	0.8	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6	1.0	0.9	0.7	0.7	0.5	0.6	0.6	1.0	1.0	0.9	0.7	0.7	0.7	0.6	
	6	EVLNLIIFMGR	1.0	1.1	0.7	0.5	0.5	0.5	0.4	1.0	1.2	0.8	0.7	0.6	0.7	0.6	1.0	1.2	0.9	0.8	0.6	0.7	0.7	1.0	1.1	1.1	0.7	0.7	0.7	0.6	
	7	AFLEVNNEEGSEAASTAVIAGR	1.0	0.9	0.7	0.6	0.5	0.5	0.5	1.0	0.9	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	1.0	0.8	0.8	0.7	0.6	0.5	0.5	1.0	1.1	0.9	0.7	0.6	0.7	0.6	
	8	FSPENTR	1.0	1.1	0.7	0.5	0.6	0.5	0.5	1.0	1.0	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	0.7	0.7	0.5	0.7	0.5	1.0	0.9	0.8	0.6	0.6	0.6	0.5	
	9	TSDDIHFFFAK	1.0	0.7	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	1.0	0.7	0.5	0.5	0.7	0.5	0.6	1.0	1.0	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	1.0	1.2	1.1	0.7	0.7	0.7	0.7	
	10	VAEGTQVLELPK	1.0	1.0	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	1.0	1.0	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.6	0.6	1.0	1.0	0.9	0.7	0.6	0.8	0.6	
	11	DIPMPNPMCIYR	1.0	1.0	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	0.9	0.8	0.9	0.9	0.7	0.8	1.0	1.1	0.8	0.7	0.9	0.5	0.8	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	
Alpha-1-antichymotrypsin	1	DEELSCVTVLTK	1.0	0.6	0.9	0.9	0.9	0.8	0.7	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0	0.9	1.0	1.0	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	2	NLAVSQVVK	1.0	1.0	1.0	0.8	0.9	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.8	1.0	0.9	0.8	1.0	0.9	1.0	0.9	1.1	1.5	1.2	1.3	1.1	
	3	ADLSGITGAR	1.0	0.9	0.8	0.9	1.0	0.8	0.8	1.0	1.2	1.1	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	1.2	1.6	1.1	1.0	1.1	
	4	WEMPPDQDTHQSR	1.0	0.4	0.4	1.4	0.3	1.0	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.6	15.0	1.4	2.1	1.3	1.2	
	5	DSLFR	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9	
	6	GTHVDLGLASANVDFAFSLYK	1.0	1.2	0.9	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	1.0	0.9	0.8	1.0	1.0	1.0	1.1	
	7	LINDYVK	1.0	0.9	1.2	1.1	1.2	1.1	0.9	1.0	1.4	1.5	1.0	1.4	1.2	1.3	1.0	1.2	1.2	1.2	1.1	1.0	1.2	1.0	1.0	0.9	0.9	1.1	0.9	0.9	
	8	LYGSEAFATDFQDSAAAK	1.0	0.9	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	1.0	0.8	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	0.9	1.0	
	9	ITLLSALVETR	1.0	1.1	1.1	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	0.8	1.0	0.9	0.7	1.0	0.8	1.0	0.9	1.0	1.2	1.0	1.1	1.0	
	10	EIGELYLPK	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	0.8	1.0	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	
	11	EQLSLDR	1.0	1.2	0.9	0.8	1.2	0.9	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	0.9	1.2	1.1	1.3	0.9	
	12	AVLVDVFEETGTEASAATAVK	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	0.9	1.2	1.1	1.3	0.9	
Haptoglobin-related protein	1	NPANPVQR	1.0	1.1	0.9	0.5	0.3	0.2	0.1	1.0	1.0	0.7	0.6	0.4	0.2	0.2	1.0	1.0	1.1	0.6	0.3	0.3	0.1	1.0	0.9	0.9	0.8	0.4	0.3	0.1	
	2	TEGDGVYTLNDK	1.0	0.7	0.8	1.0	0.9	0.8	0.8	1.0	0.8	0.8	0.9	1.1	0.8	1.2	1.0	1.0	1.0	1.1	1.4	1.0	1.2	1.0	1.2	1.2	1.0	1.0	1.0	0.9	
	3	SCAVAEYGVYVK	1.0	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.8	1.0	0.8	0.8	0.8	1.0	0.8	0.9	1.0	1.0	1.1	1.2	1.4	1.0	1.4	1.0	1.1	1.1	0.9	1.0	1.0	1.0	
	4	DIAPTLTYVGK	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	0.9	0.9	0.9	0.8	1.0	1.0	0.8	0.9	0.9	1.0	0.9	
	5	VMPICLPSK	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	
	6	QLVEIEK	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0	0.8	1.0	1.0	0.9	1.0	1.1	1.1	1.0	
	7	GSFPWQAK	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	
Hemoglobin subunit alpha	1	VGAHAGEYGAEALER	1.0	1.2	0.7	0.6	1.0	0.9	3.1	1.0	0.5	0.6	0.4	0.6	0.7	1.8	1.0	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	1.0	0.4	0.3	0.5	0.7	1.1	1.0	
	2	VADALTNAAVHVDMPNALSALDHAHK	1.0	0.9	0.8	0.7	1.1	1.0	4.0	1.0	0.5	0.6	0.5	1.0	0.8	2.2	1.0	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.3	1.0	0.4	0.3	0.3	0.6	0.9	0.9	
	3	FLASVSTVLTYSK	1.0	1.4	0.8	0.5	1.1	1.1	4.2	1.0	0.5	0.5	0.4	0.6	0.9	2.															



# 品質評価マーカー候補を用いた採血から遠心分離までの時間の推定（例）



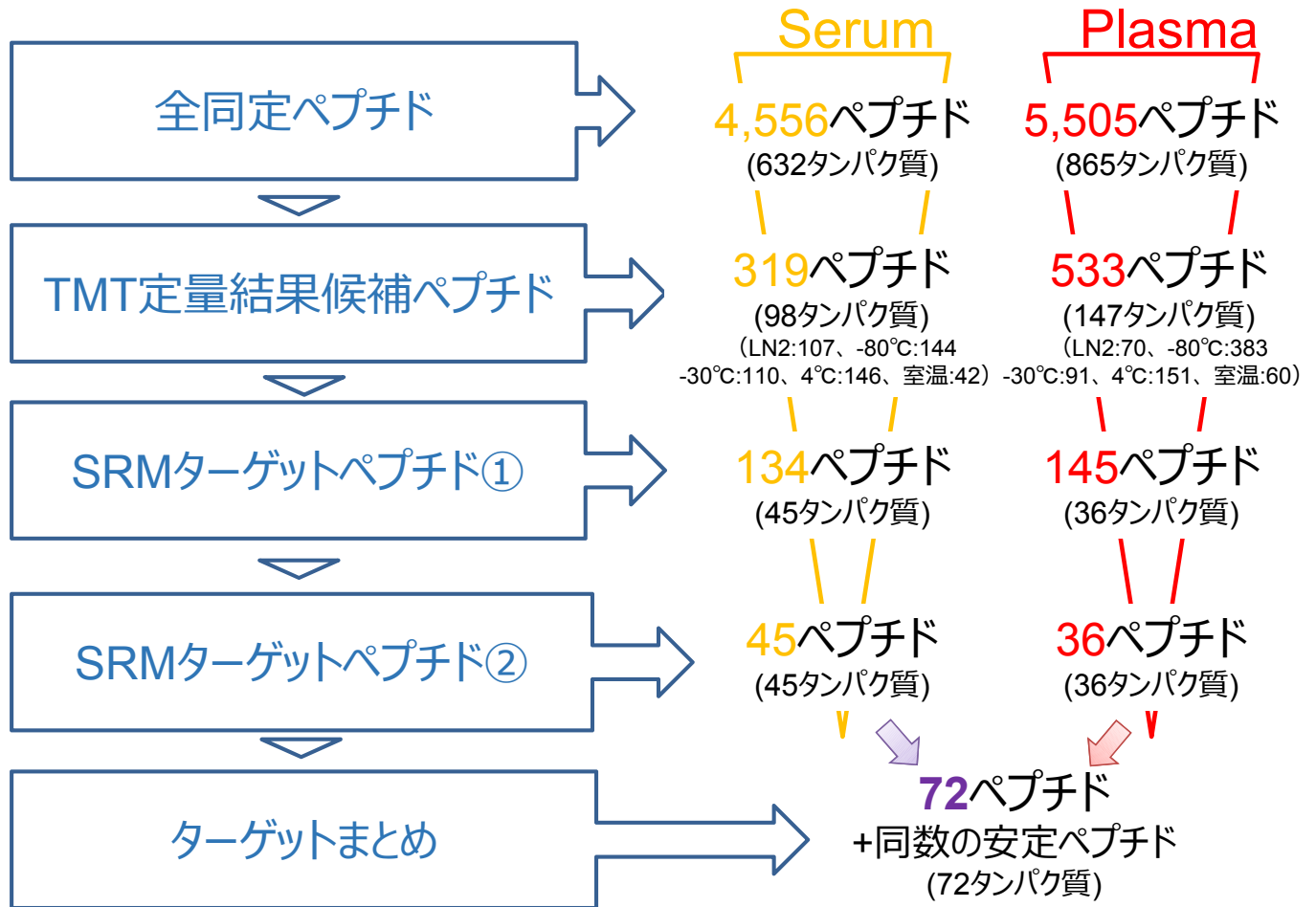
## 採血から遠心分離までの時間の推定

#61

# 実証データ2. 品質評価マーカー候補を用いた採血から遠心分離までの時間の推定（例）

- 品質（採血から遠心分離までの時間）を評価するためのマーカー候補ペプチドの観測例を以下に示す。
  - データの説明
    - ✓ (a)~(d)は、それぞれ前頁の試料A~DのHaptoglobin-related proteinに由来するペプチドの相対強度をプロットしたものである（横軸：採血から遠心分離までの時間，縦軸：相対強度）。
    - ✓ (e)~(h)は、それぞれ(a)~(d)の各時間におけるペプチド1の相対強度（◆）とペプチド2~7の相対強度の平均値（◆）をプロットしたものである。
    - ✓ (i) は(e)~(h) のペプチド1（◆）を全て同じグラフにプロットし、それらの点に対する近似曲線（赤色曲線）を求めて示したものである。
  - 未知試料の採血から遠心分離までの時間の推定
    - ✓ 未知試料をLC-MS分析してHaptoglobin-related proteinのペプチド1の強度とペプチド2~7の平均強度の比を求める。
    - ✓ その比を近似曲線  $y = e^{-0.7t} + 0.15 e^{-0.01t}$  の  $y$  として代入し、採血から遠心分離までの時間（推定時間）  $t$  を求める。

#62



#63

## 品質評価マーカーペプチド候補（保存状態：医薬基盤研）

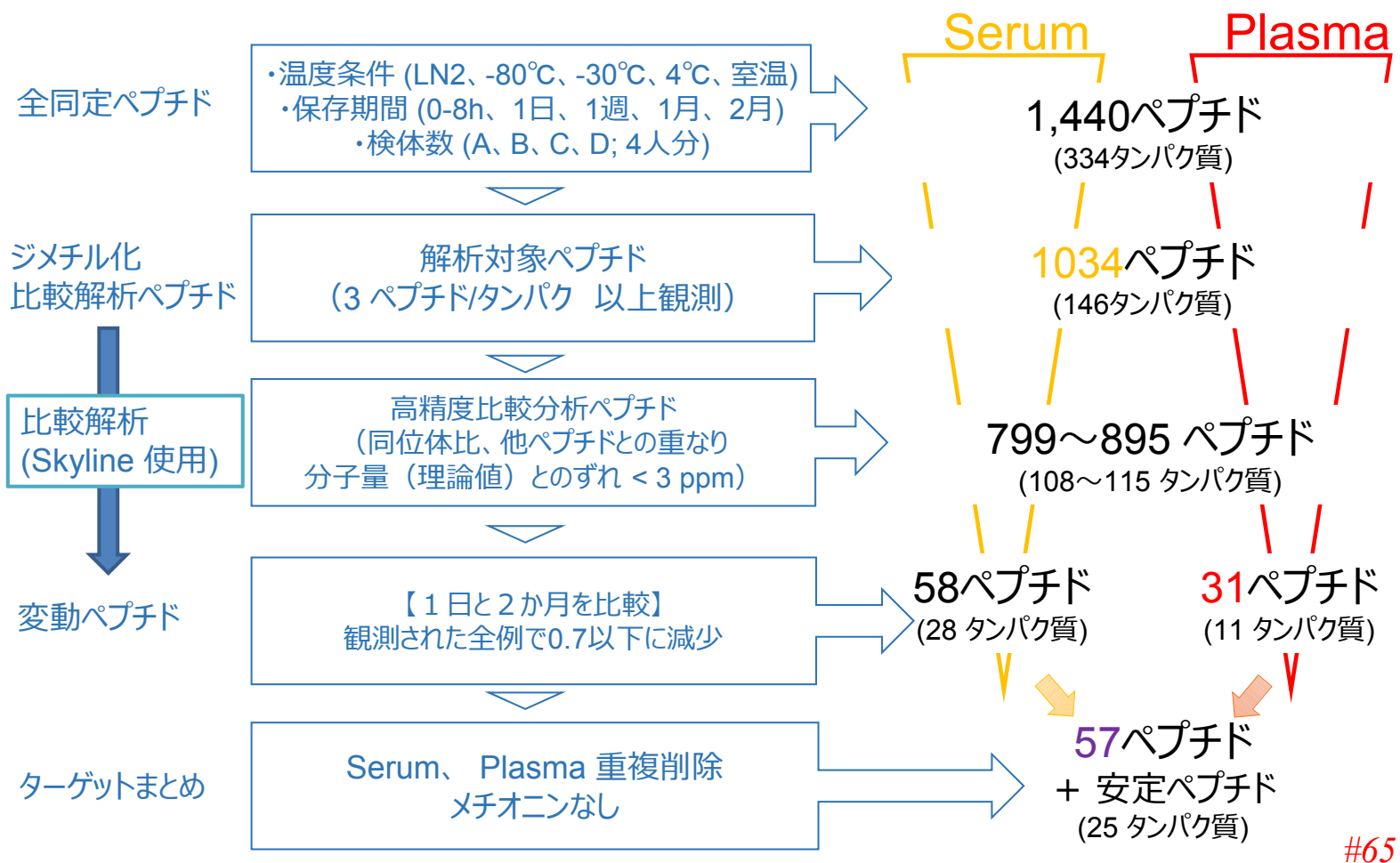
全同定ペプチドから、候補ペプチドへの絞り込みについて

- 【全同定ペプチド】
  - ・温度条件（LN2、-80°C、-30°C、4°C、室温）
  - ・保存期間（0-8h、1日、1週、1月、2月）
  - ・検体数（A、B、C、D：4人分）
 サンプル数：88×2（血清、血漿）=176  
 分画数：140×2（血清、血漿）=280
- 【TMT定量結果による選択】
  - ・4検体中、3検体で共通して減少（長期保存で1.5倍）
- 【SRMターゲットペプチドの選択①】：SRMに適した配列のペプチドを選択
  - ・同一タンパク質内に安定なペプチド同定
  - ・同定タンパク質に対してuniqueなペプチド
  - ・トリプシン切断ミスなし、メチオニンなし
- 【SRMターゲットペプチドの選択②】：タンパク質毎の候補ペプチドの選択
  - ・1タンパク質につき1ペプチドずつ
  - ・変化が大きく、ピーク強度の強いもの
- 【ターゲットまとめ】
  - ・血清、血漿それぞれの候補をまとめて重複を削除

以上の絞り込みの流れの全体像は上記の図のとおりである。

#64

## 実証データ4： 品質評価マーカーペプチド候補（保存状態：北里大学）

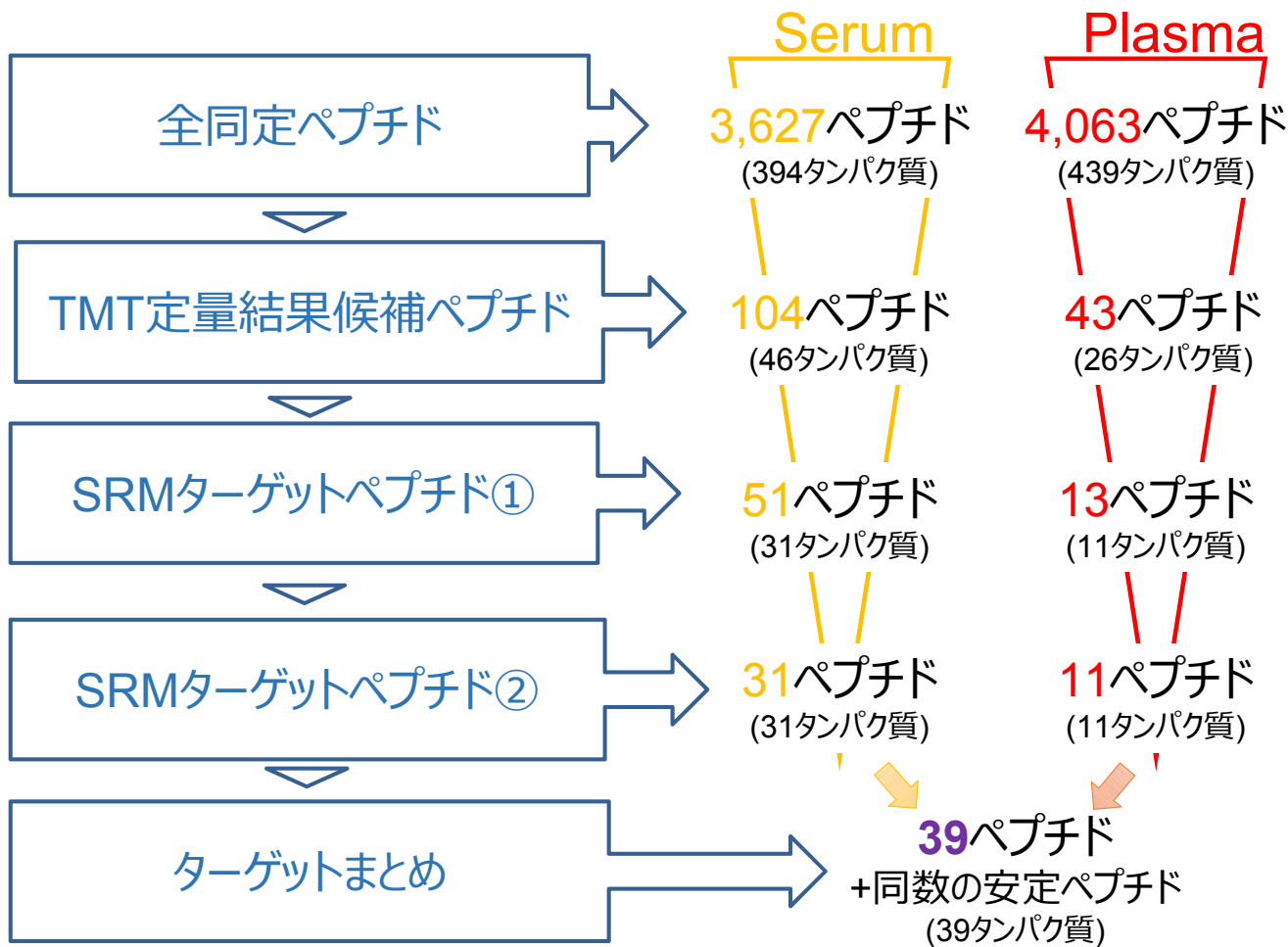


## 品質評価マーカーペプチド候補（保存状態：北里大学）

全同定ペプチドから、候補ペプチドへの絞り込みについて

- 【全同定ペプチド】
  - ・温度条件 (LN2、-80℃、-30℃、4℃、室温)
  - ・保存期間 (0-8h、1日、1週、1月、2月)
  - ・検体数 (A、B、C、D : 4人分)
- 【ジメチル化比較解析ペプチドの選択】
  - ・3ペプチド以上比較可能なタンパク質由来のペプチドを選択
- 【Skyline による比較解析】：確認用アルゴリズムを作り各ペプチドのMSクロマトグラムを確認
  - ・確認事項1：他のペプチドを誤認識していないこと (LCの溶出時間から確認)
  - ・確認事項2：他のペプチドをご認識していないこと (分子量 (理論値) との違いが 3 ppm以下であること)
  - ・確認事項3：他のペプチドと重複していないこと (MSクロマトグラム上で確認)
- 【変動ペプチドの絞り込み】
  - ・1日と2か月のMSクロマトグラムの面積比を計算：4検体全てが2か月で 0.7以下に減少しているものを選択
- 【ターゲットペプチドの決定】
  - ・血清と血漿における重複を確認、メチオニンを含んでいないペプチドを除外

以上の絞り込みの流れの全体像は上記の図のとおりである。



#67

品質評価マーカーペプチド候補（遠心までの時間：医薬基盤研）

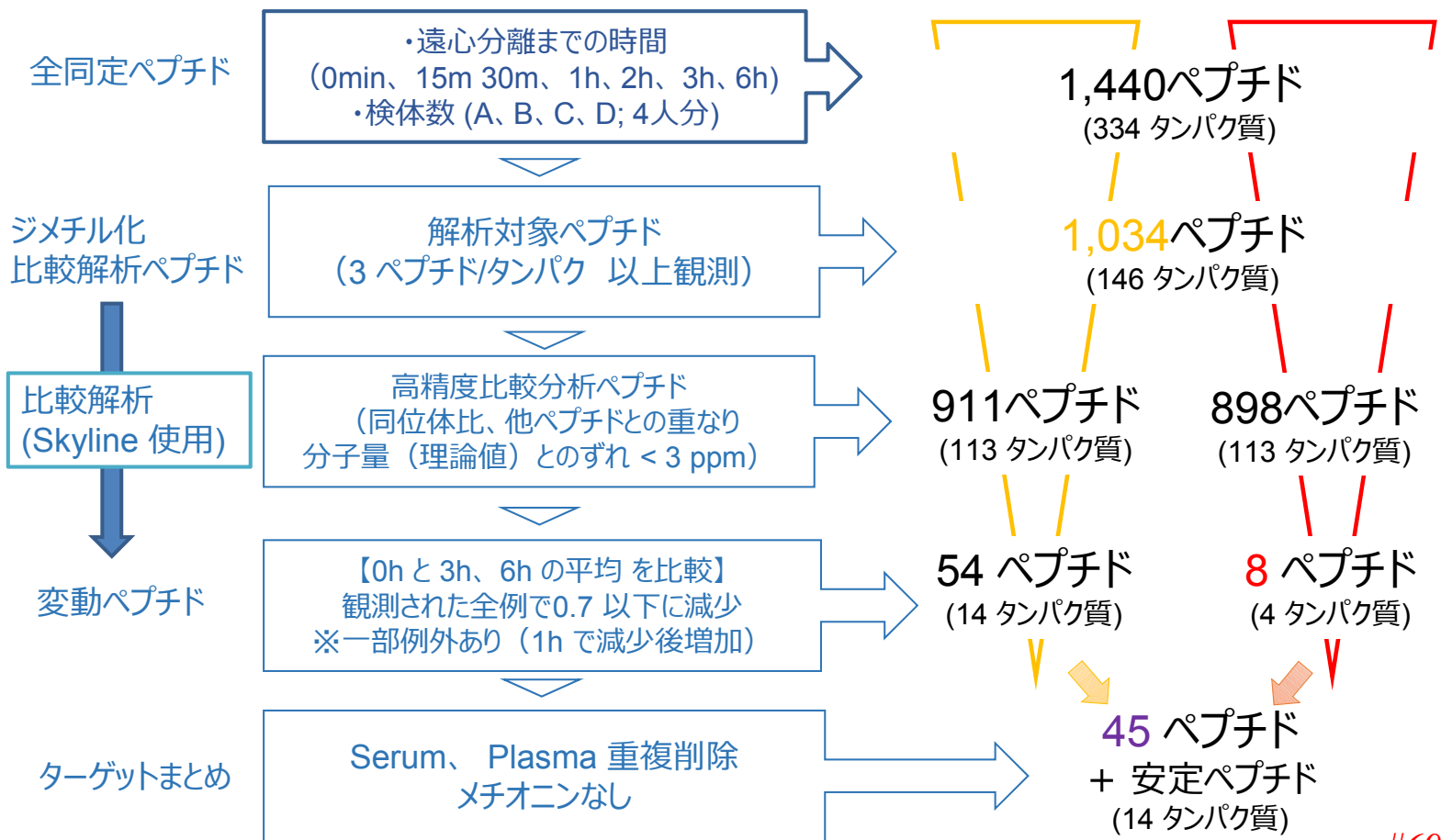
全同定ペプチドから、候補ペプチドへの絞り込みについて

- 【全同定ペプチド】
  - ・遠心分離までの時間  
(0min、15m 30m、1h、2h、3h、6h)
  - ・検体数 (A、B、C、D; 4人分)
 サンプル数：28×2（血清、血漿）=56  
 分画数：28×2（血清、血漿）=56
- 【TMT定量結果による選択】
  - ・4検体中、3検体で共通して減少（長期保存で1.5倍）
- 【SRMターゲットペプチドの選択①】：SRMに適した配列のペプチドを選択
  - ・同一タンパク質内に安定なペプチド同定
  - ・同定タンパク質に対してuniqueなペプチド
  - ・トリプシン切断ミスなし、メチオニンなし
- 【SRMターゲットペプチドの選択②】：タンパク質毎の候補ペプチドの選択
  - ・1タンパク質につき1ペプチドずつ
  - ・変化が大きく、ピーク強度の強いもの
- 【ターゲットまとめ】
  - ・血清、血漿それぞれの候補をまとめて重複を削除

以上の絞り込みの流れの全体像は上記の図のとおりである。

#68

## 実証データ6： 品質評価マーカーペプチド候補（遠心までの時間：北里大学）



#69

## 品質評価マーカーペプチド候補（遠心までの時間：北里大学）

全同定ペプチドから、候補ペプチドへの絞り込みについて

- 【全同定ペプチド】
  - ・温度条件 (LN2、-80°C、-30°C、4°C、室温)
  - ・保存期間 (0-8h、1日、1週、1月、2月)
  - ・検体数 (A、B、C、D : 4人分)
- 【ジメチル化比較解析ペプチドの選択】
  - ・3ペプチド以上比較可能なタンパク質由来のペプチドを選択
- 【Skyline による比較解析】：確認用アルゴリズムを作り各ペプチドのMSクロマトグラムを確認
  - ・確認事項1：他のペプチドを誤認識していないこと (LCの溶出時間から確認)
  - ・確認事項2：他のペプチドをご認識していないこと (分子量 (理論値) との違いが 3 ppm以下であること)
  - ・確認事項3：他のペプチドと重複していないこと (MSクロマトグラム上で確認)
- 【変動ペプチドの絞り込み】
  - ・0時間のMSクロマトグラムの面積と、3時間、6時間のMSクロマトグラムの面積の平均値の比を計算：4検体全てが0.7以下に減少しているものを選択
- 【ターゲットペプチドの決定】
  - ・血清と血漿における重複を確認、メチオニンを含んでいないペプチドを除外

以上の絞り込みの流れの全体像は上記の図のとおりである。

#70



	保存状態で変動するペプチド		遠心までの時間で変動するペプチド	
	血清	血漿	血清	血漿
北里大学	58	31	54	8
医薬基盤研	45	36	31	11
検証ペプチド	358 (重複は除く、安定なペプチドも含む)			

#71

## 品質評価マーカーペプチド候補（医薬基盤研＋北里大学）

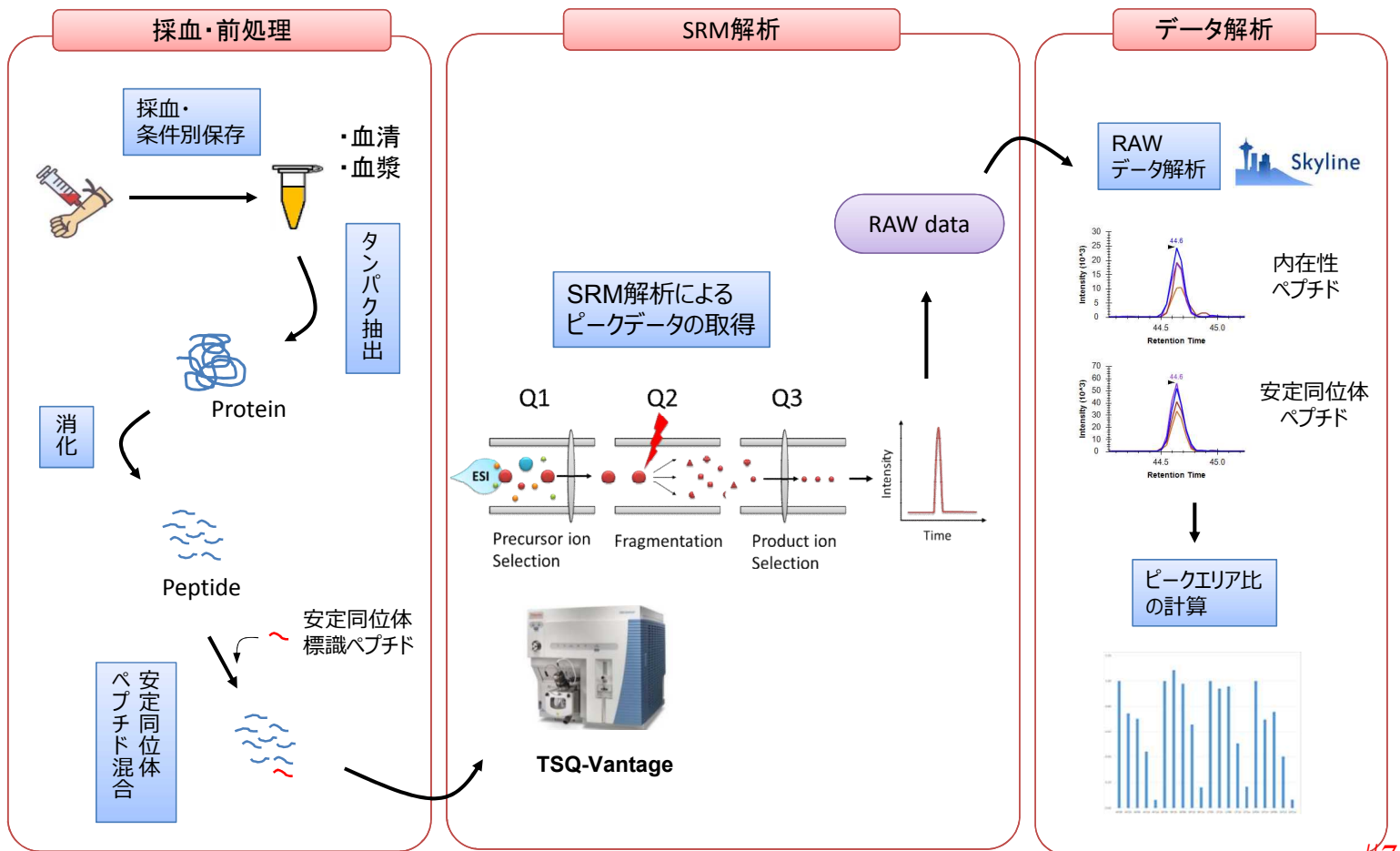
### 2施設での候補ペプチド探索結果の統合

- 【検討条件】
  - ・保存温度・保存期間
  - ・凝固時間
 } それぞれ別個にマーカー候補ペプチドを選択
- 【検証用ペプチドのまとめ】
  - ・血清、血漿それぞれの候補をまとめて、両施設での重複を削除
  - ・ターゲットとなるペプチドと同一のタンパク質から、安定なペプチドを1本以上選択する。
  - ・安定なペプチドも強度の強いものを選択。

各条件、施設別のターゲットペプチド数及び検証用のペプチド数を上記の表に示す。

#72

# 実証データ8： 品質評価マーカーペプチド候補のSRMを用いた検証



#73

## 品質評価マーカーペプチド候補のSRMを用いた検証

- 【採血・前処理】
  - ・採血・条件別保存処理：血清、血漿サンプル毎に保存温度、期間、凝固時間別のサンプルを処理
  - ・タンパク質抽出：PTS法による血中タンパク質の可溶化抽出
  - ・消化：トリプシンによる消化
  - ・安定同位体標識ペプチドの混合：ターゲットペプチドの安定同位体標識ペプチドを混合
- 【SRM解析】
  - ・SRM解析によるピークデータの取得：TSQ-Vantageにて、内在性ターゲットペプチドと内部標準安定同位体標識ペプチドのピークデータを取得。
- 【データ解析】
  - ・RAWデータ解析：測定データ(RAWデータ)を解析ソフトウェア (Skyline) で解析。定量値は対象ペプチドのピーク面積 (Peak Area) として定量される。
  - ・ピークエリア比の計算：各サンプル内のペプチド定量値は、内部標準ペプチドとのピーク面積比 (Area Ratio) として、サンプル間の比較を行う。

以上の解析の流れの全体像は上記の図のとおりである。

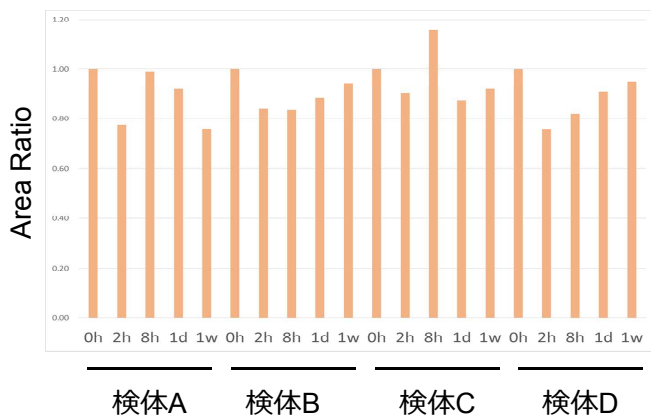
#74

# 実証データ9： SRMによる検証結果

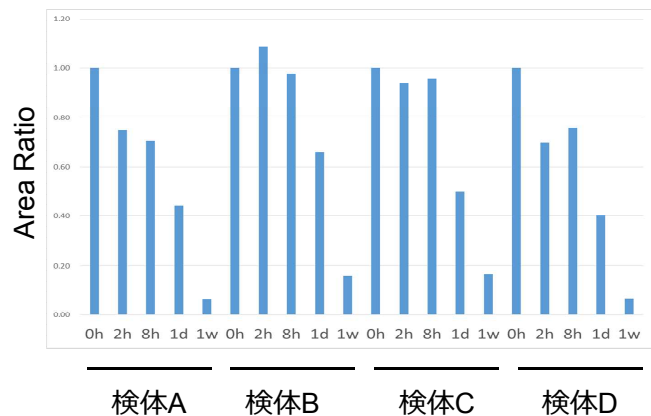
	保存状態で変動するペプチド（～2か月保存）								遠心分離までの時間で変動するペプチド（室温）	
	血清				血漿				血清	血漿
	室温のみ	室温4℃	室温4℃ -30℃	室温4℃ -30℃ -80℃	室温のみ	室温4℃	室温4℃ -30℃	室温4℃ -30℃ -80℃		
検証されたペプチド	8	11	11	15	17	22	30	41	18	36
計	15				41				54	

解析例（血漿サンプル：室温0h～8h、1day、1week）

安定ペプチド



マーカーペプチド



#75

## SRMによる検証結果

### ● 【SRM検証結果】

・保存状態で変動するペプチド：

温度条件（-80℃、-30℃、4℃、室温）  
保存期間（0-8h、1日、1週、1月、2月）  
検体数（A、B、C、D：4人分）

サンプル数：56×2（血清、血漿）=116

・遠心までの時間で変動するペプチド

室温での遠心分離までの時間  
（0min、15m、30m、1h、2h、3h、6h）  
検体数（A、B、C、D：4人分）

サンプル数：20×2（血清、血漿）=40

・検証されたペプチド：SRM解析で4検体中3検体以上で共通して変動（Ratio < 0.66）を確認

### ● 【解析例】

・室温での保存期間別（0h～8h、1day、1week）サンプルのSRM解析。安定ペプチドと変動ペプチド解析例

以上の検証結果のまとめを上記に示す。

#76

1. Elliott P, et al. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol*, 2008, 37(2), 234-244.
2. Hubel A, et al. Storage of human biospecimens: selection of the optimal storage temperature. *Biopreserv Biobank*, 2014, 12(3), 165-175.
3. Rai AJ, et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*, 2005, 5(13), 3262-3277.
4. 特許出願中 (特願2017-135808)

# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

- 第3部・・・ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク  
「生体試料の国際標準化への対応及び臨床オミックス検査への応用」
  - 3-1 脳脊髄液
  - 3-2 骨格筋
  - 3-3 心筋
  - 3-4 がん (FFPE)
  - 3-5 ゲノム医療実現に向けたオミックス検査・解析に係る国内外の品質管理の枠組の全体像の整理と提案

#79

## 【A】全体の総論

- 我が国が擁する6つのナショナルセンターは、担当疾患領域におけるhigh-volumeセンターである病院を持ち、最高レベルの医療を提供しつつ、疾患の本態解明、高度先駆的医療の基礎及び臨床開発、予防・先進医療の開発と普及、国民への情報発信と政策提言等に取り組んでいる。大学と異なり、代々の職員や研究グループの変遷があっても、組織的に一貫性のある疾患研究・対策を推進している。
- 国立研究開発法人として研究成果の最大化を図るためには、high-volumeであり、かつ単一施設としての品質管理と、経時的臨床情報へのアクセスに優れるという特長を活かした「臨床に学び、臨床に還す」データ駆動型研究がNCの強みの一つである。そのための必須の研究基盤である包括的同意に基づくバイオバンクと臨床試料のオミックス解析に早くから注力していた。2011年10月に、6NCはバイオバンクネットワーク (NCBN) を発足させ、6NC横断的なバイオバンクカタログデータベースの公開等を行っている。
- NCのバイオバンクのもう一つの特徴は、患者試料の解析が、単に基礎研究のみならず、臨床検査的な意味合いを持つ場合があることである。これはNCの研究開発が、しばしば研究と診療の境界領域・融合領域に及ぶためであるが、その傾向は特に近年、ゲノム医療への期待が高まるにつれて顕在化してきた。従ってNCBNの品質管理には、臨床ゲノム検査の時代を見据えた対応が求められている。
- NCBNの特長は、血液試料のみならず、手術等で摘出された病変部位の多彩な組織試料を豊富に保管している点である。疾患の数だけ異なる病変部位が存在し得るが、バイオバンクの必須の要件である品質管理法も、それらの臓器・組織毎に最適化していく必要がある。本研究事業ではその取組の第一歩として、脳脊髄液・骨格筋・心筋・がん組織に焦点を当てた。
- 以下に各検体種毎のオミックス研究用取扱いのベストプラクティス案と、その根拠とした実証データの主なものを示す。

#80



# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

---

- 第3部・・・ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク  
「生体試料の国際標準化への対応及び臨床オミックス検査への応用

- 3-1 脳脊髄液

- 【A】総論

- 【B】ベストプラクティス（案）

- 【C】ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ

#81

## 【A】CSFの総論

---

- 脳脊髄液（CSF）は脳と脊髄の周囲に約150mL存在する無色透明な液体で、脳の組織液と連続しているため脳由来の分子を含んでいる。また、血液と異なり、腸・肝臓など他の主要臓器と隔離されているため、その影響を受けにくい。
- このようにCSFは脳神経疾患の臨床検体として優れた特性を持っており、髄膜炎や多発性硬化症のほか、近年ではアルツハイマー病の診断（CSF中のタウタンパク質）にも用いられている。
- CSFの品質管理に関しては、これまでにアルツハイマー病バイオマーカーに関する研究が先行しており、室温放置時間や血液混入、食事による影響などは受けにくいこと、保存チューブの材料の影響は大きいことなどが示されている（Vanderstichele et al, 2012）。また多発性硬化症の研究グループが各施設の収集状況の調査からコンセンサス・ガイドラインを提案している（Teunissen et al, 2009）。しかし、我々が知る限り、CSFの処理条件を網羅的・包括的に調べた研究は見当たらない。
- 近年、オミックス解析技術の進歩は著しく、CSFバイオリソースの品質もそのような解析に対応して改善させる必要がある。我々はオミックス解析に適したCSFの収集条件を知るため、CSFの採取から解析に至る様々な処理条件を変え、プロテオーム解析（国立精神・神経医療研究センター：NCNP）、メタボローム解析（ToMMo）を行うことで、それらの解析に与える影響を調べた。

#82

CSFについてプロテオーム解析及びメタボローム解析を行い、採取時及び採取後の処理・保管条件に依存して変化する分子を同定した。以下、本項ではプロテオーム解析より得られた結果を示す。メタボローム解析については第1部東北メディカルメガバンク機構の頁（#11）を参照。

- 血液混入試料について、赤血球数5,000個/mm<sup>3</sup>（約0.1%の混入）までは、タンパク質に与える影響は比較的小さい。
- 採取用チューブの種類（ポリプロピレン、ポリスチレン、タンパク質低吸着処理）は、短時間（10分）では影響は比較的小さい。
- 採取～保存までの時間と温度について、25℃では4時間まで、4℃では24時間まで、影響は比較的小さい。
- 遠心速度（1,000～4,000G）の影響は比較的小さい。
- 保存用チューブの材質（ポリプロピレン、タンパク質低吸着処理）が試料に与える影響は大きい。ポリプロピレンチューブに保存した場合、タンパク質低吸着処理チューブに比べて減少するタンパク質が多い。

#83

- 
- 保存温度（-80℃ vs -20℃）はある程度の影響がある。-20℃で保存した場合-80℃に比べて減少するタンパク質が生じる。
  - 融解再凍結は2回までは、影響は比較的小さい。10回では減少するタンパク質・増加するタンパク質が存在する。

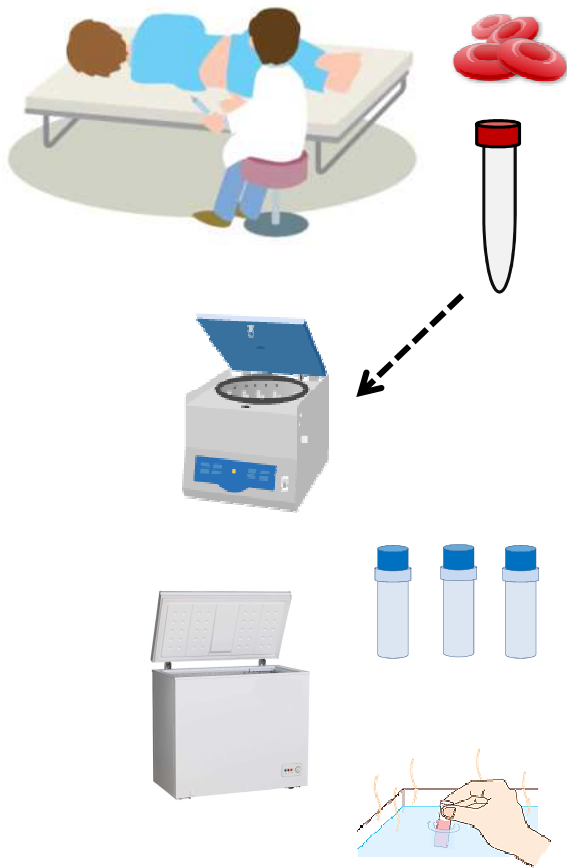
以上を踏まえ、プロテオーム解析を行う際のCSF保存条件として下記が重要と考える。

1. 保存用チューブとして低タンパク質吸着チューブが望ましい
2. 保存温度は-80℃が望ましい
3. 凍結融解は2回以内が望ましい

今後、更に解析を深め公表する予定である。

#84

### 実証解析の方法：CSF品質に影響を与える因子に対応した試料の準備



- ①血液混入の有無  
＜10、100、500、5,000個/mm<sup>3</sup>
- ②採取用チューブの種類  
PP、PS、低吸着
- ③採取～処理までの時間と温度  
4°C vs 25°C、0-24hr
- ④遠心条件  
1,000、2,000、4,000G
- ⑤保存用チューブの種類  
PP、低吸着
- ⑥保存温度  
-80°C vs -20°C
- ⑦融解再凍結  
0-10回

#85

### CSF品質に影響を与える因子に対応した試料の準備

- 採取時・処理・保管条件に依存して変化する分子を同定するために、以下の条件で試料（n=3）を用意した。

- ①血液混入の有無：腰椎穿刺の際に血液混入が生じることがある。このモデルとして、直前に被験者より血液検体（EDTA2Na）を採取し、赤血球数を直ちに測定のうえ、次いで採取したCSFに対し、各々の赤血球濃度（100、500、5,000個/mm<sup>3</sup>）になるよう希釈血液を加え、10分間静置のうえ、処理を行った。
- ②採取用チューブの種類：タンパク質低吸着チューブで採取したCSFを、タンパク質低吸着チューブ、ポリプロピレンチューブ、ポリスチレンチューブに分注し、10分間静置した後、処理を行った。
- ③採取～処理までの時間と温度：CSFを採取後4°Cまたは25°Cで、0、2、4、24hr静置し処理を行った。
- ④遠心条件：遠心速度を1,000G、2,000G、4,000G、各々10分間遠心し上清を保存した。
- ⑤保存用チューブの種類：同じ処理を経たCSFをポリプロピレンチューブ、低タンパク質吸着チューブに分注保存した。
- ⑥保存温度：CSFを-80°Cもしくは-20°Cで4週間以上保管し測定した。
- ⑦融解再凍結：CSFを0、1、2、10回融解・再凍結し測定した。

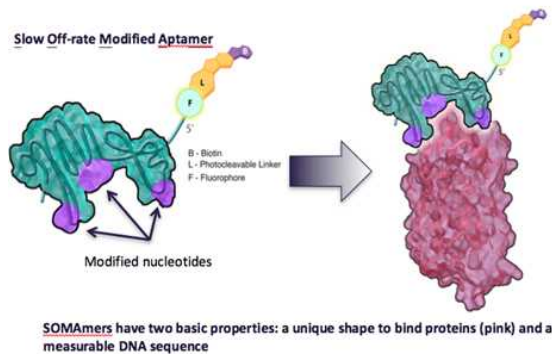
#86

## プロテオーム

SOMAscan

米国SOMALogic社

サンプル75uL



~1,300 タンパク質

## メタボローム

GC-MS/MS

東北大学小柴先生

サンプル50uL



TQ8040 (Shimadzu)

~148 代謝物

#87

## プロテオーム・メタボローム解析の方法

- プロテオーム解析については、アプタマーによる1,310分子の定量解析を米国SOMALogic社にて行った。この測定法は極めて精度・感度が高いことが判明している。
- メタボローム解析は、東北大学にて小柴博士らが行った（第1部東北メディカルメガバンク機構の頁#43以降を参照）。

#88

## プロテオーム

Nominal  $P < 0.05$ 、カッコ内はFDR  $Q < 0.05$ の分子数

①血液混入の有無 (vs $< 10/\text{mm}^3$ 以下)	100/ $\text{mm}^3$	500/ $\text{mm}^3$	5,000/ $\text{mm}^3$
	16 (0)	136 (0)	128 (0)
②採取用チューブの種類 (vs 低タンパク質吸着)	PP	PS	
	177 (0)	128 (0)	
③採取～処理までの 時間と温度 (vs 即時処理)	4°C-2hr	4°C-4hr	4°C-24hr
	161 (0)	78 (0)	91 (0)
	25°C-2hr	25°C-4hr	25°C-24hr
	30 (0)	42 (0)	155 (2)
④遠心条件 (vs 2,000G)	1000G	4,000G	
	30 (0)	90 (0)	
⑤保存用チューブの種類 (vs 低タンパク質吸着)	PP		
	111 (14)		
⑥保存温度 (vs $-80^\circ\text{C}$ )	$-20^\circ\text{C}$		
	147 (2)		
⑦融解再凍結 (vs 0回)	1	2	10
	51 (0)	96 (0)	176 (5)

#89

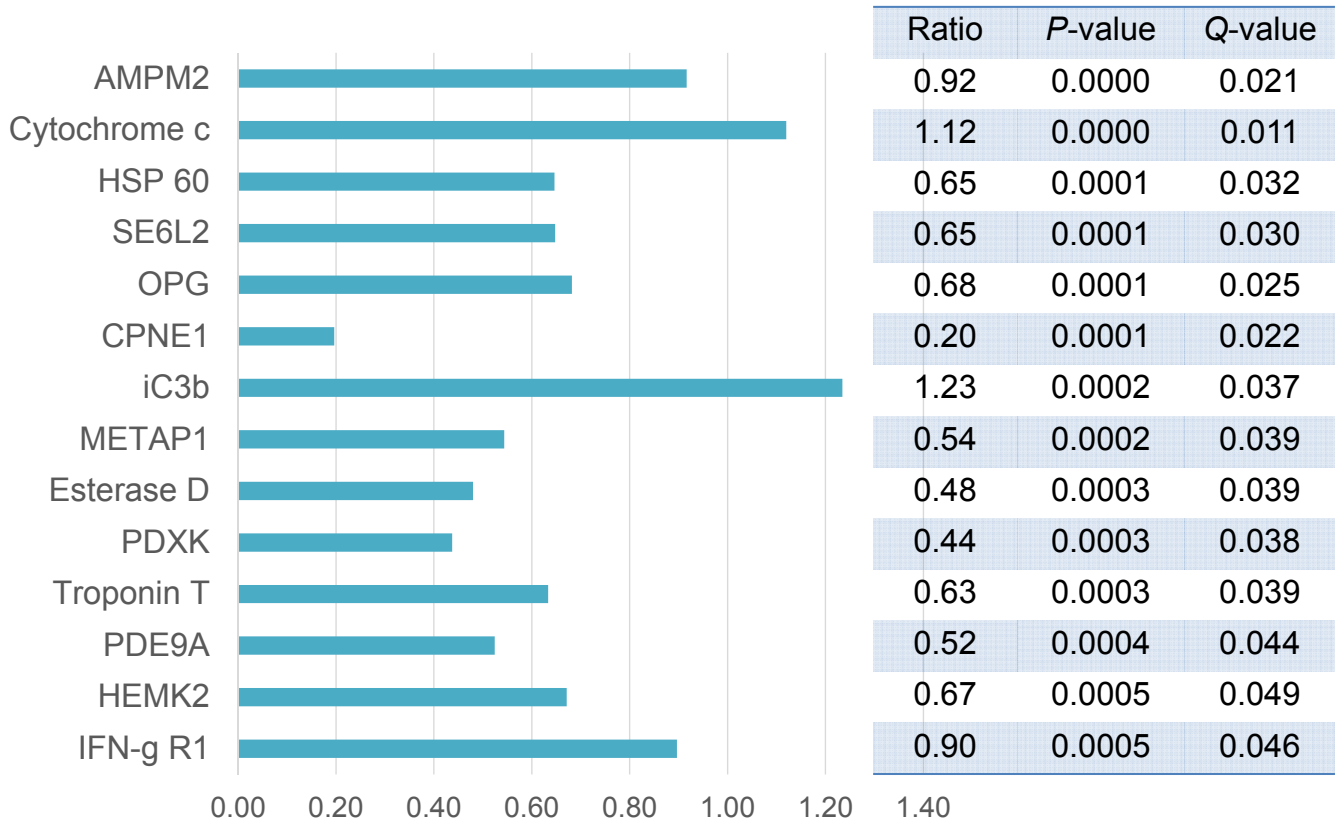
## CSFの品質に影響を与える因子（プロテオーム解析）

- 上表は、各々の条件でコントロールに対し、有意差のあった分子の数を表している。スチューデントt-testによるnominalな $P$ 値を用いた検定 ( $P < 0.05$ ) に加え、多重比較を考慮した検定（Benjamini-Hochberg法によるFalse Discovery Rateの $Q$ 値 $< 0.05$ ）も行った。
- False Discovery Rate (FDR)  $Q < 0.05$ にて有意差のあった分子の数は、室温 ( $25^\circ\text{C}$ ) 24時間静置の際に2分子、保存用チューブの種類の違い（ポリプロピレン vs タンパク質低吸着処理）による比較で14分子、保存温度の違い ( $-80^\circ\text{C}$  vs  $-20^\circ\text{C}$ ) で2分子、融解再凍結10回行った際に5分子であった。

#90



## 低吸着 vs polypropyleneチューブ



#91

## ⑤保存用チューブの種類により量が変わる分子（プロテオーム解析）

- 保存用チューブの種類により影響を受けたタンパク質として、14分子が検出された。
- Methionine aminopeptidase 2 (AMPM2)、mitochondrial 60 kDa heat shock protein (HSP 60)、Seizure 6-like protein 2 (SE6L2)、Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (OPG)、Copine-1 (CPNE1) Methionine aminopeptidase 1 (METAP1)、S-formylglutathione hydrolase (Esterase D)、Pyridoxal kinase (PDXK)、Troponin T、High affinity cGMP-specific 3', 5'-cyclic phosphodiesterase 9A (PDE9A)、HemK methyltransferase family member 2 (HEMK2)、Interferon gamma receptor 1 (IFN- $\gamma$  R1) のように、低タンパク質吸着チューブによる保存に比べ、ポリプロピレンチューブによる保存では減少する分子が多かったが、Cytochrome c、inactivated Complement C3b (iC3b) のように、ポリプロピレンチューブの方が濃度が高いタンパク質もあった。

#92

### ③即時処理 vs 25°C-24hr

Target	ratio	P	q
GAPDH、liver	0.026	8.9E-06	0.012
6-Phosphogluconate dehydrogenase	0.016	2.7E-05	0.017

### ⑥保存温度(-80°C vs -20°C)

Target	ratio	P	q
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A (RANK)	0.59	1.2E-05	0.016
Inducible T-cell costimulatory (ICOS)	0.44	5.2E-05	0.034

### ⑦融解再凍結0回 vs 10回

Target	ratio	P	q
Carbohydrate sulfotransferase 15 (ST4S6)	0.052	1.1E-07	0.00014
Heparin cofactor 2	0.073	1.4E-05	0.0089
C5a anaphylatoxin (C5a)	1.9	6.1E-05	0.027
Lipopolysaccharide-binding protein (LBP)	0.12	8.0E-05	0.026
Stem cell growth factor-alpha (SCGF- $\alpha$ )	0.19	9.8E-05	0.026
Leucine carboxyl methyltransferase 1	1.7	3.0E-04	0.049

#93

## その他の要因で量が変わる分子（プロテオーム解析）

- 室温（25°C）に24時間静置したために有意に変化した分子として、GAPDHと6-Phosphogluconate dehydrogenaseが検出された。即時処理CSFに比べ、各々約1/40、1/60に減少していた。
- 保存（4週間以上）により有意に変化した分子として、Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A（RANK）、Inducible T-cell costimulatory（ICOS）が認められた。-80°C保存に比べ、-20°C保存では、それらの分子は各々0.59、0.44まで減少していた。
- 融解再凍結により影響を受けた分子として、6分子が検出された。融解再凍結を10回行うことでCarbohydrate sulfotransferase 15（ST4S6）、Heparin cofactor 2、Lipopolysaccharide-binding protein（LBP）、及びStem cell growth factor-alpha（SCGF- $\alpha$ ）は減少したが、C5a anaphylatoxin（C5a）やLeucine carboxyl methyltransferase 1のように、むしろ増加する分子も認められた。

#94

# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

---

- 第3部・・・ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク  
「生体試料の国際標準化への対応及び臨床オミックス検査への応用」
- 3-2 骨格筋
  - 【A】総論
  - 【B】ベストプラクティス
  - 【C】上記ベストプラクティスの根拠となるデータ

#95

## 【A】骨格筋の総論

---

- 骨格筋はゲノムを含むオミックス研究に対応できる生検病理組織検体のプロトタイプになる

生検材料の病理組織検査を行う際に、パラホルム固定が一般的である。しかしながら病理形態を維持させるこの固定法は分子構造に変化を与えるために、ゲノムを含むオミックス研究には不向きである。NCNPの生検骨格筋では、形態を維持しつつ、DNA、RNA、タンパク質を保持させる急速凍結法をこれまで35年以上行ってきており、ゲノムを含むオミックス研究を発展させるために必要な試料の取扱いのプロトタイプを提供できる。

- 凍結骨格筋試料取扱いは、他の病理組織試料への応用が可能

ゲノムや他のオミックス研究を進めるためには凍結試料を確保することが重要である。たとえば、脳の形成異常を特徴とする皮質異形成の一部では、異形成のある部位の細胞にのみ変異が見つかることが判明している。このような場合には最初から病理検査とともに遺伝子検査に適した試料採取が必要になる。最近の研究で血液を用いたゲノム解析でモザイクが比較的多いことも判明しており、罹患臓器の凍結病理試料の重要性が増している。また、あらゆる組織に病態が出現するミトコンドリア病等の解析には、罹患臓器の凍結試料の確保が診断や研究に不可欠である。したがって、骨格筋組織での凍結病理組織試料の取扱いが他の病理組織試料の研究資源確保やヒト以外の動物の研究にも参考になる。

#96

### 凍結組織試料の適切な採取・固定

1. 採取対象：病理診断による支障を来さない（患者に不利益を及ぼさない）よう、適切な採取部位よりゲノム研究等に用いる組織試料を採取する。採取部位について最低限の記載を残すべきである（例：左上腕二頭筋）。
2. 採取者：各症例の生検において、組織試料の採取の可否、適切な採取組織量を、筋疾患分野に精通した医師が判断する。
3. 採取時間：生検試料は、採取後可及的速やかに急速凍結固定する。可及的速やかに凍結固定を行えない場合には、生検検体を冷蔵庫（4℃）等に保管するものとする。4℃保管3時間以内を目安にして組織検体を採取する。
4. 採取量：ゲノム研究用検体の採取量は、凍結した生検検体をクリオスタット内で薄切する。-25℃のクリオスタット内で、直径5mm程度、厚さ10μm、30-50枚程度薄切することが適切である。
5. 組織の処理：採取検体はトラガカントゴムを用いてコルク片上に直立させ、液体窒素で冷却したイソペンタンに浸漬し、急速凍結を行う。



#97

### 凍結組織試料の長期保存・研究使用・運搬

1. 長期保存：最も望ましくは、研究使用に供するまで液体窒素保存容器（-180℃程度）、もしくは、超低温槽（-80℃）に保存する。同時に、試料の付随情報・保管場所等を、適切な管理アプリケーション・カタログデータベース等に登録する。
2. ゲノム・他オミックス等の研究用保存：30年未満の検体を使用することが望ましい（30年以上ではRNAの劣化が認められた）。
3. 研究使用：研究者に試料を提供するため超低温槽（-80℃）から試料を取り出す作業時は、ドライアイス上に取り出し、また他の試料への影響を最小限にするため極力手早く作業する。
4. 運搬：通常、温度保持が期待される非密閉移送容器（簡易的には発砲スチロール容器）にドライアイスを充填し、冷凍便により運送業者に輸送を委託する。診断施設に凍結筋検体を送付する場合には、世界保健機構（WHO）「感染性物質の輸送規制に関するガイダンス」に従う。病原体を含む可能性が明らかでない場合、同ガイドラインの「例外（Exceptions）」に該当するものとして扱うことが可能である。

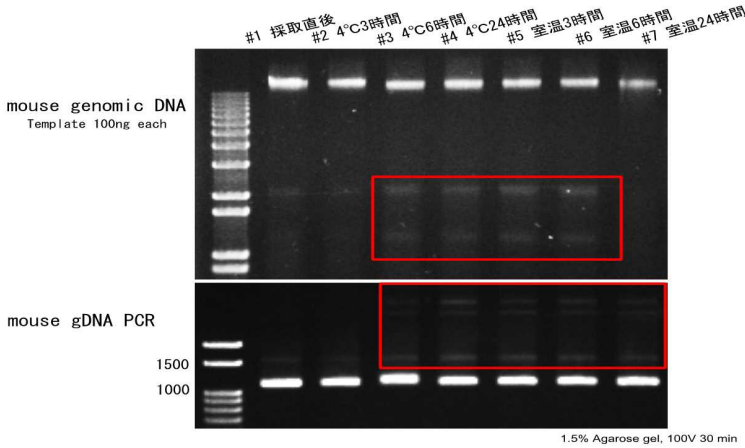
#98



# 【C】骨格筋のベストプラクティスの根拠となる実証解析データ

## 実証データの一部 (①、⑦、⑧)

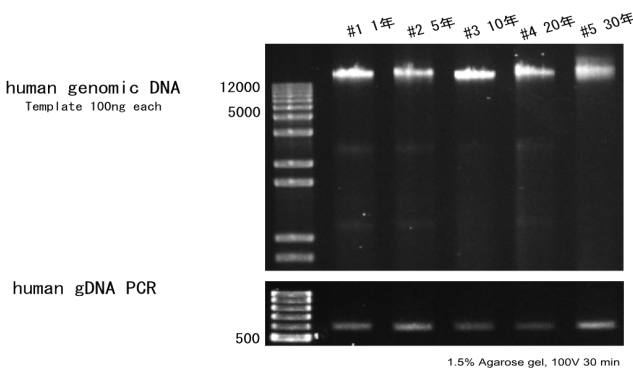
### ① 急速凍結までの時間・保管温度の影響 (DNA)



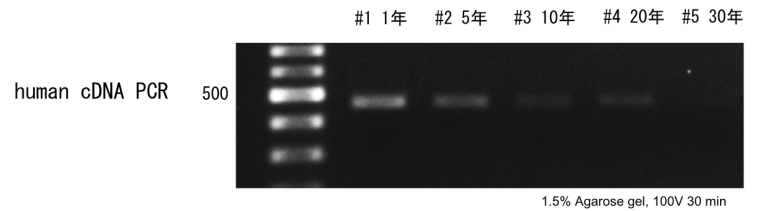
	手技	解析数	収量 (ng/μl)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
#1	抽出後速やかに、急速凍結	3	275±12.9	1.8±0.01
#2	4°C3時間保管後、急速凍結	3	237.7±36.1	1.8±0.01
#3	4°C6時間保管後、急速凍結	3	284.8±26.4	1.8±0.01
#4	4°C24時間保管後、急速凍結	3	352.8±14.7	1.8±0.01
#5	室温3時間保管後、急速凍結	3	374.7±35.3	1.8±0.03
#6	室温6時間保管後、急速凍結	2	249.3±192.5	1.2±1.0
#7	室温24時間保管後、急速凍結	2	244.56±57.8	1.49±0.4

4°C 6 時間以上、室温保管で  
DNAの剪断化を認めた

### ⑦ 長期保管の影響 (DNA)



### ⑧ 長期保管の影響 (RNA)



増幅長573bpの逆転写 (RT) -PCR法で評価

経年でRNAの品質が低下する

#99

## 骨格筋のベストプラクティスの根拠となる実証解析データ

- ① 急速凍結までの時間・保存温度のゲノムDNAの品質に対する影響
- ② 急速凍結までの時間・保存温度の品質にRNAに対する影響
- ③ 固定方法によるゲノムDNAの品質に対する影響
- ④ 固定方法によるRNAの品質に対する影響
- ⑤ 凍結方法によるゲノムDNAの品質に対する影響
- ⑥ 凍結方法によるRNAの品質に対する影響
- ⑦ 長期保存によるゲノムDNAの品質に対する影響
- ⑧ 長期保存によるRNAに対する影響
- ⑨ 運搬方法によるゲノムDNAの品質に対する影響
- ⑩ 運搬方法によるRNAの品質に対する影響
- ⑪ 融解によるゲノムDNAの品質に対する影響
- ⑫ 融解によるRNAの品質に対する影響

「ゲノム研究用病理組織検体  
取扱い規程」骨格筋版  
(分冊、PDF版) を参照



# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

---

- 第3部・・・ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク  
「生体試料の国際標準化への対応及び臨床オミックス検査への応用
- 3-3 心筋
  - 【A】総論
  - 【B】ベストプラクティス（案）
  - 【C】ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ

#101

## 【A】心筋の総論

---

- 研究用病理組織検体の適切な採取部位は、日本病理学会編「ゲノム研究用病理組織検体取り扱い規程」に準拠する。
  - 本報告で対象とする研究用組織検体はホルマリン未固定の新鮮凍結組織である。採取した検体から抽出され解析対象となるものはDNA・RNA・タンパク質等であり、いかなる解析にも使用できる質の高い検体を採取するためには、新鮮検体の中から適正な部位を選択し、適正な手順で採取することが求められる。
  - 心内膜側の肉柱や心外膜脂肪を避け、心筋部位を採取する。
  - 病的心臓では線維化が認められることが多い。線維化部位は白色調で、境界明瞭なことが多く、触ると硬い。採取は避けた方がよいが、他に採取可能な部位がなければ線維化ありと明記して採取しておく。
- 凍結組織検体の適切な採取・保管・移送方法は、日本病理学会編「ゲノム研究用病理組織検体取り扱い規程」に準拠する。
  - 本報告では、DNA・RNA・タンパク質等の変性を最小限にし、高い品質を保持して長期の保管を可能にし、将来に亘って汎用性を最大にすることを旨とし、オミックス研究に供する病理凍結組織の適切な取扱い方法を定める。

#102

## ■ DNA/RNAの基本品質管理として実施すべき事項

DIN/RIN、収率、dsDNA濃度、OD(260/280比)

## ■ 各オミックス解析における取扱い規程への提案

■ NCVCバイオバンクで実施している取扱い法を次ページ以降の5ページで示した。

● **ゲノム解析**：NCVCバイオバンクの既定取扱い法で可

● **エピゲノム解析**：NCVCバイオバンクの既定取扱い法で可

-80℃における保管期間は、6年以内が望ましい（推定）。

● **トランスクリプトーム解析**：

死亡後あるいは手術時摘出後、6時間以内でRIN6以上が必要と推定。

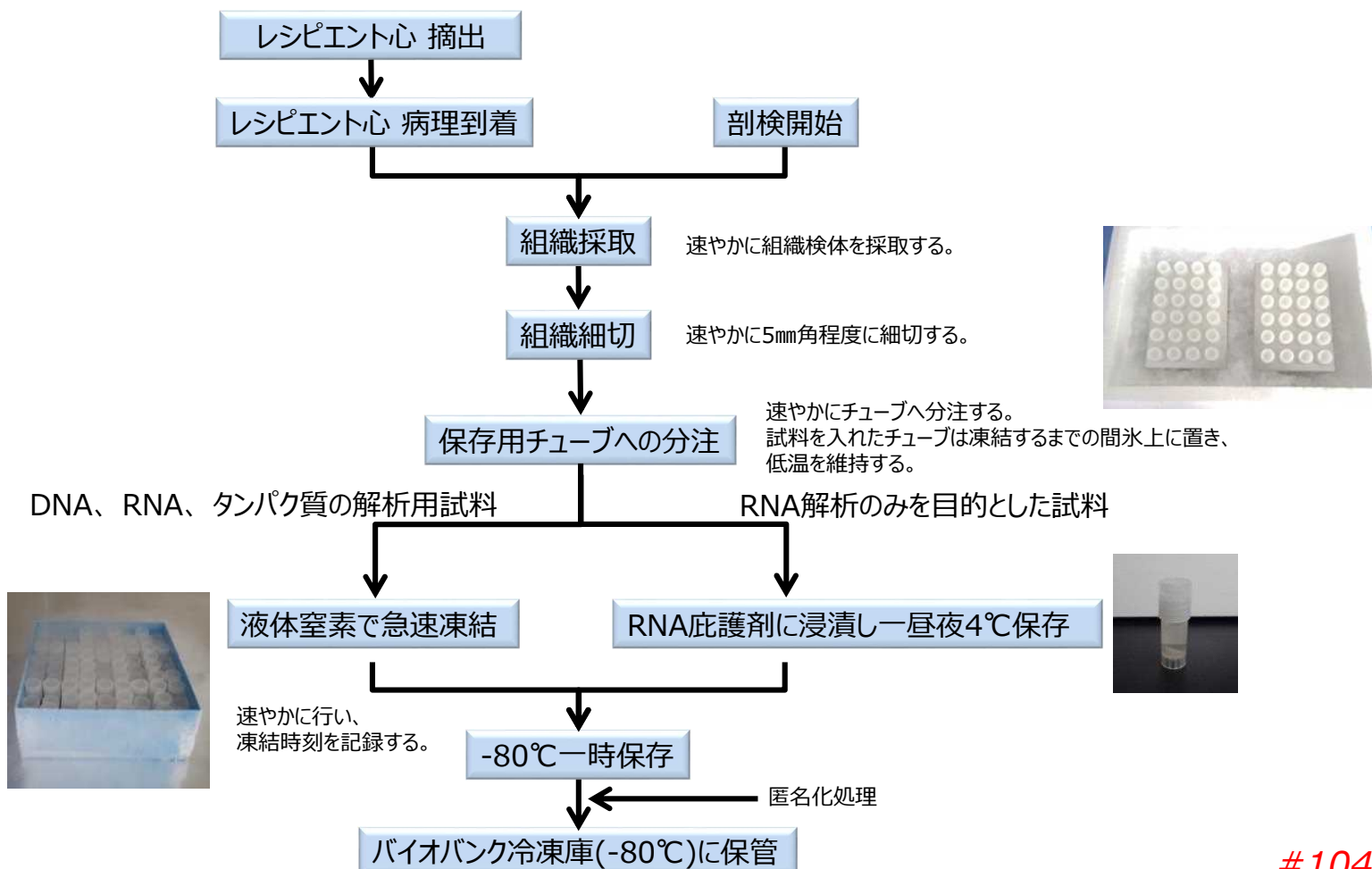
今回のRNA-seq 解析(random primer法でcDNA作成)では、結果に大きな変化が認められず、異なる調製法、解析法による比較が必要。

● **プロテオーム解析**：

死亡や手術時摘出後、6時間を超えるとプロテアーゼによる消化・分解が増加し、定量性に問題が発生する可能性があり、6時間以内に凍結することが望ましい。

#103

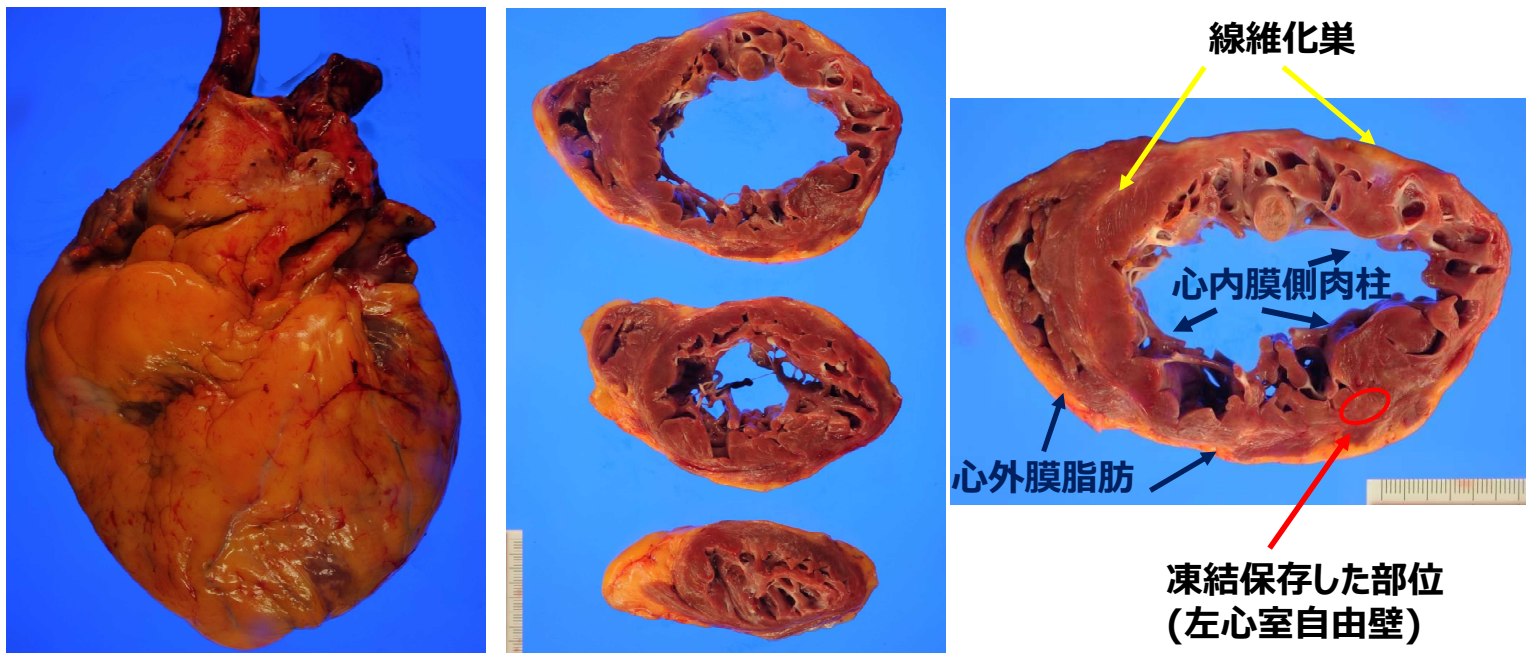
## 移植および剖検における組織凍結作業の流れ



#104

### 剖検時摘出心（拡張型心筋症症例）

#### バイオバンクにおける心筋組織の収集方法



#105

## バイオバンクにおける心筋組織の収集方法（剖検心の例）

- 剖検までの間、遺体冷蔵庫保管が望ましい。
- クラッシュアイスを用意しておく。
- 剖検開始後まず開胸し、ただちに心嚢を開いて心臓摘出。
- 摘出心を8mm厚の水平断にスライスする。マクロ撮影後、ただちにon iceとする。
- 乳頭筋レベルのスライスで、左室自由壁から心外膜脂肪、心内膜側肉柱を除いた心筋層中心部で肉眼的に線維化の無い部位から5mm角組織を収集（on ice、複数個収集）。
- 心室中隔、右室からも同様の方法でサンプリングする。
- 組織を凍結用チューブ（Thermo Fisher Scientific）に入れ液体窒素凍結後、-80℃で保管。

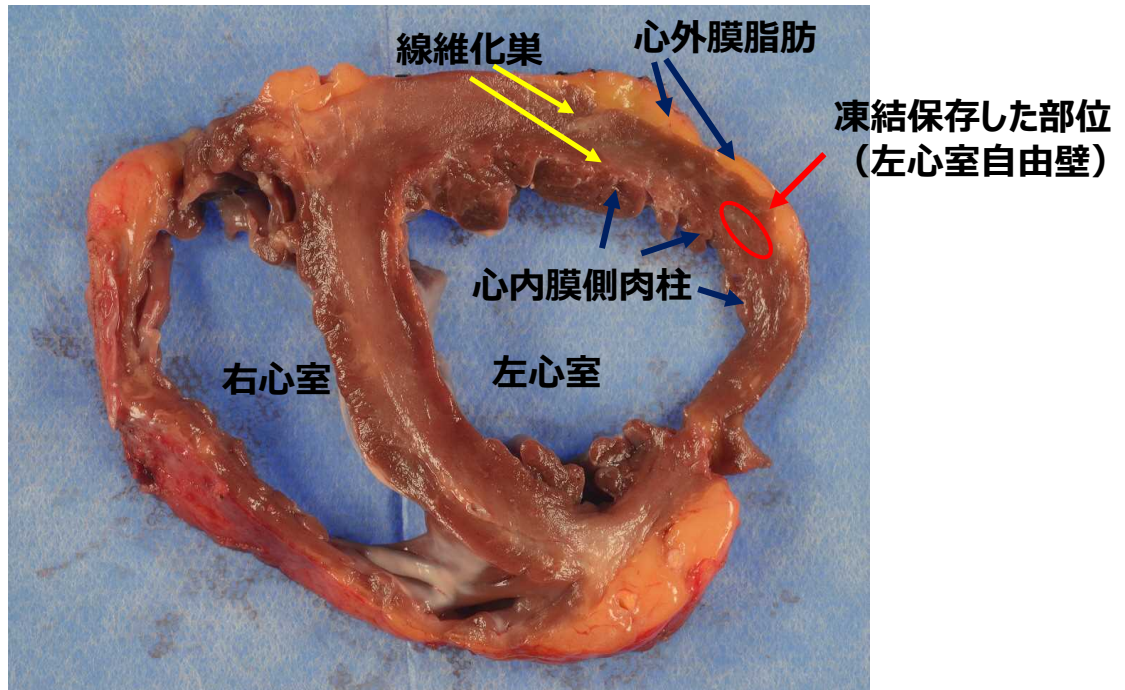
※上記の各ポイントにて作業内容、時間や温度の記録を行う。

#106



### 移植時摘出レシピエント心（拡張型心筋症症例）

バイオバンクにおける心筋組織の収集方法



#107

## バイオバンクにおける心筋組織の収集方法（移植時摘出心の例）

- 手術室にて体外循環による血流の停止、心臓摘出。
- 心摘出から病理部へ搬送まで on ice（1時間以内、心臓外科・移植医療部による検証に要30分）。
- 病理部にて摘出心を8mm厚の水平断にスライス。マクロ撮影後凍結準備をする。
- 乳頭筋レベルスライスから、左室自由壁の心外膜脂肪、心内膜側肉柱を除いた心筋層中心部で肉眼的に線維化の無い部位から5mm角組織を収集する（on ice、複数個収集）。可能であれば心室中隔、右室からも同様の方法でサンプリングする。
- 組織を凍結用チューブ（Thermo Fisher Scientific）に入れ液体窒素凍結、-80℃で保管。

※上記の各ポイントにて作業内容、時間や温度の記録を行う。

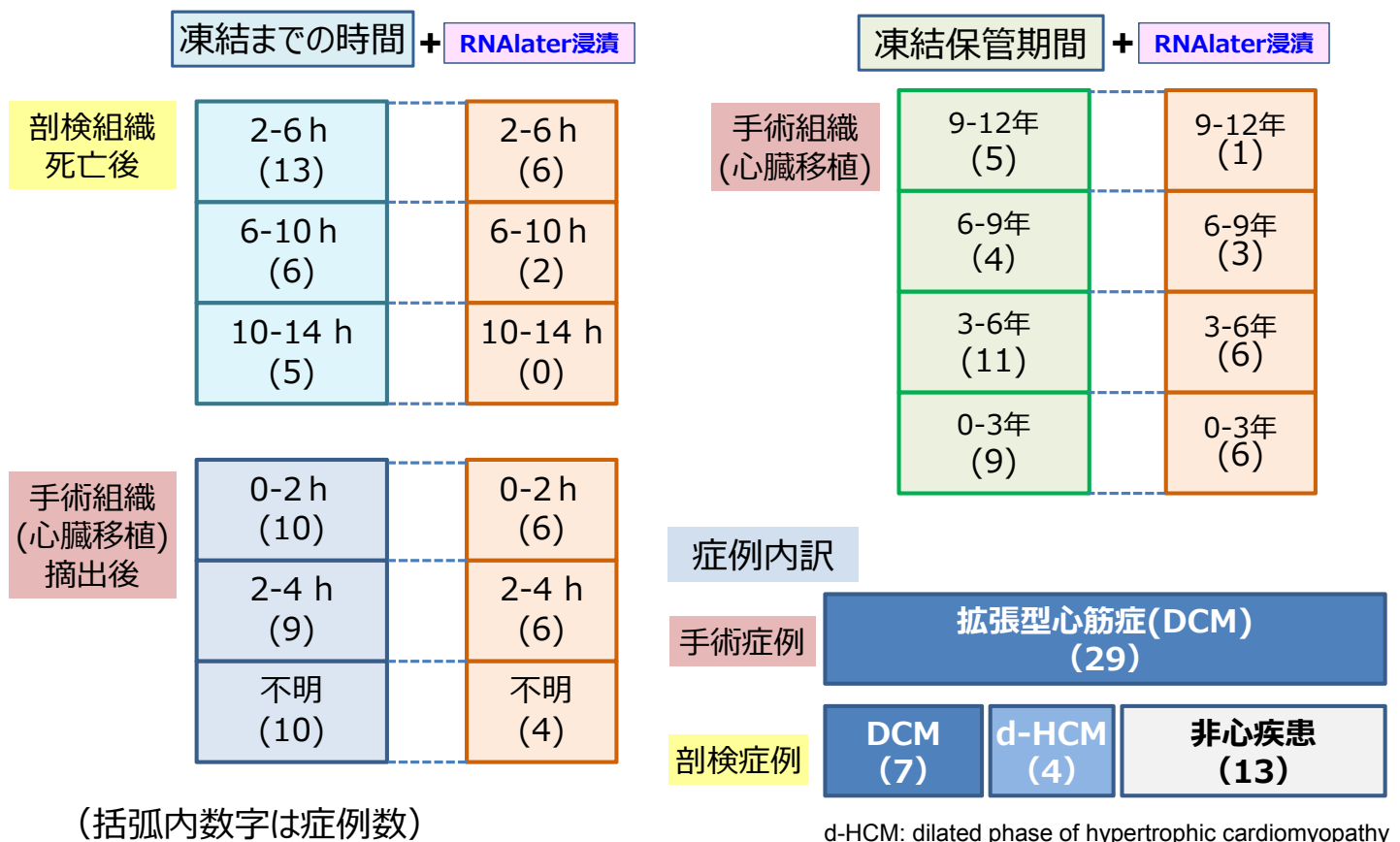
#108

## 【C】ベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ

- **目的**：NCVCバイオバンクに保管済の心筋組織を用いて、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム解析を実施。得られた解析結果に基づき、オミックス解析用心筋組織の取扱い規程を提出する。
- **対象**：特発性心筋症（主に拡張型心筋症）の左室自由壁心筋組織  
 症例数：手術症例（心臓移植時摘出されたレシピエント心）29例、  
 剖検例（特発性心筋症11、非心臓死対照13）24例  
 （保存期間、凍結までの時間などの詳細は、次図を参照。方法の詳細は後述）
- **品質評価**：DIN/RIN、収率、dsDNA濃度、OD(260/280比)など
- **ゲノム解析**：TruSight Cardio 174遺伝子エクソンのNGS解析  
 SNPアレイ解析（Japonica Array）ToMMoとの共同研究
- **エピゲノム解析**：DNAメチル化アレイ解析(Infinium MethylationEPIC BeadChip, 850K) 慶應大学・金井弥栄教授との共同研究
- **トランスクリプトーム解析**：RNA-seq 解析（rRNA 除去後、random primerで cDNA合成、library作成、HiSeq3000で1.2億リード以上で実施）大阪大学・中村昇太准教授との共同研究
- **プロテオーム解析**：非標識比較定量法（2DICAL法）

#109

### バイオバンク保管の心筋組織試料を用いた解析の概要



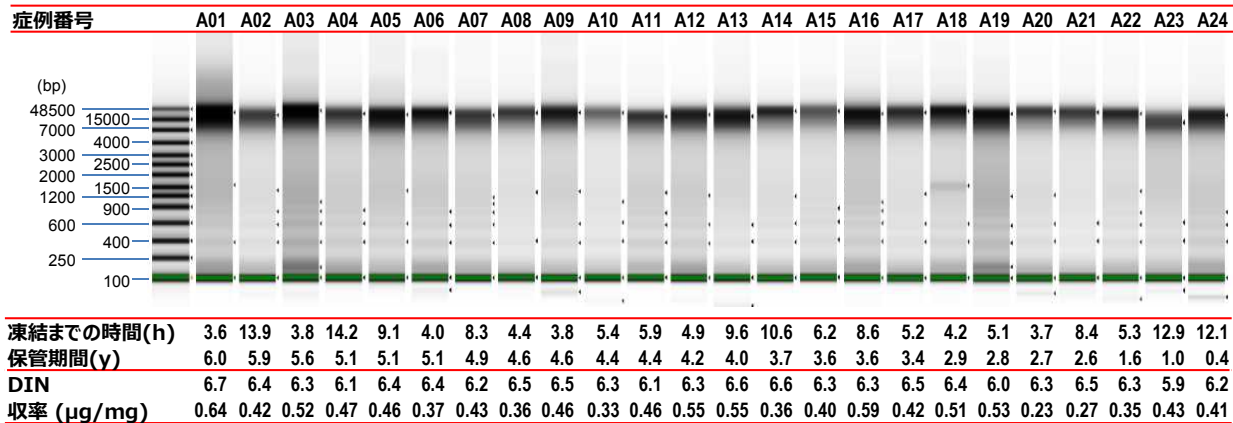
#110



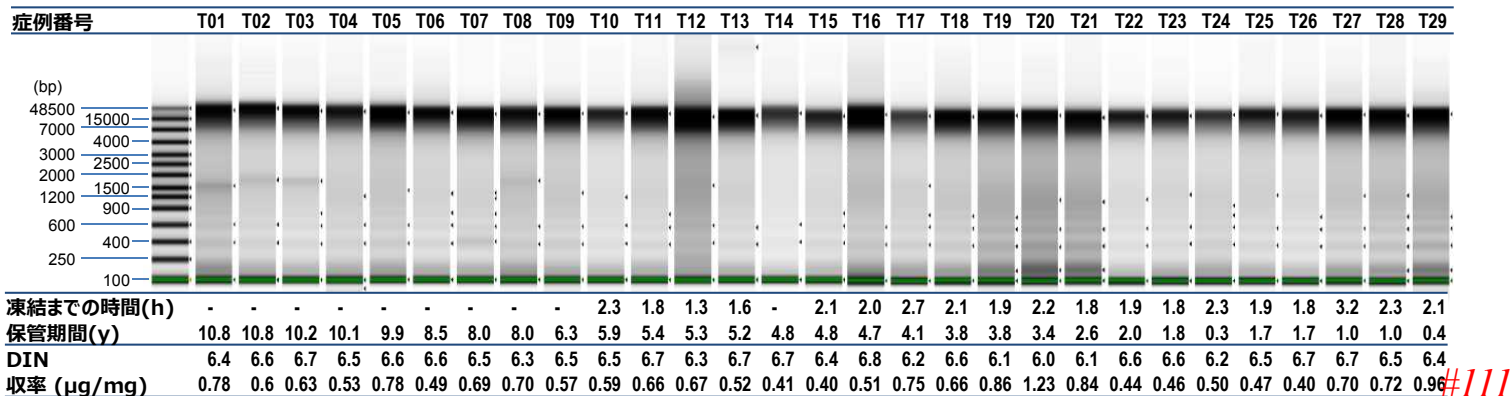
# 実証データ1： ゲノムDNAの抽出と品質評価

## 電気泳動像、凍結までの時間、保管期間、DIN及び収率

### 剖検心



### レシピエント心

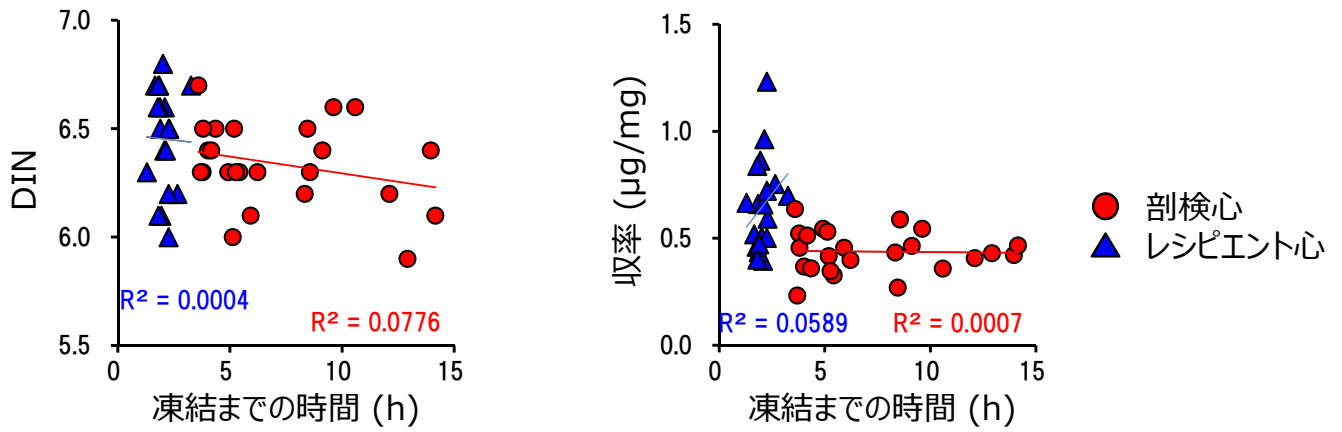


## ゲノムDNAの抽出と品質評価 (その1)

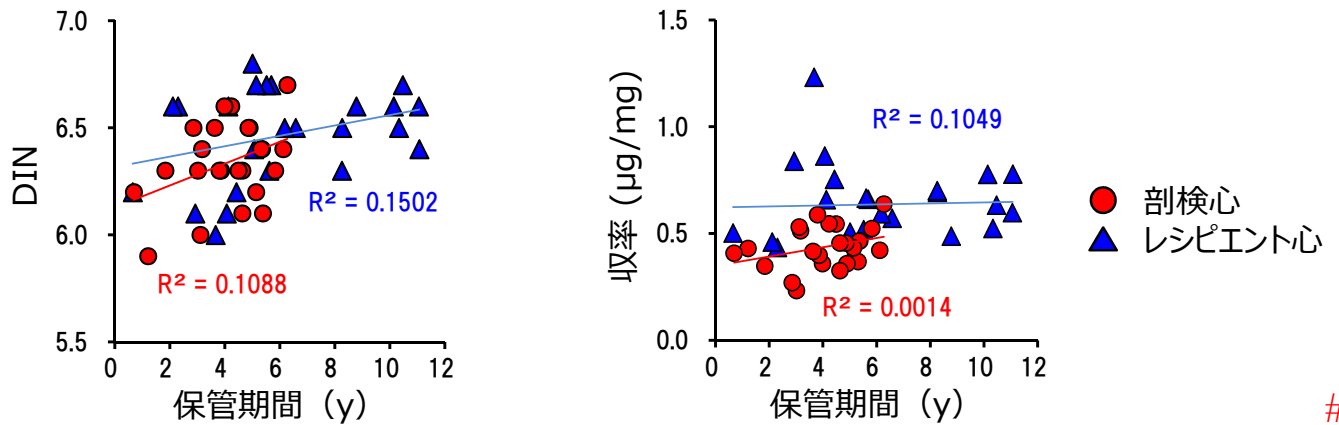
レシピエント心29例、剖検心24例の左心室自由壁より採取した新鮮凍結組織試料からゲノムDNAを抽出し、濃度測定及び電気泳動、DIN測定を行い、凍結までの時間及び保管期間の影響を検討した。

- 採取した組織は液体窒素で急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ の超低温冷凍庫内で保管した。「凍結までの時間」は、レシピエント心は心臓が摘出された時点から、剖検心は患者が死亡した時点から、液体窒素での急速凍結までの経過時間とした。
- 約20mgの組織試料から、QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) でDNAを抽出した。試料の破碎は、卓上型破碎装置シェイクマスターネオ (BMS) を用いたビーズ破碎で実施した。NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) で吸光度を測定し、4200 TapeStation (Agilent) で電気泳動及びDIN測定を行った。
- 急速凍結までの時間が約14時間、及び保存期間が約10年までの検討においては、レシピエント心及び剖検心の試料から抽出したDNAのDINは5.9-6.8に分布し、ばらつきが小さかった (平均6.42、標準偏差0.21)。

## 凍結までの時間のDIN及び収率に対する影響



## 保管期間のDIN及び収率に対する影響



#113

## ゲノムDNAの抽出と品質評価（その2）

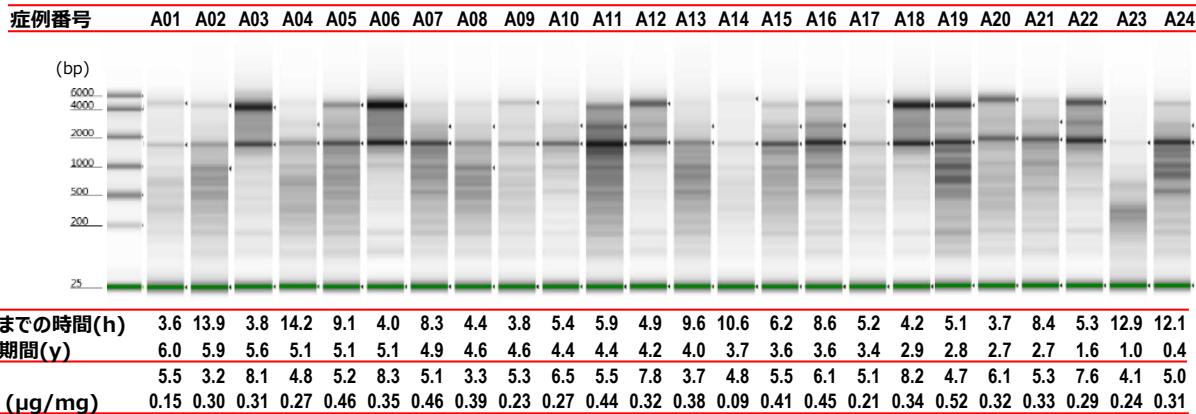
- 凍結までの時間に依存したDINの低下及び収率の低下は、ほとんど認められなかった。
- 保管期間に依存したDINの低下及び収率の低下は、ほとんど認められなかった。
- ◎ 現在の収集・保管条件であれば、DNAの品質の低下はほとんど認められなかった。

#114

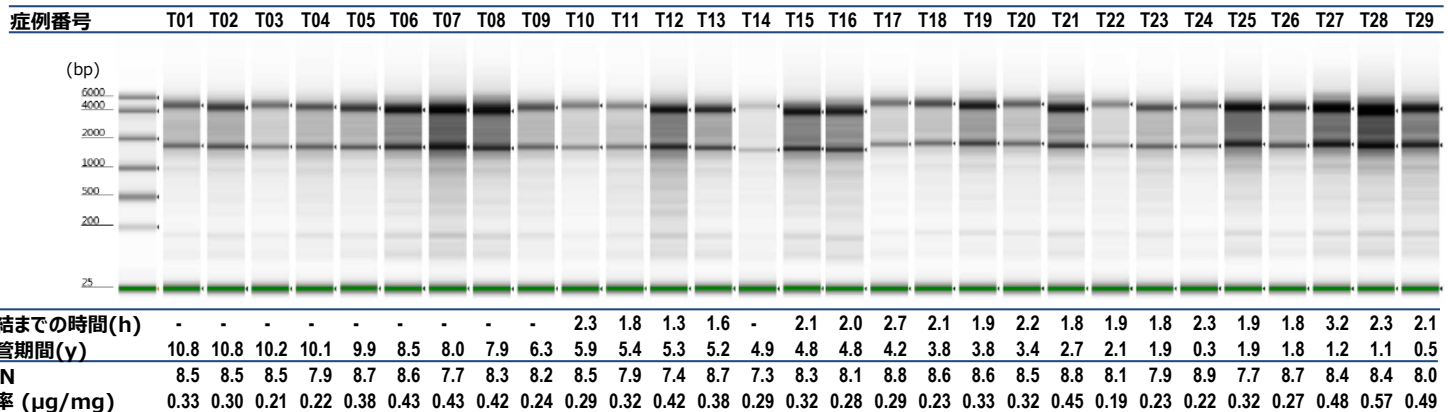
# 実証データ3： 全RNAの抽出と品質評価（その1）

## 電気泳動像、凍結までの時間、保管期間、RIN及び収率

### 剖検心



### レシピエント心



#115

## 全RNAの抽出と品質評価（その1）

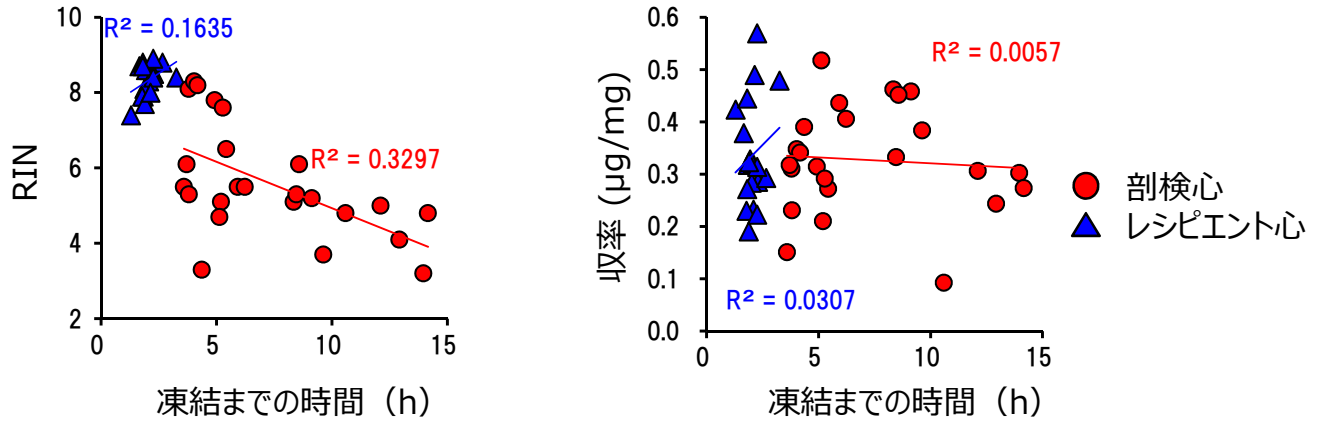
レシピエント心29例及び剖検心24例の左心室自由壁より採取した新鮮凍結組織試料から全RNAを抽出し、濃度測定及び電気泳動、RIN測定を行い、凍結までの時間及び保管期間の影響を検討した。

- 採取した組織は液体窒素で急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ の超低温冷凍庫内で保管した。「凍結までの時間」は、レシピエント心は心臓が摘出された時点から、剖検心は患者の死亡した時点から、液体窒素での急速凍結までの経過時間とした。
- 約20mgの組織試料をQIAzol Lysis Reagent (QIAGEN)中で破碎し、miRNeasy Mini kit (QIAGEN)を使用して、RNAを抽出した。試料の破碎には、ホモジナイザーT10ベーシック (IKA)を使用した。NanoVue (GE Healthcare)を使用して吸光度を測定し、4200 TapeStation (Agilent)を使用して電気泳動及びRIN測定を行った。
- レシピエント心は、全ての症例で凍結までの時間は4時間以内（1.3-3.5時間）で、RINは7.3-8.9に分布し、良好かつばらつきは小さかった（平均8.4、標準偏差0.42）。一方、剖検心では、RINは3.2-8.3に分布し、ばらつきが大きかった（平均5.6、標準偏差5.3）。

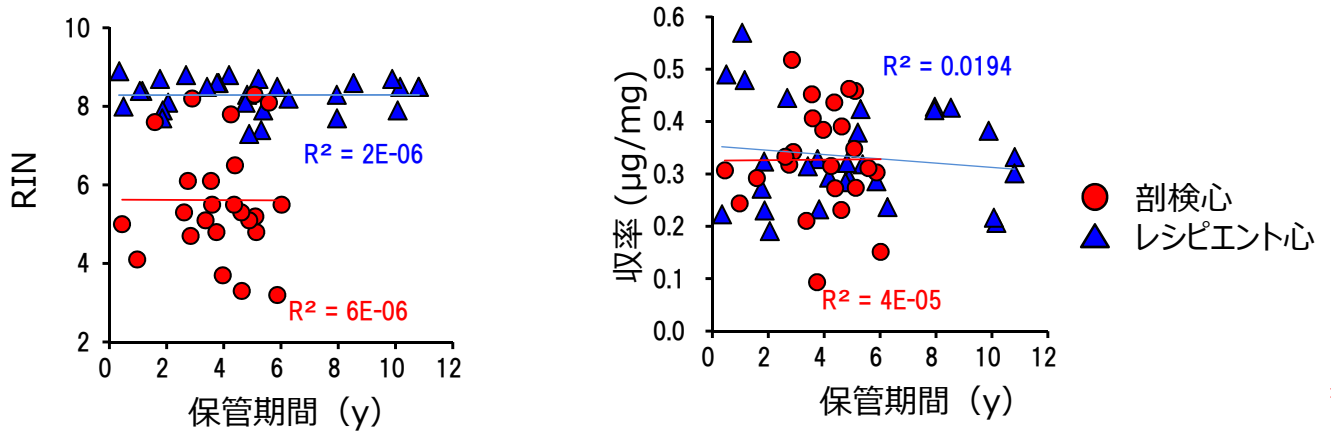
#116

# 実証データ4： 全RNAの抽出と品質評価（その2）

## 凍結までの時間のRIN及び収率に対する影響



## 保管期間のRIN及び収率に対する影響



#117

# 全RNAの抽出と品質評価（その2）

## 凍結までの時間のRINに対する影響

### レシピエント心

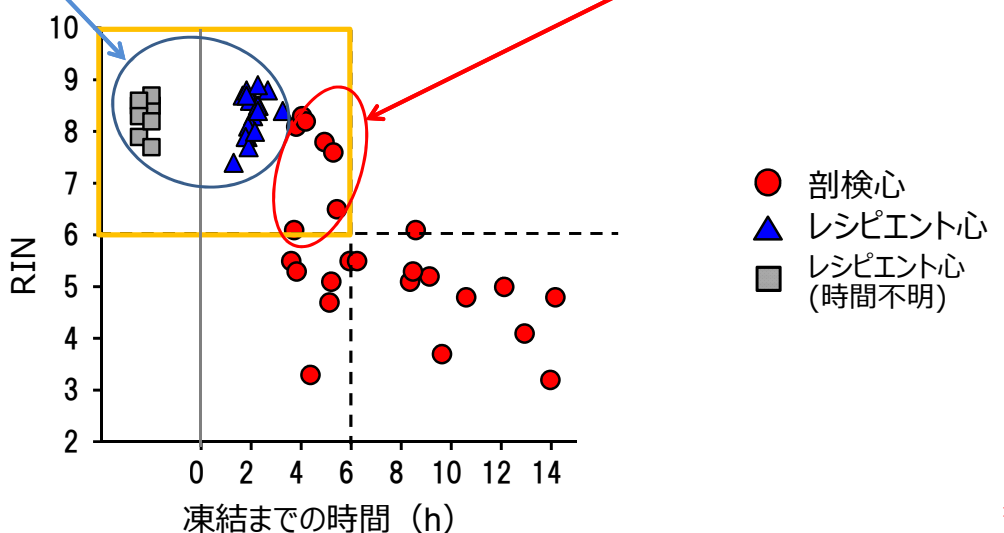
抽出後4時間以内に凍結された試料、時間不明な試料を含め、全て RIN ≥ 6

### 剖検心

死亡後6時間以内ならば、約半数の試料は RIN ≥ 6

		RIN					計
		< 6	≥ 6	≥ 7	≥ 8	≥ 9	
の凍結までの時間	0 - 2h	0	0	4	6	0	10
	2 - 4h	0	0	0	9	0	9
	不明	0	0	3	7	0	10

		RIN					計
		< 6	≥ 6	≥ 7	≥ 8	≥ 9	
の凍結までの時間	2 - 6h	6	2	2	3	0	13
	6 - 10h	5	1	0	0	0	6
	10 - 14h	5	0	0	0	0	5



#118

## 全RNAの抽出と品質評価（その2）

---

- レシピエント心で、凍結までの時間に依存したRINの低下は認められなかった。
- 剖検心では、凍結までの時間とRINの間で弱い負の相関が認められた。
- レシピエント心、剖検心で、凍結までの時間に依存した収率の低下は認められなかった。
- レシピエント心、剖検心で、RIN及び収率ともに、保管期間との間に有意な相関は認められなかった。
  
- 剖検心で、死亡後、6時間以内に採取・凍結した13試料のうち7試料で、RINが6以上だった。一方、6時間以上経過した11試料のうち、RINが6以上だったのは、1試料だった。
  
- ◎ 剖検心で凍結までの時間とRINの間で弱い負の相関が認められたため、心筋組織採取では試料の凍結までの時間を短くすることが望ましいと思われる。
- ◎ 剖検例で凍結までの時間が6時間以内でも約半数の心筋試料でRIN<6であったため、凍結までの時間が短くても、RNA解析に際しては注意を要する。
- ◎ トランスクリプトーム解析（RNA-seq解析）の結果からは、RINの低い試料（<6）でも発現データ取得は十分可能であったので、死亡後に凍結までの時間が6時間以上でも、解析法によっては利用できる可能性がある。
- ◎ -80°Cの超低温冷凍庫に保存した組織試料は、保管期間が約10年までは、抽出したRNAの品質低下は小さい。

#119

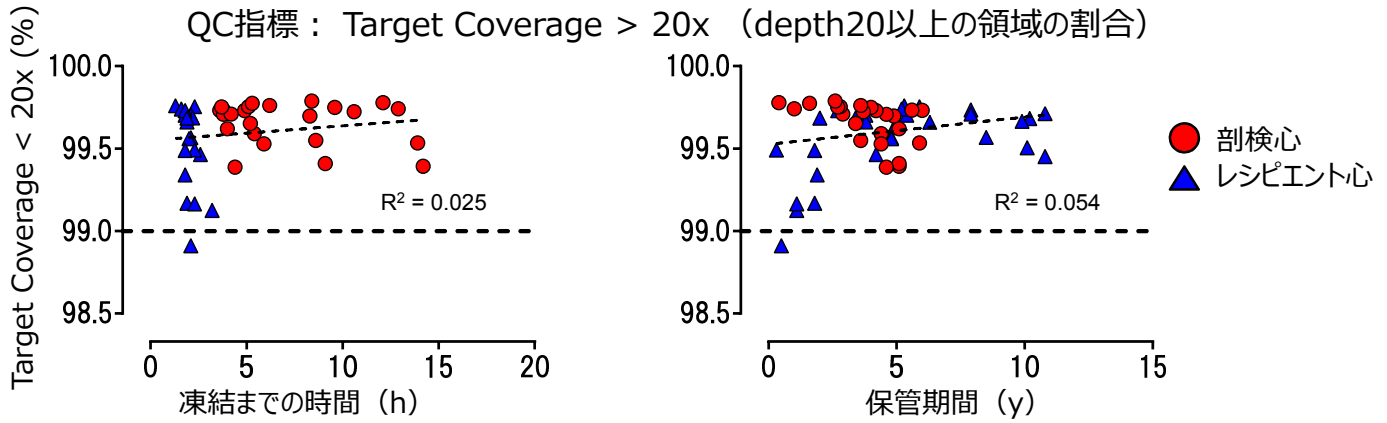
---

#120



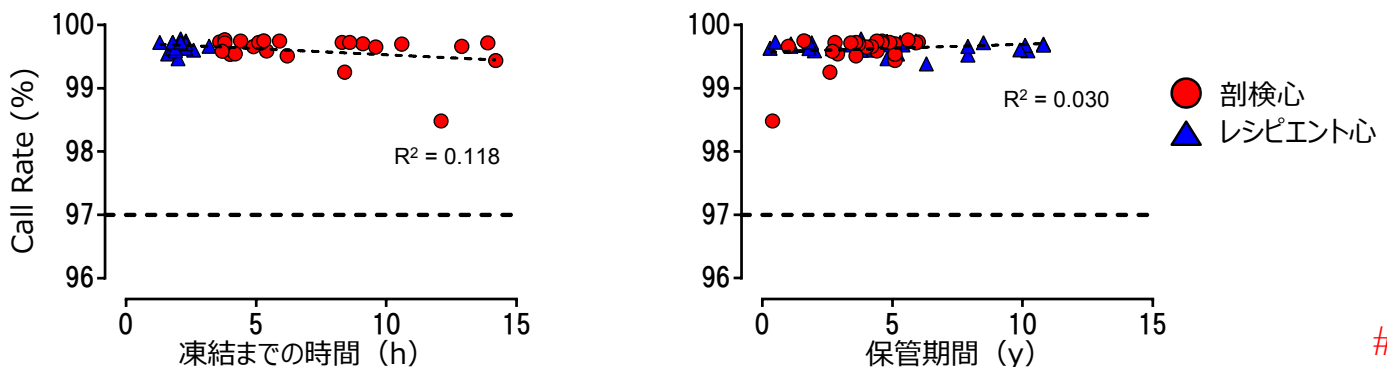
## ターゲット遺伝子シーケンスパネル解析

QC指標： Target Coverage > 20x (depth20以上の領域の割合)



## SNPジェノタイピングアレイ解析

QC指標： Call Rate (ジェノタイプを特定できたSNPの割合)



#121

## ゲノム解析データに基づく品質評価

レシピエント心29例、剖検心24例の左室自由壁組織より抽出したDNAを用いて、2種類のゲノム解析を実施した。

### ターゲット遺伝子シーケンスパネル解析

- 50 ngのゲノムDNAについて、TruSight Cardio Sequencing Kit (イルミナ、FC-141-1010) の標準プロトコルに従い、タグ化、標的配列濃縮、増幅によりライブラリーを調製し、MiSeq (イルミナ) を用いたNGS解析を実施した。
- データ品質は、Target Coverage > 20x (depth20以上の領域の割合) により評価した。
- 心筋組織の凍結までの時間、及び保管期間の影響は小さかった。
- レシピエント心1例を除き、全症例で基準 (>99%) を満たした。

### SNPジェノタイピングアレイ解析

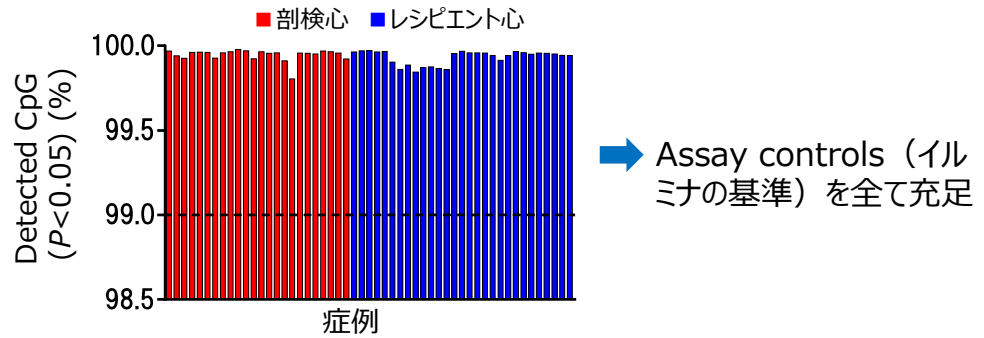
- ToMMoとの共同研究により、Japonica Arrayによる解析を実施した。
- データ品質はCall Rate (ジェノタイプを特定できたSNPの割合) により評価した。
- 心筋組織の凍結までの時間、及び保管期間の影響は小さかった。
- 全症例でCall Rateの基準 (>97%) を満たした。

◎ 上記より、前述の既定取扱い法に基づく心筋組織の収集・保管条件であれば、ゲノム解析には問題ない品質を保持していると判断した。

#122

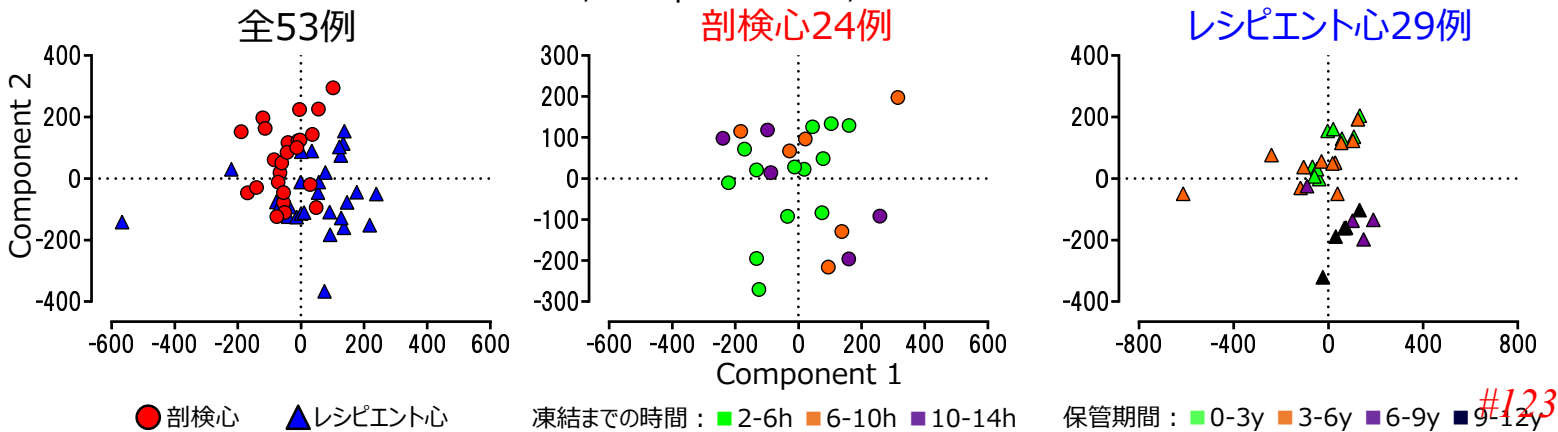
## DNAメチル化アレイ解析

QC指標： Detected CpG（検出シグナル数）



## DNAメチル化解析結果のPCA解析

TSS1,500bp以内の189,983プローブ



## エピゲノム解析データに基づく品質評価

レシピエント心29例、剖検心24例の左室自由壁組織より抽出したDNAを用いて、エピゲノム解析を実施した。

### DNAメチル化アレイ解析

- 慶應義塾大学との共同研究により、MethylationEPIC BeadChip 850K（イルミナ）を用いて、85万サイトのDNAメチル化率を測定した。
- データ品質はDetected CpG（検出シグナル数）、及びAssay Controls（イルミナの基準）により評価した。
- 全ての試料でDetected CpGの基準（>99%）の基準を満たし、他のAssay Controlsにおいても問題は認められなかった。

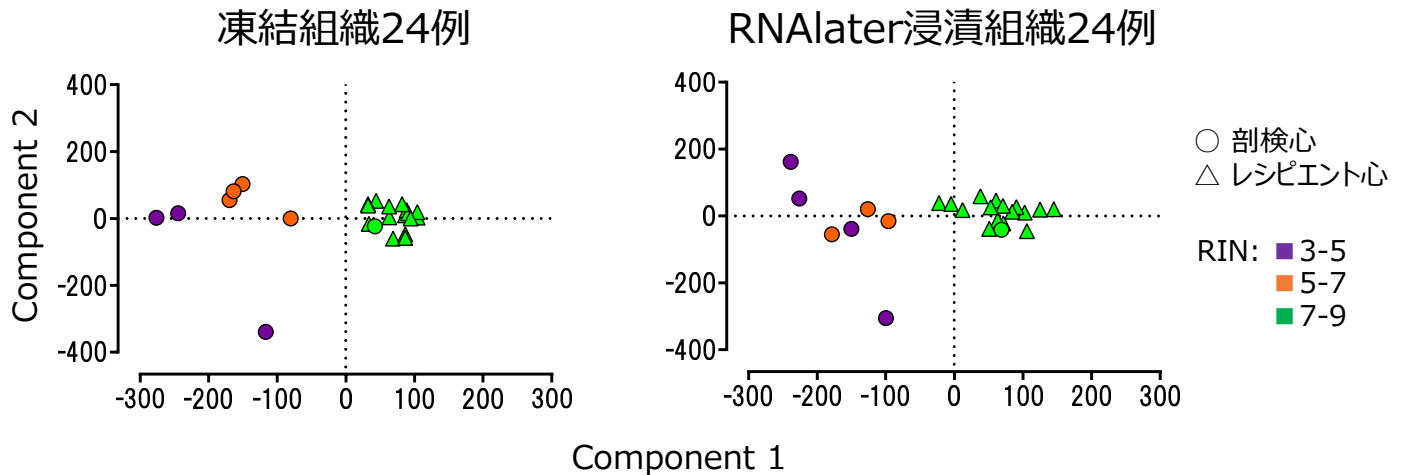
### DNAメチル化解析結果のPCA解析

- 転写開始点（TSS）から1,500bp以内のCpGサイト（189,983プローブ）のメチル化率を用いたPCA解析を実施した。
- 全症例の解析では、レシピエント心と剖検心とは明確に区分されなかった。
- 剖検心において、凍結までの時間の影響はほとんど認められなかった。
- レシピエント心では、保管期間（6年以上と以下）において相違が認められた。
- 保管期間による解析結果の変動要因は不明であるが、保管期間6年以上の試料を用いたエピゲノム解析では、保管期間に留意して解析が必要である。

- ◎ 現在の収集・保管条件であれば、エピゲノム解析に問題ないと判断した。

## RNA-Seq解析結果のPCA解析

60,502遺伝子の発現量



#125

## トランスクリプトーム解析データに基づく品質評価（その1）

レシピエント心16例、剖検心8例の左心室自由壁の凍結組織、及びRNAlater浸漬組織から抽出した2種類のRNAを用いて、トランスクリプトーム解析（RNA-seq解析）を実施した。

### RNA-seq解析

- 抽出した1ugのRNAについて、TruSeqStranded Total RNA with Ribo-Zero Gold Kit（イルミナ、RS-122-2301、2302）の標準プロトコルに従ってライブラリーを調製し、大阪大学微生物病研究所との共同研究により、HiSeq3000（イルミナ）を用いた解析（1.2億リード／サンプル）を実施した。

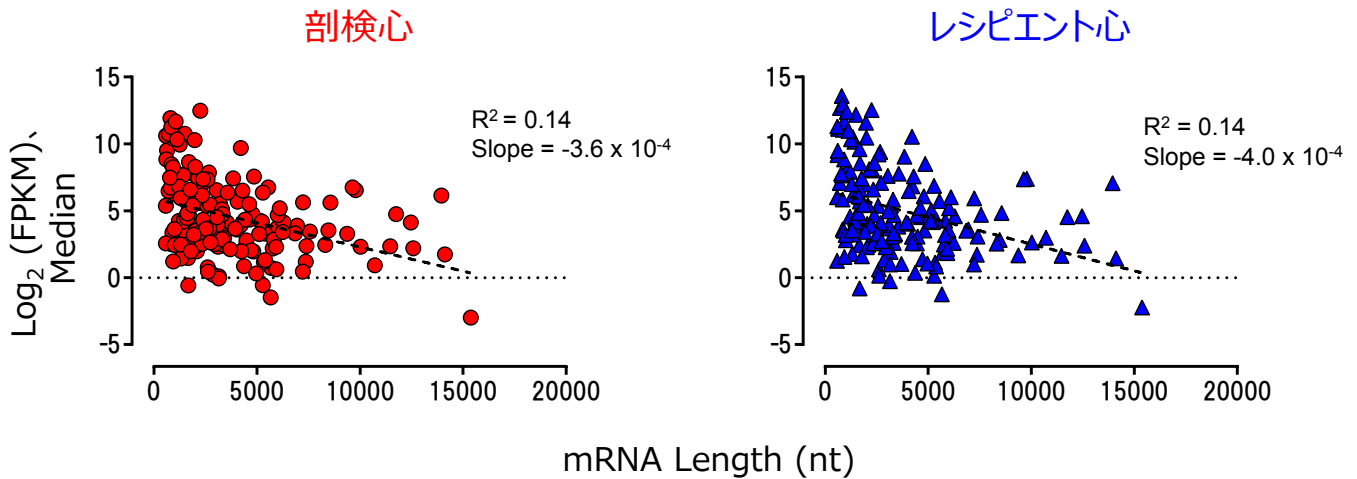
### RNA-seq解析結果のPCA解析

- アイソフォーム情報を含む60,502遺伝子の発現データを用いたPCA解析により、2種類のRNA試料間の違いを評価した。
- 凍結組織とRNAlater浸漬組織由来のRNAで明確な相違は認められず、RNAlaterの影響は、本解析においては小さいと判断された。
- PCA解析の結果では、レシピエント心と剖検心由来のRNAに大別され、RINの高低と類似した分布を示した。

#126

## mRNA鎖長と発現量の相関

心疾患関連遺伝子&ハウスキーピング遺伝子（167遺伝子）



#127

## トランスクリプトーム解析データに基づく品質評価（その2）

### mRNA鎖長と発現量の相関

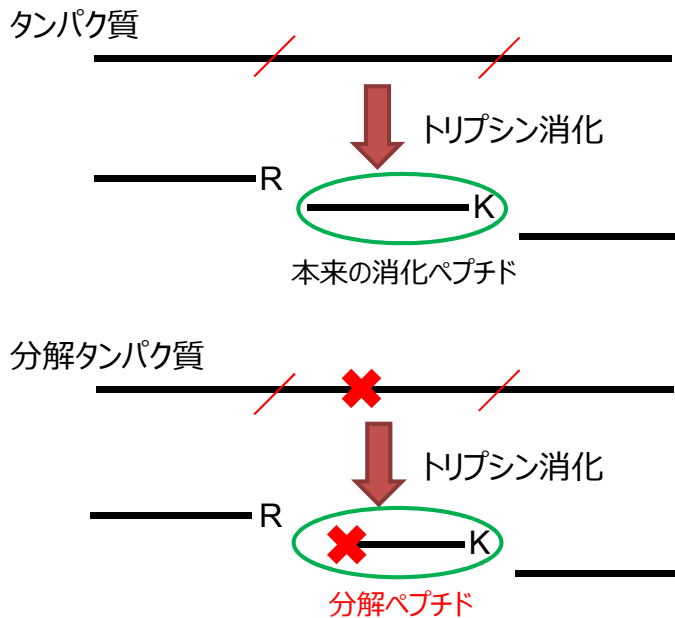
- 心疾患関連遺伝子及びハウスキーピング遺伝子の計167遺伝子について、mRNA鎖長と発現量の関連を、レシピエント心と剖検心に分けて、それぞれ比較した。
- RINが低下している剖検心の長鎖RNAにおいても、mRNAの検出頻度の低下は認められなかった。
- 本研究の解析法では、RINの低い試料（<6）でも発現データ取得は十分に可能であると考えられた。
- ◎ 以上の検討より、前述の既定取扱い法に基づく心筋組織の収集・保管条件であれば、今回の逆転写、ライブラリ作成を含むRNA-seq解析には問題ない品質を保持していると判断された。
- ◎ RNAの電気泳動像、RIN等の結果からは、剖検心においてRNAの品質低下は顕著であるので、今回とは異なる解析法による比較検討が必要である。
- ◎ 心筋組織においては、RNAlaterによる核酸保護作用に顕著な違いは認められなかった。

#128

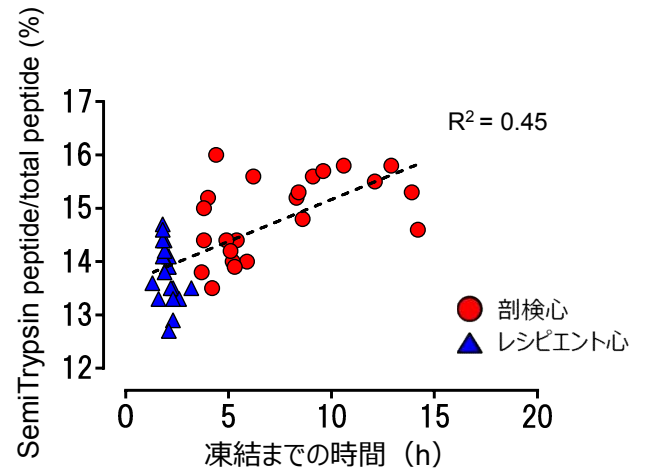
## トリプシン消化物のnanoLC-MS/MS解析

タンパク質の消化・分解により、トリプシン以外の切断部位を含むペプチド断片が生じる割合を評価

分解タンパク質検出法の模式図



N端/C端がKR以外で切断されたペプチドの全トリプシン消化ペプチドに対する割合



#129

## プロテオーム解析データに基づく品質評価

レシピエント心29例、剖検心24例の左室自由壁組織由来の心筋組織片を対象に、タンパク質をトリプシンで消化後、プロテオーム解析を実施した。

### トリプシン消化物のnanoLC-MS/MS解析

- 約10mgの組織を凍結粉碎し、そのうち5分の1量を解析に使用した。熱変性後にトリプシンで十分に消化・脱塩を行い、nanoLC-MS/MS (Triple TOF5600、AB Sciex) により取得した質量分析データについて、2DICALソフトウェアによる非標識比較定量解析を実施した。
  - タンパク質の消化・分解により生成するトリプシン以外の切断部位を含むペプチドの、トリプシン切断ペプチドに対する割合を評価した。
  - 凍結までの時間と相関して、KR以外で切断されたペプチドの割合が増加することが明らかとなった。
  - 分解ペプチド/非分解ペプチドの定量結果に基づく消化・分解の評価方法を作成することが必要である。
- ◎ 前述の既定取扱い法に基づく心筋組織の収集・保管条件であれば、凍結までに6時間を経過した場合は、タンパク質が消化・分解を受け、定量結果に影響が出る可能性が示唆された。

#130



# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

---

- 第3部・・・ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク  
「生体試料の国際標準化への対応及び臨床オミックス検査への応用」
  - 3-4 がん (FFPE)
    - 【A】総論
    - 【B】ベストプラクティス (案)
    - 【C】ベストプラクティス (案) の根拠となるデータ

#131

## 【A】がんの総論

---

- FFPEがん組織検体の作製に関するベストプラクティスについては、日本病理学会の作成した「ゲノム研究用病理組織検体取り扱い規程」にすでに詳細に記載されている。本章は、バイオバンク等に保管されているFFPEがん組織検体を、臨床オミックス検査への応用を考えたゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム解析に用いる場合のベストプラクティス (案) について、研究開発分担者の市川 仁、河野隆志、土原一哉 (国立がん研究センター [NCC])、金井弥栄 (慶應義塾大学)、間野博行 (東京大学) の経験を基に、記載するものである。本章で提示する実証データは、ゲノム解析についてはNCCバイオバンク検体及び他院取り寄せ検体をTOP-GEARプロジェクト\*において検査し蓄積されたもの、エピゲノム解析についてはNCCバイオバンク検体を使用して慶應義塾大学及びいわて東北メディカルメガバンク機構において取得したものの、トランスクリプトーム解析についてはNCCバイオバンク検体を使用してNCCにおいて取得したものである。

\*TOP-GEARプロジェクト：

標準治療を終了したがん患者を主な対象として約100遺伝子のNGS遺伝子パネル検査を行い、臨床試験エントリー等の治療選択に用いる、NCCにおいて行われている臨床研究である (Tanabe et al, 2016)。

#132

### 1. FFPEがん組織検体の処理・確認

#### 1-1. FFPEがん組織検体の薄切

- ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム解析においては、通常の組織学的解析より、検体相互のコンタミネーションの影響を強く受ける。新たな検体を薄切する度に、マイクロームの刃を交換するとともに、周囲を清掃することを推奨する。

#### 1-2. FFPEがん組織検体の確認

- 多くのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム解析において、偽陰性を防ぐためには、それぞれ一定レベル以上の腫瘍細胞を含んだ検体が必要である（実証データ1の図Aを参照：[#139](#)）。核酸抽出用の薄切を行う際、1枚目及び最後の薄切をHE染色し、確かに目的とするがん組織であることを確認するとともに、検体中の腫瘍細胞含有率を計測することを推奨する。また、稀ではあるが、他症例由来組織が混入している場合がある（実証データ1：[#139](#)）。解析に必要な腫瘍細胞率を満たさない場合、明らかなコンタミネーションが見られる場合には、マクロダイセクションを行うことを推奨する。

#133

### 2. ゲノム解析

#### 2-1. FFPEがん組織検体からのDNA抽出と定量

- FFPE組織検体から抽出されたDNAの濃度測定には吸光度ではなく、蛍光色素法を用いることを推奨する。組織体積当りのDNA収量は検体ごとに大きく異なり、検体組織の大きさから収量を予測することは難しい（実証データ2：[#141](#)）。TOP-GEARプロジェクトにおける経験によれば、 $1\text{mm}^3$ の組織量があれば、8割程度の確率で手術検体では $0.5\mu\text{g}$ 以上の、生検検体では $1.9\mu\text{g}$ 以上のDNAを得ることができると予想される。

#### 2-2. 抽出されたDNAの品質評価とNGS解析

- FFPE組織検体由来DNAの品質は検体ごとに大きく異なり、NGS解析に用いた場合に得られるデータの品質（リード重複率、読み取り深度）も影響を受ける（実証データ3：[#143](#)）。品質の良／不良はNGS解析においてまず一次ライブラリーの収量に現れ、一次ライブラリーの収量とリード重複率及び読み取り深度は強い相関を示す。過固定、長期保管等が、DNAの品質不良を引き起こすと考えられる。ゲノム解析に全く適さない検体もあるため、解析開始前に品質評価を行うことを推奨する。ゲノム解析用の品質評価法として、定量PCR測定DNA量（A）と蛍光法測定DNA量（B）の比、すなわちPCR増幅可能DNA比率（A/B）が有効である（実証データ3：[#143](#)）。

#134

---

## 2-3. 品質に対応したNGSゲノム解析用ライブラリー調製

- 低品質DNAが一次ライブラリーの低収量を引き起こす主要な原因は、断片化、塩基修飾等により酵素反応の基質となり得るDNA分子数が少ないためと考えられる。したがって、低品質DNAであっても、ライブラリー調製に用いる出発DNA量を増やすことでNGSデータの品質改善が得られる場合がある（実証データ4：#145）。逆に、高品質DNAであれば、出発DNA量を減らしても一定レベル以上の品質のNGSデータ取得が可能な場合がある（実証データ4：#145）。

## 2-4. コンタミネーションの評価

- 実証データ1（#139）に示すような検体を事前に除いたとしても、保存FFPEがん組織検体には目視で認識できない他症例組織が混入している場合があり、変異解析において他症例のSNP及び変異を解析対象症例の変異として誤検出してしまうことがある（実証データ5：#147）。生検検体等の微小組織（低DNA収量）検体では、ごくわずかな量のコンタミネーションが結果に影響するため、特に注意が必要である。可能な場合には、得られたNGSデータに対しコンタミネーション検出プログラムによる評価を行うことが推奨される。

#135

---

## 3. エピゲノム解析

### 3-1. InfiniumアレイDNAメチル化解析

- 標準的な方法で作製されたFFPE組織検体から抽出したDNAで、イルミナ社のInfiniumアレイを用いたDNAメチル化解析は十分に実施可能である（実証データ6：#149）。この時、同社のFFPE DNA Restorationキットを用いた修復反応を実施することを推奨する（実証データ7：#151）。出発DNA量は豊富である（推奨500ng）ほどよいが（実証データ8：#153）、50 ng程度でも信頼性のあるデータが取得できたので、小さな生検検体・マイクロダイセクション検体適用できると考えられた。

### 3-2. NGS DNAメチル化解析

- 現状では、FFPE組織検体から抽出したDNAで、ターゲットキャプチャ法によるNGS DNAメチル化解析を実施するのは困難であり（実証データ9：#155）、Infiniumアレイ解析を選択するのが妥当である。

#136

---

## 4. トランスクリプトーム解析

### 4-1. FFPEがん組織検体からのRNA抽出

- DNAの場合と同様に、FFPE組織検体から得られる組織体積当りのRNA収量は検体ごとに大きく異なり、検体組織の大きさから収量を予測することは難しい（実証データ10：#157）。肉腫手術検体を対象とした解析の経験によれば、1mm<sup>3</sup>の組織量があれば、8割程度の確率で0.1 µg以上のRNAを得ることができると予想される。

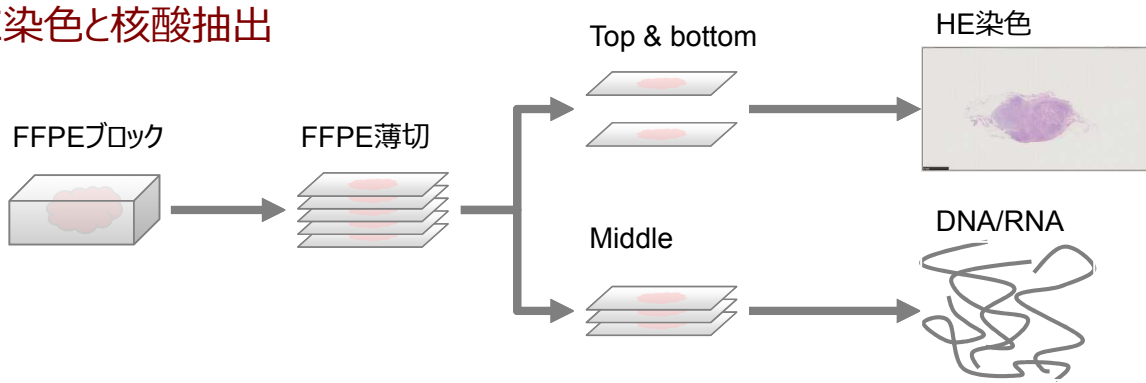
### 4-2. 抽出されたRNAの品質評価とNGS解析及びnCounter解析

- FFPE組織検体由来RNAは概ね強く断片化されているが、断片化の状態は検体ごとに大きく異なる（実証データ11：#159）。以前はこのように断片化されたFFPE組織検体由来RNAではNGS解析は困難と考えられていたが、ライブラリー作製にターゲットキャプチャー法を用いることである程度可能となっている。それでも、断片化の状態はNGS解析データの品質に強く影響し、断片化の亢進は高リード重複率につながる。nCounter解析においては、断片化の亢進は低シグナルにつながる。両解析に堪えられないほど断片化している場合もあり、解析開始前にRNA断片化の評価を行うことを推奨する。一方、FFPE検体由来RNAの品質不良が何に由来するかについては、断片化状態と強い相関を示す指標は得られず（実証データ11：#159）、はっきりしなかった。 #137

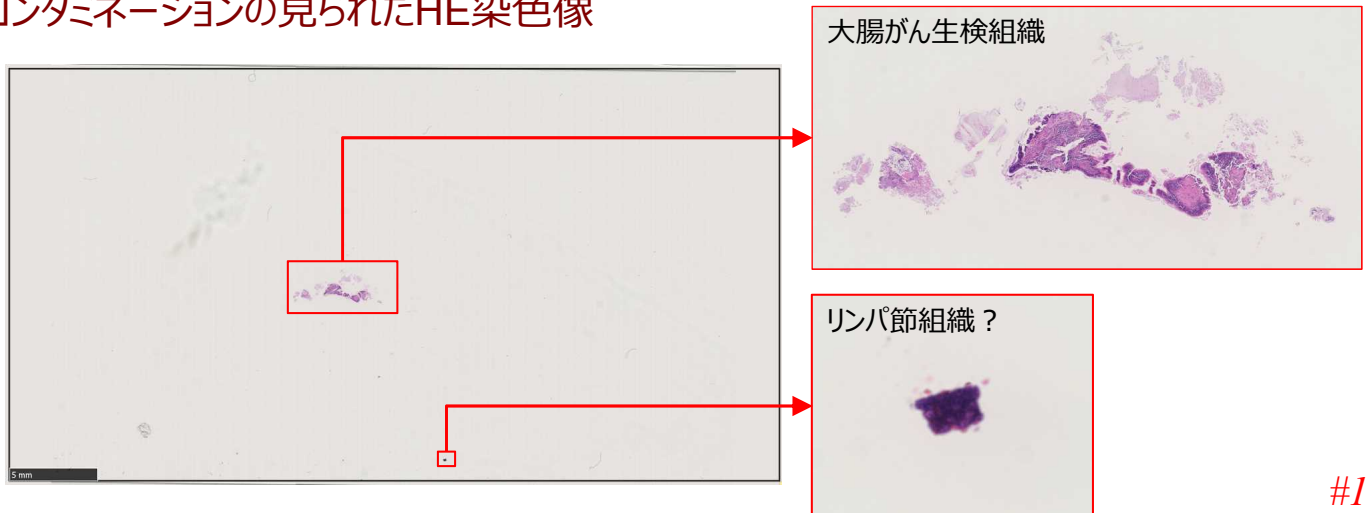
## 【C】がんのベストプラクティス（案）の根拠となる実証解析データ

実証データ1： FFPEがん組織検体の薄切と、コンタミネーションが見られたHE染色像

### A. HE染色と核酸抽出



### B. コンタミネーションの見られたHE染色像



#139

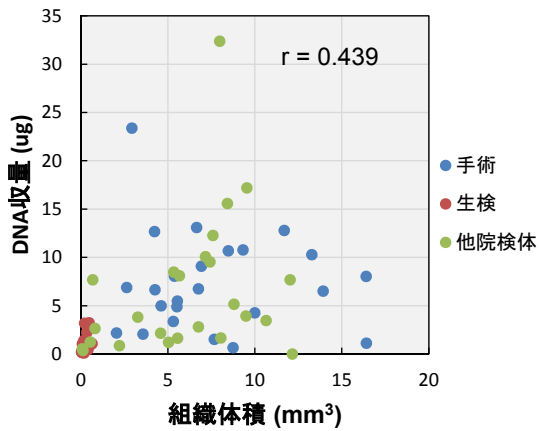
## FFPEがん組織検体の薄切と、コンタミネーションが見られたHE染色像

- (A) FFPEがん組織検体から核酸抽出を行う際には、合わせてHE染色による組織の確認を行うことが推奨される。TOP-GEARプロジェクトでは、FFPEがん組織検体からDNAを抽出する際には、1枚目及び最後の薄切をHE染色し、検体中のおおよその腫瘍細胞含有率を推定している。
- (B) HE染色の結果、明らかな別組織の混入が目視で確認できる場合がある。

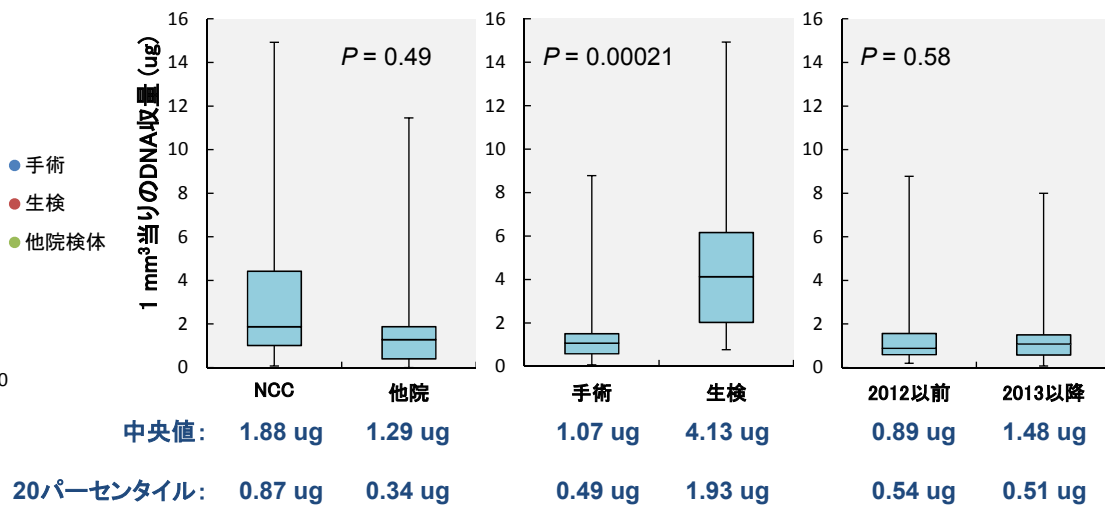
#140



## A. 組織体積とDNA収量



## B. 単位体積当りの収量の比較



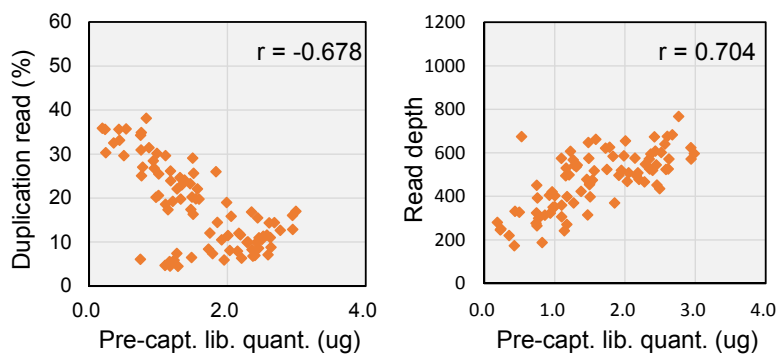
#141

# FFPEがん組織検体から抽出されるDNAの量

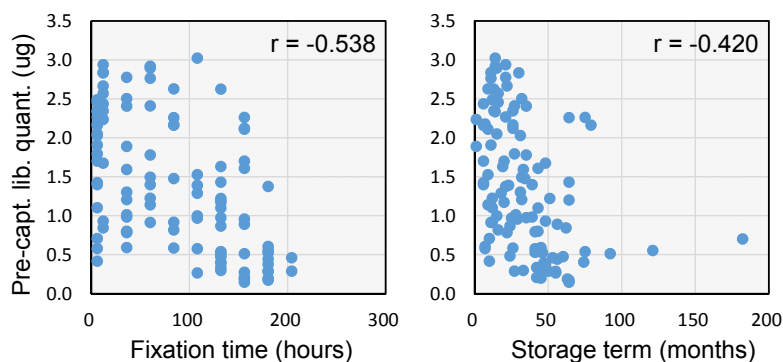
- (A) TOP-GEARプロジェクトにおいて解析された77症例の多がん種のFFPEがん組織検体について、組織体積とDNA収量を比較した結果である。TOP-GEARプロジェクトにおいては、10μm×5の薄切から、キアゲン社のQIAamp DNA FFPE Tissue Kitを用いてDNAを抽出している。組織断面積を計測し、その測定値に50μmをかけて組織体積を計算した。単位体積当りのDNA収量は検体ごとに大きく異なる。
- (B) 単位体積当りの収量を、国立がん研究センター（NCC）検体と他院取り寄せ検体、NCC検体中の手術検体と生検検体、NCC手術検体中の2012以前の検体と2013年以降の検体で比較した結果である。生検検体の方が手術検体より単位体積当りのDNA収量が高い。

#142

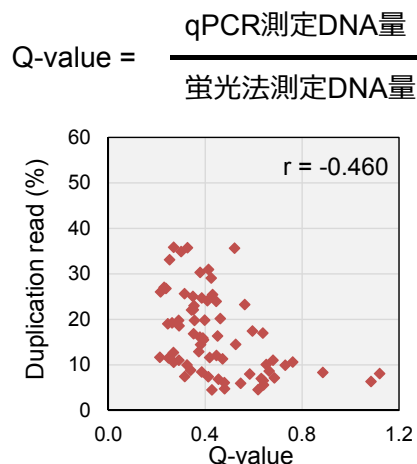
## A. 一次ライブラリー収量とNGSデータの比較



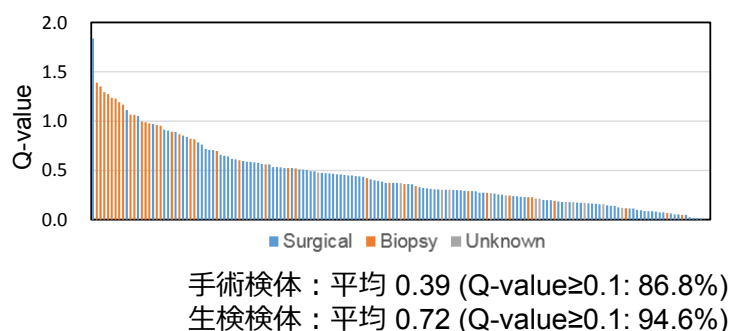
## B. 固定時間、保存期間とDNA品質の比較



## C. Q-valueとNGSデータの比較



## D. Q-valueの分布



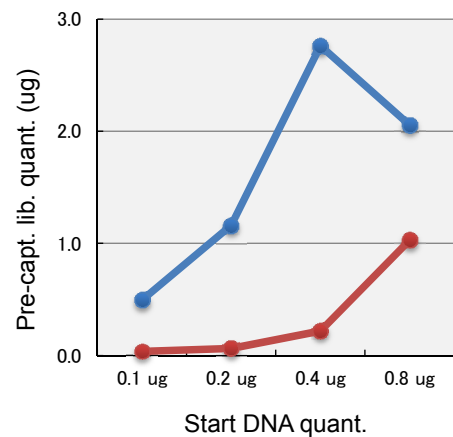
#143

## FFPEがん組織検体由来DNAの品質とNGS解析に与える影響

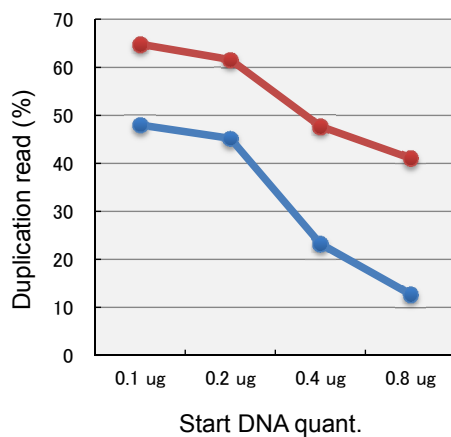
- (A) TOP-GEARプロジェクトにおいて解析された85症例のFFPEがん組織検体由来DNAについて、一次ライブラリー収量とリード重複率及び読取深度を比較したものである。品質の良／不良はNGS解析において一次ライブラリー収量に現れ、一次ライブラリー収量とリード重複率及び読み取り深度は強い相関を示す。
- (B) TOP-GEARプロジェクトにおいて解析された110症例のFFPEがん組織検体由来DNAについて、ホルマリン固定時間及びパラフィンブロックの保管期間を一次ライブラリー収量と比較した結果である。一定の相関が認められ、過固定、長期保管等が、DNAの品質不良を引き起こすと考えられる。
- (C) ゲノム解析用のFFPE検体由来DNA品質値として、TOP-GEARプロジェクトでは、PCR増幅可能DNA割合 (qPCR測定DNA量 / 蛍光報測定DNA量比) を「Q-value」と呼び、用いている。この値は、読み取り深度と相関を示す。本図では、Q-valueが0.1以上0.2未満の検体については、ライブラリー調製プロトコルが異なるため、削除している。
- (D) TOP-GEARプロジェクトにおいて解析された164症例のFFPEがん組織検体由来DNAのQ-valueの分布である。一般に、手術検体より生検検体の方が品質が良い傾向がある。TOP-GEARプロジェクトでは、Q-valueが0.1以上の検体のみを解析している。

#144

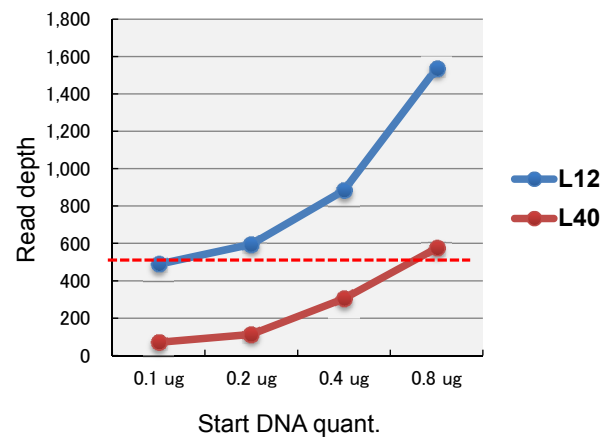
A. 一次ライブラリー収量



B. リード重複率



C. 読取深度



#145

## FFPEがん組織検体由来DNAの品質に対応したNGSライブラリー調製

- 比較的高品質のFFPEがん組織検体由来DNA (L12、Q-value = 0.465) と、低品質のFFPEがん組織検体由来DNA (L40、Q-value = 0.115) を用い、出発DNA量を0.1、0.2、0.4、0.8 $\mu$ g (標準は0.2 $\mu$ g) にして解析した結果である。低品質DNAであっても、ライブラリー調製に用いる出発DNA量を増やすことでNGSデータの品質改善が見られている。逆に、高品質DNAであれば、少ない出発DNA量でも一定レベルの品質のNGSデータが得られている。

#146

# 実証データ5： 保存FFPEがん組織検体に見出されたコンタミネーション

## A. コンタミネーションが疑われた1症例の変異コールデータ

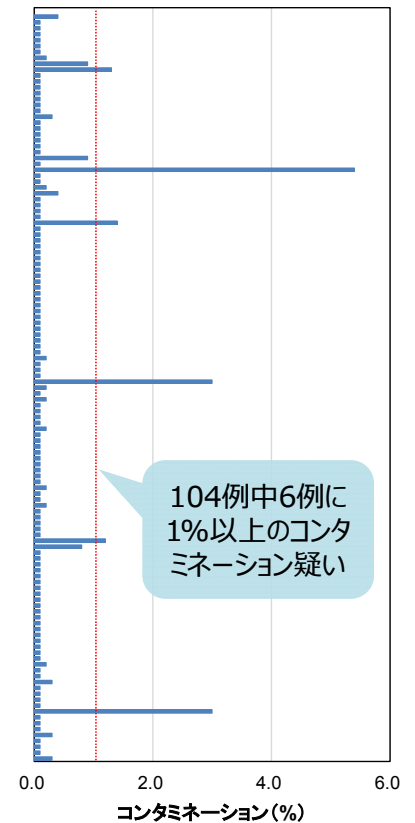
染色体	塩基位置	アレル		変異アレル頻度(%)		遺伝子	アミノ酸変化	判定
		正常	変異	Matched	Unmatched			
5	35,875,593	T	A	10.7	-	<i>IL7R</i>	Intron	コンタミネーション？
8	32,441,235	A	C	9.1	-	<i>NRG1</i>	Intron	コンタミネーション？
8	32,449,785	T	G	10.3	-	<i>NRG1</i>	Intron	コンタミネーション？
10	61,570,411	A	T	8.1	-	<i>CCDC6</i>	Intron	コンタミネーション？
11	108,158,134	T	C	10.0	-	<i>ATM</i>	Intron	コンタミネーション？
12	25,398,284	C	A	39.7	39.7	<i>KRAS</i>	G12V	体細胞変異



検証1 (再検査)      検証2 (他検体のSNP型と照合)

染色体	塩基位置	遺伝子	初回検査		再検査		混入予想	検体1	検体2	検体3	検体4
			血液	腫瘍	腫瘍	腫瘍					
5	35,875,593	<i>IL7R</i>	T	T/A	T/A	A	A	A/T	A	A/T	
8	32,441,235	<i>NRG1</i>	A	A/C	A/C	C	A/C	A	A	A/C	
8	32,449,785	<i>NRG1</i>	T	T/G	T	G	T	T	T	T	
10	61,570,411	<i>CCDC6</i>	A	A/T	A/T	T	A/T	A/T	A	A/T	
11	108,158,134	<i>ATM</i>	T	T/C	T/C	C	C	T	C/T	C/T	

## B. ContEstによる推定



#147

# 保存FFPEがん組織検体に見出されたコンタミネーション

- (A) TOP-GEARプロジェクトにおいて、他症例の組織のコンタミネーションが問題になった例を示す。Matched（当該症例の非がん組織DNAとの比較）解析において検出された5個の変異候補（赤枠）が、Unmatched（20症例の非がん組織DNAの混合物との比較）解析では検出されなかったことから、他症例の検体の混入が疑われた。その後再薄切した検体の解析でも同じ異常が検出された（検証1）が、同時に解析された別症例のSNPと一致するものはなかった（検証2）ことから、DNA抽出・NGS解析工程ではなく、FFPE組織検体自体にコンタミネーションがあることが強く疑われた。
- (B) TOP-GEARプロジェクトにおいて解析された104症例のFFPEがん組織検体由来DNAについて、ContEstプログラム（Cibulskis et al, 2011）を用いてコンタミネーションの評価を行った結果である。6例（5.8%）において1%以上のコンタミネーションが疑われた。

#148

# 実証データ6： FFPEがん組織検体由来DNAのInfiniumアレイDNAメチル化解析

検体	症例	非がん (N) or がん (T)	Double strand DNA (ng)	Restore 反応	データが得られたプローブの実数	搭載全プローブに対する割合 (%)
FFPE	1	N	50	+	864431	99.7
FFPE	1	N	100	+	864998	99.8
FFPE	1	N	150	+	865568	99.8
FFPE	1	N	200	+	865712	99.9
FFPE	1	N	250	+	865985	99.9
FFPE	1	N	500	+	865783	99.9
FFPE	1	T	50	+	864414	99.7
FFPE	1	T	100	+	864261	99.7
FFPE	1	T	150	+	864761	99.8
FFPE	1	T	200	+	865246	99.8
FFPE	1	T	250	+	865398	99.8
FFPE	1	T	500	+	865784	99.9
FFPE	2	N	200	+	865596	99.9
FFPE	2	T	200	+	865449	99.8
FFPE	1	N	50	-	863018	99.6
FFPE	1	N	100	-	864658	99.7
FFPE	1	N	150	-	864740	99.8
FFPE	1	N	200	-	865544	99.8
FFPE	1	N	250	-	865504	99.8
FFPE	1	N	500	-	865854	99.9
FFPE	1	T	50	-	857093	98.9
FFPE	1	T	100	-	862098	99.4
FFPE	1	T	150	-	861645	99.4
FFPE	1	T	200	-	864696	99.7
FFPE	1	T	250	-	864817	99.8
FFPE	1	T	500	-	865779	99.9
FFPE	2	N	200	-	865636	99.9
FFPE	2	T	200	-	863760	99.6
凍結組織	1	N	500	-	865652	99.9
凍結組織	1	T	500	-	865624	99.9
凍結組織	2	N	500	-	865949	99.9
凍結組織	2	T	500	-	865858	99.9

検出率  
99.4%以上

#149

## FFPEがん組織検体由来DNAのInfiniumアレイDNAメチル化解析

- 10%中性緩衝ホルマリンあるいは酸性ホルマリンで1-3日固定し、パラフィン包埋後2-5年である手術検体（非がん腎組織・腎細胞がん組織）を解析に供し、同一症例の凍結組織と結果を比較した。
- GenomeStudio Methylation Moduleによるデータ品質検証で、FFPE標本でも全QC項目をパスした。
- FFPE標本で（小さな生検検体・マイクロダイセクション検体に相当する50ng出発DNAでも）、良好な解析が行われた（一般に、検出P値<0.05の検出率96%以上で良好な解析とされる）。

#150

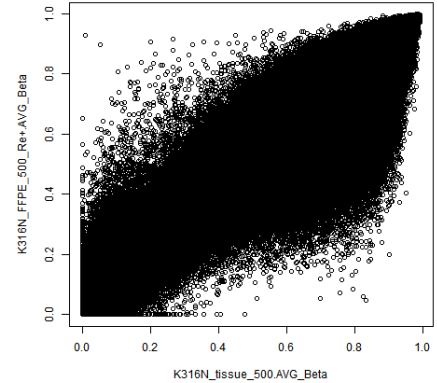


FFPE DNA Restore Kit 使用の是非

非がん (N) or がん (T)	Double strand DNA (ng)	Restore反応	同一症例の凍結組織のデータとの一致	
			P値	相関係数 (R)
N	500	+	< 2.2e-16	0.971
N	200	+	< 2.2e-16	0.963
N	150	+	< 2.2e-16	0.963
N	100	+	< 2.2e-16	0.958
T	100	+	< 2.2e-16	0.957
N	100	+	< 2.2e-16	0.955
N	50	+	< 2.2e-16	0.953
T	500	+	< 2.2e-16	0.953
T	50	+	< 2.2e-16	0.953
T	200	+	< 2.2e-16	0.946
T	250	+	< 2.2e-16	0.945
T	150	+	< 2.2e-16	0.942
N	250	+	< 2.2e-16	0.940
N	500	-	< 2.2e-16	0.927
T	200	+	< 2.2e-16	0.925
N	250	-	< 2.2e-16	0.900
N	200	-	< 2.2e-16	0.896
T	500	-	< 2.2e-16	0.889
N	100	-	< 2.2e-16	0.885
N	150	-	< 2.2e-16	0.883
T	200	-	< 2.2e-16	0.860
N	200	-	< 2.2e-16	0.849
T	250	-	< 2.2e-16	0.845
N	50	-	< 2.2e-16	0.832
T	100	-	< 2.2e-16	0.798
T	150	-	< 2.2e-16	0.797
T	200	-	< 2.2e-16	0.729
T	50	-	< 2.2e-16	0.715

非がん・がんの別、  
出発DNA量を問わず、  
Restore反応を実施した方が  
ゴールドスタンダードとよく相関

相関図の例 (R=0.971、P=2.2e-16)



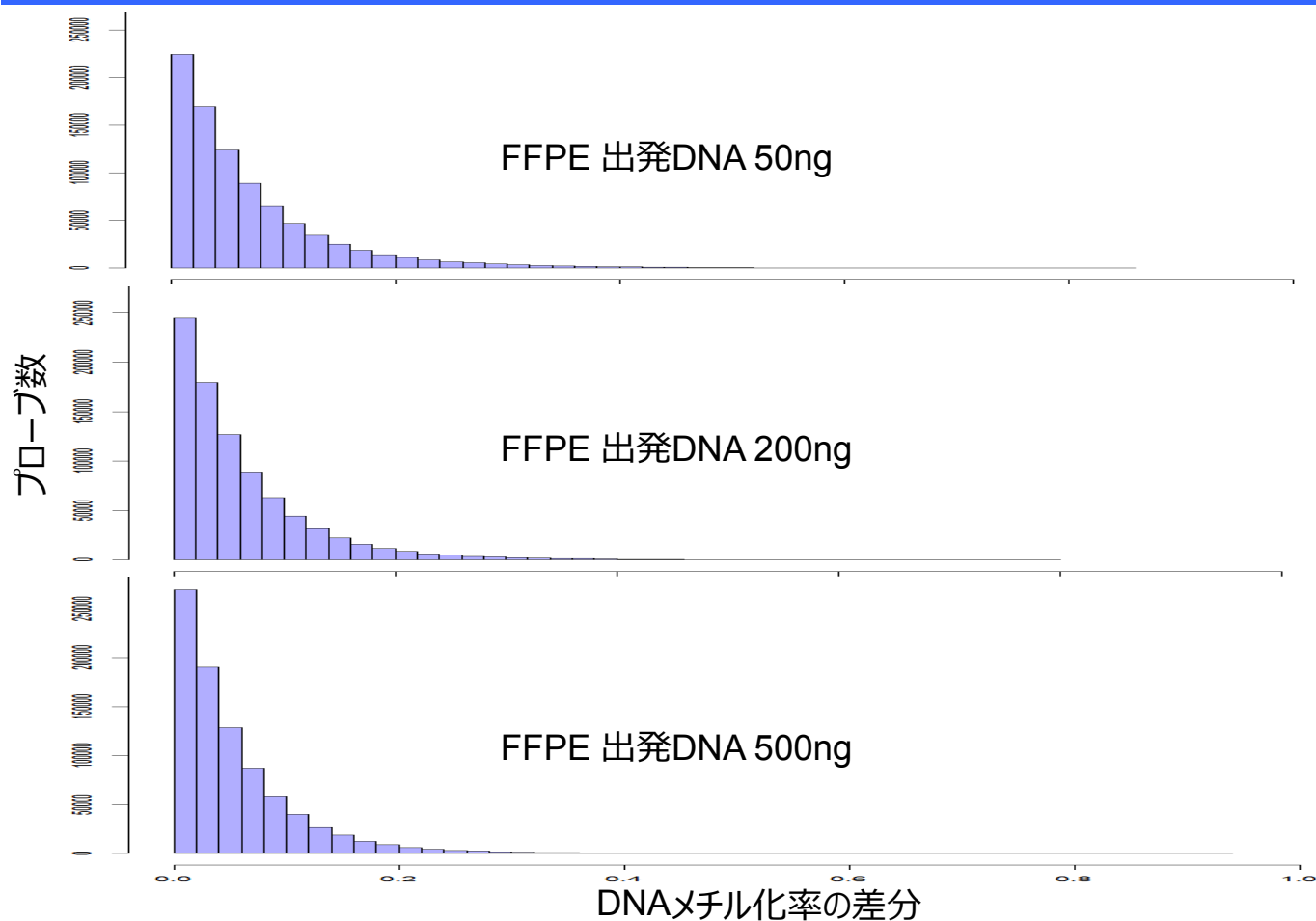
相関係数の順にソート

#151

FFPEがん組織検体由来DNAのInfiniumアレイDNAメチル化解析における修復反応の効果

- 同一のFFPE標本から等量のゲノムDNAを用いてInfinium解析を実施する際、FFPE DNA Restore Kitによる修復反応の有無を変え、ゴールドスタンダードである同一症例の凍結組織より抽出した500ng DNAを用いたデータとの相関を検討した。

#152



出発DNA量が豊富である方がゴールドスタンダードとの相関は、わずかに勝った #153

## FFPEがん組織検体由来DNAのInfiniumアレイDNAメチル化解析における出発DNA量

- 同一のFFPE標本からInfinium解析を実施する際、出発DNA量を変え、ゴールドスタンダードである同一症例の凍結組織より抽出した500ng DNAを用いたデータとの相関を検討した。

## 実証データ9： FFPEがん組織検体由来DNAのNGSを用いたキャプチャ法によるDNAメチル化解析

NGSのQC値	凍結組織						FFPE				血液			
	腎細胞がん		非がん腎組織		正常腎組織		腎細胞がん		非がん腎組織		腎細胞がん		対照	
	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.
出力リード数	59,786,777	5,533,969	60,119,386	2,659,455	62,070,189	3,725,057	56,042,463	3,217,047	52,955,491	2,097,483	58,029,570	2,814,054	59,790,164	5,062,008
マップ率 (%)	94.21	3.05	93.76	3.95	94.23	2.47	64.49	4.37	61.49	2.61	98.49	18.71	94.82	0.87
重複リード率 (%)	9.47	2.53	20.91	7.56	19.16	5.11	71.16	5.71	69.68	8.36	12.86	2.76	11.10	2.27
プローブ深度	37.58	3.38	32.83	3.25	34.18	3.26	7.20	1.19	7.34	2.40	36.07	2.19	36.82	3.05
検出されたCpG数	3,663,238	49,358	3,588,402	45,130	3,622,486	43,587	3,034,665	129,446	2,931,550	126,068	3,624,736	28,304	3,606,793	41,550
QC後のCpG数	2,886,169	29,553	2,869,440	32,530	2,885,253	26,297	1,611,751	254,405	1,517,406	356,333	2,893,631	19,277	2,876,277	35,371

FFPE標本から抽出したゲノムDNAのピークサイズは、

553.7 ± 114.6 bp (腎細胞がん)、535.0 ± 104.5 bp (非がん腎組織)で、  
もとより剪断化されていた

→NGS解析後、マップ率が低く、リード深度が浅いため定量に十分なデータとは言い難い

### 結論:

現状では、FFPE標本でNGSによるDNAメチル化キャプチャ法を実施するのは困難であり、Infiniumアレイ解析を選択するのが妥当

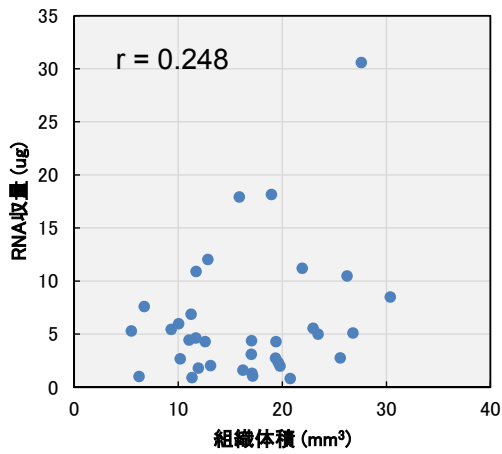
#155

## FFPEがん組織検体由来DNAのNGSを用いたキャプチャ法によるDNAメチル化解析

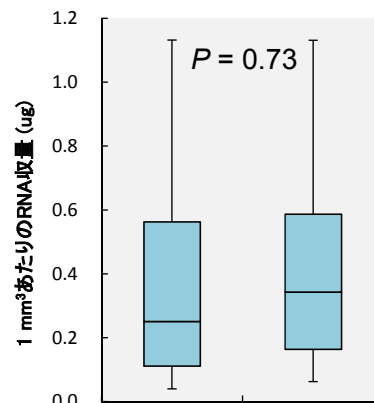
- いわて東北メディカルメガバンク機構との共同研究で、FFPEがん組織検体由来DNAを用い、SureSelect XT Human Methyl-Seqによるバイサルファイトシーケンシング (84 Mb、3.7 million CpG対象) を行った。

#156

## A. 組織体積とRNA収量



## B. FFPE作製年



	2012以前	2013以降	全体
中央値:	0.25 ug	0.34 ug	0.26 ug
20パーセンタイル:	0.10 ug	0.16 ug	0.12 ug

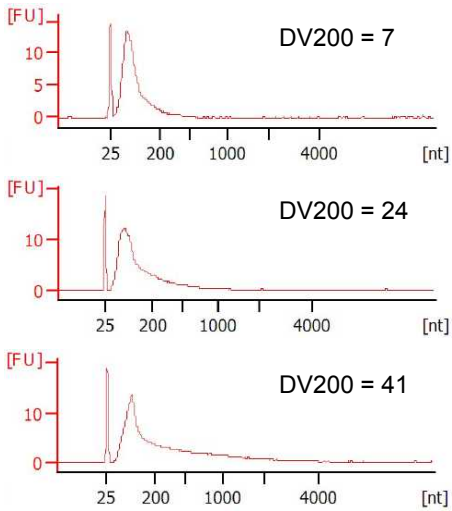
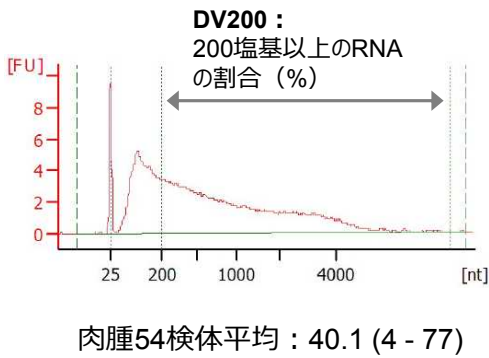
#157

## FFPEがん組織検体から抽出されるRNAの量

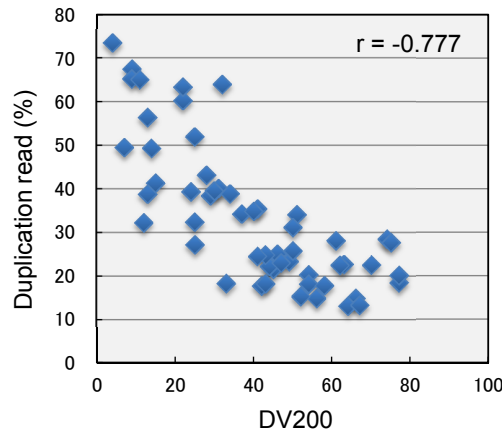
- (A) 肉腫35症例のFFPEがん組織検体について、組織体積とRNA収量を比較した結果である。10 $\mu$ m $\times$ 5の薄切から、キアゲン社のRNeasy FFPE Kitを用いてRNAを抽出した。組織断面積を計測し、その測定値に50 $\mu$ mをかけて組織体積を計算した。単位体積当りのRNA収量は検体ごとに大きく異なる。
- (B) 単位体積当りの収量を、2012以前の検体と2013年以降の検体で比較した結果である。作製年（保管期間）による収量の差は見られない。

#158

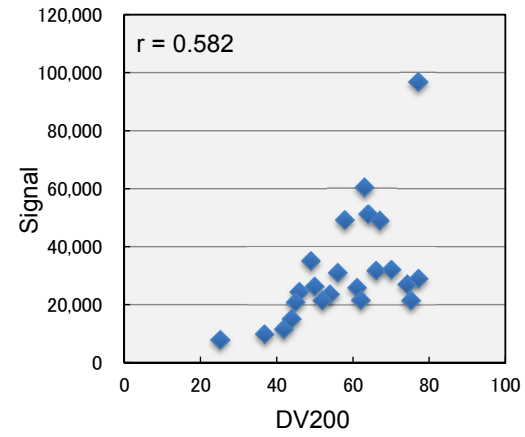
### A. RNAの品質評価



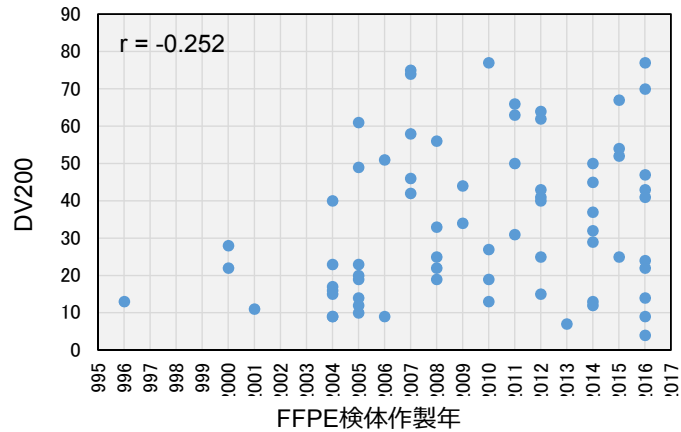
### B. NGS解析データ品質



### C. nCounter解析データ品質



### D. 検体作製年とRNA断片化度の比較



#159

## FFPEがん組織検体由来RNAの品質と、NGS解析及びnCounter解析に与える影響

- (A) FFPE検体由来RNAの断片化の状態を、アジレント社のBioAnalyzerで検討した結果である。イルミナ社の推奨するDV200（200塩基以上のRNAの割合 [%]）値で評価すると、肉腫54検体の最低値は4、最高値は77で、検体ごとに大きく異なっていた。
- (B) 肉腫54症例のFFPE検体由来RNAについて、イルミナ社のTruSight RNA PanCancer Library Prep Kitを用いてNGS解析を行い、DV200値とリード重複率を比較した結果である。強い相関が見られる。
- (C) 肉腫23症例のFFPE検体由来RNAについて、nCounter解析を行い、DV200値とハウスキーピング遺伝子のシグナル値の平均値と比較した結果である。強い相関が見られる。
- (D) 肺がん及び肉腫70症例のFFPEがん組織検体について、その作製年とDV200値を比較した結果である。作製年（保管期間）とRNA品質には相関は見られない。

#160



# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

- 第3部・・・ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク  
「生体試料の国際標準化への対応及び臨床オミックス検査への応用」
- 3-5 ゲノム医療実現に向けたオミックス検査・解析に係る国内外の品質管理の枠組の全体像の整理と提案

#161

## ゲノム医療実施体制における医療施設内における検体の管理体制確立のための指針

### 現状と問題点

ゲノム診療を行うためには、臨床検体の取り扱いの標準化を臨床検査室だけでなく病院全体の管理として適切に行われる必要がある。海外の検査室では、米国がCAP、欧州を中心にISO15189の認証が必要とされつつある。

検体の品質管理には、検体の質的管理と検体のトレーサビリティなどの管理体制整備が必要であるが、我が国の病院内では、外来、採血室、内視鏡、手術室、病棟など様々な部署で、異なった種類の検体が異なった管理体制で採取され検査室に送られている。現状では、各病院、各部門におけるSOPはすべて異なり、統一的な考え方にしなげって作成されていない。

### 研究の目的

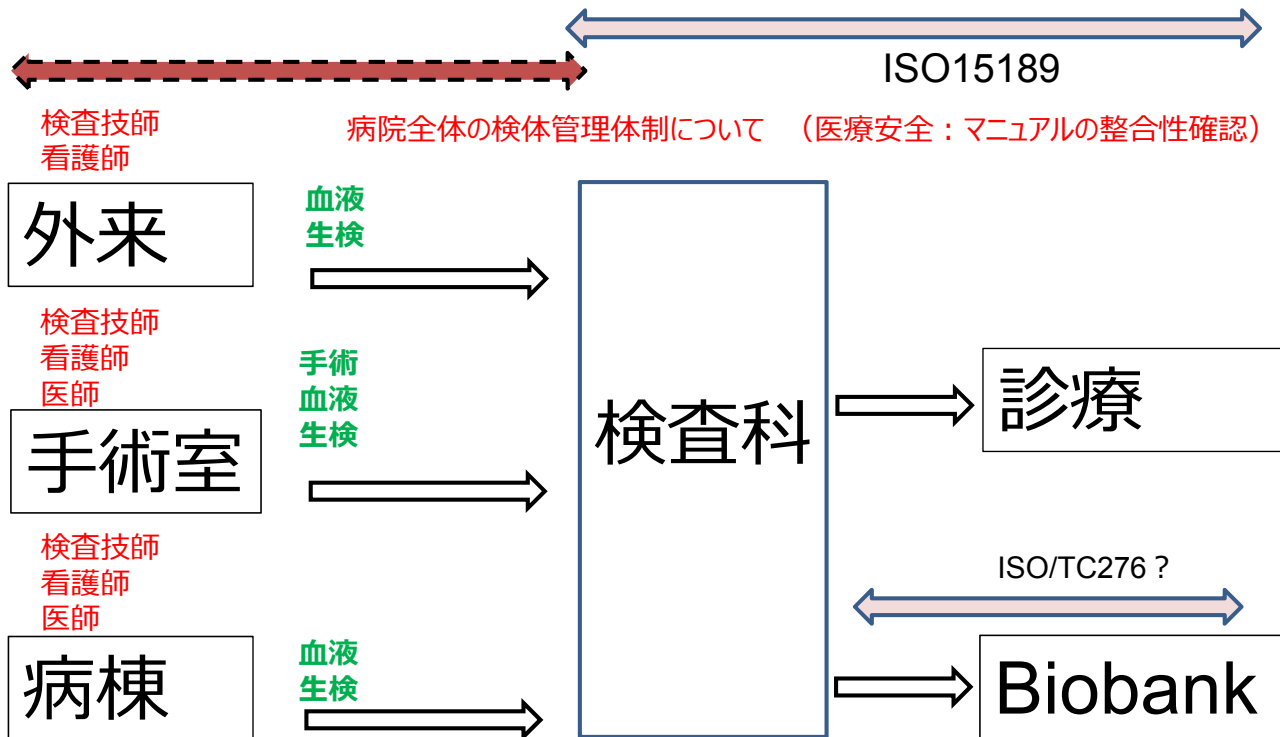
我が国のゲノム診療実装化のために必要な医療施設における検体採取から患者に報告書がわたるまでの管理体制の指針を目指す。

#162

現状では各病院・各部門のSOPはすべて異なり、統一的な考え方に従った作成はなされていない。病院機能に応じた管理体制を、病院全体の管理として構築すべき。

適切な検体管理体制  
の確立が必要

- 1) 全国の病院の場合
- 2) 臨床研究中核病院・特定機能病院など臨床研究を行う施設



#163

我が国の検体管理に関する主な関係資料としては以下のものがある。

- 日本病理学会 2016年7月19日
  - 「検体取扱いマニュアル」
  - 「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規定」検体品質保証  
<http://pathology.or.jp/genome/>
  - 「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規定（作成中）」
- 日本適合性認定協会「ISO15189」
- 公益財団法人日本医療機能評価機構 「医療安全情報」
- 各医療施設における検体取り違え事例に基づいた報告書
- 国立がん研究センター研究開発費
  - 先端的TR研究に対応する臨床検体の取扱い指針（NCC Home Page）

#164

# 国立がん研究センターとして作成したSOPの例。 中央病院・東病院では担当者も異なり、完全な統一は困難であった。

〇〇〇手続書 第1版

## 採血作業手順書

第1版

使用開始年月日： 年 月 日

国立がん研究センター

作成者		作成日	
確認者		確認日	
承認者		承認日	

1 / 24

〇〇〇手続書 第1版

## 検体取扱い手順書

検査項目名：内視鏡

第1版

文書番号：〇〇-〇〇-〇〇〇

使用開始年月日：2017年〇〇月〇〇日

国立がん研究センター東病院

作成者	〇〇 〇〇 印	作成日	2017/〇〇/〇〇
確認者	〇〇 〇〇 印	確認日	2017/〇〇/〇〇
承認者	〇〇 〇〇 印	承認日	2017/〇〇/〇〇

1 / 30

〇〇〇手続書 第1版

## 検体取扱い手順書

検査項目名：手術室

第1版

文書番号：〇〇-〇〇-〇〇〇

使用開始年月日：2017年〇〇月〇〇日

国立がん研究センター東病院

作成者	〇〇 〇〇 印	作成日	2017/〇〇/〇〇
確認者	〇〇 〇〇 印	確認日	2017/〇〇/〇〇
承認者	〇〇 〇〇 印	承認日	2017/〇〇/〇〇

1 / 9

#165

## 国立がん研究センター患者検体採血標準作業手順書の項目の例。

## 採血作業手順書

第1版

使用開始年月日： 年 月 日

国立がん研究センター

作成者		作成日	
確認者		確認日	
承認者		承認日	

1 / 24

外来採血..... 4

1. 採血基準..... 4
2. 採血室の基準..... 4
3. 採血者の心得..... 4
4. 採血者の準備..... 4
5. 採血の説明..... 4
6. 採血の指示..... 4
7. 採血に必要な器具の準備..... 5
8. 採血管への検査用ラベルの貼付..... 5
9. 患者及び採血管（検査用容器など）の確認..... 5
10. 必要事項の確認..... 6
11. 手袋の装着..... 6
12. 採血時の患者姿勢..... 6
13. 針とホルダーの接続..... 7
14. 採血用の血管の選択..... 7
15. 採血を避けるべき採血部位..... 7
16. 採血..... 7
17. 血管を緊要させる手技..... 8
18. 血管の確認..... 8
19. 消毒方法..... 8
20. 採血針の刺入・抜去及び止血..... 8
21. 採血手順..... 9
22. 採血時の注意事項..... 11
23. 検体搬送・中間搬送・気送管の取扱い..... 12
24. 検体の未到等や検査結果の管理..... 13
25. 感染症対策ボックスの管理..... 14
26. 緊急時・トラブル発生時の対応..... 14
27. 緊急時の連絡先..... 14
31. 針刺し事項の対応..... 15
32. 参考資料..... 15
33. 添付資料..... 15

3 / 24

### 外来採血

1. 採血基準
  - ・標準採血ガイドライン(OP+A-2(日本臨床検査標準協議会(JCCLS)JCCLS標準採血法検討委員会)に準じて行う。
2. 採血室の基準
  - ・採光、照明及び換気が適正であり、かつ清潔である。
  - ・採血業務を適正に行うのに支障のない面積を有する。
  - ・採血に必要な設備を有している。
  - ・採血に必要な器具を備えている。
  - ・採血により得られた血液を適正に保管・管理するために必要な設備を備えている。
  - ・採血により得られた血液を排出するために必要な器具・設備を備えている。
3. 採血者の心得
  - ・患者1人1人に敬意をもって公平に接する。
  - ・言葉使いに注意する。
  - ・常に高性のある行動を心がける。
  - ・安全、確実な採血を心がける。
  - ・患者が驚がる血管は穿通しない。
4. 採血者の準備
  - ・身だしらみ(髪・髪型・衣服など)を整え、血汗、体臭などで患者が汚染される可能性がある場合は、手拭(ガウン・プラスチックガウンなど)を着用する。
  - ・標準予防策の基本は手洗いであり、石鹸と流水により手洗いが原則となる。手洗いを念入りに行い、消毒性の手拭消毒薬などで消毒を行って手拭を清潔にする。
  - ・手袋を着用し、原則として患者毎に交換する。
  - ・マスクを着用する。また、血液、体液などが飛散し、服装を汚染する可能性が高い場合にはゴーグル等を着用する。
5. 採血の説明
  - ・原則として、医師が検査項目、その意義、採血に伴う合併症、検査結果に関する個人情報保護等について口頭又は文書を用いて患者に説明を行い、採血の同意を得る。
  - ・原則、検査内容や結果、採血合併症などについて質問があった場合は、各職種(臨床検査技師、看護師)が持つ、常備の範囲内で回答・説明などを行う。
  - ※回答困難な場合は主任・看護師に対応をお願いする。
6. 採血の指示
  - ・採血の指示は、ミッション電子カルテシステム(富士通)を用いて医師が行う。採血の指示には、下記の情報が含まれる。
    - ① 患者氏名・年齢・ID番号・性別
    - ② 採血名、所属部署(診療科)、連絡先(PHIS)
    - ③ 検査項目、依頼時間

4 / 24

#166

- 基本的な検体管理状況の確認と問題点の洗い出し
- ゲノム医療実現のための検体管理に必須の条件の確定
- 検体種別の標準手順書の提案と作成
  
- 他の病院における評価・パブリックコメントなどを求める必要性
- 全国の病院への情報発信、教育はどのようにするのか

#167

## 参考文献

---

1. Cibulskis K, et al. ContEst: estimating cross-contamination of human samples in next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 2011, 27(18), 2601-2.
2. Tanabe Y, et al. Comprehensive screening of target molecules by next-generation sequencing in patients with malignant solid tumors: guiding entry into phase I clinical trials. *Mol Cancer*, 2016, 15(1), 73.
3. Teunissen CE, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking, *Neurology*, 2009, 73, 1914-22
4. Vanderstichele H, et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative, *Alzheimers Dement*, 2012, 8, 65-73.

#168

# オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

---

## ● 第4部

「想定される国際標準規格を踏まえた3大バンク等のSOPの調査と考察」

#169

### 三大バンクSOP調査

---

国立精神・神経医療研究センター(NCNP)

国立長寿医療研究センター(NCGG)

服部功太郎(NCNP)、後藤雄一(NCNP)、新飯田俊平(NCGG)

- 現在ISO国際標準化機構で作成されているバイオバンクの標準は、基本的には施設要件であり試料要件については各バンクに委ねられる見込みである。一方、欧州を中心とする各国から試料に必要な記録事項についても列挙・提案されている。
- 三大バンクに対して、記録事項の調査を行ったところ大半の事項については対応していた。しかし、採血・処理室の温度記録など対応していない事項もあった。
- 未対応の事項を中心に、今後の対応・改善の必要性を検討するため、バイオバンクのユーザに対してニーズの調査を実施した。

#170



# 方法

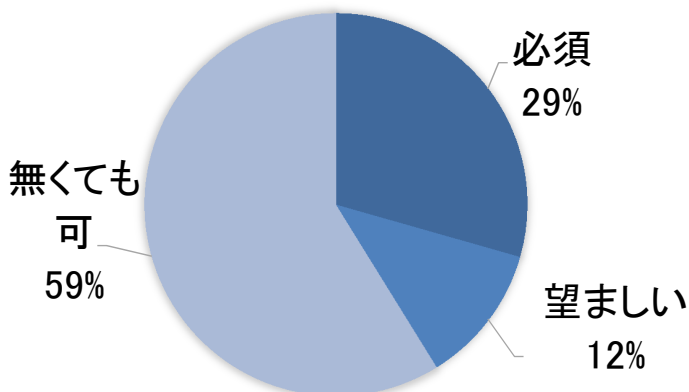
- 対象  
これまでにNCNPバイオバンクの試料を利用した外部機関の研究者
- メールで右記の調査票に対する回答を依頼
- 調査期間  
2017.2.23～3.29
- 回収数n=18  
(回収率62%)

	項目	選択肢
ヒト	診断	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	既往歴	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	服薬	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	喫煙・ 飲酒	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	身長・ 体重	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	血液検査 ( 血算 )	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	血液検査 ( 生化学 )	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	感染情報 ( HCV/HBV )	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	感染情報 ( HIV )	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
採血	採血時間	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	採血場所の温度	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	採血場所の湿度	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	採血量	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
DNA	採血から処理までの時間	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	採血から処理までの温度	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	核酸の品質の指標	(1) OD260/280, (2) PicoGreen等, (3) その他
	保存温度記録	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
血漿	採血から処理までの時間	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	採血から処理までの温度	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	遠心速度・ 時間	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	遠心温度 ( 室温の場合 )	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	フリーザー温度記録	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
血清	凝固温度記録	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	凝固時間	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	遠心開始時間	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	遠心速度・ 時間	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	遠心温度	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
	フリーザー温度記録	(1) 必須, (2)望ましい, (3) 無くて可
回答者	年齢	年齢記載
	ヒト試料研究経験年数	年数記載
	解析分子 ( 複数選択可 )	(1) DNA, (2) RNA, (3) タンパク質, (4) メタボ
	解析方法 ( 複数選択可 )	(1) 標的分子解析, (2)オミックス解析, (3)その他
	所属	(1) アカデミア, (2) 企業, (3) その他[自由記載]

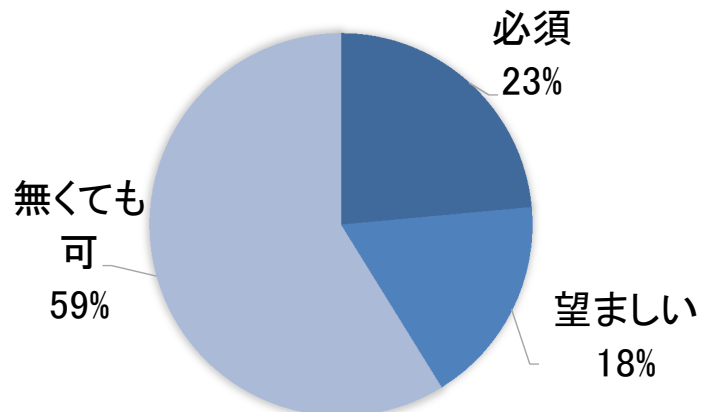
## アンケート結果の概要 (1)

### 核酸(DNA)

採血から処理までの時間



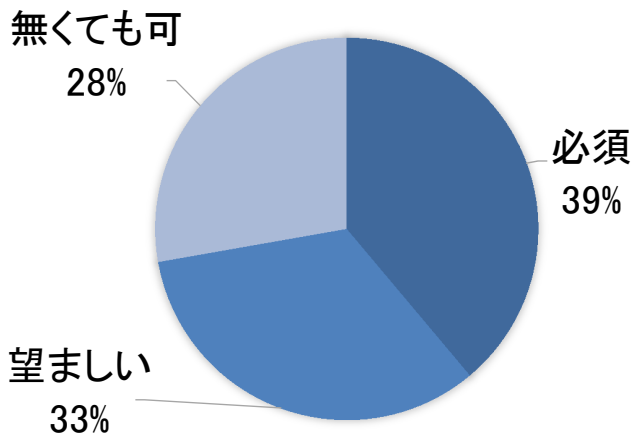
採血から処理までの温度



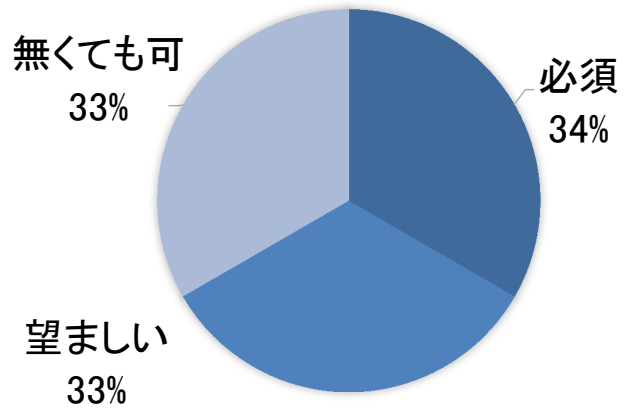
核酸配列の解析では、時間や温度の記録の要望は大きくはない。

## 血漿

採血から処理までの時間



採血から処理までの温度

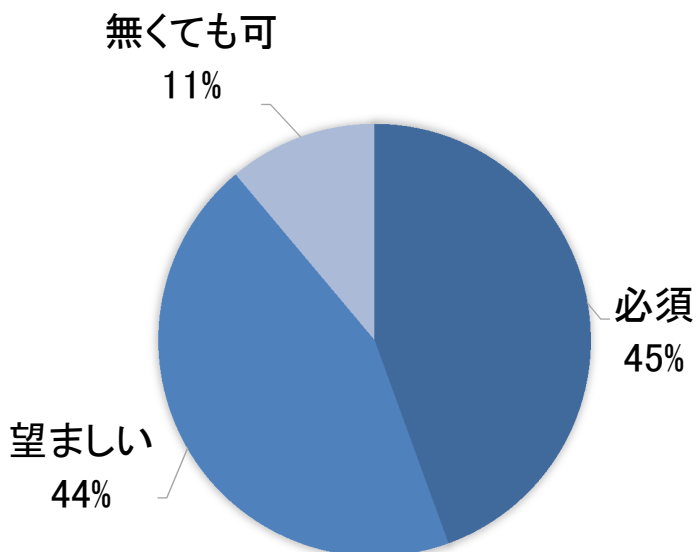


- メタボローム・プロテオーム解析、炎症性マーカーなど、品質の影響を受けやすい解析では時間・温度等の記録について要望が強い。

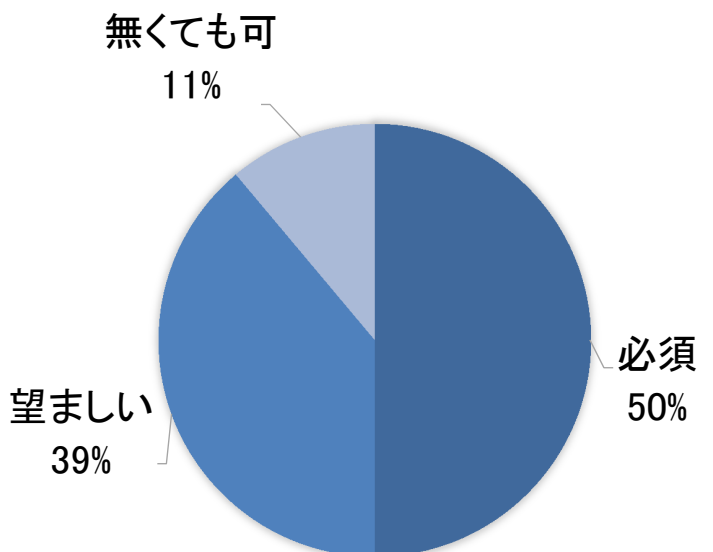
#173

## 感染情報

感染情報(HCV/HBV)



感染情報(HIV)



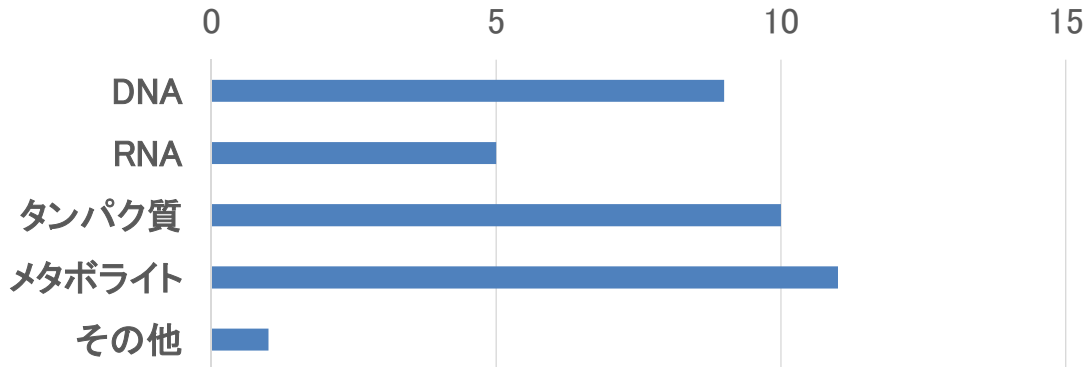
感染情報の要望は大きい。  
特に企業では感染情報が必須という意見であった。

#174

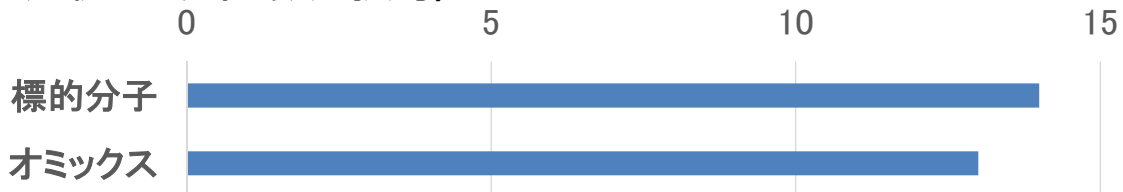
## 追加資料：アンケート結果

### 回答者属性

- 平均年齢：44.7歳（33-58歳）
- 企業2、アカデミア16
  - 解析分子（複数選択可）

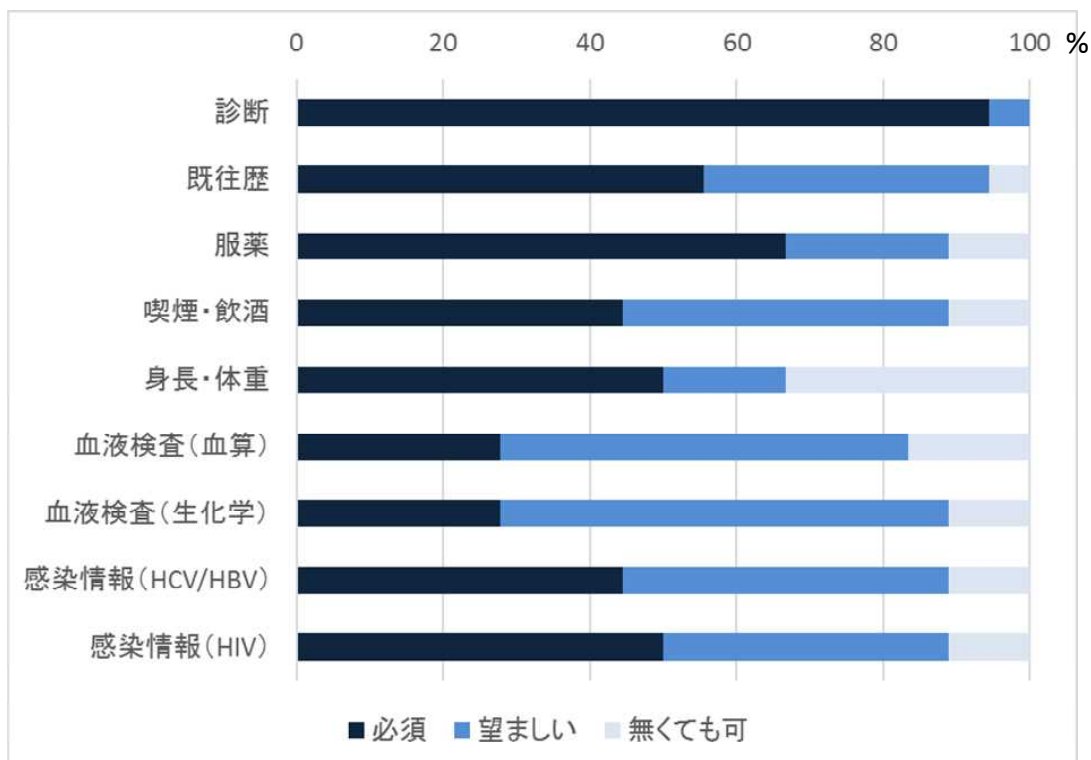


- 解析方法（複数選択可）



#175

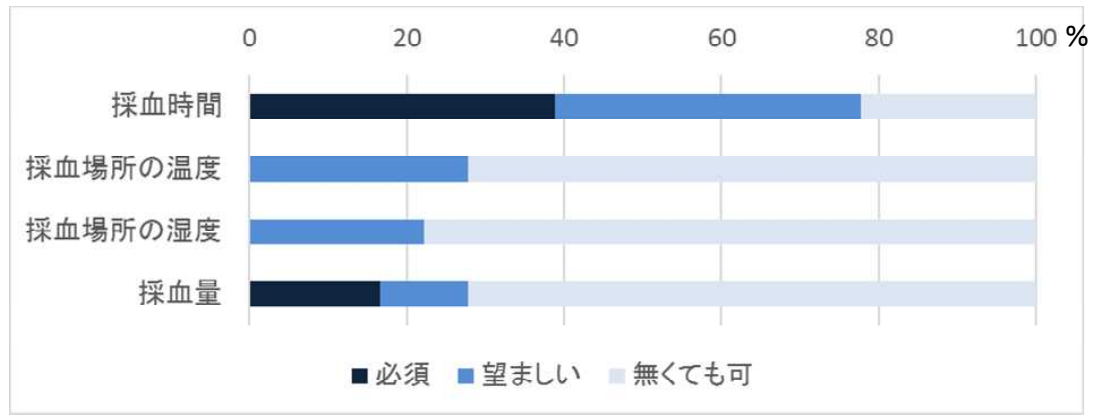
### 臨床情報



診断以外に、既往歴、服薬の情報の需要が大きい。  
企業では感染情報が必須という意見であった。

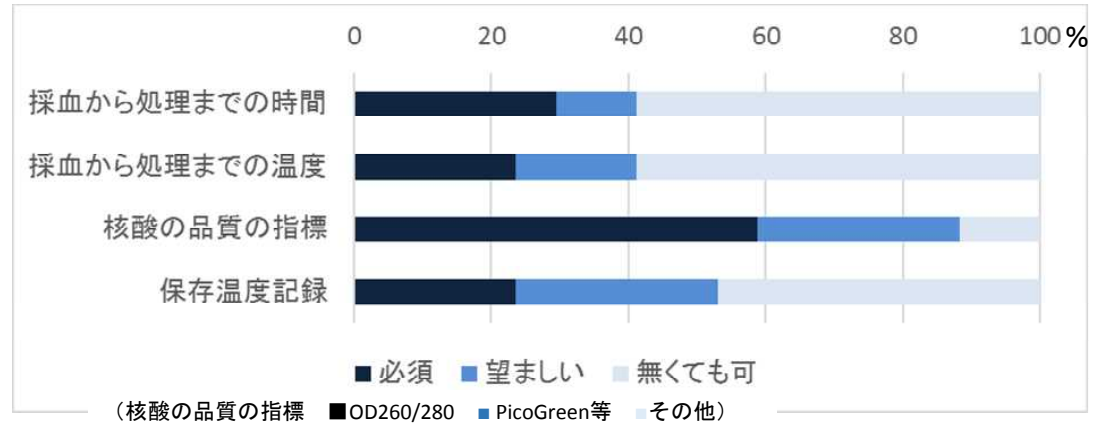
#176

## 採血



メタボローム解析を行う研究者は採血時間の希望が強い

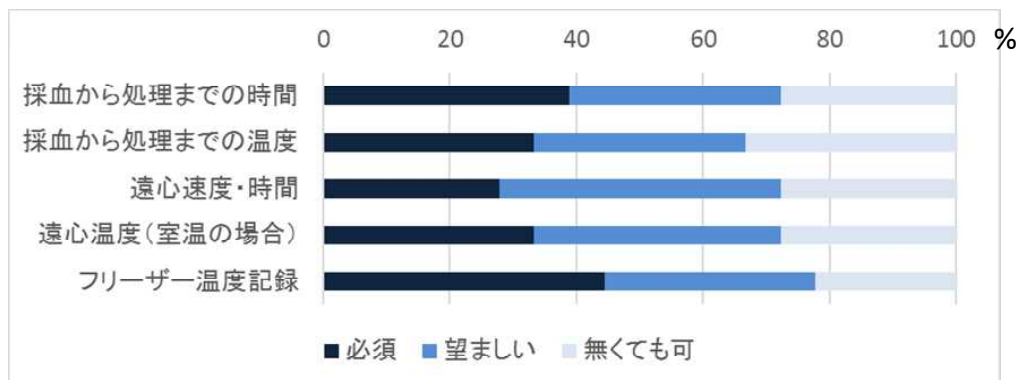
## 核酸(DNA)



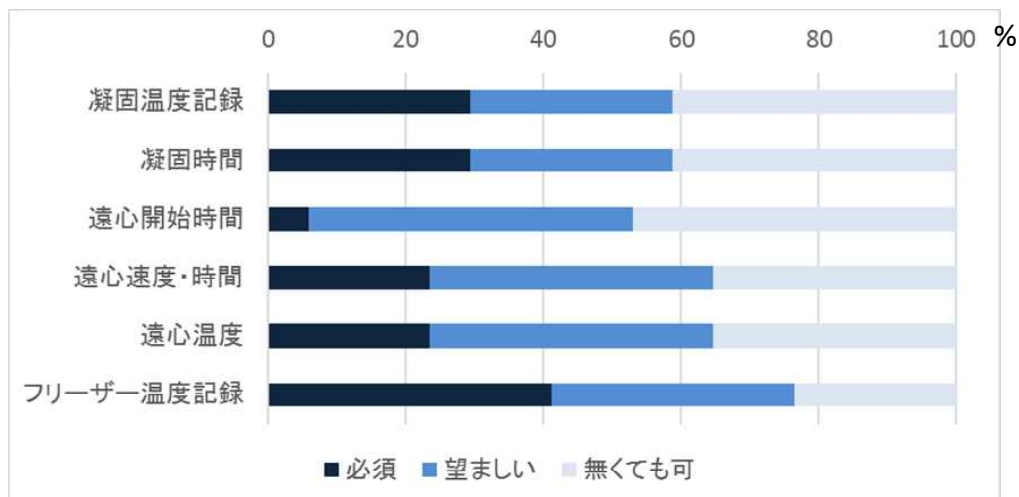
核酸配列についてはあまり時間や温度の記録は問われない

#177

## 血漿



## 血清



メタボローム・プロテオーム解析、炎症性マーカーの解析を行う研究者には時間・温度等の記録を必須とする意見が多い

#178

---

## オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書

公開日： 2017年8月10日（初版発行）

改定日： 2017年10月7日（Ver.1.1版）

発行者： 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構  
文部科学省  
厚生労働省

連絡先 〒100-0004  
東京都千代田区大手町1-7-1 読売新聞ビル21階  
Tel: 03-6870-2228  
Fax: 03-6870-2246  
E-mail: [genome-support@amed.go.jp](mailto:genome-support@amed.go.jp)