

バイオバンク利活用ハンドブック
検体の採取・処理と品質について知っておくべきこと

第 1 版

2024 年 7 月 11 日

ゲノム創薬基盤推進研究事業
バイオバンク利活用推進のための調査研究

目次

まえがき	 4
略語表	
第1章 バイオバンク検体の処理手順	 6
第1-1節 組織の処理手順	 6
1-1-1 概要	
1-1-2 新鮮凍結	
1-1-3 凍結包埋	
1-1-4 ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）	
1-1-5 その他	
第1-2節 血液の処理手順	 11
1-2-1 概要	
1-2-2 全血	
1-2-3 血清	
1-2-4 血漿	
1-2-5 末梢血単核細胞（PBMC）	
第1-3節 核酸の処理手順	 16
1-3-1 概要	
1-3-2 組織由来 DNA	
1-3-3 血液循環 DNA	
1-3-4 血液循環 RNA	
第2章 バイオバンク検体の研究利用	 22
第2-1節 生体分子アッセイ	 22
2-1-1 生体分子アッセイの概要と例	
2-1-2 生体分子アッセイに用いられる検体	
第2-2節 遺伝子変異解析	 25
2-2-1 遺伝子変異（遺伝子配列）解析の概要と例	
2-2-2 遺伝子変異解析に用いられる検体	
第2-3節 遺伝子発現解析	 27
2-3-1 遺伝子発現解析の概要	
2-3-2 遺伝子発現解析に用いられる検体	
第2-4節 免疫反応測定	 29
2-4-1 免疫反応測定の概要と例	
2-4-2 免疫反応測定に用いられる検体	
第2-5節 形態観察	 31
2-5-1 形態観察の概要と例	
2-5-2 形態観察に用いられる検体	

第 2-6 節	細胞培養	…… 35
2-6-1	細胞培養の概要と例	
2-6-2	細胞培養に用いられる検体	
第 3 章	検体処理方法と品質	
第 3-1 節	検体の品質評価方法	…… 38
3-1-1	核酸の品質評価方法	
3-1-2	核酸以外の生体分子の品質評価方法	
3-1-3	保管までの工程の記録による品質評価方法	
第 3-2 節	検体の品質に影響を与える因子	…… 41
3-2-1	概要	
3-2-2	被採取者の状態による品質への影響	
3-2-3	検体採取から保管までの要因による品質への影響	
3-2-4	保管による品質への影響	
3-2-5	利用時における品質への影響	
第 3-3 節	がん遺伝子パネル検査における品質（実験結果）	…… 46
第 3-4 節	OCT 包埋凍結組織の品質（実験結果）	…… 53
3-4-1	実証実験-1：包埋容器の検証	
3-4-2	実証実験-2：包埋容器の検証	
3-4-3	実証実験-3：溶媒の検証	

まえがき

自分の研究にヒト臨床検体を使用したい。しかし、これまでに検体を使用したことがない、または使用したことはあるが経験が少なく、研究計画に適した検体を入手できるか自信がない。このハンドブック『バイオバンク利活用ハンドブック 検体の採取・処理と品質について知っておくべきこと』（通称「ハンドブック＜試料編＞」）は、そうした悩みや不安を抱える研究者を対象としています。そして同時に、そうした研究者とのコミュニケーションを改善したいと考えているバイオバンク職員も対象としています。

このハンドブックの公開によって、検体の入手先としてのバイオバンクが使いやすくなり、結果としてバイオバンクがより広く使われるようになる。そうなることを念頭に置いて、このハンドブックは特に検体の処理に関する情報を提供しています。

このハンドブックの第1章から第3章までは次のような内容になっています。バイオバンクで扱う主な検体がどのような手順で処理されているのか（第1章）、それらの検体がどのような研究で利用されるのか（第2章）、検体の品質はどのように考えられるのか（第3章）。またこれらに加え、このハンドブックを作成するきっかけとなった調査の結果として、検体の入手に関連した現在の課題は何か（第4章）を載せています。

第1版では盛り込めなかった内容もありますが、第1版へのご意見などを踏まえ、改訂を行なっていく見込みです。ぜひ忌憚のないご意見をお聞かせ頂ければと思います。

このハンドブックの第1版は、AMED ゲノム創薬基盤推進研究事業「バイオバンク利活用推進のための調査研究」（2020～22年度）で作成されたものです。ご協力頂きました関係者のみなさんにこの場をお借りして感謝申し上げます。

執筆担当者（五十音順）

川野 竜太郎	（慶應義塾大学）
小原 有弘	（医薬基盤・健康・栄養研究所）
竹内 朋代	（筑波大学病院）
西原 広史	（慶應義塾大学）
森田 瑞樹	（岡山大学）

略語表

AMED	Japan Agency for Medical Research and Development（日本医療研究開発機構）
BLEIA	Bioluminescence Enzyme Immunoassay（生物発光酵素免疫測定法）
cfDNA	cell-free DNA（血液循環 DNA）
cfRNA	cell-free RNA（血液循環 RNA）
CLEIA	Chemiluminescence Enzyme Immunoassay（化学発光酵素免疫測定法）
CLIA	Chemiluminescence Immunoassay（化学発光免疫測定法）
CNV	Copy Number Variation（コピー数多型）
DIN	DNA Integrity Number
DNA	Deoxyribonucleic Acid（デオキシリボ核酸）
EAI	Enzyme Immunoassay（酵素免疫測定法）
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid（エチレンジアミン四酢酸）
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot
EVG 染色	Elastic van Gieson staining（エラスチカ・ワンギーソン染色）
FEIA	Fluorescent Enzyme Immunoassay（蛍光酵素免疫測定法）
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded（ホルマリン固定パラフィン包埋）
FIA	Fluorescent Immunoassay（蛍光免疫測定法）
HbA1c	Hemoglobin A1c（ヘモグロビン A1c）
HBOC	Hereditary Breast and Ovarian Cancer（遺伝性乳癌卵巣癌症候群）
HE 染色	Hematoxylin Eosin staining
HPLC	High Performance Liquid Chromatography（高速液体クロマトグラフ法）
iPS 細胞	induced Pluripotent Stem Cell（人工多能性幹細胞）
ISBER	International Society for Biological and Environmental Repositories
miRNA	microRNA（マイクロ RNA）
mRNA	messenger RNA（メッセンジャー RNA）
MS	Mass Spectrometry（質量分析装置）
NGS	Next Generation Sequencer（次世代シーケンサー）
NIPT	Non-Invasive Prenatal Genetic Testing（出生前遺伝学的検査）
NMR	Nuclear Magnetic Resonance（核磁気共鳴）
OCT	Optimal Cutting Temperature
PAM 染色	Periodic Acid-Methenamine Silver staining（過ヨウ素酸メセナミン銀染色）
PAS 染色	Periodic Acid-Schiff staining（過ヨウ素酸シッフ染色）
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells（末梢血単核細胞あるいは末梢血単核球）
PBS	Phosphate-Buffered Saline（リン酸緩衝生理食塩水）
PCR	Polymerase Chain Reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonucleic Acid（リボ核酸）
SOP	Standard Operating Procedures（標準作業手順書）
SPREC	Standard PREanalytical Code
TE バッファー	Tris-EDTA バッファー
VUS	Variant of Uncertain Significance（臨床的な意義が不明なバリエーション）

第1章 バイオバンク検体の処理手順

第1-1節 組織の処理手順

1-1-1 概要

バイオバンクに保管される組織検体の形状は、新鮮凍結、凍結包埋、ホルマリン固定パラフィン包埋などがある。

組織検体は診療の過程で切除、摘出され、最終的に病理診断に使用される。病理診断には使用されない部分または使用後の残余組織をバンキングすることは、病態を解明するための研究、診断方法や新たな創薬ターゲットを探索するための研究に非常に有用である。核酸の抽出や形態観察など研究の目的に応じて適した保管方法が異なるので、どのような研究に使用することを想定しているのか、主として保管する形状について事前に検討しておく必要がある。

品質に影響を与える要因としては、阻血時間、凍結速度（急速、緩慢）、固定時間、保管温度、保管期間などが考えられる。これらの要因は実施した内容を記録しておくことが重要となる。また、いくつかの項目については日本病理学会で策定された「ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程」[1]に実証データが掲載されているので参考にするとよい。

標準作業手順書（SOP）の策定にあたっては、各施設の設備や人員、保管する組織の種類（特定の疾患を対象とするか、網羅的に収集するか）、形状といった様々な項目を考慮する必要がある。状況に応じて適したSOPを作成し、実施されることが推奨される。

研究用の組織採取は病理診断に差し支えない部分を適切に採取しなくてはならない。そのためにも、診断に影響することがなく、かつ状態のよい部分を選択できるよう病理専門医や病理診断に精通した臨床医などの指導を受けること、さらには日本病理学会で実施しているe-ラーニング（<https://pathology.or.jp/genome/e-Learning/>）などで研修を受け、バンキング業務に従事することが望ましい。さらに組織が摘出されてから固定や切り出しなどの工程を経て、数日かけて診断用の標本となるまでの過程も理解した上でバンキングが実施されるべきである。

検体処理後の保管にあたっては、クライオチューブ等の一次容器に貼付した二次元バーコードラベルを読み込むことで収納場所や出入庫記録が管理できるシステムを用いて試料の管理を行うとよい。

＜参考文献＞

[1] 日本病理学会. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 羊土社, 2019, 160p.

1-1-2 新鮮凍結

【どのような試料か？】

組織片を凍結して保管したもので、snap frozen、dry sample ともいう。核酸（DNA、RNA）やタンパク質を抽出して使用されることが多い。組織（臓器）の種類にもよるが、長期間保管した試料からも PCR やシーケンスに使用できる良質な DNA、RNA が抽出できる事例が報告されている[1][2]。処理手順が簡単であること、また後述のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルに変換することも可能である*1といったメリットも多く、組織試料の保管方法としては第一選択とすることも推奨される。しかし、保管のための設備（超低温庫、液体窒素タンク等）、維持にコストがかかるといったデメリットもある。

【処理手順】

- (1) 採取組織を数ミリ角程度の組織片に細切する*2。
- (2) 組織片を1片ずつクライオチューブに入れる。
- (3) 液体窒素で急速凍結する。

【保管】

超低温庫または液体窒素タンクで保管する。

【One Point】

- *1 凍結組織片をそのままホルマリンに浸漬して固定後、パラフィン包埋ブロックを作製することも可能である。ただし、組織（細胞）によっては変性しているものもある。
- *2 どの程度の大きさに切り分けるか、チューブ何本分を保管するかなどを施設内で決めておく。

＜参考文献＞

- [1] 日本病理学会. “実証データ⑧ 長期保管温度のゲノム DNA の品質に対する影響”. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会編. 羊土社, 2019, p. 73-74.
- [2] 日本病理学会. “実証データ⑨ 長期保管温度の RNA の品質に対する影響”. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会編. 羊土社, 2019, p. 75.

1-1-3 凍結包埋

【どのような試料か？】

組織片を凍結組織用包埋剤で包埋して急速凍結したもので、術中迅速診断でも使用される。薄切後に HE 染色標本や免疫染色標本を作製して組織像の観察に使用される。組織像を確認できるため、採取した組織中の病変細胞（がん細胞など）の含有率を把握する指標になる。染色を行わずに未染標本から核酸やタンパク質を抽出することもできる。1-1-2 で述べた新鮮凍結組織と同様に保管のための超低温庫の購入、維持にコストがかかり、また調製も新鮮凍結と比べると作業工程がやや煩雑になる。

【処理手順】

- (1) 包埋皿にろ紙を入れ、その上に適当な大きさに切った組織片を置く。
- (2) 凍結包埋剤^{*1}を静かに流し入れ、組織を包埋する。
- (3) 液体窒素^{*2}に浮かべて包埋剤が白くなるまで凍結させる^{*3}。

【保管】

アルミ箔で包装し^{*4}、密閉性の高い容器に収納して超低温庫で保管する。

【One Point】

- *1 OCT compound（サクラファインテック）、クリオマウント（武藤化学）など各社から販売されており、感染症対策のために抗生物質が添加されたものや色のついた包埋剤も販売されている。
- *2 アセトン/ドライアイスや凍結包埋標本作製用の装置および冷却溶剤を使用して作製することもできる。しかし迅速診断と異なりバイオバンクでは長期保管を目的としているため、液体窒素の使用が推奨される。
- *3 包埋皿を直接、液体窒素に浮かべるとひびが入ってしまうことがあるので、金属カップなどに静置した状態で液体窒素に浮かべて冷却するとよい。
- *4 試料の乾燥を防ぐためにしっかりと包装する。パラフィルムは長期保管により劣化し剥がれてしまうリスクが高いため、アルミ箔が推奨される。

1-1-4 ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）

【どのような試料か？】

組織をホルマリンで固定した後、段階的に組織中の水分や脂肪を除去してパラフィンに浸透させてブロックに包埋したもので、いわゆる FFPE ブロックのことである。組織形態学的観察に優れていることはもちろん、常温で長期間の保管が可能であることも利点である。以前は固定により核酸の断片化が生じるため核酸を用いた解析については適していないと考えられていたが、解析技術が進歩したことから現在ではゲノム解析などでも積極的に使用されている[1]。新鮮組織や凍結包埋組織と比べると作業工程が長く試薬も多く必要となるため、バイオバンクで独自に調製しているというよりは病理部門と連携して試料回収を進めている施設が多い。

【処理手順】

- (1) 組織を適当な大きさに切り、ホルマリン固定液に浸漬する*1。
- (2) エタノール、キシレンなどの中間溶剤を使って脱水、脱脂を行いパラフィンに浸透させる*2。
- (3) パラフィンで包埋してブロックの成形を行う*3。

【保管】

パラフィンブロック保管用の容器、チャック付きビニールなどに入れ、室温で多湿を避けて保存する。冷蔵（4℃）で保管が可能であればさらによい。

【One Point】

- *1 固定時間は組織の種類、大きさによって検討、調製する。組織量に対して 10 倍量の固定液を使用することが望ましい。
- *2 自動包埋装置を使用する。
- *3 薄切断面を考慮して、組織の向きに注意して包埋する。

＜参考文献＞

- [1] 日本病理学会. “組織の処理”. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会編. 羊土社, 2019, p. 90-120.

1-1-5 その他

【どのような試料か？】

核酸の抽出、初代培養、異種移植など採取時に使用目的が決まっている場合には、その目的に適した形（1-1-2、1-1-3、1-1-4 以外の組織形態）で保管することや利用者へ提供することもある^{*1}。

【処理手順】

1. 核酸抽出用組織

保管試料を用いて DNA の塩基配列解析や RNA を用いた遺伝子発現解析を行うためには品質劣化を低減するために核酸安定化試薬等を用いて凍結することが望ましい。そのため、1-1-2 の要領で細切した組織片を核酸採取・保存用の試薬に浸漬して、凍結する。

2. 初代培養、異種移植用組織

初代培養や免疫不全動物への異種移植を実施する場合には生きた細胞・組織を凍結することが必要である。そのため、1-1-2 の要領で細切した組織片（初代培養用はさらに細かく組織をミンスしてもよい）を培養細胞凍結保存用溶液に浸漬して緩慢凍結する。もし、組織を利用者に速やかに提供することができる場合は、組織を PBS や培養液に浸漬しておく（凍結しない）。

【保管】

核酸採取・保存用試薬または培養細胞凍結保存用溶液に浸漬して凍結した組織は、超低温庫もしくは液体窒素タンクで保管する。非凍結組織は使用者に提供するまでの間、冷蔵庫または氷冷状態で保管する

【One Point】

- *1 最近、既存試料のみならず使用者の要望に沿った形で検体を採取し、提供するオンデマンド型の提供スタイルを実施するバイオバンクが増えている（代表例：筑波大学、岡山大学、神戸大学）。その際には、検体の処理手順や保管方法もオンデマンド型に対応できるよう様々な形態が採用されている。なお、オンデマンド型バイオバンクの一覧はクリニカルバイオバンク学会のホームページ[1]から公開されている。

＜参考文献＞

- [1] クリニカルバイオバンク学会. “診療施設併設型バイオバンク”. クリニカルバイオバンク学会. <http://www.clinicalbiobank.org/#partner>, (参照 2024-06-04).

第 1-2 節 血液の処理手順

1-2-1 概要

バイオバンクに保管されている血液検体には、全血、血清、血漿、バフィーコート、末梢血単核細胞（PBMC）などがある。

血液中には赤血球、白血球、タンパク質、電解質などが含まれ、赤血球、白血球、血小板を細胞成分（血球成分）、それ以外の水に溶解した成分を液性成分と大別する。バフィーコートや PBMC には細胞成分が、血清や血漿には液性成分が、全血にはすべてが含まれる。また、血液は採取後に凝固するが、この凝固した部分を除いたのが血清であり、凝固しないようにして遠心分離をした上清が血漿である。

血清と血漿の成分は似ているが、上で述べたように異なるところもある。また、血清では凝固を促進させるための薬剤（凝固促進剤）、血漿では凝固をさせないための薬剤（抗凝固剤）が用いられているため、血清や血漿にはこれらの薬剤の混入があり、また、これらの薬剤によって変化する成分もある。測定対象によってはこれらのことを検討に含めることが望ましい^{*1}。

血液検体の品質は、保管前や保管中の条件の影響を受ける。保管前の条件としては、採血をしてから処理を開始するまでの時間、その間の温度などがある^{*2}。また保管中の条件としては、保管温度、保管の際の凍結融解の有無・回数などがある^{*3}。

バイオバンクで保管を開始する際には、採血容器（特に抗凝固剤の種類）、採血場所から処理場所までの運搬ルート、採血から処理開始までの温度、遠心分離時の遠心力・時間・温度・ブレーキの有無、保管温度、保管用チューブの種類、チューブあたりの分注量などを決め、SOP として定める。

【One Point】

- *1 臨床検査の場合には、試薬会社や検査会社によって検査項目ごとに適した薬剤が事前に検討されており、用いる採血管などの指定が検査項目ごとにカタログに記載されている。
- *2 温度によって変化する成分、増える成分、減る成分などがあり[1]、すべての成分にとって望ましい温度はない。
- *3 一般に、凍結・融解は繰り返さないことが望ましく、これを防ぐためにはチューブあたりの分注量を少なくする。しかし一方で、分注数が増えるので、使用できる保管スペースとの兼ね合いで分注量と分注数のバランスを決めることになる。

＜参考文献＞

- [1] 日本臨床検査医学会 標準化委員会（2012-2013 年度）. “検体の保存安定性”. 臨床検査のガイドライン JSLM2021. 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編. 宇宙堂八木書店, 2021, p. 31-36.

1-2-2 全血

【どのような試料か？】

全血は、血液中のすべての成分を含んだ検体である。血液は採取して体外に出るとすぐに凝固するため、全血の保管を目的とした場合には抗凝固剤が入った採血管を使用する。採血後に全血のまま放置をすると変化をしていく^{*1}ので、速やかに凍結をすることが望ましい。全血は遠心分離などが不要なため血清や血漿などと比べて保管時間は短く済むというメリットがあるが、検体量が多くなり保管場所を取るというデメリットがある。バイオバンクとしては後者のデメリットは大きな問題となるため、血液検体の保管方法の第一選択にはなにくく、特定の研究において手間を減らすためなど特殊な事情において採用が検討されることがある。

【処理手順】

- (1) 抗凝固剤入りの採血管で採血する。
- (2) 採血後すみやかに 5 回以上の転倒混和をする。
- (3) 必要に応じてクライオチューブに分注する。

【保管】

超低温庫、液体窒素タンクで保管する。

【One Point】

- *1 採血後の血液を放置すると、赤血球の解糖系の働きによって、ブドウ糖が減少し、乳酸やピルビン酸が増加する。また、含窒素化合物の分解によりアンモニアが増加するなどのする[1][2]。

＜参考文献＞

- [1] 村本良三. “検体保存”. 最新臨床検査学講座 臨床化学検査学 第 2 版. 戸塚実・奥村伸生・浦山修・松下誠・山内一由・大川龍之介編. 医歯薬出版, 2022, p. 30-32.

[2] 米久保功. “静脈採血（シリンジ採血）”. カラー版 目でみる検体採取・取り扱いマニュアル. Medical Technology 編集委員会編. 医歯薬出版, 1998, p. 463-472.

1-2-3 血清

【どのような試料か？】

血清は、凝固した血液を遠心分離した後に上清として得られる黄色い液体成分である。このとき、下部の固形成分は血餅（けっぺい）と呼ばれ、血漿中のフィブリノゲン（血液凝固因子の1つであるタンパク質）と血球成分（赤血球、白血球、血小板）からなる。最終的に得られる血清の量は、採血した血液の量の2分の1程度になる。

【処理手順】

- (1) 凝固促進剤入りの採血管で採血する。
- (2) 採血後すみやかに5回以上の転倒混和をする。
- (3) 室温でしばらく静置する*1。
- (4) 遠心分離し、上清をクライオチューブに分注する。
- (5) 凍結する。

【保管】

超低温庫、液体窒素タンクで保管する。

【One Point】

- *1 採血後の凝固が不十分だと血清にゼリー状の物質（フィブリン）が析出し、血清をピペットで吸い上げるときに邪魔になる。このため、凝固促進剤が入った採血管を使用し、採血後、採血後に室温でしばらく静置してから遠心分離をする。

1-2-4 血漿

【どのような試料か？】

血漿は、全血（抗凝固剤入り）を遠心分離した後に上清として得られる黄色い液体成分である。下部の固形成分には赤血球が含まれ、また血漿と赤血球の間のバフィーコート（白血球層、軟層）*1と呼ばれる薄い層には血小板と白血球が含まれる。血漿には（血清には含ま

れない) フィブリノゲンが含まれる。最終的に得られる血漿の量は、採血した血液の量の 2 分の 1 程度になる。

抗凝固剤にはいくつかの種類があり、使用目的によって選択される[1]。主なものは EDTA、クエン酸、ヘパリンである。EDTA とクエン酸はキレート剤として使用され、血液が凝固する際に必要なカルシウムイオンを捕捉することで血液の凝固を防止する。ヘパリンは生体内の凝固阻止因子であるアンチトロンビンに結合してその機能（血液凝固の抑制）を強化する作用があり、この作用によって血液の凝固を防止する。

血漿中に含まれる核酸（DNA、RNA）は血液循環 DNA/RNA（cfDNA/RNA）と呼ばれ、臨床応用が進んでいる。妊娠中の母体の血漿には胎児の cfDNA が含まれるため[2]、胎児の出生前遺伝学的検査（NIPT）に使用される。また、がん患者の血漿にはがん細胞から遊離した cfDNA および cfRNA が含まれるため[3]、1-3-1 にあるようにがん遺伝子パネル検査に使用される。いずれも採血のみで済むため侵襲性が低いことが臨床において重要な要素となっている。

【処理手順】

- (1) 抗凝固剤入りの採血管で採血する*2。
- (2) 採血後すみやかに 5 回程度確実に転倒混和する。
- (3) 遠心分離し*3、上清をクライオチューブに分注する。

【保管】

超低温庫、液体窒素タンクで保管する。

【One Point】

- *1 赤血球と血小板は無核細胞であるのに対し白血球は有核細胞であるため、白血球を多く含むバフィーコートは、少ないサンプル量からでも多くの DNA を抽出することができる。なお、バフィーコート（buffy coat）の buff とは黄褐色のことであり、バフィーコートは通常このような色をしている層であることからこの名称となった。
- *2 血液の量と抗凝固剤の比は血液検査の結果に影響を及ぼすことが知られており、このため採血管ごとに推奨の採血量が定められている。しかし採血の際に推奨される血液量が得られないこともあり、もしそうした血漿検体を研究に用いる場合には測定結果に影響を及ぼすことがあるため、注意が必要である。

- *3 遠心分離が不十分だと血漿中に血球成分が混入しやすく、そのため遠心分離の遠心力（回転数）や時間は不足しないように注意する必要がある。また、必要に応じて2回目の遠心分離を行うことで、さらに夾雑物を除去することもできる。

＜参考文献＞

- [1] 東克巳, “抗凝固剤の種類と使い方”. 最新臨床検査学講座 血液検査学 第2版. 奈良信雄編. 医歯薬出版, 2021, p. 74-75.
- [2] Lo Y. M. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997, vol. 350, p. 485-487.
- [3] Crowley E. et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nature Review of Clinical Oncology. 2013, vol. 10, no. 8, p. 472-484.

1-2-5 末梢血単核細胞（PBMC）

【どのような試料か？】

末梢血単核細胞（PBMC）は、主にリンパ球と単球が含まれる液体成分である^{*1}。白血球は核を持った血球の総称であるが、形状の違いから、顆粒球、単球、リンパ球に大別される^{*2}。よって、白血球をさらに分離して得たものがPBMCであり、細胞性免疫系の臨床検査ではリンパ球の機能を検討するために用いられる[1]。

全血あるいはバフィーコートの密度勾配遠心を行うと、上層に血漿、中間層にPBMC、下層に赤血球および顆粒球へと分離される。PBMCの分離においては、比重液（分離液）として1950年代にPharmacia社（現Cytiva社）で開発された化合物Ficoll®や、その後に開発されたFicoll-Paque™、Lymphoprep™、Percoll™などが使用されることが多い。この場合、PBMCと赤血球・顆粒球の層の間に比重液の層ができる。

PBMCの分離処理が容易になるチューブや専用採血管も販売されており、目的に応じて使用される。

PBMCを凍結保管する場合には、緩慢凍結法が用いられる。

【処理手順】

- (1) 抗凝固剤入りの採血管で採血する。
- (2) 採血後すみやかに5回程度確実に転倒混和する。
- (3) 血液に同量のPBSを加え混和する。
- (4) 空のチューブに比重液を入れ、その上から混ざらないように静かに血液を入れる。

- (5) 遠心分離し、上層（血漿）を捨て、次の層を PBMC として回収する。
- (6) PBMC に 3 倍以上の PBS を加え、穏やかに懸濁させる。
- (7) 遠心分離し、上清を捨て、ペレット（PBMC）を PBS に懸濁させる。
- (8) 遠心分離し、上清を捨て、ペレット（PBMC）を細胞凍結保存液に懸濁させる。
- (9) クライオチューブに分注する。
- (10) プログラムフリーザーあるいは凍結保管容器を用いて緩慢凍結を行う。

【保管】

超低温庫、液体窒素タンクで保管する。

【One Point】

- *1 PBMC は様々な研究に利用される。細胞増殖、サイトカイン放出、iPS 細胞の樹立などにも使用されるため、保管されている PBMC のうち生きた細胞の割合（生細胞率）が重要になる。
- *2 リンパ球を分離する場合には、PBMC からさらに分離をする以外に、免疫磁気ビーズを用いた方法や、リンパ球以外に結合するモノクローナル抗体によって不要な細胞を除く方法がある。

＜参考文献＞

- [1] 窪田哲朗, “免疫不全症関連検査”. 最新臨床検査学講座 免疫検査学. 窪田哲朗・藤田清貴・細井英司・梶原道子編. 医歯薬出版, 2017, p. 212-215.

第 1-3 節 核酸の処理手順

1-3-1 概要

検査で正確な結果を得るためには高品質の核酸を用いることが重要である。血液循環 DNA と組織由来 DNA があるが、組織由来 DNA の検体には新鮮凍結検体や FFPE 検体があり、汎用性の観点から日常的には FFPE を使用することが多いと思われる。FFPE 検体から核酸を抽出するには、各プロセスにおいて重要なポイントがある。高品質の核酸を得る段階は固定前プロセスと固定後プロセスに集中している。

分析前工程として、ホルマリンによる組織の固定前プロセス、固定プロセス、固定後プロセスがあり、固定前プロセスは検体採取時から固定液に入れるまでのプロセスを指す。重要

なポイントは切除した組織をできるだけ早く固定液に浸漬することである。検体処理などで固定液への浸漬が難しい場合は冷蔵庫などでの保管が望ましい。

固定プロセスは、検体が固定液に浸漬してから病理部門における検体処理までのプロセスを指す。検体は組織の体積の 10 倍量相当の 10%中性緩衝ホルマリン固定液に 6～48 時間固定することが推奨されている。酸性ホルマリンは使用すべきでない[1][2]。ホルマリンの検体への浸漬速度は 1 mm/h 程度といわれており、大きな手術検体などでは割を入れて固定することも必要である。

固定後プロセスは、検体の切り出し、組織プロセッサを経て、FFPE 検体が作製されるまでのプロセスを指す。このプロセスでは、品質管理の観点から、検体のコンタミネーションを避けることに注意を払う必要がある。骨などの硬組織が含まれる検体の場合は、脱灰方法に注意を払う。ギ酸などの酸脱灰は急速に脱灰を完了させられるメリットはあるが、これを行うと核酸が断片化してしまい、正確な結果を得ることが不可能になる。EDTA 脱灰などの中性脱灰液を使用することが望ましい。

アナリシス段階として、病理医による適切な FFPE 検体の選定と臨床検査技師による未染標本作製がある。FFPE 検体は作製されてから 3 年以内のものが望ましく、これより古いものは核酸の断片化による影響で解析の成功率が低下する。未染標本は検査に必要な核酸量が確保できるだけの枚数を薄切する必要がある。検査によって必要な核酸量は異なるが、FoundationOne® CDx (Foundation Medicine, Inc.) では 50 ng の核酸量が必要になる。

血液循環 DNA は、保険収載されているがん遺伝子パネル検査として FoundationOne Liquid® CDx (Foundation Medicine, Inc.) に使用可能である。

新鮮凍結検体や細胞株からは FFPE よりも良質な核酸抽出が期待できるので、入手可能な検体であれば検討するのが望ましい。

＜参考文献＞

- [1] 日本病理学会. “ホルマリン固定パラフィン包埋標本の適切な作製・保管方法”. ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会編. 2016-03-01.
<https://pathology.or.jp/genome/kitei.html>, (参照 2024-06-06).
- [2] 日本病理学会. “ホルマリン固定パラフィン包埋組織・細胞検体の適切な取扱い”. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会編. 2018-03-01, p. 3-11.
https://pathology.or.jp/genome_med/pdf/textbook.pdf, (参照 2024-06-06).

1-3-2 組織由来 DNA

【準備するもの】

- ・ DNA 抽出用キット（凡例として Promega 社 Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit を使用）
- ・ FFPE 切片
- ・ 1.5 mL 遠心チューブ
- ・ 70°C設定のヒートブロック
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 微量高速遠心機
- ・ ピペットマン（P-20、P-200、P-1000）
- ・ ピペットチップ
- ・ Proteinase K 溶液
- ・ 使い捨て手袋
- ・ 消毒剤（70%エタノール、オスバン等）

【処理手順】

凡例として Promega 社 Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit を使用した場合の処理手順[1]を記載する。

1. サンプルの前処理

- (1) FFPE 切片（Total 2 mm³まで）をサンプルチューブに移す。
- (2) 遠心分離してサンプルをチューブの底に集め、溶液（Proteinase K 20 µL と Incubation buffer 180 µL）を加える。
- (3) キャップを閉め、70°Cオーバーナイトでインキュベーションする。
- (4) チューブをヒートブロックから取り出し、Lysis Buffer 400 µL を加え、ボルテックスにより攪拌する。
- (5) チューブを室温にて保管する。

2. カートリッジの準備

- (1) 検体数分のカートリッジを Maxwell® RSC Deck Tray にセットする。
- (2) 同数の Elution Tube をセットし、Nuclease-Free Water 50 µL を加える。
- (3) カートリッジのウエルにプランジャーを置く。
- (4) ライゼートをカートリッジのウエルに添加する。
- (5) Maxwell® RSC Deck Tray を本体にセットし、精製操作を開始する。

3. 精製終了後の操作

- (1) Maxwell® RSC Deck Tray を取り出し、Elution Tube を保管する。
- (2) 保管には TE バッファーによる冷蔵（2～8℃）保管が推奨される。
- (3) DNA を超低温（-70℃以下）で長期間保管する場合には、凍結融解・凍結乾燥を避けるため、分注して密閉保管することが推奨される。

<参考文献>

- [1] Promega. “Maxwell RSC FFPE Plus DNA Kit Technical Manual”. Promega.
<https://www.promega.jp/resources/protocols/technical-manuals/500/maxwell-rsc-ffpe-plus-dna-kit-protocol-tm574/>, (参照 2024-04-15).

1-3-3 血液循環 DNA

【準備するもの】

- ・ DNA 抽出用キット（凡例として Promega 社 Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit を使
核酸安定化剤入り採血管
- ・ 抗凝固剤（EDTA など）入り採血管
- ・ 1.5 mL 遠心チューブ
- ・ ローテーター
- ・ マイクロピペット（P-200、P-1000）
- ・ ピペットチップ
- ・ 使い捨て手袋
- ・ 消毒剤（70%エタノール、ベンザルコニウム塩化物液等）

【処理手順】

凡例として Promega 社 Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit を使用した場合の処理手順
[1]を記載する。

1. サンプルの前処理

- (1) 血液サンプルを少なくとも 5 分間室温で攪拌する（ローテーターなど利用）。

2. カートリッジの準備

- (1) 検体数分のカートリッジを Maxwell® RSC Deck Tray にセットする。

- (2) 同数の Elution Tube をセットし、Elution Buffer 60 μ L を加える。
- (3) カートリッジのウェルにプランジヤーを置く。
- (4) 5 分間の攪拌が完了した血液をカートリッジのウェルに添加する。
- (5) Maxwell[®] RSC Deck Tray を本体にセットし、精製操作を開始する。

3. 精製終了後の操作

- (1) Maxwell[®] RSC Deck Tray を取り出し、Elution Tube を保管する。
- (2) 保管には TE バッファーによる冷蔵 (2~8°C) 保管が推奨される。
- (3) DNA を超低温 (-70°C以下) で長期間保管する場合には、凍結融解・凍結乾燥を避けるため、分注して密閉保管することが推奨される。

<参考文献>

- [1] Promega. “Maxwell RSC Whole Blood DNA Kit Technical Manual”. Promega.
<https://www.promega.jp/resources/protocols/technical-manuals/101/maxwell-rsc-whole-blood-dna-kit-protocol/>, (参照 2024-04-15).

1-3-4 血液循環 RNA

【準備するもの】

- ・ RNA 抽出用キット (凡例として Promega 社 Maxwell[®] RSC simply RNA Blood Kit を使用)
- ・ 抗凝固剤 (EDTA など) 入り採血管
- ・ 15 mL 遠心チューブ
- ・ 微量高速遠心機
- ・ ピペットマン
- ・ RNase-free ピペットチップ

【処理手順】

凡例として Promega 社 Maxwell[®] RSC simply RNA Blood Kit を使用した場合の処理手順 [1]を記載する。

1. サンプルの前処理

- (1) 血液サンプル全血 2.5 mL を抗凝固剤入り採血管から滅菌 15 mL チューブに移す。

- (2) 7.5 mL の Cell Lysis Solution を加え、チューブを 5 ～ 6 回転倒混和する。赤血球が溶解され、白血球はそのまま残る。
- (3) 室温で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中に 2 回反転して混合する。
- (4) チューブを $3,000 \times g$ で 10 分間遠心する。
- (5) 目に見える白いペレットを乱さないように、できるだけ多くの上清を取り除いて廃棄する。チューブの底に残った液体をピペットで取り除き、上澄みを捨てる。
- (6) 冷却した 1-Thioglycerol/Homogenization 溶液 200 μL をペレットに加える。ボルテックスでよく混ぜる。
- (7) 再懸濁したペレットに 200 μL の Lysis Buffer と 25 μL の Proteinase K を加える。20 秒間ボルテックスして混合する。
- (8) 室温で 10 分間インキュベートする。
- (9) Maxwell® RSC Simply RNA Blood Cartridge のウエルに 10 μL の DNase Solution を加える。
- (10) Maxwell® RSC Simply RNA Blood Cartridge のウエルにライセートを追加する。

2. カートリッジの準備

- (1) 検体数分のカートリッジを Maxwell® RSC Deck Tray にセットする。
- (2) プランジャーを各カートリッジのウエルに入れる。
- (3) 空の 0.5 mL Elution Tube をセットする。Nuclease-Free Water 50 μL を各 Elution Tube に注入する。
- (4) Maxwell® RSC Deck Tray を本体にセットし、精製操作を開始する。

<参考文献>

- [1] Promega. “RSC simplyRNA Blood Kit Technical Manual”. Promega.
<https://www.promega.jp/resources/protocols/technical-manuals/101/maxwell-rsc-simplyrna-blood-kit-protocol/>, (参照 2024-04-15).

第2章 バイオバンク検体の研究利用

第2-1節 生体分子アッセイ

2-1-1 生体分子アッセイ概要と例

【目的】

生体分子アッセイは、生体内の血液を含む様々な体液や尿、便などの排泄物、細胞を含む生体組織などを用いて生体中に存在する分子（被測定物）の存在、量、または機能活性を定性的に評価あるいは定量的に測定することを目的として、様々な解析が実施される^{*1}。解析の対象とする分子（被測定物）には、ペプチドを含むタンパク質が主なものとして挙げられるが、その他にも DNA、mRNA、miRNA などの核酸や代謝物などの化合物も解析対象となる。解析の方法として主なものはクロマトグラフィ、分光光度計、質量分析装置、表面プラズモン共鳴、NMR、次世代シーケンサーなどがある。抗原抗体反応を用いる解析手法（第2-4節で解説する）もその一つと言える。

【手法】

生体内に存在する特定分子の量的変化を解析する際には、クロマトグラフィ、分光光度計などが用いられ、特定分子の存在を解析する時には質量分析装置などが用いられる^{*2}。

1. クロマトグラフィ

クロマトグラフィは量的変化を解析したい分子に着目して、その科学的・物理的な性質や相互作用を利用して分子を分離させる手法である。したがって、量的変化を解析するためには目的の分子を分離できるようにし、親和性のある担体で分離できるような実験系をカスタマイズする必要がある。それぞれの試料に含まれる目的分子の比較定量を行うことができるが、既知の濃度の目的分子溶液を調製することが出来れば絶対定量も可能となる。

2. 分光光度計

分光光度計は目的分子の吸光特性を利用した手法である。タンパク質量を測定する方法などが代表的であるが、主なタンパク質定量法には紫外吸収法、Bradford 法（クーマシーブルー法）、Lowry 法（フェノール試薬法）、ビシンコニン酸法（BCA 法）などがある。それぞれに長所、短所があり、また同じサンプルでも定量法によって結果に大きな差が見られることがある。したがってそれぞれの特徴を知り、自分の実験にあった方法を選択し、一連の実験では同じ測定法を使用することが望ましい[1]。この分光光度計を用いた手法も検量線を作成することにより絶対定量が可能となる。タンパク質以外にも DNA、RNA の量を

測定することが可能である。また臨床検体（血液、尿など）の生化学検査自動分析装置は、主に分光光度計を用いた吸光光度法によって定量分析・定性分析を行っている。このため、酵素、脂質、腎機能・電解質など多くの測定項目がキットによって自動分析される。

3. 質量分析装置（MS）

質量分析装置は目的分子の存在を確認するために用いられることが多い手法であり、目的分子の質量あるいは目的分子の断片の質量測定をもとに、その存在を確認することが出来る[2]。また、微量にしか存在しない分子であってもその検出感度は非常に高く、高感度分析が可能である。原理は、分子をイオン化しその質量電荷比（ m/z ）を測定することによって分子を特定するものである。装置は試料導入部、イオン源、分析部、イオン検出部、データ処理部から構成される。試料導入部には高速液体クロマトグラフィ（HPLC）やガスクロマトグラフィ（GC）、キャピラリー電気泳動（CE）などが用いられ、試料分離を行う。イオン源と分析部は質量分析装置の重要構成装置であり、それぞれ試料に電荷を持たせる（イオン化する）部分、イオン化された試料を分離する部分であり、多くのイオン化法（電子イオン化法、MALDI 法、ESI 法など）、分析型（四重極型、飛行時間型など）が開発されているので、自分の試料や目的分子の分析にあったイオン化法と分析型を選択する必要がある。

4. 表面プラズモン共鳴

分子間相互作用の分析に用いられ、抗原-抗体、タンパク質-タンパク質、ペプチド-タンパク質、低分子化合物-タンパク質などの相互作用分析が可能である[3]。

5. 核磁気共鳴（NMR）

尿をはじめとする体液中の代謝物分析（メタボロミクス分析）に活用されており、疾患特異的な代謝物の存在を分析することなどに活用されている[4]。

6. 次世代シーケンサー（NGS：Next Generation Sequencer）

ゲノム解析に威力を発揮する解析技術であるが、近年は患者から血液などの体液を採取し、その中に含まれているがん細胞由来の物質（ctDNA、miRNA など）を解析する技術（リキッドバイオプシー）にも活用されており、新たな疾患バイオマーカー解析技術として注目されている[5]。

【One point】

- *1 試料の種類と解析手法の組み合わせによって様々な生体分子アッセイが可能であるが、検体の採取条件、前処理、保管状態などによって結果に大きく影響することが多いので、扱う検体の状態には十分な注意を払う必要がある。
- *2 量的な変化を捉える方法、存在を確認する方法としたが、装置を組み合わせることによって定性・定量を行うことが出来る分析技術もある。LC/MS や GC/MS などは分離能力に優れたクロマトグラフィと定性能力に優れた質量分析装置を結合した装置で、スキャン測定より得られるマススペクトルでは溶出成分に分子量と構造情報を与えることで定性・定量が可能となる。

【使用例】

高速液体クロマトグラフ法（HPLC）を用いて血液中の HbA1c を定量することが可能である。HbA1c は糖尿病患者において高値を示すバイオマーカーであり、糖尿病関連研究において有用な手法として活用されている[6]。また、カテコールアミン（副腎髄質ホルモン：ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン）の測定にも HPLC が用いられ、褐色細胞腫（カテコールアミン産生腫瘍）、神経芽細胞腫の診断・解析に用いられている[7]。

分光光度計は自動分析装置にも搭載され、開発が進んだ分析機器であるが、より高感度な血液あるいは体液中の生体分子・病原性分子の定量化するための研究開発が行われている。

質量分析装置や NGS を用いた研究においては、疾患に由来する生体分子を高感度に検出する手法の開発が盛んに進められており、今後疾患の早期発見などに役立てられると考えられている。

＜参考文献＞

- [1] 鈴木祥夫. “総タンパク質の定量法”. ぶんせき / 日本分析化学会 編 2018 (1), p. 2-9.
- [2] J. H. グロス. “マススペクトロメトリー 原著 3 版”, 日本質量分析学会出版委員会訳, 丸善出版 (2020)
- [3] 岡本隆之, 梶川浩太郎. “プラズモニクスー基礎と応用”, 講談社 (2010)
- [4] 福原清, 大野彰子. “NMR メタボロミクスを利用した疾患関連バイオマーカーの探索” 昭和学会誌 vol. 75, No. 3, p. 288-295 (2015)
- [5] 加藤俊介. “総説—我が国のがんゲノム医療・Precision Medicine—”, 日本内分泌外科学会雑誌, 2020, vol. 37, no. 2, p. 106-109.
- [6] 東野功嗣. “HPLC 法の素敵な部分と酵素法のチャームポイント”. 生物試料分析, 2020, vol. 43, no. 4, p. 224-230.

[7]角田誠, 今井一洋. “カテコールアミンの高選択的高感度定量法の開発と応用”, 分析化学. 2003, vol. 52, no. 12, p. 1081-1089.

2-1-2 生体分子アッセイに用いられる検体

様々な分析手法が考えられるが、その対象検体としては、血液、尿をはじめとする液体成分が主な検体となる。

その他の体液（唾液、胸水、腹水など）なども特殊な解析を行う場合には対象となる。

組織や細胞に含まれる生体分子を測定する場合には、生体分子を抽出して測定に用いる場合がある。

第 2-2 節 遺伝子変異解析

2-2-1 遺伝子変異（遺伝子配列）解析の概要と例

【目的】

遺伝子変異の種類には、「置換 substitution」「欠失 deletion」「逆位 inversion」「増幅 amplification」「挿入 insertion」「フレームシフト frameshift」「融合 fusion」「コピー数多型 CNV」などがある。

がんに関連する遺伝子変異は、がん細胞内のみで生じる体細胞遺伝子変異（somatic mutation）と、患者の正常細胞が生まれながらにしてもっている遺伝子バリエーションである生殖細胞系列遺伝子変異（germline mutation）に大別される。

【遺伝子変異の例】

- ・ 置換 substitution：1 つの塩基が他の 1 つの塩基で置換された変化。
例：EGFR L858R c.2573T>G
アミノ酸変化：p.Leu858Arg
- ・ 欠失 deletion：1 つまたは複数の塩基が欠失した変化。
例：EGFR exon19 deletion c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT
アミノ酸変化：p.Leu747_Thr751del
- ・ 逆位 inversion：複数の塩基が元の配列の逆相補配列になる変化。
例：ACGTC→CTGCA
- ・ 増幅 amplification：遺伝子の数（コピー数）が増える変化。
例：ERBB2 amp (copy number=32)

- ・ 挿入 insertion：1 つ以上の塩基が挿入され、なおかつ、その挿入部の 5'側直前配列のコピーではない変化。
例：ERBB2 c.2326_2327insTAG
アミノ酸変化：p.Ala775_Gly776insVal
- ・ フレームシフト frameshift：塩基の変化によりコドンの枠がずれた場合のアミノ酸配列や C 末端位置の変化。
例：SMAD4 p.S411fs*17
- ・ 融合 fusion：2 つの遺伝子が染色体転座によって融合する変化。
例：ETV6-NTRK3
- ・ 遺伝子コピー数変異 Copy Number Variation：個体間でコピー数が異なる遺伝子領域が、ゲノム全般にわたって存在すること。
例：segmental duplication、deletion variants

【Germline バリエーションの解釈】

- ・ Pathogenic：疾患に関連することが知られているバリエーション。
例：遺伝性乳癌卵巣癌症候群（HBOC）における BRCA1/2
例：Lynch 症候群における MLH1、MSH2、MSH6、PMS2
- ・ Likely pathogenic：疾患に関連すると考えられるが、確定的ではないバリエーション。
- ・ Variant of Uncertain Significance（VUS）：臨床的・生物学的に意義がわかっていないバリエーション。疾患に関連するものかどうか、さらなる検討が必要とされている。
- ・ Likely benign：疾患にはおそらく関連しないと考えられるバリエーション。
- ・ Benign：疾患には関連しないと考えられるバリエーション。

【Germline バリエーションの解釈】

- ・ Pathogenic：疾患に関連することが知られているバリエーション。
例：遺伝性乳癌卵巣癌症候群（HBOC）における BRCA1/2
例：Lynch 症候群における MLH1、MSH2、MSH6、PMS2
- ・ Likely pathogenic：疾患に関連すると考えられるが、確定的ではないバリエーション。
- ・ Variant of Uncertain Significance（VUS）：臨床的・生物学的に意義がわかっていないバリエーション。疾患に関連するものかどうか、さらなる検討が必要とされている。
- ・ Likely benign：疾患にはおそらく関連しないと考えられるバリエーション。
- ・ Benign：疾患には関連しないと考えられるバリエーション。

【手法】

遺伝子配列を決定する機器はシーケンサーと呼ばれる。シーケンサーにより DNA 塩基配列を読み込み、リファレンス配列と比較することで変異を同定する。

Sanger 法を利用したシーケンス方法を第一世代のシーケンサーと呼ぶのに対して、一度に大量の塩基配列データをシーケンスできるものを第二世代のシーケンサーと呼び、現在ではナノポアシーケンサーなどの第三世代のシーケンサーも登場している。一般的には第二世代以降のシーケンサーを総称して次世代シーケンサー-NGS としている。NGS はショートリードシーケンサーとロングリードシーケンサーに大別される。

1. ショートリードシーケンサー

数百 bp 程度の長さの DNA 配列をシーケンスリードとして、数百万～数十億本を同時に読み取ることが可能である。塩基読み取りの正確性は 99.9%以上とされており、非常に高い精度を誇る。代表的な機械に Illumina シーケンサーや MGI シーケンサーがある。

2. ロングリードシーケンサー

PCR などの DNA 増幅をせずに 1 分子の核酸の配列を読み取ることが可能であり、数十 kbp 以上の配列を 1 本のシーケンスリードとしてシーケンスできる。遺伝子配列解析を行う際に有用な機器であり、代表的な機械に PacBio シーケンサーや Nanopore シーケンサーがある。

メリットはショートリードシーケンサーでは検出困難な数 kbp にわたる繰り返し配列や、重複や転座といった構造変異を効率よく検出することが可能な点である。デメリットは Nanopore シーケンサーの塩基読み取りの正確性が 90%程度であり、ショートリードシーケンサーに対して精度で劣る点である。一方、PacBio シーケンサーは塩基読み取りの正確性が 99.9%以上とされており、ショートリードシーケンサーと同等の精度を誇る。

2-2-2 遺伝子変異解析に用いられる検体

- ・ 組織
- ・ 血液
- ・ 尿
- ・ 体腔液
- ・ 洗浄液

第 2-3 節 遺伝子発現解析

2-3-1 遺伝子発現解析の概要

【目的】

複数のサンプル間で複数の遺伝子の発現レベルを網羅的に比較する手法。一例として薬剤の細胞に対する影響を調べるために使用される。

【手法】

1. マイクロアレイ

スライドガラスの基盤上に DNA 断片を高密度に配置し、これと蛍光標識した測定試料由来の DNA ライブラリーをハイブリダイズさせることで、DNA 断片の遺伝子発現量を大量並列的に定量する方法。

2. 次世代シーケンサー (NGS)

前節で紹介した NGS は遺伝子発現解析にも用いられる。ショートリードシーケンサーとロングリードシーケンサーのいずれも使われる。

3. リアルタイム PCR

定量的な分析を可能にした PCR 法。DNA の増幅反応サイクルをモニタリングすることで鋳型 DNA を定量できる。逆転写酵素 (reverse transcriptase) によって RNA を cDNA に転写した後、それを鋳型とすることで定量的な遺伝子発現量の解析が可能。

4. デジタル PCR

絶対定量を可能にした PCR 法。PCR 反応を「ある (1)」「なし (2)」のデジタルデータに落とし込み、微量の鋳型 DNA 量を「DNA 鎖が n コピー」と絶対的に定量する解析法。

2-3-2 遺伝子発現解析に用いられる検体

- ・ 組織
- ・ 血液
- ・ 尿
- ・ 体腔液

- ・ 洗浄液

第 2-4 節 免疫反応測定

2-4-1 免疫反応測定の概要と例

【目的】

免疫反応測定は、抗原抗体反応を利用して検体に含まれる抗原あるいは抗体を測定する。測定対象が血液や尿などの液体の場合には、含まれる生体分子（タンパク質やステロイドなど）の存在の定性的な測定や、その生体分子の量を定量的に測定するために利用される。これを応用して細胞の存在や機能を評価するために用いられる場合もある。抗原抗体反応を用いることで、非常に微量の生体分子でも測定できることや^{*1}、様々な生体分子が混在する検体から対象の生体分子を特異的に測定できることが強みである。一方、測定対象が組織や細胞の場合には、細胞の形態や細胞内の分子の局在を観察するために利用される。これらは第 2-5 節で解説する。

【手法】

液体に融解している生体分子を測定する場合、代表的な方法として、ウェスタンブロッティング法、ELISA 法、イムノクロマトグラフィ法、ELISPOT 法などがある。

1. ウェスタンブロッティング法（イムノブロット法）

ウェスタンブロッティング法、生体分子の混合物を電気泳動によって分離した後、特定の生体分子に特異的に結合する抗体を用いることでその生体分子の存在を検出する方法である。また、その生体分子の存在の検出だけでなく、その生体分子の量がわかっているコントロールを同時に測定することによって、検体中に含まれる生体分子の相対的な量を計算することができる（比較定量）。

2. ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法

ELISA 法は、抗体（一次抗体）を固定したマイクロプレートに生体分子の混合物を入れて抗体に抗原（測定対象の生体分子）を反応、次いで酵素標識をした抗体（二次抗体）をマイクロプレートに残った抗原に反応させ、さらに発色する基質を加えて比色法で酵素活性を測定することで、抗原（測定対象の生体分子）の絶対量を定量する方法である^{*2}。酵素活性を利用しない測定方法もある^{*3}。また、一次抗体をマイクロプレートではなくビーズに固定

する方法もあり、こうすることで同時に複数の生体分子を測定することができる（マルチプレックスアッセイ）。

3. イムノクロマトグラフィ法（免疫クロマトグラフィ法）

イムノクロマトグラフィ法は、クロマトグラフィ法^{*4}によって生体分子の混合物を分離した後、特定の生体分子に対する抗体を用いることでその生体分子を検出する方法である。クロマトグラフィ法には、ガスクロマトグラフィ（GC）、液体クロマトグラフィ（LC）、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）などがあるが、イムノクロマトグラフィ法はインフルエンザウイルス抗原検査のように簡便に対象とする生体分子の存在の有無を検出することを目的としているため、キット化された液体クロマトグラフィが用いられる[1]。

4. ELISPOT（Enzyme-Linked Immunospot）法

ELISPOT 法は、一次抗体を結合させたマイクロプレートに細胞を入れ、細胞に刺激を与えることで産生される生体分子を ELISA 法の原理によって検出する方法である。こうすることで細胞が存在していることを評価する、あるいは細胞の機能を評価することができる。つまり、知りたいことは細胞の情報であるが、測定をするのは細胞から産生される生体分子である。抗原に特異的な T 細胞からのサイトカインの放出など、抗原特異的な免疫応答の基礎研究（がん、感染症など）やワクチン開発などに用いられる。

【One point】

- *1 生体分子が検体中に多く含まれている場合には、分光光度法（入射光に対する透過光の減少を利用した測定法）によって測定することもできる。分光光度法による測定に必要な生体分子の濃度は、一般的には 10^{-6} mol/L 以上と言われる[2]。
- *2 比色法による標識酵素活性の測定以外に、蛍光基質を用いた蛍光酵素免疫測定法（FEIA：Fluorescent Enzyme Immunoassay）、化学発光基質を用いた化学発光酵素免疫測定法（CLEIA：Chemiluminescence Enzyme Immunoassay）、生物化学発光基質を用いた生物発光酵素免疫測定法（BLEIA：Bioluminescence Enzyme Immunoassay）がある。これらの酵素で標識した抗体を用いた測定法は酵素免疫測定法（EAI：Enzyme Immunoassay）と総称される。
- *3 検出のために酵素を用いない方法として、蛍光を用いる蛍光免疫測定法（FIA：Fluorescent Immunoassay）、化学発光を用いる化学発光免疫測定法（CLIA：Chemiluminescence Immunoassay）がある。

- *4 クロマトグラフィ法は、生体分子の混合物を固定相（固体または液体）の中で移動させ、その移動速度の差によって分離する方法の総称である。生体分子の混合物は移動相（液体または気体）と呼ばれる。

【研究の例】

ウェスタンブロッティング法や ELISA 法は、検出対象とする生体分子の抗体がこれらの手法用に販売されていれば実施でき、様々な研究に広く利用されている。イムノクロマトグラフィ法は簡便に対象とする生体分子の有無を確認できることが強みとなるため、研究以外にもインフルエンザウイルスや食中毒（腸管出血性大腸菌 O157）の迅速診断キットなど、主に感染症の臨床検査として利用されている。ELISPOT 法は細胞から放出されるサイトカインの検出に用いられており、たとえば HIV 罹患による免疫応答の低下やワクチン接種による免疫応答の増加の評価といった利用ができる。他に、感染症、がん免疫、アレルギー、自己免疫疾患などの研究で利用されている。

＜参考文献＞

- [1] 望月照次. “標識免疫測定法”. 最新臨床検査学講座 免疫検査学. 窪田哲朗・藤田清貴・細井英司・梶原道子編. 医歯薬出版, 2017, p. 126-133.
- [2] 松下誠. “分析法の選択”. 最新臨床検査学講座 臨床化学検査学. 浦山修・奥村伸生・戸塚実・松下誠編. 医歯薬出版, 2016, p. 37-38.

2-4-2 免疫反応測定に用いられる検体

ウェスタンブロッティング法、ELISA 法、イムノクロマトグラフィ法での測定では、測定に用いる検体は溶液でなければならない。

血清、血漿、尿、体腔液（唾液、胸水、腹水、母乳など）、脳脊髄液、細胞培養上清などの液性検体を測定に用いる場合には、必要に応じて緩衝液（バッファー）による希釈や遠心分離をして測定に用いる。母乳の場合には、遠心分離によって脂肪層、中間層（溶液部分）、沈殿層の 3 層に分かれるので、中間層を用いる。

組織や細胞に含まれる生体分子を測定する場合には、これらを破壊して生体分子を抽出して測定に用いる。一連の作業によって細胞や組織から得られた溶液を細胞ライセート（溶解物）や組織ライセート（組織溶解物）と呼ぶ。

ELISPOT 法は細胞の量や活性を測定するため、PBMC を用いる。

第 2-5 節 形態観察

2-5-1 形態観察の概要と例

【目的】

バイオバンクに保管される検体は、組織や細胞の形態学的特徴を観察する、特定の細胞や細菌などの微生物を検出する、といった目的で染色を施して観察に使用することがある。また、細胞の増殖や増殖因子、薬剤刺激に対する挙動などを観察する目的で、細胞を培養して観察することもある。

【手法】

形態観察を実施するためには、病理診断で使用されている染色を施して組織や細胞を観察する方法、培養した生きた状態の組織や細胞を観察する方法がある。どのような方法で形態観察を行うかによって保管方法が異なるため、あらかじめ検討した上で適切な保管法を選択する必要がある。

1. 病理組織診断で使用される主な方法

- (1) HE 染色：形態観察のための一般的な染色。
- (2) エラスチカ・ワンギーソン（EVG）染色：結合組織の染色。結合組織の中の弾性線維と膠原線維を染め分ける。
- (3) PAS 染色：多糖類の染色。グリコーゲン、粘液タンパクなどの染色法として最も多く用いられている。
- (4) マッソン・トリクローム染色：結合組織の染色。EVG と組み合わせて使用されることが多い。
- (5) アルシアンブルー染色：多糖類の染色。PAS と組み合わせて使用されることが多い。
- (6) 免疫染色：抗体を用いて細胞に存在する抗原を検出（可視化）する方法。
- (7) その他：グラム染色、グロコット染色などの病原体を染色する方法、腎臓の染色に使用する PAM 染色も多く用いられている。

2. 病理細胞診断で使用される主な方法

- (1) パパニコウ染色：細胞診標本の染色に最も広く用いられている。核と細胞質（角化扁平上皮、非角化扁平上皮）を染め分けることができる。重積した細胞や核構造が詳細に観察できる。

- (2) ギムザ染色：血液、骨髓標本の染色法として一般的に用いられている。核クロマチンや細胞質顆粒の観察に適している。

3. 培養細胞を観察する方法

- (1) 位相差観察：無色透明な試料に明暗のコントラストをつけて観察する方法。
- (2) 蛍光染色法：試料に蛍光色素を導入して観察する方法。抗体染色などで目的の細胞を生きた状態で可視化できる。

【研究の例】

形態観察のために染色を施した組織や細胞、培養をした細胞は次のような研究に使用される。

- ・ 病変部と非病変部の組織・細胞像を比較する研究[1]
- ・ 病態変化を観察する研究[2][3]
- ・ 疾患特有の形態学的特徴を解析する研究[4]

さらに染色を施した像より目的の部分抽出、特定の細胞を選択して遺伝子解析などへ応用されることもある。

＜参考文献＞

- [1] Budinská E, et al. Molecular portraits of colorectal cancer morphological regions. *eLife*. 2023, vol. 12, RP86655.
- [2] Kumar N, Verma R, Chen C, Lu C, Fu P, Willis J, Madabhushi A. Computer-extracted features of nuclear morphology in hematoxylin and eosin images distinguish stage II and IV colon tumors. *Journal of Pathology*. 2022, vol. 257, no. 1, p. 17-28.
- [3] Păun I, Costin AI, Constantin VD, Lomaca I, Ianoși NG, Socea B, Tutunaru CV, Zlatian OM, Ianoși SL, Neagoe CD, Crafcu AV, Stancu MI. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2020, vol. 61, no. 4, p. 1129–1141.
- [4] Ciereszko A, Dietrich MA, Słowińska M, Nynca J, Ciborowski M, Kaczmarek MM, Myszczyński K, Kiśluk J, Majewska A, Michalska-Falkowska A, Kodzik N, Reszeć J, Sierko E, Nikliński J. Application of two-dimensional difference gel electrophoresis to identify protein changes between center, margin, and adjacent non-tumor tissues obtained from non-small-cell lung cancer with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma subtype. *PLOS ONE*. 2022, vol. 17, no. 5, e0268073.

2-5-2 形態観察に用いられる検体

1. 組織

(1) 凍結包埋

HE 染色、EVG 染色などの特殊染色、免疫染色に使用する。必要に応じて薄切後にホルマリンなどで固定を行う。FFPE より形態は劣るが、免疫染色などの後に目的の細胞をマイクロダイセクション法で採取して核酸を抽出することが可能である。

(2) FFPE

病理診断のためにルーチンで作製されているので、形態観察には適しており HE 染色、EVG 染色などの特殊染色、免疫染色に使用する。凍結包埋より効率は下がるが、核酸の抽出も可能である。ゲノム抽出に適したホルマリンを含まない固定液も販売されており、形態像も FFPE に劣らない。ただし試薬コストが高価なため、症例を選んで使用することが推奨される。

(3) 新鮮組織

主に培養に使用され、培養細胞の位相差観察、蛍光染色などを行う。また、腫瘍組織片を免疫不全マウスに移植して腫瘍形成を観察する方法、組織をスライドグラスに押し付けて捺印細胞診標本作製し、染色をして観察する使用方法もある[1][2]。

2. 組織以外

(1) 血液

血液をスライドグラス上に薄く伸ばして染色し、観察する。また、密度勾配遠心法を利用して単核球を分離し、培養やフローサイトメトリーに使用されることもある。

(2) 気管支洗浄液、胸水、腹水など穿刺液

採取した液を遠心分離し、沈渣をスライドグラスに薄く伸ばして染色し、観察する。

【検体処理方法の注意点】

組織、細胞を用いて染色を行う際は、染色方法により適した固定の方法が異なるので病理標本作製の教科書などでよく調べてから実施するとよい。スライドグラスにマウントする組織の厚みや細胞の塗抹も染色標本のできあがりに影響を及ぼすので注意する。免疫染色に使用する抗体の中には FFPE では使用できないものもあるので、抗体を購入する際はデータシートをよく確認する。

組織、細胞を培養に使用する際は、採取してからできる限り速やかに処理を開始する（第 2-6 節 細胞培養 参照）。

＜参考文献＞

- [1] Yagishita S, Kato K, Takahashi M, Imai T, Yatabe Y, Kuwata T, Suzuki M, Ochiai A, Ohtsu A, Shimada K, Nishida T, Hamada A, Mano H. Characterization of the large-scale Japanese patient-derived xenograft (J-PDX) library. Cancer Science. 2021, vol. 112, no. 6, p. 2454-2466.
- [2] 糸山雅子, 中村純子, 佐藤元, 石田圭子, 榎本利香, 鳥居良貴, 石川恵理, 井出良浩, 渡邊隆弘, 廣田誠一. オンサイト迅速細胞診における湿固定簡易ギムザ染色の有用性. 日本臨床細胞学会雑誌, 2021, vol. 60, no. 3, p. 141-149.

第 2-6 節 細胞培養

2-6-1 細胞培養の概要と例

【目的】

生きた状態の細胞を観察するため、オンデマンド型分譲などバイオバンクで前向きに採取する試料を用いて細胞培養を行うことがある。細胞培養は組織などの生体試料から分離した細胞を生体外で人工的に増殖、維持することであり、細胞を培養することで生体内の現象を単純な系で再現することができる。培養中の細胞には薬剤の添加や様々な刺激を負荷することが可能になるので、医学・創薬研究に大変有用である。

【手法】

組織検体に酵素処理を施して細胞を分離、または組織片を培養皿に静置して細胞を増殖させる方法がある[1][2]。がん由来組織から分離したがん細胞は、比較的容易に培養ができるので研究利用されることが多い。間葉系組織由来の線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞などの細胞も広範に培養に使用される。また、末梢血、臍帯血、骨髄から分離した単核球なども培養に使用される。

【研究の例】

(1) 細胞株の樹立

細胞培養を継続する（継代）と細胞が変異を起こし、無限増殖性を獲得することがある。または遺伝子導入やウイルス感染により、細胞が特異的な性質を持つことがある[3]。このような細胞系を作る（樹立）目的で使用されることがある。

(2) 3次元培養

細胞を平面的ではなく、立体的な構造をもたせて培養する方法[4]。細胞を旋回して細胞塊を形成させる方法、細胞をコラーゲンゲルなどのゲル内で培養する方法、特殊な培養担体を用いて培養する方法などがある。

(3) 特定細胞集団の分離

細胞表面マーカー（がん細胞マーカー、幹細胞マーカーなど）を用いてフローサイトメトリーで目的の細胞を分画し、その細胞集団の挙動を解析する[5]。

(4) 細胞遊走解析

細胞の移動を評価する方法[6]。様々な大きさのメンブレンインサートを用いて、メンブレンの上下の異なる環境下での細胞挙動を解析する走化性アッセイ、走触性アッセイ、コンフルレント状態の細胞表面を引っかき無細胞となった場所に移動、増殖する細胞を解析する創傷治癒アッセイ、細胞外マトリックスをコートしたメンブレンインサートを用いて細胞の浸潤を観察する細胞浸潤アッセイなどがある。

＜参考文献＞

- [1] 藤井万紀子. “患者手術材料からの培養”. 細胞培養・組織培養の技術第4版. 日本組織培養学会編. 朝倉書店, 2023, p. 209-211.
- [2] Hayflick L. “Subculturing Human Diploid Fibroblast Cultures”. Tissue Culture methods and applications. Academic Press, 1973, p. 220-223.
- [3] 清野透. “細胞株の樹立”. 細胞培養・組織培養の技術第4版. 日本組織培養学会編. 朝倉書店, 2023, p. 128-133.
- [4] 竹澤俊明ら. “3次元培養法”. 細胞培養・組織培養の技術第4版. 日本組織培養学会編. 朝倉書店, 2023, p. 140-203.
- [5] 嶋本顕ら. “生物検体からの初代培養”. 細胞培養・組織培養の技術第4版. 日本組織培養学会編. 朝倉書店, 2023, p. 90-133.
- [6] 矢野元, 佐邊壽孝. “細胞運動観察法”. 実験医学別冊 改訂培養細胞実験ハンドブック. 黒木登志夫監修. 羊土社, 2009, p. 172-176.

2-6-2 細胞培養に用いられる検体

【組織】

前向きに採取した新鮮組織を培養に使用する。組織から消化酵素を用いて細胞を分散して培養する方法^{*1}[1]、細切した組織片を培養皿に静置して組織片から遊走、増殖した細胞を

培養する方法がある^{*2}[1]。また、腫瘍由来の組織片を免疫不全マウスに移植し、マウスの中でがん細胞を増殖させる方法もある（患者由来がんモデル）[2]。

【組織以外】

(1) 血液

末梢血から単核球細胞を分離して EV ウイルスを感染させて不死化する方法[3]、フローサイトメトリーで分画した細胞を培養する方法[3]などがある。

(2) 胸水、腹水

遠心分離して得た細胞ペレットから赤血球を除去して培養を行う。

【One Point】

- *1 組織の種類により使用する消化酵素、操作手順が異なるので文献などを参考にするとよい。
- *2 培養皿に静置した組織片は乾燥しないように注意する。

＜参考文献＞

- [1] 藤井万紀子. “患者手術材料からの培養”. 細胞培養・組織培養の技術第 4 版. 日本組織培養学会編. 朝倉書店, 2023, p. 209-211.
- [2] 井上正宏. “CTOS と PDX のシャトルシステム”. 細胞培養・組織培養の技術第 4 版. 日本組織培養学会編. 朝倉書店, 2023, p. 223-226.
- [3] 寛山隆, 中村幸夫. “末梢血細胞の培養法”. 細胞培養・組織培養の技術第 4 版. 日本組織培養学会編. 朝倉書店, 2023, p. 326-330.

第3章 検体処理方法と品質

第3-1節 検体の品質評価方法

【概要】

バイオバンクで保管する検体の使用目的として、検体中に含まれている核酸をはじめタンパク質など様々なものを解析するといったことが想定される。その目的を達成するためには出来る限り生体の状況を反映した結果が得られることが重要であり、検体の品質劣化を避け、確実な結果を得るために、検体の品質をしっかりと評価しながら使用することが必要となる。

3-1-1 核酸の品質評価方法

【代表的な核酸の品質評価方法】

・吸光度（OD260、OD260/280 比）

核酸の濃度・純度を測定する方法として、分光光度計を用いて 260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度する方法[1]が記載されている。分光光度計を用いた測定は核酸の量が多く、試料中の夾雑物が少ない場合にシンプルで正確であるとされており[1]、260 nm の吸光度から核酸濃度を算出でき、OD260/280 比によって核酸純度を算出できる。DNA であれば OD260/280 が 1.8、RNA であれば OD260/280 が 2.0 で純度が高いとされる。

【その他の核酸に関する品質評価方法】

1. DIN

DNA Integrity Number (DIN) は Agilent Technologies 社の Agilent 2200/4200 TapeStation システムを用いた Genomic DNA ScreenTape assay で測定したデータを gDNA の分解度に応じて 1~10 にスコア化された値であり、FFPE 検体の DNA 品質評価が可能である[2]。

2. Ct 値/ Δ Ct 値

Ct 値/ Δ Ct 値はリアルタイム PCR (DNA) もしくはリアルタイム RT-PCR (RNA) 法により得られる Ct 値を用いて核酸品質を評価する方法で、特殊な機器を必要としない簡便な方法である。DNA 品質評価では、異なる長さの2種のアンプリコンサイズ（例：50~100 bp 程度の短鎖アンプリコンと、100~300 bp 程度の長鎖アンプリコンなど）から得られる Ct 値の差（ Δ Ct 値）を指標とする方法が、一般に用いられている。国内大規模ゲノムスクリーニング研究（SCRUM-Japan/GI-SCREEN 試験）においては、2,000 例を超える。

FFPE 検体を用いて、Thermo Fisher Scientific 社が開発した ΔCt 値アッセイ[3]が行われ、その有用性が示されている[2]。

3. Q-ratio

Q-ratio は FFPE から得られる DNA の品質を評価するための指標の 1 つであり、qPCR を用いて 3 つの長さの異なる DNA 断片（short (41 bp)、medium (129 bp)、large (305 bp)）を増幅し、その比率から DNA 断片化の程度を評価する方法であり、 Q_{129}/Q_{41} and Q_{305}/Q_{41} の値が低いほど断片化していると評価できる[4]。

4. Q-value

Q-value は国立がん研究センター中央病院が開発した DNA の品質指標であり、qPCR 測定 DNA 量／蛍光報測定 DNA 量比で表される。Q-value が 0.2 以上のシーケンス（NCC オンコパネル v2 使用時）の成功率は約 85%と報告されている[2]。

5. DV200

DV200 はイルミナ社が開発した RNA の品質指標であり、Agilent Technologies 社の Fragment Analyzer または Agilent 2100 bioanalyzer を用いて、200 ヌクレオチド以上の RNA 断片の割合を算出する。DV200 による品質区分は、>70%の場合は High、50～70%の場合は Medium、30～50%の場合は Low、<30%は Too degraded としており、<30%の FFPE 検体では RNA シーケンスのライブラリー調製への使用を推奨していない[2]。

6. RIN

RNA Integrity Number (RIN) は Agilent Technologies 社 BioAnalyzer で得られる RNA 分解の指標となる数値で、分解が見られない状態が 10 で、分解の進行に応じて 1～10 に分類される[5]。

＜参考文献＞

- [1] 柴山祥枝. 核酸（DNA・RNA）の定量法. ぶんせき. 2018, vol. 7, p. 268-274.
- [2] 日本病理学会. “ホルマリン固定パラフィン包埋組織・細胞検体の適切な取扱い”. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会編. 2018-03-01, p. 11.
https://pathology.or.jp/genome_med/pdf/textbook.pdf, (参照 2024-06-06).

- [3] 岩田英紘ら. 良好な核酸品質保持のためのホルマリン固定条件の検討—Friday biopsy や長期休暇前に採取された生検検体を想定して—. 医学検査. 2021, vol. 70, no. 4, p. 724–732.
- [4] Kapa Biosystems. Technical Data Sheet (KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit, KR0454 – v2.16), 2016.
- [5] Schroeder A., et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, BMC Mol Biol. 2006, vol. 7, 3.

3-1-2 核酸以外の生体分子の品質評価方法

核酸以外の生体分子には、ペプチドを含むタンパク質が主なものとして挙げられる。これらの品質評価方法としては確立された手法はないものの、採取から保管までの時間、保管温度と期間、測定までの前処理方法などによって影響を受けることが明らかとなっている。

検体をプロテオーム解析する場合においては、AMED が実施した「オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書」において報告されており、保管状態で変動するペプチド、遠心分離までの時間で変動するペプチドを品質評価のマーカーペプチドとして品質評価に用いることが提案されている。また、タンパク質を医薬品としているようなバイオ医薬品においては、ペプチドマッピングという手法が用いられている。ペプチドマッピングは、タンパク質の指紋（フィンガープリント）と表現することができ、酵素的または化学的消化を受けて生成したペプチド断片から様々な情報を得ることができる。

3-1-3 保管までの工程の記録による品質評価方法

保管検体の品質は、次の第 3-2 節でも述べるように、その保管処理や保管状況などの影響を受ける。たとえば、血液を採取後にそのまま室温で 1 日静置すると、多くの生体分子の測定結果が変化する[1]。そこで検体の品質を評価するために、検体を採取してから研究に使用するまでにどのように扱われたのかという記録を用いることがある。

バイオバンクの国際学会 ISBER が作成・公表している SPREC [2]では、表 4-1 のように検体処理・保管の工程などを整理している。このうち一部の項目は標準作業手順書（SOP）として事前に定めてある項目であり（採取容器の種類、遠心分離の条件など）、残りは個々の検体の処理をした際に記録をする項目である（採取から処理までの時間、遠心分離から保管までの時間など）。この表にはないもので、他に重要な項目には、SOP からの逸脱、輸送の条件（温度、時間）などがある。

これらの工程の記録を検体の品質の評価に使用する利点は、どの施設であっても、大きな手間とコストをかけずにすべての検体について記録が残せる点にある。一方、前項までに記載した生体分子の品質の評価をすべての検体について実施するには、そのために手間とコストをかける必要が生じ、多くの場合に現実的ではない。このため、工程の記録はAMED バイオバンク横断検索[3]において検体の品質情報として利用されており、表 4-1 の項目のうちのいくつかを検体の検索条件に含めることができるようになっている。

表 3-1 SPREC における検体処理・保管の工程に関する項目

検体の種類	項目
液性検体 (血液、尿、体腔液など)	採取容器の種類
	採取から処理（遠心分離など）までの時間
	遠心分離の条件（温度、時間、遠心力、ブレーキの有無）
	遠心分離から保管までの時間
	保管の条件（保管容器の種類、保管温度）
固形検体 (組織、歯、髪など)	採取方法
	温阻血の条件（時間）
	冷阻血の条件（温度、時間）
	固定の条件（方法、時間）
	凍結の方法
	保管の条件（保管容器の種類、保管温度）

＜参考文献＞

- [1] 日本臨床検査医学会 標準化委員会（2012-2013 年度）. “検体の保存安定性”. 臨床検査のガイドライン JSLM2021. 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編. 宇宙堂八木書店, 2021, p. 31-36.
- [2] ISBER Biospecimen Science Working Group. “Standard PREanalytical Code (SPREC)”. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). <https://www.isber.org/general/custom.asp?page=SPREC>, (参照 2023-11-02).
- [3] AMED ゲノム医療実現バイオバンク利活用プログラム. “バイオバンク横断検索システム”. 日本医療研究開発機構（AMED）. <https://biobank-search.megabank.tohoku.ac.jp/v2/>, (参照 2023-11-02).

第 3-2 節 検体の品質に影響を与える因子

3-2-1 概要

ヒト検体を用いた分析は、大きく3つの工程に分けられる。分析前工程（preanalytical phase）には、検体の採取[1]や保管のための処理などが含まれる。分析工程（analytical phase）には、保管検体の分析から結果を得るまでが含まれる。分析後工程（postanalytical phase）には、得られた結果の分析や残余試料の処理などが含まれる。どの工程にも最終的な結果に影響を及ぼす要因が存在する。バイオバンクにおいては特に分析前工程の理解が重要である。

なお、あらゆる研究で最良となる検体の処理や保管の方法は実現が困難であるため、大切なことは、工程と品質の関係を把握し、研究の目的に合わせて適切な処理や保管検体を選択することである。

3-2-2 被採取者の状態による品質への影響

生体内の環境は様々な要因によって影響を受けているため、検体採取をどのような人からどのようなタイミングで行ったかによって検体の分析結果は異なり得る。

年齢、性別、人種によって濃度や活性が異なる生体分子が存在する。日内周期（サーカディアンリズム）による変化もあり、測定値が採取した時間帯によって異なるものもある。また、検体を採取する前の食事や運動によっても影響を受ける。健康診断においては、検査前の10時間以上の絶食が指示される[2]。臨床検査の「空腹時採血」とは、12時間以上[3]あるいは10～14時間[4]の絶食後の採血を指している。食事の他には、カフェイン、飲酒、常用している薬剤によって影響を受ける生体分子がある[3]。

これら以外にも影響を与える要因はあるため、研究において対象とする生体分子が決まっている場合には、何の影響を受けるかを事前に可能な範囲で調べておくことが望ましい。網羅的な解析を行う場合には、使用する検体間でどの条件が揃っていないかなどを事前に検討しておくことが望ましい。

日常診療の際に検体を採取するバイオバンクにおいては、すべての要因を記録しておくことは困難である。しかし、カルテの記録から確認できる要因もあるので、保管検体を使用する際には、自分たちの研究に必要な要因が記録されているかをバイオバンクに確認するとよい。

＜参考文献＞

- [1] 日本臨床検査医学会 標準化委員会 (2012-2013 年度) . “検体検査のサンプリング”. 臨床検査のガイドライン JSLM2021. 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編. 宇宙堂八木書店, 2021, p. 6-10.
- [2] 厚生労働科学研究費補助金 健康診査の精度管理に関する研究班 (主任研究者 渡邊清明) . “健康診査における精度管理の在り方”. 標準的な健診・保健指導プログラム (確定版) . 厚生労働省 健康局. 2007, 添付資料.
- [3] Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. 正しい検査の仕方-検体採取から測定まで-. 宇宙堂八木書店, 1998.
- [4] シー・アール・シー よくある検査のご質問. “「空腹時」採血とは、食事後何時間経てばいいでしょうか?”. CRC グループ. https://www.crc-group.co.jp/crc/q_and_a/06.html, (accessed 2023-11-07).

3-2-3 検体採取から保管までの要因による品質への影響

検体の採取から保管までの要因としては、すべての検体に共通の要因として、採取から処理開始までの温度と時間がある。他に、採取容器の種類、処理中の条件など様々な要因がある。

採取から処理開始までの時間は短い方がよい。ただし血清の場合には、遠心分離をする前の血液を凝固させる時間を確保することが重要であるため、この時間よりも短くすることができない点に注意する。温度は室温か冷蔵 (4℃) のいずれかになるが、このどちらがよいかは測定対象の生体分子によって異なる[1]。このため、測定対象が決まっている場合には条件検討の対象となる。検体の採取から検体処理をする場所 (バイオバンクなど) は通常は離れている。このため、搬送の方法や、搬送するまでの一時保管の方法によってもこれらは影響を受ける。何らかの研究によって検体を前向き収集する場合には、その研究で実施する解析の内容に合わせて、事前に採取から検体処理までの流れを詰めておく必要がある。

液性検体の場合には遠心分離の条件も影響をする。遠心力あるいは遠心時間が不足していると、十分に分離がされないことがある。確実な分離のために、遠心分離を2回行うこともある。冷蔵 (4℃) で遠心できる遠心分離機もあるが、室温と冷蔵のどちらがよいかは分析対象による。また、多くの遠心分離機は短時間でロータを停止するためにブレーキ機能が付いているが、ブレーキをかけることでたとえば細胞の回収率が下がるなどの影響を受ける場合がある。研究において測定対象とする生体分子がこれらの影響をどのように受けるのか、事前に把握しておくことが望ましい。

組織検体の場合には保管の前に何らかの方法で固定（組織の中で起こる生化学反応を停止）する。具体的には、ホルマリンなどの固定用の試薬（固定液）に漬けたり、凍結したりする。固定の種類や、固定液に漬けられていた時間などが組織検体の状態に大きく影響する。一般には液体窒素を用いて瞬間的に凍結する方法（スナップフリーズ）が最もよいが、その後に HE 染色標本を作成したり細胞培養を行ったりしたい場合にはそれらに適した処理方法を選択する。

検体採取の際に添加物が入った容器（採血管など）を使用することがある。たとえば血漿の場合には、抗凝固剤が入った採血管を使用するが、1-2-4 に記載したように抗凝固剤にはいくつかの種類があり、そのどれを使用するかによって影響を受ける生体分子が異なる [2][3]。このため、測定対象とする生体分子がどのような影響を受けるのか、使用する検体はどのような容器が用いられたかを確認することは重要である。

また、容器の材質の影響を受けることもある。タンパク質などの生体分子が容器に吸着し、濃度が低くなることがある。検体中にごく微量しか含まれていない生体分子を測定する場合には、特にその影響を受けることが考えられる。低吸着の容器が開発され販売されているが、その必要性と価格のバランスによって検討することになる。

他に検体採取の手技など様々な要因があるが、それらは検体を採取する医療従事者（臨床検査技師、看護師など）に委ねられ、検体を採取する施設におけるガイドライン遵守率などが重要な要因である。

＜参考文献＞

- [1] 日本臨床検査医学会 標準化委員会（2012-2013 年度）. “検体の保存安定性”. 臨床検査のガイドライン JSLM2021. 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編. 宇宙堂八木書店, 2021, p. 31-36.
- [2] 東克巳, “抗凝固剤の種類と使い方”. 最新臨床検査学講座 血液検査学 第 2 版. 奈良信雄編. 医歯薬出版, 2021, p. 74-75.
- [3] Guder WG, Narayanan S, Wissner H, Zawta B. 正しい検査の仕方-検体採取から測定まで -. 宇宙堂八木書店, 1998.

3-2-4 保管による品質への影響

検体の保管の条件によって生体分子は影響を受ける。最も重要な要因は保管温度である。保管中に酵素活性や化学活性が残存していると徐々に検体の状態が変化する。一般に温度は低ければ低い方がよく、水のガラス転移点（ -137°C ）以下での保管が特に望ましいとされ

る[1]。生体試料の保管にはディープフリーザー（-80℃）や液体窒素（気相、-150℃以下）が用いられることが多い。この場合、それらの温度帯での保管のために販売されている保管容器を使用する必要がある、もし適していない容器を使用した場合には、凍結の過程あるいは保管中に容器が破損する恐れがある。

ただし核酸の保管では、冷蔵が選択されることがある。これは1つのチューブから少しずつ繰り返し検体を使用する可能性がある場合である。凍結での保管の場合は、使用するたびに凍結と融解を繰り返す（freeze-thaw cycle）ことによって核酸が分解される。核酸溶解液に酵素活性を阻害する分子（EDTA など）が含まれた状態であれば、冷蔵での長期間（10年以上の）の保管も可能である[2]。EDTA が中に含まれる TE バッファー中での DNA の分解速度は、超純水中と比べて 1,700 倍遅くなるとの報告もある[3]。ただし、冷蔵保管中にカビが発生することがあり、特に日本は湿度が高いためこの点に注意を要する。

なお、検体の種類によらず、凍結・融解を行うことで保管検体の品質は劣化するため、注意が必要である。凍結保管している検体を何らかの理由で意図的に凍結・融解している場合もあり得るが、この場合、その検体が研究に利用できるかを判断できるようになるためにはその記録（ログ）が残されている必要がある。また、入出庫の繰り返しや停電などによって、保管庫の中の温度が上昇することがある。多くの場合は品質には大きな影響はないと思われるが、状況によっては品質に影響が生じるくらいの上昇となっている可能性があるため、注意を払う必要がある。

保管検体の使用前に、どの温度帯で何年間の保管がされた検体なのか、凍結・融解が何回された検体なのかなどを確認することが望ましい。あるいは、もし保管検体を用いた解析の結果の解釈に疑問が生じた場合には、保管中の何らかの事象により検体品質に影響が出た可能性を検討することも必要である。この際には保管中の記録を確認することになる。

＜参考文献＞

- [1] International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). “液体窒素保管システム”. ISBER ベスト・プラクティス：リポジトリに対する推奨事項 英語版 第4版 日本語対応版. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), 2018, p. 21-22.
- [2] QIAGEN FAQs. “Do you have stability data for genomic DNA isolated with the QIAamp DNA Blood Mini Kit?”. QIAGEN.
<https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=a2c87908-90a6-41bc-bae7-582f6ad69c26&lang=en>, (accessed 2023-11-07).

- [3] Fattorini P., et al. Producing standard damaged DNA samples by heating: pitfalls and suggestions. *Analytical Biochemistry*. 2018, vol. 549, p. 107-112.

3-2-5 利用時における品質への影響

バイオバンクに保管された検体を研究に使用する際には、バイオバンクから研究を実施する場所まで輸送が必要になる。その際、温度管理が重要である。温度管理が不十分な場合、凍結検体の輸送中凍結・融解の繰り返し、完全融解が起きることがあり得る。輸送時中における想定温度帯からの逸脱の把握のためには温度ロガーを同梱する。また融解を確実に防ぐには、輸送会社や輸送方法を慎重に選定する。混載便は安価だが融通が利かない一方で、チャーター便は高価だが細かい日時指定ができるなどの利点がある。また、検体によっては振動で質に影響を受けることがあるが、この場合には振動抑制可能な容器を持っている輸送会社を選ぶ。

保管された検体を入手して測定をする前には、保管検体をどのように扱うかも結果に影響する。検体をそのまま測定装置にかける場合もあるが、多くの場合には何らかの処理が必要となる。たとえば、血漿検体からアルブミンなどのタンパク質を除いたり、組織検体から核酸の抽出をしたりする場合である。この際の手技や使用する機器・キットが結果に影響を及ぼすことがある。

細胞の培養などのために凍結された状態の保管検体を使用する場合、融解方法によって活性に違いが生じる。急速に融解をした方がよい場合と、緩慢に融解した方がよい場合のいずれもある。また、培地の種類によっても異なる。このため、使用する検体ではどのように融解することが推奨されているか、事前に調べておくべきである。

第 3-3 節 がん遺伝子パネル検査における品質（実験結果）

本節の内容は、すべて論文報告[1]された内容および日本病理学会が発刊したゲノム研究用・診療用病理組織取り扱い規程[2]に記載された内容を元に記述したものである。ここで用いられている試薬や機器、及び詳細な手順については、[1][2]の文献を参照して頂きたい。

【目的】

FFPE 検体を用いたがん遺伝子パネル検査による DNA 品質とシーケンス成功率を検証し、がん遺伝子パネル検査に適した条件を探索する。

【材料・方法】

1. 材料

慶應義塾大学病院の乳腺外科、呼吸器外科、肝胆膵外科、耳鼻咽喉科、下部消化器科、脳神経外科、婦人科、歯科口腔外科、皮膚科、泌尿器科、整形外科、上部消化器科の12の臨床科から提出された検体で作製したFFPE計1,417検体を対象とした。

検体の内訳は、乳腺外科（P：n=6、A1：n=332）、呼吸器外科（P：n=31、A1：n=48）、肝胆膵外科（P：n=16、A1：n=42）、耳鼻咽喉科（P：n=5、A2：n=6）、下部消化器科（P：n=50、A2：n=92）、脳神経外科（P：n=38、A2：n=21）、婦人科（P：n=109、A2：n=153）、歯科口腔外科（P：n=22、A2：n=3）、皮膚科（P：n=11、A2：n=15）、泌尿器科（P：n=134、A2：n=73）、整形外科（P：n=32、A2：n=25）、上部消化器科（P：n=42、A2：n=111）であった。P、A1、A2の意味は次節で説明する。

2. 固定プロセス

FFPEの作製条件の違いにより3群に分けた。手術の際に摘出された病理検体から腫瘍部の一部を5mm×5mm×3mmに切り出し、速やかに10%中性緩衝ホルマリンに浸漬し、24時間固定。固定後は自動固定包埋装置にて脱水、脱アルコール、パラフィン浸透させ、パラフィン包埋したFFPEをゲノム検査用FFPE：P（Prospective）群とした。手術で摘出された臓器をホルマリンに浸漬し、十分に固定されたタイミングで切り出してカセットに入れ、自動固定包埋装置にて脱水、脱アルコール、パラフィン浸透させ、パラフィン包埋した病理診断用アーカイブFFPE：A（Archive）群とした。A群の中で10%中性緩衝ホルマリンで固定した呼吸器外科、乳腺外科、肝胆膵外科の検体はA1とし、20%中性緩衝ホルマリンで固定した下部消化器科、脳神経外科、婦人科、耳鼻咽喉科、歯科口腔外科、整形外科、皮膚科、泌尿器科、上部消化器科の検体はA2とした。固定時間は48時間以上であり、肝胆膵外科だけが1週間以上であった。

3. 核酸抽出

作製されたFFPEをミクロトームにて3μmの厚さに薄切し、HE染色標本作製した。HE染色標本は病理医が鏡検し、腫瘍細胞含有率の算定と、必要な場合は腫瘍部位のマッピングを行った。腫瘍細胞含有率は（腫瘍細胞数）/（有核細胞数）とし、DNAを抽出する部位のマッピングを行う。病理医の鏡検により、ゲノム検査に適していると判断されたFFPEから10μmの厚さの未染標本を10枚作製した。HE染色標本のマッピングに従い、未染標本から腫瘍部位をダイセクションし、マイクロチューブに回収した。回収したFFPE

片にミネラルオイルを添加し、ボルテックスで攪拌して、80°Cで2分間インキュベーション後に室温になるまで静置した。その後、Promega社のプロトコル通りに作成した master mix (Lysis buffer、Proteinase K、Blue Dye) を加え、ボルテックスで攪拌後、層分離のため遠心し、ヒートブロックで56°C、30分間静置後、80°C、4時間静置した。その後、RNaseを添加し、静置後に遠心。Maxwell RSC DNA FFPE Kit (Promega #AS1450) の精製キットに液層を移し、磁気シリカビーズ法を原理とした自動核酸精製システム Maxwell RSC Instrument (Promega #AS4500) にてDNAを抽出した。

抽出したDNAは、dsDNA BR (broad range) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific #Q32853) を用いて、Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) で濃度を測定し、DNAの断片度の指標であるDIN (DNA Integrity Number) を Genomic DNA Screen Tape (Agilent #5067-5365) と Genomic DNA Reagents (Agilent #5067-5366) を用いて Agilent 4200 TapeStation (Agilent #G2991AA) で測定した。

4. ライブラリー作製とシーケンス

DIN $\geq$ 2.0 かつ、DNA濃度測定可能域内のDNA濃度の検体は16 μ L を用いて、GeneRead DNAseq Targeted Panels V2 Human Comprehensive Cancer Panel (QIAGEN #NGHS-501X-96)、GeneRead DNAseq Panel PCR Kit V2 (QIAGEN #181942) によりサーマルサイクラーで反応させた後、磁気ビーズ AMPure XP (Beckman #A63882) とマグネットスタンドで精製を行った。精製したアンプリコンを TapeStation D1000 Screen Tape (Agilent #5067-5582)、TapeStation D1000 Reagents (Agilent #5067-5583) を用いて Agilent 4200 TapeStation でアンプリコン濃度を測定した。アンプリコンが100 ng になるよう濃度を調製し、GeneRead DNA Library I Core Kit の End Repair buffer、End Repair enzyme を添加して、サーマルサイクラーで反応させ、末端処理を行った。その後、GeneRead DNA Library I Core Kit の A-addition buffer、Klenow Fragment を添加して、サーマルサイクラーで反応させ、A付加を行った。次に GeneRead DNA Library I Core Kit の Ligation buffer、T4 DNA Ligase と NEXTflex™ DNA Barcodes – 48 (BIOO Scientific #NOVA-514104) で、あらかじめ決めた番号のアダプターを添加してサーマルサイクラーで反応させ、アダプターを結合させた。アダプターを結合させた後は、磁気ビーズ AMPure XP とマグネットスタンドで精製を行った。精製したライブラリーを GeneRead DNA Library I Amp Kit を用いて、サーマルサイクラーで反応させ、ライブラリーを増幅させた。増幅させたライブラリーを磁気ビーズ AMPure XP とマグネットスタンドで精製した。作製したライブラリーは、TapeStation D1000 Screen Tape (Agilent #5067-5582)、TapeStation D1000 Reagents (Agilent #5067-5583) を用いて、Agilent 4200 TapeStation

でグラフのピークが 150 bp 前後にあることを確認し、ライブラリー濃度を測定した。ライブラリー濃度が 1.8 nM になるよう調製し、0.2 N 水酸化ナトリウムで変性後、pH 7.0 トリス緩衝液で中和した。20 pM Phix とともに NextSeq 500/550 Mid Output Reagent Cartridge v2 に移した。NextSeq にフローセルとカートリッジ、Buffer をセットして測定を行った。NextSeq で得られた FASTQ ファイルを三菱電機ソフトウェア社に送り、自動解析パイプラインにて解析・アノテーションを行った。

5. シークエンス結果の評価

DNA 抽出後の濃度が測定閾値以下である場合、または $DIN < 2.0$ の場合を「検体不適」と判定した。次に、ライブラリー濃度が測定閾値以下であった場合も「検体不適」と判定した。さらに、バイオインフォマティクス解析にて、リード残存率 $\geq 70\%$ 、 $QV \geq 30$ の領域が 50% 以上存在し、かつペアリードも同じ条件を満たすリードが存在する場合で、この条件をクリアした有効リード数 ≥ 3000000 リードの場合をデータ品質良好とした。この条件に満たない場合は、データ品質が不良として「品質不適」と判定した。不適と判定された症例はその原因ごとに数値化した。

【結果と考察】

P、A1、A2 群の抽出した DNA の DIN や濃度、解析結果の一覧は表 1 及び表 2 に記載した通りであった。またこれらをまとめたグラフを図 4-1 に示す。P では 496 検体中 408 検体で全体の 82.3% が検体品質良好かつ解析成功であり、37 検体で 7.5% が $DIN \leq 2.0$ による検体不適、10 検体で 2.0% が DNA 濃度不足による検体不適、41 検体で 8.2% がバイオインフォマティクス解析での品質不良であった。

A1 では 422 検体中 333 検体で全体の 78.9% が検体品質良好かつ解析成功であり、55 検体で 13.0% が $DIN \leq 2.0$ による検体不適、2.4% が DNA 濃度不足による検体不適、24 検体で 5.7% がバイオインフォマティクス解析での品質不良であった。

A2 では 499 検体中 353 検体で全体の 70.7% が検体品質良好かつ解析成功であり、106 検体で 21.2% が $DIN \leq 2.0$ による検体不適、8 検体で 1.6% が DNA 濃度不足による検体不適、32 検体で 6.4% がバイオインフォマティクス解析での品質不良であった。

10% 中性緩衝ホルマリンを使用し固定時間が 24 時間に統一された P と、固定液は同じ 10% 中性緩衝ホルマリンを使用し固定時間が 24 時間以上である A1 での検査成功率の差は、3.4%pt となった。固定液の種類が異なる A1 と A2 での検査成功率の差は 8.2%pt であった。

P と A1 で最も差がみられたのは $DIN \leq 2.0$ の検体が占める割合であり、固定時間が長時間となる A1 で $DIN \leq 2.0$ の検体が占める割合が大きく、ホルマリン過固定により DNA の断片化が進行したことが示唆された。また、固定液の種類が異なる A1 と A2 では、 $DIN \leq 2.0$ の検体が占める割合に差がみられ、より高濃度ホルムアルデヒドが含まれる固定液を使用した A2 で $DIN \leq 2.0$ の検体が占める割合が大きく、高濃度ホルムアルデヒドによる DNA の断片化が進行したことが示唆された。

一方、ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程[2]に従い作製したゲノム検査用 FFPE (P) であっても、ゲノム解析成功率が 100%とはならなかったことについても考察した。我々は、固定液の種類や固定時間以外にも検体の品質に影響を及ぼす因子があると考え、検体を提出した臨床科ごとに検査結果を表 4-2、表 4-3 と図 4-2 に示した。

ゲノム解析成功率は、乳腺外科 (P=100%、A=78.9%)、呼吸器外科 (P=93.5%、A=89.6%)、肝胆膵外科 (P=56.3%、A=66.7%)、耳鼻咽喉科 (P=100%、A=83.3%)、下部消化器科 (P=92.0%、A=69.6%)、脳神経外科 (P=89.5%、A=90.5%)、婦人科 (P=87.2%、A=64.1%)、歯科口腔外科 (P=86.4%、A=100.0%)、皮膚科 (P=81.8%、A=86.7%)、泌尿器科 (P=75.4%、A=79.5%)、整形外科 (P=75.0%、A=40.0%)、上部消化器科 (P=73.8%、A=74.8%) であった。

【結論】

FFPE で、がんゲノム解析を 98%以上成功させるために必要な条件は、抽出した DNA が $DIN \geq 3.0$ かつ DNA 濃度 $\geq 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ であった。本検討においても固定時間とホルマリンの種類が DNA の品質に影響を与えることが明らかであり、ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程[2]の推奨通り、可能な限り 10%中性緩衝ホルマリンでの 24 時間固定が望ましい。

そのためには、検体の摘出方法や、臓器による組織構造、脱灰操作の有無など、臨床科に特異的な要因を考慮する必要がある。今後は患者の低侵襲・低負荷を優先し、生検検体や細胞診検体、リキッドバイオプシーによるゲノム解析の需要が高まっているため、検体の種類や大きさなどに応じたバイオインフォマティクス解析の品質基準も必要だと考えられた。

表 4-2 ゲノム検査用 FFPE を用いた検査成功率と不成功の原因内訳

P

臨床科	生検（成功数）	DIN ≤ 2.0	濃度不足	解析不良	成功率
乳腺外科	6（6）	0	0	0	100
呼吸器外科	31（29）	1	1	0	93.5
肝胆膵外科	16（9）	3	2	2	56.3
耳鼻咽喉科	5（5）	0	0	0	100
下部消化器科	50（46）	0	0	4	92.0
脳神経外科	38（34）	2	0	2	89.5
婦人科	109（95）	9	0	5	87.2
歯科口腔外科	22（19）	3	0	0	86.4
皮膚科	11（9）	0	1	1	81.8
泌尿器科	134（101）	12	2	19	75.4
整形外科	32（24）	1	4	3	75.0
上部消化管	42（31）	6	0	5	73.8
	496（408）	37	10	41	82.3

表 4-3 アーカイブ FFPE を用いた検査成功率と不成功の原因内訳

A

臨床科	手術材料（成功数）	DIN ≤ 2.0	濃度不足	解析不良	成功率
A1					
乳腺外科	332（262）	37	10	23	78.9
呼吸器外科	48（43）	4	0	1	89.6
肝胆膵外科	42（28）	14	0	0	66.7
	422（333）	55	10	24	78.9
A2					
耳鼻咽喉科	6（5）	1	0	0	83.3
下部消化器科	92（64）	20	0	8	69.6
脳神経外科	21（19）	1	0	1	90.5
婦人科	153（98）	41	1	13	64.1
歯科口腔外科	3（3）	0	0	0	100
皮膚科	15（13）	2	0	0	86.7
泌尿器科	73（58）	13	1	1	79.5
整形外科	25（10）	9	6	0	40.0
上部消化管	111（83）	19	0	9	74.8
	499（353）	106	8	32	70.7

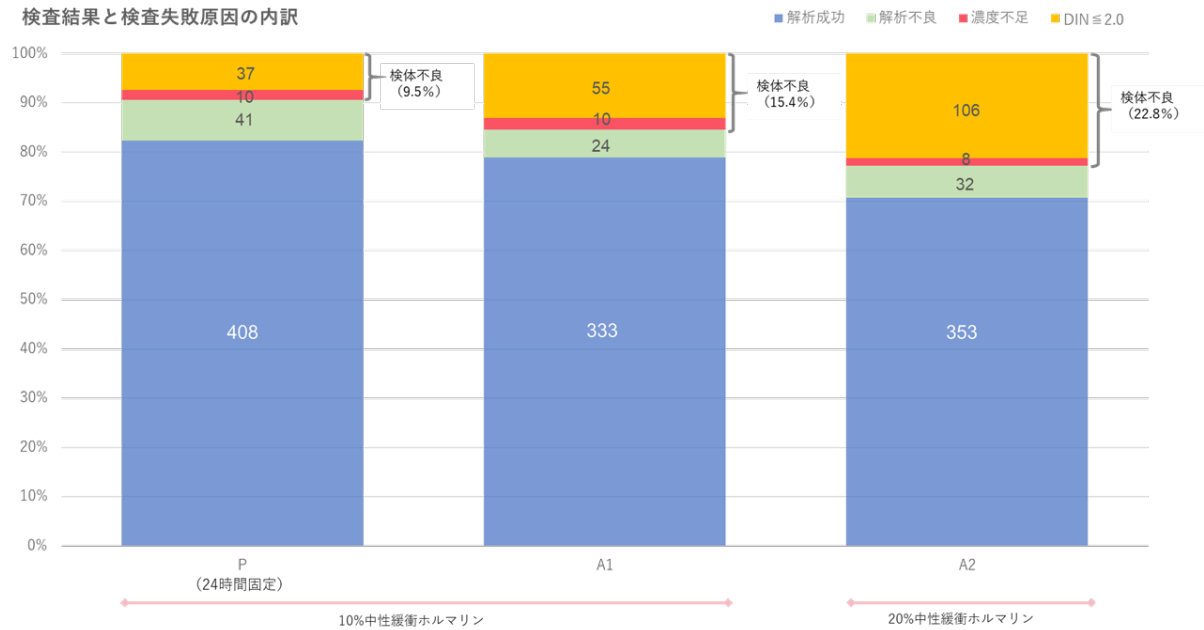


図 4-1 FFPE 作製条件別の検査結果と検査失敗原因の内訳

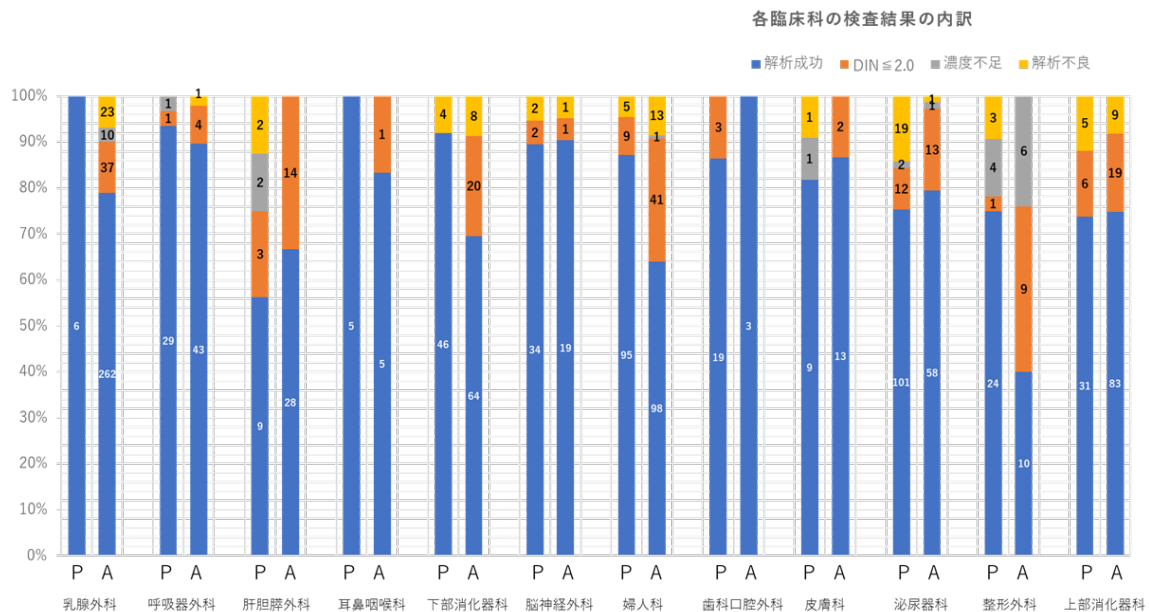


図 4-2 臨床科別の検査結果と検査失敗原因の内訳

＜参考文献＞

- [1] Yanagita E, Yamada H, Kobayashi T, Aimono E, Nakamura K, Hirasawa A, Nishihara H
The DNA integrity number and concentration are useful parameters for successful

comprehensive genomic profiling test for cancer using formalin-fixed paraffin embedded tissue. Pathology International. 2023, vol. 73, no. 5, p. 198-206.

[2] 日本病理学会. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 羊土社, 2019, 160p.

第 3-4 節 OCT 包埋凍結組織の品質（実験結果）

3-4-1 実証実験-1：包埋容器の検証

【目的】

OCT 包埋凍結組織の作製時に使用する包埋皿について、金属製とプラスチック製のものを
を用い、凍結するまでの時間及び標本の仕上がりについて比較した。

【材料と方法】

1. 材料

筑波大学附属病院の呼吸器外科から提出された肺がん検体を使用した。包埋剤はティッシュ
ー・テック O.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン）、冷媒は液体窒素を使
用した。
た。

2. 方法

金属製の包埋皿（サクラファインテックジャパン, 包埋皿, #4164）とプラスチック製の包
埋皿（サクラファインテックジャパン, クリオモルド, #4728）でそれぞれ標本作製、包埋
皿を直接液体窒素に浮かべて凍結した場合、金属容器（茶筒の蓋を利用）に静置して凍結し
た場合を比較した。

1-1：金属製包埋皿を直接、液体窒素に浮かべて作製

1-2：プラスチック製包埋皿を直接、液体窒素に浮かべて作製

1-3：金属製包埋皿を金属製容器に入れ、容器を液体窒素に浮かべて作製

1-4：プラスチック製包埋皿を金属製容器に入れ、容器を液体窒素に浮かべて作製

【結果】

結果を表 4-4 に示した。

表 4-4 包埋容器の検証結果の概要

方法	凍結するまでの時間	出来上がった標本の状態
----	-----------	-------------

1-1	40 秒～1 分	OCT コンパウンドに亀裂が生じた
1-2	25 秒～30 秒	OCT コンパウンドに亀裂が生じた
1-3	1 分 40 秒～2 分	亀裂もなくきれいな仕上がり
1-4	1 分 30 秒～1 分 40 秒	亀裂もなくきれいな仕上がり

【結論】

- ・ プラスチック製の包埋皿の方が中心部まで固まる時間が 10 秒程度短い。
- ・ プラスチック製の包埋皿の方が使用しているコンパウンドの量が少ないため凍結までの時間が短いと考えられる。

3-4-2 実証実験-2：標本を乾燥から防ぐための方法について検証

【目的】

OCT 包埋凍結組織標本を超低温庫で保管する際の乾燥を防ぐために適した梱包材を検討する。アルミ箔とパラフィルムのどちらで標本を覆うとよいか検討した。

【材料と方法】

1. 材料

筑波大学附属病院の呼吸器外科から提出された肺がん検体を使用した。包埋剤はティシュー・テック O.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン）、冷媒は液体窒素を使用した。標本の梱包にはアルミ箔とパラフィルムを使用した。

2. 方法

OCT 包埋凍結組織標本を作製し、アルミ箔またはパラフィルムで標本を覆い、超低温庫で保管し、半年後の状態を検証した。

【結果】

- ・ 作りたての標本をパラフィルムで覆うと破れてしまった。
- ・ パラフィルムは保管試料の出庫時に劣化して破れてしまっているものもあった。
- ・ アルミは半年保管しても劣化、破けなどの変化は認められなかった。

【結論】

- ・ パラフィルムは手で伸ばすため、標本に触れる面の温度が上昇することもあると考えられる。
- ・ 半年間の凍結保管後にパラフィルムは劣化していたものもあったが、アルミは変化がなく、超低温庫における保管に有用であることがわかった。

3-4-3 実証実験-3：溶媒の検証

【目的】

OCT 包埋凍結組織標本作製する方法として、液体窒素とアセトン/ドライアイスどちらの溶媒を使用するとよいか検討した。

【材料と方法】

1. 材料

筑波大学附属病院の呼吸器外科から提出された検体を使用した。包埋剤はティッシュ・テック O.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン）、冷媒は液体窒素またはアセトン/ドライアイスを使用した。

2. 方法

OCT 包埋凍結組織標本作製し、液体窒素またはアセトン/ドライアイスで凍結した後、超低温庫で保管し、2 週間、1 ヶ月、1 年後に標本を薄切して組織像を比較した。

【結果】

1. 液体窒素

- ・ あまり時間を費やすこともなく、容易に準備ができた。
- ・ 保管後、2 週間、1 ヶ月、1 年後に標本を薄切して組織像を比較したところ、保管期間による形態変化はあまり認められなかった（図 4-3 A、B）。

2. アセトン/ドライアイス

- ・ アセトンが十分に冷えるまでに少し時間がかかった。
- ・ 保管後、2 週間、1 ヶ月、1 年後に標本を薄切して組織像を比較したところ、1 ヶ月後、1 年後の標本は、薄切を行なって 1 ヶ月以内に染色した標本と比較して核の空胞化が顕著であった（図 4-3 C、D 1 ヶ月後の標本は画像なし）。
- ・ 1 ヶ月以上保管した後の標本はシャーベット状になっているものや OCT コンパウンドがゴム状に柔らかくなっているものもあり、薄切しにくいものもあった。

- ・ 作製後、1 ヶ月程度はアセトン臭が強く、冷凍庫内に充満していた。

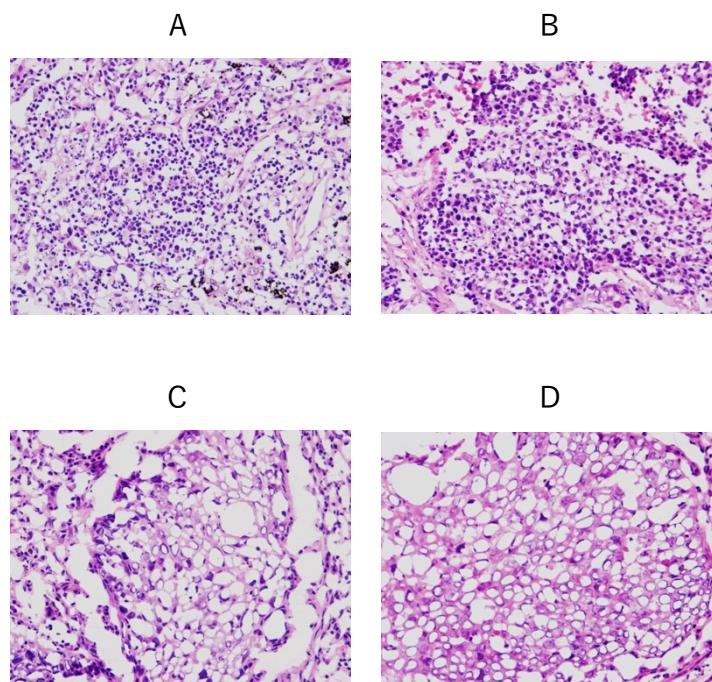


図 4-3 標本作製時の溶媒と経過年数による標本の比較

- A. Sample No. 535、液体窒素で作製、保管期間 2 週間（×100）
- B. Sample No. 535、液体窒素で作製、保管期間 1 年（×100）
- C. Sample No. 537、アセトン/ドライアイスで作製、保管期間 2 週間（×200）
- D. Sample No. 537、アセトン/ドライアイスで作製、保管期間 1 年（×200）

【結論】

- ・ 液体窒素を使用して標本作製した方が準備も容易であり、保存状態も良い。
- ・ アセトン/ドライアイスを使用して作製した標本は1 ヶ月以上保存すると品質の低下が認められる。