

臨床検査技師向け
ゲノム医療を知る入門冊子

サッと読める

GMST テキスト

Genome Medicine Support Technologist



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

ゲノム創薬基盤推進研究事業 A-3：人材育成課題
ゲノム医療従事者の養成を推進する課題 豊岡班作成（禁無断転載） 2017年9月発行

- Point ① 検体がプレアナリシス段階で受ける核酸関連の影響を正しく理解し、適切な処置を行うことができる
- ② 核酸抽出と品質評価を行うことができる
- ③ ライブラリー作成と NGS を理解する
- ④ シーケンスデータを解釈し、検査精度管理を行うことができる

目次

- 第1章 プレアナリシス段階での DNA 品質の影響
- 1.1. 固定処理
 - 1.2. パラフィン包埋・薄切
 - 1.3. FFPE ブロックの保管
- 第2章 核酸抽出と品質評価
- 2.1. FFPE からの核酸抽出法の解説 (DNA 抽出、RNA 抽出)
 - 2.2. 核酸品質確認方法 (DIN、RIN、DV200、リアルタイム PCR)
 - 2.3. 核酸品質評価の事例
- 第3章 次世代シーケンサーとライブラリー作成
- 3.1. 次世代シーケンサーを用いた様々な解析
 - 3.2. ライブラリー・ライブラリー作成
- 第4章 シーケンスデータの処理・解釈



病理検体の処理法、ホルマリン固定パラフィンブロック (FFPE) が出来るまで
検体採取



固定



パラフィン包埋



薄切



保存

↓
核酸抽出

1.1. 固定処理

固定：組織や細胞の自己融解による腐敗を抑え元の状態を保つための操作

固定液：固定する際に使用する試薬。ホルマリン、アルコール、ブアンなど

検査への影響

固定液の影響、固定時間 など



図1：FFPE ブロック 図2：連続迅速自動固定包埋装置



1.2. パラフィン包埋・薄切

パラフィン包埋：パラフィン浸透が終了した組織をパラフィンに埋没しブロックを作成する。
通称、FFPE ブロック (図1)。

脱灰：組織中の石灰成分を除去する操作。骨、歯、石灰化などの硬組織で行う。

脱脂 (脱水)：脂肪成分の多い組織であらかじめ、脂肪分中にある水を除去するため
アルコールやアセトンなどで強力に除去する操作

FFPE：Formalin-fixed, Paraffin-embedded
ホルマリン固定パラフィン包埋組織を指す。

プロセッサ：組織にパラフィンを浸透させる機器。従来法、迅速法がある。
アルコールやキシレンなどの溶媒を使用しパラフィンを浸透させる。
従来法では一夜法など 15 時間以上かけて行う。迅速法では専用機器 (図2)、
試薬を使用し約 2 時間で生検など小片組織にパラフィンを浸透させる。

未染標本：薄切後、染色を施していない状態のスライドガラス標本。

MW 照射 / 加圧：パラフィン浸透工程において薬液浸透を促進するために
マイクロウェーブや加圧、陰圧操作を行う事を指す。
具体的に脱脂や脱灰でマイクロウェーブ処理をする専用機器がある。

薄切： ミクロトーム（図3）を用いFFPE ブロックを数 μm の厚さに切る操作。



検査への影響

脱灰、脱脂の影響、プロセッサの影響（従来法、迅速法）
処理時間、使用溶媒、MW 照射 / 加圧の影響、腫瘍量・割合、
コンタミネーション防止策、未染標本保管期間、保管温度などの影響

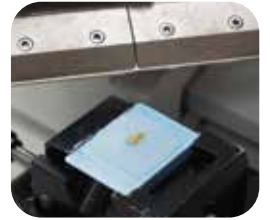


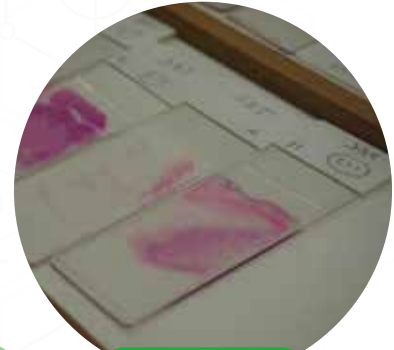
図3：ミクロトーム
（滑走式）

染色： 薄切後の標本にヘマトキシリンエオジン染色法などで着色し検鏡可能な状態にすること。

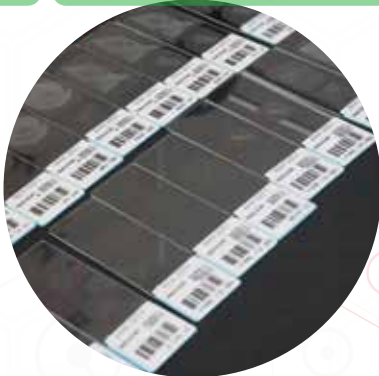
サンプル準備



染色



検鏡・観察



FFPE ブロック作成→薄切



ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE)
免疫染色



さらに学ぶには、

ゲノム病理標準化センター
<http://genome-project.jp/greeting/>

(一社) 日本病理学会 ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程
<http://pathology.or.jp/genome/>

サクラファインテックジャパン (株) 標本道場
<http://www.sakura-finetek.com/doujyou/doujyou.html>

1.3. FFPE ブロックの保管



検査への影響

保管期間、温度、湿度など



さらに学ぶには、

ゲノム病理標準化センター
<http://genome-project.jp/greeting/>

コラム 「コンタミネーション (contamination)」

がん遺伝子検査によく使用される FFPE ブロックは作成工程において
用手法によるところが多くコンタミネーションに
対し細心の注意を払わなければならない。

がん遺伝子検査において行う PCR 操作では 1 本の DNA
が 30 サイクルで $2^{30}=10^9$ 個コピーされることとなる。

病理検査においてもコンタミネーションに注意しているが更なる
配慮を今後、検討する必要がある。

使用する水や試薬、使用する器具などに浮遊する遊離 DNA にも配慮
する必要がある。

他にもマスク、手袋の着用など通常病理検査業務では
無意識に行っている手技なども見直す必要性がありそうだ。

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、
6 例 (5.8%) において 1% 以上のコンタミネーション
が疑われたとの報告がある。

病理検査用 FFPE は今後、形態学的検査だけでなくさらに様々な
用途に使用され病態の解明に使用されることを鑑みると携わる者の意識改革も必要である。



第 1 章 編集後記

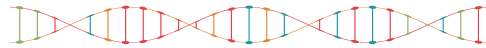
イノウエ ヒロフミ

井上 博文

臨床検査技師
国際細胞検査士

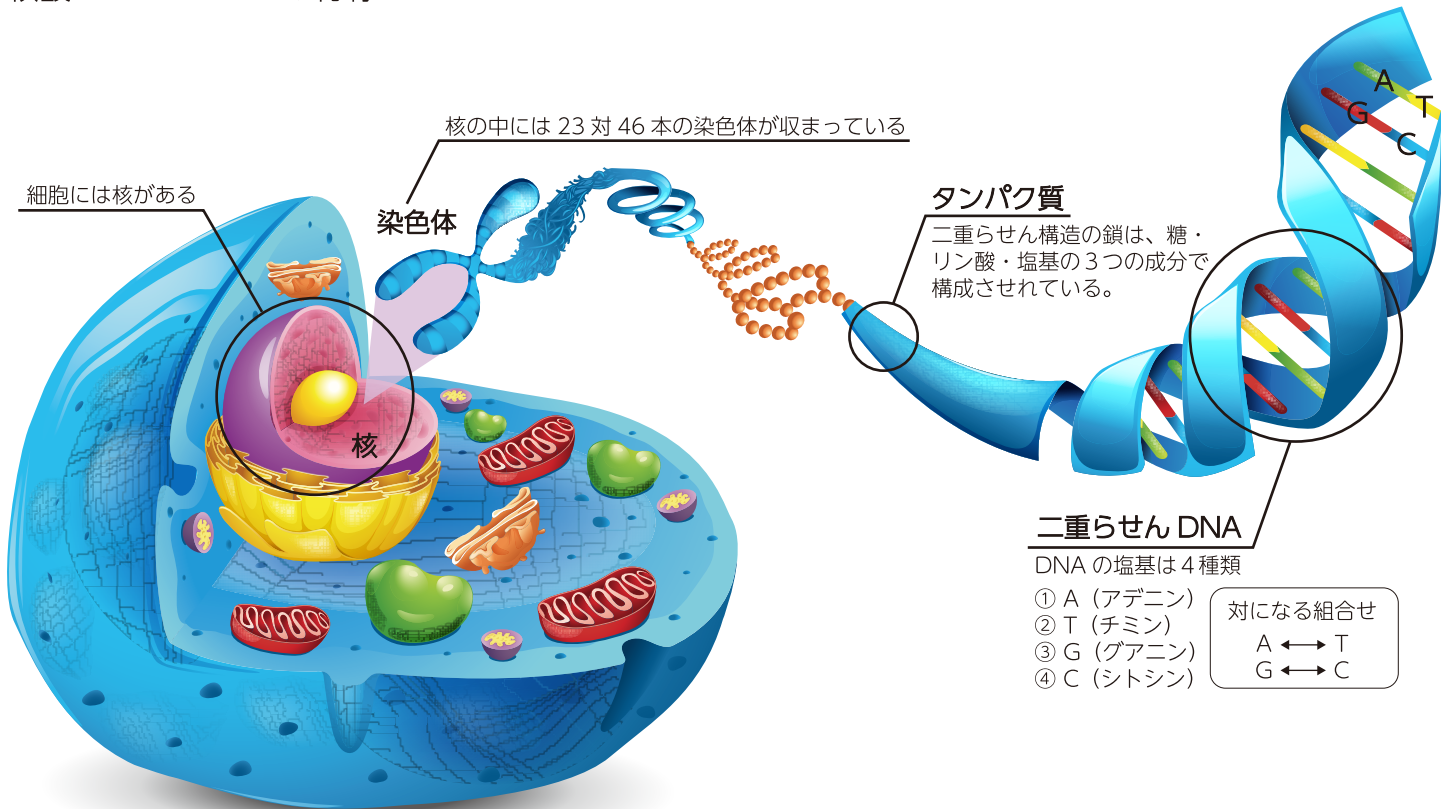
岡山大学病院
医療技術部検査部門
病理部／病理診断科

第2章 核酸抽出と品質評価



2.1. FFPE からの核酸抽出法

核酸：DNA/RNA の総称



細胞：ヒトは約 60 兆個の細胞からできている

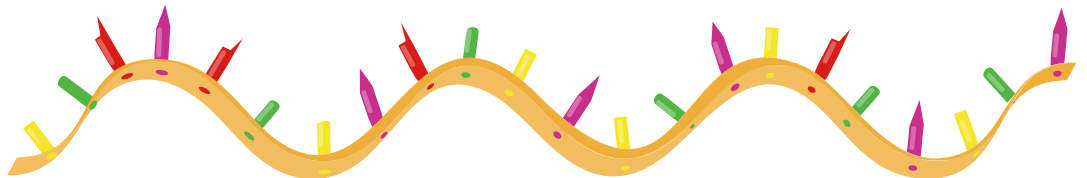
DNA と RNA の違い

構造の違い

DNA
→ 二重らせん構造



RNA
→ 単鎖構造



核酸抽出：標本中の細胞から DNA/RNA を抽出すること

1. 組織を脱パラフィン処理する
- 2-1. イソプロパノールを加えない → >500bp 以上の DNA が回収可
- 2-2. イソプロパノールを加える → >50bp 以上の DNA が回収可
3. Proteinase K で処理する
4. スピンカラムで精製する
5. DNA を溶出する

DNA 抽出

ステップ

生体材料の破壊と可溶化 → RNA の消化 → 核蛋白の解離 → 除蛋白 → DNA の分離



- ① 核膜を強力なイオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) でペプチドまで完全に解離させる。
- ② 同時にタンパク質加水分解酵素であるプロテナーゼKを作用させることにより DNA を遊離。
- ③ さらにタンパク質変性剤であるフェノール/クロロホルムで抽出して、DNA 以外の夾雑物を除去する。純度が高く比較的剪断力を受けていない DNA が抽出可能。



チオシアン酸グアニジン法

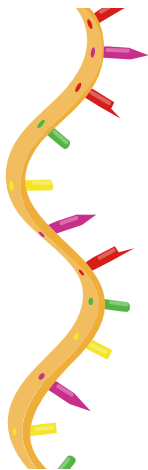
短時間で DNA 抽出が可能。市販キットの多くはこの方法を利用している。

抽出された DNA 溶液にカチオンを添加しエタノールまたは 2-プロパノールを添加すると DNA が析出する。市販の手法キットではシリカ担体、自動化法では磁性粒子を用いた方法が利用されている。

RNA 抽出

ステップ

生体材料の破壊と可溶化 → RNase の変性 → 除蛋白 → RNA の分離



タンパク質変性と DNA が酸性フェノールに溶け込むことを利用した方法

- ① 細胞にフェノール・チオシアニン酸グアニジンを入れる。
- ② 遠心・上清をエタノール沈殿させる。
- ③ ペレットを DEPC 水で溶解する。



④

※抽出方法は多種多様あり、核酸抽出キットも数多く販売されている。目的に応じて選択する必要がある。

※FFPE は固定や包埋の段階で DNA が剪断されるため PCR 法では通常 500bp 以下の増幅に使用される。

※DNA と RNA を溶液状態で安定に保存するためには、

1. 激しく振とうせず
2. 温度を低くし
3. pH を中性に保ち
4. NaCl などの塩を加える

2.2. 核酸品質確認方法 (DIN、RIN、DV200、RT-PCR)

FFPE はホルマリン固定条件や抽出検体の固定までの時間などの影響で、ゲノム DNA (gDNA) の分解が大きくなり、十分な核酸増幅がされなくなる。良質な DNA やライブラリ、正確な解析結果を得るためには品質チェックが必須である。

品質チェック

定性 → サイズ
定量 → 濃度

DIN (DNA Integrity Number)

- ① ゲノム DNA (gDNA) の分解度 (断片化) を 10 段階でスコア化
- ② 2200TapeStation(Agilent Technologies 社) を用いて 1 μ l のサンプルで測定



断片されていない状態 = 高品質 = 10
→ 断片化が進むにつれ数値が小さくなる

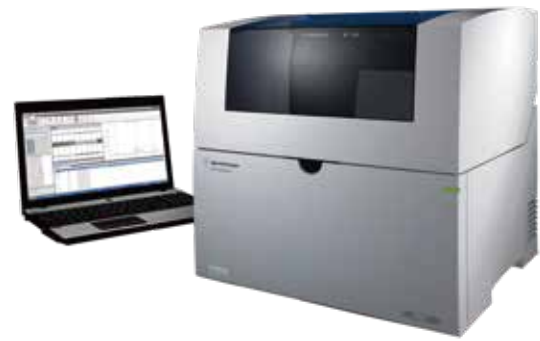


RIN (RNA Integrity Number)

- ① RNA の分解度 (断片化) を 10 段階でスコア化
- ② DIN 同様、2200TapeStation(Agilent Technologies 社) を用いて測定



断片されていない状態 = 高品質 = 10
→ 断片化が進むにつれ数値が小さくなる



DV200

- ① 200 ヌクレオチド以上の RNA 断片の割合を示す。
- ② ライブラリ調整の成功の予測値として用いる。
- ③ DV200 の値からライブラリ調整に使用するサンプルインプット量を導くことが可能である。



70%以上が高品質であり、
30%以下の使用は推奨されていない。

機器は Bioanalyzer を使用 →



リアルタイム PCR (Polymerase Chain Reaction)

遺伝子定量解析は目的とするデータの種類により 2 種類の方法に分けられる。

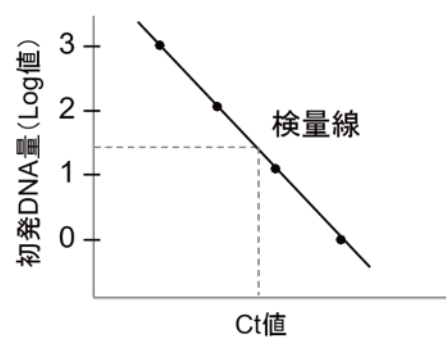
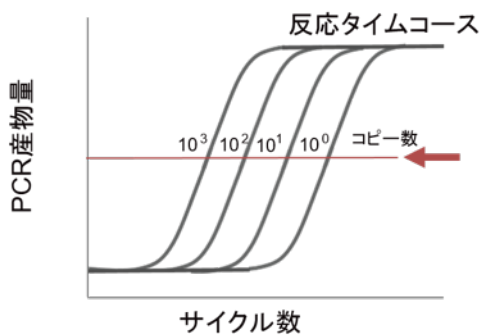
DNA 品質評価では、異なる長さの 2 種類のアンプリコンサイズから得られる差 (Δ CT) を指標とする。



絶対定量

遺伝子コピー数の絶対値を定量する解析。

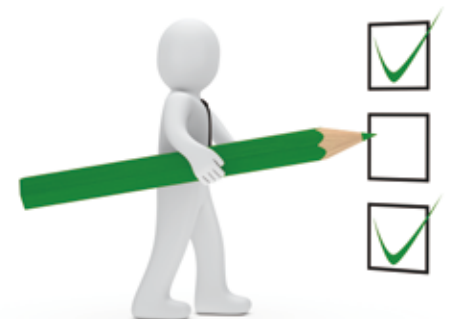
濃度既知のサンプルを段階希釈し、希釈系列を用いて検量線を作成し「一定のシグナル強度に達した時のサイクル数」を求める。濃度未知のサンプルの Ct 値を検量線に当てはめてコピー数を算出する。



相対定量

主に mRNA の発現定量に用いられる方法。

基準となるサンプルと比較して目的遺伝子がどの程度発現しているかを相対的に比較したもの。



2.3. 核酸品質評価の事例

核酸の品質評価タイミング

- ① 核酸抽出後
- ② ライブラリー構築工程中
- ③ ライブラリー構築後

核酸抽出後

核酸の濃度を確認 → 抽出された核酸の純度と濃度が十分かを確認



- ① 分光高度計 (nano drop) にて、260nm と 280nm を計測
- ② 吸光度比 260nm/280nm が 1.8 ~ 2.0 であれば純度の高い DNA
- ③ ここでは核酸抽出が成功したか、核酸濃度が十分かを確認

PCR 増幅前

核酸の断片化を確認 → 抽出された核酸の断片化 (長さ) を目安に PCR アンプリコンで核酸濃度を調整



- ① FFPE の場合、断片化が大きく DIN は 5 以下となることが多い
- ② FFPE の作製時期が古い程、ブロック表面の酸化や使用固定液の影響により、DIN は低くなる傾向

核酸の濃度を確認 → サンプルのインプット量や PCR のサイクル数を算出



- ① 二本鎖 DNA の定量 (濃度) は蛍光定量にて Qbit 3.0 Fluorometer で測定
- ② PCR アンプリコンに必要な核酸インプット量または PCR 増幅時のサイクル数を算出



ライブラリー構築

2200TapeStation で塩基長と濃度を計測することで、PCR アンプリコンは特定の長さで増幅されているのか、またライブラリー精製が正しく行われているのかを確認し、ライブラリーの濃度測定により NGS (次世代シーケンサー) へのアプライ量を算出する。



3.1. 次世代シーケンサーを用いた様々な解析

- ① 全ゲノムシーケンス (WGS : Whole Genome Sequence)
ヒトゲノム (約 30 億塩基) の全ての領域の塩基配列を解析すること。
- ② 全エクソンシーケンス (WES : Whole Exome Sequence)
ヒトゲノム (約 30 億塩基) のうち、1%~2% (30Mb~60Mb:3000 万~6000 万塩基) に相当するエクソン (タンパク質の情報を含んでいる) 領域の塩基配列を解析すること。
- ③ ターゲットシーケンス (TS : Target Sequence : がんパネル)
がんに関連した数十~数百の遺伝子のみを対象とした塩基配列の解析をすること。全遺伝子ではなく、対象を限定したライブラリー/ライブラリー作成のことをターゲットライブラリー/ターゲットライブラリー作成という。

ヒトゲノム： ヒトの全遺伝子情報 (約 30 億塩基) のこと。

シーケンサー： 遺伝子配列解析装置。
解析結果として「TTGGAATTCCGTCGTA」といった塩基配列が得られる。

次世代シーケンサー： 通称：NGS (Next Generation Sequencer)。
2000 年代後半に開発されたシーケンサー。それまでのシーケンサーに比べ、解析できる遺伝子配列が 1000 倍~ 100 万倍以上になった。



代表的なメーカー・機器

Illumina (イルミナ) 社

→ MiSeq, HiSeq

ThermoFisher (サーモフィッシャー) 社

→ IonPGM, IonProton など



Illumina MiSeq

3.2. ライブラリー・ライブラリー作成

DNA もしくは RNA を、次世代シーケンサーで解析するために処理したものをライブラリーと言い、この処理をすることをライブラリー作成という。具体的には DNA 配列に特異的な塩基配列を付加することにより、シーケンサーが解析対象の塩基配列を認識することができる。

核酸濃度測定

(dsDNA : double-stranded DNA : 二本鎖 DNA)
二本鎖 (二重鎖) の構造をとっている DNA の分解・断片化が進むと二本鎖の構造をとらない DNA が増え、ライブラリーの作成効率が悪くなる。



ライブラリー作成の流れ

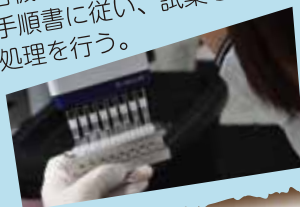
① ライブラリー調整

DNA の長さを揃えるなどの処理を行う。



② 試薬を揃える

調整後の DNA に対し、各機器・メーカーの手順書に従い、試薬を揃え、処理を行う。



注意・備考

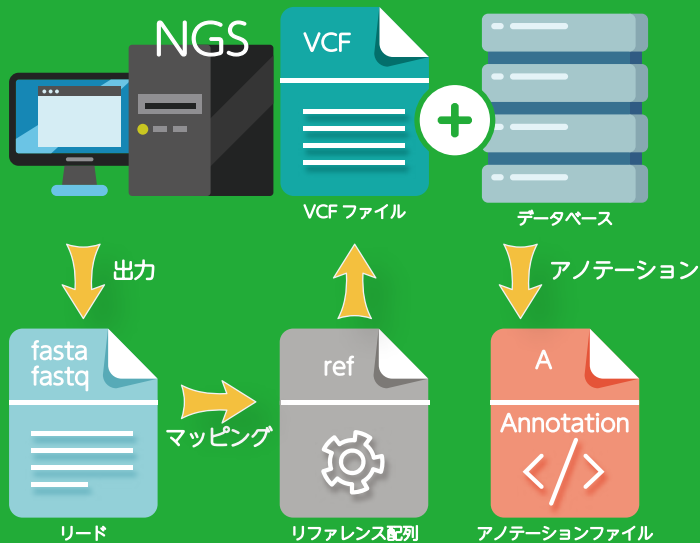
- 解析のタイプ (WGS, WES, TS) によって、ライブラリー作成のプロトコルが変わります。

- メーカーやNGSの機器により、処理・操作は異なります。

第4章 解析結果（シーケンスデータ）の処理



解析結果（シーケンスデータ）の処理の流れ（アノテーションファイルができるまで）



- ① NGS (次世代シーケンサー) から出力されるデータ (通称：リード)。形式は、fasta や fastq などがある。
- ② リードに対し、QC (Quality Check) を行なった後、それぞれの塩基配列がヒトゲノムのどの位置に該当するかをリファレンス配列を用いて解析することをマッピングと言う。
- ③ マッピングされたリードの塩基配列とリファレンス配列 (健常者の遺伝子配列) の塩基配列を比較し、相違部分の有無を見つけることを遺伝子変異解析と言う。
- ④ 見つかった遺伝子変異配列のみを集めたファイルを VCF (Variant Call Format) ファイルという。
- ⑤ VCF ファイルに情報 (遺伝子名、アミノ酸置換の有無など) を付加することをアノテーションファイルをといる。

fasta ファイルのサンプル

>HSBGPG Human gene for bone gla protein (BGP)

```
GGCAGATTCCTCCCTAGACCCGCCCGCACCATGGTCAGGCATGCCCCCTCCTCATCGCTGGGCACAGCCCAGAGGGTATAAACAGTGTCTGGAGGCTGGCGGGGAGCCAGCTGAGTCTGAGCAGACCCAGCGCAGCCACCCAGACACCATGAGAGCCCTCACACTCCTCGCCCTATTGGCCCTGGCCGCACTTTGCATCGCTGGCCAGGCAGGTGAGTGCCCCACCTCCCCTCAGGCCGCATGTCAGTGGGGGCTGAGAGGAGGAAGCACCATTGGCCACCTCTTCTCACCCCTTTGGCTGGCAGTCCCTTTGCAGTCTAACACCCTTGTTCAGGCTCAATCCATTTGCCCCAGCTCTGCCCTTG CAGAGGGAGAGGAGGAAGAGCAAGCTGCCCGAGACGCAGGGGAAGGAGGATGAGGGCCCTGGGGATGAGCTGGGGTGAACCAGGCTCCCTTTCTTTGCAGGTGCGAAGCCAGCGGTG CAGAGTCCAGCAAAGGTGACGGTATGAGGATGGACCTGATGGTTCTCTGGACCTCCCCTCTCACCCCTGGTCCCTCAGTCTCATTCCCCCACTCCTGCCACCTCCTGTCTGGCCATCAGGAAGG CCAGCCTGCTCCCCACTGATCTCCCAAACCCAGAGCCACCTGATGCCTGCCCTCTGCTCCACAGCCTTTGTGTCCAAGCAGGAGGGCAGCGAGGT → つづく
```

Point

- ① リファレンス配列にマッピングすると各リードがどこの遺伝子の配列かわかる
- ② データベースの情報をアノテーションするとどの遺伝子変異が重要かわかる

コラム 「バイオインフォマティシャン (Bioinformatician)」

次世代シーケンサー、最近では次の世代と称される第三世代のシーケンサーが登場している。シーケンサーの進歩により、塩基配列の解析は日に日に速度を速めている。

ただし、シーケンサーがするのは塩基配列の解析まで。この解析結果に意味付けをして行くのは誰であろうか？それがバイオインフォマティシャン (Bioinformatician) だ。

聞きなれない言葉かもしれないが、バイオインフォマティクス (生命情報学)

である。BIMは上記で示したアノテーションまでを作成する立場としても活躍する。様々なデータベース (dpSNP, 1000genome, COSMIC, etc.) を活用しながら、プログラミングを行いながら、作業を進める。加えて、データの品質管理まで行う。「ゲノム医療」という新しい分野の登場と共に光が差された職種、それが「バイオインフォマティシャン」である。



バイオインフォマティシャン (Bioinformatician) だ。聞きなれないが、バイオインフォマティクスをベースとする1つの職種