

国立がん研究センターバイオバンク研究採血部門

試料取り扱い標準手順書 (SOP)

1. 当センター中央病院を受診し、説明文書「診療目的で採取された血液・組織等の研究用保管と、研究用採血による医学研究へのご協力をお願い（ナショナルセンター・バイオバンク・ネットワークプロジェクト）(<http://www.ncc.go.jp/jp/ncch/consultation/pdf/kyoryoku.pdf>)」を用いた説明を受け、「研究のための採血と、それに付随する診療・予後情報を保管（バイオバンク保管）し、医学研究（遺伝子解析や、民間企業による研究開発を含む。但し 個人を特定する情報が国立がん研究センター外に提供されることはない）に利用されること」に、文書で同意された患者から血液を採取する。
2. 採血は診療のための採血に併せて1回だけ、14ml（16才未満は7ml、6才未満は5ml、2才未満は2ml以下）採血する。原則として夜間と週末の採血は行わない。

【中央病院 6階 検体検査室】

3. 採血室、病棟、小児外来で採血された採血管は、その他検査用の採血管と共に採血後速やかに中央病院6階検体検査室に運ばれる。検体検査室では各採血管を検査別に種別すると共に、バイオバンク研究用採血の採血管を所定の4℃冷蔵庫内に保管し、1日2回（12:00と15:00）、到着確認・記録を行い、それぞれ別のラックに収めて、ワークシートを印刷して確認者がサインをし、コピーを1枚取っておく。
4. 包括的同意研究補助者（以下、研究補助者）2名が15:00に検体検査室に採血管（検体）を取りに行く。二人一組でワークシートと検体を照合し確認後、ワークシートとコピーに受取日を記入して署名し、コピーを検体検査室に残し、原本を検体と共に遺伝子検査室に持ち帰る。

【中央病院 6 階 遺伝子検査室】

5. 遺伝子検査室では、遺伝子検査室担当者が検査室のシステム「クリニラン」から当日の検体一覧表を、その日のシリアルの作業番号と共に印刷する（クリニランワークシート）。同時に同じファイルの一部加工し、「クリニラン-RMS 対応表（白表）」を作成し、院内ファイル伝達システム Proself を用いて個人情報管理室に送る。
6. 研究補助者は、「クリニランワークシート」で作業番号と患者氏名、採血本数を確認し、採血管に記載されている氏名の前に作業番号をナンバリングし、作業番号順に試験管立てに採血管を並べる。
7. 予めシリアルの作業番号をふっておいた 50ml チューブに、同じ作業番号の患者の採血管 2 本分の血液検体を完全に移し、空の採血管にはパラフィルムを巻いて内部を密閉する。再度、作業番号と患者氏名を確認し、「クリニランワークシート」にチェックを入れる。この際、採血が規定量以外の場合や、その他特記事項は「クリニランワークシート」備考欄に記入する。

注：採血量の少ない検体（<5ml）は 15ml チューブを使用し、以降の処理は血漿分離と DNA 抽出用までとする。さらに採血量の少ない検体（<2ml）は新たなチューブに移し替えず、採血管のまま患者氏名を消して匿名化後、ゲノムセンターに持ち帰り採血管のまま血漿分離のための遠心をする。
8. 血液検体のはいった 50ml チューブを 3000rpm, 10 分間遠心分離する。この間に空の採血管を個人情報管理室に持って行く。
9. 遠心後、検査医または検査技師が血漿分離後の検体状態の確認をし、異常があれば「クリニランワークシート」の備考欄に記入する（溶血、黄疸、乳び等）。
10. 遠心後、まず血漿 5ml を同じ作業番号のふってある 15ml チューブに分取する。

注：血漿分取の際は、表層に脂肪分等が浮いていることもあるので、スポイトの先を血漿層に入れ込み、ただし Buffy coat は取らないようにスポイトを回しながら採取する。

- 次に 50ml チューブの残りの血球成分 (buffy coat, 赤血球) を良く攪拌し、チューブ内に DNA 用として 6.5ml 残し、それ以上の血球成分を RNA 用として新たな 15ml チューブ (同じ作業番号がふってあるもの) に分取する。

注：ここまでに分取された検体の種類は下記の通り。

- (1) DNA 用 50ml チューブに 6.5ml の血球成分
- (2) 血漿用 15ml チューブに 5ml の血漿成分
- (3) RNA 用 15ml チューブに上記残量の血球成分

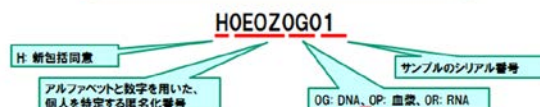
【中央病院 7 階 個人情報管理室】

- 検体の匿名化は、個人情報管理室に於いて個人情報管理実務補助者 (以下実務補助者) が行う。実務補助者は、事前に臨床試料等基盤情報管理システム (Research data Management System、以下 RMS システム) を使用して匿名化番号を振り出しておく。患者一人に対して、ラベルを 14 枚 (DNA 用 7 枚、血漿用 6 枚、RNA 用 1 枚) 出力し、一人分のラベルに作業番号 (1、2、3・・・) をマジックで書いておく。

注：匿名化番号は H で始まるアルファベットと数字を用いた最初の 5 桁が個人を特定する匿名化番号で、続く 4 桁のうち、最初の 2 桁が試料の種類を表す番号 (OG: DNA, OP: 血漿、OR: RNA)、次の 2 桁がサンプルのシリアル番号となるので、検体匿名化番号としては 9 桁の番号が書かれたラベルを 14 枚用意することになる。



- 患者一人に対して、血漿用二次元バーコードチューブ 6 本に匿名化ラベルを貼り、その匿名化番号にあたる作業番号をチューブに書いておく。



- 遺伝子検査室からプロセルフを通じて「クリニラン-RMS 対応表 (白表)」が届いたら、「クリニラン-RMS 対応表 (白表)」にある作業番号にあてて、患者氏名・ID の横に、予め振り出した匿名化番号を当てていき (対応表の作成) できたファイルを「クリニラン-RMS 対応表」とする。血漿用チューブにある二次元バーコードの情報も対応表に入れていく。

15. 研究補助者により、遺伝子検査室から作業番号の記載された空の採血管を受け取ったら、「クリニラン-RMS 対応表」の作業番号と同じ作業番号が振ってある採血管のラベルバーコード（作業依頼番号）を「クリニラン-RMS 対応表」のしかるべき位置に読み込ませることにより、作業番号と患者氏名・IDにずれや誤りが無い事を確認する。
16. 完成した対応表は RMS に登録し、対応表から患者氏名、姓、名、患者 ID、生年月日を削除して匿名化表（抜粋）、及び備考ワークシートを作成する。
17. 匿名化作業後、作業番号を書いた匿名化バーコードラベル（一人につき一連 14 シート）の束、匿名化ワークシート 3 枚（「匿名化表（抜粋）」、「血漿・DNA 用備考」「RNA 用備考」）、作業番号がふってあり匿名化バーコードラベルが貼ってある血漿保存用チューブを遺伝子検査室に運ぶ。

【中央病院 6 階 遺伝子検査室】

18. 研究補助者は、実務補助者と検体の本数の確認をする。実務補助者は匿名化表（抜粋）」に、遺伝子検査室で記載されていた「クリニランワークシート」備考欄のコメントを書き写す。
19. 「クリニランワークシート」と検体検査室から持ち帰ったワークシートは、実務補助者が個人情報管理室に持ち帰り、個人情報管理室で保管する。
20. 研究補助者は、「匿名化表（抜粋）」の作業番号・匿名化番号を確認しながら、該当する作業番号のチューブ（50mlx1 本、15mlx2 本）に該当する大きな匿名化バーコードラベルを貼る。
注：匿名化バーコードラベル 5, 6 桁目：DNA 用→0G、血漿用→0P、RNA 用→0R のラベルを使用。採血量不足により RNA 用検体が存在しない場合など、その旨を「匿名化表（抜粋）」に記載する。
21. 検体の匿名化が終了した時点で検査室の外へ持ち出して良い。ラベルを貼り終わった試料と血漿保存用二次元バーコードチューブ、匿名化ラベルの残り、

個人情報管理室から届いたファイル類を、疾病ゲノムセンター地下1階実験室に運ぶ（アイスボックスと保冷剤を使用）。

【疾病ゲノムセンター地下1階 実験室】

22. 血漿、RNA 用検体は当日処理し、DNA 用検体は翌日処理を行うため、4°Cの冷蔵室にて保管する。金曜日、休前日の場合は DNA 抽出用血球成分は-80°Cに一時保管する。

<血漿分注>

23. 血漿の入っている 15ml チューブと血漿保存用チューブに貼られている匿名化番号を照合しながら、血漿を保存用チューブ 6 本に約 700 μ l 以上ずつ分注する。採取血漿が量不足の場合は「血漿・DNA 用備考」ワークシートに採取量を記録し、血漿保存用チューブが余った場合は、データ入力者が確認してから破棄する。

注：700 μ l 以下の容量は分注しない。払い出しの時は、「血漿 1 本は 700 μ l 以上」として払い出しする。

24. 分取後の血漿は-80°Cに一時保存する。6 本の内末尾 01, 02, 03 を X、04, 05, 06 を Y の Box に保存する。間違い防止のため X と Y の Box を同時に出さないようにする。

<RNA 抽出>

25. 採血量不足で RNA 抽出用の検体が存在しない場合は、「RNA 用備考」ワークシートに記録する。
26. QIAGEN の試薬を使用して RNA 抽出の途中まで行う。下記のこと注意到意。
- ・作業中は手袋、マスク、ゴーグルを着用する。
 - ・机上に汚染防止用の濾紙を敷き、氷を準備する。
 - ・できる限り細胞が暖まらないように、氷上で操作する。
 - ・Buffer EL は、ボトルから直接取らずに使用分だけ別容器に分注しておく。
 - ・Buffer RLT 1ml に対して β -メルカプトエタノールを 10 μ l 添加する。添加後は遮光し、室温で 1 ヶ月使用可能（RLT 50ml に対して β -メルカプトエタ

ノール 500 μ l)

- ・遠心機は事前に4℃に設定しておく。
- ・廃液用容器にピューラックスを適量入れておく。
- ・保存用 2ml エッペンドルフチューブを準備し、チューブ蓋・横部分に作業番号を記載する。匿名化バーコードラベルは2次元を蓋に、1次元を横に貼り、保護用テープをその上から貼っておく。

27. RNA 用検体として血球成分が分注してある 15ml チューブに、Buffer EL をピペットを使用して遠心管のメモリで Total 12ml になるまで添加する。

注：蓋を置くときは、No. が書いてある方を上にして濾紙の上に置く。閉める時に遠心管本体と蓋の No. を間違えないようにする。

28. 十分に混和し、氷上で 10～15 分間（必要に応じて 20 分間）インキュベートして、溶血させる。インキュベート中に 2 回短時間ボルテックスをかける。

注：赤血球の溶解につれて、インキュベーション中に混濁した懸濁液が透明になっていく。

29. 4℃、400xg、10 分間遠心する。

30. 白血球のペレットを確認し、上清をデカンテーションで捨てる。濾紙の上にラップ、キムタオルの順に置き、その上にチューブの口を下にして倒立させ、ペレットを流失させない程度に上清を良く切る。

31. 再び Buffer EL をピペットで 5ml ずつ加え、ボルテックスで十分に懸濁し、氷上で 10～15 分間（必要に応じて 20 分間）インキュベートする。インキュベート中に 2 回短時間ボルテックスをかけ、細胞を懸濁する。

32. 4℃、400xg、10 分間遠心する。

33. 白血球のペレットを確認し、上清をデカンテーションで捨てる。濾紙の上にラップ、キムタオルの順に置き、その上にチューブの口を下にして倒立させ、ペレットを流失させない程度に上清を良く切る。

注：チューブを表に返した後も上清が残っていたら、遠心 400xg、1 分間程度して、200 μ l 先長チップを使用して上清を確実に除去する。

34. 白血球のペレットにβ-メルカプトエタノール入り Buffer RLT を 600μl 加える。1000μl ピペットチップを使用し、ペレットに Buffer を直接あてるようにする。
35. チューブを振とう機にセットし、ボルテックスする。ペレットが溶けなければピペッティングで良く懸濁する。量の多い白血球ペレットで塊が溶解しない場合、追加でβ-メルカプトエタノール入り Buffer RLT を 600μl 加える。
36. 溶液が均一に混濁されたのを確認後、匿名化のバーコードラベルが貼ってある 2ml エッペンドルフマイクロチューブに溶解液を移動させる。
37. チューブのキャップにパラフィルムを巻き、-80℃に保存する。

注：RNA 保存 Box は 3 箇所 Box No. ラベルを貼る。Box 内の番地をそのままデータベースに登録するので、作業番号順に正しく入れること。検体の欠番がある場合も間を空けず連続して納める。

<DNA 抽出>

38. 月曜日及び休日明けは、-80℃に保管されている DNA 抽出用血球成分から、その他の平日は前日から 4℃に保管されているそれから、QIAGEN の試薬を使用して DNA 抽出を行う。下記の事に注意。
 - ・手袋・ゴーグル・マスク着用、用液等が付着した時はこまめに替える。
 - ・机上汚染防止のため、実験台には濾紙をひく。
 - ・使用する溶液は、あらかじめ必要量を 50ml チューブ、ボトル等に分注しておく。
 - ・FG1 buffer の廃棄は必ず次亜塩素酸入りの廃液専用ビーカーに捨て、廃液ポリタンクにまとめる。
 - ・その他の廃液は FG1 buffer とは別のビーカーに捨てる。
 - ・プロトコール通りに行えなかった箇所はワークシートに記入しておく。
39. 凍結乾燥している QIAGEN Protease (30AU) を 7ml の超純水で再懸濁させる。溶解後日付けを記入し、2~8℃で保存し 2 ヶ月以内に使い切る。

40. 1 検体あたり元の総血液量約 10ml と考え、1 検体あたり使用する FG2 buffer 5ml と Protease 50 μ l を予め使用する検体数分混和し、FG2/Protease buffer を調整する。調整後は 1 時間以内に使用する。

注：7ml 採血管 \times 2 本 = 14ml から血漿 5ml 除いた残りの内の 6.5ml 分なので、
 $14 \times (6.5 \div (14-5)) = 10.08\text{ml}$ \rightarrow 元の総血液量約 10ml と考える。

41. DNA 抽出用試料にすみやかに QIAGEN FG1 buffer 25ml を加える。

注：-80 $^{\circ}$ C で保存されていた試料は恒温水槽 37 $^{\circ}$ C で穏やかに攪拌しながら、素早く解凍後、FG1 buffer を加える。

42. 5 回転倒混和して攪拌した後、スイングローターで 2000xg, 5 分間、25 $^{\circ}$ C で遠心する。

43. 遠心後ペレットを確認しながらデカンテーションで上清を捨てる。濾紙の上にラップ、その上に吸引紙を敷き、チューブを逆さに立ててなるべく上清を除去する (2 分以上)。

44. 1 検体ずつ FG2/Protease buffer 5ml を加えたらすぐ蓋をして、迅速にボルテックスでペレットを完全に破碎する。6 本立て 50ml チューブ用ミキサーを使用して、ペレットが完全に均一化されるまで (2 分~10 分) ボルテックスをかける。ホモジナイズが完全に行われた事を確認する。

注：ゼリー状の塊ができてしまった場合は、FG2 buffer のみを 1ml 加えてボルテックスする。その場合は、その後のイソプロパノールも同量増やす。

45. 65 $^{\circ}$ C の恒温水槽で 65 $^{\circ}$ C 15 分以上 30 分位、インキュベーションする。検体溶液の色が赤からオリーブ緑になって、タンパク質が分解されたことを確認する。

46. チューブ内の温度を下げるため、37 $^{\circ}$ C で 1 分間インキュベーションする。

47. 2000xg, 3 分間、25 $^{\circ}$ C で遠心する。

48. イソプロパノール (100%) 5ml を添加後、DNA 沈殿が糸状または塊のように認められるまで、十分にじっくりと転倒混和する。
49. 2000xg, 5 分間、25°Cで遠心する。
50. ペレットを確認しながらデカンテーションで上清を捨てる。ペレットに注意しながら、吸水性のある紙の上にチューブの口をトントンとあてて上清を切る。
51. 70%エタノール 5ml 添加して、穏やかな転倒混和で壁面・ペレットをリンスする。
52. 2000xg, 3 分間、25°Cで遠心する。
53. ペレットを確認しながらデカンテーションで上清を捨てる。濾紙の上にラップを敷き、その上に吸引紙を敷き、チューブを逆さに立てて上清を除去する (5分以上)。
注：ペレットがチューブ内に残留していることを確認する。
54. チューブを上向きに戻し、エタノール臭がなくなるまでペレットを風乾する。ただし乾燥させすぎないこと。
55. TE buffer (pH8.0) 500~800 μ l 加えてペレットを溶解する。ペレットの大きさに応じて、最終的に 150~800ng/ μ l の範囲になるように、加える buffer 量を調整する。
56. 65°Cの恒温水槽で 1 時間インキュベーションして DNA を完全に溶解させる。
57. チューブ内の温度を下げるため、37°Cで 1 分間インキュベーションする。
58. 2000xg, 1 分間、25°Cでスピンドウンする。

59. インキュベーション時間中等に作成した、作業番号が記載してあり匿名化バーコードラベルの貼ってある 2ml のスクリーキャップパッキング付き自立型マイクロチューブに、作業番号とラベルを確認しながら 50ml チューブの中の DNA 溶液を完全に移す。多少の DNA 塊が残っていても、1000 μ l のチップで据える範囲なら移す。

注：使用済み 50ml チューブは捨てずに濃度測定終了時まで保管しておく。

60. 2ml チューブに入った DNA 溶液は、一晚 37 $^{\circ}$ C の孵卵器の中で転倒混和する。
61. 翌日、DNA 溶液が均一に溶解していることを確認したら、孵卵器からチューブを出して 4 $^{\circ}$ C に保管する。濃度測定前に良くボルテックスしてスピンドウンしてから、25 μ l 用チップを使用して NanoDrop で OD を測定する。
62. 測定時の Sample name は、頭に作業番号を手入力し、次にバーコードリーダーでチューブの横のバーコードを読み取る。
63. 測定データは所定のフォルダに保存する。波形の測定値画面をエクセルファイルに画像で貼り付けたものと、NanoDrop の table txt data ファイルの 2 種類を保存する。
64. 測定値 800ng/ μ l 以上は溶解量と同量の TE buffer pH8.0 で希釈し、DNA 抽出ワークシートの溶解量を赤字で訂正しておく。
65. DNA の質は OD 比 (260/280) が 1.8 以上であり、それ以下の場合は Phenol-Chloroform による再精製とする。
66. 「DNA 抽出表_日付け.xlsx」ファイルにアップデートされている濃度を入力し、データを更新する。
補給
67. 上記ファイルを開き、分注する DNA 群のリストをプリントする。上記リストを参考に、OG01 の 2ml 保存用チューブ(親チューブ)の DNA を新しい分注用

0.5ml のスクリュウキャップパッキング付き自立型マイクロチューブ(子チューブ)に 55 μ l ずつ移す。この際子チューブの匿名化番号は末尾が 0G02～0G07 となり DNA が 5 μ g 以上分注されていることになる。

注：親チューブへの分注量が 1ml を超えてしまう場合は、検体匿名化番号シール 0G08 以降を発行し、8 本以上に分注する。

68. DNA 抽出時に作成した「DNA 抽出ワークシート_日付」に各保存用チューブのキャップの二次元バーコードとチューブ横の一次元バーコードをそれぞれ読み込ませ、バーコード番号の確認をする。また、DNA 保存用チューブを収めるべき保管 Box 内の番地を確認する。

69. 保存用チューブの「0G01」はフリーズボックスの「0」に、0G02～0G03 は「X」、0G04～0G05 は「Y」、0G06～0G07 は「Z」のボックスに横方向へ収め、バイオバンク室へ搬入するまで 4 $^{\circ}$ C にて保管しておく。

注：□ ボックス X、Y、Z に収めるチューブは 2 本一組とし、満たない場合は空所とし詰めない。ただし、2 本とも存在しない場合は、詰めて収める。

70. 毎週月曜午後に、血漿、DNA、RNA 用検体とも、フリーズボックスが一杯になっている箱に関して、ドライアイスとアイスボックスを使用して疾病ゲノムセンター地下実験室から、研究所 1 階バイオバンク事務室まで、検体情報のはいった電子ファイルとともに検体を移動する。

【研究所 1 階 バイオバンク事務室】

71. バイオバンク事務室では検体情報（匿名化番号、保管ボックス内の番地等）を番地管理ソフトに入れると共に、血漿の入っているチューブの二次元バーコードを読み取り、番地管理ソフトに記録し、それぞれのサンプルを -80 $^{\circ}$ C に保管する。この時、ボックス「X」と「Y」は、違うフリーザーに保管する。

72. DNA のフリーズボックス「0」「X」「Y」「Z」、RNA のフリーズボックスについては、検体情報を番地管理ソフトに入れ、それぞれのボックスを違う -80 $^{\circ}$ C に保管する。