

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)

制定 平成 23 年 5 月 13 日

改訂 平成 27 年 8 月 1 日

改訂 令和 2 年 4 月 30 日

改訂 令和 5 年 4 月 1 日

改訂 令和 6 年 1 月 4 日

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）(https://www.ncc.go.jp/jp/biobank/files/NCCH_BB_ICF_Ver.4.0.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、文書で同意戴い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、13ml（実際は 12ml）（16 才未満は 6.5ml（実際は 6ml）、6 才未満は 5ml、2 才未満は 2ml 以下）採血する。但し、参加者の体調や病状などを鑑み、担当医が問題ないと判断した上で実施し、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、病棟及び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℃冷蔵庫内に保管する。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、ワークシートを印刷後確認者がサインをし、コピーを 1 部取る。
4. 包括的同意研究補助者（以下、研究補助者）2 名が 15:00 に検体検査室にて採血管（検体）を受領する。二人一組で検体とワークシートを照合して確認後、ワークシートとコピーに受取日を記入して署名する。コピーは検体検査室保管とし、原本は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「CLINILAN」から当日の検体一覧を抽出し、その日のシリアル番号の作業番号と共に印刷する（CLINILAN ワークシート）。同時に同じファイルを一部加工し、「CLINILAN-RMS 対応表（白表）」を作成し、院内共通基盤システム築地・認証ポータル内のファイル共有サービス（以下、ファイル共有サービス）を用いて個人情報管理室に送信する。
6. 研究補助者は、CLINILAN ワークシートで作業番号と患者氏名及び採血管本数を確認し、採血管に記載されている患者氏名の前に作業番号をナンバリングし、作業番号順に採血管を試験管立てに並べる。二人一組で採血管のラベルと CLINILAN ワークシートを照合しながら、作業番号と患者氏名を確認し、CLINILAN ワークシートにチェックを入れる。
7. 予めシリアル番号の作業番号を付番した 50ml チューブに、対応する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、空の採血管に元の栓をして内部を密閉する。採血が規定量以外の場合や、その他特記事項のある場合は CLINILAN ワークシートの備考欄に記入する。

注：採血量の少ない検体（<5ml）は 15ml チューブに血液検体を移す。遠心分離後は血漿を 15ml チューブに移し、残りを DNA 抽出用とする。さらに採血量の少ない検体（<2ml）は新たなチューブに移さず、採血管のまま患者氏名を消して匿名化後、研究所 2 階実験室に持ち帰り採血管のまま遠心分離を行う。遠心分離後は血漿保存用チューブに直接血漿を分取し、残りを DNA 抽出用とする。
8. 血液検体の入った 50ml チューブを 1500xg、10 分間、15～25℃で遠心分離する。この間に空の採血管を個人情報管理室へ持って行く。
9. 遠心後、検査医または検査技師が血漿分離後の検体の性状確認をし、異常があれば CLINILAN ワークシートの備考欄に記入する（溶血、黄疸、乳び等）。
10. まず血漿 5ml を対応する作業番号の 15ml チューブに分取する。

注：表層に脂肪分等が浮いていることがあるので、スポイトの先を血漿層に入れ込みスポイトを回しながら血漿を採取する。ただし Buffy coat は取らないように注意する。
11. 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、新たな 15ml チューブ（同じ作業番号を付番したもの）に 1.5ml の血球成分を RNA 用として分取し、残りを DNA 用とする。

注：ここまでに分取された検体の種類は下記の通り。

- (1) 血漿用 15ml チューブに 5ml の血漿成分
- (2) RNA 用 15ml チューブに 1.5ml の血球成分
- (3) DNA 用 50ml チューブに上記残量の血球成分

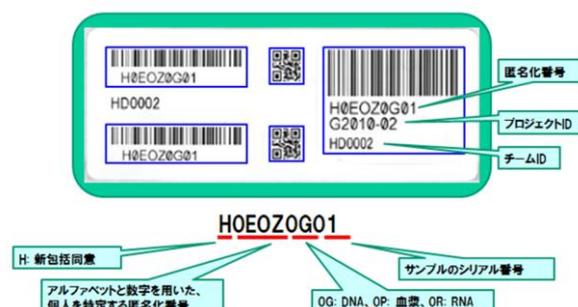
なお、血漿を採取した後の血球成分が 5ml 未満の場合は、RNA 用の血球成分は分取せず、すべて DNA 用とする。

【中央病院 7 階 個人情報管理室】

12. 検体の匿名化は、個人情報管理室に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、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、予め匿名化番号を振り出す。患者一人に対して、匿名化バーコードラベルを 14 枚 (DNA 用 7 枚、血漿用 6 枚、RNA 用 1 枚) 出力し、一連の匿名化バーコードラベルに作業番号を書く。

注：検体匿名化番号は 9 桁の番号であり、H 又は A 又は B 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。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。

13. 患者一人に対して、血漿用二次元バーコードチューブ 6 本に匿名化バーコードラベルを貼り、その匿名化番号に対応する作業番号をチューブに書く。



14. 遺伝子検査室からファイル共有サービスを通じて「CLINILAN-RMS 対応表 (白表)」が届いたら、「CLINILAN-RMS 対応表 (白表)」の作業番号に対応する患者氏名・ID の横に、予め振り出した匿名化番号を充て (対応表の作成)、「CLINILAN-RMS 対応表」を作成する。血漿用チューブの二次元バーコード情報も対応表に入力する。

15. 研究補助者から空の採血管を受け取ったら、「CLINILAN-RMS 対応表」の作業番号と同じ作業番号の採血管のラベルバーコード (作業依頼番号) を「CLINILAN-RMS 対応表」のしるべき位置に読み込ませる。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、匿名化ワークシート 3 枚 (「匿名化表 (抜粋)」、「血漿・DNA 用備考」、「RNA 用備

考」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 枚）、匿名化ワークシート 3 枚、作業番号が付番された匿名化バーコードラベルが貼られた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等の確認を行う。実務補助者は CLINILAN ワークシート備考欄のコメントを「匿名化表（抜粋）」に転記する。
19. CLINILAN 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、対応する作業番号のチューブ（50ml×1 本、15ml×2 本）に匿名化バーコードラベル（大）を貼る。
注：匿名化バーコードラベル 6, 7 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）」に記入する。
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可能となる。匿名化バーコードラベルを貼付した検体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、研究所 2 階実験室に搬送する。アイスボックスと保冷剤を使用し、15 分以内に搬送する。

【研究所 2 階 実験室】

22. 血漿検体は当日処理し、DNA・RNA 用検体は翌日処理を行うため、4℃冷蔵庫内で保管する。金曜日、休前日の場合、RNA 用検体は 4℃冷蔵庫内で、DNA 用検体は-80℃フリーザー内で一時保管する。3 日以上間が空く場合、RNA 用検体は保管せず当日処理する。

<血漿分注・保存>

23. 15ml チューブ内の血漿を、血漿保存用チューブ 6 本に約 700 μ l 以上ずつ分注する。作業番号・匿名化番号を照合しながら行う。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と分注本数を記録し、未分注の血漿保存用チューブは、データ入力者が確認後破棄する。

注：700 μ l 未満の容量は分注しない。払い出しの際は、「血漿 1 本は 700 μ l 以上」とする。

24. 分注が完了した血漿保存チューブは-80℃フリーザーに一時保存する。6本の内末尾01, 02, 03をX、04, 05, 06をYのボックスに保存する。間違い防止のためXとYのボックスを同時に出さない。

<RNA抽出>

25. 採血量不足でRNA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抽出の途中までを行う。以下の点に注意する。
- ・作業中は手袋、マスク、ゴーグルを着用、溶液等が付着した場合は替える。
 - ・机上に汚染防止用の濾紙を敷く。
 - ・赤血球溶解後は全てのステップを出来るだけ迅速に室温で行う。
 - ・Buffer ELは、予め必要量を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10μl添加する（RLT 50mlに対してβ-メルカプトエタノール 500μl）。調製後は遮光して室温で保存し、使用期限は1ヶ月とする。
 - ・遠心機は事前に4℃に設定し、氷を準備する。
 - ・廃液は必ず次亜塩素酸入りの廃液用容器に入れる。
（有効塩素濃度5000ppm(0.5%)で消毒するため、廃液500mlに対して41.7mlのピューラックス(6%)を加える）
 - ・保存用2mlマイクロチューブの蓋・横部分に作業番号を書く。匿名化バーコードラベル（匿名化番号末尾0R01）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る。
27. RNA用検体にBuffer ELを12mlのチューブ目盛まで加える。
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する。
注：赤血球の溶解につれて、混濁した懸濁液がインキュベーション中に透明になっていく。
29. 400xg、10分間、4℃で遠心する。
30. ペレットを確認しながら、デカンテーションで上清を除く。濾紙の上にラップ、吸水紙の順に置き、その上にチューブの口を下にして倒立させ、上清を完全に除く。

31. 再び Buffer EL を 5ml ずつ加え、ボルテックスし細胞を懸濁する。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し、細胞を懸濁する。
32. 400xg、10 分間、4℃で遠心する。
33. ペレットを確認しながら、デカンテーションで上清を除く。濾紙の上にラップ、吸水紙の順に置き、その上にチューブの口を下にして倒立させ、上清を完全に除く。
注：チューブを上向きに戻した後に上清が残っていたら、400xg、1 分間程度遠心して、先長チップを用いて上清を取り除く。
34. β-メルカプトエタノール添加 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加える。
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ティングで良く混和する。ペレットが溶解しない場合、追加でβ-メルカプトエタノール添加 Buffer RLT を 600μl 加える。
36. 溶液が均一に混濁されたのを確認後、保存用 2ml マイクロチューブに溶解液を移す。作業番号・匿名化番号を照合しながら行う。
37. チューブのキャップにパラフィルムを巻き、-80℃フリーザーに一時保存する。
注：RNA 保存ボックスは 3 箇所ボックス番号ラベルを貼る。ボックス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。検体の欠番がある場合は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℃フリーザー内に、その他の平日は前日から 4℃冷蔵庫内に保管されている DNA 用検体から、QIAGEN の試薬を使用して DNA 抽出を行う。以下の点に注意する。
 - ・作業中は手袋、マスク、ゴーグルを着用、溶液等が付着した場合は替える。
 - ・机上に汚染防止用濾紙を敷く。
 - ・使用する溶液は、予め必要量を 50ml チューブ、ボトル等に分注しておく。
 - ・Buffer FG1 の廃棄は必ず次亜塩素酸入りの廃液用容器に入れる。
(有効塩素濃度 5000ppm(0.5%)で消毒するため、廃液 500ml に対して 41.7ml のピューラックス(6%)を加える)

- ・その他の廃液は Buffer FG1 とは別の廃液用容器に入れる。
- ・保存用 2ml スクリューキャップパッキング付き自立型マイクロチューブ（以下保存用 2ml チューブ）の蓋・横部分に作業番号を書く。匿名化バーコードラベル（匿名化番号末尾 0G01）を横に貼り、保護用テープをその上から貼る。
- ・分注用 0.5ml スクリューキャップパッキング付き自立型マイクロチューブ（以下分注用 0.5ml チューブ）の蓋・横部分に作業番号を書く。匿名化バーコードラベル（匿名化番号末尾 0G02～0G07）を横に貼り、保護用テープをその上から貼る。
- ・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載する。

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℃で保存し使用期限は 2 ヶ月とする。

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 Buffer FG2 5ml と Protease 50μl を抽出本数分混和し、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×2 本 = 14ml から血漿 5ml 除いた残りの内の 6.5ml 分なので、
 $14 \times (6.5 \div (14-5)) = 10.1\text{ml}$ → 元の総血液量約 10ml と考える。

41. DNA 用検体にすみやかに Buffer FG1 を 25ml 加える。

注：-80℃で保存されていた検体は恒温水槽 37℃で穏やかに攪拌しながら、素早く解凍後、Buffer FG1 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℃で遠心する。

43. ペレットを確認しながらデカンテーションで上清を除く。濾紙の上にラップ、吸引紙の順に置き、その上にチューブの口を下にして倒立させ、ペレットを流出させない程度に上清を除く（2 分以上）。

44. 1 検体ずつ FG2/Protease buffer を 5ml 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）ボルテックスする。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た場合は、Buffer FG2 のみを 1ml 加えてボルテックスする。その場合は、その後の 2-プロパノールも同量増やす。

45. 65°Cの恒温水槽で15分以上（30分位迄）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り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°Cで1分間インキュベーションする。
47. 2000xg、3分間、25°Cでスピンドウンする。
48. 2-プロパノール（100%）を5ml加えた後、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除く。濾紙の上にラップ、吸引紙の順に置き、その上にチューブの口を下にして倒立させ、ペレットを流出させない程度に上清を除く。
51. 70%エタノールを5ml加えて、穏やかな転倒混和でペレット・チューブ内をリンスする。
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除く。濾紙の上にラップ、吸引紙の順に置き、その上にチューブの口を下にして倒立させ、ペレットを流出させない程度に上清を除く（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、液体が蒸発す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) を400~1000 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、DNA濃度が150~800ng/ μ l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、3分間、25°Cでスピンドウンする。

59. 保存用 2ml チューブに 50ml チューブ内の DNA 溶液を完全に移す。作業番号・匿名化番号を照合しながら行う。DNA 塊が残っていても、1000 μ l のチップで吸える程度なら移す。
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する。
60. 37 $^{\circ}$ C の孵卵器の中で一晩転倒混和する。
61. 翌日、DNA 溶液が均一に溶解していることを確認後、孵卵器からチューブを取り出し 4 $^{\circ}$ C 冷蔵庫に保管する。濃度測定前に良く混和しスピンドウンしてから、20 μ l 用チップを使用して NanoDrop で濃度測定を行う。
62. 測定時の Sample name は、バーコードリーダーで保存用 2ml チューブのバーコードを読み、次にアンダーバー (_) 作業番号を手入力する。
63. NanoDrop の測定データ (table txt data) は所定のフォルダに保存する。
64. 測定値 800ng/ μ l 以上は溶解量と同量の TE buffer で希釈し、再度濃度測定を行う。DNA 抽出ワークシートの溶解量を赤字で訂正する。
65. DNA の質は OD 比 (260/280) 1.8 以上を基準とし、それ未満の場合は Phenol-Chloroform 抽出による再精製を行う。
66. 「日付_DNA 抽出表.xlsx」ファイルに DNA 濃度、溶解量を入力しデータを更新する。
67. 「日付_DNA 抽出表.xlsx」ファイルの分注 DNA 群リストを印刷する。このリストを参考に、保存用 2ml チューブから分注用 0.5ml チューブ 6 本に 55 μ l ずつ分注する (DNA は 5 μ g 以上分注される)。DNA 溶液が量不足の場合は、分注 DNA 群リストに溶液量と分注本数を記録し、未分注の分注用 0.5ml チューブはデータ入力者が確認後破棄する。
注：保存用 2ml チューブへの分注量が 1ml を超える場合は、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. 「日付_DNA 抽出表.xlsx」に、バーコードリーダーで保存用・分注用チューブバーコードを読み、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ボックス内の番地を確認する。
69. 保存用 2ml チューブの匿名化番号末尾 0G01 は保管ボックスの「0」に、分注用 0.5ml チ

チューブの匿名化番号末尾 OG02～OG03 は「X」、OG04～OG05 は「Y」、OG06～OG07 は「Z」、それ以外は「E」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℃冷蔵庫にて保管する。

注：ボックス X、Y 及び 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、ボックスが一杯になった血漿、DNA 及び RNA 用検体を、研究所 2 階実験室から、研究所 2 階バイオバンク室に移動する。移動にはドライアイスとアイスボックスを使用し、検体情報（匿名化番号、保管ボックス内の番地等）の電子ファイルは PASS 付き USB メモリに保存して移動する。

【研究所 2 階 バイオバンク室】

71. バイオバンク室では、血漿、DNA 及び RNA 用検体の検体情報を番地管理ソフトに取り込むと共に、それぞれのボックスを異なる-80℃フリーザーに保管する。血漿に関しては、更に保存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する。研究所 2 階実験室の 4℃冷蔵庫及び-80℃フリーザーから 30 分以内にバイオバンク室の-80℃フリーザーに検体を移動する。

— 以上 —