

# Heidelberg CardioBiobank の DNA サンプルの品質に関する レトロスペクティブ分析

## 著者

Tanja Heimberger<sup>1</sup>,  
Steffi Sandke<sup>1</sup>, Tanja Weis<sup>1</sup>,  
and Eva Graf<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Heidelberg CardioBiobank,  
Department of Internal  
Medicine III,  
University Hospital,  
Heidelberg Germany

<sup>2</sup> Agilent Technologies, Inc.

## 概要

本アプリケーションノートでは、Agilent 4150 TapeStation System を品質管理 (QC) ツールとして使用し、Heidelberg CardioBiobank (HCB) に保存されている DNA サンプルを分析した事例をご紹介します。血液検体から DNA を抽出した直後に、確実に高品質の DNA サンプルのみを保存する重要なステップとして品質管理が実施されています。その後の研究に使用される前に、過去に凍結された DNA サンプルの品質管理も繰り返し行われます。本アプリケーションノートでは保存されている DNA サンプルの品質と定量に関するレトロスペクティブな分析に着目しています。一部のサンプルでは、サンプルの代表として一度も凍結融解されず -80 °C で 9 年間保存したものを使用し、分析しました。

HCB ではこの期間中、異なる DNA 抽出方式が採用されており、結果としてサンプルの品質レベルにはばらつきが生まれました。QC 後の分析により、過去に使用されたサンプル抽出や処理方法の効率性の検証を行うことができました。

## はじめに

HCB はドイツで最大規模のバイオバンクのひとつで、心血管疾患に重点をおいています。HCB は病院統合型のバイオバンクとして運営されるだけでなく、いくつかの国内および国際的な臨床試験や研究プロジェクトの中核となるバイオバンクでもあります (図 1)。このバイオバンクでは発足当初、各研究それぞれの方法で保存された生体サンプル (主に液体サンプル) を通常の -80 °C フリーザーで保存し、生体サンプルの収集は各研究のガイドラインに応じて実施されていました。2014 年に HCB は組織改編を行い、最大で 120 万サンプルを収容可能なフルオートメーションの -80 °C 保存システム (Liconic AG (Liechtenstein) による特注システム) を導入し、生体サンプルが確実に目的に適したものであることを保証するため、サンプル収集、処理、輸送および保存方法において全体のワークフローを評価し、最適化を行いました。さらに、プレアナリシスの全工程に具体的な標準作業手順書 (SOP) を開発・実装し、最先端のトランスレーショナルリサーチに

必須である高品質なサンプルの保存が可能となりました (図 2)。バイオバンクにおいてこれらの手順がどのように影響するかを調べるため、2010 年から 2018 年の連続 9 年間のサンプルから無作為に選択し、DNA の品質

と量をほかの確立された品質マネジメント (QM) ツールで解析しました。さらに、4150 TapeStation System を全自動電気泳動によるゲノム DNA の定量と品質評価を行う QC ツールとして評価し、結果を比較しました。

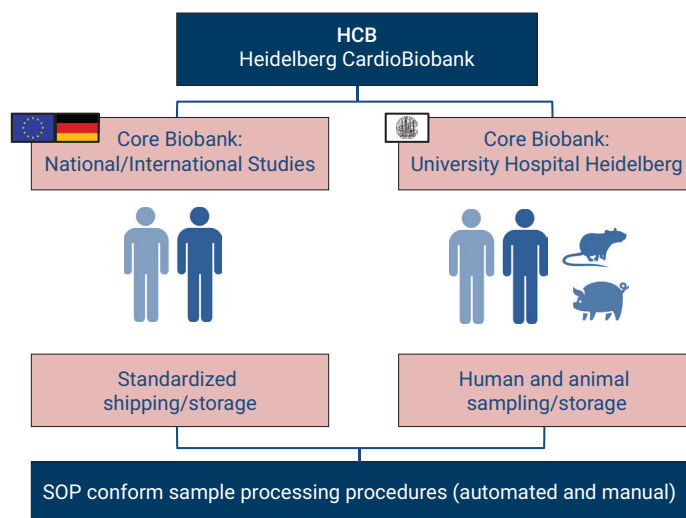


図 1. Heidelberg CardioBiobank (HCB) の体系

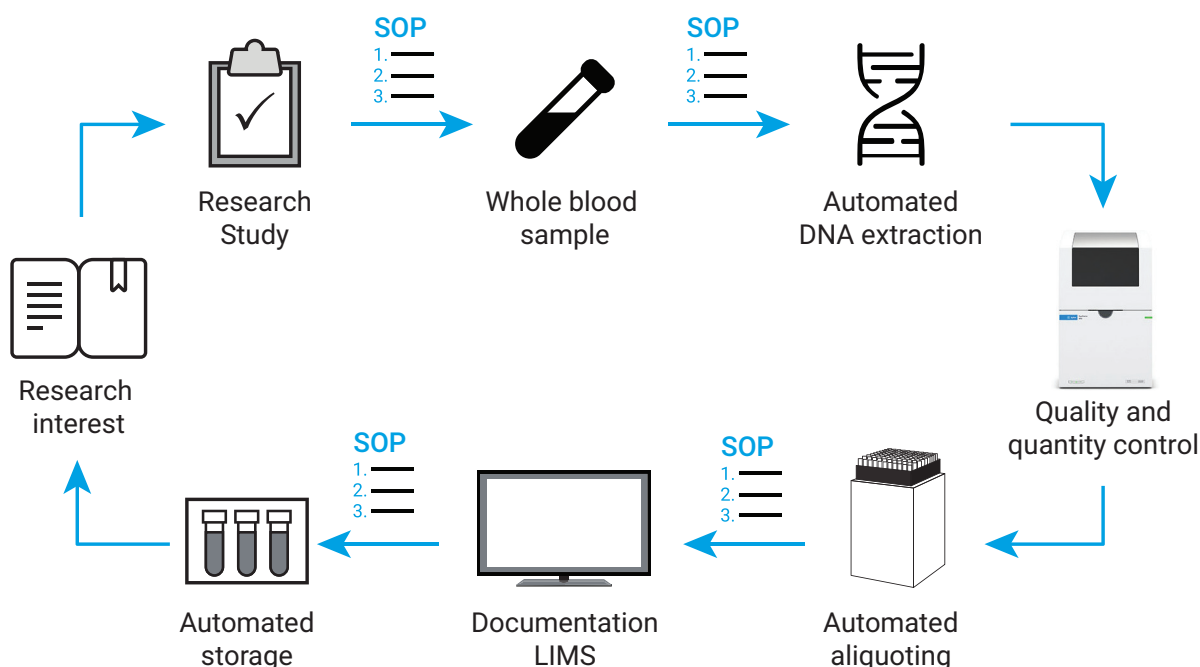


図 2. DNA 抽出を含めた全血サンプル処理のワークフロー

すべてのプレアナリシス過程において、SOP を作成し標準時間が設定されました。SOP は生体サンプルとその輸送、さらに該当する場合は自動化された DNA 抽出 (Tecan/Promega Freedom EVO HSM workstation) の手順に関して示されています。液体サンプルは自動で分注 (Tecan Freedom EVO system) され、自動化 -80°Cフリーザーシステム (Liconic 社による特注 STC store) で保存されます。各ステップの正確な記録はサンプルデータだけではなく各過程のタイムスタンプを記録する LIMS software CetraXX (Kairos) で実施されます。

## 実験方法

### DNA 抽出

長期保存された DNA の解析のため、2010 年から 2018 年までの 1 年あたり 20 サンプルを無作為に選択しました。2015 年以前は、血液サンプルの収集は若干異なる条件で行われていました。例えば、ある研究では DNA 抽出前の 4 °C での保存についての時間を定めていませんでした。DNA 抽出は EDTA 採血した全血 (9 mL) から、シリカメンブレンカラムを使用する NucleoSpin Blood XL カラムキット (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を用い手作業で行いました。2015 年以降、DNA 抽出はビーズ法による ReliaPrep Large Volume HT gDNA Isolation system を使用し自動化された抽出システム (Tecan/Promega Freedom EVO HSM workstation、Tecan, Männedorf, Switzerland) により行いました。EDTA 採血した全血 (9 mL) はサンプル処理まで 4 °C で保存し、全自動での DNA 自動抽出までの保存期間は 7 日以内としました。2014 年から自動化システムへの変更に伴い、消耗品 (生体サンプルの保存チューブ) を変更する必要がありました。保存チューブがサンプルの品質に影響する可能性を除外するために 2014 年のサンプルに関しては 2 グループの解析を行いました。2014 年のサンプルグループ 1 は Mironic 社のチューブ、グループ 2 は FluidX 社のチューブで保存したものです。自動化システムの実装と並行して、生体サンプルの取り扱い、処理、輸送に関連した SOP の改善を行いました。

### DNA 分析

選択した DNA サンプルは同一の融解条件 (4 °C で 18 時間) で処理し、分注して次のステップに進めました。まず、サンプル濃度を NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) で測定し、2010 年から 2018 年までの凍結前の測定結果と比較しました。さらに蛍光色素による測定法である Quantus Fluorometer (Promega, Madison, USA) でも測定しました。Quantus の測定結果を用いて DNA 濃度を Agilent 4150 TapeStation System の Genomic DNA ScreenTape Assay の定量範囲 (10 ~ 100 ng/μL) に調整しました。取

り扱い説明書に従い、すべてのキットの構成部品は室温に 30 分間置き、室温に戻しました。選択した DNA サンプルを希釈した後、10 μL の Genomic DNA Sample Buffer と 1 μL のゲノム DNA を注意深く分注し、ボルテックスで 1 分間混合後、スピンドウンして Genomic DNA ScreenTape にロードしました<sup>1</sup>。多くの場合、4150 TapeStation Controller Software で利用可能なすべてのサンプルポジションを選択しました。図 3 に示したワークフローの通り、測定は 3 回繰り返して実施しました。TapeStation Analysis Software を用いて、DNA サンプルの濃度と DNA Integrity Number (DIN) を評価しました。

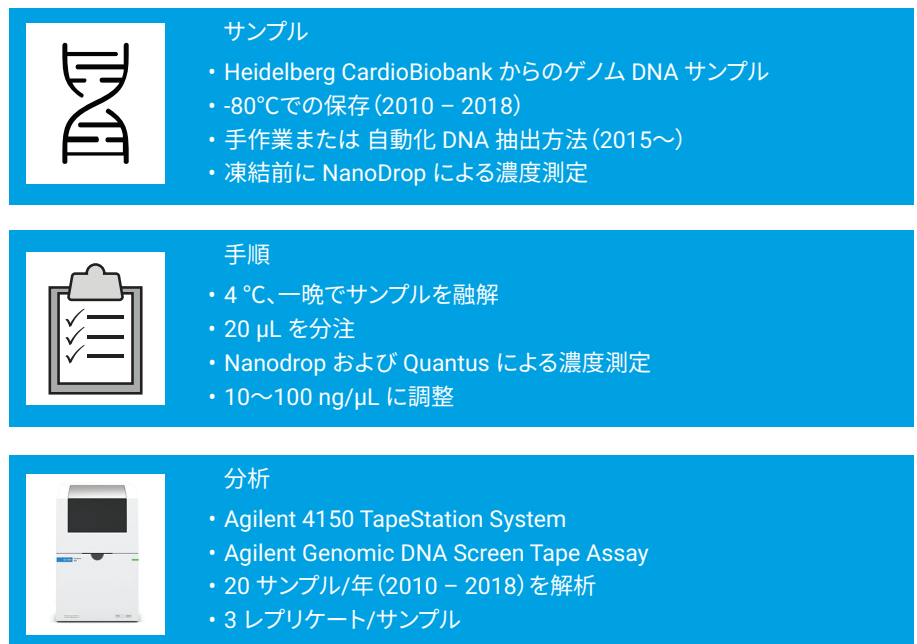


図 3. DNA 定量と品質評価解析のワークフロー

## 結果と考察

### 品質

DIN アルゴリズムは、TapeStation Analysis Software に搭載されており、1～10 までの数値スコアを割り当て DNA サンプルの品質評価を行います。DIN が高い場合、分解をうけていない高品質のゲノム DNA であることを、DIN が低い場合、分解されたゲノム DNA であることを示します<sup>2</sup>。DNA 分析の結果、自動化プロセスと改善版 SOP が導入された 2015 年から現在にいたるまで、解析した DNA サンプルは一貫して品質が高い (DIN > 9) ことがわかりました。対照的に、2014 年以前のサンプルは品質に大きなばらつきがありました (図 4)。図 5 に 2010 年から 2018 年まで

のそれぞれ代表するサンプルのゲル表示とエレクトロフェログラムの重ね書きを示します。2014 年に自動化された保存および処理システムの導入に伴い、保存チューブのタイプが変更されました。そのため、2014 年のサン

プルは 2 セット (2014/1 と 2014/2) を解析しました。チューブの製造元を Micronic 社から FluidX 社に変更しましたが、DNA サンプルの品質に影響はありませんでした。

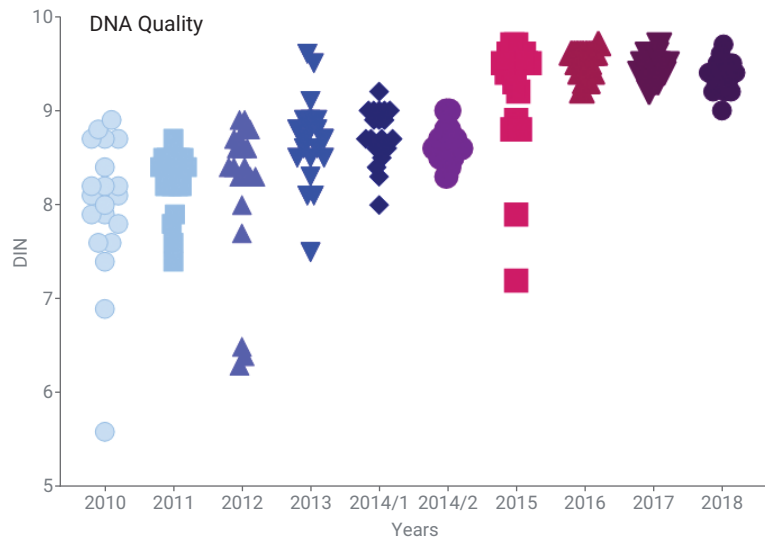


図 4. 9 年間のサンプル品質の比較

各年につき 20 の DNA サンプルを Genomic DNA ScreenTape Assay で分析しました。2014 年はチューブを変更したため 2 グループを分析しました。

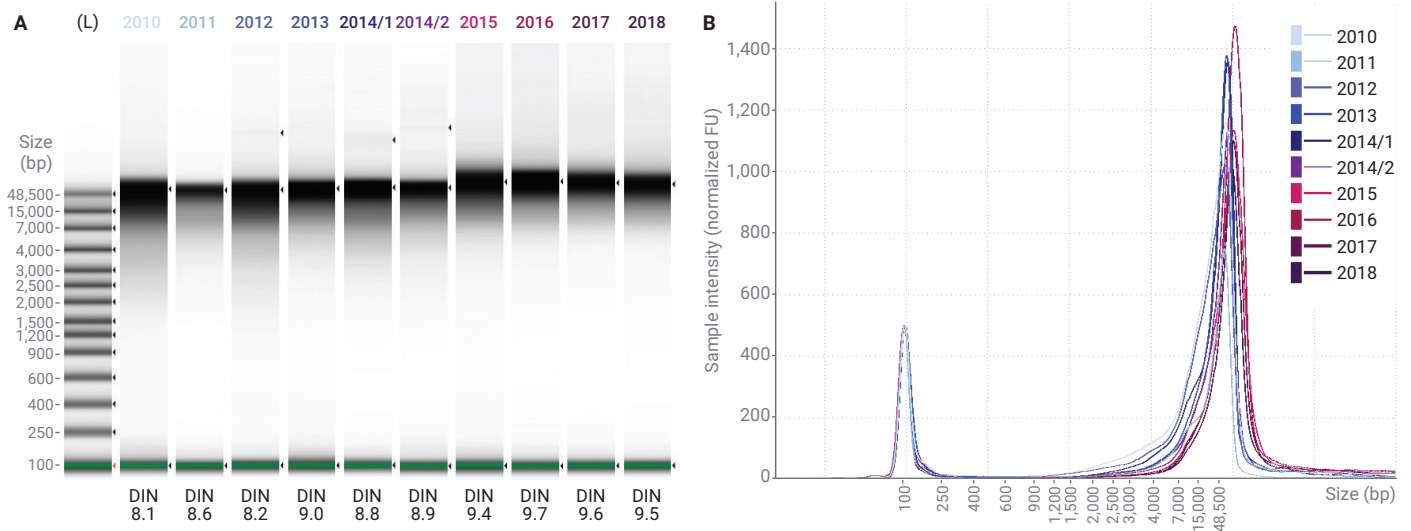


図 5. 2010 年から 2018 年までの代表サンプルの比較

DNA サンプル 2014/1 は Micronic 社のチューブを、2014/2 は FluidX 社のチューブを使用しました。サンプルの品質は 2015 年以降に向上し、高い DIN 値に反映されています。A) TapeStation ゲル表示 B) 10 サンプルのエレクトロフェログラムの重ね書き。これらの表示はサンプルの品質を視覚的に比較可能です。

## DNA 定量

DNA 濃度は HCB での DNA 抽出の直後に NanoDrop spectrophotometer で規定通りに測定しました。2010 年から 2014 年の DNA サンプルは手作業で抽出され（実験方法を参照）、DNA 濃度は平均で約 120 ng/μL でした。2015 年に SOP を改善し、自動化 DNA 抽出法を導入した結果、DNA 収量の平均は約 300 ng/μL となりました。本研究では、サンプルを解凍した後、再度 NanoDrop で DNA を定量しました。-80 °C での保存は保存期間に関わらず、サンプル濃度に変化はありませんでした（図 6）。TapeStation System は DNA 濃度の決定が蛍光色素ベースであるため、蛍光色素で DNA を評価する Quantus でもサンプルを測定しました。評価したサンプルはすべて、双方のシステムで同等の DNA 濃度を示しました（図 7）。

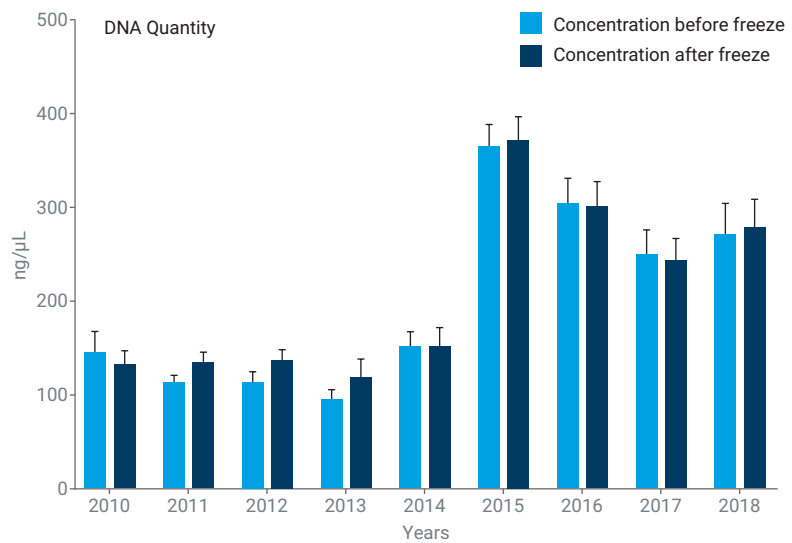


図 6. NanoDrop 分光光度計で測定した DNA 濃度

2014 年から 2015 年の間に DNA 抽出方法をマニュアルから自動化に変更したことで、DNA 濃度が増加しました。すべての DNA 濃度は-80°Cでの保存で数年にわたり安定していました。

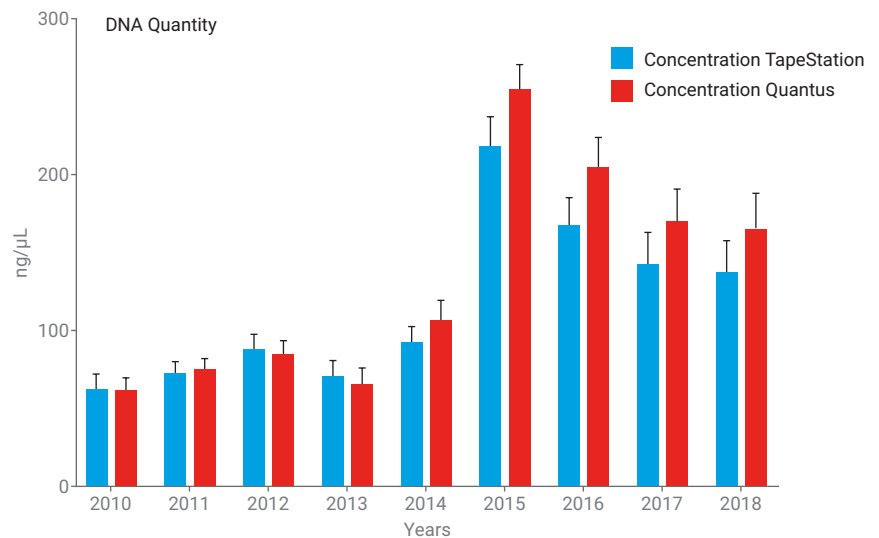


図 7. Quantus fluorometer と TapeStation System による DNA 定量

2014 年と 2015 年の間での DNA 濃度の増加は、DNA 抽出方法をマニュアルから自動化に切り替えたことによります。

## 結論

2010年から2014年まで、HCBでの生体サンプルの収集は、2015年から2018年に比較するといくつかの研究では厳密性が低いSOPで実施されていました（例えば、血液サンプルを処理するまでの保存時間が2時間から数日、研究によりばらつきがありました）。結果として、2010年から2014年では分析されたDNAサンプルの品質にばらつきが認められました。

2015年にプロセスの大幅な改善のために、サンプル収集、輸送、サンプル調製手順などのワークフローの評価を行いました。インキュベーション時間、保存方法など前処理のパラメータがDNAの品質に与える影響を調査し、その結果、先進的なSOPの開発と実装につながりました。手順の標準化に加え、DNA抽出のために自動化装置を導入したことで、結果が改善されました。DNA抽出プロセスを

自動化することにより、収量、品質および品質の安定性を大幅に向上させることができました。Genomic DNA ScreenTape Assayにより、DNAの品質をDINを用いて評価することができるようになりました。サンプルの処理、抽出プロセスの改善はDNAの品質にも反映し、DINの値が有意に高いレベルで安定した値となりました。現在、個別化医療や精密医療の必要性は非常に明白であり、ベストプラクティスに従ったトランスレーショナルリサーチが必要とされています。本アプリケーションノートでは、標準化され、ほぼ完全に自動化されたサンプル処理システムの導入により、生体サンプルの品質を非常に高く保てることを示しました。4150 TapeStation SystemとGenomic DNA ScreenTape Assayは下流のアプリケーションで重要となるDNAサンプルの品質を確認するための信頼のおけるQCツールとして、我々のワークフローにスムーズに統合することができました。

## 参考文献

1. Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide for 4200 TapeStation System, *Agilent Technologies*, publication number G2991-90040, **2015**.
2. Gassman, M.; McHoull, B. DNA Integrity Number (DIN) with the Agilent 2200 TapeStation System and the Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-5258EN, **2015**.

### [お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタマコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email\_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2020

本書の一部または全部を画面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan, April 9, 2019

5994-0811JAJP