

## 仕 様 書

1. 件 名 リアルタイム PCR 法を用いた間質性肺炎および関連疾患のヒト血清中 miRNA 発現解析

### 2. 目的

本委託解析は、発注者より提供するヒト血清に含まれる 15 種類の microRNA (miRNA) を定量 PCR 法により測定する業務である。

### 3. 作業内容

#### 1) カスタム qPCR パネル作製

指定の miRNA 15 種 および Spike-in コントロール (cel-miR-54-3p を想定)の合計 16 種の miRNA を 1 セットとして、TaqMan qPCR 法に適したプライマー及びプローブを設計合成し、96well プレートに整列化する。96well プレートあたり 6 セット分を配置する。設計合成は TaqMan Advanced miRNA Assay (カスタム qPCR パネル) (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を利用する。

#### 2) 合成 miRNA の調製

指定の miRNA 15 種類、および Spike-in コントロール (cel-miR-54-3p) の 5' リン酸化 RNA オリゴ (以下、合成 miRNA とする) をそれぞれ合成し、注射用水に溶解する。合成時の分子量情報から 5 段階希釈溶液を作成し、16 種類の合成 miRNA を混合した合成 miRNA 混合希釈溶液を準備する。

#### 3) RNA 抽出精製

供与血清 200  $\mu$ L から miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen 社)を用いて total RNA を抽出精製する。このとき供与血清に Spike-in コントロールを添加し、品質検定の指標の一つとする。得られた RNA は Agilent 2100 バイオアナライザまたは TapeStation(アジレント・テクノロジーズ社)を用いて低分子 RNA が回収されていることを確認する。

#### 4) qPCR 解析

TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用いて、一定量の血清由来 total RNA から cDNA を合成する。合成した cDNA 溶液の一部を鋳型として、TaqMan Fast Advanced Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)、および 1) で作製したカスタム qPCR パネルを用いて qPCR を実施する。qPCR は StepOnePlus リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用

いて実施し、各 miRNA の Cq 値を算出する。検体あたり N=1 で評価する。

得られた Spike-in コントロールのデータをもとに、qPCR データの品質確認を行う。具体的数値は別途相談のうえ、決定する。

## 5) 分析能バリデーション

### 5)-1 市販血清を用いた併行精度確認

上記 1) で作製したカスタム qPCR パネルを用いて、市販血清 (Human Serum (pool) (コスモバイオ社) から抽出した total RNA を鋳型として qPCR を行う。抽出精製工程から qPCR 解析工程までの作業は 3) および 4) の仕様に従って実施する。市販血清を N=3 で評価する。残り 1 セットは注射用水を鋳型とした no template control (以下 NTC とする) を評価する。解析結果から測定値(Cq 値)、95%信頼区間、標準偏差および変動係数 (CV) を算出し、結果を報告する。本解析は業務実施期間中 3 回実施する。

### 5)-2 合成 miRNA を用いた併行精度・直線性・範囲確認

上記 1) で作製したカスタムパネルを用いて、上記 2) で作製した合成 miRNA 混合希釈溶液の qPCR を、4) の仕様に従って N=4 で実施する。解析結果から測定値(Cq 値)、95%信頼区間、標準偏差および変動係数 (CV) を算出し、報告する。また、直線性評価については miRNA それぞれについて検量線を作成する。検量線は段階希釈系列の濃度に対して、その定量結果である測定値をプロットし、回帰直線を引くことで作成する。それぞれの miRNA に対して相関係数、回帰式を算出し、決定係数を報告する。データのばらつきから定量下限を算出し、協議のうえ設定する。

## 4. 納品物

- ・ 解析報告書
- ・ 解析データ (記録メディア)
- ・ Raw データ
- ・ 解析結果を出力したエクセルファイル
- ・ 残余血清

## 5. 供与物

- ・ 血清                    263 検体 (各 250  $\mu$ L 以上)

## 6. 実施機関

- ・ 解析機関は、上記作業内容を同一施設内で実施できること。

- ・ 輸送時の供与物の品質劣化を抑えるために、解析機関は日本国内にあること。
- ・ 解析作業は ISO9001 管理下で実施すること。

#### 7. 試験の進捗状況の報告等

解析データについて説明を求めることがあるため、問い合わせ後 3 営業日以内に解析機関担当者が技術説明訪問可能であること。

#### 8. 納品

2019 年 3 月 29 日までに、木原記念横浜生命科学振興財団に提出すること。

#### 9. その他

当該事業について疑義が生じた場合、木原記念横浜生命科学振興財団またはその指定する者と協議するものとする。

本契約の相手方が、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（以下、AMED）から委託されている『官民共同による重篤副作用バイオマーカー開発』事業における再委託先機関や、研究開発参加者が所属する機関及び共同研究参加企業となる場合は、AMED が定める『委託研究開発契約事務処理説明書』に定められている利益排除等の取り扱いに従う。