

委託仕様書

件 名	マウス脳および腸管組織を用いた遺伝子発現解析業務委託		
発注部署	次世代臨床研究センター	担当者名	講師 小林 雄祐
委託内容 (具体的に)	1 委託内容 ※※ 別紙参照 ※※		
	2 納品物 ・作業報告書 ・以下のデータを格納した記憶媒体 (HDD) およびダウンロードリンク ✓ fastq データ ✓ 各解析パイプラインによる出力ファイル一式 (Space Ranger 出力ファイル、DRAGEN 解析出力ファイル等)		
	3 納入期限 2027 年 6 月 30 日までに結果を・納品すること。		
	4 納品場所 横浜市立大学附属病院 次世代臨床研究センター		
	その他、本仕様書に定めのないことは、別途協議により決定する。		
部分払い	☒ しない ☐ する (回)		
特記事項			
別紙	☐ なし ☒ あり		
支 払 い	月末締め翌月 2 5 日支払い		

1. 委託内容

(1) 脳サンプルにおける①RNA-seq / ②PIP-seq / ③Visium HD WT

① RNA-seq

■ 実施検体数

マウス脳：27 検体

■ RNA 抽出および品質評価

委託者が提供するマウス脳組織から RNA を抽出する。抽出した RNA について、電気泳動装置を用いて RNA の品質を評価し、RNA Integrity Number (RIN) 値を確認する。また、Qubit Fluorometer などの蛍光測定法を用いて RNA 濃度を測定する。

■ ライブラリ作製

抽出した RNA の品質評価結果に基づき、解析に適した RNA シークエンス解析用ライブラリ作製キットを選定し、mRNA を対象とした RNA シークエンス解析用のライブラリを作製する。

作製したライブラリについて、電気泳動装置を用いてライブラリサイズおよび品質を確認する。また、Qubit Fluorometer などの蛍光測定法を用いてライブラリ濃度を測定し、シークエンス解析に適したライブラリであることを確認する。

■ シークエンシング

Illumina 社の synthesis-by-sequencing 技術を用いたシークエンサーである NovaSeq X plus または NextSeq2000 でライブラリの塩基配列を決定し、fastq ファイルを出力する。シークエンスデータは、本委託終了後、3ヶ月間保管する。

② PIP-seq

■ 実施検体数

マウス脳：18 検体

■ 裸核処理

委託者が提供するマウス凍結脳組織に対し、シングル核遺伝子発現解析に適した核懸濁液を調製するため、複数条件による核抽出のパイロット試験を実施する。得られた核懸濁液について、核数、核の状態、デブリス量等の品質評価を行い、解析に適した条件を選定する。選定した条件に基づき、本試験に用いる核懸濁液を調製する。

■ ライブラリ作製

裸核処理により調製した細胞核を用いて、Illumina Single Cell 3' RNA Prep T10 を使用し、シングル核遺伝子発現解析用のライブラリを作製する。作製するライブラリには、次世代シーケンサーによる解析に必要なアダプター配列およびサンプル識別用 Index 配列を付加する。

作製したライブラリについて、電気泳動装置を用いてライブラリサイズおよび品質を確認する。

また、Qubit Fluorometer などの蛍光測定法を用いてライブラリ濃度を測定し、シーケンス解析に適したライブラリであることを確認する。

■ シーケンシング

Illumina 社の synthesis-by-sequencing 技術を用いたシーケンサーである NovaSeq X plus または NextSeq2000 でライブラリの塩基配列を決定し、fastq ファイルを出力する。シーケンスデータは、本委託終了後、3ヶ月間保管する。

■ データ解析

得られた fastq ファイルに対し、Illumina 社が提供する DRAGEN Single Cell RNA 解析パイプライン等を用いて解析を実施する。得られた fastq ファイルに対し、Illumina 社が提供する DRAGEN Single Cell RNA 解析パイプライン等を用いて解析を実施する。遺伝子発現量の定量および品質評価に必要な出力ファイル（遺伝子発現マトリクス、細胞（核）情報ファイル、QC レポート等）を取得し、Seurat による下流解析に利用可能な入力データを作成する。

③ Visium HD WT

■ 実施検体数

マウス脳：2 スライド(4 Capture Areas)

■ 凍結切片作製および検体の品質評価

委託者より提供されたマウス凍結脳組織を用いて、クリオスタットにより品質評価用および解析用凍結切片を作製する。切片厚は、品質評価用および解析用ともに約10 μmとする。

解析用切片については、1つの解析エリア（6.5 mm四方）に2枚の切片を配置する（スライス1：海馬および視床下部、スライス2：前頭前野および脳梁）。

なお、規定した解析用切片の作製が困難な場合は、委託者と協議の上、切片作製内容を変更する。

品質評価用の凍結切片から RNA を抽出し、電気泳動装置を用いて RNA 品質評価を実施する。

RNA 品質評価では、RNA Integrity Number (RIN) 値および Distribution Value 200 (DV200：200 塩基以上の RNA 断片の割合) を測定し、解析に適した RNA 品質であることを確認する。

■ 解析用の HE 染色および画像取得

10x Genomics 社が提供する指定のプロトコルに従って、HE 染色を実施する。

HE 染色を実施した後、10x Genomics 社が提供する指定のプロトコルに従ってパーチャルスライドスキャナーを用いて高解像度の HE 染色画像の取得を行う。

■ ライブラリ作製

HE 染色後の切片を用いて、Visium HD Spatial Gene Expression Reagent Kits および Visium CytAssist を用いて、空間的遺伝子発現解析用ライブラリを作製する。

作製したライブラリについて、電気泳動装置を用いてライブラリサイズおよび品質を確認する。

また、Qubit Fluorometer などの蛍光測定法を用いてライブラリ濃度を測定し、シーケンス解析に適したライブラリであることを確認する。

ライブラリ作製中に生じた組織切片の軽微な剥がれについては、試薬販売元が補償を行う場合を除き、補償の対象外とする。

■ シークエンシング

Illumina 社の synthesis-by-sequencing 技術を用いたシーケンサーである NovaSeq X plus または NextSeq2000 でライブラリの塩基配列を決定し、fastq ファイルを出力する。シーケンスデータは、本委託終了後、3ヶ月間保管する。

■ データ解析

得られた fastq ファイルに対し、10x Genomics 社が提供する Space Ranger を用いてデータのプロセッシングを実行する。Space Ranger 出力ファイル一式を得る。

(2) 腸サンプルにおける④RNA-seq / ⑤PIP-seq / ⑥Visium HDWT

④ RNA-seq

- 実施検体数

マウス腸：54 検体

- RNA 抽出および品質評価

委託者が提供するマウス腸管組織からRNAを抽出する。抽出したRNAについて、電気泳動装置を用いてRNAの品質を評価し、RNA Integrity Number (RIN) 値を確認する。また、Qubit Fluorometer などの蛍光測定法を用いてRNA濃度を測定する。

- ライブラリ作製

抽出したRNAの品質評価結果に基づき、解析に適したRNAシーケンス解析用ライブラリ作製キットを選定し、mRNAを対象としたRNAシーケンス解析用のライブラリを作製する。

作製したライブラリについて、電気泳動装置を用いてライブラリサイズおよび品質を確認する。また、Qubit Fluorometer などの蛍光測定法を用いてライブラリ濃度を測定し、シーケンス解析に適したライブラリであることを確認する。

- シーケンシング

Illumina 社の synthesis-by-sequencing 技術を用いたシーケンサーである NovaSeq X plus または NextSeq2000でライブラリの塩基配列を決定し、fastq ファイルを出力する。シーケンスデータは、本委託終了後、3ヶ月間保管する。

⑤ PIP-seq

- 実施検体数

マウス腸：9 検体

- 裸核処理

委託者が提供するマウス凍結腸管組織に対し、シングル核遺伝子発現解析に適した核懸濁液を調製するため、複数条件による核抽出のパイロット試験を実施する。得られた核懸濁液について、核数、核の状態、デブリス量等の品質評価を行い、解析に適した条件を選定する。選定した条件に基づき、本試験に用いる核懸濁液を調製する。

- ライブラリ作製

裸核処理により調製した細胞核を用いて、Illumina Single Cell 3' RNA Prep T10 を使用し、シングル核遺伝子発現解析用のライブラリを作製する。作製するライブラリには、次世代シーケンサーによる解析に必要なアダプタ

ー配列およびサンプル識別用 Index 配列を付加する。

作製したライブラリについて、電気泳動装置を用いてライブラリサイズおよび品質を確認する。

また、Qubit Fluorometer などの蛍光測定法を用いてライブラリ濃度を測定し、シーケンス解析に適したライブラリであることを確認する。

■ シークエンシング

Illumina 社の synthesis-by-sequencing 技術を用いたシーケンサーである NovaSeq X plus または NextSeq2000 でライブラリの塩基配列を決定し、fastq ファイルを出力する。シーケンスデータは、本委託終了後、3ヶ月間保管する。

■ データ解析

得られた fastq ファイルに対し、Illumina 社が提供する DRAGEN Single Cell RNA 解析パイプライン等を用いて解析を実施する。得られた fastq ファイルに対し、Illumina 社が提供する DRAGEN Single Cell RNA 解析パイプライン等を用いて解析を実施する。遺伝子発現量の定量および品質評価に必要な出力ファイル（遺伝子発現マトリクス、細胞（核）情報ファイル、QC レポート等）を取得し、Seurat による下流解析に利用可能な入力データを作成する。

⑥ Visium HD WT

■ 実施検体数

マウス腸：2 スライド(4 Capture Areas)

■ 凍結切片作製および検体の品質評価

委託者より提供されたマウス腸管組織を用いて、解析用の凍結ブロックを作製する。

解析用の凍結ブロックは、クリオスタットにより品質評価用および解析用の凍結切片を作製する。

切片厚は、品質評価用および解析用ともに約10 μmとする。

品質評価用の凍結切片から RNA を抽出し、電気泳動装置を用いて RNA 品質評価を実施する。

RNA品質評価では、RNA Integrity Number (RIN) 値およびDistribution Value 200 (DV200 : 200塩基以上のRNA断片の割合) を測定し、解析に適したRNA品質であることを確認する。

■ 解析用の HE 染色および画像取得

10x Genomics 社が提供する指定のプロトコルに従って、HE 染色を実施する。

HE 染色を実施した後、10x Genomics 社が提供する指定のプロトコルに従ってバーチャルスライドスキャナーを用いて高解像度の HE 染色画像の取得を行う。

■ ライブラリ作製

HE 染色後の切片を用いて、Visium HD Spatial Gene Expression Reagent Kits および Visium CytAssist を用いて、空間的遺伝子発現解析用ライブラリを作製する。

作製したライブラリについて、電気泳動装置を用いてライブラリサイズおよび品質を確認する。

また、Qubit Fluorometer などの蛍光測定法を用いてライブラリ濃度を測定し、シーケンス解析に適したライブラリであることを確認する。

ラリであることを確認する。

ライブラリ作製中に生じた組織切片の軽微な剥がれについては、試薬販売元が補償を行う場合を除き、補償の対象外とする。

■ シークエンシング

Illumina 社の synthesis-by-sequencing 技術を用いたシーケンサーである NovaSeq X plus または NextSeq2000 でライブラリの塩基配列を決定し、fastq ファイルを出力する。シーケンスデータは、本委託終了後、3ヶ月間保管する。

■ データ解析

得られた fastq ファイルに対し、10x Genomics 社が提供する Space Ranger を用いてデータのプロセッシングを実行する。Space Ranger 出力ファイル一式を得る。

業務実施にあたり求める要件

① 設備の要件

- (ア) 病理染色を実施する事業所内において、6 枚以上のスライドガラスを同時に装填可能なスライドスキャナーを保有していること、または同等の撮像能力を有する体制を整備していること。
- (イ) 10x Genomics 社の認証サービスプロバイダー（10x Genomics Certified Service Provide）であり、トラブル発生時には、使用機器や試薬の供給元である 10xGenomics 社の正規のサポートが可能であること。
- (ウ) トラブル時の迅速な対応を可能とするために、日本国内の同一事業所内に 10x Genomics 社の CytAssist が 2 台以上設置されていること。
- (エ) トラブル時の迅速な対応を可能とするために、日本国内の同一事業所内に Illumina 社の NovaSeq X plus または NextSeq2000 のいずれか有すること。

② 業務従事者の要件

- (ア) 複数のマウス臓器を対象としたシングル核遺伝子発現解析および空間トランスクリプトーム解析について、受託者として各臓器の特性に応じた実験設計および条件最適化を実施できる体制を有し、当該分野において十分な実績および経験を有していること。
- (イ) 切片作製、染色等の病理切片の取り扱いにおいて、5 年以上の実務経験を有し、かつ空間的遺伝子発現解析のための切片作製について相当数の実績（目安として 1,000 枚以上）を有する人員が HE 染色及びライブラリ作製を担当すること。
- (ウ) 病理専門医および分子病理医の資格を有した人員が在籍し、必要に応じて病理技術者を支援できる体制を有していること。
- (エ) 10x Genomics 社製キットを用い空間遺伝子発現解析用ライブラリの作製について、安定した操作を担保する十分な経験（目安として 100 回以上の実施経験）を有する人員が実験を担当すること。
- (オ) 前号の作業において、迅速かつ正確な作業を行うため、前号の条件を満たす人員が 2 名で実験を実施する体制を有すること。
- (カ) 次世代シーケンサーから出力されるデータの解析を実施するために、コマンドラインによるデータ解析を実施できる人員が 2 名以上在籍していること。
- (キ) 日本国内に設置された Illumina 社製シーケンサーの操作経験を有する人員が 2 名以上在籍し、本委託業務におけるシーケンシング工程を実施可能な体制を有していること。
- (ク) 医学的知見を要する問い合わせに対応できるよう、医師免許の資格を有する人員が在籍していること。
- (ケ) 当該業務を滞りなく遂行するために本委託業務を統括する責任者は以下の要件を満たすこと。
 - ①博士号または同等の研究実績を有すること。
 - ②ゲノミクス領域における査読付き学術論文の著者経験を有すること。
 - ③日本語でのサポートが可能であること。