

# 仕 様 書

## 1 件名

全ゲノムシーケンス解析（ロングリード）業務委託

## 2 解析の目的

エクソーム解析を用いてもその原因が解明されない未診断症例に対して、エクソン以外の領域も含む全ゲノムを対象としたシーケンス解析を行い、その原因を潜在する複雑な構造異常も含め明らかにする。

## 3 解析等委託項目

（別表1）のとおり

## 4 発注及び納品場所

神奈川県立こども医療センター臨床研究所ゲノム解析研究部門（管理棟2階組織培養実験室）

## 5 契約期間

契約日から令和4年3月31日まで

## 6 技術的要件

（別表2）のとおり

## 7 その他の要件

- 7-1 受注者は、3（別表1）に掲げる項目のすべてを受注可能であること。
- 7-2 受注者は、臨床検体を用いたヒトゲノムライブラリー作製が過去3年間のうち年間100件以上を有する等豊富な経験を有すること。
- 7-3 受注者は、ヒトの疾患を対象とするゲノム解析で国立研究開発法人など公的機関からの受託実績を有し、解析結果の質問に対する対応・説明することができること。
- 7-4 解析は、輸送時の供与物の品質劣化を抑えるため、日本国内で実施すること。
- 7-5 「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」第5章第12条9（海外にある者へ資料・情報を提出する場合の取扱い）に基づき、解析データは日本国内のみで保持されること。
- 7-6 本委託業務により作成された資料・データ等は、すべて発注者に帰属する。
- 7-7 本仕様書に定めのない事項及び疑義については、双方協議の上で定めるものとする。

(別表1) 解析等委託項目 (全ゲノムシーケンス解析 (ロングリード))

	解析等委託項目名	内容 データ量 / 発送単位	予定数量(件)
1	全ゲノムシーケンス解析 (ロングリード) (ライブ ラリ調整含む)	90G	5
2	データ解析 (ヒトゲノム構造変異解析)		5
3	解析報告書 (PDF、CD-R 料を含む)		5
4	データ納品料 (USB3HDD に保存、納品のこと)		5
5	解析残余検体の返送	3 検体につき 1 回返送	2
6	解析サービス	解析の内容に関して協議が必 要な場合は、ヒトの疾患を対 象とした遺伝学やバイオイン フォマティクスの知見がある 解析担当者もしくは技術者が 来所 (WEB 会議も可) して協 議を行うこと	5
6-1	解析結果報告会議の開催		
6-2	遺伝子解析の解析サポート		
7	6 によりカスタマイズ解析に対応すること		5

※ 検体発送は発注者の負担とする。

(別表2) 全ゲノムシーケンス解析 (ロングリード) に係る技術的要件

使用機種	PromethION (英 Oxford Nanopore Technologies 社)
機器の原理	ナノポアシーケンシング技術を用い、数十から 100kb におよぶゲノム構造異常の検出が可能となるように、最大 1Mb にもおよぶロングリードシーケンスが行えること。
解析の種類	全ゲノムシーケンス (ライブラリー調整含む)
対象生物	ヒト
データ量	90Gb
リード長	最大 1MB (サンプル品質に依存)
ライブラリ作成	Ligation Sequencing Kit for PromethION
シーケンス方法	1 フローセルシーケンス
データ解析	構造変異解析
解析の詳細	<p>(1) 全ゲノムシーケンス (ロングリード)</p> <p>1) クオリティーチェック</p> <p>下記項目について、提供する gDNA の品質確認を行うこと。</p> <p>(1-1) 必要に応じて、EDTA及び低分子を取り除くためのAmPure精製を実施する。</p> <p>(1-2) Qubitを用いたDNA濃度測定</p> <p>(1-3) Nanodropによる吸光度測定</p> <p>(1-4) アガロースゲル電気泳動により、30kb以上にメインバンドがあり、分解が少ないことを確認する。</p> <p>2) 解析準備作業</p> <p>Ligation Sequencing Kit for PromethIONを用いて、ライブラリー調製を行うこと。</p> <p>(2-1) 品質確認の結果に基づき、必要に応じてDNA断片化を実施した後、DNAのダメージ修復、末端修復、およびdA付加を行う。</p> <p>(2-2) AMPureXPビーズを用いて、DNAの精製処理を行う。</p> <p>(2-3) アダプターライゲーションおよびクリーンアップ処理を行う。</p> <p>3) シーケンス</p> <p>ライブラリーをフローセル上にローディング後、解析用機器PromethION及び、Ligation Sequencing Kit for PromethION 付属のFlow Cell Priming Kitを用いて、1セル分のシーケンシングランを行い、解析データを取得すること。</p> <p>(3-1) フローセルをPromethIONに設置し、ライブラリーをフローセルに添加する。</p> <p>(3-2) 装置付属のコントロールソフトウェアを用いてシーケンシングランを実施する。</p> <p>(3-3) 装置付属のベースコールソフトウェアを用いてベースコールを実施し、FASTQファイルを生成する。</p>

	<p>4) データ解析</p> <p>3)で得られた配列データについて FASTQ ファイルを用いて、以下の解析を行う。</p> <p>(4-1) アダプター配列のトリミングと低品質リードのフィルタリングを行う。</p> <p>(4-2) 得られたクリーンリード配列について、ヒト参照ゲノム配列上へのマッピングを行い、マッピング結果を BAM ファイルに格納する。</p> <p>(4-3) 参照ゲノム配列にマップされたリード群について、参照ゲノム配列上の複数領域にまたがってマップされるキメリックリードを抽出し、これをもとに検体のゲノム配列内に存在する大きな挿入、欠失、および、逆位、転座といったゲノム構造変異を検出する。</p> <p>(4-4) 得られた構造異常について、参照ゲノムの遺伝子アノテーション情報をもとに、遺伝子産物配列に与える影響をアノテーションし、結果を VCF ファイルおよび Excel ファイルに出力する。</p>
納期	依頼日より 2 か月程度（解析終了次第、速やかに納品に応じること）
納品物	<p>(1) 次世代シーケンス解析結果生データ（FASTQ ファイルおよび FAST5 ファイル）</p> <p>(2) 次世代シーケンス解析結果の報告書（PDF ファイル）</p> <p>(3) マッピング解析結果（BAM ファイル）</p> <p>(4) 構造変異解析結果（VCF ファイルおよび Excel ファイル）</p> <p>※ 解析データには暗号化処理又はこれと同等以上の保護措置を取り納品すること</p> <p>※ 上記はいずれも、コピーデータを納品日より 3 ヶ月間解析機関にて保管すること</p> <p>※ 保管期間後、コピーデータは確実な方法で消去し、「廃棄・消去に関する証明書」を提出すること</p>
解析残余検体の返送	受注者は、上記解析に用いた残余検体を発注者に返送する。