

セッション4:リキッドバイオプシー技術のもたらす未来と展望

リキッドバイオプシーを臨床検査として 活用するために

Application of Liquid Biopsy to Clinical Laboratory Testing

浜松医科大学・臨床検査医学 前川真人

Masato Maekawa, Dept. Laboratory Medicine,

Hamamatsu University School of Medicine



組織生検と液体生検(LB)の比較

	組織生検	リキッドバイオプシー
利点	病理診断が可能(がんの性状、組織型、病期など) 細胞生物学的、分子生物学的解析が可能 日常診療に使われている	低侵襲 or 無侵襲 繰り返し検査が可能 その時点での状態がわかる 分子的多様性が見える
欠点	運用面での手技の難しさ 侵襲性(繰り返しは困難) 合併症 試料の量・質 失敗率(がん細胞を外す) 分子的多様性を掴みにくい	手技の難しさ 高コスト 検出感度 試料の量・質 失敗率(微量のため) 研究段階(発展途上)

臨床検査

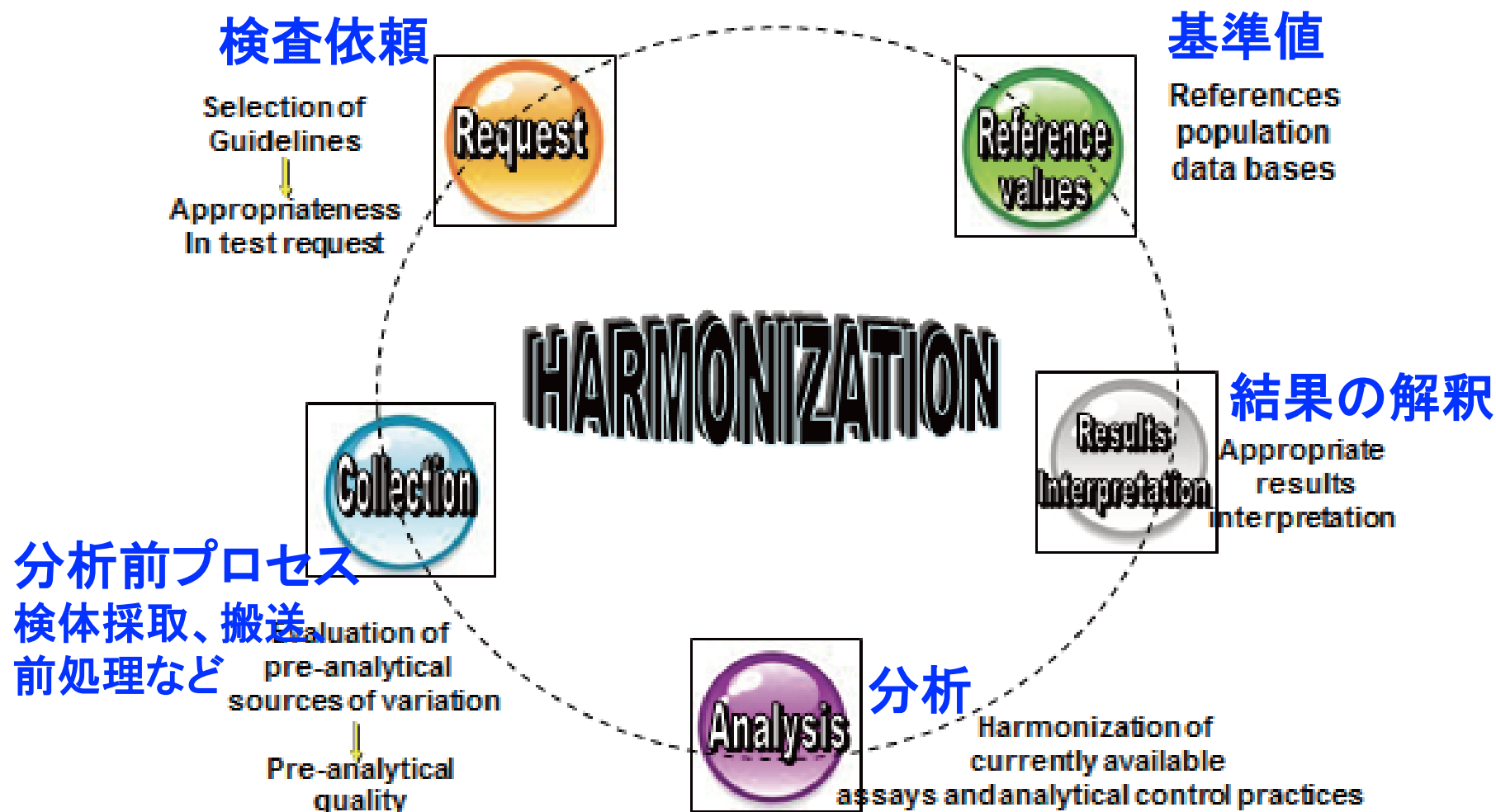
- 病態の診断

- 全身状態、肝臓の機能、腎臓の機能、貧血、炎症など
- どこが、どのように障害されているのか、複数項目の組合せで判断する
- 従来までの臨床検査

- 疾患の診断

- ピンポイントでどこが悪いのかを絞り込む
- Xという疾患が疑われる
- 新しいタイプの疾患バイオマーカー

Laboratory total testing procedure that enables harmonisation



測定値の変動要因

1. 分析前プロセス
2. 分析プロセス
3. 分析後プロセス

測定値は分析機や試薬など、分析のみによって変動するわけではなく、分析前工程や分析後工程も大切である。特に、分析前工程の影響が強い。すなわち、検体をいつ、どこで、どのように採取したか、また採取後の試料をどのように扱ったか（保存、搬送、前処理など）が、測定値に影響を及ぼす。

分析前プロセスでエラーが頻発

- Preanalytical errors still account for nearly **60%–70%** of all mistakes occurring in laboratory diagnostics, most of them attributable to mishandling during collection, handling and preparing the specimens for testing.

分析前プロセス	68.2%	→	61.9%
分析プロセス	13.3%	→	15.0%
分析後プロセス	18.5%	→	23.1%
(Plebaniら. Clin Chem 1997		→	CC 2007)

errors

Missing sample and/or test request

Wrong/missing identification

In vitro haemolysis

4. Undue clotting

5. Wrong container

6. Contamination from infusion route

7. Insufficient sample

8. Inappropriate blood to anticoagulant ratio

9. Insufficient mixing of the sample

10. Inappropriate transport and storage conditions

11. Inappropriate centrifugation conditions

適正検査条件

- 薬物の使用状況を含めた患者の環境の検索
- 生理的変動、日内変動を考慮
 - 薬物による検査値への干渉
 - 食事の検査値への影響
 - 運動、喫煙、飲酒、その他
 - 生理的変動(日内変動、季節間変動)
 - 年齢、性差
 - 体位、姿勢

採取条件を厳密にすることによって個人の変動幅は小さくなり、異常を鋭敏に認識できる。

臨床検査値の変動要因

1. 生理的変動要因（個体内、個体間）
2. 検体採取方法・処理方法
3. 患者の病態（状態）
4. 測定（分析の不確かさ、測定方法）

1. 生理的変動要因

- ・ 性・年齢
- ・ 生活習慣
- ・ 日内変動
 - 血清鉄は午前中高く、夕方に低い。ドラマティックに変動
 - 無機リンは朝低く、夕方から 1 mg/dl 程度上昇
- ・ 日差変動、季節間変動、性周期
- ・ 食事： 血糖、TG、インスリン、他
- ・ 運動： 骨格筋の傷害、WBCなど
- ・ 体位による違い：（5～10%）
 - 血管内から血管外へ水分移動
 - 高分子成分は立位＞座位＞臥位

臨床検査値の生理的変動

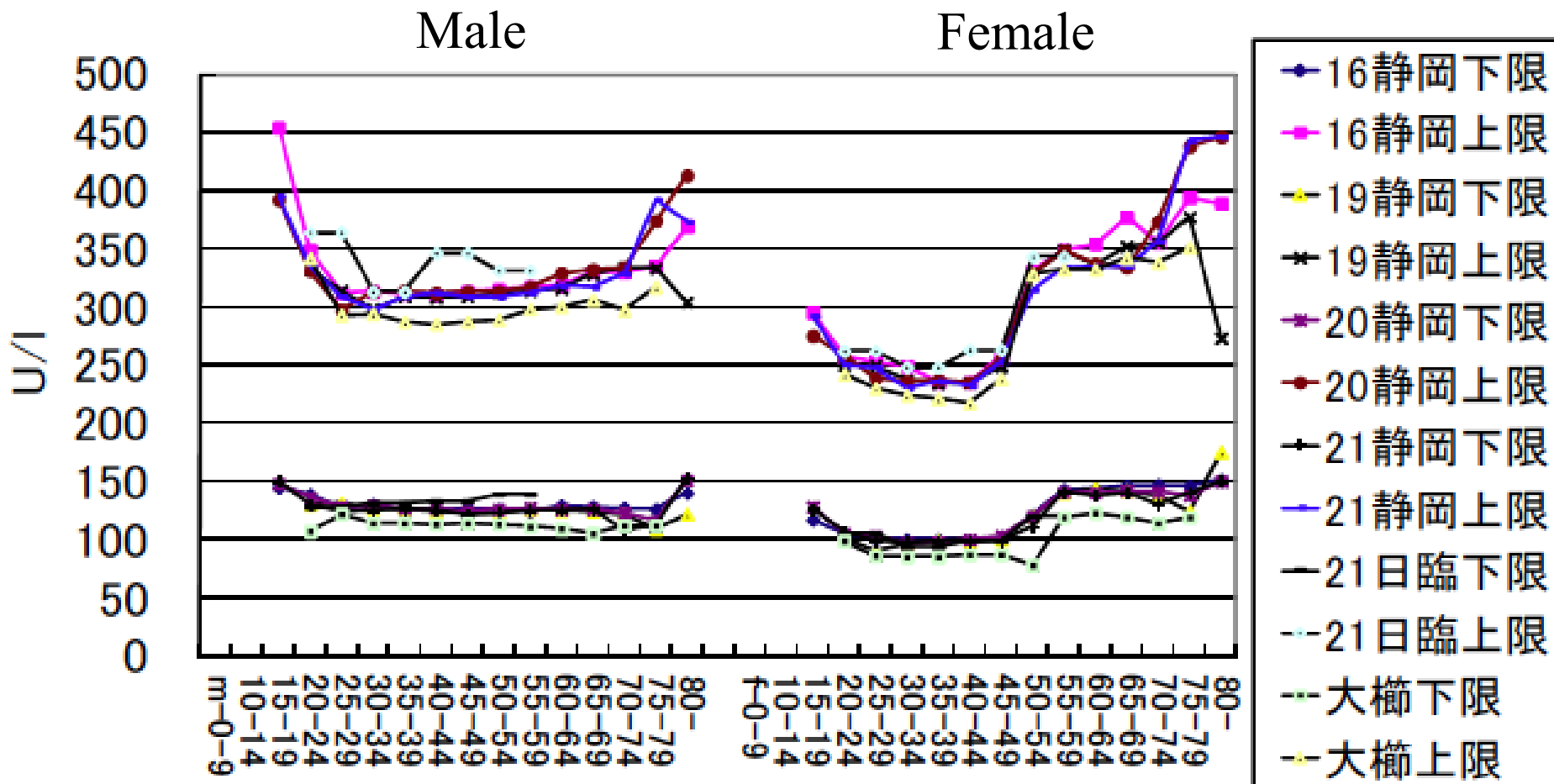
種類	変動要因	変動検査項目(例)
個体間変動	性別	男>女：ヘモグロビン, ヘマトクリット, 赤血球数, 尿素窒素, クレアチニン, 尿酸, CK, 中性脂肪, 血清鉄 女>男：赤沈, LH, FSH, HDL コレステロール
	年齢	幼児>成人：コリンエステラーゼ, AST, ALT, LD, CK, γ -GT, 無機リン, ビリルビン, 末梢血白血球リンパ球比率 小児<成人：総蛋白, アルブミン, 免疫グロブリン, アミラーゼ, 総コレステロール, 尿素窒素, 総カルシウム, 白血球数 思春期高値：ALP 閉経後高値(女性)：総コレステロール, 中性脂肪
	生活環境 生活習慣	高脂肪食：総コレステロール, LDL-コレステロール, 中性脂肪 高蛋白食：尿素窒素, アルブミン, アミノ酸 核・核酸を含む食事：尿酸 飲酒により高値： γ -GT, 中性脂肪, AST(>ALT), 尿酸 喫煙により高値：白血球数, CRP, フィブリノーゲン, CEA 喫煙により低値：HDL-コレステロール 高地居住により高値：ヘモグロビン
	血液型	B, O型>A, AB型：ALP(小腸型ALP) Le(a-b-)で低値：CA19-9
	その他	遺伝的個体差, 人種差, 職業など
個体内変動	日内変動	朝>夜：ACTH, コルチゾール, 血清鉄 昼>夜：総蛋白, 尿酸, カリウム 夜>昼：尿素窒素, アミラーゼ
	日差変動	大きいもの：中性脂肪, ビリルビン, 血清鉄
	食事	食後>空腹時：血糖, 中性脂肪, インスリン, 血清鉄, ALP 高蛋白食；アミノ酸, アンモニア, レチノール結合蛋白, トランスサイレチン 空腹時>食後：遊離脂肪酸, 無機リン
	運動	運動後>運動前：CK, AST, LD, ミオグロビン, 遊離脂肪酸, 血糖, クレアチニン, 乳酸, 白血球数
	体位	立位>臥位：総蛋白, アルブミン, レニン, アルドステロン, ノルエピネフリン, エピネフリン, その他高分子成分 臥位>立位：心房性ナトリウム尿ペプチド
	妊娠	上昇：ALP(胎盤型), 凝固因子, 甲状腺ホルモン, 脂質, 銅, セルロプラスミン, 赤沈, フィブリノゲン, CRP 低下：総蛋白, アルブミン, ヘモグロビン, 赤血球数, 血清鉄, フェリチン
	その他	性周期, 季節差

個人の健常値

皆が同じ基準値との比較
でよいわけではない

個別のデータ管理

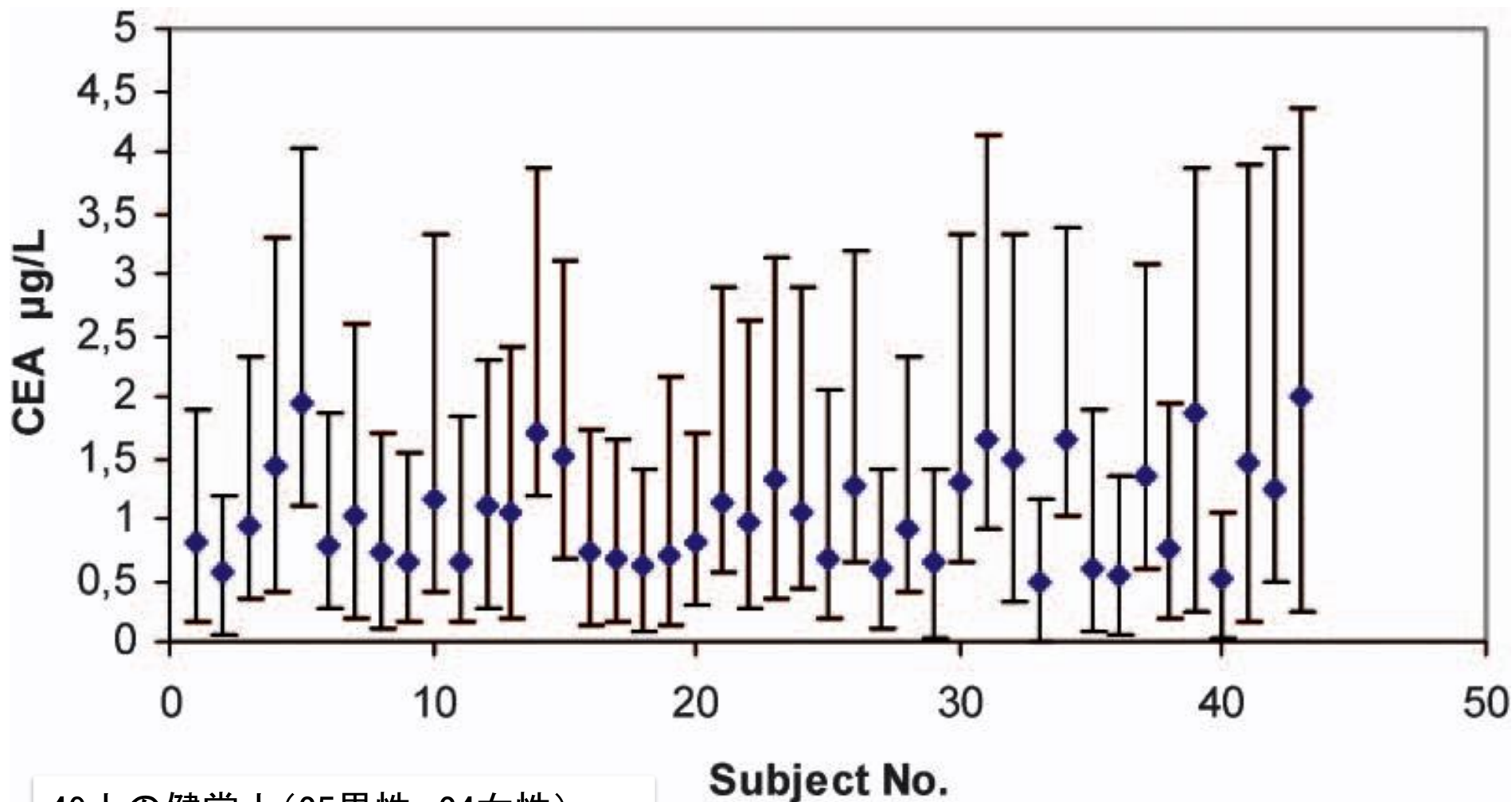
Alkaline Phosphatase (ALP) の基準範囲



Example of the Biological Variation (BV)

検査項目	個体内変動 Within-subject BV	個体間変動 Between-subject BV	個体性指数 Reference change value
AFP	12.2	45.6	0.27
CA19-9	16.0	130.5	0.12
CEA	12.7	55.6	0.23
CA15-3	6.1	62.9	0.10
CA125	24.7	54.6	0.45
ALP	6.45	26.1	0.25
TC	5.95	15.3	0.39
Na	0.6	0.7	0.86

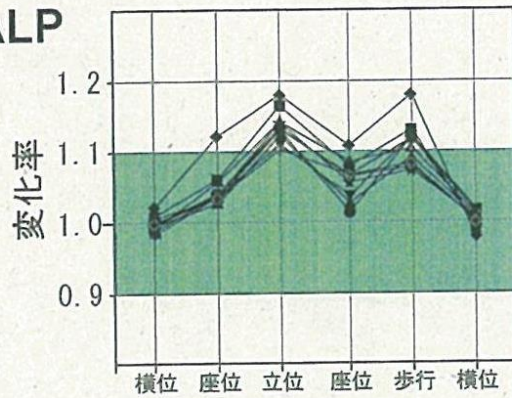
CEA の変動 (メジアン、最大値—最小値)



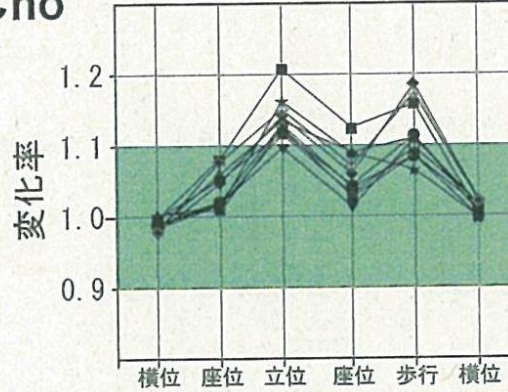
49人の健常人 (25男性、24女性)
2週間間隔で4回採血
アーキテクトで測定

体位による臨床検査値の変動

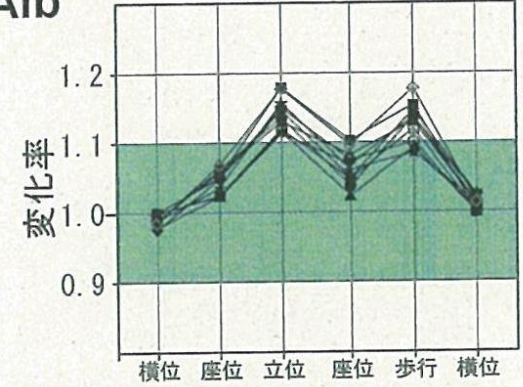
ALP



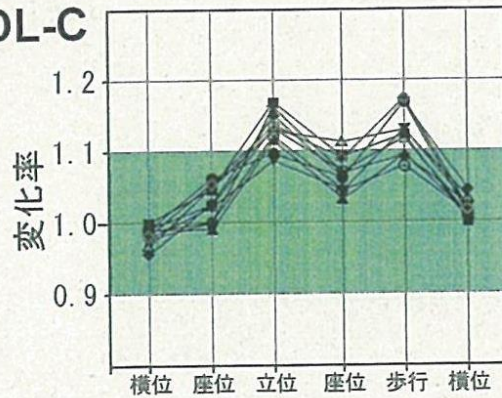
TCho



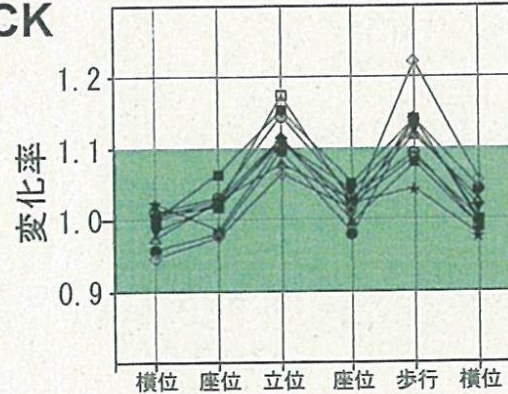
Alb



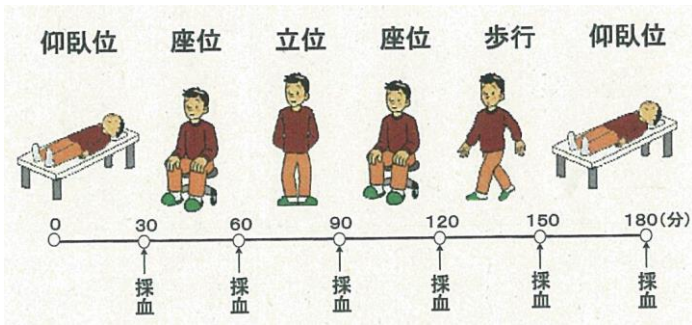
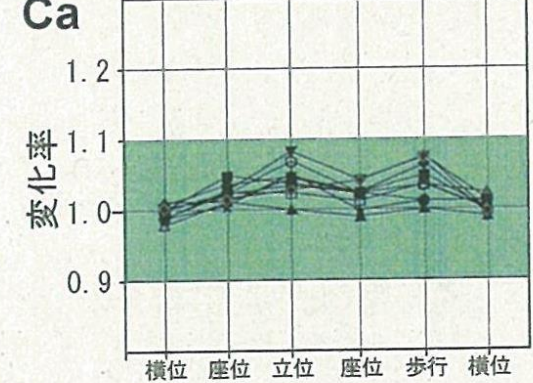
HDL-C



CK



Ca



2. 検体採取方法・処理方法

- ・ 検体の種別
 - 血液: 全血、血漿、血清
 - 血球由来の影響(溶血、白血球、血小板)、抗凝固剤
 - その他の体液
- ・ 測定対象の安定性
- ・ 点滴、輸血、薬剤などの影響
- ・ 組織液の混入

- ・ 患者の認識
- ・ 検体の搬送
- ・ 検体の前処理(血漿、血清の調製など)
- ・ 検体の保管、保存

溶血 (Hemolysis)

- 赤血球が壊れて、細胞内成分が血漿や血清に遊出
- 血漿・血清よりも赤血球中に多い成分の影響が強い

Degree of hemolysis

検査項目	赤血球／血漿
LD	160
K	23
AST	20



輸液中の四肢 からの採血

日本医療機能評価機構
医療安全情報

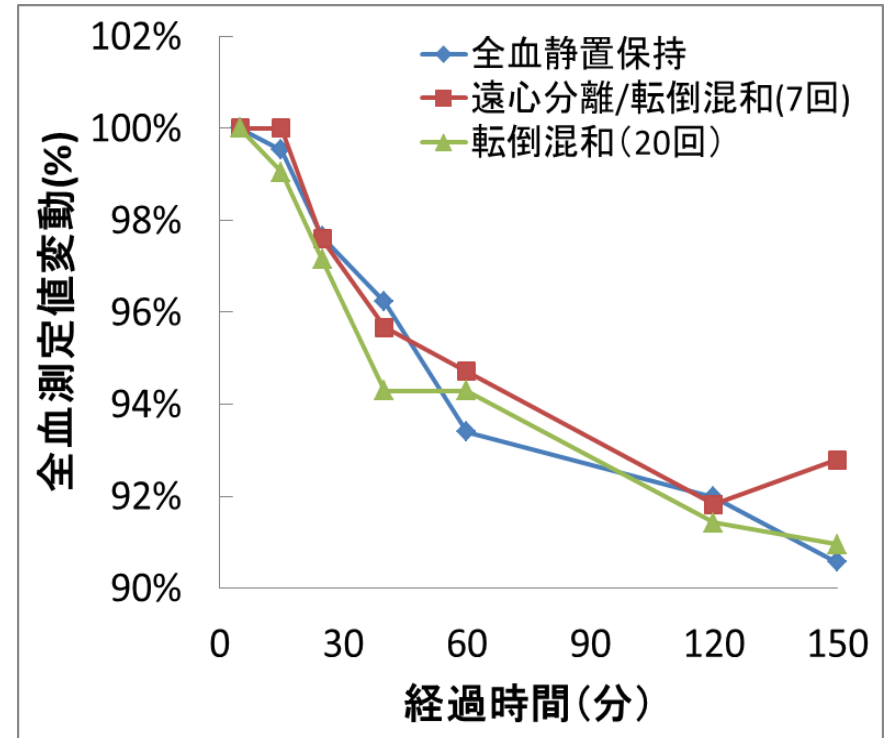
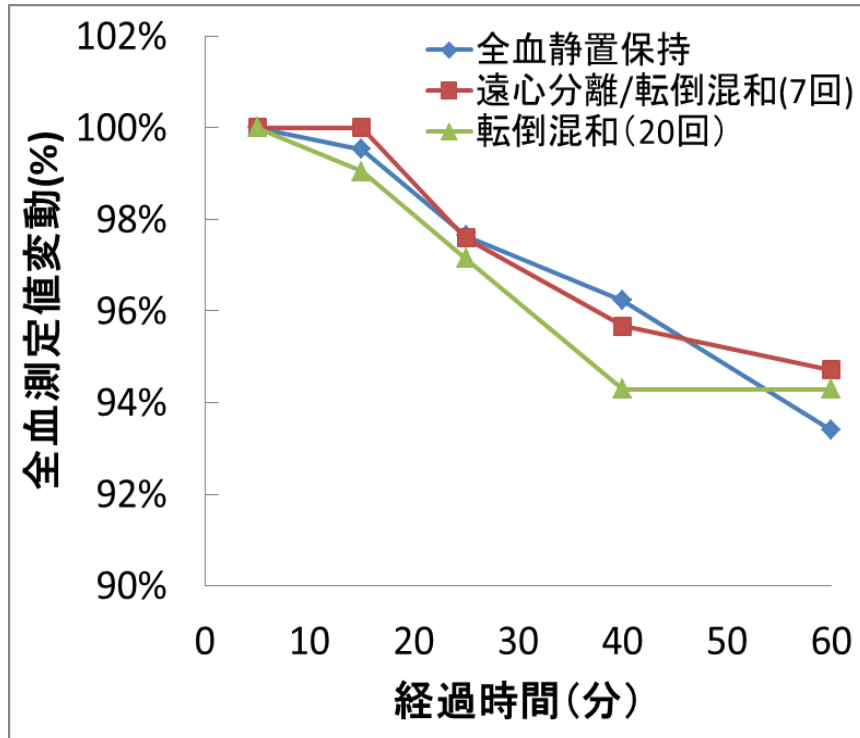
No.126 2017年5月

採血部位	検査結果	指示 または 実施した 治療	背景
左上肢	血糖値 656mg/dL	ヒューマリンR 10単位 投与	・乳がん術後で「右上肢での採血・血圧測定は禁止」の表示がベッドの頭元にあった
記載なし	血糖値 上昇	過剰な インスリン 療法	・採血することに集中し、輸液中であることを認識していなかった
右上肢	ナトリウム 110mEq/L カリウム 7.8mEq/L	カルチコール 投与 ・ GI療法	・左上肢にPICCカテーテルを留置していた ・輸液中の四肢で採血すると検査結果に影響を及ぼすことを知らなかった

事例が発生した医療機関の取り組み

- ・輸液中の四肢から採血を行うと、検査値に影響する可能性があることを院内に周知する。
- ・検査結果が異常値の場合、患者の状態をアセスメントして治療の必要性を判断する。

採血後の血糖値の変化：解糖の影響

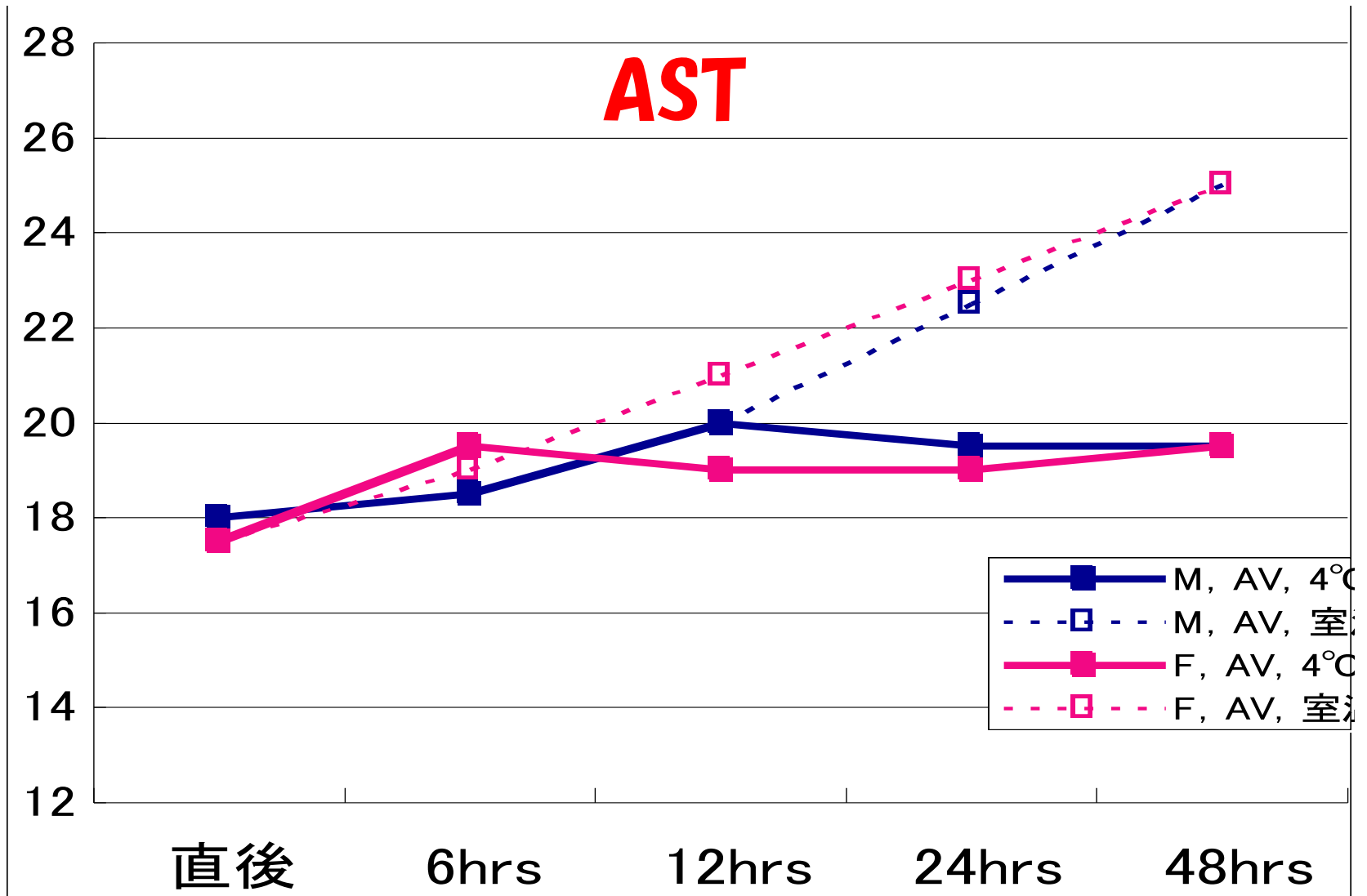


全血静置保持：全血のまま静置

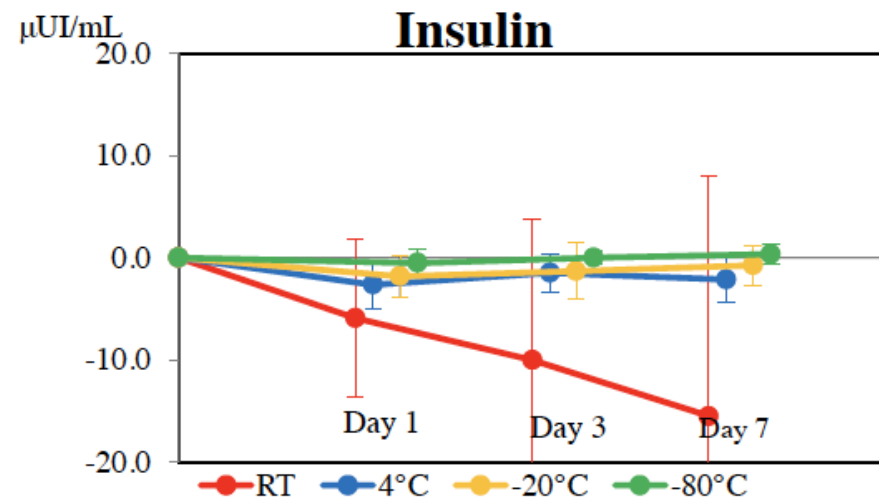
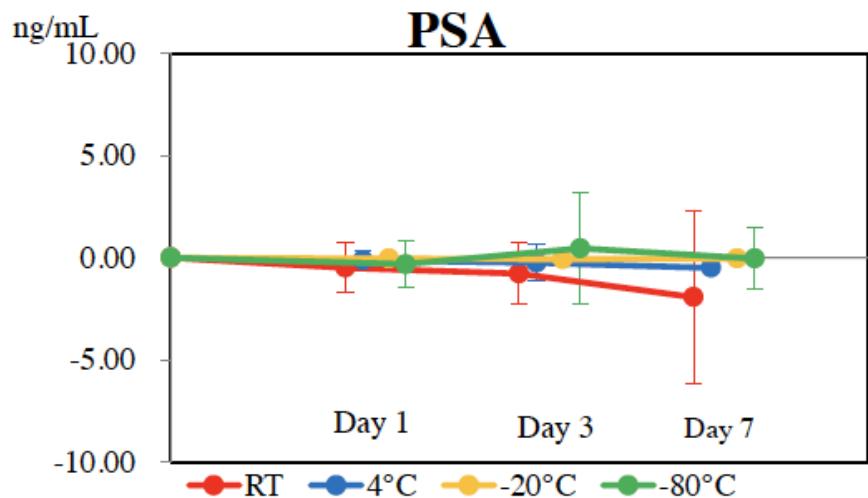
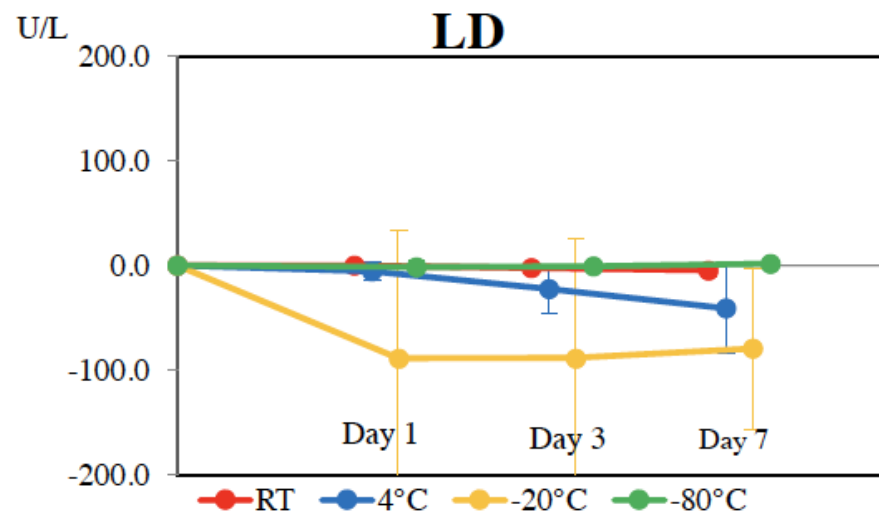
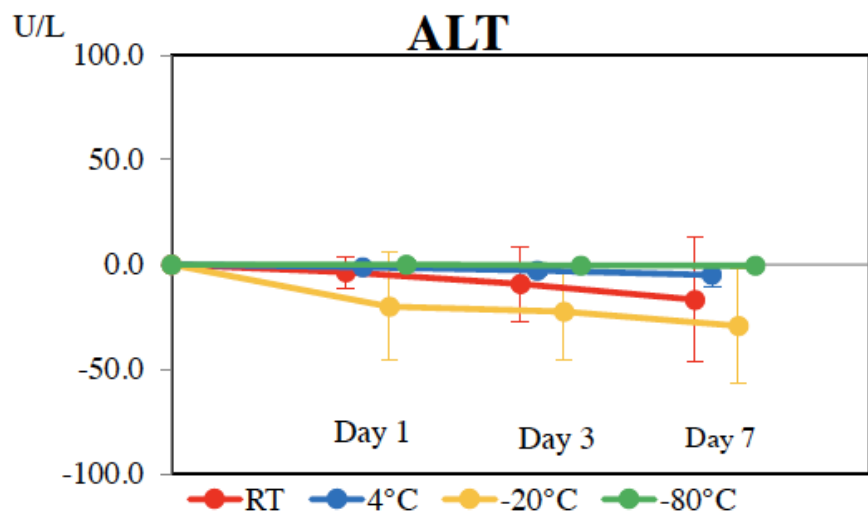
遠心分離/転倒混和(7回)：測定後、遠心分離/転倒混和し、次の測定まで放置

転倒混和(20回)：測定後転倒混和し、次の測定まで放置

採血から遠心分離までの時間の影響 (4°C、室温)



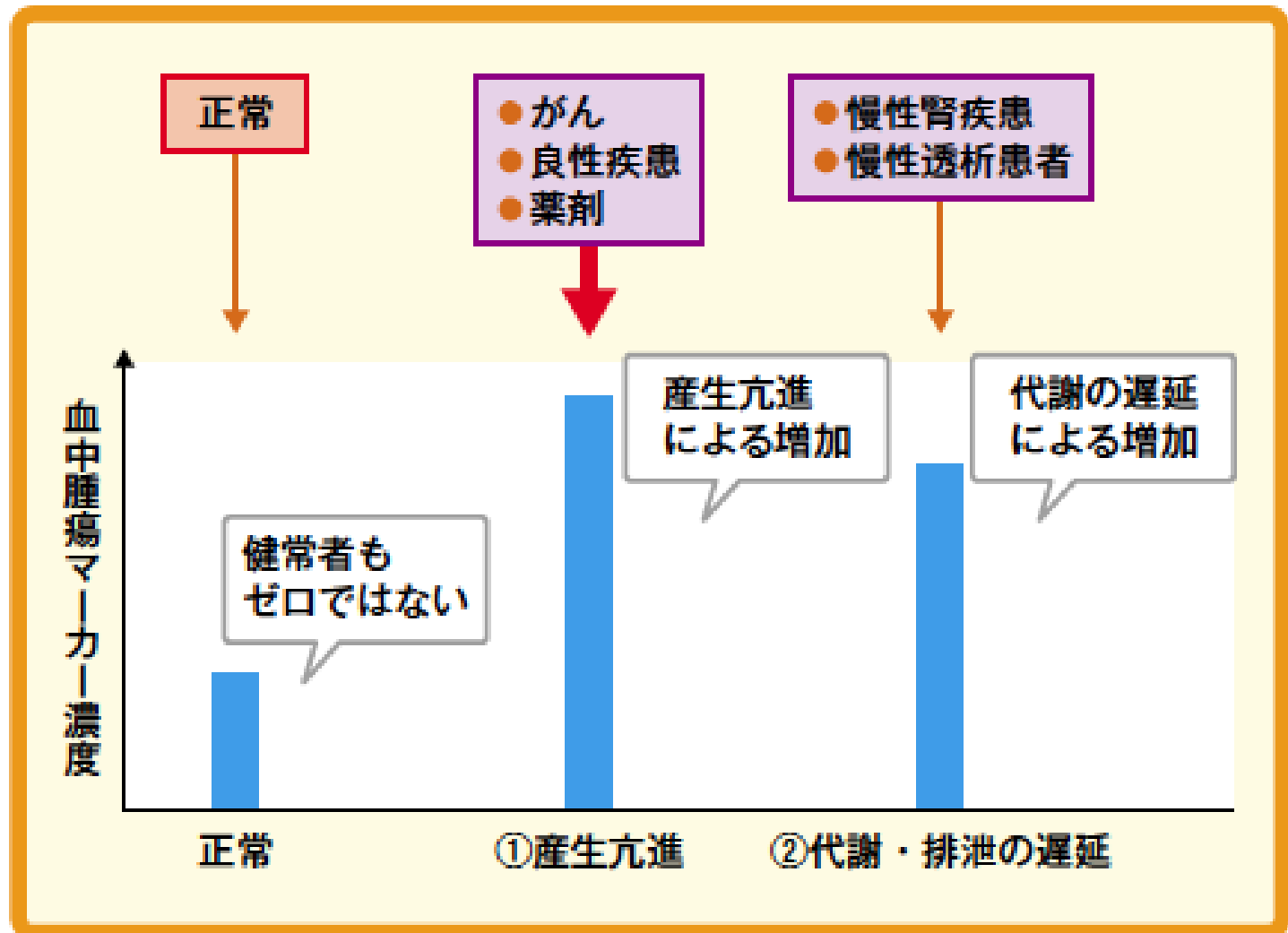
検体の保存温度による安定性



3. 患者の病態による変動要因

- ・ 脱水・希釈による検査値の変動
 - 栄養状態が悪い患者は水分も不足（脱水状態）であることが多い → Albは予想より高値
- ・ 同化（合成）と異化（代謝・分解）、摂取と漏出（喪失）のバランス
 - Albは肝臓での合成障害、腎臓・消化管・皮膚からの喪失でも低下

腫瘍マーカー上昇の想定メカニズム



透析患者における腫瘍マーカーの判断基準

項目	分子量	一般的なカットオフ値の適応	カットオフ値の修正が必要	適応
CEA	18万	×	○ 2倍程度	大腸癌, 胃癌, 肺癌, 乳癌
CA19-9	300万以上 (癌)	×	○ 2倍程度	膵癌, 大腸癌
AFP	6.5万	○	×	肝細胞癌, 胚細胞腫
PIVKA2	7万	×	△?	肝細胞癌
CA125	10~40万	○	×	卵巣癌, 子宮頸癌
SCC	4.6万	×	○ 2.5~3倍	子宮頸癌, 肺癌
CYFRA	4万	×	○	肺扁平上皮癌
TPA	2.3万	×	○ 4倍程度	臓器特異性低い
PSA	3.4万	○	×	前立腺癌
NSE	5万	×	○	肺小細胞癌
ProGRP	1万	×	○ 2~3倍	肺小細胞癌
CA15-3	9万	○	×	乳癌

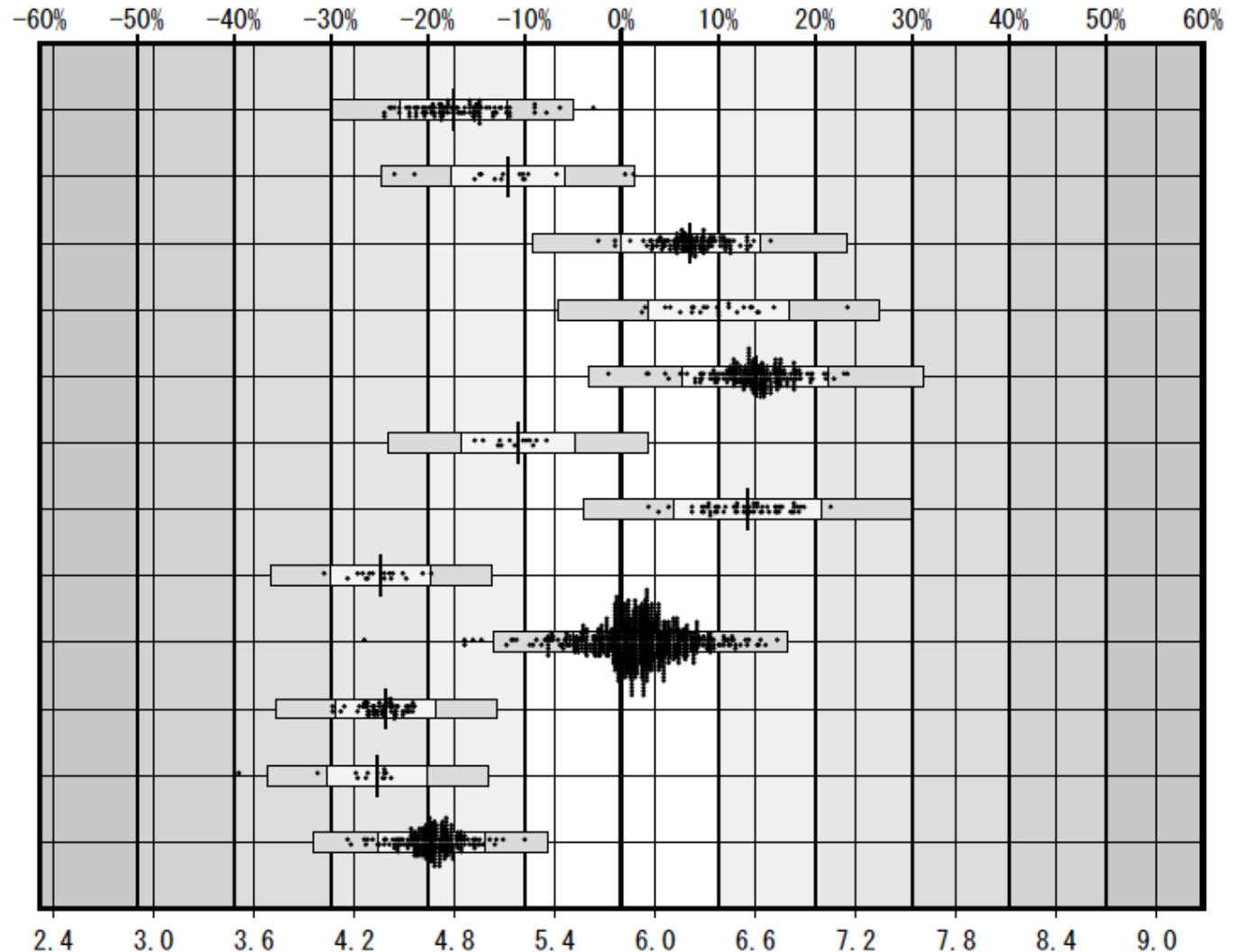
4. 測定方法

イムノアッセイの測定条件（抗体、標識の種類・方法、測定時間、標準物質など）によって、データが異なり、測定キットによってカットオフ値が異なる。

- ・ 日本医師会精度管理調査 他
- ・ マトリクス効果

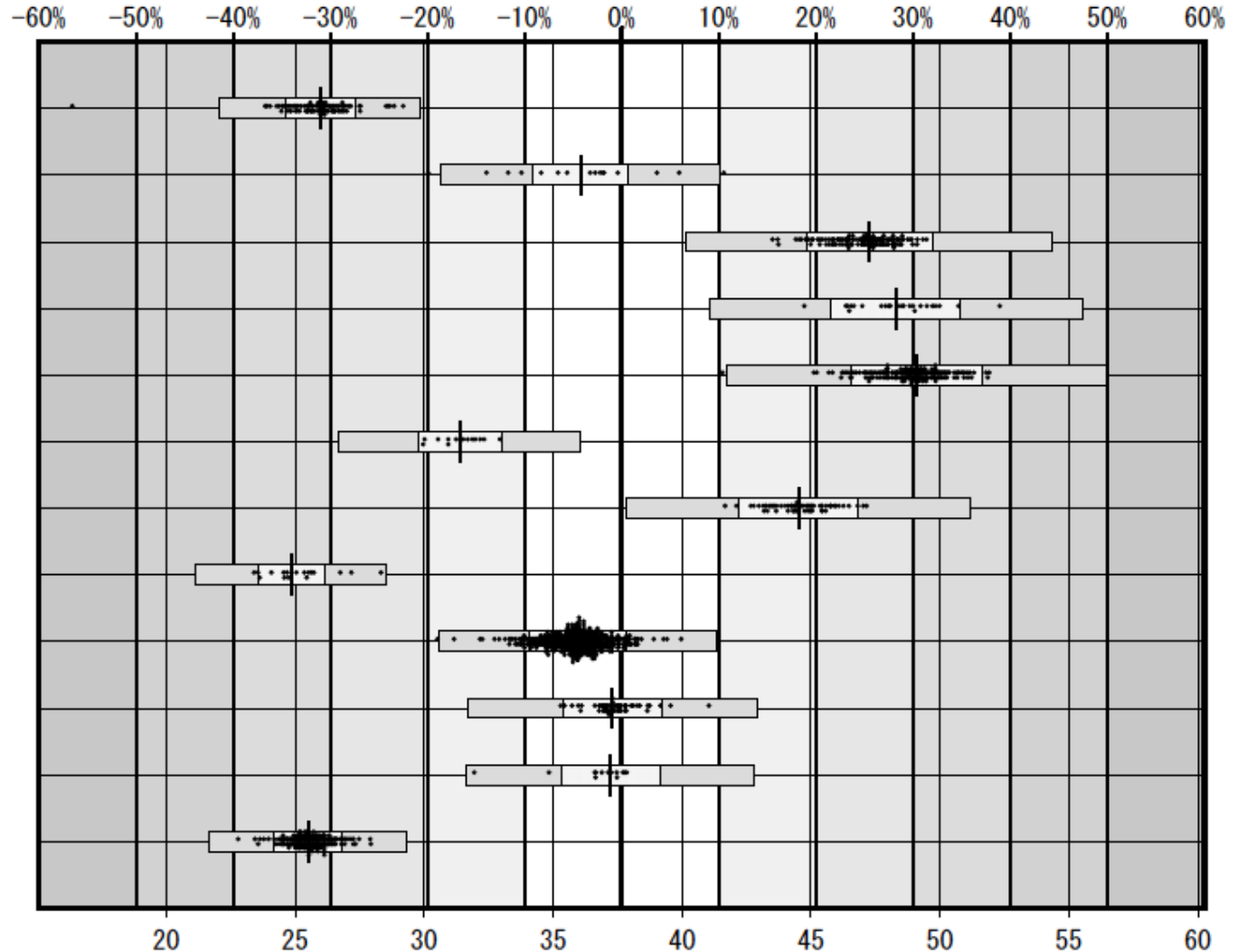
CEAの測定法別測定結果

方法間CV= 14.07% (0.82) 方法内CV= 3.50% (0.20) 共通CV= 3.37% (3.79%) 評価用CV= 7.50% (コンセンサスCV) 総平均 5.797



CEAの測定法別測定結果

方法間CV= 23.88%(8.99) 方法内CV= 2.80%(1.03) 共通CV= 2.59%(2.61%) 評価用CV= 7.50%(コンセンサスCV) 総平均 37.653



CEAの測定系

CEAにほぼ特化した測定系	NCA-2も測定する系
ルミパルス（富士レビオ）	アーキテクト（アボット）
Centaur（シーメンス）	エクルーシス（ロシュ）
UniCel, Access（ベックマン・コールター）	AIA（東ソー）
スフィアライト（和光純薬）	HISCL（シスメックス）
	ビトロス（オーソCD）

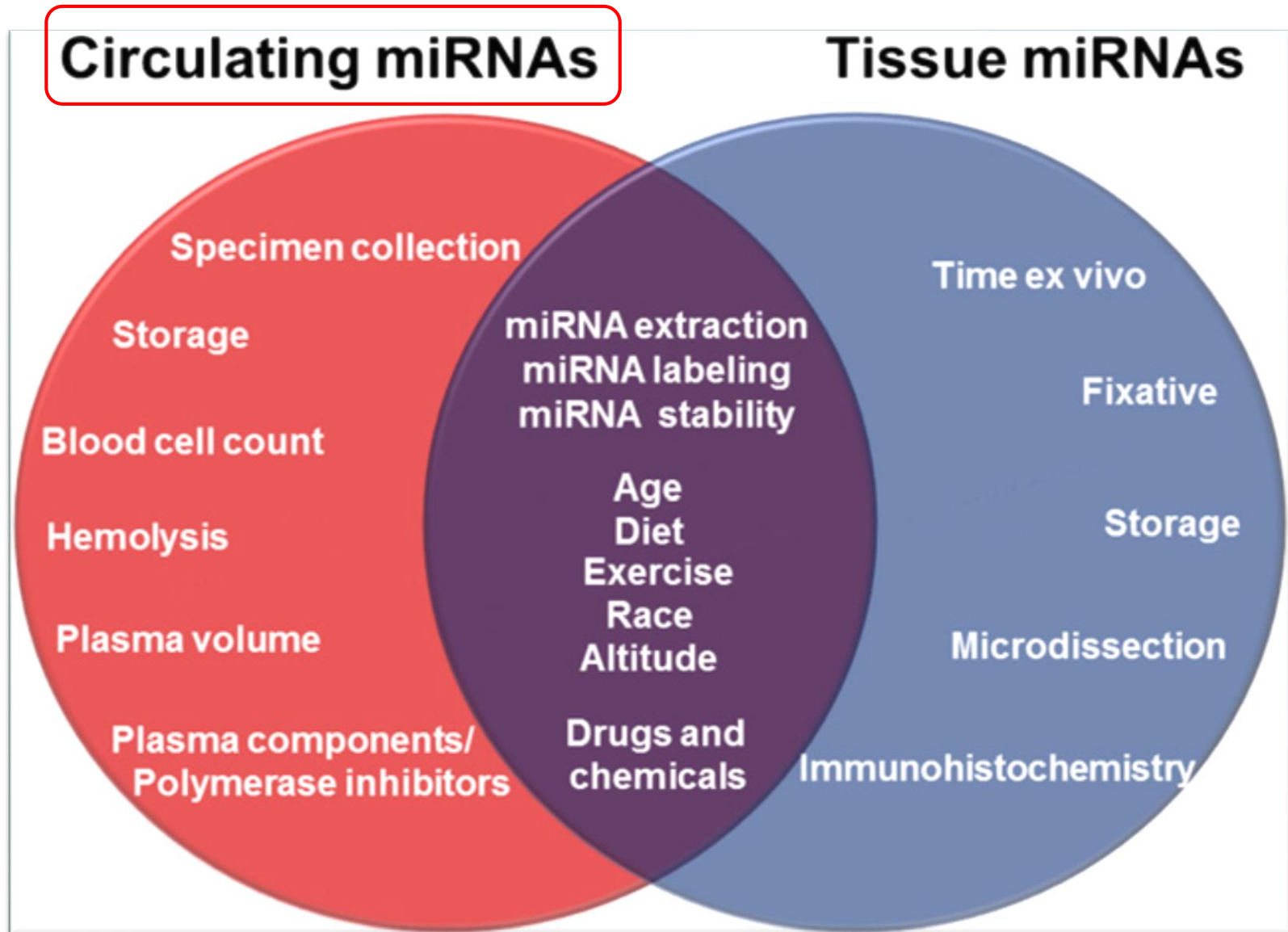
miRNAではどうでしょうか

1. 生理的変動要因（個体内、個体間）
2. 検体採取方法・処理方法
3. 患者の病態（状態）
4. 測定（分析の不確かさ、測定方法）

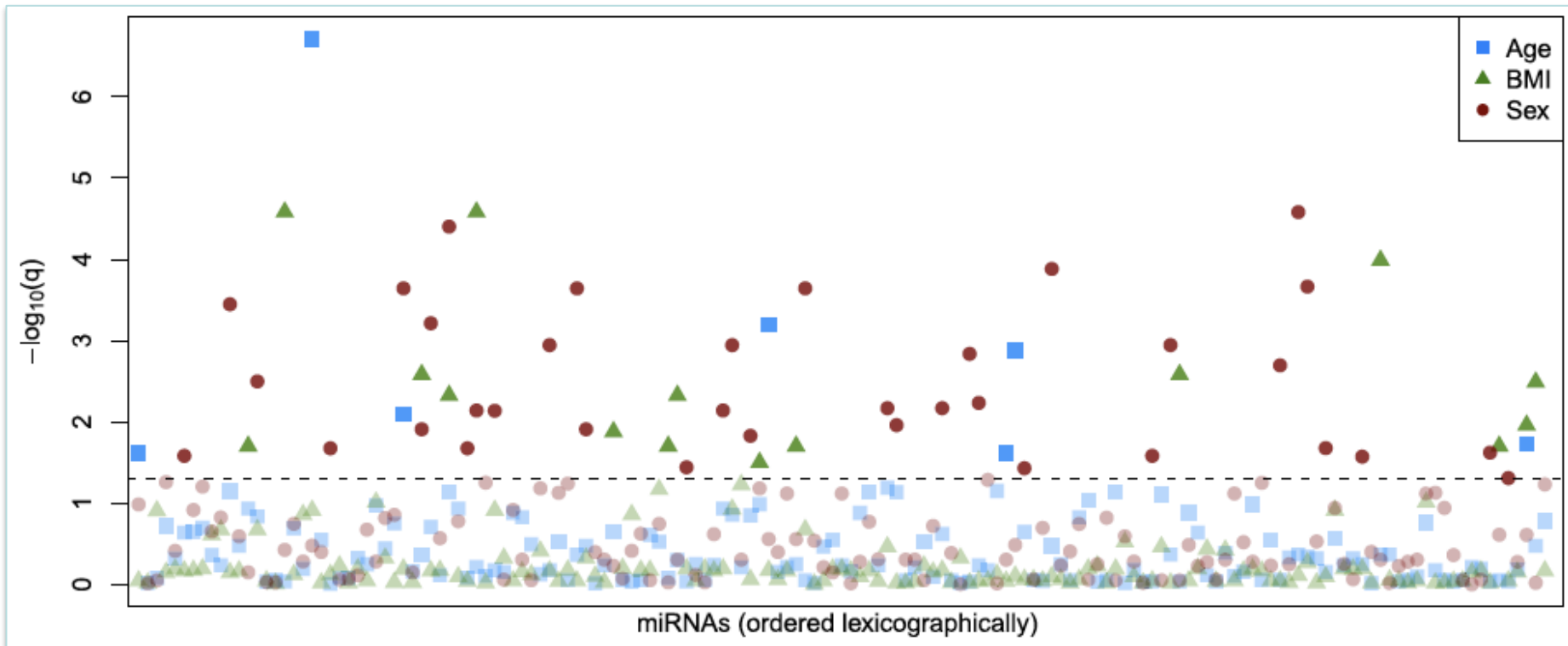
miRNAではどうでしょうか

1. 生理的変動要因（個体内、個体間）
2. 検体採取方法・処理方法
3. 患者の病態（状態）
4. 測定（分析の不確かさ、測定方法）

miRNAの検査前プロセスにおける変動要因



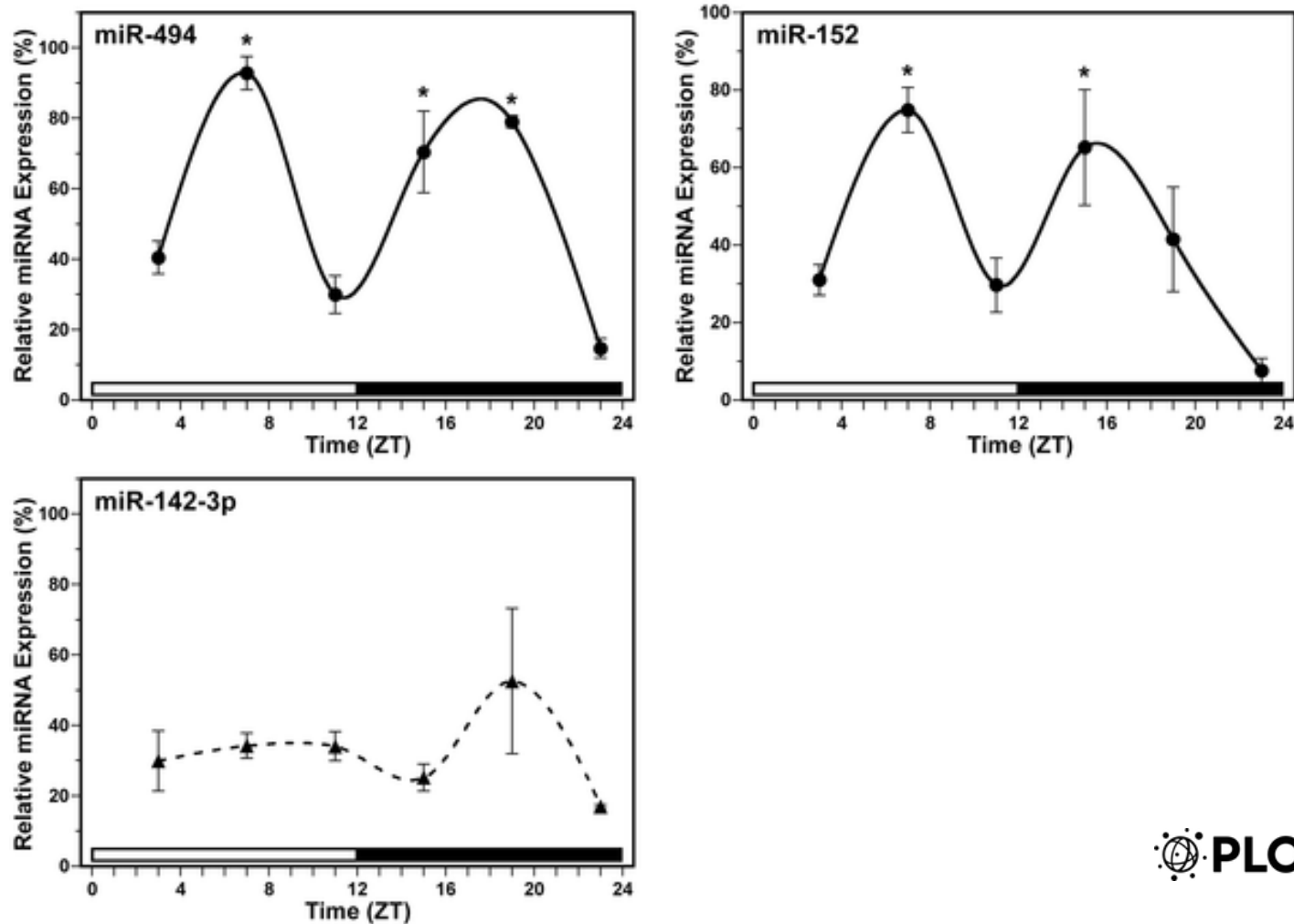
miRNAの年齢、BMI、性別との関係



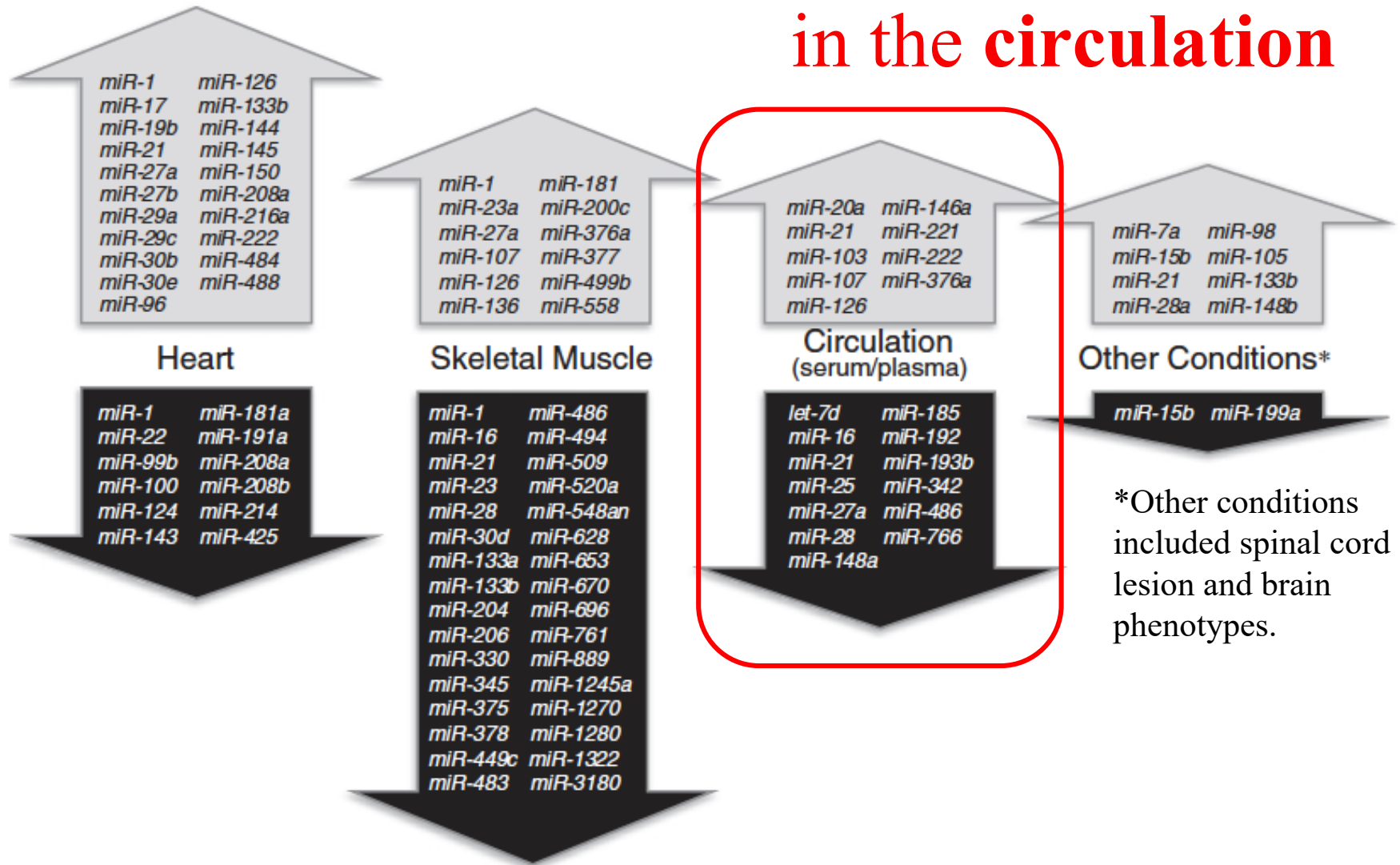
Association q-values of miRNAs in two-step regression models with adjustment for technical and biological parameters. The $-\log_{10}(q)$ values of the linear regression analysis of miRNA levels and phenotypes age (blue rectangle), BMI (green triangle) and sex (red circle) are depicted. Q-values were obtained via Benjamini-Hochberg (BH) multiple testing correction of raw p-values. The dotted line marks the significance threshold of $q = 0.05$. Plasma miRNAs are lexicographically arranged on the x-axis (though not labelled individually)

時計遺伝子の *Bmal1* を標的とする miRNA 発現量の日内リズム

Figure 3. Temporal patterns of miR-494, miR-152 and miR-142-3p expression in mouse serum.

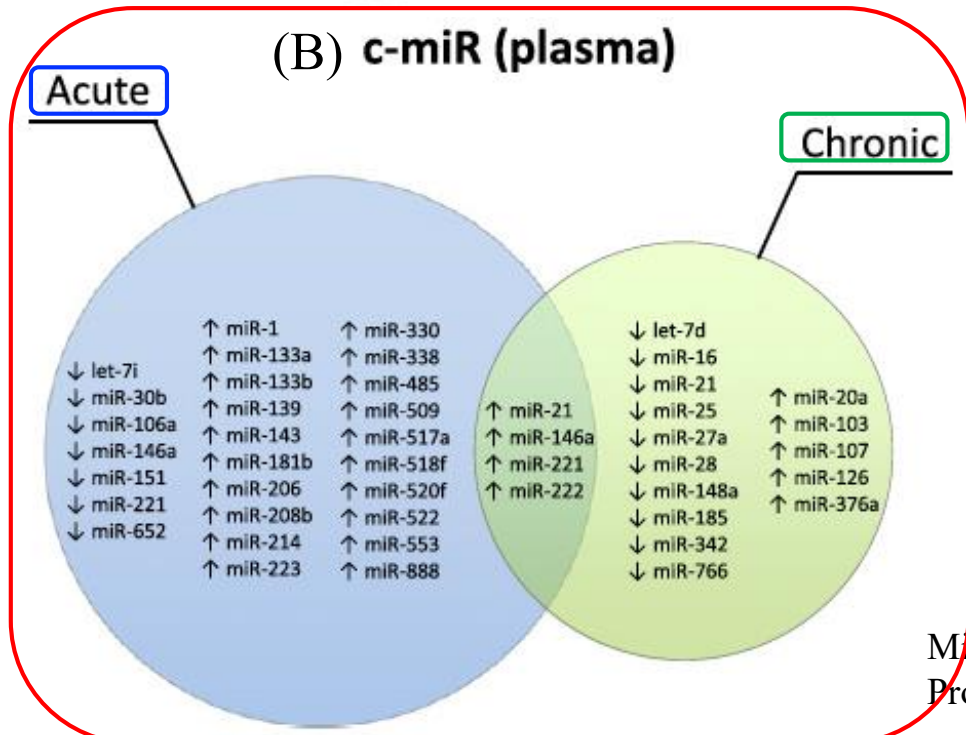
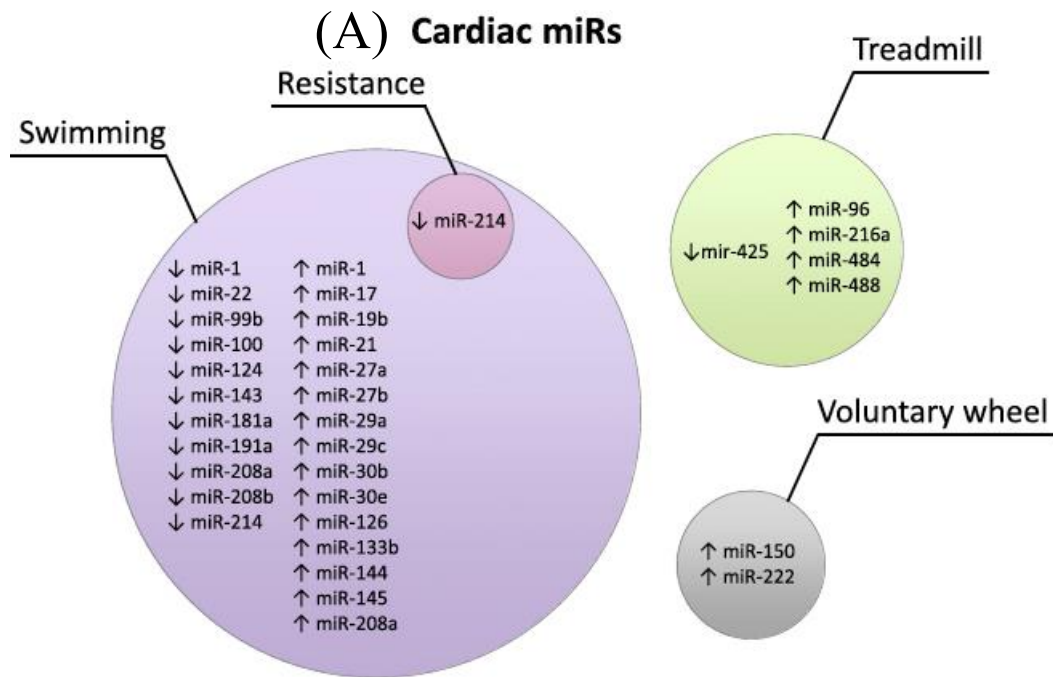


miRNAs up and down regulated by exercise training in different tissues and in the circulation



*Other conditions included spinal cord lesion and brain phenotypes.

Effects of acute and chronic exercise training on miRNAs



(A) Exercise training modality (resistance training vs. aerobic exercise training on motorized treadmill vs. voluntary running wheel vs. swimming exercise training) influencing miRNAs expression in the heart;

(B) acute and chronic exercise inducing changes in circulating miRNAs

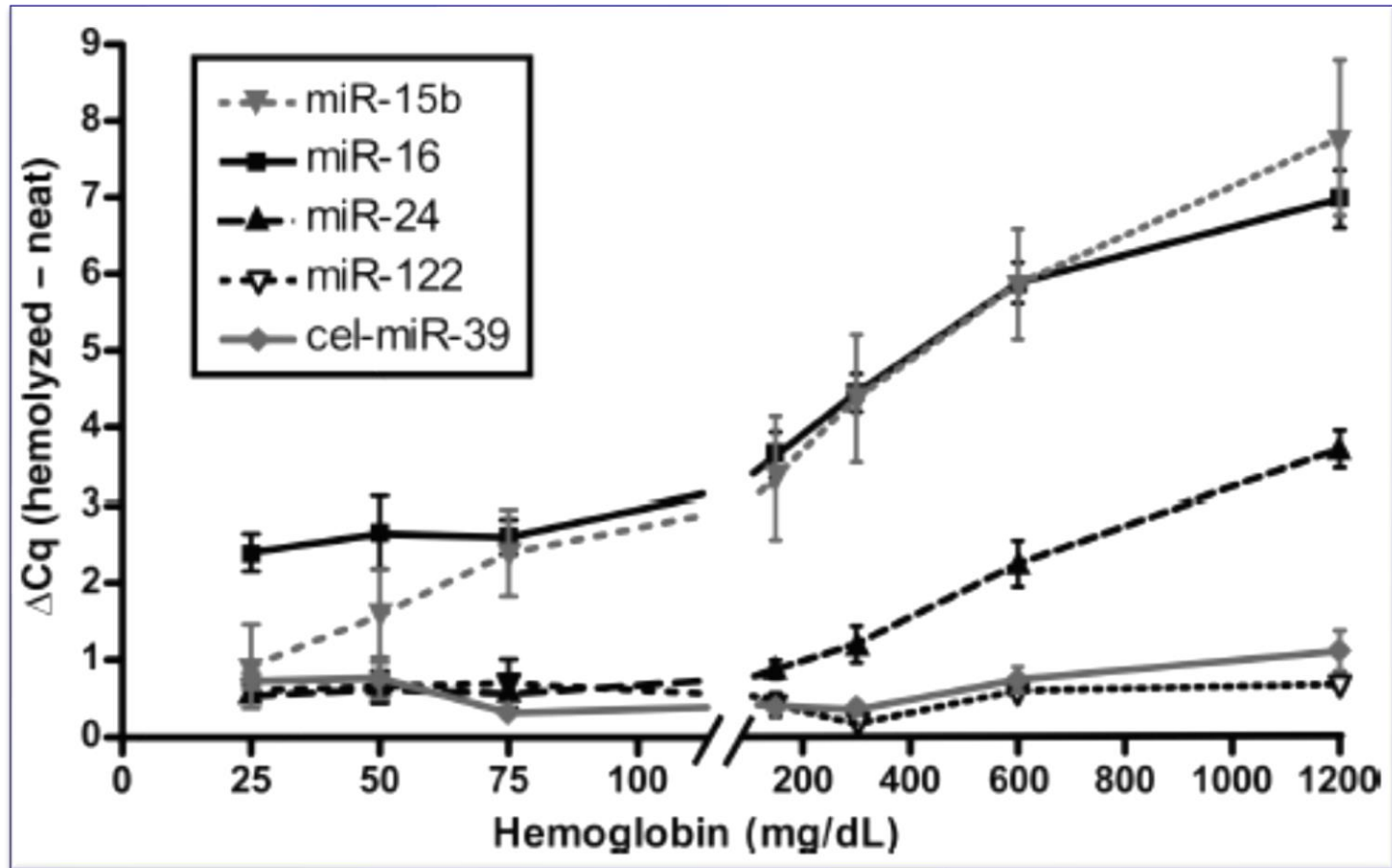
miRNAではどうでしょうか

1. 生理的変動要因（個体内、個体間）
2. 検体採取方法・処理方法
3. 測定（分析の不確かさ、測定方法）
4. 患者の病態（状態）

採血管種の miRNA分析への影響

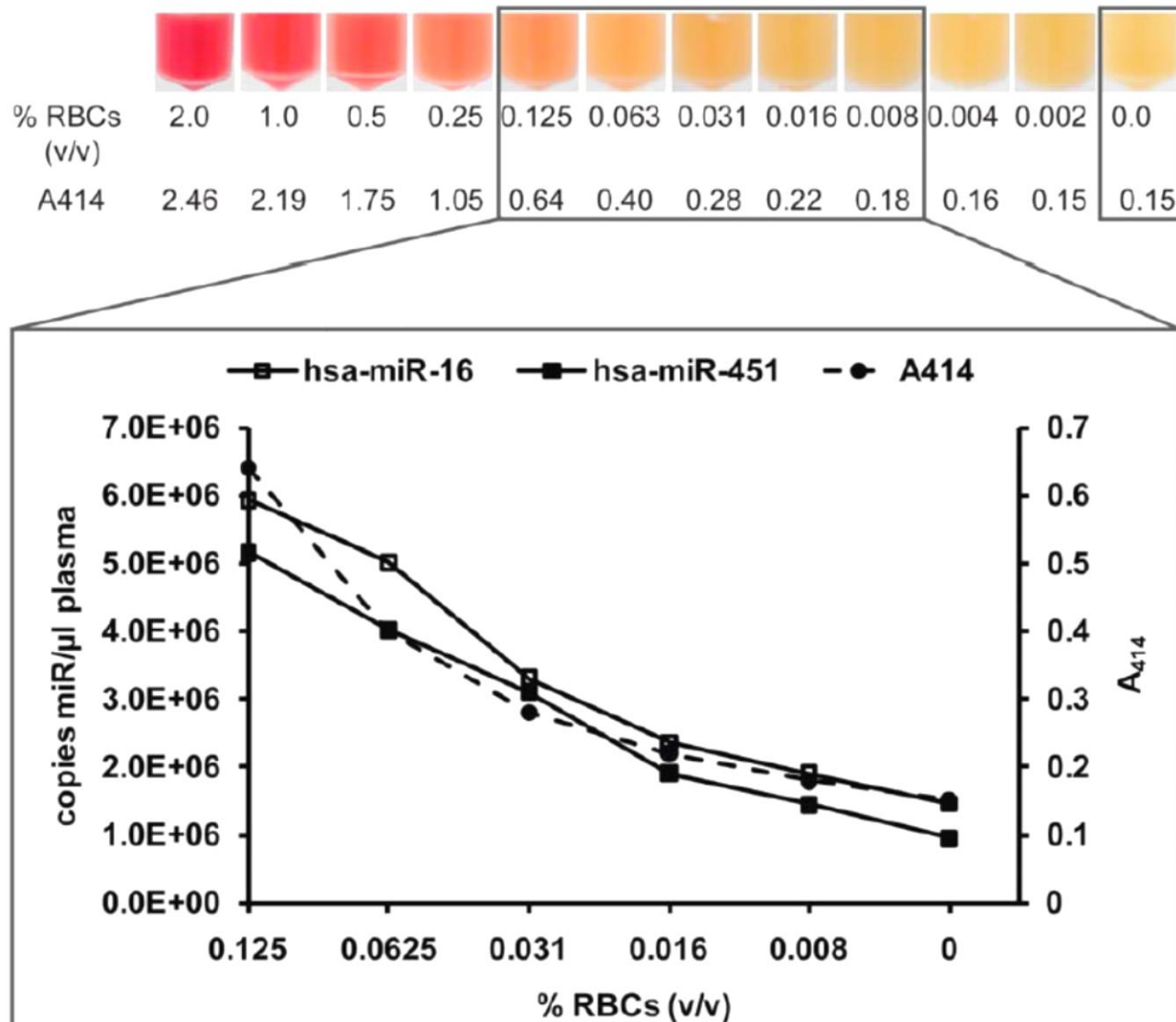
Sample matrix	miRNA behavior	Reference
Plasma-EDTA	Best anticoagulant for PCR-based (miRNA) profiling	[84]
	Higher levels of miR-223 compared to the other matrices	[85]
Plasma-heparin	Interferes with enzyme activity in PCR-based assays	[14]
	Lowest levels of both miR-16 and miR-223	[85]
Plasma NaF/KOx	Suitable alternative to EDTA, but it can determine increased miRNA detection compared to the other matrices	[85]
	Higher levels of miR-223 compared to the other matrices	[85]
	When NaF/KOx are added to frozen samples, levels of miR-16 doubled in EDTA-plasma, and tripled in serum	[85]
Plasma-citrate Serum	Interferes with enzyme activity in PCR-based assays	[14]
	Stable and reproducible	[17]
	Higher variability of miR-16 and miR-223 compared to the other matrices	[85]

溶血のmiRNA濃度に及ぼす影響



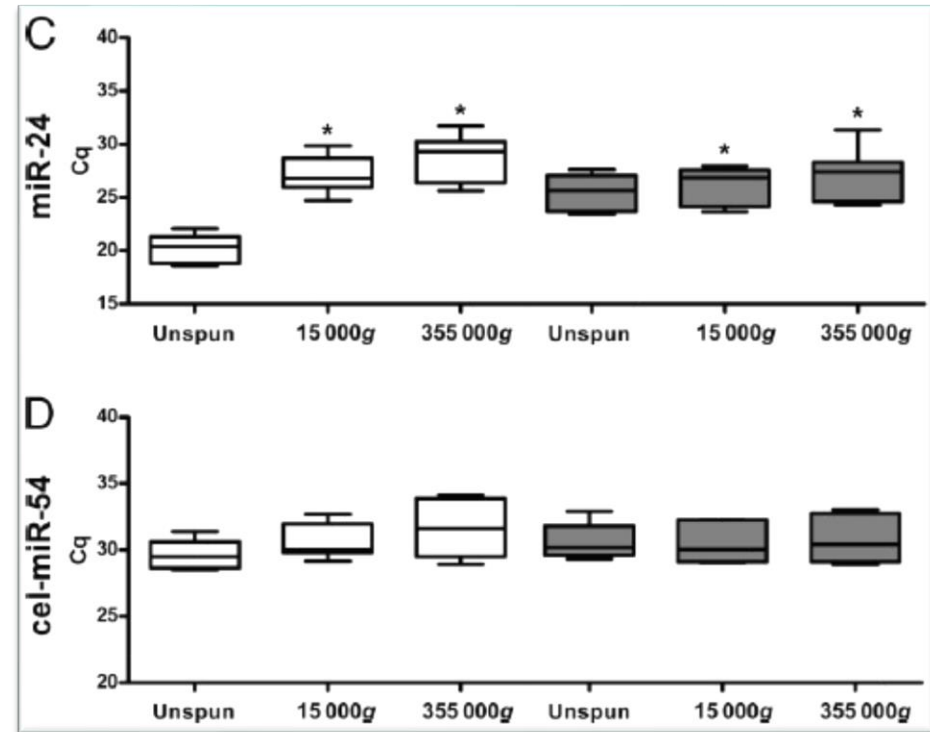
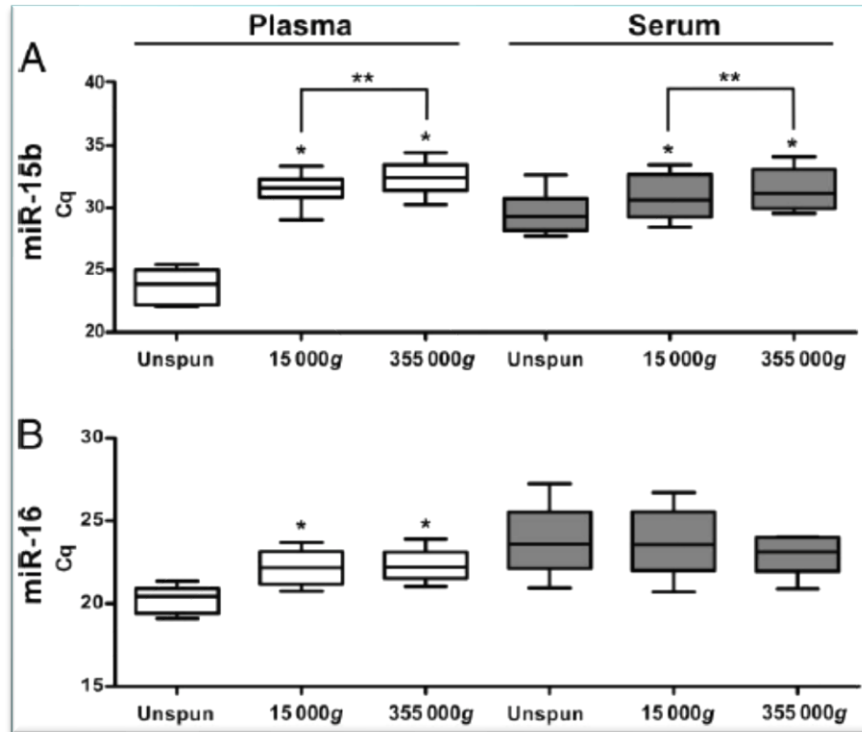
Results are reported as the difference in raw Cq values between the hemolyzed sample and unhemolyzed (Neat) sample. The x axis is broken between 100 and 200 mg/dL (1.0 and 2.0 g/L) to highlight the effect of low hemoglobin concentrations. **Positive results represent increases in miRNA concentration.** Error bars represent the SD.

Relationship between free haemoglobin (Hb) and miRNA content of plasma samples



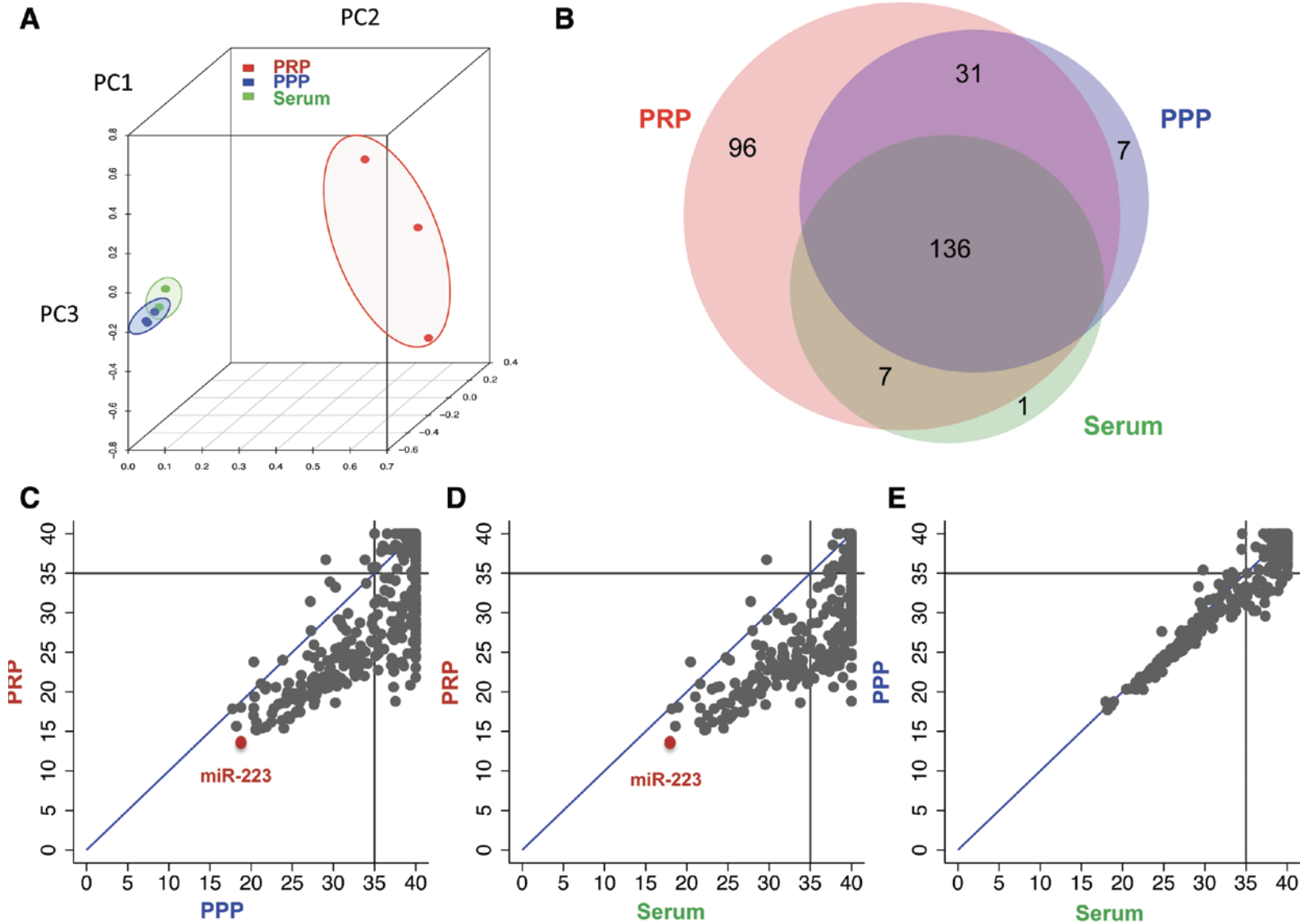
A dilution series of lysed RBCs in plasma (top) was prepared and Hb content measured by absorbance at 414 nm [33]. RNA was isolated from the samples indicated by the box and levels of **miR-16** and **miR-451** were quantified using a standard curve. While a change in plasma colour is only clearly visible from a RBC concentration of 0.125% (v/v) the amount of free Hb as well as this of both miR-451 and miR-16 already substantially increased at a RBC concentration of 0.031% (v/v).

遠心後の血漿と血清のmiRNA濃度



Paired plasma (left 3 columns) and serum (right 3 columns) samples were obtained from 10 healthy individuals. We spiked 400 L of the uncentrifuged (Unspun) and 2 supernatant aliquots with *C. elegans* cel-miR-54, extracted the RNA, and analyzed the samples for miR-15b (A), miR-16 (B), miR-24 (C), and cel-miR-54 (D). The resulting miRNA concentrations are reported as raw Cq values. The boxes represent the 25th and 75th percentiles; the horizontal line in each box represents the mean; the error bars indicate the range. Significant differences ($P < 0.05$, Wilcoxon signed rank test) from the unspun control (*) and significant differences between the 15 000g and 355 000g centrifugation steps (**) are indicated.

血小板由来のmiRNAの干渉



Platelet-rich plasma showed markedly higher levels of miRNAs than serum and platelet-poor plasma. Few abundant platelet miRNAs, such as miR-24, miR-197, miR-191, and miR-223, were also increased in serum compared with platelet-poor plasma. In contrast, antiplatelet therapy significantly reduced miRNA levels.

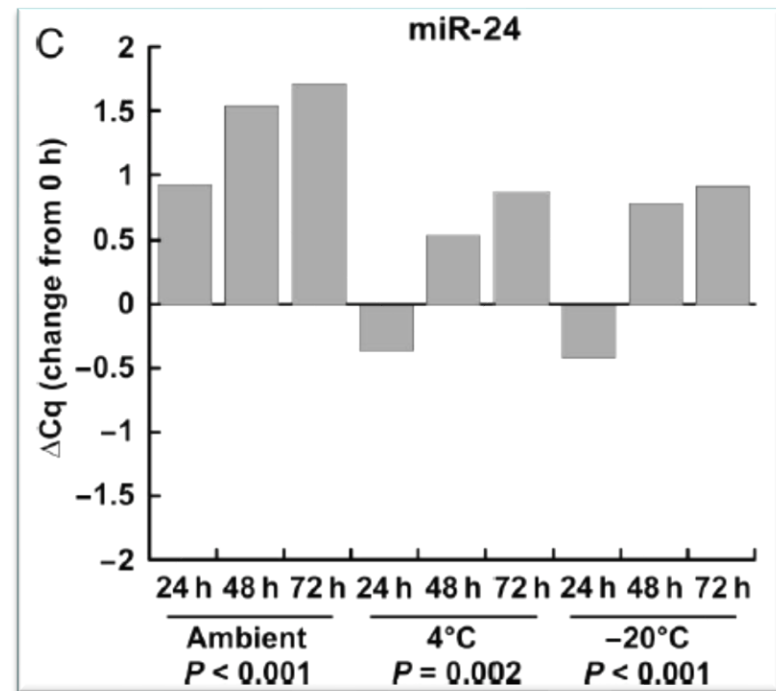
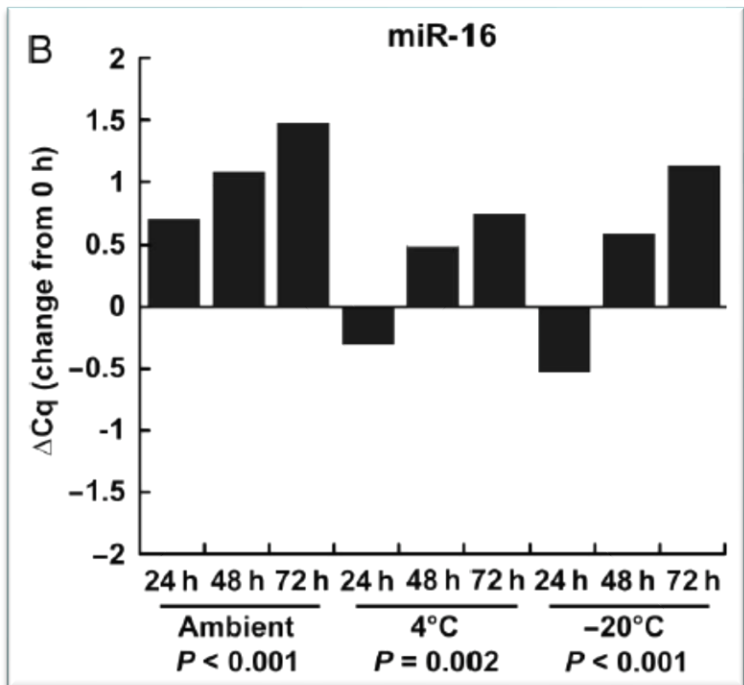
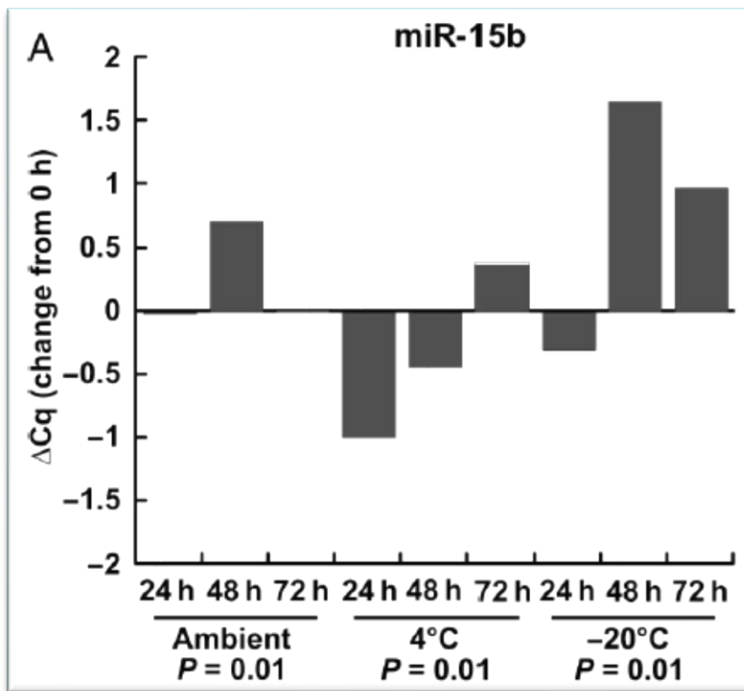
異なる遠心条件で調製した血漿のmiRNA発現

B

	sample	donor	miR-142-3p	let-7a	miR-223	miR-16	miR-451	miR-122
Normalized CT Difference from Mean	Platelet _{CONC}	1-1	-5.3	-4.1	-4.3	-2.7	0.1	1.4
		1-2	-5.7	-3.9	-3.9	-2.5	-0.1	1.7
		2-1	-5.0	-3.8	-3.8	-1.6	0.6	0.5
		2-2	-5.4	-4.1	-4.1	-2.3	-0.3	0.4
		3-1	-5.7	-5.6	-5.6	-2.4	0.5	0.2
		3-2	-6.3	-5.3	-5.3	-2.6	-0.3	0.0
	Plasma _{RICH}	1-1	-3.5	-3.2	-3.2	-1.3	0.5	0.9
		1-2	-3.4	-3.2	-3.2	-1.3	0.5	0.8
		2-1	-3.1	-3.5	-3.5	-1.2	-0.6	0.2
		2-2	-3.9	-3.6	-3.6	-1.1	0.2	0.3
		3-1	-4.6	-4.3	-4.3	-1.0	-0.2	0.2
		3-2	-4.3	-4.2	-4.2	-0.9	-0.3	0.3
	Plasma _{STD}	1-1	-0.2	-0.8	-0.8	0.5	-0.8	-1.3
		1-2	0.1	-0.5	-0.5	0.7	-0.4	-0.6
		2-1	0.7	0.4	0.4	0.5	-0.8	-0.5
		2-2	1.3	0.5	0.5	1.1	0.0	-0.2
		3-1	2.1	1.7	1.7	1.0	-0.5	0.0
		3-2	2.5	1.9	1.9	0.8	0.0	0.0
	Plasma _{POOR}	1-1	3.0	2.8	2.8	1.5	-0.2	-0.7
		1-2	2.7	2.3	2.3	1.1	-0.6	-1.1
		2-1	2.0	2.3	2.3	1.0	0.4	0.2
		2-2	2.9	2.5	2.5	1.2	0.1	-0.1
		3-1	2.9	3.7	3.7	1.0	0.1	0.0
		3-2	3.7	3.5	3.5	1.1	-0.3	-0.2
Plasma _{FILT}	1-1	6.2	5.5	5.5	1.9	0.2	-0.5	
	1-2	6.4	5.5	5.5	2.0	0.4	-0.6	
	2-1	5.3	4.7	4.7	1.4	0.2	-0.2	
	2-2	5.2	4.6	4.6	1.1	0.0	-0.5	
	3-1	5.1	4.5	4.5	1.5	0.0	-0.2	
	3-2	4.6	4.0	4.0	1.8	0.8	0.0	
Average Fold Difference	Plasma _{RICH} to Plasma _{POOR}	102	92	92	5	1	1	
	Plasma _{STD} to Plasma _{FILT}	21	19	19	2	2	1	
	Plasma _{POOR} to Plasma _{FILT}	6	4	4	1	1	1	

Plasma Processing
Conditions
Substantially
Influence Circulating
microRNA
Biomarker Levels.
PLoS ONE 8(6):
e64795.

miRNAの保存安定性

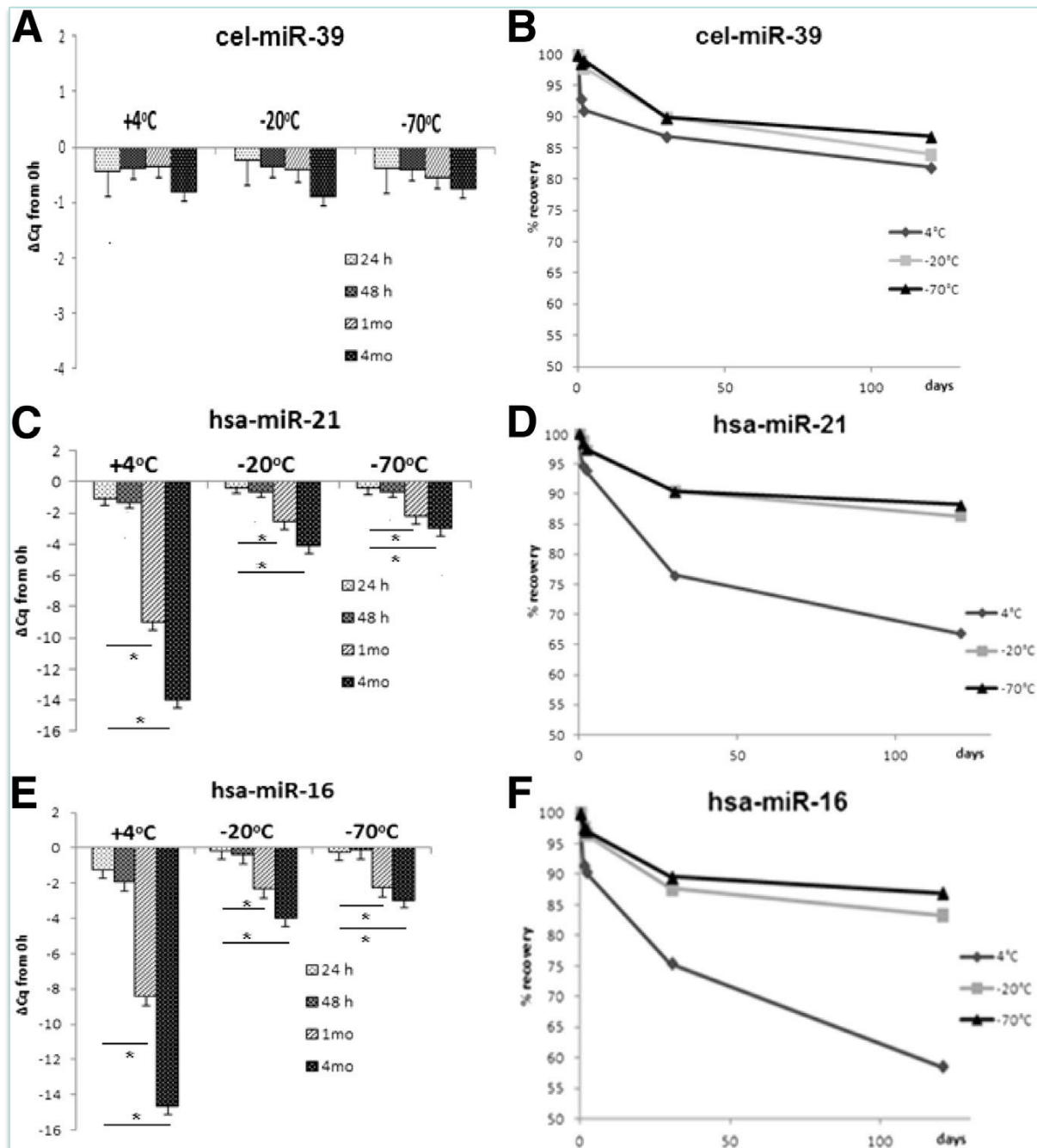


Results are presented as the difference in raw Cq values from the 0-h control. Positive differences represent decreases in miRNA concentration, and negative differences represent increases in miRNA concentration. P values were determined by using repeated measures ANOVA.

miRNAの 保存温度に よる安定性

Stability study of circulating miRNAs in **plasma** at different storage time and temperature conditions. A and B: cel-miR-39. C and D: hsa-miR-21. E and F: hsa-miR-16. The results are presented as differences in raw Cq values from the 0-hour control (0h) (positive differences represent decreases and negative differences represent increases in miRNA concentrations) and as percentage recoveries from the 0h for each miRNA. The data represent the means \pm SD of three independent experiments. Statistical evaluation was based on the U-test. *P<0.05.

Quantification of Circulating miRNAs in Plasma Effect of Preanalytical and Analytical Parameters on Their Isolation and Stability.
J Mol Diag 15(6), 2013

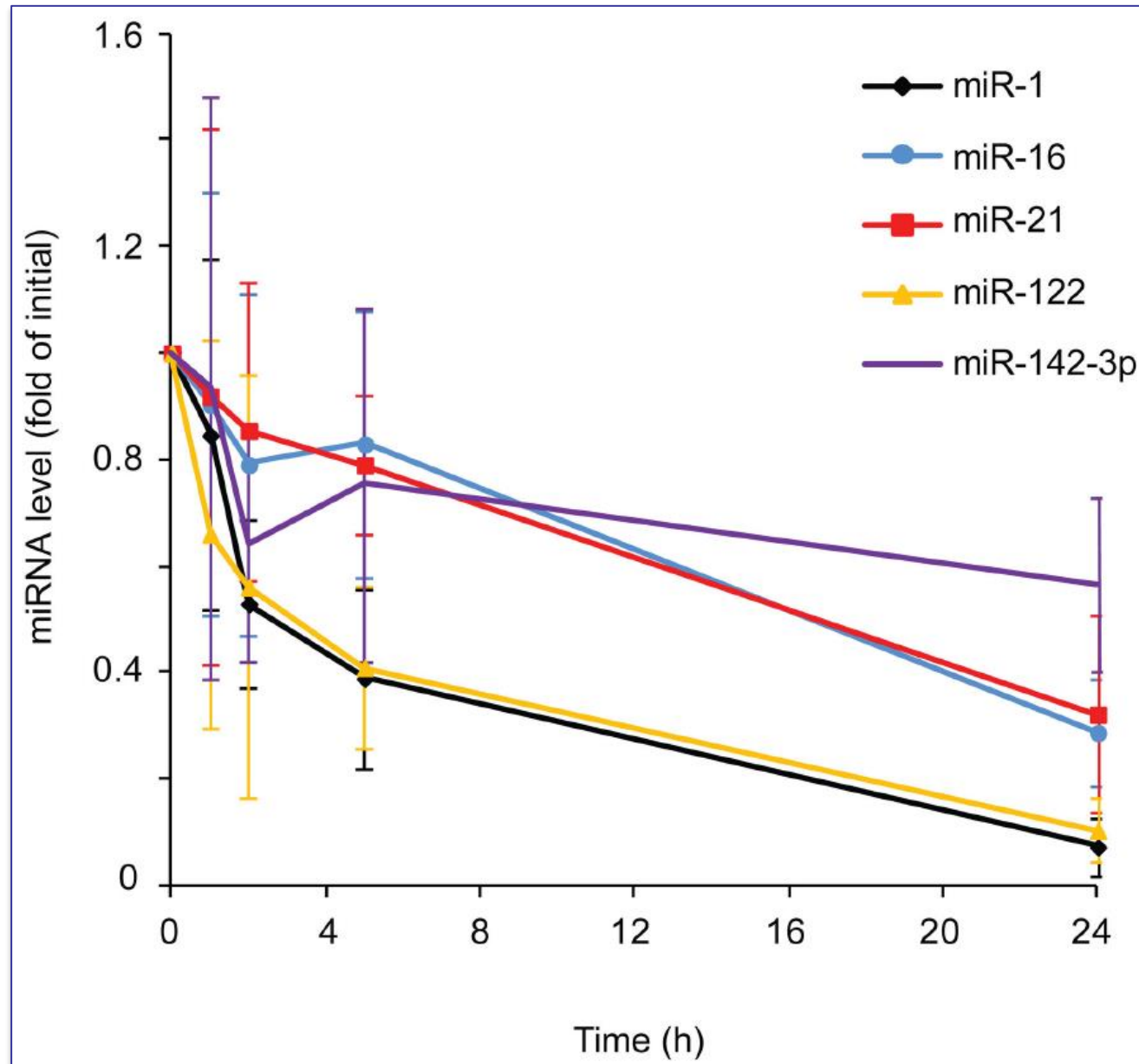


miRNAの 室温安定性

The levels of miRNAs decline with different kinetics in serum.

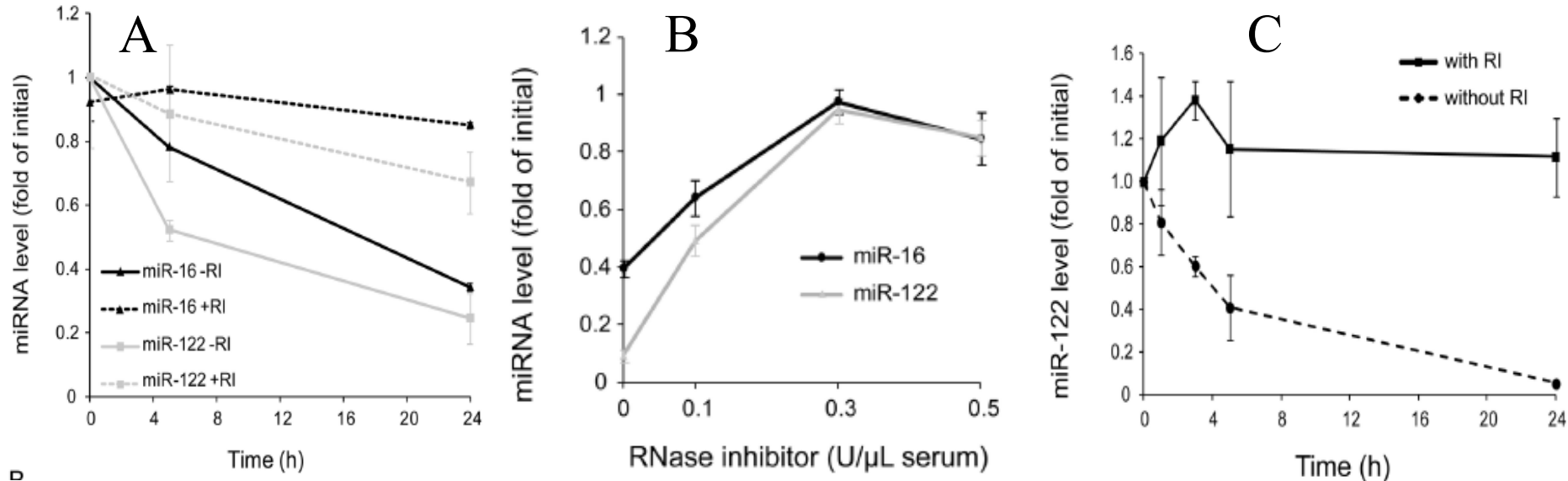
Serum ($n \geq 3$) was separated from blood cells directly after blood drawing and incubated at **room temperature** for different durations (0, 1, 3, 5 or 24 h) before extraction of the RNA.

Levels of five different microRNAs (miR-1, miR-16, miR-21, miR-122 and miR-142-3p) were analyzed by reverse transcription realtime PCR and normalized to their initial values. To test for statistically significant differences between the five microRNAs a Kruskal-Wallis test with multiple Dunn comparison and Bonferroni-Holm correction was performed. This revealed significant differences between miR-16 and miR-122 ($P < 0.001$) and miR-21 and miR-122 ($P < 0.01$).



Differential Stability of Cell-Free Circulating microRNAs: Implications for Their Utilization as Biomarkers. PLoS ONE 8(9): e75184, 2013.

miRNAの安定性: RNase阻害剤(RI)の影響

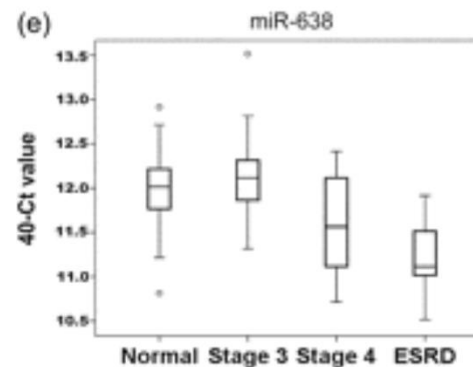
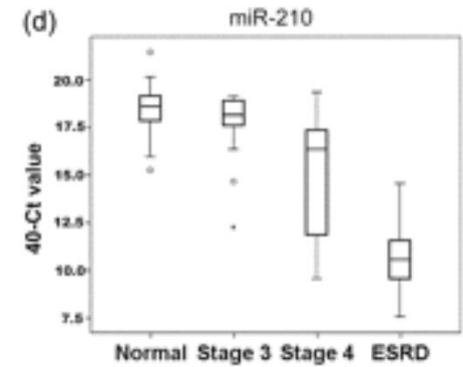
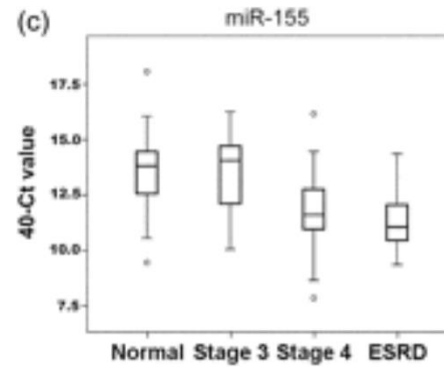
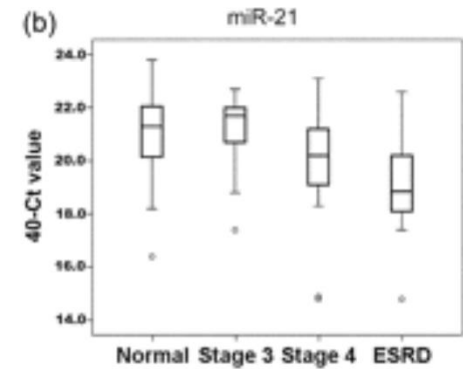
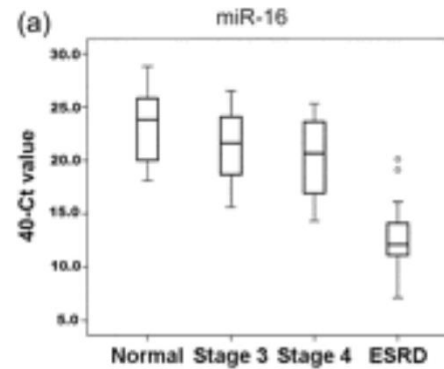
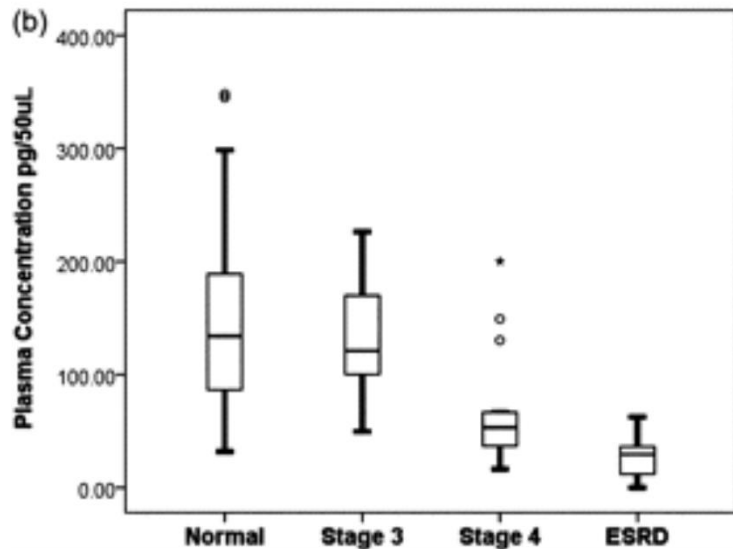
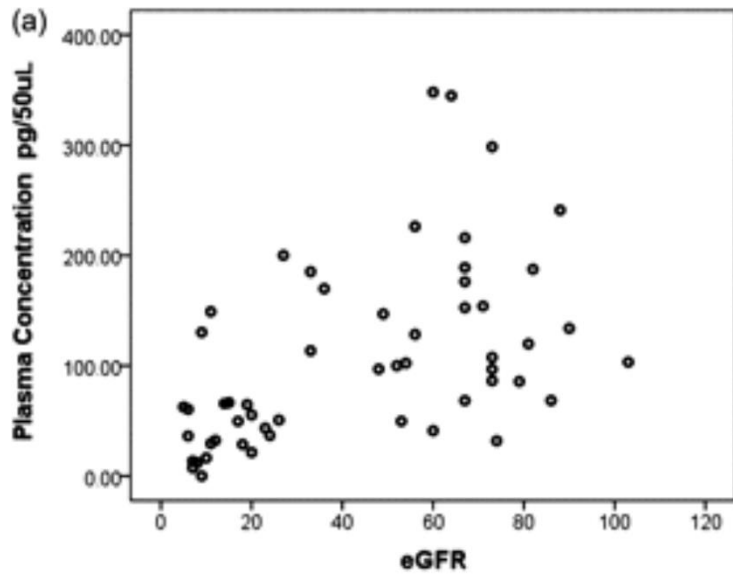


(A) **Serum** was incubated for 0, 5 or 24 h **with or without RI** (0.2 U/μL serum) before RNA isolation. Levels of **miR-16** and **miR-122** were analyzed by RT-real-time PCR and normalized to the initial value (0 h). A representative figure from three independent experiments with similar results is displayed. (B) Serum was incubated for 24 h with **different concentrations of RI** (0, 0.1, 0.3 or 0.5 U/μL serum), miR-16 and miR-122 levels were analyzed and normalized to the corresponding levels without serum incubation. The data shown is representative for three independent experiments with similar results. (C) Whole blood in serum tubes (n = 3) was incubated with and without RI (0.3 U/μL blood) for 0, 1, 3, 5 or 24 h at room temperature, followed by separation of serum from blood cells. RNA was isolated from 200 μL of serum and **miR-122** levels were analyzed by reverse transcription real-time PCR. MicroRNA levels were normalized to the initial value at timepoint 0. Wilcoxon-Mann-Whitney-U test revealed statistical significance (P < 0.001) between miR-122 serum levels with or without RI.

miRNAではどうでしょうか

1. 生理的変動要因（個体内、個体間）
2. 検体採取方法・処理方法
3. 患者の病態（状態）
4. 測定（分析の不確かさ、測定方法）

トータルおよび個々のmiRNA量は慢性腎疾患で減少する

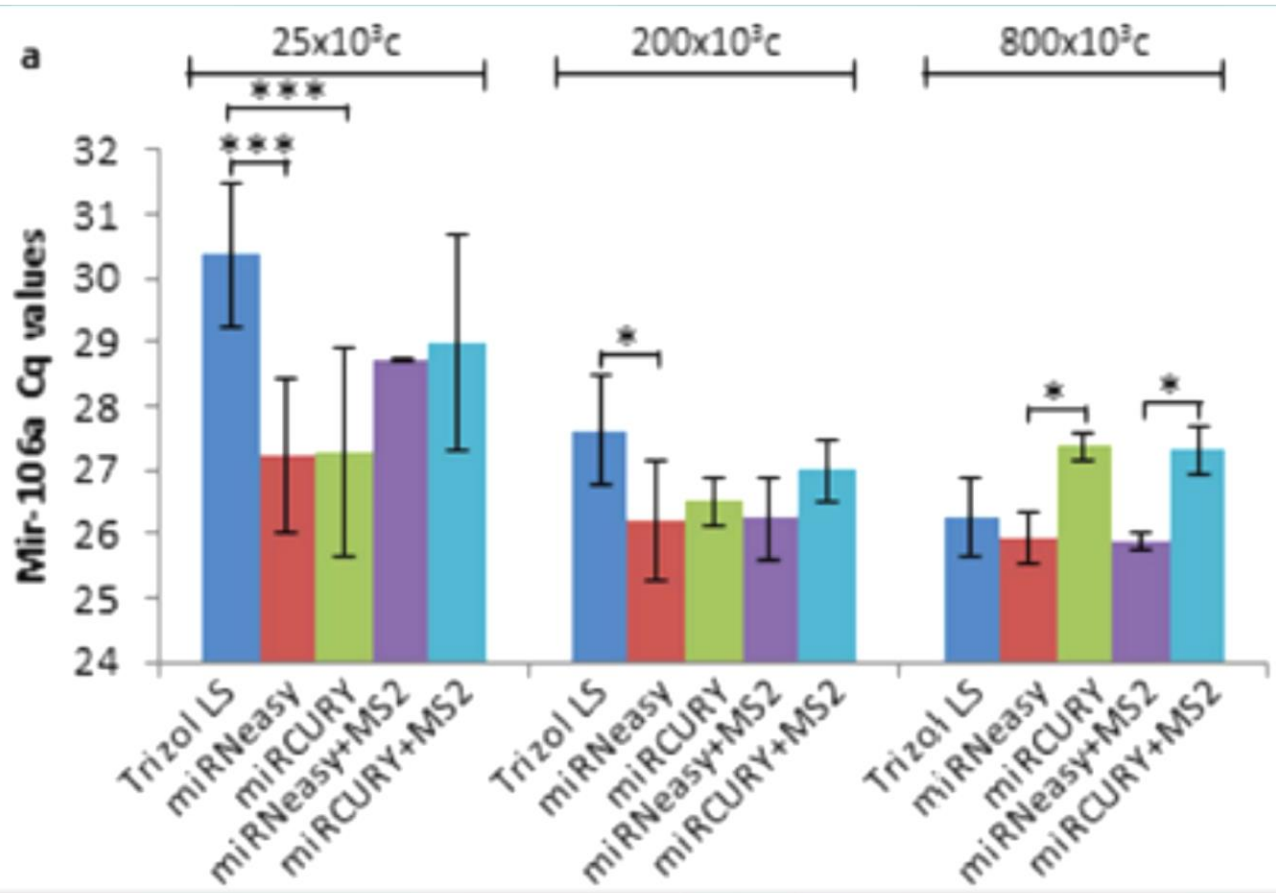


ESRD: end-stage renal disease

miRNAではどうでしょうか

1. 生理的変動要因（個体内、個体間）
2. 検体採取方法・処理方法
3. 患者の病態（状態）
4. 測定（分析の不確かさ、測定方法）

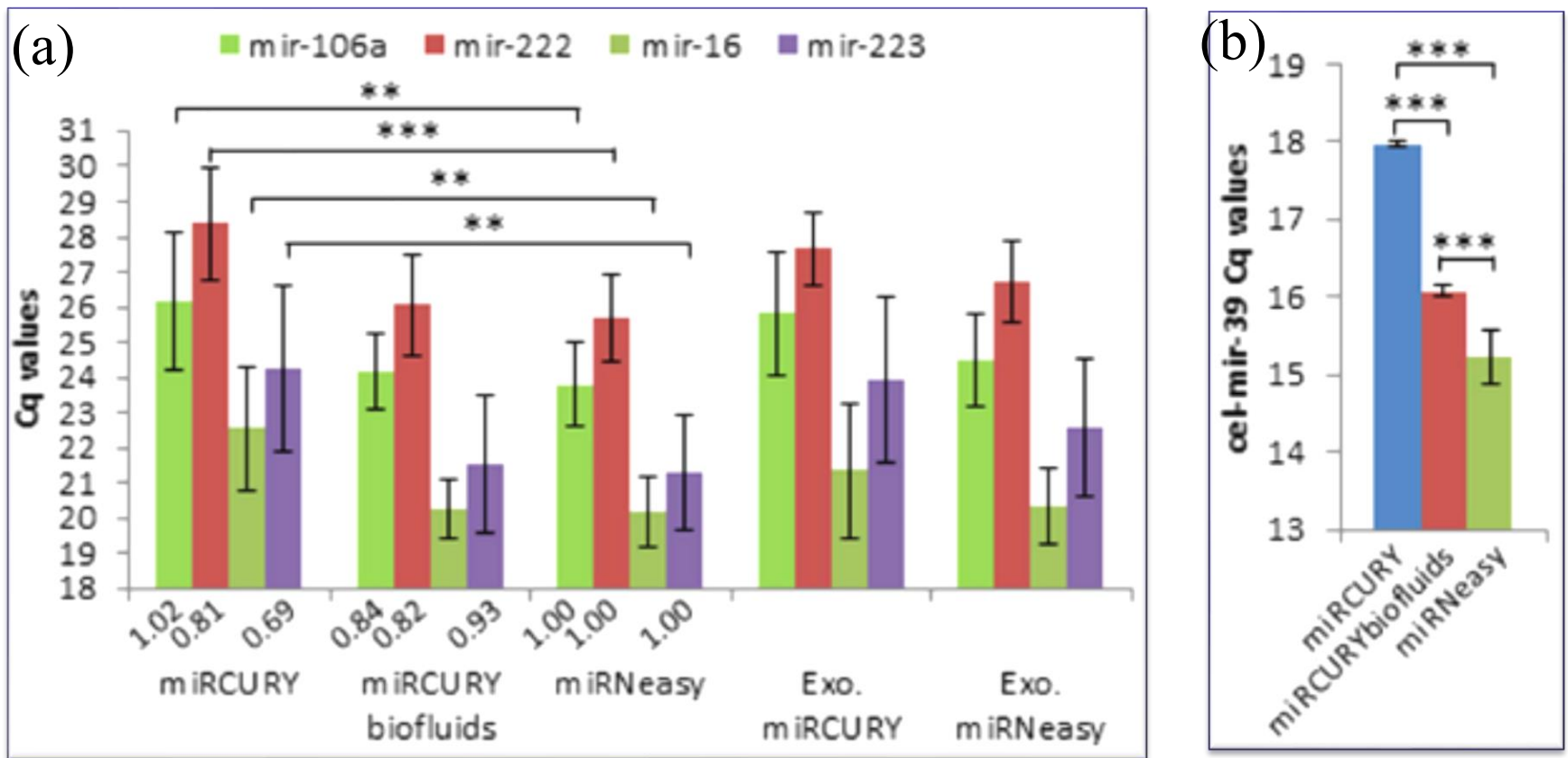
Efficiency of RNA extraction methods for miRNA detection by RT-qPCR in different cell density conditions, using a fixed RNA quantity



The results represent average Cq values obtained for (a) mir-106a. RNA samples from 25×10^3 , 200×10^3 and 800×10^3 A549 cells were obtained by extraction with either Trizol® LS, miRNeasy®, or miRCURY™, in the presence or absence of MS2 carrier. The detection of miRNA was performed by RT-qPCR starting with 5 ng of total RNA/RT reaction. The mean values \pm SD of 3 independent experiments are shown. *P < 0.05 ***P < 0.001.

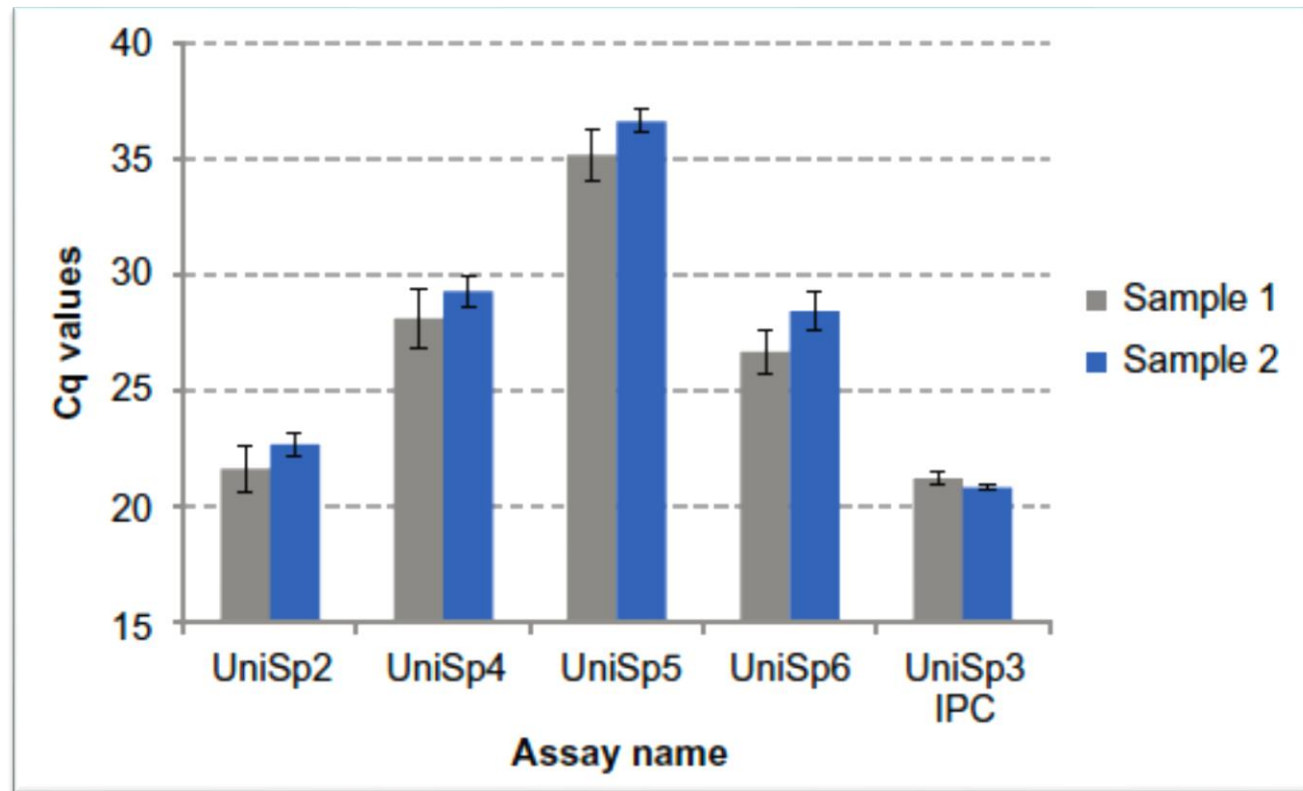
Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Scientific Reports* 6: 19529 (2016)

Detection of miRNAs in plasma by RT-qPCR, using different RNA extraction methods and fixed RNA volumes



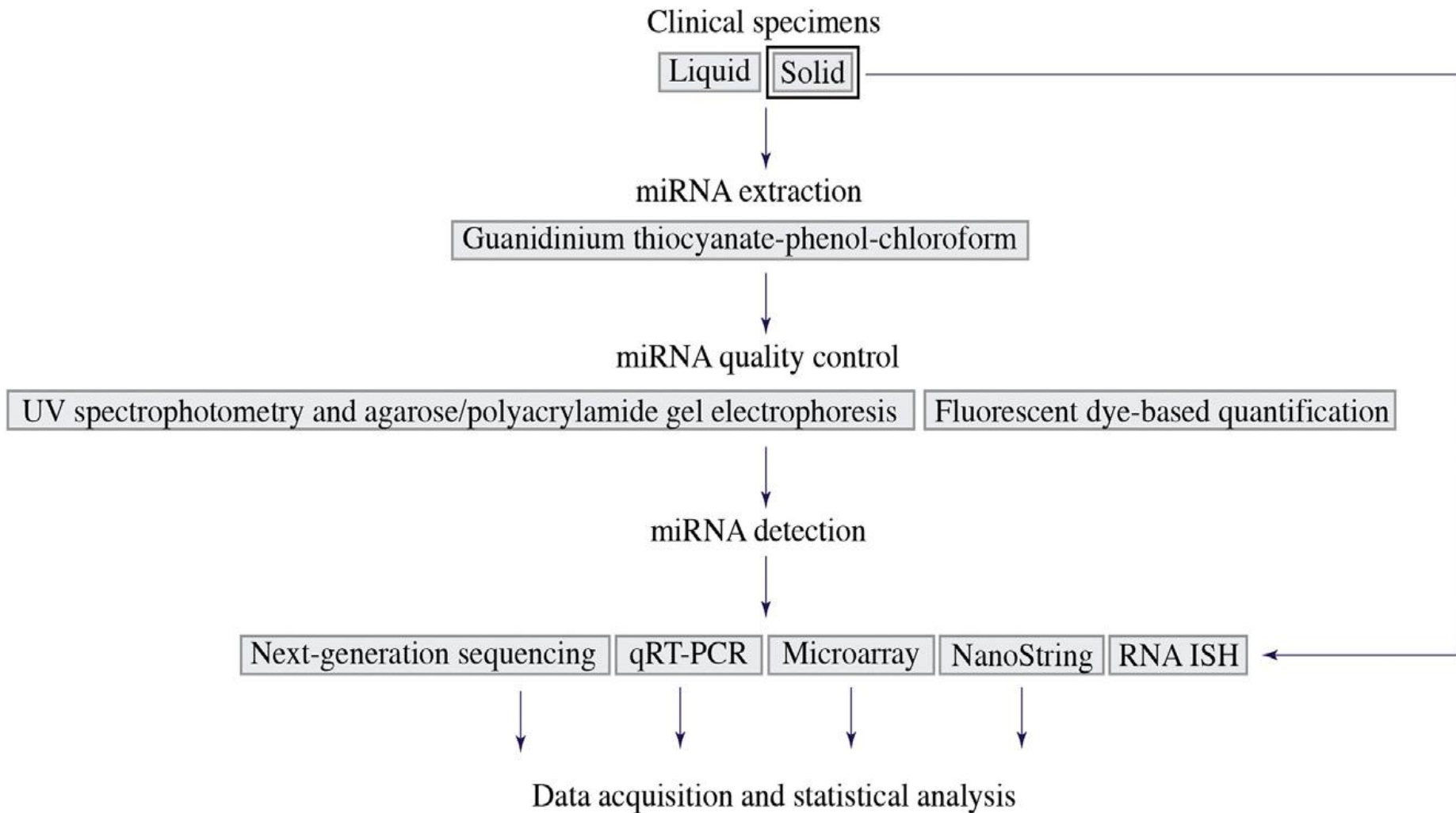
(a) RNA was extracted from 200 μ L of plasma (n = 6). Exosomes were isolated from 2 x 2 mL of plasma (n = 3), then subjected to RNA isolation. The results represent mean Cq values \pm SD, using 2.5 μ L of RNA/RT reaction. Expression levels of plasma mir-106a, mir-222 and mir-223 were normalized to mir-16 levels and expressed as fold change relative to miRNeasy® condition under the histograms. (b) RNA was isolated from 200 μ L of plasma (n = 3) containing 25 fmol of cel-mir-39-3p as a spike-in control directly added into the lysis solution before mixing it with the plasma sample. The results represent mean Cq values \pm SD, using 2.5 μ L of RNA/RT reaction. **P < 0.01 ***P < 0.001.

RNA抽出の 精度管理に 合成RNAの スパイクイン を使用



The use of synthetic spike-ins to control RNA isolation quality. Three synthetic RNA spike-ins in different concentrations are used to control yield (UniSp2, UniSp 4 and UniSp5). A fourth Spike-in, UniSp6 is used to monitor the cDNA synthesis reaction for signs of inhibition and UniSp3 IPC is used to monitor PCR efficiency. Each plasma sample has been extracted five times and error bars show the standard deviation between extractions. A significant difference in the Cq values for UniSp6 indicated the possible presence of RT inhibitors in sample two.

Typical miRNA diagnostic workflow



Practice points

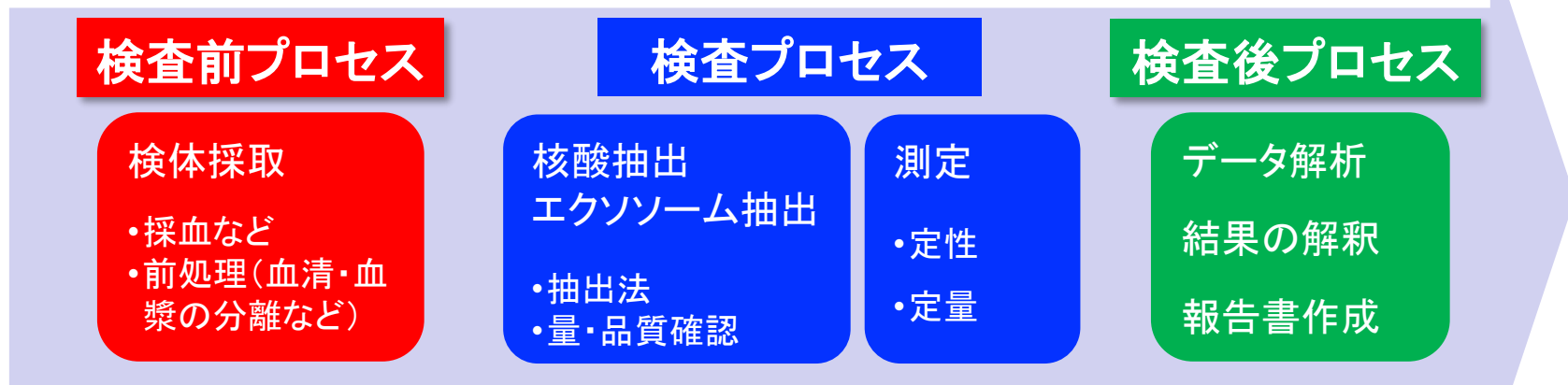
1. Be aware of **scientific and methodological issues** that can affect miRNA clinical testing.
2. Record **pre-analytical variables** for all clinical samples.
3. Assess **RNA quality**. Low RNA Integrity Numbers should not discourage miRNA clinical testing.
4. Match **miRNA detection method** to diagnostic need. Establish **criteria for accepting or rejecting** miRNA clinical test results.
5. Use **miRNA online resources** to evaluate miRNA diagnostic tests and results.
6. For optimal miRNA-guided diagnostics, **assemble a working group involving clinicians, laboratory scientists, and statisticians**.

Research agenda

To advance miRNA-guided diagnostics, the following research activities are recommended:

1. Defining miRNA sequences thorough iterative miRNA **database curation**.
2. Establishing a comprehensive human miRNA **expression atlas** through profiling of common and rare cell lines and dissociated tissues.
3. Evaluating the impact of **pre-analytical variables** on miRNA **detection**.
4. Designing novel and improving existing miRNA **detection technologies**.
5. Performing **cross-platform comparisons** of miRNA **detection methodologies**.
6. Building **user-friendly online resources** for analyzing and comparing miRNA **expression data**.
7. Elucidating the **best statistical approaches** for analyzing miRNA **clinical data**.
8. Performing **feasibility studies** for implementing and automating miRNA testing **in routine clinical practice**.

miRNA分析などの品質保証プロセス



改
正
医
療
法

バリデーション(妥当性確認)

内部精度管理 (IQC)

外部精度評価 (EQA)

第三者認定の実務体制 (ISO 15189)

精度の確保に係る責任者

書類の整備 (標準作業手順書、作業日誌、台帳など)

要員の研修・教育

検査機器などの整備

Significance of EQA Scheme

- ・ EQAを通して、自施設の判定能力を知ることができ、他施設との比較ができる。
- ・ 自施設のプラットフォーム、パイプラインの特徴、弱点を知ることによって、改良を加えるなど対策を講じることができ、最適化につなげることができる。

EQAは Laboratory Quality Management System の改善に重要であり、検査室のパフォーマンス (Laboratory Performance) を押し量る基準である。

Laboratory Total Testing Procedure that enables HARMONIZATION

