



# マイクロSSPのいろは

株式会社ベリタス

2021/11/25

2021/11/30 一部修正

# 目次

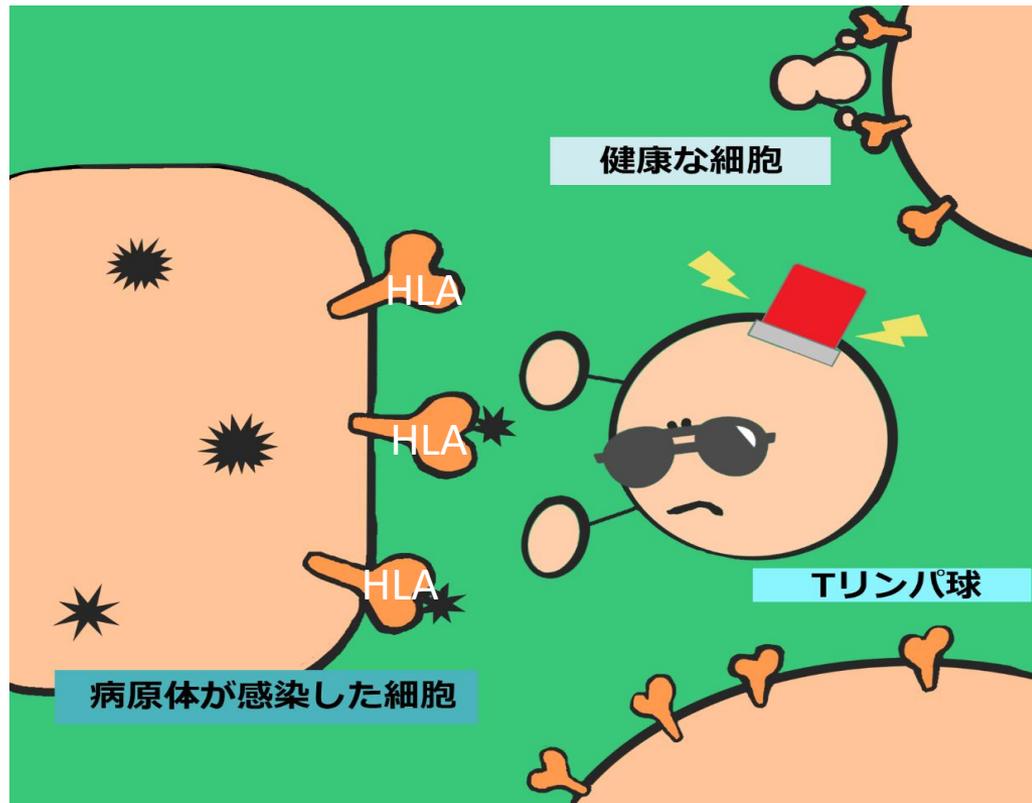
---

- HLAとは
- SSP法について
- 手技のポイント
- 解析のポイント
- よくある質問

# HLAとは

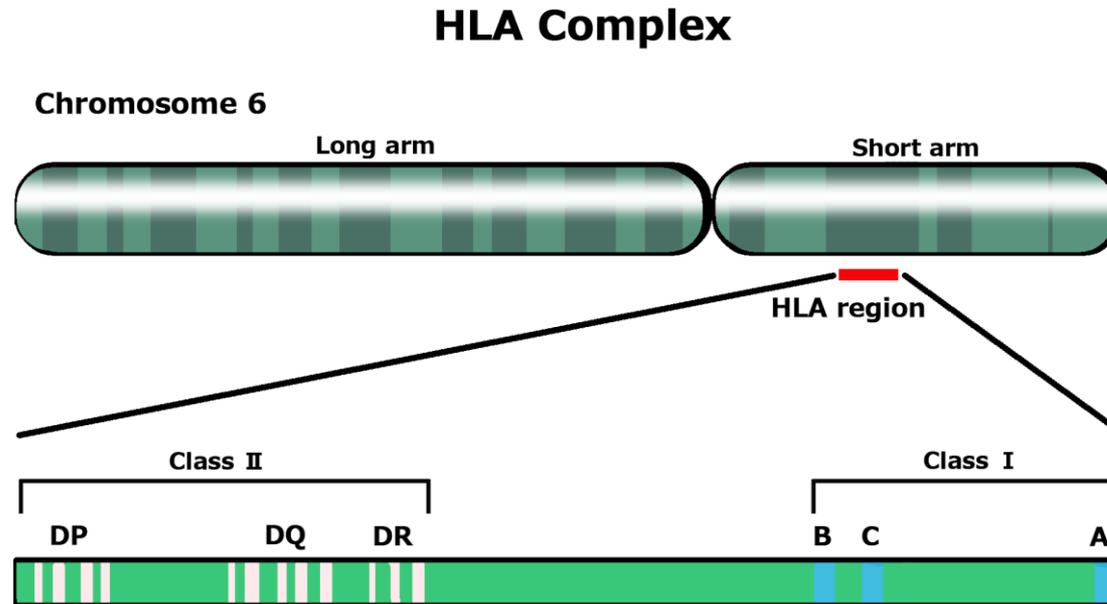
# HLAの役割

- 生体防御のために自己非自己を見分けるための重要分子



# HLA(Human Leukocyte Antigen)

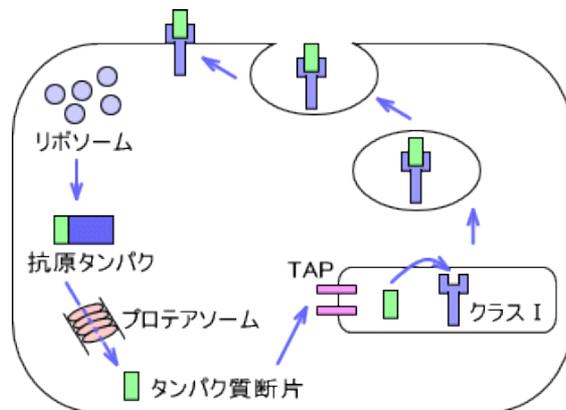
- ヒト白血球抗原として1952年頃に発見
- 第6染色体の短腕部に存在
- A, B, C, DR, DQ, DPなど多くの抗原で構成



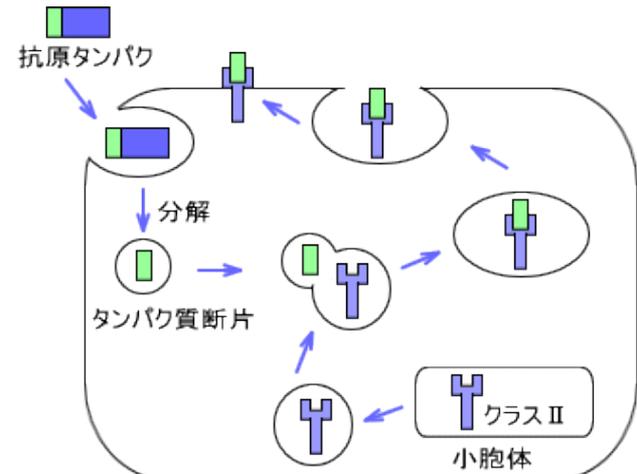
# Class IとClass IIの違い

Class I	比較項目	Class II
A, B, C	主な抗原(ローカス)	DR, DQ, DP
ほとんどの有核細胞 (血小板等)	発現している細胞	抗原提示細胞
細胞内で合成された タンパク質=自己	抗原として提示するもの	細胞外から入ってきた タンパク質=非自己
キラーT細胞	抗原を認識する細胞	ヘルパーT細胞

Class I: 内在性のたんぱく質(ペプチド)を提示



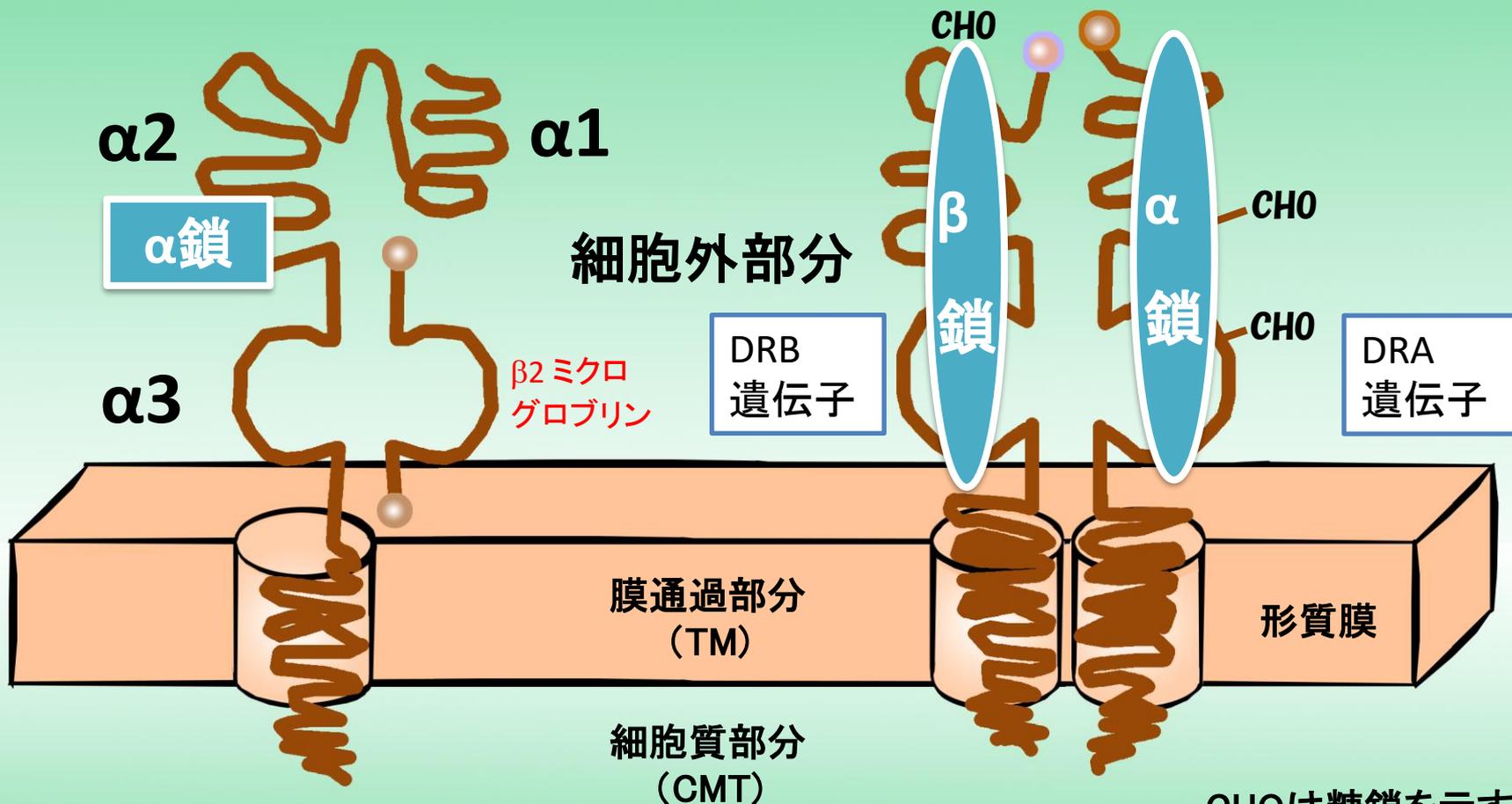
Class II: 外来性のたんぱく質(ペプチド)を提示



# HLA分子構造の模式図

## MHC Class I (HLA-A、B、C)

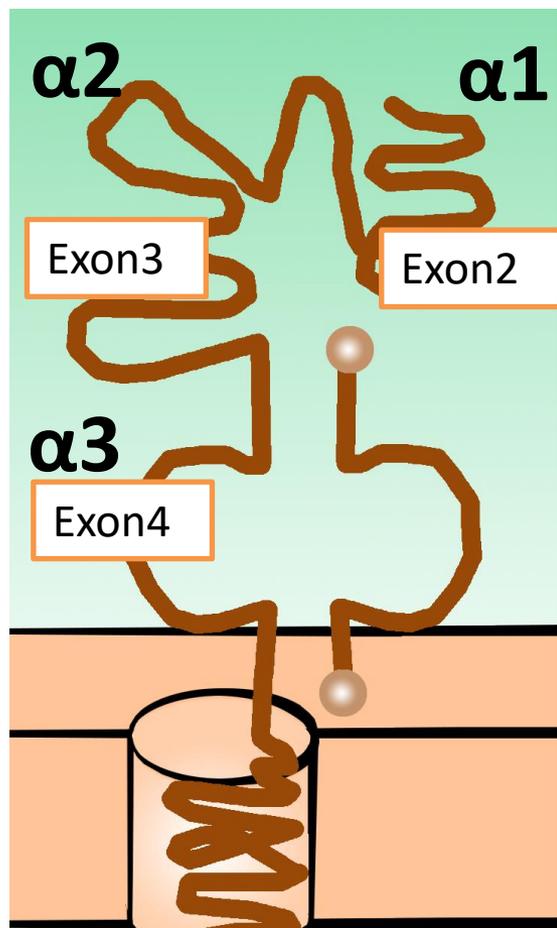
## MHC Class II (HLA-DR、DQ、DP)



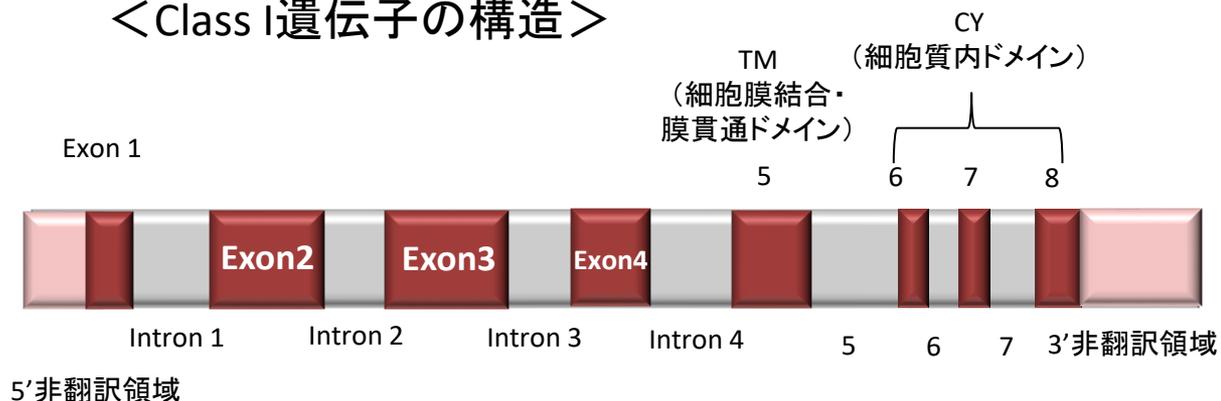
CHOは糖鎖を示す

# 分子構造と遺伝子の対応

## <分子構造>



## <Class I 遺伝子の構造>

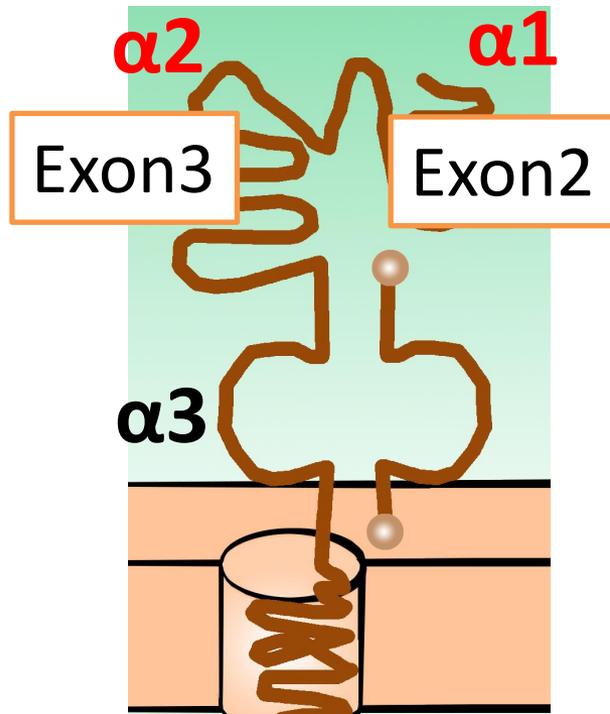


- 遺伝子の長さは約5-6 kbp (5,000-6000塩基対)
  - 分子構造に関連する箇所 (Exon)
  - 分子構造に関連しない箇所 (Intron) などで構成

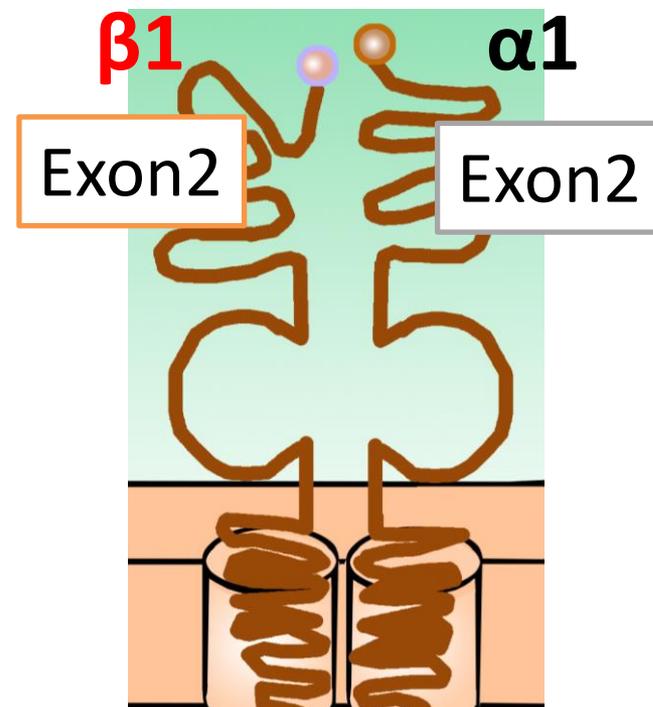
遺伝子のExon部分が分子構造と対応

# HLAタイピングとは

HLA遺伝子を解析してHLAアレルを決定すること  
Class I は $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 、Class IIは $\alpha 1$ と $\beta 1$ が抗原結合部位  
=SSP法ではClass I Exon2/3、Class II  $\beta$ 鎖のExon2を解析

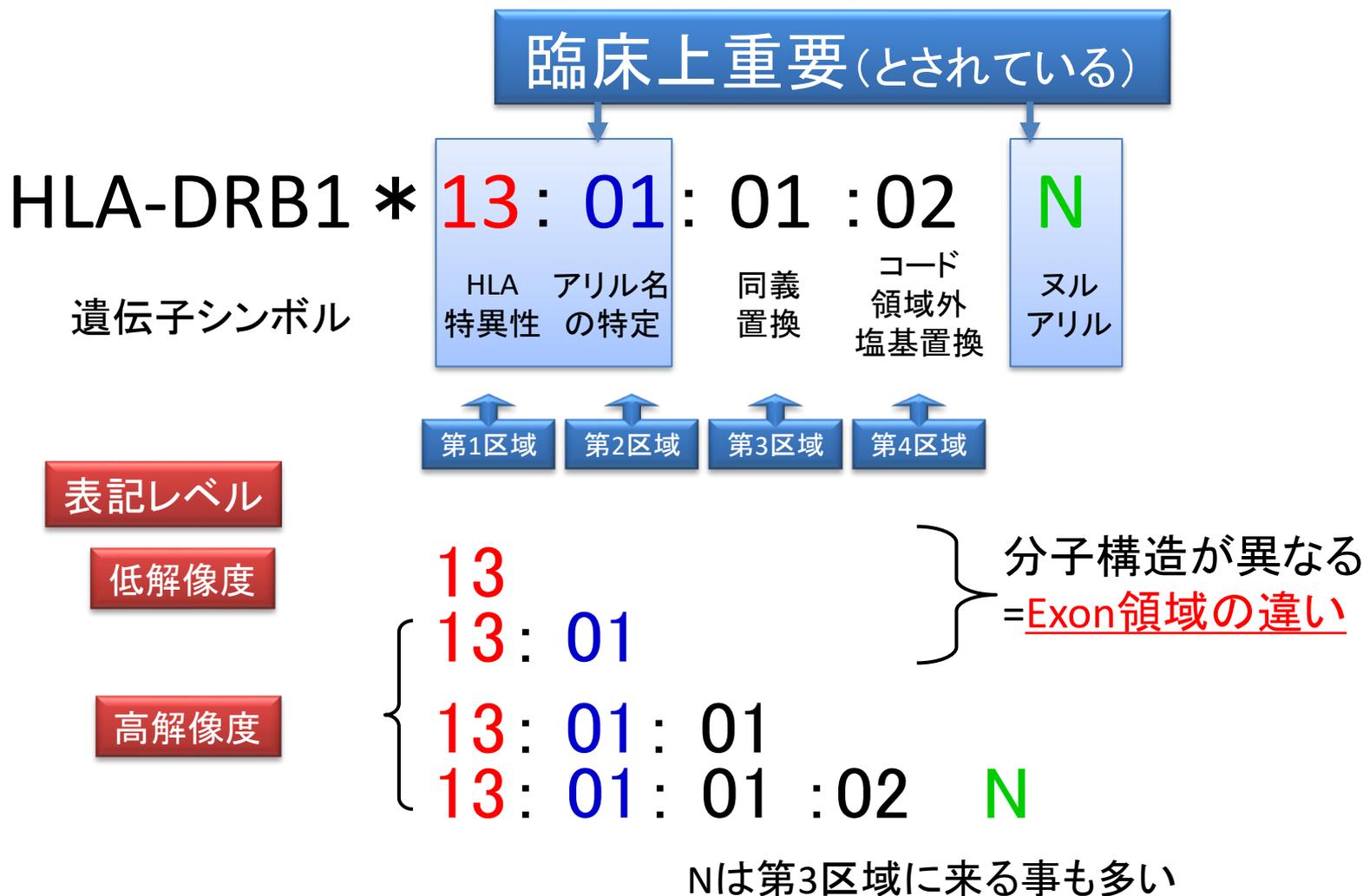


<Class I>



<Class II>

# HLAアレルの表記法 (2010年4月改訂)



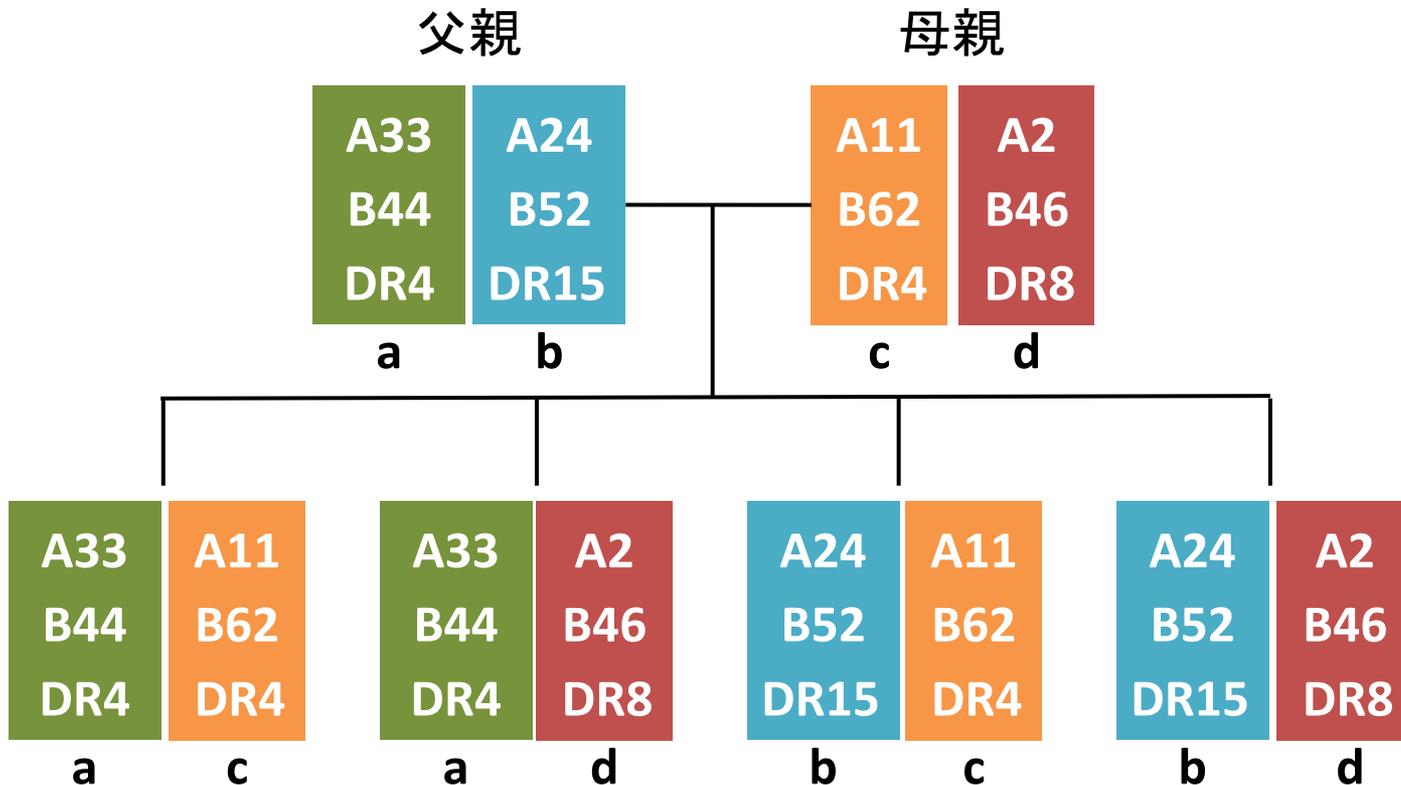
# HLAアレルの特長①人種間差

	Allele	Japanese	African American	European Caucasian
1	A*24:02	36.1	2.5	8.4
2	A*02:01	11.4	11.5	27.5
3	A*02:06	9.2	0.1	0.1
4	A*11:01	9.0	1.4	6.0
5	A*31:01	8.6	1.0	2.7

- 人種により遺伝子頻度は大きく異なる
- 膨大なアレルから頻度を参考に同定
  - 検体(人種)によってフィルターを変える必要

# HLAアレルの特長②ハプロタイプ

- 片親由来のHLAの組み合わせがハプロタイプ
  - 両親より1組ずつ受け継ぐ
  - 兄弟でタイプが全く同じになる確率は25%
- 基本的にはハプロタイプは維持される



# HLAアレルの特長③連鎖

- DR-DQなどの異なるローカスで、特定のアレルの組み合わせの頻度が有意に高くなる(連鎖不平衡)
  - 複数のローカスのタイピング結果を考慮する必要

		DQB1																	
		DQB1*05:01	DQB1*05:02	DQB1*05:03	DQB1*06:01	DQB1*06:03	DQB1*06:02	DQB1*06:04	DQB1*06:09	DQB1*02:01	DQB1*02:02	DQB1*03:01		DQB1*03:02	DQB1*04:01	DQB1*04:02			
DRB1	DQA1																		
	DRB345	DQA1*01:01	DQA1*01:02	DQA1*01:04	DQA1*01:03	DQA1*01:02	DQA1*05:01	DQA1*02:01	DQA1*03:03	DQA1*05:03	DQA1*05:05	DQA1*05:06	DQA1*05:07	DQA1*05:08	DQA1*06:01	DQA1*03:01	DQA1*03:02	DQA1*03:03	DQA1*04:01
DRB1*01:01	(Blank)																		
DRB1*10:01	(Blank)																		
DRB1*08:02	(Blank)																		
DRB1*08:03	(Blank)																		
DRB1*15:01	DRB5*01:01																		
DRB1*15:02	DRB5*01:02																		
DRB1*16:02	DRB5*02:02																		
DRB1*13:01	(Blank)																		
DRB1*12:01	DRB3*01:01																		
DRB1*14:03	DRB3*01:01																		
DRB1*14:12	DRB3*01:01																		
DRB1*03:01	DRB3*02:02																		
DRB1*11:01	DRB3*02:02																		
DRB1*13:07	DRB3*02:02																		
DRB1*14:06	DRB3*02:02																		
DRB1*14:54	DRB3*02:02																		
DRB1*14:07	DRB3*02:02																		
DRB1*14:05	DRB3*02:02																		
DRB1*12:02	DRB3*03:01																		
DRB1*13:02	DRB3*03:01																		
DRB1*04:01	DRB4*01:02																		
DRB1*04:05	DRB4*01:02																		
DRB1*04:10	DRB4*01:02																		
DRB1*04:03	DRB4*01:03																		
DRB1*04:06	DRB4*01:03																		
DRB1*04:07	DRB4*01:03																		
DRB1*07:01	DRB4*01:03																		
DRB1*09:01	DRB4*01:03																		

# 動画のご紹介 -HLAとは

- 本年3月に開催いたしましたWeb講演会「HLAのいろは」で詳しく説明しておりますので是非ご覧ください
  - [https://www.veritastk.co.jp/products/reference\\_detail/hla-iroha-2021\\_1.html](https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/hla-iroha-2021_1.html)



# SSP法について

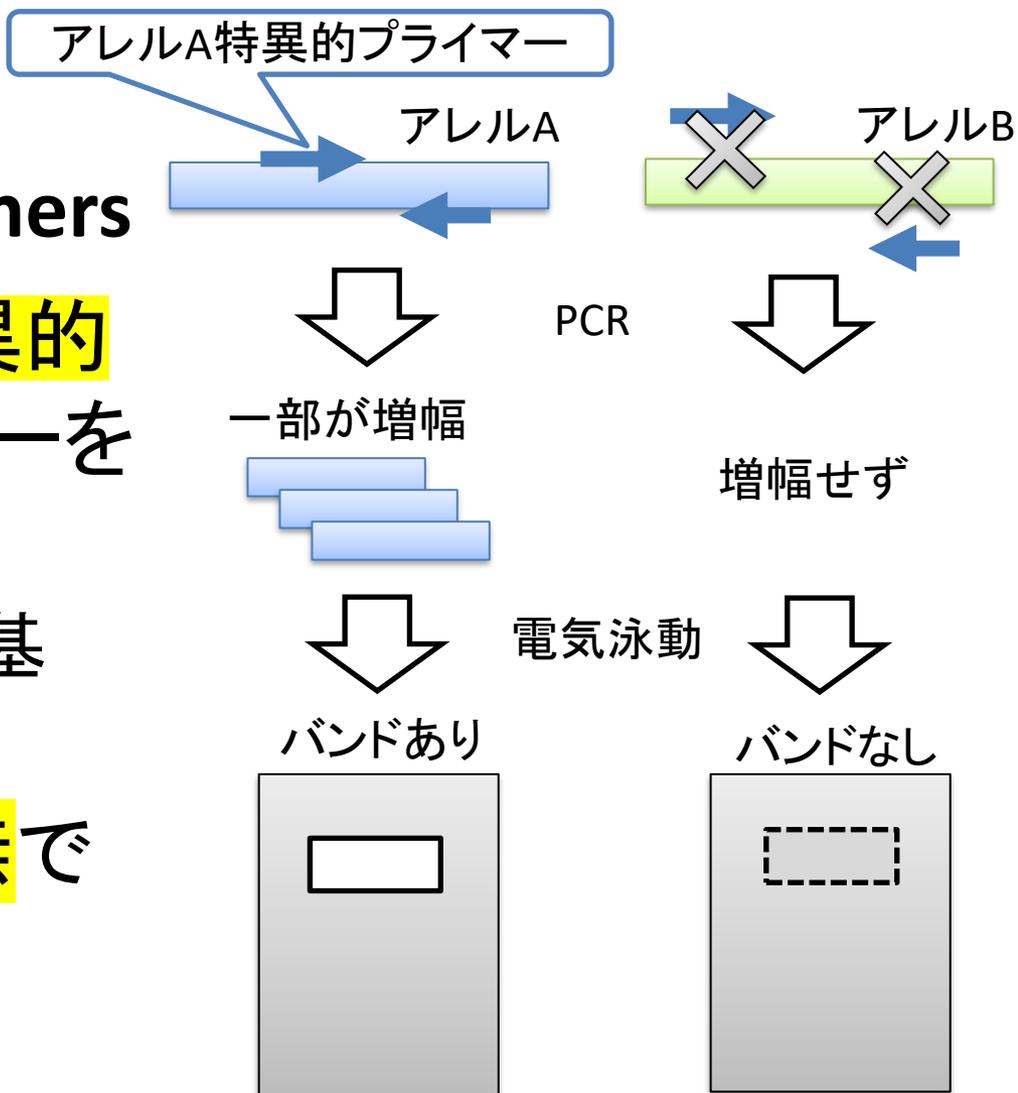
# 色々なHLAタイピング手法



# SSP法とは

## Sequence Specific Primers

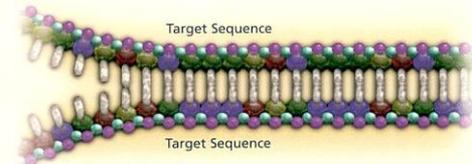
- アレルの配列に**特異的に結合する**プライマーを用いPCR増幅
  - 通常100-300 bp(塩基対)程度を増幅
- PCR**増幅産物の有無**でアレルの判定を行う



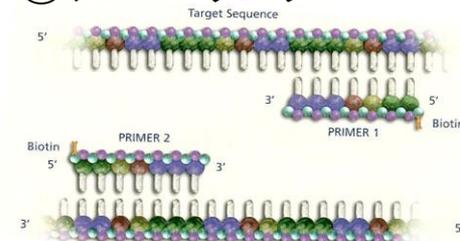
# PCR反応について

- Taqポリメラーゼ (**酵素**) を使って **DNAの一部** を **増幅**
- PCRの3ステップ
  - ①変性 (Denaturation)  
DNAを1本鎖に
  - ②アニーリング (Annealing)  
プライマーの結合
  - ③伸長 (Extension)  
2本鎖の合成

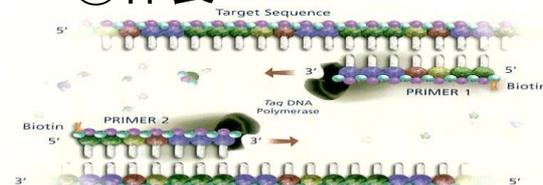
## ①変性



## ②アニーリング



## ③伸長



# One LambdaマイクロSSP製品について



## Genericトレー(抗原レベル・2桁)

- ABC/DRDQ JPN
- HLA A Typing Kit
- Class I Generic Typing Kit など

## High resolutionトレー(4桁レベル)

- Class II High Res. DRB Typing Kit など

## Allele Specificトレー(4桁レベル)

- Allele Specific B\*57 など



- 96wellフォーマットで提供
- 簡便なプロトコル
- 専用の泳動槽で3分の電気泳動

# マイクロSSPキットに含まれるもの

## ✓ タイピングトレー (4-10枚)

ウェルに含まれているもの

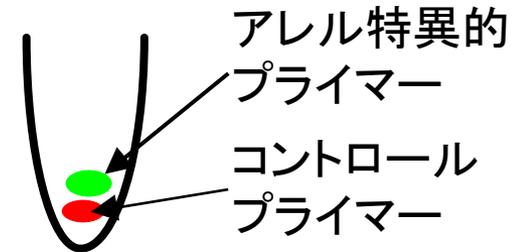
- ・ コントロールプライマー

検体DNAに必ず含まれる遺伝子を増幅

- ・ アレル特異的プライマー

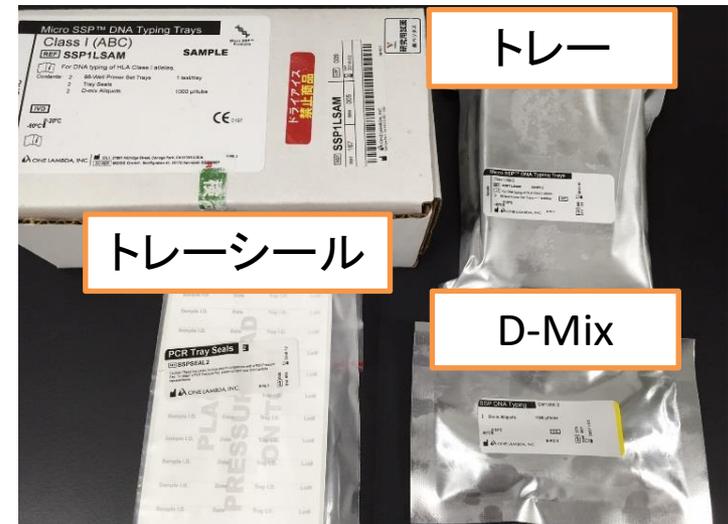
特定のアレルを増幅

1ウェル中に複数含まれる



## ✓ D-Mix溶液

## ✓ タイピングトレーシール



# キット以外に必要な試薬、器具

種類	商品名	メーカー
サーマルサイクラー	GeneAmp PCR System 9700シリーズ (アルミヘッドは不可) Veriti 96-Well サーマルサイクラー	ABI (Life Technologies)
PCRパッド	マイクロSSP PCR用パッド PE9700用	ベリタス (One Lambda) SSPPADTN
PCRポリメラーゼ	AmpliTaq DNA Polymerase Goldは不可	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) N8081060
電気泳動装置	マイクロSSP用泳動槽	ベリタス (One Lambda) MGS108
	パワーサプライ(150V用)	メーカー不問
ゲル作成機器	ゲル作成用電子レンジ	メーカー不問
電気泳動用試薬	SeaKem LE Agarose	ロンザジャパンなど (FMC Bioproducts) 50000
	エチジウムブロマイド	メーカー不問
	マイクロSSP サイズマーカー	ベリタス (One Lambda) SSP-SM
	10 × TBE	メーカー不問

# 手技のポイント

# マイクロSSPの操作ステップ

DNAの抽出

DNAと試薬の混合

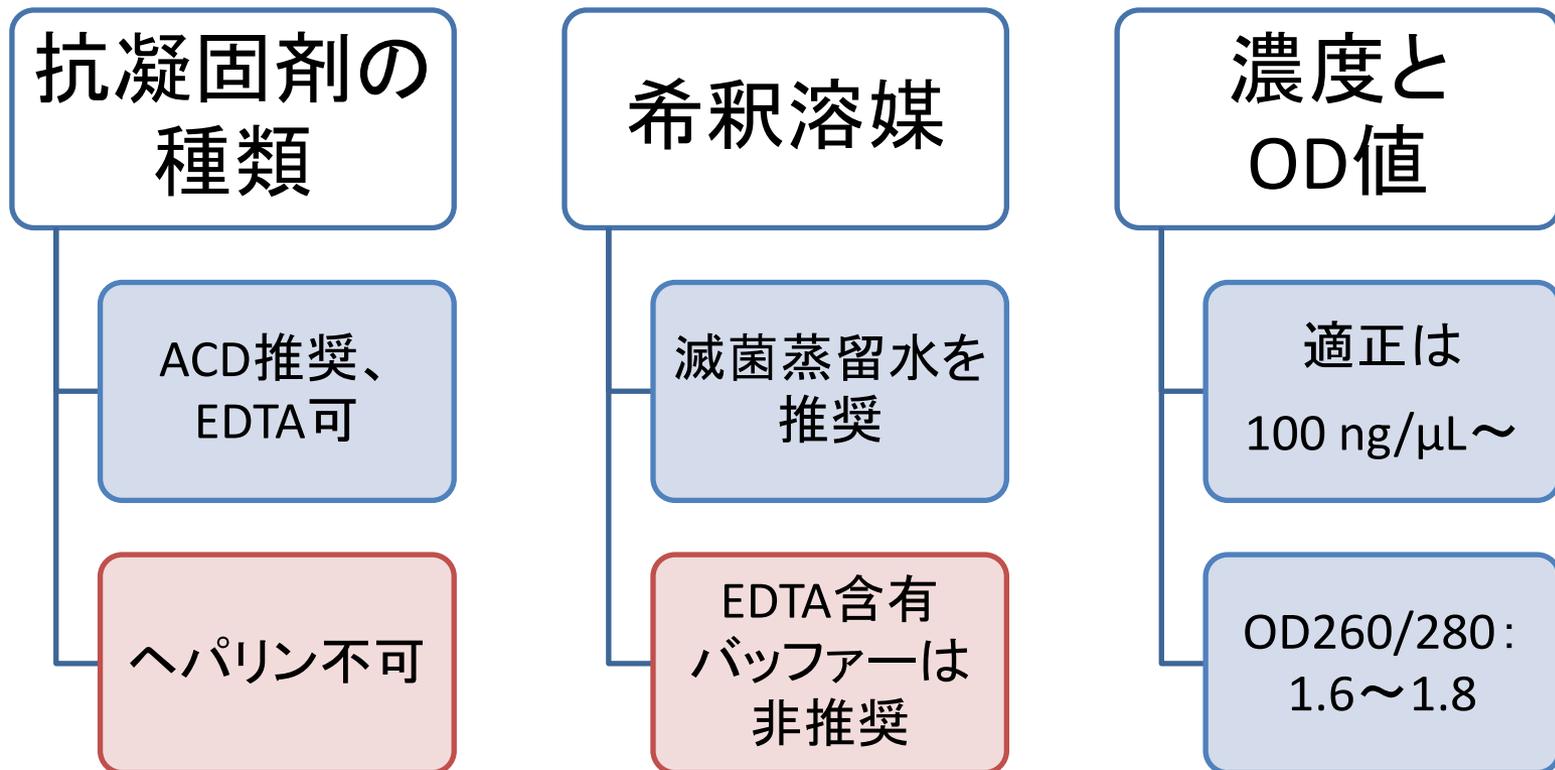
トレーへのアプライ

PCR

電気泳動

# DNAの抽出

PCRに適した品質、濃度のDNAを抽出  
PCRを阻害する成分の混入を避ける



# PCRに用いるDNAの量

酵素反応に最適な量を使用

↑ 非特異増幅

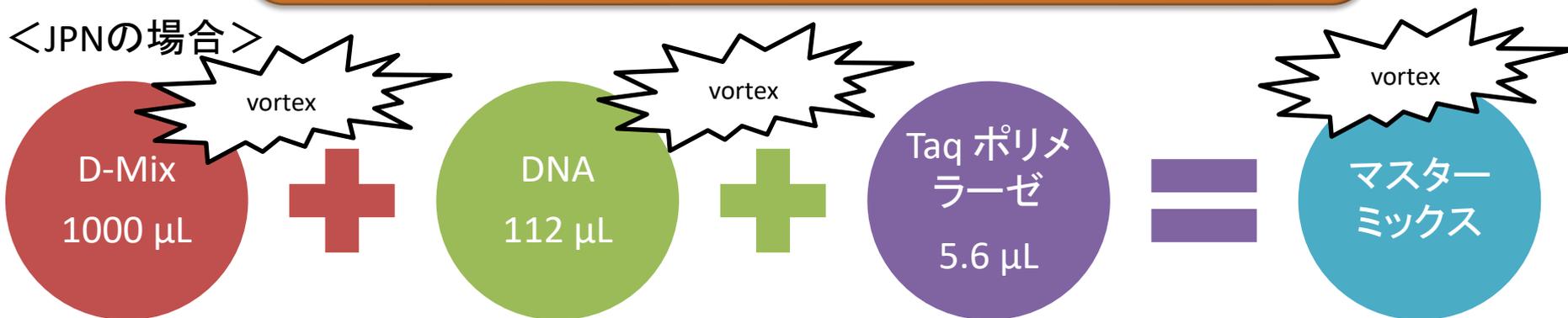
JPNの場合 : 75-150 ng/ $\mu$ L  
(100 ng / $\mu$ Lが最適)

↓ 増幅不良

# DNAとD-Mix、ポリメラーゼの混合

D-Mixの状態を確認  
ポリメラーゼは正確な量を取る  
しっかり混合、遠心

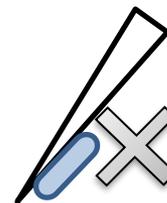
<JPNの場合>



- 室温に戻してvortex
- 黄色になった試薬は使用不可



- AmpliTaq Goldは不可
  - ポリメラーゼはvortex不可
  - 過剰量取らない
- PCR増幅不良につながる



# トレーへのアプライ

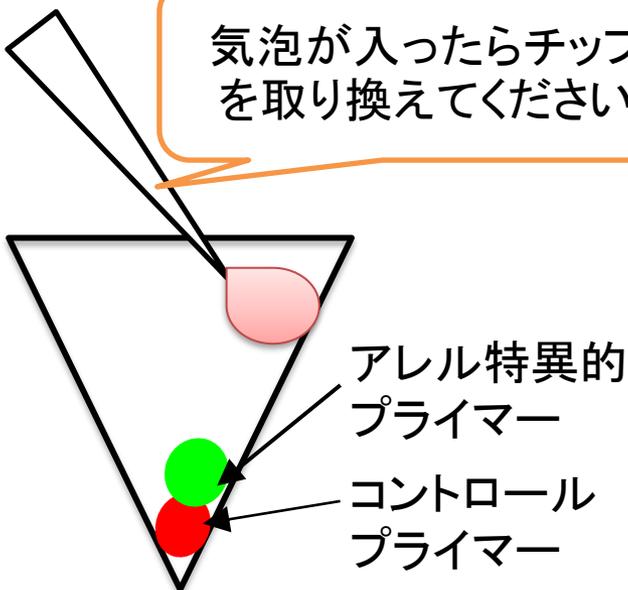
ウェルへの添加は壁面上部から  
シールをしっかりと貼る

- トレーを室温に戻し、マスターミックスを各ウェルに10 uLずつ添加
- トレーにキット付属のシールを貼る

剥がしたシールは保存  
をお勧めします



気泡が入ったらチップ  
を取り換えてください



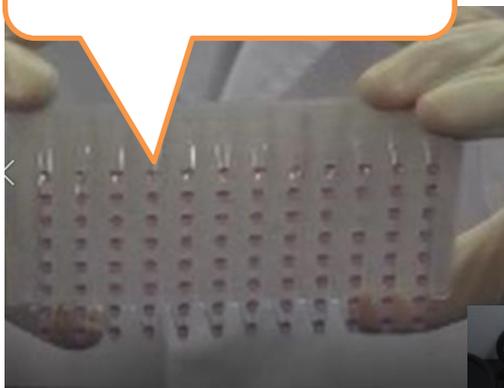
蒸発しないよう  
しっかりシール



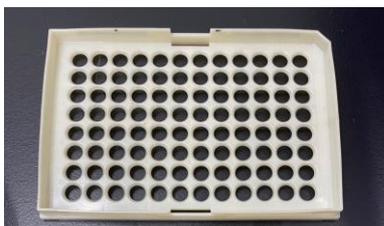
# PCR (約85分)

プラスチックトレイ、パッドでしっかり固定  
9600モードを使用

試薬がウェル底に  
あることを確認



パッド&トレイで  
蒸発防止



PCR条件 (Reaction volumeは10  $\mu$ L)

温度	時間	サイクル数
96°C	130 sec	1 cycle
63°C	60 sec	
96°C	10 sec	9 cycles
63°C	60 sec	
96°C	10 sec	20 cycles
59°C	50 sec	
72°C	30 sec	
4°C		$\infty$

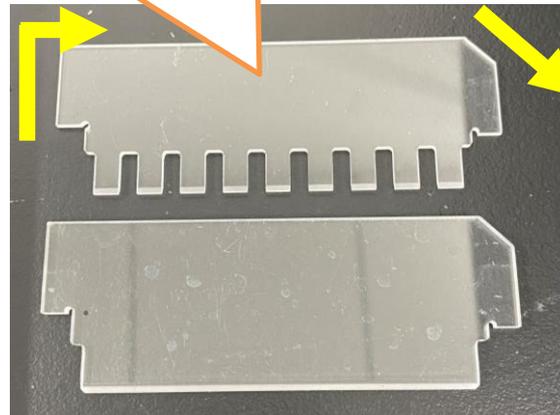
# ゲルボックスの準備

- ゲルボックスをベースにはめ、ねじで固定
- 水準器でベースが水平であることを確認
- コームをコームホルダーにセット



傾きは黒いねじ  
(3か所)で調整

上: ウェル用コーム(12枚)  
下: 電極用コーム(両端2枚)  
片側に斜めの切れ込み



手前側(赤)から見て  
右に切り込み

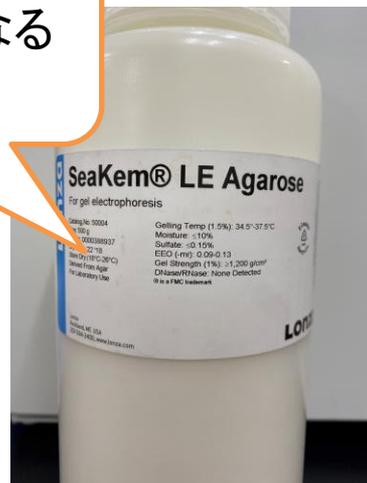


# ゲルの作製①

ゲルは用事調製  
アガロース溶解はしっかり(ただし加熱しすぎない)

- Seakem LEアガロース 0.75 g + 1 x TBE 35 mLを加熱
- 10 mg/mL エチジウムブロマイド 2  $\mu$ Lを添加

推奨品以外は  
バンドが不鮮明になる  
可能性



アガロースの結晶  
(キラキラしたもの)が  
溶けるまで混合



# ゲルの作製②

- ゲルをボックスに注ぎコームを挿し15分放置
- ゲルが固まった後1 x TBE 10 mLの一部を注ぎコームを外す
- 残りの1 x TBEを注ぐ(足りない場合は追加)



泡立えないように  
ゆっくり

コームの向き  
に注意



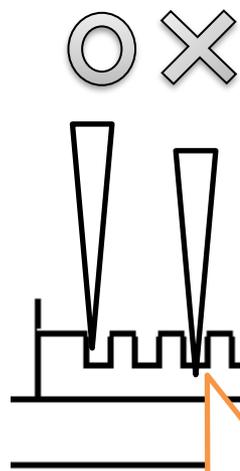
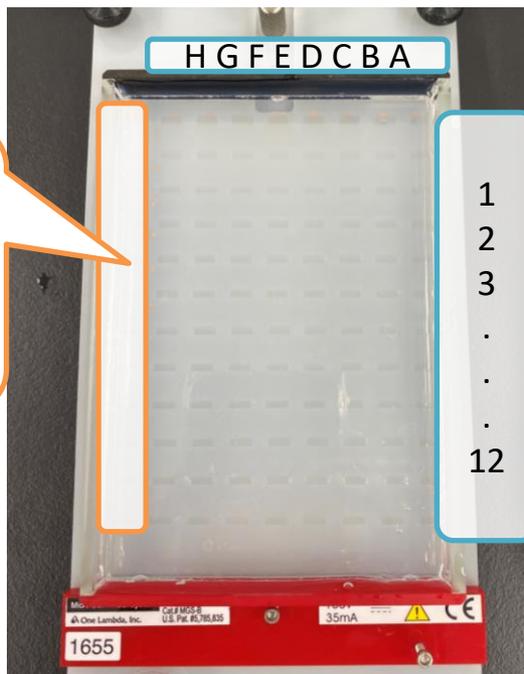
バッファは  
ゲル上部を  
覆うように

# サンプルのアプライ

アプライは8連ピペットでスムーズに入れる位置と量をチェック

- サンプルおよびサイズマーカー10 uLをアプライ

サイズマーカー  
(毎ウェルでなくても可)



チップは深く入れすぎない

時間が経つとサンプルが拡散しバンドが薄くなります



# 電気泳動、撮影

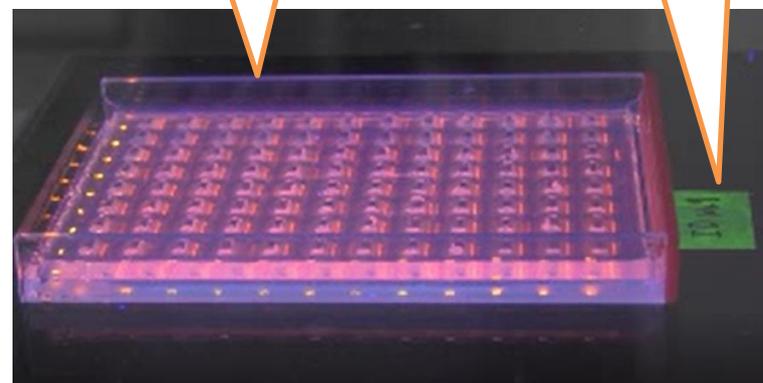
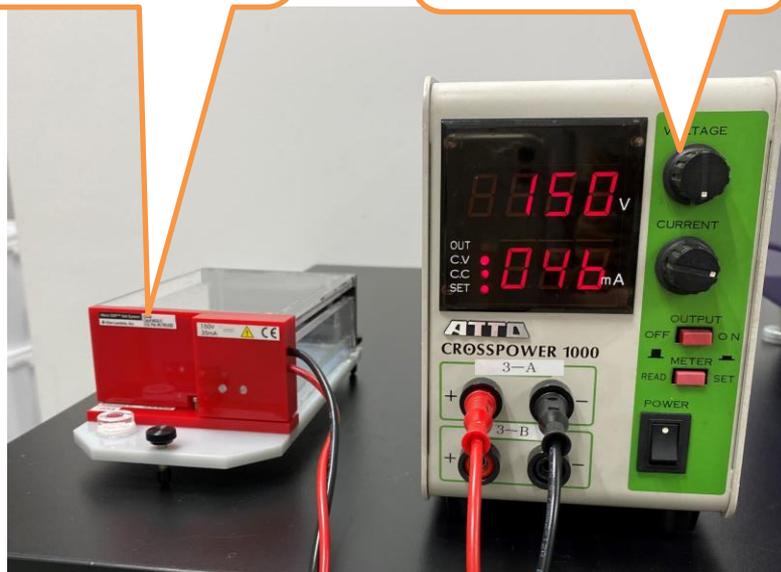
泳動は規定条件と時間で  
写真撮影はまっすぐ上からピントを合わせて

蓋の向き  
(手前が赤)

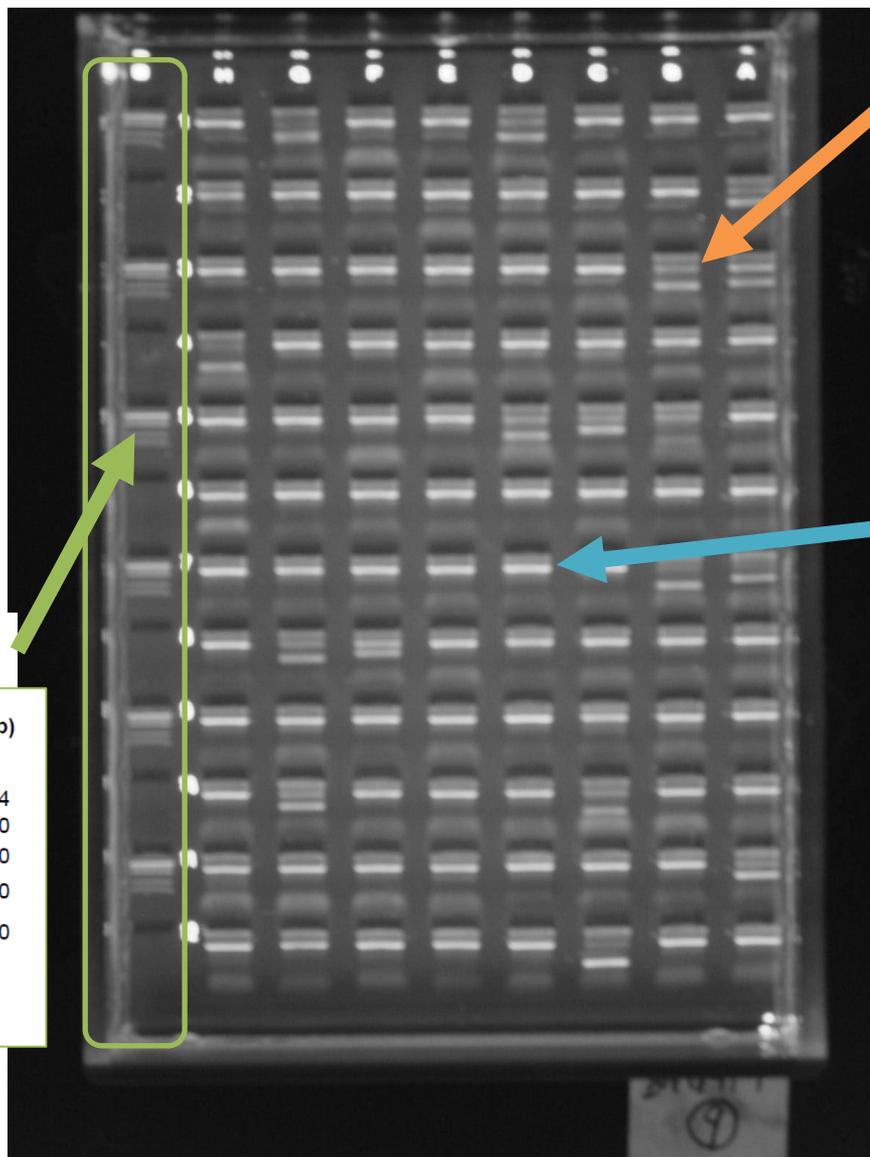
150 V、3分

ゲルボックスに  
入れたままで  
OK

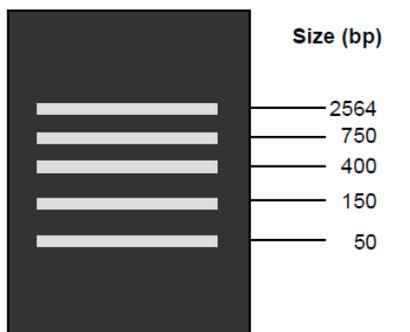
サンプルラベル  
も同時に撮影



# ゲル画像の例



サイズマーカー



## 陽性ウェル

- コントロールバンドよりも下にアレルバンドがある
- コントロールバンドは薄いか確認できない

## 陰性ウェル

- コントロールバンドのみ

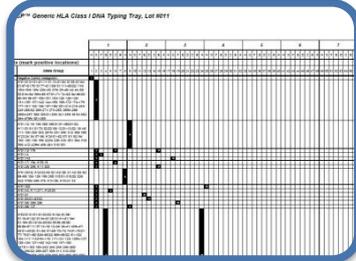
# 動画のご紹介 – マイクロSSPハンズオン

- マニュアル動画が公開中です
- [https://www.veritastk.co.jp/products/reference\\_detail/hlaprotcol-microssp.html](https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/hlaprotcol-microssp.html)



# 解析のポイント

# 解析の3つの手法



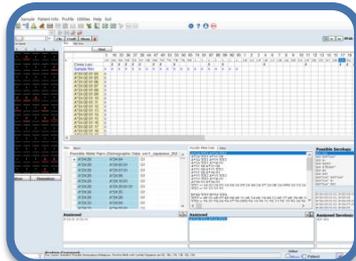
## ワークシート

- マイクロSSPすべての製品で製品ロットごとに提供(pdf)
- One Lambdaよりリリース
- 血清型ファイルの更新によりアップデート(年2回)



## マイクロSSP JPN早見表

- JPNのみ対応
- ベリタスにて作成、提供(pdf)
- JSHI推定アレル表の更新によりアップデート(年1回)

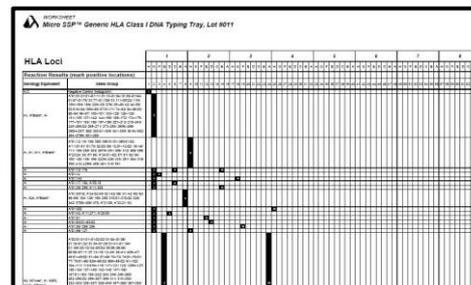
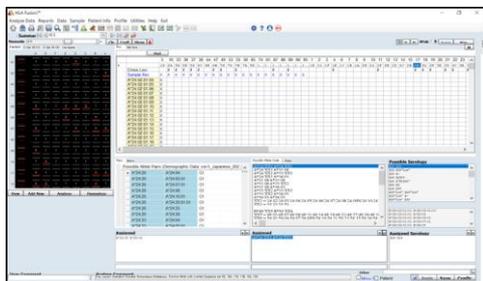


## HLA Fusion (ソフトウェア)

- マイクロSSPすべての製品に対応
- ロット、血清型ファイルの更新により解析用ファイルがアップデート

# 解析の流れ

JPN以外の場合：  
HLA Fusionで結果を確認（必要に応じワークシートを併用）

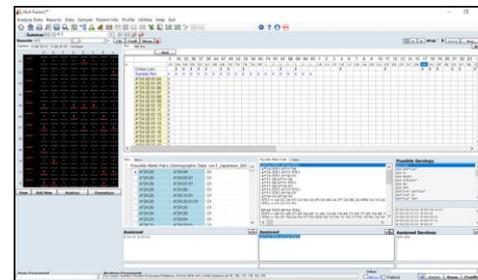


HLA Loci	1	2	3	4	5	6	7	8
A*01:01								
A*02:01								
A*03:01								
A*04:01								
A*05:01								
A*06:01								
A*07:01								
A*08:01								
A*09:01								
A*10:01								
A*11:01								
A*12:01								
A*13:01								
A*14:01								
A*15:01								
A*16:01								
A*17:01								
A*18:01								
A*19:01								
A*20:01								
A*21:01								
A*22:01								
A*23:01								
A*24:01								
A*25:01								
A*26:01								
A*27:01								
A*28:01								
A*29:01								
A*30:01								
A*31:01								
A*32:01								
A*33:01								
A*34:01								
A*35:01								
A*36:01								
A*37:01								
A*38:01								
A*39:01								
A*40:01								
A*41:01								
A*42:01								
A*43:01								
A*44:01								
A*45:01								
A*46:01								
A*47:01								
A*48:01								
A*49:01								
A*50:01								
A*51:01								
A*52:01								
A*53:01								
A*54:01								
A*55:01								
A*56:01								
A*57:01								
A*58:01								
A*59:01								
A*60:01								
A*61:01								
A*62:01								
A*63:01								
A*64:01								
A*65:01								
A*66:01								
A*67:01								
A*68:01								
A*69:01								
A*70:01								
A*71:01								
A*72:01								
A*73:01								
A*74:01								
A*75:01								
A*76:01								
A*77:01								
A*78:01								
A*79:01								
A*80:01								
A*81:01								
A*82:01								
A*83:01								
A*84:01								
A*85:01								
A*86:01								
A*87:01								
A*88:01								
A*89:01								
A*90:01								
A*91:01								
A*92:01								
A*93:01								
A*94:01								
A*95:01								
A*96:01								
A*97:01								
A*98:01								
A*99:01								
A*100:01								

JPNの場合：  
早見表で結果の予想をした後にHLA Fusionで結果を確認



HLA Locus	Allele	Antigen
A	A*01:01	A1
A	A*02:01	A2
A	A*03:01	A3
A	A*04:01	A4
A	A*05:01	A5
A	A*06:01	A6
A	A*07:01	A7
A	A*08:01	A8
A	A*09:01	A9
A	A*10:01	A10
A	A*11:01	A11
A	A*12:01	A12
A	A*13:01	A13
A	A*14:01	A14
A	A*15:01	A15
A	A*16:01	A16
A	A*17:01	A17
A	A*18:01	A18
A	A*19:01	A19
A	A*20:01	A20
A	A*21:01	A21
A	A*22:01	A22
A	A*23:01	A23
A	A*24:01	A24
A	A*25:01	A25
A	A*26:01	A26
A	A*27:01	A27
A	A*28:01	A28
A	A*29:01	A29
A	A*30:01	A30
A	A*31:01	A31
A	A*32:01	A32
A	A*33:01	A33
A	A*34:01	A34
A	A*35:01	A35
A	A*36:01	A36
A	A*37:01	A37
A	A*38:01	A38
A	A*39:01	A39
A	A*40:01	A40
A	A*41:01	A41
A	A*42:01	A42
A	A*43:01	A43
A	A*44:01	A44
A	A*45:01	A45
A	A*46:01	A46
A	A*47:01	A47
A	A*48:01	A48
A	A*49:01	A49
A	A*50:01	A50
A	A*51:01	A51
A	A*52:01	A52
A	A*53:01	A53
A	A*54:01	A54
A	A*55:01	A55
A	A*56:01	A56
A	A*57:01	A57
A	A*58:01	A58
A	A*59:01	A59
A	A*60:01	A60
A	A*61:01	A61
A	A*62:01	A62
A	A*63:01	A63
A	A*64:01	A64
A	A*65:01	A65
A	A*66:01	A66
A	A*67:01	A67
A	A*68:01	A68
A	A*69:01	A69
A	A*70:01	A70
A	A*71:01	A71
A	A*72:01	A72
A	A*73:01	A73
A	A*74:01	A74
A	A*75:01	A75
A	A*76:01	A76
A	A*77:01	A77
A	A*78:01	A78
A	A*79:01	A79
A	A*80:01	A80
A	A*81:01	A81
A	A*82:01	A82
A	A*83:01	A83
A	A*84:01	A84
A	A*85:01	A85
A	A*86:01	A86
A	A*87:01	A87
A	A*88:01	A88
A	A*89:01	A89
A	A*90:01	A90
A	A*91:01	A91
A	A*92:01	A92
A	A*93:01	A93
A	A*94:01	A94
A	A*95:01	A95
A	A*96:01	A96
A	A*97:01	A97
A	A*98:01	A98
A	A*99:01	A99
A	A*100:01	A100







# JPN早見表②



- DRB1/DRB345/DQは連鎖も確認ができます

●DRB345のアレルグループは、ワシラムタのワークシートを参照してください。

DRB1					DQB1				DRB3,4,5				9	
推定アレル AF≥0.001%	アレル表記頻度順	推定アレルに基づく HLA型 読み替え AF≥0.001%	HLA型表記	頻度(GP%)	推定アレルAF≥0.001%	アレル表記頻度順	推定アレルに基づく HLA型 読み替え AF≥0.001%	HLA表記型	推定アレルAF ≥0.001%	アレル表記頻度順	推定アレルに基づく HLA型 読み替え AF≥0.001%	HLA表記型	C	B
DRB1*01:01 DRB1*01:02	DRB1*01:01/02	DR1	DR1	5.647	DQB1*05:01 DQB1*05:02 DQB1*05:03	DQB1*05:01/03/02	DQ5	DQ5						
DRB1*15:01 DRB1*15:02 DRB1*15:04	DRB1*15:02/01/04/+	DR15	DR15	18.197	DQB1*06:01 DQB1*06:02 DQB1*06:03 DQB1*06:04 DQB1*06:09	DQB1*06:01/02/04/+	DQ6	DQ6	DRB5*01:01 DRB5*01:02 DRB5*02:02	DRB5*01:01/01:02/02:02	DR51	DR51		
					DQB1*03:01	DQB1*03:01	DQ7	DQ7						
DRB1*16:01 DRB1*16:02	DRB1*16:02/01	DR16	DR16	0.817	DQB1*05:01 DQB1*05:02 DQB1*05:03	DQB1*05:01/03/02	DQ5	DQ5	DRB5*01:01 DRB5*01:02 DRB5*02:02	DRB5*01:01/01:02/02:02	DR51	DR51		
DRB1*03:01	DRB1*03:01	DR17	DR17	0.136	DQB1*02:01 DQB1*02:02	DQB1*02:02/01	DQ2	DQ2	DRB3*01:01 DRB3*02:02 DRB3*03:01	DRB3*02:02/03:01/01:01	DR52	DR52		
DRB1*04:01 DRB1*04:03 DRB1*04:04 DRB1*04:07 DRB1*04:08	DRB1*04:03/01/07/+	DR4	DR4	4.862	DQB1*03:01	DQB1*03:01	DQ7	DQ7						
					DQB1*03:02	DQB1*03:02	DQ8	DQ8						
DRB1*04:05 DRB1*04:06 DRB1*04:09 DRB1*04:10 DRB1*04:11	DRB1*04:05/06/10/+	DR4	DR4	18.82	DQB1*04:01 DQB1*04:02	DQB1*04:01/02	DQ4	DQ4	DRB4*01:01 DRB4*01:02 DRB4*01:03	DRB4*01:03/02/01	DR53	DR53		
					DQB1*03:02	DQB1*03:02	DQ8	DQ8						
					DQB1*03:01	DQB1*03:01	DQ7	DQ7						



# HLA Fusionでの解析方法



血清型ファイル、日本人フィルタ、  
カタログファイルのインポート

解析の設定

検査情報の入力

電気泳動結果の入力

解析結果の確認

# 解析に必要なファイル

- 血清型ファイル(アレルのデータベース)
  - 年2回(4月、10月)更新
- 日本人フィルタ(JSHI推定アレル表に基づくフィルタ)
  - JPN用は年1回更新、その他は年2回更新
- カタログファイル(試薬のプライマー等のデータ)
  - ロットごとに提供
  - 年2回更新

2021年11月現在の最新ファイル一覧

	JPN	JPN以外
血清型ファイル	sero_equivalent_2019July	sero_equivalent_2021July
日本人フィルタ	IMGT337_Japanese_2021JSHI	ver2_2021_Jul_allelefilter
カタログファイル	SSPJPN_007_20	各製品の最新のファイル

# 血清型ファイルとは

sero\_equivalent\_2021January

sero\_equivalent\_2019July

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Official Name	My Name	SerologicaBw	Local	v2 Format	IMGT/HLA 3.45.1		
1152	A*02:06:30		A2			A*02:06:30		
1153	A*02:07	A0207	A2		1	A*0207		
1154	A*02:07:01		A2		1	A*02:07:01		
1155	A*02:07:01:01		A2		1	A*02:07:01:01		
1156	A*02:07:01:02		A2			A*02:07:01:02		

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Official Name	My Name	SerologicaBw	Local	v2 Format	IMGT/HLA 3.37.0		
776	A*02:06:28		A2			A*02:06:28		
777	A*02:07	A0207	A2		1	A*0207		
778	A*02:07:01		A2		1	A*02:07:01		
779	A*02:07:02		A2			A*02:07:02		
780	A*02:07:03		A2			A*02:07:03		

- IMGTのデータベースに登録されている全てのアレルがリストされています
- 最新の血清型ファイルではA\*02:07は8桁、2019年のファイルでは6桁、のように含まれるアレル情報が異なります
- 解析に使用する血清型ファイルによって、表示されるタイピング結果が異なります

# 日本人フィルタとは

- 最新の血清型ファイルを用いて、日本組織適合性学会より発表されている最新のHLA 推定アレル一覧表 (JSHI) を元に作成しています
- HLA Fusionの解析に使用することでタイピング結果が下記のように表示されます
  - G1: 対立遺伝子の両方が最新のHLA 推定アレル一覧表 (JSHI) に含まれる
  - G2: 対立遺伝子の片方が最新のHLA 推定アレル一覧表 (JSHI) に含まれる
  - G3: 対立遺伝子の両方とも最新のHLA 推定アレル一覧表 (JSHI) に含まれない

A		
A*02:01:01:01	A*02:01:01:01	G1
A*02:01:01:01	A*02:03:01	G1
A*02:01:01:01	A*02:05:01:01	G1
A*02:01:01:01	A*02:06:01:01	G1
A*02:01:01:01	A*02:07:01:01	G1
A*02:01:01:01	A*02:10	G1
A*02:01:01:01	A*02:15N	G1
A*02:01:01:01	A*02:18	G1
A*02:01:01:01	A*02:28	G1
A*02:01:01:01	A*02:42:01	G1

A*02:72	A*02:72	G1
A*02:01:01:01	A*02:01:01:02L	G2
A*02:01:01:01	A*02:01:01:03	G2
A*02:01:01:01	A*02:01:01:04	G2
A*02:01:01:01	A*02:01:01:05	G2
A*02:01:01:01	A*02:01:01:06	G2
A*02:01:01:01	A*02:01:01:07	G2
A*02:01:01:01	A*02:01:01:08	G2
A*02:01:01:01	A*02:01:01:09	G2
A*02:01:01:01	A*02:01:01:10	G2

A*02:954	A*02:59	G2
A*02:954	A*02:72	G2
A*02:01:01:02L	A*02:01:01:02L	G3
A*02:01:01:03	A*02:01:01:02L	G3
A*02:01:01:03	A*02:01:01:03	G3
A*02:01:01:03	A*02:01:01:04	G3
A*02:01:01:03	A*02:01:01:05	G3
A*02:01:01:03	A*02:01:01:06	G3
A*02:01:01:03	A*02:01:01:07	G3
A*02:01:01:03	A*02:01:01:08	G3

日本人フィルタに含まれるアレルは青でハイライト表示されます

# 血清型ファイルと日本人フィルタ

① sero\_equivalent\_2021January

② sero\_equivalent\_2019July

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Official Name	My Name	SerologicaBw	Local	v2 Format	IMGT/HLA 3.45.1		
1152	A*02:06:30		A2			A*02:06:30		
1153	A*02:07	A0207	A2		1	A*0207		
1154	A*02:07:01		A2		1	A*02:07:01		
1155	A*02:07:01:01		A2		1	A*02:07:01:01		
1156	A*02:07:01:02		A2			A*02:07:01:02		

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Official Name	My Name	SerologicaBw	Local	v2 Format	IMGT/HLA 3.37.0		
776	A*02:06:28		A2			A*02:06:28		
777	A*02:07	A0207	A2		1	A*0207		
778	A*02:07:01		A2		1	A*02:07:01		
779	A*02:07:02		A2			A*02:07:02		
780	A*02:07:03		A2			A*02:07:03		

- 血清型ファイルと日本人フィルタ(またはカタログファイル)のバージョンが異なると、G1に表示される結果が異なります

血清型ファイル	日本人フィルタ	G1に表示される結果
sero_equivalent_2021January	ver2_2021_Jul_allelefilter	A*02:07:01:01
sero_equivalent_2021January	ver1_2019_July_allelefilter	A*02:07:01:01がG3に表示

# ファイルのバージョンの確認方法①

HLA Fusion™ Home

Product	Catalogs	Last	# of	# of	Recent
LABType	25	2021/11/07	1	5	2021/09/16
SSP	3	2021/11/07	2	2	2021/10/01
LABScreen	29	2021/11/04	33	131	2021/11/04
LAT	0		0	0	
FlowPRA	0		0	0	
LCT	0		0	0	

System  
Sero Equivalent: 3.45.1/2021July;

Database  
HLA Fusion: (local)\FUSION\_SQL14EXP\210909  
\_FUSION44  
Used - 2% - 260 MB of 10240 MB DB size  
Audit Log: N/A  
Audit Log Status: ■

血清型ファイルの確認

HLA Fusion™ Micro SSP

Batch Entry

Include Imported

c:\OLI FUSION\data  
CSV File Name

Locus Type	Catalogs	Last	# of	# of	Recent
			0	0	
			0	0	
			0	0	

Code: NMDP  
Updated On: Local  
Imported On: Local

Alele Frequency Filter: **ver1\_Japanese\_2021\_Jul\_GF2021.**

Number of False Positives: 1  
Show Well ID: False  
Computer Assigned Serology: No

Catalog	Nomenclature Date	IMGT Version	Catalog Description	Worksheet (8.5x11)	Worksheet (11x17)	Probe/Primer	Datasheet
<a href="#">SSP1L_011_09</a>	July 2021	3.45.1	Micro SSP™ Generic ...				
<a href="#">SSPABDR_011_09</a>	July 2021	3.45.1	Micro SSP™ Generic ...				
<a href="#">SSP2L_007_27</a>	July 2021	3.45.1	Micro SSP™ Generic ...				

IMGTのバージョンが同じことを確認

日本人フィルタの確認

カタログファイルの確認

# ファイルのバージョンの確認方法②

**日本人フィルタの確認**

Possible Allele Pairs (Demographic Data: ver1\_Japanese\_2021\_Jul\_GF2021JSHI)

Allele 1	Allele 2	Group
A*02:01:01:01	A*02:01:01:01	G1
A*02:01:01:01	A*02:03:01:01	G1

**カタログファイルの確認**

Possible Allele Code | Allele

Allele Code	Allele
A*02:01:01:01	A*02:01:01:01
A*02:01:01:01	A*02:03:01:01
A*02:01:01:01	A*02:05:01:01
A*02:01:01:01	A*02:06:01:01
A*02:01:01:01	A*02:07:01:01
A*02:01:01:01	A*02:10
A*02:01:01:01	A*02:15N
A*02:01:01:01	A*02:18
A*02:01:01:01	A*02:28
A*02:01:01:01	A*02:42:01
A*02:01:01:01	A*02:53N
A*02:01:01:01	A*02:59
A*02:01:01:01	A*02:72

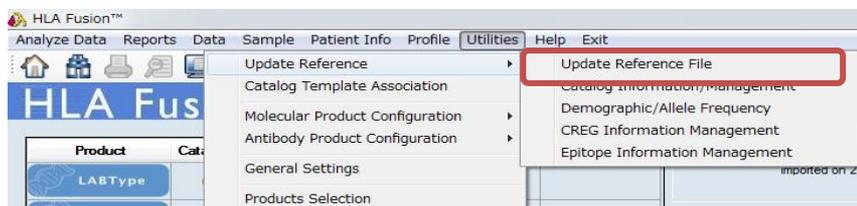
Assigned Allele: **CID SSPABDR\_011\_09** | NOM/Img | July 2021/3.45.1

Assigned Serology: A\*02:01:01:01 A\*02:01:01:03 A\*02:01:01:01 A\*02:01:01:04 A\*02:01:01:01 A\*02:01:01:05 A\*02:01:01:01 A\*02:01:01:06

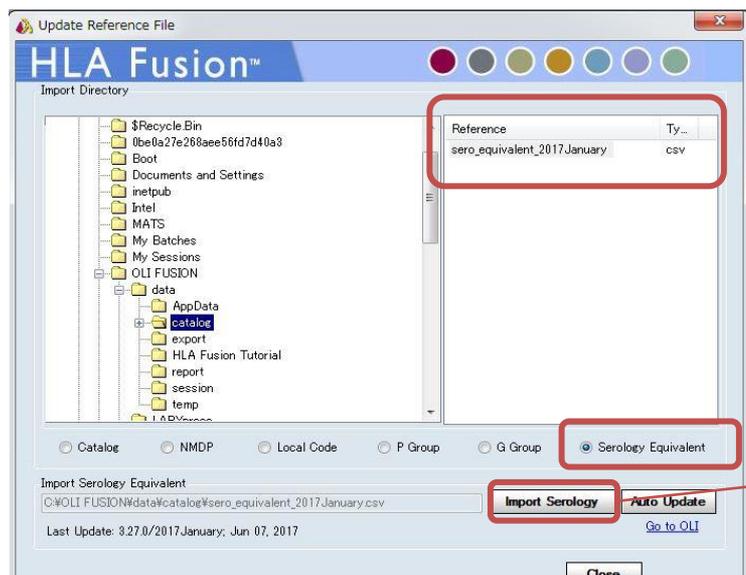
Well 1 PID LID SID | Micro SSP\_20211107170849 | CID SSPABDR\_011\_09 | NOM/Img | July 2021/3.45.1 | test Date D21/11/0 | Ver | 4.4.0

# 血清型ファイルのインポート

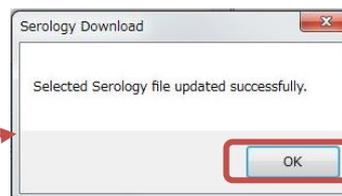
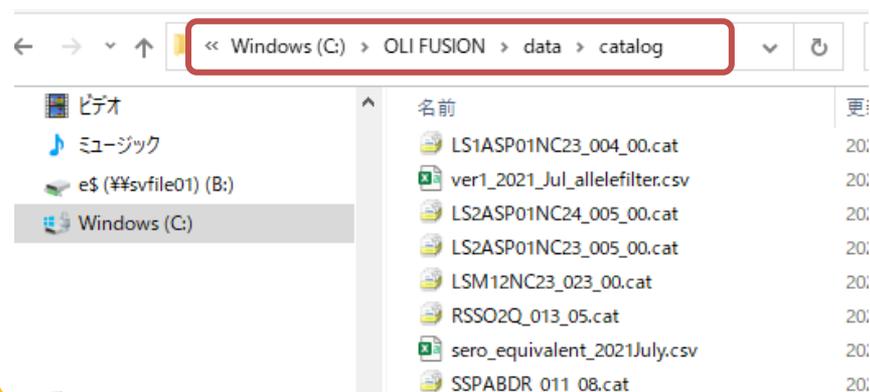
## ① Utilities→Update Reference→ Update Reference File



## ② Serology Equivalent→血清型ファイルを選択→import serology

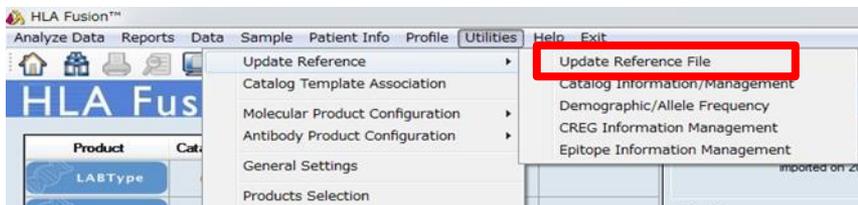


## 解析用ファイルの保存場所



# カタログファイルのインポート

## ① Utilities → Update Reference → Update Reference File



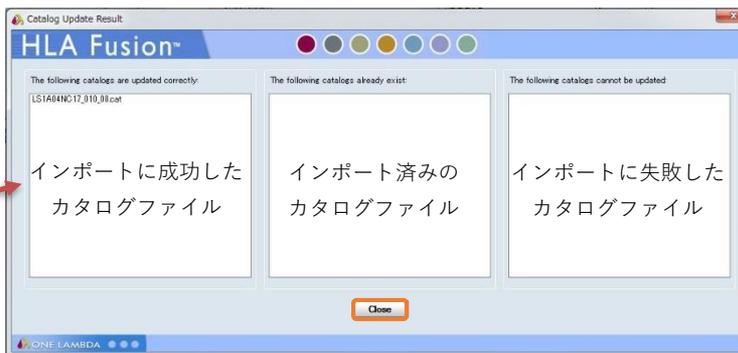
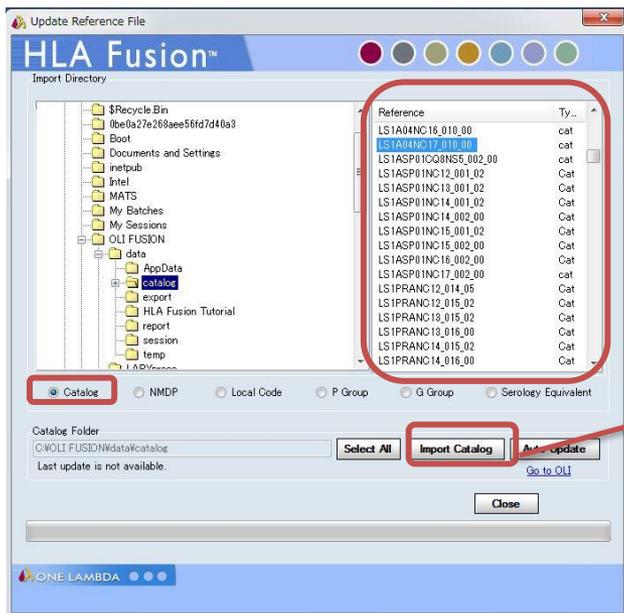
カタログファイルの名前

製品コード\_ロット\_バージョン

SSPJPN\_007\_20.cat

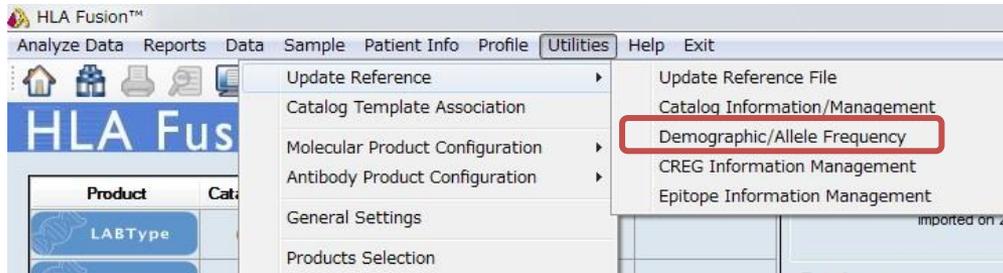
SSPABDR\_011\_08.cat

## ② Catalog → 該当ファイルを選択 → Import Catalog

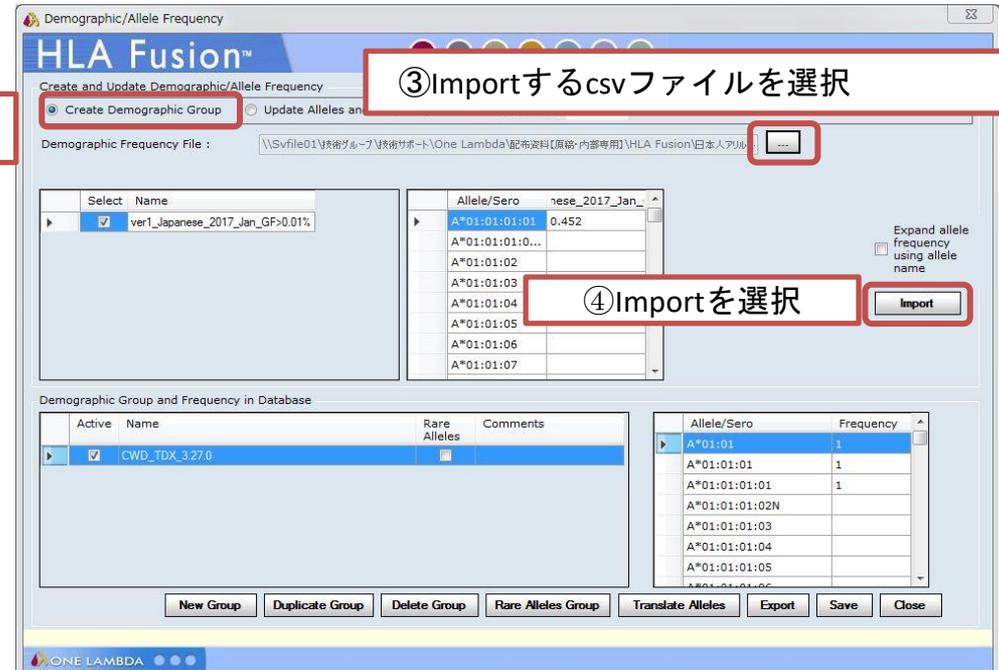


# 日本人フィルタのインポート①

①Utilities>Update Reference>Demographic Allele



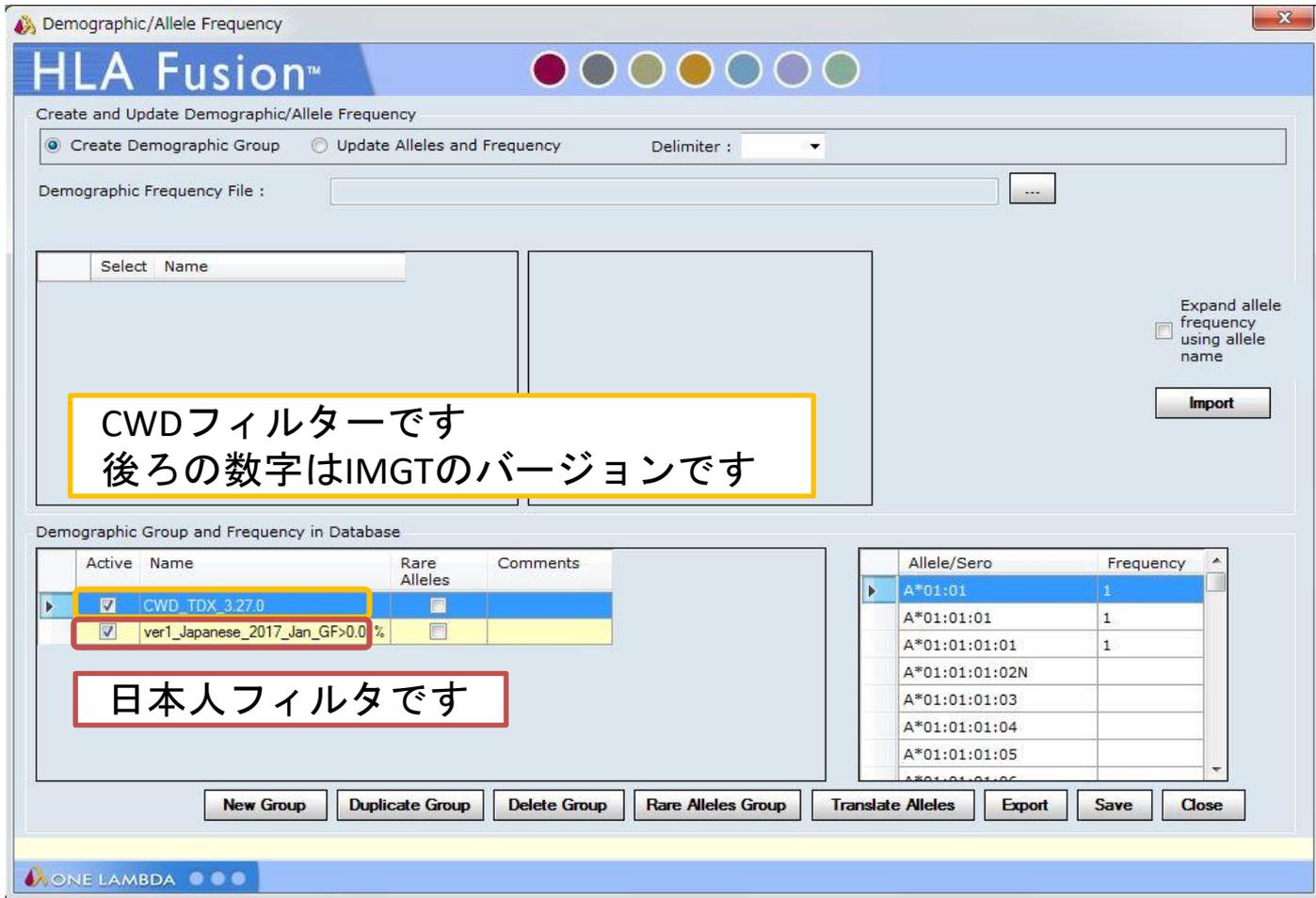
②Create...を選択



③Importするcsvファイルを選択

④Importを選択

# 日本人フィルタのインポート②



The screenshot shows the HLA Fusion software interface. The main window title is "Demographic/Allele Frequency". The interface includes a header with the "HLA Fusion™" logo and a set of colored circles. Below the header, there are radio buttons for "Create Demographic Group" (selected) and "Update Alleles and Frequency", along with a "Delimiter" dropdown menu. A text field for "Demographic Frequency File" is present with a browse button. A large empty box is intended for file selection. To the right, there is a checkbox for "Expand allele frequency using allele name" and an "Import" button.

A yellow-bordered text box contains the following text:

CWDフィルターです  
後ろの数字はIMGTのバージョンです

The "Demographic Group and Frequency in Database" section contains two tables:

Active	Name	Rare Alleles	Comments
<input checked="" type="checkbox"/>	CWD_TDX_3.27.0	<input type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	ver1_Japanese_2017_Jan_GF>0.0 %	<input type="checkbox"/>	

A red-bordered text box contains the following text:

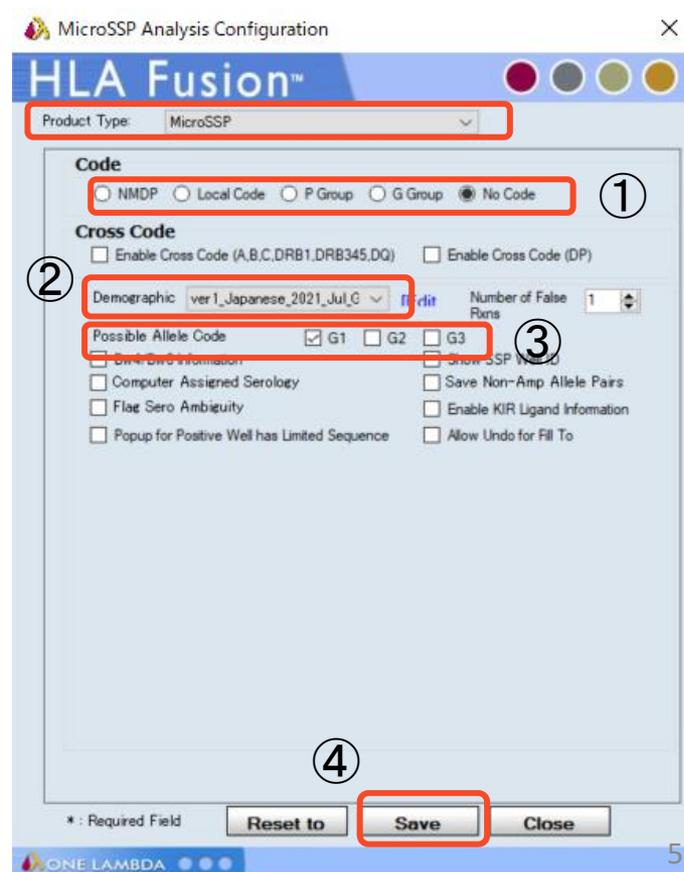
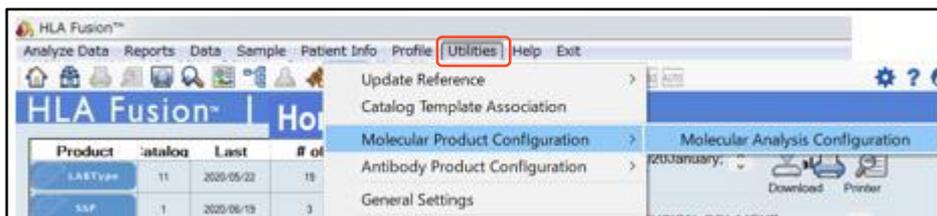
日本人フィルタです

Allele/Sero	Frequency
A*01:01	1
A*01:01:01	1
A*01:01:01:01	1
A*01:01:01:02N	
A*01:01:01:03	
A*01:01:01:04	
A*01:01:01:05	
A*01:01:01:06	

At the bottom of the interface, there are several buttons: "New Group", "Duplicate Group", "Delete Group", "Rare Alleles Group", "Translate Alleles", "Export", "Save", and "Close". The bottom status bar shows "ONE LAMBDA" and a set of colored circles.

# 解析の設定

- 日本人フィルタ、結果表示の方法を設定します
- Utilities>Molecular Product Configuration>Molecular Analysis Configuration



- ① Codeを「No Code」に設定
- ② 日本人フィルタを設定
- ③ 結果表示するグループを設定  
G1のみのチェックを推奨
- ④ Save

# 結果表示の設定

**G1のみ表示**

Possible Allele Code 1 Allele

- A\*02:01:01:01/02:03:01:01/02:05:01:01/02:06:01:01/02:07:01:01/02:10/02:15N/02:18/02:28/02:42:01/02:53N/02:59/02:72
- A\*02:01:01:01/02:03:01:01/02:05:01:01/02:06:01:01/02:07:01:01/02:10/02:15N/02:18/02:28/02:42:01/02:53N/02:59/02:72
- B\*40:02:01:01/40:50:01:01
- B\*51:01:01:01/51:03/51:07:01
- DRB1\*14:02:01:01/14:03:01/14:05:01:01/14:06:01/14:12:01/14:18/14:29/14:45
- DRB1\*15:01:01:01/15:04
- DRB3\*01:01:02:01/01:01:05
- DRB5\*01:01:01:01/01:02:01
- DRB3\*01:01:02:01/01:01:05
- DRB5\*02:02:01

**G1,G2,G3全てを表示**

Possible Allele Code 1 Allele

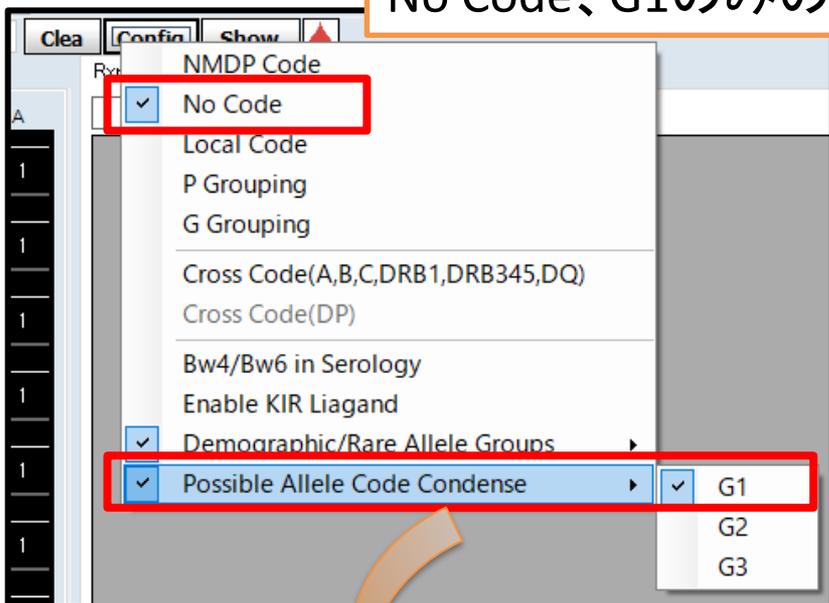
- A\*02:01:01:01/02:01:01:02L/02:01:01:03/02:01:01:04/02:01:01:05/02:01:01:06/02:01:01:07/02:01:01:08/02:01:01:09/02:01:01:10/02:01:01:11
- A\*02:01:01:01/02:01:01:02L/02:01:01:03/02:01:01:04/02:01:01:05/02:01:01:06/02:01:01:07/02:01:01:08/02:01:01:09/02:01:01:10/02:01:01:11
- B\*40:02:01:01/40:02:01:02/40:02:01:03/40:02:01:04/40:02:01:05/40:02:01:06/40:02:01:07/40:02:01:08/40:02:01:09/40:02:01:10/40:02:01:11
- B\*51:01:01:01/51:01:01:02/51:01:01:03/51:01:01:04/51:01:01:05/51:01:01:06/51:01:01:07/51:01:01:08/51:01:01:09/51:01:01:10/51:01:01:11
- DRB1\*13:178/13:193
- DRB1\*15:01:01:01/15:01:01:02/15:01:01:03/15:01:01:04/15:01:01:05/15:01:01:06/15:01:01:07/15:01:01:08/15:01:02/15:01:03/15:01:04/15:01:05
- DRB1\*14:02:01:01/14:02:01:02/14:02:03/14:02:04/14:02:05/14:02:06/14:02:07/14:02:08/14:02:09/14:03:01/14:03:02/14:05:01:01/14:05:01:02/14:05:01:03/14:05:01:04/15:01:01:05/15:01:01:06/15:01:01:07/15:01:01:08/15:01:02/15:01:03/15:01:04/15:01:05
- DRB3\*01:01:02:01/01:01:02:02/01:01:02:03/01:01:02:04/01:01:02:05/01:01:02:06/01:01:03/01:01:04/01:01:05/01:01:06/01:01:07/01:01:08/01:01:09/01:01:10/01:01:11
- DRB5\*01:01:01:01/01:01:01:02/01:01:01:03/01:01:01:04/01:01:01:05/01:01:01:06/01:01:02/01:01:03/01:01:04/01:01:05/01:01:06/01:01:07/01:01:08/01:01:09/01:01:10/01:01:11
- DRB3\*01:01:02:01/01:01:02:02/01:01:02:03/01:01:02:04/01:01:02:05/01:01:02:06/01:01:03/01:01:04/01:01:05/01:01:06/01:01:07/01:01:08/01:01:09/01:01:10/01:01:11
- DRB5\*02:02:01/02:02:02/02:02:03/02:02:04/02:03/02:04/02:05/02:06/02:07/02:08/02:09/02:10/02:11/02:12/02:13/02:14/02:16/02:17/02:18
- DRB3\*02:01:02:01/01:02:02:01/02:02:01:03/02:02:01:04/02:02:01:05/02:02:01:06/02:02:01:07/02:02:01:08/02:02:01:09/02:02:01:10/02:02:01:11
- DRB5\*01:01:01:01/01:01:01:02/01:01:01:03/01:01:01:04/01:01:01:05/01:01:01:06/01:01:01:07/01:01:01:08/01:01:01:09/01:01:01:10/01:01:01:11
- DRB3\*02:01:02:02:01/02:02:01:02/02:02:01:03/02:02:01:04/02:02:01:05/02:02:01:06/02:02:01:07/02:02:01:08/02:02:01:09/02:02:01:10/02:02:01:11
- DRB5\*02:02:01/02:02:02/02:02:03/02:02:04/02:03/02:04/02:05/02:06/02:07/02:08/02:09/02:10/02:11/02:12/02:13/02:14/02:16/02:17/02:18

Assigned Allele

Assigned Serology

# 結果表記について(QCWSの指摘事項)

No Code、G1のみの表示にします

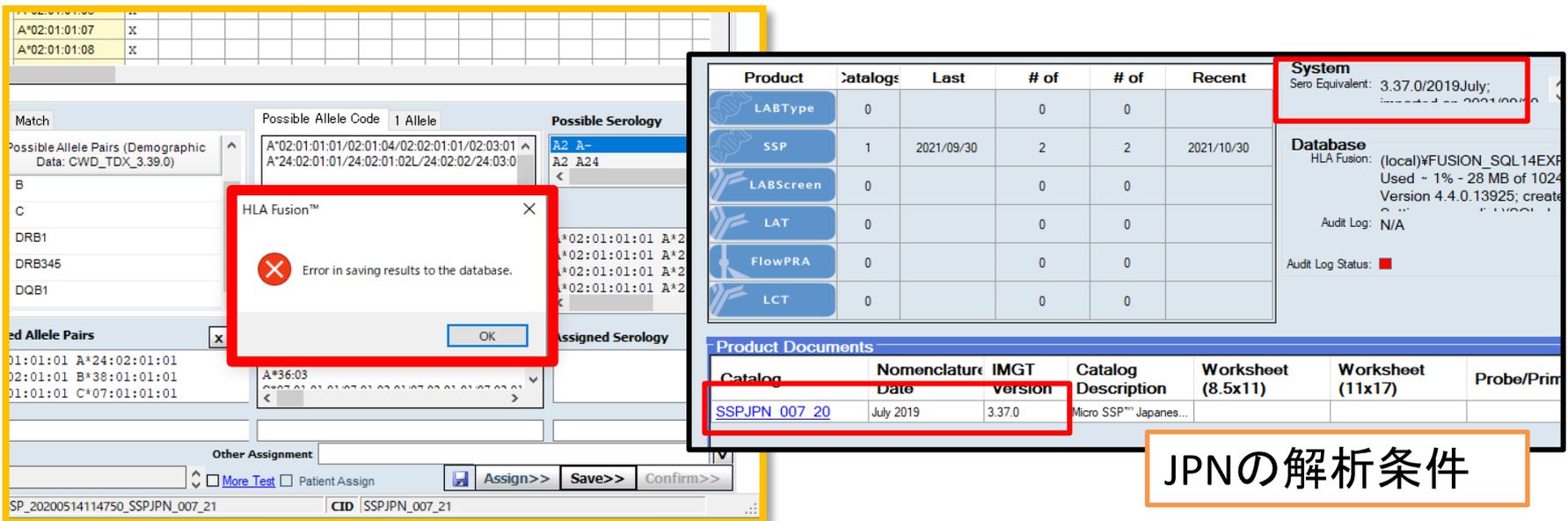


JSHIより公開されている最新のHLA 推定アレル一覧表に含まれるアレルのみが Ambiguityの候補として表示されます  
→頻度順に3つ記載してください  
例) A\*02:01/06/07/+

Possible Allele Code	1 Allele
A*02:01:01:01/02:03:01:01/02:05:01:01/02:06:01:01/02:07:01:01/02:10:02:15N/02:18/02:28/02:42:01/02:53N/02:59/02:72	
A*02:01:01:01/02:03:01:01/02:05:01:01/02:06:01:01/02:07:01:01/02:10:02:15N/02:18/02:28/02:42:01/02:53N/02:59/02:72	
B*40:02:01:01/40:50:01:01	
B*51:01:01:01/51:03/51:07:01	
DRB1*14:02:01:01/14:03:01:01/14:05:01:01/14:06:01/14:12:01/14:18/14:29/14:45	
DRB1*15:01:01:01/15:04	
DRB3*01:01:02:01/01:01:05	
DRB5*01:01:01:01/01:02:01	
DRB3*01:01:02:01/01:01:05	
DRB5*02:02:01	

# JPNの注意事項

- 血清型ファイル(IMGMT)のバージョンが3.39以降の場合、解析結果がSaveできないエラーが発生しております
  - JPN専用のデータベースで解析してください



The screenshot displays the HLA Fusion software interface. A red box highlights an error message: "Error in saving results to the database." Another red box highlights the "System" information, showing "Sero Equivalent: 3.37.0/2019July;". A third red box highlights the "Product Documents" table, specifically the row for "SSPJPN\_007\_20" with "Date" July 2019 and "version" 3.37.0. An orange box at the bottom right contains the text "JPNの解析条件".

Product	Catalogs	Last	# of	# of	Recent
LABType	0		0	0	
SSP	1	2021/09/30	2	2	2021/10/30
LABScreen	0		0	0	
LAT	0		0	0	
FlowPRA	0		0	0	
LCT	0		0	0	

Catalog	Nomenclature	IMGMT	Catalog	Worksheet	Worksheet	Probe/Prim
	Date	version	Description	(8.5x11)	(11x17)	
SSPJPN_007_20	July 2019	3.37.0	Micro SSP™ Japanes...			

# データベースの変更



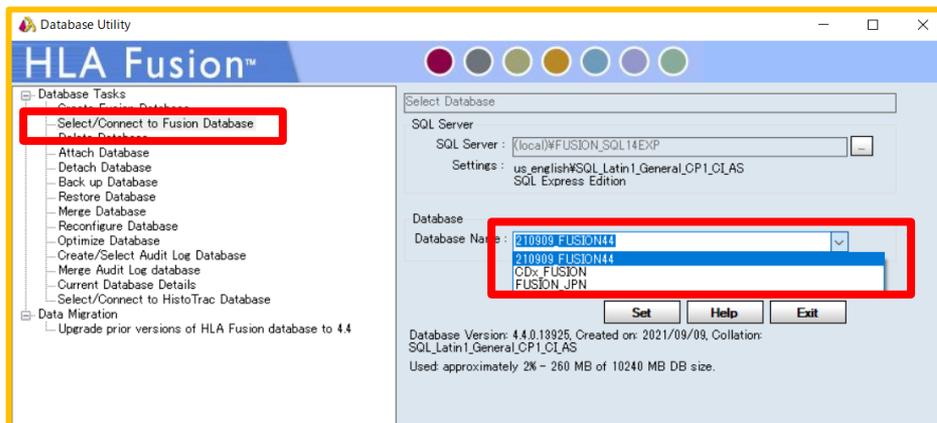
HLA Fusion



	JPN以外
血清型ファイル	sero_equivalent_2021July
日本人フィルタ	ver2_2021_Jul_allelefilter
カタログファイル	各製品の最新のファイル



	JPN
血清型ファイル	sero_equivalent_2019July
日本人フィルタ	IMGT337_Japanese_2021JSHI
カタログファイル	SSPJPN_007_20



# 動画のご紹介 –HLA Fusionの使用法

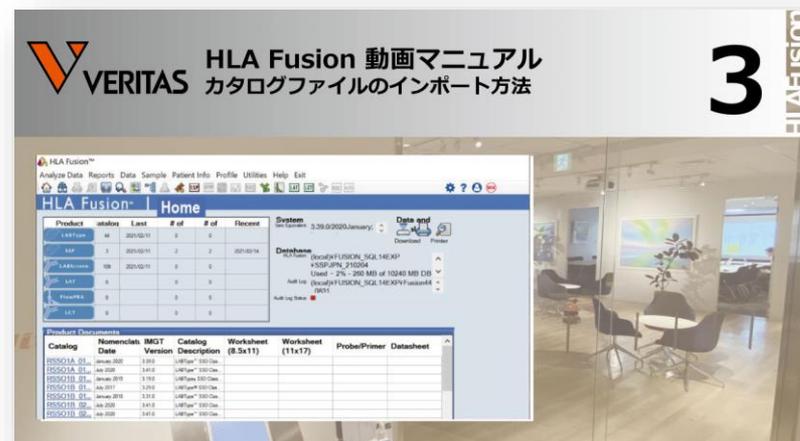
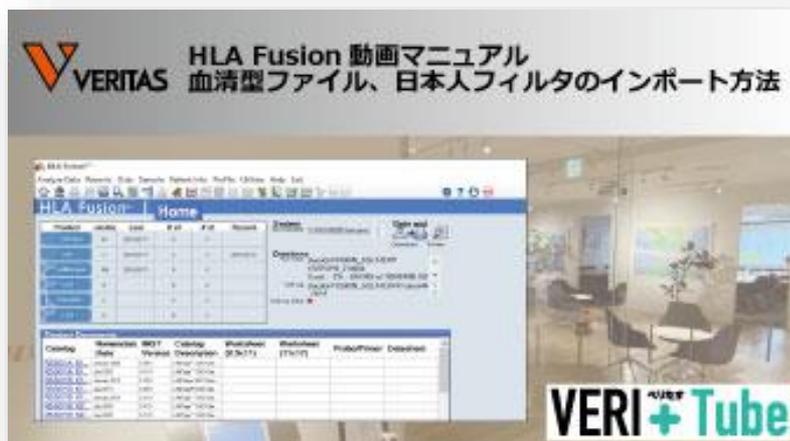
## HLA Fusionの初期設定方法を中心に紹介

- Vol1～6が公開中

<https://www.veritask.co.jp/sciencelibrary/learning/hla-video-compilation.html>

Vol.1:血清型ファイル、日本人フィルタのインポート

Vol.3:カタログファイルのインポート



# HLA Fusionでの解析方法



血清型ファイル、日本人フィルタ、  
カタログファイルのインポート

解析の設定

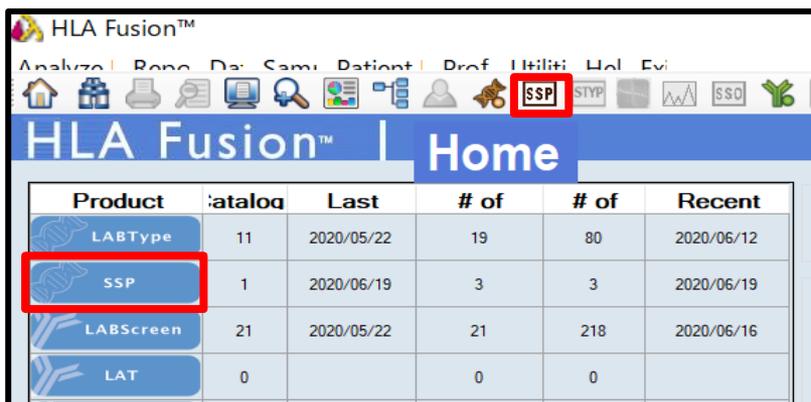
検査情報の入力

電気泳動結果の入力

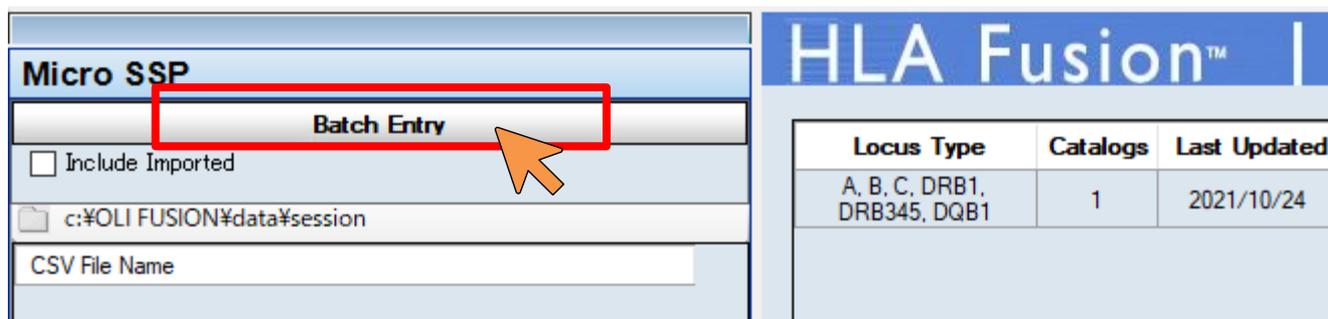
解析結果の確認

# 検査情報の入力

- TOP画面からSSPのアイコン(どちらでも可)をクリック



- 画面左上の「Batch Entry」のボタンをクリック
- セッション情報入力画面が出ます



# 検査情報の入力

## 検査を行った条件を確認し入力

- キットのローカス
- カタログファイル
- Session名
- サンプル名
- (ゲルの写真)
- (Batch名)

### 入力例

Batch Name:  Batch Date:  ~  Existing Batches:

Locus	Catalog*	Session*	Test Date*	Sample Name*
A,B,C,DRB1,DRB3&45,DQB1	SSPJPN_007_20	Micro_SSP_20200622114333_SSPJPN_007_20	2020年06月22日	TESTJ

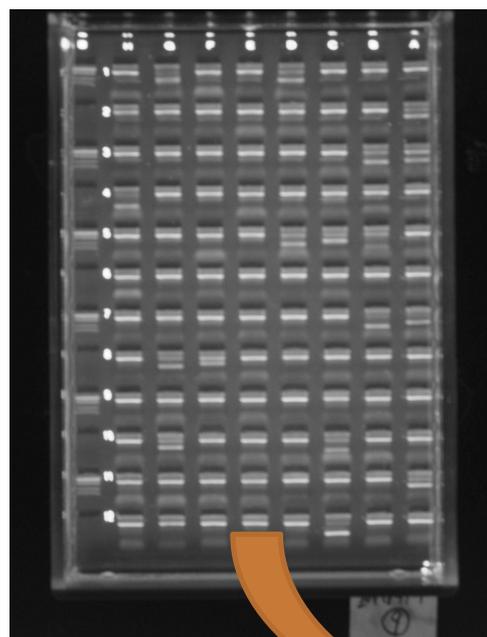
  

Patient / Donor	Gel Image
	C:\OLI FUSION\data#session#MicroSSP#well_211024.jpg

最後にNextをクリック

# 電気泳動結果の入力

- 判定結果をクリックで入力 (0/1/8)



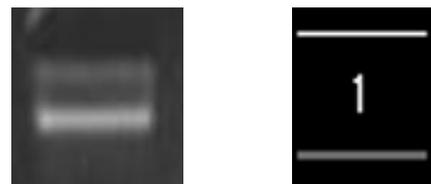
	H	G	F	E	D	C	B	A
01	1	8	1	1	8	1	1	1
02	1	1	1	1	1	1	1	8
03	1	1	1	1	1	1	8	8
04	8	1	1	1	1	1	1	1
05	1	1	1	1	8	8	1	1
06	1	1	1	1	1	1	1	1
07	1	1	1	1	1	1	8	8
08	1	8	8	1	1	1	1	1
09	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	8	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	8
12	1	1	1	1	1	8	1	1

入力終了後 Analyze

アレル特異的バンド(陽性)



コントロールバンドのみ(陰性)



バンドなし(無反応)



# 解析結果画面

- 青字のx: 今回の検体で陽性となったwell
- 黒字のx: 各アレルが陽性になるwell
- 黒字の#: 2つ以上のローカスにまたがって陽性になるwell

The screenshot displays a forensic DNA analysis software interface. On the left is a gel image with lanes labeled H, G, F, E, D, C, B, A and rows 01-12. The main area contains a data table with columns for loci (1G, 1D, 2A, 3B, 3A, 4H, 5D, 5C) and rows for Cross Loci and Sample Rn. Below the table are three summary panels:

- 候補のアレルペア (Possible Allele Pairs):** A table listing pairs of alleles (e.g., A\*02:01:01:01 and A\*24:02:01:01) and their corresponding group (G1).
- アレル情報 (Possible Allele Code):** A list of possible allele codes for each locus, such as A\*02:01:01:01:02:03:01:02:05:01:01:02:06:01:02:07:01:02:10:02:13:02:18:02:28:02:42:01:02:33:02:07:01:24:03:01:01:24:04:24:05:01:24:07:01:24:08:24:10:01:24:20:01:01:24:25:24:28:24:33:24:46.
- 血清型 (Possible Serology):** A list of possible serology types, including A2 A-, A2 A24, A2 A24"Low", A2 A2403, A2 A"Blank", A2 A9, A2 A36, A2"Low" A-, A2"Low" A24, A2"Low" A24"Low", and A2"Low" A2403.

At the bottom, there are sections for Assigned Allele Pairs, Assigned Allele Code, and Assigned Serology, each with a table and a close button (X). The bottom status bar includes a User Comment, System Comment (Tray Layout: Standard, Possible Homozygous Possible Allele Code Grouping Excludes(G2,G3)), and other assignment options like More Test, Patient Assign, Assign>>, Save>>, and Confirm>>.

# Possible Serologyの表示について

- Cw12,Cw14などは日本独自で命名された抗原名のため表示されない
- 抗原名がないアレルは“blank”として表示

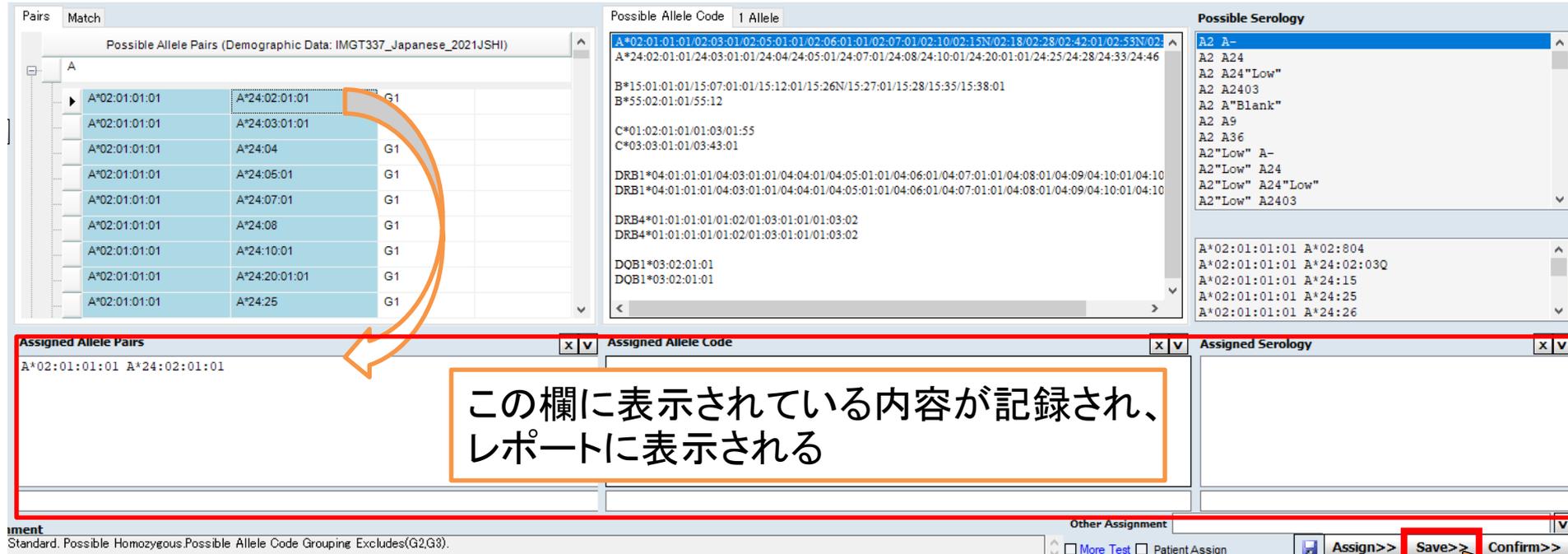
A	B	C	D	DR	DQ	DP	
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B5102	Cw4	Dw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B5103	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B52(5)	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B53	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B54(22)	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B55(22)	Cw9(w3)	Dw9	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B56(22)	Cw10(w3)	Dw10	DR9		
A24(9)	B18	B57(17)		Dw11(w7)	DR10		
A2403	B21	B58(17)		Dw12	DR11(5)		
A25(10)	B22	B59		Dw13	DR12(5)		
A26(10)	B27	B60(40)		Dw14	DR13(6)		
A28	B2708	B61(40)		Dw15	DR14(6)		
A29(19)	B35	B62(15)		Dw16	DR1403		
A30(19)	B37	B63(15)		Dw17(w7)	DR1404		
A31(19)	B38(16)	B64(14)		Dw18(w6)	DR15(2)		
A32(19)	B39(16)	B65(14)		Dw19(w6)	DR16(2)		
A33(19)	B3901	B67		Dw20	DR17(3)		
A34(10)	B3902	B70		Dw21	DR18(3)		
A36	B40	B71(70)		Dw22			
A43	B4005	B72(70)		Dw23	DR51		
A66(10)	B41	B73		Dw24	DR52		
A68(28)	B42	B75(15)		Dw25	DR53		
A69(28)	B44(12)	B76(15)		Dw26			
A74(19)	B45(12)	B77(15)					
A80	B46	B78					
	B47	B81					
	B48	B82					
		Bw4					
		Bw6					

JSHIの表記法ルールに沿って報告を  
[http://jshi.umin.ac.jp/standardization/file/JSHI-hyoki-2017\\_1.1.pdf](http://jshi.umin.ac.jp/standardization/file/JSHI-hyoki-2017_1.1.pdf)

HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則  
 (2017年版)

日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会  
 (2019年4月1日改訂 1.1版)

# 解析結果の記録



Possible Allele Pairs (Demographic Data: IMGT337\_Japanese\_2021JSHI)

A	A	G
A*02:01:01:01	A*24:02:01:01	G1
A*02:01:01:01	A*24:03:01:01	G1
A*02:01:01:01	A*24:04	G1
A*02:01:01:01	A*24:05:01	G1
A*02:01:01:01	A*24:07:01	G1
A*02:01:01:01	A*24:08	G1
A*02:01:01:01	A*24:10:01	G1
A*02:01:01:01	A*24:20:01:01	G1
A*02:01:01:01	A*24:25	G1

Possible Allele Code 1 Allele

A\*02:01:01:01:02:03:01:02:05:01:01:02:06:01:01:02:07:01:02:10:02:15N:02:18:02:28:02:42:01:02:53N:02  
A\*24:02:01:01:24:03:01:01:24:04:24:05:01:24:07:01:24:08:24:10:01:24:20:01:01:24:25:24:28:24:33:24:46  
B\*15:01:01:01:15:07:01:01:15:12:01:15:26N:15:27:01:15:28:15:35:15:38:01  
B\*55:02:01:01:55:12  
C\*01:02:01:01:01:03:01:55  
C\*03:03:01:01:03:43:01  
DRB1\*04:01:01:01:04:03:01:01:04:04:01:04:05:01:01:04:06:01:04:07:01:01:04:08:01:04:09:04:10:01:04:10  
DRB1\*04:01:01:01:04:03:01:01:04:04:01:04:05:01:01:04:06:01:04:07:01:01:04:08:01:04:09:04:10:01:04:10  
DRB4\*01:01:01:01:01:02:01:03:01:01:01:03:02  
DRB4\*01:01:01:01:01:02:01:03:01:01:01:03:02  
DOB1\*03:02:01:01  
DOB1\*03:02:01:01

Possible Serology

A2 A-  
A2 A24  
A2 A24"Low"  
A2 A2403  
A2 A"Blank"  
A2 A9  
A2 A36  
A2"Low" A-  
A2"Low" A24  
A2"Low" A24"Low"  
A2"Low" A2403

Assigned Allele Pairs  
A\*02:01:01:01 A\*24:02:01:01

Assigned Allele Code

Assigned Serology

この欄に表示されている内容が記録され、レポートに表示される

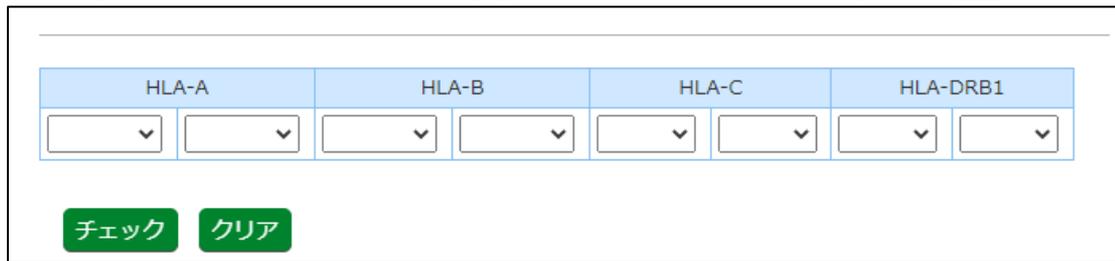
Save>>

- 各タブよりタイピング結果をダブルクリック
  - Pairsタブ
  - (必要に応じて) Allele Codeタブ、Possible Serologyタブ
- Assignedの欄に表示される
- 解析終了後は必ずSave

# ハプロタイプの確認(日本人の場合)

- HLA研究所様のホームページ

[https://hla.or.jp/med/haplo\\_tools/](https://hla.or.jp/med/haplo_tools/)



- 造血幹細胞移植情報サービス

[https://www.bs.jrc.or.jp/bmdc/donorregistrant/m2\\_03\\_00\\_statistics.html](https://www.bs.jrc.or.jp/bmdc/donorregistrant/m2_03_00_statistics.html)

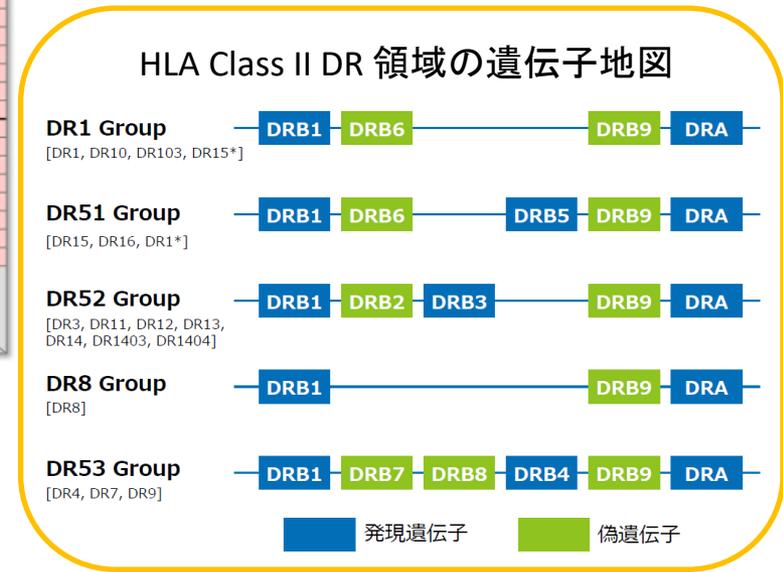
ドナー登録者のハプロタイプ頻度 (A-B-C-DRB1)

- 地域別一覧 (全国上位100タイプ) [Excel : 79KB] 

# DR-DQの連鎖の確認(日本人の場合)

		DQB1										DRB1																				
		DQB1*05:01	DQB1*05:02	DQB1*05:03	DQB1*06:01	DQB1*06:03	DQB1*06:02	DQB1*06:04	DQB1*06:09	DQB1*02:01	DQB1*02:02	DQB1*03:01	DQB1*03:02	DQB1*03:03	DQB1*04:01	DQB1*04:02																
		DQA1										DRB345																				
		DQA1*01:01	DQA1*01:05	DQA1*01:02	DQA1*01:04	DQA1*01:03	DQA1*01:02	DQA1*05:01	DQA1*02:01	DQA1*02:01	DQA1*03:03	DQA1*05:03	DQA1*05:05	DQA1*05:06	DQA1*05:07	DQA1*05:08	DQA1*06:01	DQA1*03:01	DQA1*03:02	DQA1*03:03	DQA1*04:01	DQA1*04:02										
DRB1*01:01																							DRB1*01:01									
DRB1*10:01																							DRB1*10:01									
DRB1*08:02																							DRB1*08:02									
DRB1*08:03																							DRB1*08:03									
DRB1*15:01	DRB5*01:01																						DRB1*15:01									
DRB1*15:02	DRB5*01:02																						DRB1*15:02									
DRB1*16:02	DRB5*02:02																						DRB1*16:02									
DRB1*13:01																							DRB1*13:01									
DRB1*12:01	DRB3*01:01																						DRB1*12:01									
DRB1*14:03																							DRB1*14:03									
DRB1*14:12																							DRB1*14:12									
DRB1*03:01																							DRB1*03:01									
DRB1*11:01																							DRB1*11:01									
DRB1*13:07	DRB3*02:02																						DRB1*13:07									
DRB1*14:06																							DRB1*14:06									
DRB1*14:54																							DRB1*14:54									
DRB1*14:07																							DRB1*14:07									
DRB1*14:05																							DRB1*14:05									
DRB1*12:02	DRB3*03:01																						DRB1*12:02									
DRB1*13:02																							DRB1*13:02									
DRB1*04:01	DRB4*01:02																						DRB1*04:01									
DRB1*04:05																							DRB1*04:05									
DRB1*04:10																							DRB1*04:10									
DRB1*04:03	DRB4*01:03																						DRB1*04:03									
DRB1*04:06																							DRB1*04:06									
DRB1*04:07																							DRB1*04:07									
DRB1*07:01																							DRB1*07:01									
DRB1*09:01																							DRB1*09:01									

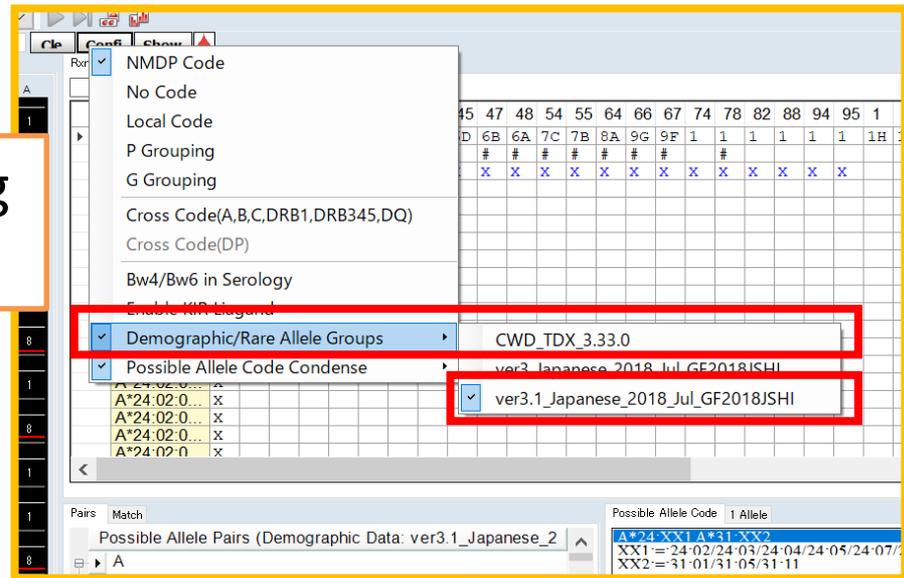
(HLA検査に必要なHLAの基礎知識 中島様講演会資料)



# フィルタの変更

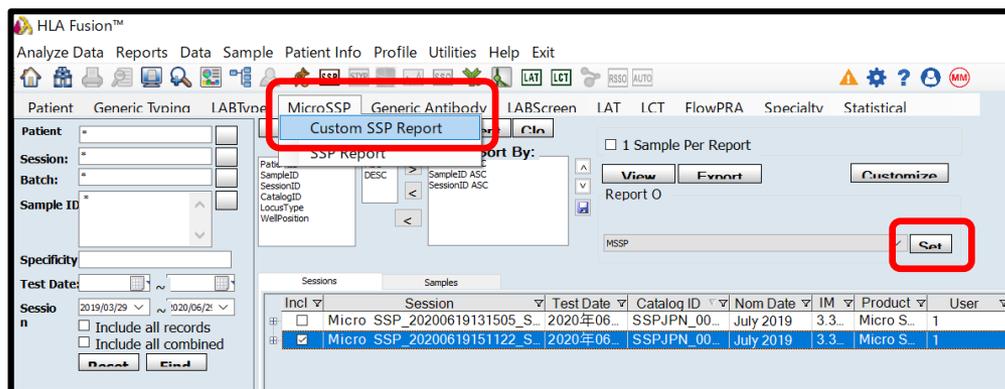
- CWDフィルタがデフォルトでインストールされています
- CWDとは
  - Common Well-Documentedの略で世界的に頻度の高いアレルが登録されている
- 海外の方のタイピングを行う場合はCWDフィルタの使用を推奨

解析結果画面のConfig  
より変更ができます



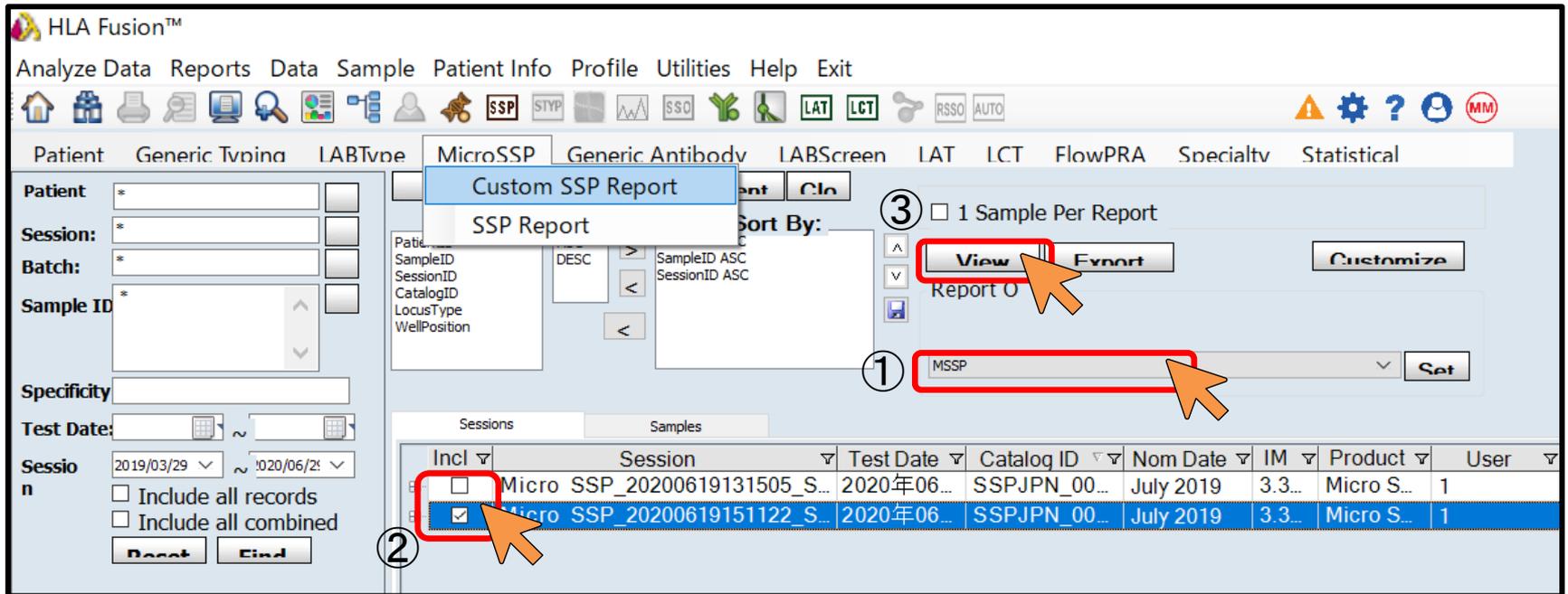
# レポートの作成①

- Reports>MicroSSP>Custom SSP Reports
- 初回のみSetよりレポートの出力内容を設定



# レポートの作成②

- Reports>MicroSSP>Custom SSP Reports
- レポート作成する結果に✓、View Report



HLA Fusion™

Analyze Data Reports Data Sample Patient Info Profile Utilities Help Exit

Patient Generic Typing LABType MicroSSP Generic Antibody LABScreen LAT LCT FlowPRA Specialty Statistical

Custom SSP Report  
SSP Report

Sort By:  1 Sample Per Report

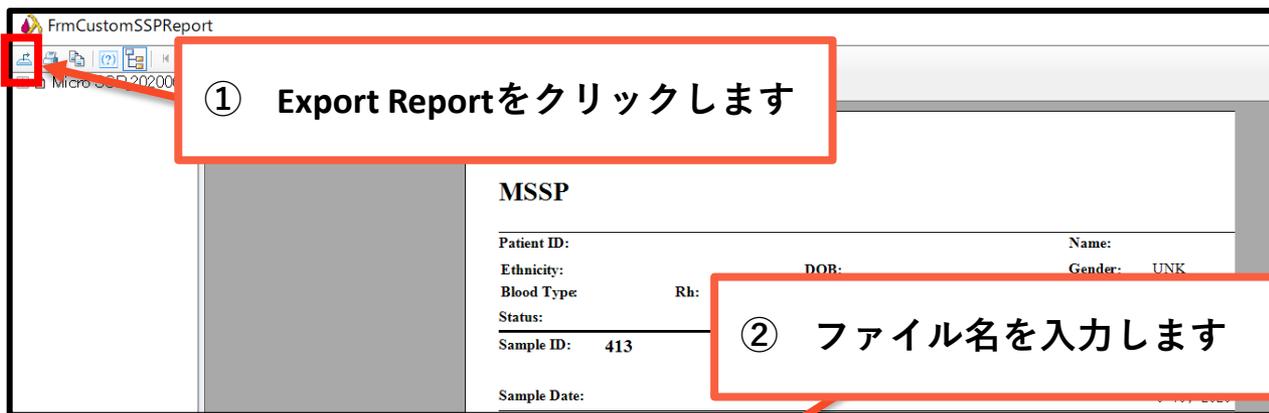
View  Export

Report 0

Sessions Samples

Incl	Session	Test Date	Catalog ID	Nom Date	IM	Product	User
<input type="checkbox"/>	Micro SSP_20200619131505_S...	2020年06...	SSPJPN_00...	July 2019	3.3...	Micro S...	1
<input checked="" type="checkbox"/>	Micro SSP_20200619151122_S...	2020年06...	SSPJPN_00...	July 2019	3.3...	Micro S...	1

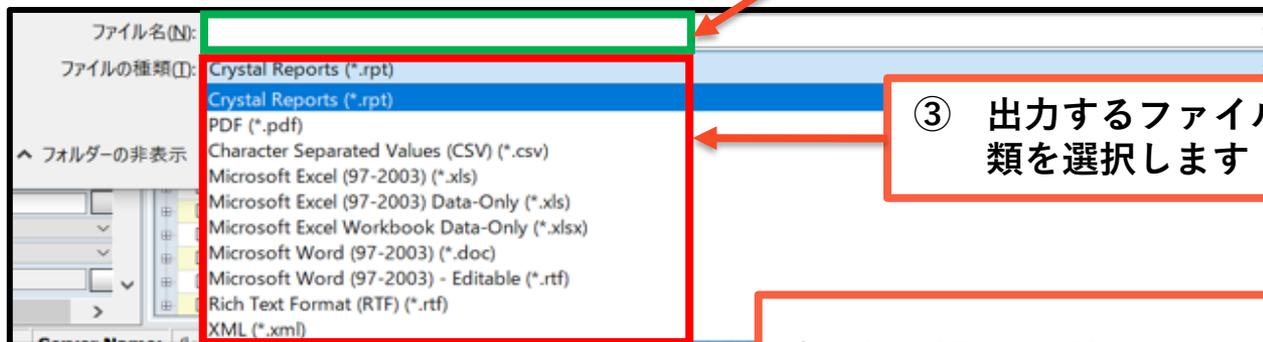
# レポートの出力



① Export Reportをクリックします

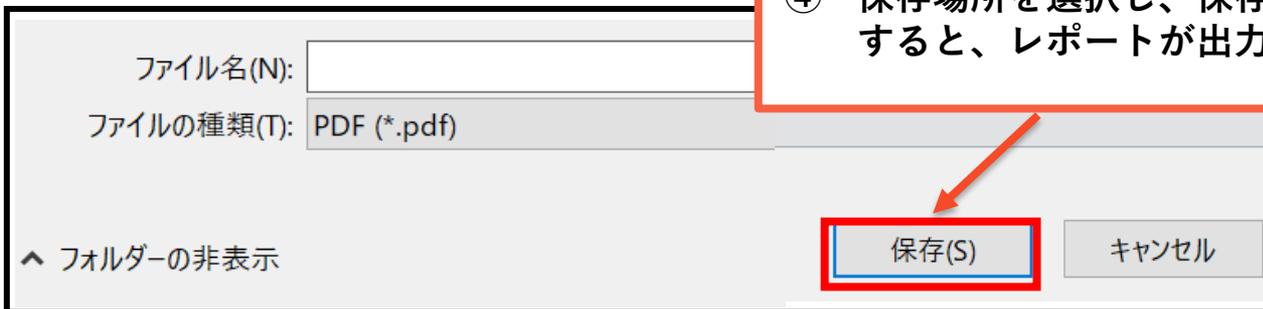
MSSP

Patient ID: \_\_\_\_\_ Name: \_\_\_\_\_  
Ethnicity: \_\_\_\_\_ DOB: \_\_\_\_\_ Gender: UNK  
Blood Type \_\_\_\_\_ Rh: \_\_\_\_\_  
Status: \_\_\_\_\_  
Sample ID: 413  
Sample Date: \_\_\_\_\_



③ 出力するファイルの種類を選択します

ファイル名(N): \_\_\_\_\_  
ファイルの種類(T): Crystal Reports (\*.rpt)  
Crystal Reports (\*.rpt)  
PDF (\*.pdf)  
Character Separated Values (CSV) (\*.csv)  
Microsoft Excel (97-2003) (\*.xls)  
Microsoft Excel (97-2003) Data-Only (\*.xls)  
Microsoft Excel Workbook Data-Only (\*.xlsx)  
Microsoft Word (97-2003) (\*.doc)  
Microsoft Word (97-2003) - Editable (\*.rtf)  
Rich Text Format (RTF) (\*.rtf)  
XML (\*.xml)



④ 保存場所を選択し、保存をクリックすると、レポートが出力されます

ファイル名(N): \_\_\_\_\_  
ファイルの種類(T): PDF (\*.pdf)

保存(S) キャンセル

# レポート見本

## MSSP

Patient ID: \_\_\_\_\_ Name: \_\_\_\_\_  
 Sample ID: VERITAS Local ID: \_\_\_\_\_

Sample Date: \_\_\_\_\_ Test Date: 11 8, 2021

Possible Allele Code: A\*24:02:01:01/24:03:01:01/24:04:24:05:01/24:07:01/24:08/24:10:01/24:20:01:01/24:25/24:28/24:33/24:46  
 A\*24:02:01:01/24:03:01:01/24:04:24:05:01/24:07:01/24:08/24:10:01/24:20:01:01/24:25/24:28/24:33/24:46  
 B\*51:01:01:01/51:03/51:06:01/51:07:01  
 B\*54:01:01  
 C\*01:02:01:01/01:03  
 C\*15:02:01:01/15:05:01:01  
 DRB1\*04:05:01:01/04:06:01/04:09/04:10:01/04:10:03/04:11:01  
 DRB1\*16:01:01/16:02:01:01  
 DRB4\*01:01:01:01/01:02:01:03:01:01/01:03:02  
 DRB5\*01:01:01:01/01:02  
 DRB4\*01:01:01:01/01:02:01:03:01:01/01:03:02  
 DRB5\*02:02:01  
 DQB1\*04:01:01:01/04:02:01:01  
 DQB1\*05:01:01:01/05:02:01:01/05:03:01:01

Assigned Serology: A24 A-  
 B51 B54  
 Cw1 C-  
 DQ4 DQ5  
 DR4 DR16  
 DR53 DR51

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	1	1	1	1	8	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	8	8
3	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	8	8	1	1	8	1	1
5	1	1	1	8	8	8	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	8	1	8
8	1	1	1	8	1	1	1	1
9	1	1	1	1	8	1	1	8
10	1	8	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	8	1	8
12	1	8	1	1	1	1	1	8

Sample ID: VERITAS

Local ID: \_\_\_\_\_

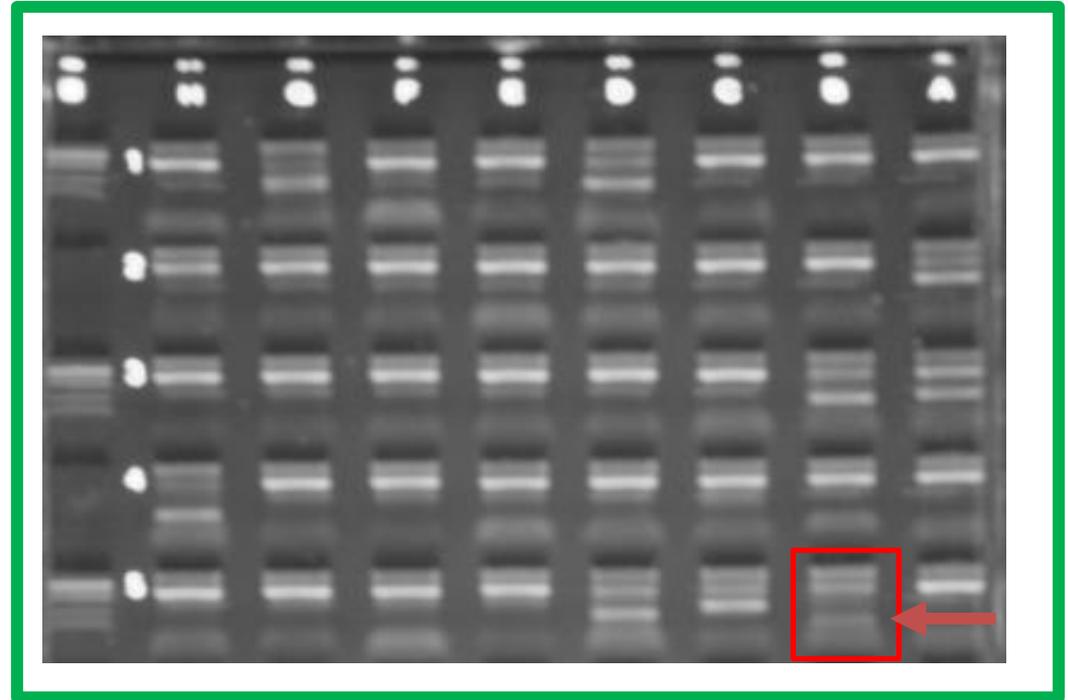
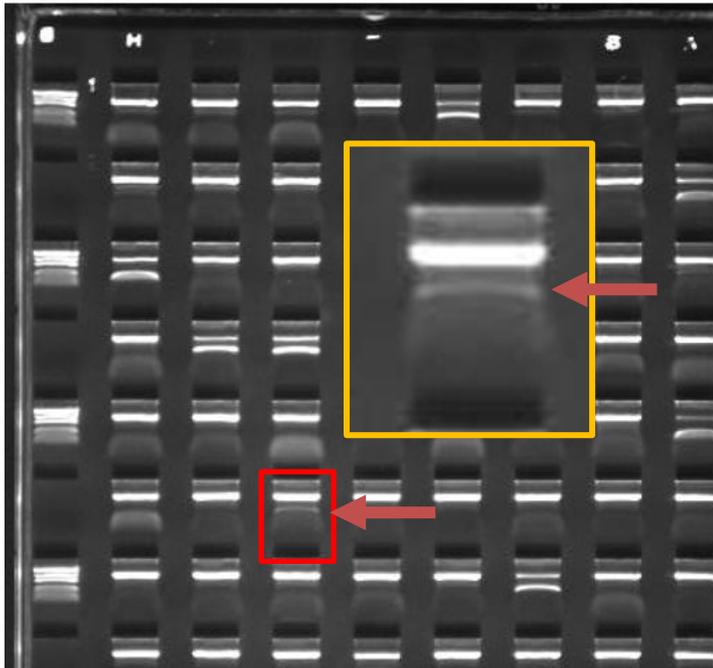


# よくある質問

# よくある質問の例

- 他のウェルと比較して薄いバンドがある
  - 多くのウェルに薄いバンドがある
  - HLA Fusionの解析結果がNo Solutionになった
- ・・・など

# 他のウェルと比較して薄いバンドがある①

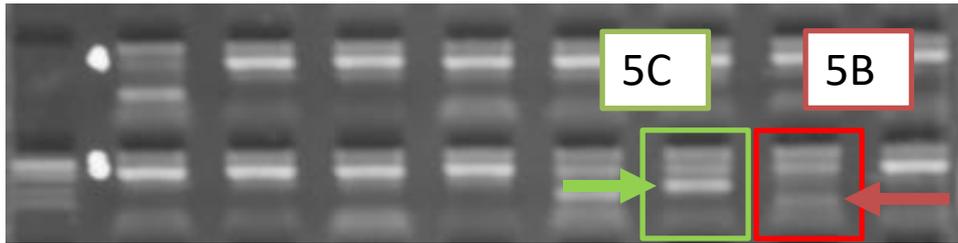


このようなバンドは陽性? or 陰性?

- バンドサイズの確認

- 含まれるプライマー情報の確認

# バンドサイズの確認



```
Well Position : 5B
Rec Site : {-9}-V(-8)+[44RE45 + 50-50]
Specificity (Abbr) :
B*07:271; B*13:97; B*15:506; B*18:37:01; B*27:01~05:07/05:09~25/30/32/35/37~38/47/66N/68~70/90:01~91/96:01~96:02/101/109~118/123/125/128/131/137/142/144/146/150/157~158/162~163/165/169/173~194/197/199-202/204~215N; B*35:49/361; B*44:130/210:01; B*55:102; B*56:05:01~05:02; B*81:01:01~01:02/01:04~01:05/05; B*83:01 (*)
Base Pair Size : 325
Locus type : B
```

```
Well Position : 5C
Rec Site : 95W-T97 / 94-L-S97+163T--165
Specificity (Abbr) :
B*07:19/31/34/43; B*08:01:01:01~10/13~15/17~20:02/22~24/26:01~26:03/28~39/41~48/50~59:02/61~75/77~78/80~88/90~106/108~124/126~128/130~155/157~164/166~170/172~174/176~180/182~183/185/187~204/206~213/215N~231/233~245; B*13:46/53/131; B*14:05/13/53; B*15:42/83/485; B*18:14; B*35:60/87/276; B*37:09; B*38:19; B*39:03:01:01~03:01:02/06:01~06:06/14:01:01~14:01:02/24:01~24:02/29/34/37/62/64/76/83/90/109/120/127/129/132/140~141/144/152/154; B*40:39; B*41:02:01:01~02:09/04/10~11/13/15/18/23~24/27/31/36/38~43/45N~47/49/51~52/55/58; B*42:01:01~11/14~27; B*44:166; B*46:18; B*48:37; B*51:21/36/101/143/153/157/197/280/295/300; B*52:37/71/84; B*54:01:01~02/04~05N/07~08N/10~25/27~32/34~37/39/41; B*55:01:01:01~07/10/12~13/15~21/23/25~50/52~106; B*56:23/54; B*59:01:01:01~03/05~08/10N; B*78:07; C*06:264; C*07:294/526:01/530/681/758; C*08:08:01~08:02; C*12:183; C*14:92
Base Pair Size : 225
Locus type : B,C
```

各ウェルにカーソルを合わせるとバンドサイズやプライマー情報が確認できます  
5Bの方がbpが大きいですが、5Cよりも遠くに流れている  
→陽性バンドではない

# ウェル情報を参照しても判定が難しい場合は

陽性、もしくは陰性として解析をしてみる



陽性と  
すると

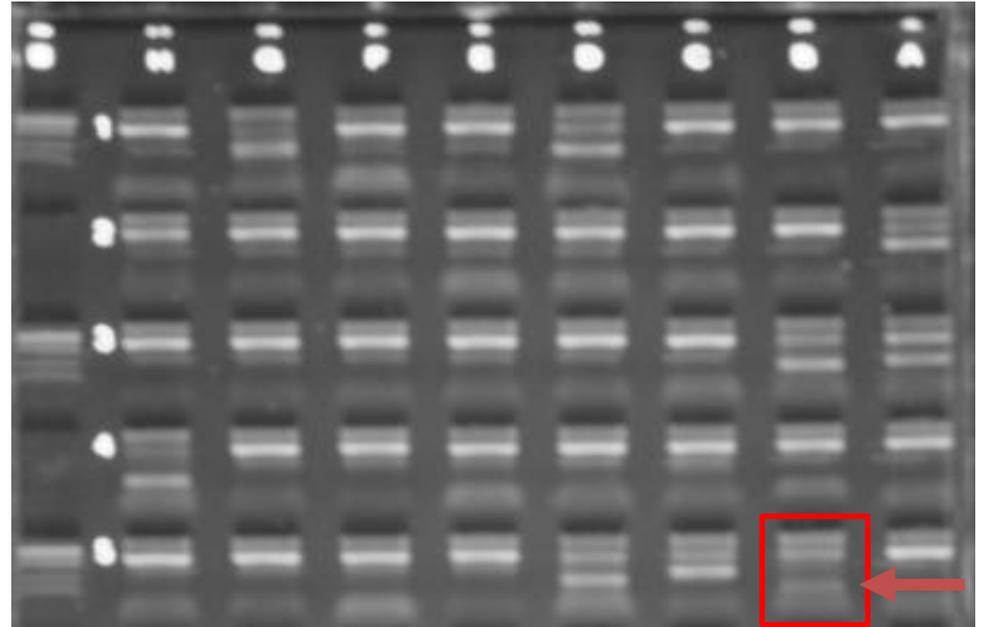
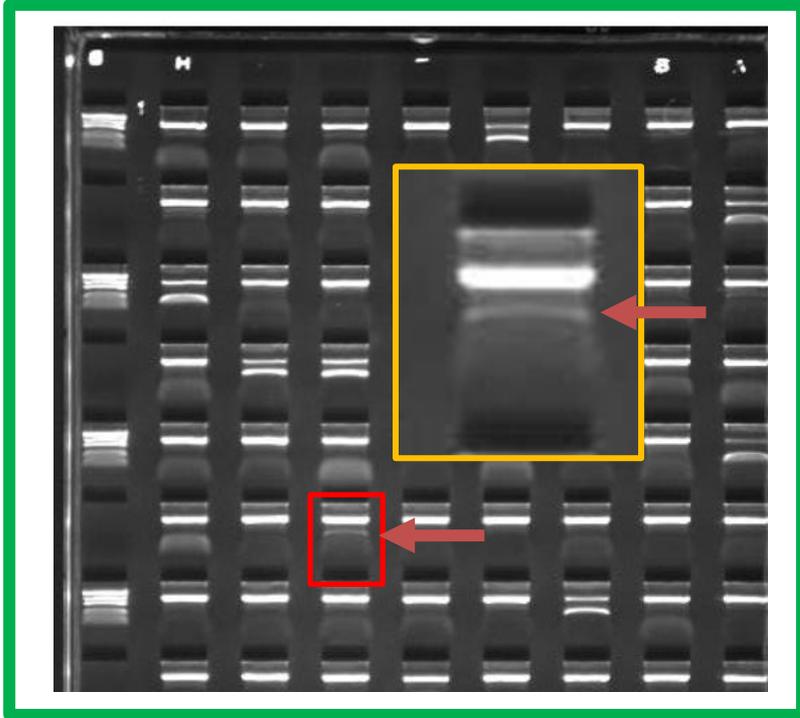
偽陽性  
偽陰性  
ウェル  
の表示

FN# 4C
FP# 5B
FP# 5B

陰性と  
すると

Pairs	Match	Pos
A		
B		
B*15:01:01:01	B*55:02:01:01	G1
B*15:01:01:01	B*55:12	G1
B*15:07:01:01	B*55:02:01:01	G1
B*15:07:01:01	B*55:12	G1
B*15:12:01	B*55:02:01:01	G1
B*15:12:01	B*55:12	G1
B*15:26N	B*55:02:01:01	G1
B*15:26N	B*55:12	G1

## 他のウェルと比較して薄いバンドがある②



このようなバンドは陽性? or 陰性?

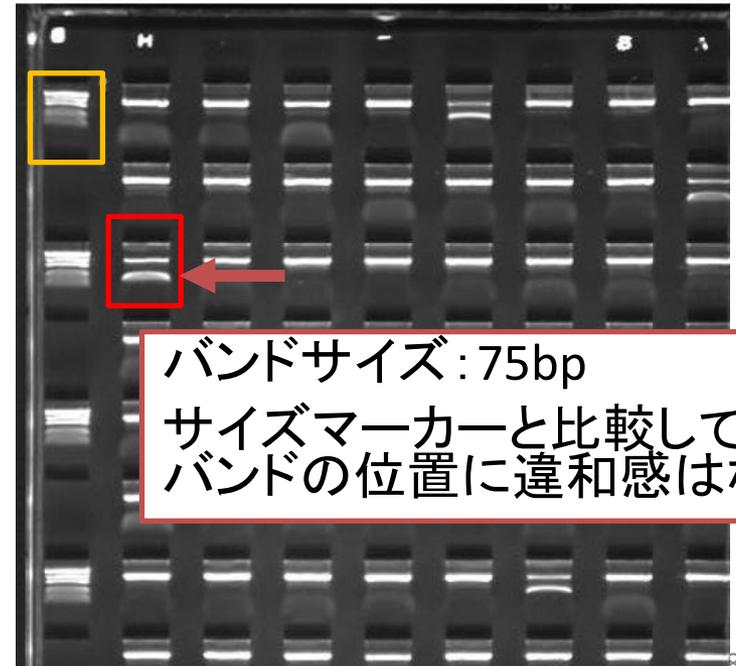
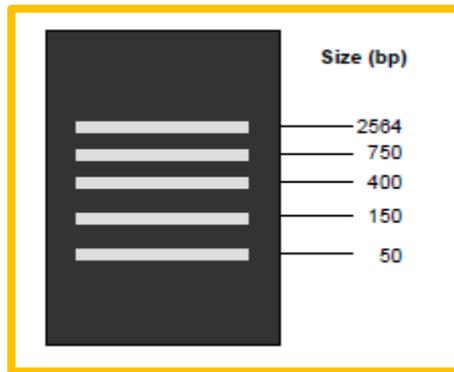
- バンドサイズの確認

- 含まれるプライマー情報の確認

# バンドサイズの確認①

各ウェルにカーソルを合わせると  
バンドサイズやプライマー情報が  
確認できます

Well Position : 3H  
Spec. site : 02K-03+00180  
Specificity (Abbr) :  
A\*24:309; A\*32:39; B\*15:16:01:01-17:07/24:01-24:02/67/87/157/162/168/177/196/208/216/222/230/254/268/273/356/361-362/396/403/408/411/423-424/442/446/500/516/523/532/546Q; B\*27:02:01:01-02:04/30/53/57/62/65N/75/77/83/95/102/119/126/134/163/171-172/176N/181/188/197/203/213; B\*37:34; B\*38:25; B\*40:13/19/109/117/292/340/394; B\*41:46/60; B\*44:18/25/50:01-50:03/95; B\*48:18; B\*49:01:01:01-01:15/03-25/27-29/54; B\*51:221; B\*52:01:01:01-01:28/01:30-19/21:01-72/74-93; B\*53:17:01-17:02/28; B\*58:100  
Base Pair Size : 75  
Locus type : B.A

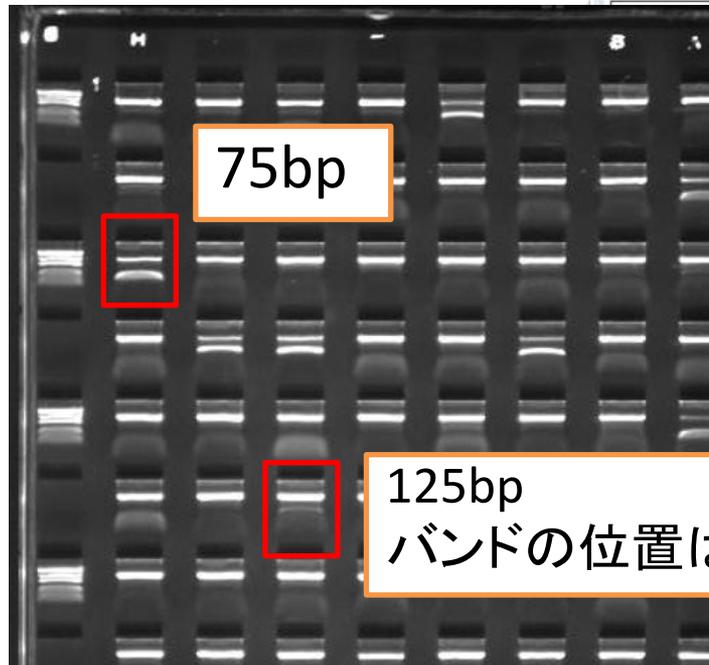


サイズマーカー  
5種類の大きさのDNAが含まれている  
検体のWellのバンドの位置が正しいことを  
確認する指標になる

# バンドサイズの確認②

```
Well Position : 6F
Rec Site : [113HD-(S/Y/F)116 + 131S131]+156L156
Specificity (Abbr) :
B*07:235; B*13:04/26:01~26:02/35/72; B*14:23/56; B*15:03:01:01~03:09/05:01~05:03/10:01:01~10:04/16:01:01~16:04/18:01:01~18:02/18:04~18:07/20/23/29/37/39:01~40:02/52/61~62/64:01~64:02/67/69/74/80/90~91/
93/95/98/103/108/114~115/119/123~124/127/131~134/136/138/151/153/155/158/161/173/176/185~186/194~195/197:01~198/200/210/220:01:01~220:02/222~223/226N/235/238/242:01~242:02/253~255/263/266/268/274~
275:02/281~282/288/290/292~294N/306~307/310~314/323/332/335/337~338/348/351/354/362/364/369/376/380N/382~383/388~389/393/397/402/407~408/414/426~427/433~434/436/439/444~445/447~449/451/455/475/487N/
494/497/502~504/506/508~509/511/517/526~527/530/539; B*18:01:01:01~12:02/14~18:01:02/22~25/27~29/31~39/42~55/57:01~60/62~96/98~112/114~121/123~163/167/169~185; B*27:41/136; B*35:01:01:01~01:63/
03:01:01~03:29/05:01:01~05:03/07/10~11:02/13/15:01~17:03/19~21/23~30/32:01~37/39~42:02/46~58/63/65Q/68:01~78/82/84~85/89~94/96~98/101:01~101:02/103~104/106~113/116/119~120/122~128/130N~131:01/132/134N/
136~141/143~148/150:01~153/155/159~161/165N~168/170~171/173:01N~173:02N/175/177~181/186/188~191/193~200/202~204/207~210/212/216N~219/221~224/226~228/231/235~250/252~257/259/263/267~269/271~272/274~275/
277~284/286~290/293~299/302~308/310/312~315/317~320/324~327/329~330/332/336/340/344/347~353/355/358~360/362~365/368~371/373/376/380:01:01~383/385/389/392~393/395/397~402/404~409/412/415~418/420~424/
427N~430N/433~436/438~442/447~459N; B*38:29/52; B*39:07/15/29/43/49/55/91; B*44:43:01~43:02/107/276; B*46:08/13:01~13:03/19/21:01~21:02/25/33/43; B*48:02:01~02:03/25; B*49:04:01~04:02; B*51:37/45/90/
92:01~92:02/135; B*52:12/75; B*53:01:01:01~01:16/01:18~06/08:01~10/12~15/17:01~18/20~21/23/25~35/37~49/51~54/56; B*54:09/14; B*55:14/23/27/68; B*56:09/11/18/31~32/50; B*57:01:01:01~01:01:06/01:03~
01:32/01:34~01:40/06/08/10~11/14:01~16/18/20~23/25~27/29/33~38/40/43~45/47~56/58~62/64~65/67:01~69/71~79N/81/83/85~93/98Q~100/102~106/108~117/120~123/125~126; B*58:01:01:01~01:14/01:16~01:17/01:19~
01:29/01:31~02:01/04~07/09~19/21/23~26/29~45:02/47~60/62~64/66~72N/74~77/79~85/87~101/103~113/115; C*15:126
```

Base Pair Size : 125  
Locus type : B,C

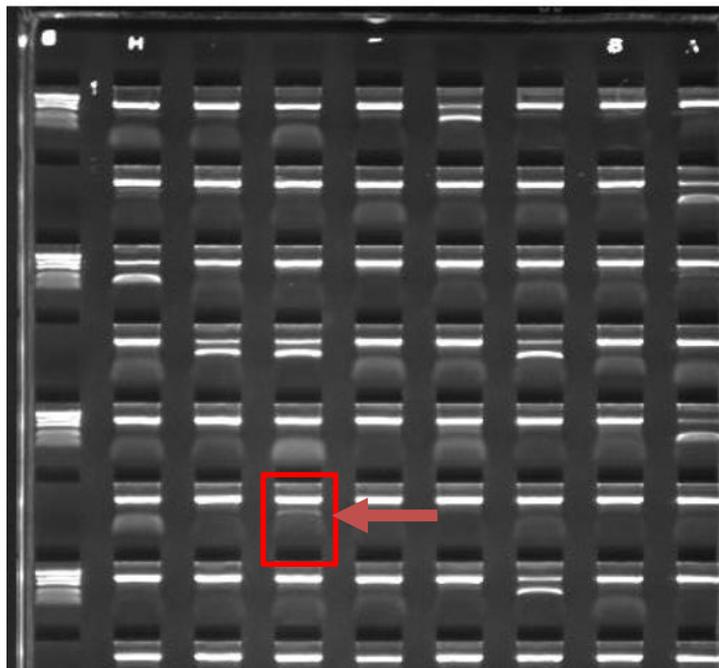


# プライマー情報の確認



- ウェルに含まれるプライマー情報が表示される
  - 6FのウェルにはB7, B15 B18, B35, B39, B44 B51, B52, B53 など多くの抗原に対するプライマーが含まれる
  - バンドが薄い場合、偽陽性の可能性がある

# 他のウェルと比較して薄いバンドがある



6Fは陽性? or 陰性?

①ウェルのバンドサイズの確認

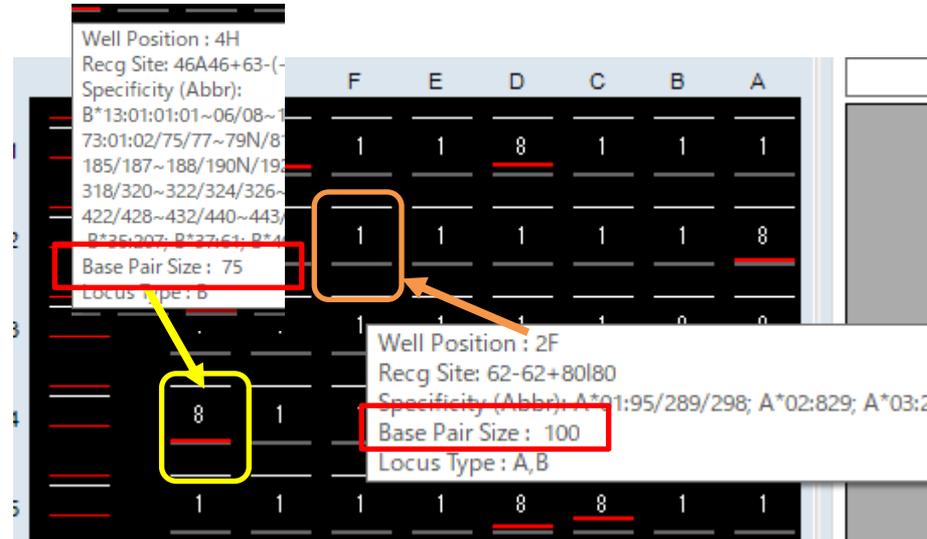
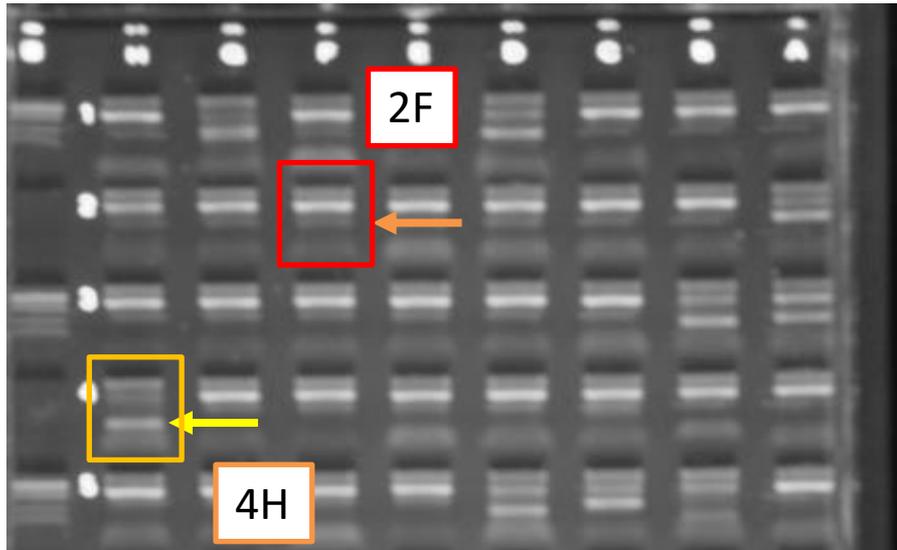
→問題なし

②ウェルに含まれるプライマー情報の確認

→多くの抗原に対するプライマーが含まれていた。この検体のBローカスはB52のホモであり、B52のレアアレルのプライマーも含まれるため弱い反応を示したと推測される

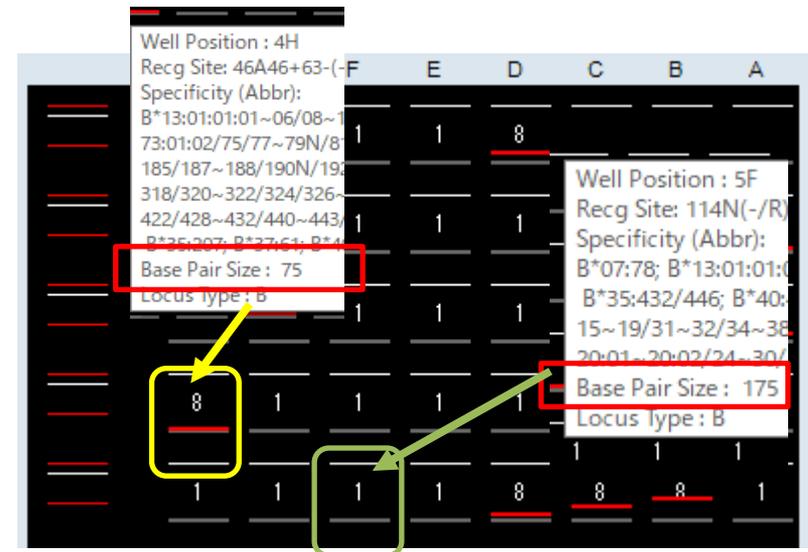
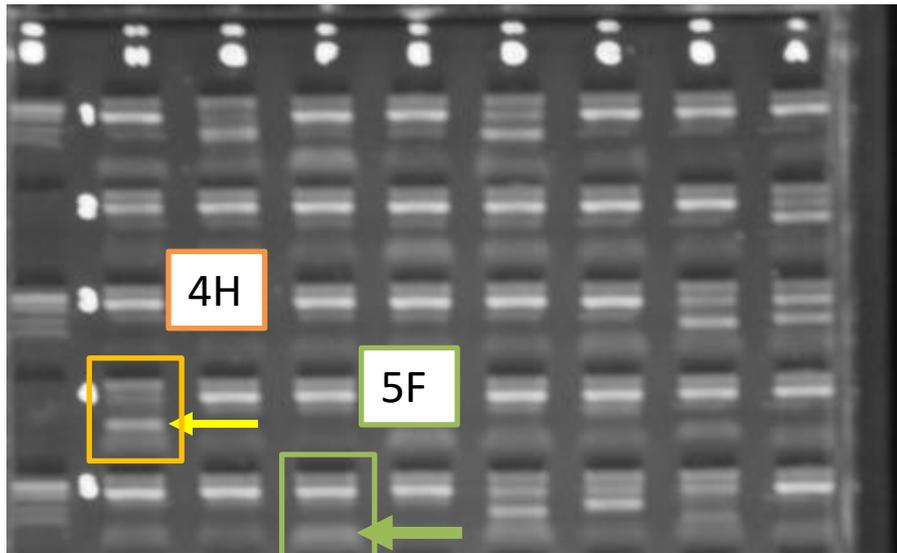
バンドは偽陽性であり、6Fは陰性と判断できる

# 多くのウェルに薄いバンドがある①



- ・陽性バンドであれば100 bpの位置
  - ・4Hの明らかな陽性バンド(75bp)と比較すると、2Fのバンドの位置はまったく異なる
  - ・2G,2Hなど他のウェルにもみられる
- 2Fは陽性バンドではない、**陰性**と判断できる

# 多くのウェルに薄いバンドがある②



- ・陽性バンドであれば175 bpの位置
  - ・4Hの明らかな陽性バンド(75bp)と比較すると、5Fのバンドの位置はまったく異なる
  - ・不特定多数のウェルに出現している
- 5Fは陽性バンドではない、**陰性**と判断できる

# その他のよくある質問

- No solutionになった
  - まずはゲルの写真を再確認を
    - 異なるウェルにチェックを入れていないか?入力ミスが意外と多いです
- バンドが無いウェル(0)があります
  - 再検査を行ってください
  - JPN以外のキットの場合、ネガティブコントロールウェル(1H)は0で問題ありません
- ホモの場合はハプロタイプ、連鎖をよく確認
  - 陽性ウェルの見逃しが無いことの確認を

# 最後に

- マイクロSSPはシンプルな検査です  
– 手技のポイント

DNAの  
品質と濃度

試薬の  
状態と量

DNAと試薬  
の混合

PCR条件

ゲル作成・  
アプライ

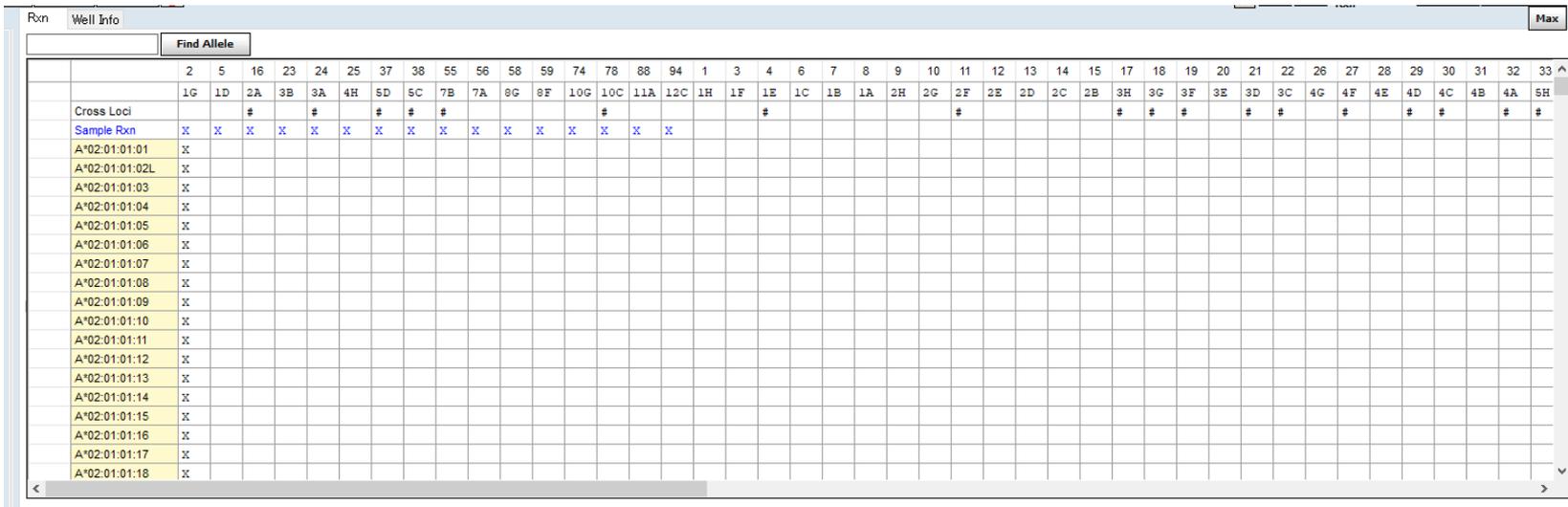
- 解析はHLA Fusionで  
– ハプロタイプと連鎖の確認を忘れずに



# 追加資料

# アレルの検索について

- 候補となるアレルのバンドパターンも確認すると確実です
- アレルの検索を使ってチェック



	2	5	16	23	24	25	37	38	55	56	58	59	74	78	88	94	1	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21	22	26	27	28	29	30	31	32	33					
	1G	1D	2A	3B	3A	4H	5D	5C	7B	7A	8G	8F	10G	10C	11A	12C	1H	1F	1E	1C	1B	1A	2H	2G	2F	2E	2D	2C	2B	3H	3G	3F	3E	3D	3C	4G	4F	4E	4D	4C	4B	4A	5H					
Cross Loci			#		#		#	#	#					#											#				#	#	#		#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#			
Sample RXN	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																																
A*02:01:01:01	X																																															
A*02:01:01:02L	X																																															
A*02:01:01:03	X																																															
A*02:01:01:04	X																																															
A*02:01:01:05	X																																															
A*02:01:01:06	X																																															
A*02:01:01:07	X																																															
A*02:01:01:08	X																																															
A*02:01:01:09	X																																															
A*02:01:01:10	X																																															
A*02:01:01:11	X																																															
A*02:01:01:12	X																																															
A*02:01:01:13	X																																															
A*02:01:01:14	X																																															
A*02:01:01:15	X																																															
A*02:01:01:16	X																																															
A*02:01:01:17	X																																															
A*02:01:01:18	X																																															

# アレルの検索方法

Rxn Well Info

B\*48:01 Find

検索するアレルを入力し、「Find」をクリックします  
例として、B\*48:01を検索します

	5	16	33	36	37	38	44	47	49	53	55	56	65	74	81	87	88	89	90	9
	1D	2A	5H	5E	5D	5C	6E	6B	7H	7D	7B	7A	9H	1..	1..	1..	1..	1..	1..	1..
Cross Loci	#	#	#	#	#	#		#	#		#					#		#		
Sample Rxn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
A*24:76	X																			
A*24:78	X																			
A*24:79	X																			
A*24:80	X																			
A*24:82	X																			
A*24:83N	X																			

Rxn Well Info

Find

検索したアレルが一番上に表示されます

	5	16	33	36	37	38	44	47	49	53	55	56	65	74	81	87	88	89	90	9
	1D	2A	5H	5E	5D	5C	6E	6B	7H	7D	7B	7A	9H	1..	1..	1..	1..	1..	1..	1..
Cross Loci	#	#	#	#	#	#		#	#		#					#		#		
Sample Rxn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B*48:01:01:01		X					X	X	X	X	X									
B*48:01:01:02		X																		
B*48:01:02		X																		
B*48:01:03		X																		
B*48:01:04		X					X	X	X	X	X									
B*48:01:05		X					X	X	X	X	X									
B*48:01:06		X					X	X	X	X	X									

# アレルの検索方法

Rxn Well Info

Find

検索するアレルの左側の欄をクリックします

Cross Loci		#	#	#	#	#		#	#									#	#	
Sample Rxn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B*48:01:01:01			X					X	X	X	X	X								
B*48:01:01:02			X					X	X	X	X	X								
B*48:01:02			X					X	X	X	X	X								
B*48:01:03			X					X	X	X	X	X								
B*48:01:04			X					X	X	X	X	X								
B*48:01:05			X					X	X	X	X	X								
B*48:01:06			X					X												

Rxn Well Info

Find

選択したアレルに対して陽性になるwellが左端から整列した状態が表示されます

Cross Loci		#	#	#		#		#	#	#	#							#	#	
Sample Rxn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B*48:01:01:01	X	X	X	X	X	X														
B*48:01:01:02	X	X	X	X	X	X														
B*48:01:02	X	X	X	X	X	X														
B*48:01:03	X	X	X	X	X	X														
B*48:01:04	X	X	X	X	X	X														
B*48:01:05	X	X	X	X	X	X														
B*48:01:06	X	X	X	X	X	X														
B*48:01:07	X	X	X	X	X	X														

# アレルの検索結果

5C陽性  
とすると

緑  
偽陰性と判定

赤  
偽陽性と判定

	23	24	25	16	37	38	39	55	2	5	16	37	38	56	58	59	74	78	88	94	1	3
	3B	3A	4H	2A	4C	5D	5C	5B	5A	1G	1D	7A	8G	8F	10G	10C	11A	12C	1H	1F	1E	1D
Cross Loci		#		#	#	#	#	#								#						
Sample Rxn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B*15:01:25	X	X	X																			
B*55:102				X	X	X	X	X	X													
A*02:01:01:01											X											
A*02:01:01:02																						

バンドパターンと不一致

5C陰性  
とすると

バンドパターンと一致

	23	24	25	55	2	5	16	37	38	56	58	59	74	78	88
	3B	3A	4H	7B	1G	1D	2A	5D	5C	7A	8G	8F	10G	10C	11A
Cross Loci		#		#			#	#	#					#	
Sample Rxn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B*15:01:01:01	X	X	X	X											
B*55:02:01:01				X			X	X	X						

