



今日から始めるHLA Vol.3 マイクロSSP入門

HLA Fusionを使用したMSSPの解析

株式会社ベリタス 2023年12月6日

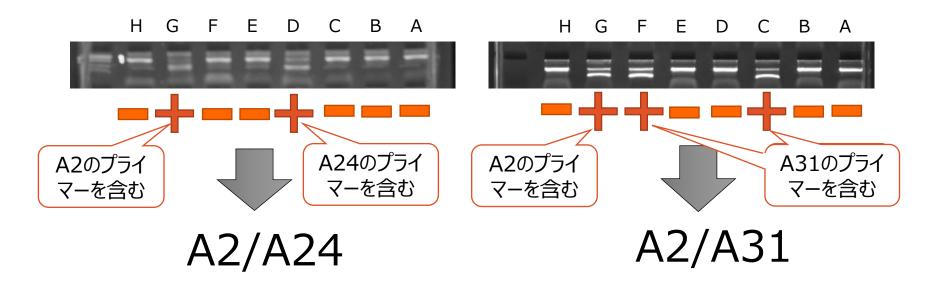


マイクロSSPの解析方法

マイクロSSPの判定原理



ウェルごとに陽性/陰性の判定を行い、陽性ウェルの組み合わせより抗原 (アレル)の同定を行う

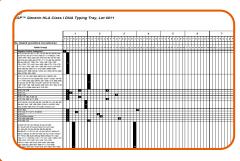


- 増幅したウェルより組み合わせを判定
- 陽性となるウェルの数はアレルによって異なる
- 陰性ウェルも判定に重要

*上記はイメージです 実際の結果とは異なります

解析の3つの手法





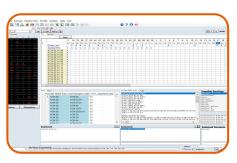
ワークシート

- すべてのマイクロSSP製品でロットごとに提供(pdf)
- One Lambdaより公開
- 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
- 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)

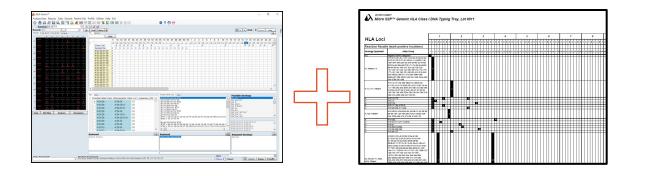
- すべてのマイクロSSP製品で使用可能
- ロット、血清型ファイルの更新によりカタログファイルがアップデート
- Fusion4.6.1では、JPNキットで発生していた解析結果が保存できない問題は解消しました

解析の流れ



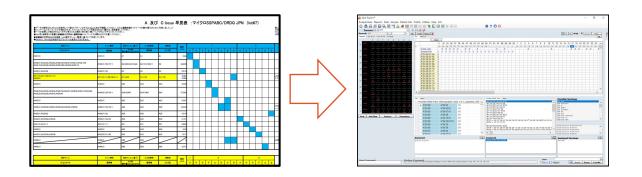
JPN以外の場合:

HLA Fusionで結果を確認(必要に応じてワークシートを併用)



JPNの場合:

早見表で結果を予想した後にHLA Fusionで結果を確認



ワークシート



• 1枚目:各ウェルの増幅するPCR産物のサイズ(bp)

• 2枚目:検出できないアレル

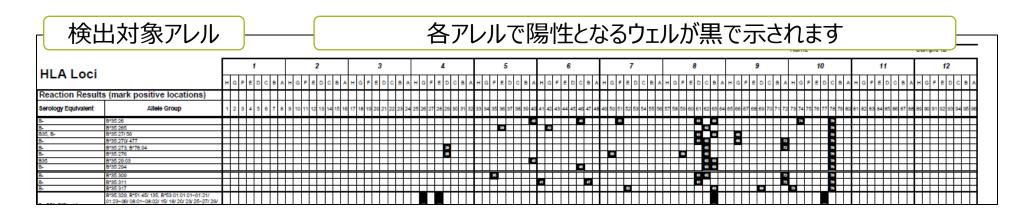
• 3枚目~: 判定シート (バンドパターン)

	Н	G	F	Е	D	С	В	Α	Tray Position
Well#	1	2	3	4	5	6	7	8	
bps	750	200	200	150 - 250	250	200	200	175 - 225	
Well#	9	10	11	12	13	14	15	16	2
bps	200 / 225	75	175	75 / 100	125 / 150	175	100	200	2
Well#	17	18	19	20	21	22	23	24	3
bps	175	200	100	175 / 200	150	175 / 200	350	175	3
	0.5	0.0	27	0.0			0.4	00	

複数の長さの増幅産物が含まれる ウェルは「/」または「-」で示されます

1A: 175 ~ 225 bp

3C: 175 or 200 bp



ワークシートのダウンロード方法



- One Lambdaウェブページからのダウンロード
 - https://www.thermofisher.com/onelambda/wo/en/home.html



JPN早見表-1



• バンドパターンとJSHI推定アレルリストが記載

推定アレルリスト
※JSHI推定アレル表に従った表記と頻度

陽性となるウェル

解析時の注意事項

推定アレル	アレル表記	推定アレルに基づく	HLA型表記					1						2	2			備考
AF≧0.00196	頻度順	HLA型 読み替えAF≧0.001%	頻度順	Н	G	F	Е	D	С	В	Α	Η	G	F	Е	D	С	388.72
A+01:01	A*01:01	A1	A1															
A+02:01,A+02:03,A+02:05,A+02:06,A+02:07,A+02:10,A+02:11,A+02:15N A+02:18,A+02:28,A+02:42,A+02:53N,A+02:59,A+02:72	A*02:01/06/07/+	A2,A203,A210,Null	A2/210/203/+															
A+03:01,A+03:02	A*03:01/02	A3	A3															
A*11:01,A*11:02,A*11:13 A*34:01	A*11:01/11:02/34:01/+	A11,A34	A11/34															2018年度版HLA推定アレル一覧表からA*34:01が追加されたため、ambiguity となります。精査する場合は、他の手法で確認してください。
A+23:01	A*23:01	A23	A23															
A+24:02.A+24:03.A+24:04.A+24:05.A+24:07.A+24:08.A+24:10.A+24:20. A+24:25.A+24:28.A+24:33.A+24:46	A*24:02/20/08/+	A24,A2403	A24/2403															
A+25:01	A*25:01	A25	A25															
A+26:01,A+26:02,A+26:03,A+26:04,A+26:05,A+26:06	A*26:01/03/02/+	A26	A26															
A*29:01,A*29:02	A*29:01/02	A29	A29															
A*30:01,A*30:02,A*30:04	A*30:01/04/02	A30	A30															
A*31:01,A*31:11	A*31:01/11	A31	A31															
A*32:01	A*32:01	A32	A32															
A*33:01,A*33:03,A*33:08	A*33:03/01/08	A33	A33															
A+66:01	A*66:01	A66	A66															HLA推定アレル一覧表に掲載されていませんので、本HLAアレルが考えられる場合は他の手法で確認してください。
A+68:01.A+68:02	A*68:01/02	A68	A68															

JPN早見表-2



• DRB1/DRB345/DQは連鎖の確認もできる

	DRB1				DQB1				DRB3,4,5				9				10		Т			11					13	2	
推定プレル AF≧0.001%	アレル表記領度順	推定アレルに基づく HLA型 読み替え AF≧0.001%	HLA型表記	権定プレルAF≥0.001%	アレル機能頻度順	機定アレルに基づく HLA型 競み替え AF≧0.001%	HLA表記型	推定アレルAF ≧0.001%	アレル表記頻度順	検定アレルに基づく HLA型 読み替え AF≥0.001%	HLA表 記型	С	В	н	G	F E	D	В	A H	G	F	E D	С	ВА	н	G	F E	D	с в а
DRB1*01:01 DRB1*01:02	DRB1*01:01/02	DR1	DR1	DQB1*05:01 DQB1*05:02 DQB1*05:03	DQB1*05:01/03/02	DQ5	DQ5																					\prod	
DRB1*15:01 DRB1*15:02 DRB1*15:04	DRB1*15:02/01/04	DR15	DR15	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	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	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							\prod											
DRB1*04:01				DQB1*03:01	DQB1*03:01	DQ7	DQ7					П		Т					十						П				\Box
DRB1*04:02 DRB1*04:03 DRB1*04:04 DRB1*04:07 DRB1*04:08	DRB1*04:03/01/07/+	DR4	DR4	DQB1*03:02	DQB1*03:02	DQ8	DQ8	DRB4*01:01 DRB4*01:02	PPP-1-01-02-02-02-02-02-02-02-02-02-02-02-02-02-	0.054	DR53																		
DRB1*04:05 DRB1*04:06				DQB1*04:01 DQB1*04:02	DQB1*04:01/02	DQ4	DQ4	DRB4*01:03	DRB4*01:03/02/01	DR53	DRSS																		
DRB1*04:09 DRB1*04:10 DRB1*04:11	DRB1*04:05/06/10/+	DR4	DR4	DQB1*03:02	DQB1*03:02	DQ8	DQ8																						
				DQB1*03:01	DQB1*03:01	DQ7	DQ7																						
DRB1*11:01 DRB1*11:04				DQB1*03:02	DQB1*03:02	DQ8	DQ8																						
DRB1*11:06 DRB1*11:19 DRB1*11:23	DRB1*11:01/04/19/+	DR11	DR11	DQB1*03:03	DQB1*03:03	DQ9	DQ9	DRB3*01:01 DRB3*02:02 DRB3*03:01	DRB3*02:02/03:01/01:01	DR52	DR52																		
DRB1*11:08	DRB1*11:08	DR11	DR11	DQB1*03:01	DQB1*03:01	DQ7	DQ7																						
	I			DOR1#03:01	DOR1#03/01	DO7	DO7												Т										

ワークシート、早見表の使い方



陽性となったウェルのパターンと一致するアレルを見つける

例:3A、3B、3G、4H、7B、7D、7Gが陽性の場合

推定アレル	アレル表記	推定アレルに基づく	HLA型表記	検索型	頻度	2	L	- ,	3	1					4						5						6						7				9	
AF≧0.001%	頻度順	HLA型 読み替えAF≧	頻度順	(HLA型)	(GF%)	ВА	н	G F	E	D (СВ	Α	н	i F	E	ОС	В	АН	G	F	D	С	В	АН	G	F	E C	С	В	Α	н	ì F	Е	D	C E	в	н	G
B*07:02	B*07:02	B7	B7	B7	5.451													Τ						T												I	J	Π
B*07:05	B*07:05	B7	B7	B7	0.016		Ц			Ī								Ī					Ī	Ĭ			Ì			Ì						I		
B*08:01	B*08:01	B8	B8	B8	0.017																			Ī									Ц		Ţ			
B*13:01	B*13:01	B13	B13	B13	1.176																											Г	П			Т		
B*13:02	B*13:02	B13	B13	B13	0.275																																	
B*14:01	B*14:01	B64	B64	B64	0.013																			Т							T				T		\Box	
B*14:02	B*14:02	B65	B65	B65	0.005																																	
B*15:01,B15:07,B*15:12,B*15:26N, B*15:27,B*15:28,B*15:35, B*15:38,	B*15:01/07/27/+	B62,B76,Null,B15	B62/15/Null/+	B62	8.717								ŀ					I						I						\Box								
3*15:02	B*15:02	B/5	B/5	B/5	0.044						•							Ť						Ť						T		T				T	"	
3*15:03	B*15:03	B72	B72	B72	0.001						Į,				T														Π	T	Ī.				I.		Т	

B*07:02

B*15:01/07/27/+



HLA Fusionを使用した解析

HLA Fusionでの解析手順



解析に必要な3つのファイルのインポート

解析の設定

- ①血清型ファイル
- ②カタログファイル
- ③日本人フィルタ
- *年に2回、1月と7月のIMGTの更新時に更新される

検査情報の入力

電気泳動結果の入力

解析結果の確認

血清型ファイル



- IMGT(HLAのデータベース)に登録されている全ての血清型、アレル情報を含む
- ファイル名の例:sero_equivalent_2023July.csv

常に同じ

IMGTのバージョン

- 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る
- 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るため最新のファイルの使用が必須

sero_equivalent_2023July

sero_equivalent_2019July

	А	В	С	D	Е	F	G
1	Official Name	My Name	Serologica	Bw	Local	v2 Format	IMGT/HLA 3.53.0
1325	A*02:07	A0207	A2		1	A*0207	
1326	A*02:07:01		A2		1	A*02:07:0	1
1327	A*02:07:01:01		A2		1	A*02:07:0	1:01
1328	A*02:07:01:02		A2			A*02:07:0	1:02

	Α	В	С	D	Е	F	G	Н
1	Official Name	My Name	Serologica	Bw	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		

カタログファイル



- 各ウェルに含まれるプライマー情報を含む
- 製品、ロットごとに作成される 製品ロット
- ファイル名の例: SSP1A 007 02 cat 製品コード バージョン
- ・血清型ファイルの更新と同時に更新 - 更新時にバージョンの数字が1つずつ上がる

日本人フィルタ



- 日本組織適合性学会(JSHI)発表のHLA 推定アレル一覧表を元に 弊社で作成
 - 推定アレル一覧表に含まれるか否かによって、G1~G3分類される

	HLA 推定アレル一覧	表に含まれるか
	アレル1	アレル2
G1	0	0
G2	0	×
	×	0
G3	×	×

推定アレル一覧表に含まれるアレルは青でハイライト表示

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*02:01:01:03	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*02:01:01:02L	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

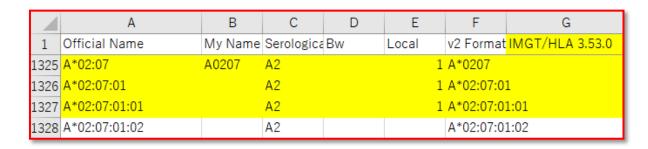
解析ファイルのバージョン



・血清型ファイルと日本人フィルタや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

sero_equivalent_2023July

sero_equivalent_2019July



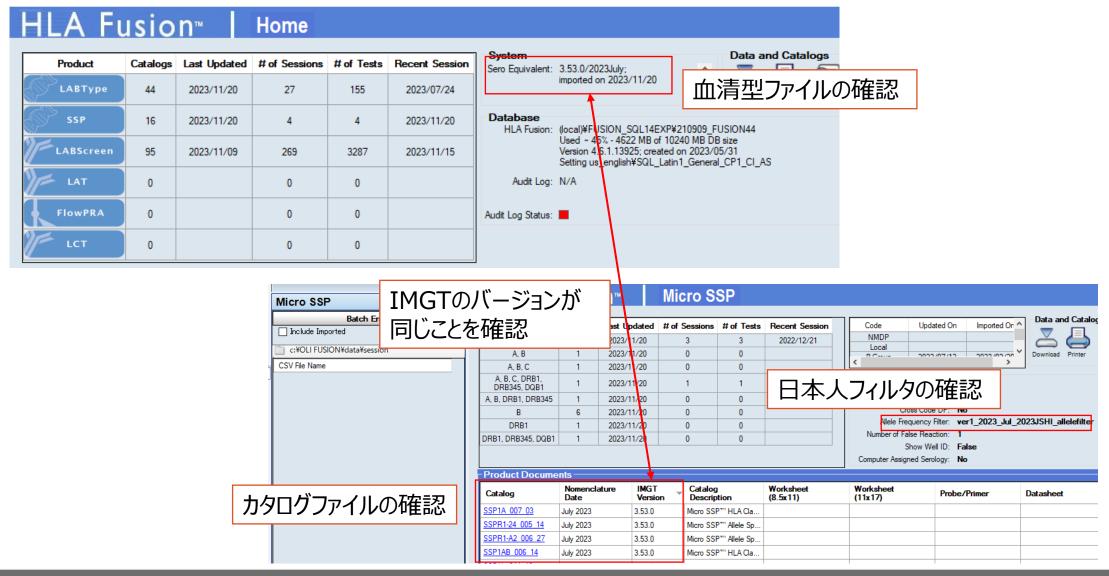
	А	В	С	D	Е	F	G	Н
1	Official Name	My Name	Serologica	Bw	Local	v2 Format	IMGT/HLA	3.37.0
776	A*02:06:28		A2			A*02:06:28		
777	A*02:07	A0207	A2		1	A*0207		
778	A*02:07:01		A2		1	A*02:07:01		
779	A*02:07:02		A2			A*02:07:02		

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_2023July	ver1_2023_Jul_allelefilter	A*02:07:01:01
sero_equivalent_2023July	ver1_2019_July_allelefilter	A*02:07:01:01がG3に表示

必ず最新版の解析ファイルの使用をお願いします

解析ファイルのバージョンの確認方法





解析ファイルのダウンロード方法-1



• 解析に必要な3つのファイルはベリタスのホームページに掲載しております

• 血清型ファイル、日本人フィルタ





解析ファイルのダウンロード方法-2



- カタログファイル
 - 主な製品のみ掲載しております
 - 掲載していない製品は、One Lambdaのホームページより取得をお願いします



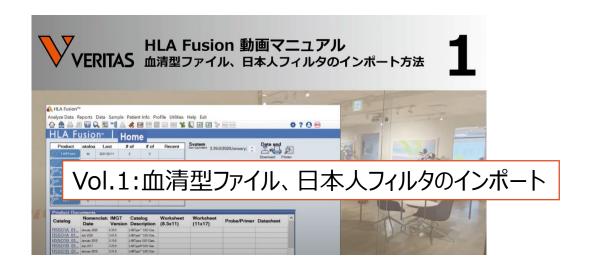


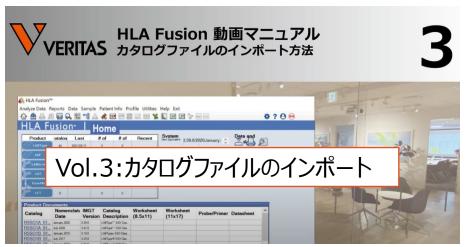
マイクロSSPカタログファイル マイクロSSP ABC/DRDQ JPN マイクロSSP AB/DR マイクロSSP Class 1 Generic Typing kit マイクロSSP Class 2 Generic Typing kit (DRB/DQB)

ファイルのインポート方法



- 解析用ファイルのインポート方法の動画を公開しています
- https://www.veritastk.co.jp/sciencelibrary/learning/hla-videocompilation.html





解析ファイルは年に2回、更新をお願いします

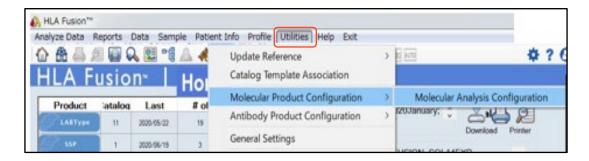
解析の設定



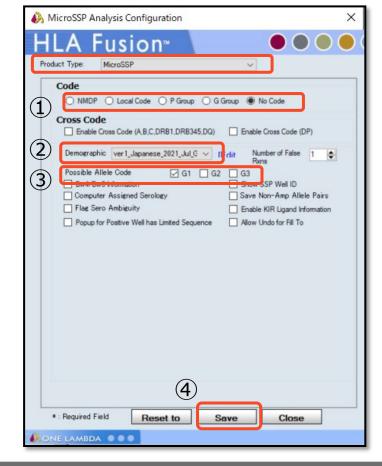
・日本人フィルタはインポート後に解析に使用するための設定が必要

Utilities>Molecular Product Configuration>Molecular Analysis

Configuration

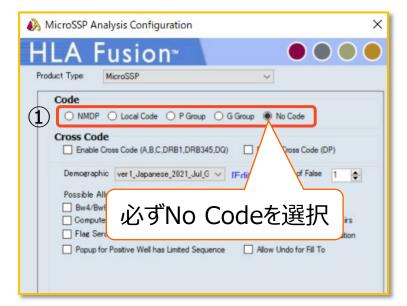


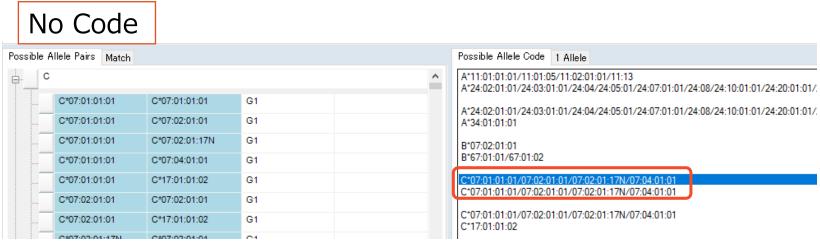
- ①Codeを「No Code」に設定
- ②インポートした日本人フィルタを選択
- ③結果表示するグループを設定 G1のみのチェックを推奨
- 4 Save



結果表示(Nullの表示:QCWSの指摘事項)



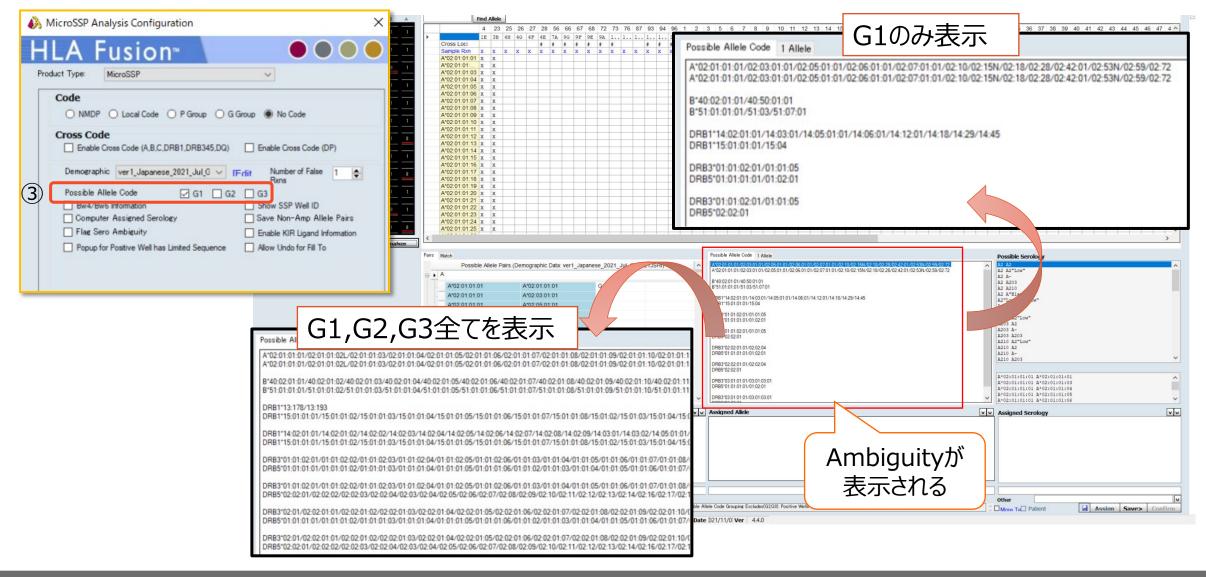




NMDP Code Possible Allele Pairs | Match Possible Allele Code 1 A NMDP Code表示は A*11:XX1 A*24:XX2 A*24:XX2 A*34:01 Nullが表示されない XX1:=:11:01/11:02/11:13 C*07:01:01:01 C*07:01:01:01 G1 XX2:=:24:02/24:03/24:04/2 C*07:02:01:01 C*07:01:01:01 G1 B*07:02 B*67:01 C*07:01:01:01 C*07:02:01:17N G1 C*07:XX5 C*07:XX5 C*07:01:01:01 C*07:04:01:01 G1 C*07:XX5 C*17:01 C*07:01:01:01 C*17:01:01:02 C*07:02:01:01 C*07:02:01:01 G1 DRB1*01:XX7 DRB1*16:XX8 XX7:=:01:01/01:02 C*07:02:01:01 C*17:01:01:02 G1 XX8:=:16:01/16:02

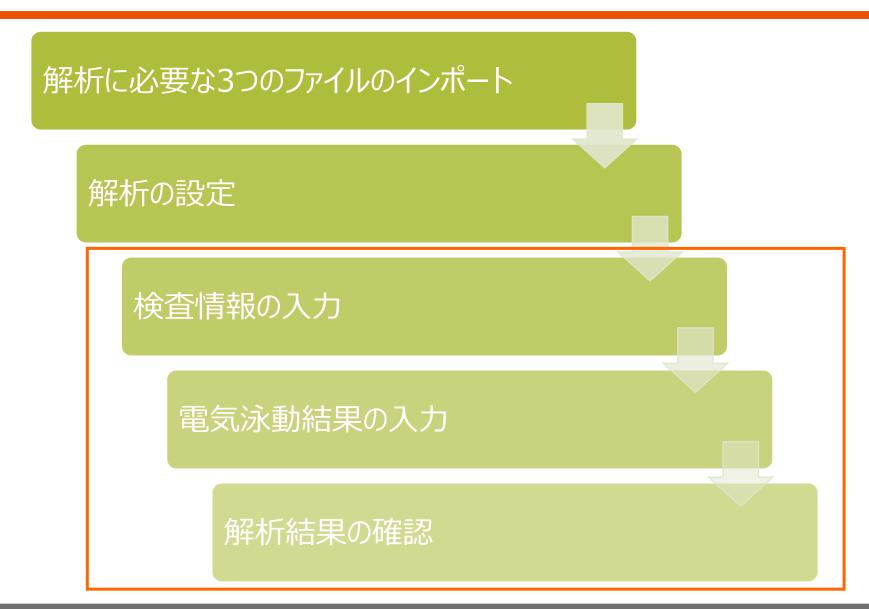
結果表示(Ambiguityの表示)





HLA Fusionでの解析手順

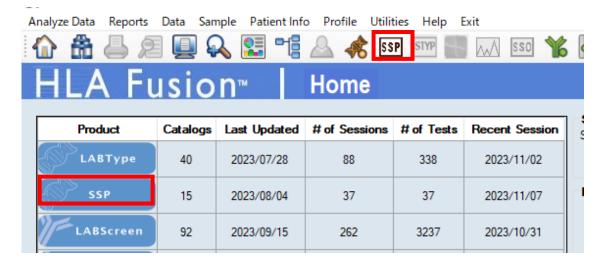




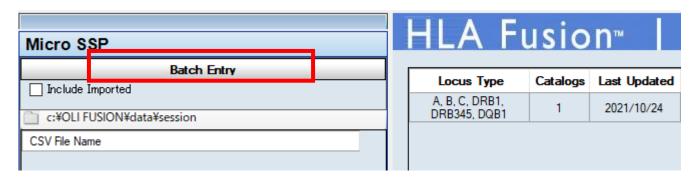
検査情報の入力



• TOP画面からSSPのアイコン(どちらでも可)をクリック

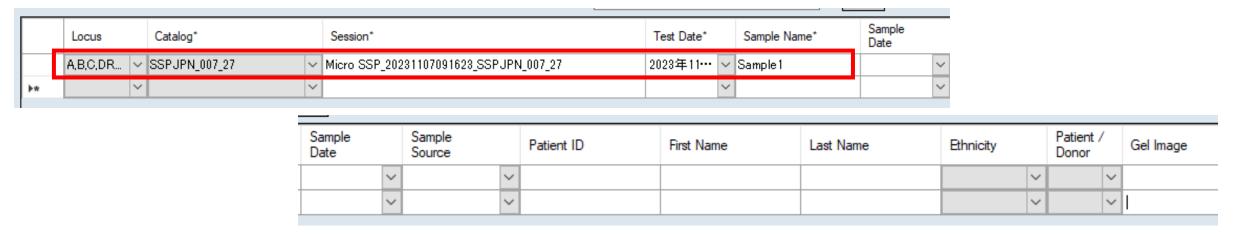


左上の「Batch Entry」のボタンをクリック



検査情報の入力





・赤枠内は必ず入力

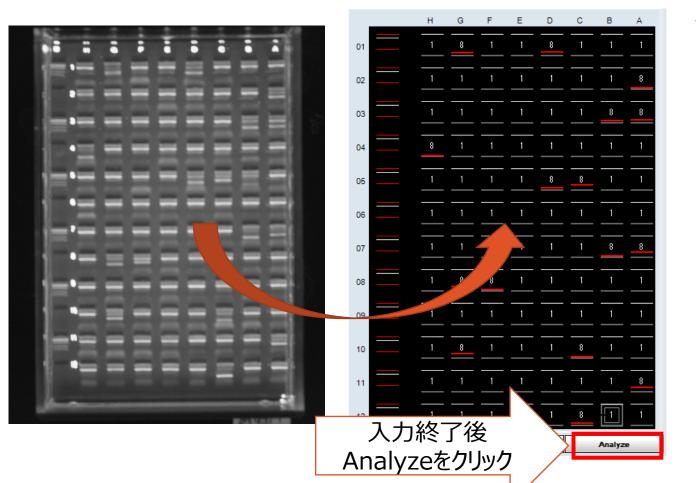
Batch Import New Batch Save Next > Close

- タイピング対象ローカス(プルダウンより選択)
- カタログファイル(プルダウンより選択)
- Session名(自動で入力される、必要に応じて編集)
- Test Date
- Sample Name
- 入力後はNextをクリック

電気泳動結果の入力



• 目視判定の結果を入力(0/1/8)

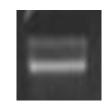


アレル特異的バンドがある(陽性)





コントロールバンドのみ(陰性)





バンドなし (判定不能)





ゲルの目視判定

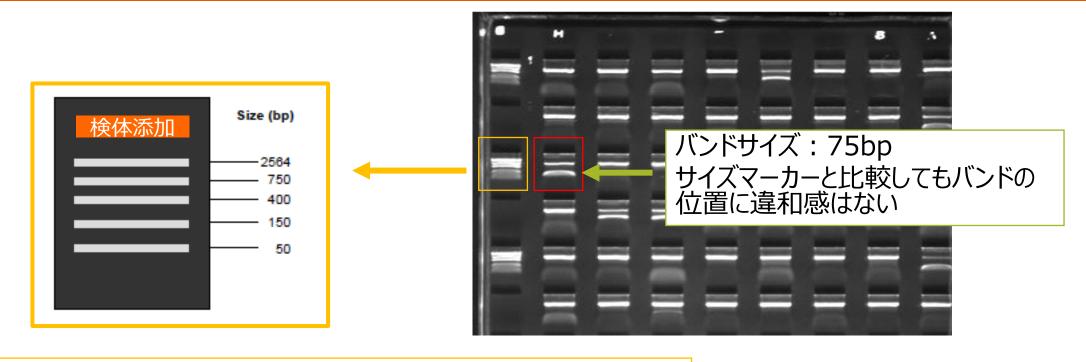


	陽性	陰性	ネガティブ コントロール (水)
コントロールバンド	1本(薄い or 確認できない)	1本 (濃くはっきりしている)	確認できない
アレル特異的バンド	1本 or 複数 濃くはっきりしている	確認できない	確認できない
ゲル画像の例			

ゲルの作製条件、泳動条件、撮影条件に依存します プレート全体(ウェル全体)を見て判定してください

サイズマーカーの活用



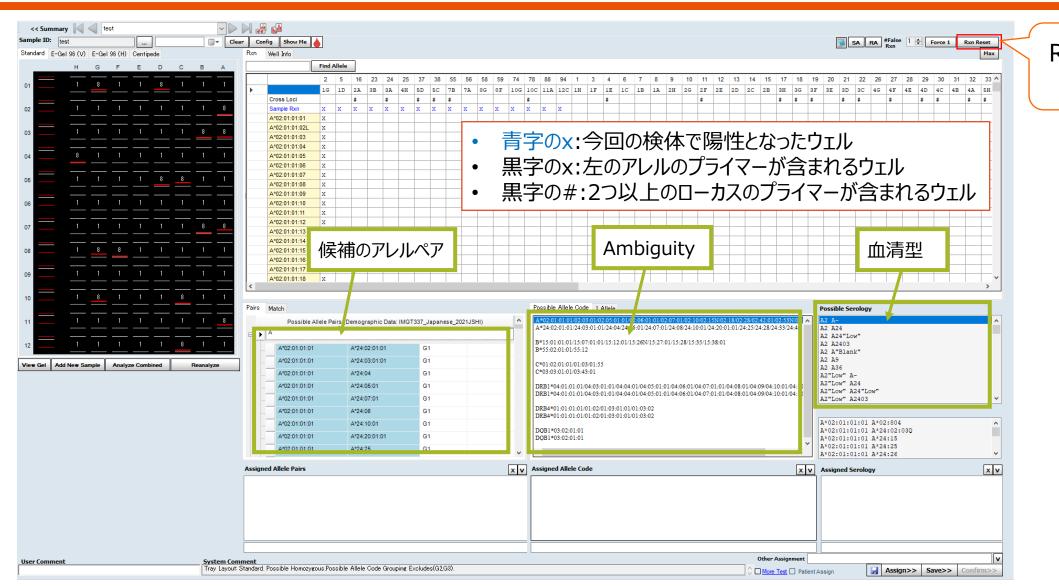


サイズマーカーとは:5種類の大きさのDNAが含まれている試薬 検体のWellのバンドの位置が正しいことを確認する指標になる bpサイズの数字が大きいほどDNAの重さは重い

- →泳動距離は短い
- →バンドが出現する場所は検体を添加した場所に近い

解析結果の確認





Rxn Resetを クリックする

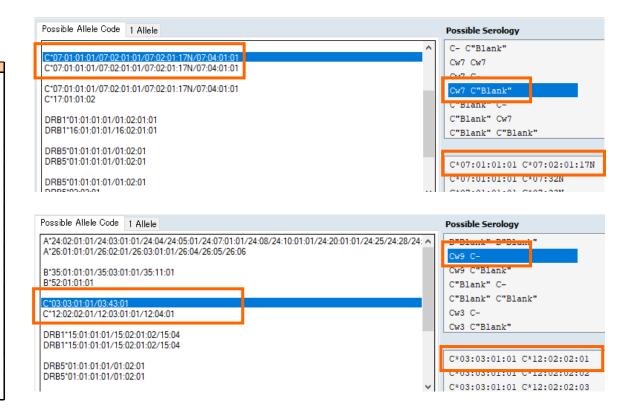
Possible Serologyの表示



- WHOで定義されている抗原名のみ表示
- 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"や"ー"として表示

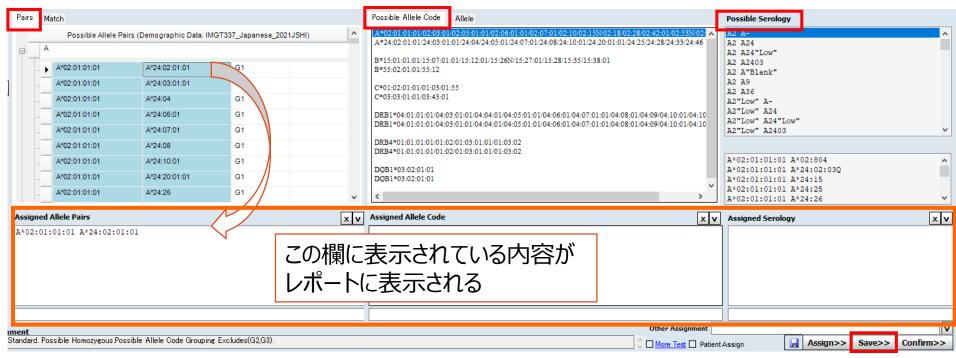
WHOで定義されている抗原

Α		В	С	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)			
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				ĺ	



解析結果の記録

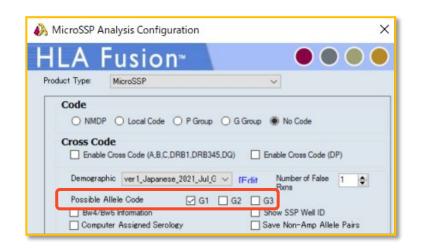




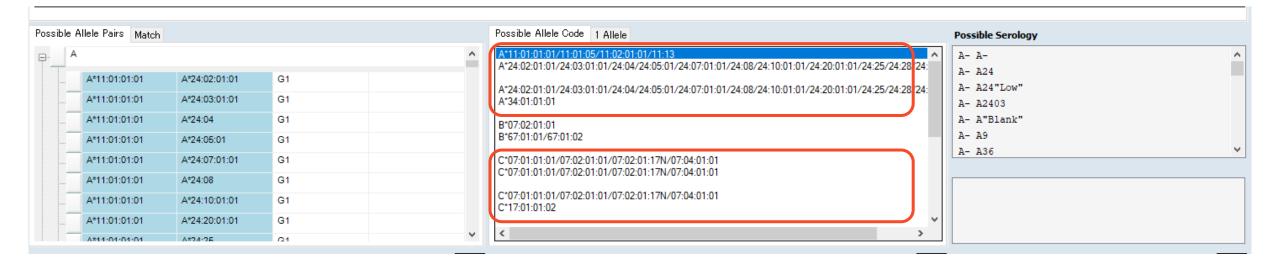
- 各タブよりタイピング結果をダブルクリックし、Assignedの欄に入力されたことを確認
 - Pairsタブ
 - (必要に応じて)Allele Codeタブ、Possible Serologyタブ
- 解析終了後はSaveで保存して終了

血清型のAmbiguity (QCWSの指摘事項)





- ・G1のみ表示に設定
- "Possible Allele Code"の欄に2組のペアが表示される場合は、2桁(血清型)でのAmbiguityが存在
- ・早見表を再度確認し、報告漏れがないように注意

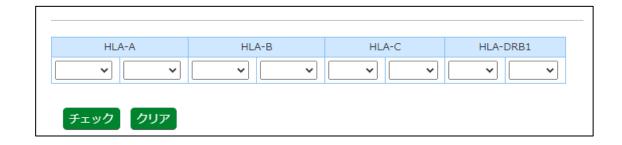


ハプロタイプの確認(日本人の場合)



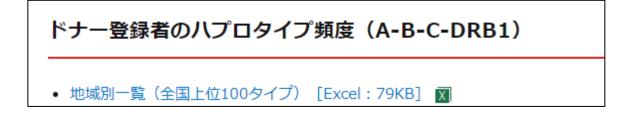
• HLA研究所様のホームページ

https://hla.or.jp/med/haplo_tools/



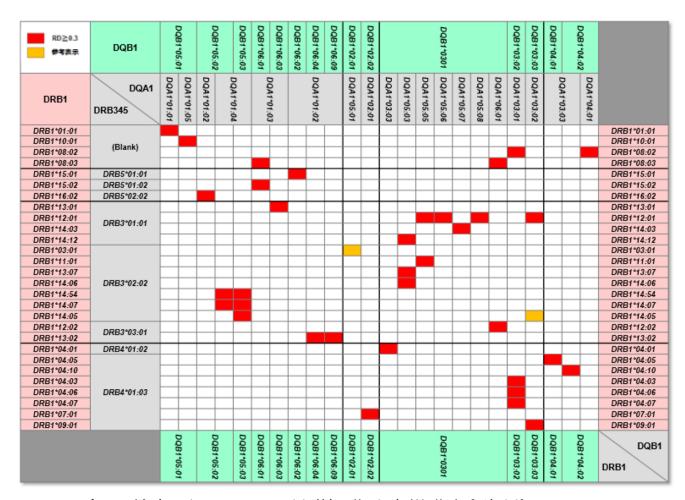
• 造血幹細胞移植情報サービス

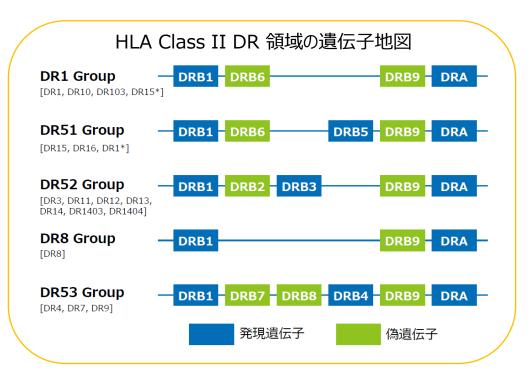
https://www.bs.jrc.or.jp/bmdc/donorregistrant/m2_03_00_statistics.html



DR-DQの連鎖の確認(日本人の場合)







(HLA検査に必要なHLAの基礎知識 中島様講演会資料)

日本人以外の検体のタイピング

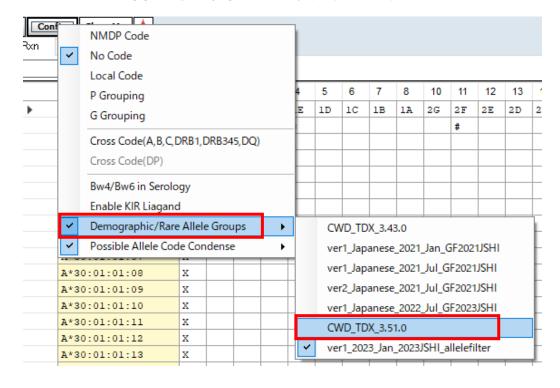


- 海外の方のタイピングを行う場合はCWDフィルタの使用を推奨
 - 血清型ファイルをインポートした際に自動でインポートされる
- CWDとは

- 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

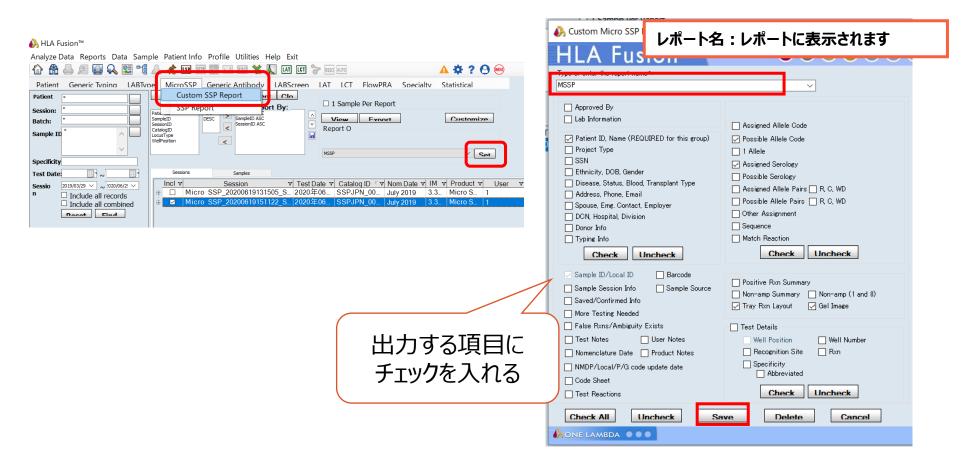
解析結果画面の Configより変更ができる



レポートの作成-1



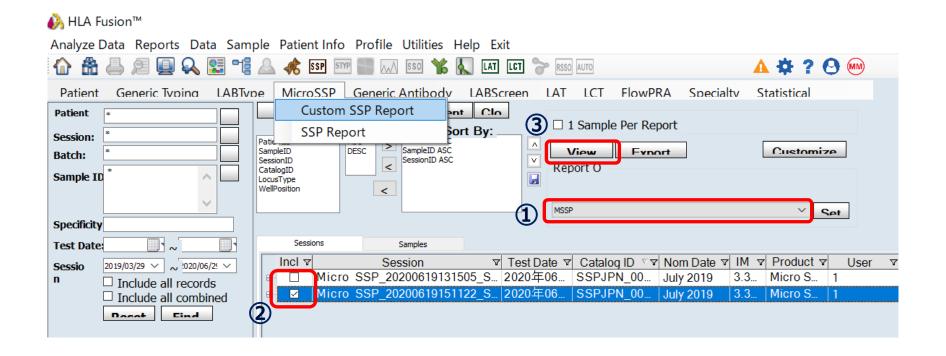
- Reports>MicroSSP>Custom SSP Reports
- 初回のみSetよりレポートの出力内容を設定



レポートの作成-2



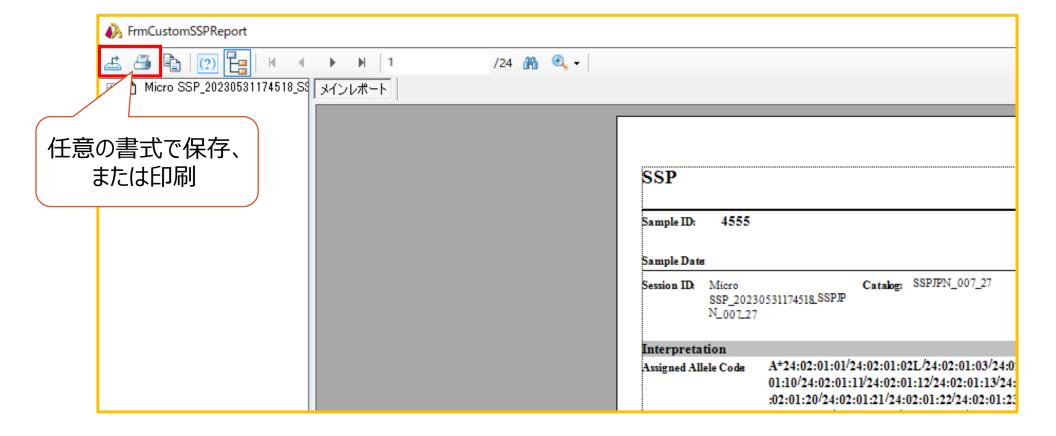
- Reports>MicroSSP>Custom SSP Reports
- レポートを出力する検体にくを入れ、View Reportをクリック



レポートの出力



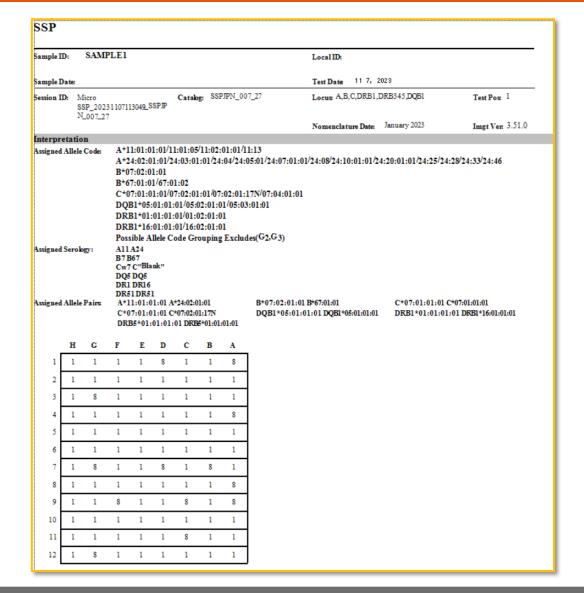
• 印刷または、任意の書式で保存



レポート見本







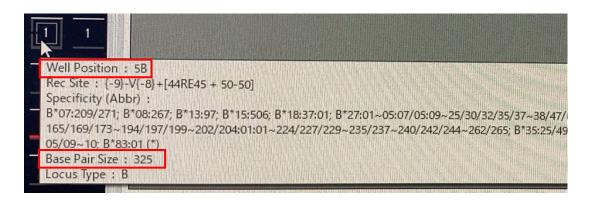


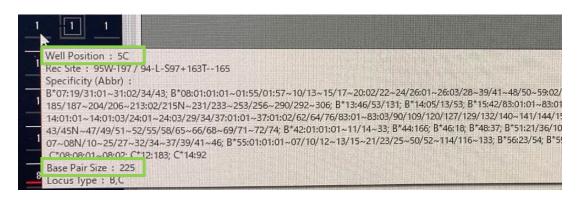
HLA Fusionの機能紹介

バンドサイズの確認

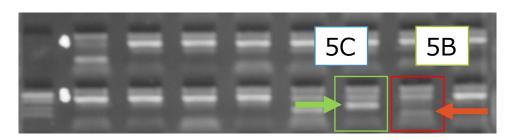


ウェルにカーソルを合わせるとバンドサイズが表示される





・陽性/陰性の判定に迷うウェルがある場合に有用



bpの数字が大きいほどバンドは重い

- →泳動の距離は短い
- →バンドが現れる場所は検体を添加した場所に近い

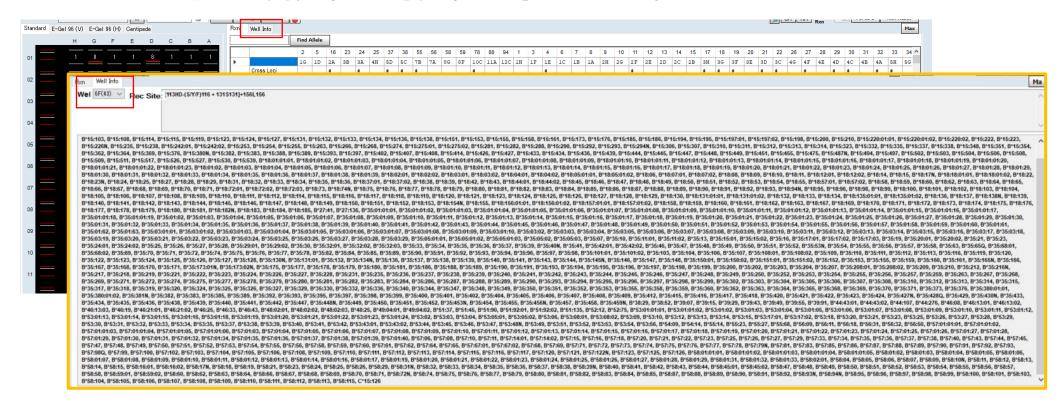
5Bのバンドは陽性バンドか?

- →5Bの方がbpが大きいが、5Cよりも泳動距離が長い
- →陽性バンドではない

プライマー情報の確認



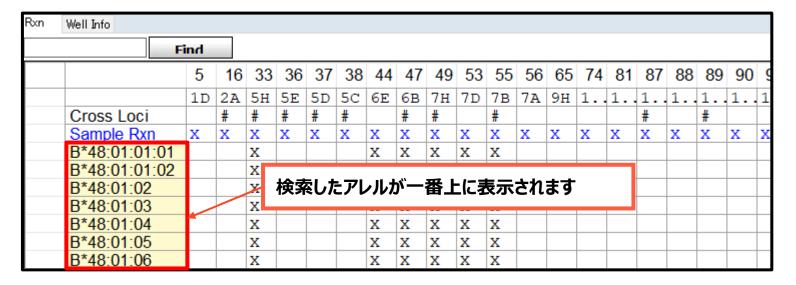
- Well Infoのタブでウェルに含まれるアレル情報が確認できる
 - 6FのウェルにはB7,B15,B18,B35,B39,B44,B51,B52,B53など多くの抗原に対するプライマーが含まれる
 - バンドが薄い場合は偽陽性の可能性を考慮する必要がある



プライマーを含むウェルの検索-1

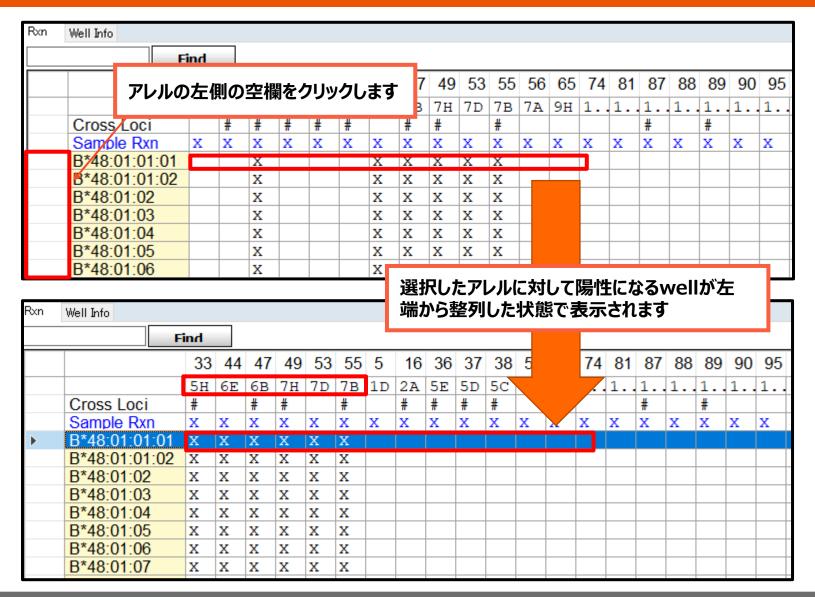






プライマーを含むウェルの検索-2

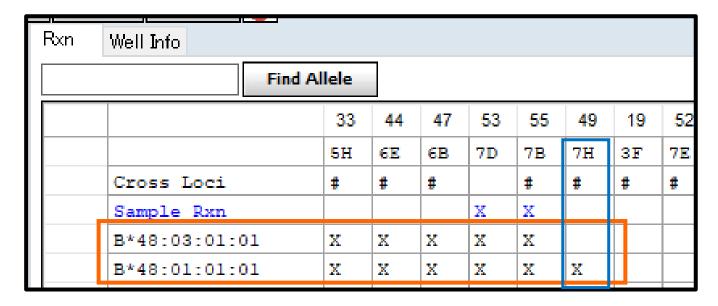




プライマーを含むウェルの検索-3



• Ambiguityの可能性を否定する際に使用



候補のアレルを並列で表示

→7HのウェルはB*48:01は陽性となるが、B*48:03は陰性

→7Hのバンドの有無を確認することでAmbiguityを否定できる

ご清聴ありがとうございました。 ご質問はございますでしょうか?

